

IDENTIFIKACIJA PROTEINSKIH BILJEGA KOD METASTATSKOGA PLANOCELULARNOG KARCINOMA GRKLJANA I DOPRINOS POLISIJALIZACIJE NCAM-MOLEKULE PROGRESIJI PLANOCELULARNOG KARCINOMA GRKLJANA

Klobučar, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:859507>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Marko Klobučar

**IDENTIFIKACIJA PROTEINSKIH
BILJEGA KOD METASTATSKOGA
PLANOCELULARNOG KARCINOMA
GRKLJANA I DOPRINOS
POLISIJALIZACIJE NCAM-MOLEKULE
PROGRESIJI PLANOCELULARNOG
KARCINOMA GRKLJANA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2017.

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Marko Klobučar

**IDENTIFICATION OF PROTEIN
MARKERS IN METASTATIC
LARYNGEAL SQUAMOUS CELL
CARCINOMA AND CONTRIBUTION OF
NCAM MOLECULE POLYSIALYLATION
TO PROGRESSION OF SQUAMOUS
CELL CARCINOMA OF THE LARYNX**

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2017.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Krešimir Pavelić, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
2. Prof.dr.sc Anđelka Radojčić Badovinac, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
3. Prof.dr.sc. Roberto Antolović, Hrvatsko katoličko sveučilište, Zagreb
4. Izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Hvala mojoj mentorici, izv.prof.dr.sc. Sandri Kraljević Pavelić, na bezrezervnoj podršci i savjetima prilikom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem i prof.dr.sc. Krešimiru Paveliću na konstruktivnim prijedlozima i savjetima. Isto tako, zahvaljujem mojim kolegama, posebice doc.dr.sc. Ivani Ratkaj, na pomoći tijekom izrade ovog rada i veliko hvala mojoj obitelji na beskonačnom strpljenju, ljubavi i podršci.

Ova je doktorska disertacija dijelom napravljena u sklopu projekta s FGCZ-Zurich, Švicarska, PRIME-XS-0000019 „Glycoproteomics of larynx squamous cell cancer“ (voditeljice projekta, prof. Jasna Peter-Katalinić i prof. Sandra Kraljević Pavelić). Pristup dijelu opreme korištene za izradu ovog rada omogućen je projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

Lektura doktorske disertacije: mr.sc. Morana Butković, prevoditeljica za njemački jezik

Sažetak

Planocelularni karcinom grkljana najčešći je oblik malignog oboljenja glave i vrata kojeg tijekom progresije karakterizira učestala pojava metastaza u limfnim čvorovima vrata u ranim fazama razvoja bolesti. Ovaj tip karcinoma obilježavaju mnogobrojne genetske abnormalnosti i promjene razine ekspresije niza proteinskih i glikoproteinskih molekula koje su neposredno povezane s procesom kancerogeneze. Unatoč brojnim otkrićima molekularni mehanizmi u pozadini patogeneze ovog oboljenja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Osim toga, sve je više dokaza koji upućuju na to da je abnormalna ekspresija i glikozilacija proteina posljedica inicijalne maligne transformacije stanica, a aberantna glikozilacija predstavlja jedan od ključnih događaja u invaziji i metastaziranju mnogih malignih oboljenja. U svrhu identifikacije novih proteinskih biljega, koji bi dodatno razjasnili patogenezu metastatskog oblika bolesti i koji bi se mogli koristiti kao potencijalni dijagnostički i prognostički biljezi, u ovomu doktorskom radu je provedeno globalno diferencijalno proteomsko profiliranje uzoraka tkiva primarnih metastatskih tumora i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva. Primijenjena je metoda masene spektrometrije spregnute s tekućinskom kromatografijom i naknadnom bioinformatičkom analizom. Identificirano je ukupno 289 statistički značajno diferencijalno eksprimiranih proteina u metastatskim tumorima, a validacija odabranih potencijalnih markera je provedena uz pomoć metoda *Western blot* i 2D imunoblot. U primarnom metastatskom planocelularnom karcinomu grkljana su po prvi puta specifično potvrđeni potencijalni proteinski biljezi ladinin-1, antigen diferencijacije monocita- CD 14, lumikan, alfa 4A lanac tubulina-TUBA4A, afamin, ali i s njima povezani stanični signalni putevi poput CD44- β 1 integrinskoga signalnog puta induciranog faktorom inhibicije migracije makrofaga-MIF i signalnog puta nuklearnog faktora kapa B. Nadalje, uz pomoć imunohistokemijske analize je u svim uzorcima tkiva primarnih tumora utvrđena i ekspresija polisijalizirane forme adhezijske molekule neuralnih stanica (engl. *PSA-NCAM -Polysialylated neural cell adhesion molecule*), onkofetalnoga glikoproteinskog antigena, koji se povezuje s patogeneзом i metastatskom

diseminacijom nekih izrazito malignih oboljenja. Utjecaj PSA-NCAM na promjenu statusa staničnih signalnih kaskada, koje su uključene u održanje normalne homeostaze tkiva sluznice, bio je negativan što upućuje na činjenicu da ekspresija PSA-NCAM doprinosi ranim fazama maligne transformacije planocelularnog karcinoma grkljana.

Ključne riječi

Ladinin-1; antigen diferencijacije monocita- CD 14; lumikan; alfa 4A lanac tubulina; afamin; CD44- β 1 integrin -MIF; nuklearni faktora kapa B; metastaziranje; proteomika; planocelularni karcinom grkljana; polisijalizacija; primarni planocelularni karcinom grkljana; progresija

Summary

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is the most common form of malignant disease in the head and neck region characterized by the frequent occurrence of metastases in the neck lymph nodes early in the disease progression. This form of cancer is characterised with numerous genetic abnormalities and changes in expression levels of proteins and glycoproteins associated with the process of carcinogenesis. Despite numerous findings molecular mechanism of metastatic disease has not yet been fully elucidated. In addition, there is increasing evidence that abnormal expression and glycosylation of proteins result of initial malignant transformation of cells, and aberrant glycosylation is one of the key events in the invasion and metastasis of many malignant diseases. In addition, there is increasing evidence indicating that abnormal expression and glycosylation of proteins is a result of cellular initial malignant transformation, and aberrant glycosylation is one of the key events in the invasion and metastasis of many malignant diseases. To identify novel protein markers which would further elucidate the pathogenesis of the metastatic disease and that could be also used as potential diagnostic and prognostic biomarkers, the global differential proteomic profiling of primary metastatic tumour and matched tumour non-affected tissues was performed. For proteomic profiling the method of mass spectrometry coupled with liquid chromatography and subsequent bioinformatic analysis was applied. A total number of 289 differentially expressed proteins were identified in metastatic tumors and selected protein markers were further validated by Western blot and 2D-immunoblot method. Potential protein biomarkers Ladinin-1, monocyte differentiation antigen CD-14, lumican, alpha-tubulin 4A chain TUBA4A, afamin and their associated cellular signaling pathways such as CD44- β 1 integrin induced macrophage migration inhibitory factor MIF and nuclear factor kappa B signaling pathway, were for the first time to our knowledge specifically determined in metastatic LSCC. Furthermore, in all analysed primary tumor tissue samples the expression of polysialylated neural cell molecule (PSA-NCAM), an oncofetal glycoprotein antigen previously associated with pathogenesis and metastatic dissemination of highly malignant diseases, was

determined by immunohistochemical analysis. The impact of PSA-NCAM expression on the cellular signaling cascades involved in maintenance of normal mucosa tissue homeostasis was negative, which indicates that the expression of PSA-NCAM contribute to the initial stages of malignant transformation in laryngeal squamous cell carcinoma.

Keywords

Ladinin-1; monocyte differentiation antigen CD-14, lumican, alpha-tubulin chain 4A, afamin; CD44- β 1 integrin- MIF; nuclear factor kappa B; metastases; proteomics; laryngeal squamous cell carcinoma; polysialylation; NCAM; primary laryngeal squamous cell carcinoma; progression

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Osnove anatomije grkljana.....	2
1.1.1. Uloga grkljana.....	4
1.2. Planocelularni karcinom grkljana.....	4
1.2.1. Etiologija.....	5
1.2.2. Klinička lokalizacija	5
1.2.3. TNM stupnjevanje prema UICC i AJCC klasifikaciji.....	6
1.2.4. Histopatološko stupnjevanje	11
1.2.5. Širenje i metastaziranje	11
1.2.6. Klinički tretman, prognoza i prediktivni faktori	13
1.3. Molekularna osnova metastaziranja.....	14
1.4. Proteomika karcinoma grkljana.....	19
1.5. Uloga polisijalizacije adhezijske molekule neuralnih stanica u procesu kancerogenze.....	22
2. Ciljevi istraživanja.....	24
3. Materijali i metode.....	25
3.1. Prikupljanje uzoraka tkiva pacijenata.....	25
3.1.1. Prikupljanje uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana u svrhu proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa	25
3.1.2. Prikupljanje uzoraka tumorskih tkiva pacijenata u svrhu utvrđivanja ekspresije polisijaliziranog oblika NCAM-molekule metodom imunohistokemije.....	25
3.2. Proteomsko profiliranje metastatskog karcinoma grkljana uz pomoć spektrometrije masa spregnute tekućinskom kromatografijom (LC -MS)	27

3.2.1.	Izolacija proteina iz tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana	31
3.2.2.	Određivanje koncentracije proteina u tkivnim lizatima	31
3.2.3.	Priprema uzoraka proteina za analizu pomoću metode LC-MS....	33
3.2.4.	Analiza uzoraka proteina pomoću metode LC-MS.....	35
3.2.5.	Identifikacija proteina uz pomoć specijaliziranih računalnih programa i proteomskih baza podataka.....	35
3.2.6.	Određivanje diferencijalne razlike u ekspresiji proteina pomoću metode LC-MS.....	36
3.3.	Pretraživanje funkcionalnih proteomskih i genomskih funkcionalnih baza podataka	37
3.4.	<i>Western blot</i> analiza razine relativne ekspresije proteina odabranih na temelju rezultata proteomskog profiliranja pomoću spektrometrije masa i staničnih signalnih puteva povezanih s procesom metastaziranja....	37
3.5.	Dvodimenzionalna (2-DE) imunoblot analiza razine ekspresije različitih formi malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa lumikana	40
3.6.	Priprema uzoraka tkiva tumora za imunohistokemijsku analizu.....	43
3.6.1.	Semikvantitativna imunohistokemijska analiza ekspresije polisijaliziranog oblika NCAM-molekule u sekcijama tkiva primarnih metastatskih i nemetastatskih planocelularnih tumora grkljana... .	43
3.7.	<i>Western blot</i> analiza razine relativne ekspresije proteina i staničnih signalnih puteva povezanih s ekspresijom polisijaliziranog oblika NCAM- molekule.....	45
4.	Rezultati.....	45
4.1.	Rezultati kvalitativnog i kvantitativnoga proteomskog profiliranja uzoraka tkiva metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana uz pomoć metode LC-MS.	45

4.2.	Bioinformatička analiza rezultata kvantitativnoga proteomskog profila uzoraka metastatskoga tkiva.....	91
4.2.1.	Rezultati PANTHER klasifikacijske analize ukupnoga diferencijalnog proteomskog profila uzoraka metastatskoga tkiva.....	92
4.2.2.	Rezultati klasifikacijske analize PANTHER proteinskog profila ekspresije u tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana	100
4.3.	Validacija meta uključenih u imunološke procese i signalizaciju pokrenutu izvan stanice.....	107
4.3.1.	Rezultati analize ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tkiva nezahvaćenih tumorom pacijenata s metastatskim planocelularnim karcinomom grkljana.....	108
4.3.2.	Rezultati analize ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tkiva nezahvaćenih tumorom pacijenata s nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana.	111
4.4.	Rezultati 2-DE imunoblot analize različitih formi malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa lumikana u tumorskim tkivima i pripadajućim tkivima nezahvaćenim tumorom pacijenata s metastatskim i nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana.....	114
4.5.	Ekspresija polisijaliziranog oblika NCAM-molekule u sekcijama primarnih tumora pacijenata s metastatskim i nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana.....	117
4.5.1.	Rezultati analize ekspresije polisijalotransferaze IV, siglek-11 i aktivacije signalnog puta receptora za faktore rasta fibroblasta1.....	127
5.	Rasprava.....	131
6.	Zaključci.....	145
7.	Popis literature.....	147
8.	Životopis.....	180

9. Prilozi.....	184
------------------------	------------

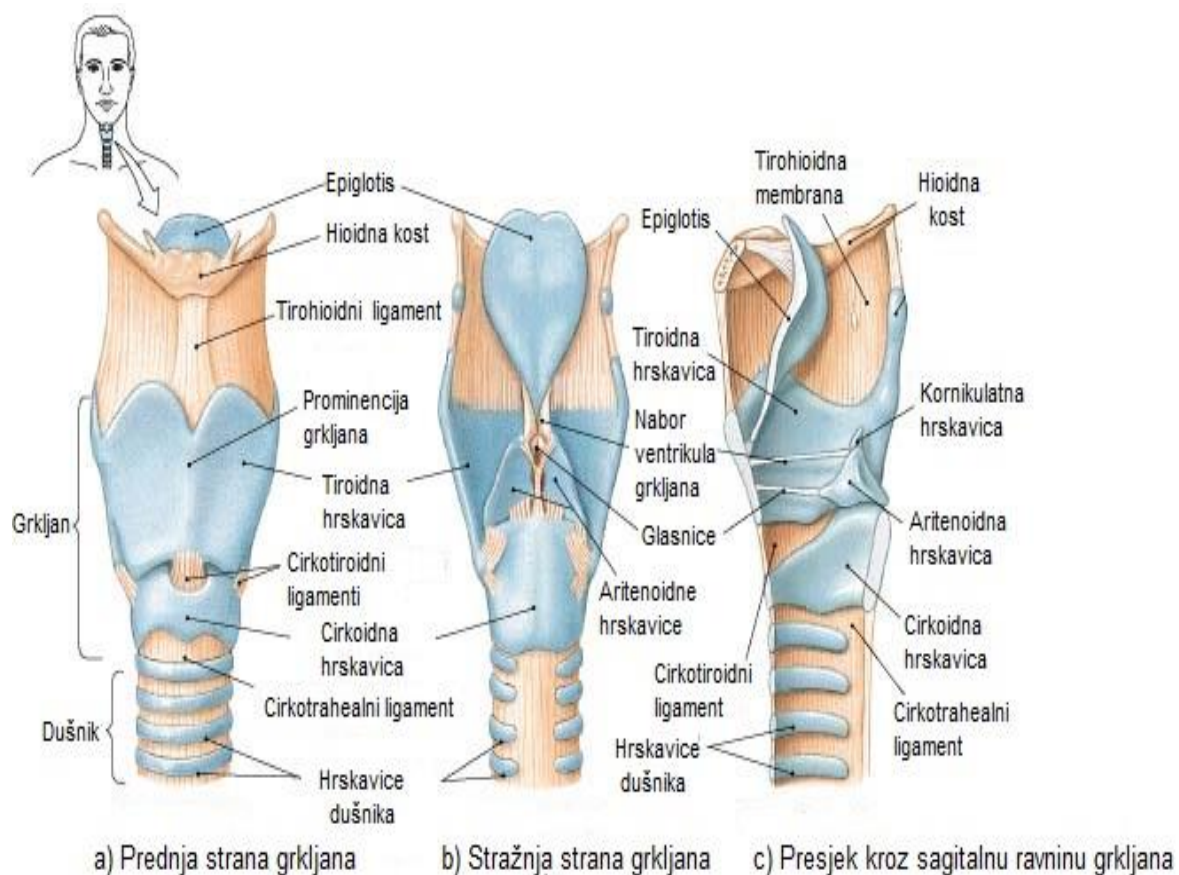
1. Uvod

Planocelularni (skvamozni) karcinom grkljana (engl. *LSCC – Laryngeal squamous cell carcinoma*) je najčešći oblik malignog oboljenja područja glave i vrata kojeg rano tijekom progresije bolesti karakterizira učestala pojava metastaza u limfnim čvorovima vrata. Karcinom grkljana najčešće se javlja u muškaraca između šestoga i sedmog desetljeća života, a na njegovo pojavljivanje utječe način života, posebice navike pušenja i konzumacije alkoholnih pića koje u kombinaciji imaju multiplikacijski učinak na razvoj bolesti. Unatoč agresivnim i multidisciplinarnim pristupima liječenju, koji uključuju kemo- i radioterapiju prije i nakon kirurškog zahvata, posljednjih se nekoliko desetljeća petogodišnja stopa preživljenja pacijenata nije mijenjala jer velik broj oboljelih (gotovo trećina pacijenata) prilikom inicijalne dijagnoze ima uznapredovali oblik bolesti s metastazama u limfnim čvorovima i lokoregionalni sekundarni tumor te metastaze u drugim organima. Na molekularnoj razini ovaj je oblik karcinoma povezan s mnogobrojnim genetskim abnormalnostima i promjenama razine ekspresije mnogih proteinskih vrsta vezanih uz proces kancerogeneze. Unatoč brojnim otkrićima molekularni mehanizam ovoga metastatskog oboljenja još nije u potpunosti razjašnjen. U svrhu identifikacije novih proteinskih kandidata s potencijalnom dijagnostičkom vrijednošću i doprinosa boljem razumijevanju metastatske forme bolesti općenito u ovom doktorskom radu se uz pomoć proteomskog pristupa i bioloških metoda validacije izvršilo globalno diferencijalno proteomsko profiliranje uzoraka tkiva primarnih tumora i pripadajućeg tkiva nezahvaćenog tumorom pacijenata oboljelih od primarnog metastazirajućeg tumora. Poznato je kako polisijalizacija adhezijske molekule neuralnih stanica (engl. *PSA – NCAM, Polysialylated-neural cell adhesion molecule*) djeluje na stanične adhezivne osobine i staničnu signalizaciju te se povezuje s procesom kancerogeneze i metastatskom diseminacijom brojnih visokomalignih oboljenja poput neuroblastoma, Wilmsovog tumora te karcinoma pluća velikih i malih stanica. Ekspresija nepolisijaliziranog oblika molekule je prethodno utvrđena kod planocelularnih karcinoma glave i vrata te je povezana s procesom invazije tumora. U svrhu utvrđivanja ekspresije polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica i njenog doprinosa procesu kancerogeneze planocelularnog karcinoma grkljana u ovom se istraživanju uz proteomsko profiliranje imunohistokemijskom analizom

uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana po prvi puta ispitala ekspresija polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica u karcinomu grkljana te njen utjecaj na stanične signalne kaskade važne za patogenezu i razvoj bolesti.

1.1. Osnove anatomije grkljana

Grkljan je u odraslih organ složene strukture veličine 6 cm i dio je respiratornog sustava unutar anteriornog područja vrata, odnosno nalazi se na prednjoj strani donjeg dijela ždrijela iznad dušnika i povezuje ždrijelo s dušnikom. Njegova primarna uloga je zaštita gornjih dišnih puteva prilikom gutanja. Ostale uloge grkljana uključuju fonaciju ili proizvodnju zvuka pomoću glasnica, kašalj i sl. Kostur grkljana čine tri velike neparne hrskavice; cirkoidna, tiroidna, epiglotis i tri parne manje hrskavice, aritenoidna, kuneiformna i kornikulatna. Osim toga grkljan ima dobro razvijen sustav mišića, ligamenata i membrana te razvijen krvožilni, limfni i živčani sustav [1, 2] (slika 1).



Slika 1. Sustav hrskavica i membrana grkljana prikazan s prednje strane (a) i stražnje strane grkljana (b) te u presjeku kroz sagitalnu ravninu grkljana (c) (Prilagođeno s URL: <https://anatomyofthefoot.com/cartilages-of-the-larynx.html>)

1.1.1. Uloga grkljana

Primarna uloga grkljana je zaštita gornjih dišnih puteva od inhalacije stranih čestica tijekom procesa gutanja prilikom čega zbog mehaničke stimulacije grkljana dolazi do zatvaranja epiglotične hrskavice što zadržava respiraciju i sprečava ulazak stranih tvari u dušnik. Osim toga grkljan ima važnu ulogu kao osjetilni organ i u procesu disanja prilikom čega je epiglotična hrskavica otvorena, a glasnice su međusobno razmaknute jedna od druge [3]. Sljedeća važna uloga grkljana je fonacija ili proizvodnja zvuka pomoću pravih glasnica. Fonacija je složen proces koji omogućava specijalizirana mikroanatomija pravih glasnica. Naime, glasnice se sastoje od tri glavna histološka sloja, tj. mukoze glasnica i podliježećega vokalnog ligamenta te vokalnih mišića. Zbog odsustva submukoznog sloja je mukoza glasnica specijalizirana za vibratornu funkciju, odnosno strujanje zraka preko glasnica uzrokuje slobodno pomicanje mukoze preko krutih strukturalnih slojeva glasnica i uzrokuje proizvodnju zvuka [4].

Anatomija i struktura grkljana složena je te ove elemente treba imati na umu kod istraživanja patologije grkljana koja uključuje različite strukture i tkiva. Tako i kod karcinoma grkljana lokalizacija tumora određuje tijek bolesti i terapiju.

1.2. Planocelularni karcinom grkljana

Planocelularni karcinom grkljana (engl. *LSCC – Laryngeal squamous cell carcinoma*) najčešći je oblik raznolike skupine planocelularnih karcinoma glave i vrata te uzrokuje 2 – 5 % novih godišnjih malignih oboljenja u svijetu [5, 6]. Planocelularni karcinomi glave i vrata razvijaju se iz skvamozne mukoze ili respiratornog epitela gornjih dišnih puteva te uz larinks obuhvaćaju druga anatomska područja kao usnu šupljinu, paranazalne sinuse, dušnik, nazo-, hipo- i orofarinks [7]. Konvencionalni planocelularni oblik karcinoma odnosi se na 95 % malignih oboljenja grkljana, dok ostalih 5 % čine drugi oblici malignosti poput karcinoma bazalnih stanica, adenokarcinoma, neuroendokrinog i verukoznog karcinoma [8, 9]. Planocelularni karcinomi glave i vrata najčešće se javljaju kod muškaraca kasnije životne dobi [10,

11], iako je sve veći broj slučajeva zabilježen i kod žena i djece zbog pojačane prevalencije pušenja te promjena u načinu života zadnjih nekoliko desetljeća [12].

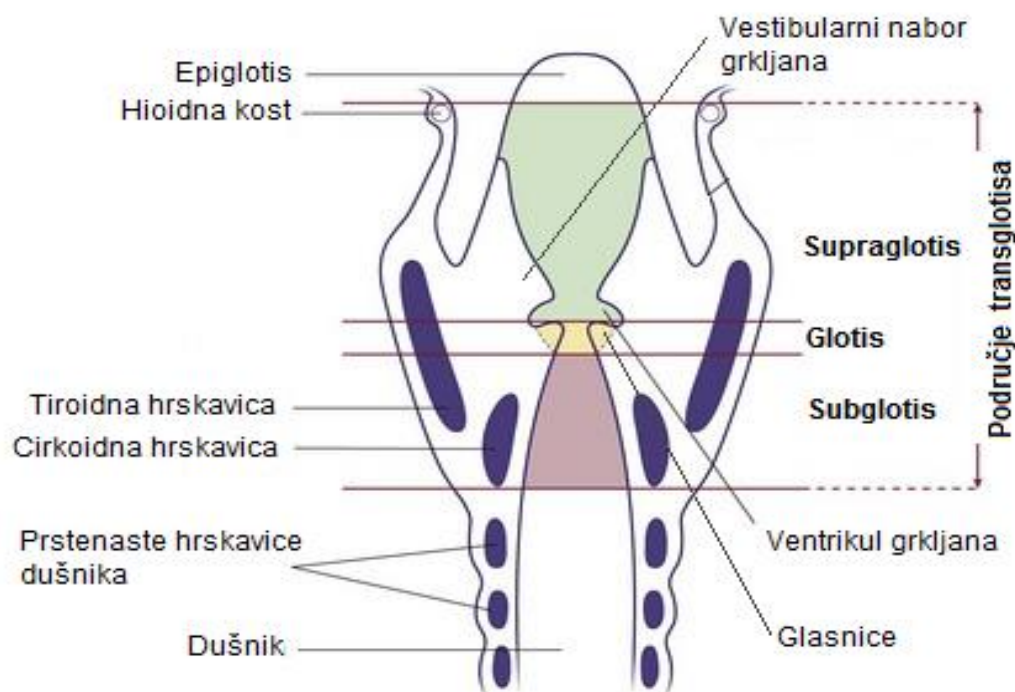
1.2.1. Etiologija

Glavni faktori rizika povezani s razvojem planocelularnog karcinoma grkljana su pušenje i konzumacija alkohola, koji zajedno imaju multiplikativan učinak na razvoj bolesti [13], a njihovo izbjegavanje može spriječiti velik broj slučajeva karcinoma grkljana [14]. Poznato je da duhanski dim sadrži više od 50 različitih kancerogenih komponenti poput poliaromatskih ugljikovodika, nitrozamina, aromatskih amina i aldehida za koje je poznato da uzrokuju neoplastičnu transformaciju stanica sluznice gornjih dišnih puteva [15], dok izlaganje alkoholu povećava permeabilnost stanica sluznice za kancerogene prisutne u duhanskom dimu [16]. Uz to, povećani relativni rizik utjecaja pušenja na razvoj oboljenja povezan je i s anatomskim mjestom pojavljivanja tumora, primjerice relativni rizik utjecaja pušenja na razvoj karcinoma, glotis je povećan 10 puta u odnosu na karcinom supraglotisa [17]. Druge navike pušenja povezane s većom vjerojatnošću razvoja karcinoma grkljana su pušenje u ranijoj dobi, dugotrajno pušenje, duboka inhalacija dima i dr. [18]. Osim toga postoje dokazi koji upućuju da izlaganje poliaromatskim ugljikovodicima, cementnoj prašini, lakovima, parama sumporne kiseline, loše prehrambene navike i dr. također povećavaju vjerojatnost za razvoj bolesti [19-21]. Važno je spomenuti da je i gastroezofagealni refluks povezan s povećanim rizikom u razvoju karcinoma grkljana [22].

1.2.2. Klinička lokalizacija

U svrhu kliničkog stupnjevanja tumora planocelularni se karcinomi grkljana ovisno o lokalizaciji dijele na tumore supraglotisa, glotisa i subglotisa [23, 24]. Postoji dodatna kategorija tumora, tzv. transglotični tumori koji uključuju tumore koji prelaze ventrikul grkljana od područja supraglotisa i uključuje glotis ili se proteže subglotično više od 10 mm ili oboje [24, 25]. Anatomske mjesto pojavljivanja tumora grkljana može utjecati na stupanj prezentacije tumora prilikom dijagnoze; tip simptoma, tretman i dijagnozu. Tako primjerice promjena u kvaliteti glasa, odnosno promuklost je jedan

od najranijih simptoma tumora glotisa, dok su disfagija, odinofagija, hemoptiza, osjet stranog tijela u grlu simptomi supraglotičkih karcinoma [26].



Slika 2. Podjela planocelularnih karcinoma grkljana s obzirom na njihovu anatomska lokalizaciju (Prilagođeno s URL: <http://www.slideshare.net/Satz25/anatomy-of-larynx-39187218>)

1.2.3. TNM stupnjevanje planocelularnog karcinoma grkljana prema UICC i AJCC klasifikaciji

TNM klasifikacija predstavlja internacionalno prihvaćen standard za stupnjevanje tumora prema anatomske sadržaju bolesti i glavna je odrednica odgovarajućega kliničkog tretmana i prognoze. IUCC (engl. *IUCC- Union for International Cancer Control*) i AJCC (engl. *AJCC- The American Joint Committee on Cancer*) TNM klasifikacija je sustav temeljen na anatomske opsegu bolesti koji bilježi veličinu primarnog tumora i zahvaćenost regionalnih limfnih čvoreva te prisustvo ili odsustvo metastaze u udaljenim organima [23].

