

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Meliha Solak Mekić**

**Otkrivanje prognostičkih čimbenika u  
bolesnika s karcinomom prostate pomoću  
proteomske analize tumorskoga tkiva**

**DISERTACIJA**



Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Meliha Solak Mekić**

**Otkrivanje prognostičkih čimbenika u  
bolesnika s karcinomom prostate pomoću  
proteomske analize tumorskoga tkiva**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Zavodu za radioterapiju i internističku onkologiju Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra «Sestre milosrdnice» i u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu Zavoda za molekularnu medicinu Instituta «Ruđer Bošković».

Voditelji rada: prof. dr. sc. Lidija Beketić Orešković, dr. med. i doc. dr. sc. Mario Cindrić

Zahvaljujem se svom mentoru, doc. dr. sc. Mariju Cindriću što je beskrajno vjerovao u mene, potaknuo me i naučio drugačije razmišljati.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Lidiji Beketić Orešković, dr. med., koja me je pratila i podržavala svo vrijeme.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mirku Šamiji jer je još za vrijeme moje specijalizacije prepoznao ideju ovog doktorata, pokrenuo je i uvijek me poticao na napredak.

Hvala mojoj obitelji bez čije ljubavi, brige, mudrosti i snage nikad ne bih uspjela završiti ovo putovanje.

I na kraju, zahvaljujem se svojoj majci, koja me učila da su znanje i vještine koje posjeduješ najveće blago i mijenjaju tvoj život i postojanje na bolje, dajući mu svrhu.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. PROSTATA.....	1
1.1.1. Građa prostate.....	1
1.1.2. Histološka građa prostate .....	1
1.1.3. Histologija i fiziologija tkiva prostate .....	1
1.1.4. Epitelno-mezenhimalna interakcija .....	2
1.1.5. Stanična fiziologija – djelovanje testosterona preko androgenog receptora.....	4
1.1.6. Fiziologija na razini organa .....	7
1.1.6.1. Prostata specifični antigen (PSA).....	7
1.1.6.2. Prostatična kiselina fosfataza (PAP,PSAP,ACPP).....	7
1.2. RAK PROSTATE .....	8
1.2.1. Epidemiologija.....	8
1.2.2. Patologija raka prostate .....	8
1.2.2.1. Gleasonov sistem gradiranja .....	9
1.2.3. Histologija i fiziologija raka prostate.....	11
1.2.4. Patofiziologija raka prostate – uloga androgenog receptora .....	12
1.2.5. Prostata specifični antigen (PSA) i tumor prostate.....	12
1.2.5.1. Prostata specifični antigen (PSA) kao biomarker raka prostate .....	13
1.2.5.2. Prostata specifični antigen i dijagnoza raka prostate.....	13
1.2.6. Liječenje raka prostate .....	14
1.2.6.1. Stratifikacija bolesnika za postoperativno liječenje.....	15
1.2.6.2. Značaj nepovoljnih patohistoloških obilježja kod odluke o provođenju postoperacijske radioterapije .....	16
1.2.6.3. Adjuvantna radioterapija .....	17
1.2.6.4. Značaj PSA kod odluke o provođenju postoperacijske radioterapije .....	18
1.2.6.5. <i>Salvage</i> radioterapija .....	20
1.3. PROTEOMIKA .....	22
1.3.1. Primjena spektrometrije masa u proteomici.....	23
1.3.1.1. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE).....	23
1.3.1.2. Spektrometrija masa.....	25
1.3.1.2.1. Ionizacijska komora .....	25
1.3.1.2.2. Analizator masa.....	26
1.3.1.2.3. Detektori.....	28
1.3.1.2.4. Matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem .....	28
1.3.1.2.5. Proteinske baze podataka .....	30
1.3.1.2.5.1. Pretraživanje proteinskih baza podataka .....	31
1.3.2. Dosadašnja proteomska istraživanja tkiva karcinoma prostate .....	31
1.4. SVRHA RADA.....	36
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....	37
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	38
4. MATERIJALI I METODE.....	39
4.1. MATERIJALI .....	39
4.1.1. Osnovne kemikalije.....	39
4.1.2. Puferske otopine .....	39

4.1.3. Instrumenti i programska podrška .....	40
4.2. ISPITANICI .....	40
4.2.1. Uzorkovanje tkiva.....	41
4.3. METODE RADA .....	42
4.3.1. Priprema lizata iz uzoraka tkiva prostate .....	42
4.3.2. Određivanje koncentracije proteina .....	43
4.3.3. Rehidracija i izoelektrično fokusiranje.....	43
4.3.4. Ekvilibracija IPG traka .....	45
4.3.5. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecil sulfat (SDS gel elektroforeza) .....	45
4.3.6. Bojenje gelova.....	47
4.3.7. Snimanje i analiza gelova .....	48
4.3.8. Priprema uzorka za analizu spektrometrijom masa .....	48
4.3.8.1. Odbojavanje izrezanih komadića gelova.....	48
4.3.8.2. Digestija u gelu.....	48
4.3.8.3. Pročišćavanje tehnikom Zip-Tip pomoću C18 kolona .....	49
4.3.9. Spektrometrija masa.....	50
4.3.9.1. Analiza spektrometrom masa .....	50
4.3.9.2. Pretraživanje proteinskih baza podataka .....	52
5. REZULTATI.....	54
5.1. Prikaz kliničkih i patohistoloških karakteristika ispitanika .....	54
5.2. Histopatološka analiza i određivanje koncentracije proteina .....	59
5.3. Rezultati denzitometrijske analize gelova dobivenih dvodimenzionalnom gel elektroferezom (2-DE).....	60
5.4. Rezultati analize spektrometrijom masa i pretrage baze podataka .....	61
5.5. Individualni prikaz ispitanika i njihovih proteomskih profila .....	62
5.5.1. Individualni prikaz alfa G1 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	62
5.5.2. Individualni prikaz alfa G2 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	67
5.5.3. Individualni prikaz alfa G3 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	70
5.5.4. Individualni prikaz alfa G4 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	73
5.5.5. Individualni prikaz alfa G5 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	76
5.5.6. Individualni prikaz alfa G6 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	79
5.5.7. Individualni prikaz alfa G7 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	83
5.5.8. Individualni prikaz alfa G8 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	87
5.5.9. Individualni prikaz alfa G9 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	90
5.5.10. Individualni prikaz alfa G10 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	92
5.5.11. Individualni prikaz alfa G11 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	96

5.5.12. Individualni prikaz alfa G12 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva .....	99
6. RASPRAVA.....	106
6.1. Klasifikacija proteina identificiranih razlikovnim prikazom tumorskog i zdravog tkiva .....	110
7. ZAKLJUČCI .....	136
8. SAŽETAK.....	138
9. SUMMARY .....	139
10. LITERATURA.....	140
11. ŽIVOTOPIS.....	156

## POPIS OZNAKA I KRATICA

APS	amonijev persulfat
AR	androgen receptor
ARE	androgen odgovorni element (engl. <i>Androgen Response Element</i> )
ARR	androgen odgovorna područja (engl. <i>Androgen Response Regions</i> )
BLAST	računalni program za usporedbu slijedova proteina i nuklinskih kiselina (engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
CA	amfolitni nosači (engl. <i>Carrier Ampholytes</i> )
CBB	boja Coomassie Brilliant Blue
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonat
CHCA	matrica $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
cPAP	stanična prostatična kiselna fosfataza (engl. <i>Cellular Prostatic Acid Phosphatase</i> )
DBD	DNA-vezajuća domena androgenog receptora (engl. <i>DNA-binding Domain</i> )
DHT	dihidrotestosteron
DRP	digitorektalni pregled
DTT	ditiotreitol
2D-DIGE	dvodimenzionalna diferencijacijska gel elektroforeza (engl. <i>Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis</i> )
2-DE	dvodimenzionalna gel elektroforeza (engl. <i>Two Dimensional Gel Electrophoresis</i> )
EGF	epidermalni čimbenik rasta (engl. <i>Epidermal Growth Factor</i> )
Entrez	računalni program za pretraživanje baze podataka NCBI
EPE	ekstraprostatično širenje
ESI	elektroraspršenje (engl. <i>Electrospray</i> )
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (engl. <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
FSH	folikulstimulirajući hormon (engl. <i>Follicle-stimulating Hormone</i> )
FSHRH	hormon koji oslobađa folikulstimulirajući hormon (engl. <i>Follicle-</i>

	<i>stimulating Hormone Releasing Hormone)</i>
f/t PSA	omjer slobodnog (engl. <i>Free - fPSA</i> ) i ukupnog (engl. <i>Total - tPSA</i> ) PSA
FT ICR MS	Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko ciklotronske rezonancije (engl. <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> )
GnRH	gonadotropin oslobađajući hormon (engl. <i>Gonadotropin-releasing Hormone</i> )
GS	Gleason zbroj (engl. <i>Gleason Score</i> )
H	malo spojno područje andoregenog receptora (engl. <i>Hinge</i> )
Her 2 receptor	receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta (engl. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i> )
IAA	jodoacetamid
ICSH	hormon koji podražuje intersticijske stanice (engl. <i>Interstitial Cell Stimulating Hormone</i> )
IEF	izoelektrično fokusiranje (engl. <i>Isoelectric Focusing</i> )
IGF	inzulinu sličan faktor rasta (engl. <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
IPG	imobilizirani pH gradijent (engl. <i>Immobilized pH Gradient</i> )
iTRAQ	izobarična oznaka za relativnu i apsolutnu kvantitaciju (engl. <i>Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i> )
LBD	ligand-vezajuća domena androgenog receptora (engl. <i>Ligand Binding Domain</i> )
LCM	laserska mikrodisekcija (engl. <i>Laser Capture Microdissection</i> )
LH	luteinizirajući hormon (engl. <i>Luteinizing Hormone</i> )
LHRH	hormon koji oslobađa luteinizirajući hormon (engl. <i>Luteinizing Hormone-releasing Hormone</i> )
MALDI	matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
Mascot	računalna platforma za pretraživanje proteinskih baza podataka
MGF	mitogeni faktori rasta



Mowse rezultat	osnova MOWSE algoritma (engl. <i>Probability Based Mowse Score</i> )
MS	spektrometrija masa (engl. <i>Mass Spectrometry</i> )
MS/MS	tandemna spektrometrija masa (engl. <i>MS/MS Ions Search</i> )
MSMB	beta-mikroseminoprotein (engl. <i>Beta-microseminoprotein</i> )
NA	nikotinska kiselina
NCBI	Nacionalni centar za biotehnološku informaciju (engl. <i>the National Center for Biotechnology Information</i> )
NCBI nr	opsežna neponavljajuća proteinska baza smještena na Nacionalni centar za biotehnološku informaciju u SAD (engl. <i>NCBI Non-redundant</i> )
NTD	aminoterminalna domena androgenog receptora (engl. <i>Aminoterminal Domain</i> )
PAP,PSAP,ACPP	prostatična kiselina fosfataza (engl. <i>Prostatic Acid Phosphatase</i> )
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDB	proteinska baza podataka (engl. <i>Protein Data Bank</i> )
PDQuest	računalni program za analizu 2-DE gelova
5- $\alpha$ -R	5-alfa-reduktaza
pI	izoelektrična točka
PMF	metoda otiska prsta (engl. <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> )
PS	proteinska vrijednost (engl. <i>Protein Score</i> )
PSA	prostata specifični antigen (engl. <i>Prostate Specific Antigen</i> )
PSMA	prostata specifični membranski antigen (engl. <i>Prostate-specific Membrane Antigen</i> )
Q	kvadrupolni analizator masa (engl. <i>Quadropole</i> )
R1	pozitivan rub
SA	sinapinska kiselina
SDS	natrij dodecil sulfat

SDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecil sulfat
SELDI	površinski pojačana desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (engl. <i>Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization</i> )
SHBP	spolni-hormon vezajući protein (engl. <i>Sex-hormone Binding Protein</i> )
SVI	infiltracija sjemenskih mjehurića
SVM	sjemenskih mjehurića mezenhim
SwissProt	visokokvalitetna, ručno anotirana i neredudantna baza proteinskih slijedova, sastavnica UniProtKB
T	testosteron
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TOF	analizator koji mjeri vrijeme leta
TRUS	transuretralni ultrazvuk
UGM	urogenitalni sinusni mezenhim
UGS	endodermalni urogenitalni sinus
Uni Prot	konzorcij koji okuplja European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) i Protein Information Resource (PIR)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

## 1. UVOD

### 1.1. PROSTATA

#### 1.1.1. Građa prostate

Prostata, predstojna žlijezda ili kestenjača neparan je mišićno-žljezdani organ koji okružuje početnih 3 cm mokraćne cijevi u muškaraca. Spada u pomoćne spolne žlijezde muškoga spolnog sustava. Baza prostate smještena je ispod mokraćnog mjehura i nalazi se proksimalno, dok je sam vrh distalno te leži na dijelu urogenitalne dijafragme koji oblikuje sfinkter uretre. Prostata je građena od dvaju režnjeva (lat. *lobus prostatae dexter et sinister*) i jednog suženja (lat. *isthmus prostatae*). S vanjske je strane obavijena tankom i čvrstom ovojnicom (lat. *capsula prostatica*) oko koje se nalazi rahlo vezivno tkivo. Između njih je prostatični venski splet, a arterijska krv dolazi prostatičnim ograncima dviju zdjeličnih arterija. Limfa iz prostate odlazi u unutrašnje ilijačne i sakralne limfne čvorove koji pripadaju zdjeličnim limfnim čvorovima. U stromi se nalaze simpatička i parasimpatička živčana vlakna. Prostatično tkivo (lat. *parenchyma*) sastoji se od žljezdanog (lat. *ductuli prostatici*) i mišićnog dijela (lat. *substantia muscularis*) (1).

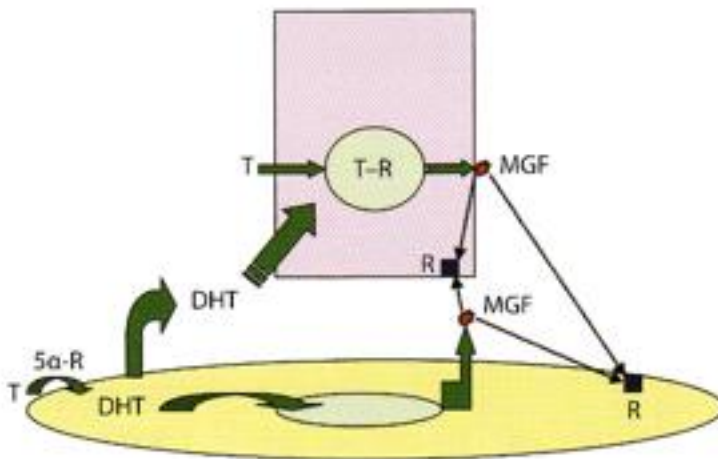
#### 1.1.2. Histološka građa prostate

Prostata je građena od tubuloalveolarnih žlijezda i fibromuskularne strome. Tubuloalveolarne žlijezde sintetiziraju sekret koji se izlučuje u mokraćnu cijev. Epitel žlijezda jednoslojan je višeredni cilindričan, a okružen je bazalnom membranom i rahlim vezivnim tkivom. Epitelne stanice mogu biti glavne i bazalne, a u žlijezdama se nalaze i pojedinačne endokrine stanice. Fibromuskularna stroma građena je od rahlog vezivnog tkiva i glatkih mišićnih stanica koje imaju ulogu da kontrakcijski potpomognu istiskivanje sekreta (1).

#### 1.1.3. Histologija i fiziologija tkiva prostate

Aktivnost epitela prostate ovisna je o stimulaciji androgenim hormonima. Osobito je važna uloga dihidrotestosterona (DHT) unutar fibromuskularne strome. Testosteron (T) dolazi iz krvnih žila difuzijom do stanica strome koje jedine sadrže enzim 5-alfa-reduktazu ( $5-\alpha-R$ ).  $5-\alpha-R$  pretvara testosteron u DHT, aktivni oblik

testosterona. Zatim se DHT veže na svoj receptor (DHT-AR) i ulazi u jezgru gdje pobuđuje sintezu mitogenih faktora rasta (MGF). DHT iz stanica strome odlazi i u susjedne epitelne stanice te tamo pobuđuje sintezu MGF. U epitelnim stanicama i testosteron se veže na svoj receptor (T-AR) te zajedno s dihidrottestosteronom potiče sintezu MGF. Potom, mitogeni faktori rasta djeluju na vlastite receptore smještene na staničnim membranama epitelnih i stromalnih stanica te potiču njihov rast i proliferaciju. Ovaj se proces događa uglavnom u području mukoznih i submukoznih žlijezda, a tako nastaje benigna hiperplazija prostate (Slika 1.) (1).



**Slika 1. Međusobno djelovanje stanica strome (dolje) i epitelnih stanica (gore). Testosteron (T) iz krvnih žila difuzijom dolazi do stromalnih stanica. Pod utjecajem 5-alfa-reduktaze (5- $\alpha$ -R) pretvara se u dihidrottestosteron (DHT). DHT se veže na svoj receptor (DHT-AR) i u jezgri pobuđuje mitogene faktore rasta (MGF) na sintezu. U epitelnim stanicama DHT iz strome, zajedno s testosteronom koji se veže na svoj receptor (T-AR), dovodi do pojačane stimulacije stanica, te ih potiče na diobu i rast pri čemu dolazi do benigne hiperplazije prostate (Preuzeto iz Šamija i sur.) (1).**

#### 1.1.4. Epitelno-mezenhimalna interakcija

Kod normalnog razvoja prostate naglašena je važnost epitelno-mezenhimalnih interakcija. Ove stanice međusobno djeluju autokrino i parakrino te na taj način

međusobno utječu na sekreciju, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Stoga, epitelno-mezenhimalna komunikacija bitna je za razvoj i normalno funkcioniranje stanica od samog početka razvoja prostate te se smatra da sudjeluje i u razvoju karcinoma prostate (2). Kod svih vrsta, pa tako i kod čovjeka, prostata se razvija iz endodermalnog urogenitalnog sinusa (UGS). Endodermalni UGS ambiseksualni je rudiment koji se razvija u prostatu, prostatični dio uretre i bulbouretralne žlijezde kod muškaraca, vaginu i uretru kod žena te mokraćni mjehur kod obaju spolova (3). Okružen je embrijskim vezivnim tkivom koji se zove unrogenitalni sinusni mezenhim (UGM). Prije spolne diferencijacije, mezenhimalne stanice obaju spolova sadrže androgene receptore (4). Nakon stimulacije fetalnim androgenima, epitelni pupoljci iz zida UGS rastu u UGM u preciznom prostornom obrascu i tu već nastaje podjela prostate u lobarne subodjeljke (anteriorni, dorzolateralni i ventralni). Anteriorna prostata raste u bliskom odnosu sa sjemenskim mjehurićima. Također, epitelijalni rudimenti sjemenskih mjehurića i anteriorna prostata razvijaju se unutar iste mase mezenhima koji je u povijesti imao naziv mezenhim sjemenskih mjehurića (SVM). U stvarnosti, mezenhim sjemenskih mjehurića u biti je mezenhim koji inducira prostatu i sjemenske mjehuriće te uzrokuje specifični tkivni odgovor koji je posljedica derivacije bazalnog sloja iz epitela (5).

Nakon rođenja, pupoljci se kanaliziraju, dolazi do citodiferencijacije epitelnih stanica (postaju luminalne i bazalne stanice) i mezenhimalnih stanica (postaju stanice glatkih mišića i fibroblasti) (6). Pokusima na životinjama dokazano je da je za diferencijaciju epitelnih stanica prostate bitna prisutnost androgenih receptora u mezenhimalnim stanicama i samih androgena. S druge strane, za diferencijaciju mezenhimalnih stanica u glatkomišićne stanice potrebna je prisutnost diferenciranih epitelnih stanica (2). Ukoliko se u eksperimentu odvoje epitelne i glatkomišićne stanice zrele prostate te nastave uzgajati *in vitro*, utoliko ubrzo dolazi do dediferencijacije i proliferacije obiju vrsta stanica što upućuje na to da je za homeostazu važan blizak kontakt stanica i njihovo međudjelovanje. Valja napomenuti da su duktalna morfogeneza, citodiferencijacija epitela, apoptoza i proliferacija pritom regulirani od strane stromalnih, a ne androgenih receptora (2).

Također, postoji još jedan tip stanica. To su intersticijske stanice koje su u međusobnoj vezi s glatkomišićnim stanicama. Istovjetne su stanicama, takozvanim

elektrostimulatorima, nađenima u crijevu i mokraćnom mjehuru gdje igraju ulogu u gibanju tih organa. Njihova je uloga kod prostate nepoznata (1).

### **1.1.5. Stanična fiziologija – djelovanje testosterona preko androgenog receptora**

Testosteron je steroidni hormon koji izlučuju Leydigove stanice u testisima, a njegova sinteza počinje od kolesterola u procesu koji se naziva androgeneza. Većina testosterona (90%) nastaje u stanicama testisa, a ostatak nastaje u nadbubrežnim žlijezdama (7). On je glavni cirkulirajući androgen, ali nije jedini. U adrenalnom korteksu proizvode se i drugi androgeni kao što su androstendion, androstendiol i dehidroepiandrosteron koji se u perifernim tkivima konvertiraju u testosteron. Testosteron se veže na androgeni receptor (AR) koji se nalazi u citosolu kao testosteron ili u svom reduciranom obliku kao dihidrotestosteron (DHT). Valja napomenuti da DHT ima jači afinitet vezanja za AR. Androgeni receptor je protein, a njegov gen se nalazi se na kromosomu Xq11-13 i sadrži osam eksona. Sam protein ima više funkcionalnih domena: aminoterminalnu (engl. *Aminoterminal Domain* - NTD), DNA-vezujuću (engl. *DNA-binding Domain* - DBD), malo spojno područje (engl. *Hinge* - H) i C-terminalnu ligand-vezujuću domenu (engl. *Ligand Binding Domain* - LBD).

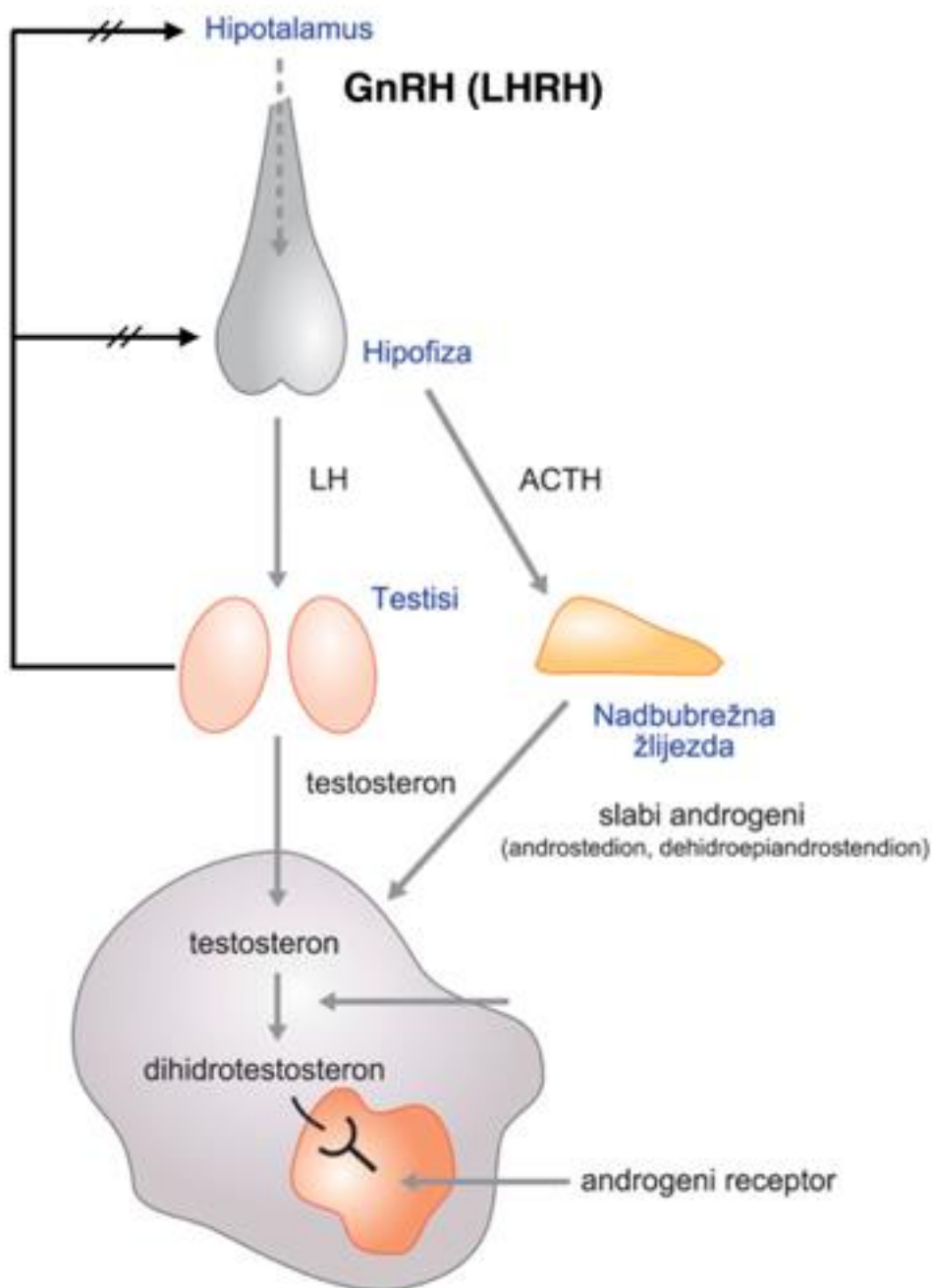
Vezanjem androgena za AR dolazi do njegove konformacije, fosforilacije i formiranja homodimera (1). Nakon toga slijede nuklearna translokacija i dimerizacija koja pak može biti u više oblika. Nakon ulaska u jezgru homodimer se veže za androgen odgovarajući element (engl. *Androgen Response Element* - ARE) i regulira transkripciju ciljnih gena promovirajući na taj način rast stanica, preživljavanje i sintezu PSA (8). Receptor androgena može se vezati i na manje specifične slijedove, nazvane androgen odgovorna područja (engl. *Androgen Response Regions* - ARR), uzvodno od ARE mjesta kao i na PSA udaljeni pojačivač (engl. *PSA Distal Enhancer*) (9).

