Praćenje procesa malignih modifikacija stanica prostate i jetara

Šrajer Gajdošik, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:217:989618

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Martina Šrajer Gajdošik

MONITORING THE PROCESSES OF MALIGNANT MODIFICATIONS OF PROSTATE AND LIVER CELLS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Martina Šrajer Gajdošik

PRAĆENJE PROCESA MALIGNIH MODIFIKACIJA STANICA PROSTATE I JETARA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Đuro Josić

Zagreb, 2014.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Martina Šrajer Gajdošik

MONITORING THE PROCESSES OF MALIGNANT MODIFICATIONS OF PROSTATE AND LIVER CELLS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. dr. sc. Đuro Josić

Zagreb, 2014.

Zahvale

Veliko hvala mojem mentoru prof. dr. sc. Đuri Josiću, neiscrpnom izvoru znanja, što mi je omogućio izradu ove disertacije kao i na ukazanom povjerenju te neizmjernoj pomoći i savjetima tijekom pisanja.

Hvala dr. Davidu Millsu i dr. Douglasu Hixsonu iz Rhode Island Hospital, Providence, RI, SAD, što su me primili u svoj laboratorij i nesebično podjelili sa mnom svoje znanje i vještine.

Hvala Kate Brilliant i Elizabeth Smith na velikoj pomoći pri rješavanju svih nemogućih problema, ali ponajviše na prekrasnom prijateljstvu.

Hvala DonQuin Yang, Helen Callanan i Donni Flanagan na svoj tehničkoj pomoći i prijateljskim savjetima.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Spomenki Kovač što je vjerovala u mene i omogućila mi da budem na pravom mjestu u pravo vrijeme.

Veliko hvala mojim roditeljima, Vesni i Vladi, za svu požrtvovnost i ljubav koju su mi uvijek pružali.

Ovu disertaciju bih posvetila mojim najdražima, suprugu Silviju i kćerkici Evelin. Hvala vam na bezgraničnoj potpori, razumijevanju i ljubavi.

Martina

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XIII**

ABSTRACT ..... **XV**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1. Rak **4**

2.1.1. Karcinogeneza i teorije nastanka tumora *6*

2.2. Rak prostate **8**

2.2.1. Građa i stanična organizacija prostate *8*

2.2.2. Čimbenici rizika *10*

2.2.3. Antigen specifičan za prostatu *11*

2.2.4. Molekularni mehanizmi uključeni u nastanak i progresiju raka prostate *12*

2.2.4.1. Genske promjene uključene u inicijaciju i progresiju raka prostate *13*

2.2.4.2. Signalizacija putem androgenog receptora *14*

2.2.4.3. Proteomički biomarkeri raka prostate *15*

2.3. Hepatocelularni karcinom **17**

2.3.1. Građa i funkcija jetara *17*

2.3.2. Čimbenici rizika *18*

2.3.3. Stanično porijeklo HCK *19*

2.3.4. Putovi signalnog provođenja uključeni u nastanak hepatocelularnog karcinoma *21*

2.3.4.1. Wnt/β-katenin signalni put *22*

2.3.4.2. MAPK signalni put *22*

2.3.4.3. PI3K/AKT/mTOR put *23*

2.3.5. Proteomički biomarkeri HCK *24*

2.4. Ekstracelularne vezikule **25**

2.4.1. Vrste ekstracelularnih vezikula *27*

2.4.2. Ekstracelularne vezikule tumorskih stanica *28*

2.4.3. Proteomička istraživanja EV *29*

2.5. Uloga stanica prirođenih ubojica u tumorskoj imunologiji **30**

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **32**

3.1. Materijali **32**

3.1.1. Kemikalije *32*

3.1.2. Antitijela *33*

3.1.3. Stanične linije i uzgoj stanica in vitro *33*
3.1.3.1. Izolacija i uspostavljanje stanične linije iz epitela prostate štakora *33*
3.1.3.2. PEC stanice *34*
3.1.3.3. DU145 stanice *34*
3.1.3.4. Jetrene stanične linije *35*
3.2. Metode **35**
3.2.1. Rast i selekcija stanica na mekom agaru *35*
3.2.2. Ispitivanje stanične proliferacije MTS testom *36*
3.2.3. Određivanje pokretljivosti stanica *36*
3.2.4. Identifikacija i usporedba različito eksprimiranih signalnih proteina *37*
3.2.5. Priprava staničnih lizata *37*
3.2.6. Indirektna imunofluorescencija *38*
3.2.7. Western blot analiza *38*
3.2.8. Ispitivanje tumorogeničnosti in vivo *39*
3.2.9. Izolacija i transmisijska elektronska mikroskopija EV *39*
3.2.10. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a *40*
3.2.11. Digestija uzoraka u gelu *40*
3.2.12. Masena spektrometrija EV *41*
3.2.13. Izolacija prirodnih stanica ubojica (NK) iz jetara i slezene štakora *42*
3.2.14. Mjerenje citotoksičnosti NK stanica metodom otpuštanja radioaktivnog ^{51}Cr *43*
3.2.15. Statistička obrada podataka *43*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **44**
4.1. Spontana neoplastična transformacija epitelnih stanica prostate štakora i selekcija subpopulacije stanica na mekom agaru **44**
4.1.1. Morfološke promjene epitelnih stanica prostate štakora uslijed kontinuiranog precjepljivanja *45*
4.1.2. Ispitivanje rasta neovisnog o čvrstoj podlozi i detekcija subpopulacije invazivne na mekom agaru *47*
4.1.2.1. Izdvajanje subpopulacije stanica sa sposobnošću prodiranja kroz meki agar *48*
4.1.3. Određivanje i uspoređivanje brzine proliferacije PEC stanica *49*
4.1.4. Ispitivanje pokretljivosti stanica *50*
4.1.5. Promjene u ekspresija kolangiocitnih markera na PEC tijekom transformacije i invazije na mekom agaru *52*
4.1.6. Promjene u ekspresiji signalnih proteina *54*
4.1.6.1. Western blot validacija *60*
4.1.6.2. GO anotacije *63*
4.1.7. Ispitivanje i uspoređivanje tumorogeničnosti PEC stanica in vivo *66*

4.1.8. Izolacija SAI populacije i uspoređivanje tumorogeničnosti ljudske stanične linije raka prostate, DU145 ..... *68*

4.2. Analiza ekstracelularnih vezikula iz transformiranih epitelnih stanica jetara **70**

4.2.1. Morfološka usporedba WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanica *70*

4.2.2. Promjene u ekspresiji signalnih proteina *72*

4.2.2.1. GO anotacije *76*

4.2.3. Morfološke karakteristike EV *80*

4.2.4. Proteomička analiza EV *81*

4.2.5. GO anotacije *87*

4.2.6. Ekspresija Necl-5 i utjecaj EV na citotoksičnost NK stanica *91*

§ 5. ZAKLJUČAK **94**

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **98**

§ 7. LITERATURNI IZVORI **101**

§ 8. DODATAK **118**

§ 9. ŽIVOTOPIS **128**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

PRAĆENJE PROCESA MALIGNIH MODIFIKACIJA STANICA PROSTATE I JETARA

Martina Šrajer Gajdošik

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju
Cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek

Ključni molekularni i stanični mehanizmi koji dovode do pojave i progresije karcinoma prostate i jetara još uvijek su u velikoj mjeri nepoznati. U ovom smo radu pokazali da pri uzastopnom precjepljivanju normalnih stanica epitela prostate štakora (PEC) dolazi do spontane transformacije uslijed koje su PEC visokog pasaža (p>85) stekle sposobnost rasta neovisnog o čvrstoj podlozi i stvaranja tumora nakon injekcije u imunodeficijentne miševe. Mala subpopulacija tih stanica (SAI) imala je sposobnost prolaska kroz meki agar te je pokazivala značajne razlike u morfologiji, proliferaciji, pokretljivosti i ekspresiji signalnih proteina kao i veći tumorogeni potencijal. Ispitali smo također razlike između ekstracelularnih vezikula (EV) koje su otpuštale WB-F334 (WB) stanice epitela jetara sa svojstvima matičnih, GP7TB stanice dobivene kemijskom transformacijom WB, te GP7TB.SAI stanice invazivne na mekom agaru. Osim razlika u broju, veličini i proteomičkom sastavu EV pojedinih linija, uočeno je da su EV GP7TB.SAI stimulirale citotoksičnost stanica prirođenih ubojica (NK) nasuprot onima iz GP7TB unatoč tomu što su ove EV pokazale veću ekspresiju površinskog glikoproteina Necl-5.

(131 stranica, 29 slika, 12 tablica, 197 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ekstracelularne vezikule/epitelne stanice prostate/hepatocelularni karcinom/maligna transformacija/proteomika/tumorogenost.

Mentor: Prof. dr. sc. Đuro Josić, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Boris Mildner, Sveučilište u Zagrebu, PMF
Prof. dr. sc. Đuro Josić, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju
Doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec, Sveučilište u Zagrebu, PMF

Rad prihvaćen: 3. prosinca 2014.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MONITORING THE PROCESSES OF MALIGNANT MODIFICATIONS OF PROSTATE AND LIVER CELLS

Martina Šrajer Gajdošik

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry
Cara Hadrijana 8/A, 31 000 Osijek

The critical molecular and cellular mechanisms involved in the development and progression of prostate and liver cancer remain elusive. In this work we demonstrated that normal rat prostate epithelial cells (PEC) undergo spontaneous transformation at high passage (p>85) evidenced by the acquisition of anchorage independent growth and tumorigenicity when injected into immunodeficient mice. Minor subpopulation of these cells (SAI) had the ability to migrate through soft agar and showed marked differences in cell morphology, proliferation, motility and expression of signaling proteins as well as higher tumorigenic potential. In addition, we examined changes between released extracellular vesicles (EV) from stem-like liver epithelial cell line WB-F344 (WB), their chemically transformed GP7TB and GP7TB.SAI, a soft agar invasive subpopulation. Apart from changes in number, size and proteomic content of EV, we discovered that GP7TB.SAI derived EVs significantly stimulated NK-mediated cytotoxicity opposite to those purified from the GP7TB line, despite their higher expression of Necl-5.

(131 pages, 29 figures, 12 tables, 197 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: extracellular vesicles/prostate epithelial cells/hepatocellular carcinoma/ malignant transformation/proteomics/ tumorigenicity

Supervisor: Prof. Đuro Josić, Ph.D., University of Rijeka, Department of Biotechnology

Reviewers: Asst. Prof. Boris Mildner, Ph.D., University of Zagreb, PMF
Prof. Đuro Josić, Ph.D., University of Rijeka, Department of Biotechnology
Asst. Prof. Jasmina Rokov-Plavec, Ph.D., University of Zagreb, PMF

Thesis accepted: December 3rd, 2014

§ 1. UVOD

Pojam raka obuhvaća veliki broj bolesti s različitim fenotipskim karakteristikama i jednom bitnom zajedničkom osobinom, nekontroliranom proliferacijom stanica koje imaju sposobnost izbjegavanja različitih mehanizama stanične regulacije. Rak je, poslije kardiovaskularnih bolesti, drugi po redu uzročnik smrtnosti kod ljudi. Obično se javlja u starijoj dobi no nerijetko obolijevaju i pripadnici mlađe populacije.[1] U 2012. godini od raka je umrlo 8,2 milijuna ljudi diljem svijeta.[2]

Rak ili karcinom prostate je jedan od najčešćih oblika malignog oboljenja kod muškaraca. Ujedno je i karcinom koji je, nakon raka kože, drugi po redu uzročnik smrtnosti.[3] Procijenjeno je da će jednom od tri muškarca tijekom života biti dijagnosticiran tumor ili predmaligna lezija prostate. U Europi se godišnje dijagnosticira oko 346 000 novih slučajeva s oko 87 000 smrtnih ishoda.[4] Kako je bolest učestalija među starijim muškarcima, očekuje se povećanje postotka oboljelih kako se bude povećavala dobna starost cjelokupne populacije.[3] Unatoč takvim statistikama i predviđanjima, te velikom napretku u istraživanjima u posljednjih deset godina, ključni molekularni i stanični mehanizmi uključeni u razvoj i napredovanje raka prostate i dalje su nejasni i neodređeni. Mnogostrukost genetskih mehanizama i heterogenost tumora prostate otežali su definiranje kritičnih događaja odgovornih za karcinogenezu. U nizu istraživanja predložene su različite molekularne abnormalnosti potencijalno odgovorne za inicijaciju i razvoj ovog tumora.[3,5,6] Među njima su promjene u funkciji i ekspresiji molekula stanične adhezije (E-kadherina, α-, β-, i γ katenina, integrina),[7] povećan stupanj aneoploidnosti,[8] povećana ekspresija onkogena (bcl-2, c-myc)[5,9,10] te mutacije ili utišavanje tumorsupresorskih gena (*p53, PTEN, CDKN1B, CDKN2A*).[6,10] Međutim, do sada nije uspostavljen djelotvoran *in vitro* model za proučavanje karcinoma prostate. Veliki broj različitih staničnih linija, poput PC-3, DU145 i LNCaP potječu od samog karcinoma prostate ili metastaza te kao takve ne daju uvid u promjene koje dovode do transformacije normalnih stanica u maligne.[5,11]

Rak jetara se nalazi među pet najčešćih tumorskih oboljenja u svijetu te rezultira sa gotovo 700 000 smrtnih slučajeva godišnje. Hepatocelularni karcinom, nastao iz zloćudnih hepatocita, predstavlja 90% posto primarnih malignih oboljenja jetara, dok ostalih 10% čini

kolangiokarcinom, maligni tumor epitelnih stanica žučnih kanalića.[12] Upotrebom raznih *in vitro* i *in vivo* modela postignut je veliki napredak u razumijevanju molekularnih mehanizama nastanka karcinoma jetara te je omogućeno otkrivanje mnogih promjena odgovornih za deregulaciju staničnog ciklusa i signalnih putova u tumorskim stanicama.[13,14] Liječenje hepatocelularnog karcinoma obično uključuje kirurško odstranjivanje tumora ili transplantaciju jetara, često u kombinaciji sa zračenjem i kemoterapijom. Petogodišnje preživljavanje je svega oko 14 % što naglašava važnost što boljeg razumijevanja ove bolesti kako bi se moglo pronaći nove i poboljšati postojeće metode liječenja. U tu je svrhu dosada razvijen niz različitih eksperimentalnih modela koji se koriste za istraživanje patogeneze hepatocelularnog karcinoma i testiranje novih lijekova.

Ekstracelularne vezikule (EV) čine novi, tek nedavno priznati, sustav međustanične komunikacije za koji se smatra da ima jednu od ključnih uloga u prijenosu informacija između stanica. EV su mali, membranom obavijeni fragmenti koje otpuštaju gotovo svi tipovi stanica. Sadrže RNA, proteine, lipide i dr. molekule koje su karakteristične za stanicu od koje potječu. Poznato je da stanice otpuštaju povećani broj EV tijekom upala i ozljeda ili kod tumorskih bolesti. Važno je istaknuti da EV utječu na razne biološke procese okolnog tkiva mijenjajući, primjerice, njegovu staničnu signalizaciju, stvaranje citokina te regulaciju imunosnog sustava.[15,16]

Cilj je ovog istraživanja bio razviti model spontane transformacije epitelnih stanica prostate kojim bi se omogućilo praćenje molekularnih i staničnih promjena koje se događaju tijekom maligne modifikacije. Uzastopnim precjepljivanjem stanične linije epitelnih stanica prostate (PEC), uspostavljene iz dorsolateralnog režnja prostate štakora, nastojalo se oponašati umnažanje i selekciju stanica koja se prirodno odvija uslijed ozljede i malignog oboljenja ovog organa. Na taj su način dobivene tri subpopulacije stanica različitog broja precjepljivanja (malog, srednjeg i velikog) kojima su ispitivane i uspoređivane neke od osnovnih karakteristika neoplastičnosti stanica poput brzine proliferacije, pokretljivosti, rasta neovisnog o čvrstoj podlozi te sposobnosti stvaranja tumora *in vivo*. Ispitivanjem sposobnosti rasta na mekom agaru iz PEC stanica visokog broja precjepljivanja izolirana je dodatna subpopulacija stanica koja je imala sposobnost prodiranja kroz meki agar što je karakteristika povezana s visokom metastatičnosti. Stanice u različitim stupnjevima transformacije ispitane su i na proteomičkoj razini s naglaskom na razlike u ekspresiji signalnih proteina.

Osim istraživanja provedenih na epitelnim stanicama prostate dio smo rada usmjerili i na proširivanje spoznaja o staničnim karakteristikama i mehanizmima hepatokarcinogeneze. U tu smo svrhu odabrali poznati model u kojem je iz epitelnih stanica jetara WB-F344 (WB) djelovanjem kemijskih karcinogena dobivena populacija transformiranih GP7TB stanica. Iz tih je stanica, prethodno spomenutom metodom selekcije na mekom agaru, također izolirana subpopulacija koja je imala sposobnost prolaska kroz agar i koja je pokazivala razlike u morfologiji i ekspresiji proteina u odnosu na populaciju iz koje je izdvojena. Tijekom istraživanja uočili smo da sve tri stanične linije otpuštaju membranom obavijene čestice, ekstracelularne vezikule, kakve su prethodno opisane od niza drugih istraživača. Kako bismo što bolje okarakterizirali ovaj model maligne transformacije jetrenih stanica, usporedili smo EV iz ispitivanih staničnih linija na morfološkoj, proteomičkoj i funkcionalnoj razini. Osim toga, ispitana je ekspresija površinskog glikoproteina Necl-5 i provjeren mogući utjecaj EV na citotoksičnost NK stanica.

Ovim se istraživanjem nastojalo proširiti spoznaje o ključnim molekularnim mehanizmima koji dovode do pojave raka prostate i jetara kako bi se omogućila identifikacija i uspostava učinkovitijih metoda detekcije potencijalnih biomarkera, što bi u konačnici pridonijelo i kreiranju novih odgovarajućih terapija.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

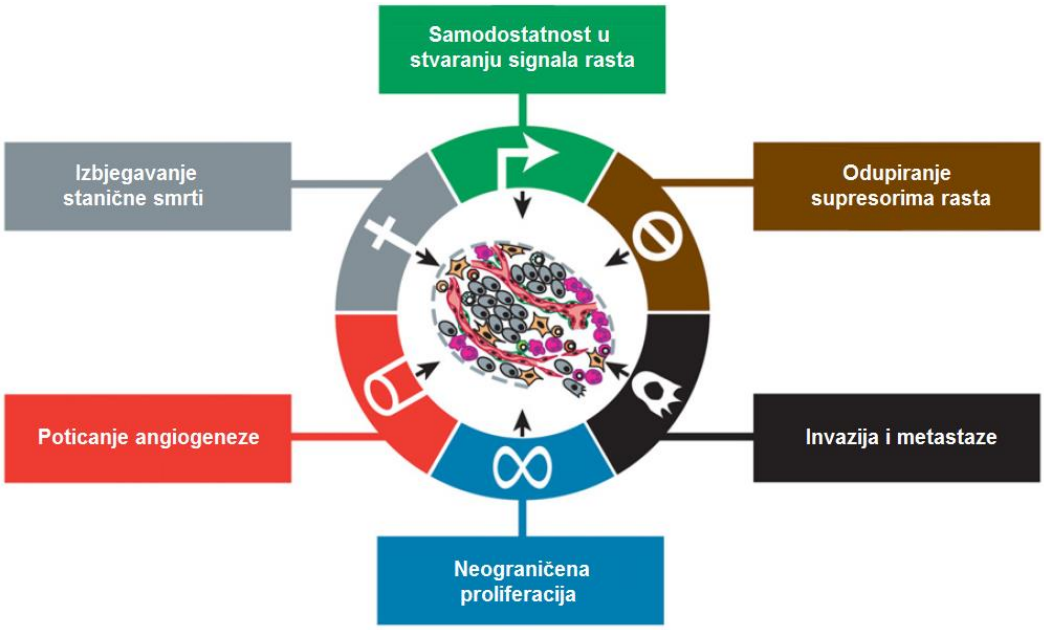
2.1. Rak

Rak je pojam koji se koristi za veliku skupinu bolesti u kojima se abnormalne stanice dijele bez kontrole te imaju sposobnost prodiranja i invazije u druga tkiva. Gubitak kontrole rasta poslijedica je narušavanja niza regulacijskih sustava što rezultira nastankom stanica sa promijenjenim svojstvima u odnosu na normalne stanice.[17]

Tijelo se odraslog čovjeka sastoji od otprilike 10^{15} stanica od kojih mnoge imaju sposobnost dijeljenja i diferencijacije kako bi mogle obnavljati tkiva i organe kojima je to potrebno. Ipak, unatoč ogromnoj proizvodnji novih stanica ljudsko tijelo zadržava konstantnu masu tijekom mnogih desetljeća. To se postiže strogom kontrolom nad umnažanjem stanica djelovanjem složenih i isprepletenih molekularnih mehanizama koji upravljaju staničnom proliferacijom s jedne strane te staničnom smrti, ili apoptozom ukoliko se radi o programiranom događaju, s druge strane. Bilo koji čimbenik koji mijenja tu ravnotežu ima potencijal, ukoliko ga se ne spriječi, promijeniti ukupan broj stanica u određenom organu ili tkivu. Nakon više generacija takvo povećano umnažanje stanica može postati klinički prepoznatljivo kao neoplazija (grč. *neos* - nov, *plasia* - rast) ili tumor (lat. *tumor* - oteklina).[1,17] Prema hipotezi koju je 1976. postavio Nowell većina neoplazmi nastaje iz jedne stanice dok je progresija tumora rezultat genetske varijabilnosti unutar originalnog klona nastala uslijed uzastopne selekcije agresivnijih subkolonova.[18] Nakupine abnormalnih stanica mogu tvoriti benigne ili maligne tumore. Benigni tumori rastu sporo, ograničeni su na određenu lokaciju i vrlo rijetko uzrokuju smrt. Nasuprot tome, maligni su tumori, koji se označavaju i pojmom rak, često smrtonosni jer imaju sposobnost metastaziranja, tj. migracije putem krvi i limfe u udaljene dijelove tijela. Rak se može razviti u bilo kojem organu ili tkivu te se prema tome klasificira na karcinome (tumore epitelnog tkiva organa poput kože, dojki, unutarnjih organa i različitih žlijezda), sarkome (potječu iz mezenhima, to su tumori kosti, hrskavice, mišića i masnog tkiva), leukemije (maligni tumori krvnih stanica i koštane srži) i limfome (tumori limfocita).[17]

Za proces u kojem dolazi do transformacije normalne stanice u malignu potreban je niz mutacija koje nastaju kao posljedica oštećenja genoma. To oštećenje može biti rezultat

endogenih procesa kao što su pogreške u replikaciji DNA, kemijska nestabilnost određenih baza u DNA ili djelovanje slobodnih radikala nastalih metabolizmom stanice. Oštećenja molekula DNA mogu također biti posljedica interakcija s egzogenim čimbenicima tzv. karcinogenima poput ionizirajućeg i UV zračenje te različitih kemijskih spojeva.[1,17-19] Stanice imaju razvijene sustave za otkrivanje i popravak takvih oštećenja, međutim zbog različitih razloga ipak može doći do nastanka trajnih mutacija. Ukoliko inaktivirajuće mutacije nastanu u genima odgovornim za očuvanje genetskog integriteta stvara se genetska nestabilnost koja pogoduje daljnjem procesu maligne transformacije.[20]



Slika 1. Set funkcionalnih karakteristika tzv. „stečenih sposobnosti“ koje dobivaju sve stanice raka tijekom svog razvoja djelovanjem različitih mehanizama (prema Hahn i Weinberg[22])

Hahn i Weinberg[22] su predložili teoriju prema kojoj je rak upravljan nizom genetskih i biokemijskih pravila koja vrijede za većinu, ako ne i za sve, tipove tumorskih oboljenja. Ta pravila, pak, odražavaju djelovanje nekoliko ključnih unutarnjih regulacijskih ciklusa koji se susreću u većini tipova stanica. Iako ti ciklusi nisu još u potpunosti razjašnjeni, dosadašnja eksperimentalna opažanja upućuju na to da gotovo sve stanice raka dijele isti set bioloških karakteristika, odnosno promjena u staničnoj fiziologiji, nazvanih „stečenim sposobnostima“. Te karakteristike uključuju sposobnost stanica raka da: (*i*) stvaraju vlastite mitogene signale,

(*ii*) se odupru egzogenim signalima inhibicije rasta, (*iii*) izbjegnu apoptozu, (*iv*) da neograničeno proliferiraju (tj. postanu besmrtne), (*v*) da potaknu stvaranje krvnih žila (angiogeneza) te (*vi*) da u naprednijim stupnjevima raka, prodiru u druga tkiva (invazija) i metastaziraju (slika 1.). Ove sposobnosti stanice raka obično stječu kroz složene genetske promjene koje se nakupljaju tijekom tumorogeneze, koja ponekad može trajati i nekoliko desetljeća.[22,23]

2.1.1. Karcinogeneza i teorije nastanka tumora

Karcinogeneza je proces pretvorbe normalne stanice u malignu i odvija se u tri stadija: inicijacija, promocija i progresija. U inicijaciji dolazi do ireverzibilne promjene u genima stanice. Za nastanak i razvoj maligne stanice ključna su mutacijska oštećenja koja rezultiraju aktivacijom gena uključenih u stimulaciju proliferacije i preživljavanja stanica tzv. onkogena, te inaktivacijom tzv. tumorsupresorskih gena koji sprječavaju pretjeranu (nekontroliranu) proliferaciju i rast stanica te potiču apoptozu. Fazu promocije karakterizira klonalna ekspanzija početne stanice koja dovodi do abnormalnog rasta i daljnjih mutacija djelovanjem raznih čimbenika. U posljednjoj fazi, progresiji, stanice stječu potpuni maligni fenotip, odvajaju se od primarnog tumora i prodiru i napadaju druga tkiva.[17,21]

Još je u ranim istraživanjima raka postavljena pretpostavka da je tumor složeni skup neprirodnih stanica od kojih svaka potječe od jedne zajedničke stanice pretka čime je opisano klonalno porijeklo raka. Međutim, proces kojim se ta izvorna stanica razvija u heterogeni tumor koji neprestano raste još uvijek je velikim dijelom nerazjašnjen. Klasični tzv. stohastički model karcinogeneze temelji se na postavci da sve tumorske stanice imaju jednak tumorogeni potencijal.[24,25] Maligna transformacija nastaje uslijed nasumičnih mutacija, dok je progresija tumora rezultat kontinuirane selekcije najotpornijih klonova. Prema tom modelu, diferencirana se somatska stanica mora reprogramirati ili „dediferencirati“ kako bi stekla imortalizirana („besmrtna“) svojstva zloćudnog tumora.[25] Kako diferencirana stanica ima ograničen životni vijek i kapacitet proliferacije, kod karcinogeneze je potrebno inducirati ireverzibilnu promjenu koja će joj omogućiti neograničenu proliferaciju i dovoljno dugo preživljavanje kako bi stekla sve potrebne maligne karakteristike.[25]

Poznato je da su fiziološka tkiva hijerarhijski organizirana i građena od različitih staničnih populacija s različitim sposobnostima samoobnavljanja i proliferacije. Na vrhu se stanične hijerarhije nalaze matične stanice. To su nediferencirane i nespecijalizirane stanice koje se

mogu neograničeno dijeliti, samoobnavljati i stvarati progenitorne klonove koji se diferencijacijom specijaliziraju i stvaraju pojedino tkivo. Među ključnim osobinama matičnih stanica su sposobnost mirovanja staničnog ciklusa, asimetrična podjela i multipotentnost.[25,27] U skladu s tim postavljen je drugi, tzv. hijerarhijski, model karcinogeneze koji pretpostavlja postojanje malene populacije stanica unutar tumora koje zadržavaju sposobnost dugotrajne proliferacije i tumorogeni potencijal te su odgovorne za rast tumora i metastaze.[24-27] Te su stanice nazvane tumorskim matičnim stanicama (TMS) ili stanicama koje iniciraju tumor. One imaju, kao i normalne matične stanice, sposobnost samoobnavljanja pri čemu nastaje novi maligni matični klon, ali i klon iz kojeg diferencijacijom nastaju heterogene tumorske stanične linije.[25-28] Pretpostavka da tumorske matične stanice čine osnovu tumora predložena je 1994. godine u istraživanju ljudskih stanica leukemije pri čemu su Lapidot i sur.[29] pokazali da je samo malena populacija tumorskih stanica mogla proliferirati kroz duži period vremena i uzrokovati leukemiju u SCID (eng. *severe combined immune deficient mice*) miševima. Istraživanja su kasnije utvrdila postojanje stanica s karakteristikama matičnih i u tzv. „čvrstim tumorima" kao što su tumor dojke,[30] mozga,[31] prostate,[32] kostiju[33] i pluća.[34]

Iako TMS dijele neke od bitnih karakteristika s normalnim matičnim stanicama do danas nije jasno utvrđeno njihovo porijeklo.[25,26] Prema nedavnim istraživanjima smatra se da ove stanice čine osnovu metastaza i posjeduju sposobnost inicijacije tumora koja je neophodna za uspostavljanje sekundarnih tumora u udaljenim organima. Također, TMS pokazuju i ekspresiju EMT (eng. *epithelial-mesenchymal transition*) markera ključnih za migraciju što ih čini najvjerojatnijim kandidatima za inicijaciju metastaza.[35] Osim toga, istraživanja su pokazala da one mogu posjedovati sposobnost poticanja angiogeneze, izbjegavanja imunosnom nadzoru te da pokazuju povećanu otpornost na lijekove i ionizirajuće zračenje. Slično mnogim odraslim matičnim stanicama, tumorske matične stanice mogu naizmjenično prelaziti iz stanja mirovanja u aktivno stanje u kojem dolazi do brzog prolaska kroz stanični ciklus.[25,35] Pretpostavlja se, da sposobnost zadržavanja u fazi mirovanja može biti jedan od čimbenika koji čini TMS manje podložnim konvencionalnim metodama liječenja koje primarno ciljaju stanice u fazi dijeljenja. U skladu s tom pretpostavkom predloženo je da potencijalna reaktivacija mirujućih TMS može inducirati ponovnu pojavu tumora koja se može dogoditi i nekoliko desetljeća nakon liječenja.[35,36]

2.2. Rak prostate

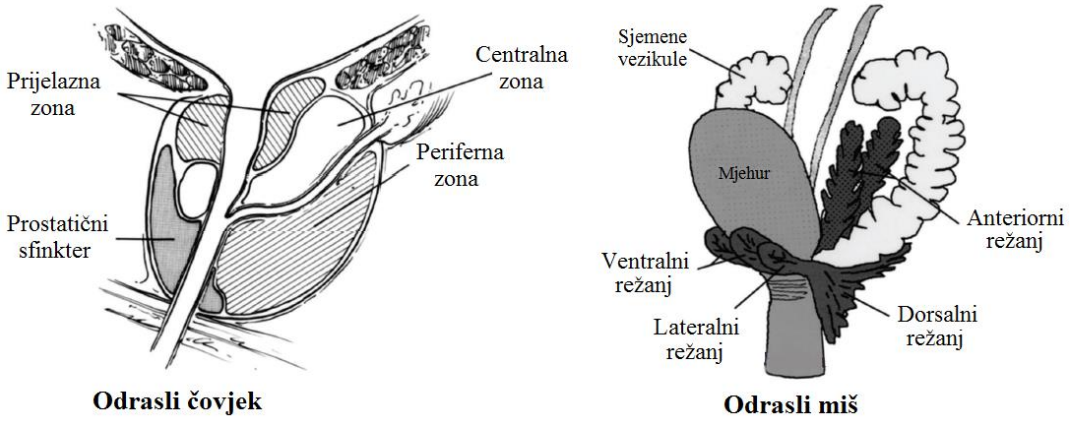
Rak prostate je među najučestalijim malignim oboljenjima muškaraca u zapadnim zemljama. Drugi je po redu uzročnik smrtnosti i čini više od jedne četvrtine dijagnosticiranih malignih oboljenja u muškaraca.[37] Najčešće se javlja u osmom desetljeću, a vrlo je rijedak u muškaraca do 40. godine života. Upravo zbog toga predstavlja velik zdravstvenosocijalni problem u razvijenim zemljama svijeta koje imaju sve stariju populaciju.[3]

Karcinom prostate je kompleksna i heterogena bolest koja je rezultat niza promjena u genetskom materijalu epitelnih stanica. Iako se smatra da tumori nastaju iz jednog klona genetički transformirane stanice, karcinom prostate bi mogao biti iznimka. Istraživanja su pokazala da prostata muškaraca s dijagnosticiranim karcinomom može sadržavati više individualnih neoplastičnih lezija koje imaju različito porijeklo te su međusobno genetički različite.[38,39] Ovaj karcinom relativno sporo napreduje te je od velike važnosti rano otkrivanje bolesti. Klinički lokalizirani rak prostate liječi se kirurškim zahvatom i zračenjem. Međutim, ukoliko se ne otkrije u ranom stadiju, može preći u invazivni oblik praćen metastazama i to najčešće u kosti. Takav je oblik neizlječiv.[40,41]

2.2.1. Građa i stanična organizacija prostate

Prostata je muška spolna žlijezda, kestenastog oblika, smještena ispod mokraćnog mjehura. Okružuje mokraćnu cijev, a osnovna funkcija je stvaranje sjemene tekućine. Prostata se čovjeka sastoji od dva režnja (lobula), lijevog i desnog, te jednog suženja.[42] Prema McNeilu[43] razlikuju se tri morfološki različite zone prostate: periferna, prijelazna i centralna zona (slika 2.). Benigna hiperplazija prostate je nemaligno povećanje prostate i javlja se najvećim djelom u prijelaznoj zoni dok većina karcinoma prostate (oko 70%) nastaje u perifernoj zoni koja čini 70-80% cijele žlijezde.[44]

Za razliku od ljudske prostate, prostata se glodavaca sastoji od četiri različita režnja: anteriornog (koji se još naziva i koagulirajuća žlijezda), ventralnog te dorsalnog i lateralnog (često se zajedno nazivaju dorsolateralni) (slika 2.). Ne postoji jasna analogija između anatomije prostate glodavaca i čovjeka, međutim dorsolateralni režanj glodavaca opisan je kao najsličniji perifernoj zoni ljudske prostate.[11,44]



Slika 2. Ilustrirani prikaz anatomije prostate čovjeka i miša (prema Abate-Shen i Shen[43])

Prostata se sastoji od žljezdanog epitela i fibromuskularne strome. Epitel prostate čini kompleksnu mrežu kanalića i sačinjavaju ga tri različita tipa stanica: sekrecijske luminalne, bazalne i neuroendokrine stanice.[44,45] Luminalne stanice su visoke i cilindričnog oblika. Ovisne su o androgenim hormonima koji su neophodni za njihovo preživljavanje te luče antigen specifičan za prostatu (PSA, engl. *prostate specific antigen*) i prostatičnu kiselu fosfatazu (PAP). Fenotip im je karakteriziran ekspresijom citokeratina (CK) male molekulske mase, CK8 i CK18, androgenog receptora (AR) i PSA.[44-47] Bazalne su stanice sploštene i leže uz bazalnu membranu žljezdanog epitela. Većina bazalnih stanica ne sadrži androgene receptore (AR) i ne stvaraju sekrecijske proteine. Karakterizira ih ekspresija citokeratina velike molekulske mase, CK5 i CK14 te p63, CD44 i integrina $\alpha 2\beta 1$.[46-49] Pretpostavlja se da bazalne stanice imaju sposobnost samoobnavljajućih matičnih stanica i da mogu diferencirati u luminalne stanice. U skladu s tom pretpostavkom, bazalne stanice pokazuju ekspresiju faktora koji štite DNA od oštećenja kao što su glutation-S-transferaza-π, koja djeluje na uklanjanje slobodnih radikala, te pro-apoptotični Bcl-2 protein.[50] Neuroendokrine stanice su raspršene među bazalnim stanicama. Neovisne su o androgenima i luče različite peptide. Njihova uloga nije razjašnjena, ali se vjeruje da sudjeluju u rastu i diferencijaciji prostate u razvoju, a povezane su i s procesom karcinogeneze.[45,51]

2.2.2. Čimbenici rizika

Čimbenici rizika povezani s rakom prostate su različiti i obuhvaćaju genetske i okolišne utjecaje. Do sada su jasno potvrđena tri rizična faktora: dob, rasa i karcinom prostate u obitelji. Ipak, prema novijim saznanjima ulogu u njegovu nastanku može imati i prehrana te određene lezije prostate poput prostatične intraepitelne neoplazije (PIN).[3,40,41] PIN je najraniji opće prihvaćeni stadij u razvoju karcinoma prostate koji s razvijenim karcinomom ujedno dijeli i neke fenotipske, biokemijske i genetske promjene.[41]

Najvažniji rizični faktor za nastanak karcinoma prostate je dob. Gotovo 85% oboljelih su stariji od 65 godina. Na staničnoj se razini ovaj karcinom javlja u znatno ranijoj dobi međutim klinički vidljiv oblik izrazito je rijedak u muškaraca mlađih od 40 godina pa se u većini slučajeva dijagnosticira u sedamdesetim i osamdesetim godinama života.[40,51]

Pojava karcinoma prostate veća je u muškaraca koji imaju rođake s dijagnosticiranom bolesti. Rizik obolijevanja može biti dvostruk ukoliko je bolest zabilježena kod rodbine prvog koljena, a u slučaju da je u prvom koljenu bolesno dvoje ili više rođaka rizik je 5 do 11 puta veći. Danas se smatra da oko 9% oboljelih ima nasljednu bolest.[52] To su u pravilu osobe u kojih se tumor dijagnosticira u ranijoj dobi, prije 55 godina.[2,52] Iako do sada nije potvrđen gen izravno povezan s nasljednom skolonošću razvoja raka prostate prema nekim istraživanjima *RNaseL* i *ELAC2* su dva potencijalna kandidata.[40,41] Funkcija *ELAC2* nije još jasno definirana dok *RNaseL* sudjeluje u regulaciji stanične proliferacije i apoptoze te odgovoru stanice domaćina na viruse.[53]

Pripadnici crne rase imaju gotovo dva puta veću stopu obolijevanja od raka prostate. Uzroci tomu nisu još razjašnjeni, no smatra se da je jedan o mogućih razloga genetski polimorfizam u sintezi i metabolizmu androgenih hormona. Domena za aktivaciju transkripcije androgenih receptora (AR) sadrži polimorfnu N-terminalnu regiju na eksonu 1 koja sadrži niz ponavljanja od tri nukleotida, CAG, koji kodiraju aminokiselinu glutamin. Duljina tog ponavljajućeg niza je inverzna s transkripcijskom aktivnosti AR-a. Pokazano je da muški pripadnici crne rase češće imaju kraći CAG niz u odnosu na pripadnike bijele rase.[54,55]

Stopa oboljelih od karcinoma prostate razlikuje se u određenim geografskim područjima, visoka je u SAD-u i Europi, dok je znatno niža u Aziji i Japanu.[2] Migracijska su istraživanja pokazala da se Japancima doseljenim iz zone niske incidencije u SAD znatno

povećala rizičnost obolijevanja od raka prostate.[40] To se pokušava objasniti okolišnim faktorima, koji do danas nisu jasno definirani.

Značajne razlike u prehrambenim navikama populacija Azije i zapadnih zemalja vjerojatno pridonose velikim razlikama u odnosu na rizik od karcinoma prostate. Prema podacima većih istraživanja povećani unos crvenog mesa, životinjskih masti, te ukupno uvećan unos masnoća znatno povećava rizik za nastanak karcinoma.[56] S druge strane se smatra da povećani unos likopena, karotenoida iz rajčice, može smanjiti rizik od nastanka ove bolesti.[57] Također se navodi da selen, vitamin E, soja i vitamin D mogu smanjiti rizik.[41,56]

2.2.3. Antigen specifičan za prostatu

U posljednjih 30 godina primijećen je gotovo dvostruki broj muškaraca kojima je dijagnosticiran rak prostate. Jedan od uzroka tog povećanja je i uvođenje PSA kao markera za ranu detekciju raka prostate. PSA je glikoprotein građen od 240 aminokiselina molekulske mase 33 000 Da. Po svojoj funkciji je enzim, serinska proteaza. Stvara se u epitelnim stanicama prostate koje ga luče u sjemenu plazmu te sudjeluje u likvefakciji sperme. U fiziološkim se uvjetima u serumu zdravih muškaraca nalazi vrlo niska koncentracija PSA koji je porijeklom iz prostate. Veće količine ovog glikoproteina dospijevaju u serum samo ukoliko je narušena arhitektura tkiva što dovodi do njegovog prijelaza u izvanstanični prostor pri čemu postaje pokazatelj traume ili oboljenja prostate.[40,58]

Vrijednost PSA u serumu ispod 4 ng mL^{-1} smatra se normalnom. Međutim, oko 20% bolesnika sa rakom prostate ima vrijednost PSA manju od 4 ng/ml dok se kod značajnog postotka osoba s PSA vrijednostima 4–10 ng mL^{-1} karcinom neće razviti.[59] Njegove vrijednosti mogu biti povišene i kod većih, benignih prostata, u starijoj dobi bolesnika, u slučajevima upala ili nakon pregleda prostate. Kako je PSA nedovoljno specifičan, značajan broj bolesnika podvrgava se nepotrebnim biopsijama.[58] Radi postizanja veće specifičnosti određivanja karcinoma razvijeni su različiti PSA-bazirani markeri poput gustoće PSA prijelazne zone te udjela slobodnog i ukupnog PSA.[54]

2.2.4. Molekularni mehanizmi uključeni u nastanak i progresiju raka prostate

Tijekom posljednjeg desetljeća, niz molekularnih istraživanja nastojalo je otkriti mehanizme uključene u nastanak i progresiju raka prostate. Identifikacija i karakterizacija gena povezanih s naslijednom sklonošću te gena sa somatskim mutacijama u stanicama raka prostate upućuje na to da infekcija ili upala pridonosi nastanku raka prostate. Smatra se da je proliferativna upalna atrofija (PIA), prekursor već spomenute prostatične intraepitelne neoplazije (PIN-a). Novija su istraživanja pokazala da PIA i PIN pokazuju više genskih promjena prisutnih u raku prostate te se kao i rak javljaju najvećim djelom u perifernoj zoni prostate.[40,41,44] Prema jednom od predloženih modela nastanka i progresije raka prostate normalni epitel prostate, kroz niz morfoloških i genetskih promjena, prelazi u lezije karakteristične za PIA-u i PIN iz kojih se daljnjim promjenama razvija rak koji može preći u invazivni oblik. Kod stanica primarnog i invazivnog tumora može doći do gubitka ovisnosti o androgenima.[41,44]

Prepreku u istraživanju ključnih molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka raka prostate čine poteškoće pri uspostavljanju učinkovitog *in vitro* modela.[11,60] Iako je nekoliko istraživanja pokazalo da se epitelne stanice mogu izolirati iz prostate odraslog čovjeka i štakora te se stanice mogu u kulturi održati vrlo kratak period pa se većina *in vitro* istraživanja vrši na staničnim linijama izvedenim iz raka prostate kao što su DU145, PC3 i LNCaP. Iako su značajno pridonijele trenutnim spoznajama o karcinomu prostate ove stanične linije nisu dobar model za proučavanje tijeka karcinogeneze.[11] Imortalizacija se također nije pokazala kao idealno rješenje jer može dovesti do „lažnog“ stjecanja malignih karakteristika.[60] Halpert i sur.[61] su opisali razvoj kulture epitelnih stanica iz prostate štakora (PEC) uspostavljene bez prethodne imortalizacije i tretiranja karcinogenima. Indirektnom imunofluorescencijom potvrđeno je da te PEC stanice pokazuju antigenski fenotip vrlo sličan onom *in situ* na normalnim odraslim epitelnim stanicama prostate. Tako su PEC bile pozitivne na CK14 i CK19, koji su eksprimirani specifično na bazalnim stanicama epitela prostate, te na PSA. Osim toga ova je kultura bila pozitivna i na uobičajene epitelne markere poput E-kadherina i dezmoplakina 1.[61] Nedavno su Mills i sur.[62] pokazali da PEC stanice također eksprimiraju BD.1 kolangiocitni marker te da se njegova ekspresija mijenja s brojem precjepljivanja. LC-ESI-MS/MS metodom je otkriveno da je taj antigen identičan elongacijskom inicijacijskom faktoru 3 (eIF3a).[62]

Uspostavljanje dugotrajne kulture PEC omogućuje praćenje prirodne progresije tih stanica s vremenom te kako je pokazano u ovom radu pridonosi boljem razumijevanju staničnih i molekularnih mehanizama u procesu karcinogeneze prostate.