Svaki pojedinačni aspekt TNM klasifikacije označava se kao kategorija:

- **T** kategorija opisuje veličinu primarnog tumora (tablica 1)
- **N** kategorija opisuje prisustvo metastaze u regionalnim limfnim čvorovima (tablica 2)
- **M** kategorija opisuje prisustvo metastaze u udaljenim organima (tablica 3)

Razvrstavanje tumora prema TNM sustavu pruža potpuni opis stvarne rasprostranjenosti bolesti. Klinički stadiji bolesti se obilježavaju brojevima I, II, III i IV te su rezultat zbroja vrijednosti unutar pojedinačnih kategorija TNM sustava (tablica 4). Tako primjerice tumor T₁, N₀ i M₀ znači da je u I. kliničkom stadiju bolesti.

Tablica 1. T klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

T stupanj (primarni tumor)	Tumori supraglotisa	Tumori glotisa	Tumori subglotisa
TX	primarni tumor ne može se utvrditi		
T0	nema dokaza za postojanje primarnog tumora		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	tumor ograničen na jedno područje supraglotisa / pokretljivost glasnica normalna	tumor je ograničen na prave glasnice (uz normalnu pokretljivost glasnica)	tumor ograničen na područje subglotisa
T1a	-	tumor zahvaća jednu pravu glasnicu	-
T1b	-	tumor zahvaća obje prave	-

		glasnice	
T2	tumor invadira mukozu, više dijelova supraglotisa ili se proširio na regije izvan supraglotisa (glotis, medijalni zid piriformnog sinusa, mukoza osnovice jezika i sl.)	tumor se proširio na područje supra i subglotisa praćeno sa/bez nepokretljivosti pravih glasnica	tumor se proširio na prave glasnice koje su normalno pokretne ili nepokretne
T3	tumor limitiran na područje grkljana s fiksacijom glasnica i/ili invadira sljedeće regije: postcirkoidno područje, preepiglотиčno tkivo, paraglotični prostor		tumor limitiran na područje grkljana s fiksacijom glasnica
T4a	tumor invadira tiroidnu hrskavicu i/ili invadira tkiva izvan grkljana (dušnik, meko tkivo vrata, mišići jezika i dr.)		
T4b	tumor invadira prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili obuhvaća karotidnu arteriju		

Tablica 2. N klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

N stupanj (metastaza u regionalnim limfnim čvorovima)	
NX	ne može se utvrditi prisustvo metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
N0	ne postoji metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	metastaza prisutna u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru promjera manjeg ili jednakog 3 cm
N2a	metastaza prisutna u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru promjera manjeg od 6 cm i većeg od 3 cm
N2b	metastaza prisutna u više ipsilateralnih limfnih čvorova promjera manjeg od 6 cm
N2c	metastaza prisutna u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima promjera manjeg od 6 cm
N3	metastaza prisutna u limfnom čvoru promjera većeg od 6 cm

Tablica 3. M klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

M stupanj (metastaza u udaljenim organima)	
MX	ne može se utvrditi postojanje metastaze u udaljenim organima
M0	ne postoji metastaza u udaljenim organima
M1	postoji metastaza u udaljenim organima

Tablica 4. Kliničko stupnjevanje planocelularnog karcinoma grkljana prema TNM klasifikaciji (kriterij AJCC)

Stupanj 0	Tis	N0	M0
Stupanj I	T1	N0	M0
Stupanj II	T2	N0	M0
Stupanj III	T1, T2, T3	N1, N0, N1	M0
Stupanj IVA	T1,T2, T3, T4a	N2, N0, N1, N2	M0
Stupanj IVB	T4b ili bilo koji T stupanj	N3 ili bilo koji N stupanj	M0
Stupanj IVC	bilo koji T stupanj	bilo koji N stupanj	M1

Tablica 5. Histološko stupnjevanje (gradus) planocelularnog karcinoma grkljana (kriterij AJCC)

Histološki stupanj diferencijacije (gradus tumora - G)	
G(X)	ne može se utvrditi gradus tumora
GI	dobro diferencirani tumori
GII	umjereno diferencirani tumori
GIII	slabo diferencirani tumori

1.2.4. Histopatološko stupnjevanje

Konvencionalni planocelularni karcinom grkljana odlikuje epitelna diferencijacija praćena pojačanom keratinizacijom. Invazija planocelularnih karcinoma obično je praćena stromalnom reakcijom koja se sastoji od dezmozoplazije s depozicijom komponenti izvanstaničnoga matriksa i od proliferirajućih miofibroblasta [27]. Histopatološki planocelularni karcinomi glave i vrata se dijele na dobro, umjereno i slabo diferencirane tumore. Dobro diferencirani planocelularni karcinomi histološki izgledaju kao normalan pločasti epitel i dobro su keratinizirani. Umjereno diferencirane tumore odlikuju abnormalne mitoze i obično su slabije keratinizirani od dobro diferenciranih, dok su slabo diferencirani tumori karakterizirani prisustvom brojnih atipičnih mitozâ i minimumom keratinizacije te se smatraju najagresivnijim tipom tumora [23]. Većina slučajeva planocelularnih karcinoma glave i vrata umjereno su diferencirani tumori [27].

1.2.5. Širenje i metastaziranje

Planocelularni karcinom grkljana se izravno može širiti na obližnje strukture ili se putem limfotoka i krvotoka može proširiti na regionalne limfne čvorove ili udaljena mjesta. Supraglotični oblik karcinoma grkljana ima tendenciju izravnog širenja na preepiglotični prostor, piriformni sinus ili prema bazi jezika, ali u rijetkim se slučajevima širi na područje glotisa i zahvaća hrskavicu štitne žlijezde. Karcinom

glotisa ima tendenciju ostati lokaliziran na području glotisa tijekom dužeg vremenskog perioda, ali se u kasnim stadijima bolest može proširiti na suprotnu pravu glasnicu te supra i subglotis, dok se subglotični karcinom može širiti na štitnu žlijezdu, hipofarinks, vratni dio jednjaka i stijenku dušnika [27, 28].

Planocelularni karcinom grkljana učestalo metastazira u limfne čvorove vrata što se uz ekstrakapsularno širenje metastaze iz limfnog čvora i infiltraciju metastaze u okolno tkivo smatra najgorim prognostičkim faktorom [29, 30]. Uz to, velik problem u kliničkom tretmanu oboljelih predstavlja prisustvo tzv. okultnih metastaza u klinički negativnim (N0) limfnim čvorovima vrata [31, 32]. Metastaziranje u regionalne limfne čvorove povezano je s kliničkom lokalizacijom primarnog tumora [33]. Tako se pojava metastaziranja u regionalne limfne čvorove vrata najčešće javlja kod supra- i subglotičnih tumora jer te dvije regije grkljana imaju dobro razvijen sustav limfnih žila te je primjerice 70 % pacijenata oboljelih od supraglotičkog oblika karcinoma prilikom inicijalne dijagnoze prezentirano s uznapredovalim oblikom bolesti. Suprotno tomu, prilikom inicijalne dijagnoze je 75 % tumora glotisa prezentirano s lokaliziranom bolešću u inicijalnom stupnju jer područje glotisa ima slabo razvijen sustav limfnih žila [34-36].

Duže vrijeme se smatralo da je metastaziranje u udaljene organe putem krvotoka rijetka pojava u planocelularnom karcinomu grkljana i da se javlja svega u 1-2 % slučajeva prilikom inicijalne dijagnoze [37]. Suprotno tomu, novija istraživanja upućuju da se metastaziranje u udaljene organe javlja čak i do 16 % slučajeva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana [36, 38]. Najčešća mjesta metastaziranja u udaljene organe su pluća, zatim jetra i koštana srž [39]. Uz to, jedan od glavnih problema u kliničkom tretmanu planocelularnih karcinoma glave i vrata je učestala pojava tumorskih relapsa unutar iste regije ili blizu mjesta primarnog tumora. Ako se ovakvi relapsi pojave unutar tri godine nakon tretmana i nalaze se na udaljenosti manjoj od 2 cm od mjesta primarnog tumora, tada se nazivaju lokalni relapsi, dok se relapsi koji ne zadovoljavaju ove uvjete nazivaju sekundarni primarni tumori (SPT) [40, 41]. SPT su definirani kao dodatne primarne malignosti koje su jasno odvojene od primarnog tumora i genetski različite od primarnog tumora [42]. Vjerojatnost pojavljivanja sekundarnoga primarnog tumora ovisi o mjestu pojavljivanja primarnog tumora, pa je veća vjerojatnost razvoja SPT kod supraglotičkog nego kod glotičkog oblika tumora grkljana [43]. Isto tako vjerojatnost

razvoja sekundarnog oboljenja korelira s etiološkim faktorima, odnosno pušenjem i konzumacijom alkohola te je udvostručena u odnosu na oboljele bez utjecaja faktora rizika [27, 43]. Kod tumora glotisa se sekundarno oboljenje najčešće javlja u plućima, dok kod tumora supraglotisa duž aerodigestivnog trakta [44]

1.2.6. Klinički tretman, prognoza i prediktivni faktori

Preko 95 % planocelularnih karcinoma grkljana može se tretirati standardnim tretmanima koji uključuju operaciju, radioterapiju, kemoterapiju ili kombiniranu terapiju [45, 46]. Opće je prihvaćeno da se karcinom grkljana ranih stadija tretira putem unimodalne terapije (radioterapija ili operacija) s petogodišnjom kontrolom od 85 - 95 %. U slučaju uznapredovale bolesti (klinički stupanj III i IV) visokog stupnja obično se koristi multimodalna terapija temeljena na radioterapiji i operaciji, kemoterapiji ili kombiniranoj kemoradioterapiji [47, 48]. Standardni tretman za planocelularne karcinome glave i vrata je operacija, ali je često ograničena anatomskim sadržajem tumora i željom da se sačuva funkcionalan organ [49, 50]. Upotreba modernih kirurških tehnika poput mikrokirurškog tretmana endoskopskim laserom je značajno poboljšalo funkcionalan ishod operacije u odnosu na otvorene kirurške postupke [51]. Radioterapija je integralni dio primarnoga ili adjuvantnog tretmana karcinoma grkljana te se tipično aplicira u dnevnim dozama zračenja od 2 x 30 Gy, 5 dana u tjednu do ukupne doze od 70 Gy u 7 tjedana [52]. Isto tako radi boljeg učinka radioterapije je razvijen i režim frakcionirane radioterapije koji uključuje tretman s više frakcija zračenja dnevno poput hiperfrakcionirajuće [53] i akcelerirane frakcionirajuće terapije [54]. Kemoterapija je postala glavni tretman liječenja uznapredovalih slučajeva oboljenja poput neoperabilnih pacijenata oboljelih od metastatskog oboljenja i tumorskih relapsa [55, 56]. Od kemoterapeutika se koriste različite skupine agenasa kao komponente platine, taksani i dr. za koje se pokazalo da pojedinačno, ali i u kombinaciji djeluju protiv bolesti [57, 58].

Uz to je u svrhu kontrole lokalno uznapredovale bolesti razvijena i kemoradioterapija, a nekoliko kliničkih ispitivanja je pokazalo da primjena kombinirane kemo- i radioterapije, primjerice tretman sa cisplatinom i radioterapijom poboljšava lokoregionalnu kontrolu bolesti i izgleda za preživljenje oboljelih [59].

U novije vrijeme su se počele razvijati ciljane terapije temeljene na molekularnoj osnovi planocelularnog karcinoma grkljana, odnosno upotrebi ciljanih lijekova. Prvi takav odobreni lijek je cetuximab, monoklono protutijelo usmjereno protiv epidermalnog receptora za faktore rasta čija je pojačana ekspresija zabilježena u više od 80 % slučajeva planocelularnih karcinoma glave i vrata [60]. Ovaj se lijek veže na receptor i sprečava njegovu aktivaciju tako da blokira vezanje liganda na receptor. Povećani doprinos preživljenju oboljelih i trajanje lokoregionalne kontrole zabilježeno je u kliničkoj studiji kod pacijenata oboljelih od uznapredovale bolesti, koji su liječeni kombiniranom radioterapijom (RT) i cetuximabom u odnosu na pacijente liječene samo RT-om [61], ali i tretman pojedinačnom ili kombiniranom kemoterapijom i cetuximabom pokazuje visoku efikasnost u liječenju pacijenata oboljelih od metastatske bolesti i tumorskih relapsa [62].

Unatoč agresivnim i multidisciplinarnim pristupima liječenja, koji uključuju pre- ili postoperativnu kemo- ili radioterapiju, posljednjih se nekoliko desetljeća petogodišnja stopa preživljenja pacijenata nije mijenjala, a petogodišnja stopa preživljenja oboljelih nakon tretmana iznosi 85 % za tumore glotisa, 60 – 70 % za tumore supraglotisa i 40 % za tumore subglotisa [63].

Razlog tomu je što velik broj oboljelih (gotovo trećina pacijenata) prilikom inicijalne dijagnoze ima uznapredovali oblik bolesti s metastazama u limfnim čvorovima i zbog pojave lokoregionalnoga sekundarnog tumora te metastaza u drugim organima [64]. Osim toga, kao najznačajniji je klinički prediktivni faktor preživljenja oboljelih i dalje ostala TNM klasifikacija tumora koja korelira s anatomskom lokalizacijom tumora [65].

1.3. Molekularna osnova metastaziranja

Planocelularni karcinom glave i vrata je na molekularnoj razini kompleksna i heterogena bolest povezana s genetskim abnormalnostima u onkogenima te tumor supresor genima i gubitkom heterozigotnosti na brojnim kromosomalnim lokacijama [66, 67]. Danas je opće prihvaćeno da planocelularni karcinomi glave i vrata slijede stupnjeviti model kancerogeneze u kojem metastaziranje predstavlja posljednji korak ovog modela, odnosno stjecanje invazivnog fenotipa i završetak onkogene faze kancerogeneze [68, 69]. Prema ovome modelu se planocelularni karcinomi glave i

vrata razvijaju iz tzv. prekanceroznih polja (histološki se obično odnose na displaziju) iz zajedničke premaligne stanice povezane s rastom klonalnih populacija koje sadrže kumulativne genetičke alternacije. Prvi koraci ovog modela odnose se na inicijaciju tumora i uključuju kumulativne genetske te epigenetske alternacije (uključuju inaktivaciju tumor supresor gena i aktivaciju onkogenâ putem delecija, točkastih mutacija, metilaciju promotor regije, gubitak heterozigotnosti i sl.) u prekanceroznim staničnim poljima što uzrokuje razvoj invazivnoga staničnog fenotipa [70, 71]. Najraniji genetski događaj u procesu kancerogeneze planocelularnih karcinoma glave i vrata gubitak je heterozigotnosti na kromosomalnoj regiji 9p21 i pronađen je u 70 - 80 % slučajeva displazije planocelularnih karcinoma glave i vrata [72]. Na ovoj se regiji nalaze genski lokusi za tumor supresor gene p14 i p16 čiji proteinski produkti blokiraju ciklin ovisne kinaze 4 i 6 odgovorne za inhibiciju retinoblastoma proteina putem hiperfosforilacije [73] što je važno za normalnu regulaciju staničnog ciklusa [74]. Osim toga, p14 arf i p16 su odgovorni i za proteosomalnu degradaciju p53 proteina posredovanu MDM2 proteinom [75]. Druge važne genetske alternacije koje induciraju invazivni fenotip tumora uključuju gubitak heterozigotnosti i točkaste inaktivirajuće mutacije 17p13 kromosomalne regije [76] i amplifikaciju regije 11q3 [77] što odgovara promjenama u ekspresiji dva važna proteinska transkripta proteina p53 i ciklina D1 uključena u patogenezu tumora [78, 79]. Uz to, alternacije na kromosomalnim regijama 11q, 4q i na kromosomu 8 tipična su pojava za invazivan oblik planocelularnih karcinoma glave i vrata [80].

Planocelularni karcinomi glave i vrata primarno metastaziraju u limfne čvorove vrata što se smatra vrlo lošim prognostičkim faktorom u smislu ishoda liječenja oboljelih. Metastaziranje planocelularnih karcinoma glave i vrata predstavlja posljednji korak u procesu kancerogeneze i uključuje promjene u razini ekspresije mnogih molekula i deregulaciju staničnih signalnih puteva koji su povezani s akvizicijom invazivnog fenotipa stanica raka, degradacijom ekstracelularnog matriksa i procesima angio- i limfoangiogeneze [81, 82].

Jedan od prvih koraka koji se odvija prilikom metastaziranja planocelularnih karcinoma je gubitak stabilnoga epitelnog integriteta. Ovaj se proces naziva epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) i inače je dio normalnoga embrionalnog razvoja i procesa zacjeljivanja [83]. Ovaj se proces odnosi na gubitak epitelnih staničnih

osobina i poprimanje osobina mezenhimalnih stanica što uključuje preraspodjelu citoskeletnih te proteina ekstracelularnog matriksa, modulacije aktivnosti adhezijskih molekula što stanicama raka daje povećanu migratornu sposobnost [84, 85]. Normalni epitel karakteriziraju stabilni međustanični kontakti i postojanje međustaničnih spojnica (engl. *Adherens junctions*), struktura koje međusobno povezuju epitelne stanice [86]. Međustanične spojnice su većinom sastavljene od kalcij ovisnoga membranskog proteina E-kadherina koji sa svojim ekstracelularnim domenama potiče homofilne interakcije između epitelnih stanica i doprinosi staničnoj adheziji. Osim međusobnog povezivanja epitelne stanice E-kadherin je vezan na stanični citoskelet putem proteina β -katenina [87]. Snižena razina ekspresije E-kadherina u planocelularnih karcinoma glave i vrata uzrokuje translokaciju β -katenina u jezgru koji uzrokuje transkripciju gena uključenih u proces epitelno-mezenhimalne tranzicije tj. Twist, Slug i Snail transkripcijskih faktora [88]. Uz to, snižena razina ekspresije E-kadherina, povećana razina N-kadherina (engl. *Cadherin switching*) [89, 90] i povećana razina Twist [91], Slug [92] i Snail [93] EMT transkripcijskih faktora korelira s neoplastičnom transformacijom, a posljedično i metastaziranjem u limfne čvorove vrata planocelularnih karcinoma glave i vrata [94, 95].

Postoje i druge adhezijske molekule koje doprinose EMT-u kod planocelularnih karcinoma glave i vrata poput integrina i CD44 porodice proteina [96]. Integrini su heterodimerni adhezijski receptori sastavljeni od α i β podjedinice (kod ljudi postoji 18α i 8β podjedinica) koje se različito kombiniraju [97]. Vezanje integrina za komponente ekstracelularnog matriksa kao fibronektin, laminin i kolagen uzrokuje aktivaciju niza nizvodnih staničnih signala kao MAPK (engl. *MAPK - Mitogen-activated protein kinase pathway*) i PI3K (engl. *PI3K- Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase pathway*) signalnih puteva odgovornih za kontrolu staničnog polariteta i pojačanu sekreciju proteolitičkih enzima, pokretljivost i staničnu proliferaciju [96, 98]. Isto tako povećana razina ekspresije $\alpha\beta1$ kod planocelularnog karcinoma grkljana korelira s pojačanom invazijom, ali i s rezistencijom na kemoterapiju [99]). Uz to je utvrđeno da povećana razina ekspresije $\beta1$ integrina korelira s metastaziranjem u limfne čvorove pacijenata oboljelih od planocelularnih karcinoma glave i vrata [100]. Porodica proteina CD44 obuhvaća stanične adhezijske molekule koje se vežu na hijaluron kao ligand i uključene su u staničnu adheziju,

međustaničnu komunikaciju, migraciju i interakciju s receptor tirozinskim kinazama [101]. Pojačana razina ekspresije CD44 zabilježena je kod pacijenata oboljelih od supraglotičnog oblika karcinoma grkljana i korelira s metastaziranjem u limfne čvorove [102], dok je povećana razina CD44 varijante V3 povezana s metastaziranjem u limfne čvorove, a V10 u udaljene organe u pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana [103].

Promjena u ekspresiji staničnih adhezijskih molekula kao posljedica procesa epitelno- mezenhimalne tranzicije popraćena je i disregulacijom citoskeletnih proteina poput vimentina, F-aktina, kortaktina i fascina koji doprinose migraciji tumorskih stanica te stvaranju staničnih struktura invadipodija bitnih za proces tumorske invazije [81]. To potvrđuje i ustanovljena povećana razina ekspresije fascina [104] i kortaktina [105] kod pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana koja korelira s lošom prognozom i invazijom oboljelih.

Osim prethodno navedenog na migraciju stanica planocelularnog karcinoma utječe i povećana aktivnost tirozinkinaznih staničnih receptora za faktore rasta poput receptora za epidermalne i hepatocitne faktore rasta (engl. *EGFR – Epidermal growth factor receptor* i *HGFR- Hepatocyte growth factor receptor*) koja je povezana s disocijacijom slojeva epitela, pojačanom proliferacijom i aktivacijom staničnih signalnih puteva uključenih u invaziju tumora [106]. Kod planocelularnih karcinoma glave i vrata EGFR receptor je konstitutivno aktiviran putem autokrine stimulacije s endogenim ligandima poput transformirajućeg faktora rasta alfa (engl. *TGF α - Transforming growth factor α*) i dr. te je njegova povećana ekspresija zabilježena u više od 90 % slučajeva planocelularnih karcinoma glave i vrata [107-109]. Pojačana aktivacija receptora posljedično stimulira velik broj nizvodnih staničnih signalnih puteva kao MAPK, STAT (engl. *STAT- Signal transducer and activator of transcription pathway*) i PI3K signalni put koji naposljetku doprinose malignom rastu i metastatskom potencijalu [107].

Nedavna istraživanja su pokazala da je ekspresija još jedne receptor tirozinkinaze tj. neurotropinskog receptora B (engl. *TrkB- Tropomyosin receptor kinase B*) i njenog liganda povećana kod pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata te je na staničnim modelima utvrđeno da TrkB i njegov ligand BDNF (engl.

BDNF- Brain-derived neurotrophic factor) doprinosi pojačanoj migraciji i procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije tumorskih staničnih linija planocelularnog karcinoma glave i vrata [110]. Osim toga je utvrđeno da povećana razina ekspresije Trk B receptora doprinosi patogenezi bolesti kod pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata [111]. Isto tako je pronađeno nekoliko transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju gena uključenih u metastaziranje u limfne čvorove i proces EMT-a kod planocelularnih karcinoma glave i vrata poput Nf kapa B [112], hipoksija inducibilnog faktora 1 alfa [113] te transformirajućeg faktora rasta beta 1 [114] koji reguliraju ekspresiju epitelno mezenhimalnih transkripcijskih faktora poput Slug, Snail i Twist transkripcijskih faktora [115].

Proces invazije karcinoma glave i vrata je popraćen proteolizom komponenti ekstracelularnog matriksa te bazalne membrane u što su uključeni proteolitički enzimi, odnosno matriksmetaloproteinaze (engl. *MMP- Matrix metalloproteinases*) i katepsini [96, 116]. U planocelularnom karcinoma grkljana pronađena je povećana razina MMP 9 [117] i 14 [118] te endopeptidaze katepsina D [119] koji su odgovorni za razgradnju strukturalnih molekula ekstracelularnog matriksa, ali i aktivaciju inaktivnih sekretiranih oblika metaloproteinaza.

Neoangiogeneza ili stvaranje novih krvnih žila je važan proces u biologiji tumora jer omogućava dotok nutrijenata i kisika rastućem tumoru, ali i stvara nove puteve za metastatsku diseminaciju [120]. Ovaj je proces kod planocelularnog karcinoma induciran lučenjem citokina, primjerice endotelnog faktora rasta (engl. *VEGF – Vascular endothelial growth factor*) i pojačanom razinom ekspresije njihovih receptora [121] te enzima uključenih u sintezu prostaglandina poput ciklooksigenaze 2 [122] što uzrokuje proliferaciju stanica endotela krvnih žila. S neovaskularizacijom planocelularnih karcinoma glave i vrata povezana je i hipoksija u tumorskom mikrookolišu [123].

Planocelularni karcinomi glave i vrata učestalo iskorištavaju signale iz tumorskog mikrookoliša koji potječu od susjednih stanica i komponenti ekstracelularnog matriksa da bi promovirali svoj rast, razvoj i invaziju. Poznato je da miofibroblasti, endotelne stanice i stanice imunskog sustava iz tumorskog mikrookoliša potiču proces tumorske invazije pomoću sekrecije transkripcijskih faktora poput transformirajućeg

faktora rasta beta1 (engl. *TGF- β 1 -Transforming growth factor beta*), faktora rasta (primjerice epidermalnoga i hepatocitnog faktora rasta) te enzima poput matriksmetaloproteinaza [124, 125]. Osim toga, planocelularni karcinomi glave i vrata iskorištavaju kemokine mehanizme (sustav CXCR4 i CCR7 kemoatraktivnih receptora i njihovih liganada) imunosnih stanica domaćina što pospješuje migraciju tumorskih stanica u limfne čvorove vrata [126].

Uz prethodno navedeno treba spomenuti i doprinos komponenata ekstracelularnog matriksa poput kolagena, laminina, ali i malih proteoglikana ekstracelularnog matriksa procesima tumorigeneze i metastaziranja kod planocelularnih karcinoma glave i vrata [85]. Tako je primjerice utvrđeno da povećana ekspresija kolagena 4, laminina 5, fibronektina i proteoglikana ekstracelularnog matriksa poput dekorina i versikana korelira s progresijom i invazijom tumora [85, 127]. Isto tako proteoliza agrekana, tj. najvažnijeg proteoglikana hrskavičnog tkiva grkljana smatra se važnim događajem za proces invazije planocelularnog karcinoma grkljana [127].

1.4. Proteomika karcinoma grkljana

Novi trend u istraživanju bolesti predstavlja upotreba osjetljivih analitičkih visokopropusnih metoda kojima je moguće analizirati cjelokupni sadržaj proteina u nekoj stanici, tkivu ili tjelesnoj tekućini s ciljem određivanja razine njihove ekspresije, poslijetranslacijskih modifikacija i izoformi. Te su metode poznate pod nazivom proteomske metode.

Proteomika je znanstvena disciplina koja se bavi sustavnom analizom ekspresije velikog broja proteina stanice ili organizma u određenom trenutku, odnosno proučavanjem proteoma [128]. Stanice odgovaraju na promjene u vanjskom okolišu tako da reguliraju razinu aktivnosti staničnih proteina što uzrokuje promjene u staničnom proteomu. Grana proteomike, koja se bavi proučavanjem diferencijalnih kvalitativnih i kvantitativnih ekspresijskih proteinskih profila stanica, tkiva ili tjelesnih tekućina na razini proteoma ili subproteoma (primjerice nastalih zbog patogenih procesa u organizmu), naziva se ekspresijska ili kvantitativna proteomika [129].

Tradicionalno ekspresijski proteomski pristupi koriste semikvantitativne dvodimenzionalne ili diferencijalne gel elektroforetske separacijske tehnike odvajanja proteina praćene identifikacijom diferencijalno eksprimiranih proteina pomoću spektrometrije masa [130, 131]. U novije vrijeme zbog ubrzanog razvoja kombiniranih analitičkih tehnika masene spektrometrije spregnute tekućinskom kromatografijom (engl. *LC-MS - Liquid chromatography – mass spectrometry*) sve se više koriste tzv. *direktne odozdo prema gore* (engl. *Bottom up*) proteomske metode koje se odnose na izravnu identifikaciju proteinskih proteolitičkih fragmenata nastalih enzimatskim cijepanjem ukupnih izoliranih proteina iz bioloških uzoraka praćenu relativnim kvantitativnim metodama pomoću spektrometrije masa [132].