Androgeni se otpuštaju u krv gdje cirkuliraju povezani s albuminima ili spolni-hormon vezajućim proteinima (engl. *Sex-hormone Binding Protein* - SHBP). Manji dio testosterona povezan s proteinima u kapilarama odvaja se od njih, tako da je količina aktivnog testosterona znatno viša, dok ostatak količine vezanog testosterona služi kao zaliha. Samo mala količina slobodnih androgena može ući u stanice

prostate (zbog hidrofobnosti testosterona) i vezati se za AR (10,11).

Sinteza androgena regulirana je osi hipotalamus-hipofiza-testis. Početak je regulacije stvaranja testosterona u hipotalamusu gdje se stvaraju gonadotropin oslobađajući hormoni (engl. *Gonadotropin-releasing Hormone* - GnRH) poznati kao hormoni koji oslobađaju folikulstimulirajući hormon (engl. *Follicle-stimulating Hormone Releasing Hormone* - FSH-RH) te oni koji oslobađaju luteinizirajući hormon (engl. *Luteinizing Hormone-releasing Hormone* - LHRH). Pod utjecajem FSH-RH iz prednjeg dijela hipofize oslobađa se folikulstimulirajući hormon (engl. *Follicle-stimulating Hormone* - FSH), dok se pod utjecajem LHRH iz hipofize oslobađa luteinizirajući (engl. *Luteinizing Hormone* - LH). FSH i LH djeluju na testise. FSH pojačava u Sertolijevim stanicama testisa stvaranje proteina koji vežu androgene i time utječe na spermatogenezu. LH, koji se u muškaraca također naziva i hormonom koji podražuje intersticijske stanice (engl. *Interstitial Cell Stimulating Hormone* - ICSH), potiče stvaranje testosterona u Leydigovim stanicama testisa.

Sekrecija LH i FSH regulirana je testosteronom i predstavlja klasični mehanizam negativne povratne sprege. Testosteron djeluje povratno inhibicijski u dvije točke. Na razini hipofize blokira djelovanje GnRH i na razini hipotalamusa inhibira oslobađanje GnRH (Slika 2.).



**Slika 2. Os hipotalamus-hipofiza-testis koja sudjeluje u sintezi androgena. GnRH (LHRH) potiče lučenje LH. Testosteron u muškaraca djeluje povratno inhibicijski na dvije razine: prvo na razini hipofize, blokirajući djelovanje GnRH, i drugo na razini hipolamausa inhibirajući oslobađanje GnRH (LHRH); (Preuzeto i modificirano iz Šamija i sur.) (1).**



### **1.1.6. Fiziologija na razini organa**

Prostata ima egzokrinu ulogu, a navažniji dio te uloge sudjelovanje je u stvaranju i izlučivanju sperme. Sekret koji izlučuje prostata mješavina je organskih i anorganskih sastojaka. U njemu se nalazi i čitav niz proteina. To su prostata specifični antigen (engl. *Prostate Specific Antigen* - PSA), prostatična kisela fosfataza (engl. *Prostatic Acid Phosphatase* - PAP), beta-mikroseminoprotein (engl. *Beta-microseminoprotein* - MSMB), za prostatu vezujući protein (engl. *Prostate-binding Protein*) i semenogelini. Izlučivanje PAP i PSA pod utjecajem je androgena.

#### **1.1.6.1. Prostata specifični antigen (PSA)**

Prostata specifični antigen (engl. *Prostate Specific Antigen* - PSA) monomerni je glikoprotein koji se nalazi samo u epitelnim stanicama prostate. Androgeni receptor potiče ekspresiju PSA, a epidermalni čimbenik rasta (engl. *Epidermal Growth Factor* - EGF) ju inhibira (12). PSA je enzim-serinska proteaza iz porodice proteina kalikreina, a kodiran je genom *k1k3* koji se nalazi na kromosomskoj lokaciji 19q13.4 (13). PSA je aktivna i kao arginin-esteraza s enzimskom aktivnosti sličnoj kimotripsinu i tripsinu (14). Smatra se da je glavna funkcija PSA u ejakulatu proces razgradnje ugrušaka, a sam je značaj tog procesa u organizmu nepoznat.

Iz epitelnih stanica u kanaliće prostate dolazi kao inaktivni proenzim (pro-PSA) dugačak 224 aminokiseline, a aktivira se cijepanjem sedam N-terminalnih aminokiselina (15). Intaktni PSA nakon ulaska u cirkulaciju veže se na inhibitore proteaza. Preostaje mala frakcija enzima (10% - 30% ukupnog PSA), proteolitički se cijepa i kao takva slobodno cirkulira u organizmu (slobodni PSA). Koncentracija je PSA u sjemenoj tekućini između 0,5 i 5,0 mg/mL, a u serumu je znatno manja (1,0-4,0 ng/mL). U krvi se nalazi u dva oblika: slobodni PSA i vezani PSA.

#### **1.1.6.2. Prostatična kisela fosfataza (PAP,PSAP,ACPP)**

Prostatična kisela fosfataza (engl. *Prostatic Acid Phosphatase* - PAP, PSAP, ACPP) je glikoprotein uključen u sastav ejakulata. Njenu ekspresiju, također, reguliraju androgeni. Zbog niske osjetljivosti i specifičnosti ne rabi se kao dijagnostički biomarker. Gen za PAP nalazi se na kromosomskoj lokaciji 3q21-q23 (16). Ima ulogu u oplodnji jajne stanice. Kod bolesti prostate povećana je ekspresija stanične prostatične kisele fosfataze (engl. *Cellular Prostatic Acid Phosphatase* -

cPAP) koja je bitna za defosforilaciju Her 2 receptora.

## **1.2. RAK PROSTATE**

Rak prostate naziv je za skupinu malignih oboljenja koja se razvijaju u žlijezdi muškog reproduktivnog sustava - prostati.

### **1.2.1. Epidemiologija**

U današnje vrijeme rak prostate jedan je od javnozdravstvenih problema u cijelom svijetu, osobito u razvijenim zemljama. Brzi porast incidencije posljedica je poboljšane dijagnostike i uvođenja probira. Prema podacima GLOBOCAN- a za 2012. godinu rak prostate drugi je najčešći zloćudni tumor u muškaraca, nakon karcinoma pluća. Također, šesti je uzrok smrtnosti od raka uopće (17). Broj novooboljelih iznosio je 1 112 000, a broj umrlih 307 000. Prema podacima Registra za rak Hrvatske broj novootkrivenih u godini 2014. bio je 1708, a 750 ljudi umrlo je od raka prostate (18).

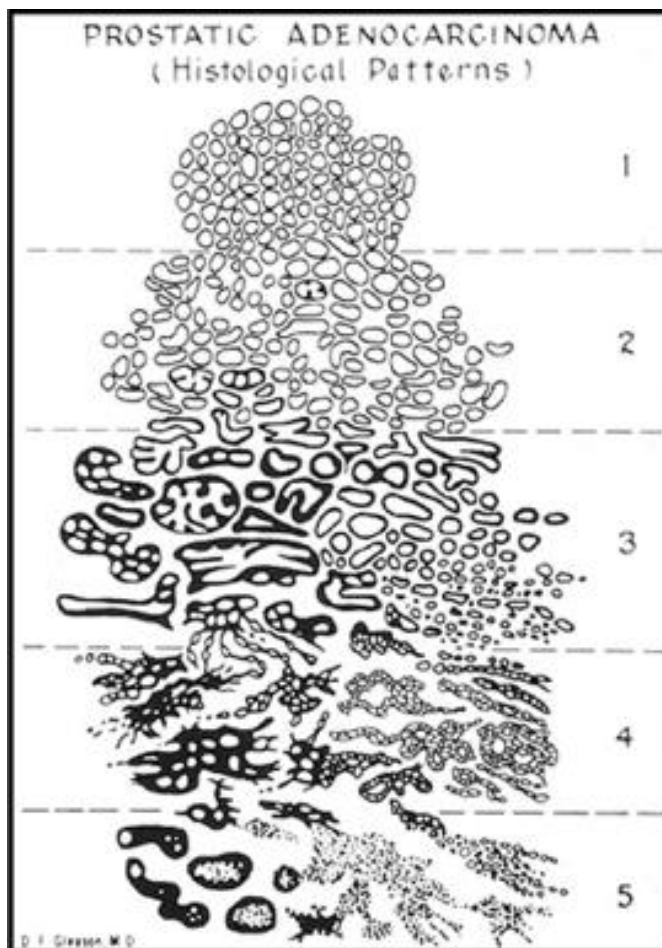
### **1.2.2. Patologija raka prostate**

Tumori prostate podijeljeni su u nekoliko osnovnih skupina. Acinarni adenokarcinom čini 90% do 95% svih primarnih karcinoma prostate. Preostalih 5% do 10% otpada na posebne tipove: atrofični, adenokarcinom prostatičnih duktusa, pseudohiperplastični adenokarcinom, adenokarcinom pjenušavih stanica, mucinozni adenokarcinom, karcinom stanica tipa «prstena pečatnjaka», onkocitni adenokarcinom, adenoskvamozni i karcinom pločastih stanica, bazaloidni i adenocistični karcinom, urotelni karcinom prostate, neuroendokrini karcinom, sarkomatoidni karcinom i karcinom nalik limfoepiteliomu (19).

Mikroskopska dijagnoza ili sumnja na karcinom temelji se na kombinaciji arhitekturnih i citoloških kriterija te se u slučaju nemogućnosti razlikovanja promjena koje imitiraju karcinom prostate nadopunjuje imunohistokemijskim markerima karakterističnim za karcinom prostate.

### 1.2.2.1. Gleasonov sistem gradiranja

Svjetska zdravstvena organizacija preporuča sljedeći sustav za određivanje diferenciranosti raka prostate - Gleason stupanj, odnosno zbroj (20). U uporabi je od 1974. Godine te se temelji na arhitekturnom načinu rasta tumora. Tumori su podijeljeni u 5 stupnjeva/tipova rasta (Slika 3.). Tipovi Gleason 1, 2 i 3 predstavljaju tumore koji dijelom nalikuju normalnom prostatičnom tkivu, dok Gleason 4 i 5 predstavljaju slabo diferencirane tumore koji se značajno razlikuju od normalnog žljezdanog tkiva (Tablica 1.). Konačni stupanj karcinoma prostate određuje se zbrajanjem dvaju najzastupljenijih tipova i prikazuje se tzv. Gleasonovim zbrojem (engl. *Gleason Score*).



Slika 3. Standardna shema histološki raspoređenih Gleasonovih stupnjeva adenokarcinoma prostate (Preuzeto iz Humphrey i sur.) (21).

**Tablica 1. Arhitekturni tipovi karcinoma prostate prema ISUP-ovoj modifikaciji Gleasonova sistema stupnjevanja iz 2005. godine (22).**

Gleasonov stupanj/tip	Opis
Gleasonov stupanj/tip 1.	Oštro ograničeno žarište/čvor građeno od jednoličnih, gusto zbijenih, okruglastih do ovalnih srednje velikih žljezdolikih formacija često je definirano u prošlosti kao Gleason 1 tip. Danas se više ne upotrebljava Gleason zbroj 1+1=2.
Gleasonov stupanj/tip 2.	Relativno oštro ograničeno žarište/čvor građeno od srednje širokih žljezdolikih formacija s minimalnim infiltrativnim načinom rasta na periferiji čvora. Žlijezde su nešto nepravilnije od tipa 1, moguća je blaga atipija stanica, a kribriformne formacije u ovoj skupini nisu dopuštene. Najčešći je u transuretralnim biopsijama prostate.
Gleasonov stupanj/tip 3.	Nepravilne, sitne žljezdolike formacije infiltrativnog načina rasta koje pokazuju značajne varijacije u obliku i veličini. Također, oštro ograničena, sitna kribriformna žarišta, bez vidljivih bazalnih stanica na periferiji se u određenim okolnostima mogu uklopiti u ovaj tip.
Gleasonov stupanj/tip 4.	Sitne, gusto zbijene i konfluirajuće žlijezde nepravilnih lumena te veće,

	neoštro ograničene, kribriformne žljezdolike formacije. U ovu skupinu spadaju i većina manjih kribriformnih žarišta te glomeruloidne formacije.
Gleasonov stupanj/tip 5.	Tračci i pojedinačne stanice bez vidljivog stvaranja žljezdolikih struktura te solidnih područja, s i bez komedo nekroze. Ako se nađe tipična centralna komedonekroza u područjima s izraženom papilarnom i kribriformnom proliferacijom, I navedeni tumori uključuju se u Gleasonov 5. stupanj.

Prisutnost sekundarnog i tercijarnog stupnja tumora te njegovo opisivanje u konačnom nalazu ovisi o stupnju nađene komponente. Prisutnost dobro diferenciranog tumora u manje od 5% tumorskog tkiva zanemaruje se, dok se prisutnost slabo diferencirane komponente (Gleason 4 i 5) obavezno navodi, neovisno o postotku zastupljenosti. Radikalne prostatektomije s multiplim tumorskim čvorovima stupnjuju se prema dominantnom čvoru.

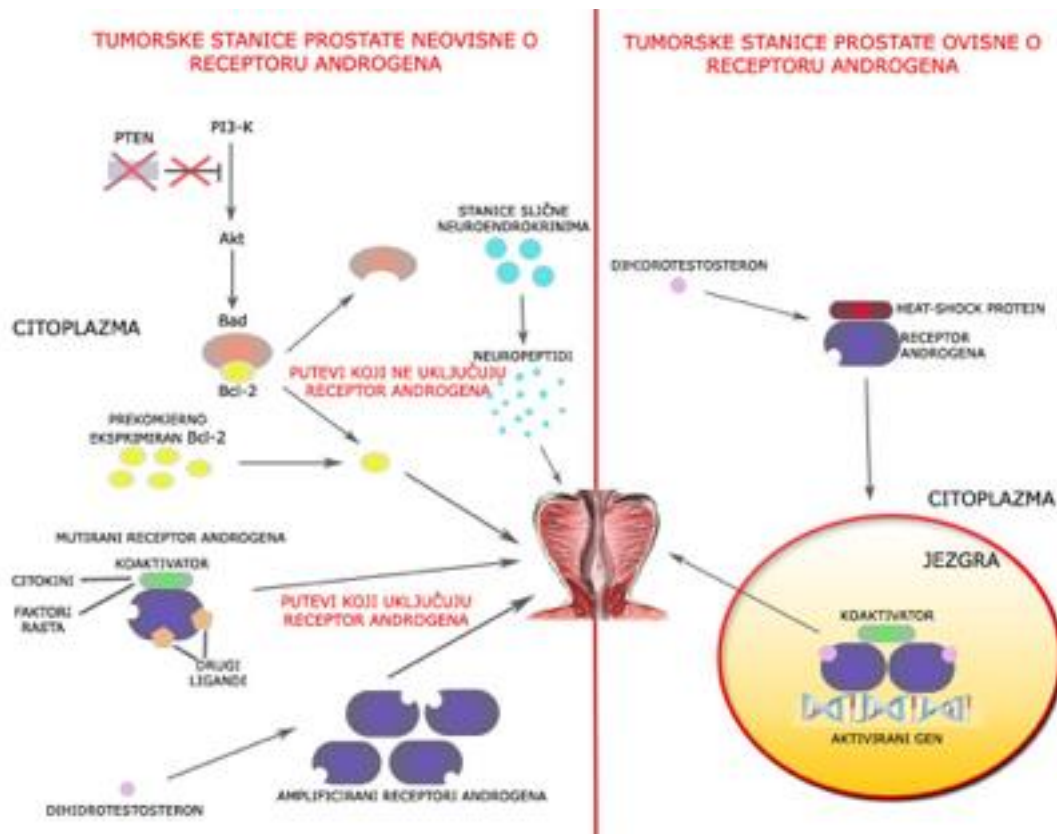
Od strane Internacionalnog društva za urološku patologiju 2014. godine uvedena je nova defincija stupnjeva tumora i predložen je novi sistem stupnjevanja koji se od 2015. godine počinje primjenjivati u svakodnevnoj kliničkoj praksi (23).

### 1.2.3. Histologija i fiziologija raka prostate

Kod tumora prostate smatra se da razvojni mehanizmi iz organogeneze mogu imati utjecaj na karcinogenezu tumora prostate. Smatra se da epitelno-mezenhimalna interakcija ranog razvoja prostate sudjeluje i u nastanku karcinoma prostate (2). S pojavom karcinogeneze dolazi do poremećaja ravnoteže između recipročnih stanica-stanica interakcija. Također, progresija prema tumorogenezi izazvana je parakrinim utjecajem testosterona i estradiola. Kastracija potiče apoptozu epitelnih stanica prostate pri čemu androgeni receptori epitelnih stanica (prisutni u stanicama zrele prostate) nisu bitni za tu funkciju (24,25).

#### 1.2.4. Patofiziologija raka prostate – uloga androgenog receptora

Kod kastracijski rezistentnog karcinoma prostate aktiviraju se alternativni putevi aktivacije AR (Slika 4.). Različiti molekularni mehanizmi mogu dovesti do navedenog napredovanja bolesti. Pritom su najvažnije amplifikacija i prekomjerna izraženost AR, mutacije u ligand-vezujućoj domeni, ligand-neovisna aktivacija i «splice» varijante AR te intrakrinska sinteza androgena (26, 27).



Slika 4. Androgen-AR interakcija u tumorskim stanicama prostate neovisne o AR (lijevo) i ovisne o AR (desno) (Preuzeto iz Šamija i sur.) (1).

#### 1.2.5. Prostata specifični antigen (PSA) i tumor prostate

PSA je enzim «specifičan za prostatu». Zbog nedostatka tumorskog markera, kod karcinoma prostate unatrag 30 godina upotrebljava se u probiru, aktivnom praćenju neliječenih bolesnika kao i u praćenju bolesnika podvrgnutih radikalnoj

prostataktomiji, radioterapiji te ostalim oblicima terapije.

#### **1.2.5.1. Prostata specifični antigen (PSA) kao biomarker raka prostate**

Thomson i sur. pokazali su da 75% muškaraca s pozitivnom vrijednosti koncentracije PSA ( $\geq 4$  ng/mL) nemaju karcinom te da 15% muškaraca s negativnim vrijednostima PSA i urednim kliničkim nalazom imaju karcinom prostate (28). PSA probir se u puno većem opsegu primjenjuje u SAD-u, nego u evropskim zemljama, ali unatoč tome stope preživljavanja su podjednake.

Osim činjenice da su nam neophodni markeri kojima bismo rano i precizno otkrili karcinom prostate, veliki nesrazmjer između stopa incidencije i preživljavanja upozorava na potrebu što točnijeg izdvajanja skupine bolesnika koji zahtijevaju agresivniji terapijski postupak.

U posljednjih desetak godina sve se više rabi pojam tumorskoga proteinskog biomarkera. To je protein koji se može izmjeriti u tjelesnoj tekućini ili tkivu te reflektira prisutnost tumora u organizmu. Također, ujedno i pokazuje stupanj njegove agresivnosti, stadija i odgovora na terapiju (29). Danas se tumorski proteinski biomarkeri dijele u tri skupine: dijagnostičko-probirni, prognostički i stratifikacijski (svrstavaju bolesnika u skupinu ovisno o odgovoru na liječenje).

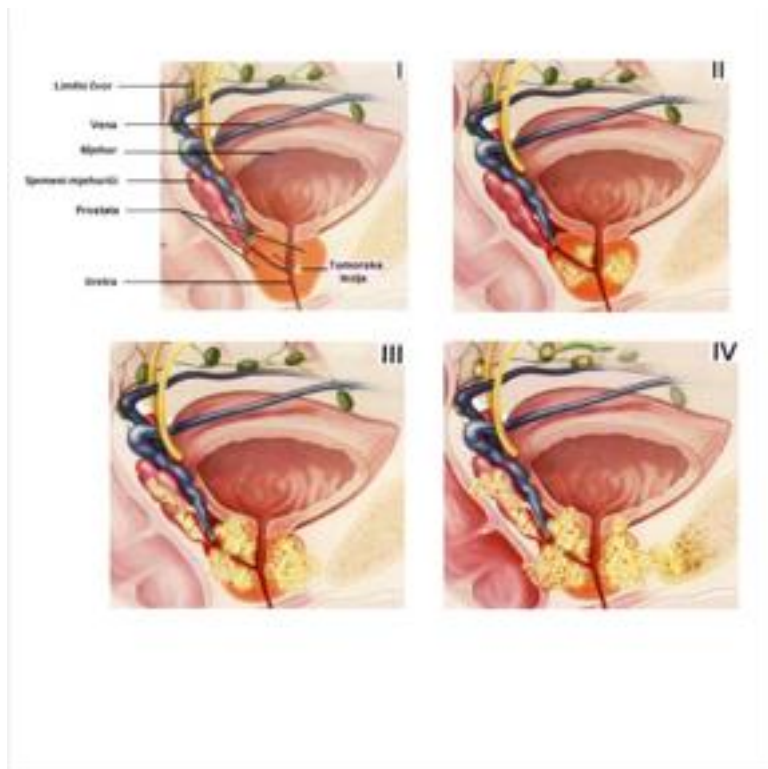
Kod karcinoma prostate, PSA je još uvijek predstavnik svih triju skupina koji može pokazati promjene u progresiji bolesti, ali je nedostatan za detaljniju rasčlambu bolesti.

#### **1.2.5.2. Prostata specifični antigen i dijagnoza raka prostate**

U dijagnozi raka prostate služimo se anamnezom, digitorektalnim pregledom (DRP), transuretralnim ultrazvukom (TRUS), određivanjem PSA i biopsijom prostate. Za podjelu tumora po stadijima najčešće se primjenjuje TNM klasifikacija (Slika 5.) (30).

PSA nije isključivo tkivno specifičan, pa se male količine nalaze i u drugim tkivima te su nepoznate funkcije (31). Može biti povišen kod upala prostate, nakon ejakulacije, digitorektalnog pregleda, invazivnih postupaka (kateterizacija) i tijekom primjene nekih lijekova. U navedenim slučajevima, u smislu dijagnostičke obrade

promatra se omjer slobodnog (engl. *Free* - fPSA) i ukupnog (engl. *Total* - tPSA) PSA (f/t PSA). Ako je udio slobodnog PSA viši od 25% ukupnog PSA, postoji mala vjerojatnost da bolesnik ima karcinom prostate. Nasuprot tome, ako je slobodni PSA manji od 10%, radi se biopsija prostate. S obzirom na to da PSA nije pouzdan marker, osobito u koncentracijski nedefiniranom području (PSA od 4 do 10 ng/mL), određuju se još brzina PSA (engl. *PSA Velocity*) i gustoća PSA (engl. *PSA Density*), koji nam pomažu u razlikovanju benigne hiperplazije i karcinoma prostate.