2.2.4.1. Genske promjene uključene u inicijaciju i progresiju raka prostate

Razvoj raka prostate je složen proces u koji je uključen niz genetskih promjena. Među njima su pomjene na kromosomima 8, 10, 13, 16 i 17 pri čemu je gubitak heterozigotnosti na kromosomu 8p jedan od najranijih događaja.[63] Pretpostavlja se da taj dio kodira *NKX3.1* gen koji je neophodan za normalan razvoj prostate.[28,44,47] Nekoliko je skupina pokazalo da su miševi s *NKX3.1* mutacijom razvili lezije prostate slične onima koji se javljaju kod PIN-a. Unatoč nepotpunim saznanjima, *NKX3.1* najvjerojatnije predstavlja regulacijski gen čiji je gubitak uključen u inicijaciju nastanka raka prostate.[41,63]

Promjene *GSTP1* gena koji kodira detoksificirajući enzim glutation S-transferazu π, jedne su od najčešćih do sada opaženiha promjena kod raka prostate. Utišavanje ekspresije *GSTP1* gena hipermetilacijom promotorske regije (CpG otoka) otkriveno je u 90-95% karcinoma prostate, 70% PIN lezija i 6% PIA, što upućuje na njegovu ulogu u ranoj karcinogenezi.[64]

Gen homologan fosfatazi i tenzinu (*PTEN*) je tumorsupresorski gen lociran u 10q23 regiji u kojoj su vrlo često vidljive delecije kod raka prostate. *PTEN* kodira lipidnu fosfatazu čiji je glavni supstrat fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3).[6,44] Wu i sur. [65] su pokazali da inaktivacija *PTEN*-a u staničnim linijama karcinoma prostate uzrokuje kontinuiranu aktivaciju PI3K/Akt signalnog puta uslijed povećane akumulacije PIP3. Kao poslijedica dolazi do sprječavanja apoptoze. *PTEN* je također povezan i sa neprirodnom proliferacijom.[66] Promjene na ovom genu su najčešće u naprednom stadiju i povezane su sa stjecanjem metastatskog potencijala. Međutim, u nekoliko istraživanja, imunohistokemijskim su metodama zabilježene smanjene ekspresije *PTEN*-a i u primarnim tumorima, što upućuje na to da njegov gubitak može biti jedan od ključnih događaja u karcinogenezi prostate.[6,31,47]

Dva važna regulatora apoptoze, *p53* i *Bcl-2*, su vrlo često mutirani u velikom broju različitih karcinoma uključujući i karcinom prostate. Ti proteini pokazuju promjenjenu ekspresiju i abnormalnu funkciju kako ovaj karcinom napreduje te su uključeni u stjecanje neovisnosti o androgenima.[6,41,63] Protein p53 je ključni regulator staničnog ciklusa i kontrolira prijelaz iz G1 u S fazu. Uslijed oštećenja DNA p53 može ili inducirati apoptozu ili izazvati zaustavljanje staničnog ciklusa radi njenog popravka. Mutacije *p53* gena su rijetke kod

lokaliziranog karcinoma prostate, međutim, vrlo su česte kod uznapredovanog, metastatskog oblika. Mutirani p53 se nakuplja u jezgri te je obično pokazatelj lošeg ishoda.[63] Povećana ekspresija anti-apoptotičnog Bcl-2 proteina, u stanicama raka prostate obilježje je uznapredovale bolesti neovisne o androgenima. Tu i sur.[67] su pokazali da povećana ekspresija Bcl-2 kod staničnih linija raka prostate ima ulogu u povećanoj otpornosti na kemoterapiju.

U normalnim epitelnim stanicama prostate relativno spora brzina rasta stanica u ravnoteži je s isto tako sporijom brzinom apoptoze. Nasuprot tome, PIN i rak prostate karakterizira gotovo deset puta veća brzina proliferacije, dok je brzina apoptoze kod invazivnog raka do 60% manja.[44] Genske nepravilnosti u kontroli prijelaza iz G1 u S1 fazu tijekom staničnog ciklusa prisutne su u svim oblicima raka. Retinoblastomski protein (Rb), u svojem fosforiliranom obliku, onemogućava podjelu stanica sprječavajući prolazak iz G1 u S1 fazu. Mutacije *Rb* gena i gubitak ekspresije Rb proteina opažene su u klinički lokaliziranim kao i u uznapredovalim stadijima raka prostate.[44] Ujedno, Rb je uključen u regulaciju apoptoze stanica prostate, posebice uslijed djelovanja androgena.[68]

Među proteinima za regulaciju staničnog ciklusa u stanicama raka prostate prevladava gubitak funkcije p27 proteina, inhibitora ciklin ovisnih protein-kinaza. Gubitak njegove aktivnosti karakterističan je za mnoge karcinome, uključujući rak dojke i debelog crijeva.[44] Međutim, smatra se da inaktivacija nije posljedica mutacije *p27* gena već gubitka ekspresije ili promjene substanične lokalizacije p27 proteina uslijed narušavanja normalne fosforilacije proteina.[69] Nekoliko je istraživanja ukazalo da je povećana ekspresija ovog proteina povezana sa naprednijim stadijem raka i lošijom prognozom.[70]

2.2.4.2. Signalizacija putem androgenog receptora

Androgeni hormoni su neophodni za normalni razvoj i funkciju prostate. Njihovo djelovanje posredovano je preko androgenog receptora (AR), hormonski aktiviranog transkripcijskog faktora. Neaktivni AR nalazi se u citoplazmi i vezan je za šaperone poput proteina toplinskog šoka 90 (Hsp90, engl. *Heat shock protein* 90).[71] Glavni cirkulirajući androgen je testosteron koji se u prostati djelovanjem enzima 5α-reduktaze prevodi u dihidrotestosteron (DHT). Vezanje DHT-a na AR uzrokuje promjenu konformacije receptora, dimerizaciju i njegovu translokaciju u jezgru gdje se veže na DNA te sudjeluje u regulaciji transkripcije.[55]

Signalizacija putem androgenog receptora ključna je za rast i funkciju tumorskih stanica prostate.[71] Zbog toga je jedan od prvih postupaka u liječenju raka prostate ablacija androgena

upotrebom lijekova ili kirurškim uklanjanjem tkiva testisa, koja uzrokuje apoptozu hormonski ovisnih tumorskih stanica. Međutim, takav postupak ne eliminira tumor u potpunosti jer jedan dio rezistentnih stanica preživi te se nakon određenog perioda (9-30 mjeseci) razvija tumor koji ne reagira na terapiju.[72]

Nekoliko je mogućih mehanizama kojima tumorske stanice stječu neovisnost o androgenima. Primjerice, mutacije u domeni AR-a koja veže ligand omogućuju njegovu aktivaciju vezanjem drugih steroidnih hormona poput estrogena, progesterona ili čak nekih sintetskih antagonista androgena, zaobilazeći potrebu stanica za hormonima. Također, nekoliko faktora rasta i citokina, poput epidermalnog faktora rasta (EGF) i interleukina-6 (IL-6) može aktivirati AR neovisno o vezanju steroidnog liganda.[71] Nadalje, Visakorpi i sur.[73] su pokazali da je amplifikacija AR gena koja uzrokuje njegovu povećanu ekspresiju najčešća genska promjena kod stanica tumora prostate koje rastu u uvjetima ablacije androgena što dovodi do povećane osjetljivosti na minimalne količine androgena, ali i drugih aktivirajućih signala. Različitost navedenih mehanizama znatno otežava pronalaženje terapeutskih rješenja za problem androgene neovisnosti.

2.2.4.3. Proteomički biomarkeri raka prostate

Proteomika se bavi istraživanjem ukupnog seta proteina eksprimiranih u određenoj stanici ili tkivu. Osim ekspresije, proteomičkim se metodama određuje i struktura proteina, njihova lokalizacija, aktivnost, posttranslacijske modifikacije i interakcije u raznim fiziološkim i patološkim stanjima. S obzirom da proteini vrše većinu bioloških funkcija, proteomika povezuje informaciju kodiranu u genetičkom slijedu sa ponašanjem stanice.

U novije se vrijeme sve više koriste različite proteomičke metode kojima se, u svrhu pronalaska novih biomarkera, nastoji otkriti proteine različito eksprimirane u tumorskim stanicama. Tako su među ostalima, Lexander i sur.[74] kombinacijom 2-D elektroforeze i tandemske masene spektrometrije (MS/MS) analizirali razlike u uzorcima karcinoma prostate s malim i velikim stupnjem agresivnosti pri čemu su otkrili 38 različito eksprimiranih proteina. Među onima s povećanom ekspresijom u izrazito agresivnom tipu, identificirali su proteine toplinskog šoka, membranske proteine i enzime uključene u stišavanje gena te metaboličke proteine. U drugom su pak istraživanju Johansson i sur.[75] također upotrebom gore navedenih metoda ispitali razlike između LNCaP stanične linije ovisne o androgenima i iz nje izvedene linije stanica neovisnih o androgenima. Među identificiranim proteinima izdvojili su protein

toplinskog šoka 60 (Hsp60) čija je ekspresija bila povišena u stanicama neovisnim o androgenima. Hsp60 je protein šaperon koji sudjeluje u pravilnom smatanju proteina. Visoko je eksprimiran i u primarnom i uznapredovanom karcinomu prostate nasuprot normalnom epitelu ovog organa u kojem je slabo eksprimiran, i to samo u bazalnom sloju.[75]

Lapek i sur.[76] su usporedbom rezultata dobivnih analizom stanica različitog stupnja progresije raka prostate pomoću tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) između ostalih identificirali različitu ekspresiju maspina, protein toplinskog šoka 70 (Hsp70) i eukariotskog translacijskog elongacijskog faktora 1 alfa (eEF1a). Maspin pripada skupini serpina, inhibitora serinskih proteaza. Smatra se da ima svojstva tumor supresora u epitelnim stanicama u kojima suzbija invaziju i metastaziranje stanica raka. Njegova je ekspresija smanjena u nekim karcinomima uključujući i onaj prostate.[76] Hsp 70, između ostalog ima inhibicijsku ulogu u apoptozi induciranoj djelovanjem TNF (eng. *tumor necrosis factor*) te stabilizira mutirani oblik p53 proteina. Eksprimiran je u nekoliko karcinoma, ali do sada nije potvrđena veza ekspresije Hsp70 s karcinomom prostate. Osim uloge u translaciji eEF1a, ima niz funkcija u stanici poput eksporta proteina iz jezgre i organizacije citoskeleta. Nedavno je pokazano da ovaj faktor djeluje s fosforiliranim Akt-om u regulaciji proliferacije, preživljavanja i mobilnosti stanica karcinoma dojki, a njegova povišena ekspresija zabilježena je i u tkivu karcinoma prostate.[76]

Proteomička istraživanja pomažu u razjašnjavanju mehanizama inicijacije i progresije karcinoma prostate te imaju veliki potencijal u otkrivanju novih biomarkera ove bolesti.

2.3. Hepatocelularni karcinom

Hepatocelularni karcinom (HCK) je u svijetu po učestalosti na petom mjestu među malignim oboljenjima kod muškaraca te na sedmom kod žena. Ukupno zauzima treće mjesto među malignim uzročnicima smrti. Prema statistikama, gotovo je 700 000 ljudi umrlo od ovog karcinoma u svijetu 2008. godine.[2] Visoku stopa incidencije hepatocelularnog karcinoma je u istočnoj Aziji i Africi što se smatra posljedicom velikog broja zaraženih virusima hepatitisa B i C i kontaminacijom hrane aflatoksinom B1. Međutim, broj oboljenja je u stalnom porastu i u Europi i SAD-u.[77]

HCK se najčešće razvija u osoba s kroničnim hepatitisom (B i C) i cirozom jetara. To je bolest s vrlo brzom progresijom. Očekivani životni vijek nakon dijagnoze je svega 6 mjeseci. Učinkovitije metode liječenja za lokalizirani stadij su djelomična resekcija i transplantacija jetara. Terapija uznapredovanog stadija bolesti s neoperabilnim tumorima uključuje kemoterapiju i primjenu farmakoloških preparata te *in situ* ablaciju.[12,77,78]

2.3.1. Građa i funkcija jetara

Jetra su najveća žlijezda, a poslije kože, ujedno i najveći organ ljudskog tijela. Čine približno 2,5-5% težine odraslog čovjeka.[42] Smještena su u gornjem desnom dijelu trbušne šupljine, neposredno ispod dijafragme, te iznad želuca, desnog bubrega i crijeva. Ljudska se jetra sastoje od dva režnja (lat. *lobus*) od kojih je desni znatno veći od lijevog. Sadrže veliki broj temeljnih funkcionalnih jedinica koje se nazivaju jetreni režnjići. Hepatociti predstavljaju osnovni tip stanica jetara te čine 60-78% ukupnog volumena. Iako sačinjavaju veći dio ovog organa, hepatociti djeluju u suradnji s ostalim stanicama kao što su kolangiociti (stanice žučovoda) i Kuppferove stanice kako bi održali normalnu funkciju jetara.[42,79]

Jetra imaju vrlo važnu ulogu u nizu procesa u organizmu. Imaju jedinstveni položaj u tijelu koji omogućuje da primaju vensku krv direktno iz crijeva, slezene i gušterače uslijed kojeg u jetra dotiče veliki broj različitih toksina, hormona i hranjivih tvari. Jetrina endokrina funkcija obuhvaća izlučivanje hormona poput faktora rasta sličnih inzulinu, anginotenziogena te trombopoietina. Osim endokrine funkcije, jetra imaju i egzokrinu funkciju koja se očituje lučenjem žuči.[42]

U metabolizmu ugljikohidrata ovaj organ ima ulogu u pohranjivanju glikogena, pretvaranju fruktoze i galaktoze u glukozu, glukoneogenezi te stvaranju brojnih važnih kemijskih spojeva iz međuprodukata ugljikohidratnog metabolizma. Jetra su posebno važna za održavanje normalne koncentracije glukoze u krvi te za metabolizam lipida. U jetrima se odvija oksidacija masnih kiselina i stvaranje energije za druge funkcije tijela. Ima važnu ulogu u detoksifikaciji organizma, u metabolizamu uree te u sintezi i izlučivanju velikog broja proteina plazme.[29,59] Uz sve navedeno, jetra fetusa su mjesto hematopoeze za razvijajući embrio zbog čega je brzi razvoj jetara ključan kako bi se mogla održati potrebna dostava krvi.[42]

2.3.2. Čimbenici rizika

Glavni rizični čimbenici povezani s nastankom HCK-a su kronična infekcija virusom hepatitisa B (HBV) i C (HCV) i ciroza jetara. Ostali čimbenici su prekomjerna konzumacija alkohola, izloženost aflatoksinu B1, pretilost te prirođeni genetski poremećaji poput hemokromatoze i gubitka alfa 1-antitripsina. Prevladavajući rizični čimbenici znatno se razlikuju ovisno o pojedinim zemljama. Dok je kronična infekcija HBV-om uz ili bez izloženosti aflatoksinu B glavni uzročnik većine slučajeva HCK u zemljama u razvoju, u Europi, SAD-u i Japanu 90% slučajeva HCK-a nastaje zbog ciroze jetara uzrokovane infekcijom HCV-om i pretjeranim unosom alkohola.[77,80]

HBV pridonosi nastanku HCK-a u 50% slučajeva širom svijeta, odnosno u 80% slučajeva u endemskim područjima kao što su južna Azija i subsaharska Afrika.[81] HBV je DNA-virus s lipidnom ovojnicom koji se inkorporira u DNA domaćina. Smatra se da HBV sudjeluje indirektno u karcinogenezi aktivacijom staničnih onkogena i stvaranjem genetičke nestabilnosti. HBx protein, ključan za replikaciju HBV-a ima *in vivo* sposobnost aktivacije promotora onkogena kao što su *c-jun* i *c-fos*. Također, HBx može inhibirati apoptozu inaktivacijom p53 proteina.[82] HBV može biti uključen i indirektno u patogenezu HCK jer kronični virusni hepatitis uzrokuje konstantnu stimulaciju replikacije hepatocita i fibrozu.[81]

HCV uzrokuje akutni i kronični hepatitis, a putem oksidativnog stresa, fibroze i ciroze vodi nastanku HCK-a.[80,81] HCV je RNA-virus s lipidnom ovojnicom čiji se životni ciklus odvija u staničnoj citoplazmi. Prema tome, HCV najvjerojatnije sudjeluje u karcinogenezi promjenom stanične signalizacije i metabolizma kao i modifikacijom imunosnih odgovora. Virusni proteini mogu djelovati na ključne regulatore staničnog ciklusa, poput Rb i p53, te uzrokovati povećanje stanične proliferacije i narušavanje genske stabilnosti.[81]

Jedan od mogućih jetrenih karcinogena je aflatoksin B1, proizvod plijesni *Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus flavus*. Od najveće je važnosti za područje Azije i subsaharske Afrike, gdje klimatski čimbenici pogoduju kontaminaciji hrane ovim gljivicama, te uz HBV infekciju može doprinjeti nastanku HCK-a. U organizmu se metabolizira u mutageni epoksid. Zabilježena je specifična mutacija u 249. kodonu p53 proteina koja uključuje promjenu G u T (arginina u serin) za koju se smatra da je uzrokovana aflatoksinom B1.[80]

U Sjevernoj Americi i sjevernoj Europi prekomjerna konzumacija alkohola je vodeći rizični čimbenik kroničnih jetrenih bolesti i ciroze. Pojava HCK-a je dva puta učestalija u muškaraca koji konzumiraju alkohol u velikim količinama.[80]

2.3.3. Stanično porijeklo HCK

Unatoč mnogim provedenima istraživanjima još uvijek nije poznato koji je tip stanica u jetrima odgovoran za nastanak karcinoma. Promjene koje se u ovom organu odvijaju tijekom hepatokarcinogeneze upućuju na to da karcinom može nastati malignom transformacijom nekoliko tipova stanica uključujući i matične stanice u različitim stupnjevima diferencijacije.[24,83-86] Hepatociti i kolangiociti se razlikuju od većine potpuno diferenciranih stanica svojim velikim kapacitetom proliferacije i samoobnavljanja. Iako u normalnim uvjetima rijetko proliferiraju i imaju životni vijek oko godinu dana, uslijed oštećenja tkiva ove stanice svojom ubrzanom replikacijom obnavljaju jetrenu masu. Tako je uočeno da kod glodavaca, nakon djelomične hepatektomije u kojoj je uklonjeno dvije trećine organa, jetra već nakon otprilike 10 dana vraća svoju originalnu masu.[84] Unatoč početnom vjerovanju da je regenerativni kapacitet hepatocita ograničen na dva kruga proliferacije, danas je poznato da oni imaju gotovo neograničen potencijal samoobnavljanja. Pokusi sa serijskim transplantacijama hepatocita iz odraslog glodavca u eksperimentalni model za repopulaciju jetara pokazali su da se hepatociti mogu najmanje 69 puta podijeliti, a da pri tome ne izgube svoje funkcionalne sposobnosti.[84,85] Smatra se da zbog navedenih karakteristika, hepatociti mogu biti stanice odgovorne za nastanak HCK. Tako su Williams i sur.[87] pokazali da se tretiranjem štakora sa karcinogenom dietil-nitrozoaminom (DEN) razvija HCK iz zrelih proliferirajućih hepatocita koje su prethodno obilježili β-galaktozidazom.

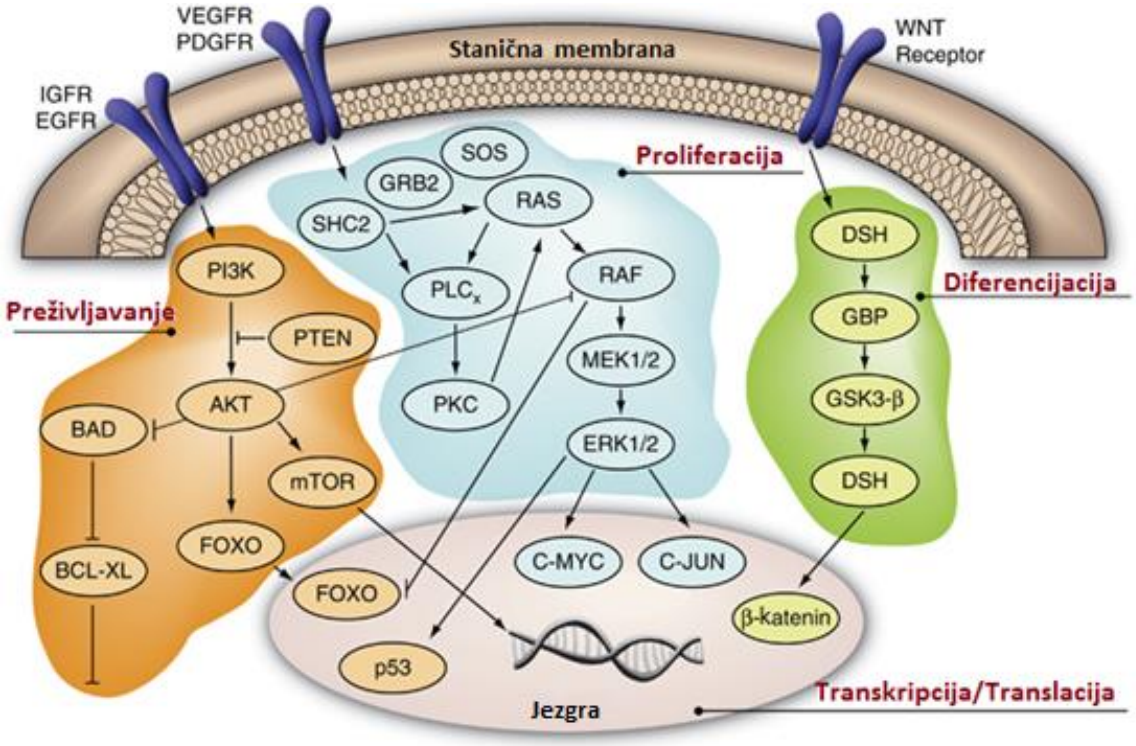
Uslijed dugotrajnog oštećenja jetara, posebice djelovanjem toksičnih spojeva, kada su hepatociti oštećeni ili je njihova proliferacija inhibirana, aktiviraju se stanice smještene na krajevima intrahepatičnih žučnih kanalića u tzv. Hering-ovim kanalima. Stanice koje su kod

glodavaca nazvane ovalnim, a kojima odgovaraju progenitorne jetrene stanice kod ljudi predstavljaju populaciju bipotentnih matičnih stanica jetara koje imaju mogućnost diferencijacije u hepatocite i kolangiocite.[83,87] Ovalne stanice su male stanice sa velikim omjerom ovoidne jezgre u odnosu na citoplazmu. Nekoliko je modela hepatokarcinogeneze koji upućuju da hepatocelularni karcinom može nastati iz ovih stanica. Jedan od najznačajnih je tzv. Solt-Farber[89] model u kojem je primijenjeno jedno izlaganje DEN-u praćeno nizom tretiranja sa 2-acetil-aminofluorenom (2-AAF) koji blokira regenerativnu sposobnost normalnih hepatocita. Potom se izvršila djelomična hepatektomija kako bi se stimulirala proliferacija stanica. Praćenjem staničnih promjena i usporedbom fenotipova ovalnih stanica, razvijenih čvorića te u konačnici nastalog HCK-a, zaključilo se da karcinom u ovome modelu nastaje iz ovalnih stanica.

Nadalje je pretpostavljeno da će, ukoliko je zaista nastao iz matičnih stanica u kojima je zaustavljen proces diferencijacije, HCK sadržavati veliki raspon neoplastičnih fenotipova koji obuhvaćaju stadije normalnog razvoja jetara. Kako bi dobili što bolji uvid u proces diferencijacije ovalnih stanica i njihovu u ulogu u procesu karcinogeneze Hixson i sur.[90,91] su razvili niz površinski reaktivnih monoklonskih antitijela koja prepoznaju antigene označene sa OC.2, OC.4, OC.5 i OC.10. Njihov identitet je za sada još nepoznat, no utvrđeno je da su ti antigeni različito eksprimirani na ovalnim stanicama kao i na razvijajućim i odraslim epitelnim stanicama žučovoda (BDEC, eng. *bile duct epithelial cells*).[84,88,90,91] Kasnije je pokazana reaktivnost nekoliko od njih i na drugim odraslim tkivima kao što su prostata i gušterača.[91] Na modelu hepatokarcinogeneze u kojem je miševima davana hrana bez kolina s dodatkom 0,1 % etionina (CDE prehrana), Hixson i sur.[84,90,91] su upotrebom gore navedenih monoklonskih antitijela pokazali da tako nastali HCK eksprimira antigenske profile slične onima prisutnim tijekom diferencijacije BDEC. Ujedno, prisutnost ovih markera na stanicama HCK podržava pretpostavku da etioninom induciran HCK barem djelom nastaje iz ovalnih stanica. Ovi rezultati upućuju na snažnu vezu između molekularnih događaja koji sudjeluju u razvoju, regeneraciji, ali i tumorogenezi jetara.

2.3.4. Putovi signalnog provođenja uključeni u nastanak hepatocelularnog karcinoma

Opsežna su epidemiološka istraživanja tijekom godina identificirala glavne čimbenike rizika HCK te je postignut veliki napredak u razumijevanju njegove patogeneze. Međutim, relativno malo toga je poznato o molekularnim mehanizmima koji dovode do procesa karcinogeneze ovog karcinoma. Transformacije koje nastaju u tkivu jetara uslijed virusne infekcije ili izlaganja hepatotoksičnim agensima uzrokuju značajne promjene u putovima provođenja signala te mijenjaju ekspresiju gena što za posljedicu ima formiranje tumora.[13,14,92] Na slici 3. je prikazan pregled signalnih putova, s nekoliko glavnih pripadnika, uključenih u razvoj HCK.



Slika 3. Signalni putovi i njihovi glavni pripadnici čije promjene narušavaju stanične procese poput proliferacije, preživljavanja, diferencijacije te transkripcije odnosno translacije i mogu uzrokovati nastanak hepatocelularnog karcinoma (prema Whittaker i sur.[92])

2.3.4.1. Wnt/β-katenin signalni put

Wnt signalni put je poznat zbog svoje ključne uloge u embriogenezi i sudjeluje u staničnoj diferencijaciji, proliferaciji i apoptozi.[93] Ukoliko Wnt signalni receptori na membrani nisu aktivirani, citoplazmatski β-katenin stvara kompleks sa supresorima tumora APC-om (eng. *adenomatosis polyposis coli*) i aksinom kao i s kinazom glikogen sintaze-3β (GSK3β). U tom kompleksu GSK3β fosforilira β-katenin određujući ga za ubikvtinaciju i razgradnju. Međutim, ukoliko se Wnt receptori na plazma membrani stanice aktiviraju djelovanjem odgovarajućih liganda, dolazi do konformacijske promjene aksinskog kompleksa što omogućuje nakupljanje nefosforiliranog β-katenina u citosolu i njegovu translokaciju u jezgru. U jezgri β-katenin stvara kompleks s DNA-vezujućim transkripcijskim faktorima i aktivira transkripciju različitih gena.[93,94]

Različita su istraživanja transkriptoma i proteoma pokazala povećanu aktivnost Wnt signalnog puta u hepatocelularnom karcinomu i to najvjerojatnije kao posljedicu mutacija u aksinu 1, na mjestu koje veže β-katenin, i/ili mutacija na *CTNNB1* genu koji kodira β-katenin. Također, 50-70% tumora jetara pokazuje povećanu razinu β-katenina u citoplazmi i jezgri.[92,83] Njegova povećana ekspresija i lokalizacija u jezgri zabilježena je i u karcinomu prostate iako su mutacije samog *CTNNB1* gena u ovom karcinomu rijetke. Osim uloge u Wnt signalnom putu β-katenin djeluje kao kofaktor AR-a povećavajući njegovu osjetljivost na niske razine androgena što upućuje na ulogu ovog proteina u razvoju hormonski neovisnog oblika karcinoma prostate.[94]

Prema nekim pretpostavkama, povećana signalizacija Wnt putom važna je za održavanje tzv. „matičnosti" (engl. *„stemness"*) hepatocelularnog karcinoma koju karakterizira stanična proliferacija i besmrtnost.[93] Iako nema sumnje da postoji jaka veza između nenormalne Wnt signalizacije i hepatocelularnog karcinoma, precizna uloga njegove aktivacije u patogenezi tumora nije razjašnjena te se smatra da uvelike ovisi o kontekstu i o međusobnoj komunikaciji s ostalim signalnim putovima.

2.3.4.2. MAPK signalni put

Mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*) su serin-treonin kinaze uključene u niz staničnih aktivnosti kao što su stanično preživljavanje, diferencijacija, adhezija i proliferacija. Tri su osnovne skupine MAPK, kinaza regulirana

izvanstaničnim signalom (ERK, eng. ex*tracellular signal-regulated kinase*), c-Jun NH2-terminalna kinaza (JNK) i p38. Aktivnost tih kinaza ovisi o dvostrukoj fosforilaciji treoninskih (T) i tirozinskih (Y) ostataka lociranih u aktivacijskoj petlji.[95]

ERK signalni put je najčešće proučavan zbog toga što potiče proliferaciju, migraciju i preživljavanje i povezan je s tumorogenezom i progresijom raka. Aktiviraju ga razni receptori, posebice receptori iz skupine tirozinskih protein-kinaza (RTK) kao što su VEGFR i FGFR. Nakon vezanja liganda, ti receptori dimeriziraju pri čemu se aktivira njihova unutarstanična kinazna domena što za posljedicu ima fosforilaciju receptora na tirozinskim ostacima koji onda služe kao mjesta za vezanje adaptorskih proteina kao što su Grb2 i Sos. Ti proteini potom aktiviraju Ras, pripadnika razreda malih G-proteina, koji aktivira serin/treonin kinazu Raf. Aktivirani Raf, koji je kinaza MAPK kinaze (MAP3K), fosforilira i aktivira MEK, MAPK–kinazu (MAP2K), dok je MEK kinaza za ERK.[13,95] Do sada je poznato više od stotinu supstrata za ERK od kojih su mnogi transkripcijski faktori. Izmijenjena ekspresija i aktivnost transkripcijskih faktora uslijed aktivacije ERK-a može dovesti do promjene u razini ekspresije gena, kao što je *c-myc*, ključnih za progresiju staničnog ciklusa. Ujedno, ERK put regulira proteine uključene u apoptozu pri čemu promiče preživljavanje tumorskih stanica.[96]

S obzirom na ulogu ERK signalizacije u promicanju stanične proliferacije, migracije i preživljavanja, ne iznenađuju rezultati koji pokazuju konstitucijsku aktivaciju ovog puta u mnogim tumorima. Povećana ekspresija proteina pripadnika ERK signalnog puta otkrivena je i u HCK kao i povišena razina fosforiliranog ERK-a čija je aktivacija povezana s agresivnim fenotipom.[13,92] Također, Huynh i sur.[97] su pokazali 7 puta veću fosforilaciju MEK-a u tkivu HCK u odnosu na okolno benigno tkivo jetre. Ujedno, razina ekspresije Spred proteina (engl. *Sprouty-related protein*), inhibitora Ras/Raf/ERK puta, smanjena je u ljudskom HCK.[98] Poticanje Spred ekspresije uzrokovalo je inhibiciju aktivacije ERK-a *in vivo* i *in vitro*, rezultirajući smanjenom proliferacijom stanica raka i smanjenim izlučivanjem metaloproteinaza matriksa 2 i 9.[98] To je otkriće pokazalo direktnu vezu MAPK/ERK puta s HCK te Spred proteine kao potencijalnu metu u liječenju istoga.

2.3.4.3. PI3K/AKT/mTOR put

PI3K/AKT/mTOR je vitalan stanični signalni put uključen u niz staničnih aktivnosti poput rasta i preživljavanja. Promjene u signalizaciji ovog puta česte su u tumorima. Fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K) je lipidna kinaza koja fosforilira fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP2) pri čemu

nastaje drugi lipidni glasnik PIP3 koji je ključan za translokaciju Akt-a na plazmatsku membranu. Akt i mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin)* su serin/treonin kinaze dok je Akt poznat još pod nazivom protein-kinaza B (PKB).[99]

U nestimuliranim je stanicama razina PIP3 mala, a Akt se nalazi u neaktivnom obliku u citosolu. Aktivacija odgovarajućih receptora na površini stanice (npr. RTK ili receptori vezani na G-proteine) rezultira vezanjem PI3K na unutarstaničnu domenom tih receptora. PI3K fosforilira PIP2 u PIP3. Akumulacija PIP3 potiče niz unutarstaničnih događaja uključujući lokalizaciju na membranu i aktivaciju Akt-a. Aktivirani Akt fosforilira niz proteina i regulira različite stanične aktivnosti. Jedan od najvažnijih supstrata za Akt je mTOR.[99,100] Ovaj protein kontrolira nekoliko važnih staničnih procesa uključujući i regulaciju translacije proteina. Narušavanje procesa translacije često je uzrok abnormalnog staničnog rasta i tumorogeneze. Povećana ekspresija fosforiliranog mTOR također je prisutna u HCK.

Važnu ulogu u negativnoj regulaciji PI3K/AKT/mTOR puta ima već spomenuti PTEN koji defosforilira fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat. PI3K/AKT/mTOR put može se aktivirati povećanom proizvodnjom faktora rasta i citokina, gubitkom ekspresije PTEN te mutacijama u receptorima faktora rasta, PTEN ili same PI3K.[101,102] Signalizacija putem PI3K/AKT/mTOR često je pojačana u različitim tumorskim stanicama. Imunohistokemijskim istraživanjem je pokazano da je fosforilacija Akt-a povećana u hepatocelularnom karcinomu te je povezana sa ponovnom pojavom tumora i lošim prognozama.[103]

Kako je iz dosadašnjih istraživanja vidljivo da je narušena signalizacija PI3K/AKT/mTOR puta snažno povezana s hepatocelularnim karcinomom, njegova farmakološka inhibicija moguća je terapijska strategija u liječenju HCK. Nekoliko kliničkih studija radi na ispitivanju inhibicije PI3K/AKT/mTOR puta.[100]

2.3.5. Proteomički biomarkeri HCK

Proteomičke se metode sve više koriste i za otkrivanje potencijalnih boimarkera HCK. Tako su između ostalog Megger i sur.,[104] uspoređujući proteomički profil tumorskog i normalnog tkiva jetara, otkrili čak 51 različito eksprimiran protein. Dodatnim su istraživanjima među njima izdvojili dva kao moguće biomarkere, MVP (eng. *major vault protein*) i betain-homocistein S-metiltransferazu 1 (BHMT, eng. *betaine-homocysteine S-methyltransferase 1*). Za MVP je zabilježeno značajno povećanje ekspresije u tumorskom tkivu dok je ekspresija BHMT bila smanjena. Protein MVP je sastavni dio ribonukleoproteinskih čestica i sudjeluje u nekoliko

signalnih putova uključujući MAPK i PI3K/Akt. Njegova povećana ekspresija zabilježena je u drugim karcinomima. BHMT je transferaza koja sudjeluje u metabolizmu nekoliko aminokiselina. Ranija su istraživanja upotrebom 2D elektoforeze i MS-a također otkrila smanjenu ekspresiju ovog proteina u HCK.[104]

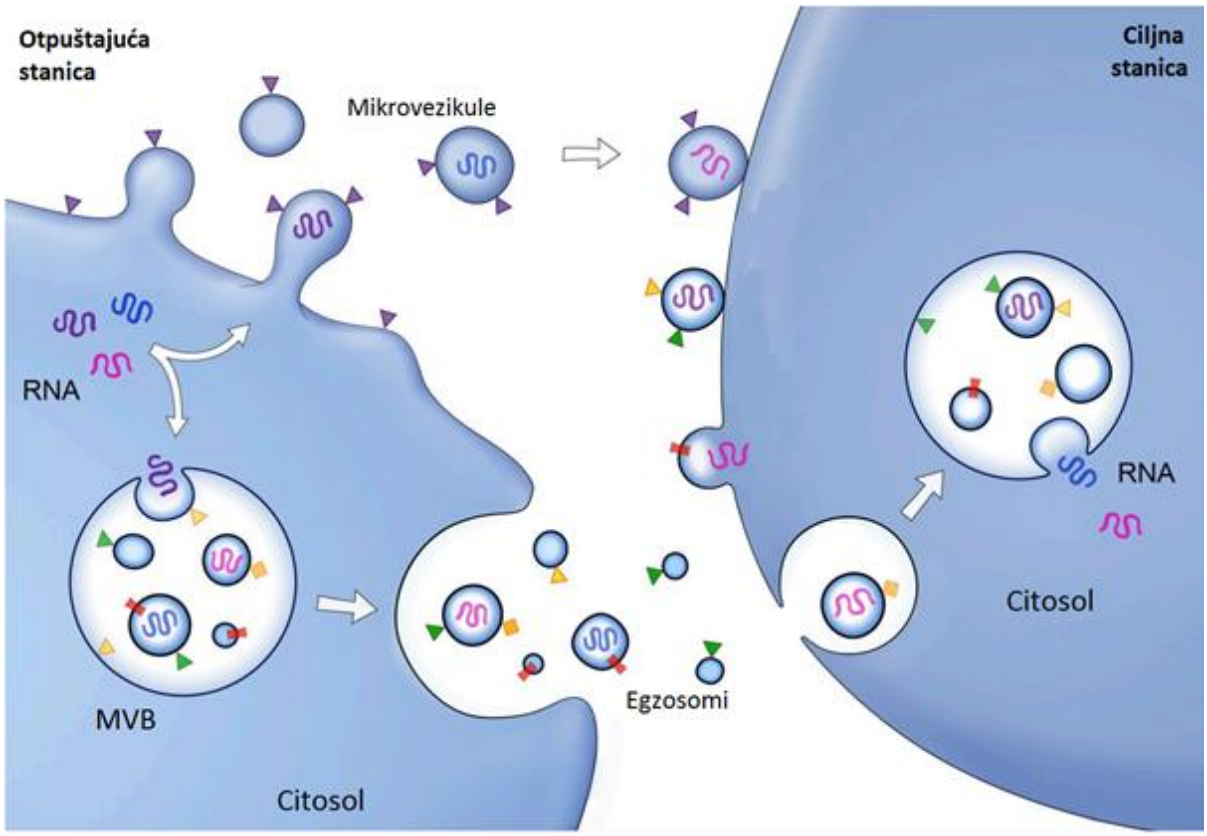
Analiza proteoma s površine stanice posebno je zanimljiva u istraživanju tumorskih biomarkera. Plazmatska membrana ima ključne uloge u funkciji stanice, a njezin proteinski sastav značajno se mijenja tijekom maligne transformacije. Pomoću LC-ESI-MS/MS Clifton i sur.[105,106] su napravili proteomičku usporedbu proteina plazmatskih membrana uzoraka normalnih jetara štakora i tumorskog tkiva. Među proteinima identificiranim u uzorcima karcinoma, a koji nisu bili prisutni u proteomu plazmatskih membrana normalnih jetara bili su među ostalima proteini toplinskog šoka (Hsp70, Hsp90) i aneksini (A1, A2, A4, A5, A7) te CD44 i transferin. Protein CD44 je molekula na površini stanične membrane uključena u staničnu proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i angiogenezu. Povećana ekspresija ovog proteina zabilježena je u mnogim karcinomima i povezana je s lošim ishodom. Transferin je transmembranski receptor čija je povećana ekspresija u HCK pokazana genomičkim metodama kao i imunohistokemijski.

Dosadašnja su istraživanja pokazala da proteomika ima važnu ulogu u u molekularnoj karakterizaciji HCK pa ne iznenađuje sve veći porast radova objavljenih na tu temu.

2.4. Ekstracelularne vezikule

Međustanična je komunikacija jedna od ključnih karakteristika višestaničnih organizama. Stanice međusobno komuniciraju i izmjenjuju informacije djelovanjem nekoliko mehanizama koji mogu uključivati topljive molekule kao što su hormoni, faktori rasta i citokini ili se pak komunikacija može odvijati putem direktnog kontakta između stanica posredovanog nizom adhezijskih molekula.[107] Međutim, u posljednje se vrijeme sve veći fokus stavlja na međustaničnu komunikaciju u kojoj središnju ulogu imaju mali, membranom obavijeni fragmenti stanica, tzv. ekstracelularne vezikule (EV).[15,107] Poznato je da svi tipovi stanica otpuštaju EV kontinuirano ili kao odgovor na različite aktivacijske signale. Mogu djelovati u blizini stanice koja ih ispušta ili mogu putovati do udaljenih mjesta.[108]

Signalizacija putem EV se razlikuje po tome što se do ciljne stanice prenose kompleksni „paketići“ informacija koji sadrže, kako komponente membrane tako i citoplazmatski sadržaj i genetički materijal stanice iz koje potječu. Na taj se način istovremeno prenosi više signala iz čega mogu proizaći kompleksniji i učinkovitiji stanični odgovori.[15] Sadržaj EV uključuje različite biomolekule kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Stanice također mogu koristiti EV za uklanjanje suvišnih i opasnih komponenti poput lijekova i mikroorganizama. Sadržaj pojedinih populacija EV reflektira fenotip stanice od koje potječu.[107,108]



Slika 4. Mehanizam nastajanja mikrovezikula i egzosoma te njihova interakcija s ciljnom stanicom (prema Raposo i Stoorvogel[108])

Nakon sekrecije EV će djelovati samo na one stanice koje specifično prepoznaje i to na nekoliko različitih načina koji su prikazani na slici 4. Većinom je interakcija ograničena na površinu ciljne stanice i posredovana je receptorima. U tom slučaju molekule na membrani EV djeluju kao ligandi koji se specifično vežu na određene receptore na ciljnoj stanici uzrokujući aktivaciju niza signalnih putova. U drugim se pak slučajevima EV mogu vezati za specifične adhezijske receptore te se stopiti s plazmatskom membranom ciljne stanice ili ih ona može

endocitirati. Ako dolazi do stapanja EV sa membranom, tada se njezin sadržaj prenosi direktno u citosol dok se komponente membrane inkorporiraju u citoplazmatsku membranu ciljne stanice. Među komponentama membrane mogu biti receptori koji će inducirati signalizaciju pa čak i transformaciju dok se u citosolu mogu naći npr. mRNA koje mogu uzrokovati promjene u regulaciji ekspresije pojedinih gena u ciljnoj stanici. U slučaju endocitoze EV se može a) stopiti s membranom endosoma i otpustiti sadržaj u citosol stanice, b) zajedno s pripadajućim endosomom stopiti s lizosomom, ili c) otpustiti natrag u međustanični prostor procesom transcitoze.[108-110]

Sve je više dokaza da EV nemaju isključivo ulogu u međustaničnoj komunikaciji već su uključene i u niz fizioloških i patoloških procesa. Uloga EV potvrđena je u koagulaciji gdje posreduju u međudjelovanju trombocita, makrofaga i neutrofila,[111] potom u upalnim procesima gdje sudjeluju u otpuštanju citokina[112] te u progresiji tumora.[15]

2.4.1. Vrste ekstracelularnih vezikula

Prema većini autora, ekstracelularne se vezikule dijele na dvije skupine, egzosome i mikrovezikule. Osim što se razlikuju morfološki i po sastavu, ključna razlika između egzosoma i mikrovezikula je u mehanizmu njihova nastajanja.[108,110]

Mikrovezikule, koje se u literaturi još često nazivaju i mikročesticama ili ektosomima, imaju promjer 100 nm do 1 μm. Nastaju pupanjem plazmatske membrane pri čemu se stvaraju mala citoplazmatska ispupčenja koja se odvajaju od stanice (slika 4.). Različiti aktivacijski signali te povišenje koncentracije Ca^{2+} iniciraju reorganizaciju citoskeleta i membranskih komponenti što može dovesti do stvaranja mikrovezikula. Ca^{2+} ioni induciraju aktivaciju skramblaze i kalpaina.[110] Skramblaza je protein koji omogućuje translokaciju fosfolipida između lipidnih slojeva membrane. Njezina aktivacija pri formiranju mikrovezikula uzrokuje premještanje fosfatidilserina iz unutrašnjeg u vanjski sloj membrane. Funkcija ekspresije fosfatidilserina na površini mikrovezikula nije u potpunosti razjašnjena. Između ostalog, smatra se da pridonosi ulozi mikrovezikula u imunosnom odovoru.[113] Kalpain potiče reorganizaciju citoskeleta koja za posljedicu ima odvajanje mikrovezikula s površine stanice.

Za razliku od mikrovezikula, egzosomi su homogenija populacija s veličinom promjera 30 do 100 nm. Biogeneza egzosoma započinje procesom endocitoze, odnosno, pupanjem membrane prema unutrašnjosti stanice pri čemu nastaju male unutarstanične vezikule koje čine rani endosom. Pupanjem membrane u unutrašnjost endosoma nastaju intraluminalne vezikule.

Endosom koji sadrži intraluminalne vezikule naziva se kasni endosom ili multivezikularno tjelešce (MVB, eng. *multivesicular body*). MVB se može stopiti s lizosomom, gdje će doći do razgradnje njegovog sadržaja, ili sa plazmatskom membranom, pri čemu se iz stanice otpuštaju intraluminalne vezikule[108,110]. Tako otpuštene intraluminalne vezikule nazivaju se egzosomima.