Prethodno se navedene metode dijele na metode putem obilježavanja sa stabilnim izotopima i bez označavanja sa stabilnim izotopima. Stabilni izotopi se u svrhu kvantitativne proteomske analize mogu ugraditi u proteine (peptide) metaboličkim putem ili pomoću enzimatskih i kemijskih reakcija [133]. Što se tiče metoda bez obilježavanja sa stabilnim izotopima dijelimo ih na tzv. *peak intensity* i *spectral count* metode. U slučaju metoda putem obilježavanja sa stabilnim izotopima i *peak intensity* metoda bez obilježavanja integrirano mjerenje intenziteta kromatografskog signala služi kao mjera relativne kvantitativne obrade podataka, dok se u slučaju *spectral count* metoda bez označavanja kao mjera relativne kvantifikacije koristi broj fragmentnih spektara triptičkih peptidnih fragmenata. Kod svih prethodno navedenih metoda relativna kvantitativna obrada podataka i identifikacija proteina zahtijeva visoko specijalizirane računalne programe i statističke algoritme [134]. Odabir pristupa u ovoj doktorskoj disertaciji temelji se na protokolu tekućinske kromatografije (engl. *LC- Liquid chromatography – mass spectrometry*) spregnute kvantitativnim metodama spektrometrije masa za proteomsko profiliranje *odozdo prema gore* bez obilježavanja sa stabilnim izotopima koje se odnose na izravnu identifikaciju proteinskih proteolitičkih fragmenata nastalih enzimatskim cijepanjem ukupnih izoliranih proteina iz bioloških uzoraka [135].

Postoji niz publikacija iz područja proteomike koje se odnose na razne tipove planocelularnih karcinoma glave i vrata [64], no mali se broj istraživanja odnosi na proteomsko profiliranje karcinoma grkljana. Studije temeljene na identifikaciji diferencijalno eksprimiranih proteina planocelularnih karcinoma glave i vrata općenito

su ukazale na neke nove tumorske biljege, primjerice aneksin V [136] i protein RACK1 [137] te nekoliko novih meta za lijekove uključujući receptorsku tirozin-kinazu EPHA2 i receptor za epidermalni faktor rasta [138]. Isto tako su pokazale da bi specifični profili ekspresije proteina mogli biti korisni u predviđanju kliničkog ishoda i procjeni rizika od planocelularnih karcinoma glave i vrata [139].

Nadalje, novije studije poput istraživanja Zha i sur. [140] te Li i sur. [141] koriste direktan proteomski tzv. pristup *odozdo prema gore* u svrhu identifikacije i relativne kvantifikacije diferencijalno eksprimiranih proteina izoliranih iz uzoraka tumorskog tkiva i okolnog tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata oboljelih od karcinoma grkljana. Prva se studija temelji na kvantitativnoj metodi obilježavanja iTRAQ (engl. *Isobaric tags for relative and absolute quantification*). U njoj su autori identificirali 100 diferencijalno eksprimiranih proteina u tumoru i kao potencijalne kandidate za imunodetekcijsku validaciju odabrali su pet proteina od kojih su na staničnom modelu dokazali i ulogu S100A2 kalcij vezujućeg proteina u staničnoj migraciji. Za razliku od prethodno navedenog istraživanja studija Li i sur. koristi postupak masene spektrometrije spregnute dvodimenzionalnom kromatografijom kao relativnu kvantitativnu metodu bez označavanja u svrhu određivanja globalnoga proteomskog profila proteina izoliranih iz uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od karcinoma grkljana. Četiri odabrana proteinska kandidata (nukleolin, profilin 1, osteoglicin i citosolna nespecifična dipeptidaza značajna za patogenezu bolesti) potvrđena su imunodetekcijskim metodama, a na staničnom su modelu pokazali da inhibicija ekspresije profilina 1 smanjuje migratornu sposobnost stanica raka grkljana u *in vitro* uvjetima.

Dosadašnja ciljana proteomska istraživanja pokazala su kako postoje i neki promijenjeni glikoproteini u serumu i tkivima oboljelih od planocelularnih karcinoma glave i vrata, primjerice α 1 kiselog glikoproteina [142], galektina 3 [143], CA-50, CA 19-9, CEA [144], MUC1 i MUC2 glikoproteina [145]. Prema dosadašnjim spoznajama nisu opisani proteinski/glikoproteinski proteini u kontekstu metastaziranja u tkivima oboljelih od metastatskog karcinoma grkljana što zasigurno otvara novo poglavlje u istraživanju ove bolesti.

1.5. Uloga polisijalizacije adhezijske molekule neuralnih stanica u procesu kancerogeneze

Adhezijska molekula neuralnih stanica (engl. *NCAM ili CD 56 – neural cell adhesion molecule*) je prva molekula u kralježnjaka identificirana i karakterizirana kao stanična adhezijska molekula. NCAM je glikoprotein prisutan na površini neuralnih stanica i pripada u imunoglobulinsku (IG) nadporodicu glikoproteina [145] te osim adhezijske uloge putem homofilnih i heterofilnih NCAM interakcija i vezanih signalnih staničnih kaskada [146, 147], sudjeluje u rastu i regeneraciji živčanih stanica, aksonalnoj migraciji i dr. [148]. Isto tako NCAM je eksprimiran na mnogim drugim stanicama u organizmu uključujući epitelne stanice raznih organa, mišićne stanice, beta stanice gušterače i imunosne stanice [149, 150]. Adhezijska molekula neuralnih stanica postoji u nekoliko izoformi kao rezultat alternativnog cijepanja NCAM1 gena lociranog na kromosomu 11 u ljudi [151]. Kod ljudi NCAM postoji u obliku tri glavne membranske izoforme poznate kao NCAM-180, 140 i 120 [152] nazvanih prema molekularnoj veličini pojedinih izoformi. Ekstracelularna domena ovih izoformi sastoji se od 5 domena sličnih imunoglobulinu i dva fibronektinska modula tipa III koja imaju različitu ulogu na biološku funkciju molekule [147]. NCAM je jedan od svega nekoliko proteina kralježnjaka za koji je poznato da je glikoziliran s polisijalinskom kiselinom (engl. *PSA -polysialic acid*) [153]. Polisijalinska kiselina je linearan homopolimer sastavljen od negativnih ostataka sijalinske kiseline vezanih α 2-8 vezom [154] sintetiziran putem dvaju visoko specifičnih enzima iz porodice sijalotransferaza, točnije polisijalotransferaze II (ST8Sia II) i IV (ST8Sia IV) čija je ekspresija prostorno i vremenski regulirana [155].

Polisijalizirani oblik adhezijske molekule većinom je eksprimiran tijekom embrionalnog razvoja kad uz pomoć kontrole migracije i diferencijacije živčanih stanica ima važnu ulogu u razvoju živčanog sustava [156]. Suprotno tomu, ekspresija PSA-NCAM (engl. *Polysialylated neural cell adhesion molecule*) izostaje u većini tkiva odraslih [157] i ograničena je na regije živčanog sustava visokog stupnja sinaptičke plastičnosti poput hipokampusa i olfaktornog reznja [158]. Reekspresija polisijaliziranog oblika NCAM u odraslih je zabilježena tijekom procesa zacjeljivanja organa poput jetre [159], ali i u mnogim malignim oboljenjima poput neuroblastoma, Wilmsovog tumora, karcinoma velikih i malih plućnih stanica i dr. [160]. U kontekstu

nastanka i razvoja tumora, PSA-NCAM se smatra onkofetalnim antigenom čija se ekspresija povezuje s metaplastičnom transformacijom, progresijom i metastaziranjem visoko malignih oboljenja [161]. Osim generalnoga antiadhezivnog efekta uzrokovanog polianionskom prirodom polisijalinske kiseline [162] polisijalizacija NCAM može doprinijeti procesu kancerogeneze putem negativne modulacije homofilnih i heterofilnih NCAM interakcija te vezanih staničnih signalnih kaskada uključenih u procese poput stanične migracije, diferencijacije i proliferacije [163].

Budući da je povećana ekspresija adhezijske molekule neuralnih stanica zabilježena kod planocelularnih i adenokarcinoma glave i vrata, u ovomu doktorskom radu će se uz pomoć imunohistokemije ispitati ekspresija polisijaliziranog oblika NCAM u sekcijama tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od metastatskog i nemetastatskog oblika planocelularnog karcinoma grkljana te utjecaj njene ekspresije na progresiju i metastaziranje tumora. Isto tako, na ukupinim proteinskim lizatima tumorskih i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od metastatskog i nemetastatskog oboljenja pomoću imunodetekcijske metode će se istražiti utjecaj PSA-NCAM na stanične nizvodne signalne kaskade uključene u diferencijaciju i migraciju stanica te imunološki odgovor.

2. Ciljevi istraživanja

S obzirom kako je kancerogeneza složen proces tijekom kojeg dolazi do narušavanja molekularne homeostaze organa, glavna hipoteza ovog istraživanja polazi od toga da će se te promjene očitovati u razlikama u ekspresiji proteina tumorskog tkiva i tkiva nezahvaćenog tumorom u pacijenata oboljelih od metastatskog oblika tumora. Kako se metastaziranje u limfne čvorove vrata odvija ubrzano i rano tijekom progresije planocelularnog karcinoma grkljana, cilj je ovog istraživanja uz pomoć globalnoga proteomskog profiliranja utvrditi potencijalne proteinske biljege, s osobitim naglaskom na glikoproteinske biljege i komponente izvanstaničnog matriksa kao i s njima povezane biološke procese potencijalnoga dijagnostičkog karaktera čime se želi pridonijeti boljem razumijevanju molekularne prirode metastaziranja ovog tipa karcinoma. Uz to, brojni dokazi upućuju da je polisijalizacija adhezijske molekule neuralnih stanica uključena u proces metastaziranja brojnih malignih oboljenja, pa je uz proteomsko profiliranje tkiva metastatskog karcinoma grkljana sljedeći cilj ovog istraživanja pomoću imunohistokemije utvrditi status polisijalizacije adhezijske molekule neuralnih stanica kod uzoraka sekција tumorskih tkiva pacijenata i njen doprinos procesu kancerogeneze planocelularnog karcinoma grkljana kroz modulaciju staničnih signalnih puteva važnih za održanje normalne homeostaze organa.

3. Materijali i metode

3.1. Prikupljanje uzoraka tkiva pacijenata

3.1.1. Prikupljanje uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana u svrhu proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa

Uzorci tkiva pacijenata s tumorom u ovom istraživanju su (a) tumorom zahvaćena tkiva i (b) pripadajuća, okolna histološki neizmijenjena tkiva prikupljena tijekom kirurške resekcije sedam pacijenata oboljelih od metastatskog karcinoma (primarnih tumora s metastazama u limfnim čvorovima vrata) u okviru suradnje s Klinikom za bolesti uha, nosa i grla te kirurgije glave i vrata Kliničkoga bolničkog centra Zagreb uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i informiranog pristanka svakog pacijenta koji sudjeluje u istraživanju. Tijekom operacije pacijenata uzet je dio tumorskog tkiva odabranog iz središta tumorske lezije i okolnog tkiva na udaljenosti od tumora većoj od 1 cm kod svakog pacijenta zasebno. Svi su uzorci trenutno pohranjeni u tekućem dušiku i analizirani od strane iskusnog kirurga i patologa. Osim uzoraka tkiva sedam pacijenata oboljelih od metastatske bolesti prikupljeni su i uzorci tumorom zahvaćenog te nezahvaćenog tkiva pacijenata oboljelih od tumora koji nisu metastazirali, a koji su služili kao kontrolna skupina prilikom validacije odabranih proteinskih meta koje doprinose procesu metastaziranja.

3.1.2. Prikupljanje uzoraka tumorskih tkiva pacijenata u svrhu utvrđivanja ekspresije PSA-NCAM metodom imunohistokemije

Uzorci tkiva pacijenata oboljelih od metastatske (ukupno 13 pacijenata) i nemetastatske (ukupno 17 pacijenata) bolesti u svrhu imunohistokemijske analize ekspresije polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica prikupljeni su tijekom operacije pacijenata u razdoblju od siječnja 2012. do siječnja 2014. na Klinici za bolesti uha, nosa i grla te kirurgije glave i vrata Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Uzorci tkiva su nakon kirurške resekcije fiksirani u 10 % otopini formaldehida

i pohranjeni u parafinske blokove. Tijekom zadnje faze prikupljanja uzoraka za imunohistokemijsku analizu iz iste skupine pacijenata prikupljeni su i uzorci za prethodno navedenu proteomsku analizu putem spektrometrije masa. Glavne kliničko-patološke osobine pacijenata uključenih u studiju prikazane su u tablici 6 i uključuju demografske osobine (dob i spol), patološko TNM stupnjevanje prema kriterijima AJCC [23] i stupanj histološke diferencijacije tumora označen kao slabo diferencirani tumori (gradus III, GIII), umjereno diferencirani tumori (GII-histološki gradus II) i dobro diferencirani tumori (GIII-histološki gradus III)

Tablica 6. Kliničke i patološke osobine pacijenata

Kliničke i patološke osobine	Broj nemetastatskih tumorskih uzoraka	Broj metastatskih tumorskih uzoraka
Spol		
Muški	16	13
Ženski	2	0
Dob (godine)		
<64 (medijan)	10	6
»64	8	7
T-stupanj		
T1	1	1
T2	6	5
T3	6	6
T4a	5	1

N-stupanj		
N0	18	0
N1	0	3
N2b	0	7
N2c	0	3
Histološki stupanj diferencijacije (gradus tumora)		
GI	4	3
GII	10	2
GIII	4	8

3.2. Proteomsko profiliranje metastatskog karcinoma grkljana uz pomoć spektrometrije masa spregnute tekućinskom kromatografijom (LC-MS)

Spektrometrija masa je analitička metoda visoke osjetljivosti koja mjeri omjer mase i naboja (m/z) molekula u svrhu detekcije, identifikacije i kvantifikacije molekula u jednostavnim i kompleksnim smjesama. Spektrometrija masa je postala važan alat u širokom rasponu znanstvenih disciplina uključujući i proteomiku. U zadnjih nekoliko desetljeća razvoj visokoprotodne i kvantitativne tehnologije spektrometrije masa je proširio uvid u strukturu, funkciju, posttranslacijske modifikacije i globalnu dinamiku proteina [164].

Spektrometri masa sastoje se od tri osnovna dijela ionskog izvora, analizatora masa i detektora. Ionski izvor (engl. *Ion source*) dio je spektrometra masa koji služi za stvaranje iona molekula analita. Dvije najčešće korištene tehnike ionizacije bioloških makromolekula su elektrosprej ionizacija (engl. *ESI-electrospray ionisation*) [165] i matriksom potpomognuta laser desorpcija/ionizacija (engl. *MALDI- matrix-assisted*

laser desorption/ionization) [166]. Nakon izvršene ionizacije molekule analita se zatim putem električnoga ili magnetskog polja usmjeravaju u analizator masa poput kvadropolnog analizatora (engl. *Quadrupole*), TOF- analizatora (engl. *TOF- Time of flight*) i ionske stupice (engl. *Ion trap*) koji odvajaju ione prema njihovim m/z vrijednostima. Svaki od navedenih analizatora ima specifične osobine i može se koristiti u svrhu odvajanja svih analita u uzorku radi globalnog profiliranja ili se može koristiti za filtriranje iona specifičnih m/z vrijednosti. Nakon razdvajanja iona u analizatoru masa ioni dolaze do ionskog detektora. Svaki puta kada ion dotakne detektorsku pločicu dolazi do emisije elektrona koju bilježi detektor [167]. Maseni spektrometri su povezani s računalima koja su opremljena specijaliziranim računalnim programima za analizu podataka iz detektora i organizaciju signala iona nastalih u detektoru u grafove m/z vrijednosti te relativnog izobilja iona. U slučaju proteina nastali signali peptidnih iona se zatim mogu procesuirati putem specijaliziranih baza podataka u svrhu predviđanja identiteta molekule na temelju usporedbe njene m/z vrijednosti s poznatim m/z vrijednostima peptida u bazi podataka (tzv. metoda otiska prsta ili engl. *peptide mass fingerprint*) [168]. Uz prethodno navedeno još detaljniji uvid u strukturu biomolekula i njihovu pouzdaniju identifikaciju omogućuje tandemski spektrometrija masa (engl. *MS/MS*) [169]. Tandemski spektrometri masa koriste kombinaciju dva ili više jednaka ili različita analizatora masa što omogućuje odabir iona specifičnih m/z vrijednosti u prvom analizatoru, njihovu dodatnu fragmentaciju putem različitih pristupa, primjerice procesom kolizije s molekulama inertnog plina tzv. kolizijom inducirana disocijacija (engl. *CID-collision-induced dissociation*), odvajanje novonastalih fragmentnih peptidnih iona u drugom analizatoru na temelju njihove m/z vrijednosti i njihovu detekciju [169]. Nastali signali fragmentiranih iona se zatim uspoređuju s teoretskim sekvencama proteina u bazama podataka poput X!Tandem, SEQUEST (fields.scripps.edu/sequest/) i Swiss-Prot (www.uniprot.org) u svrhu pouzdanije identifikacije proteina [170].

Kako su biološki uzorci učestalo kompleksne mješavine, koje pokazuju velik dinamički raspon u koncentraciji molekula smjese, razvijene su metode masene spektrometrije spregnute tekućinskom kromatografijom (engl. *LC-MS* i *LC MS/MS - Liquid chromatography mass spectrometry / tandem mass spectrometry*) u svrhu

separacije komponenata smjese prije njihove detekcije, identifikacije i strukturalne karakterizacije putem spektrometrije masa [171]. Osim toga, s obzirom da masena spektrometrija nije isključivo kvantitativna analitička metoda, korištenje navedenih spregnutih tehnika je omogućilo razvoj relativnih i absolutnih kvantitativnih metoda u istraživanju proteina iz kompleksnih bioloških uzoraka. Slično kao u metodi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *HPLC - High performance liquid chromatography*), masena spektrometrija spregnuta tekućinskom kromatografijom iskorištava intrinistički afinitet molekula analita za mobilnu (otapalo) i stacionarnu fazu tekućinske kromatografije (porozna čvrsta podloga obložena različitim materijalom) u svrhu separacije otopljenih tvari iz smjese [171]. U osnovi se putem pumpa stvara kontinuirani protok otapala u koji se introducira otopljeni uzorak. Kad se uzorak nalazi u toku otapala, tada putuje kroz analitičku kolonu ispunjenu stacionarnom fazom. Komponente prisutne u uzorku se potom odvajaju ovisno o njihovom afinitetu za stacionarnu fazu analitičke kolone. Nakon završene separacije komponenata u uzorku one se ispiru s kromatografske kolone i ulaze u ionski izvor masenog spektrometra, tzv. elektrosprej ionski izvor. ESI ionizacija je meki oblik ionizacije pod atmosferskim tlakom tijekom koje dolazi do minimalne fragmentacije uzorka [172]. Prilikom elektrosprej ionizacije dolazi do raspršenja uzorka u aerosol i isparavanja otapala uslijed visoke temperature te potencijala na elektrosprej kapilari prilikom procesa ionizacije. Ionizacija uzorka može biti pozitivna ili negativna (engl. *Positive ion mode and negative ion mode*) što ovisi o naponu elektrosprej kapilare i kolektorske elektrode. U slučaju bioloških makromolekula na ovaj način nastaju tzv. protonirani ili deprotonirani ($M+H$; $M-H$) tipično višestruko nabijeni kvazimolekularni ioni. Nakon izvršene ionizacije nabijene molekule ulaze u analizator masa, koji ih odvaja na temelju njihove m/z vrijednosti te naposljetku dolaze do detektora masa, koji detektira m/z vrijednosti molekula analita. Odgovor detektora masa i izmjereno retencijsko vrijeme na kromatografskoj koloni (vrijeme potrebno za prolaz komponente od injektora do detektora) specifične komponente koristi se za njenu identifikaciju, ali i relativnu ili apsolutnu kvantifikaciju.

U ovoj doktorskoj disertaciji proteomsko je profiliranje tumorskih te pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana u svrhu identifikacije i relativnoga kvantitativnog profiliranja

proteina putem metoda bez označavanja sa stabilnim izotopima izvršeno na hibridnom LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) spektrometru masa spregnutom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. LTQ Orbitrap Velos je spektrometar masa visoke rezolucije koji se sastoji od kombinacije linearne ionske stupice (engl. *LTQ- Linear trap quadropole.*) i orbitrap analizatora. U orbitrap analizatoru masa se ioni zatoče u elektrostatskom polju između vanjske i unutarnje elektrode analizatora. Takvi ioni se rotiraju oko unutarnje elektrode uz simultano kretanje duž osi elektrode analizatora s frekvencijom karakterističnom za njihovu m/z vrijednost [173].

Prikupljanjem navedenih tranzijenata i Fourierovom transformacijom tih signala stvaraju se frekvencije određenog intenziteta koje se pomoću matematičkog algoritma konvertiraju u m/z vrijednosti iona [173].

Osnovni metodološki pristupi koji su korišteni u ovoj disertaciji u svrhu proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa uključuju: (1) izolaciju proteina iz biološkog materijala, (2) određivanje koncentracije proteina u tkivnim lizatima, (3) enzimsku digestiju ukupnih izoliranih tkivnih proteina, (4) identifikaciju razdvojenih proteina uz pomoć tandemске spektrometrije masa (MS/MS) i pretraživanja specijaliziranih baza podataka te računalnih algoritama, (5) analizu razlike u relativnoj ekspresiji proteina izoliranih iz uzoraka tkiva putem metoda bez označavanja sa stabilnim izotopima na temelju intenziteta signala nefragmentiranih peptidnih iona (MS) uz pomoć spektrometrije masa i specijaliziranih računalnih paketa, (6) pretraživanje proteomskih i genomskih funkcionalnih baza podataka te literaturnih navoda na temelju rezultata analize spektrometrije masa u svrhu određivanja novih proteinskih potencijalnih kandidata i bioloških procesa povezanih s razvojem metastaze, (7) validaciju odabranih proteinskih kandidata i staničnih puteva u kojima sudjeluju na istoj skupini uzoraka pomoću imunodetekcijske metode i statističke obrade dobivenih rezultata i (8) validaciju odabranih proteinskih kandidata na skupini uzoraka tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od nemetastatske bolesti tkiva pomoću imunodetekcijske metode i statističke obrade dobivenih rezultata.

3.2.1. Izolacija proteina iz tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana

Tumorska i tumorom nezahvaćena pripadajuća tkiva sedam pacijenata oboljelih od metastatskog i četiri pacijenta oboljela od nemetastatskog oboljenja mehanički su usitnjena i homogenizirana putem tekućeg dušika u tarioniku. Homogenizirani uzorci tkiva su otopljeni u 1ml pufera za lizu sastava (7M urea/2M thiourea, Sigma-Aldrich, SAD; 4 % (w/v) CHAPS, Sigma-Aldrich, SAD; 0,2 % (w/v) smjesa amfolita pH 3-10 Bio-Rad, SAD; 1 % (w/v) ditiotritol (DTT), Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 5x razrijeđenog koktela inhibitora proteaza i fosfataza (Roche, Švicarska). Proteinski lizat je podvrgnut ultrazvučnoj sonikaciji putem 4 mm sonde snage 6W (Microson™, PGC Scientifics, SAD) 4x10s. Nakon izvršene sonikacije lizatima tkiva je dodano po 10µl mješavine nukleaza (BioRad, SAD). Tkivni lizati su zatim inkubirani 1h na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje na termobloku (Eppendorf, Njemačka). Nakon toga su uzorci centrifugirani 45 min na 14 000 rpm i pri temperaturi od 4°C (Eppendorf, Njemačka). Nakon završenog centrifugiranja sakupljen je supernatant koji sadrži topive proteine i koji je pohranjen na - 80°C.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina u tkivnim lizatima

Relativne koncentracije proteina u lizatima tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva utvrđene su putem komercijalnog Qubit™ fluorimetrijskog esejja korištenjem Qubit™ fluorimetrijske kvantifikacijske platforme (Invitrogen, SAD) prema uputama proizvođača. Qubit™ fluorimetrijska kvantifikacijska platforma koristi visoko specifične fluorescentne boje i Qubit™ proteinske standarde poznate koncentracije u svrhu određivanja koncentracije proteina u lizatu. Ove boje pokazuju izrazito nisku razinu fluorescencije sve dok se ne povežu na svoju metu, odnosno u ovom slučaju proteine. Nakon vezanja na proteine iz uzorka razina fluorescencije boje raste i količina vezane boje tj. intenzitet fluorescentnog signala je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Sažeto rečeno, iz svakog lizata tkiva je odvojeno po 3x5 µl uzorka i prebačeno u čiste plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka). Kako bi se uklonile ionske nečistoće

iz uzoraka i ukoncentrirali proteini taloženjem, uzorcima je dodano četiri volumena čistog acetona (Sigma-Aldrich, SAD) ohlađenog na -20°C. Smjesa je zatim ostavljena preko noći na -20°C. Nakon završenog taloženja proteina uzorci su centrifugirani 10 min na 4°C i 14 000 rpm (Eppendorf, Njemačka). Višak acetona je uklonjen, a talozi su osušeni na sobnoj temperaturi te im je dodano po 5 µl pufera za kvantifikaciju proteina (0,125 M Tris-Cl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glicerol, Sigma-Aldrich, SAD). Proteinski talozi su zatim temeljito resuspendirani mikropipetom i inkubirani na termomikseru na 30°C sve dok se nisu u potpunosti otopili.

Radna Qubit™ otopina za kvantifikaciju proteina pripravljena je dodavanjem 1 µl Qubit™ fluorescentne proteinske boje u 199 µl Qubit™ komercijalnog pufera za kvantifikaciju proteina. Neposredno prije mjerenja koncentracije proteina Qubit™ fluorimetrijska kvantifikacijska platforma je kalibrirana putem Qubit™ proteinskih standarda poznate koncentracije. 1 µl od svakog uzorka je prebačen u čistu plastičnu epruvetu (Invitrogen, SAD) te mu je dodano 199 µl prethodno pripravljene radne Qubit™ otopine za kvantifikaciju proteina. Navedena smjesa je zatim inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su izmjerene koncentracije proteina u uzorcima. Sva mjerenja su izvršena tri puta. Izmjerene relativne koncentracije proteina izoliranih iz uzoraka tumorskih tkiva i okolnih tumorom nezahvaćenih tkiva prikazane su u tablici 7 i 8.