**Slika 5. Stadiji tumora prostate prema TNM klasifikaciji. Slijeva nadesno prikazani su stadiji od I do IV (Prilagođeno prema <http://www.cancer.gov>) (30).**

### 1.2.6. Liječenje raka prostate

Unatoč svojim nedostacima, PSA probir omogućio je da se poveća broj bolesnika kod kojih se dijagnoza postavlja u ranim lokalnim stadijima bolesti. Ti se bolesnici podvrgavaju lokalnim radikalnim metodama liječenja s ciljem izlječenja. Najčešće su primjenjivane metode radikalna prostatektomija te radioterapija uz mogućnost upotrebe hormonske terapije.



U liječenju prostate optimalan terapijski postupak zahtijeva procjenu rizika, tj. određivanje vjerojatnosti širenja bolesti u limfne čvorove i vjerojatnosti prisutne metastatske bolesti. Pretpostavka prognoze značajna je za odluku o obliku početnog terapijskog liječenja i primjenu dodatnih oblika liječenja. Tijekom godina razvijen je čitav sustav nomograma koji kliničaru pomažu procijeniti rizik. Oni uzimaju u obzir međusobnu interakciju više prognostičkih čimbenika u svrhu što preciznije individualne procjene stadija i prognoze svakog bolesnika. Smatraju se puno točnijim alatom od prognostičkih skupina jer imaju mogućnost usustavljanja diskordantnih početnih vrijednosti. Danas su u tijeku studije kojima je cilj usavršavanje nomograma primjenom molekularnih biomarkera i najnovijih radioloških metoda (32).

#### **1.2.6.1. Stratifikacija bolesnika za postoperativno liječenje**

Bolesnici u lokalnim stadijima bolesti najčešće se podvrgavaju radikalnoj prostatektomiji ili radioterapiji uz mogućnost upotrebe hormonske terapije. Definicija visokorizične skupine bolesnika za povrat bolesti nakon početnog liječenja nije jednostavna, a ta skupina bolesnika nema podjednako lošu prognozu daljnjeg tijeka razvoja bolesti (33). Veliki prognostički raspon nakon inicijalnog liječenja posljedica je heterogenosti tumora prostate. Dodatna otežavajuća činjenica je da ne postoji pouzdan prognostički biomarker koji bi bio učinkovit u odabiru skupine bolesnika koja će imati najveću korist od dodatnog nastavka liječenja.

Nakon radikalne prostatektomije primjenjuju se adjuvantna i *salvage* radioterapija uz individualnu kombinaciju s hormonskom terapijom kao sistemskim oblikom liječenja. Radioterapija se primjenjuje u fazi sumnje na lokalnu ostatnu bolest i predstavlja kurativan terapijski postupak. Adjuvantna se primjenjuje odmah nakon radikalne prostatektomije, a kod *salvage* radioterapije čeka se na porast vrijednosti PSA kao parametra koji upozorava na postojanje lokalnog recidiva.

Rezultati studija pokazali su da je rizik za recidiv bolesti nakon radikalne prostatektomije najveći kod bolesnika sa sljedećim nepovoljnim patohistološkim obilježjima: pozitivan rub (R1), infiltracija sjemenskih mjehurića (SVI), ekstraprostatično širenje (EPE) i visok Gleason zbroj.

Jedno od pitanja na koje se tražio odgovor jest, kako nakon radikalne prostatektomije izdvojiti skupinu bolesnika koja će imati korist od dodatnih terapijskih

postupaka (adjuvantna/*salvage* radioterapija u mogućoj kombinaciji s hormonskom terapijom?).

Provedeno je preko 180 studija s bolesnicima koji su liječeni radioterapijski s ciljem procjene prognostičke vrijednosti različitih čimbenika (vrijednost PSA, Gleason zbroj, vrijeme udvostručenja PSA, pozitivni rubovi i dr.) koji bi izdvojili skupinu bolesnika s najvećom koristi od daljnjeg liječenja (34,35). Iz studija su proizašli kriteriji koje svakodnevno rabimo prilikom donošenja odluke o nastavku i vrsti liječenja. Unatoč tome, još uvijek ne može prepoznati gore navedenu skupinu bolesnika. Upravo zbog toga, adjuvantna i *salvage* radioterapija imaju dvostruku ulogu, a ta je da su istovremeno dijagnostički i terapijski postupci. Nakon njihove provedbe, razotkrivaju se bolesnici s agresivnijim oblicima raka prostate kod kojih radioterapija nije učinkovita, a s druge strane liječimo skupinu bolesnika koji nemaju toliko agresivne oblike bolesti.

#### **1.2.6.2. Značaj nepovoljnih patohistoloških obilježja kod odluke o provođenju postoperacijske radioterapije**

Studije su pokazale da su značajni prognostički pokazatelji koje vidimo iz patohistološkog nalaza pozitivan kirurški rub, prodor tumora kroz kapsulu, infiltracija sjemenih mjehurića i metastaze u zdjeličnim limfnim čvorovima.

Pozitivan kirurški rub utvrđuje se kao dosezanje tumora do tintom označenog ruba resektiranog uzorka. Sama njegova prisutnost upućuje na veću mogućnost recidiva zbog moguće ostatne bolesti u zdjelici (36).

Dva su načina nastanka tumorski pozitivnog ruba. Jedan je zbog zarezivanja u ekstraprostatični dio tumora koji se širi izvan granica resekcije, a rizik za nastanak istog povezan je s agresivnijim tumorima. Drugi način nastanka ovisi o tehnici operatera i posljedica je nepažnje (37).

Studija koju su proveli Eastman i sur. na 4629 bolesnika s T1-T3 tumorom prostate pokazala je da je pojavnost pozitivnog kirurškog ruba 20% (u rasponu od 0% do 48%) (37). Općenito, kod lokalno uznapredovale bolesti stopa pozitivnih rubova značajno je veća. Značaj tumorski pozitivnih resekcijskih rubova leži u činjenici da oni smanjuju bolest i ukupno preživljavanje te su povezani s pojavom biokemijskog

relapsa bolesti (33% - 62% bolesnika) (37).

Značenje je prodora tumora kroz kapsulu prostate kao prognostičkog pokazatelja upitno. Naime, studije ne dokazuju jedinstven stav o utjecaju ovog prognostičkog pokazatelja, a prisutan je u do 50% bolesnika (37).

Posljednje negativno patohistološko obilježje važno za postavljanje indikacije za radioterapiju infiltracija je sjemenskih mjehurića. Istraživanja su pokazala da je ona važna kao neovisan prognostički pokazatelj za pojavu udaljenih hematogenih metastaza (38). Dio studija ističe važnost infiltracije sjemenskih mjehurića i za lokalnu kontrolu bolesti.

### **1.2.6.3. Adjuvantna radioterapija**

Adjuvantna radioterapija vrsta je radioterapije koja se primjenjuje kod bolesnika koji imaju nepovoljna patohistološka obilježja, a time i visok rizik za pojavu recidiva bolesti nakon radikalne prostatektomije, a prije pojave istog.

Svrha adjuvantne radioterapije uništavanje je ostatne mikroskopske bolesti u ležištu prostate nakon radikalne prostatektomije. Na taj način smanjuje se rizik lokalnog i biokemijskog recidiva. S obzirom na to da zaostale tumorske stanice u ležištu prostate mogu biti polazište metastaza, njen konačni cilj smanjenje je ukupnog mortaliteta (1). Upravo je iz tog razloga kod liječenja bolesnika nakon radikalne prostatektomije važno prepoznati one koji imaju veću vjerojatnost lokoregionalnog relapsa bolesti.

Negativna patohistološka obilježja temelj su indikacije za adjuvantnu radioterapiju a potvrđena su rezultatima triju velikih randomiziranih studija faze III (SWOG 8794, EORTC 22911 i ARO 96-02) (39,40,41).

U studiji SWOG 8794 primarni cilj bio je preživljavanje bez metastaske bolesti. U EORTC 22911 početni cilj bio je lokalna kontrola bolesti, ali je kasnije promijenjen u praćenje preživljavanja bez znakova bolesti. Cilj posljednje studije iz ove grupe (ARO 96-02) bio je preživljavanje bez biokemijskog relapsa bolesti. Primjenjivana je različita definicija biokemijskog relapsa bolesti (od 0.005 do 0,4 ng/mL).

Prednost adjuvantne radioterapije od 20% u obliku perioda bez biokemijskog relapsa

bolesti pokazale su sve tri studije. Pritom je značajan benefit od 30% koji se definira kao biokemijski relaps bolesti nakon 5 godina imala skupina bolesnika s R1 i pT3 rakom prostate.

Također, varijabilnost tumora prostate očituje se iz rezultata koji se odnose na podatke praćenih bolesnika s nepovoljnim patohistološkim parametrima, tj. na petogodišnji period bez biokemijskog relapsa bolesti koji je kod SWOG studije iznosio 44%, EORTC-a 56% te kod ARO studije 54%.

Uočivši rezultate nameće nam se sljedeće pitanje: postoji li mogućnost prekomjernog tretiranja bolesnika primjenom adjuvantne radioterapije (engl. *Overtreatment*)?

U dvjema studijama dio bolesnika u grani koja se pratila nakon porasta PSA liječen je *salvage* radioterapijom te su zbog toga imali bolje mogućnosti preživljavanja.

U tijeku su tri velike randomizirane studije (RADICALS, RAVES i GETUG17) koje bi trebale dati odgovor na pitanje je li je bolja adjuvantna ili *salvage* radioterapija i kada bi se trebala uključiti hormonska terapija uz zračenje.

#### **1.2.6.4. Značaj PSA kod odluke o provođenju postoperacijske radioterapije**

Kod bolesnika kod kojih je provedena radikalana prostatektomija poslijeoperacijski povišen PSA rabi se kao biomarker koji pokazuje da bolesnik ima aktivnu bolest. Ustanovljeno je da je PSA prisutan u krvi bolesnika 18 do 24 mjeseca prije pojave klinički manifestne bolesti (42).

Smatra se da postoperativno povišenje vrijednosti PSA u serumu nije samo znak da bolesnik ima bolest u ležištu prostate, tj. lokalnu bolest, već se PSA uporebljava kao biomarker koji utvrđuje da bolesnik može imati metastatsku bolest ili istodobno lokalnu i metastatsku bolest. Provedena su istraživanja kojima je cilj bio vidjeti postoji li aktivna tumorska bolest u ležištu prostate i u kakvom je odnosu s povišenom vrijednosti PSA. Fowler i sur. su u 39% bolesnika s vrijednostima PSA  $\geq$  0,4 ng/mL, u najmanje tri uzastopna navrata, patohistološki potvrdili tumorske stanice u poslijeoperacijskom ležištu prostate. Potvrda postojanja tumorskih stanica bila je prisutna u čak 23% bolesnika urednih fizikalnih nalaza (43). Studije su, također, pokazale da je najčešće mjesto pojave lokalnog recidiva u blizini vezikouretrale

anastomoze (63%), potom u retrovezikalnom prostoru (17%) te u vratu mokraćnog mjehura (10%) (44).

Tijekom godina dokazano je da visoka preradioterapijska vrijednost PSA ima negativan utjecaj na ishod bolesnika liječenih *salvage* radioterapijom. Postavilo se pitanje: koja vrijednost PSA označuje aktivnu bolest?

S vremenom se počeo razvijati «interval PSA» izmjeren nakon radikalne prostatektomije koji upućuje na lokalni recidiv. Zbog smanjene snage PSA, kao biomarkera, i heterogenosti bolesti istraživači su ubrzo ustanovili da je nužno gledati interval koji se novim spoznajama vremenom sužavao i na taj način omogućio donošenje jedinstvene definicije biokemijskog recidiva. Posebna pozornost usmjerena je na donju vrijednost zbog mogućnosti pretretiranosti bolesnika, gornju vrijednost zbog mogućnosti razvijene okultne metastatske bolesti i potvrdu povišene vrijednosti zbog mogućnosti tranzitornog povišenja PSA zbog ostatnog tkiva prostate. Granične vrijednosti koje su se gledale bile su  $PSA \geq 0,4$  ng/mL i  $PSA \geq 0,2$  ng/mL s posebnim osvrtom na vrijednost drugog mjerenja. Zbog nešto veće osjetljivosti prihvaćena je definicija koja je imala graničnu vrijednost od 0,2 ng/mL.

Na taj je način riješen problem primjene vrlo niskog praga biokemijskog recidiva bolesti zbog veće mogućnosti pretretiranosti bolesnika kod kojih je mjerljiv PSA te zbog prisutnog benignog rezidualnog tkiva prostate. Postoji studija koja je pokazala da je jednokratni porast PSA na vrijednost koja je manja od 0,4 ng/mL povezan sa stabilnom, neprogresivnom bolesti u 50% ispitanika (45). Upravo zbog toga, trebalo bi potvrditi trend porasta PSA prije postavljanja indikacije za *salvage* radioterapiju.

Danas se biokemijski recidiv definira kao detektabilna vrijednost  $PSA \geq 0,2$  ng/mL uz još jednu potvrdu vrijednosti  $PSA \geq 0,2$  ng/mL, tj. kao porast vrijednosti PSA u dva uzastopna mjerenja. Nepovoljna patohistološka obilježja i promjene vrijednosti PSA temelj su za danas najčešće upotrebljavane kombinacije parametara koji potvrđuju ima li bolesnik lokalnu ili sistemsku bolest nakon radikalne prostatektomije.

Kombinacija pokazatelja koja je povezana s manjom vjerojatnošću lokalnog recidiva nakon radikalne prostatektomije sastoji se od: negativnoga kirurškog ruba, Gleasonova zbroja  $< 7$ , sporijeg porasta PSA s periodom duljim od godine dana između radikalne prostatektomije i porasta PSA te vremenom udvostručenja PSA

dužim od 12 mjeseci.

Kombinacija pozitivnoga kirurškog ruba, biokemijskog recidiva i agresivnog tumora (Gleason zbroja od 8 do 10 te brzog udvostručenja PSA) povezana je s većom vjerojatnošću metastatske bolesti (46). Pravovremeno otkrivanje biokemijskog recidiva i brzog udvostručenja PSA kod bolesnika s agresivnijim tumorima (Gleason zbroja od 8 do 10 i pozitivnog ruba) još uvijek upućuje na pojavu lokalnog recidiva i zahtijeva brzi početak liječenja prije značajnijeg porasta PSA i pojave metastatske bolesti.

#### **1.2.6.5. *Salvage* radioterapija**

*Salvage* ili spasilačka radioterapija vrsta je radioterapije koja se provodi kod bolesnika nakon radikalne prostatektomije, koji imaju rezidualni ili recidivirajući rak prostate uz uvjet da udaljene metastaze nisu prisutne. Naziva se spasilačka jer je to jedini oblik terapije koji ovim bolesnicima pruža mogućnost izlječenja. PSA je u ovom slučaju prognostički biomarker i služi kao pokazatelj vjerojatnog postojanja bolesti uključujući u većini slučajeva oblike bolesti bez znakova diseminacije ili klinički detektabilne bolesti u standardnoj dijagnostičkoj obradi.

Prilikom odluke o indikaciji *salvage* radioterapije promatraju se dvije skupine prognostičkih pokazatelja. Jedna skupina povezana je s PSA (vrijednost PSA prije prostatektomije i prije početka terapije, vrijeme od kirurškog zahvata do pojave biokemijskog recidiva, vrijeme udvostručenja PSA), a drugu skupinu čine nepovoljna patohistološka obilježja (Gleason zbroj, infiltracija sjemenskih mjehurića i pozitivan rub).

Obje skupine pokazale su se značajnim pokazateljima preživljavanja bez biokemijskog relapsa bolesti, dok su se kao prognostički pokazatelji agresivne bolesti izdvojili kratko vrijeme udvostručenja PSA (kraće od 12 mjeseci) ili Gleason zbroj od 8 do 10 (46). Ustanovljena je njihova veza s većim rizikom udaljenih metastaza te se počelo smatrati da bi ova skupina bolesnika imala najveću dobit uvođenjem još jednog oblika liječenja (hormonske terapije).

U posljednjih petnaestak godina objavljen je čitav niz restrospektivnih studija koje su istraživale *salvage* radioterapiju.

Stephenson i sur. proveli su retrospektivnu studiju s najdetaljnijom analizom niza prediktivnih čimbenika koji upućuju na pojavu recidiva nakon *salvage* radioterapije (46). Cilj je bio izdvojiti bolesnike koji imaju najveću dobit od liječenja i indentificirati čimbenike koje upućuju na bolji odgovor. Nakon 45 mjeseci praćenja, 50% ispitanika imalo je progresiju bolesti, 10% razvilo je udaljene metastaze, a zbog karcinoma prostate umrlo je 4% ispitanika. Najznačaniji prediktori progresije bolesti bili su Gleason zbroj 8 do 10, prijeterapijska vrijednost PSA > 2.0 ng/mL, negativne kirurške margine, udvostručenje PSA ≤ 10 mjeseci i infiltracija sjemenskih mjehurića. Također, ustanovili su da u skupini bolesnika s visokim stupnjem i/ili brzim udvostručenjem PSA, za koje se mislilo da su neizlječivi, ranom primjenom *salvage* radioterapije postiže 37% vjerojatnosti četverogodišnjeg perioda bez progresije bolesti. Posljedica ovih rezultata bila je promjena uvriježenog mišljenja da bolesnici s agresivnom bolesti imaju već okultnu metastatsku bolest i da za njih nema izlječivog tretmana. Nadalje, većina ovih bolesnika primala je androgen deprivacijsku terapiju (ADT) koja je oblik terapijskog postupka koji ne izlječuje.

*Salvage* radioterapija dovodi do pada vrijednosti PSA u 60% do 70% bolesnika. Desetogodišnje praćenje bolesnika pokazalo je da se samo u 20% do 30% bolesnika ne razvije relaps bolesti. Nema dovoljno podataka koji bi odgovorili koja je to vrijednost PSA koja upućuje da bolesnik ima odgovor na terapiju. Trenutno se gleda vrijednost PSA < 0,3 ng/mL.

Još uvijek nema jasnih smjernica za primjenu hormonske terapije u kombinaciji sa *salvage* radioterapijom. Postoje samo 23 studije, ali su dobiveni različiti rezultati. Sedam studija pokazalo je statistički značajno bolji ishod u grupi bolesnika liječenih kombinacijom, a u 8 studija dokazan je nešto bolji ishod koji nije bio od većeg značaja (47). Rezultati randomiziranih studija koje su u tijeku dat će odgovor i na ovo pitanje.

Iz svega navedenog vidljivo je da PSA zauzima značajno mjesto od dijagnoze bolesti do svih segmenata liječenja i praćenja bolesnika. Ograničenje PSA kao biomarkera dovodi do postojanja širokog spektra bolesnika koji se svrstavaju u iste prognostičke skupine. Usprkos cijelom nizu nastojanja, detaljnija raščlamba i podjela skupina za sada nisu moguće. Posljedica toga otežano je prepoznavanje bolesnika s agresivnim tumorima i njihovo promptno radikalno liječenje. S druge strane, u

skupinama se nalazi velik broj bolesnika kod kojih, zbog postojanja pojedine negativne značajke bolesti, ne možemo odmah prepoznati da se radi o indolentnim oblicima tumora i koje izlažemo nepotrebnom liječenju. Upravo zbog toga, nužan je pronalazak novih biomarkera koji bi nam pomogli u detaljnijoj karakterizaciji tumora i samim time bolesti.

### **1.3. PROTEOMIKA**

Kada je početkom ovog tisućljeća Craig Venter po prvi put odredio sekvencu čitavog ljudskog genoma, dokazano je da su geni ono što funkcionalno čini međustaničnu razliku, no, posljedično, razlika nastaje i u ekspresiji proteina, metabolita, šećera, lipida i svih ostalih građevnih i funkcionalnih dijelova stanice. Proteom je ukupni sastav proteina u određenoj stanici, tkivu ili organizmu, a proteomika je znanstvena disciplina koja se bavi njegovom analizom. Složenost proteomike proizlazi iz činjenice da se proteom razlikuje od stanice do stanice i pod utjecajem je okoliša (izloženost toksinima i patogenima, progresija bolesti, stadij razvoja i sl.). Budući da su proteini strukturne i funkcionalne stanične makromolekule, koje ujedno sudjeluju u njezinim procesima, molekularna karakterizacija proteoma važna je za potpuno razumijevanje bioloških sustava (48). U ukupnosti bioloških sustava proteomika i genomika komplementarne su discipline.

Zbog brojnosti proteina i njihove multifunkcionalnosti (unutar jedne eukariotske stanice nalazi se minimalno 50 000 različitih proteina, a ako se uzmu i poslijetranslacijske modifikacije u obzir, broj postaje još veći) proteomika, kao znanstvena disciplina, ima nekoliko pravaca: otkrivanje molekularnih mehanizama iz različitih staničnih procesa, karakterizaciju interaktoma - proteinskih mreža, otkrivanje dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera i identifikacija potencijalnih meta nove generacije lijekova (49,50).

Proteomika se intenzivno počela razvijati tek sredinom devedesetih godina i to zahvaljujući razvoju biokemijskih i bioinformatičkih tehnologija. Istovremeno, s razvojem proteomike podudara se i jedan od puteva razvoja onkologije, primjena individualnog oblika liječenja tumora. Dvije su glavne prepreke na tom putu



sposobnost razvoja i progresije tumora u sistemska bolest (nakupljanjem mutacija dolazi do aktivacije i inaktivacije proteina, fuzije proteina ili prekomjerne ekspresije uslijed genske amplifikacije) i stjecanje otpornosti na primijenjeni lijek (51). Klinička proteomika, kao zasebni dio proteomike, interdisciplinarno je istraživačko područje usmjereno analizi tkiva i tjelesnih tekućina; uzimajući u obzir prisutnost ciljanih stanica, heterogenost stanica, kvantitativnu zastupljenost biomarkera, mogućnost dobivanja uzoraka kroz duži vremenski period, eksperimentalni dizajn te optimalne metode selekcije (52).

Jedan od najvažnijih pravaca istraživanja tumora prostate usmjeren je prema razlikovanju indolentne od agresivne bolesti. Posljedica PSA probira povećanje je broja bolesnika s postavljenom dijagnozom u lokalnim stadijima bolesti što vodi pretretiranosti bolesnika s manje agresivnim tumorima. Još uvijek ne postoji učinkovito liječenje agresivnih i metastatskih oblika bolesti. Objavljeni rezultati proteomskih analiza upućuju na to da bi se primjenom kvalitativne i kvantitativne analize proteina mogli otkriti novi biljezi, senzitivniji i specifičniji od danas najčešće rabljenog PSA.

### **1.3.1. Primjena spektrometrije masa u proteomici**

Proteomika proučava proteinski sastav stanica, uključujući identifikaciju, modifikaciju, kvantifikaciju i lokalizaciju pojedinih proteina. Spektrometrija masa tehnika je koja upotrebljava analizu masa u svrhu karakterizacije proteina te spada među najobuhvatnije alate koji se danas rabe u proteomici. Brz razvoj tehnike osobito je vidljiv u posljednja dva desetljeća što se očituje u značajnom napretku u eksperimentalnim metodama, instrumentima i pristupima analize podataka (53). Da bismo analizirali proteine ili peptide pomoću spektrometrije masa, u većini slučajeva moramo razdvojiti smjesu proteina, koja se dobije iz bioloških uzoraka, za što primjenjujemo tehniku dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE).

#### **1.3.1.1. Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE)**

Pojmom elektroforeza označavamo gibanje čestica u električnom polju, a njihova pokretljivost ovisi o jakosti električnog polja, svojstvima čestica i sredini u kojoj se gibaju. Primijeni li se električno polje na otopinu proteina, različite će se

molekule, ovisno o gustoći svojeg naboja, gibati različitim brzinama prema anodi ili katodi. Nosači su tvari koje nam omogućuju da tako razdvojene čestice ostanu oštro odvojene nakon prestanka djelovanja električnog polja. Tehnike elektroforeze često se kombiniraju u svrhu boljeg razdvajanja kompleksnih uzoraka. Tako je dvodimezionalna gel elektroforeza (2-DE) nastala spajanjem izoelektričnog fokusiranja kao prve dimenzije i elektroforeze na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecil sulfat (SDS-PAGE) kao druge dimenzije (54). Metoda razdvaja proteine s obzirom na njihova dva fiziološka svojstva: naboj i veličinu.

Izoelektrično fokusiranje razdvaja proteine na temelju njihovog ukupnog naboja, odnosno izoelektrične točke u pH gradijentu. Proteini sadrže pozitivno i negativno nabijene skupine, tj. amfoliti su i imaju svojstvo ovisnosti naboja o koncentraciji vodikovih iona u otopini, odnosno o pH. Izoelektrična točka ( $pI$ ) je vrijednost pH pri kojoj je ukupni naboj amfolita jednak nuli te se kod ovakvog pH amfolit ne giba u električnom polju. Na taj se način molekula proteina u gradijentu pH pod utjecajem električnog polja giba prema elektrodi suprotnog naboja. Tijekom tog puta protein prima ili otpušta vodikove ione te se njegov naboj i pokretljivost smanjuju do njegove izoelektrične točke u gradijentu. Ako protein difundira iz svoje izoelektrične točke, postaje električki nabijen i vraća se natrag. Upravo zbog toga, proteini s različitim izoelektričnim točkama raspoređuju se različito kroz gel (55,56).