Važno je naglasiti da terminologija koja se odnosi na EV nije još u potpunosti usuglašena. Isto je tako većina istraživanja do sada izvršena na uzorcima koji su sadržavali oba tipa EV.[108]

2.4.2. Ekstracelularne vezikule tumorskih stanica

Veliki je broj istraživanja pokazao da tumorske stanice otpuštaju EV. Količina otpuštenih EV povećava se kako bolest napreduje i u korelaciji je s invazivnom sposobnosti tumorskih stanica *in vitro* i *in* vivo.[15,114] Prisutnost EV u pacijenata oboljelih od raka zabilježena je prvi put 1978. kada su identificirane u kulturama stanica limfnih čvorova pacijenta koji je bolovao od Hodgkinove bolesti (tumora limfnih čvorova).[115] Nedugo poslije, Poste i Nicholson[116] su pokazali da su B16 (F10) stanice iz melanoma miša s velikim metastatskim potencijalom iz citoplazmatske membrane spontano otpuštale veliki broj EV. Stapanje tih EV sa B16 (F1) melanomskim stanicama, koje ishodno imaju slabi metastatski potencijal, omogućilo je sada izmijenjenim B16 (F1) stanicama metastaziranje u pluća. Ti su eksperimenti postavili temelje za daljnja istraživanja značaja EV u progresiji tumora. Ekstracelularne vezikule koje potječu od tumora (TEV) otkrivene su u plazmi i drugim tjelesnim tekućinama oboljelih od raka, kao i u supernantantima tumorskih stanica u kulturi. Iako te TEV posjeduju niz različitih karakteristika, one sve odražavaju poseban potencijal tumorskih stanica za preživljavanjem i ekspanzijom tumora. TEV sadrže u svom sastavu sve komponente koje omogućuju tumorskim stanicama da izbjegnu nadzoru imunosnog sustava, te da stvore mikrookolinu pogodnu za nastajanje i odvajanje novih tumorskih stanica.[15,114,117]

TEV utječu na niz aspekata progresije tumora kao što su stanično preživljavanje, izbjegavanje imunosnom nadzoru te stjecanje agresivnog fenotipa i metastaze. Otkriveno je da tumorske stanice putem TEV izbacuju kaspazu 3, jedan od glavnih enzima uključenih u apoptozu, što pridonosi njihovom preživljavanju.[118] Osim toga, TEV su jedan od mehanizama kojima stanice raka izbacuju terapeutike poput doksorubicina (antibiotik koji se koristi u kemoterapiji) te tako stječu otpornost na lijekove.[119] Prema tome, sposobnost TEV da selektivno prikupljaju bioaktivne molekule može imati značajan utjecaj na preživljavanje i rast tumora.

Jedan od načina na koji tumorske stanice mogu povećati preživljavanje je suzbijanjem imunosnog odgovora otpuštanjem TEV koje na sebi nose molekule koje mogu modulirati imunost ili pak mogu koristiti EV kako bi eliminirale tumorske antigene. Pri tome citotoksični T-limfociti i stanice prirođene ubojice (NK, eng. *natural killer cells*) ne mogu prepoznati transformirane stanice.[109,117]

Metastaziranje tumora u velikoj mjeri ovisi o sposobnosti stanica da se učvrste za izvanstanični matriks, razgrađuju ga, migriraju i pričvrste se za nove površine. Taj proces ujedno zahtjeva i formiranje novih krvnih žila. Među mnogim biološki aktivnim sastojcima TEV-a nalaze se i metaloproteinaze matriksa poput MMP2, MMP9 te njihovi zimogeni, urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i vaskularni endotelni faktor rasta, VGEF (eng. *vascular endothelial growth factor*) koji potiče angiogenezu. Metaloproteinaze razgrađuju kolagen u bazalnoj membrani dok uPA katalizira pretvorbu plazminogena u plazmin. Plazmin je serinska proteaza koja razgrađuje razne komponente izvanstaničnog matriksa uključujući fibrin te aktivira zimogene MMP-a.[15,117]

2.4.3. Proteomička istraživanja EV

S obzirom da EV sadrže set proteina koji je u velikoj mjeri specifičan za stanicu od koje potječu te su lako dostupne u mnogim biološkim tekućinama sve je više istraživanja usmjereno na proteomičko ispitivanje njihovog sastava kao i usporedbu sa sastavom proteina EV iz odgovarajućeg nemalignog uzorka u nadi pronalaska novih i učinkovitijih tumorskih biomarkera.

U posljednjih je nekoliko godina proteomička analiza temeljena na masenoj spektrometriji omogućila karakterizaciju EV iz staničnih linija različitih tipova karcinoma poput raka prostate,[120] debelog crijeva,[121] mokraćnog mjehura[122] i dr. Tako su Sandvig i sur.[120] razdvajanjem proteina SDS-PAGE elektroforezom te njihovom analizom pomoću nano LC-MS/MS nastojali odrediti proteom EV koje u okolni medij otpuštaju stanice metastatke linije karcinoma prostate PC-3. Identificirano je 266 proteina s različitim staničnim lokalizacijama koji su u najvećoj mjeri bili uključeni u biološke procese transporta, stanične organizacije i biogeneze te u metaboličke putove. Nekoliko je proteina iz skupine aneksina, integrina, proteina citoskeleta i toplinskog šoka otkriveno i u uzorcima EV iz drugih izvora. Međutim, proteini poput CD151 i CDCP1 bili su specifični za EV iz PC-3 stanica. Njihova je povećana ekspresija i uloga u tumorogenezi već ranije potvrđena. CD151 djeluje s integrinima i metaloproteinazama

te potiče progresiju raka regulirajući migraciju stanica dok je CDCP1 već spominjan u kontekstu biomarkera i djeluje kao antiapoptotična molekula uključena u preživljavanje i metastaze.[120] Proteom EV iz PC-3 stanica uspoređen je i s proteomima EV koje otpuštaju stanice karcinoma mjehura i debelog crijeva te je pokazano da se ti proteomi preklapaju u samo 35 %. Ovime je potvrđeno da EV imaju sadržaj proteina specifičan za stanicu od koje potječu te da imaju potencijal biti tumor specifične odnosno da se njihova prisutnost u biološkim tekućinama može barem djelomično pripisati određenom tipu karcinoma.[120]

Prema svemu navedenom, EV čine jedne od prvih indikatora oštećenja stanica, te se njihov sastav značajno mijenja tijekom i nakon maligne modifikacije što ih čini izvrsim kandidatima u istraživanju biomarkera malignih oboljenja

2.5. Uloga stanica prirođenih ubojica u tumorskoj imunologiji

Učinkoviti nadzor imunosnog sustava važan je u borbi organizma protiv raka. Stanice prirođene i stečene imunosti prepoznaju promjene u ekspresiji antigena na površini tumorskih stanica i nastoje ih uništiti. Međutim, kako bolest napreduje, tumorske stanice razvijaju mehanizme pomoću kojih prikrivaju svoj imunogeni profil i aktiviraju putove suzbijanja imunosnog odgovora.

Stanice prirođene ubojice ili NK stanice su veliki granulirani limfociti koji imaju vrlo važnu ulogu u ranom urođenom imunosnom odgovoru. Čine nespecifičnu prvu liniju obrane putem njihove sposobnosti ubijanja transformiranih stanica domaćina i stanica inficiranih patogenom. Široko su rasprostranjene u tijelu i nalazi ih se u krvi, limfnim čvorovima, koštanoj srži, slezeni, jetrima, plućima i dr. Djeluju brzo i bez prethodne imunizacije.[123] NK stanice sadrže dva tipa funkcionalno različitih receptora na površini stanica koji im omogućuju da razlikuju između normalne i transformirane stanice. Prvi tip receptora je specifičan za površinske molekule čija je ekspresija povećana u inficiranim i tumorskim stanicama, a koje nisu eksprimirane na površini normalnih stanica. Vezanje odgovarajućih liganda na te receptore aktivira NK stanice i stimulira njihovu citotoksičnost. Drugi tip receptora prepoznaje molekule eksprimirane na površini normalnih stanica i šalje inhibitorne signale kako bi se ta stanica sačuvala od napada. Najpoznatiji inhibicijski receptori na NK stanicama su specifični za MHC (eng. *major histocompatibility complex*) molekule klase I eksprimirane na normalnim

stanicama. Budući da brojni virusi i tumori potiskuju ekspresiju MHC molekula klase I kako bi izbjegli stečeni imunološki odgovor, ovi limfociti imaju važnu ulogu u obrani organizma. NK stanice liziraju tumorske stanice koje zbog nedostatka MHC molekula klase I nisu u mogućnosti inhibirati njihovo citotoksično djelovanje.[123,124]

Uz inhibirajuće i aktivirajuće receptore, NK stanice eksprimiraju i niz adhezijskih molekula koje im omogućuju povezivanje s ciljnim tumorskim stanicama. Tako npr. receptori poput CD226, CD96 i CRTAM eksprimirani na površini NK stanica reagiraju s nektinima i Necl molekulama na površini tumorske stanice što dovodi do aktivacije citotoksičnog djelovanja.[125] Nektini su skupina imunoglobulina koji posreduju u Ca^{2+}–ovisnoj međustaničnoj adheziji. Skupina sadrži nektin-1, -2, -3 i -4. Identificirano je do sada i pet molekula sličnih nektinima nazvanih Necl-1 (engl. „*nectin-like*“) do Necl-5. Mnoge tumorske stanice eksprimiraju povećanu razinu nektina i/ili Necl molekula, što upućuje na to da ti proteini pogoduju rastu, širenju i metastaziranju tumorskih stanica.[126] Necl-5 je prvo opisan kao poliovirusni receptor PVR (CD155), a kasnije je, prilikom nastojanja da se upotrebom monoklonskih antitijela izoliraju specifični markeri hepatocelularnog karcinoma njegov ortolog otkriven i u štakora.[127] Pende i sur.[128] su, ispitujući citotoksičnost NK stanica prema stanicama nekoliko vrsta leukemije pokazali da interakcije između Necl-5 i njegovog receptora CD226 na površini NK stanica ima značajnu ulogu u uništavanju tumorskih stanica.

NK stanice imaju važnu ulogu u anti-tumorskoj imunosti, međutim još je niz nepoznanica o tome na koje sve načine receptori te njihovi ligandi sudjeluju u prepoznavanju tumorskih stanica. Što bolje razumijevanje mehanizama kojima NK stanice međudjeluju s tumorskim stanicama kao i načina njihove eliminacije omogućit će učinkovitiju upotrebu tih limfocita u tumorskoj imunoterapiji.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela korištene su kemikalije različitih proizvođača prema dolje navedenom:

- *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD* – HBSS (Hanks Balanced Salt Solution), $CaCl_2$, proteaze tipa XIV, $NaHCO_3$, natrijev piruvat, MCDB medij, glutamin, agaroza, etilenglikol-bis (β-aminoetil eter)-*N,N,N',N'*-tetraoctena kiselina (EGTA), Tris-HCl, NaCl, natrijev deoksikolat, natrijev dodecilsulfat (SDS), goveđi serumski albumin (BSA, eng. *bovine serum albumin*)
- *GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD* – gentamicin, kolagenaze tipa I, RPMI 1640 medij (Roswell Park Memorial Institute medium), PBS (eng. *phosphate buffered saline*), Deksametazon, tripsin
- *BD Bisciences, San Jose, CA, SAD – Dispase digestion medium*, epidermalni faktor rasta (EGF), ekstrakt hipofize goveda (BPE, eng. bovine pituitary extract), ITS (eng. *Insulin-Transferrin-Selenium*)
- *InvivoGen, San Diego, CA, SAD* – Fungizon, kolera toksin, Normocin
- *Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD* – fetalni goveđi serum (FBS, eng. *fetal bovine serum*)
- *Calbiochem, San Diego, CA, SAD* – Forskolin, koktel inhibitora proteaza
- *Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD* – DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)

3.1.2. Antitijela

Za indirektnu imunofluorescenciju – *primarna antitijela* – proizvedena u vlastitom laboratoriju – monoklonsko antitijelo OC.2[90] (1:1000) i monoklonsko antitijelo OC.5[91] (1:1000).

Sekundarna antitijela – Alexa Fluor 488 kozji anti-mišiji IgG i Alexa Fluor 594 kozji anti-mišiji IgM (Molecular Probes, Eugene, OR, SAD), 1:400.

Za Western blot – *primarna antitijela* – poliklonsko anti-EGFR, 1:400 (IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD); poliklonsko anti-Raf 1, 1:500 (IgG; Abcam Inc., Cambridge, MA, SAD); poliklonsko anti-Stat3, 1:1000 (IgG; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD); poliklonsko anti-fosfo-Stat3 (Ser727), 1:1000 (IgG; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA); monoklonsko anti-β-aktin, 1:30 000 (IgG; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO), monoklonsko anti-Necl-5 (MAb 324.9,[129] proizvedeno u našem laboratoriju), 1:1000.

Sekundarna antitijela – kozji anti-mišiji IgG konjugiran s HRP-om (eng. *horseradish peroxidase*), 1:25 000 (Biosource, Camarillo, CA).

3.1.3. Stanične linije i uzgoj stanica in vitro

3.1.3.1. Izolacija i uspostavljanje stanične linije iz epitela prostate štakora

Porijeklo i izolacija stanične linije iz epitela prostate štakora, PEC (eng. *prostate epithelial cells*) je prethodno opisana.[61,62]

Iz prostate Fischer 344 štakora (200-250 g) (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, SAD) uklonjeni su dorsalni i lateralni režanj, očišćeni od vezivnog tkiva i isprani s HBSS uz dodatak antibiotika gentamicina (0,25 mg mL^{-1}) i 2 mM EGTA. Pripravljen je medij za digestiju koji je sadržavao HBSS; 0,025 mM $CaCl_2$; 0,1 % (w/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS), 0,1 % (w/v) kolagenaze tipa I (158 jedinica mg^{-1}) i 0,1 % (w/v) proteaze tipa XIV (5,3 jedinica mg^{-1}). Usitnjeno tkivo inkubirano je u mediju za digestiju na tresilici u vodenoj kupelji 1 sat na 37 °C. Stanice i fragmenti tkiva su izdvojeni cetrifugiranjem na 150 x *g*, 10 min i resuspendirani u RPMI 1640 mediju (*Roswell Park Memorial Institute medium*). Nakon stajanja 5 min, odvojen je supernatant sa izdvojenim stanicama, a preostali fragmenti nerazgrađenog tkiva inkubirani su u 10 mL *Dispase digestion medium* 30 min na 37 °C. Nakon centrifugiranja na 150 x *g*, 10 min, stanice su resuspendirane u RPMI 1640 mediju i spojene s prvim uzorkom. Nakon protiskivanja kroz iglu (veličina 18 G) stanice su resuspendirane u PEC mediju u koji je dodan

Fungizone (12,5 μg mL^{-1}) i kolera toksin (20 ng mL^{-1}). Po 1 mL suspenzije nasađen je u ploče s 12 jažica. Tako je dobivena primarna kultura stanične linije epitela prostate štakora.

3.1.3.2. PEC stanice

Dva tjedna nakon uspostavljanja primarne kulture, PEC stanice su precjepljene u boce za kulturu stanica površine 75 cm^2 (T75) u koncentraciji 1 x 10^5 stanica. Uzgajane su u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlifeTM, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima 37 °C, 5 % CO_2 i precjepljivane svakih 7-14 dana.

Broj precjepljivanja ili pasaža (eng. *passage*) označen je slovom „p". Mali, srednji i veliki broj precjepljivanja definirani su kao p < 35, p 36–85 i p > 85.

Medij za uzgoj PEC stanica sadržavao je: RPMI 1640 i MCDB medije u omjeru 1:1, pH 7,4; $NaHCO_3$ (1,9 g L^{-1}); 0,5 mM natrijev piruvat; 5 % (v/v) FBS; EGF (0,02 μg mL^{-1}); BPE (5 μg mL^{-1}); 2 mM deksametazon; 1 % (w/v) glutamin; gentamicin (0,1 mg mL^{-1}); 0,25 % (v/v) ITS; forskolin (2,5 μg mL^{-1}) i Normocin (0,1 mg mL^{-1}).

Za održavanje i presađivanje adherentnih PEC koristio se 0,25% tripsin/EDTA za odvajanje stanica od podloge kako bi se mogle presaditi u novu T75. Tripsinizacija je trajala od 3–5 min u CO_2 inkubatoru. Gustoća nasađivanja u svrhu kontinuiteta održavanja i proširivanja stanične linije ovisila je o stupnju konfluentnosti i potrebama.

Vijabilnost i brojnost stanica je određena bojanjem s tripan plavilom u Bürker-Türk komorici. Žive stanice s neoštećenom staničnom membranom ne propuštaju boju Tripan plavilo te su neobojene, za razliku od mrtvih stanica, koje se bojaju plavo.

3.1.3.3. DU145 stanice

Humana stanična linija raka prostate, DU145 je dobivena od American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, SAD). Za uzgoj stanica korišten je RPMI 1640 medij s dodatkom 5 % (v/v) FBS i gentamicina (0,1 mg mL^{-1}). Uzgajane su u bocama za kulturu stanica T75 u CO_2 inkubatoru u uvjetima 37 °C, 5 % CO_2 i precjepljivane svakih 7-14 dana. Presađivanje stanica vršeno je prema gore opisanom postupku.

3.1.3.4. Jetrene stanične linije

Diploidna stanična linija epitela jetara WB-F334 i iz nje izvedena tumorska stanična linija GP7TB uzgajane su u DMEM/F12 mediju s dodatkom 10 % FBS i glutamina (2 mmol L^{-1}). Uzgajane su u bocama za kulturu stanica T75 u CO_2 inkubatoru u uvjetima 37 °C, 5 % CO_2 i precjepljivane kada su dostigle 80 % konfluentnosti. Presađivanje stanica vršeno je prema gore opisanom postupku.

3.2. Metode

3.2.1. Rast i selekcija stanica na mekom agaru

Kako bi se odredila sposobnost stanica da rastu bez čvrste podloge, jedne od glavnih karakteristika maligne transformacije, korištena je metoda rasta na mekom agaru.[130] Za razliku od normalnih stanica koje ne mogu rasti bez čvrste podloge, transformirane stanice na površini mekog agara stvaraju kolonije.

Za izvođenje pokusa pripremljena je 1 %-tna otopina agaroze (w/v) mješanjem 2 %-tne otopine agaroze (w/v) u sterilnoj H_2O i odgovarajućeg staničnog medija u omjeru 1:1. Po 2 mL 1 %-tne otopine agaroze (w/v) dodano je u plastične ploče za uzgoj stanica sa 6 jažica.

PEC stanice su odvojene od podloge prema gore opisanom postupku i nasađene na površinu mekoga agara u koncentraciji 1 x 10^6 po jažici. Svakoj je jažici dodano po 2 mL odgovarajućeg medija koji je sadržavao 0,35 % agara (w/v). Ploče su inkubirane na 37 °C, 2-3 tjedna.

Nakon inkubacije, jažice su mikroskopski pregledane kako bi se utvrdilo postojanje kolonija na površini mekog agara ili stanica koje su prodrle kroz agar i nastavile rast pričvršćene za dno posude, tzv. „*soft agar invasive*“, SAI stanica. Ukoliko su SAI stanice bile prisutne, agar je pažljivo uklonjen, dodan je odgovarajući medij i nastavljen je uzgoj prema gore navedenom postupku.

3.2.2. Ispitivanje stanične proliferacije MTS testom

Određivanje stanične proliferacije izvršeno je pomoću MTS testa upotrebom *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, SAD). MTS test je kolorimetrijska metoda za određivanje broja živih stanica koje proliferiraju te za ispitivanje citotoksičnosti. Temelji se na redukciji žute tetrazolijeve soli, MTS (4-[5-[3-(karboksimetoksi)fenil]-3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2-il)tetrazol-3-ij-2-il] benzensulfonat) u tamno smeđi krajnji produkt formazan, u prisutnosti elektron akceptora fenazin-metosulfata (PMS), djelovanjem dehidrogenaza u metabolički aktivnim stanicama. Količina nastalog formazana direktno je proporcionalna broju živih stanica u kulturi i očitava se kao apsorbancija pri 490 nm.[131]

PEC stanice su nasađene u ploče za uzgoj (s 24 jažice) u koncentraciji 5 x 10^4 po jažici. Neposredno prije izvođenja pokusa iz svake je jažice uklonjen kondicionirani medij te je dodano po 125 μL svježeg medija. Potom je dodano 25 μL PMS/MTS otopine pripremljene prema uputama proizvođača. Ploče su inkubirane 1 sat na 37 °C. Iz svake je jažice izdvojeno 100 μL u jažice mikrotitarske pločice (s 96 jažica). Apsorbancija je očitana na 490 nm na Bio-Kinetics EL312 automatskom čitaču pločica (Bio-Tek, Winooski, VT, SAD).

3.2.3. Određivanje pokretljivosti stanica

Pokretljivost stanica ispitana je koristeći *Cellomics Cell Motility Kit* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, SAD) prema uputama proizvođača. *Cellomics Cell Motility Kit* omogućuje određivanje pokretljivosti stanica uvidom u tragove nastale njihovim migriranjem. Ispitivanje se izvodi nanošenjem stanica na sloj fluorescentnih mikroskopskih kuglica (*Blue Flourescent Beads*). Kako se stanice kreću kroz sloj, fagocitiraju i odguruju kuglice, ostavljajući iza sebe rasčišćeni trag.

Ukratko, fluorescentne mikroskopske kuglice nanešene su na površinu jažica presvučenih kolagenom mikrotitarske pločice s 96 jažica. U svaku je jažicu potom dodano 500 stanica u ukupnom volumenu od 100 μL PEC medija. Stanice su inkubirane 18 sati, fiksirane i obojane s faloidinom konjugiranim s rodaminom. Vizualizacija tragova migrirajućih stanica napravljena je fluorescentnom mikroskopijom na EIDAQ 100 (Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD).

3.2.4. Identifikacija i usporedba različito eksprimiranih signalnih proteina

Za identifikaciju i usporedbu različito eksprimiranih signalnih proteina u pojedinoj staničnoj liniji korišten je *Kinex antibody Microarray* (Kinexus Bioinformatic, Vancuver, Kanada). U toj se analizi uzorak ispituje na 812 antitijela od kojih je svako, u duplikatu, imobilizirano na pločicu. Njih 550 je pan-specifično i detektiraju ukupni protein, a 262 je fosfospecifično te vežu protein koji je fosforiliran na točno određenom mjestu.

Priprema staničnih lizata napravljena je prema uputama proizvođača. Svakom je uzorku određena koncentracija proteina spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu[132] te su poslani na analizu tvrtci Kinexus Bioinformatics (Vancuver, Kanada). Napravljene su usporedbe između WB i GP7TB stanica, te GP7TB i GP7TB.SAI stanica. Rezultati su prikazani u Excel tablici u kojoj su navedene razlike u ekspresiji proteina za pojedinu usporedbu. Razlike su izražene kao Z-omjer, statistička veličina izračunata iz Z-vrijednosti za pojedini protein. Z-vrijednosti služe za određivanje položaja pojedinog rezultata u skupini i računaju se prema formuli $Z = (x - \overline{X}) / SD$ pri čemu je x = intenzitet pojedine točke u uzorku, $\overline{X}$ = prosječna vrijednost intenziteta svih točaka u uzorku i SD = standardna devijacija intenziteta svih izmjerenih točaka u uzorku. Z-omjer se dobije podjelom razlike između prosječnih Z-vrijednosti za promatrani protein s SD svih razlika u određenoj usporedbi uzoraka. Vrijednosti Z-omjera veće od ± 1 smatraju se statistički značajnima pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na povećanje ekspresije, dok negativna vrijednost predstavlja smenjenje ekspresije.

Za klasifikaciju razlika u ekspresiji proteina dobivenih Kinex analizom korištena je baza DAVID Bioinformatics Resources 6.7 *(*eng. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*).[133]

3.2.5. Priprava staničnih lizata

Stanice su tretirane s 0,5% (v/v) otopinom tripsina u EGTA kako bi ih se odvojilo od površine. Odvojene stanice isprane su od ostatka medija dodatkom HBSS-a i kratko centrifugirane na 100 x *g* (Beckman CS-6R, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD). Stanice su potom lizirane pomoću pufera koji je sadržavao 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 % (w/v) natrijev deoksikolat, 1 % (w/v) SDS i 20 μL koktela inhibitora proteaza, vorteksirane i inkubirane na ledu u trajanju od 15 min. Netopljivi sadržaj je uklonjen cetrifugiranjem na 4000 x *g*, na 4 °C

u trajanju od 15 min. Postupak je ponovljen, te su dobiveni supernatanti spojeni. Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski metodom po Bradfordu.[132]

3.2.6. Indirektna imunofluorescencija

PEC subpopulacije su nasađene u svako polje predmetnice s dva polja (*permanox chamber slide*, Nalge Ninc International, Rochester, NY, SAD) u koncentraciji 1 x 10^5 stanica mL^{-1} i inkubirane 48-72 sata na 37 °C i 5 % CO_2. Stanice su potom tri puta isprane s PBS, fiksirane u ledeno hladnom acetonu 5 min na 4 °C i pohranjene na -80 °C do upotrebe.

Za provođenje indirektne imunofluorescencije (IIF), fiksirane predmetnice su inkubirane (blokirane) 10 min sa 1 %-tnom otopinom BSA/PBS (w/v) koja je sadržavala 10 % (v/v) NGS (*normal goat serum*, Sigma-Aldrich). Primarna i sekundarna tijela razrijeđena su u 1 % BSA/PBS sa 10 % NGS i inkubirana sa stanicama 45 minuta na sobnoj temperaturi. Korištena su primarna monoklonska antitijela OC.2[90] i OC.5,[91] razrijeđenje 1:1000, te sekundarna Alexa Fluor 488 kozji anti-mišiji IgG i Alexa Fluor 594 kozji anti-mišiji IgM.

Uzorci su ispitani fluorescentnom mikroskopijom pomoću Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, SAD) s montiranom kamerom u boji (SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, SAD).

3.2.7. Western blot analiza

Prvi korak u postupku je razdvajanje uzoraka SDS-poliakrilamid gel elektroforezom. U svaku je jažicu gela naneseno 20 μg proteina. Nakon razdvajanja proteini su sa gela prebačeni na nitroceluloznu membranu (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) upotrebom uređaja za polusuhi transfer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) u trajanju od 30 min pri 25 V. Pufera za polusuhi transfer sadržavao je 48 mM Tris-HCl, 39 mM glicin i 20% (v/v) metanol. Membrana je potom tretirana s 5 % -tnom (w/v) otopinom mlijeka u prahu u PBS-u. Nakon ispiranja inkubirana je 1 sat s primarnim antitijelom, isprana te potom inkubirana sa sekundarnim, HRP-konjugiranim anti-IgG. Vezani je HRP vizualiziran kemoluminiscencijom pomoću *SuperSignal West Pico* supstrata (Pierce, Rockford, IL, SAD) prema uputama proizvođača.

3.2.8. Ispitivanje tumorogeničnosti in vivo

Ispitivanje i uspoređivanje tumorogeničnosti pojedinih PEC subpopulacija (mali, srednji, veliki broj precjepljivanja i SAI) *in vivo* provedeno je na 4-6 tjedana starim ženkama Bg/Nu/XID (eng. *beige/nude/xid triple deficient mice*) miševa (15-18 g) (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, SAD). Tijekom istraživanja životinje su boravile u kavezima pod kontroliranim uvjetima (periodična izmjena svjetla svakih 12 sati, temperatura 24 °C) sa slobodnim pristupom (*ad libitum*) hrani i vodi.

Istraživanje je provedeno prema pravilniku odobrenom od *Rhode Island Hospital Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC), Providence, RI, SAD.

Korištena metoda određivanja tumorogeničnosti *in vivo* prethodno je opisana u Rozich i sur.[134] Stanice su uzgojene u T 75 do približno 80 % konfluentnosti te tripsinizirane sa otopinom tripsin/EGTA i isprane dva puta s HBSS. 1 x10^7 stanica suspendiranih u HBSS injektirano je u lijevi prednji bok miševa. Miševi su nadzirani svakodnevno u periodu od maksimalno jednog mjeseca. Injektirano je minimalno tri životinje za svaku subpopulaciju PEC stanica.

U trenutku žrtvovanja, tumori su izmjereni, uklonjeni, izvagani i zamrznuti u smjesi heksan/aceton te pohranjeni na –80 °C.

3.2.9. Izolacija i transmisijska elektronska mikroskopija EV

EV iz WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanica, izolirane su iz kondicioniranog medija 3-4 dana nakon presađivanja stanica. Medij je prvo centrifugiran 10 min na 600 x *g* (Beckman CS-6R, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD) kako bi se uklonile cijele stanice kao i njihovi drugi ostaci. Dobiveni supernatant je potom centrifugiran u ultracentrifugi (Beckman L7-65, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD) 1 sat na 100 000 x *g* na 4 °C, kako bi se izdvojile EV. Dobiveni je talog resupendiran u sterilnom PBS-u i pohranjen na –80 °C.

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) napravljena je u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju bolnice Rhode Island (*Rhode Island Hospital Electron Microscopy Facility*). Ukratko, uzorci su fiksirani s 3 %-tnim (v/v) glutaraldehidom u 0,15 M fosfatnom puferu te post-fiksirani u 1 %-tnoj otopini osmijevog tetraoksida. Potom su izrezani na kockice veličine 1,5 mm, prekriveni s 3 %-tnom otopinom agara, dehidrirani ispiranjem s acetonom i uklopljeni u Spurr smolu (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Napravljeni su ultratanki rezovi

koji su promatrani elektronskim transmisijskim mikroskopom (Morgagni 268, Fei™, Hillsboro, OR, SAD).

3.2.10. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a

Za izvođenje SDS-elektroforeze korišteni su gotovi 4–12% Bis-Tris gelovi (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i uređaj za vertikalnu elektroforezu Xcell Sure Lock Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD). Uzorci, koji su sadržavali jednaku količinu proteina (15-20 μg), pomiješani su s puferom za nanošenje uzoraka NuPage (sastav: 106 mM Tris HCl; 141 mM Tris; 2% SDS; 10% glicerol; 0,51 mM EDTA; 0,22 mM SERVA Blue G250; 0,175 mM Phenol Red; pH 8,5) kojemu je dodan NuPage reducirajući agens (50 mM ditiotreitol, DTT). Tako pripremljeni uzorci zagrijavani su 5 min na 100 °C.

Uzorci su nanešeni u jažice gela svaki u ukupnom volumenu od 30 μL. Elektroforeza je vođena u NuPage SDS-puferu sastava 50 mM MES; 50 mM Tris-HCL; 0,1% SDS; 1 mM EDTA; pH 7,3 pri konstantnom naponu od 200 V.

Detekcija proteina izvršena je inkubacijom gela 1 sat u otopini *Gel Code Blue Stain* (Pierce, Rockford, IL, SAD) uz potresanje na rotacijskoj platformi. Kako bi se uklonila nevezana boja, gel je inkubiran 2 x 30 min u destiliranoj vodi uz potresanje na rotacijskoj platformi.

3.2.11. Digestija uzoraka u gelu

Nakon razdvajanja proteina SDS-elektroforezom, dobivene trake, koje odgovaraju pojedinim uzorcima podjeljene su u 5 vrpci kako bi se smanjila kompleksnost uzorka za analizu masenom spektrometrijom. Svaka vrpca je potom izrezana na sitne kockice i podvrgnuta postupku digestije u gelu (eng. *„in-gel" digestion*).

Izrezani komadići gela isprani su prvo s vodom visokog stupnja čistoće, a potom sa smjesom 1:1 (v/v) 0,1 M NH_4HCO_3 i acetonitrila u trajanju od 15 min uz potresanje. Dodane količine bile su otprilike dvostruko veće od volumena komadića gela. Nakon ispiranja, uklonjena je tekućina te je dodan acetonitril u količini koja je prekrila sve komadiće gela. Kada su se svi komadići gela skupili i slijepili, uklonjen je acetonitril te se dodatkom 0,1 M NH_4HCO_3 izvršila rehidratacija gela u trajanju od 10 min. Potom je dodana jednaka količina acetonitrila

kako bi se postigao omjer 1:1 v/v. Nakon inkubacije 10 min, uklonjena je sva tekućina te su komadići gela osušeni u vakuum centrifugi.

Reduciranje proteina izvršeno je dodatkom 10 mM DTT u 0,1 M NH_4HCO_3 , 45 min na 56 °C, te potom alkilirano sa 55 mM jodoacetamidom u 0,1 M NH_4HCO_3, 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon redukcije i alkiliranja, komadići gela isprani su ponavljanjem postupka opisanog u prethodnom odlomku.

Poslije ispiranja, proteini u gelu su podvrgnuti razgradnji tripsinom (Sigma). Svakom je uzorku dodano 30 μL otopine tripsina koncentracije 20 μg L^{-1} te su 24 sata ostavljeni na 37 °C. Peptidi zaostali u gelu su izdvojeni dodatkom 25 mM NH_4HCO_3 kojemu je nakon inkubacije od 10 min dodana jednaka količina acetonitrila. Postupak je potom dva puta ponovljen s 5 %-tnom mravljom kiselinom i acetonitrilom. Svi su ekstrakti spojeni s tripsinskim ekstraktom i osušeni u vakuum centrifugi.

3.2.12. Masena spektrometrija EV

Proteoma EV određen je pomoću masene spektrometrije. Uzorci su prvo razdvojeni SDS-elektroforezom te je izvršena digestija uzoraka u gelu prema gore navedenim postupcima. Nakon digestije, dobiveni su peptidi analizirani pomoću LC-ESI-MS/MS (*eng.* liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry) masene spektrometrije na QSTAR XL masenom spektrometru (Sciex and Applied Biosystems, Concord, Ontario, Kanada) kako je prethodno opisano.[135,136] Ukratko, triptički su peptidi prvo razdvojeni kromatografijom na reverzno-faznom stupcu (C-18 PepMap 100, LC Packings/Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). Primijenjeni separacijski gradijent počinjao je s 5 %-tnim (v/v) acetonitrilom (ACN) u mravljoj kiselini (otopina A) i završavao s 95 %-tnim ACN u 0,1 % (v/v) mravljoj kiselini (otopina B). Eluat je direktno ubrizgan pomoću ESI u QSTAR XL maseni spektrometar. Proteini su identificirani pomoću programa ProteinPilot (Sciex and Applied Biosystems, Concord, Ontario, Kanada).

Identificirani su proteini prikazani u tablici s dobivenim postotkom združivanja (eng. *protein score*). Postotak združivanja predstavlja mjeru pouzdanosti identifikacije određenog proteina. Primjerice, *protein score* = 1,3 znači da je protein točno identificiran s 95 %-tnom vjerojatnošću, dok je za *protein score* = 2 ta vjerojatnost 99 %.[106]

3.2.13. Izolacija prirodnih stanica ubojica (NK) iz jetara i slezene štakora

NK stanice izolirane su iz 6-8 tjedana starih Fischer 344 štakora (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Jetra i slezena su uklonjene u sterilnim uvjetima i isprane s PBS. Suspenzije stanica dobivene su protiskivanjem tkiva s malom količinom sterilnog PBS kroz stanični filter (*Falcon cell strainer*, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) u epruvetu od 50 mL. Dodana je količina sterilnog PBS sobne temperature u omjeru 1:1.

Potom je polagano, pipetom, na dno epruvete dodano 10 mL Fico/Lite-LR (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA, SAD). Fico/Lite-LR je medij s gradijentom gustoće koji se koristi za pročišćavanje stanica pri tome ih štiteći od štetnog utjecaja visokog osmotskog tlaka. Tako pripremljeni uzorci cetrifugirani su 30 min na 2500 okretaja min^{-1} u centrifugi s ljuljajućim košaricama (Beckman CS-6R, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD). Nakon centrifugiranja vidljiva su tri sloja. U središnjem se sloju nalaze limfociti i NK stanice dok su u gornjem (Fico) sloju uklonjeni eritrociti i granulociti. Većina najgornjeg sloja je pažljivo uklonjena te se međusloj aspirirao s pipetom. U preostali donji sloj se dodalo novih 10 mL Fico/Lite-LR te se ponovio postupak pročišćavanja. Međuslojevi su se spojili u novu epruvetu i isprali dva puta s dvostrukom količinom PBS-a te centrifugirali 10 min na 2500 okretaja min^{-1} (Beckman J2-21 M/E, Beckman Coulter Inc., Indianapolis, IN, SAD). Dobiveni talog resuspendiran je s 1 mL otpine PBS koja je sadržavala 0,5 % (w/v) BSA i 2 mM EDTA.

Upotrebom antitijela za pojedine glikoproteinske komplekse (CD markere) karakteristične za pojedinu skupinu stanica uklonjene su neželjene stanice. Korištena su antitijela: anti-CD5 (mAb, IgG, domaćin miš, Pharmingen, San Diego, CA, SAD), za uklanjanje T-limfocita i dijela B limfocita, anti-CD45R (mAb, IgG, domaćin miš, Abcam®, Cambrige, MA, SAD), za uklanjanje B-limfocita i anti-CD80 (B7-1), (mAb, IgG, domaćin miš, eBioscience, Inc., San Diego, CA, SAD) za uklanjanje makrofaga i dendritičkih stanica. U ukupni volumen od 1 mL uzorka dodano je po 3 μL od svakog navedenog antitijela nakon čega je slijedila inkubacija na 4 °C u trajanju od 30 min.

Za uklanjanje stanica vezanih na primarna antitijela korištene su BioMag magnetne mikrokuglice s imobiliziranim anti-mišjim IgG (Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, SAD). Korišteno je 500 μL suspenzije magnetnih mikrosfera koje su prvo isprane s PBS kako bi se uklonio pufer. Isprane mikrosfere su dodane uzorku i inkubirane 20 min na 4 °C. Nakon

inkubacije, mikrosfere s vezanim primarnim antitijelima uklonjene su pomoću magneta. Dobiveni je uzorak sadržavao pročišćene NK stanice.

3.2.14. Mjerenje citotoksičnosti NK stanica metodom otpuštanja radioaktivnog ^{51}Cr

Citotoksičnost NK stanica, tj. njihova sposobnost ubijanja ciljnih stanica, mjerena je metodom otpuštanja radioaktivnog kroma (^{51}Cr) kojim su obilježene ciljne tumorske stanice. Kao ciljne stanice upotrebljene su YAC-1 tumorske stanice (ATCC, Rockville, MD, SAD), stanična linija nastala iz limfoma miša.

Označavanje tumorskih stanica provedeno je na način da je 5 x 10^6 YAC-1 stanica obilježeno sa 5.55 MBq (150 μCi) $Na_2{}^{51}CrO_4$ (Perkin Elmer, Waltham, MA, SAD) na 37 °C u trajanju od 60 min. Prije inkubacije sa tako obilježenim stanicama, NK stanice su inkubirane s ili bez (kontrola) membranskih vezikula (iz pojedinih staničnih linija) 60 min na 37 °C.

Test citotoksičnosti proveden je u duplikatu na mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD). Efektorske NK stanice (E) inkubirane su sa ciljnim (T) YAC-1 stanicama u omjerima E:T = 1:1, 2.5:1, 5:1 i 10:1 u ukupnom volumenu od 200 μL. Nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od 4 sata, gama-brojačem je određena radioaktivnost svakog supernatanta pojedinačno. Rezultati su prikazani kao postotak otpuštenog radioaktivnog kroma (^{51}Cr).

3.2.15. Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni pomoću programa *Statistica for Windows v. 8.0*. Na grafikonima su prikazane srednje vrijednosti dobivene iz naznačenog broja uzoraka dok su odstupanja izražena kao standardna devijacija (SD).

Za određivanje statistički značajne razlike korišten je t-test pri čemu su vrijednosti $p < 0,05$ smatrane statistički značajnima.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Spontana neoplastična transformacija epitelnih stanica prostate štakora i selekcija subpopulacije stanica na mekom agaru

Proces maligne transformacije stanica u kulturi često se koristi kao model za proučavanje razvoja i progresije raka. Tako su primjerice u istraživanjima koja su prethodila ovome radu Rozich i sur.[134] otkrili da se u epitelnim stanicama žučovoda štakora (BDEC), s povećanjem broja precjepljivanja nakupljaju neoplastične karakteristike koje su između ostalog potrebne za indukciju rasta neovisnog o čvrstoj podlozi *in vitro* te za sposobnost stvaranja tumora *in vivo*. BDEC su do srednjeg pasaža (p35–84) pokazivale promjene u morfologiji, početak aneuploidnosti, povećanu brzinu rasta neovisnog o faktorima rasta, smanjenu staničnu adheziju te gubitak kolangiocitnih markera eksprimiranih na BDEC stanicama niskog pasaža ($p < 35$). Pri visokom broju pasaža ($p > 85$), BDEC su pokazivale sposobnost rasta na mekom agaru te su imale sposobnost stvaranja tumora nakon injektiranja u miševe bez imunosnog sustava.

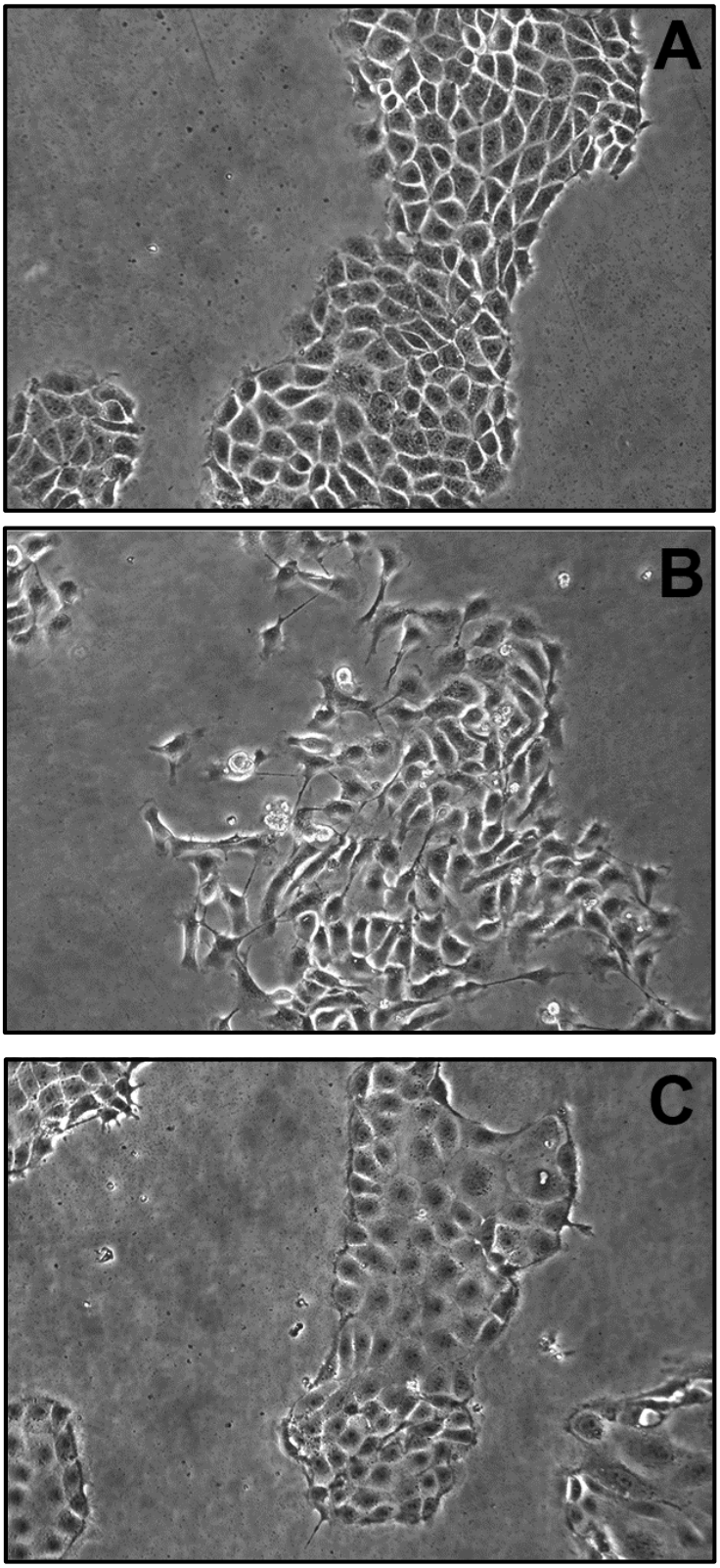
U ovom je radu opisan sličan *in vitro* model spontane transformacije kontinuirane linije epitelnih stanica prostate štakora (PEC, eng. *prostate epithelial cells*) uspostavljene iz dorso-lateralnog režnja prostate bez imortalizacije ili prethodnog tretiranja karcinogenima.[61] Ova se stanična linija ističe po tome što su u mnogim protokolima koji opisuju dugotrajno održavanje stanica u kulturi štakori tretirani s karcinogenima prije izolacije stanica ili su pak izolirane stanice imortalizirane pomoću metoda s rekombinantnom DNA. Ona se samim porijeklom razlikuje od mnogih do sada opisanih primarnih epitelnih staničnih linija prostate koje su većinom izolirane iz ventralnog režnja. Među razlozima davanja prednosti ventralnom režnju su mala veličina i nedostatak izraženih individualnih karakteristika dorsalnog i lateralnog režnja. Međutim, dorso-lateralna regija prostate štakora sklonija je razvoju spontanih i induciranih neoplazmi te je najsličnija upravo perifrnoj zoni prostate čovjeka u kojoj se najčešće javljaju karcinomi.[11,44]

4.1.1. Morfološke promjene epitelnih stanica prostate štakora uslijed kontinuiranog precjepljivanja

Ranija su istraživanja pokazala da neoplastičnom transformacijom u kulturi dolazi do značajnih promjena u morfologiji stanica.

Pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa ispitali smo postoje li razlike u morfologiji između PEC stanica različitog broja pasaža. Na slici 5. se može vidjeti da je, uslijed kontinuiranog precjepljivanja u normalnim uvjetima uzgoja, došlo do vidljivih promjena u morfologiji. PEC niskog pasaža (p29) su poligonalnog oblika i tvore gusto zbijene strukture stanica u jednom sloju na plastičnoj površini. Nasuprot tomu PEC visokog pasaža (p102) su vretenastog oblika, manje zbijene te su više nasumično organizirane u odnosu na PEC niskog pasaža.

Vezu između morfoloških karakteristika i tumorogenog potencijala stanica pokazali su Hooth i sur.[137] u svom modelu spontane transformacije već spomenutih WB stanica. Oni su otkrili da klonovi s normalnom morfologijom nisu uspjeli potaknuti razvoj tumora u imunodeficijentnim miševima dok su oni s promjenjenim morfološkim karakteristikama bili tumorogeni.