Tablica 7. Izmjerena relativna koncentracija proteina (mg/ml) u uzorcima primarnih tumora i pripadajućih okolnih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana

Pacijenti oboljeli od metastatske bolesti	Relativna koncentracija proteina u tumorskom tkivu (mg/ml)	Relativna koncentracija proteina u okolnom tumorom nezahvaćenom tkivu (mg/ml)
Uzorak 1.	8.71	10.6
Uzorak 2.	3.81	4.60

Uzorak 3.	4.21	4.57
Uzorak 4.	9.90	4.99
Uzorak 5.	8.47	7.96
Uzorak 6.	3.64	4.94
Uzorak 7.	16.10	11.60

Tablica 8. Izmjerena relativna koncentracija proteina (mg/ml) u uzorcima primarnih tumora i pripadajućih okolnih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od nemetastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana

Pacijenti oboljeli od nemetastatske bolesti	Relativna koncentracija proteina u tumorskom tkivu (mg/ml)	Relativna koncentracija proteina u okolnom tumorom nezahvaćenom tkivu (mg/ml)
Uzorak 1.	7.94	5.*25
Uzorak 2.	12.40	6.55
Uzorak 3.	7.89	8.34
Uzorak 4.	16.70	5.80

3.2.3. Priprema uzoraka proteina za analizu pomoću metode LC-MS

U svrhu proteomskog profiliranja ukupnih proteina tkiva izoliranih iz sedam uzoraka primarnih tumora, koji su metastazirali, i pripadajućih sedam tumorom nezahvaćenih tkiva pomoću spektrometrije masa spregnute tekućinskom kromatografijom uzorci proteina su pripremljeni uz pomoć RapiGest SF (Waters, SAD) komercijalnog kita za digestiju proteina prema uputama proizvođača. RapiGest SF je komercijalni surfaktant, koji pospješuje enzimsku razgradnju proteina, a da pritom ne inhibira

aktivnost enzima korištenih za digestiju proteina. Sažeto rečeno, 50µg ukupnih proteina iz svakog uzorka istaloženo je u četiri volumena ledenog acetona (-20°C) i ostavljeno preko noći na -20°C u svrhu uklanjanja ionskih nečistoća i lipida iz uzoraka. Nakon završenog taloženja uzorci proteina su centrifugirani 10 min na 4°C i 14 000 rpm. Aceton je zatim uklonjen, a talozi proteina osušeni u vakuum koncentratoru (Eppendorf, Njemačka). Zatim je pripremljena radna otopina za digestiju proteina uz pomoć RapiGest SF. Liofilizat RapiGest SF je otopljen u 500 µl 50 mM amonijevog hidrogen bikarbonata (NH₄HCO₃, Sigma-Aldrich) te je tako napravljena 0,1 %-tna radna otopina. Svakom uzorku je dodano 50µl 0,1 %-tne radne otopine RapiGest SF surfakanta i 0,3 µl 5 mM otopine ditiotreitola (DTT, Sigma-Aldrich, SAD). Uzorci su zatim inkubirani na termostresilici 30 min na 50°C. Nakon završene inkubacije uzorcima je dodano po 0,75 µl 15 mM otopine iodoacetamida (IAA, Sigma-Aldrich, SAD). Uzorci su potom inkubirani u zamračenoj komori 30 min. Enzimska digestija proteina je provedena dodavanjem 5 µl otopine tripsina finalne koncentracije 20 µg/ml (Promega, Madison, WI, SAD) svakom uzorku i inkubacijom preko noći na 37°C. RapiGest SF surfakant je u uzorcima potom hidroliziran do finalne koncentracije od 0,5 % putem dodavanja tri-flourooctene kiseline (TFA, Sigma-Aldrich, SAD) u uzorke i inkubacije na 37 °C u trajanju od 35 min. Uzorci su nakon toga centrifugirani 10 min na 14000 rpm pri 15 °C (Eppendorf, Njemačka). Nakon završenog centrifugiranja uzorci su prebačeni u nove plastične epruvete (Eppendorf, Njemačka). Dio svakog uzorka od otprilike 6 µg proteina je odsoljen korištenjem ZipTip C18 nastavaka za mikropipete (Merck Millipore, Billerica, MA, SAD) prema protokolu proizvođača. Peptidi su zatim isprani sa ZipTip C18 nastavaka putem 10 µl otopine sastava 60 % acetonitril / 0,1 % TFA (Sigma-Aldrich, SAD) i osušeni u vakuum koncentratoru (Eppendorf, Njemačka). Neposredno prije analize uzoraka putem masene spektrometrije spregnute tekućinskom kromatografijom osušeni su uzorci otopljeni u 20 µl otopine sastava 3 % acetonitril / 0,1 % mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, SAD).

3.2.4. Analiza uzoraka proteina pomoću metode LC-MS

Uzorci proteina iz uzoraka tumorskih i tumorom nezahvaćenoga pripadajućeg tkiva analizirani su pomoću LTQ Orbitrap Velos spektrometra masa (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) spregnutog s Easy-nLC 1000 sustavom za visokoprotočnu tekućinsku kromatografiju (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). Sustav otapala za kromatografiju činili su pufer A sastava 0,1 % mravlja kiselina / voda i pufer B sastava 0,1 % mravlja kiselina / acetonitril. Po 6 µl peptida svakog uzorka je injektirano u kromatografsku kolonu napunjenu s C18 materijalom obrnute faze i unutarnjeg promjera 75 µm (AQ, 3 µm 200 Å, Bischoff GmbH, Leonberg, Njemačka). Peptidi su ispirani s kromatografske kolone pri protoku od 300 nl u minuti u sljedećem gradijentu otapala: 0 min: 0 % pufer B, 110 min: 30 % pufer B, 120 min: 50 % pufer B, 122 min: 100 % pufer B, 130 min: 100 % pufer B.

Maseni spektri su bilježeni u Orbitrap analizatoru u rasponu m/z vrijednosti od 300-2000 Da pri rezoluciji od 3000 na m/z vrijednosti od 400 Da u pozitivnom ionskom načinu rada (engl. *Positive ion mode*). Kalibracija instrumenta je izvršena putem komercijalne kalibracijske otopine za elektrosprej ionizaciju (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) u rasponu m/z vrijednosti od 74-1822 Da. MS/MS fragmentacija peptida je izvršena u slučaju 20 signala peptidnih iona najjačeg intenziteta. Normalizirana kolizijska energija od 35 % i vrijeme aktivacije od 10 ms korišteni su za izolaciju preteča iona (engl. *Precursor ion*). Izabrani preteče ioni za MS/MS fragmentaciju su isključeni iz daljnjeg odabira tijekom sljedećih 45 sekundi s prozorom za isključenje namještenim na 20 ppm-a. Sva mjerenja putem spektrometrije masa izvršena su u triplicatu zasebno za svaki uzorak.

3.2.5. Identifikacija proteina uz pomoć specijaliziranih računalnih programa i proteomskih baza podataka

Dobiveni neobrađeni rezultati spektrometrije masa su analizirani uz pomoć računalnog programa Progenesis LC-MS v.4.0. (Nonlinear Dynamics Limited, Velika Britanija). Prije automatskog ujednačavanja spektara putem programa su uklonjeni signali otapala i odabrana je referenca za ujednačavanje spektara na temelju

najvećeg broja detektiranih spektralnih osobina. Na osnovu dekonvuliranih MS/MS spektara (maksimalno 5 za svaki peptid) je izvršeno pretraživanje Mascot v.2.4.1 baze podataka (www.matrixscience.com) u svrhu identifikacije proteina. Prilikom pretraživanja Mascot baze putem fragmentnih peptidnih spektara su odabrani sljedeći parametri: tolerancija mase za odabir preteče iona je iznosila 10 ppm; tolerancija mase za fragmentne ione je iznosila 0,6 Da; tripsin je odabran kao enzim korišten za digestiju proteina uz dopuštena 2 promaknuta cijepanja; kao fiksirana modifikacija peptida je odabrana karbomidometilacija cisteinskih ostataka; kao varijabilne modifikacije proteina su odabrane oksidacija metionina, formiranje piroglutamata od N-terminalnog glutamina, deamidacija glutamina i N-terminalna acetilacija proteina.

S rezultatima spektrometrije masa izvršeno je pretraživanje naspram tzv. ljudske reverzne baze podataka (engl. *Forward and reversed human database*, www.uniprot.org) koja sadrži do 260 poznatih kontaminanata i služi za eliminaciju lažno pozitivnih identifikacija proteina putem korištenja tzv. meta-mamac strategije (engl. *Target-decoy strategy*) [174]. Osim toga je putem rezultata Mascot analize izvršeno dodatno potvrđivanje identifikacije proteina na temelju fragmentnih peptidnih spektara putem Scaffold v.4.1.1 računalnog programa (Proteome Software, SAD) koji koristi Protein i Peptide Prophet algoritme u svrhu automatske identifikacije proteina na temelju asigniranih tandemskih peptidnih spektara masa.

3.2.6. Određivanje diferencijalne razlike u ekspresiji proteina pomoću metode LC-MS

Za određivanje razlike u relativnoj ekspresiji proteina korišteni su svi proteini identificirani s minimalnim brojem od dva jedinstvena triptička peptida putem Progenesis računalnog programa (Nonlinear Dynamics Limited, Velika Britanija) koji koristi specijalizirane računalne algoritme u svrhu ujednačavanja kompleksnih ion-kromatograma i analize razlike u relativnoj ekspresiji proteina putem integracije kromatografskoga elucijskog profila s peptidnim signalima nastalim tijekom eksperimenta (engl. *Peak intensity methods*). U svrhu analize diferencijalne ekspresije proteina uzorci su podijeljeni u dvije skupine: tumorsko tkivo (n=7) i okolno

tumorem nezahvaćeno tkivo (n=7). Normalizacija intenziteta peptidnih iona je provedena prema unaprijed određenim postavkama računalnog programa. Razlika u diferencijalnoj ekspresiji proteina je odabrana kao značajna kad je razlika u razini ekspresije prelazila vrijednost od dva i kad je p vrijednost utvrđena pomoću parametrijskog parnog t-testa bila manja od 0,05.

3.3. Pretraživanje funkcionalnih proteomskih i genomskih funkcionalnih baza podataka

Zbog pojednostavljivanja postupka potencijalno novih proteinskih kandidata i staničnih procesa povezanih s patogeneom metastaziranja na temelju kvantitativnih i kvalitativnih rezultata analize spektrometrije masa izvršeno je pretraživanje internetskih funkcionalnih proteomskih i genomskih baza podataka. Navedene baze objedinjuju informacije o strukturi i taksonomiji poznatih proteina, ulozi proteina u biološkim i staničnim procesima, interakciji proteina, a pomoću specijaliziranih računalnih algoritama i statističkih alata omogućuju pojedinačno i mnogostruko pretraživanje proteina prema njihovoj funkciji, interakciji, biološkim putevima u kojima sudjeluju, subcelularnoj lokalizaciji i dr. U ovoj doktorskoj disertaciji sa statistički značajno diferencijalno eksprimiranim proteinima izvršeno je pojedinačno pretraživanje proteina prema biološkim procesima u kojima sudjeluju pomoću Uniprot (www.uniprot.org) baze podataka. Dodatno uz pomoć PANTHER (engl. *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*; www.pantherdb.org) baze podataka je izvršena simultana klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina prema biološkim procesima i proteinskim razredima u koje su uključeni te lokalizaciji unutar stanice.

3.4. Western blot analiza razine relativne ekspresije proteina odabranih na temelju rezultata proteomskog profiliranja pomoću spektrometrije masa i staničnih signalnih puteva povezanih s procesom metastaziranja

Western blot ili proteinski imunoblot analitička je metoda koja služi za potvrđivanje identiteta i određivanje nivoa ekspresije određenog proteina koji se obično nalazi u

kompleksnoj mješavini proteina ekstrahiranih iz stanica, tkiva, tjelesnih tekućina i dr. *Western blot* postupak se sastoji od nekoliko ključnih koraka koji uključuju: separaciju ukupnih izoliranih proteina putem gel elektroforeze, prijenos proteina uz pomoć električne struje na odgovarajuću čvrstu podlogu (nitrocelulozna ili polivinidilenfluoridna – PVDF membrana, detekcije ciljanih proteina pomoću specifičnih monoklonalnih ili poliklonalnih primarnih i obilježenih sekundarnih antitijela npr. putem peroksidaze hrena te vizualizacije, normalizacije i analize relativne ekspresije dobivenog signala putem sustava za vizualizaciju i specijaliziranih računalnih programa [175].

Pedeset µg ukupnih proteina iz tkivnih lizata metastatskih i nemetastatskih te pripadajućih okolnih tumorom nezahvaćenih tkiva je prethodno istaloženo preko noći na -20°C u četiri volumena acetona ohlađenog na -20°C. Nakon završenog taloženja uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4°C pri 14000 rpm (Eppendorf, Njemačka). Dobiveni proteinski talozi su otopljeni u puferu za nanošenje uzoraka na gel (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25 % glicerol, 2 % natrij dodecil sulfat, 0,01 % Bromphenol Blue), 10 % 2M ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, SAD) i zagrijani 5 minuta pri 95°C na termobloku (Eppendorf, Njemačka). Na ovaj su način pripremljeni uzorci proteina. Potom su uz proteinske standarde poznate molekularne mase (BioRad, SAD) nanoseni na gel i separirani putem denaturirajuće natrij dodecil sulfat gel elektroforeze (engl. *SDS PAGE-Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) na 10 % ili 12 % poliakrilamidnom gelu (ovisno o molekularnoj veličini ispitivanog proteina) korištenjem elektroforetskog pufera sastava: 25 mM Tris baza 190mM glicin (Sigma-Aldrich, SAD), 0,1 % natrij dodecil sulfat (SDS, Bio-Rad, SAD), pH=8,3, mQ voda (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 200V i vremenu trajanja elektroforetske separacije od 45 minuta uz pomoć *Mini-protean tetra cell* sustava (Bio-Rad, SAD). Prijenos proteina na membranu PVDF (Bio-Rad, SAD) odvijao se pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA na temperaturi od 4°C u trajanju od 1h i 30 min u puferu za prijenos proteina (25mM Tris baza, 192 mM glicin 10 ili 20 % v/v metanol; Sigma-Aldrich, SAD, ovisno o veličini proteina, pH 8,3).

Uspješnost prijenosa proteina na membranu provjerena je uz pomoć bojanja membrane PVDF s Amido Blue Black bojom (0,1 % Amido Blue Black boja, 1 %

octena kiselina, Sigma-Aldrich, SAD). Prije inkubacije s primarnim antitijelima membrane PVDF blokirane su u 4 % otopini mlijeka u prahu (Bio-Rad, SAD) ili 3 % goveđeg albumina iz seruma (Sigma-Aldrich, SAD) otopljenih u 0,1 % TBST puferu (50 mM Tris baza, 150 mM NaCl, Sigma-Aldrich, SAD; 0,05 % Tween 20, Bio-Rad, SAD, pH=7,8) u trajanju od sat vremena pri sobnoj temperaturi.

U svrhu imunološke validacije odabranih proteinskih kandidata na temelju rezultata spektrometrije masa i staničnih signalnih puteva vezanih uz proces metastaziranja membrane uzoraka tkivnih proteina pacijenata oboljelih od metastatske bolesti inkubirane su s primarnim protutijelima usmjerenim na ladinin 1 (1:500, zečje monoklonalno protutijelo, Acris antibodies, Njemačka), afamin (1:500, zečje poliklonalno protutijelo, Abcam, UK), MIF (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, BD biosciences, SAD), CD14 (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK), tubulin alfa-4a lanac-TUBA4A (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK), biglikan (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK), lumikan (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK), β -integrin (1:2000, mišje monoklonalno protutijelo, BD biosciences, SAD), CD44 (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD), E-kadherin (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD), α -tubulin (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Sigma-Aldrich, SAD), β -aktin (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo Cell Signaling Technology), vimentin (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD), RANKL (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK) i fosforilirane aktivirane oblike β -katenina (Y142; 1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK), Nf κ B p65 (S536; 1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD), p38 proteina (T180+Y182; 1:500 zečje poliklonalno protutijelo, Abcam, UK) te inaktivirani fosforilirani oblik Src kinaze (Y529; 1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK). Uz to su u svrhu komparativne analize razine ekspresije proteina odabranih na temelju proteomskog profiliranja i vezanih staničnih signalnih puteva, a na taj način i potvrđivanja njihovog doprinosa metastaziranju, membrane uzoraka tkivnih proteina pacijenata oboljelih od nemetastatske bolesti inkubirane s istim primarnim protutijelima kao i membrane uzoraka pacijenata oboljelih od metastatske bolesti.

Za sva ispiranja membrana koristio se 0,1 % TBST pufer (50 mM Tris baza, 150 mM NaCl, Sigma-Aldrich, SAD; 0,05 % Tween 20, Bio-Rad, SAD, pH=7,8). Signali ciljanih proteina nastali vezanjem primarnih i sekundarnih protutijela su vizualizirani uz pomoć kemiluminiscentnog substrata (Roche, Švicarska), a slikanje kemiluminiscentnih signala je izvršeno na uređaju ImageQuant LAS500 uređaju (GE Healthcare, SAD). Normalizacija intenziteta pojedinih signala provedena putem tzv. metode bojanja ukupnih proteina (engl. *Total protein stain*) [176] u Quantity One 4.6.6 računalnom programu (Bio-Rad SAD). Statistička analiza dobivenih rezultata izvršena je putem dvostranog parnog t-testa u Microsoft Office Excel računalnom programu. P vrijednosti < 0,05 su smatrane statistički značajnima.

3.5. Dvodimenzionalna (2-DE) imunoblot analiza razine ekspresije različitih formi malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa lumikana

Dvodimenzionalna imunoblot (engl. *2-DE immunoblot*) analiza je metoda koja objedinjuje tehnike dvodimenzionalne gel elektroforeze i *Western* blota. Klasična dvodimenzionalna gel elektroforeza (engl. *2-DE Two-dimensional gel electrophoresis*) koristi izoelektrično fokusiranje kao prvu dimenziju odvajanja proteina na temelju njihove izoelektrične točke putem djelovanja električnog polja u gradijentu pH i natrij dodecil sulfat denaturirajuću vertikalnu elektroforezu kao drugu dimenziju u kojoj se proteini separiraju na temelju njihove molekularne veličine [177]. Kombinacija dvodimenzionalne gel elektroforeze kao tehnike visoke sposobnosti razdvajanja proteina i *Western blot* metode omogućila je razvoj 2-DE imunoblot tehnike, koja se pokazala kao vrlo korisna metoda za ispitivanje posttranslacijskih modifikacija proteina, jer mnoge posttranslacijske modifikacije proteina uzrokuju pomake u izoelektričnoj točki i molekularnoj veličini ispitivanih proteina [177, 178].

U ovoj doktorskoj disertaciji 2-DE imunoblot metoda korištena je u svrhu utvrđivanja različitih glikoforma malog proteoglikana ekstracelularnog matriksa lumikana kod metastatskog i nemetastatskog oblika planocelularnog karcinoma grkljana.

Volumeni proteinskih lizata od ukupno 100 µg ukupnih sedam metastatskih uzoraka i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva prethodno su međusobno pomiješani u

dvije odvojene skupine uzoraka (proteini ukupnih metastatskih tumorskih i tumorom nezahvaćenih tkiva). Isti postupak ponovljen je i za proteinske lizate četiri nemetastatska tumorska uzorka tkiva i odgovarajućega okolnog tumorom nezahvaćenog tkiva. Nakon ponovnog određivanja koncentracije proteina u navedenim uzorcima za potrebu dvodimenzionalne gel elektroforetske separacije proteina istaloženo je po 100 µg proteina iz sva četiri uzorka i otopljeno u radnom puferu za rehidraciju (7M urea, 2M tiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 0,0002 % bromfenol modriilo, Sigma-Aldrich) u koji je neposredno prije upotrebe dodano 10 mg ditiotreitol (w/v 1 % DTT, Sigma-Aldrich, SAD) i 5x razrijeđen koktel inhibitora proteaza i fosfataza (Roche, Švicarska) na 1 ml radnog pufera). Otopljeni su uzorci potom inkubirani na sobnoj temperaturi 45 min uz lagno protresanje na vorteksu (Ika, Njemačka). Nakon završene inkubacije otopljeni su uzorci naneseni uzduž kanala uređaja za fokusiranje (engl. *Focusing tray*, Bio-Rad, SAD), a preko njih su položene trakice za izoelektrično fokusiranje (engl. *IPG strip- Immobilized pH gradient strip*) u nelinearnom gradijentu pH (NL IPG strip, 7 cm, pH 3-10, Bio-Rad, SAD) s gel stranom trakica okrenutom prema dolje. Kako bi se spriječilo isušivanje i kontaminacija na trakice IPG je dodano mineralno ulje (Bio-Rad, SAD) nakon čega je provedena njihova aktivna rehidracija pri naponu od 50V na 20°C i trajanju od 14h.

Nakon završene rehidracije ispod svake trakice su na obje elektrode položeni navlaženi filter papirići (engl. *Wick*, Bio-Rad, SAD) i provedeno je izoelektrično fokusiranje prema uvjetima navedenim u tablici 9. Rehidracija trakica IPG i izoelektrično fokusiranje provedeni su na uređaju PROTEAN® IEF (Bio-Rad, SAD).

Tablica 9. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja

Korak	Porast napona	Ostvareni napon/V	Trajanje/h	Trajanje/ (V·h)
S1	BRZI	250	0:15	/
S2	SPORI	4000	1:00	/
S3	BRZI	4000	-	15000

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja sa trakica je uklonjen višak mineralnog ulja pomoću filter papira. Trakice IPG su zatim ekvilibrirane u dva pufera za ekvilibraciju istoga početnog sastava (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M urea, 30 % w/v glicerol, 2 % w/v SDS, bromfenol modriilo, Sigma-Aldrich, SAD), u koje je u svrhu redukcije disulfidnih mostova između cisteinskih ostataka dodan ditiotreitol (1 % w/v DTT, Sigma-Aldrich, SAD), a u svrhu njihove alkilacije dodan je jodoacetamid (25 g dm⁻³ IAA, Sigma-Aldrich, SAD). Trakice IPG su se prvo ekvilibrirale 15 min na tresilici (Ika, Njemačka) u ekvilibracijskom puferu s dodatkom ditiotreitola nakon čega je slijedila ekvilibracija trakica IPG u ekvilibracijskom puferu s dodatkom jodoacetamida 15 min na tresilici.

Nakon ekvilibracije u IAA, trakica IPG je kratko ekvilibrirana u puferu za elektroforezu (25mM Tris baza, 190mM glicin, 0,1 % natrij dodecil sulfat (SDS), Sigma-Aldrich, SAD, pH=8,3; mQ voda, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) i položena na gornju površinu 12 %-tnog gela za elektroforezu te učvršćena 1 %-tnom otopinom agaroze (Sigma-Aldrich, SAD). Uz trakicu IPG su na gel za elektroforezu nanesheni proteinski standardi poznate molekularne mase (Bio-Rad, SAD). Elektroforeza se odvijala pod istim uvjetima kao jednodimenzionalna elektroforeza u slučaju *Western blot* metode (konstantan napon od 200 V, 45 min). Prijenos proteina na PVDF membranu (Bio-Rad, SAD) se odvijao pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA na temperaturi od 4°C u trajanju od 1h i 30 min u puferu za prijenos proteina (25Mm Tris baza, 192 mM glicin, 10 % v/v metanol, pH 8,3, Sigma-Aldrich, SAD). Uspješnost prijenosa proteina na membranu je provjerena uz pomoć bojanja membrane PVDF s Amido Blue Black bojom (0,1 % Amido Blue Black boja / 1 % octena kiselina, Sigma-Aldrich, SAD).

Membrane PVDF su blokirane 1h na sobnoj temperaturi u 4 % otopini mlijeka u prahu (Bio-Rad, SAD) u TBST puferu (50 mM Tris baza, 150 mM NaCl, Sigma-Aldrich, SAD; 0,05 % Tween 20, Bio-Rad, SAD, pH=7,8). Nakon završenog blokiranja membrane su inkubirane s primarnim protutijelima usmjerenim na lumikan (1:1000, zečje monoklonalno protutijelo, Abcam, UK) i α -tubulin (1:1000, mišje monoklonalno protutijelo, Sigma-Aldrich, SAD) preko noći na 4°C. Nakon završene inkubacije s

primarnim protutijelima membrane su inkubirane sa sekundarnim protutijelima obilježenim s peroksidazom hrena i usmjerenim protiv imunoglobulina G miša (1:2000, HRP kozja protutijela, Santa Cruz Biotechnology) ili zeca (1:2000, HRP kozja protutijela, Santa Cruz Biotechnology) sat vremena na sobnoj temperaturi. Signali ciljanih proteina vizualizirani su uz pomoć kemiluminiscentnog substrata (Roche, Švicarska), a slikanje kemiluminiscentnih signala izvršeno je na ImageQuant LAS500 uređaju (GE Healthcare, SAD).

3.6. Priprema uzoraka tkiva tumora za imunohistokemijsku analizu

Odmah nakon provedene kirurške resekcije uzorci biopsije tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od metastatskog i nemetastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana su fiksirani u 10 %-tnoj otopini formaldehida (Sigma-Aldrich, SAD) u trajanju od 24h. Uzorci tkiva zatim su dehidrirani pomoću etanola (Kemika, Hrvatska), uklopljeni u parafinske kocke i putem mikrotoma (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) narezani u tkivne sekcije debljine od 5 µm. Sekcije su zatim bojane standardnom hematoksilin-eozin metodom u svrhu utvrđivanja reprezentativnih regija tumorskog i okolnog histološki neizmijenjenog tkiva putem svjetlosne mikroskopije. Osim toga su za ispitivanje ekspresije polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica putem imunohistokemije pripremljene nove sekcije tkiva debljine 3-4 µm.

3.6.1. Semikvantitativna imunohistokemijska analiza ekspresije polisijaliziranog oblika NCAM-molekule u sekcijama tkiva primarnih metastatskih i nemetastatskih planocelularnih tumora grkljana

Sekcije tumorskih tkiva deparafinizirane su dvostrukim ispiranjem u otopini ksilena u trajanju od 10 min, nakon čega je uslijedila rehidracija sekcija u setu otopina etanola različite koncentracije. Aktivnost endogene peroksidaze inhibirana je putem inkubacije sekcija u otopini 3 % vodikovog peroksida u trajanju od 30 min. Nakon inhibicija endogene peroksidaze, stakalca za imunohistokemiju grijana su u komercijalnoj otopini za otkrivanje tkivnih antigena (Universal Antigen Retrieval Reagent, R & D Systems, SAD). Imunohistokemijsko bojanje izvedeno je avidin-biotin imunoperoksidaznom metodom. Sažeto rečeno, sekcije tumorskih tkiva su

inkubirane preko noći na 4°C s primarnim protutijelom koje specifično prepoznaje polisijalizirani oblik NCAM- molekule (1:50, mišje monoklonalno protutijelo klon 12E3, eBioscience, SAD). Nakon inkubacije s primarnim protutijelom sekcije su inkubirane sa sekundarnim biotiniliranim protutijelom (Dako, Danska) u trajanju od sat vremena na sobnoj temperaturi. Imunohistokemijska reakcija je vizualizirana pomoću EnVision™ FLEX (K8000 Dako, Danska) sustava za detekciju putem inkubacije stakalaca s 3,3-diaminobenzidin tetrahidrokloridom kromogenom (DAB, Sigma-Aldrich, SAD) u trajanju od 10 min. Stakalca su zatim isprana destiliranom vodom i ponovno obojana hematoksilin-eozin metodom. Kao pozitivna kontrola koristilo se tkivo hipokampusa odraslog čovjeka za koje je poznato da ekspirira polisijalizirani oblik adhezijske molekule neuralnih stanica [179]. Kao negativna kontrola koristilo se isto tkivo inkubirano s neimuniziranim mišjim imunoglobulinom M. Sva imunohistokemijska stakalca su analizirana uz pomoć svjetlosne mikroskopije (Zeiss Axiophot, Zeiss, Njemačka) i nezavisno ispitana od strane dva iskusna kirurška patologa koji nisu bili upoznati s kliničko-patološkim osobinama pacijenata. Imunohistokemijske reakcije su utvrđene na mjestima najveće reaktivnosti PSA-NCAM protutijela u 10 reprezentativnih područja svake sekcije koja su odabrana na temelju prethodne analize cijele sekcije tkiva uz pomoć svjetlosne mikroskopije pri ukupnom povećanju od 100x. Na mjestima najveće PSA-NCAM imunoreaktivnosti je izbrojeno ukupno 100 stanica i određen je intenzitet bojanja (engl. *SI- staining intensity*) koji je bodovan kao: 0 nema reakcije, 1+ slaba imunoreaktivnost, 2++ umjerena imunoreaktivnost i 3+++ jaka imunoreaktivnost, dok je postotak obojanih stanica bodovan na slijedeći način: 0= nema pozitivnih stanica; 1= < 10 % pozitivnih stanica; 2= 10-50 % pozitivnih stanica; 3= 51-80 % pozitivnih stanica; 4= >80 % pozitivnih stanica. U svrhu određivanja razine relativne ekspresije PSA-NCAM rezultati imunohistokemijske analize evaluirani su semikvantitativno korištenjem sustava bodovanja imunoreaktivnosti (engl. *IRS - immunoreactivity scoring system*) prema prethodno opisanim kriterijima [180]. Sažeto rečeno, IRS-vrijednosti u rasponu od 0-12 su utvrđene u tumorskom i okolnom histološki neizmijenjenom epitelnom tkivu kombinacijom intenziteta obojenja (SI) i % obojanih stanica. Za IRS vrijednosti u rasponu od 0-1 je smatrano da nema PSA-NCAM imunoreaktivnosti, dok su IRS vrijednosti od 2-3 smatrane kao slaba, 4-7 umjerena i > 8 kao jaka PSA-NCAM imunoreaktivnost.