Nakon što se proteini razdvoje u prvoj dimenziji, razdvajanje se nastavlja ovisno o njihovoj molekularnoj masi u drugoj dimenziji pomoću elektroforeze na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrij dodecil sulfat (SDS-PAGE). Poliakrilamidni gel nosač je koji nastaje polimerizacijom monomera koji tvore molekularno sito. Natrijev dodecil sulfat (SDS) anionski je deterdžent koji denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance te ih potom veže. Kad se proteini kreću kroz poliakrilamidni gel usporavaju ovisno o omjeru njihove mase i naboja te, također, ovisno o svom obliku. Količina SDS-a vezana po jedinici mase proteina je stalna. Posljedično tome, pokretljivost različitih polipeptida u gelu ovisi samo o njihovoj molekularnoj masi. Rezultat toga je da proteini manje molekularne mase migriraju brže kroz pore gela nego proteini veće molekularne mase. Na kraju elektroforeze dobijamo gel kod kojeg se veći proteini nalaze pri vrhu, a manji pri dnu gela. Posljednji korak dvodimenzionalne gel elektroforeze vizualizacija je razdvojenih proteina metodama

detekcije. Bojenje i obilježavanje dvije su glavne metode otkrivanja proteina. Najjednostavnije i rutinski rabljene tehnike bojenja su bojenje srebrom ili otopinom Coomassie Brilliant Blue (57). Dvije najčešće upotrebljavane metode obilježavanja su radioobilježavanje i obilježavanje bojom.

### **1.3.1.2. Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa analitička je metoda koja u plinskoj fazi razdvaja ione pod utjecajem električnog, a po potrebi i magnetskog polja, te se potom detektiraju prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Za analizu je dovoljna mala količina uzorka, a ova analitička metoda omogućuje nam dobivanje podataka povezanih sa strukturom molekula široka raspona masa.

Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionski izvor, analizator masa i detektor. Spektar masa nastaje na osnovu sljedećeg principa rada spektrometra. Na početku se procesa analit uvodi u ionski izvor i dolazi do njegove ionizacije. Nastali ioni putuju u analizator masa u kojem se razdvajaju prema svojim omjerima mase i naboja. Nakon razdvajanja, registrira ih detektor pri svakoj vrijednosti omjera mase i naboja, rezultat čega je stvaranje spektra (58).

#### **1.3.1.2.1. Ionizacijska komora**

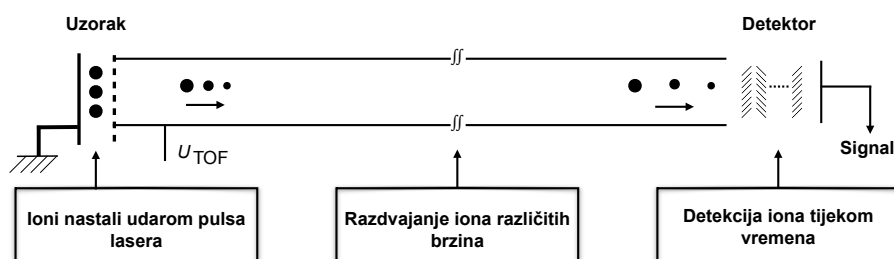
Ionizacijska komora osnovni je dio spektrometra masa u kojem se događa ionizacija analita. Osnovni princip rada temelji se na procesu kemijske ionizacije kojom se uzorak u većini slučajeva ionizira tijekom faznog prijelaza. Posljedično tome, da bi analit mogao sudjelovati u ionizaciji, mora biti u plinovitom stanju. Proces se odvija na način da ionizacijski izvor stvara nabijene ione dodatkom ili oduzimanjem elektrona ili protona te dolazi do stvaranja iona iz molekula ili prijenosa naboja na neutralne molekule analita, koje se potom usmjeravaju prema analizatoru masa. Danas se ionizacijske tehnike dijele u dvije glavne skupine ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita i energiji koja se prenosi tijekom procesa. Primjena tvrdih ili mekih ionizacijskih izvora dovodi do prijenosa različite količine unutarnje energije tijekom ionizacijskog procesa. Prijenos velike količine energije omogućuju tvrdi ionizacijski izvori uzrokujući posljedično jaku fragmentaciju analita. Kod mekih izvora fragmentacija izostaje kao posljedica prijenosa male količine energije (58).

U skupinu koja uzima u obzir fizikalno kemijska svojstva analita spadaju plinske i desorpcijske metode. Uzorak se prije ionizacije prevodi u plinovito stanje kod plinskih ionskih izvora nasuprot desorpcijskim metodama kojima se uzorak izravno iz čvrstog ili tekućeg stanja prevodi u ionizirani plin. Kod krutina uzorak se prvo miješa s čvrstom ili tekućom matricom. Nakon djelovanja energetskih čestica ili fotona, ioni analita desorbiraju se s površine (59).

### 1.3.1.2.2. Analizator masa

Ioni nastali tijekom ionizacije putuju u analizator spektrometra masa gdje se odijeljuju u vremenu i prostoru na temelju svog omjera  $m/z$ . Najčešće su u upotrebi sljedeći tipovi analizatora masa: kvadrupol (engl. *Quadropole*), analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time-of-Flight* - TOF), ionska stupica (engl. *Ion Trap*), Fourier-transformirani spektrometar masa ionsko ciklotronske rezonancije (engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* - FT ICR) i analizator s magnetskim sektorom (55).

Osnovna postavka rada analizatora masa kvantno je mehanički postulat koji kaže da će brzina iona biti proporcionalna njihovoj masi ako im se inicijalno preda ista količina kinetičke energije (60). Rad analizatora koji mjeri vrijeme leta temelji se na činjenici da ioni različitih masa imaju različitu brzinu. Manji ioni kreću se brže, a veći sporije. Posljedično tome, na detektor dolaze u različitim vremenima (59) što se može uočiti na Slici 6.

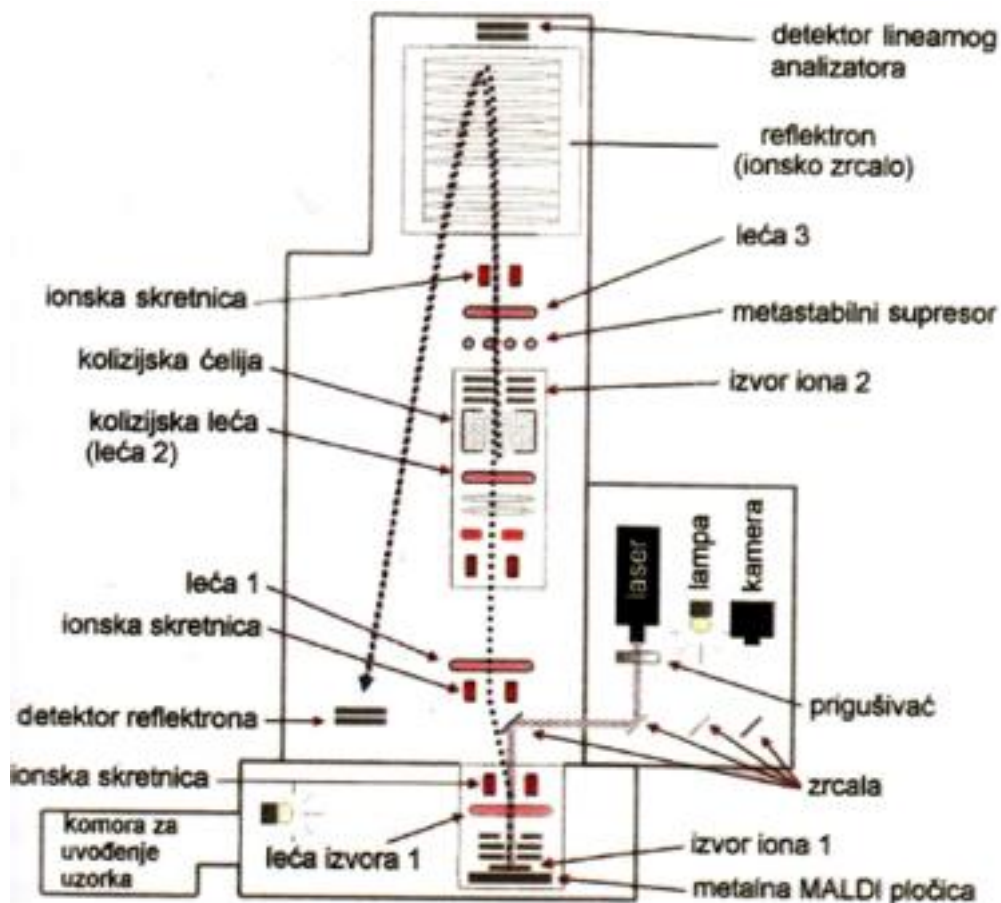


**Slika 6. Shematski prikaz analizatora masa koji mjeri vrijeme leta (Preuzeto iz Galić i sur.) (59).**

TOF je analizator prilagođen pulsним tehnikama ionizacije jer mjerenje vremena leta zahtijeva da svi mjereni ioni istovremeno počnu put kroz analizator. Može se dogoditi da ioni istih masa nemaju jednaku kinetičku energiju i zbog toga dolaze na detektor u različitim vremenima. Zbog toga se u TOF analizatore ugrađuje ionsko zrcalo ili reflekttron. To je uređaj čija je svrha zadržavanje iona veće energije i na taj način osiguravanje njihovog istovremenog dolaska na detektor kad i iona istog omjera  $m/z$  i manje početne energije.

Kombinacijom različitih analizatora masa mogu se poboljšati svojstva spektrometra masa. Prvi analizator masa služi za probir iona specifičnog omjera  $m/z$ , dok drugi ili treći analizator kod takvog spektrometra masa ima ulogu pretražnog analizatora (55).

MALDI TOF/TOF spektrometar masa kao analizator ima kombinaciju linearnog i reflektroenskog TOF instrumenta (Slika 7.). Kod ove vrste analizatora, u prvom TOF analizatoru provede se selekcija iona tako da ostanu samo oni ioni koji imaju specifični omjer  $m/z$ . Između prvog i drugog analizatora nalazi se kolizijska ćelija u kojoj se ioni sudaraju s molekulama inertnog plina, prelaze u ekscitirano stanje što dovodi do pucanja kovalentne veze, najčešće duž okosnice peptidnog lanca. Vrijednosti  $m/z$  fragmenata određuju se u drugom TOF analizatoru (59). Ovaj analizator omogućuje strukturnu analizu proteina primjenom tehnike tandemne spektrometrije masa (MS/MS).



Slika 7. Shematski prikaz MALDI TOF/TOF spektrometra masa. (Preuzeto i prilagođeno prema <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html>) (61).

### 1.3.1.2.3. Detektori

Ioni se nakon prolaska kroz analizator masa moraju detektirati i prevesti u mjerljiv signal. Danas se najčešće rabe elektronski multiplikator, višekanalne diode ili fotomultiplikator (59). Oni funkcioniraju na način da nabijeni ioni udaraju u diode, oslobađaju se elektroni koji se različitim postupcima ovisno o vrsti detektora prevode u mjerni signal.

### 1.3.1.2.4. Matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem

Posebno dostignuće koje je omogućilo primjenu spektrometrije masa kao

metode analize proteina zasigurno je razvoj tehnikâ ionizacije. Danas se najčešće upotrebljavaju matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) i elektroraspršenje (ESI) (53).

Matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* - MALDI) tehnika je ionizacije koja se najčešće rabi u analizi biomakromolekula i sintetskih polimera. Na početku, otopina uzorka miješa se sa suviškom matrice na način da su molekule analita u potpunosti izolirane jedna od druge i nanosi se na MALDI pločicu. Laserska zraka je izvor ionizacije, a danas se najčešće u tu svrhu upotrebljavaju UV laseri (dušikov laser (337 nm,  $\lambda$ ) i Nd: YAG laser (266 i 355 nm,  $\lambda$ )). Ona se usmjerava na površinu kristala, tj. «čvrstu otopinu» matrice i analita i uzrokuje ekscitaciju molekula matrice. Zbog velike količine energije akumulirane u kratkom vremenu u krutini, dolazi do naglog zagrijavanja te sublimacije i ekspanzije matrice (a unutar nje i intaktnog analita) u plinsku fazu. Pobuđene molekule matrice stabiliziraju se prijenosom protona na molekule analita. Nastali ioni analita potom se odjeljuju u analizatoru (62, 63) što je vidljivo na dolje umetnutoj Slici 8. Glavna karakteristika UV lasera je proizvodnja pulsnih laserskih zraka koje uzrokuju stvaranje neizmjeničnih ionskih snopova. Zbog toga se MALDI povezuje s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time-of-Flight* - TOF).



Slika 8. Prikaz MALDI procesa ionizacije. (Preuzeto i prilagođeno prema

[http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html)  
(63).

MALDI je tehnika koja nam omogućuje strukturnu analizu proteina uz pomoć dviju metoda. To su metoda otiska prsta (engl. *Peptide Mass Fingerprinting* – PMF) i metoda tandemne spektrometrije masa (MS/MS).

Metoda otiska prsta temelji se na postupku cijepanja nepoznatog protein tripsinom (64). To je proteaza koja specifično cijepa protein na karboksilnom kraju argininskih i lizinskih ostataka. Produkt analize proteina spektrometrom je spektar masa triptičkih peptida koji je za svaki protein jedinstven poput otiska prsta. Tako se analizirani protein potom identificira pretraživanjem spektralnih baza podataka proteina i peptida. Kada se primjenom ove metode ne mogu dobiti zadovoljavajući rezultati, zbog npr. poslijetranslacijskih modifikacija ili kompleksnosti proteinskih smjesa, primjenjuje se metoda tandemne spektrometrije masa (MS/MS). Kod ove metode značajan je TOF/TOF analizator.

U pristupu analiza odozdo-nagore protein se prije same analize pocijepa tripsinom. Ionizirani peptidni fragmenti koji nastaju dalje se analiziraju zasebno (u postavkama instrumenta izabire se određeni broj najintenzivnijih signala). Oni izlaze iz prvog analizatora masa u kolizijsku ćeliju te dolazi do njihovog sudaranja s molekulama inertnog plina prisutnih u ćeliji. Zbog eksitacije dolazi do fragmentacije peptida i pucanja jedne od peptidnih veza na amino ili karboksilnom kraju, a naboj ioniziranog peptida prenosi se na jedan od dobivenih fragmenata. Fragmenti se dalje usmjeravaju u sljedeći analizator masa koji razdvaja sve pristigle fragmente prema njihovom omjeru  $m/z$ . U dobivenom spektru masa svaki prethodni signal predstavlja fragment s jednom aminokiselinom manje, a iz razlike tih signala može se iščitati slijed peptida. Za određivanje proteina dovoljan je slijed i od nekoliko aminokiselina, a iz informacije o primarnoj strukturi, može se odrediti gen ili njegov homolog koji kodira za taj protein.

#### **1.3.1.2.5. Proteinske baze podataka**

Nakon analize spektrometrijom masa proteini se identificiraju usporedbom eksperimentalnih rezultata s podacima pohranjenim u spektralnim bazama podataka



proteina i peptida. To su baze koje sadrže: teorijske (dobivene predviđenom translacijom određenih lokusa gena) i potvrđene primarne slijedove proteina, moguće teorijski nastale peptide nakon proteolitičkog cijepanja i molekulske ione peptida gdje su proteinski standardi visoke čistoće pocijepani proteazom (najčešće tripsinom) (65).

*Protein Data Bank* (PDB) spada među najstarije baze (66). Ona sadrži gotovo sve podatke o strukturi određenog proteina, slijedove DNA i RNA koji kodiraju za određeni protein te cijeli niz bioloških, funkcionalnih i strukturalnih podataka (<http://www.wwpdb.org>).

UniProt baza podijeljena je u četiri središnje baze, a jedna od njih sadrži SwissProt bazu koja omogućuje korisniku cijeli niz informacija o traženom proteinu. Pogodna je za pretraživanje strukturalne analize proteina, odnosno metodu otiska prsta (67).

NCBI nr je baza čiji su unosi zapravo skup unosa nekoliko baza (translatirana genomska baza GenBank, PIR, PDB, SwissProt, PDB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Sadrži dva važna pretraživačka alata: BLAST i Entrez. BLAST uspoređuje određene slijedove proteina ili nukleinskih kiselina s unosima u bazi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

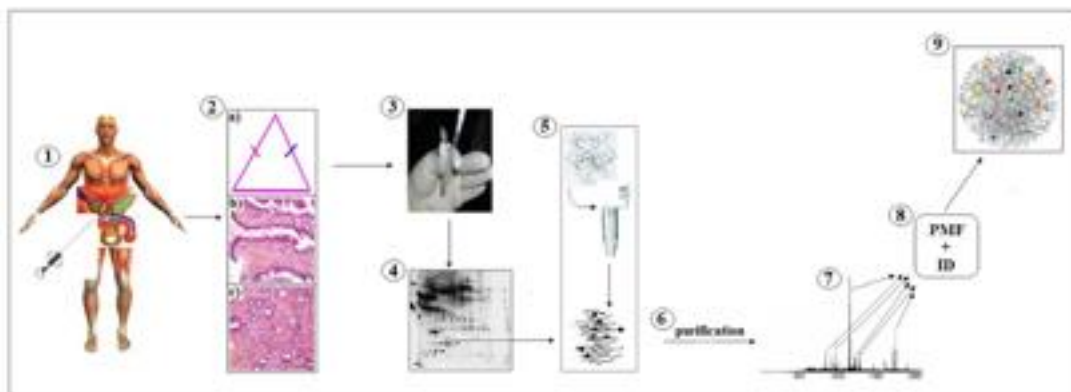
#### **1.3.1.2.5.1. Pretraživanje proteinskih baza podataka**

Baze podataka pretražuju se posebnim računalnim programima, tzv. pretraživačima. Mascot je razvijen po uzoru na MOWSE program i ujedinjuje sve danas poznate načine pretraživanja baza: PMF, pretraživanje na temelju spektra dobivenog tandemnom spektrometrijom masa (engl. *MS/MS Ions Search*) i pretraživanje slijedom (engl. *Sequence Query*; [http://www.matrixscience.com/search\\_intro.html](http://www.matrixscience.com/search_intro.html)). Ovim računalnim programom pretražuju se sljedeće baze podataka: MSDB, NCBI nr, SwissProt i nukleotidna baza dbEST (56). Nakon što se dobiju rezultati, program ih potom statistički obradi s obzirom na značajne vrijednosti vjerojatnosti prema Mowse rezultatu (engl. *Probability Based Mowse Score*) (68).

#### **1.3.2. Dosadašnja proteomska istraživanja tkiva karcinoma prostate**

Proteomskim istraživanjima otkriven je velik broj potencijalnih biomarkera

karcinoma prostate koji se još uvijek ne rabe u svakodnevnom onkološkom liječenju. Razlog leži u činjenici da njihova vrijednost nije potvrđena u drugim neovisnim istraživanjima. Kod proteomskih analiza sve više se uzima u obzir heterogenost tumora. Da bismo razumjeli koji su stanični putevi odgovorni za nastanak i progresiju tumora prostate, moramo rastaviti kompleksni ekosistem tumorskog tkiva na sastavne djelove (fibroblasti, epitelne, endotelne, živčane i druge stanice). Posljednjih godina usavršavaju se dvije nove tehnike u izoliranju čistih tumorskih subpopulacija – sortiranje stanica (engl. *Cell Sorting*) i laserska mikrodisekcija (engl. *Laser Capture Microdissection* - LCM) (69). Sortiranje stanica omogućuje izolaciju stanica na osnovu njihovih CD markera. Laserska mikrodisekcija omogućuje izolaciju homogenih tipova stanica iz tkiva na osnovu njihove histomorfologije nakon specifičnog bojenja te vizualizacijom ispod mikroskopa. Kvalitativne analize omogućuju sada već široko primjenjivanje tehnike spektrometrije masa (MALDI/ESI-MS uz upotrebu dvodimenzionalnih separacijskih tehnika) te kvantitativne i-TRAQ spektrometrije masa koja omogućuje kvantitativne analize proteomskih varijacija (Slika 9.).



**Slika 9. Hodogram s prikazom slijeda protomske analize od uzimanja uzoraka, pripreme, spektrometrije masa i analize dobivenih podataka.**

Jedan od najvažnijih biomarkera tkiva karcinoma prostate koji je važan za prognozu bolesti je AR. Androgeni su ključni regulatori rasta karcinoma prostate na dva načina. Jedan je stimulacija proliferacija, a drugi je inhibicija apoptoze. Međutim, kod karcinoma prostate značajnu ulogu igra epitelno-mezenhimalna interakcija koja podržava proliferaciju tumorskih stanica parakrinim medijatorima (IGF, EGF, FGF)

koji aktiviraju tirozin-kinazne receptore i na taj način potiču proliferaciju karcinoma prostate. Kod kastracijski rezistentnog karcinoma prostate aktiviraju se alternativni putevi aktivacije AR. Za vrijeme progresije karcinoma prostate dolazi do učestalih promjena u aktivaciji puteva važnih za AR što je djelomično povezano s mutacijama. Do danas zna se za više od 600 mutacija ovog receptora. Nedavno je napravljena mreža proteina određivanjem protein-protein interakcija triju genetičkih varijanti androgenog receptora koja je pokazala da se ovisno o izoformi AR različito aktiviraju putevi koji su aktivni u karcinomu prostate (70). Također, jedno od značajnih područja potrage za novim lijekovima povezano je s koaktivatorima AR koji sudjeluju u razvitku rezistencije hormonski ovisnog karcinoma prostate. Proteomska istraživanja, također, pokušala su potvrditi značaj epitelno-mezenhimalne interakcije kod karcinoma prostate. Khamis i sur. pronašli su povećanu ekspresiju integrina- $\alpha$ -6 u epitelu karcinoma prostate kojeg nije bilo u miofibroblastima (71).

Proveden je čitav niz proteomskih analiza koje su se usmjerile prema traženju biomarkera globalnim pristupom neovisno od veze s androgenim receptorom.

Glavni cilj jedne skupine proteomskih analiza bio je pronalazak specifičnih biomarkera koji bi omogućili razlikovanje karcinoma prostate od benigne prostatične hiperplazije, dok se druga skupina usmjerila prema traženju biljega koji bi omogućili otkrivanje agresivnijih tumora s ciljem optimalnijeg liječenja.

Među prvima provedena je studija na četrnaest ispitanika pri čemu je otkriven niz proteina jezgrina matriksa u tkivima karcinoma prostate kao što je to npr. protein molekulske mase 56000 kDa, naziva PC-1(72). Tkiva karcinoma prostate u ovoj su studiji uspoređivana s uzorcima tkiva benigne hiperplazije i s normalnim kontrolama.

Pawletz i sur. prvi su primijenili lasersku mikrodisekciju i SELDI MS u proteomskoj analizi i ustanovili da bi ova kombinacija mogla biti korisna u analizi tkiva karcinoma prostate (69). Primjenom laserske mikrodisekcije slijeđene analizom intaktnih proteina SELDI spektrometrijom masa Zheng i sur. identificirali su protein (tzv. Pca-24) u 94% tkiva karcinoma prostate (n=17) koji nije bio prisutan u uzorcima normalnog tkiva (n=17) i uzorcima benigne hiperplazije (n=12) (73). Ummani i sur. otkrili su pojačanu ekspresiju prekursora prostatične kisele fosfataze, prohibitina, NDRG 1 tumor supresor proteina, *heat shock* proteina, citoskeletnih proteina i

enzima u uzorcima biopsije benigne hiperplazije (n=11) i karcinoma prostate (n=12) (74).

Dio istraživača usmjerio se na traženje «skupa biomarkera» koji su različiti između karcinoma prostate i benigne hiperpalazije. Alaiya i sur. pronašli su pojačanu ekspresiju 22 proteina kod usporedbe uzoraka karcinoma prostate (n=8) i benigne hiperplazije (n=16) te je za 15 od njih nađena različita ekspresija u različitim laboratorijima (75). Pojačana ekspresija disulfid-izomerase, 14-3-3-proteina, enoil CoA-hidraze, prohibitina i B-tubulina  $\beta$ -2 nađena je kod karcinoma prostate, a keratina-II, dezmina, HSP71, ATP-sintaze- $\beta$ -lanca i kreatin kinaze- $\beta$ -lanca kod benigne hiperplazije.