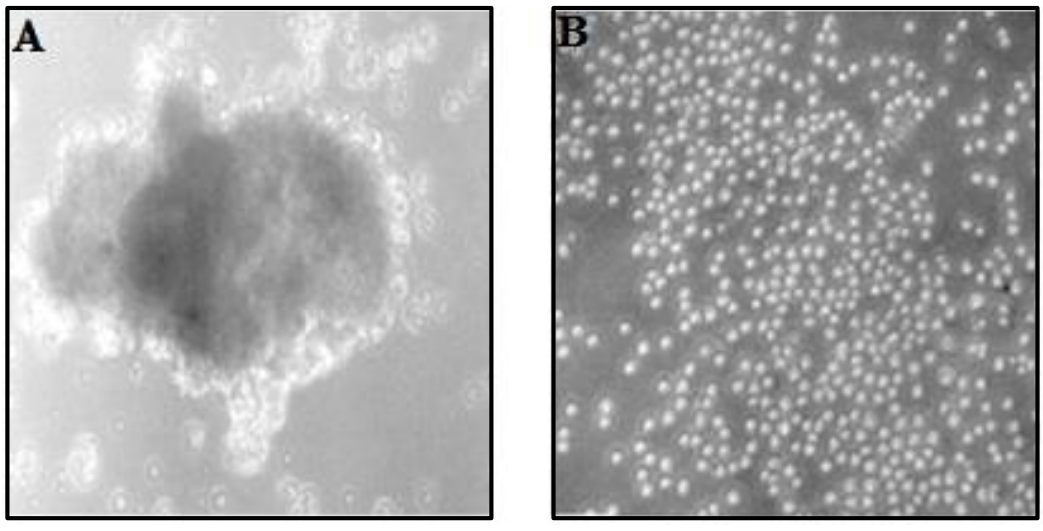


Slika 5. Morfologija PEC stanica niskog, p29 (A) i visokog, p102 (B) broja precjepljivanja, te stanica koje su prošle kroz meki agar (C).

4.1.2. Ispitivanje rasta neovisnog o čvrstoj podlozi i detekcija subpopulacije invazivne na mekom agaru

Sposobnost transformiranih stanica da proliferiraju bez adhezije na čvrstu podlogu *in vitro* u velikoj je mjeri povezana s tumorogeničnosti stanica *in vivo*. To upućuje na to da su molekularni mehanizmi koji sudjeluju u rastu neovisnom o čvrstoj podlozi vjerojatno povezani s nekim od mehanizama koji čine osnovu agresivnog rasta, karakterističnog za karcinome.[17,138]

Kako bi ispitali sposobnost rasta neovisnog o čvrstoj podlozi PEC stanice niskog, srednjeg i visokog pasaža suspendirane su u kompletnom mediju i nanesene na površinu 1 %-tnog mekog agara. PEC visokog pasaža su nastavile rasti na površini mekog agara stvarajući velike sferoidne agregate (Slika 6. A). Stanice niskog i srednjeg pasaža nisu stvarale prepoznatljive kolonije nakon kulture na mekom agaru i nisu preživjele (Slika 6. B). Takvi su rezultati u skladu s onima dobivenim za model spontane transformacije BDEC stanica.[134] Kako je gotovo svim tipovima netransformiranih stanica potrebna adhezija na čvrstu podlogu da bi preživjeli i proliferirali ovi rezultati upućuju na to su PEC visokog pasaža stekle jednu od karakteristika maligne transformacije.



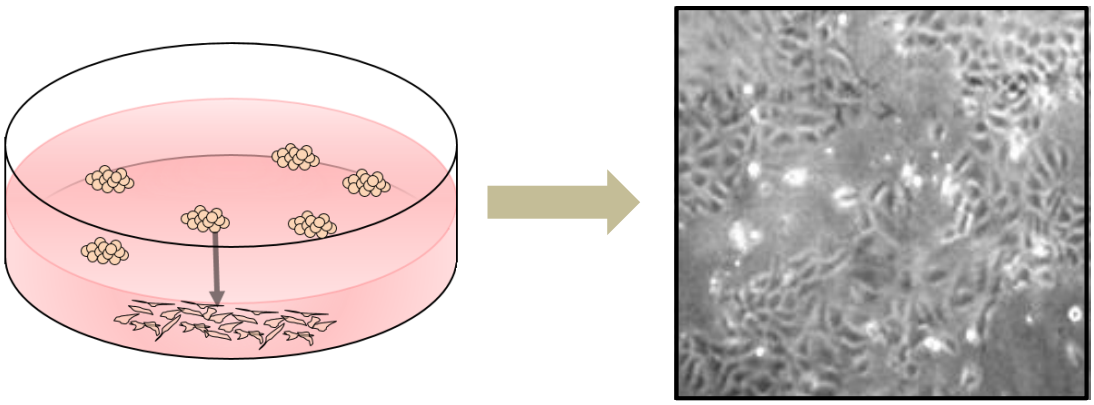
Slika 6. Stanice visokog broja pasaža su neovisne o rastu na čvrstoj podlozi i na površini mekog agara tvore kolonije (A). Stanice niskog i srednjeg pasaža nisu preživjele bez čvrste površine (B).

4.1.2.1. Izdvajanje subpopulacije stanica sa sposobnošću prodiranja kroz meki agar

Provodeći eksperiment ispitivanja sposobnosti rasta na mekom agaru, otkriveno je da je dio PEC stanica visokog pasaža migrirao kroz sloj mekog agara, pričvrstio se za plastičnu podlogu posude za uzgoj stanica i nastavio proliferirati prema modelu na slici 7. Koliko nam je poznato ovakva subpopulacija stanica nije do sada otkrivena.

Fazno-kontrastna mikroskopija je pokazala da se morfologija tih, stanica invazivnih na mekom agaru (SAI, eng. *soft agar invasive*) razlikuje od stanica i niskog i visokog pasaža (slika 6. C i slika 7.). Kako je vidljivo na slici 6. C, SAI stanice pokazuju morfološke karakteristike između onih za PEC niskog i visokog pasaža. Tako su izgubile vretenast oblik karakterističan za stanice visokog pasaža te su više zbijene i organizirane sličnije stanicama niskog pasaža. Selekcija SAI subpopulacije specifična je za stanice visokog pasaža neovisnih o rastu na čvrstoj podlozi i nije otkrivena kod stanica manjih broja precjepljivanja ($p < 85$) za čiji je rast neophodna čvrsta podloga.

Stanice SAI subpopulacija uključene su u daljnje analize kako bi se pobliže okarakterizirale i usporedile sa stanicama od kojih su potekle.

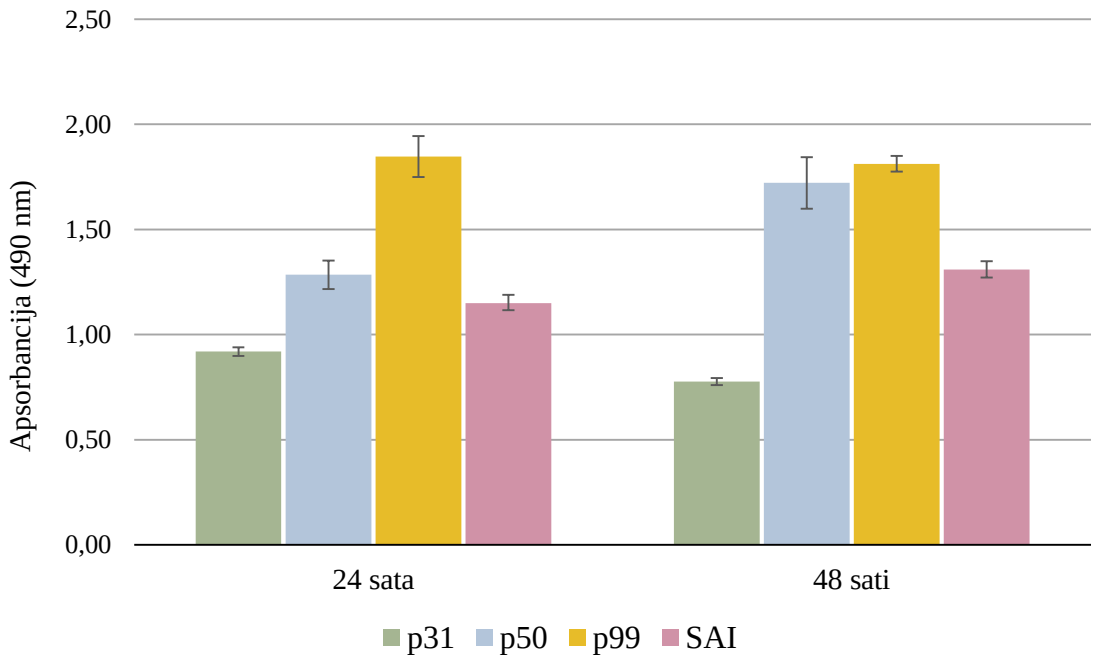


Slika 7. Model PEC invazivne populacije koja prolazi kroz meki agar. Stanice visokog broja precjepljivanja rastu neovisno o čvrstoj podlozi i stvaraju kolonije na ili u mekom agaru. Mala subpopulacija stanica prolazi kroz meki agar i nastavlja proliferirati na plastičnoj podlozi.

4.1.3. Određivanje i uspoređivanje brzine proliferacije PEC stanica

Kako je već spomenuto u literaturnom pregledu (odlomak 2.1.), neoplastične stanice vrlo često pokazuju znatno veće brzine proliferacije u odnosu na normalne stanice. Kako bi ispitali da li su PEC stanice stekle ovu karakteristiku transformacije, pomoću MTS testa, određene su brzine rasta PEC različitog broja precjepljivanja te SAI stanica.

Rozich i sur.[134] su pokazali da su BDEC visokog pasaža proliferirale znatno brže od onih niskog pasaža. Takvo povećanje proliferacije stanica s visokim brojem precjepljivanja uočeno je i kod PEC. Kako je prikazano na slici 8. nakon 24 sata PEC visokog pasaža (p99) pokazivale su gotovo dvostruko veću brzinu rasta u usporedbi sa stanicama niskog i srednjeg pasaža (p31 i p50). Nasuprot tome, SAI stanice izdvojene iz PEC visokog pasaža p92 pokazivale su smanjenje brzine proliferacije u odnosu na neselektirane stanice visokog pasaža te je njihova brzina rasta bila tek nešto malo veća od brzine rasta PEC niskog pasaža. Sličan trend zabilježen je i nakon 48 sati iako su stanice srednjeg pasaža tu pokazivale veću brzinu rasta sličniju onoj neselektiranih PEC visokog pasaža.



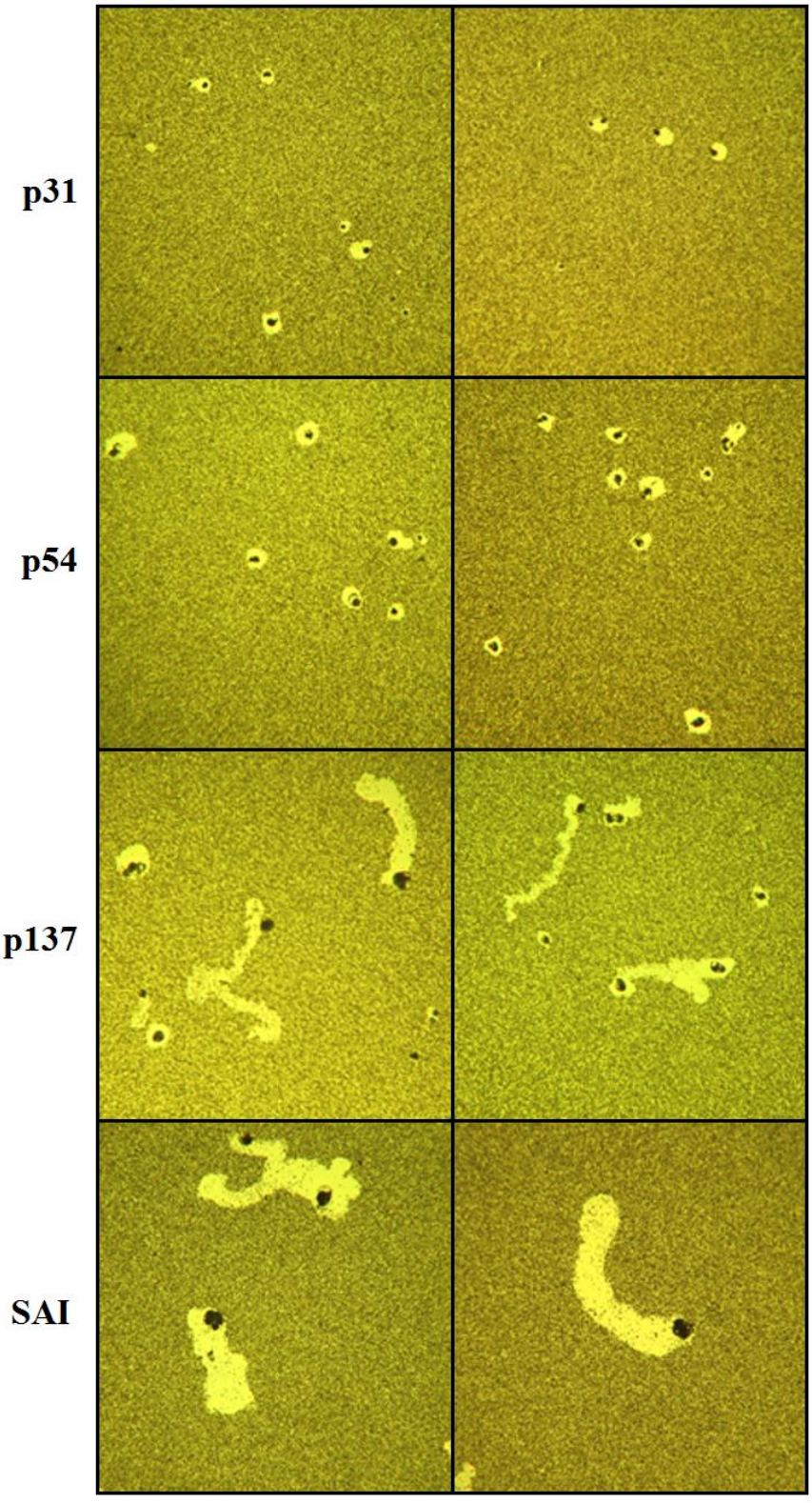
Slika 8. Apsorbancija (490 nm) koja je proporcionalna brzini proliferacije PEC niskog, srednjeg i visokog pasaža te SAI stanica izmjerena nakon 24 i 48 sati MTS testom. Napravljena su 4 replikata za svaku populaciju. Odstupanja su iskazana kao SD.

Ovo je još jedna potvrda da su PEC stanice stekle transformirani fenotip uslijed velikog broja precjepljivanja. Interesantno je da je kod SAI stanica uočeno smanjenje brzine rasta što dodatno upućuje na to da je na mekom agaru izolirana subpopulacija koja se razlikuje od PEC visokog pasaža iz kojih je izdvojena. Kako je već spomenuto u odlomku 2.1.1., prema nekim teorijama, tumori sadrže specifične subpopulacije kao što su tumorske matične stanice kojima je jedna od karakteristika upravo usporena proliferacija u odnosu na ostale stanice tumorske mase. Prema tome se može postaviti hipoteza da SAI stanice dijele neka obilježja upravo tih stanica.

4.1.4. Ispitivanje pokretljivosti stanica

Kako je povećanje pokretljivosti jedna od *in vitro* karakteristika koja se često povezuje s invazivnim rastom *in vivo*[17,22] željelo se ispitati pokazuju li PEC visokog pasaža i SAI stanice veći motilitet u odnosu na PEC niskog i srednjeg pasaža. Iz slike 9 se može zaključiti da te stanice uistinu posjeduju i ovu osobinu malignih stanica. Naime, PEC niskog (p31) i srednjeg pasaža (p54) su bile slabo pokretljive i napravile su tek neznatni trag na sloju fluorescentnih mikroskopskih kuglica nanešenih na dno posude. Nasuprot tome, PEC visokog pasaža (p137) i SAI stanice su ostavile značajan trag što upućuje na njihovu izrazitu pokretljivost.

Pokretljivost tumorskih stanica jedan je od osnovnih preduvjeta progresije karcinoma u invazivni i metastazirajući tip. Povećanje pokretljivosti transformiranih stanica uočeno je u nizu modela koji opisuju malignu transformaciju[139,140]. Među ostalima je pokazano da i stanice humane stanične linije epitela prostate, RWPE-1, nakon tretiranja s karcinogenom vazoaktivnim intestinalnim peptidom (VIP, eng. *Vasoactive intestinal peptide*), pokazuju povećanu pokretljivosti u odnosu na normalne, netransformirane stanice.[139]

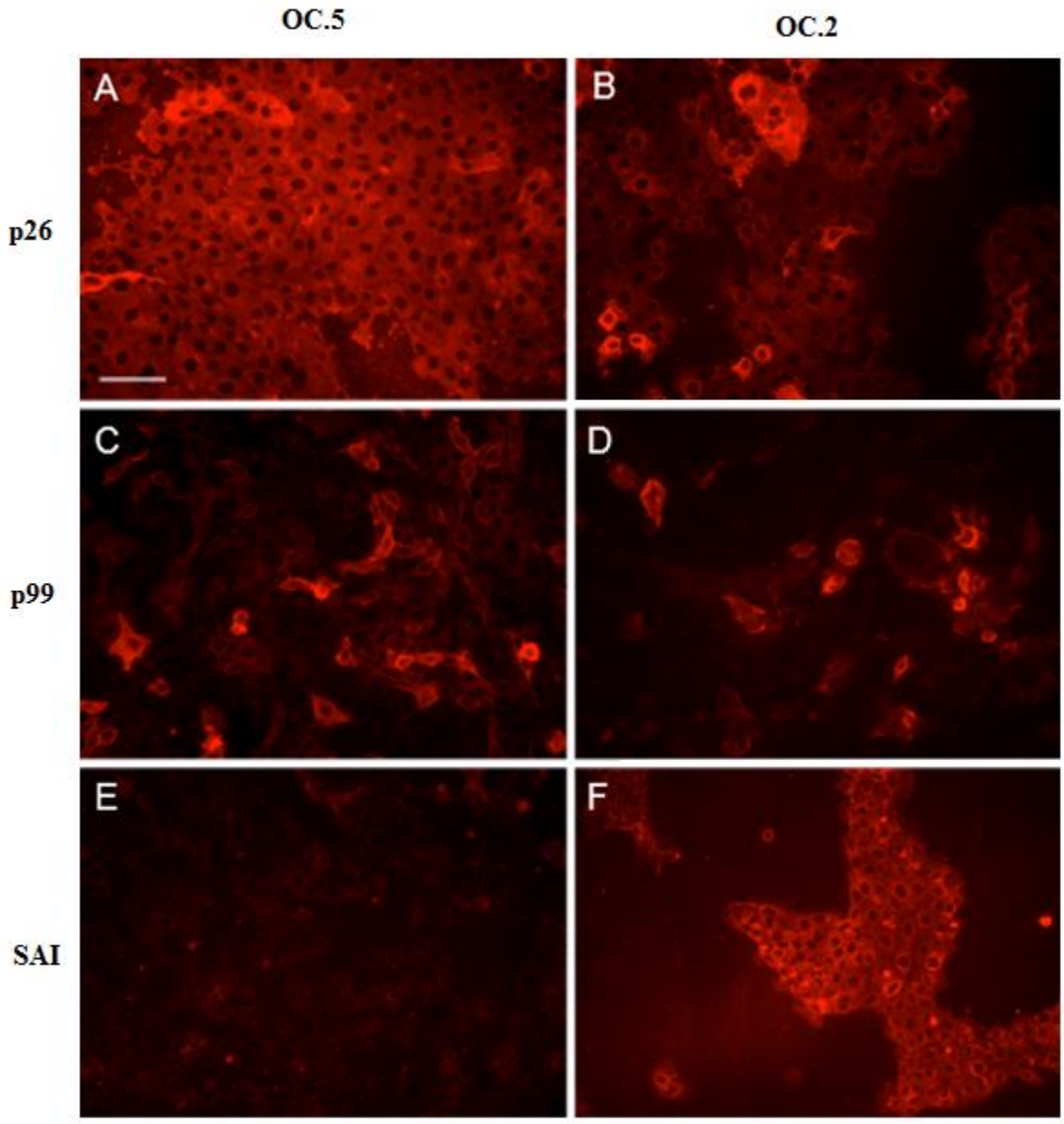


Slika 9. Pokretljivost stanica u različitim stupnjevima transformacije praćena pomoću *Cellomics Cell Motility* kompleta. Prikazana su po dva uzorka za svaku subpopulaciju: PEC niskog (p31), PEC srednjeg (p54) i visokog pasaža (p137) te SAI

4.1.5. Promjene u ekspresija kolangiocitnih markera na PEC tijekom transformacije i invazije na mekom agaru

Dosada je već pokazano da stanice epitela prostate reagiraju s monoklonskim antitijelima prvobitno pripravljenim za normalne i karcinogenima tretirane epitelne stanice jetrenih kanalića.[88,90,91] Ta činjenica ne iznenađuje jer je prostata poput jetara izvedena iz endoderma i sadrži složenu mrežu kanalića.[79,91]

S obzirom da je za BDEC otkriveno da dolazi do promjena u profilu antigena na površini stanica kako one napreduju od niskog do visokog pasaža te u nastojanju da se što bolje okarakterizira ovdje predstavljeni model transformacije, PEC su metodom indirektne imunofluorescencije ispitane na prisutnost kolangiocitnih markera OC.2 i OC.5. Kako je vidljivo na slici 10. gotovo su sve stanice PEC niskog (p28) pasaža bile pozitivne na OC.5 dok je samo mali postotak pokazivao ekspresiju OC.2. Mala ekspresija OC.2 zabilježena je i kod stanica visokog pasaža (p99). Međutim, te su stanice pokazivale značajno smanjenje ekspresije OC.5 u odnosu na PEC niskog pasaža. Zanimljivo je da se OC.5 potpuno gubi u SAI populaciji čije su sve stanice bile pozitivne na OC.2. Ovakvi rezultati dovode do zaključka da SAI populacija pokazuje novi, specifični antigenski fenotip ($OC.2^{+}/OC.5^{-}$). Identitet tih reaktivnih antigena za sada je nepoznat i radi se na njegovom otkrivanju. No, kako je spomenuto u literaturnom pregledu (odlomak 2.3.3.), dosadašnja istraživanja upućuju na to da bi te molekule mogle imati ulogu u diferencijaciji i karcinogenezi stanica raka prostata. Također, s obzirom na njihovu lokalizaciju na površini stanice, ti bi antigeni mogli pridonijeti nastojanjima izolacije specifične subpopulacije stanica u daljnjim istraživanjima.



Slika 10. Ekspresija kolangiocitnih markera OC.2 i OC.5 na PEC niskog (p26) i visokog (p99) pasaža te SAI stanicama dobivena metodom indirektne imunofluorescencije

4.1.6. Promjene u ekspresiji signalnih proteina

Putovi stanične signalizacije čine vrlo složenu mrežu molekula putem kojih se u stanici prenose različite informacije. Te informacije stanica prima pomoću različitih molekula smještenih na površini poput receptora faktora rasta i reguliraju razne procese kao što su sinteza proteina, proliferacija, diferencijacija, apoptoza i sl. U mnogim je istraživanjima pokazano da je nastanak tumora i njegova progresija povezana s promjenama u regulaciji i ekspresiji velikog broja signalnih proteina.[5,17,66,92] Te promjene dovode do narušavanja normalnih staničnih procesa i omogućuju stanicama raka stjecanje osobina poput neograničenog rasta, invazije u druga tkiva i izbjegavanja apoptoze. Zbog toga se ekspresije mnogih signalnih proteina često koriste kao prognostički biomarkeri.

Iako molekularni mehanizmi koji potiču progresiju raka prostate nisu u potpunosti poznati, do sada je zabilježeno niz promjena u ekspresiji signalnih proteina uključujući i povećanu ekspresiju nekoliko faktora rasta i njihovi receptora, posebice EGFR-a.[5,6,141] Kako bi se odredilo postoje li razlike u ekspresiji proteina koji sudjeluju u putovima za prijenos staničnih signala, a koji bi mogli biti povezani sa spontanom transformacijom (od niskog do visokog pasaža) ili sposobnošću selekcije jedinstvene subpopulacije transformiranih PEC na mekom agaru, ispitana je reaktivnost staničnih lizata na Kinexusovoj mreži antitijela za signalne proteine. Napravljena je usporedba u parovima između staničnih lizata PEC stanica niskog i visokog pasaža, te između PEC visokog pasaža i SAI stanica.

Usporedba PEC stanica niskog i visokog pasaža pokazala je ukupno 31 različito eksprimirani protein. Od toga je 29 proteina imalo povećanu dok je samo 2 proteina imalo smanjenu ekspresiju u stanicama visokog u odnosu na stanice niskog pasaža. Znatno više različito eksprimiranih signalnih proteina otkriveno je usporedbom SAI stanica sa stanicama visokog pasaža. Tako je 33 proteina imalo povećanu, a 43 proteina smanjenu ekspresiju u SAI stanicama u odnosu na stanice visokog pasaža. Te razlike u ekspresiji signalnih proteina dodatno upućuju na to da se invazijom na mekom agaru izdvojila jedinstvena subpopulacija neoplastičnih stanica neovisnih o rastu na čvrstoj podlozi. Radi preglednosti dio je identificiranih proteina prikazan u tablicama 1. i 2., dok se cjeloviti popis proteina nalazi u dodatku.

Tablica 1. Različito eksprimirani signalni proteini identificirani Kinexus analizom u stanicama visokog pasaža (PEC-H) u usporedbi sa stanicama niskog pasaža (PEC-L). Vrijednosti Z-omjera veće od ± 1 smatraju se statistički značajnima pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na povećanje ekspresije, dok negativna vrijednost predstavlja smenjenje ekspresije.

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Puni naziv proteina	Z-omjer (PEC-H, PEC-L)
PDK1	**S241**	**Fosfoinozitid-ovisna kinaza 1**	**7,15**
PKC ξ/λ	**T410/T412**	**Protein kinaza-C zeta/lambda**	**3,86**
EGFR	**Y1197**	**Receptor epidermalnog faktora rasta**	**3,30**
p38g MAPK (Erk6)	Pan-spec	Mitogenom aktivirana protein kinaza p38 gama (MAPK12)	**3,01**
PKA R2a	Pan-spec	Serinska kinaza ovisna o cAMP-u, regulatorna podjedinica 2, alfa	**2,62**
ASK1 (MAP3K5)	Pan-spec	Kinaza proteina za regulaciju apoptoze	**2,58**
IGF1R	Pan-spec	Receptor kinaza faktora rasta sličnog inzulinu	**2,55**
ErbB2 (HER2)	Pan-spec	ErbB2 (Neu) receptor kinaza	**2,24**
Cyclin D1	Pan-spec	Ciklin D1	**2,22**
PI4KCB	Pan-spec	Kinaza fosfatidilinozitola, beta podjedinica	**2,06**
MEK2 (MAP2K2)	Pan-spec	MAPK/ERK protein kinaza 2 (MKK2)	**1,97**
CDK10	Pan-spec	Kinaza ovisna o ciklinu 10 [PISSLRE]	**1,84**
p21 CDKI1	Pan-spec	Inhibitor 1 kinaze ovisne o ciklinu (MDA6)	**1,67**
RSK1/3	T359+S363/ T356+S360	Kinaza ribosomskog proteina S6 1/3	**1,67**
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogenom aktivirana protein kinaza p38 gama alfa	**1,65**
CDK6	Pan-spec	Kinaza ovisna o ciklinu 6	**1,57**
Hsp90a/b	**Pan-spec**	**Protein toplinskog šoka 90 kDa alfa/beta**	**-1,54**
ROKb (ROCK1)	**Pan-spec**	**Kinaza RhoA proteina beta**	**-1,57**

Tablica 2. Različito eksprimirani signalni proteini identificirani Kinexus analizom u SAI stanicama (SAI) u usporedbi sa stanicama visokog pasaža (PEC-H). Vrijednosti Z-omjera veće od ± 1 smatraju se statistički značajnima pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na povećanje ekspresije, dok negativna vrijednost predstavlja smenjenje ekspresije.

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Puni naziv proteina	Z-omjer (PEC-H, SAI)
FAS	**Pan-spec**	**Faktor tumorske nekroze (CD95)**	**2,26**
EGFR	**T693**	**Receptor epidermalnog faktora rasta**	**2,09**
PKC ξ/λ	**T410/T412**	**Protein kinaza-C zeta/lambda**	**1,58**
CD45	Pan-spec	Fosfataza receptora leukocitnog antigena CD45	**1,56**
CDK1/2	T161	Kinaza ovisna o ciklinu 1/2	**1,46**
Rb	Pan-spec	Retinoblastomski protein	**1,40**
Erk1 + Erk2	[T202+Y204] + [T185+Y187]	Kinaza regulirana izvanstaničnim signalom 1 + Kinaza regulirana izvanstaničnim signalom 2	**1,37**
JNK1/2/3	T183 + Y185	Jun N-terminalna protein kinaza (proteinska kinaza aktivirana stresom (SAPK) 1/2/3	**1,34**
Hsp90a/b	Pan-spec	Protein toplinskog šoka 90 kDa alfa/beta	**1,29**
CDK1/2	Y15	Kinaza ovisna o ciklinu 1/2	**1,09**
Msk1	S376	Mitogenom i stresom aktivirana protein kinaza 1	**1,04**
Raf1	Pan-spec	Raf1 kinaza kodirana proto-onkogenom	**-1,03**
PKBb (Akt2)	Pan-spec	Protein kinaza-B beta	**-1,07**
CDK5	Pan-spec	Kinaza ovisna o ciklinu 5	**-1,18**
MEK5 (MAP2K5)	Pan-spec	MAPK/ERK protein kinaza 5 (MKK5)	**-1,25**
PAK1/2/3	T423/402/436	Kinaza 1/2/3 aktivirana p21 proteinom	**-1,27**
ASK1 (MAP3K5)	Pan-spec	Kinaza proteina za regulaciju apoptoze	**-1,66**
JNK1/2/3	Pan-spec	Jun N-terminalna protein kinaza (proteinska kinaza aktivirana stresom (SAPK) 1/2/3	**-1,66**
CDK10	Pan-spec	Kinaza ovisna o ciklinu 10 [PISSLRE]	**-1,77**
PAK1	Pan-spec	Kinaza 1 aktivirana p21 proteinom	**-1,78**
PDK1	S241	Fosfoinozitid-ovisna kinaza 1	**-1,80**
PI4KCB	Pan-spec	Kinaza fosfatidilinozitola, beta podjedinica	**-1,89**
Cyclin D1	**Pan-spec**	**Ciklin D1**	**-1,95**
CDK6	**Pan-spec**	**Kinaza ovisna o ciklinu 6**	**-2,72**
CDK8	**Pan-spec**	**Kinaza ovisna o ciklinu 8**	**-3,70**

Najznačajnije povećanje ekspresije u stanicama visokog pasaža u odnosu na one niskog pokazale su kinaze fosfoinozitid–ovisna kinaza 1 (PDK1) i protein kinaza-C zeta/lambda (PKC ξ/λ) te EGFR i nekoliko pripadnika MAPK signalnog puta. PDK1 je serin/treonin kinaza ključna za aktivaciju Akt-a posredovanjem PI3K. Poznato je da je PI3K/Akt signalni put dereguliran u mnogim karcinomima, a novija istraživanja pokazuju da PDK1 unutar PI3K/Akt signalnog puta ima svojstva onkogena.[142] Istraživanja provedena najvećim djelom na stanicama raka dojke upućuju na to da su promjene u ekspresiji ovog proteina važne za progresiju navedenog karcinoma. Također je pokazano da smanjenje njegove razine inhibira migraciju stanica.[142] Smatra se da je PDK1 konstitutivno aktivan te da je za njegovu aktivnost neophodna autofosforilacija na Ser 241.[143] Među proteine koje aktivira PDK1 pripadaju i PKC ξ/λ, kinaze iz skupine atipičnih PKC čija je aktivacija neovisna o Ca^{2+} i forbol esterima. Cornford i sur.[144] su prvi pokazali povišenu ekspresiju PKC ξ/λ u malignom epitelu prostate u usporedbi s normalnim prostatičnim epitelom. Kasnije je povišena ekspresija ove kinaze zabilježena i u drugim karcinomima.[145] U daljnjem istraživanju na PC-3 stanicama raka prostate utvrđeno je da smanjenjem transkripcije *PRKCξ/λ* gena pomoću siRNA dolazi do smanjenja tumorskog potencijala stanice potvrđujući ulogu PKC ξ/λ u promoviranju malignog fenotipa. Također je pokazano da smanjenje njegove ekspresije inhibira migraciju i invaziju stanica.[145] Iz tablice 2. se može vidjeti i da se ekspresija PKC ξ/λ dodatno povećala u SAI stanicama u odnosu na PEC visokog pasaža.

EGFR je transmembranski glikoprotein iz skupine receptora tirozin kinaza. Aktivira se vezanjem faktora rasta poput EGF-a i TNF-α pri čemu dolazi do autofosforilacije pet tirozinskih ostataka u unutarstaničnoj domeni EGFR-a. Tako fosforilirani tirozini, uključujući i Tyr 1173, služe kao sidra za velik broj proteina koji potom aktiviraju signalne putove (MAPK, PI3K/Akt) uključene u nastanak malignog fenotipa. Nepravilnosti u njegovoj funkciji i signalizaciji kao i povećana ekspresija zabilježene su u velikom broju malignih oboljenja uključujući i prostatu.[141,146,147] Sherwood i sur.[146] su pokazali da PC3 i DU145, ljudske stanične linije karcinoma prostate neovisne o androgenima, imaju znatno veću ekspresiju EGFR-a u odnosu na normalne stanice epitela prostate, ali i u odnosu na LNCaP stanice raka prostate ovisne o androgenima čija je ekspresija EGFR-a bila samo nešto viša od one normalnih stanica prostatičnog epitela. Slične rezultate dobili su Di Lorezzo i sur.[147] koji su imunohistokemijskom metodom na uzorcima tkiva karcinoma prostate pokazali da je povećana ekspresija EGFR-a povezana s progresijom ove bolesti prema hormonski neovisnom obliku.

Kinexus analiza je identificirala samo dva proteina, Protein toplinskog šoka 90 (Hsp90, eng. *Heat shock protein 90*) i Rock1 (eng. *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*), sa smanjenom ekspresijom u PEC visokog pasaža. Hsp90 je molekularni šaperon ključan za funkciju velikog broja proteina poput receptora hormona, raznih kinaza te proteina koji kontroliraju stanični ciklus i apoptozu. Pretjerana ekspresija Hsp90 povezana je s lošim prognozama i metastatskim fenotipom u mnogim malignim oboljenjima. Također je poznato da je neophodan za stabilnost i funkciju nekoliko onkogena koji posreduju u progresiji raka prostate uključujući normalni i mutirani AR te Akt.[148] Inhibitori Hsp90, poput 17-*N*-alilaminogeldanamicina (17-AAG), često se koriste u nastojanjima razvoja novih metoda liječenja karcinoma prostate, ali i drugih malignih oboljenja.[148]

Protein ROCK1 (eng. *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*) pripada skupini serin/treonin kinaza. Jedan je od glavnih efektora male GTPaze RhoA te sudjeluje u poticanju aktin-miozin kontrakcija. Istraživanja su nedavno usmjerena na otkrivanje njegove uloge u malignim oboljenjima.[149,150] Tako su Lin i sur.[149] pokazali da aktivni ROCK1 može imati ulogu u poticanju migracija i metastaza fosforilacijom miozina u PC3 i DU145, ljudskim staničnim linijama karcinoma prostate neovisnim o androgenima. Međutim u drugom je istraživanju pokazano da ROCK1 kao dio Rho/ROCK/aktin signalnog puta kojeg aktivira membranski AR inducira apoptozu u stanicama raka prostate.[150]

Osim već spomenutih EGFR-a i PKC ξ/λ najveće povećanje ekspresije u SAI stanicama u odnosu na PEC visokog pasaža zabilježeno je za Fas receptor. Fas ili CD95 je transmembranski protein iz skupine tzv. receptora smrti. Aktiviran Fas ligandom ovaj receptor inducira niz signala koji dovode do programirane smrti stanice (apoptoze). Ujedno je i važan posrednik u imunosnom odgovoru. Zbog toga se smatra da ima ulogu supresora tumora. Smanjena ekspresija ili mutacije Fas-a predložene su kao mehanizmi kojima stanice raka izbjegavaju apoptozu i eliminaciju pomoću imunosnog sustava.[151,152] Unatoč tome što je prvobitno prepoznat kao tumorski supresor nekoliko je istraživanja pokazalo da njegova ekspresija značajno ovisi o stadiju tumora. Tako je primjerice pokazano da je ekspresija Fas-a povećana u karcinomima s unapredovalim u odnosu na one s niskim stadijem.[151] Istraživanja Wiltrouta su pokazala da skspresija CD95 na tumorskim stanicama otpornim na CD95 posredovanu apoptozu može aktivirati tumorogenične signale i potaknuti rast tih stanica *in vivo*.[153]

Među proteinima sa značajnijim povećanjem ekspresije u SAI stanicama je i kiseli fosfonuklearni protein pp32 (eng. *Acidic nuclear phosphoprotein pp32*). Povećana ekspresija

pp32 zabilježena je u malignim stanicama, ali i u normalnom tkivu u stanicama koje imaju sposobnonost samoobnavljanja.[154] Uznapredovali stadij karcinoma prostate karakterizira povećana ekspresija ovog proteina, međutim otkriveno je da pp32 može u nekim slučajevima djelovati i kao tumorski supresor sprječavajući djelovanje onkogena poput *c-myc*-a.[155]

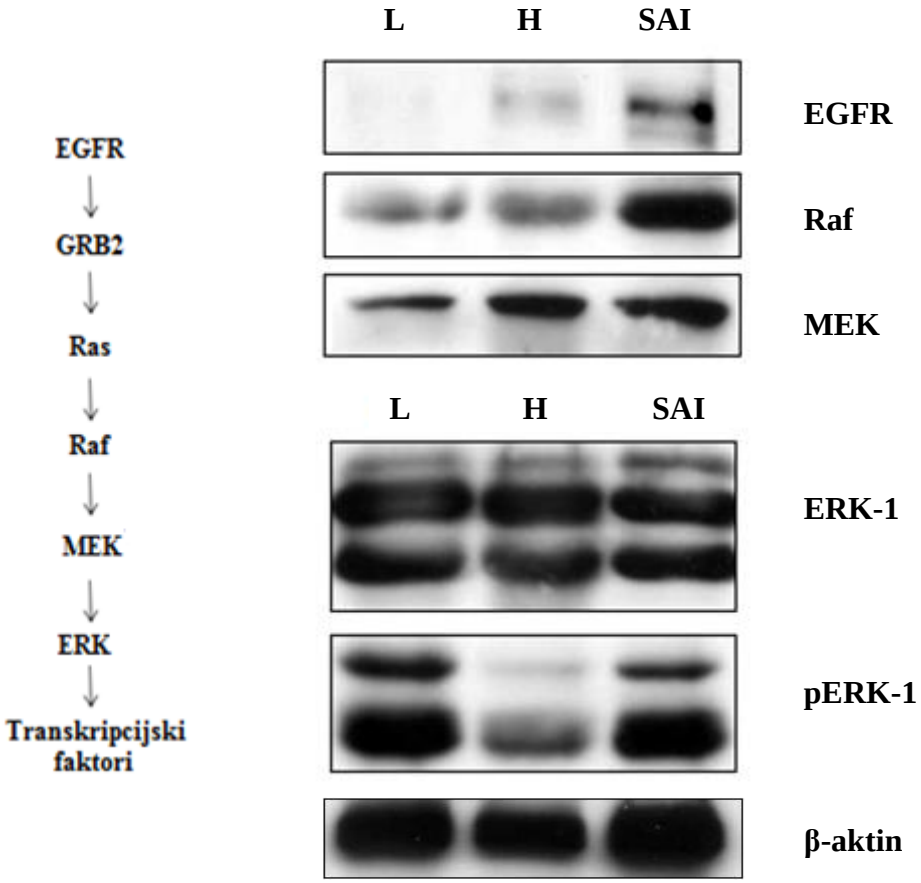
Među proteinima sa smanjenom ekspresijom u SAI stanicama nalazi se nekoliko kinaza ovisnih o ciklinu (CDK) te ciklin D1. CDK pripadaju skupini serin/treonin kinaza koje su ključne za regulaciju staničnog ciklusa. Njihova katalitička aktivnost inducira se vezanjem regulacijskih proteina ciklina. Ovako nastali CDK-ciklin kompleks fosforilira Rb protein koji potom prekida suzbijanje transkripcije što omogućava prolazak kroz stanični ciklus. Kako je narušavanje kontrole rasta jedna od osnovnih karakteristika stanica raka tako su i promjene u ekspresiji CDK i ciklina, posebice onih iz skupine D, zabilježene u velikom broju karcinoma.[156,157] CDK6 je u kompleksu sa ciklinom D1 jedan od glavnih promotora staničnog ciklusa. Međutim, otkriveno je da se CDK6 može vezati i poboljšati transkripcijsku aktivnost AR u LNCaP stanicama karcinoma prostate.[156] Takvo djelovanje CDK6 neovisno je o njegovoj kinaznoj aktivnosti odnosno ne zahtjeva vezanje ciklina D1. Također, LNCaP stanice s povećanom ekspresijom ove kinaze pokazivale su i povećanu ekspresiju PSA.[156] Prema tim rezultatima povećana ekspresija CDK6 može pridonijeti progresiji karcinoma prostate u oblik neovisan o androgenima. Ciklin D1 je važan regulator progresije iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Uključen je u nastanak i progresiju nekoliko oblika karcinoma u kojima je zabilježena njegova pretjerana ekspresija. Međutim istaživanja na staničim linijama kao i uzorcima tkiva primarnih karcinoma prostate pokazala su da se ekspresija ciklina D1 nije znatno razlikovala u odnosu na normalne stanice i tkiva dok je u DU145 invazivnim stanicama čak bila smanjena.[158] CDK8 posreduje u regulaciji signalnih putova povezanih s rakom ali i matičnim stanicama. Između ostalog aktivira Wnt put suzbijajući aktivnost inhibitora β-katenina. Adler i sur.[157] su pokazali da je CDK8, osim što je potreban za proliferaciju stanica raka *in vitro,* vrlo važan i za rast tumora *in vivo* te za održavanje njegovog dediferenciranog oblika. Zanimljivo je da su ovi proteini, iako u većini istraživanja pojačano eksprimirani u stanicama raka, u našem slučaju smanjeni u SAI subpopulaciji u odnosu na PEC visokog pasaža iz kojih su izolirane. Međutim, smanjenje ekspresije proteina staničnog ciklusa može biti povezano s rezultatima iz odlomka 4.1.3. gdje je uočena sporija proliferacija SAI stanica u odnosu na PEC visokog pasaža.

4.1.6.1. Western blot validacija

Ekspresija nekoliko proteina za koje su Kinexus analizom zabilježene promjene ispitana je *western blot*-om. Odabran je EGFR za koji je proteomičkom analizom zabilježeno povećanje ekspresije u obje usporedbe. Kako je već spomenuto taj receptor s površine stanica aktivira niz signalnih putova uključenih u malignu transformaciju. Imunoblotom je ispitana i ekspresija nekoliko pripadnika MAPK signalnog puta, aktiviranog među ostalima i EGFR-om, a koji je dereguliran u gotovo svim karcinomima (odlomak 2.3.3.2.).