3.7. Western blot analiza razine relativne ekspresije proteina i staničnih signalnih puteva povezanih s ekspresijom polisijaliziranog oblika NCAM-molekule

U svrhu imunološke validacije staničnih signalnih puteva i bioloških procesa povezanih s ekspresijom polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica membrane s uzorcima tkivnih proteina pacijenata oboljelih od metastatske i nemetastatske bolesti inkubirane su s primarnim protutijelima usmjerenim na fosforilirane aktivirane oblike receptora za faktore rasta fibroblasta 1- pFGFR1 (Tyr 653/654; 1:1000, mišje monoklono protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD), Erk 1 i 2 kinaze- pErk ½ (Thr202/Tyr204; 1:1000, mišje monoklono protutijelo, Abcam, UK), fokalne adhezijske kinaze-pFak (Y397; 1:1000, zečje poliklono protutijelo, Cell Signaling Technology, SAD) i c-Raf kinaze (S338; 1:1000, zečje monoklono protutijelo, Cell Signaling Technology) te ST8sia IV (zečje poliklono protutijelo, Abcam, UK) i siglek-11 (1:500, zečje poliklono protutijelo, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). Inkubacija s primarnim protutijelima odvijala se preko noći na 4°C. Nakon završene inkubacije s primarnim protutijelima membrane inkubirane su sa sekundarnim protutijelima obilježenim peroksidazom hrena i usmjerenim protiv imunoglobulina G miša (1:2000, HRP kozja protutijela, Santa Cruz Biotechnology) ili zeca (1:2000, HRP kozja protutijela, Santa Cruz Biotechnology) sat vremena na sobnoj temperaturi

4. Rezultati

4.1. Rezultati kvalitativnog i kvantitativnoga proteomskog profiliranja uzoraka tkiva metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana uz pomoć metode LC-MS

Nakon proteomskog profiliranja uzoraka tumorskih tkiva i tumorom nezahvaćenih pripadajućih tkiva sedam pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana uz pomoć masene spektrometrije spregnute tekućinskom kromatografijom i identifikacije proteina uz pomoć baze podataka Mascot (v.2.4.1, www.matrixscience.com) uspješno je identificirano 1275 različitih proteina. Za

identifikaciju proteina preduvjet je bio postojanje dva eksperimentalno utvrđena peptidna iona što je dodatno povećalo razinu pouzdanosti identifikacije. Procijenjena razina pogrešne stope detekcije (engl. *FDR -False discovery rate*) na razini proteina je iznosila 0,94 %. Za kvantitativnu analizu razlike u ekspresiji proteina između tumorskih uzoraka tkiva i tumorom nezahvaćenih pripadajućih uzoraka tkiva uz pomoć računalnog programa Progenesis korištene su normalizirane vrijednosti količine svih proteina identificiranih s minimalno dva peptidna iona zasebno za svaki uzorak. Kvantitativnom analizom temeljenom na intenzitetu kromatografskog signala peptidnih iona je utvrđeno 286 statistički značajno diferencijalno eksprimiranih proteina ($p < 0,05$). Od tog broja je 218 proteina imalo minimalno dva puta povećanu razinu ekspresije u tkivima primarnih tumora, a 67 proteina je imalo smanjenu razinu ekspresije u tkivima primarnih tumora koji su metastazirali (tablice 10 i 11). Pretraživanjem baze podataka Uniprot (www.uniprot.org) istražila se pojedinačna uloga diferencijalno eksprimiranih proteina kao i njihova uloga u biološkim procesima. Tako je utvrđeno da diferencijalno eksprimirani proteini u tumorskom tkivu sudjeluju u nizu staničnih procesa, koji doprinose metastaziranju i razvoju bolesti poput reorganizacije aktinskog citoskeleta, koji je važan čimbenik povećane pokretljivost stanica raka (primjerice proteini profilin-1, kofilin-1, Ras GTP-azni aktivirajući protein IQGAP2), stanične proliferacije (primjerice izoforma 2 CDV3 homolognog proteina, hepatomalni faktor rasta), angiogenezi (primjerice protein timidin fosforilaza), promjenama molekula izvanstaničnog matriksa (primjerice proteini serpin H1, adhezijska molekula međustaničnih spojnica A, plastin-2), regulaciji stanične smrti i apoptoze (primjerice proteini mitohondrijski protein temperaturnog stresa od 10, protein PML, podjedinica beta-1 importina), procesima epitelno-mezenhimalne tranzicije (primjerice proteini izoforma 2 heterogenoga nuklearnog ribonukleoproteina), homeostazu iona unutar stanice (izoforma 2 proteina s LIM i SH3 domenama, retikulokalbin-1), upalnim procesima i imunološkom odgovoru (primjerice proteini DRB1-9 beta lanac histokompatibilnog antigena HLA razreda II, antigen diferencijacije monocita CD14, tip 5 proteosomalna podjedinica alfa, intracelularna adhezijska molekula 1) te metabolizmu i procesuiranju ribonukleinskih kiselina i proteina stanice (primjerice protein engleskog naziva *Far upstream element-binding* protein 2, zatim izoforma 1 RNK-vezujućeg proteina Raly, RNK-vezujući protein 2 sličan Luc 7; heterogeni nuklearni ribonukleoprotein L, podjedinica

5 prefoldina, plastin-2; tablica 10). Važno je napomenuti kako su identificirani diferencijalno eksprimirani proteini u tumorskom tkivu uključeni u niz staničnih signalnih puteva povezanih s nastanka i razvoja planocelularnih karcinoma glave i vrata, primjerice signalni putevi posredovani citokinima (npr. ubikvitinu sličan protein ISG15, interferonom induciran gvanilat vezujući protein 1) ili receptorima za epidermalne i endotelne faktore rasta (npr. 14-3-3 protein beta/alfa, teta i eta, botulin toksin supstrat povezan s Ras C3) koji su uključeni u signalizaciju MAPK (primjerice protein 29 endoplazmatskog retikuluma, regulatorna podjedinica 7 26S proteaze, 26S ne-ATPazna regulatorna podjedinica 5 proteasoma), JAK-STAT (engl. *JAK-STAT- Janus kinase and Signal transducer and activator of transcription signaling pathway* - npr. STAT 3 i STAT 1 alfa/beta proteini), signalizaciju putem TrkB receptora (primjerice transformirajući protein RhoA, 26S ne-ATP-azna regulatorna podjedinica 5 proteasoma), NfκB (engl. *Nuclear factor kappa B signaling pathway* - npr. miotropin, izoforma 3 elongacijskog faktora 1-delta) i signalizaciju SMAD (npr. aktivirani RNK polimerazni II transkripcijski koaktivator p15; tablica 10.). Analogno je istražena i biološka funkcija proteina koji su imali povećanu razinu ekspresije u okolnomu tumorom nezahvaćenom tkivu uz pomoć baze podataka Uniprot. Analiza je pokazala kako su identificirani proteini uključeni u biološke procese povezane s upalnim i imunološkim odgovorom (npr. serum amiloidna P-komponenta, alfa lanac C4b-vezujućeg proteina, izoforma 2 alfa lanca fibrinogena, faktor komplementa B, alfa-1 kiseli glikoprotein 1 i komplement C3), održavanjem homeostaze i transportom različitih iona unutar stanice (npr. serotransferin, ugljična anhidraza 1, hemopeksin, ceruloplazmin), negativnom regulacijom anoikisa i apoptoze (npr. stanična adhezijska molekula 5 srodna karcinoembrionalnom antigenu), adhezijom stanica na izvanstanični matriks i organizacijom izvanstaničnog matriksa (npr. angiotenzinogen, dekorin, mimekan, alfa-2-makroglobulin, von Willebrand faktor) te pravilnom staničnom morfogenezi i diferencijacijom (npr. homolog anteriornoga gradijentnog proteina 2, envoplakin, izoforma 3 alfa-aducina, izoforma 1 četvrte i srednje domene proteina LIM, izoforma 2 jetrene karboksilesteraze; tablica 11).

Tablica 10. Popis identificiranih proteina s povećanom razinom ekspresije u tumorskim tkivima pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana. Kratice: P-broj identificiranih peptida; Q- broj peptida korišten za relativnu kvantifikaciju pomoću spektrometrije masa; FC-povećanje relativne razine ekspresije proteina u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva

Oznaka proteina prema Uniprot. bazi podataka	P	Q	Parni t-test (p)	FC	Protein	Biološki proces
STIP1_HUMAN	6	6	<0,01	2,4	Stresom induciran fosfoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=STIP1 PE=1 SV=1	Odgovor na stanični stres
PAK2_HUMAN	5	5	<0,01	3,2	Serin/treonin protein kinaza PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3	Organizacija aktinskog citoskeleta
IF2G_HUMAN	4	4	<0,01	3,2	Podjedinica 2 Eukariotskog translacijskog faktora inicijacije 2 OS=Homo sapiens GN=EIF2S3 PE=1 SV=3	Stanični metabolički procesi
ERP29_HUMAN	7	7	<0,01	2,4	Protein 29 endoplazmatskog retikuluma OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4	Aktivacija MAPK kinaza

GBP1_HUMAN	6	6	<0,01	4,2	Interferonom induciran gvanilat vezujući protein 1 OS=Homo sapiens GN=GBP1 PE=1 SV=2	Stanični signalni putevi posredovani citokinima , negativna regulacija Erk ½ signalne kaskade
CDV3_HUMAN	3	3	<0,01	4,5	Izoforma 2 CDV3 homolognog proteina OS=Homo sapiens GN=CDV3 PE=1 SV=2	Stanična proliferacija
CH60_HUMAN	26	25	<0,01	2,2	Mitochondrijski protein temperaturnoga stresa od 60 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	Imunosni odgovor
MTPN_HUMAN	2	2	<0,01	2,2	Miotropin OS=Homo sapiens GN=MTPN PE=1 SV=2	Metabolizam kateholamina ,pozitivna regulacija NfκB signalizacije
EF1D_HUMAN	7	1	<0,01	4,7	Izoforma 3 elongacijskog faktora 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D	Pozitivna regulacija NfκB signalizacije
EFHD2_HUMAN	4	4	<0,01	3,6	Protein D2 sa EF domenom OS=Homo sapiens GN=EFHD2 PE=1 SV=1	Vežanje iona metala

HDGF_HUMAN	5	5	<0,01	2,6	Hepatomalni faktor rasta OS=Homo sapiens GN=HDGF PE=1 SV=1	Stanična proliferacija
IPYR_HUMAN	8	8	<0,01	2,1	Anorganska fosfataza OS=Homo sapiens GN=PPA1 PE=1 SV=2	Metabolizam difosfata
SH3L3_HUMAN	3	3	<0,01	2,2	Protein sličan 3 koji se veže za domenu bogatu glutamatom OS=Homo sapiens GN=SH3BGRL3 PE=1 SV=1	Homeostaza staničnog redoks sustava
CH10_HUMAN	5	5	<0,01	2,5	Mitohondrijski protein temperaturnoga stresa od 10 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	Aktivacija endopeptidaza cisteinskog tipa uključenih u proces apoptoze
F8VXI6_HUMAN	5	5	<0,01	2,5	Fragment proteina 1- kao 1 uključenog u organizaciju nukleosoma OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=3 SV=1	Organizacija nukleosoma
PRS7_HUMAN	5	5	<0,01	2,3	Regulatorna podjedinica 7 26S proteaze OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3	Aktivacija MAPK kinaza
GSTO1_HUMAN	5	5	<0,01	2,6	Glutation S-transferaza omega -1	Detoksikacija staničnih

					OS=Homo sapiens GN=GSTO1 PE=1 SV=2	oksidansa
SEPT9_HUMAN	4	4	<0,01	2,7	Izoforma 9 Septina 9 OS=Homo sapiens GN=SEPT9 PE=1 SV=2	Heterooligomeriz acija proteina
GANAB_HUMAN	22	1	<0,01	2,6	Neutralna alfa-glukozidaza AB OS=Homo sapiens GN=GANAB PE=1 SV=3	Metabolički procesi stanice
APMAP_HUMAN	3	3	<0,01	2,5	Protein vezan uz plazmatsku membranu adipocita OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2	Biosintetski procesi
FKBP4_HUMAN	4	4	<0,01	3,2	Peptidil-prolil cis-trans izomeraza FKBP4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3	Signalizacija putem androgenih receptora
KPYM_HUMAN	28	27	<0,01	2,1	Izozimi M1/M1 piruvat kinaze M1/M2 OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	Biosinteza ATP-a
PROF1_HUMAN	11	10	<0,01	2,3	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	Organizacija aktinskog citoskeleta
PML_HUMAN	5	4	<0,01	2,8	Protein PML OS=Homo sapiens GN=PML	Aktivacija endopeptidaza cisteinskog tipa

					PE=1 SV=3	uključenih u proces apoptoze
NTF2_HUMAN	4	4	<0,01	2,7	Transportni faktor nukleusa 2 OS=Homo sapiens GN=NUTF2 PE=1 SV=1	Transport proteina
EIF1_HUMAN	3	2	<0,01	2,5	Eukariotski translacijski faktor inicijacije 1 OS=Homo sapiens GN=EIF1 PE=1 SV=1	Biosinteza proteina
FUBP2_HUMAN	13	11	<0,01	2,5	Protein 2 koji se veže za daleku uzvodnu domenu OS=Homo sapiens GN=KHSRP PE=1 SV=4	Katabolički procesi glasnikčke RNK molekule
LUM_HUMAN	18	18	<0,01	3,4	Lumikan OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	Biosinteza i metabolizam ugljikohidrata i proteoglikana
TBA4A_HUMAN	19	5	<0,01	2,3	Tubulin alfa -4A lanac OS=Homo sapiens GN=TUBA4A PE=1 SV=1	Mitotska G2/M tranzicija
PSA7_HUMAN	4	4	<0,01	2,1	Tip 7 proteosomalna podjedinica alfa OS=Homo sapiens GN=PSMA7 PE=1 SV=1	Urođeni imunosni odgovor, NfκB signalizacija, TRK receptor signaliranje posredovano neurotropinima

ICAM1_HUMAN	4	4	<0,01	5,4	Intracelularna adhezijska molekula 1 OS=Homo sapiens GN=ICAM1 PE=1 SV=2	Odgovor na akutnu upalu stimuliranu antgenima
TPM3_HUMAN	11	2	<0,01	2,9	Izoforma 2 alfa-3 lanca tropomiozina OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=1 SV=2	Kretanje subcelularnih komponenti
PSA4_HUMAN	3	3	<0,01	2,6	Tip 4 proteosomalna podjedinica alfa OS=Homo sapiens GN=PSMA4 PE=1 SV=1	Urođeni imunosni odgovor, NfκB signalizacija, TRK receptor signaliranje posredovano neurotrofinima
PSA5_HUMAN	6	6	<0,01	2,1	Tip 5 proteosomalna podjedinica alfa OS=Homo sapiens GN=PSMA5 PE=1 SV=3	Urođeni imunosni odgovor, NfκB signalizacija, TRK receptor signaliranje posredovano neurotrofinima
MARCS_HUMAN	11	11	<0,01	2,5	Mirastolirani alaninski C-kinazni substrat OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4	Organizacija aktinskih filamenata
NPM_HUMAN	10	10	<0,01	2,3	Izoforma 2 Nukleofosmina OS=Homo sapiens GN=NPM1	Proces staničnog starenja

RTCB_HUMAN	3	3	<0,01	2,7	tRNA-splicing ligaza, RtcB homolog OS=Homo sapiens GN=C22orf28 PE=1 SV=1	Ekspresija gena, negativna regulacija morfogeneze dendrita
TB182_HUMAN	3	3	<0,01	3,9	182 kDa tankiraza-1-vezujući protein OS=Homo sapiens GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=4	Ekspresija gena
CBX3_HUMAN	3	3	<0,01	3,7	Homolog 3 kromoboks proteina OS=Homo sapiens GN=CBX3 PE=1 SV=4	Negativna regulacija transkripcije
CALU_HUMAN	9	9	<0,01	2,2	Izoforma 3 Kalumenina OS=Homo sapiens GN=CALU	Regeneracija aksona perifernog živčanog sustava
MOES_HUMAN	22	15	<0,01	2,4	Moezin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3	Regulacija staničnog oblika
MARE1_HUMAN	3	3	<0,01	3,4	Mikrotubul-vezujući proteini RP/EB član porodice 1 OS=Homo sapiens GN=MAPRE1 PE=1 SV=3	Stanična dioba
QCR1_HUMAN	4	4	<0,01	2,9	Mitochondrijska podjedinica 1 Citokrom b-c1 kompleksa OS=Homo sapiens GN=UQCRC1 PE=1 SV=3	Stanični metabolički procesi
MX1_HUMAN	13	12	<0,01	3,6	Interferonom induciran GTP-vezujući protein Mx1	Urođeni imunosni

					OS=Homo sapiens GN=MX1 PE=1 SV=4	odgovor
COTL1_HUMAN	5	4	<0,01	4	Protein sličan Koaktozinu OS=Homo sapiens GN=COTL1 PE=1 SV=3	-
1433F_HUMAN	9	4	<0,01	3	14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4	Apoptotski proces
UB2V1_HUMAN	3	1	<0,01	2,4	Izoforma 5 of Ubikvitin konjugirajućeg enzima E2, varijanta 1 OS=Homo sapiens GN=UBE2V1	Urođeni imunosni odgovor, pozitivna regulacija NfκB signalizacije, TLR signaliranje ovisno o MyD88
SYWC_HUMAN	13	12	<0,01	7,5	Citoplazmatska Tryptofan - tRNA ligaza OS=Homo sapiens GN=WARS PE=1 SV=2	Angiogeneza
HCLS1_HUMAN	2	1	<0,01	3,4	Protein specifičan za hematopoetsku liniju OS=Homo sapiens GN=HCLS1	Polimerizacija filamenata aktina
H3BPF6_HUMAN	2	2	<0,01	3,2	Podjedinica 5 Prefoldina OS=Homo sapiens GN=PFDN5 PE=4 SV=1	Smatanje proteina u pravilnu konformaciju

NUCB1_HUMAN	2	2	<0,01	3,4	Nukleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4	Odgovor na cisplatinu
HS90B_HUMAN	30	16	<0,01	2,1	Protein induciran temperaturnim stresom HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	Odgovor na stanični stres
TIF1B_HUMAN	4	4	<0,01	2,7	Izoforma 2 Transkripcijskog intermedijernog faktora 1-beta OS=Homo sapiens GN=TRIM28	Popravak DNK
FUS_HUMAN	4	2	<0,01	2,7	Short izoforma RNA- vezujućeg proteina FUS OS=Homo sapiens GN=FUS	Stanični odgovor na ione kalcija
STAT1_HUMAN	15	12	<0,01	4,3	STAT 1-alfa/beta OS=Homo sapiens GN=STAT1 PE=1 SV=2	JAK-STAT signalna kaskada
E2AK2_HUMAN	2	2	<0,01	2,4	Interferonom inducirana i dvolančanom RNK aktivirana protein kinaza OS=Homo sapiens GN=EIF2AK2 PE=1 SV=2	Imunosni odgovor
E9PRQ7_HUMAN	2	2	<0,01	2,5	Protein 1 sa UBX domenom OS=Homo sapiens	-

					GN=UBXN1 PE=4 SV=1	
MIF_HUMAN	2	2	<0,01	2,1	Inhibitorni faktor migracije makrofaga OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	Imunosni odgovor
APEX1_HUMAN	7	7	<0,01	3,1	DNA-liaza OS=Homo sapiens GN=APEX1 PE=1 SV=2	Popravak DNK oštećenja
TYPH_HUMAN	17	16	<0,01	4,3	Timidin fosforilaza OS=Homo sapiens GN=TYMP PE=1 SV=2	Angiogeneza
LASP1_HUMAN	7	7	<0,01	2,1	Izoforma 2 proteina sa LIM i SH3 domenama OS=Homo sapiens GN=LASP1	Ionski transport
FKBP5_HUMAN	2	2	<0,01	4,5	Peptidil-prolil cis-trans izomeraza FKBP5 OS=Homo sapiens GN=FKBP5 PE=1 SV=2	Smatanje proteina u pravilnu konformaciju posredovano šaperonima
SERPH_HUMAN	11	11	<0,01	5	Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2	Organizacija ekstracelularnog matriksa

ML12A_HUMAN	8	3	<0,01	2,3	Regulatorni laki lanac 12B miozina OS=Homo sapiens GN=MYL12B PE=1 SV=2	-
RALY_HUMAN	3	2	<0,01	2,9	Izoforma 1 RNK-vezujućeg proteina Raly OS=Homo sapiens GN=RALY	Splicing glasničke RNK
RUVB1_HUMAN	5	5	<0,01	2,4	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1	Stanična dioba
GGH_HUMAN	3	3	<0,01	2,1	Gama-glutamil hidrolaza OS=Homo sapiens GN=GGH PE=1 SV=2	Metabolizam glutamina
TAP2_HUMAN	5	5	<0,01	4,7	Transporter 2 peptidnih antigena OS=Homo sapiens GN=TAP2 PE=1 SV=1	Stečeni imunosni odgovor
HOYIZO_HUMAN	2	1	<0,01	5,2	Fragment serinske hidroksimetiltransferaze) OS=Homo sapiens GN=SHMT2 PE=3 SV=1	Metabolizam glicina i serina
JAM1_HUMAN	3	3	<0,01	2,8	Adhezijska molekula A međustaničnih spojnica OS=Homo sapiens GN=F11R	Organizacija ekstracelularnog matriksa

					PE=1 SV=1	
RHOG_HUMAN	3	3	<0,01	3,5	Rho-srodan GTP-vezujući protein RhoG OS=Homo sapiens GN=RHOG PE=1 SV=1	Organizacija aktinskog citoskeleta
RL10A_HUMAN	3	3	<0,01	2,7	60S ribosomalni protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1 SV=2	Metabolizam staničnih proteina
HNRH2_HUMAN	4	1	<0,01	2,2	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein H2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1	Spliceosomalno procesuiranje glasničke RNK
PSME1_HUMAN	12	11	<0,01	2,1	Podjedinica 1 proteasomalnog aktivator kompleksa OS=Homo sapiens GN=PSME1 PE=1 SV=1	Urođeni imunosni odgovor, pozitivna regulacija NfκB signalizacije, TRK receptor signaliranje posredovano neurotrofinima
SERC_HUMAN	4	4	<0,01	3,4	Fosfoferin aminotransferaza OS=Homo sapiens GN=PSAT1 PE=1 SV=2	Biosinteza aminokiselina
RL13A_HUMAN	3	3	<0,01	3	60S ribosomalni protein L13a OS=Homo sapiens GN=RPL13A PE=1 SV=2	Metabolizam staničnih proteina

CAND1_HUMAN	4	4	<0,01	3,7	Izoforma 2 NEDD8- disociirajućeg proteina povezanog s kulinom OS=Homo sapiens GN=CAND1	Stanična diferencijacija
CAZA1_HUMAN	6	5	<0,01	2,2	Podjedinica alfa 1 koja pokriva F-aktin OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	Organizacija aktinskog citoskeleta
LRRF1_HUMAN	4	4	<0,01	2,7	Izoforma 3 leucinom ponavljajućih regija proteina 1 OS=Homo sapiens GN=LRRFIP1	Urođeni imunosni odgovor
NUDC_HUMAN	2	2	<0,01	3,3	Nuklearni migracijski protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	Regulacija staničnog ciklusa
PALLD_HUMAN	5	5	<0,01	2,5	Paladin OS=Homo sapiens GN=PALLD PE=1 SV=3	Organizacija aktinskog citoskeleta
ROAA_HUMAN	6	5	<0,01	2,1	Izoforma 2 heterogenognuklearnog ribonukleoproteina A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB	Epitelno mezenhimalna tranzicija

EF1D_HUMAN	8	2	<0,01	2,8	Izoforma 2 elongacijskog faktora 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D	Metabolizam staničnih proteina
LC7L2_HUMAN	2	2	<0,01	3,8	RNK-vezujući protein Luc7-sličan 2 OS=Homo sapiens GN=LUC7L2 PE=1 SV=2	Splicing glasničkih RNK molekula
PSME2_HUMAN	7	7	<0,01	2,9	Podjedinica 2 proteosomalnog aktivator kompleksa OS=Homo sapiens GN=PSME2 PE=1 SV=4	Urođeni imunosni odgovor, EGFR i NfκB signalni put, TRK receptor signaliranje posredovano neurotrofinima
SRP09_HUMAN	2	2	<0,01	2,3	Izoforma 2 čestice za prepoznavanje signala 9 kDa proteina OS=Homo sapiens GN=SRP9	Metabolizam staničnih proteina
RCN1_HUMAN	3	3	<0,01	3,6	Retikulokalbin-1 OS=Homo sapiens GN=RCN1 PE=1 SV=1	Vezanje kalcij iona
XPO2_HUMAN	3	3	<0,01	3,7	Isoforma 3 eksportina-2 OS=Homo sapiens	Transport staničnih

					GN=CSE1L	proteina
H0YHG0_HUMAN	2	2	<0,01	2,	Fragment nekarakteriziranog proteina OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	-
SF3A1_HUMAN	2	2	<0,01	2,7	Podjedinica 1 splicing faktora 3A OS=Homo sapiens GN=SF3A1 PE=1 SV=1	Regulacija ekspresije gena
LIMA1_HUMAN	3	3	<0,01	2,8	Izoforma 4 aktin -vezujućeg proteina 1 sa LIM domenom OS=Homo sapiens GN=LIMA1	Organizacija aktinskih filamenata
AP2A1_HUMAN	3	3	<0,01	3,6	Izoforma B podjedinice alfa-1 AP-2 kompleksa OS=Homo sapiens GN=AP2A1	Proces endocitoze, EGFR signalni put, signalizacija putem TRK receptora
SYFB_HUMAN	2	2	<0,01	2,3	Beta podjedinica fenilalanin - tRNK ligaze OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=3	Regulacija ekspresije gena
APOL2_HUMAN	3	3	<0,01	2,3	Apolipoprotein L2	Metabolizam

					OS=Homo sapiens GN=APOL2 PE=1 SV=1	lipida
IQGA2_HUMAN	3	1	<0,01	T	Ras GTPazni-aktivirajući protein IQGAP2 OS=Homo sapiens GN=IQGAP2 PE=1 SV=4	Nukleacija aktina putem Arp 2/3 kompleksa
HPRT_HUMAN	2	2	<0,01	5,9	Hipoksantinska-gvaninska fosforiboziltransferaza OS=Homo sapiens GN=HPRT1 PE=1 SV=2	Metabolizam hipoksantina
PP1R7_HUMAN	4	2	<0,01	3,7	Izoforma 3 regulatorne podjedinice 7 protein fosfataze 1 OS=Homo sapiens GN=PPP1R7	Pozitivna regulacije defosforilacije proteina
LUM_HUMAN	18	18	<0,01	3,4	Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	Organizacija izvanstaničnog matriksa
GUAA_HUMAN	2	2	0,010	3,4	Glutamin hidrolizirajuća GMP sintaza OS=Homo sapiens GN=GMPS PE=1 SV=1	Metabolizam glutamina
ISG15_HUMAN	3	3	0,010	5,4	Ubikvitinu sličan protein ISG15 OS=Homo sapiens	Stanični signalni putevi posredovani