Dio studija usmjerio se na određivanje razike ekspresije proteina između tumora niskog i visokog Gleason zbroja. Skvortsov i sur. primijenili su kombinaciju 2D-DIGE, laser mikrodisekcije i MALDI-TOF/TOF MS u analizi parnih uzoraka bolesnika s tumorima Gleason zbroja 6 i bolesnika s tumorima Gleason zbroja većeg ili jednakog 8 (n=23). Pronašli su pojačanu ekspresiju hsp 60 u tumorskom tkivu u usporedbi s zdravim te lamin A kao diskriminatorni protein između tumora niskog i visokog stupnja (76).

Mnoga proteomska istraživanja potvrdila su rezultate radova u kojima su primjenjivane imunohistokemijske tehnike analize tkiva karcinoma prostate. Potvrđena je povećana ekspresija prostata specifičnog membranskog antigena (PSMA),  $\alpha$ -metilacil CoA racemaze i gp 96 kod metastaskih uzoraka.

*Heat shock* proteini jedna su od najzastupljenijih skupina koja se pojavljuje u cijelom nizu rezultata. Tako je pronađena promijenjena ekspresija gp 96, BIP proteina, hsp60, 27 i 90 (77). Proteomskom analizom nađena je supresija gp 96 u cirkulirajućim tumorskim stanicama, a *microarray* metodom u tkivima što upućuje na moguću ulogu u progresiji karcinoma prostate. Protein GRP 78/BIP sudjeluje u karcinogenezi posredovanoj gubitkom PTEN-a, jednog od najvažnijih tumorsupresora karcinoma prostate. Tan i sur. pronašli su vezu između pojačane ekspresije AR i GRP 78 kod neliječenih bolesnika i lošijeg ishoda, a ovaj protein također posreduje u djelovanju AR u inhibicije autofagije (78,79). Katanasaka i sur. smatraju da BIP može regulirati proliferaciju endotelnih stanica induciranih VEGF-om

i na taj način može biti ciljna molekula terapije posredovane protutijelima (80). Hsp 60 ima ulogu u postizanju bazične konformacije polipeptida i u karcinogenezi, osobito u preživljenju i proliferaciji tumorskih stanica. Njegova uloga kod karcinoma prostate potvrđena je imunohistokemijskim, genomskim i proteomskim istraživanjima. Tako se hsp 60 pokazao kao neovisan faktor biokemijskog recidiva, a njegova pojačana ekspresija nađena je osim kod androgen rezistentnih linija stanica karcinoma prostate i kod lokalno uznapredovanih tumora liječenih hormonskom terapijom s ranijim početkom hormonski rezistentne bolesti i kraćim tumor specifičnim preživljenjem (81,82).

U novije vrijeme započela je i primjena iTRAQ-a, tehnologije koja nam omogućuje kvantitativnu analizu proteoma i izravnu usporedbu između dvaju uzoraka.

Proteomske varijacije nisu neovisne od genetskih i epigenetskih varijacija. Također, miRNA ima značajnu ulogu u postranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena i na taj način sudjeluje u modulaciji proteoma i njegovim varijacijama za vrijeme razvoja tumora i progresije. Khan i sur. proveli su identifikaciju peptida iTRAQ masenim spektrometrom te kvantificirali više od 1000 proteina koji su organizirani u proteomske zapise karakteristične za stadij bolesti. Daljnjom PCR analizom potvrdili su važnost miR-128 kao važnog negativnog regulatora invazije stanica karcinoma prostate (83). Poznato je da miRNA utječe na proliferaciju i progresiju karcinoma prostate regulacijom signalnog puta AR, p 27 i drugih proteina te da deregulacija miRNA značajno utječe na staničnu fiziologiju i funkciju onkogeni. Valja napomenuti da zadnjih godina raste svijest o potrebi proteomskih biomarkera u praćenju odgovora na liječenje. Christensen i sur. naglašavaju potrebu utvrđivanja proteomskog potpisa kod serijskih uzoraka za vrijeme frakcionirane radioterapije (84).

#### **1.4. SVRHA RADA**

Svrha ovog istraživanja je pridonijeti razlikovanju indolentnog od agresivnog karcinoma prostate povezivanjem protomskih podataka, organiziranih u individualni interakom svakog ispitanika, s Gleasonovim zbrojem, vrijednosti PSA, patohistološkim obilježjima, provedenim onkološkim liječenjem i praćenjem.

## **2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza ovog istraživanja je da se prognostički čimbenici karcinoma prostate otkrivaju preko mreže proteinskih interakcija koju izgrađuju proteini čija ekspresija je specifično promjenjena za svakog pojedinog ispitanika.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja mogu se podijeliti na opće i specifične ciljeve:

#### A) Opći ciljevi:

- 1.) Odrediti nove i potvrditi već poznate proteine koji imaju ulogu u malignoj transformaciji tkiva prostate.
- 2.) Otkriti razliku u ekspresiji proteina tkiva karcinoma prostate i zdravog tkiva kod istog ispitanika (nadprodukcija nasuprot podprodukciji proteina).
- 3.) Izraditi mrežu biomarkera eksprimiranih iz uzoraka svakog ispitanika.
- 4.) Ustanoviti pomaže li mreža biomarkera u procjeni agresivnosti i rizika progresije karcinoma prostate kod svakog ispitanika.

#### B) Specifični ciljevi:

- 1.) Usporediti mrežu biomarkera s podacima dobijenim nakon praćenja bolesnika koji uključuju pojavu biokemijskog recidiva, primijenjeno onkološko liječenje i odgovor na terapiju praćen promjenom PSA.
- 2.) Ustanoviti daje li nam mreža dodatne informacije koje nam pomažu u pouzdanijem izdvajanju ispitanika koji imaju najveću korist od daljnjeg liječenja.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. MATERIJALI

#### 4.1.1. Osnovne kemikalije

U eksperimentalnom radu rabljene su sljedeće kemikalije:

inhibitori proteaza (Roche, Švicarska); urea za elektroforezu (Sigma, SAD); tiourea,  $\geq 99\%$  (Sigma, SAD); ditiotreitol (DTT),  $\geq 99\%$  (Sigma, SAD); jodoacetamid (IAA),  $\geq 90\%$  (Sigma, SAD); natrijev dodecilsulfat (SDS),  $\sim 95\%$  (Sigma, SAD); glicin,  $\geq 99\%$  (Sigma, SAD); CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonio]-1-propansulfonat),  $\geq 98\%$  (Sigma, SAD); Trizma® base,  $\geq 99,9\%$  (Sigma, SAD); akrilamid,  $\geq 99\%$  (Sigma, SAD); bisakrilamid,  $\geq 98\%$  (Sigma, SAD); amonijev persulfat (APS),  $\geq 98\%$  (Sigma, SAD); tetrametiletilendiamin (TEMED),  $\sim 99\%$  (Sigma, SAD); agaroz (Sigma, SAD); amonijev sulfat,  $\geq 99,5\%$  (Kemika, Hrvatska); amonijev hidrogenkarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), p.a. (Sigma, SAD); acetonitril (MeCN), p.a. (J. T. Baker, SAD); trifluoroctena kiselina (TFA), p.a. (Merck, Njemačka); 4-sulfofenil izotiocijanat  $\geq 95\%$  (Merck, Njemačka); tripsin (Merck, Njemačka);  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA),  $\geq 99\%$  (Sigma, SAD); Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad, SAD); bromfenol modriilo (Fluka, Njemačka); staklene kuglice, 0,4-0,6 mm (Sartorius StedimBiotech GmbH, Njemačka); mineralno ulje (Bio-Rad, SAD); aceton, p.a. (Kemika, Hrvatska); etanol, p.a. (Kemika, Hrvatska); metanol, p.a. (Kemika, Hrvatska); 1-butanol, p.a. (Kemika, Hrvatska); octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), (99%;  $\varphi$ ), p.a. (Kemika, Hrvatska); klorovodična kiselina (HCl), (37%;  $\varphi$ ), p.a. (Kemika, Hrvatska); kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), p.a. (Kemika, Hrvatska); fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), (85%;  $\varphi$ ), p.a. (Kemika, Hrvatska); glicerol, p.a. (Kemika, Hrvatska), pročišćena destilirana voda, otpornost  $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}^3$  pri 25 °C, ukupna količina ugljika  $\leq 5 \mu\text{g dm}^{-3}$ .

#### 4.1.2. Puferske otopine

U eksperimentalnom radu upotrebljavane su sljedeće puferske otopine:

radni pufer (7 mol  $\text{dm}^{-3}$  urea, 2 mol  $\text{dm}^{-3}$  tiourea, 40 g  $\text{dm}^{-3}$  CHAPS); M1 pufer (10 g  $\text{dm}^{-3}$  DTT; 14,28% smjesa inhibitora proteaza, 85,72% radni pufer;  $\varphi$ ); pufer za otapanje uzoraka (11,11% smjesa inhibitora proteaza, 88,89% radni pufer;  $\varphi$ ); Bradfordov reagens (100 g  $\text{dm}^{-3}$  Coomassie Brilliant Blue G-250; 10% fosforna

kiselina, 5% etanol;  $\varphi$ ); pufer za elektroforezu (25 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 192 mmol dm<sup>-3</sup> glicin; 0,1% SDS;  $\varphi$ ; pH 8,3); ekvibracijski pufer (75 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, pH 8,8, 6 mol dm<sup>-3</sup> urea, 20 g dm<sup>-3</sup> SDS, bromfenol modriilo na vrhu nastavka pipetora; 30% glicerol;  $\varphi$ ); otopina agaroze (0,5% agaroz, 0,0002% bromfenol modriilo, 95% 5x koncentriran pufer za elektroforezu; w); tripsinski pufer (25 mmol dm<sup>-3</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>); otopina za digestiju tripsinom (10  $\mu$ g/ml tripsina koji je razrijeđen u tripsinskom puferu); ekstrakcijska otopina (50% acetonitril, 45% voda, 5% TFA;  $\varphi$ ); otopina matrice CHCA (5 mg cm<sup>-3</sup> CHCA; 50% MeCN, 49,95% voda, 0,05% TFA;  $\varphi$ ).

#### 4.1.3. Instrumenti i programska podrška

U eksperimentalnom radu rabljeni su sljedeći instrumenti i programi: termomiješalica Comfort (Eppendorf, Njemačka); centrifuga 5415R (Eppendorf, Njemačka); centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka); vakuum centrifuga 5301 (Eppendorf, Njemačka); tresilica IKA® MS 3 basic, brzina 200-3000 rpm (IKA, SAD); tresilica GFL® 3006 (GFL® - Gesellschaft für Labortechnik, Njemačka); spektrofotometar BioPhotometer (Eppendorf, Njemačka); PROTEAN IEF cell (Bio-Rad, SAD); IPG trake, Immobiline™ DryStrip 18 cm, pH 3-10 NL (GE Healthcare, Švedska); jedinica za sastavljanje velikih gelova te jedinica za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu, PROTEAN II XL cell (Bio-Rad, SAD); uređaj za napajanje PowerPac™ 3000 (Bio-Rad, SAD); VersaDoc Imaging System, model 4000 (Bio-Rad, SAD); sonifikacijska kupelj SONOREX (Bandelin, Njemačka); Zip-Tip, C18 (Millipore, SAD); nastavci za pročišćavanje peptida, C18 (Agilent Technologies, SAD); 4800 plus MALDI TOF/TOF™ (Applied Biosystems, SAD); MALDI pločica za nanošenje uzoraka (Applied Biosystems, SAD); PDQuest SW, verzija 7.4.0 (Bio-Rad, SAD); Mascot platforma za pretraživanje, verzija 2.4 (Matrix Science, Velika Britanija), DUST algoritam - De novo Utilizing Sequencing Tool (Institut Ruđer Bošković, Hrvatska).

#### 4.2. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i športa «Proteomska analiza tkiva u bolesnika s karcinomom prostate». Projekt i ovaj doktorski rad dobili su odobrenje Etičkog povjerenstva KB «Dubrava», KBC «Sestre milosrdnice» i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Svi ispitanici bili su poznati s

protokolom i ciljevima istraživanja, a prije uključivanja u istraživanje potpisali su informirani pristanak.

U istraživanje su uključeni ispitanici kojima je zbog dijagnoze karcinoma prostate u KB «Dubrava» učinjena radikalna prostatektomija. Kriterij uključivanja bio je pozitivan nalaz u preoperativnoj biopsiji prostate i dijagnoza adenokarcinoma prostate, Gleason zbroja 6 ili 7 (3+4) ili (4+3) u minimalno 10% pregledanog tkiva u svakom od dva cilindra prostate. U studiju je uključeno 30 ispitanika. Za vrijeme radikalne prostatektomije pristupilo se uzimanju uzoraka i njihovoj pohrani u tekući dušik unutar 10 minuta od vađenja prostate. Proteomska analiza provedena je u 12 ispitanika s parnim uzorcima, tj. uzorkom tumorskog i zdravog tkiva od istog ispitanika. Ispitanici kod kojih nismo uspjeli dobiti parne uzorke bili su isključeni iz istraživanja. Svakom ispitaniku određeni su: veličina i proširenost primarnog tumora (klinički T, N i M stadij), stupanj diferenciranosti tumora (Gleason zbroj), najveća razina PSA u serumu u trenutku dijagnoze i postotak bioptičkog materijala zahvaćenog tumorom.

Nakon radikalne prostatektomije kod ispitanika kod kojih je provedena proteomska analiza određeni su ostali kliničko-patohistološki parametri koji se u kombinaciji s gore navedenim preoperacijskim kliničko-patohistološkim parametrima uzimaju u obzir prilikom donošenja konačne odluke o nastavku liječenja. To su: pozitivan reseksijski rub, proboj kapsule, zahvaćanje sjemenskih mjehurića, perineuralna invazija, prisutne metastaze u limfne čvorove i postoperacijska vrijednost PSA. Provedeno je daljnje onkološko liječenje. Terapijske opcije bile su: praćenje, adjuvantna trodimenzionalna konformalna radioterapija, *salvage* trodimenzionalna konformalna radioterapija +/- androgena deprivacijska terapija. Ispitanici su praćeni određivanjem tromjesečnih vrijednosti PSA.

#### **4.2.1. Uzorkovanje tkiva**

Tijekom radikalne prostatektomije, neposredno nakon vađenja, prostata je pohranjena u plastičnu posudu i hitno prenesena u Klinički zavod za patologiju i citologiju KB «Dubrava». Po zaprimanju, mjerenju i markiranju orijentacije (lijevo/desno), svježa prostata paralelnim je rezovima serijski izrezana. Nakon izrezivanja identificirana su područja makroskopski evidentnog tumora ili izrazito

suspektnog područja te područje koje makroskopski nije zahvaćeno tumorom. Cilj nam je bio za svakog ispitanika pripremiti parni uzorak odnosno cca 0,5 cm<sup>3</sup> tumorskog i zdravog tkiva. Prije odluke o uzimanju tkiva za analizu, makroskopski nalaz prostate uspoređivao se s nalazom preoperativne biopsije (lateralizacija tumora). Uz navedeno, u obzir su se uzimale i tipične lokalizacije tumora (najčešće posterolateralno u perifernoj zoni prostate; uz samu čahuru) i područja s predominantnim benignim promjenama (anteriorno područje i centralna zona prostate). S obzirom na ograničenja makroskopske identifikacije reprezentativnih područja, za svakog ispitanika, uzimana su po dva parna uzorka tumorskog i zdravog tkiva. Mjesta uzimanja uzoraka posebno su označavana, a defekti tkiva u izvađenoj prostati u cijelosti su preuzimani i histološki analizirani. Tkiva su odmah po uzimanju pohranjena u tekući dušik i prenesena u Zavod za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković gdje je izvršena odgovarajuća pohrana uzoraka. Za proteomsku analizu uzeti su samo oni uzorci kojima je u ležištu prostate histološki dokazano samo tumorsko ili zdravo tkivo, tj. ako je postojalo jasno histopatološko razgraničenje tumorskog i zdravog tkiva. Kako jasno razgraničenje, s obzirom na serijsko histološko izrezivanje prostate, samu heterogenu prirodu širenja tumorskoga tkiva i razasutu agregaciju tkiva unutar organa, nije moguće uvijek postići, određeni broj uzoraka je odbačen i nije bio uključen u daljnje istraživanje. Proteomska analiza provedena je na 12 parnih uzoraka.

### **4.3. METODE RADA**

#### **4.3.1. Priprema lizata iz uzoraka tkiva prostate**

Tkiva parnih uzoraka (tkivo karcinoma i zdravo tkivo prostate) usitnjena su i homogenizirana tekućim dušikom u tarioniku. Homogenizirana tkiva su potom otopljena u 1 ml pufera za citolizu (1 ml M1 pufera kojem je netom prije upotrebe dodan ditiotreitol (10 mg na 1 ml pufera)). Dobijeni lizati prenijeti su u plastične epruvete i miješani staklenim kuglicama (0,4-0,6mm) na način da je visina kuglica u epruveti jednaka visini suspenzije tkiva. Lizati su protresani (6 puta po 30 s, s pauzama od 60 s), a zbog zagrijavanja prilikom postupka, hlađeni su ledom (2 - 8°C). Na supernatant prenesen u novu plastičnu epruvetu dodan je volumen M1 pufera (kojem je netom prije korištenja dodan ditiotreitol (10mg na 1 ml pufera)). Pri tome

visina dodanog volumena pufera bila je jednaka visini staklenih kuglica. Protresanje i hlađenje ponavljano je u još dva navrata, a sva tri supernatanta spojena su zajedno i centrifugirana (20 °C, 45 min, 13200 rpm). Novonastali supernatant odvojen je u čistu plastičnu epruvetu i dodano je 8 ml čistog acetona ohlađenog na 20 °C. Smjesa je ostavljena na -20°C preko noći kako bi se uklonile ionske nečistoće i lipidi, a proteini koncentrirali taloženjem. Nakon što su se proteini istaložili, uzorci su centrifugirani (20 °C, 15 min, 5000 rpm) i ponovno isprani acetonom. Postupak je ponovljen nakon 24 sata, aceton je uklonjen, a talog je kratko posušen na zraku i dodano mu je 450 µl pufera za otapanje. Suspenzije su inkubirane (37 °C, 20 min, 700 rpm), a uzorci centrifugirani (5 min, sobna temperatura, 12500 rpm). Nakon prebacivanja supernatanta u čiste epruvete uzeta su po tri alikvota od 15 µl zbog određivanja koncentracije proteina. Uzorci su spremljeni na -20 °C do pokretanja izoelektričnog fokusiranja.

#### **4.3.2. Određivanje koncentracije proteina**

Od ukupne količine otopljenog uzorka odvojena su tri alikvota i serijski su razrijeđeni. Uzorak svakog razrijeđenja otapan je vodi i 10 µl pojedinog razrijeđenja pomiješano je sa 100 µl Bradfordovog reagensa. Razrijeđenjima je izmjerena koncentracija spektrofotometrom i izračunata je koncentracija proteina u samom uzorku.

#### **4.3.3. Rehidracija i izoelektrično fokusiranje**

Izoelektrično fokusiranje prvi je dio dvodimenzionalne gel elektroforeze koji razdvaja proteine ovisno o njihovom ukupnom naboju, tj. na temelju izoelektrične točke u pH gradijentu. Uspješnost metode u razdvajanju proteina ovisi o načinu uspostave pH gradijenta. Danas su u upotrebi dva oblika izoelektričnog fokusiranja. Prvi je uz pomoć slobodnih amfolitnih nosača, dok je drugi uspostava imobiliziranog pH gradijenta.

Slobodni amfolitni nosači (engl. *Carrier Ampholytes* – CA) male su molekule koje posjeduju različite izoelektrične točke (*pI* 3-11). Puferski kapacitet karakteristično je obilježje koje posjeduju ove molekule u svojoj izoelektričnoj točki. Kod izoelektričnog fokusiranja s ovim nosačima njihova smjesa nalazi se unutar

poliakrilamidnog gela. Kad se na nju primijeni električno polje, dolazi do stvaranja pH gradijenta. Otopljeni uzorak mora se nanijeti na gel prije njegove polimerizacije što predstavlja najveći nedostatak ove metode (54, 55).

Imobilizirani pH gradijent (engl. *Immobilized pH Gradient* - IPG) metoda je izoelektričnog fokusiranja koju karakterizira niz pH gradijenata u gelu. Kod nje se imobilini (slabi kiseli i bazični puferi) ugrađuju u poliakrilamidni gel u trenutku njegove polimerizacije. Imobilini ne putuju kroz električno polje te se na taj način izbjegava pojava interferencije koja je izražena kod slobodnih amfolitnih nosača u obliku nepravilne migracije tijekom izoelektričnog fokusiranja (55, 85). Kod ove metode rabe se komercijalno dostupne IPG trake koje se prije upotrebe moraju rehidrirati (86). To su suhe trake gela s imobiliziranim pH gradijentom. Prekrivene su zaštitnim slojem koji štiti gel od oštećenja i kontaminacije.

Nakon rehidracije na gel se nanose proteini te pokretanjem električnog polja kreću se prema imobilinima slične izoelektrične točke.

Prije izoelektričnog fokusiranja kod svih uzoraka uključenih u istraživanje određena je količina proteina koja je nanešena na IPG trake (500-800 µg po uzorku). Uzorci za izoelektrično fokusiranje pripremljeni su tako da je određeni volumen otopljenih uzoraka pomiješan s određenim volumenom pufera M1. Volumeni su određeni na način da su koncentracije uzorka jednake i da ukupni volumen uzorka i pufera iznosi 350 µl. Tako pripremljenom uzorku za izoelektrično fokusiranje dodano je bromfenol modriko te je otpipetiran uzduž kanala kadice za fokusiranje. Na uzorak je pažljivo položena IPG traka (18 cm, pH 3-10 NL) s gradijentnim gelom okrenutim prema dolje. Položaj trake je dobar kad su uklonjeni svi nastali mjehurići zraka ispod nje što je postignuto laganim podizanjem i spuštanjem trake u kanal. Kako bi se spriječilo isušivanje trake i kontaminacija dodano je oko 3 ml mineralnog ulja na njih. Trake su ostavljene na aktivnoj rehidraciji 14 sati u PROTEAN IEF cell pri 50 V na 20° C kako bi proteini ušli ravnomjerno u gel. Potom je na obje elektrode ispod svake trake postavljen filter papirić navlažen vodom i provedeno je izoelektrično fokusiranje prema uvjetima navedenim u Tablici 2.

**Tablica 2. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za dvodimenzionalne analitičke gelove pH 3-10 NL.**

Korak	Porast napona	Ostvareni napon / V	Trajanje / min	Trajanje / V h
SO1	SPORI	200	75	-
SO2	SPORI	500	15	-
SO3	BRZI	500	60	-
SO4	SPORI	1000	15	-
SO5	BRZI	1000	60	-
SO6	SPORI	7000	240	-
SO7	BRZI	7000	-	90000
SO8	BRZI	500	1440*	-

\* - Napon se održava dok se uređaj ne isključi, do maksimalno 24h.

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja trake su ocijeđene od mineralnog ulja i pohranjene na -20°C do daljnje analize.

#### 4.3.4. Ekvilibracija IPG traka

Neposredno prije postupka ekvilibracije IPG trake su izvađene iz hladnjaka i temperirane na sobnoj temperaturi. Početna ekvilibracija provedena je na način da su trake uronjene u epruvete s ekvilibracijskim puferom kojem je dodano 10 g dm<sup>-3</sup> ditiotreitola te su lagano protresane 15 minuta. Uloga ditiotreitola redukcija je disulfidnih mostova. Potom je postupak ponovljen u novim epruvetama s ekvilibracijskim puferom kojem je dodano 25 g dm<sup>-3</sup> jodoacetamida. On alikilira sulfhidrilne skupine na proteinima i sprječava njihovu reoksidaciju tijekom elektroforeze. Na taj način blokirane su interakcije između cisteinskih ostataka koji otežavaju indentifikaciju proteina spektrometrijom. Nakon ekvilibracije provedeno je razdvajanje proteina drugom dimenzijom - SDS gel elektroforezom.

#### 4.3.5. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrijev dodecil sulfat (SDS gel elektroforeza)

Razdvajanje proteina ovisno o njihovoj molekulskoj masi nastavlja se u drugoj dimenziji uz pomoć elektroforeze na poliakrilamidnom gelu koji sadrži natrij dodecil sulfat (SDS-PAGE). Metoda se sastoji od pripreme poliakrilamidnog gela koji sadrži anionski deterdžent. Potom se staklene ploče s pripremljenim gelovima stavljaju u kadu za elektroforezu. Između stakala umeću se IPG trake s proteinima iz uzoraka koji su razdvojeni na temelju njihovog pH gradijenta. Sustav se stavlja u izvor struje i pokreće se gel elektroforeze. Konačan rezultat su gelovi kod kojih se veći proteini

nalaze pri vrhu, a manji pri dnu gela.

Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom monomera akrilamida i N, N-metilenbisakrilamida (bis-akrilamid) radikalnim mehanizmom, a katalizator reakcije je N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED). Polimerizacijom monomera dobije se molekulska sito kroz koje se proteini kreću usporavajući ovisno o omjeru njihove mase i naboja. Sastavni dio poliakrilamidnog gela je anionski deterdžent natrijev dodecil sulfat (SDS) koji veže denaturirane proteine. Količina SDS-a koja je vezana po jedinici mase proteina je konstantna posljedica čega je da proteini manje molekulske mase putuju brže kroz gel (56). Na kraju elektroforeze dobijemo gel kod kojeg su veći proteini na vrhu, a manji na dnu gela.

Na početku SDS gel elektroforeze stakla za pripremu gelova složena su u jedinicu za sastavljanje velikih gelova prema zadanim uputama proizvođača. Pripremljena je smjesa za dva 12% gela debljine 1 mm i dimenzija 20 x 18 cm od 60 ml smjese akrilamid/bisakrilamida, 50,2 ml redestilirane vode, 37,5 ml 1,5 mol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl, pH 8,8, 3 ml 100 g  $\text{dm}^{-3}$  otopine SDS-a (30,8 %T, 2,7 %C), 50  $\mu\text{l}$  100 g  $\text{dm}^{-3}$  amonijevog persulfata (APS) i 20  $\mu\text{l}$  TEMED-a. Smjesa je odmah i pažljivo izlivena u prethodno složena stakla za gelove na visinu od oko 1 cm kako bi se spriječilo curenje gela iz stakala. Nakon stvrdnjavanja gela, u početnu smjesu dodano je još 750  $\mu\text{l}$  100 g  $\text{dm}^{-3}$  APSA-a i 75  $\mu\text{l}$  TEMED-a te je ona potom pažljivo izlivena između stakala i na taj način ispunjen je prostor između stakala do njihovog gornjeg ruba. Smjesa je potom pokrivena s 3 ml n-butanola da se onemogući oksidacija na površini gela koja spriječava polimerizaciju. Nakon polimerizacije gelova n-butanol je u više navrata ispran s površine gela destiliranom vodom. Staklene ploče s gelovima su pričvršćene na jedinicu za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu (PROTEAN II XL cell) i umetnute u kadu za elektroforezu. S površine gelova uklonjeni su ostaci vode, a između stakala umetnute IPG trake koje su prethodno ekvilibrirane i kratko isprane u puferu za elektroforezu. Prilikom umetanja, trake su postavljene na način da je strana trake bez gela prislonjena uz veće staklo te je traka ravnomjerno gurana prema gelu. Potom su uklonjeni svi mjehurići ispod traka, a zbog izbacivanja preostalog zraka i zaštite traka prelivene su s oko 4 ml ugrijane agaroze. Nakon polimerizacije agaroze, jedinica za hlađenje sustava zajedno sa staklima (između kojih su gelovi) premještena je u kadu za elektroforezu. Potom je uliven pufer za



elektroforezu, sustav je zatvoren i spojen na vodu. Osim vode koje ima ulogu hlađenja sustav je spojen i na izvor struje te je pokrenuta elektroforeza prema uvjetima navedenim u Tablici 3.

**Tablica 3. Uvjeti pri kojima je vođena SDS poliakrilamidna gel elektroforeza.**

Korak	Jakost struje / mA / gel	Trajanje / min	Trajanje / Vh
SO1	15	60	-
SO2	20	-	600
SO3	30	300*	-

\* - Napon se održava dok se uređaj ne isključi, do maksimalno 24h.

#### **4.3.6. Bojenje gelova**

Posljednji korak dvodimenzionalne gel elektroforeze nakon razdvajanja proteina je njihova vizualizacija metodama detekcije. Kao metode bojenja za označavanje proteina rabe se boje koje se vežu *in situ* na proteine unutar matrice gela. Jedna od najčešćih metoda bojenja je bojenje otopinom Coomassie Brilliant Blue.

Coomassie Brilliant Blue (CBB) dolazi u dvije modifikacije: Coomassie R-250 i Coomassie G-250. U kiselom mediju boja se veže na proteine elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama (56). CBB G-250 je hidrofobnija od CBB R-250 zahvaljujući dvjema dodatnim metilnim skupinama zbog čega se može koristiti i kao koloidna boja (88).

Nakon elektroforeze 2-DE gelovi svih uzoraka iz istraživanja obojani su Coomassie bojom. Pripremljena je matična otopina koloidne Coomassie boje sastava: 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250, 10% amonijev sulfat, 2% orto-fosforna kiselina. Za bojenje gela rabljena je radna otopina koja je pripremljena mješanjem matične otopine i metanola u omjeru 4:1. Na gelove je izliveno cca 300 ml radne otopine te su ostavljeni preko noći na bojenju uz lagano protresanje. Nakon toga gelovi su isprani u nekoliko navrata redestiliranom vodom i ostavljeni su preko noći u vodi na tresilici.

#### **4.3.7. Snimanje i analiza gelova**

Nakon vizualizacije proteina gelovi su kvalitativno i kvantitativno analizirani uz pomoć uređaja VersaDoc Imaging System, model 4000 i specijaliziranog računalnog programa (PDQuest SW, verzija 7.4.0).

Vrijeme ekspozicije svakog gela u uređaju iznosilo je 10 sekundi. Nakon toga, slijedila je daljnja kvantitativna analiza pomoću PDQuest SW računalnog programa. Prije iste provedena je normalizacija gelova pomoću metode ukupne gustoće na slici gela (engl. *Total Density in Gel Image*) na način da su zbrojene vrijednosti optičkih gustoća svih točaka unutar slike. Usporedbom vrijednosti dobivena je osnova za normalizaciju. Kao značajna vrijednost uzeto je trostruko povećanje ili smanjenje koncentracije proteina u uzorku. Analizom točaka uz pomoć PDQuest, indentificirana su mjesta značajne razlike u gustoći. Odabrana proteinska zacrnjenja na gelu su ručno izrezana pomoću nastavka pipetora čiji je vrh, ovisno o veličini zacrnjenja, odrezan.

#### **4.3.8. Priprema uzorka za analizu spektrometrijom masa**

##### **4.3.8.1. Odbojavanje izrezanih komadića gelova**

Izrezani komadići gela stavljeni su u čiste 1,5ml plastične epruvete i dodano im je 1 ml otopine za odbojavanje (40% metanol, 10% ledena octena kiselina, 50% voda,  $\varphi$ ) te su ostavljeni 1,5 h na 45 °C i 700 rpm u termomiješalici. Potom je otopina za odbojavanje uklonjena pipetom. Ukoliko su komadići gela i dalje bili obojani u plavo, utoliko je postupak ponavljan dok u potpunosti ne odboje. Nakon odbojavanja komadića gela otopina za odbojavanje uklonjena je pomoću pipete.

##### **4.3.8.2. Digestija u gelu**

Digestiji tripsinom u gelu prethodi priprema uzoraka. U epruvetu s komadićem gela dodano je 500  $\mu$ l otopine amonijevog hidrogenkarbonata ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) koncentracije 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$ , pH=7,8. Uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi na 700 rpm u termomiješalici. Otopina je uklonjena pipetom i postupak je triput dodatno ponavljan, s tim da je treći put nakon dodavanja otopine uzorak

inkubiran 30 minuta.

Nakon zadnje inkubacije, vršna otopina je uklonjena te je svakom uzorku dodano 500  $\mu\text{l}$  smjese otopina 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  amonijevog hidrogenkarbonata, pH 7,8 i acetonitrila u omjeru 1:1. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi na 700 rpm u termomiješalici.

Nakon inkubacije, vršna otpina je uklonjena te je svakom uzorku sad dodano 100  $\mu\text{l}$  otopine acetonitrila. Uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi na 700 rpm u termomiješalici nakon čega se gel skupio i pobijelio. Otopina acetonitrila je uklonjena, a komadići gela sušeni su uparivanjem u vakuum centrifugi 10-ak minuta.

Nakon pripreme uzoraka provedena je digestija tripsinom u gelu. Komadići gela prebačeni su u 200  $\mu\text{l}$  plastične epruvete kojima je dodano 10  $\mu\text{l}$  otopine za digestiju. Otopina sadrži 10  $\mu\text{g/ml}$  tripsina razrijeđenog u tripsinskom puferu (25  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{CO}_3$ ). Uzorci su inkubirani 18 h na 37 °C na 500 rpm u termomiješalici. Nakon digestije u gelu od svih uzoraka odvojen je tripsinski pufer u nove 1,5 ml plastične epruvete, te je potom uparen u vakuum centrifugi. Komadići gela podvrgnuti su ekstrakciji triptičkih peptida. Prebačeni su u 2200  $\mu\text{l}$  plastične epruvete i dodano im je 10  $\mu\text{l}$  ekstrakcijske otopine (5% TFA, 45% voda, 50% MeCN;  $\varphi$ ). Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi u sonifikacijskoj kupelji te još 15 min na sobnoj temperaturi na 500 rpm u termomiješalici. Komadići gela potom su uklonjeni, a otopine su dodane na osušene tripsinske pufere i ponovno su uparene u vakuum centrifugi. Osušeni uzorci otopljeni su u 10  $\mu\text{l}$  otopine trifluoroctene kiseline ( $\varphi=0,001$ ) i pročišćeni tehnikom Zip-Tip.

#### **4.3.8.3. Pročišćavanje tehnikom Zip-Tip pomoću C18 kolona**

S obzirom na to da je rabljena MALDI tehnika ionizacije prije spektrometrije masa provedena je tekućinska kromatografija obrnutih faza, tj. Zip-Tip metoda. To je metoda koja omogućuje odstranjivanja onečišćenja teško hlapljivih soli koja utječu na intenzitet iona.

Uzorak se nanosi na malu količinu nepokretne faze širokih pora koja se nalazi na kraju plastičnog nastavka pipetora. Nakon ispiranja uzorka (smjesa vode, acetonitrila i trifluoroctene kiseline) dobiju se eluati koji sadrže ukoncentrirani analit.

Na pipetor je stavljen nastavak za Zip-Tip i ispran je tri puta s po 10  $\mu$ l otopine acetonitrila ( $\varphi=0,8$ ) i TFA ( $\varphi=0,001$ ), zatim tri puta s po 10  $\mu$ l otopine acetonitrila ( $\varphi=0,5$ ) i TFA ( $\varphi=0,001$ ), te na kraju tri puta s po 10  $\mu$ l otopine TFA ( $\varphi=0,001$ ). Naknadno su proteini vezani na kolonu ispiranjem Zip-Tip s po 10  $\mu$ l uzorka razrijeđenog u otopini TFA ( $\varphi=0,001$ ). Pri tome se sadržaj epruvete u kojoj se nalazi razrijeđeni uzorak povlači i izbacuje deset puta. Na kolonu se uz proteine vežu i onečišćenja i soli koji su uklonjeni ispiranjem pet puta s po 10  $\mu$ l otopine TFA ( $\varphi=0,001$ ). Zatim su proteini isprani s kolone s po 10  $\mu$ l otopine acetonitrila ( $\varphi=0,8$ ) i TFA ( $\varphi=0,001$ ). To se radi u novoj čistoj 1,5 ml plastičnoj epruveti tako da se sadržaj povlači i izbacuje deset puta. Nakon pročišćavanja tehnikom Zip-Tip uzorci su osušeni u vakuum centrifugi. Za potrebe potvrde nađenih peptida putem *de novo* sekvenciranja, u koraku ispiranja se uz opisani standardni postupak koristio 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5) u kojem je bio otopljen 4-sulfofenil izotiocijanat masene koncentracije 10 mg/mL (88).

#### **4.3.9. Spektrometrija masa**

##### **4.3.9.1. Analiza spektrometrom masa**

Uzorci su analizirani MALDI TOF/TOF spektrometrom masa kod kojeg se primjenjuje matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem kao tehnika ionizacije. To je tehnika koja rabi matricu za međusobnu izolaciju molekula analita. Danas su najčešće upotrebljavane matrice: sinapinska kiselina (SA), 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB),  $\alpha$ -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA) i nikotinska kiselina (NA). Da bi neka molekula bila dobra matrica, mora imati određene karakteristike. To su dobra apsorpcija valne duljine laserskog zračenja, potpuna izolacija molekula analita i izostanak stvaranja adukata s ionima analita (51,89). Otopina uzorka miješa se sa suviškom matrice i nanosi na MALDI pločicu koja se analizira u spektrometru masa.

Analizator je dio spektrometra masa koji odjeljuje ione nastale tijekom ionizacije u vremenu i prostoru na osnovu njihovog omjera  $m/z$  (59).

Ioni nastali u ionizacijskoj komori ubrzavaju se potencijalom od najmanje 20 kV.

Prolaskom kroz cijev instrumenta odjeljuju se na temelju različitih brzina. Na kraju se mjeri vrijeme ( $t$ ) potrebno ionu da prijeđe udaljenost od ionskog izvora do detektora ( $l$ ):

$$t = \frac{l}{v}$$

Na izlazu iz ionskog izvora ioni mase  $m$  i nabojnog broja  $z$  ubrzani su potencijalom  $\varphi$  i imaju kinetičku energiju:

$$E_k = \frac{mv^2}{2}$$

$$E_k = ze\varphi$$

Uvrštavanjem izraza za brzinu dobije se:

$$t = \sqrt{\frac{ml^2}{2ze\varphi}}$$

Vrijeme leta isključivo ovisi o omjeru  $m/z$  (duljina puta i potencijal su konstante instrumenta, a  $e$  označuje elementarni naboj ( $e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ )) (55,90).

Osnovni signal spektra masa je najintenzivniji signal i odgovara signalu intaktnog ili fragmentnog iona. Intenziteti svih ostalih iona preračunavaju u odnosu na intenzitet osnovnog signala. Iza signala koji odgovara masi iona analita nalaze se izotopni signali kao posljedica prisutnosti prirodne izotopne zastupljenosti jednog ili više elemenata, a omogućavaju izračunavanje udjela izotopa u uzorku. Signali koji se nalaze prije najveće vrijednosti  $m/z$  (odnosno manje vrijednosti  $m/z$ ) posljedica su fragmentiranja ili pregradnje iona analita (59).

Za analizu spektrometrom masa smjesa osušenih peptida uzoraka uključenih u istraživanje je resuspendirana u 4  $\mu\text{l}$  CHCA matrice. Uzorci su potom nanešeni na MLADI pločicu i analizirani MALDI TOF/TOF spektrometrom masa (4800 plus MALDI TOF/TOF™). U programu su podešeni kalibracijski parametri i snimljeni su MS spektri svih nanešenih uzoraka. Potom je provedena interna kalibracija pomoću signala peptida koji su nastali autolizom samog tripsina, odabrati su prekursori i

snimljeni su MS/MS spektri. Na temelju dobijenih MS i MS/MS spektara pretražene su baze podataka.

#### 4.3.9.2. Pretraživanje proteinskih baza podataka

Nakon analize spektrometrijom masa proteini se identificiraju usporedbom eksperimentalnih podataka s podacima pohranjenima u proteinskim bazama podataka. Baze se pretražuju uz pomoć specijalnog računalnog programa Mascot, verzija 2.4. Pretraga se vrši na taj način da pretraživač izabire što sličnije vrijednosti eksperimentalnih podataka i podataka iz baze. Ako u bazi ne postoji traženi protein, uzet će se prvi sljedeći s što većom homologijom (najčešće se radi o homologima u srodnim vrstama). Nakon što se dobiju rezultati, program ih još jednom statistički obradi s obzirom na značajne vrijednosti vjerojatnosti prema Mowse rezultatu.

Pretražene su baze SwissProt te NCBIInr, uz zadane uvjete pretrage (Tablica 4.). Prihvaćeni su oni rezultati kojima je proteinska vrijednost (engl. *Protein Score* - PS) veća od 43 za NCBIInr; odnosno 34 za SwissProt. Granica proteinske vrijednosti dobiva se kao značajna vrijednost vjerojatnosti prema Mowse rezultatu. Dodatna potvrda nađenih rezultata je načinjena upotrebom DUST algoritma (De novo Utilizing Sequencing Tool), vezanog uz *de novo* sekvenciranje pronađenih peptida. Na taj je način omogućena dodatna provjera točnosti pronađenih proteina usporedbom Mowse rezultata i navedenog algoritma (88).

**Tablica 4. Zadani uvjeti pretrage Mascot platforme, verzija 2.4, za dobivanje rezultata MS i MS/MS iona peptida izoliranih iz uzoraka tkiva tumora prostata, putem spektrometra masa.**

Zadani uvjet	Odabrani uvjet pretrage
Značajna vrijednost ispod koje se ne gledaju rezultati	$p < 0,05$
Dopuštena pogrešna cijepanja peptida tripsinom (engl. <i>Miscleavage</i> )	2
Taksonomska podjedinica	<i>Homo sapiens</i> (čovjek)
Fiksirane modifikacije	-
Varijabilne modifikacije	Fosforilacija serina, treonina i tirozina (te u malom broju slučajeva i aspartata i histidina); oksidacija i/ili hidroksilacija
Tolerancija na masu peptida	1,0 Da
Izotopna raspodijela	-
Tolerancija na masu fragmentnog MS/MS iona	0,3 Da
Naboj peptida	+1
Vrijednost mase	Monoizotopna
Granična vrijednost prekursora	-
Instrument	MALDI-TOF-TOF
Pretraga koja dopušta i pogreške (radi smanjenja osjetljivosti)	-

## 5. REZULTATI

### 5.1. Prikaz kliničkih i patohistoloških karakteristika ispitanika

U svrhu proteomske analize u ovo su istraživanje uključeni ispitanici s pozitivnim nalazom u biopsiji prostate i dijagnozom adenokarcinoma prostate Gleason zbroja 6 (3+3) ili 7 (3+4 ili 4+3) u najmanje dva pozitivna cilindra s više od 10% tumorskog tkiva u svakom od cilindara.

S obzirom na učestalost i radikalnu prostatektomiju kao osnovni terapijski modalitet, svi ispitanici imali su tumore Gleason zbroja 6 ili 7 (3+4 ili 4+3). Iz istraživanja su isključeni ispitanici s tumorima Gleason zbroja 8, 9 ili 10 zbog otežanog prikupljanja njihovih uzoraka, zato što radikalna prostatektomija nije osnovni terapijski modalitet liječenja ovih bolesnika.

Od ukupno 30 bolesnika uključenih u studiju, proteomska analiza provedena je u njih 12 s parnim uzorcima tumorskog i zdravog tkiva, tj. samo kod ispitanika kod kojih smo dobili uzorak tumorskog i uzorak zdravog tkiva. U svrhu adekvatnog prikupljanja uzoraka nakon makroskopske indentifikacije reprezentativnih područja od strane patologa, uzeta su po dva uzorka tumorski promijenjenog i nepromijenjenog tkiva te su posebno bojom označena mjesta uzoraka. Defekti tkiva u izvađenoj prostati preuzeti su u cijelosti i histološki analizirani. U istraživanje su uključeni samo ispitanici za koje se prepostavilo (na temelju patohistološke analize defekta tkiva izvađene prostate) da se u njihovim uzorcima nalazi samo tumorsko ili samo benigno tkivo.

Nadalje, uključeni ispitanici klasificirani su kao dvije zasebne skupine vezane uz procjenu rizika PSA recidiva (srednji i visok rizik). Sustav prognostičkih skupina temelj je pristupa bolesnicima u trenutku postavljanja dijagnoze, planiranja njihovog liječenja i predviđanja ishoda bolesti.

Kod svih ispitanika određena su preoperativna kliničko-patohistološka obilježja, neophodna za svrstavanje u prognostičke skupine. To su: dob, najveća razina PSA u serumu u trenutku dijagnoze (ng/mL), veličina i proširenost primarnog tumora (klinički cT i N i M stadij), stupanj diferenciranosti tumora kod biopsije (Gleason zbroj, GS) i postotak bioptičkog materijala zahvaćenog tumorom (uključujući broj pozitivnih cilindara od ukupno pregledanih lijevo i desno te postotak zahvaćanja cilindara). Klinički (cTNM) stadij određen je prema 7. izdanju TNM



klasifikacije iz 2009. godine (91). Diferenciranost karcinoma prostate ispitanika u cilindrima nakon biopsije i uzorcima nakon radikalne prostatektomije određena je Gleasonovim sustavom gradiranja. On se temelji na arhitekturnom načinu rasta tumora te su tumori podijeljeni u 5 tipova rasta. Arhitekturni tipovi 1,2 i 3 predstavljaju tumore koji dijelom nalikuju normalnom prostatičnom tkivu, dok tipovi 4 i 5 predstavljaju slabo diferencirane tumore. Konačni gradus karcinoma prostate određen je zbrajanjem dva najzastupljenija tipa i prikazan je Gleasonovim zbrojem. Prisutnost sekundarnog i tercijarnog gradusa tumora te njegovo opisivanje u konačnom nalazu ovisili su o gradusu nađene sekundarne i tercijarne komponente. Prisutnost dobro diferenciranog tumora u manje od 5% tumorskog tkiva zanemarila se, dok se prisutnost slabo diferencirane komponente (Gleason 4 i 5) obavezno navela, neovisno o postotku zastupljenosti. U slučajevima gdje su nađeni različiti gradusi tumora u cilindrima prostate, Gleasonov je zbroj uključivao najzastupljeniju komponentu i najviši gradus. U slučajevima gdje je prisutnost malog postotka slabo diferencirane komponente u radikalnoj prostatektomiji, u ispitanika u kojih je dominirao nalaz umjereno diferenciranog adenokarcinoma, prikazana je u obliku tercijarnog gradusa. Gleason zbroj određen je prema 7. izdanju TNM klasifikacije iz 2009. godine (91).

Nakon radikalne prostatektomije kod ispitanika kod kojih je provedena proteomska analiza određeni su patološki stadiji bolesti (pTNM), Gleason zbroj i druge negativne patohistološke karakteristike (pozitivan resekcijski rub (R1) i perineuralna invazija (PNI)), koje su važne za svrstavanje ispitanika u prognostičke skupine. Patološki stadij (pTNM) određen je prema 7. izdanju TNM klasifikacije iz 2009. godine (91).

U postoperativna kliničko-patohistološka obilježja koja su važna za konačni odabir liječenja spadaju: pozitivan resekcijski rub, proboj kapsule tumorom, zahvaćanje sjemenskih mjehurića tumorom, prisutne metastaze u limfnim čvorovima i biokemijski recidiv PSA. Nepovoljna patohistološka obilježja i promjene vrijednosti PSA temelj su danas najčešće korištene kombinacije parametara (kliničko-patohistoloških obilježja) koje svrstavaju bolesnike u prognostičke skupine te na taj način ukazuju ima li bolesnik nakon radikalne prostatektomije lokalnu ili sistemsku bolest. Kod ispitanika postoperativna kliničko-patohistološka obilježja kombinirana

su s početno određenim preoperativnim kliničko-patohistološkim obilježjima te je na taj način dobiven optimalan probir ispitanika.

Iz patohistološkog stadija bolesti (pTNM) ispitanika određen je dio negativnih patohistoloških obilježja koja su uzeta u obzir prilikom donošenja konačne odluke o liječenju. To su proboj kapsule (stadij bolesti pT3a), zahvaćanje sjemenskih mjehurića (stadij bolesti pT3b) i prisutne metastaze u limfne čvorove (N1). Iz patohistološkog nalaza kod svakog ispitanika verificirala se prisutnost još jednog značajnog patohistološkog obilježja, pozitivnog resekcijskog ruba (R1). On se definira kao doseg tumora do tintom označenog ruba reseciranog uzorka.

Ispitanici su praćeni određivanjem tromjesečnih vrijednosti PSA te su dodatno zabilježene vrijednosti PSA (ng/mL) nakon četiri, dvanaest i dvadeset i četiri mjeseca. Biokemijski recidiv definiran je kao porast PSA  $\geq 0,2$  ng/mL u dva uzastopna mjerenja.

Kod svih ispitanika provedeno je onkološko liječenje na osnovu trenutnih uroloških i onkoloških smjernica. Primijenjeni su sljedeći modaliteti liječenja: praćenje, adjuvantna trodimenzionalna konformalna radioterapija (RT), *salvage* trodimenzionalna konformalna RT +/- androgena deprivacijska terapija (ADT).