Rezultati Western blot analize na slici 11. velikim djelom potvrđuju razlike u ekspresiji EGFR-a, Raf, MEK te fosforiliranog Erk-1 (pErk1) između PEC niskog i visokog pasaža te SAI stanica. Tako je ekspresija EGFR bila gotovo nezamjetna u PEC niskog pasaža dok se povećanje ekspresije može vidjeti kako stanice napreduju prema SAI populaciji. Slični rezultati zabilježeni su i za Raf i MEK čija je ekspresija također bila najveća u SAI stanicama. Rezultati za Raf se razlikuju od Kinexus rezultata u kojima je zabilježena nešto smanjena ekspresija u SAI stanicama u odnosu na PEC visokog pasaža dok promjene u ekspresiji MEK-a nisu zabilježene proteomičkom analizom. Rezultati ekspresije za Raf u dosadašnjim istraživanjima karcinoma prostate također pokazuju različite rezultate. Tako je studija u kojoj su imunohistokemijski analizirani uzorci tumora prostate otkrila je povećanje ekspresije Raf kako je bolest napredovala te njegovu potencijalnu ulogu u razvoju hormonski neovisnog oblika.[159] Drugo je pak istraživanje na staničnim linijama karcinoma prostate pokazalo njegovu smanjenu ekspresiju u odnosu na netransformirane stanice.[160] Povećana ekspresija i aktivnost MEK kinaze unutar Ras/Raf/Mek/Erk zabilježena je u metastazirajućim, ali i nemetastazirajućim stanicama karcinoma prostate.[161] MEK je kinaza koja ima veliku specifičnost za supstrat, Erk1/2, koji za razliku od nje reagira s nizom citosolnih i nuklearnih supstrata. Zbog toga je inhibicija MEK-a prepoznata kao jedan od načina blokiranja ovog signalnog puta. Do sada je razvijeno nekoliko inhibitora ove kinaze (Trametinib, Cobimetinib i sl.) na kojima se vrše klinička ispitivanja.[162] Erk1/2 ključni efektor MAPK puta. Može translocirati u jezgru i direktno fosforilirati niz transkripcijskih faktora što za poslijedicu dovodi do povećanja proliferacije, preživljavanja, pokretljivosti i invazivnosti stanica.[161,163] Gioli i sur.[163] su pokazali da se u tumorima prostate, razina aktiviranog Erk1/2 (pErk1/2) povećava sa stadijem. Velika aktivnost Erk1/2 zabilježena je u povratnim tumorima nastalim nakon terapije ablacijom androgena. Ti rezultati upućuju da je Erk1/2 uključen u progresiju karcinoma prostate.[163] Međutim, ovakvu

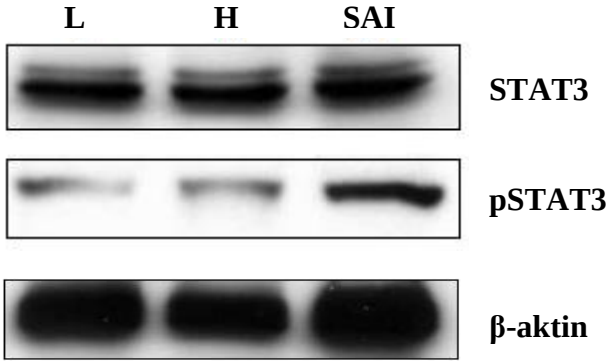
vezu nisu otkrili Uzgare i sur.[164] koji su pokazali na mišjem TRAMP modelu da u PIN-u dolazi do povećane aktivacije Erk1/2 koja se potom smanjuje kako bolest napreduje do karcinoma. Razlike u dobivenim rezultatima za ekspresiju pErka za sada još nisu razjašnjene što stvara prepreku u njegovu korištenju kao prognostičkog biomarkera. Naši rezultati imunoblota pokazuju jednaku ekspresiju nefosforiliranog Erk1/2 u sve tri stanične populacije. Smanjena ekspresija fosforiliranog oblika zabilježena je u PEC visokog pasaža u odnosu na PEC niskog pasaža i SAI stanice među kojima nije bilo razlike u ekspresiji.



Slika 11. Western blot analiza za EGFR, Raf, MEK Erk1/2 i pERK1/2 u PEC niskog (L) i visokog (H) pasaža te SAI stanicama.

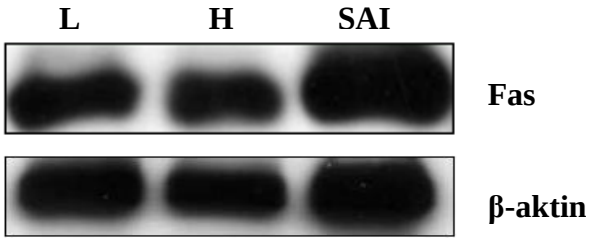
S obzirom da EGFR također djeluje kao tirozin kinaza uslijed vezanja liganda Park i sur.[165] su otkrili da ova RTK može direktno fosforilirati i aktivirati STAT proteine (eng. *signal transducer and activator of transcription*). Zbog toga je ispitana ekspresija STAT3 i njegovog

fosforiliranog oblika (pSTAT3). Iako je razina STAT3 bila konzistenta među tri stanične populacije, razina pSTAT3 pratila je ekspresiju EGFR-a i postupno se povećavala sa povećanjem broja precjepljivanja i selekcijom na agaru. Povećana razina aktiviranog STAT3 česta je karakteristika stanica raka prostate. Otkriveno je da njegova direktna inhibicija inducira apoptozu u DU145 stanicama.[166]



Slika 12. *Western blot* analiza za STAT3 i njegov fosforilirani oblik pSTAT3 u PEC niskog (L) i visokog (H) pasaža te SAI stanicama.

Veliko povećanje ekspresije Fas proteina u SAI stanicama u odnosu na PEC visokog pasaža dobiveno proteomičkom metodom potvrđeno je i *Western blot*-om. Kako je vidljivo na slici 13. i PEC niskog i visokog pasaža su pokazale ekspresiju Fas-a koja se nije međusobno razlikovala. Dok je znatno veća ekspresija zabilježena u SAI stanicama.



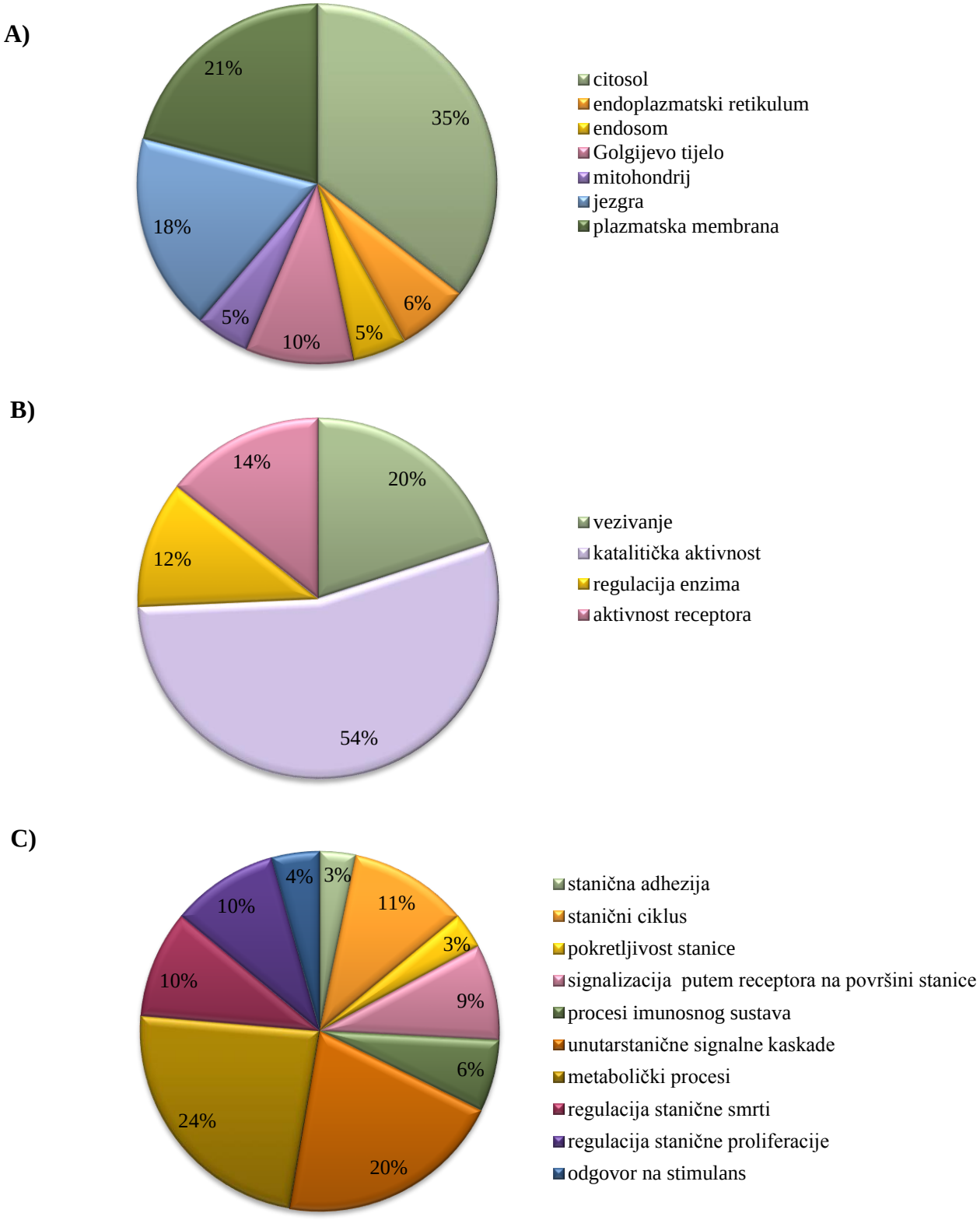
Slika 13. Western blot analiza za Fas u PEC niskog (L) i visokog (H) pasaža te SAI stanicama.

4.1.6.2. GO anotacije

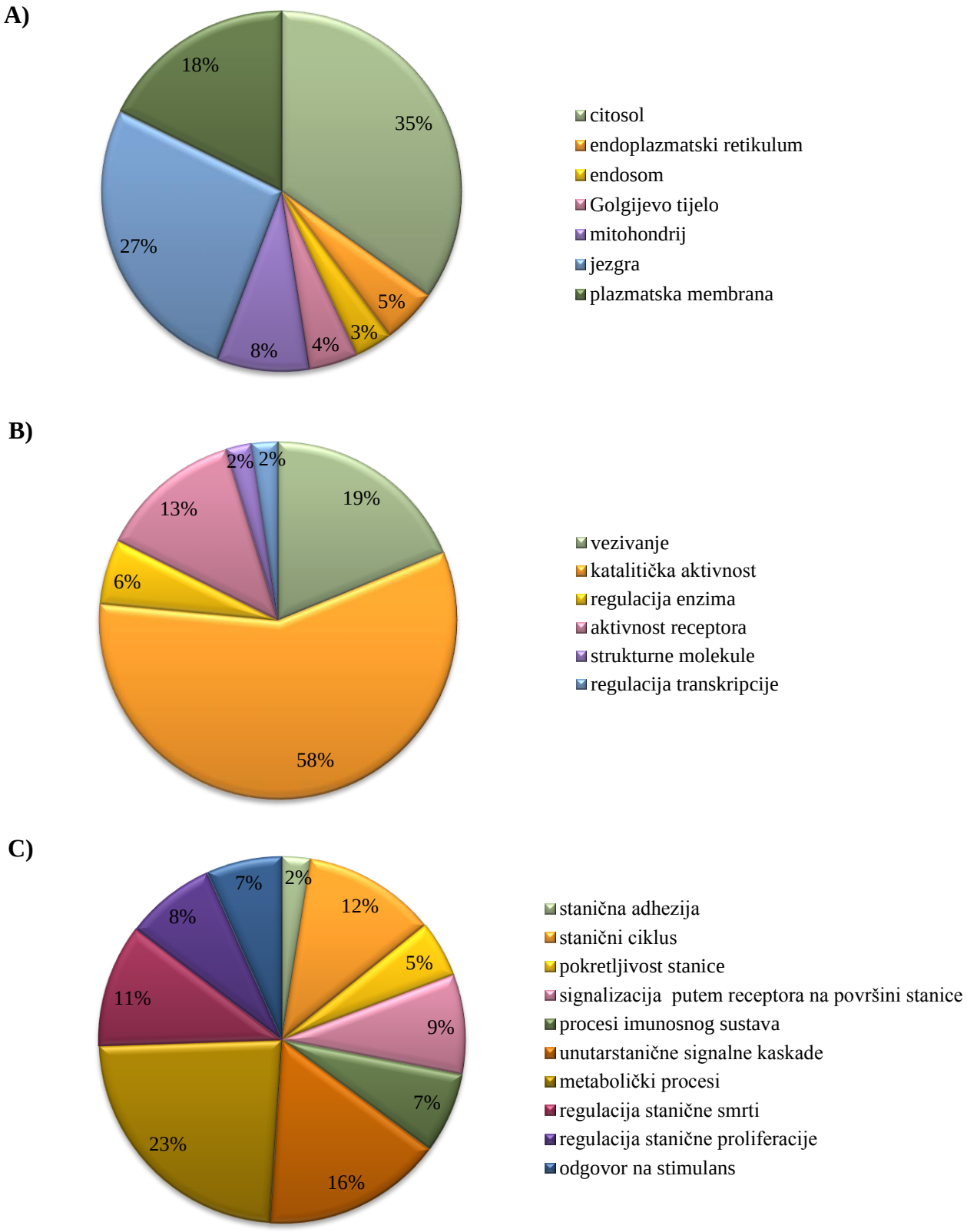
Različito eksprimirani proteini identificirani proteomičkom analizom klasificirani su pomoću DAVID baze prema njihovoj staničnoj lokalizaciji, molekularnoj funkciji i biološkim procesima.[132] Potrebno je napomeniti da proteini mogu imati po nekoliko anotacija. Na tortnim grafikonima (slika 14. i 15.) prikazani su postotci najzastupljenijih anotacija u pojedinoj kategoriji za obje usporedbe. Prema dobivenim rezultatima različito eksprimirani proteini u usporedbi PEC niskog i visokog pasaža lokalizirani su najviše u citosolu (35%), plazmatskoj membrani (21%) i jezgri (18%). Od ostalih staničnih komponenti prisutni su još Golgijevo tijelo (10%), endoplazmatski retikulum (6%), te mitohondrij i endosom sa po 5% anotiranih proteina. Vrlo slični rezultati za staničnu lokalizaciju dobiveni su i u usporedbi PEC visokog pasaža i SAI stanica. Tako je i ovdje najviše proteina bilo iz citosola (35%), plazmatske membrane (18%) i jezgre (27%). Međutim, ovdje je je zabilježen nešto veći postotak proteina lociranih u jezgri u odnosu na prethodnu usporedbu što može biti povezano s većim promjenama u ekspresiji transkripcijskih faktora kao što je npr. pokazano za STAT3.

Molekularna funkcija nekog proteina definira se kao njegova temeljna aktivnost na molekularnoj razini. Niz molekularnih događaja ili funkcija sa jasno definirani početkom i završetkom čini biološki proces. Rezultati za molekularnu funkciju u usporedbi PEC niskog i visokog pasaža pokazuju da najveći dio različito eksprimiranih proteina ima katalitičku aktivnost (54%). Takvi rezultati ne iznenađuju jer se proteomičko istraživanje usmjerilo na signalne proteine u kojima su enzimi, poput kinaza, zastupljeni u velikoj mjeri. Među ostalim funkcijama su vezivanje (eng. *binding*) (20%), aktivnost receptora (14%) i regulacija enzima (12%). Slična raspodjela molekularnih funkcija zabilježena je i za proteine iz usporedbe PEC visokog pasaža i SAI stanica. No, osim navedenih u prvoj usporedbi ovdje su prisutne i funkcija strukturnih molekula te regulacija transkripcije.

Rezultati za raspodjelu proteina s obzirom na biološke procese vrlo su slični za obje usporedbe. Tako, najviše proteina sudjeluje u metaboličkim procesima i unutarstaničnom prijenosu signala što je opet bilo za očekivati s obzirom na profil analize. Osim ovih bioloških procesa, s većim postotkom anotiranih proteina su i regulacija stanične smrti i proliferacije, signalizacija putem receptora na površini stanice i stanični ciklus. Različito eksprimirani proteini sudjeluju još u pokretljivosti stanica i odgovoru na stimulans te procesima imunosnog sustava i stanične adhezije.



Slika 14. GO anotacije različito eksprimiranih signalnih proteina u usporedbi PEC stanica niskog i visokog pasaža. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.



Slika 15. GO anotacije različito eksprimiranih signalnih proteina u usporedbi PEC stanica visokog pasaža i SAI stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.

4.1.7. Ispitivanje i uspoređivanje tumorogeničnosti PEC stanica in vivo

Tumorogeničnost se definira kao sposobnost stanica uzgojenih u kulturi da tvore tumore nakon ubrizgavanja u životinjskog domaćina. Jedna je od ključnih obilježja stanične transformacije i stjecanja malignog fenotipa.[17,23] Kako bismo ispitali i usporedili tumorogeni potencijal naših staničnih subpopulacija, PEC niskog i visokog pasaža te SAI stanice su injektirane u miševe bez imunosnog sustava.[134] Ispitivanje tumorogeničnosti stanica *in vivo* provedeno je na 4-6 tjedana starim ženkama Bg/Nu/XID miševa. Svaka subpopulacija injektirana je u najmanje 3 životinje.

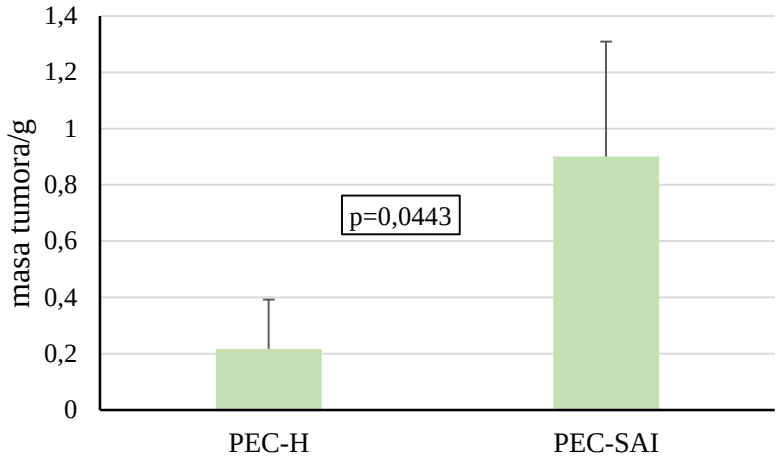
U skladu s rezultatima koji opisuju promjene u tumorogeničnosti BDEC stanica u odnosu na broj precjepljivanja, otkriveno je da PEC stanice visokog pasaža (p91), neovisne o rastu na čvrstoj podlozi, stvaraju velike podkožne tumore nakon injektiranja u Bg/Nu/XID miševe (slika 16.). Tumori izrezani 28. dan nakon injekcije težili su u prosjeku 0,22 g. U miševima injektiranim s PEC stanicama niskog i srednjeg pasaža, ovisnim o rastu na čvrstoj podlozi, nisu pronađeni tumori niti nakon 35 dana od injekcije (najduži promatrani period).

Nasuprot tomu, SAI stanice su pokazale znatno veći tumorogeni potencijal od PEC stanica visokog pasaža. U miševa injektiranih SAI stanicama zapažen je smanjeni period latencije i značajno povećanje u veličini tumora u odnosu na rezultate dobivene za PEC visokog pasaža. Tako je prosječna veličina tumora 21 dan nakon injekcije SAI stanica iznosila 0,77 g ($p=0,0443$). Zbog težine tumora bilo je neophodno žrtvovati miševe injektirane SAI stanicama prije isteka 35 dana, perioda koji se koristio u eksperimentima sa PEC stanicama niskog, srednjeg i visokog pasaža.

Ovi rezultati potvrđuju da je uzastopnim precjepljivanjem došlo do transformacije stanica koje su kod visokog pasaža stekle sposobnost stvaranja tumora *in vivo*. Također se može vidjeti da je selekcijom na mekom agaru iz tih stanica izdvojena subpopulacija (SAI) sa znatno većim tumorogenim potencijalom.



Slika 16. Tumori razvijeni u imunodeficijentnim miševima nakon nakon injektiranja sa PEC stanicama visokog pasaža (A) i SAI stanicama (B). Promatrani period inkubacije bio je 28 dana za životinje injektirane stanicama visokog pasaža dok su životinje injektirane SAI stanicama žrtvovane nakon 21. dana iz etičkih razloga.



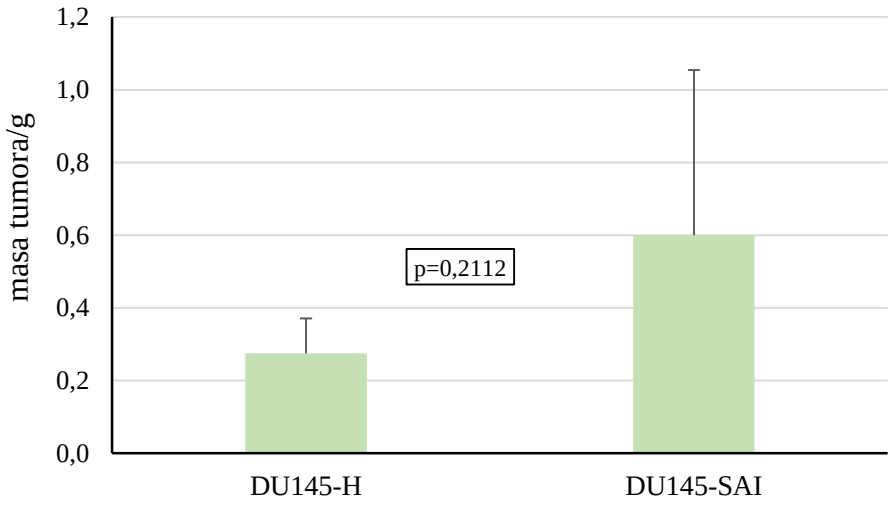
Slika 17. Prosječna masa tumora (N = 3) razvijenog nakon injektiranja PEC-H i PEC-SAI stanica u imunodeficijentne miševe. Odstupanja su iskazana kao SD. Statistički značajnima se smatraju vrijednosti $p < 0,05$.

4.1.8. Izolacija SAI populacije i uspoređivanje tumorogeničnosti ljudske stanične linije raka prostate, DU145

DU145 stanice odabrali smo kako bi ispitali nalazi li se i među njima karakteristična SAI subpopulaciju sa većim tumorogenim potencijalom. DU145 je humana stanična linija izvedena iz karcinoma prostate s metastazama u mozak. To su epitelne stanice koje imaju sposobnost stvaranja kolonija na mekom agaru i tumora nakon injektirnja u odgovarajući životinjski model.

Prethodno opisanim postupkom iz DU145 je uistinu izolirana subpopulacija stanica koje su prodrle kroz meki agar i nastavile rasti na plastičnoj podlozi analogno SAI stanicama iz PEC visokog pasaža. Kako je otprije poznato da su DU145 tumorogene, željeli smo usporediti pokazuje li SAI subpopulacija DU145 stanica veću tumorogeničnost u odnosu na neselektiranu roditeljsku populaciju. U svrhu uspoređivanja tumorogenog potencijala, neselektirane DU145 stanice neovisne o rastu na čvrstoj podlozi i svježe izolirane DU145-SAI stanice injektirane su u imunodeficijentne Bg/Nu/XID miševe. Životinje su praćene kroz četiri tjedna. Po završetku eksperimenta (28. dan) prosječna masa tumora razvijenih u miševa injektiranih sa

neselektiranim DU145 stanicama iznosila je 0,28 g. U skladu s rezultatima za tumorogeničnost dobivenim za PEC stanice, DU145-SAI stanice pokazale su veći tumorogeni potencijal s tumorima prosječne težine 0,60 g po isteku ispitivanog perioda. U ovom slučaju nije se dobila statistički značajna razlika (p=0,2112) unatoč velikoj razlici u prosječnoj masi tumora. No, treba uzeti u obzir da su ispitivanja iz humanih razloga napravljena na relativno malom uzorku. Eksperiment je ponovljen i dobiveni su vrlo slični rezultati za novi set od 4 životinje. Međutim kada se rezultati oba eksperimenta spoje i poveća se broj uzoraka za obradu statistička razlika postaje izraženija (p=0,08).



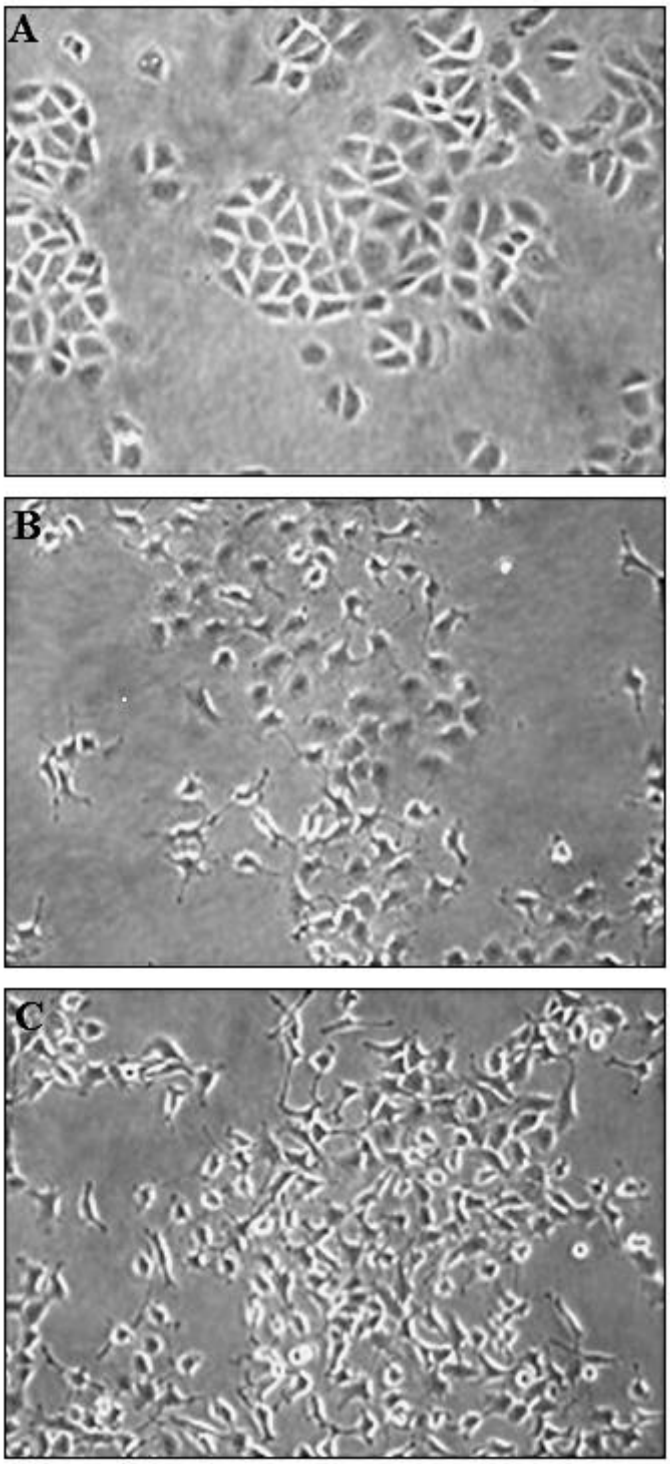
Slika 18. Prosječna masa tumora razvijenog nakon injektiranja DU145-H i DU145-SAI stanica u imunodeficijentne miševe. Odstupanja su iskazana kao SD. Statistički značajnima se smatraju vrijednosti $p < 0,05$.

4.2. Analiza ekstracelularnih vezikula iz transformiranih epitelnih stanica jetara

U dijelu ovoga rada nastojalo se, pomoću ranije poznatog modela kemijske transformacije stanica jetrene linije WB-F344 (WB) u maligne GP7TB stanice, proširiti spoznaje o malignoj tansformaciji ovog organa. WB je linija diploidnih epitelnih stanica koje sadrže fenotipske karakteristike i hepatocita i kolangiocita. Međutim, sveukupni fenotip WB stanica se bitno razlikuje od oba tipa ovih, potpuno diferenciranih stanica i zapravo je najsličniji onom ovalnih stanica, koje se smatraju jetrenim matičnim stanicama.[167,168] Tretiranje WB stanica u kulturi s *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozogvanidinom (MNNG) inducira fenotipske i kariotipske promjene slične onima koji se pojavljuju u stanicama jetara štakora tretiranih karcinogenima prije nego što su postale tumorogene.[167] Transplantacija tih, kemijski tretiranih GP7TB stanica natrag u štakore rezultirala je nastankom različitih tipova tumora među njima i onih, sličnih hepatocelularnom karcinomu.[167,168] U skladu s prethodnim istraživanjem na stanicama prostate, i iz tumorogenih jetrenih GP7TB stanica izolirali smo specifičnu populaciju stanica invazivnih na mekom agaru, GP7TB.SAI.

4.2.1. Morfološka usporedba WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanica

Kako je već spomenuto u mnogim stanicama dolazi do značajne promjene u morfologiji tijekom prijelaza iz normalnog u transformirani, maligni, fenotip. Morfološke razlike između WB i kemijski transformiranih stanica GP7TB ispitane su upotrebom fazno-kontrastnog mikroskopa. Posebno nas je zanimalo pokazuju li GP7TB.SAI stanice različitu morfologiju u odnosu na GP7TB populaciju iz koje su izolirane analogno rezultatima dobivenima za SAI iz PEC visokog pasaža. Kako je vidljivo na slici 19. invazivne stanice izolirane prolaskom kroz meki agar (GP7TB.SAI) doista pokazuju jedinstvenu morfologiju u odnosu na normalne WB i transformirane GP7TB. Te stanice imaju izduženi, vretenasti oblik te su slabo zbijene i manje organizirane u odnosu na WB stanice koje su poligonalnog, gotovo okruglastog oblika te su gusto zbijene. Zanimljivo je da se u GP7TB populaciji nalaze stanice s različitom morfologijom tako neke više nalikuju WB, a druge pak GP7TB.SAI stanicama.



Slika 19. Morfologija WB (A), GP7TB (B) i GP7TB.SAI stanica (C)

4.2.2. Promjene u ekspresiji signalnih proteina

S obzirom na već spomenutu važnost putova stanične signalizacije u održavanju homeostaze, ali i njihovu ulogu u nastanku karcinoma, uključujući i hepatocelularni karcinom, željeli smo ispitati promjene u ekspresiji signalnih proteina između WB, GP7TB i GP7TB.SAI.

Kinexus analizom uspoređene su ekspresije proteina između WB i GP7TB stanica te između GP7TB i GP7TB.SAI. Prva usporedba pokazala je 47 proteina s povećanom i 32 proteina sa smanjenom ekspresijom u GP7TB stanicama u odnosu na WB. Dio tih proteina prikazan je u tablici 3., a cjeloviti popis je u dodatku. U drugoj je usporedbi identificirano 13 proteina sa povećanom kao i 13 sa smanjenom ekspresijom u GP7TB.SAI stanicama u odnosu na GP7TB (tablica 4.).

Među proteinima s najvećim povećanjem ekspresije u GP7TB u odnosu na WB stanice su kristalin-αB, katalitička delta podjedinica PI3K-a (PI3K p110δ) i CDK5. Kristalin-αB (eng. *Crystallin-αB*) je globularni protein iz skupine malih proteina toplinskog šoka 20 (Hsp20) Njegovu potencijalnu ulogu kao prognostičkog biomarkera za HCC predložili su Tang i sur.[169] koji su imunohistokemijskim metodama otkrili da je ekspresija ovog proteina bila do 30 puta veća u tumorskom u usporedbi s normalnim jetrenim tkivom. Petrovic i sur.[170] su također pokazali da kristalin-αB ima ulogu u sprječavanju apoptoze te promiče preživljavanje i otpornost stanica na kemoterapiju. Oni su predložili da ovaj protein može imati ulogu u promicanju maligne transformacije u kombinaciji s inaktivacijom p53 proteina. Zanimljivo je da je p53 jedan od proteina s najznačajnijim smanjenjem ekspresije u GP7TB u odnosu na netransformirane WB stanice. Kako je već spomenuto p53 je transkripcijski faktor koji djeluje kao tumor supresor. Osim mutacija p53 gena koje omogućuju stanicama s oštećenim genomom da izbjegnu apoptozu i nastave prolazak kroz stanični ciklus, česte su i promjene u ekspresiji samog p53 proteina.[63] Tako je između ostalog i zabilježena njegova smanjena ekspresija u HCK.[171] Nekoliko je istraživanja dosada dalo naslutiti ulogu CDK5 u progresiji raka. Ova je kinaza ovisna o ciklinu povezana s nastankom, napredovanjem i metastazama karcinoma gušterače kao i regulacijom pokretljivosti stanica karcinoma prostate.[172,173]

Tablica 3. Različito eksprimirani signalni proteini identificirani Kinexus analizom u GP7TB stanicama u usporedbi s WB stanicama. Vrijednosti Z-omjera veće od ± 1 smatraju se statistički značajnima pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na povećanje ekspresije, dok negativna vrijednost predstavlja smenjenje ekspresije.

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Naziv proteina	Z-omjer (GP7TB, WB)
Crystallin aB	**S45**	**kristalin-αB**	**4,36**
PI3K p110δ	**Pan-specific**	**Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat kinaza katalitička delta podjedinica**	**1,89**
CDK5	**Pan-specific**	**Kinaza ovisna o ciklinu 5**	**1,73**
PKBa (Akt1)	T308	Protein kinaza-B alfa	1,69
PAK1	Pan-specific	Kinaza 1 aktivirana p21 proteinom	1,65
CD45	Pan-specific	Fosfataza receptora leukocitnog antigena CD45	1,45
PKCz	Pan-specific	Protein kinaza-C zeta	1,37
PI3K	Pan-specific	Fosfatidilinozitol 3-kinaza regulacijska podjedinica alfa	1,36
IKKb	Pan-specific	Inhibitor NF-kappa-B proteinske kinaze beta	1,32
PKR1	Pan-specific	Protein kinaza ovisna o dvostrukoj RNA uzvojnici	1,30
PKA Ca/b	Pan-specific	Serinska kinaza ovisna o cAMP-u, regulacijska podjedinica alfa/beta	1,29
MEF-2	Pan-specific	Mijelinski faktor ekspresije 2 (MYEF2)	1,26
CDK2	Pan-specific	Kinaza ovisna o ciklinu 2	1,23
eIF4E	S209	Eukariotski inicijacijski faktor translacije	1,22
Rb	Pan-specific	Retinoblastomski protein	1,22
Raf1	Pan-specific	Raf1 kinaza kodirana proto-onkogenom	1,19
PKCd	Pan-specific	Protein kinaza-C delta	1,18
MEK6 (MAP2K6)	Pan-specific	MAPK/ERK protein kinaza 6 (MKK6)	1,12
FasL	Pan-specific	Ligand faktora tumorske nekroze	1,11
PDK1	S241	Fosfoinozitid-ovisna kinaza 1	-1,06
ILK1	Pan-specific	Protein kinaza 1 vezana s integrinom	-1,16
PARP1	Pan-specific	Poli [ADP-riboza] polimeraza 1 (ADPRT)	-1,17
p38a MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	-1,23
PI3KR4	Pan-specific	Fosfoinozitid-3-kinaza, regulacijska podjedinica 4	-1,27
PAK1/2/3	S144/S141/S154	p21-activated kinase 1/2/3 (serine/threonine-protein kinase PAK 1/2/3)	-1,41
Tau	S713	Mikrotubularni protein Tau	-1,61
p53	**S392**	**Tumorsupresorski protein p53**	**-3,64**
PKCa/b2	**T638/T641**	**Protein kinaza-C alfa/beta 2**	**-4,09**
CDK8	**Pan-specific**	**Kinaza ovisna o ciklinu 8**	**-4,15**

Tablica 4. Različito eksprimirani signalni proteini identificirani Kinexus analizom u GP7TB.SAI stanicama u usporedbi s GP7TB stanicama. Vrijednosti Z-omjera veće od ± 1 smatraju se statistički značajnima pri čemu pozitivna vrijednost upućuje na povećanje ekspresije, dok negativna vrijednost predstavlja smenjenje ekspresije.

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Naziv proteina	Z-omjer (GP7TB, GP7TB.SAI)
ATF2	**S112**	**Aktivirajući transkripcijski faktor 2 (CRE-BP1)**	**2,03**
Cyclin D1	**Pan-specific**	**Ciklin D1**	**1,87**
EphA1	Pan-specific	Kinaza receptora proteina tipa efrina A	1,85
ROS	Pan-specific	Kinaza receptora orosomukoida 1	1,66
CASP6	Pan-specific	Kaspaza 6	1,51
PLCg1	Y783	Fosfodiesteraza 1-fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata, gama 1	1,31
CASP7	Pan-specific	Kaspaza 7	1,22
ROR2	Pan-specific	ROR2 neurotrofna receptor kinaza	1,21
DGKz	Pan-specific	Kinaza diacilglicerola zeta	1,20
LATS1	Pan-specific	Kinaza proteina velikog tumorskog supresora 1 (WARTS)	1,09
CaMK2a	T286	Protein kinaza ovisna o kalciju/kalmodulinu 2 alfa	1,08
IRAK3	Pan-specific	Kinaza receptora interleukina 3	1,06
CD45	Pan-specific	Fosfataza receptora leukocitnog antigena CD45	-1,01
CAS	Pan-specific	Protein podložan staničnoj apoptozi (CSE1L)	-1,02
Msk1	S376	Mitogenom i stresom aktivirana protein kinaza 1	-1,02
CPG16/CaMK inase VI	Pan-specific	Serin/treonin protein kinaza DCAMKL1	-1,12
MEK3/6 (MAP2K3/6)	S218/S207	MAPK/ERK protein kinaza 3/6 (MKK3/6)	-1,22
CDK6	Pan-specific	Kinaza ovisna o ciklinu 6	-1,23
SOD (Mn)	Pan-specific	Superoksid dismutaza [Mn]	-1,35
ICK	Pan-specific	Protein kinaza intestinalnih stanica	-1,61
Rab5	Pan-specific	Ras-vezani protein Rab-5A	-1,64
TAK1	**Pan-specific**	**Protein kinaza 1 aktivirana TGF-betom**	**-1,72**
PI3K p110δ	**Pan-specific**	**Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat kinaza katalitička delta podjedinica**	**-1,84**
PKBb (Akt2)	**Pan-specific**	**Protein kinaza-B beta**	**-2,21**

PI3K sudjeluje u signalnom putu kojim nastaju lipidni drugi glasnici uključeni u kontrolu stanične diobe, preživljavanja, metabolizma, migracije i dr. Poznate su tri klase ovog enzima od kojih je najbolje proučena PI3K klasa I. Ona uključuje izoforme katalitičke podjedinice označene p110α, β, γ i δ koje mogu biti vezane s različitim regulacijskim podjedinicama. Kako je p110δ pretežno prisutna u leukocitima većina je istraživanja do sada usmjerena na njezinu ulogu u imunosnom sustavu te hematološkim malignim bolestima.[174] Tako je između ostalog pokazano da p110δ ima ulogu u sazrijevanju NK stanica kao i u njihovom prepoznavanju tumorskih stanica. Međutim, u novije je vrijeme otkriveno da ekspresija ove podjedinice PI3K može biti povećana i u karcinomima tzv. čvrstog tkiva poput dojki te da potiskuje aktivnost PTEN-a.[175] No, Tzenaki i sur.[174,175] su pak pokazali da je ekspresija p110δ u nekim tipovima karcinoma povećana dok je u u drugima pak smanjena. Razlozi tomu dosada nisu poznati. Prema našim rezultatima dobivenim proteomičkom analizom ekspresija PI3K p110δ se povećava uslijed kemijske transformacije WB stanica u maligne GP7TB, međutim u populaciji izoliranoj na mekom agaru ta se ekspresija smanjuje te je ovaj protein među onima s najznačajnijim smanjem ekspresije u GP7TB.SAI stanicama u odnosu na GP7TB stanice (Tablica 4.).

Osim spomenutg p53, proteini s najvećim smanjenjem ekspresije u GP7TB u odnosu na WB stanice su CDK8, čije je smanjenje zabilježeno i u prethodnoj Kinexus analizi na stanicama prostate, te α/β2 izoforme PKC. PKC α i β2 pripadaju skupini konvencionalnih za čiju je aktivaciju neophodan diacilglicerol (DAG) uz koaktivatore fosfatidilserin i Ca^{2+}. U malignim stanicama ekspresija i funkcija pojedinih PKC izoformi znatno se razlikuje.[176,177] Tako je npr. poznato da PKCα ima povišenu ekspresiju u većini karcinoma te potiče proliferaciju malignih stanica dok u stanicama karcinoma debelog crijeva djeluje antiproliferarivno. U tom je karcinomu pak zabilježena povećana ekspresija PKC β2 povezana s povećanom proliferacijom i invazijom nasuprot HCK-u u kojem je zabilježena smanjena ekspresija ove kinaze.[177]

Kako je već spomenuto u literaturnom pregledu Akt (PKB) je, kao sudionik PI3K/Akt/mTOR, signalne kaskade jedan od ključnih posrednika u održavanju stanične homeostaze. Pretjerana aktivnost ovog puta ključna je za progresiju niza karcinoma. Akt2 (PKBβ) je jedna od tri izoforme Akt proteina i obično se povezuje s invazijom, metastazama i preživljavanjem.[99,103] Xu i sur.[178] su pokazali povezanost ekspresije ovog oblika proteina s prognozama razvoja i progresije HCK. Tako je u 38 % ispitivanih uzoraka tkiva HCK ekspresija

Akt2 bila povišena, međutim u nekim je uzorcima zabilježena i smanjena ekspresija u odnosu na nemaligno tkivo koja je bila u vezi sa stupnjem diferencijacije i invazijom tumora.

Protein serin kinaza 1 aktivirana TGF-β-om, TAK1 (eng. *TGF-β-activated kinase 1*) pripada skupini MAPKK kinaza koja sudjeluje u odgovoru na upalne procese. Aktivira se djelovanjem raznih citkina poput TNF, TGF- β, i interleukina-1 (IL-1) te kontrolira aktivaciju kinaza p38, JNK i NF-κB. Nekoliko je istraživanja pokazalo da gubitak TAK1 u stanicama jetrenog parenhima (hepatocitima i kolangiocitima) dovodi do nastanka fibroze jetara i razvoja HCK.[179]

Aktivirajući transkripcijski faktor 2 (ATF2) sudjeluje u nizu staničnih funkcija. Posebno su značajne njegove uloge u razvoju i odgovoru stanice na stres i DNA oštećenja. Kao jedan od supstrata za MAPK kinaze, JNK i p38, fosforilirani oblik ovog proteina ima važnu ulogu u razvoju embrionalnih stanica jetara. Osim toga, istraživanja su pokazala da ATF2 sudjeluje u progresiji raka kože pri čemu je njegova inhibicija uzrokovala apoptozu i smanjenje tumorogeničnosti malignih stanica.[180] Također, povećana lokalizacija u jezgri upućuje na loše prognoze.[181] Beier i sur.[182] su otkrili da ovaj transkripcijski faktor stimulira aktivnost promotora ciklina D1 pri čemu je pokazano da se ona, uslijed povećane ekspresije ATF2, povećava čak 3,5 puta. Zanimljivo je da je upravo uz ATF2, ciklin D1 protein s najvećim povećanjem ekspresije u GP7TB.SAI stanicama u odnosu na GP7TB. Kako je već spomenuto, ciklin D1 je važan regulator staničnog ciklusa te je njegova povećana ekspresija zabilježena i u HCK. Istraživanja Joo-a i sur.[183] upućuju na to da do povećanja ekspresije ovog proteina dolazi rano u procesu hepatokarcinogeneze te da on ima ulogu diferencijaciji tumora. Oni su također pokazali da u HCK ekspresija ciklina D1 nije povezana s proliferacijom tumorskih stanica.

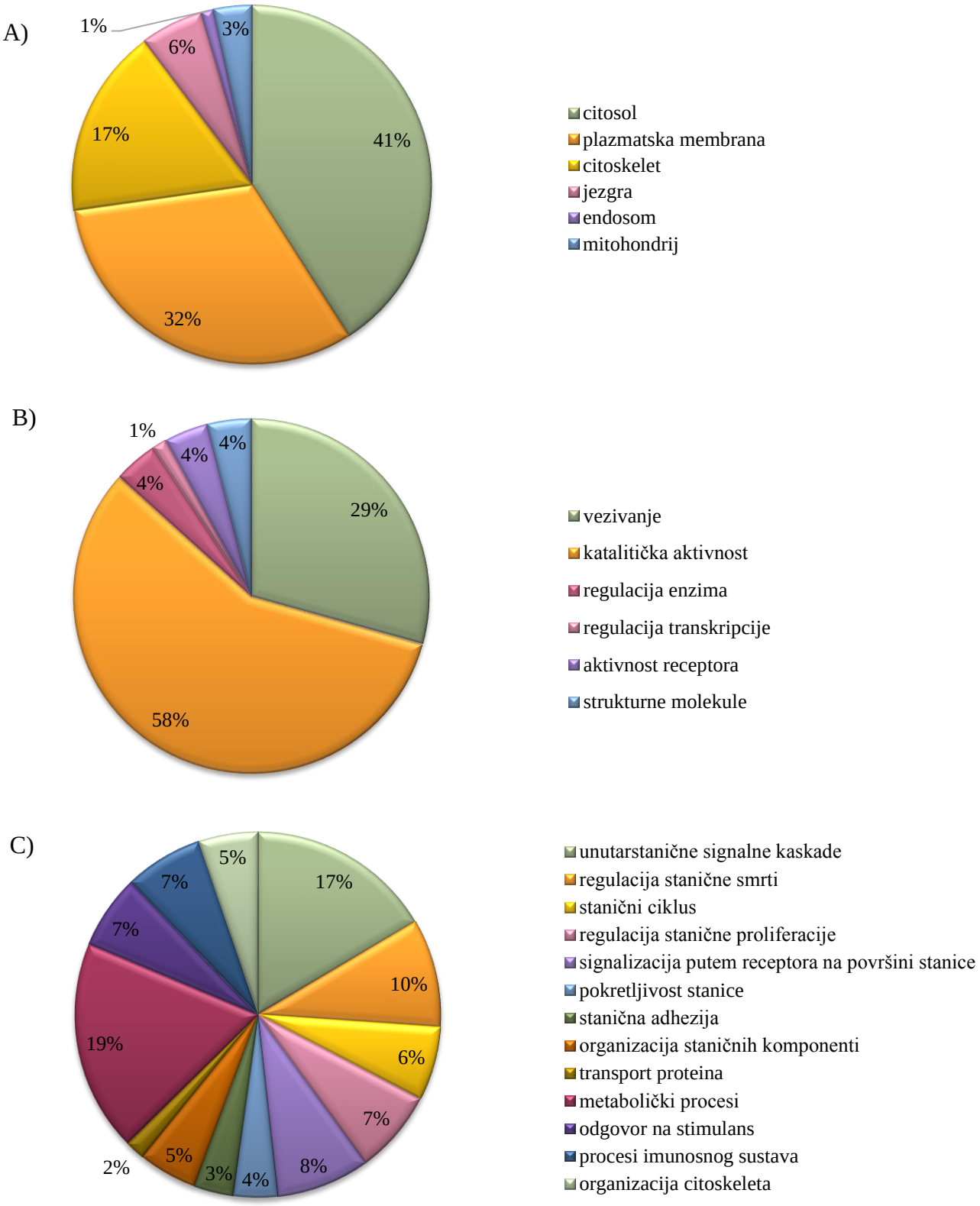
4.2.2.1. GO anotacije

Različito eksprimirani proteini u usporedbi WB sa GP7TB te GP7TB sa GP7TB.SAI stanicama dobiveni Kinexus analizom klasificirani su pomoću DAVID baze prema njihovoj staničnoj lokalizaciji, molekularnoj funkciji i biološkim procesima. Na tortnim grafikonima (slika 20. i 21.) prikazani su postotci najzastupljenijih anotacija u pojedinoj kategoriji za obje usporedbe. Rezultati za staničnu lokalizaciju pokazuju da najviše proteina pripada citosolu i plazmatskoj membrani pri čemu je njihova raspodjela u postocima gotovo identična za obje usporedbe. Zanimljivo je da različito eksprimirani proteini u usporedbi WB sa GP7TB stanicama imaju značajan postotak proteina koji pripadaju citoskeletu, dok je manji postotak onih iz jezgre.