					GN=ISG15 PE=1 SV=5	citokinima
TCP4_HUMAN	6	5	0,010	2,8	Aktivirani RNK polimerazni II transkripcijski koaktivator p15 OS=Homo sapiens GN=SUB1 PE=1 SV=3	Regulacija transkripcije
RLA1_HUMAN	4	3	0,010	2,9	60S kiseli ribosomalni protein P1 OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=1 SV=1	Metabolizam staničnih proteina
LAMC2_HUMAN	4	4	0,010	8,4	Gama- 2 podjedinica laminina OS=Homo sapiens GN=LAMC2 PE=1 SV=2	Stanična adhezija
SET_HUMAN	6	6	0,011	2,1	Izoforma 2 SET proteina OS=Homo sapiens GN=SET	Replikacija DNK
K2C75_HUMAN	16	2	0,011	2,1	Tip II citoskeletnog keratina 75 OS=Homo sapiens GN=KRT75 PE=1 SV=2	-
TOM22_HUMAN	2	2	0,011	3,1	TOM22 homologna podjedinica mitohondrijskog receptora OS=Homo sapiens GN=TOMM22 PE=1 SV=3	Makroautofagija
Q5TEC6_HUMAN	3	1	0,012	3,6	Histon H3 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3PS2 PE=1 SV=1	-

SSBP_HUMAN	5	5	0,012	2,5	Mitohondrijski protein koji veže jednolančanu DNK OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=1 SV=1	Replikacija DNK molekule
TAP1_HUMAN	3	3	0,012	4,9	Transporter peptidnih antigena 1 OS=Homo sapiens GN=TAP1 PE=1 SV=2	Stečeni imunosni odgovor
HNRPL_HUMAN	11	11	0,012	2,7	Heterogeni nuklearni ribunukleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNRNPL PE=1 SV=2	Procesuiranje RNK molekula
COR1C_HUMAN	5	5	0,013	3,1	Koronin-1C OS=Homo sapiens GN=CORO1C PE=1 SV=1	Organizacija aktinskog citoskeleta
IF2B_HUMAN	3	3	0,013	2,3	Podjedinica 2 eukariotskog translacijskog faktora inicijacije 2 OS=Homo sapiens GN=EIF2S2 PE=1 SV=2	Metabolizam staničnih proteina
RANG_HUMAN	4	4	0,013	2,1	Ran-specifičan GTPazni-aktivirajući protein OS=Homo sapiens GN=RANBP1 PE=1 SV=1	Unutarstanični transport
PLSL_HUMAN	29	22	0,013	3,1	Plastin-2 OS=Homo sapiens GN=LCP1 PE=1 SV=6	Reorganizacija ekstracelularnog

						matriksa
ERP44_HUMAN	3	2	0,013	2,1	Protein endoplazmatskog retikuluma 44 OS=Homo sapiens GN=ERP44 PE=1 SV=1	Metabolizam glikoproteina
CHM4B_HUMAN	3	3	0,013	2,4	Nabijen protein 4b multivezikularnog tjelešca OS=Homo sapiens GN=CHMP4B PE=1 SV=1	Regulacija staničnog ciklusa
DDX17_HUMAN	11	7	0,014	2,1	Izoforma 4 RNK helikaze DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17	Pozitivna regulacija transkripcije
SFPQ_HUMAN	7	6	0,014	2,2	Kratka izoforma splicing faktora bogatog prolinom i leucinom OS=Homo sapiens GN=SFPQ	Alternativni splicing glasničke RNK molekule
PHB2_HUMAN	6	6	0,015	2,1	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=1 SV=2	Regulacija transkripcije
HG2A_HUMAN	5	5	0,015	2,6	Izoforma 2 gama lanca histokompatibilnog antigena HLA razreda II OS=Homo sapiens GN=CD74	Stečeni imunosni odgovor

AN32B_HUMAN	4	2	0,015	2,3	Izoforma 2 kiselog leucinom bogatog nuklearnog fosfoproteina 32 OS=Homo sapiens GN=ANP32B	Aktivacija endopeptidaza uključenih u proces apoptoze
UB2L3_HUMAN	5	5	0,015	2,3	Ubikvitin-konjugirajući enzim E2 L3 OS=Homo sapiens GN=UBE2L3 PE=1 SV=1	Regulacija transkripcije
PERP1_HUMAN	6	6	0,015	2,8	Protein endoplazmatskog reikuluma induciranog plazma stanicama OS=Homo sapiens GN=PACAP PE=1 SV=1	Proces apoptoze
GLU2B_HUMAN	10	10	0,016	2,2	Izoforma 2 beta podjedinice glukozidaze 2 OS=Homo sapiens GN=PRKCSH	Metabolizam staničnih proteina
RAC2_HUMAN	4	2	0,016	3,4	Ras-srodan C3 substrat 2 toksina botulina OS=Homo sapiens GN=RAC2 PE=1 SV=1	Kemotaksija
DDX21_HUMAN	3	3	0,016	2,5	Izoforma 2 RNK helikaze 2 nukleolusa OS=Homo sapiens	Procesuiranje ribosomalne RNK molekule

					GN=DDX21	
LA_HUMAN	5	5	0,016	2,4	Lupus La protein OS=Homo sapiens GN=SSB PE=1 SV=2	-
ARPC3_HUMAN	4	4	0,016	2,2	Actin-povezani protein 2/3 kompleksa podjedinica 3 OS=Homo sapiens GN=ARPC3 PE=1 SV=3	Nukleacija aktina putem Arp 2/3 kompleksa
CATS_HUMAN	2	2	0,016	3	Izoforma 2 of katepsina S OS=Homo sapiens GN=CTSS	Stečeni imunosni odgovor
PERM_HUMAN	9	9	0,017	3,1	Izoforma H7 mijeloperoksidaze OS=Homo sapiens GN=MPO	Katabolizam vodikovog peroksida
1C06_HUMAN	8	2	0,017	6,3	Cw-6 alfa lanac histokompatibilnog antigena HLA razreda I OS=Homo sapiens GN=HLA-C PE=1 SV=2	Regulacija imunosnog odgovora
METK2_HUMAN	2	2	0,017	2,3	Tip-2 izoforma S-adenozilmetionin sintaze OS=Homo sapiens GN=MAT2A PE=1 SV=1	Metabolizam malih molekula

GLRX1_HUMAN	2	2	0,017	3,8	Glutaredoksin-1 OS=Homo sapiens GN=GLRX PE=1 SV=2	Homeostaza staničnog redoks sustava
LSM2_HUMAN	2	2	0,017	2,1	U6 snRNA-asocirani Sm-slični protein LSm2 OS=Homo sapiens GN=LSM2 PE=1 SV=1	Regulacija ekspresije gena
LAD1_HUMAN	5	5	0,018	4	Ladinin-1 OS=Homo sapiens GN=LAD1 PE=1 SV=2	-
GANAB_HUMAN	22	1	0,018	7,4	Izoforma 2 neutralne alfa- glukozidaze AB OS=Homo sapiens GN=GANAB	Posttranslacijska modifikacija proteina
MYH9_HUMAN	68	53	0,018	2,2	Miozin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	Reorganizacija aktinskog citoskeleta
DDX6_HUMAN	3	3	0,018	2,4	RNK helikaza DDX6 OS=Homo sapiens GN=DDX6 PE=1 SV=2	Regulacija ekspresije gena, negativna regulacija neuralne diferencijacije
HNRL2_HUMAN	5	5	0,018	2,1	Heterogeni jezgrin ribonukleoprotein U-sličan protein 2 OS=Homo sapiens	-

					GN=HNRNPUL2 PE=1 SV=1	
RS5_HUMAN	2	2	0,018	2,1	40S ribosomalni protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=4	Metabolizam staničnih proteina
E7EVA0_HUMAN	7	6	0,019	2,2	Protein vezan uz mikrotubule OS=Homo sapiens GN=MAP4 PE=4 SV=1	-
GSTP1_HUMAN	18	18	0,019	2,1	Glutation S -transferaza P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2	Konjugacija reduciranog glutaciona na endo/egzogene hidrofobne elektrofile, negativna regulacija Erk 1 i 2 signalne kaskade
H2B3B_HUMAN	9	1	0,019	3,1	Histon H2B tip 3-B OS=Homo sapiens GN=HIST3H2BB PE=1 SV=3	Organizacija kromatina
AT2B4_HUMAN	2	2	0,020	2,66 3	Izoforma XB membranske kalcij -transportne ATPaze 4 OS=Homo sapiens GN=ATP2B4	Homeostaza kalcij iona u stanici
NIBAN_HUMAN	3	3	0,020	2,5	Protein Niban OS=Homo sapiens	Odgovor na stres

					GN=FAM129A PE=1 SV=1	
GDIR2_HUMAN	5	5	0,020	2,2	Rho GDP-inhibitor disocijacije 2 OS=Homo sapiens GN=ARHGDIB PE=1 SV=3	Organizacija aktinskog citoskeleta
PSB2_HUMAN	3	3	0,021	3,4	Proteosomalna podjedinica tip-2 beta OS=Homo sapiens GN=PSMB2 PE=1 SV=1	Urođeni imunosni odgovor, NfκB signalizacija, signalizacija putem TRK receptora posredovana neurotrofinima
K1C14_HUMAN	53	20	0,021	7,9	Tip I citoskeletnog keratina 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	Diferencijacija epitelnih stanica
PSPC1_HUMAN	2	2	0,022	2,5	'Paraspeckle' komponenta 1 OS=Homo sapiens GN=PSPC1 PE=1 SV=1	Regulacija transkripcije
LSP1_HUMAN	6	6	0,022	3,8	Protein 1 specifičan za limfocite OS=Homo sapiens GN=LSP1 PE=1 SV=1	Kemotaksija
NONO_HUMAN	4	3	0,022	2,7	Oktamer-vezujući protein s domenom Ne-POU OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4	Popravlak DNK oštećenja
BASI_HUMAN	2	2	0,022	10,6	Izoforma 4 bazigina	Organizacija ekstracelularnog

					OS=Homo sapiens GN=BSG	matriksa
PSMD5_HUMAN	2	2	0,023	2,2	26S ne-ATPazna regulatorna podjedinica 5 proteasoma OS=Homo sapiens GN=PSMD5 PE=1 SV=3	Urođeni imunosni odgovor, NfκB signalizacija, signalizacija putem TRK receptora posredovana neurotrofinima
ALDOC_HUMAN	8	3	0,023	2,7	Fruktoza-bifosfat aldolaza C OS=Homo sapiens GN=ALDOC PE=1 SV=2	Glikoliza
HNRPF_HUMAN	5	3	0,023	2,3	Heterogeni nuklearni ribonuklearni protein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3	Regulacija genske ekspresije
RSMB_HUMAN	4	3	0,023	3,3	Izoforma SM-B1 malih nuklearnih proteina B i B' OS=Homo sapiens GN=SNRNP	Procesuiranje glasničke RNK
CATC_HUMAN	6	6	0,024	3	Dipeptidil peptidaza 1 OS=Homo sapiens GN=CTSC PE=1 SV=2	Stanični katabolički procesi
1433T_HUMAN	14	7	0,024	2,2	14-3-3 protein teta OS=Homo sapiens GN=YWHAQ PE=1 SV=1	Intrinistički apoptotski signalni put

CD14_HUMAN	2	2	0,024	2,2	Antigen diferencijacije monocita CD14 OS=Homo sapiens GN=CD14 PE=1 SV=2	Urođeni imunosni odgovor
2B19_HUMAN	3	1	0,025	2,2	DRB1-9 beta lanac histokompatibilnog antigena HLA razreda II OS=Homo sapiens GN=HLA-DRB1 PE=1 SV=1	Humoralni imunosni odgovor posredovan molekulama imunoglobulina
H0Y6E7_HUMAN	3	2	0,025	2,2	RNA-vezujući motiv protein, X kromosom (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=4 SV=2	-
LEG1_HUMAN	10	10	0,025	2,1	Galektin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2	Apoptotski proces
G8JLB6_HUMAN	7	3	0,025	2,2	Heterogeni nuklearni ribonuklearni protein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=4 SV=1	-
IMB1_HUMAN	6	6	0,026	2,5	Podjedinica beta-1 importina OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2	Apoptotska DNK fragmentacija
1B41_HUMAN	9	3	0,026	3,3	B-41 alfa lanac histokompatibilnog antigena HLA razreda I OS=Homo sapiens GN=HLA-	Regulacija imunosnog odgovora

					B PE=1 SV=1	
TENA_HUMAN	39	39	0,026	3,5	Izoforma 4 tenascina OS=Homo sapiens GN=TNC	Stanična adhezija, proces zacijeljivanja
SYAC_HUMAN	7	7	0,026	3,3	Citoplazmatska alanin-tRNK ligaza OS=Homo sapiens GN=AARS PE=1 SV=2	Biosinteza proteina
COCA1_HUMAN	21	21	0,026	3,5	Izoforma 4 kolagen alfa-1(XII) lanca OS=Homo sapiens GN=COL12A1	Organizacija kolegenskih fibrila
RHOA_HUMAN	4	3	0,026	3	Transformirajući protein RhoA OS=Homo sapiens GN=RHOA PE=1 SV=1	Pozitivna regulacija I κ B/Nf κ B signalizacije, signalizacija putem TRK receptora posredovana neurotropinima
PRP19_HUMAN	2	2	0,027	3,2	Pre-gRNK-procesirajući faktor 19 OS=Homo sapiens GN=PRPF19 PE=1 SV=1	Popravlak DNK oštećenja
THIC_HUMAN	4	4	0,027	2,1	Citosolna acetil-CoA acetiltransferaza	Metabolizam lipida

					OS=Homo sapiens GN=ACAT2 PE=1 SV=2	
RL27_HUMAN	3	3	0,027	2,7	60S ribosomalni protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2	Metabolizam staničnih proteina
DHAK_HUMAN	3	3	0,028	2,9	Bifunkcionalni ATP-ovisna dihidroksi-aceton kinaza/FAD- AMP liaza (ciklizirajuća) OS=Homo sapiens GN=DAK PE=1 SV=2	Metabolizam ugljikohidrata
SAMH1_HUMAN	13	12	0,028	2,1	Protein 1 sa SAM i HD domenama OS=Homo sapiens GN=SAMHD1 PE=1 SV=2	Urođeni imunosni odgovor
4F2_HUMAN	7	7	0,028	5,8	Izoforma 4 teškog lanca 4F2 antigena na površini stanice OS=Homo sapiens GN=SLC3A2	Transport aminokiselina
HNRPM_HUMAN	17	16	0,029	2,1	Izoforma 2 heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM	Procesuiranje glasničke RNK molekule
DSC3_HUMAN	3	3	0,030	2,5	3B izoforma desmokolina-3	Stanična

					OS=Homo sapiens GN=DSC3	adhezija
BOLA2_HUMAN	2	2	0,031	13,4	Izoforma 2 proteina 2 sličnom Bola proteinu OS=Homo sapiens GN=BOLA2	-
D6RB85_HUMAN	3	1	0,032	T	Kalneksin (fragment) OS=Homo sapiens GN=CANX PE=3 SV=1	Smatanje proteina u pravilnu konformaciju
RLA2_HUMAN	6	2	0,032	2	60S kiseli ribosomalni protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1	Regulacija ekspresije gena
SF01_HUMAN	3	3	0,033	3,5	Izoforma 6 splicing faktora 1 OS=Homo sapiens GN=SF1	Regulacija transkripcije
B3KUK2_HUMAN	9	9	0,033	2,3	Superoksid dismutaza OS=Homo sapiens GN=SOD2 PE=2 SV=1	Negativna regulacija intrinističkog apoptotskog signalnog puta uzrokovanog oksidativnim stresom
LAMB3_HUMAN	8	8	0,034	3,6	Beta-3 podjedinica laminina OS=Homo sapiens GN=LAMB3 PE=1 SV=1	Stanična adhezija

FSCN1_HUMAN	14	14	0,035	2,9	Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 PE=1 SV=3	Organizacija aktinskog citoskeleta
DRA_HUMAN	4	4	0,036	3,7	DR alfa lanac histokompatibilnog antigena HLA razreda II OS=Homo sapiens GN=HLA- DRA PE=1 SV=1	Imunosni odgovor
H0YAS8_HUMAN	2	1	0,036	3	Beta lanac klasterina OS=Homo sapiens GN=CLU PE=4 SV=1	-
PPIC_HUMAN	2	2	0,037	3,3	Peptidil-prolil cis-trans izomeraza C OS=Homo sapiens GN=PPIC PE=1 SV=1	Smatanje proteina u pravilnu konformaciju
RTN4_HUMAN	6	5	0,037	2,1	Retikulon-4 OS=Homo sapiens GN=RTN4 PE=1 SV=2	Splicing transportne RNK molekule
H0YGY9_HUMAN	2	2	0,037	3,6	tRNK 2'-fosfotransferaza 1 (fragment) OS=Homo sapiens GN=TRPT1 PE=4 SV=1	Splicing transportne RNK molekule
FA49B_HUMAN	4	4	0,038	4	Protein FAM49B OS=Homo sapiens	-

					GN=FAM49B PE=1 SV=1	
PTMA_HUMAN	6	6	0,038	2,4	Izoforma 2 protomiozina alfa OS=Homo sapiens GN=PTMA	Transkripcija
ELOB_HUMAN	3	3	0,039	2	Transkripcijski elongacijski faktor B, polipeptid 2 OS=Homo sapiens GN=TCEB2 PE=1 SV=1	Stanični odgovor na hipoksiju
PSMD1_HUMAN	5	4	0,040	2,4	Izoforma 2 26S proteosomalne ne-ATPazne regulatorne podjedinice 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1	Urođeni imunosni odgovor, EGFR signalizacija i NfκB signalizacija, signalizacija putem TRK receptora posredovana neurotropinima
YBOX1_HUMAN	5	4	0,040	2,2	Vezujući protein 1 s elementom osjetljivosti na nukleaze OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3	CRD- posredovana stabilizacija glasničke RNK molekule
K1967_HUMAN	3	3	0,040	3	Izoforma 2 podjedinice KIAA1967 DBIRD kompleksa OS=Homo sapiens GN=KIAA1967	Stanični odgovor na oštećenje DNK molekule

AMPL_HUMAN	18	18	0,042	2,2	Izoforma 2 citosolne aminopeptidaze OS=Homo sapiens GN=LAP3	Proteoliza
KHDR1_HUMAN	2	2	0,042	3,2	Protein 1 s domenom KH, RNA-vezujući, povezan sa signalnom transdukcijom OS=Homo sapiens GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1	Zastoj staničnog ciklusa
H2B1K_HUMAN	10	1	0,043	2,6	Histone H2B tip F-S OS=Homo sapiens GN=H2BFS PE=1 SV=2	Urođeni imunosni odgovor na području sluznice
RAB5C_HUMAN	4	3	0,044	2,5	Ras-srodan protein Rab-5C OS=Homo sapiens GN=RAB5C PE=1 SV=2	Endosomalna organizacija
GT251_HUMAN	2	2	0,044	2,6	Prokolagen galaktoziltransferaza 1 OS=Homo sapiens GN=GLT25D1 PE=1 SV=1	Organizacija ekstracelularnog matriksa
PUR6_HUMAN	5	5	0,047	2,5	Izoforma 2 multifunkcionalnog proteina ADE2 OS=Homo sapiens GN=PAICS	"de novo" biosintetski proces IMP-a
MPRD_HUMAN	2	2	0,047	7,8	Kation -ovisni manozni-6- fosfatni receptor OS=Homo sapiens GN=M6PR PE=1 SV=1	Endocitoza posredovana receptorima
STML2_HUMAN	3	3	0,047	3	Protein 2 sličan stomatinu	Homeostaza kalcij iona unutar

					OS=Homo sapiens GN=STOML2 PE=1 SV=1	stanice
--	--	--	--	--	--	---------

Tablica 11. Popis identificiranih proteina s povećanom razinom ekspresije u okolnomu tumorom nezahvaćenom tkivu pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana. Kratice: P-broj identificiranih peptida; Q- broj peptida korišten za relativnu kvantifikaciju pomoću spektrometrije masa; FC-povećanje relativne razine ekspresije proteina u odnosu na tumorska tkiva

Oznaka proteina prema Uniprot. bazi podataka	P	Q	Parni t- test (p)	FC	Protein	Biološki proces
SAMP_HUMAN	3	3	<0,01	3,3	Serum amiloidna P- komponenta OS=Homo sapiens GN=APCS PE=1 SV=2	Urođeni imunološki odgovor
ITIH2_HUMAN	10	9	<0,01	2,7	H2 teški lanac inhibitora inter-alfa tripsina OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=1 SV=2	Negativna regulacija endopeptidazne aktivnosti
HEP2_HUMAN	3	3	<0,01	6,8	Heparinski kofaktor 2 OS=Homo sapiens GN=SERPIND1	Kemotaksija

					PE=1 SV=3	
ITIH4_HUMAN	10	10	<0,01	2,9	Izoforma 2 H4 teškog lanca inhibitora inter-alfa tripsina OS=Homo sapiens GN=ITIH4	Odgovor akutne faze, negativna regulacija endopeptidazne aktivnosti
ANT3_HUMAN	9	9	<0,01	2,9	Antitrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	Održavanje hemostaze
FIBA_HUMAN	30	30	<0,01	2,7	Izoforma 2 alfa lanca fibrinogena OS=Homo sapiens GN=FGA	Urođeni i stečeni imunološki odgovor, pozitivna regulacija Erk 1 i 2 signalne kaskade
C4BPA_HUMAN	4	4	<0,01	4,8	Alfa lanac C4b- vezujućeg proteina GN=C4BPA PE=1 SV=2	Urođeni imunološki odgovor
A2MG_HUMAN	53	52	<0,01	2,6	Alfa-2- makroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3	Organizacija ekstracelularnog matriksa
CERU_HUMAN	20	19	<0,01	3,1	Ceruloplazmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	Homeostaza iona unutar stanice

SODE_HUMAN	2	2	<0,01	7,4	Ekstracelularna superoksid dismutaza [Cu-Zn] OS=Homo sapiens GN=SOD3 PE=1 SV=2	Uklanjanje superoksidnih radikala
CO3_HUMAN	8	6	<0,01	3,5	Faktor komplementa B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=2 SV=1	Imunološki i upalni odgovor
CAH2_HUMAN	8	8	<0,01	2,4	Ugljična anhidraza 2 OS=Homo sapiens GN=CA2	Signalni put aktiviran angiotenzinom, morfogeneza epitela
APOB_HUMAN	49	48	<0,01	2,9	Apolipoprotein B- 100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2	Metabolizam kolesterola i lipida
COEA1_HUMAN	25	24	<0,01	2,9	Izoforma 2 alfa lanca kolagena (XIV) OS=Homo sapiens GN=COL14A1	Organizacija fibrila kolagena
CO3_HUMAN	66	64	<0,01	2,8	Komplement C3 OS=Homo sapiens	Imunološki i upalni odgovor

					GN=C3 PE=1 SV=2	
HPT_HUMAN	24	20	<0,01	2,9	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	Imunološki odgovor
AFAM_HUMAN	3	3	<0,01	3,4	Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	Transport vitamina
HEMO_HUMAN	15	14	<0,01	2,8	Hemopeksin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	Homeostaza iona željeza u stanici
CAH1_HUMAN	16	16	<0,01	2	Ugljična anhidraza 1 OS=Homo sapiens GN=CA1	Transport bikarbonat iona
A1AG1_HUMAN	10	7	<0,01	2,5	Alfa1-kiseli glikoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	Regulacija procesa imunskog sustava
AACT_HUMAN	8	8	<0,01	3	Alfa-1- antikimotripsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3	Odgovor na upalu
MIME_HUMAN	9	9	<0,01	4,4	Mimekan OS=Homo sapiens	Metabolički procesi proteoglikana, organizacija

					GN=OGN PE=1 SV=1	izvanstaničnog matriksa
KNG1_HUMAN	6	6	<0,01	4,1	LMW izoforma kininogena-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1	Proces grušanja krvi
APOD_HUMAN	3	3	<0,01	3,5	Apolipoprotein D OS=Homo sapiens GN=APOD PE=1 SV=1	Transport, odgovor na reaktivne vrste kisika
A1BG_HUMAN	8	8	<0,01	3,9	Alfa1-B glikoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	-
FIBB_HUMAN	26	25	<0,01	2,4	Beta lanac fibrinogena OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2	Stečeni imunološki odgovor, pozitivna regulacija Erk 1 i 2 signalne kaskade
ALBU_HUMAN	67	61	<0,01	2,7	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	Transport
A1AT_HUMAN	31	31	<0,01	2,8	Alfa-1-antitripsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	Odgovor akutne faze

E9PBV3_HUMAN	7	7	<0,01	5,3	Suprabazin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=4 SV=1	-
SBP1_HUMAN	8	8	<0,01	3,2	Selenij-vezujući protein 1 OS=Homo sapiens GN=SELENBP1 PE=1 SV=2	Transport proteina
MYL9_HUMAN	6	1	<0,01	2,2	Miozinski regulatorni laki polipeptid 9 OS=Homo sapiens GN=MYL9 PE=1 SV=4	Transdukcija signala posredovana malim GTPazama
A6H8M8_HUMAN	19	19	<0,01	2,4	C4A protein OS=Homo sapiens GN=C4A PE=2 SV=1	Imunološki i upalni odgovor
EST1_HUMAN	7	7	<0,01	5	Izoforma 2 jetrene karboksilesteraze 1 OS=Homo sapiens GN=CES1	Diferencijacija epitelnih stanica
PGS2_HUMAN	8	7	<0,01	3,6	Dekorin OS=Homo sapiens GN=DCN PE=1 SV=1	Biosinteza i metabolizam ugljikohidrata i proteoglikana, organizacija izvanstaničnog matriksa

HSPB6_HUMAN	3	3	<0,01	8,7	Beta-6 protein temperaturnog stresa OS=Homo sapiens GN=HSPB6 PE=1 SV=2	Odgovor na stanični stres
FHL1_HUMAN	3	3	<0,01	3,7	Izoforma 1 proteina 1 četiri i pol LIM domena OS=Homo sapiens GN=FHL1	Stanična diferencijacija
TTHY_HUMAN	5	5	<0,01	2,8	Transtiretin OS=Homo sapiens GN=TTR PE=1 SV=1	Organizacija ekstracelularnog matriksa
A2AP_HUMAN	2	2	<0,01	8,3	Alfa-2-antiplazmin OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=1 SV=3	Odgovor akutne faze
KV310_HUMAN	2	2	<0,01	2,7	Regija VH Ig kapa lanca V-III (fragment) OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	Regulacija procesa povezanih sa imunološkim odgovorom
TENX_HUMAN	20	19	<0,01	3,9	Izoforma 3 of tenascina-X OS=Homo sapiens GN=TNXB	Organizacija ekstracelularnih fibrila

B3AT_HUMAN	9	9	<0,01	2,7	Band 3 anionski transportni protein OS=Homo sapiens GN=SLC4A1 PE=1 SV=3	Transmembranski transport aniona
IGHG4_HUMAN	15	4	<0,01	2,7	Ig gamma-4 chain C regija Ig gama-4 lanca OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1	Urođeni imunološki odgovor
ADDA_HUMAN	3	3	0,010	2,7	Izoforma 3 of alfa-aducina OS=Homo sapiens GN=ADD1_HUMAN]	Organizacija aktinskog citoskeleta, stanična morfogeneza
VTDB_HUMAN	12	12	0,010	2,1	Izoforma 3 vitamin D-vezujućeg proteina OS=Homo sapiens GN=GC	Transport
TARSH_HUMAN	3	3	0,012	2,4	Meta proteina Nesh-SH3 OS=Homo sapiens GN=ABI3BP PE=1 SV=1	Organizacija ekstracelularnog matriksa
A1AG2_HUMAN	7	4	0,012	3,4	Alfa-1-kiseli glikoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=2	Regulacija procesa povezanih sa imunološkim odgovorom