Svi ispitanici bili su muškarci, a prosječna dob iznosila je 67,6 godina (u rasponu od 41 do 76 godina). Prosječna prijeterapijska vrijednost PSA iznosila je 11,83 ng/mL (u rasponu od 4,8 do 24,6 ng/mL). Od dvanaest ispitanika njih šest (50%) imalo je klinički stadij cT2bN0M0 bolesti, dok su tri (25%) ispitanika imala klinički stadij cT1cN0M0 bolesti. Dva ispitanika (16.7%) imala su klinički stadij cT2aN0M0 bolesti, a jedan (8.3%) stadij cT2cN0M0.

U patohistološkom nalazu biopsije tri (25%) ispitanika imala su tumore Gleason zbroja 6(3+3), sedam (58.3%) ispitanika tumore Gleason zbroja 7(3+4), dok su dva (16.6%) ispitanika imala tumore Gleason zbroja 7(4+3).

Patohistološki stadij pT2c+N0M0, pT3abN0M0 i pT2cN0M0 imalo je dvoje (16.7%) ispitanika. Četiri (41.7%) ispitanika imala su patohistološki stadij bolesti pT3a, a jedan ispitanik imao je i pozitivan limfni čvor. Stadij bolesti pT2a+N0M0 imao je jedan (8.3%) ispitanik.

Od dvanaest ispitanika, kod kojih je učinjena proteomska analiza parnih uzoraka zdravog i tumorskog tkiva, dva (16.7%) ispitanika imala su tumor Gleason zbroja 6, obrazac 3+3, dok je deset (83.3%) ispitanika imalo tumor Gleason zbroja 7.

Tri (30%) ispitanika iz skupine s tumorom Gleason zbroja 7 imala su tumor s obrascem 3+4, a obrazac 4+3 imalo je sedam (70%) ispitanika. Tercijarni gradus 5 u 10 % tumorskog tkiva bio je prisutan kod tri (42.9%) ispitanika iz ove skupine. Pozitivan kirurški rub imalo je sedam (58.3%) ispitanika. Perineuralna invazija nađena je u tumorskom tkivu kod devet (75%) ispitanika.

Od dvanaest ispitanika njih šest (50%) je dalje samo praćeno, kod jednog (8.3%) ispitanika primijenjena je adjuvantna RT, dok je kod pet (41.7%) ispitanika primijenjena *salvage* RT. Kod dvaju (40%) ispitanika kod kojih je primijenjena *salvage* RT primijenjena je i ADT. Prosječna vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,154 ng/mL (u rasponu od 0,0002 do 1,5 ng/mL). Prosječna vrijednost PSA nakon dvanaest mjeseci praćenja iznosila je 0,037 ng/mL (u rasponu od 0,00 do 0,12 ng/mL). Prosječna vrijednost PSA nakon dvadeset i četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,058 ng/mL (u rasponu od 0,00 do 0,35 ng/mL).

**Tablica 5. Klinička i patohistološka obilježja ispitanika.**

Ispitanik	Dob (godine)	PSA (ng/mL)	Klinički stadij (cTNM)	Gleason zbroj (biopsija)	Pozitivni cilindri i % (desno)	Pozitivni cilindri i % (lijevo)	Patohistološki stadij (pTNM)	Gleason zbroj (nakon RP)	Druga negativna patološka obilježja	Terapijska opcija	Praćenje (4 mjeseci) PSA (ng/mL)	Praćenje (12 mjeseci) PSA (ng/mL)	Praćenje (24 mjeseci) PSA (ng/mL)
alfa G1	71	13,90	T2bN0M0	6(3+3)	5/6(20-80%)	1/6(10%)	T2c+N0MX	7 (3+4)	R1, PNI	Praćenje	0,04	0,12	0,13
alfa G2	70	9,90	T2aN0M0	7(3+4)	0/6	4/6(5-60%)	T3abN0MX	7 (4+3)	R1	Salvage RT+ADT	0,24	0,02	0,08
alfa G3	72	11,10	T2bN0M0	6(3+3)	0/6	3/6(5-10%)	T3aN0MX	7 (3+4)	R1,PNI	Salvage RT	1,50	0,001	0,002
alfa G4	74	13,30	T2bN0M0	7(3+4)	0/6	3/6(20-60%)	T3aN0MX	6 (3+3)	PNI	Praćenje	0,00	0,00	0,00
alfa G5	75	4,80	T1cN0M0	6(3+3)	4/6(5-20%)	1/6(5%)	T3aN0MX	6 (3+3)	PNI	Adjuvantna RT	0,006	0,10	0,008
alfa G6	64	18,12	T2bN0M0	7(3+4)	6/8(5-50%)	8/8(50-90%)	T3abN0MX	7(4+3) *[5,10%]	PNI	Salvage RT	0,03	0,01	0,03
alfa G7	68	10,81	T2cN0M0	7(4+3)	5/6(50%)	3/6	T3aN1MX	7(4+3) *[5,10%]	R1	Salvage RT +ADT	0,01	0,00	0,00
alfa G8	70	8,20	T2aN0M0	7(3+4)	6/6(15-90%)	0/6	T2a+N0MX	7 (4+3)	R1, PNI	Salvage RT	0,02	0,09	0,35
alfa G9	66	10,00	T2bN0M0	7(4+3)	4/6(40-80%)	0/6	T2cN0MX	7 (4+3)	PNI	Praćenje	0,0002	0,00	0,00
alfa G10	64	5,90	T2bN0M0	7(3+4)	1/6	5/6(5-70%)	T2c+N0MX	7 (3+4)	R1	Praćenje	0,00	0,00	0,00
alfa G11	76	24,60	T1cN0M0	7(3+4)	4/6(30-80%)	0/6	T3aN0MX	7 (4+3) *[5,10%]	R1, PNI	Praćenje	0,00	0,10	0,10
alfa G12	41	11,30	T1cN0M0	7(3+4)	3/6(5-20%)	0/6	T2cN0MX	7 (4+3)	PNI	Praćenje	0,00	0,00	0,00

Legenda: Patološki stadij (pT) i Gleason zbroj (GS) određeni su prema TNM klasifikaciji (7 izdanje, 2009) (91). R1- tumor prisutan na kirurškom rubu; PNI-prisutna perineuralna invazija; N1-prisutne metastaze u limfne čvorove; \*Tercijarni gradus 5 prisutan u 10% tumorskog tkiva; RP-radikalna prostatektomija; RT-radioterapija; ADT-androgen deprivacijska terapija.

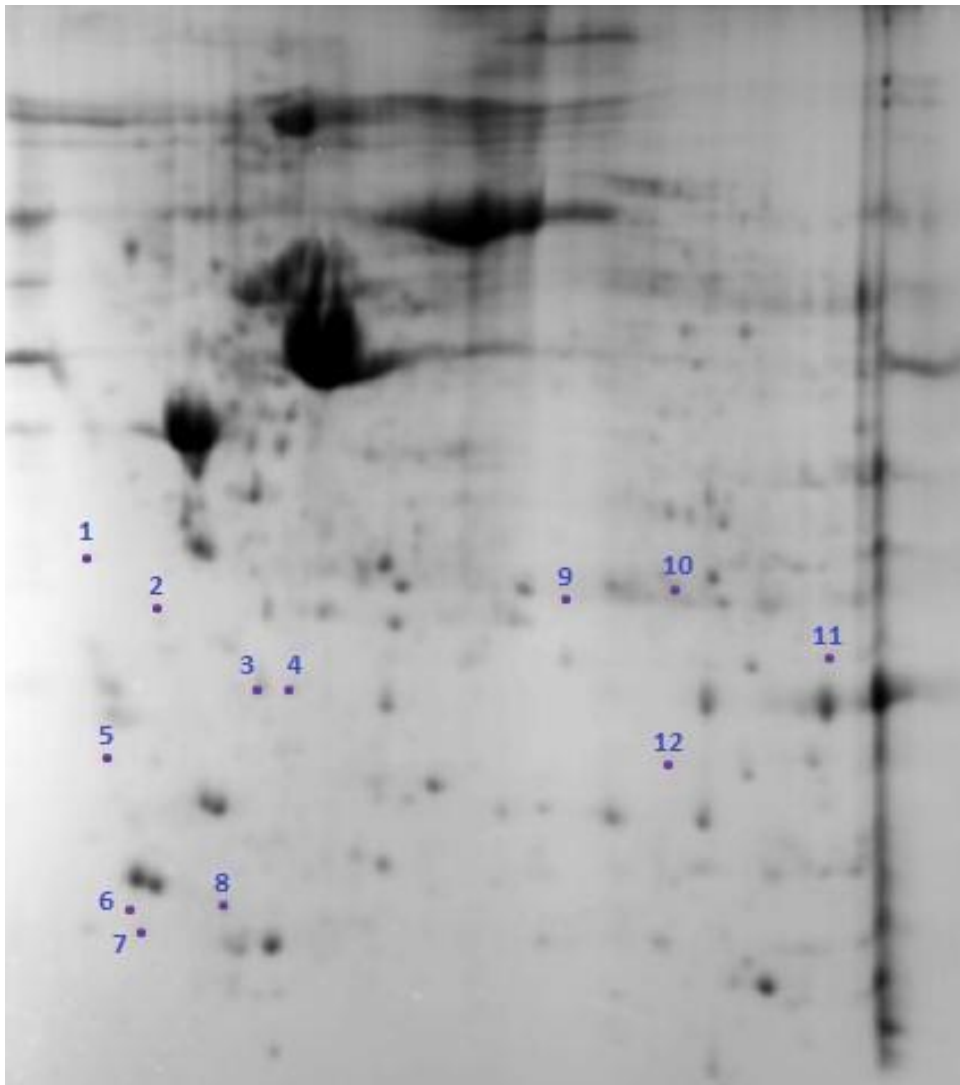
## 5.2. Histopatološka analiza i određivanje koncentracije proteina

Sakupljeno je dvanaest parnih uzoraka (tumorsko i zdravo tkivo) kod ispitanika podvrgnutih radikalnoj prostatektomiji. Tijekom samog operativnog zahvata, neposredno nakon vađenja, prostata je pohranjena u plastičnu posudu i hitno prenošena u histopatološki laboratorij. Po zaprimanju, mjerenju i orijentaciji (lijevo ili desno), prostata je od strane patologa serijski izrezana i identificirana su područja makroskopski evidentnog tumora, ili izrazito suspektna područja, te područja koja makroskopski nisu bila zahvaćena tumorom. Također, uspoređen je makroskopski nalaz prostate s nalazom preoperativne biopsije zbog laterizacije tumora. Prije uzimanja uzoraka uzete su u obzir i tipične lokalizacije tumora (najčešće posterolateralno u perifernoj zoni prostate, uz samu čahuru) te lokalizacije područja s predominantnim benignim promjenama (anteriorno područje i centralna zona prostate). S obzirom na ograničenja makroskopske identifikacije reprezentativnih područja, za svakog su ispitanika uzeta po dva uzorka, odnosno cca 0,5cm<sup>3</sup> tkiva, iz tumorski promijenjenog i nepromijenjenog područja. Mjesta uzimanja uzoraka posebno su označena, a defekti tkiva u izvađenoj prostati u cijelosti su preuzeti i histološki analizirani. U istraživanje su uključeni samo uzorci u čijim je defektima u izvađenoj prostati, nakon cjelovitog preuzimanja i histološke analize, nađeno isključivo tumorsko ili benigno tkivo prostate. Pritom je isti ispitanik morao imati i uzorak zdravog i tumorskog tkiva. Drugi par uzoraka služio nam je za slučajeve kad u prvom paru nismo dobili adekvatne uzorke za analizu. Od 30 ispitanika uključenih u istraživanje, samo kod 12 ispitanika dobili smo kod istog ispitanika i tumorski i zdravi uzorak u jednom od dva para uzetih uzoraka. Rezultati histopatološke analize nalaze su u tablici 5.

Uzorci su pohranjeni u tekući dušik do pripreme lizata. Iz istih je analiziran ukupni proteom koji je pročišćen taloženjem acetona. Potom su određene koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu, a pritom se pazilo da su zastupljene jednake koncentracije parova tumorskog i zdravog tkiva zbog kvantitativne usporedbe gelova. Provedeno je razdvajanje proteina na temelju njihovih izoelektričnih točaka u gradijentu pH 3-10 nakon čega su razdvojeni u drugoj dimenziji - SDS gel elektroforezom.

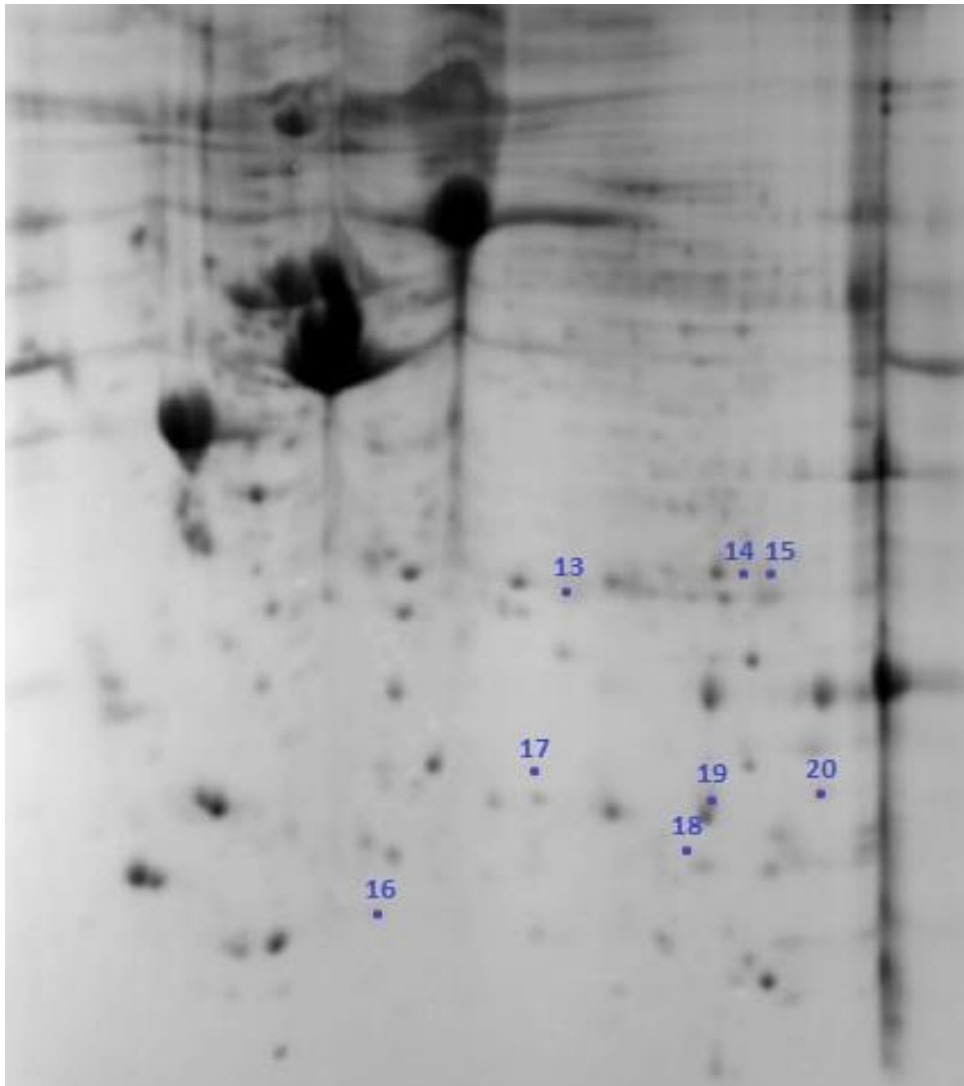
### 5.3. Rezultati denzitometrijske analize gelova dobivenih dvodimenzionalnom gel elektroforezom (2-DE)

Nakon razdvajanja izoliranih proteina putem dvodimenzionalne elektroforeze, dobiveni gelovi obojani su koloidnom otopinom boje Coomassie Brilliant Blue. Potom su fotografirani uređajem za denzitometrijsku analizu gelova VersaDoc Imaging System (model 4000) (Slika 10. i 11.) i kvantitativno analizirani računalnim programom za analizu gelova PDQuest, SW, verzija 7.4.0.



**Slika 10. Reprezentativni 2-DE prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskom tkivu prostate (uzorak alfa G8 tumorskog tkiva prema uzorku alfa**

G8 zdravog tkiva). Brojevne oznake predstavljaju razlikovno eksprimirane proteine.



Slika 11. Reprezentativni 2-DE prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u zdravom tkivu prostate (uzorak alfa G8 zdravog tkiva prema uzorku alfa G8 tumorskog tkiva). Brojevne oznake predstavljaju razlikovno eksprimirane proteine.

#### 5.4. Rezultati analize spektrometrijom masa i pretrage baze podataka

Prema metodologiji opisanoj u 5.2. i 5.3. dobiveno je 310 diferencijalno eksprimiranih proteina, označenih kao zacrnjenja na 2-D gelu. Sva zacrnjenja su, nakon ekstrakcije iz gela i cijepanja tripsinom, izolirana na 232 proteinske pozicije na

MALDI pločici. Svi proteini uočeni na 2-D gelu kao razlikovno eksprimirani identificirani su pomoću spektrometrije masa na instrumentu MALDI TOF/TOF uz pretraživanje baza podataka (Tablica. 6.-29.).

Kod sedam proteinskih točaka uočena je prisutnost dvaju različitih proteina. Razlika, odnosno homolognost tih dijeljenih pozicija proteina, provjerena je putem računalnog programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) te još jednom provjerena, obzirom na njihovu teorijski izračunatu masu i izoelektričnu točku. Budući da je pretragom potvrđeno da se radi o različitim proteinima, uzeta su u obzir oba rezultata. Kod dvije proteinske točke, navedene dodatne provjere pravilne identifikacije proteina nisu dale jednoznačan rezultat, pa su u obzir uzeti svi nalazi pretrage baze podataka. Također, postoje i proteini koji su identificirani na dvije različite točke u gelu, jednake mase, ali različite izoelektrične točke. Razlog tomu su poslijetranslacijske modifikacije (posebice pojačana glikozilacija proteina, često prisutna u tumorskom tkivu).

Kad se svi parametri probira uzmu u obzir, u konačnici je dobiveno 230 diferencijalno eksprimiranih proteina, od čega je 169 proteina bilo prekomjerno eksprimirano u tumorskom tkivu, a kod 61 proteina uočena je smanjena ekspresija u tumorskom tkivu. Korištene su proteinske baze NCBI nr i SwissProt putem računalne platforme Mascot, verzija 2.4., a rezultati pretraga međusobno su uspoređeni, kako bi se postigla što veća točnost dobivenih podataka.

## **5.5. Individualni prikaz ispitanika i njihovih proteomskih profila**

### **5.5.1. Individualni prikaz alfa G1 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**

Kod alfa G1 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 71. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 13,90 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 6 (3+3). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u jednom od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 10%. U desnom režnju prostate tumor je bio













prisutan u pet od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 20 do 80%.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT2c+N0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obostrana infiltracija kapsule uz brojna žarišta perineuralne invazije, posterolateralno i bazalno desno tumor je dopirao do resekcijskih rubova.























Nakon radikalne prostatektomije ispitanik je praćen dvije godine. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja je iznosila 0,04 ng/mL, nakon godinu dana 0,12 ng/mL te 0,13 ng/mL nakon dvije godine. U tablicama 6. i 7. nalaze se popisi nađenih diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G1 ispitanika.









**Tablica 6. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G1 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
3,5	A3,A5	hypothetical protein LOC643677	CCDC168	801,4	8,94
4	A4	Vinculin	VLC	100,9	5,35
8	A8	CLL-associated antigen KW-4 splice variant 2	ZNF268	108,3	9,14
9	A9	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	MYH 8	222,7	5,65
31	B7	Nuclear mitotic apparatus protein 1 variant	NUMA1	238,1	5,63
32	B8	Glyoxalase I	GLO 1	20,8	5,12
34	B10	MHC class I promoter binding protein	RXRB	25,6	6,42
35	B11	fetal-myosin heavy chain (1437 AA)	MYH 8	165,8	5,46
38	B14	hCG2011852	CCDC168	801,4	8,94
39,51	B15,C3	myosin-8	MYH 8	222,8	5,58
40	B16	Chain A, Crystal And Molecular Structure Of Human Plasminogen Kringle 4 Refined At 1.9-Angstroms Re	PLG	9,0	8,59
41	B17	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2	TPM 4	27,5	4,77
43	B19	kyphoscoliosis peptidase, isoform CRA_b	KY	63,1	7,08
44	B20	complement component 3, isoform CRA_a	C3	143,6	8,24

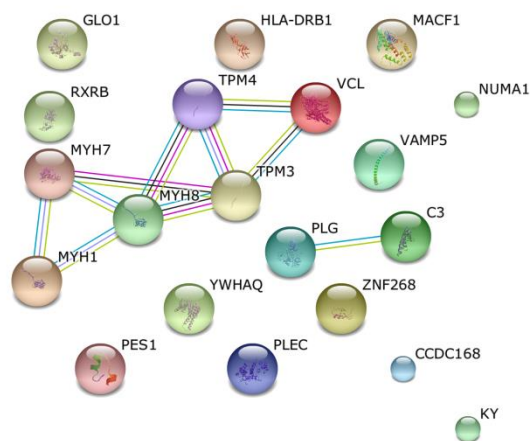
45	B21	Chain A, Complement C3b In Complex With Factor H Domains 1-4	 C3	71,3	6,82
46	B22	beta-myosin heavy chain	 MYH 7	222,9	5,63
47	B23	tropomyosin 3, isoform CRA_d	 TPM3	28,1	4,73
48	B24	Pescadilo homolog 1	 PES1	67,5	7,21
49	C1	Chain A, 14-3-3 Protein Theta (Human) Complexed To Peptide	 YWHAQ	29,2	5,17
50	C2	plectin isoform 1e	 PLEC 1	513,7	5,61
52	C4	myosin heavy chain IIx/d	 MYH 1	223,1	5,58
53	C5	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_i	 MACF1	619,4	5,25
54	C6	MHC class II antigen vesicle-associated membrane protein 5	 HLA DR4  VAMP 5	8,9 12,7	5,53 7,70

**Tablica 7. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G1 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
56,57	C8,C9	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	 TPM2	32,8	4,66
58	C10	tropomyosin isoform	 TPM1	32,6	4,69
59	C11	complement component C3	 C3	187,0	6,02
60	C12	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	 ALB	69,3	5,92
61	C13	actin prepeptide	 ACTA2	41,9	5,24
62	C14	zinc finger protein 569	 ZNF569	79,5	8,97
63	C15	myosin XVIIIIB, isoform CRA_e	 MYO18B	285,0	6,45
64,79	C16,C22	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,6	5,58
65	C17	dedicator of cytokinesis 9, isoform CRA_i	 DOCK 9	236,2	7,25
66	C18	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
67	C19	vinculin, isoform CRA_a	 VLC	123,7	5,50
68	C20	NuMA protein	 NUMA1	238,2	5,63
69	C21	immunoglobulin heavy chain variable region suppression of tumorigenicity 5 protein isoform 2	 ENSG00000223931  ST5	49,2 126,4	6,35 9,35
70	C22	NuMA protein	 NUMA1	238,3	5,6
71	C23	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	358,5	9,49
72	C24	beta globin	 HBB	159,8	6,74
73	D1	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form	 HBB	159,8	6,74
74	D2	centromere protein F	 CENPF	367,5	5,03
75	D3	KIAA0402	 PCNT	377,8	5,40
75	D3	pericentrin B	 PCNT	377,8	5,40
76	D4	annexin A1, isoform CRA_c	 ANXA1	38,6	6,57

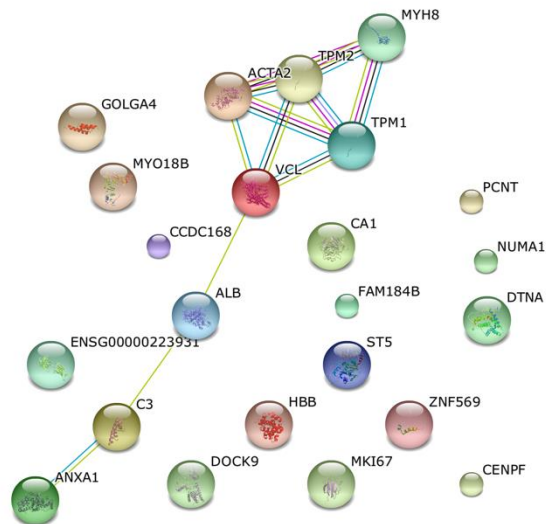
77	D5	dystrobrevin alpha isoform 8	 DTNA	83,8	6,43
77	D5	CTCL tumor antigen se20-7	 GOLGA4	260,9	5,33
78	D6	hypothetical protein LOC27146	 FAM184B	120,9	5,87
79	D7	CENP-F kinetochore protein	 CENPF	367,5	5,03
80	D8	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a	 MKI67	358,4	9,49
81	D8	carbonic anhydrase 1	 CA1	28,8	6,59
82	D10	beta globin chain	 HBB	15,9	6,74
83	D11	beta-hemoglobin	 HBB	15,9	6,74

Na slikama 12. i 13. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G1. Na slici 14. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G1.