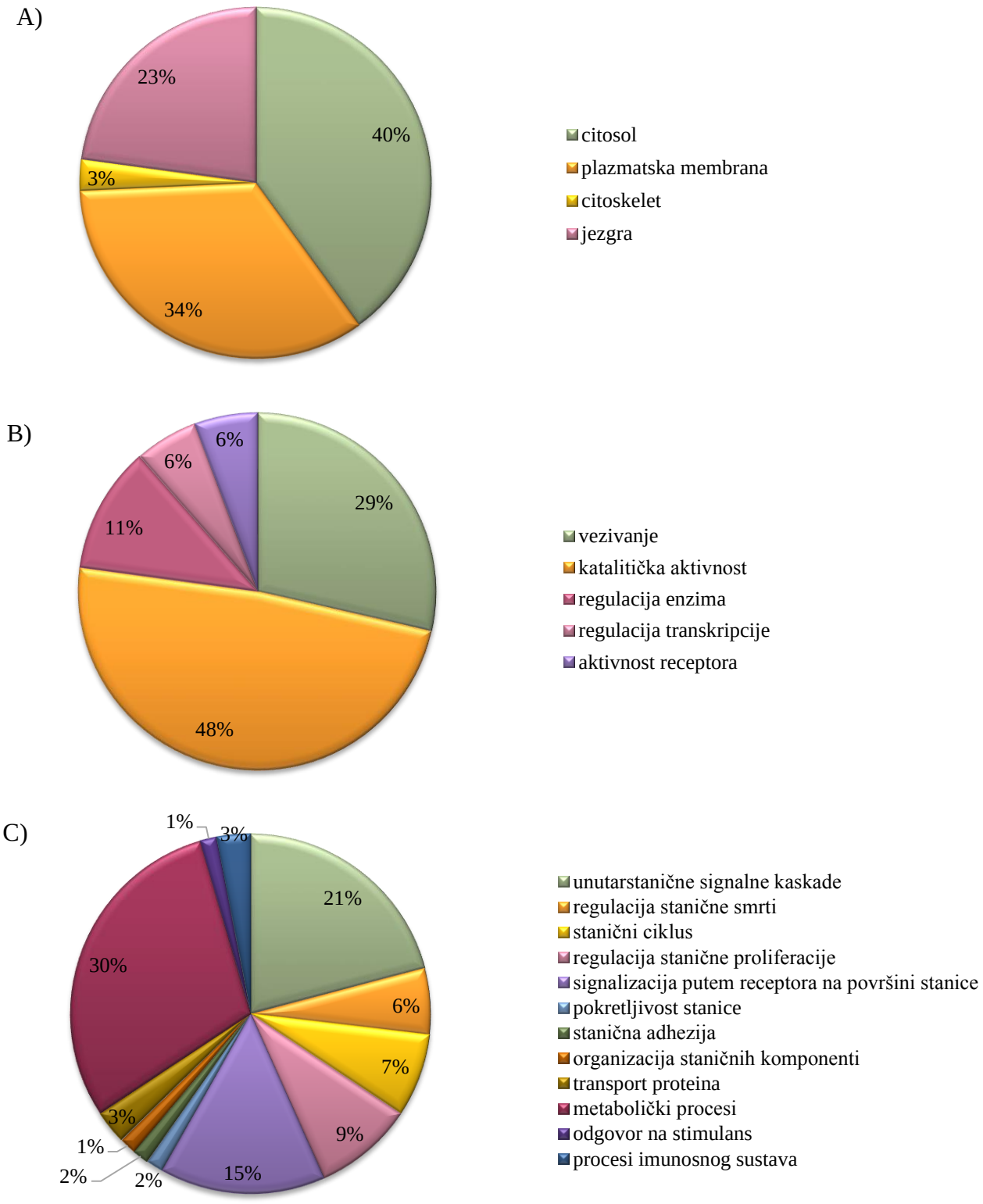
Suprotno tome, rezultati raspodjele stanične lokalizacije za usporedbu GP7TB sa GP7TB.SAI stanicama pokazuju značajan postotak proteina jezgre i tek vrlo malo postotak onih koji pripadaju citoskeletu. Izraženije promjene u ekspresiji proteina jezgre u SAI stanicama u odnosu na populaciju iz koje su izolirane zabilježili smo i za stanice prostate (odlomak 4.1.6.2).

Rezultati za molekularnu funkciju vrlo su slični za obje usporedbe. Tako najviše proteina ima funkciju katalitičke aktivnosti i vezivanja (eng. *binding*). Nešto veći postotak proteina u usporedbi GP7TB i GP7TB.SAI stanica ima ulogu u regulaciji enzima ali i transkripcije što je opet vjerojatno povezano s većim brojem proteina anotiranih u jezgru. Ostali proteini imaju još i ulogu aktivnosti receptora dok su samo u usporedbi WB i GP7TB stanica zabilježeni proteini s ulogom strukturnih molekula.

Rezultati raspodjele proteina s obzirom na njihove biološke procese pokazuju nešto veće razlike među usporedbama. Očekivano, i ovdje najveći postotak proteina u obje usporedbe sudjeluje u metaboličkim procesima te unutarstaničnim signalnim kaskadama. U usporedbi WB i GP7TB stanica zabilježen je nešto veći postotak proteina koji sudjeluju u procesima imunosnog sustava, stanične adhezije i pokretljivosti stanica, dok su proteini koji sudjeluju u signalizaciji putem receptora na površini stanice zastupljeniji u usporedbi GP7TB sa GP7TB.SAI stanicama.



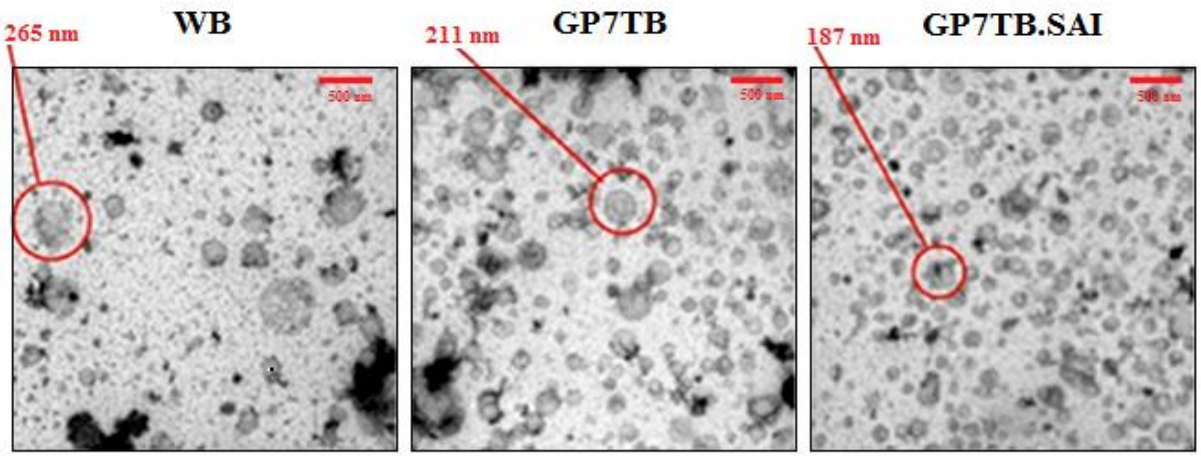
Slika 20. GO anotacije različito eksprimranih signalnih proteina u usporedbi WB i GP7TB stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.



Slika 21. GO anotacije različito eksprimranih signalnih proteina u usporedbi GP7TB i GP7TB.SAI stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.

4.2.3. Morfološke karakteristike EV

Analiza EV transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) je pokazala značajne razlike u veličini i broju otpuštenih EV među pojedinim staničnim linijama. Na slici 22. je vidljivo da su WB stanice otpuštale veće EV (265 nm) u odnosu na GP7TB (211 nm) i GP7TB.SAI čije su EV bile najmanjeg promjera (187 nm). Također, se može uočiti da su GP7TB.SAI stanice otpuštale najveći broj za razliku od WB koje su otpustile najmanji broj EV. Povećano otpuštanje EV moguća je posljedica maligne transformacije WB stanica u GP7TB odnosno dodatne sposobnosti SAI da prodru kroz meki agar. Naime, nekoliko je istraživanja otkrilo da su uzorci plazme pacijenata s uznapredovalim oblicima raka pluća, jajnika i prostate sadržavali veći broj EV u usporedbi sa kontrolnim pacijentima[110,117,120] dok su Ginestra i sur.,[184] ispitivanjem pet ljudskih tumorskih staničnih linija, pokazali da je količina otpuštenih EV povezana s invazivnom sposobnošću tih stanica *in vitro*.

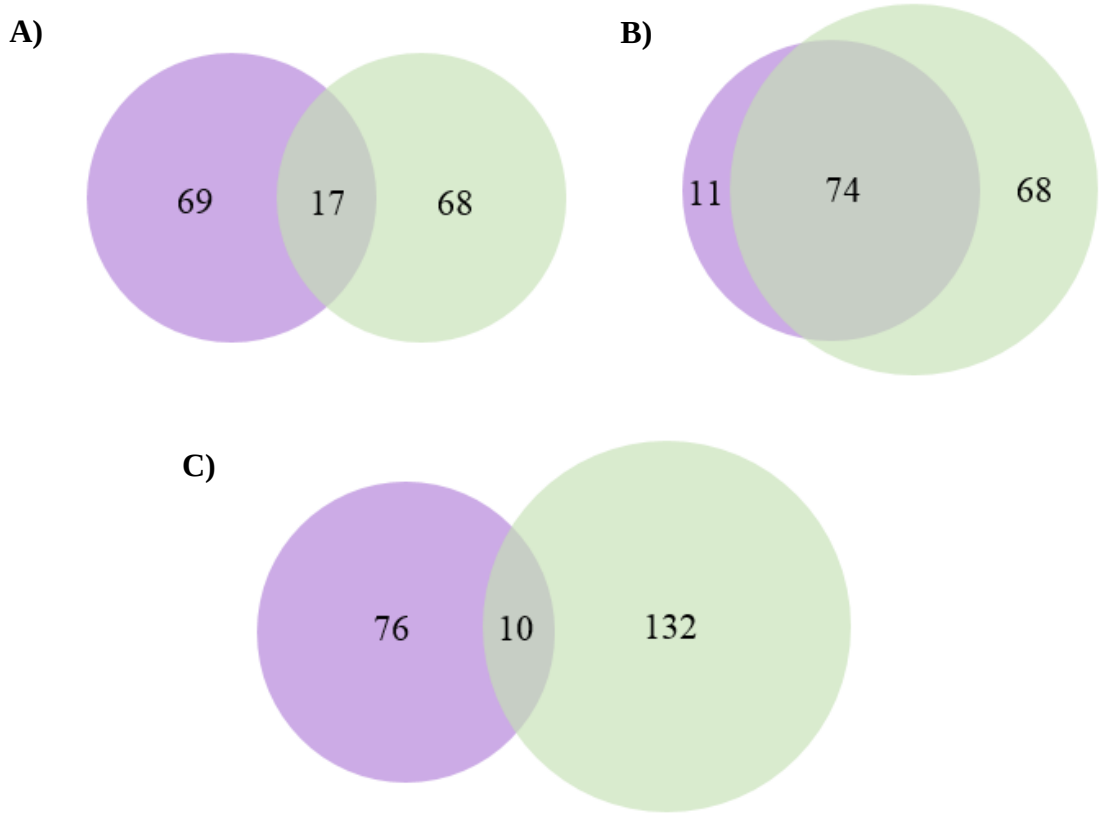


Slika 22. Transmisijska elektronska mikroskopija EV WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanica

4.2.4. Proteomička analiza EV

S obzirom da je poznato da EV sudjeluju u nizu bioloških procesa od značajnog je interesa istražiti njihov proteinski sastav kako bi se što bolje razjasnile njihove uloge. Proteomika se dosada pokazala kao učinkovito sredstvo za proučavanje EV pa broj objavljenih radova na tu temu sve više raste.[120-122] Kako bi što bolje okarakterizirali razlike između pojedinih staničnih linija, ali i u nastojanju pronalaska proteina, potencijalnih biomarkera maligne transformacije, ispitali smo i usporedili proteomički sastav WB, GP7Tb i GP7TB.SAI stanica. Proteomička analiza EV napravljena je upotrebom LC-ESI-MS/MS masene spektrometrije. Izolirane EV iz kondicioniranog medija triju ispitivanih staničnih linija prvo su analizirane pomoću SDS-poliakrilamid elektroforeze nakon čega su postupkom digestije u gelu pripremljeni uzorci za analizu na masenom spektrometru.

Kako je prikazano na slici 23. usporedba proteina dobivenih proteomičkom analizom EV iz WB i GP7TB stanica otkrila je 69 proteina jedistvenih za WB populaciju, 68 proteina jedinstvenih za GP7TB populaciju dok je svega 17 proteina prisutno u oba uzorka. Slični rezultati dobiveni su i u usporedbi proteina EV iz WB i GP7TB.SAI stanica pri čemu su ova dva uzorka također pokazala mali broj zajedničkih proteina, svega njih 10. U EV iz WB populacije identificirano je 76 jedinstvenih proteina nasuprot 132 proteina jedinstvenih za EV GP7TB.SAI stanica. EV iz GP7TB i GP7TB.SAI stanica sadržavale su znatan broj zajedničkih proteina, njih 74, dok je 11 proteina bilo prisutno samo u EV proteomu GP7TB te 68 samo u onom GP7TB.SAI populacije.



Slika 23. Broj zajedničkih i jedinstvenih proteina identificiranih u proteomičkoj analizi EV. Usporedba EV proteina između: A) WB i GP7TB, B) GP7TB i GP7TB.SAI i C) WB i GP7TB.SAI stanica

Među proteinima jedinstvenim za EV GP7TB populacije u usporedbi sa EV WB stanica identificirani su različiti integrini (Itgb1, Itga6, Itgav, Itga2b), mali GTP-azni proteini (Rab7a, Rap1b, Rab11b, Rala, Rab5a, Rab10), proteini toplinskog šoka (Hsp90ab1, Hspa5), metabolički proteini (Gapdh, Pkm2, Ldha, Ppia, Enpp1) te transportni/kanalni proteini (Atp1a1, Slc3a2, Slc16a1, Slc4a7, Atp1b1, Slc44a1, Slc25a3,Atp1b3, Slc2a1, Slc1a4). Gotovo svi navedeni proteini prisutni su i u proteomu EV GP7TB.SAI stanica. Neki od jedinstvenih proteina u EV GP7TB.SAI stanica u usporedbi s EV GP7TB stanica su metabolički proteini (Eno1, Aldoa, Pgd, Pgk1, Gpi, Mdh2), proteini povezani s prometom vezikula (eng. *vesicle trafficking-associated proteins*) (Pdcd6ip, Vcp) te ostali s različitim ulogama u progresiji tumora poput Cd44 i Cspg4.

Tablica 5. Proteini identificirani samo u EV GP7TB stanica u usporedbi s EV WB stanica. Postotak združivanja predstavlja mjeru pouzdanosti identifikacije određenog proteina.

Oznaka gena	Naziv proteina	Uniprot oznaka	Postotak združivanja (*protein "score"*)
Itgb1	Integrin beta-1	P49134	23.2
Pkm2	Piruvat kinaza	Q6P7S0	12.0
Itga6	Integrin alfa-6	G3V991	10.5
Gapdh	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	P04797	8.70
Vcl	Vinkulin	P85972	7.10
Rab7a	Ras-vezani protein Rab-7a	P09527	6.85
Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	P63102	6.83
Ctnna1	Katenin, alfa 1	Q5U302	6.52
Gnai2	Gvanin nukleotid vezni protein G(i) podjedinica alfa-2	P04897	4.84
Hsp90ab1	Protein toplinskog šoka 90-beta	P34058	4.57
Anxa6	Aneksin A6	P48037	4.45
Slc3a2	4F2 antigen na površini stanice, teški lanac	Q794F9	4.20
Slc16a1	Transporter monokarboksilata 1	P53987	3.51
Tfrc	Receptor transferina 1	Q99376	2.91
Htra1	Proteaza proteina za vezanje inzulinskog faktora rasta 5	Q9QZK5	2.85
Sdcbp	Sintenin-1	Q9JI92	2.84
Tubb2b	Tubulin beta-2B lanac	Q3KRE8	2.47
Prdx1	Peroksiredoksin-1	Q63716	2.42
Rab11b	Ras-vezani protein Rab-11B	O35509	2.40
Ldha	L-laktat-dehidrogenaza A	Q6P9U7	2.37
Slc4a7	Kotransporter natrijevog bikarbonata 3	Q9R1N3	2.34
Ywhag	14-3-3 protein gama	P61983	2.24
Atp1b1	ATP-aza natrij/kalij transporta, podjedinica beta-1	P07340	2.23
Gstp1	Glutation S-transferaza P	P04906	2.15
Epha2	Receptor Efrina	Q03145	2.13
Tln1	Talin	Q498D4	2.10
Alcam	CD166 antigen	O35112	2.07
Itga2b	Integrin alfa-2, beta	D3ZAC0	2.06
Rala	Ras-vezani protein Ral-A	P63322	2.03
Gnb2	Gvanin nukleotid vezni protein beta-2	Q9QX35	2.02
Rab5a	Mali GTP-azni protein rab5	O88565	2.02
Akr1b1	Reduktaza aldolaze	P07943	2.02
Cd9	CD9 antigen	P40241	2.02
Hspa5	78 kDa protein reguliran glukozom	P06761	2.01
Slc44a1	Protein transporter kolina 1, izoforma 1	Q8VII6	2.01
Itga5	Integrin alfa-5	D4ACU9	2.00
Rhoa	Transformirajući protein RhoA	P61589	2.00
Ppia	Peptidil-prolil-*cis-trans*-izomeraza A	P10111	2.00
Atp1b3	ATP-aza natrij/kalij transporta, podjedinica beta-3	Q63377	2.00
Itgav	Integrin alfa-V	F1LZX9	2.00
Slc2a1	Transporter olakšanog prijenosa glukoze	P11167	1.86
Rab10	Ras-vezani protein Rab-10	P35281	1.72

Tablica 6. Proteini identificirani samo u EV GP7TB.SAI u usporedbi s EV GP7TB stanica. Postotak združivanja predstavlja mjeru pouzdanosti identifikacije određenog proteina.

Oznaka gena	Naziv proteina	Uniprot oznaka	Postotak združivanja (*protein "score"*)
Pdcd6ip	Protein programirane stanične smrti 6	Q9QZA2	21,1
Akr1b8	Protein sličan reduktazi aldoze	Q91W30	14,5
Vcp	Protein koji sadrži valozin	P46462	10,3
Eno1	Enolaza	P04764	7,7
Aldoa	Frzuktoza-bisfosfat aldolaza A	P05065	6,1
Myh9	Miosin-9	Q62812	5,55
Tuba3a	Tubulin alfa-3 lanac	Q68FR8	5,1
Cd44	CD44 protein	O08779	4,99
Pgk1	Fosfoglicerat kinaza 1	P16617	4,12
Rab5c	Ras-vezani protein Rab-5C	P35278	4.06
Hspa2	Protein toplinskog šoka 2	P14659	4,04
Kpnb1	Importin podjedinica beta-1	P52296	4,02
Cdc42	Kontrolni protein stanične podjele 42	Q8CFN2	4
Cfl1	Kofilin-1	P45592	4
Atp5b	ATP sintaza, podjedinica beta, mitohondrijska	P10719	2,57
Plscr3	Fosfolipidna skramblaza 3	Q6QBQ4	2,46
Plec	Plektin	P30427	2,44
Txn1	Tioredoksin	P11232	2,4
Ywhae	14-3-3 protein epsilon	P62260	2,33
Hspa1l	Protein sličan proteinu toplinskog šoka 1	P55063	2,28
Lphn2	Latrofilin-2	O88923	2,26
Cd14	Monocitni antigen diferencijacije CD14	Q63691	2,18
Fdps	Farnesil-pirofosfat sintaza	P05369	2,13
Clic1	Unutarstanični kanalni kloridni protein 1	Q6MG61	2,09
Myof	Mioferlin	Q69ZN7	2,09
A2m	Alfa-2-makroglobulin	Q6LDG8	2,06
Mdh2	Malat-dehidrogenaza, mitohondrijska	P04636	2,01
Pgd	6-fosfoglukonat-dehidrogenaza, dekarboksilirajuća	Q7TP11	2,01
Serpinh1	Serpin H1	P29457	2,01
Bsg	Basigin	P26453	2
Cspg4	Kondroitin sulfatni proteoglikan 4	Q00657	2
Dnaja1	DnaJ homolog 1	P63036	2
Psma4	Podjedinica alfa 4 proteasoma	P21670	2
Wars	Triptofanil-tRNA sintetaza, citoplazmatska	F8WFH8	2
Aldh3a1	Aldehid-dehidrogenaza	P11883	1,81
Car3	Karbonska anhidraza 3	P14141	1,72
Cct6a	Šaperonin podjedinica 6a	Q3MHS9	1,71
Pafah1b2	Acetilhidrolaza aktivirajućeg faktora trombocita, beta podjed.	O35264	1,7
Ttn	Titin	D4A8Y1	1,63
Pdia3	Protein disulfidne-izomeraze A3	P11598	1,59
Gpi	Glukoza-6-fosfat izomeraza	Q6P6V0	1,34

Tablica 7. Proteini identificirani samo u EV GP7TB u usporedbi s EV GP7TB.SAI stanica. Postotak združivanja predstavlja mjeru pouzdanosti identifikacije određenog proteina.

Oznaka gena	Naziv proteina	Uniprot oznaka	Postotak združivanja (*protein "score"*)
Cltc	Klatrin, teški lanac	P11442	14.3
Epha2	Receptor efrina	Q03145	2.13
Dst	Protein Dst	F1M118	2.12
Slc25a3	Prijenosnik fosfata 25 (mitohondrijski prijenosnik)	P16036	2.01
Itga5	Neokarakterizirani protein Itga5	D4ACU9	2.00
Rab10	Ras-vezani protein Rab-10	P35281	1.72
Efnb1	Efrin B1	Q6P7B6	1.54
Trpm4	Melastatin-4	Q9ESQ5	1.41
Trim47	Protein 47 s „*tripartite*" motivom	D3ZA22	1.40
Sin3a	Neokarakterizirani protein Sin3a	Q96ST3	1.33
Enpp1	Pripadnik porodice pirofosfataza/fosfodiesteraza 1	Q924C3	1.33

Promjene u adhezijskim svojstvima neoplastičnih stanica igraju važnu ulogu u razvoju i progresiji raka. Integrini predstavljaju jednu od najvažnijih skupina molekula stanične adhezije koje ujedno sudjeluju u međustaničnom prijenosu kao i prijenosu signala između stanice i izvanstaničnog matriksa. Usporedba proteomičkog sastava EV iz triju ispitivanih staničnih linija je pokazala nekoliko integrina (Itgb1, Itga6, Itgav, Itga2b) prisutnih u GP7TB i GP7TB.SAI stanicama koji nisu otkriveni u WB populaciji. Ovi su integrini pronađeni u proteomu EV otpuštenih iz nekoliko različitih tumorskih staničnih linija dok je nekoliko istraživanja potvrdilo njihovu ulogu u progresiji i invazivnosti karcinoma jetre.[120,121,185] Primjerice, pokazano je da povećanje ekspresije integrina beta-1 (Itgb1) u više staničnih linija hepatocelularnog karcinoma povezano s njihovom invazivnom sposobnošću.[186] Slični rezultati dobiveni su i za integrin alfa-6 (Itga6) u istraživanju njegove ekspresije na humanim stanicama intrahepatičnog kolangiokarcinoma.[187] Zanimljivo je da je integrin beta-5 (Itgb5) pronađen samo u proteomu GP7TB.SAI EV. Nedavna istražiivanja upućuju na ulogu Itgb5 u EMT prijelazu induciranom djelovanjem TGF-β, tumorskoj angiogenezi i otpornosti na kemoterapiju.[188]

Proteomičkom analizom je u EV GP7TB i GP7TB.SAI stanica identificiran i jedan aneksin, aneksin A6, koji nije bio prisutan u WB EV. Aneksini su skupina unutarstaničnih proteina koji regiraju s fosfolipidima stanične membrane ovisno o koncentraciji Ca^{2+} te imaju

ulogu u organizaciji stanične membrane. Ovi proteini također, kroz različite mehanizme, reguliraju niz signalnih puteva koji potiču proliferaciju i pokretljivost stanica kao i invaziju tumora i metastaze. Organizacijski sadrže dvije regije, visoko konzerviranu jezgru i N-terminalni dio koji znatno varira.[105] Aneksin A6 se razlikuje od ostalih pripadnika ove skupine po tome što u jezgri sadrži osam, a ne četiri aneksinska ponavljanja. Istraživanjima na staničnim linijama raka dojke pokazala su dvojaku ulogu ovog proteina u karcinomu dojke. Tako je otkriveno da je smanjena ekspresija aneksina A6 potrebna za pojačanu proliferaciju tumorskih stanica neovisnu o čvrstoj podlozi pri čemu je taj protein djelovao kao tumorski supresor. Međutim njegova je ekspresija bila potrebna za povećanu pokretljivost i invaziju tumorskih stanica.[189] Osim toga, pokazano da te stanice izlučuju aneksine vezane za staničnu membranu, uključujući i aneksin A6, putem EV.[105,189]

Promjene u metaboličkim putovima poput povećane glikolize jedno je od glavnih fizioloških obilježja svih stanica raka. Danas je poznato da stanice raka troše znatno veće količine glukoze od normalnih stanica kako bi zadovoljile potrebe neograničenog rasa. Zbog toga nije neobično da su promjene u ekspresiji glikolitičkih enzima zabilježene u gotovo svim tipovima karcinoma.[17,22,23] Analiza proteoma EV GP7TB i GP7TB.SAI je pokazala da su te EV sadržavale niz metaboličkih proteina koji nisu otkriveni u proteomu EV iz WB populacije. Jedan od njih, piruvat-kinaza (Pk), enzim je koji katalizira poslijednju reakciju glikolize. Stanice raka, uključujući i one HCK, pretežno ekprimiraju M2 izoformu ovog enzima (Pkm2) jer se njegova aktivnost može jednostavno i brzo regulirati dimerizacijom. Ulogu Pkm2 u hepatokarcinogenezi pokazali su Wang i sur.[190] pri čemu je inhibicija ovog enzima u kombinaciji s potiskivanjem MAPK signalnog puta suzbila rast malignih stanica. Između ostalog je pokazano da Pkm2 može u jezgri regulirati ekspresiju gena. Tako je u jednom istraživanju otkriveno da je translokacija Pkm2 u jezgru regulirana Erk-om i povezana s metastatskim potencijalom HCK[191] Zanimljivo je da je proteom EV iz GP7TB.SAI sadržavao i nekoliko jedinstvenih metaboličkih proteina koji nisu identificirani niti u GP7TB EV proteomu. Među njima su enolaza i i glukoza-6-fosfat izomeraza (Gpi). Enolaza je glikolitički ezim koji katalizira pretvorbu 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat. Oblik ovog enzima, Enolaza 1 (Eno1), prisutan je u gotovo svim odraslim tkivima a njegova je povećana ekspresija zabilježena u nekoliko tumorogenih i metastatskih staničnih linija. Proteomičkom metodom je otkriveno da je povećana ekspresija ovog enzima uključena u progresiju HCK povezanog s HPV C infekcijom.[192] Gpi je enzim koji ima važnu ulogu kao glikolitički enzim unutar stanice,

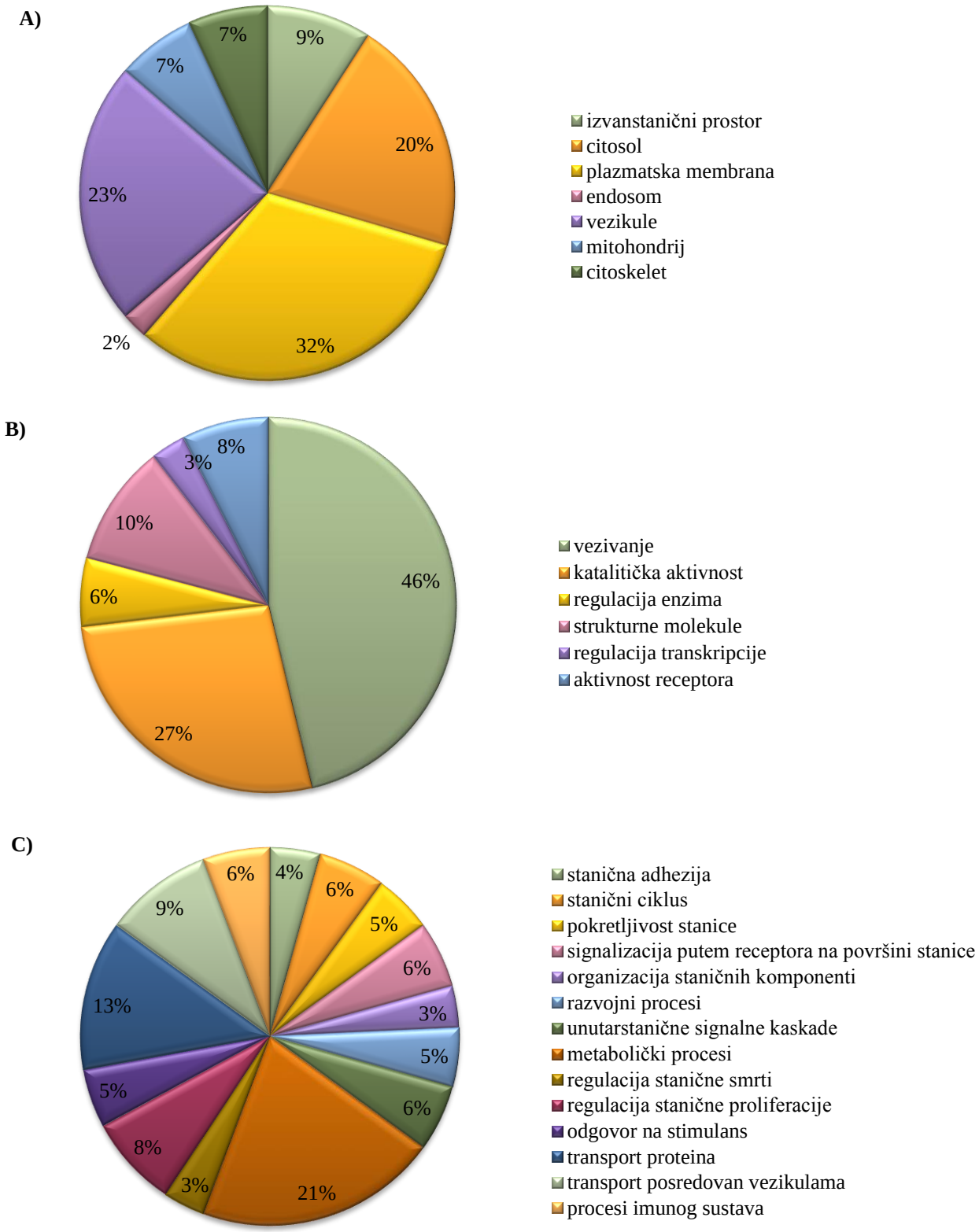
međutim izlučen izvan nje poznat je kao autokrini faktor pokretljivosti (AMF, eng. *autocrine motility factor*) te stimulira angiogenezu i pokretljivost tumorskih stanica. Pokazano je da Gpi štiti stanice raka od apoptoze i regulira stanični rast aktivacijom kaspaza.[193] Uloga ovog enzima u invaziji tumora potvrđena je otkrićem da Gpi inducira ekspresiju metaloproteinaze matriksa 3 u stanicama hepatocelularnog karcinoma.[194]

Među proteinima jedinstvenim za EV GP7TB.SAI populacije pronađeni su i proteini Vcp (eng. *valosine containing protein*) i Pdcd6ip (eng. *programmed cell death 6-interacting protein*) koji sudjeluju u prometu vezikula, ali koji imaju i značajnu ulogu u regulaciji stanične smrti. Smatra se da Vcp ima antiapoptotsku ulogu i sudjeluje u poticanju metastaza aktivirajući signalni put u koji je uključen transkripcijski faktor NF-κB.[195] Također je pokazano da je razina ekspresije ovog proteina povezana s prognozama i ponovnom pojavom nekoliko karcinom uključujući i hepatocelularni.[196] Pdcd6ip sudjeluje u modulaciji apoptoze kroz interakciju s različitim proteinima uključenim u programiranu smrt stanice. Proteomička analiza pokazala je prisutnost ovog proteina u EV otpuštenima iz stanične linije raka debelog crijeva s visokim metastatskim potencijalom dok u EV iz stanica primarnog karcinoma nije identificiran.[121]

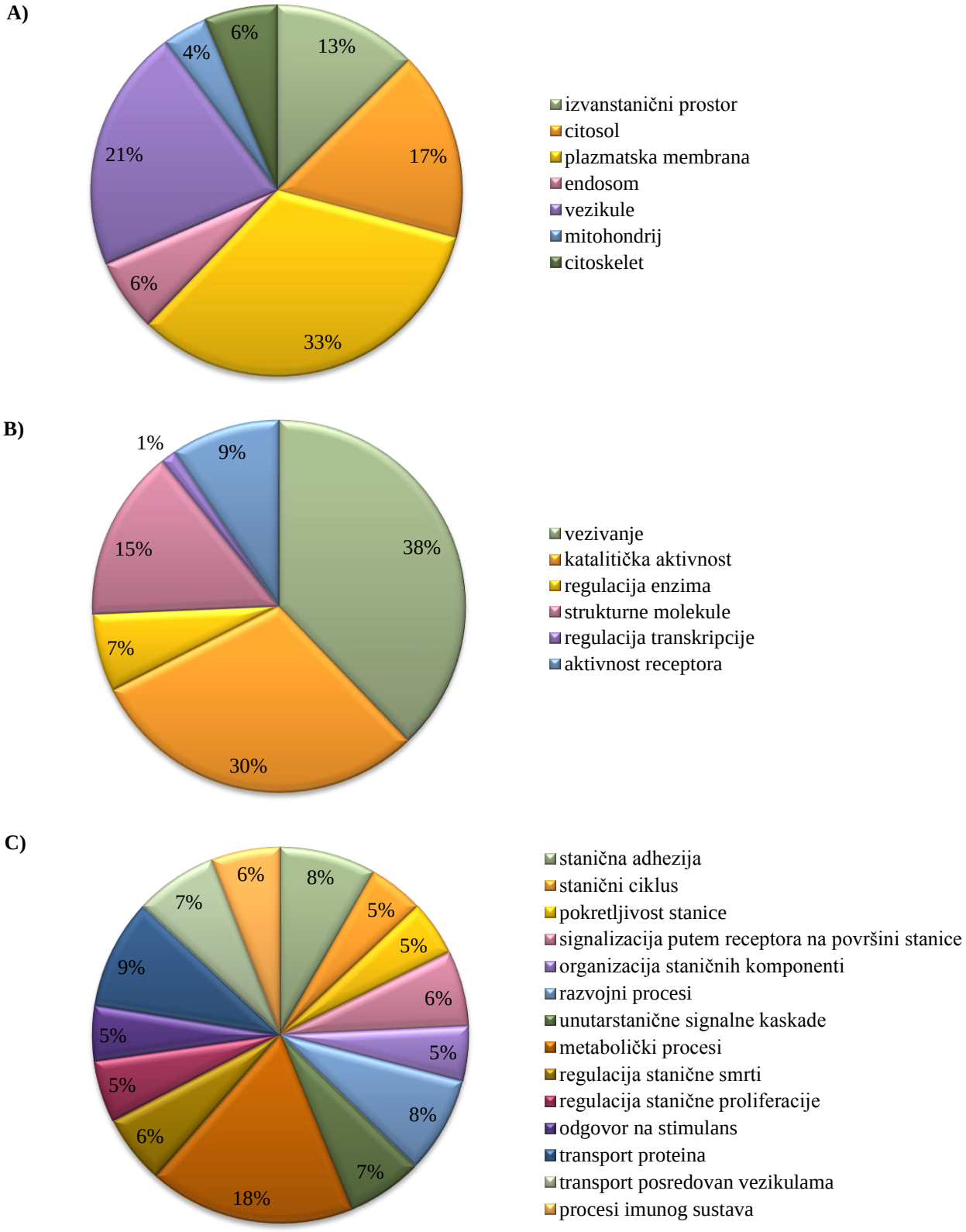
Iz ovdje prikazanih rezultata vidi se da i sadržaj proteina EV upućuje na neke od promjena do kojih je došlo uslijed kemijske transformacije jetrenih epitelnih stanica. Isto tako se na osnovi razlika između proteoma EV GP7TB i GP7TB.SAI stanica može potvrditi da je na mekom agaru izolirana specifična subpopulacija stanica čiji jedinstveni EV proteini imaju izraženiju ulogu u izbjegavanju apoptoze, invaziji, angiogenezi i staničnoj pokretljivosti.

4.2.5. GO anotacije

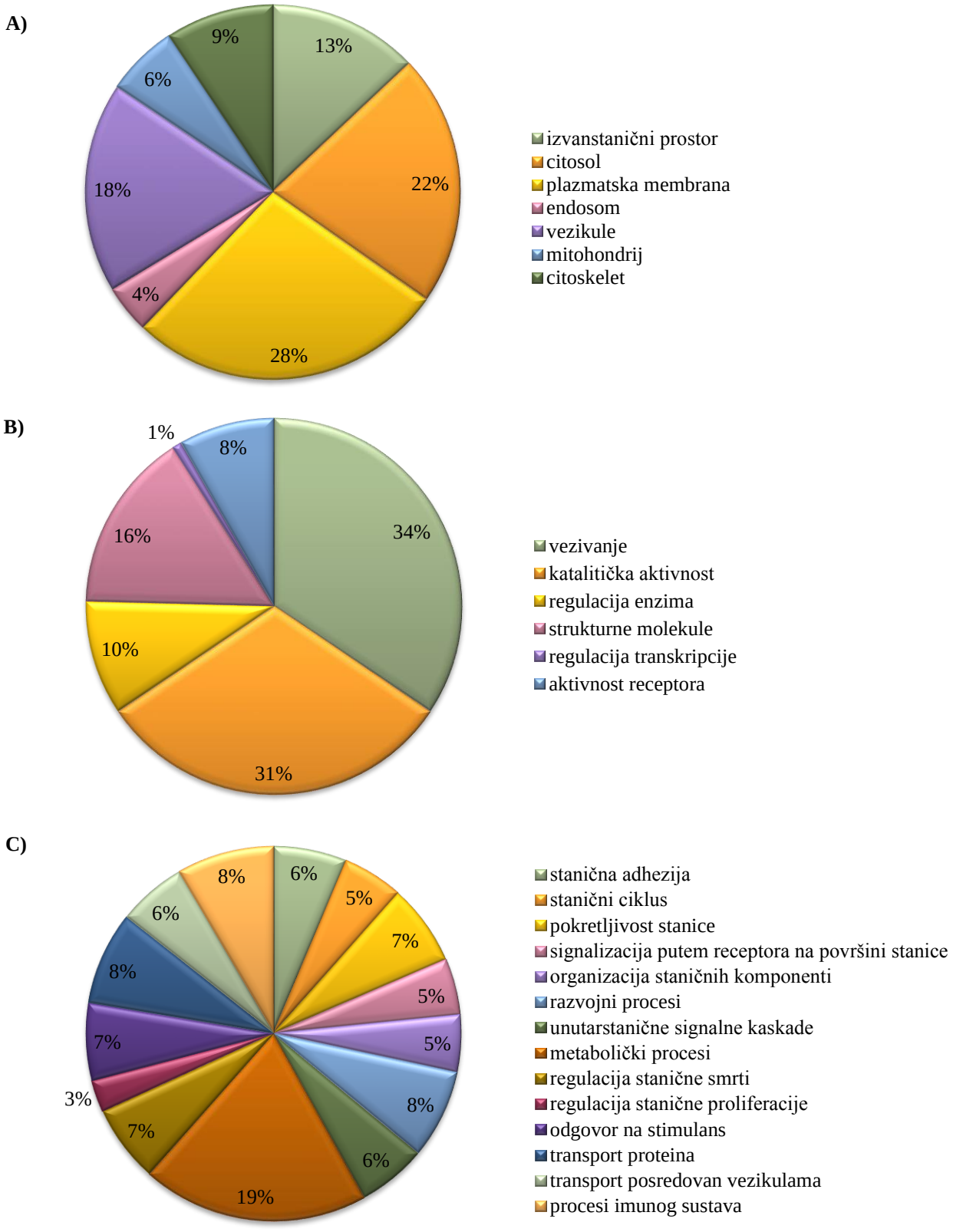
Proteini dobiveni proteomičkom analizom EV WB, GP7TB i GP7TB.SAI populacije klasificirani su pomoću DAVID baze prema njihovoj staničnoj lokalizaciji, molekularnoj funkciji i biološkim procesima. Na tortnim grafikonima (slike 24., 25. i 26.) prikazani su postotci najzastupljenijih anotacija u pojedinoj kategoriji za proteine identificirane u sva tri uzorka. Rezultati dobiveni za staničnu lokalizaciju pokazuju vrlo sličnu raspodjelu proteina EV za sve tri stanične populacije. Tako je najveći postotak proteina bio iz plazmatske membrane i citosola te je kako, je i očekivano velik broj proteina, čak oko 20 % u sva tri uzorka, pripadao nekom obliku vezikula. Od ostalih staničnih komponenti prisutni su još proteini mitohondrija i endosoma, a podjednaki je dio proteina pripadao citoskeletu stanice i izvanstaničnom prostoru.



Slika 24. GO anotacija proteina identificiranih LC-MS/MS analizom EV WB stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.



Slika 25. GO anotacija proteina identificiranih LC-MS/MS analizom EV GP7TB stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.



Slika 26. GO anotacija proteina identificiranih LC-MS/MS analizom EV GP7TB.SAI stanica. Proteini su anotirani prema njihovoj: A) staničnoj komponenti, B) molekularnoj funkciji i C) biološkom procesu.

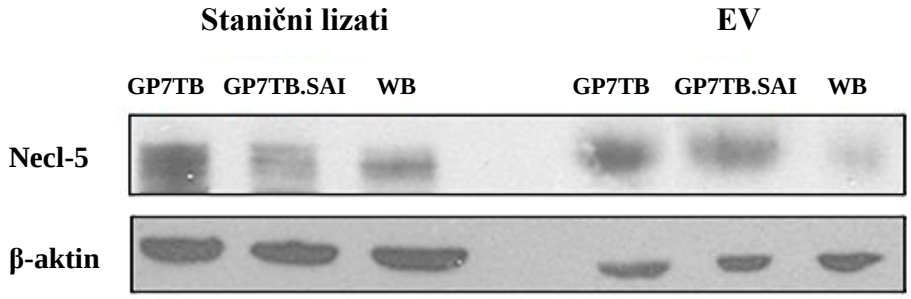
Rezultati za molekularnu funkciju također su vrlo slični za EV sve tri stanične linije. Među najzastupljenijima su funkcije vezivanja (eng. *binding*) i katalitička aktivnost koje zajedno imaju preko 60 % anotiranih proteina. Proteini s funkcijom strukturnih molekula nešto su zastupljniji u EV transformiranih stanica, GP7TB i GP7TB.SAI, u odnosu na one WB stanica kod kojih je prisutan nešto veći postotak proteina s funkcijom regulacije transkripcije. Preostali dio u sva tri uzorka EV čine proteini s funkcijama regulacije enzima i aktivnošću receptora.

Proteini identificirani u EV sve tri stanične linije pripadaju velikom broju različitih bioloških procesa. Među njima najviše je proteina koji sudjeluju u metaboličkim procesima. Unatoč vrlo sličnoj raspodjeli na ostale procese mogu se zapaziti neke razlike uspoređujući proteom EV pojedinih staničnih linija. Tako npr. EV GP7TB i GP7TB.SAI imaju nešto više proteina anotiranih u procesu stanične adhezije i regulaciji stanične smrti dok su proteini koji sudjeluju u transportu proteina i onom posredovanom vezikulama zastupljeniji u EV WB stanica. Zanimljivo je da se postotak proteina koji sudjeluju u staničnoj proliferaciji smanjuje od netransformiranih WB stanica do na mekom agaru invazivnih GP7TB.SAI što može upućivati na sličnost GP7TB.SAI sa SAI populacijom PEC stanica u kojoj je zabilježena smanjena ekspresija proteina staničnog ciklusa.