TRFE_HUMAN	42	42	0,012	2,6	Serotransferin OS=Homo sapiens GN=TF	Homeostaza iona željeza unutar stanice
PRELP_HUMAN	17	17	0,013	2,7	Prolargin OS=Homo sapiens GN=PRELP PE=1 SV=1	Metabolizam ugljikohidrata i proteoglikana
6PGD_HUMAN	11	10	0,014	2,1	Dekarboksilirajuća 6-fosfoglukonat dehidrogenaza OS=Homo sapiens GN=PGD PE=1 SV=3	Metabolizam ugljikohidrata
FETUA_HUMAN	7	6	0,014	3	Alfa-2-HS- glikoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	Mineralna ravnoteža
ANGT_HUMAN	6	5	0,015	2,5	Angiotenzinogen OS=Homo sapiens GN=AGT PE=1 SV=1	Adhezija stanica na izvanstanični matriks
IGHA1_HUMAN	16	5	0,017	3,4	C regija Ig alfa-1 lanca OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	Urođeni imunološki odgovor

HBG2_HUMAN	6	1	0,017	2,1	Podjedinica gama-2 hemoglobina OS=Homo sapiens GN=HBG2 PE=1 SV=2	Grušanje krvi
F13A_HUMAN	10	9	0,019	2,4	A lanac koagulacijskog faktora XIII OS=Homo sapiens GN=F13A1 PE=1 SV=4	Grušanje krvi
VWF_HUMAN	2	2	0,021	5,4	von Willebrand faktor OS=Homo sapiens GN=VWF PE=1 SV=4	Grušanje krvi, stanična adhezija
AGR2_HUMAN	3	3	0,022	4,5	Homolog anteriornog gradijentnog proteina 2 homolog OS=Homo sapiens GN=AGR2 PE=1 SV=1	Diferencijacija Gobeltovih stanica pluća, stanična adhezija
APOA1_HUMAN	17	14	0,022	2,1	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	Metabolizam i transport kolesterola i lipida
EVPL_HUMAN	16	14	0,024	3,5	Envoplakin	Diferencijacija keratinocita

					OS=Homo sapiens GN=EVPL PE=1 SV=3	
A2GL_HUMAN	7	7	0,024	3,3	Alfa-2-glikoprotein bogat leucinom OS=Homo sapiens GN=LRG1 PE=1 SV=2	Diferencijacija smeđih masnih stanica
AKA12_HUMAN	5	5	0,024	9,3	Izoforma 3 A-kinaze vezujućeg proteina 12 OS=Homo sapiens GN=AKAP12	Pozitivna regulacija sinteze cikličkog AMP
CEAM5_HUMAN	2	2	0,025	3,3	Stanična adhezijska molekula 5 srodna karcinoembrionalno m antigenu OS=Homo sapiens GN=CEACAM5 PE=1 SV=3	Negativna regulacija anoikisa i apoptoze
TRYB2_HUMAN	9	9	0,026	3,3	Beta-2 triptaza OS=Homo sapiens GN=TPSB2 PE=1	Endopeptidazna aktivnost
SDPR_HUMAN	2	2	0,027	2,4	Protein odgovora na deprivaciju serumom OS=Homo sapiens GN=SDPR PE=1 SV=3	-
H7BZB5_HUMAN	2	1	0,029	8,4	STAT 1-alfa/beta OS=Homo sapiens	Transdukcija staničnih signala

					GN=STAT1 PE=4 SV=1	
LV204_HUMAN	2	2	0,044	3	Regija TRO Ig lambda lanca V-II OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	Urođeni imunološki odgovor
KV204_HUMAN	2	2	0,044	2,7	Regija TEW Ig kapa lanca V-II OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	Regulacija procesa imunološkog odgovora
LV105_HUMAN	2	2	0,049	3,2	Regija NEWM Ig lambda lanca V-I OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	Urođeni imunološki odgovor

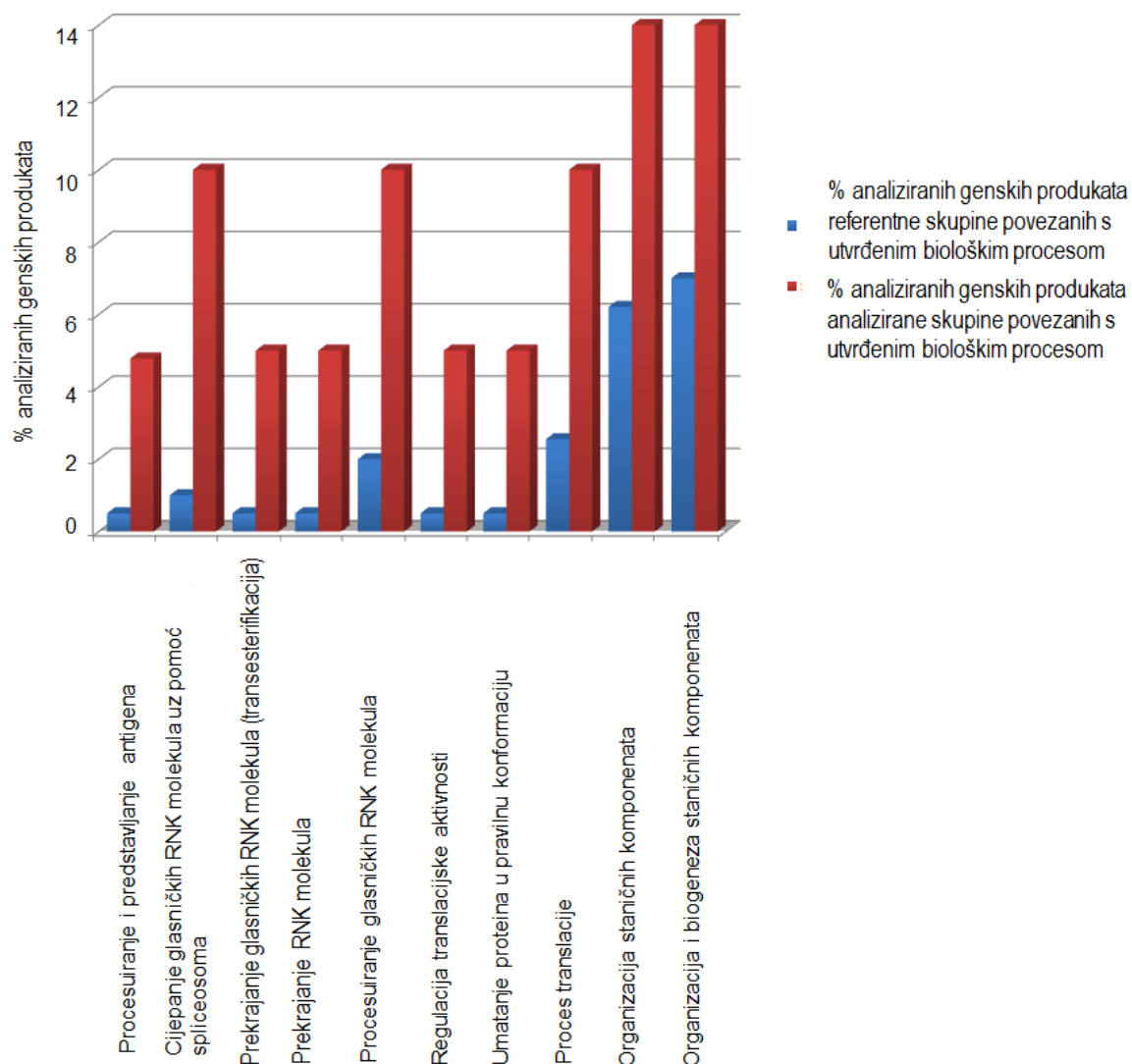
4.2. Bioinformatička analiza rezultata kvantitativnoga proteomskog profila uzoraka metastatskoga tkiva

U svrhu utvrđivanja najvažnijih bioloških procesa povezanih s metastaziranjem i patogenezi bolesti i svrstavanja proteina u određene proteinske razrede je na temelju kvantitativnih rezultata analize spektrometrije masa izvršena skupna klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina uz pomoć PANTHER proteomske/genomske funkcionalne baze podataka (www.pantherdb.org). To je klasifikacijska baza koja integrira i svrstava veliku količinu podataka u genske i proteinske porodice te s njima funkcionalno povezane podskupine. *Gene Ontology* anotacija (engl. *PANTHER GO-slim*) i statistički alati (binominalni statistički test) omogućuju simultano ili pojedinačno klasificiranje genskih produkata prema molekularnoj funkciji, pripadnosti proteinskom razredu, uključenosti u biološke procese, subcelularnoj lokalizaciji i slično. Skupna klasifikacija diferencijalno

ekspimiranih proteina je uz pomoć baze podataka PANTHER u ovoj doktorskoj disertaciji izvršena prema njihovoj uključenosti u biološke procese, pripadnosti proteinskim razredima i lokalizaciji unutar stanice, zasebno za proteine s utvrđenom povećanom razinom ekspresije u tumorskom i okolnomu tumorom nezahvaćenom tkivu.

4.2.1. Rezultati PANTHER klasifikacijske analize ukupnoga diferencijalnog proteomskog profila uzoraka metastatskoga tkiva

Utvršeni najznačajniji biološki procesi povezani su s patogeneзом bolesti i procesom metastaziranja uz pomoć klasifikacije platformom PANTHER, a cijeli je set diferencijalno ekspimiranih proteina u tumorskim tkivima analiziran uz pomoć funkcije PANTHER GO-slim (engl. *PANTHER overrepresentation test*). Ova se funkcija koristi statističkim alatima za grupiranje analiziranih skupina genskih produkata u određene ontološke grupe (Gene Ontology) čime se može analizirati status određenoga biološkog procesa. U ovoj su doktorskoj disertaciji proteini s pojačanom razinom ekspresije u tumorskom tkivu analizirani prema unaprijed određenim postavkama platforme PANTHER, a kao referentna skupina gena za usporedbu je korišten genom čovjeka (*Homo sapiens*) s ukupnom referentnom skupinom 20814 gena. PANTHER klasifikacija i statistička analiza pokazala je 10 statistički značajnih ($p < 0.05$) bioloških procesa povezanih s diferencijalno ekspimiranim proteinima u tumorskom tkivu koji su bili povećani najmanje dva puta u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata (slika 3, tablica 12). Biološki procesi s najvećom statističkom značajnošću povećani su za više od pet puta u odnosu na referentnu skupinu gena; radi se o procesima procesiranja molekula RNK (npr. procesiranje glasničke RNK molekule uz pomoć tzv. splicesoma i procesiranje molekula ribonukleinskih kiselina putem reakcija transesterifikacije), regulacije translacije, smatanja proteina i procesima povezanim s imun

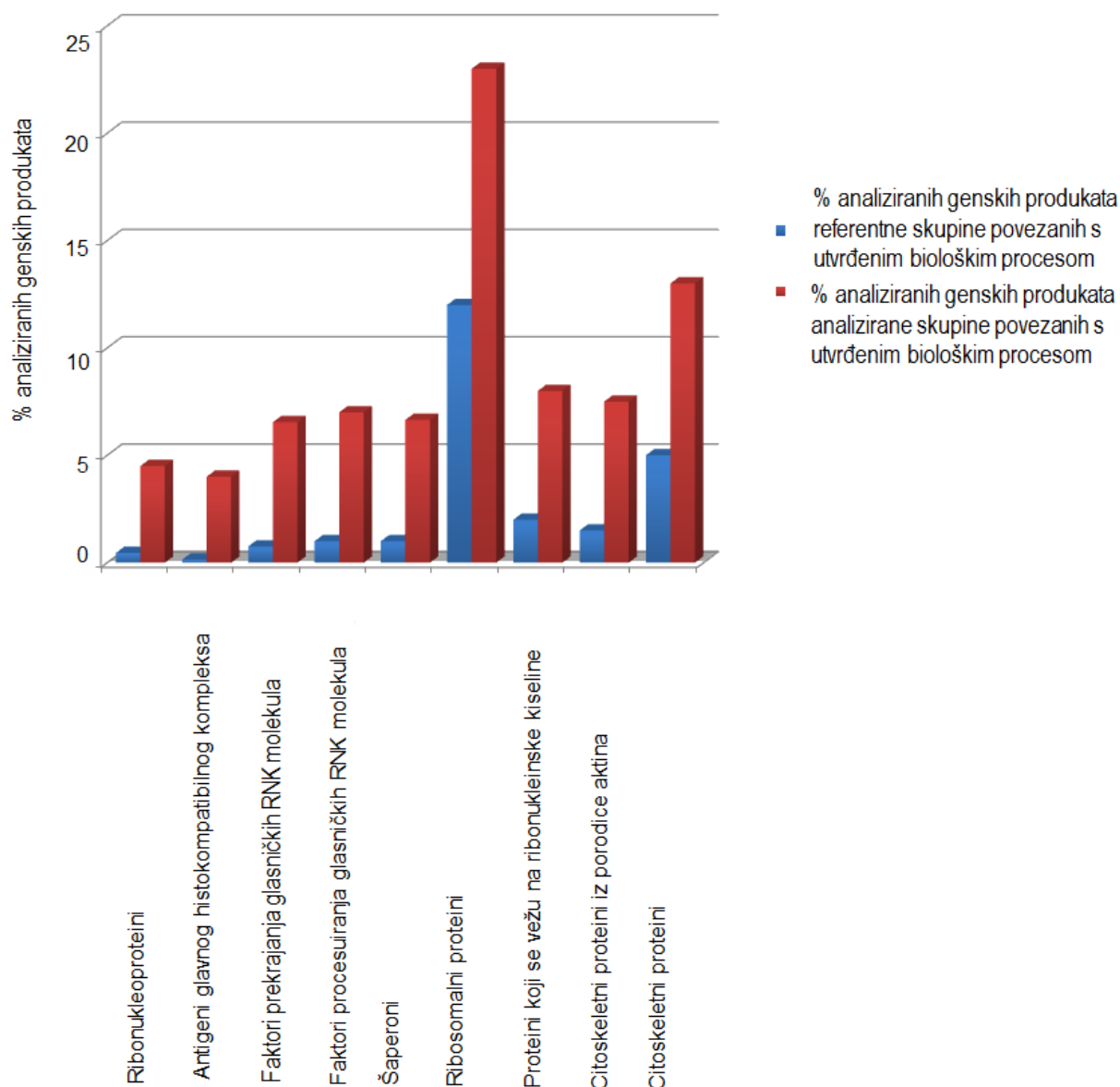


Slika 3. Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa pri $p < 0.05$ u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini tumorskih tkiva (analizirana skupina gena) utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER (engl. *PANTHER overrepresentation test*): stupići prikazuju razinu povećanja procesa u odnosu na

Tablica 12. Statistički značajni biološki procesi pri $p < 0.05$ u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorskim tkivima utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER. U svrhu višestrukoga statističkog testiranja, p-vrijednost je ispravljena korištenjem Bonferroni korekcije. RS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar referentne skupine gena/genskih produkata (*Homo sapiens*); AS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar skupine diferencijalno eksprimiranih proteina; FC - povećanje broja genskih produkata vezanih uz pojedinačan biološki proces unutar analizirane skupine u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata vezanih uz isti proces. Logaritam frakcionalne razlike (uočene naspram očekivanih vrijednosti) izračunat je kao (broj gena u kategoriji - broj očekivanih gena) / broj očekivanih gena.

PANTHER GO-Slim biološki proces	RS	AS	FC	p-vrijednost
Procesuiranje i predstavljanje antigena (GO:0019882)	56	6	> 5	5.66E-03
Cijepanje glasničkih RNK molekula uz pomoć spliceosoma (GO:0000398)	183	17	> 5	2.00E-09
Prekrajanje glasničkih RNK molekula putem reakcija transesterifikacije	132	10	> 5	2.61E-04
Prekrajanje RNK molekula (GO:0008380)	135	10	> 5	3.18E-04
Procesuiranje glasničkih RNK molekula (				

Nakon razvrstavanja diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskim tkivima u proteinske razrede PANTHER utvrđeno je devet statistički značajnih proteinskih razreda ($p < 0.05$) povećanih najmanje dva puta u odnosu na referentnu skupinu gena/genskih produkata. Sukladno klasifikaciji proteina prema najznačajnijim biološkim procesima, u koje su ti isti proteini uključeni, utvrđeno je kako su proteini s povećanom razinom ekspresije u tumorskom tkivu povezani s procesiranjem ribonukleinskih kiselina, imunološkim odgovorom, procesima pravilnog smatanja proteina i organizacije staničnih komponenti (slika 4, tablica 13). Od ukupno 218 analiziranih genskih produkata, 58 genskih produkata nije bilo moguće klasificirati u proteinske razrede (tablica 13).

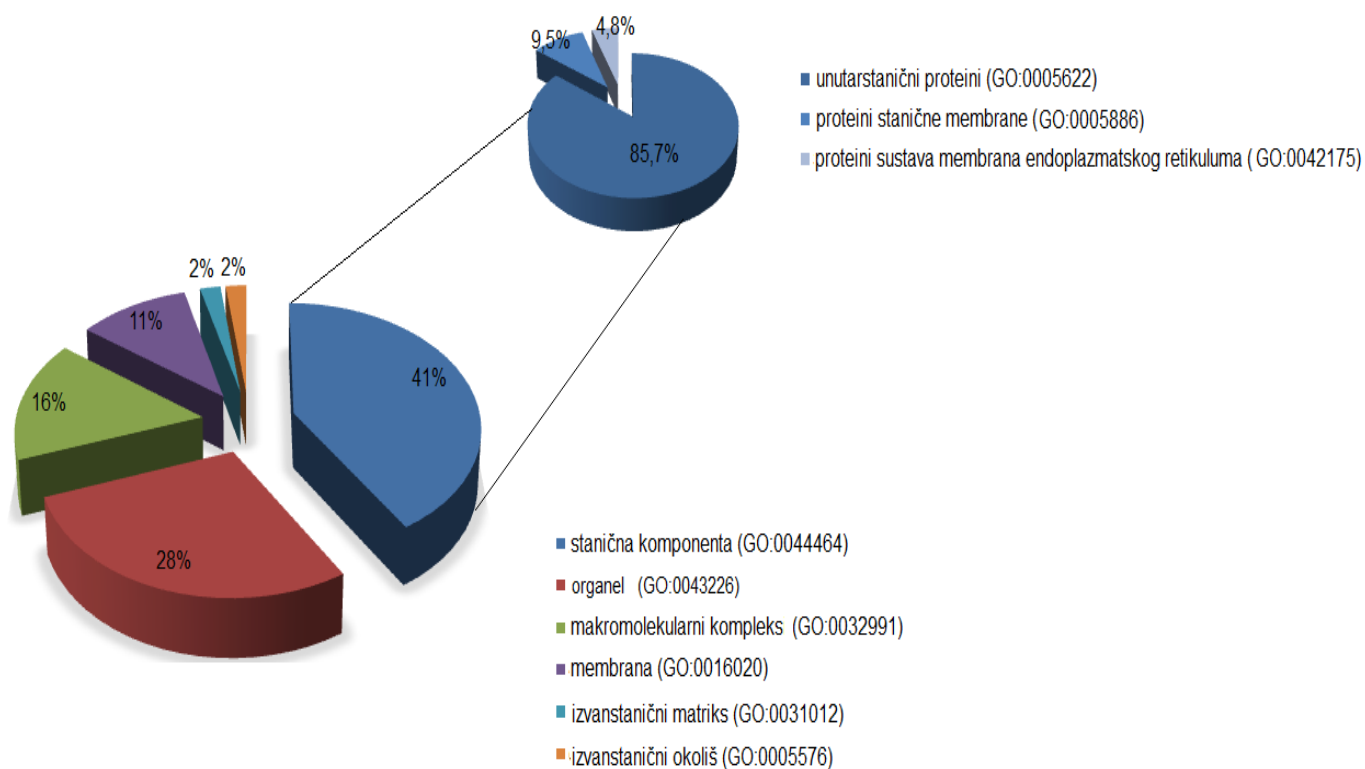


Slika 4. Grafički prikaz statistički značajnih razreda proteina PANTHER za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorskim tkivima (analizirana skupina genskih produkata):

Tablica 13. Statistički značajni ($p < 0.05$) razredi diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskim tkivima pacijenata utvrđeni su uz pomoć klasifikacije PANTHER. U svrhu višestrukoga statističkog testiranja p-vrijednost je ispravljena korištenjem Bonferroni korekcije. RS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar referentne skupine genskih produkata (*Homo sapiens*); AS - broj analiziranih gena/genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar skupine diferencijalno eksprimiranih proteina; FC - povećanje broja gena/genskih produkata vezanih uz pojedinačan razred proteina unutar analizirane skupine u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata vezanih uz razred. Logaritam frakcionalne razlike (uočene naspram očekivanih vrijednosti) izračunat je kao (broj gena u kategoriji - broj očekivanih gena) / broj očekivanih gena.

PANTHER razred proteina	RS	AS	FC	p-vrijednost
Ribonukleoproteini (PC00201)	51	6	> 5	3.09E-03
Antigeni glavnoga histokompatibilnog kompleksa (PC00149)	46	5	> 5	2.33E-02
Faktori prekrajanja glasničkih RNK molekula (PC00148)	121	11	> 5	1.16E-05
Faktori procesuiranja glasničkih RNK molekula (PC00147)	166	12	> 5	3.32E-05
Šaperoni (PC00072)	196	12	> 5	1.88E-04

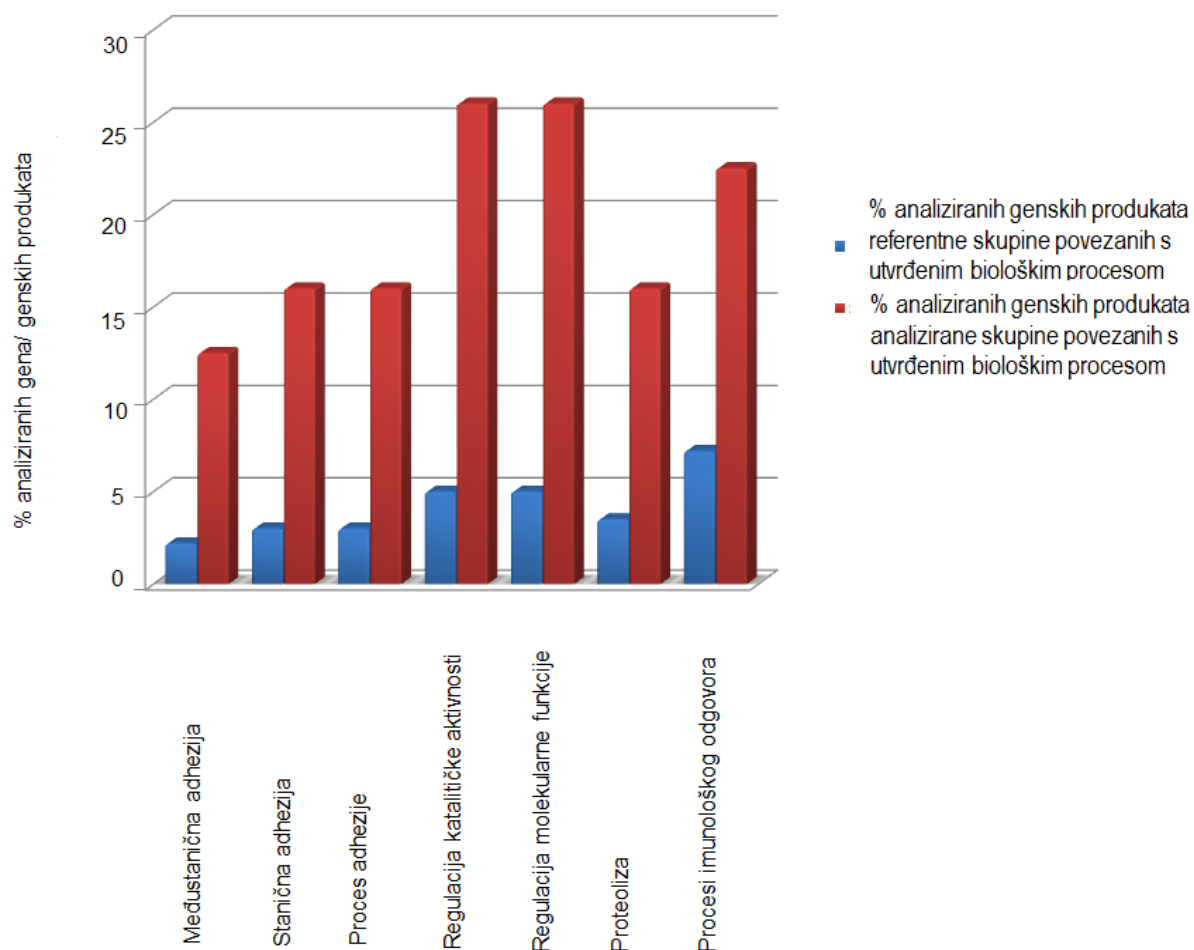
Razvrstavanje diferencijalno eksprimiranih proteina prema njihovoj staničnoj lokalizaciji je provedeno uz pomoć funkcije GO-slim. Utvrđeno je kako 41 % proteina s povećanom razinom ekspresije u tumorskim tkivima prema kategoriji *Gene Ontology* spada u kategoriju '*stanična komponenta*' koja obuhvaća unutarstanične proteine (87 %), proteine stanične membrane (9.5 %) i proteine sustava membrana endoplazmatskog retikuluma (4.8 %; slika 5). Za 28.4 % i 15.7 % diferencijalno eksprimiranih proteina je utvrđeno da su dio staničnih organela i makromolekularnih kompleksa, dok se ostatak analiziranih proteina odnosio na membranske proteine (10.8 %) i proteine izvanstaničnog matriksa (2.0 %) i okoliša (2.0 %; slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz

4.2.2. Rezultati klasifikacijske analize PANTHER proteinskog profila ekspresije u tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana

PANTHER klasifikacija i statistička analiza ($p < 0.05$) diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata je pokazala kako se više od 5 puta povećani biološki procesi u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata odnose na procese stanične i međustanične adhezije (slika 6, tablica 14). Statistički značajno povećani procesi su u nešto manjoj mjeri i pojačana regulacija katalitičke aktivnosti i molekularnih funkcija te imunološki odgovor (slika 6, tablica 14). Od ukupno 68 analiziranih genskih produkata, 16 genskih produkata nije bilo moguće klasificirati (tablica 14).