4.2.6. Ekspresija Necl-5 i utjecaj EV na citotoksičnost NK stanica

Kako je spomenuto u literaturnom pregledu Necl-5 je molekula stanične adhezije koja pripada skupini nektina. Njegova je ekspresija rijetko izražena u normalnim epitelnim stanicama, ali je zato značajno povišena u malignim stanicama. Međutim od posebnog su interesa istraživanja koja su pokazala da je Necl-5 ujedno i ligand za CD226, protein na površini NK stanica koji regulira njihovu citotoksičnost.[125-128] S obzirom da je poznato da i EV koje otpuštaju tumorske stanice mogu modulirati imunosne odgovore željeli smo, u daljnjem nastojanju karakterizacije ovog modela hepatokarcinogeneze, ispitati ekspresiju Necl-5 i mogući utjecaj EV na citotoksičnost NK stanica.

Western blot analizom ispitana je ekspresija Necl-5 na staničnim lizatima WB, GP7TB i GP7TB.SAI populacije kao i na EV otpuštenim iz pojedine linije stanica. Kako je vidljivo na slici 27. GP7TB stanice su pokazale najveću ekspresiju Necl-5. Isti rezultat zabilježen je i za GP7TB EV. Zanimljivo je da su WB i GP7TB.SAI stanični lizati imali sličnu ekspresiju ovog proteina dok je u EV WB stanica ona bila gotovo nezamjetna.

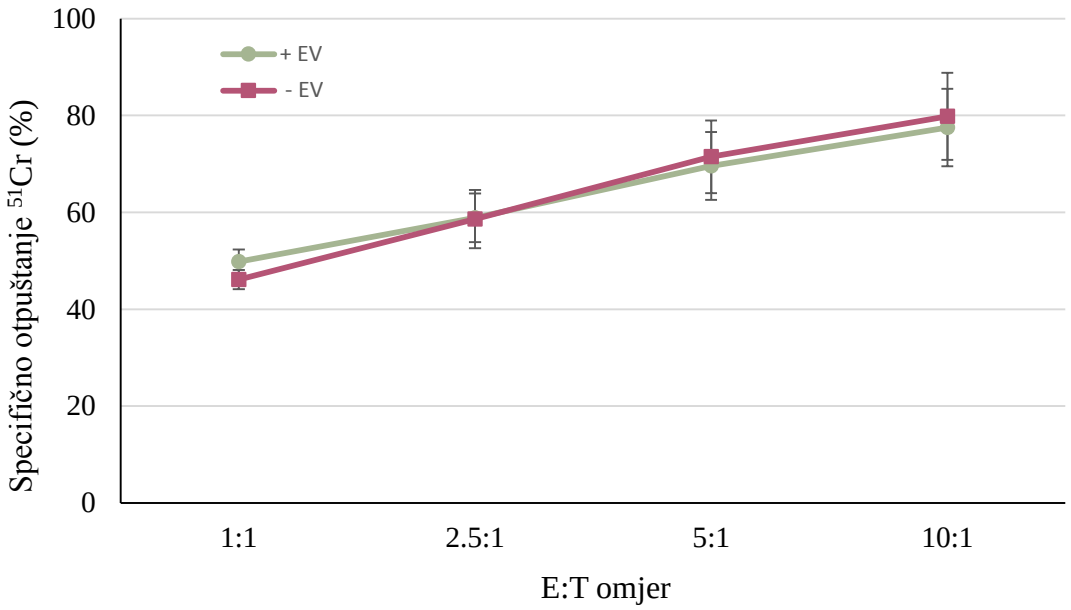


Slika 27. Ekspresija Necl-5 na staničnim lizatima i EV iz WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanica.

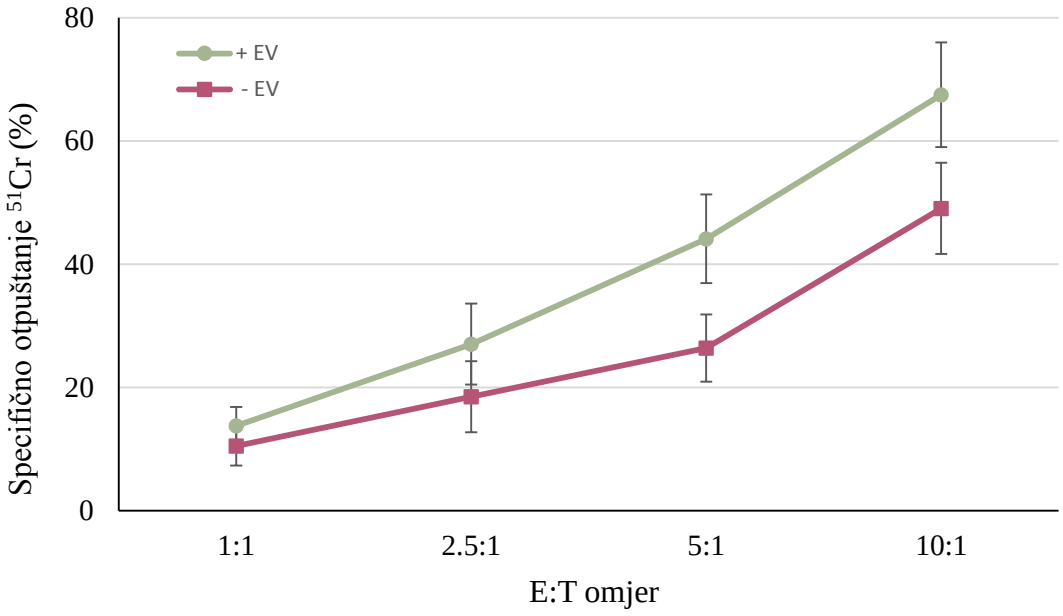
U sljedećem je koraku metodom otpuštanja radioaktivnog kroma (^{51}Cr) ispitan utjecaj EV koje su otpustile transformirane GP7TB stanice kao i iz njih, na mekom agaru, izdvojene GP7TB.SAI stanice na citotoksičnosti NK stanica izoliranih iz jetara štakora. Prije analize NK stanice su predinkubirane u mediju s ili bez prisutnosti EV GP7TB i GP7TB.SAI te potom inkubirane s ^{51}Cr stanicama u različitim E:T omjerima. Iz dijagrama na slici 28. se može vidjeti da GP7TB EV nisu imale nikakav utjecaj na promjenu aktivnosti NK stranica. Dobivene se vrijednosti u svim E:T omjerima podudaraju s onima dobivenima u eksperimentu bez EV. Međutim, rezultati analize s EV izoliranim iz GP7TB.SAI pokazuju znatno povećanje aktivnosti NK stanica u odnosu na uzorak bez EV (slika 29.). Kako se povećavao E:T omjer te su razlike u citotoksičnosti postajale izraženije.

Dobiveni rezultati pokazuju da Necl-5 pozitivne EV GP7TB.SAI stimuliraju citotoksičnost NK stanica. S obzirom da su GP7TB stanice transformirane, te da se vjeruje da Necl-5 ima funkciju stimulatora NK citotoksičnosti pretpostavili smo da povećana ekspresija Necl-5 na stanicama višeg stupnja transformacije stimulira veći imunosni odgovor kako bi se te stanice kontrolirale. Međutim, činjenica da EV GP7TB stanica nisu imale učinak na citotoksičnost NK stanica unatoč većoj ekspresiji Necl-5 (čak i u odnosu na GP7TB.SAI EV) upućuje na važnost drugih molekularnih faktora koji određuju utjecaj EV na imunosni odgovor. Iako se u posljednje vrijeme povećao interes za istraživanjem njihovog djelovanja u imunosnom nadzoru, malo je toga do sada objavljeno o direktom utjecaju EV na funkciju NK stanica. Iako je većina radova upućivala na ulogu EV u suzbijanju citotoksičnosti NK stanica, Gastpar i sur.[197] su pokazali da egzosomi staničnih linija hepatocelularnog karcinoma koji na površini eksprimiraju Hsp70 mogu aktivirati citotoksičnost NK stanica. Zbog toga je potrebno provesti daljnja istraživanja

kako bi se utvrdilo koje su druge molekule, osim Necl-5, uključene u suzbijanje ili stimulaciju aktivnosti NK stanica. S obzirom na veliki broj kandidata, polazište istraživanja mogli bi biti neki od proteina čije smo razlike u ekspresiji utvrdili proteomičkim metodama.



Slika 28. Utjecaj EV iz GP7TB na citotoksičnost NK stanica. Svaki je uzorak napravljen u 4 replikata. Odstupanja su izražena kao SD.



Slika 29. Utjecaj EV iz GP7TB.SAI na citotoksičnost NK stanica. Svaki je uzorak napravljen u 4 replikata. Odstupanja su izražena kao SD.

§ 5. ZAKLJUČAK

Rak je na molekularnoj razini vrlo heterogena bolest i jedan od glavnih uzročnika smrti u svijetu. Postojanje velikog broja tipova tumora s različitim karakteristikama znatno otežava njegovo razumijevanje i kreiranje učinkovitih metoda liječenja. Stanične linije se vrlo često koriste u istraživanjima bioloških mehanizama uključenih u nastanak i progresiju gotovo svih tipova karcinoma.

U nastojanju da produbimo saznanja o molekularnim i staničnim mehanizmima koji sudjeluju u razvoju i progresiji raka prostate, a koji su još velikim dijelom nerazjašnjeni, u ovom smo radu predstavili novi model spontane transformacije epitelnih stanica prostate (PEC). Kao izvor PEC stanica izabran je dorsalno-lateralni režanj prostate štakora zbog sklonosti razvoju spontanih neoplazmi i njegove sličnosti s perifernom zonom prostate čovjeka, najčešćim mjestom nastanka humanog karcinoma prostate. Također, PEC su izolirane bez imortalizacije (bez ugradnje onkogena) ili prethodnog tretiranja karcinogenima. Uzastopnim precjepljivanjem izoliranih PEC dobivene su subpopulacije stanica niskog ($p < 35$), srednjeg (p35–84) i visokog pasaža ($p > 85$). Kako su stanice napredovale prema visokom pasažu uočene su razlike u morfologiji, brzini proliferacije i pokretljivosti. PEC visokog pasaža su pokazivale gotovo dvostruko veće brzine proliferacije i bile su znatno pokretljivije od PEC niskog i srednjeg pasaža.

Jedan od glavnih pokazatelja koji upućuju da je uzastopnim precjepljivanjem stanica *in vitro* došlo do neoplastične transformacije je sposobnost transformiranih stanica da proliferiraju bez čvrste podloge. Tako su PEC visokog, za razliku od PEC niskog i srednjeg pasaža, preživjele i stvarale kolonije na površini mekog agara. Tijekom provođenja ovog eksperimenta posebno je zanimljivo bilo otkriće male subpopulacije stanica PEC visokog pasaža koje su prodrle kroz meki agar i nastavile rasti na plastičnoj podlozi. Koliko nam je poznato ovakva, populacija invazivna na mekom agaru (SAI), dosada nije opisana. Te su SAI stanice pokazivale značajne razlike u ispitivanim svojstvima u odnosu na neselektirane PEC stanice visokog pasaža iz kojih su izolirane. Imale su morfološke karakteristike i PEC niskog i visokog pasaža te su proliferirale nešto sporije od PEC visokog pasaža. Također su pokazale karakterističnu ekspresiju kolangiocitnih markera OC.2 i OC.5 što upućuje na specifični antigenski fenotip ($OC.2^{+}/OC.5^{-}$).

Promjene u ekspresiji signalnih putova karakteristika su razvoja i progresije tumora stoga ne iznenađuju naši rezultati koji pokazuju niz razlika u ekspresiji signalnih proteina kako PEC napreduju od niskog do visokog pasaža. Zanimljivo je da je i velik broja proteina različito eksprimiran u usporedbi PEC visokog pasaža i SAI stanica što dodatno potvrđuje specifičnost ove subpopulacije. Proteomička je analiza otkrila povećanu ekspresiju EGFR-a i nekoliko proteina koji pripadaju signalnim putovima aktiviranim ovim receptorom kao što su pErk-1 i Raf. Njihova je ekspresija potvrđena i *Western blot*-om. Pretjerana ekspresija i narušena regulacija signalnih putova reguliranih EGFR-om povezana je s rastom tumorskih stanica, otpornosti na lijekove i sposobnosti samoobnavljanja tumorskih matičnih stanica. Zbog toga vjerujemo da će selekcija SAI subpopulacije s povišenom ekspresijom EGFR-a omogućiti daljnje istraživanje uloge ovih proteina i njihove signalizacije u procesu spontane transformacije, invazije i tumorogeničnosti.

Potvrda spontane transformacije PEC stanica dobivena je i ispitivanjem tumorogeničnosti koje je pokazalo da su PEC visokog pasaža stekle sposobnost stvaranja tumora nakon injektiranja u imunodeficijentne miševe. Ta karakteristika nije zabilježena kod PEC niskog i srednjeg pasaža. Značajno je, međutim da je SAI populacija imala veći tumorogeni potencijal u odnosu na neselektiranu populaciju PEC visokog pasaža. Vrlo slični rezultati dobiveni su i za humanu staničnu liniju karcinoma prostate DU145 iz koje je također navedenim postupkom izolirana DU145-SAI populacija koja je u imunodeficijentnim miševima tvorila veće tumore od ishodnih DU145.

Kako je vidljivo u drugom dijelu ovog istraživanja, ali i iz naših rezultata koji ovdje nisu prikazani, SAI populacija je izolirana i iz drugih epitelnih staničnih linija. Potrebno je provesti daljnju karakterizaciju i dodatna ispitivanja tumorogeničnosti ovih stanica, međutim, dosadašnji rezultati upućuju da izolacija na mekom agaru predstavlja novu metodu selekcije visoko tumorogenih stanica iz transformiranih epitelnih stanica neovisnih o rastu na čvrstoj podlozi. Ovdje opisane promjene povezane sa SAI populacijom ukazuju da te stanice imaju ulogu u pokretanju razvoja tumora i predstavljaju atraktivnu staničnu populaciju za daljnje studije razvoja tumora ili za studije primjena anti-tumorskih terapija.

Populaciju invazivnu na mekom agaru izolirali smo i iz GP7TB stanica nastalih kemijskom transformacijom WB-F334 epitelnih stanica jetara štakora s karakteristikama ovalnih stanica. Na ovom, ranije opisanom modelu kemijski inducirane hepatokarcinogeneze, nastojali smo produbiti spoznaje o staničnim karakteristikama i molekularnim mehanizmima

hepatocelularnog karcinoma. I ovdje smo pokazali da WB, GP7TB i GP7TB.SAI stanice pokazuju značajne razlike u morfologiji i ekspresiji signalnih proteina. GP7TB populacija je sadržavala stanice koje su morfološki bile sličnije onima WB populacije, ali i one koje su imale morfologiju sličniju GP7TB.SAI stanicama.

Razlike između ove tri stanične populacije očitovale su se i u broju i veličini otpuštenih EV kao i u njihovom proteomičkom sastavu. GP7TB.SAI stanice otpuštale su veći broj promjerom manjih EV u odnosu na preostale dvije stanične populacije što upućuje na promjene u regulacijskim mehanizmima koji sudjeluju u njihovom nastajanju. S obzirom na mnoge funkcionalne implikacije EV, poput transporta proteina i RNA između stanica, te promjene mogu imati značajan utjecaj na to kako stanice djeluju s drugim stanicama u svom mikrookolišu. Razlike u proteomu EV daju još jedan uvid u potencijalne razlike u međustaničnoj komunikaciji i signalizaciji. Rezultati proteomičke analize su pokazali da su EV WB stanica imale tek mali broj zajedničkih proteina s EV preostale dvije populacije što je vjerojatno rezultat maligne transformacije stanica. Nasuprot tomu, većina proteina identificiranih u EV GP7TB bila je prisutna i u EV proteomu GP7TB.SAI. Međutim, GP7TB.SAI proteom je sadržavao i veliki broj jedinstvenih proteina što opet naglašava različitost ove subpopulacije stanica od onih iz kojih je izolirana.

S obzirom da Necl-5 ima ulogu u staničnoj adheziji i komunikaciji te interakciji s NK stanicama, njegova ekspresija na EV može upućivati na njihovu ulogu u transformiranim stanicama koje proizvode EV i time šire tumorogenične faktore a djeluju i utječu na imunosni sustav. Naši su rezultati Western blot analize pokazali povećanu ekspresiju Necl-5 na transformiranim stanicama i njihovim EV u odnosu na netransformiranu WB populaciju. Zanimljivo je da su rezultati analize utjecaja EV na aktivnost NK stanica pokazali da GP7TB.SAI EV stimuliraju citoksičnost unatoč nešto manjoj ekspresiji Necl-5 u odnosu na GP7TB EV koje na citotoksičnost nisu utjecale. Iz toga možemo zaključiti da ekspresija ovog proteina nije samostalni čimbenik i da je krajnji ishod staničnih interakcija poput ove određen reguliranom ravnotežom između stimulacijskih i inhibicijskih učinaka mnogih antigena i receptora.

Bolje razumijevanje promijena koje nastaju kada stanica postaje tumorogenična te međusobne komunikacije tumorskih stanica kao i komunikacije tih stanica s okolinom, omogućit će liječnicima i znanstvenicima bržu identifikaciju premalignih i malignih stanica i pomoći u kreiranju učinkovitijih metoda liječenja. Također, saznanja o tome na koji način

stanice raka djeluju i komuniciraju s NK stanicama, možda će nam omogućiti poticanje imunosnog odgovora organizma i pospješiti uništavanje stanica raka.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

2-AAF	2-acetil-aminofluoren
APC	eng. *adenomatosis polyposis coli*
AR	androgeni receptor
ATF2	aktivirajući transkripcijski faktor 2
BDEC	epitelne stanice žučovoda (eng. *bile duct epithelial cells*)
BHMT	S-metiltransferaza betain-homocisteina 1 (eng. *betaine-homocysteine S-methyltransferase 1*)
BPE	ekstrakt hipofize goveda (eng. *bovine pituitary extract*)
CDK	ciklin neovisne kinaze
CK	citokeratin
DAG	diacilglicerol
DEN	dietil-nitrozoamin
DHT	dihidrotestosteron
DU145	stanična linija raka prostate
EGF	epidermalni faktor rasta
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta
EGTA	etilenglikol-bis (β-aminoetil eter)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraoctena kiselina
eIF3a	elongacijski inicijacijski faktor 3
EMT	prijelaz epitel-mezenhim (eng. *epithelial-mesenchymal transition endothelial growth factor receptor*)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (eng. ex*tracellular*
ESI	ionizacija elektroraspršivanjem (eng. *electrosprey ionization*)
EV	ekstracelularne vezikule
FBS	fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*)
FGFR	receptor faktora rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor receptor*)
GP7TB	stanična linija kemijski transformiranih WB-F344
Gpi	glukoza-6-fosfat izomeraza
GSK3β	sintaza glikogen kinaze-3β

HBV	virus hepatitisa B
HCK	hepatocelularni karcinom
HCV	virus hepatitisa C
Hsp90	proteina toplinskog šoka 90 (eng. *Heat shock protein* 90)
Itg	integrin
JNK	c-Jun NH2-terminalna kinaza
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom
LNCaP	stanična linija raka prostate
MAP3K	MAPK kinaza kinaza
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
MHC	veliki histokompatibilni kompleks (eng. *major histocompatibility complex*)
MMP	metaloproteinaza
MNNG	*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozogvanidin
mTOR	ciljna molekula rapamicina u sisavca (eng. *mammalian target of rapamycin*)
MVB	multivezikularno tjelešce (eng. *multivesicular body*)
MVP	veliki protein organela (eng. *major vault protein*)
NK stanice	stanice prirođene ubojice (eng. *natural killer cells*)
OC.2	kolangiocitni marker nepoznatog identiteta
OC.5	kolangiocitni marker nepoznatog identiteta
PAP	prostatična kisela fosfataza
PC3	stanična linija raka prostate
PDK1	fosfoinozitid–ovisna kinaza 1
PEC	stanična linija epitelnih stanica prostate
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PIA	proliferativna upalna atrofija
PIN	intraepitelna neoplazija prostate
PIP2	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PIP3	fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat
PKB	protein-kinaza B

PKC	protein-kinaza C
PSA	prostata specifični antigen
PTEN	Gen homologan fosfatazi i tenzinu
Rb	retinoblastomski protein
Rock1	Kinaza RhoA proteina beta (eng. *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*
RPMI 1640 medij	Roswell Park Memorial Institute medij
RTK	receptorska tirozinska protein-kinaza (eng. *receptor tyrosine kinase*)
SAI	stanice invazivne na mekom agaru (eng. *soft agar invasive*)
SCID	eng. *severe combined immune deficient mice*
SDS	natrijev dodecilsulfat (eng. *sodium dodecil sulphate*)
STAT	prijenosnik signala i aktivator transkripcije (eng. *signal transducer and activator of transcription*)
TAK1	kinaza 1 aktivirana TGF-β-om (eng. *TGF-β-activated kinase 1*)
TMS	tumorske matične stanice
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*)
uPA	urokinazni aktivator plazminogena
VEGFR	receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *vascular*
VGEF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth*
VIP	vazoaktivni intestinalni peptid (eng. *Vasoactive intestinal peptide*)
WB-F344 (WB)	stanična linija epitelnih stanica jetre

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. J. J. S. Bertram, The molecular biology of cancer, *Mol. Aspects Med.* **21** (2001) 167-223.

2. GLOBOCAN 2012 (IARC), Section of Cancer Information, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (preuzeto 27.svibnja.2014).

3. A. Buhmeida, S. Pyrhonen, M. Laato i Y. Collan, Prognostic factors in prostate cancer, *Diagn. Pathol.* **1** (2006) 4-19.

4. P. Ferlay, J. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet i P. Boyle, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann. Oncol.* **18** (2007) 581‑592.

5. R. Foley, D. Hollywood i M. Lawler, Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease, *Endocr-relat. Cancer* **11** (2004) 477-488.

6. T. J. Bradford, S. A. Tomlins, X. Wang i A. M. Chinnaiyan, Molecular markers of prostate cancer, *Urol. Oncol.-Semin. Ori.* **24** (2006) 538-551.

7. A. Drivalos, A. G. Papatsoris, M. Chrisofos, E. Efstathiou i M.A. Dimopoulos, The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer, *Int. Braz. J. Urol.* **37** (2011) 302-306.

8. J. L. Phillips, S. W. Hayward, Z. Wang, J. Vasselli, C. Pavlovich, H. Padilla-Nash, J.R. Pezullo, B. M. Ghadimi, G. D. Grossfeld, A. Rivera, W. Marston Linehan, G. R. Cunha i T. Ried, The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis, *Cancer Res.* **61** (2001) 8143-8149.

9. S. Dasgupta, S. Srinidhi i J. K. Vishwanatha, Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J. Carcinog.* **11** (2004) 39-49.

10. W. Isaacs i T. Kainu, Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Epidemiol. Rev.* **23** (2001) 36-41.

11. K. C. Valkenburg i B. O. Williams, Mouse models of prostate cancer, *Prostate Cancer* (2011) 1-22.

12. D. Gomez i D. N. Lobo, Malignant liver tumors, *Surgery* **29** (2011) 632-639.

13. R. N. Aravalli, C. J. Steer i E. N. Cressman, Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma, *Hepatology* **48** (2008) 2047-2063.

14. M. Frau, F. Biasi, F. Feo i R. M. Pascale, Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Mol. Aspects Med.* **31** (2010) 179‑193.

15. V. Muralidharan-Chari, J. W. Clancy, A. Sedgwick i C. D' Souza-Schorey, Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* **123** (2010) 1603-1611.

16. M. Iero, R. Valenti, V. Huber, P. Filipazzi, G. Parmiani, S. Fais i L. Rivoltini, Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* **15** (2008) 80-88.

17. R. W. Ruddon, *Cancer Biology 4th Edition*, Oxford University Press, New York, 2007.

18. P. C. Nowell, The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194** (1976) 23-28.

19. P. Irigaray i D. Belpomme, Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **31** (2010) 135–148.

20. D. P. Cahill, K. W. Kinzler, B. Vogelstein i C. Lengauer, Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell. Biol.* **9** (1999) M57–M60.

21. B. B. Tysnes i R. B. Bjerkvig, Cancer initiation and progression: Involvment of stem cells and the microenvironment. *Biochim. Biopshy. Acta* **1775** (2007) 283-297.

22. W. C. Hahn i R. A. Weinberg, Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 331–341.

23. D. Hanahan i R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144** (2011) 646-74.

24. S. J. Miller, R. M. Lavker i T. T. Sun, Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1756** (2005) 25-52.

25. B. Loaiza, E. Rojas i M. Valverde, *The New Model of Carcinogenesis: The Cancer Stem Cell Hypothesis*, u: M. Pesheva (ur.), *Carcinogen*, 2012, 1-31 (http://www.intechopen.com/books/carcinogen/the-new-model-of-carcinogenesis-the-cancer-stem-cell-hypothesis).

26. D. Bonnet i J. E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3** (1997) 730–737.

27. S. Sell, Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Cr. Rev. Oncol-Hem*. **51** (2004) 1–28.

28. M. F. Clarke, J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. M. Jamieson, D. L. Jones, J.Visvader, I. L. Weissman i G. M. Wahl, Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* **66** (2006) 9339–9344.

29. T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri i J. E. Dick, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367** (1994) 645-648.

30. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison i M. F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *P. Natl. Acad. Sci. U S A* **100** (2003) 3983–3988.

31. S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire i P. B. Dirks, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.* **63** (2003) 5821–5828.

32. A. T. Collins, P.A. Berry, C. Hyde, M. J. Stower i N. J. Maitland, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res.* **65** (2005) 10946–10951.

33. C. P. Gibbs, V. G. Kukekov, J. D. Reith, O. Tchigrinova, O. N. Suslov, E. W. Scott, S. C. Ghivizzani, T. N. Ignatova i D. A. Steindler, Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis, *Neoplasia* **7** (2005) 967–976.

34. C. F. Kim, E. L. Jackson, A. E. Woolfenden, S. Lawrence, I. Babar, S. Vogel, D. Crowley, R. T. Bronson i T. Jacks, Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer, **Cell** *121* (2005) 823–835.

35. I. Baccelli i A. Trumpp, The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J. Cell Biol.* **198** (2012) 281-293.

36. A. Wilson, E. Laurenti, G. Oser, R. C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C. F. Dunant, L. Eshkind i E. Bockamp, Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to selfrenewal during homeostasis and repair. *Cell* **135** (2008) 1118–1129.

37. D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay i P. Pisani. Global cancer statistics, 2002. *CA-Cancer J. Clin.* **55** (2005) 74-108.

38. L. Cheng, S. Y. Song, T. G. Pretlow, F. W. Abdul-Karim, H. J. Kung, D. V. Dawson, W. S. Park, Y. W. Moon, M. L. Tsai, W. M. Linehan, M. R. Emmert-Buck, L. A. Liotta i Z. Zhuang, Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90** (1998) 233-237.

39. C. A. Macintosh, M. Stower, N. Reid i N. J. Maitland, Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res.* **58** (1998) 23-28.

40. W. Isaacs, A. De Marzo i W. G. Nelson, Focus on prostate cancer. *Cancer Cell* **2** (2002) 113-116.

41. W. G. Nelson, A. M. De Marzo i W. B. Isaacs, Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **349** (2003) 366-81.

42. Arthur C. Guyton, *Medicinska fiziologija 9. izdanje*, Medicinska naklada, Zagreb, 1999.

43. J. E. McNeal, Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12** (1988) 619-633.

44. C. Abate-Shen i M. M. Shen, Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* **14** (2000) 2410-2434.

45. R. M. Long, C. Morrissey, J. M. Fitzpatrick i R. W. G. Watson, Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin. Sci.* **108** (2005) 1–11.

46. E. R. Sherwood, G. Theyer, G. Steiner, L. A. Berg, J. M. Kozlowski i C. Lee, Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate. *Prostate* **18** (1991) 303–314.

47. A. Y. Liu, L. D. True, L. LaTray, P. S. Nelson, W. J. Ellis, R. L. Vessella, P. H. Lange, L. Hood i G. van den Engh, Cell–cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *P. Natl. Acad. Sci.* **94** (1997) 10705–10710.

48. S. Signoretti, D. Waltregny, J. Dilk, B. Isaacs, D. Lin, L. Garraway, A. Yang, R. Montrioni, F. McKeon i M. Loda, p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol.* **157** (2000) 1769–1775.

49. A. T. Collins, F. K. Habib, N. J. Maitland i D. E. Neal, Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on $\alpha 2\beta 1$-integrin expression. *J. Cell Sci.* **114** (2001) 3865–3872.

50. M. Bui i R. E. Reiter, Stem cell genes in androgen independent prostate cancer. *Cancer Metast. Rev.* **17** (1998) 391–399.

51. P. A. Abrahamsson, Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* **39** (1999) 135–148.

52. G. D. Steinber, B. S. Carter T. H. Beaty, B. Childs i P. C. Walsh, Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* **17** (1990) 337-347.

53. J. Carpten, N. Nupponen, S. Isaacs, R. Sood, C. Robbins, J. Xu, M. Faruque, T. Moses, C. Ewing, E. Gillanders, P. Hu, P. Bujnoszky, I. Makalowska, A. Baffoe-Bonnie, D. Faith i J. Smith, Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat. Genet.* **30** (2002) 181–184.

54. H. G. van der Poel, Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **61** (2007) 104-139.

55. S. Koochekpour, Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer *Asian J. Androl.* **12** (2010) 639–657.

56. M. C. Bosland, I. Oakley-Girvan i A. S. Whittemore, Dietary fat, calories, and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer. Inst*. **91** (1999) 489-491.

57. E. Giovannucci, E. B. Rimm, Y. Liu, M. J. Stampfer i W. C. Willett, A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J. Natl. Cancer. Inst.* **94** (2002) 391-398.

58. P. S. Bunting, Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. *Clin. Chim. Acta* **315** (2002) 71–97.

59. F. H. Schroder, R. Raaijmakers, R. Postma, T. H. van der Kwast i M. J. Roobol, 4-year prostate specific antigen progression and diagnosis of prostate cancer in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam. *J. Urol.* **174** (2005) 489–494.

60. S. C. Presnell, W. J. Glover, K. M. Borchert, C. W. Gregory, J. L. Mohler i G. J. Smith, Isolation and partial characterization of an epithelial cell line (RPE-F344) from the regenerating prostate of a normal adult male rat. *Prostate Cancer P. D.* 2 (1999) 257-263.

61. G. Halpert, A. Makarovskiy, B. S. Stein i D. C. Hixson, Development of normal and SV40-large T immortalization dorsal-lateral rat prostate cell lines. *P. Am. Assoc. Canc. Res.* **37** (1996) 508.

62. D. R. Mills, R. A. Rozich, D. L. Flanagan, K. E. Brilliant, D. Q. Yang i D. C. Hixson, The cholangiocyte marker, BD. 1, forms a stable complex with CLIP170 and shares an identity with eIF3a, a multifunctional subunit of the eIF3 initiation complex. *Exp. Mol. Pathol.* **93** (2012) 250-260.

63. J. Simard, M. Dumont, P. Sourcy P i F. Labrie, Perspective: Prostate Cancer susceptibility genes. *Endocrinology* **143** (2002) 2029-2040.

64. M. Nakayama, C. J. Bennett, J. L. Hicks, J. I. Epstein, E. A. Platz, W. G. Nelson i A. M. De Marzo, Hypermethylation of the human glutathione *S*-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am. J. Pathol.* **163** (2003) 923–933.

65. X. Wu, K. Senechal, M. S. Neshat, Y. E. Whang i C. L. Sawyers, The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 15587-15591.

66. H. Sun, R. Lesche, D. M. Li, J. Liliental, H. Zhang, J. Gao, N. Gavrilova, B. Mueller, X. Liu i H. Wu, PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *P. Natl. Acad. Sci.* **96** (1999) 6199–6204.

67. S. M. Tu, K. McConnell, M. C. Marin, M. L. Campbell, A. Fernandez, A. C. von Eschenbach, i T. J. McDonnell, Combination adriamycin and suramin induces apoptosis in bcl-2 expressing prostate carcinoma cells. *Cancer Lett.* **93** (1995) 147–155.

68. S. Yeh, H. Miyamoto, K. Nishimura, H. Kang, J. Ludlow, P. Hsiao, C. Wang, C. Su, i C. Chang, Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **248** (1998) 361–367.

69. S. P. Singh, J. Lipman, H. Goldman, F. H. Ellis, Jr., L. Aizenman, M. G. Cangi, S. Signoretti, D. S. Chiaur, M. Pagano i M. Loda, Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res.* **58** (1998) 1730–1735.

70. X. Gao, Y. Q. Chen, N. Wu, D. J. Grignon, W. Sakr, A. T. Porter i K. V. Honn, Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* **11** (1995) 1395–1398.

71. A. A. Shafi, A. E. Yen i N. L. Weigel, Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol. Therapeut*. **140** (2013) 223-238.

72. M. Laufer, S. R. Denmeade, V. J. Sinibaldi, M. A. Carducci, M. A. Eisenberger, Complete androgen blockade for prostate cancer: What went wrong? *J. Urology* **164** (2000) 3–9.

73. T. Visakorpi, E. Hytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. KeinaÈnen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola i O. P. Kallioniemi, In vivo amplifcation of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* **9** (1995) 401-406.

74. H. Lexander, B. Franzén, D. Hirschberg, S. Becker, M. Hellström, T. Bergman, H. Jörnvall, G. Auer i L. Egevad, Differential protein expression in anatomical zones of the prostate. *Proteomics* **10** (2005) 2570–2576.

75. B. Johansson, M. R. Pourian, Y. C. Chuan, I. Byman, A. Bergh, S. T. Pang, G. Norstedt, T. Bergman i A. Pousette, Proteomic comparison of prostate cancer cell lines LNCaP-FGC and LNCaP-r reveals heatshock protein 60 as a marker for prostate malignancy. *Prostate* **66** (2006) 1235-1244.

76. J. D. Lapek Jr., J. L. McGrath, W. A. Ricke i A. E. Friedman, LC/LC-MS/MS of innovative prostate human epithelial cancer (PHEC) *in vitro* model system. *J. Chromatogr.* B **893** (2012) 34-42.

77. A. Forner, J. M. Llovet i J. Bruix, Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **379** (2012) 1245–1255.

78. I. S. Tait, S. M. Yong i S. A. Cuschieri SA, Laparoscopic in situ ablation of liver cancer with cryotherapy and radiofrequency ablation. *Br. J. Surg.* **89** (2002) 1613-1619.

79. K. Si-Tayeb, F. P. Lemaigre i S. A. Duncan, Organogenesis and Development of the Liver *Dev. Cell* **18** (2010) 175-189.

80. G. Montalto, M. Cervello, L. Giannitrapani, F. Dantona, A. Terranova, L. A. Castagnetta, Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann. NY Acad. Sci.* **963** (2002) 13-20.

81. B. Bartosch, Hepatitis B and C Viruses and Hepatocellular Carcinoma. *Viruses* **2** (2010) 1504-1509.

82. X. W. Wang, K. Forrester, H. Yeh, M. A. Feitelson, J. R. Gu i C. C. Harris, Hepatitis-B-virus-x protein inhibits p53 sequence-specific DNAbinding.Transcriptional Activity, and Association With Transcription Factor Ercc3. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 2230–2234.

83. X. Z. Wu i D. Chen, Origin of hepatocellular carcinoma: Role of stem cells. *J. Gastroen. Hepatol*. **21** (2006) 1093–1098.

84. K. Overturf, M. al-Dhalimy, C. N. Ou, M. Finegold i M. Grompe, Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* **151** (1997) 1273–1280.

85. M. R. Alison, Characterization of the differentiation capacity of rat-derived hepatic stem cells. *Semin. Liver Dis.* **23** (2005) 325-236.

86. D. C. Hixson, L. Chapman, A. McBride, R. Faris i L. Yang, Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis* **18** (1997) 1169-1175.

87. Williams GM, Gebhardt R, Sirma H, Stenback F. Non-linearity of neoplastic conversion induced in rat liver by low exposures to diethylnitrosamine. Carcinogenesis 1993;14:2149-2156.

88. R. A. Faris, B. A. Monfils, H. A. Dunsford i D. C. Hixon, Antigenic Relationship between Oval Cells and a subpopulation of Hepatic Foci, Nodules and Carcinomas Induced by „Resistant Hepatocyte“ Model System. *Cancer Res.* **51** (1991) 1308-1317.

89. D. B. Solt i E. Farber, Persistence of carcinogen-inducedinitiated hepatocytes in liver carcinogenesis. *P. Am. Assoc. Canc. Res.* **18** (1977) 52.

90. D.C. Hixson i J. P. Allison, Monoclonal Antibodies Recognizing Oval Cells Induced in the Liver of Rats by N-2-Fluorenilacetamide or Ethionine in a Choline-deficient Diet. *Cancer Res.* **45** (1985) 3750-3760.

91. D. C. Hixson, J. Brown, A. C. McBride i S. Affigne, Differentiation Status of Rat Ductal Cells and Ethionine-Induces Hepatic Carcinomas Defined with Surface-Reactive Monoclonal Antibodies. *Exp. Mol. Path.* **68** (2000) 152-169.

92. S. Whittaker, R. Marais i A. X. Zhu, The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **29** (2010) 4989-5005.

93. C. Cavard, S. Colnot, V. Audard, S. Benhamouche, L. Finzi, C. Torre, G. Grimber, C. Godard, B. Terris i C. Perret, Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncol.* 4 (2008) 647–660.

94. D. R. Chesire, C. M. Ewing, W. R. Gage i W. B. Isaacs, In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene* **21** (2001) 2679-2694.

95. L. Min., B. He i L. Hui, Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin. Cancer Biol.* **21** (2011) 10-20.

96. K. Balmanno i S. J. Cook, Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell. Death Differ*. **16** (2009) 368-377.

97. H. Huynh, T. T. Nguyen, K. H. Chow, P. H. Tan, K. C. Soo i E. Tran, Overexpression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.* **3** (2003) 19.

98. T. Yoshida, T. Hisamoto, J. Akiba, H. Koga, K. Nakamura, Y. Tokunaga, S. Hanada, H. Kumemura, M. Maeyama, M. Harada, H. Ogata, H. Yano, M. Kojiro, T. Ueno, A. Yosimura i M. Sata, Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* **25** (2006) 6056-6066.

99. Q. Zhou, V. W. Lui, i W. Yeo, Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 10 (2011) 1149-1167.

100. A. Villanueva, D. Y. Chiang, P. Newell, J. Peix, S. Thung, C. Alsinet, V. Tovar, S. Roayaie, B. Minguez, M. Sole, C. Battiston, S. Van Laarhoven, M. I. Fiel, A. Di Feo, Y. Hoshida, S. Yea, S. Toffanin, A. Ramos, J. A. Martignetti, V. Mazzaferro, J. Bruix, S. Waxman, M. Schwartz, M. Meyerson, S. L. Friedman i J. M. Llovet, Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **135** (2008) 1972-1983.

101. J. W. Lee, Y. H. Soung, S. Y. Kim, H. W. Lee, W. S. Park, S. W. Nam, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo i S. H. Lee, PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24** (2005) 1477-1480.

102. T. H. Hu, C. C. Huang, P. R. Lin, H. W. Chang, L. P. Ger, Y. W. Lin, C. S. Changchien, C. M. Lee i M. H. Tai, Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **97** (2003) 1929-1940.

103. K. Nakanishi, M. Sakamoto, S. Yamasaki, S. Todo i S. Hirohashi, Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **103** (2005) 307-312.

104. D. A. Megger, T. Bracht, M. Kohl, M. Ahrens, W. Naboulsi, F. Weber, A. C. Hoffmann, C. Stephan, K. Kuhlmann, M. Eisenacher, J. F. Schlaak, H. A. Baba, H. E. Meyer i B.Sitek, Proteomic Differences Between Hepatocellular Carcinoma and Nontumorous Liver Tissue Investigated by a Combined Gel-based and Label-free Quantitative Proteomics Study. *Mol. Cell. Proteomics* **12** (2013) 2006-2020.

105. J. G. Clifton, M. K. Brown, F. Huang, X. Li, W. Reutter, W. Hofmann, D. C. Hixson i D. Josic, Identification of members of the annexin family in the detergent-insoluble fraction of rat Morris hepatoma plasma membranes. *J. Chromatogr. A* **1123** (2006) 205-211.

106. J. G. Clifton, X. Li, W. Reutter, D. C. Hixson i D. Josic, Comparative proteomics of rat liver and Morris hepatoma 7777 plasma membranes. *J. Chromatogr. B* **849** (2007) 293-301.

107. J. Ratajczak, M. Wysoczynski, F. Hayek, A. Janowska-Wieczorek i M. Z. Ratajczak, Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **20** (2006) 1487-1495.

108. G. Raposo i W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell. Biol.* **18** (2013) 373-383.

109. C. Théry, M. Ostrowski i E. Segura, Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8** (2009) 581-593.

110. E Cocucci, G Racchetti i J Meldolesi, Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends cell biol.* **19** (2009) 43-51.

111. I. Muller, A. Klocke, M. Alex, M. Klotzcs, T. Luther, E. Morgenstern, S. Zieseniss, S. Zahler i B. Engelmann, Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* **17** (2003) 476–478.

112. A. MacKenzie, H. L. Wilson, E. Kiss-Toth, S. K. Dower, R. A. North i A. Suprenant, Rapid secretion of interleukin-1b by microvesicle shedding. *Immunity* **15** (2001) 825–835.

113. L. G. Lima, R. Chammas, R. Q. Monteiro, M. E. Moreira, M. A. Barcinski, Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett.* **283** (2009) 168-175.

114. E. Pap, E. Pállinger i A. Falus, The role of membrane vesicles in tumorigenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **79** (2011) 213-23.

115. C. Friend, W. Marovitz, G. Henie, W. Henie, D. Tsuei, K. Hirschhorn, J. G. Holland i J. Cuttner, Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer Res.* **38** (1978) 2581-2591.

116. G. Poste i G. L. Nicolson, Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 399-403.

117. F. F. van Doormaal, A. Kleinjan, M. Di Nisio, H. R. Büller i R. Nieuwland, Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth. J. Med.* **67** (2009) 266-273.

118. A. N. Boing, C. M. Hau, A. Sturk i R. Nieuwland, Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*. **19** (2008) 96-103.

119. K. Shedden, X. T. Xie, P. Chandaroy, Y. T. Chang i G. R. Rosania, Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **63** (2003) 4331-4337.

120. K. Sandvig i A. Llorente, Proteomic Analysis of Microvesicles Released by the Human Prostate Cancer Cell Line PC-3. *Mol. Cell. Proteomics* **11** (2012) M111.

121. D. Choi, D. Y. Choi, B. S. Hong, S. C. Jang, D. Kim, J. Lee, Y. Kim, K. Kim i Y. Gho, Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J. Extracell. Vesicles* **1** (2012) 1874-1889.

122. J. L. Welton, S. Khanna, P. J. Giles, P. Brennan, I. A. Brewis, J. Staffurth, M. D. Mason i A. Clayton, Proteomic Analysis of Blader Cancer Exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* **9** (2010) 1324-1338.

123. K. S. Campbell i J. Hasegawa, Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol*. **132** (2013) 536-544.

124. N. J. Topham i E. W. Hewitt, Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* **128** (2009) 7–15.

125. A. Fuchs i M. Colonna, The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin. Cancer Biol.* **16** (2006) 359–366.

126. Y. Takai, J. Miyoshi, W. Ikeda i H. Ogita, Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **9** (2008) 603-615.

127. B. M. Erickson, N. L. Thompson i D. C. Hixson, Tightly regulated induction of the adhesion molecule necl-5/CD155 during rat liver regeneration and acute liver injury. *Hepatology* **43** (2006) 325–334.

128. D. Pende, G.M. Spaggiari, S. Marcenaro, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, M. Falco, E. Lanino, I. Pierri, R. Zambello, A. Bacigalupo, M. C. Mingari, A. Moretta i L. Moretta, Analysis of the receptor–ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* **105** (2005) 2066–2073.

129. R. A. Faris, K. D. McEntire, N. L. Thompson i D. C. Hixson, Identification and characterization of a rat hepatic oncofetal membrane glycoprotein. *Cancer Res.* **50** (1990) 4755-4763.

130. J. Cao, J. Schulte, A. Knight, N. R. Leslie, A. Zagozdzon, R. Bronson, Y. Manevich, C. Beeson i C. A. Neumann, Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO J.* **28** (2009) 1505–1517.

131. J. A. Baltrop, T. C. Owen, A. H. Cory i J. G. Cory, 5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1** (1991) 611–614.

132. M. M. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.

133. D. W. Huang, B.T. Sherman i R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4** (2009) 44-57.

134. R. A. Rozich, D. R. Mills, K. E. Brilliant, H. M. Callanan, D. Q. Yang, U. Tantravahi i D. C. Hixson, Accumulation of neoplastic traits prior to spontaneous in vitro transformation of rat cholangiocytes determines susceptibilitz to activated ErbB-2/Neu. *Exp. Mol. Pathol.* **89** (2010) 248-259.

135. M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, J. Clifton, L. Breen, L. Cao, J. Giacometti i D. Josić, Sample preparation and further proteomic investigation of the inhibitory activity of pyridinium oximes to Gram-positive and Gram-negative food pathogens. *Food Res. Int.* **51** (2013) 46-52.

136. J. Clifton, F. Huang, M. Rucevic, L. Cao, D. C. Hixson i D. Josic, Protease inhibitors as possible pitfalls in proteomic analyses of complex biological samples. *J. Proteomics* **74** (2011) 935–941.

137. M. J. Hooth, W. B. Coleman, S. C. Presnell, K. M. Borchert, J. W. Grisham i G. J. Smith, Spontaneous neoplastic transformation of WB-F344 rat liver epithelial cells. *Am. J. Pathol.* **153** (1998) 1913-1921.

138. J. J. Yang i R. S. Kraus, Extracellular ATP induces anchorage-independent expression of cyclin A and rescues the transformed phenotype of a ras-resistant mutant cell line. *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 3103-3108.

139. A. B. Fernández-Martínez, A. M. Bajo, M. Isabel Arenas, M. Sánchez-Chapado, J. C. Prieto i M. J. Carmena, Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1. *Cancer. Lett.* **299** (2010) 11-21.

140. J. Mei, H. Hu, M. McEntee, H. Plummer, P. Song i H. C. Wang, Transformation of non-cancerous human breast epithelial cell line MCF10A by the tobacco-specific carcinogen NNK. *Breast Cancer Res. Tr.* **79** (2003) 95-105.

141. R. A. Marks, S. Zhang, R. Montironi, R. P. McCarthy, G. T. MacLennan, A. Lopez-Beltran A, Z. Jiang, H. Zhou, S. Zheng, D. D. Davidson, L. A. Baldrige i L. Cheng, Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: a fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Prostate* **68** (2008) 919–923.

142. C. Raimondi i M. Falasca, Targeting PDK1 in cancer. *Curr. Med. Chem.* **18** (2011) 2763-2769.

143. A. Casamayor, N. A. Morrice i D: R. Alessi, Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation *in vivo*. *Biochem. J.* **342** (1999) 287-292.

144. P. Cornford P, J. Evans, A. Dodson, K. Parsons, A. Woolfenden, J. Neoptolemos i C. S. Foster, Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am. J. Pathol.* **154** (1999) 137-144.

145. S. Yao, A. Bee, D. Brewer, A. Dodson, C..Beesley, Y. Ke, L. Ambroisine, G. Fisher, H. Møller, T. Dickinson, P. Gerard, L. Lian, J. Risk, B. Lane, P. Smith, V. Reuter, D. Berney, C. Gosden, P. Scardino, J. Cuzick, M. B. A. Djamgoz, C. Cooper i C. S. Foster, PRKC-ζ Expression Promotes the Aggressive Phenotype of Human Prostate Cancer Cells and Is a Novel Target for Therapeutic Intervention. *Genes Cancer* **1** (2010) 444–464.

146. E. R. Sherwood, J. L. Van Dongen, C. G. Wood, S. Liao, J. M. Kozlowski, and C. Lee, Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-

stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Brit. J. Cancer* **77** (1998) 855-861.

147. G. Di Lorenzo, G. Tortora, F. P. D'Armiento, G. De Rosa, S. Staibano, R. Autorino, M. D'Armiento, M. De Laurentiis, S. De Placido, G. Catalano, A. R. Bianco i F. Ciardiello, Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. Clin *Cancer Res.* **8** (2002) 3438-3444.

148. D. B. Solit, H. I. Scher i N. Rosen, Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer. *Semin. Oncol.* 30 (2003) 709-716.

149. S. L. Lin, D. Chang i S. Y. Ying, Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. *Carcinogenesis* **28** (2007) 310-320.

150. N. Papadopoulou, I. Charalampopoulos, K. Alevizopoulos, A. Gravanis i C. Stournaras, Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp. Cell. Res*. **314** (2008) 3162-74.

151. M. E. Peter, P. Legembre i B. C. Barnhart, Does CD95 have tumor promoting activities? *BBA-Rev. Cancer* **1775** (2005) 25-36.

152. J. E. Cardier, T. Schulte, H. Kammer, J. Kwak i M. Cardier, Fas (CD95, APO-1) antigen expression and function in murine liver endothelial cells: implications for the regulation of apoptosis in liver endothelial cells. *FASEB J.* **13** (1999) 1950-1960.

153. J. K Lee, T. J. Sayers, T. C. Back, J. M. Wigginton i R. H. Wiltrout, Lack of FasL-mediated killing leads to in vivo tumor promotion in mouse Lewis lung cancer.

154. S. S. Kadkol, J. R. Brody, J. Epstein, F. P. Kuhajda i G. R. Pasternack, Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer. *Prostate* **34** (1998) 231-237.

155. T. H. Chen, J. R. Brody, F. E. Romantsev, J. G. Yu, A. E. Kayler, E. Voneiff, F. P. Kuhajda i G. R. Pasternack. Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol. Biol. Cell*. **7** (1996) 2045-2056.

156. J. T. Lim, M. Mansukhani i I. B. Weinstein, Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 5156-5161.

157. A. S. Adler, M. L. McCleland, T. Truong, S. Lau, Z. Modrusan, T. M. Soukup, M. Roose-Girma, E. M. Blackwood i R. Firestein, CDK8 maintains tumor dedifferentiation and embryonic stem cell pluripotency. *Cancer Res*. 72 (2012) 2129-2139.

158. L. M. Gumbiner, P. H. Gumerlock, P. C. Mack, S. Chi, R. W. deVere White, J. L. Mohler, T. G. Pretlow i J. V. Tricoli, Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma. The Prostate 38 (1999) 40–45.

159. R. Mukherjee, J. M. Bartlett, N. S. Krishna, M. A. Underwood i J. Edwards, Raf-1 expression may influence progression to androgen insensitive prostate cancer. *Prostate* **64** (2005) 101-107.

160. Z. Fu, P. C. Smith, L. Zhang, M. A. Rubin, R. L. Dunn RL, Z. Yao i E. T. Keller, Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **95** (2003) 878-889.

161. R. Mukherjee, D. H. McGuinness, P. McCall, M. A. Underwood, M. Seywright, C. Orange i J. Edwards, Upregulation of MAPK pathway is associated with survival in castrate-resistant prostate cancer. *Brit. J. Cancer* **104** (2011) 1920–1928.

162. A. Akinleye, M. Furqan, N. Mukhi, P. Ravella i D. Liu, MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J. Hematol. Oncol.* **6** (2013) 27-38.

163. D. Gioeli, B. E. Black, V. Gordon, A. Spencer, C. T. Kesler, S. T. Eblen, B. M. Paschal i M. J. Weber, Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol. Endocrinol*. **20** (2006) 503-515.

164. A. R. Uzgare, P. J. Kaplan, i N. M. Greenberg, Differential expression and/or activation of p38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate* **55** (2003) 128–139.

165. O. K. Park, T. S. Schaefer i D. Nathans, *In vitro* activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *P. Natl. Acad. Sci*. USA **93** (1996) 13704-13708.

166. B. E. Barton, J. G. Karras, T. F. Murphy, A. Barton i H. F. Huang, Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol. Cancer Ther.* **3** (2004) 11-20.

167. M. Tsao, J. W. Grisham, K. G. Nelson i J. D. Smith, Phenotypic and karyotypic changes induced in cultured rat hepatic epithelial cells that express the oval cell phenotype by exposure to N-Methyl-N'nitro-N-nitrosoguanidine. *Am. J. Pathol.* **118** (1985) 306-315.

168. W. B. Coleman, A. E. Wennerberg, G. J. Smith i J. W. Grisham, Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stemlike) cells by the hepatic microenvironment. *Am. J. Pathol.* **142** (1993) 1373-1382.

169. Q. Tang, Y. Liu, X. Zhub, Y. Li, J. Zhu, J. P. Zhang, Z.Feng i X. Guan, Expression and prognostic significance of the αB-crystallin gene in human hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol*. **40** (2009) 300–305.

170. V. Petrovic, D. Malin i V. L. Cryns, αB-Crystallin promotes oncogenic transformation and inhibits caspase activation in cells primed for apoptosis by Rb inactivation. *Breast Cancer Res. Tr.* **138** (2013) 300-3005.

171. S. Parveen, R. Mehboob, A. A. Khan, M. H. Bukhari i F. J. Ahmad, Novel strategy to diagnose and grade hepatocellular carcinoma. *Nat. Sci.* **5** (2013) 22-30.

172. J. Strock, J. I. Park, E. K. Nakakura, G. S. Bova, J. T. Isaacs, D. W. Ball i B. D. Nelkin, Cyclindependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **66** (2006) 7509-7515.

173. G. Feldmann, A. Mishra, S. M. Hong, S. Bisht, C. J. Strock, D. W. Ball, M. Goggins, A. Maitra i B. D. Nelkin, Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res*. **70** (2010) 4460-4469.

174. N. Tzenaki i E. A. Papakonstanti, p110δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. *Front. Oncol.* **3** (2013).

175. N. Tzenaki, M. Andreou, K. Stratigi, A. Vergetaki, A. Makrigiannakis, B. Vanhaesebroeck i E. A. Papakonstanti, High levels of p110d PI3K expression in solid tumor cells suppress PTEN activity, generating cellular sensitivity to p110d inhibitors through PTEN activation. *FASEB J.* 26 (2012) 2498-508.

176. H. C. Lu, F. P. Chou, K. T. Yeh, Y. S. Chang, N. C. Hsu i J. G. Chang, Expression of protein kinase C family in human hepatocellular carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.***16** (2010) 385-391.

177. N. R. Murray, L. A. Davidson, R. S. Chapkin, W. C. Gustafson, D. G. Schattenberg, i A.P. Fields, Overexpression of protein kinase C β(II) induces colonic hyperproliferation and increased sensitivity to colon carcinogenesis, *J. Cell Biol.* **145** (1999) 699–711.

178. X. Xu, M. Sakon, H. Nagano, N. Hiraoka, H. Yamamoto, N. Hayashi, K. Dono, S. Nakamori, K. Umeshita, Y. Ito, N. Matsuura i M. Monden, Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep*. **11** (2004) 25-32.

179. S. Inokuchi, T. Aoyama, K. Miura, C. H. Österreicher, Y. Kodama, K. Miyai, S. Akira, D. A. Brenner i E. Sekia, Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (2010) 844–849.

180. P. Papassava, V. G. Gorgoulis, D. Papaevangeliou, S. Vlahopoulos, H. van Dam i V. Zoumpourlis, Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res.* **64** (2004) 8573-8584

181. A. J. Berger, H. M. Kluger, N. Li, E. Kielhorn, R. Halaban, Z. Ronai i D. L. Rimm, Subcellular localization of activating transcription factor 2 in melanoma specimens predicts patient survival. *Cancer Res.* **63** (2003) 8103-8107.

182. F. Beier, R. J. Lee, A. C. Taylor, R. G. Pestell i P. LuValle, Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 1433-1438.

183. M. Joo, Y. K. Kang, M. R. Kim, H. K. Lee i J. J. Jang, Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* **21** (2001) 89-95.

184. A. Ginestra, M. D. La Placa, F. Saladino, D. Cassarà, H. Nagase i M. L. Vittorelli, The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* **18** (1998) 3433-3437.

185. J. L. Welton, S. Khanna, P. J. Giles, P. Brennan, I. A. Brewis, J. Staffurth, M. D. Mason i A. Clayton, Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol. Cell. Proteomics* **9** (2010) 1324-1338.

186. A. Masumoto, S. Arao i M. Otsuki. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **29** (1999) 68-74.

187. Y. B. Ding, B. Deng, Y. S. Huang, W. M. Xiao, J. Wu, Y. Q. Zhang, Y. Z. Wang, D. C. Wu, G. T. Lu i K. Y. Wu, A high level of integrin α6 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma cells is associated with a migratory and invasive phenotype. *Dig Dis Sci.* **58** (2013) 1627-1635.

188. A. Bianchi, M. Gervasi i A. Bakin, Role of beta5-integrin in epithelial-mesenchymal transition in response to TGF-beta. *Cell Cycle* **9** (2010) 1647–1659.

189. A. M. Sakwe, R. Koumangoye, B. Guillory i J. Ochieng, Annexin A6 contributes to the invasiveness of breast carcinoma cells by influencing the organization and localization of functional focal adhesions. *Exp. Cell Res.* **317** (2011) 823–837.

190. C. Wang, S. Delogu, C. Ho, S. A. Lee, B. Gui, L. Jiang, S. Ladu, A. Cigliano, F. Dombrowski, M. Evert, D. F. Calvisi i X. Chen, Inactivation of Spry2 accelerates AKT-driven hepatocarcinogenesis via activation of MAPK and PKM2 pathways. *J. Hepatol.* **57** (2012) 577–58.

191. F. T. Fan, C. S. Shen, L. Tao, C. Tian, Z. G. Liu, Z. J. Zhu, Y. P. Liu, C. S. Pei, H. Y. Wu, L. Zhang, A. Y. Wang, S. Z. Zheng, S. L. Huang i Y. Lu, PKM2 regulates hepatocellular carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and migration upon EGFR activation. *Asian Pac. J. Cancer P.* **15** (2014) 1961-1970.

192. M. Takashima, Y. Kuramitsu, Y. Yokoyama, N. Iizuka M. Fujimoto, T. Nishisaka, K. Okita, M. Oka i K. Nakamura, Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-

related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis. *Proteomics* **5** (2005) 1686-16922.

193. A. Haga, T. Funasaka, Y. Niinaka, A. Raz i H. Nagase. Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression. *Int. J. Cancer* **107** (2003) 707-714.

194. W. L. Shih, M. H. Liao, F. L. Yu, P. Y. Lin, H. Y. Hsu i S. J. Chiu, AMF/PGI transactivates the MMP-3 gene through the activation of Src-RhoA-phosphatidylinositol 3-kinase signaling to induce hepatoma cell migration. *Cancer Lett.* **270** (2008) 202–217.

195. T. Asai, Y. Tomita, S. Nakatsuka Y. Hoshida, A. Myoui, H. Yoshikawa i K. Aozasa, VCP (p97) Regulates NFkappaB Signaling Pathway, Which Is Important for Metastasis of Osteosarcoma Cell Line. *Jpn. J. Cancer Res.* **93** (2002) 296–304.

196. S. Yamamoto, Y. Tomita, S. Nakamori, Y. Hoshida, H. Nagano, K. Dono, K. Umeshita, M. Sakon, M. Monden i K. Aozasa, Elevated Expression of Valosin-Containing Protein (p97) in Hepatocellular Carcinoma Is Correlated With Increased Incidence of Tumor Recurrence. *J. Clin. Oncol.* **21** (2003) 447–452.

197. R. Gastpar, M. Gehrmann, M. A. Bausero, A. Asea C. Gross, J. A. Schroeder i G. Multhoff, Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* **65** (2005) 5238-5247.

§ 8. DODATAK

Tablica 8. Popis svih različito eksprimiranih signalnih proteina identificirani Kinexus analizom u stanicama visokog pasaža (PEC-H) u usporedbi sa stanicama niskog pasaža (PEC-L)

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Naziv proteina	Z-omjer (PEC-H, PEC-L)
PDK1	S241	3-Phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	7,15
PKCz/l	T410/T412	Protein-serine kinase C zeta/lambda	3,86
EGFR	Y1197	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	3,30
p38g MAPK (Erk6)	Pan-spec	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 gamma (MAPK12)	3,01
p38a MAPK	Pan-spec	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	2,78
PKA R2a	Pan-spec	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha	2,62
ASK1 (MAP3K5)	Pan-spec	Apoptosis signal regulating protein-serine kinase	2,58
IGF1R	Pan-spec	Insulin-like growth factor receptor protein-tyrosine kinase	2,55
RYK	Pan-spec	RYK tyrosine-protein kinase	2,44
Tau	T522	Microtubule-associated protein tau	2,28
ErbB2 (HER2)	Pan-spec	ErbB2 (Neu) receptor-tyrosine kinase	2,24
Cyclin D1	Pan-spec	Cyclin D1 (PRAD1)	2,22
MEK2 (MAP2K2)	Pan-spec	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)	2,20
14-3-3 z	Pan-spec	14-3-3 protein zeta (cross-reacts with other isoforms)	2,10
PI4KCB	Pan-spec	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta polypeptide	2,06
SOD (Mn)	Pan-spec	Superoxide dismutase [Mn]	2,00
MEK2 (MAP2K2)	Pan-spec	MAPK/ERK protein-serine kinase 2 (MKK2)	1,97
CDK10	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 10 [PISSLRE]	1,84
ROR2	Pan-spec	ROR2 neurotrophic receptor-tyrosine kinase	1,83
LATS1	Pan-spec	Large tumor suppressor 1 protein-serine kinase (WARTS)	1,80
IRAK3	Pan-spec	Interleukin 1 receptor-associated kinase 3	1,74
p21 CDKI1	Pan-spec	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (MDA6)	1,67
RSK1/3	T359+S363/T356 +S360	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/3	1,67
p38a MAPK	T180+Y182	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	1,65
PKCz	Pan-spec	Protein-serine kinase C zeta	1,59
CDK6	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 6	1,57
IKKa	Pan-spec	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)	1,56
PKA R1a	Pan-spec	cAMP-dependent protein-serine kinase type I-alpha regulatory chain	1,54

PAK1	Pan-spec	p21-activated kinase 1 (alpha) (serine/threonine-protein kinase PAK 1)	1,53
Hsp90a/b	Pan-spec	Heat shock 90 kDa protein alpha/beta	-1,54
ROKb (ROCK1)	Pan-spec	RhoA protein-serine kinase beta	-1,57

Tablica 9. Popis svih različito eksprimiranih signalnih proteina identificirani Kinexus analizom u SAI stanicama (SAI) u usporedbi sa stanicama visokog pasaža (PEC-H)

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Naziv proteina	Z-omjer (PEC-SAI, PEC-H)
FAS	Pan-spec	Tumor necrosis factor superfamily member 6 (Apo1, CD95)	2,26
Tyrosine Hydroxylase	S70	Tyrosine hydroxylase isoform a	2,24
EGFR	T693	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	2,09
I1PP2A	Pan-spec	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	1,86
ZAP70	Pan-spec	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	1,83
PKA Ca/b	Pan-spec	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta	1,68
PKCz/l	T410/T412	Protein-serine kinase C zeta/lambda	1,58
Cdc25B	Pan-spec	Cell division cycle 25B phosphatase	1,56
CD45	Pan-spec	Leukocyte common antigen CD45 receptor-tyrosine phosphatase (LCA, T200)	1,56
TRADD	Pan-spec	Tumor necrosis factor receptor type 1 associated DEATH domain protein	1,54
RIP2/RICK	Pan-spec	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2)	1,53
Grp78	Pan-spec	Glucose regulated protein 78	1,51
ROKb (ROCK1)	Pan-spec	RhoA protein-serine kinase beta	1,48
CDK1/2	T161	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	1,46
Rb	Pan-spec	Retinoblastoma-associated protein 1	1,40
Erk1 + Erk2	[T202+Y204] + [T185+Y187]	Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase) + Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase)	1,37
GAP-43	S41	Growth associated protein 43 (Neuromodulin)	1,37
JNK1/2/3	T183 + Y185	Jun N-terminus protein-serine kinase (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	1,34
Bax	Pan-spec	Apoptosis regulator Bcl2-associated X protein	1,29
Hsp90a/b	Pan-spec	Heat shock 90 kDa protein alpha/beta	1,29
RONa	Pan-spec	Macrophage-stimulating protein receptor alpha chain	1,22
RIPK1	Pan-spec	Receptor-interacting protein-serine kinase 1	1,18
Tau	S721	Microtubule-associated protein tau	1,17
Hsp27	S78	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	1,13

PKCb2	T641	Protein-serine kinase C beta 2	1,12
IKKb	Pan-spec	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta	1,10
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	1,09
RSK1/2	S380/S386	Ribosomal S6 protein-serine kinase 1/2	1,08
PP2Cd	Pan-spec	Protein-serine phosphatase 2C - catalytic subunit - delta isoform	1,08
Ubiquitin	Pan-spec	Ubiquitin	1,05
Tau	S739	Microtubule-associated protein tau	1,04
Msk1	S376	Mitogen & stress-activated protein-serine kinase 1	1,04
Smad2/3	Pan-spec	SMA- and mothers against decapentaplegic homolog 2/3	1,01
PTP1D	Pan-spec	Protein-tyrosine phosphatase 1D (SHP2, SHPTP2, Syp, PTP2C)	1,00
Tlk1	Pan-spec	Tousled-like protein-serine kinase 1	-1,01
IRAK2	Pan-spec	Interleukin 1 receptor-associated kinase 2	-1,01
CDK8	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	-1,01
CaMK1d	Pan-spec	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase 1 delta	-1,01
Raf1	Pan-spec	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	-1,03
PRP4K	Pan-spec	Protein-serine kinase PRP4 homolog	-1,04
ILK1	Pan-spec	Integrin-linked protein-serine kinase 1	-1,05
Tau	T522	Microtubule-associated protein tau	-1,05
PKBb (Akt2)	Pan-spec	Protein-serine kinase B beta	-1,07
KHS	Pan-spec	Kinase homologous to SPS1/STE20 (MAP kinase kinase kinase protein-serine kinase 5 (MEKKK5)	-1,08
ANKRD3	Pan-spec	Ankyrin repeat domain protein-serine kinase 3 (RIPK4, DIK)	-1,14
NIK	Pan-spec	NF-kappa beta-inducing kinase	-1,16
CDK5	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 5	-1,18
c-IAP1	Pan-spec	Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 3, apoptosis inhibitor 2 (API2))	-1,22
MEK5 (MAP2K5)	Pan-spec	MAPK/ERK protein-serine kinase 5 (MKK5)	-1,25
PAK1/2/3	T423/402/436	p21-activated kinase 1/2/3 (serine/threonine-protein kinase PAK 1/2/3)	-1,27
PKR1	Pan-spec	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase	-1,36
PKBb (Akt2)	Pan-spec	Protein-serine kinase B beta	-1,36
MAK	Pan-spec	Male germ cell-associated protein-serine kinase	-1,39
PRKWNK4	Pan-spec	Putative protein-serine kinase WNK4	-1,46
IKKa	Pan-spec	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase alpha (CHUK)	-1,47
IGF1R	Pan-spec	Insulin-like growth factor receptor protein-tyrosine kinase	-1,53
MLC(MLRC2)	S19	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform	-1,53
ALS2CR7 (PFTAIRE2)	Pan-spec	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene protein-serine kinase 7	-1,59
COT	Pan-spec	Osaka thyroid oncogene protein-serine kinase (Tpl2)	-1,61
ASK1 (MAP3K5)	Pan-spec	Apoptosis signal regulating protein-serine kinase	-1,66
JNK1/2/3	Pan-spec	Jun N-terminus protein-serine kinases (stress-activated protein kinase (SAPK)) 1/2/3	-1,66

ERP57	Pan-spec	ER protein 57 kDa (protein disulfide isomerase-associated 3; 58 kDa glucose regulated protein)	-1,70
RSK2	Pan-spec	Ribosomal S6 protein-serine kinase 2	-1,71
CDK10	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 10 [PISSLRE]	-1,77
PAK1	Pan-spec	p21-activated kinase 1 (alpha) (serine/threonine-protein kinase PAK 1)	-1,78
PDK1	S241	3-Phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	-1,80
PI4KCB	Pan-spec	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, beta polypeptide	-1,89
TEK (TIE2)	Pan-spec	Angiopoietin-1 receptor-tyrosine kinase	-1,91
Cyclin D1	Pan-spec	Cyclin D1 (PRAD1)	-1,95
PKBg (Akt3)	Pan-spec	Protein-serine kinase B gamma	-2,08
PAK2	Pan-spec	p21-activated kinase 2 (gamma) (serine/threonine-protein kinase PAK 2)	-2,13
IKKb	Pan-spec	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta	-2,21
MEKK2 (MAP3K2)	Pan-spec	MAPK/ERK kinase kinase 2	-2,26
B23 (NPM)	S4	B23 (nucleophosmin, numatrin, nucleolar protein NO38)	-2,44
RYK	Pan-spec	RYK tyrosine-protein kinase	-2,44
PKA R2a	Pan-spec	cAMP-dependent protein-serine kinase regulatory type 2 subunit alpha	-2,47
CDK6	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 6	-2,72
CDK8	Pan-spec	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	-3,70

Tablica 10. Popis svih različito eksprimiranih signalnih proteina identificirani Kinexus analizom u GP7TB stanicama u usporedbi s WB stanicama

Oznaka proteina	Mjesto fosforilacije	Naziv proteina	Z-omjer (GP7TB, WB)
Crystallin aB	S45	Crystallin alpha B (heat-shock 20 kDa like-protein)	4,36
PITSLRE	Pan-specific	PITSLRE serine/threonine-protein kinase CDC2L1	1,92
PI3K p110 delta	Pan-specific	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,89
CDK5	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 5	1,73
PKBa (Akt1)	T308	Protein-serine kinase B alpha	1,69
PAK1	Pan-specific	p21-activated kinase 1 (alpha) (serine/threonine-protein kinase PAK 1)	1,65
PRK2 (PKN2)	Pan-specific	Protein kinase C-related protein-serine kinase 2	1,64
MEK1/2 (MAP2K1/2)	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 1/2 (MKK1/2)	1,57
IKKg (NEMO)	Pan-specific	I-kappa-B kinase gamma/NF-kappa-B essential modulator	1,55
Tau	T548	Microtubule-associated protein tau	1,55
Histone H3	T12	Histone H3.3	1,53
RIP2/RICK	Pan-specific	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2)	1,52

CD45	Pan-specific	Leukocyte common antigen CD45 receptor-tyrosine phosphatase (LCA, T200)	1,45
PTP1B	Pan-specific	Protein-tyrosine phosphatase 1B	1,45
PKCz	Pan-specific	Protein-serine kinase C zeta	1,37
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2	1,37
PI3K	Pan-specific	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	1,36
HspBP1	Pan-specific	Hsp70 binding protein 1	1,35
IKKb	Pan-specific	Inhibitor of NF-kappa-B protein-serine kinase beta	1,32
ZIPK	Pan-specific	ZIP kinase (death associated protein-serine kinase 3 (DAPK3))	1,30
PKR1	Pan-specific	Double stranded RNA dependent protein-serine kinase	1,30
PKA Ca/b	Pan-specific	cAMP-dependent protein-serine kinase catalytic subunit alpha/beta	1,29
LIMK1	Pan-specific	LIM domain kinase 1	1,29
MEF-2	Pan-specific	Myelin expression factor 2 (MYEF2)	1,26
CAS	Pan-specific	Cellular apoptosis susceptibility protein (CSE1L)	1,26
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2	1,23
eIF4E	S209	Eukaryotic translation initiation factor 4 (mRNA cap binding protein)	1,22
Rb	Pan-specific	Retinoblastoma-associated protein 1	1,22
RONa	Pan-specific	Macrophage-stimulating protein receptor alpha chain	1,21
Raf1	Pan-specific	Raf1 proto-oncogene-encoded protein-serine kinase	1,19
PKCd	Pan-specific	Protein-serine kinase C delta	1,18
CPG16/CaMKinase VI	Pan-specific	Serine/threonine-protein kinase DCAMKL1	1,14
PKCm (PKD)	Pan-specific	Protein-serine kinase C mu (Protein kinase D)	1,12
MEK6 (MAP2K6)	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 6 (MKK6)	1,12
PP2A/Ca + PP2A/Cb	Pan-specific	Protein-serine phosphatase 2A - catalytic subunit alpha isoform	1,12
FasL	Pan-specific	Tumor necrosis factor ligand, member 6	1,11
ROKb (ROCK1)	Pan-specific	RhoA protein-serine kinase beta	1,10
CASP1	Pan-specific	Caspase 1 (Interleukin-1 beta convertase) (alpha/beta/gamma/delta isoforms, p20)	1,08
Tyrosine Hydroxylase	S70	Tyrosine hydroxylase isoform a	1,08
CDC2L5 (CHED)	Pan-specific	Cell division cycle 2-like protein-serine kinase 5	1,07
Csk	Pan-specific	C-terminus of Src tyrosine kinase	1,06
Rb	S807+S811	Retinoblastoma-associated protein 1	1,05
IRAK1	Pan-specific	Interleukin 1 receptor-associated kinase 1 (Pelle-like protein kinase)	1,04
PKR1	T451	Double-stranded RNA-dependent protein-serine kinase	1,03
MAPKAPK2	Pan-specific	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	1,02
Rac1	Pan-specific	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1,01
Dab1	Y198	Disabled homolog 1	1,01
MLC(MLRC2)	S19	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform	-1,00
ZAP70	Y315+Y319	Zeta-chain (TCR) associated protein-tyrosine kinase, 70 kDa	-1,00

Src	Pan-specific	Src proto-oncogene-encoded protein-tyrosine kinase	-1,02
DAPK2	Pan-specific	Death-associated protein kinase 2	-1,05
PDK1	S241	3-Phosphoinositide-dependent protein-serine kinase 1	-1,06
MEK1 (MAP2K1)	Pan-specific	MAPK/ERK protein-serine kinase 1 (MKK1)	-1,13
MYPT1	T696	Myosin phosphatase target 1	-1,15
ILK1	Pan-specific	Integrin-linked protein-serine kinase 1	-1,16
PARP1	Pan-specific	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (ADPRT)	-1,17
Nek2	Pan-specific	NIMA (never-in-mitosis)-related protein-serine kinase 2	-1,20
p38a MAPK	Pan-specific	Mitogen-activated protein-serine kinase p38 alpha	-1,23
Erk1 + Erk2	Pan-specific	Extracellular regulated protein-serine kinase 1 (p44 MAP kinase) + Extracellular regulated protein-serine kinase 2 (p42 MAP kinase)	-1,24
PI3KR4	Pan-specific	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	-1,27
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2	-1,29
SMC1	S957	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	-1,32
BUB1A	Pan-specific	BUB1 mitotic checkpoint protein-serine kinase	-1,32
MST1	Pan-specific	Mammalian STE20-like protein-serine kinase 1 (KRS2)	-1,34
NME7	Pan-specific	Nucleotide diphosphate kinase 7 (nm23-H7)	-1,38
CaMKK (CaMKK2)	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase kinase	-1,41
PAK1/2/3	S144/S141/S154	p21-activated kinase 1/2/3 (serine/threonine-protein kinase PAK 1/2/3)	-1,41
COT	Pan-specific	Osaka thyroid oncogene protein-serine kinase (Tpl2)	-1,48
CDK5	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 5	-1,54
Tau	S713	Microtubule-associated protein tau	-1,61
PACSIN1	Pan-specific	Protein kinase C + casein kinase substrate in neurons protein 1	-1,83
CDK2	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 2	-2,12
CAMK2d	Pan-specific	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase 2 delta	-2,20
RYK	Pan-specific	RYK tyrosine-protein kinase	-2,48
TAK1	Pan-specific	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1	-2,81
TEK (TIE2)	Pan-specific	Angiopoietin-1 receptor-tyrosine kinase	-3,26
p53	S392	Tumor suppressor protein p53 (antigenNY-CO-13)	-3,64
PKCa/b2	T638/T641	Protein-serine kinase C alpha/beta 2	-4,09
CDK8	Pan-specific	Cyclin-dependent protein-serine kinase 8	-4,15

Tablica 11. Popis svih proteina identificiranih samo u EV GP7TB stanica u usporedbi s EV WB stanica.

Oznaka gena	Naziv proteina	Uniprot oznaka	Ukupni postotak združivanja
Itgb1	Integrin beta-1	P49134	23.2
Ptgfrn	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	Q62786	12.0
Pkm2	Pyruvate kinase	Q6P7S0	12.0
Itga6	Integrin, alpha 6	G3V991	10.5
C3	Complement C3 (Fragment)	P01026	8.86
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04797	8.70
Vcl	Vinculin	P85972	7.10
Rab7a	Ras-related protein Rab-7a	P09527	6.85
Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	P63102	6.83
Ctnna1	Catenin (Cadherin-associated protein), alpha 1, isoform CRA_b	Q5U302	6.52
Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	P54311	6.03
Ehd2	EH domain-containing protein 2	Q4V8H8	5.74
Msn	Moesin	O35763	5.71
Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	P04897	4.84
Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	P34058	4.57
Anxa6	Annexin A6	P48037	4.45
Slc3a2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	Q794F9	4.20
Actn4	Alpha-actinin-4	Q9QXQ0	4.09
Rap1b	Ras-related protein Rap-1b	Q62636	3.70
Mmrn2	Putative uncharacterized protein Mmrn2	D4ABX6	3.61
Slc16a1	Monocarboxylate transporter 1	P53987	3.51
Plp2	Proteolipid protein 2	Q6P742	3.40
Cab39	Putative uncharacterized protein Cab39	Q8K312	3.05
Tfrc	transferrin receptor protein 1	Q99376	2.91
Htra1	Insulin-like growth factor binding protein 5 protease	Q9QZK5	2.85
Sdcbp	Syntenin-1	Q9JI92	2.84
Ehd4	Pincher	Q8R3Z7	2.77
Tubb2b	Tubulin beta-2B chain	Q3KRE8	2.47
Prdx1	Peroxiredoxin-1	Q63716	2.42
Rab11b	Ras-related protein Rab-11B	O35509	2.40
Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain	Q6P9U7	2.37
Slc4a7	Isoform 3 of Sodium bicarbonate cotransporter 3	Q9R1N3	2.34
Ctnnd1	Putative uncharacterized protein Ctnnd1	D3ZZZ9	2.25
Ywhag	14-3-3 protein gamma	P61983	2.24
Atp1b1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	P07340	2.23
Gstp1	Glutathione S-transferase P	P04906	2.15
Epha2	Ephrin receptor	Q03145	2.13
Dst	Protein Dst	F1M118	2.12
Ehd1	EH domain-containing protein 1	Q641Z6	2.11
Tln1	talin	Q498D4	2.10
Alcam	CD166 antigen	O35112	2.07
Itga2b	Putative uncharacterized protein Itga2b	D3ZAC0	2.06

Rala	Ras-related protein Ral-A	P63322	2.03
Gnb2	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2	Q9QX35	2.02
Rab5a	Small GTP-binding protein rab5	O88565	2.02
Akr1b1	Aldose reductase	P07943	2.02
Cd9	CD9 antigen	P40241	2.02
Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	P06761	2.01
Slc44a1	Isoform 1 of Choline transporter-like protein 1	Q8VII6	2.01
Cyfip2	Putative uncharacterized protein Cyfip2	Q5SQX6	2.00
Itga5	Putative uncharacterized protein Itga5	D4ACU9	2.00
Rhoa	Transforming protein RhoA	P61589	2.00
Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P10111	2.00
Atp1b3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	Q63377	2.00
Itgav	Integrin, alpha V	F1LZX9	2.00
Slc2a1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	P11167	1.86
Rab10	Ras-related protein Rab-10	P35281	1.72
Ywhah	14-3-3 protein eta	P68511	3.65
Rps27a	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	P62982	1.54
Efnb1	Ephrin B1	Q6P7B6	1.54
Cct4	T-complex protein 1 subunit delta	Q7TPB1	1.42
Trpm4	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4	Q9ESQ5	1.41
Trim47	Similar to Tripartite motif protein 47	D3ZA22	1.40
Sin3a	Putative uncharacterized protein Sin3a	Q96ST3	1.33
Enpp1	Isoform 1 of Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	Q924C3	1.33
Slc1a4	Neutral amino acid transporter ASCT1	Q76GL9	1.31
Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha	P82995	15,3

Tablica 12. Popis svih proteina identificiranih samo u EV GP7TB.SAI u usporedbi s EV GP7TB stanica.

Oznaka gena	Naziv proteina	Uniprot oznaka	Ukupni postotak združivanja
Pdcd6ip	Programmed cell death 6-interacting protein	Q9QZA2	21,1
Akr1b8	Aldose reductase-like protein	Q91W30	14,5
Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P46462	10,3
Eno1	Enolase	P04764	7,7
Iqgap1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	G3V7Q7	6,52
Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A	P05065	6,1
Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63039	6,02
Myh9	Myosin-9	Q62812	5,55
Ppp2r1a	Protein phosphatase 2 (Formerly 2A), regulatory subunit A, alpha	Q5XI34	5,41
Tuba3a	Tubulin alpha-3 chain	Q68FR8	5,1
Cd44	CD44 protein	O08779	4,99
Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	P16617	4,12
Rab5c	Ras-related protein Rab-5C	P35278	4.06

Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P14659	4,04
Kpnb1	Importin subunit beta-1	P52296	4,02
Cdc42	Isoform 1 of Cell division control protein 42 homolog	Q8CFN2	4
Cfl1	Cofilin-1	P45592	4
Mug1	Alpha-1-inhibitor 3	P14046	3,28
Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P10719	2,57
Itgb5	integrin, beta 5	D4AC54	2,54
Plscr3	Phospholipid scramblase 3	Q6QBQ4	2,46
Plec	Plectin	P30427	2,44
Txn1	Thioredoxin	P11232	2,4
Ywhae	14-3-3 protein epsilon	P62260	2,33
Hspa1l	Heat shock 70 kDa protein 1-like	P55063	2,28
Lphn2	Latrophilin-2	O88923	2,26
Cd14	Monocyte differentiation antigen CD14	Q63691	2,18
Fdps	Farnesyl pyrophosphate synthase	P05369	2,13
Actr3b	Protein Actr3b	F1LY09	2,11
LOC10036238	Ferritin	M0R597	2,1
Fam65b	Ab2-162	Q7TP54	2,1
Clic1	Chloride intracellular channel protein 1	Q6MG61	2,09
Myof	myoferlin	Q69ZN7	2,09
A2m	Alpha-2-macroglobulin	Q6LDG8	2,06
Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	Q6P502	2,05
Klhl6	Putative uncharacterized protein Klhl6	D4A1Z1	2,03
Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	P04636	2,01
Pgd	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Q7TP11	2,01
Serpinh1	Serpin H1	P29457	2,01
Bsg	Basigin	P26453	2
Cspg4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Q00657	2
Dnaja1	DnaJ homolog subfamily A member 1	P63036	2
F5	Protein F5	F1LNI3	2
LOC652956	p55 protein	Q5BK33	2
Psma4	Proteasome subunit alpha type-4	P21670	2
RGD1564380	hypothetical protein LOC292711	D3Z9W4	2
Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	F8WFH8	2
Prss3	Cationic trypsin-3	P08426	1,94
Ccdc69	Similar to DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 461, expressed	D3ZTN8	1,9
Flna	Filamin, alpha (Predicted), isoform CRA_a	C0JPT7	1,82
Aldh3a1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	P11883	1,81
RGD1305534	Putative uncharacterized protein RGD1305534	D3ZY24	1,74
Car3	Carbonic anhydrase 3	P14141	1,72
Cct6a	Chaperonin subunit 6a	Q3MHS9	1,71
Hspa1b;	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Q07439	1,71
Larp6	Putative uncharacterized protein Larp6	D3ZCR5	1,7
Olr1695	olfactory receptor Olr1695	D4ACX6	1,7
Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	O35264	1,7
Pxdn	peroxidasin homolog	F1M335	1,7
Smchd1	Protein Smchd1	D4AAG8	1,65
Ttn	titin	D4A8Y1	1,63

Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	P11598	1,59
Sbno2	Putative uncharacterized protein Sbno2	D3ZDU8	1,41
Gna13	Guanine nucleotide binding protein alpha 13	Q6Q7Y5	1,37
Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase	Q6P6V0	1,34
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	P05982	1,31
Prdx2	Peroxiredoxin-2	P35704	1,31

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: **Martina Šrajer Gajdošik**
Adresa: Bednjanska 6a, 31 000 Osijek
Kontakt telefon: 031/399-955
e-mail: msgajdosik@kemija.unios.hr

Rođena sam 20. travnja 1983. godine u Osijeku. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u I. Gimnaziji (Općoj) u Osijeku gdje sam i maturirala 2001. godine. Iste sam godine upisala Prehrambeno-tehnološki fakultet na Sveučilištu J. J. Strossmayera u Osijeku. Dobitnica sam Rektorove nagrade 2006. godine. Diplomirala sam 2008. godine i stekla zvanje diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva. Kratko sam radila kao asistent na Institutu za razvoj novih proizvoda u Saponii d. d. u Osijeku. Krajem 2008. godine zaposlila sam se kao asistent na Odjelu za kemiju pri Sveučilištu J. J. Strossmayera u Osijeku, gdje sudjelujem u izvođenju nastave na katedri za organsku kemiju i biokemiju. Godine 2008. upisala sam Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na stručnom usavršavanju sam bila u Austriji na Institutu za analitičku kemiju Sveučilišta u Beču (veljača – ožujak 2009. godine) i u SAD-u na *Brown University* i u *Rhode Island hospital*, Providence, RI (veljača – travanj 2010.) Dobitnica sam Fulbright-ove stipendije (stupendije Vlade SAD-a) za 2010. godinu u sklopu koje sam provela 9 mjeseci na *Brown University* i u *Rhode Island hospital*, Providence, RI, SAD (listopad 2010. – lipanj 2011.)

Glavno područje mog znanstvenog interesa vezano je uz analizu bioloških uzoraka metodama tekućinske kromatografije i masene spektrometrije te istraživanje bioloških procesa povezanih s nastankom raka. Pri Odjelu za kemiju sudjelujem u izvođenju nastave iz kolegija Praktikum biokemije te seminarima iz Biokemije I i Biokemije II. Članica sam Hrvatskog kemijskog društva.

Udana sam i majka jedne djevojčice.

Znanstveni radovi u CC časopisima:

1. M. Šrajer Gajdošik, S. Kovač, N. Malatesti Nela, E. Müller i Đ. Josić, Ion-Exchange Sample Displacement Chromatography as a Method for Fast and Simple Isolation of Low- and High-Abundance Proteins from Complex Biological Mixtures. *Food Technol. Biotech*. **52** (2014) 58-63.

2. M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, J. Clifton, L. Breen, L. Cao, J. Giacometti, i Đ. Josić, Sample preparation and further proteomic investigation of the inhibitory activity of pyridinium oximes to Gram-positive and Gram-negative food pathogens. *Food Res. Int.* **51** (2013) 46-52.

3. Đ. Josić, L. Breen, J. Clifton, M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, M. Ručević i E. Müller. Separation of proteins from human plasma by sample displacement chromatography in hydrophobic interaction mode. *Electrophoresis* **33** (2012) 1842-1849.

4. M. Šrajer Gajdošik, J. Clifton, James i Đ. Josić, Sample displacement chromatography as a method for purification of proteins and peptides from complex mixtures. *J. Chromatogr. A* **1239** (2012) 1-9.

Znanstveni radovi u drugim časopisima:

1. L. Breen, L. Cao, K. Eom, M. Šrajer Gajdošik, L. Camara, J. Giacometti, D. E. Dupuy i Đ. Josić, High-throughput fractionation of human plasma for fast enrichment of low- and high-abundance proteins. *Blood Trans.* **10** (2012) S89-S100.

Poglavlja u knjizi:

1. L. Yu-Chen, M. Šrajer Gajdošik, Đ. Josić i S. Lin. Plasma Membrane Isolation Using Immobilized Concanavalin A Magnetic Beads, Liver Proteomics, Methods and Protocols, Đ. Josić i D. C. Hixson, (ur.), Humana Press, New York, 2012., 29-41.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

1. Đ. Josić, D. Gašo-Sokač, M. Šrajer Gajdošik i J. Clifton, *Microbial omics for food safety*, Book of Abstracts 7th Central European Congress on Food, Kukurinov, Vladimir (ur.), Skopje, 2014. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak).

2. M. Šrajer Gajdošik, D. Yang, D. Pantazatos, L. Cao, Đ. Josić, K. Brilliant, D. Chatterjee, P. J. Quesenberry, D. C. Hixson, i D. R. Mills, *Identification of a transformed subpopulation of liver epithelial cell-derived microvesicles that stimulate NK cytotoxicity.* Book of Abstracts from Second International Meeting of ISEV 2013., Boston, MA, USA, 2013. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

3. M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, H. Pavlović, J. Clifton, L. Breen, L. Cao, J. Giacometti, i Đ. Josić, *Priprema uzoraka i proteomička analiza inhibitorne aktivnosti piridinijevih oksima na gram-negativne i gram-pozitivne patogene u hrani.* Knjiga sažetaka XXIII. hrvatskog skupa kemičara i kemijskih inženjera, A. Hadžiev i Z. Blažeković (ur.). HDKI/Kemija u industriji, 2013., Zagreb (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

4. M. Šrajer Gajdošik, D. Yang, D. Catterjee, S. Cross-Knorr, K. E. Brilliant, M. Gorman, D. C. Hixson i D. R. Mills, *Defective signaling in a spontaneous transformation model of rat prostate epithelial cells.* The FASEB Journal, 2012., San Diego, CA, SAD (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Đ. Josić, D. Gašo Sokač i M. Šrajer Gajdošik, *Application of proteomics for the process development, quality control, authenticity and product safety in food technology*. Abstract book of 6th Central European Congress on Food., 2012., Novi Sad, Srbija (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

6. D. R. Mills, D. Yang, H. M. Callanan, K. E. Brilliant, Y. Wan, M. Šrajer Gajdošik, Đ. Josić, i D. C. Hixson, *Transformed Rat Prostate Cell-Derived Microvesicles Support Immune Evasion. Abstract book of International Symposium of Cellular Vesicles: Determination of Cell Fate*, 2011., Providence, RI, SAD, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. D. Gašo-Sokač, D. Kocevski, S. Kovač, V. Bušić, M. Šrajer Gajdošik, i H. Pavlović, *Synthesis of novel analogues of vitamin B6 and evaluation of their antibacterial activity*. Book of Abstracts, D. Šubarić (ur.), 2010., Osijek (poster, domaća recenzija, sažetak).