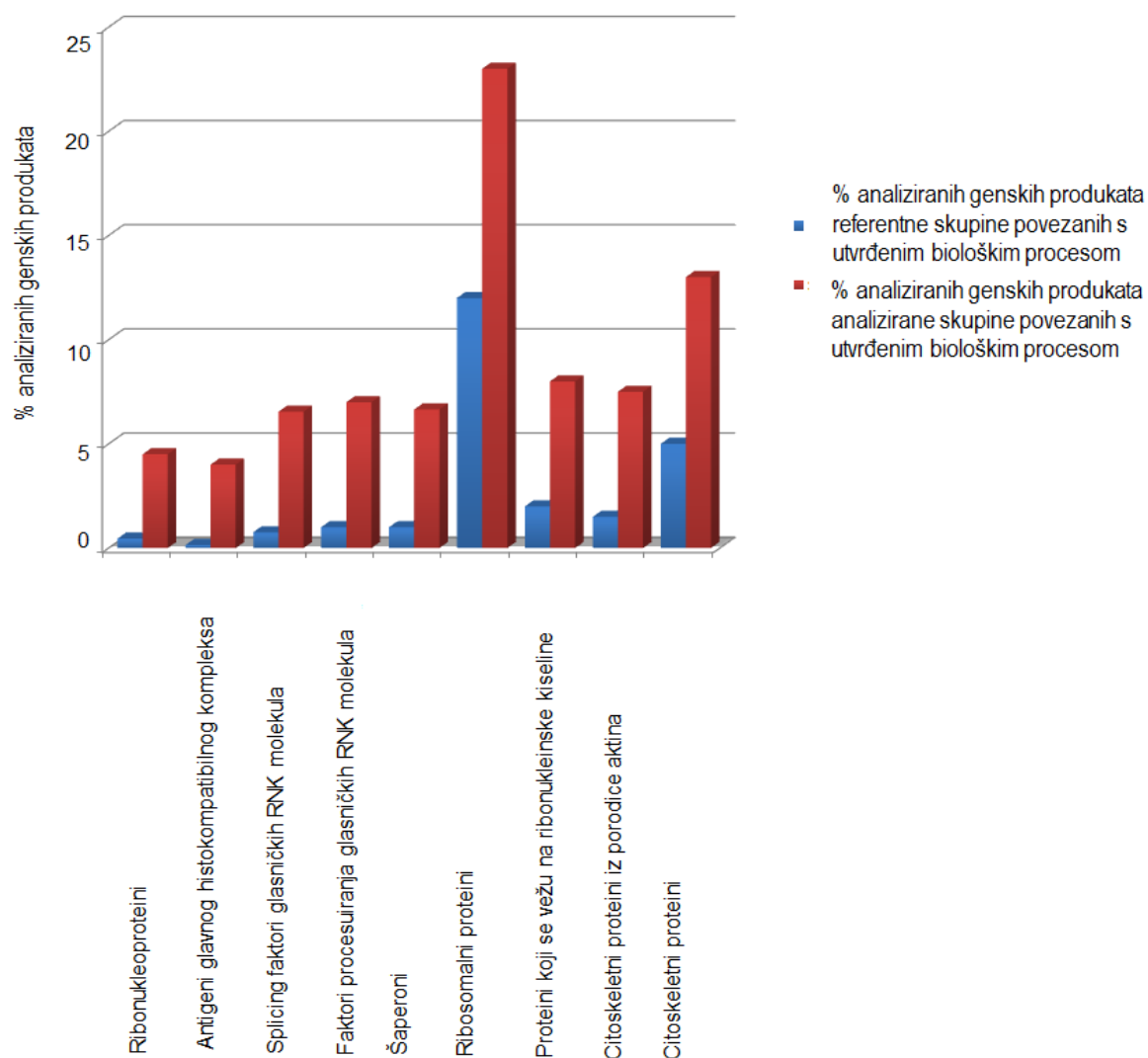


Slika 6. Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorom nezahvaćenim tkivima utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER: stupići prikazuju povećanje procesa u odnosu na iste procese u referentnoj skupini genskih produkata (genom *Homo sapiens*). Postotak gena/genskih produkata vezanih uz pojedini biološki proces je izračunat kao: broj analiziranih genskih produkata uvrštenih u određenu kategoriju/ukupan broj analiziranih genskih produkata x 100.

Tablica 14. Statistički značajni ($p < 0.05$) biološki procesi, u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorom nezahvaćenim tkivima, utvrđeni su uz pomoć klasifikacije PANTHER. U svrhu višestrukoga statističkog testiranja p-vrijednost je ispravljena korištenjem Bonferroni korekcije. RS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar referentne skupine gena/genskih produkata (*Homo sapiens*); AS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar skupine diferencijalno eksprimiranih proteina; FC - povećanje broja genskih produkata vezanih uz pojedinačan biološki proces unutar analizirane skupine u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata vezanih uz isti proces. Logaritam frakcionalne razlike (uočene naspram očekivanih vrijednosti) je izračunat kao (broj gena u kategoriji - broj očekivanih gena) / broj očekivanih gena.

PANTHER GO-slim biološki proces	RS	AS	FC	p-vrijednost
Međustanična adhezija (GO:0016337)	391	8	> 5	5.29E-03
Stanična adhezija (GO:0007155)	579	10	> 5	2.03E-03
Proces adhezije (GO:0022610)	606	10	> 5	3.01E-03
Regulacija katalitičke aktivnosti (GO:0050790)	1073	16	4.93	1.97E-05
Regulacija molekularne funkcije (GO:0065009)	1096	16	4.82</	

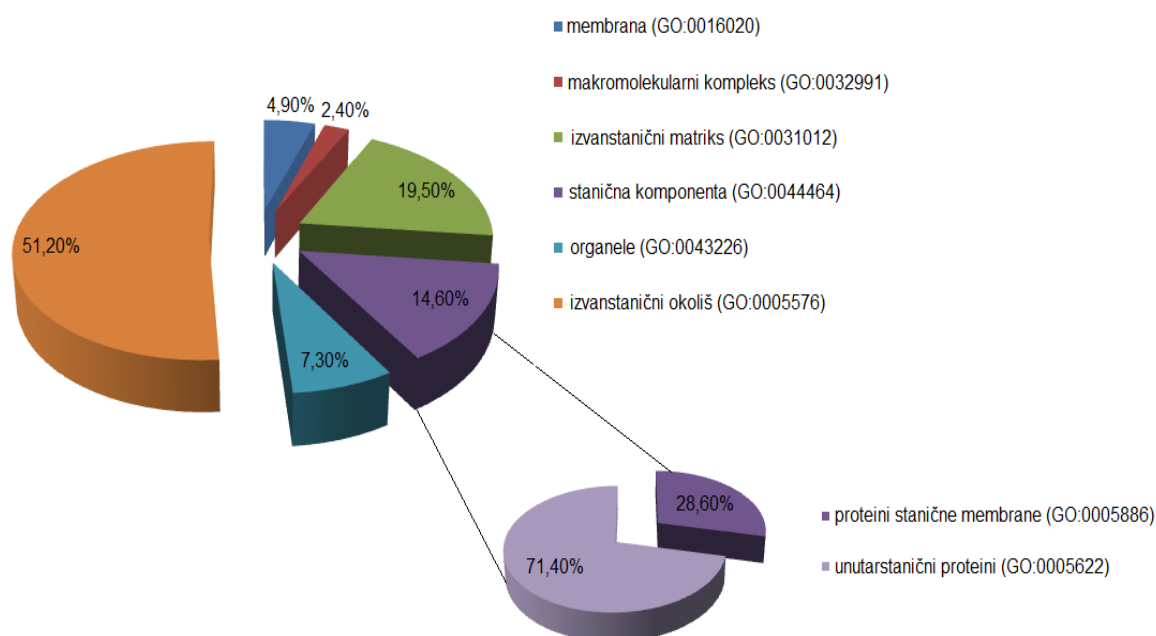
Razvrstavanje diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima u proteinske razrede PANTHER je pokazalo postojanje 6 statistički značajno povećanih proteinskih razreda u odnosu na referentnu skupinu ($p < 0.05$). Osim toga, sukladno klasifikaciji diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima prema najznačajnijim biološkim procesima, u koje su uključeni, utvrđeno je kako se najznačajnije povećani proteinski razredi odnose na komponente komplement sustava koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, proteine izvanstaničnog matriksa vezane uz procese stanične i međustanične adhezije, inhibitore proteazne aktivnosti i modulatore enzimske aktivnosti koji su uključeni u biološke procese regulacije katalitičke aktivnosti i molekularne funkcije. Od ukupno 68 analiziranih genskih produkata, 14 genskih produkata nije bilo moguće klasificirati u proteinske razrede (slika 7, tablica 15).



Tablica 15. Statistički značajni ($p < 0.05$) razredi proteina za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER. U svrhu višestrukoga statističkog testiranja p-vrijednost je ispravljena korištenjem Bonferroni korekcije. RS - broj analiziranih gena/genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar referentne skupine gena/genskih produkata (*Homo sapiens*); AS - broj analiziranih genskih produkata vezanih uz biološki proces unutar skupine diferencijalno eksprimiranih proteina; FC - povećanje broja genskih produkata vezanih uz pojedinačan razred proteina unutar analizirane skupine u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata vezanih uz razred. Logaritam frakcionalne razlike (uočene naspram očekivanih vrijednosti) izračunat je kao (broj gena u kategoriji - broj očekivanih gena) / broj očekivanih gena.

Razred proteina PANTHER	RS	AS	FC	p-vrijednost
Komponente komplement sustava (PC00078)	51	5	> 5	1.12E-04
Inhibitori serinskih proteaza (PC00204)	119	11	> 5	2.03E-11
Inhibitori proteaza (PC00191)	245	14	> 5	4.33E-12
Proteini izvanstaničnog matriksa (PC00102)	380	8	> 5	3.97E-03
Transportni proteini (PC00219)	400	7</		

Klasifikacija diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima prema njihovoj lokalizaciji unutar stanice uz pomoć razvrstavanja u *GO-slim* termine je pokazala da se najveći broj proteina odnosi na proteine izvanstaničnog okoliša i matriksa (51.20 % i 19.50 % od svih analiziranih proteina; slika 8). Ostale ontološke kategorije za unutarstaničnu lokalizaciju se odnose na stanične komponente (14.60 % proteina) i organele (7.30 % proteina) te na membranske proteine (4.90 % proteina) i proteine u obliku makromolekularnih kompleksa (2.40 % proteina; slika 8).



mete za dodatnu validaciju uz pomoć metode *Western blot* koje su u korelaciji s promjenama u imunološkom statusu i izvanstanično-pokrenutoj signalizaciji. Odabrani proteinski kandidati su mali proteoglikan lumikan i proteini ladinin -1, antigen diferencijacije monocita-CD 14, faktor inhibicije migracije makrofaga-MIF, alfa-4a lanac tubulina i afamin.

4.3. Validacija meta uključenih u imunološke procese i signalizaciju pokrenutu izvan stanice

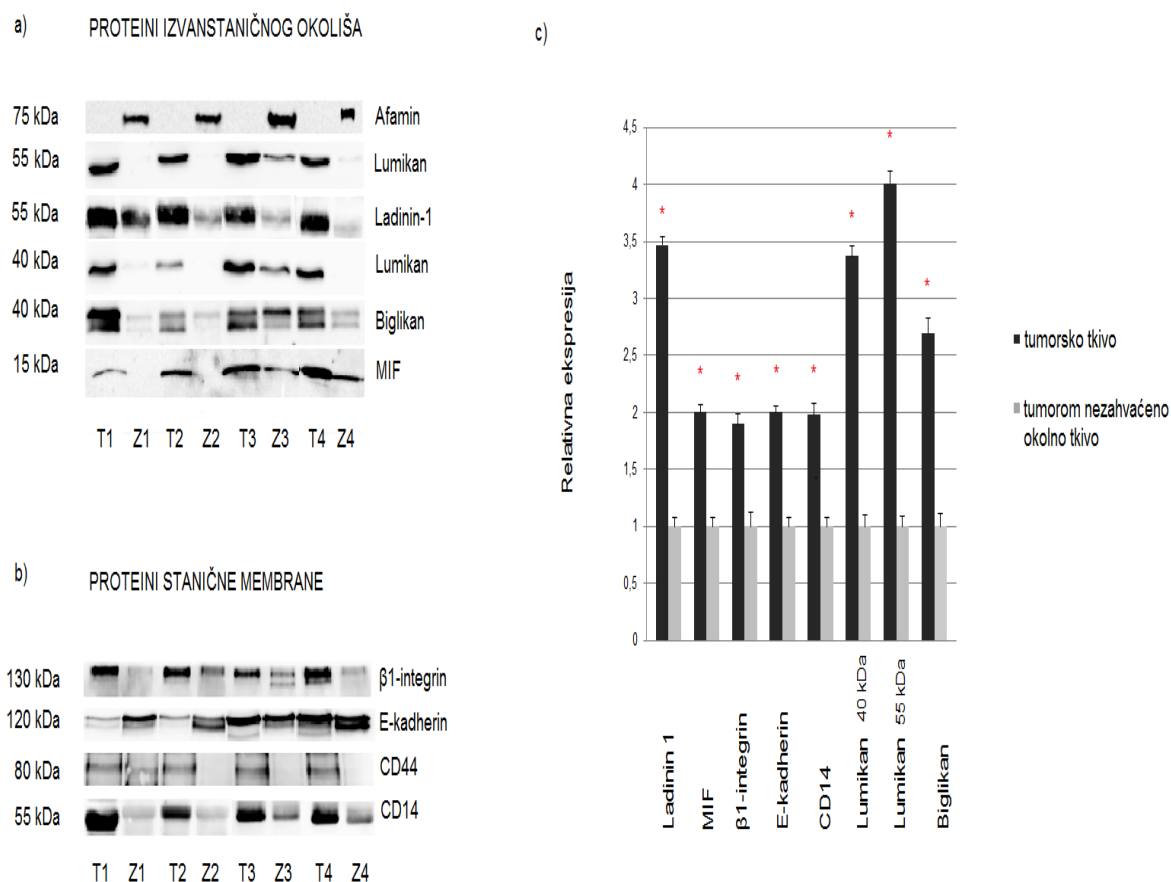
Novi proteinski kandidati koji potencijalno doprinose procesu metastaziranja planocelularnog karcinoma grkljana su analizirani uz pomoć metode *Western blot*. U tu svrhu su odabrani proteini ladinin-1, antigen diferencijacije monocita CD-14, faktor inhibicije makrofaga–MIF (engl. *MIF-Macrophage migration inhibitory factor*), alfa-4a lanac tubulina TUBA4A, afamin i mali proteoglikan lumikan. Razina relativne ekspresije ovih proteina dobivena je na uzorcima primarnih tumora i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva sedam pacijenata s preoperativno dijagnosticiranom metastazom i četiri pacijenta bez dijagnosticirane metastaze u limfnim čvorovima vrata. U svrhu validacije staničnih signalnih puteva i bioloških procesa povezanih s odabranim proteinskim kandidatima te procesom metastaziranja planocelularnih karcinoma glave i vrata na istim se uzorcima analizirala i relativna ekspresija signalnih proteina uključenih u procese koji su identificirani tijekom bioinformatičke analize proteomskih podataka:

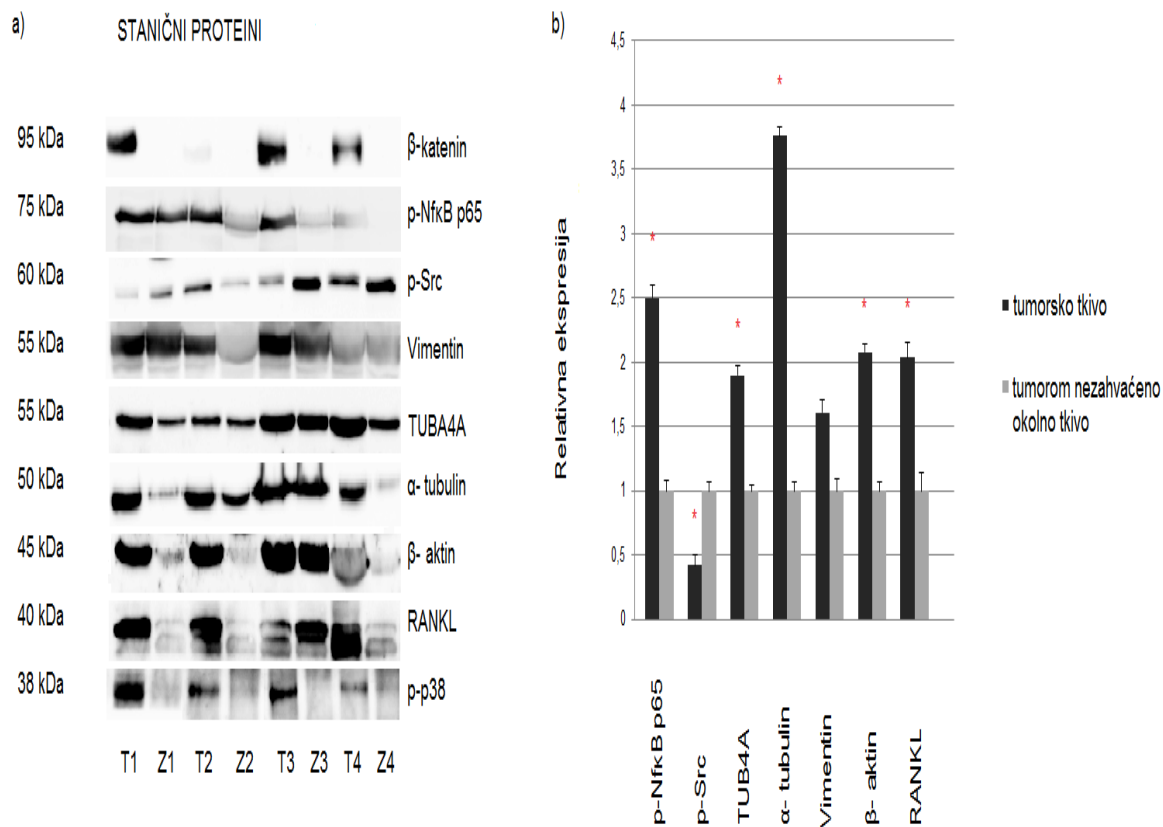
- izvanstanično pokrenuta signalizacija (antigen CD44, biglikan, MIF)

4.3.1. Rezultati analize ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tkiva nezahvaćenih tumorom tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s metastatskim planocelularnim karcinomom grkljana

Analiza ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s metastatskim planocelularnim karcinomom larinksa je provedena na tkivima sedam pacijenata, a statistički povećana ekspresija ($p < 0.05$) je utvrđena za izvanstanični protein ladinin-1, CD14, MIF, mali proteoglikan lumikan (slika 9), i citoskeletni protein TUBA4A (slika 9, slika 10). Za lumikan je statistički povećana ekspresija ($p < 0.05$) utvrđena za dvije forme, točnije za glikozilirani oblik lumikana od 55 kDa i proteinsku osnovicu lumikana od 40 kDa (slika 9). Statistički povećana ekspresija ($p < 0.05$) za sekretorni protein afamin je utvrđena u okolnomu tumorom nezahvaćenom tkivu (slika 9) što je u skladu s rezultatima kvantitativnoga proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa.

Analiza ekspresije odabranih signalnih proteina je pokazala statistički značajno povećanje ekspresije ($p < 0.05$) svih analiziranih proteina u tkivima tumora metastatskog oblika bolesti u odnosu na tumorom nezahvaćena tkiva s izuzetkom citoskeletnog proteina vimentina i inaktiviranog obli



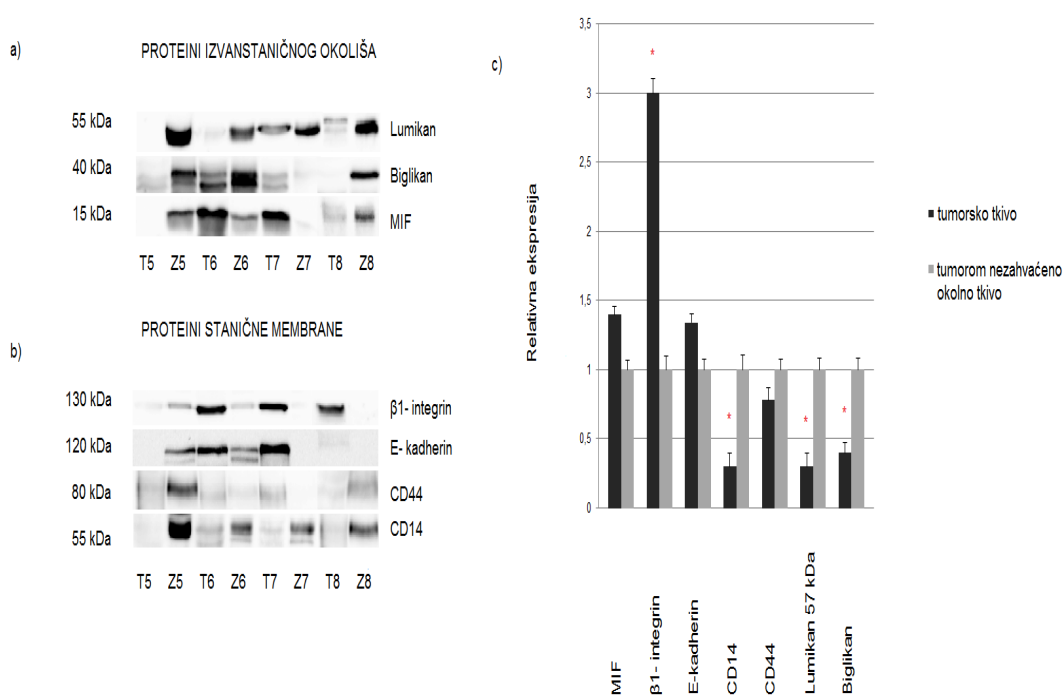


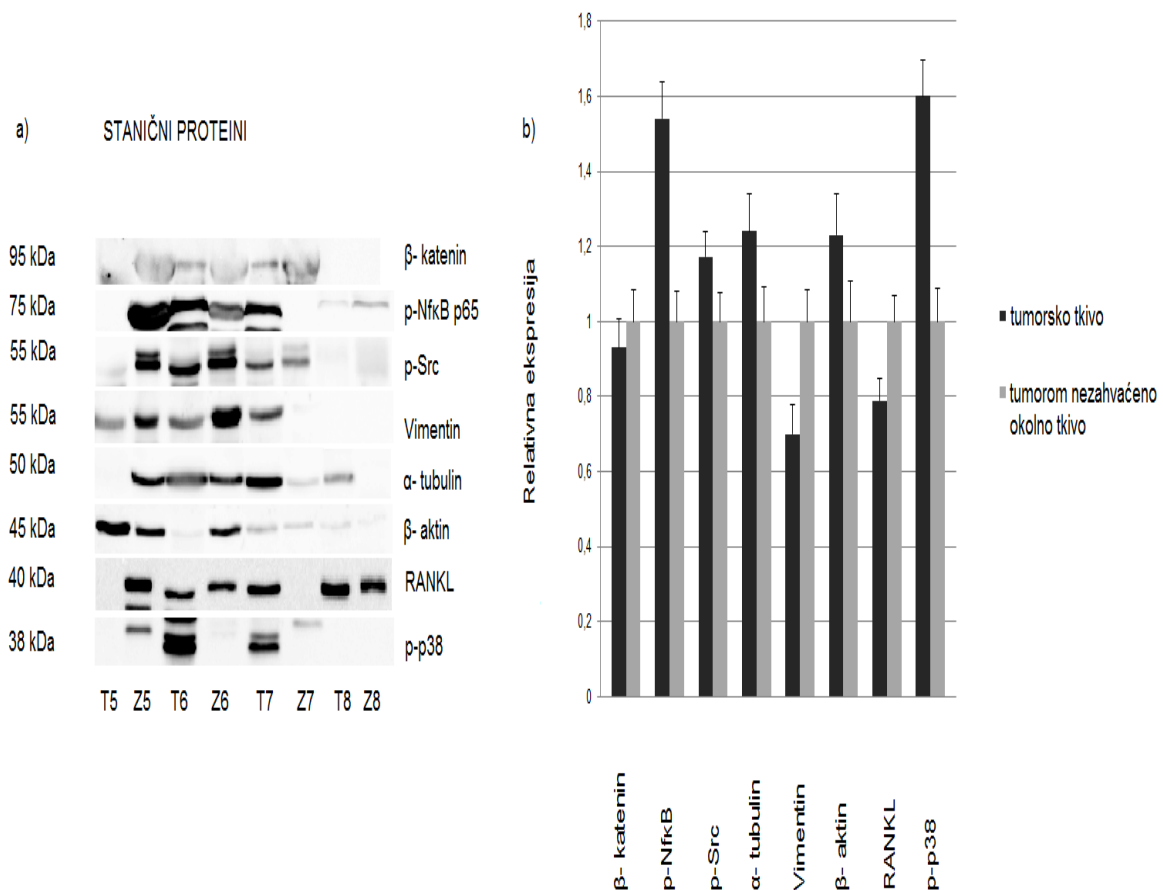
Slika 10.

4.3.2. Rezultati analize ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tkiva nezahvaćenih tumorom pacijenata s nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana

Analiza ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s nemetastatskim planocelularnim karcinomom larinksa je provedena na tkivima četiri pacijenta, a statistički smanjena ekspresija ($p < 0.05$) je utvrđena za CD14 antigen i lumikan (slika 11). Zanimljivo je kako je analizom ekspresije lumikana detektiran samo glikozilirani oblik molekule molekularne veličine od 55 kDa. Nadalje, u tumorskim tkivima je vidljiva povećana razina ekspresije faktora MIF (slika 11) bez statističke značajnosti, a ekspresija afamina, ladinina-1 i TUBA4A je bila ispod razine detekcije u svim analiziranim tkivima. Na temelju ovih rezultata može se utvrditi kako je u metastaziranju važna uloga CD14 antigena i lumikana s obzirom da je njihova razina ekspresije snižena u uzorcima tumorskih tkiva u usporedbi s tumorskim tkivima pacijenata s metastatskim oblikom bolesti. Osim toga, značajnu ulogu u metastaziranju imaju i proteini afamin, ladinin-1 i TUBA4A čija ekspresija uopće nije detektirana u nemetastatskim tumorima. Uz to, statistički beznačajna povećana razina ekspresije faktora MIF u uzorcima primarnih tumora, koji nisu metastazirali u odnosu na tumore koji su metastazirali, ukazuje na moguću ulogu u napredovanju bolesti što potvrđuju i rezultati proteomskog profiliranja spektrometrijom masa.

slučaju primarnih tumora pacijenata kod kojih nisu dijagnosticirane metastaze u limfnim čvorovima vrata utvrđena je statistički značajna smanjena razina relativne ekspresije malog proteoglikana biglikana i statistički beznačajna smanjena razina ekspresije proteina vimentina, RANKL i β -katenina (slika 12).





4.4. Rezultati 2-DE imunoblot analize različitih formi malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa lumikana u tumorskim tkivima i pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata s metastatskim i nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana

Lumikan je proteoglikan izvanstaničnog okoliša i pripada porodici malih proteoglikana čije proteinske osnovice približne molekularne mase od 40 kDa sadrže konzervirane ponavljajuće leucinske regije [181]. Uz proteoglikansku formu lumikana kod koje je proteinska osnovica kovalentno modificirana negativno nabijenim ograncima molekula keratan-sulfata ili slabo sulfoniranim/nesulfoniranim polilaktozaminskim lancima različite dužine, lumikan također može postojati u formi glikoproteina kovalentno modificiranog kratkim N-glikanima (približna molekularna masa od 50 kDa) ili u neglikoziliranom obliku [182]. Biološka uloga lumikana se povezuje s postojanjem različitih formi lumikana i strukturalnim glikanskim formama molekule. U ovisnosti o formi mijenja se i uloga lumikana te on može sudjelovati u čitavom nizu različitih procesa počevši od procesa fibrilogeneze kolagena, pa sve do regulacije stanične proliferacije, migracije i adhezije [182]. Isto tako je poznato kako negativno nabijeni ugljikohidratni ostaci prisutni u glikozilaminoglikanskim ograncima proteoglikana i glikanima glikoproteina generalno doprinose smanjenju vrijednosti njihove izoelektrične točke [183, 184].

lumikana, i (2) neglikozilirane proteinske osnovice lumikana molekularne mase od 40 kDa. U odnosu na detektiranu proteinsku točku α -tubulina je proteinska točka glikoziliranog oblika lumikana detektirana na širokom rasponu nižih pH vrijednosti gela (približno između pH 3 do 5; slika 13.). Ovo smanjenje vrijednosti izoelektrične točke (teoretska izračunata izoelektrična točka lumikana ima vrijednost od 6) upućuje na prisustvo negativno nabijenih ugljikohidratnih ostataka kod glikoziliranoga oblika molekule, najvjerojatnije terminalnih ostataka sijalinske kiseline na N-glikanima glikoproteinskog oblika lumikana [184]. Uz glikozilirani oblik lumikana su u regiji gela pH 5 do 7 utvrđene su tri proteinske točke približne molekularne mase od 40 kDa (slika), koje odgovaraju proteinskoj osnovici lumikana; teorijska izoelektrična točka proteinske osnovice lumikana iznosi 6. U pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima nije bilo moguće utvrditi ekspresiju lumikana što je u skladu s rezultatima *Western blot* analize.