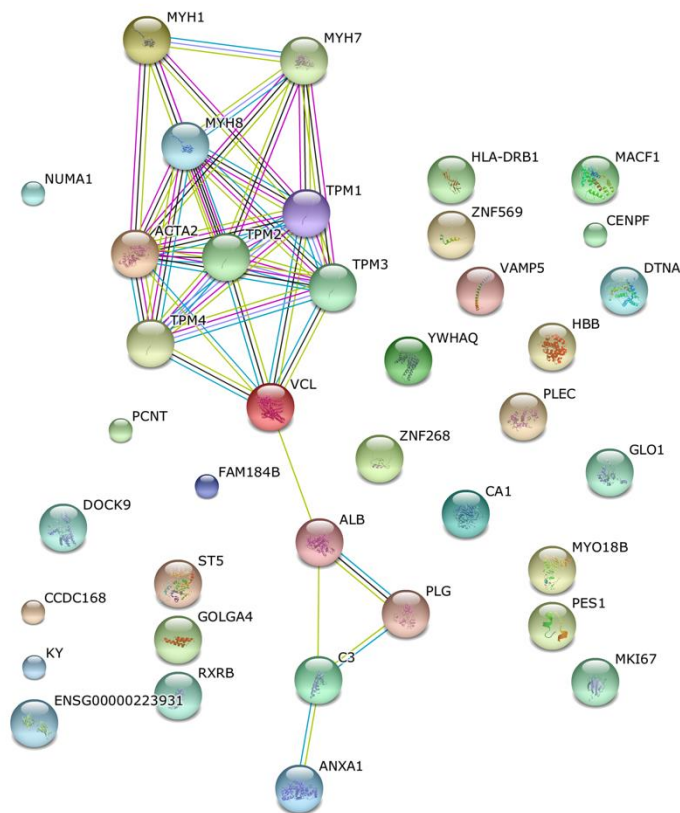


**Slika 12. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G1. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 6. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 13. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G1. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 7. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**



**Slika 14. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G1. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 6. i 7. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.

### **5.5.2. Individualni prikaz alfa G2 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**








Kod alfa G2 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 70. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 9,90 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2aN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u četiri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 60%. U desnom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara.























U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT3abN0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obostrana infiltracija i proboj vezivne kapsule prostate te širenje tumora u okolnu mast i vezivo. Najveća žarišta ekstraprostatičnog širenja nalazila su se posterolateralno bazalno uz sjemenske mjehuriće. Također, tumor je obostrano, uz sjemenske mjehuriće te posterolateralno lijevo, dopirao do resekcijskih rubova.

Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,24 ng/mL te je provedena *salvage* RT uz primjenu ADT. Neposredno prije početka onkološkog liječenja, vrijednost PSA je iznosila 0,29 ng/mL. Na područje ležišta prostate aplicirano je 68 Gy u 34 frakcije te je započeta hormonska terapija bikalutamidom u dozi od 150 mg koja je trajala dvije godine. Tijekom hormonskog liječenja, vrijednost PSA nakon godinu dana praćenja iznosila je 0,02 ng/mL. Prva vrijednost PSA nakon završetka hormonskog liječenja, tj. nakon dvije godine praćenja iznosila je 0,08 ng/mL. U tablicama 8. i 9. nalaze se popisi nađenih diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G2 ispitanika.

**Tablica 8. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G2 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

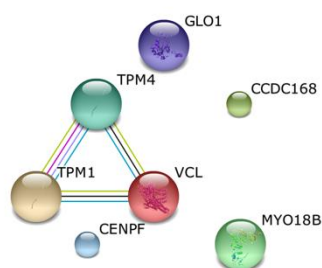
Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1,2	A1,A2	tropomyosin isoform	 TPM1	33,0	4,63
3	A3	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
4	A4	unnamed protein product	 VLC	100,9	5,35
32	B8	Glyoxalase I	 GLO1	20,8	5,12
36	B12	centromere protein F, 350/400ka	 CENPF	357,2	5,06
37	B13	MYO18B protein	 MYO18B	285,0	6,45
41	B17	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2	 TPM4	27,5	4,77

**Tablica 9. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih kod uzorka zdravog tkiva prostate alfa G2 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
56,57	C8,C9	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	 TPM2	32,8	4,66
58	C10	tropomyosin isoform	 TPM1	32,6	4,69
59	C11	complement component C3	 C3	187,0	6,02
60	C12	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	 ALB	69,3	5,92
61	C13	actin prepeptide	 ACTA2	41,9	5,24
62	C14	zinc finger protein 569	 ZNF569	79,5	8,97
63	C15	myosin XVIII B, isoform CRA_e	 MYO18B	285,0	6,45
64,79	C16,C22	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,6	5,58
65	C17	dedicator of cytokinesis 9, isoform CRA_i	 DOCK9	236,2	7,25
66	C18	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
67	C19	vinculin, isoform CRA_a	 VLC	123,7	5,50
68	C20	NuMA protein	 NUMA1	238,2	5,63
69	C21	immunoglobulin heavy chain variable region suppression of tumorigenicity 5 protein isoform 2	 ENSG00000223931  ST5	49,2	6,35
				126,4	9,35
70	C22	NuMA protein	 NUMA1	238,3	5,6
71	C23	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	358,5	9,49
72	C24	beta globin	 HBB	159,8	6,74
73	D1	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form	 HBB	159,8	6,74
74	D2	centromere protein F	 CENPF	367,5	5,03
75	D3	KIAA0402	 PCNT	377,8	5,40
75	D3	pericentrin B	 PCNT	377,8	5,40
76	D4	annexin A1, isoform CRA_c	 ANXA1	38,6	6,57

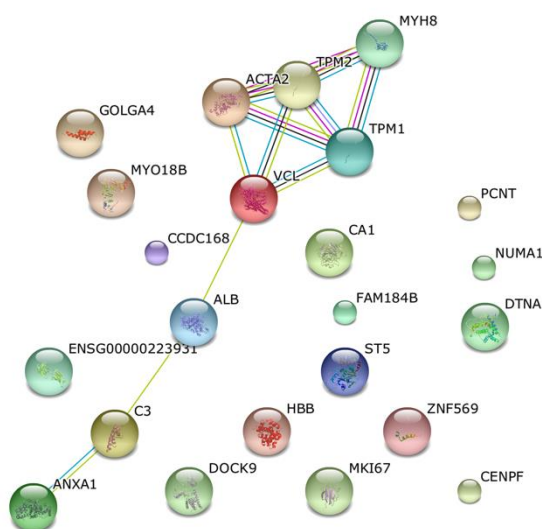
77	D5	dystrobrevin alpha isoform 8	DTNA	83,8	6,43
77	D5	CTCL tumor antigen se20-7	GOLGA4	260,9	5,33
78	D6	hypothetical protein LOC27146	FAM184B	120,9	5,87
79	D7	CENP-F kinetochore protein	CENPF	367,5	5,03
80	D8	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a	MKI67	358,4	9,49
81	D8	carbonic anhydrase 1	CA1	28,8	6,59
82	D10	beta globin chain	HBB	15,9	6,74
83	D11	beta-hemoglobin	HBB	15,9	6,74

Na slikama 15. i 16. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G2. Na slici 17. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G2.



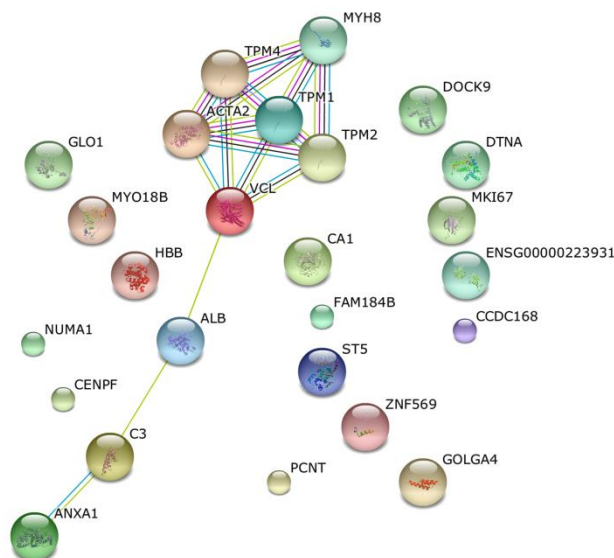
**Slika 15. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G2. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici. 8 te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 16. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G2. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 9. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 17. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G2. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 8. i 9. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

### **5.5.3. Individualni prikaz alfa G3 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**

Kod alfa G3 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 72. godini života. Najveća prijeterapijska vrijednost PSA iznosila je 11,10 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 6 (3+3). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u tri od šest pregledanih cilindara s postotkom











zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 10%. U desnom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT3aN0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: infiltracija i žarišno probijanje vezivne kapsule lijevo te širenje u okolnu mast i periprostatično rahlo vezivno tkivo. Također, tumorsko tkivo dopiralo je do resekcijskog ruba posterolateralno lijevo te su nađena žarišta perineuralne invazije.













Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja je iznosila 1,50 ng/mL. S obzirom na brzi porast i visoku vrijednost PSA nakon provedenog operativnog zahvata te prisutna negativna patohistološka obilježja kod bolesnika je provedena *salvage* RT. Na ležište prostate aplicirano je 72 Gy u 36 frakcija. Vrijednost PSA nakon godine dana praćenja iznosila je 0,001 ng/mL te 0,002 ng/mL nakon dvije godine. U tablicama 10. i 11. nalaze se popisi nađenih diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G3 ispitanika.

**Tablica 10. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G3 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
44, 60, 64, 70	P18,J18, J22,N24	macrophin 1 isoform 2	 MACF1	529,4	5,04
45	P19	fetal-myosin heavy chain (1437 AA)	 MYH 8	165,8	5,46
48, 51	P22, J9	transgelin, isoform CRA_c	 TAGLN	23,7	8,54
49	P23	transgelin variant	 TAGLN	20,9	8,69
61	J19	dystonin, isoform CRA_k	 DST	590,7	5,5
64	J22	nuclear mitotic apparatus protein 1	 NUMA 1	238,3	5,63
65	J23	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_b	 MACF1	434,3	5,2
69	N23	centrosomal protein 290kDa, isoform CRA_b	 CEP 290	290,4	5,75

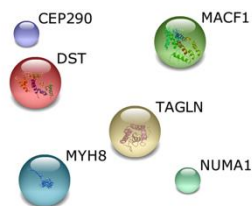
**Tablica 11. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G3 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski	Mr	pI
--------	-------	--------------	------------------	----	----

na gelu			broj proteina (kDa)		
24	O22	Tpr	 TPR	84,0	5,42
24	O22	HDCMA18P protein, isoform CRA_b	 LARP7	66,9	9,57
25	O23	myosin heavy chain IIx/d	 MYH1	223,1	5,59
25	O23	semenogelin I, isoform CRA_b	 SEMG1	42,5	9,63
31	P5	proapolipoprotein	 APOA1	30,8	5,56
32, 33	P6, P7	Chain A, Structure Of Human Annexin A2 In The Presence Of Calcium Ions	 ANXA2	36,5	8,32
34	P8	hCG2027094	 CEP135	99,1	5,61
34	P8	antigen KI-67 isoform 2	 MKI67	319,4	9,54
34	P8	hCG1640777, isoform CRA_b	**		
35	P9	proapolipoprotein	 APOA1	28,9	5,45
36	P10	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_d	 MACF1	452,8	5,16
37	P11	zinc finger protein 718	 ZNF141	55,4	9,55
40	P14	Chain B, T-To-T(High) Quaternary Transitions In Human Hemoglobin: Deshis146beta Deoxy Low-Salt	 HBB	0,0	

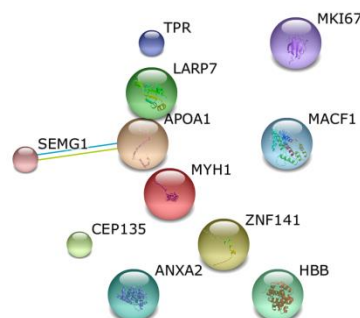
\*\* Nije pronađena interakcija u STRING-u.

Na slikama 18. i 19. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G3. Na slici 20. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G3.



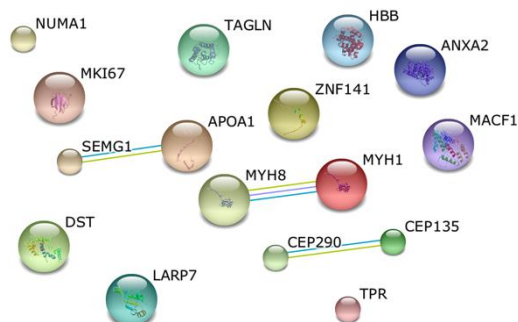
**Slika 18. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G3. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 10. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.



**Slika 19. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G3. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 11. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 20. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G3. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 10. i 11. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

#### **5.5.4. Individualni prikaz alfa G4 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**








Kod alfa G4 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 74. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 13,30 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u tri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 20 do 60%. U desnom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara.














U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 6 (3+3). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT3aN0MX. Prisutna su sljedeća

negativna patohistološka obilježja: obilna infiltracija i žarišno probijanje vezivne kapsule prostate lijevo, širenje u okolnu mast i vezivo te žarišta perineuralne invazije. Nakon radikalne prostatektomije ispitanik je praćen dvije godine. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,00 ng/mL te se nije mijenjala do kraja. U tablicama 12. i 13. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih kod parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G4 ispitanika.

**Tablica 12. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G4 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

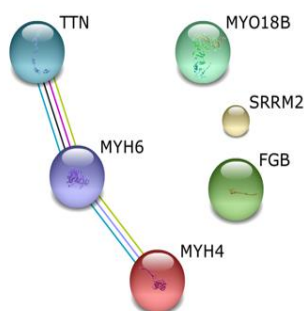
Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
31	L7	Chain B, Crystal Structure Of Human Fibrinogen	 FGB	52,3	7,14
35	L11	KIAA0324 protein	 SRRM2	304,2	12,05
36	L12	Myosin-6	 MYH6	223,7	5,58
37	L13	titin	 TTN	2991,6	6,35
39	L15	myosin-like protein	 MYO18B	285,1	6,44
40	L16	titin, isoform CRA_b	 TTN	2991,2	6,35
42	L18	myosin-4	 MYH 4	223,1	5,65

**Tablica 13. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G4 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1	K1	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2 tropomyosin 4-anaplastic lymphoma kinase fusion protein	 TPM4  TPM4	27,5	4,77
2	K2	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	36,6	4,89
4	K4	myosin XVIIIIB, isoform CRA_e	 MYO18B	358,5	9,49
5	K5	nebulin, isoform CRA_d	 NEB	273,6	6,51
6	K6	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1	 IGFN1	775,9	9,1
9	K9	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	 GAPHD	383,6	5,72
10	K10	calponin-1	 CNN1	36,1	8,57
11	K11	myosin-8	 MYH8	33,2	9,14
14	K14	semenogelin I	 SEMG1	222,8	5,58
16	K16	transgelin	 TAGLN	52,1	9,3
17	K17	transgelin, isoform CRA_c	 TAGLN	22,6	8,87
18	K18	myosin, heavy polypeptide 7B,	 MYH7B	23,7	8,54
				223,3	5,74

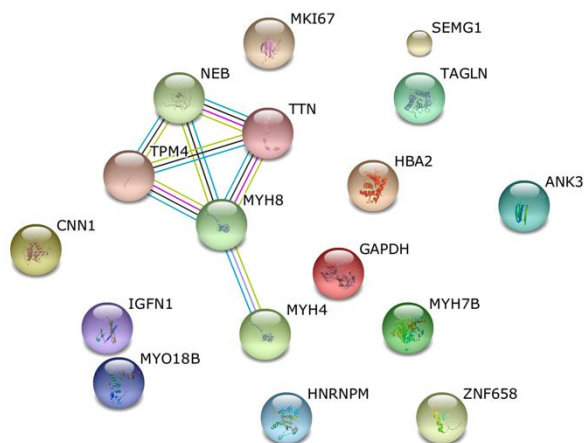
		cardiac muscle, beta, isoform CRA_c			
20	K20	zinc finger protein 658	ZNF658	122,3	8,63
22	K22	hemoglobin subunit alpha	HBA1	15,3	8,72
24	K24	myosin-4	MYH4	223,1	5,65
27	L3	ankyrin G	ANK3	480,4	6,07
28	L4	M4 protein deletion mutant	HNRNPM	73,5	8,9
29	L5	titin, isoform CRA_b	TTN	2991,2	6,35

Na slikama 21. i 22. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G4. Na slici 23. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G4.



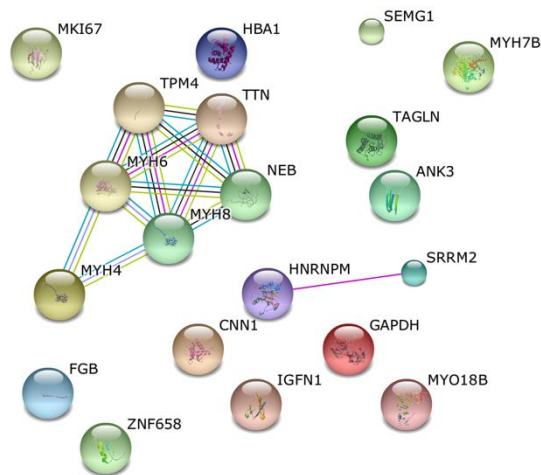
**Slika 21. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G4. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 12. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.



**Slika 22. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G4. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 13. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.



**Slika 23. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G4. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 12. i 13. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.

### **5.5.5. Individualni prikaz alfa G5 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**










Kod alfa G5 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 75. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 4,80 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT1N0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 6 (3+3). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u jednom od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 5%. U desnom režnju prostate tumor je bio prisutan u četiri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 20%.






U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 6 (3+3). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT3aN0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obostrana infiltracija vezivne kapsule prostate uz žarišno probijanje desno, posterolateralno i plitko širenje u okolnu mast te brojna žarišta perineuralne invazije.

Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,006 ng/mL. Unatoč niskoj vrijednosti PSA, zbog prisutnih negativnih patohistoloških obilježja kod ispitanika je provedena adjuvantna RT. Na ležište prostate aplicirano je 64 Gy u 32 frakcije. Vrijednost PSA nakon godinu dana praćenja iznosila je 0,1 ng/mL te 0,008 ng/mL nakon dvije godine. U tablicama 14. i 15. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u parnim uzorcima tumorskog i zdravog tkiva alfa G5 ispitanika.

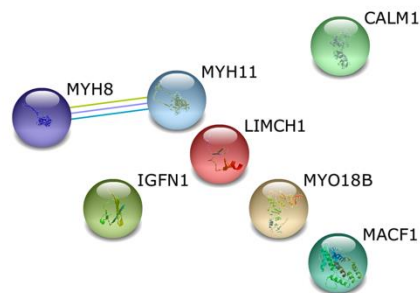
**Tablica 14. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G5 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
60	M12	smooth muscle myosin heavy chain	 MYH11	122,0	5,02
62	M14	hypothetical protein, isoform CRA_c	 LIMCH1	164,3	5,99
64	M16	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1	 IGFN1	383,6	5,72
65	M17	myosin XVIIIIB, isoform CRA_e	 MYO18B	273,6	6,51
66	M18	macrophin 1 isoform 2	 MACF1	529,4	5,04
		microtubule-actin cross-linking factor 1 isoform a	 MACF1	620,0	5,27
69	M21	calmodulin	 CALM1	17,2	4,06
70	M22	Myosin-XVIIIb	 MYO18B	285,2	6,49
72	M24	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,7	5,64

**Tablica 15. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G5 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

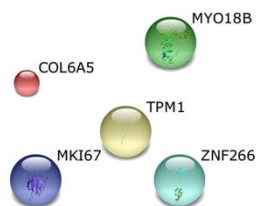
Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
46	L22	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a	 MKI67	308,6	9,55
47	L24	myosin XVIIIIB, isoform CRA_e	 MYO18B	273,6	6,51
50	M3	tropomyosin isoform	 TPM1	28,4	4,89
54	M6	Collagen alpha-5(VI) chain	 COL6A5	289,9	6,5
55	M7	ZNF266 protein	 ZNF266	45,2	9,17

Na slikama 24. i 25. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G5. Na slici 26. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G5.



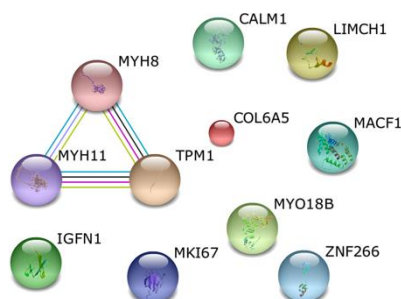
**Slika 24. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G5. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 14. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 25. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G5. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 15. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 26. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G5. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se**



**nalaze u tablici 14. i 15. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

#### **5.5.6. Individualni prikaz alfa G6 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**



























Kod alfa G6 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 64. godini života. Najveća prijeternijska vrijednost PSA iznosila je 18,12 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u svih osam pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 50 do 90%. U desnom režnju prostate tumor je nađen u šest od osam pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 50%.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Tercijarni gradus 5 bio je prisutan u 10% tumorskog tkiva. Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT3abN0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obostrana obilna infiltracija vezivne kapsule prostate i sjemenih mjehurića uz brojna žarišta perineuralne invazije. Na više mjesta obostrano posterolateralno i uz sjemene mehuriće bila su vidljiva područja plitke infiltracije ekstraprostatičnog veziva.































Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,03 ng/mL. S obzirom na vrijednost PSA i negativna patohistološka obilježja kod ispitanika je provedena *salvage* RT. Na ležište prostate aplicirano je 66 Gy u 33 frakcije. Vrijednost PSA nakon godinu dana praćenja iznosila je 0,01 ng/mL te 0,03 ng/mL nakon dvije godine. U tablicama 16. i 17. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih kod parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G6 ispitanika.

**Tablica 16. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G6 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

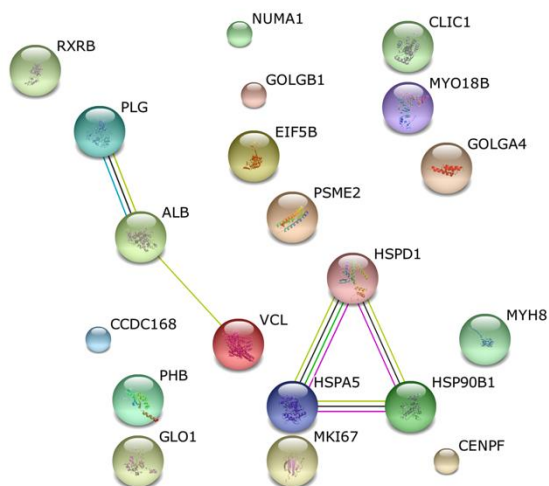
Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
3,5	A3,A5	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	277,7	9,35
4	A4	unnamed protein product	 VLC	87,3	5,64
18	A18	golgin-245	 GOLGA4	244,4	5,28
19	A19	Heat shock protein gp96 precursor	 HSP90B1	90,1	4,73
		Tumor rejection antigen (gp96) 1	 HSP90B1	92,3	4,77
20	A20	BiP protein	 HSPA5	0,0	5,23
21	A21	mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1	 HSPD1	0,0	5,83
23	A23	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	 ALB	319,3	9,51
24	A24	antigen of the monoclonal antibody Ki-67	 MKI67	358,4	9,49
25	B1	giantin	 GOLGB1	376,1	4,96
26	B2	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	358,7	9,49
27	B3	Chain A, Crystal Structure Of A Soluble Dimeric Form Of Oxidised Clic1	 CLIC1	27,1	5,09
		nuclear chloride channel	 CLIC1	26,9	5,09
28	B4	PSME2	 PSME2	27,4	5,44
29	B5	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1	**	629,1	5,8
30	B6	prohibitin	 PHB	29,8	5,57
31	B7	Nuclear mitotic apparatus protein 1 variant	 NUMA1	238,1	6,45
32	B8	Glyoxalase I	 GLO1	20,8	5,12
33	B9	NuMA protein	 NUMA1	238,3	5,63
34	B10	Eukaryotic translation initiation factor 5B	 EIF5B	138,8	5,37
		MHC class I promoter binding protein	 RXRB	25,6	6,42
35	B11	fetal-myosin heavy chain (1437 AA)	 MYH8	165,8	5,46
36	B12	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	 CENPF	357,2	5,06
37	B13	MYO18B protein	 MYO18B	285,2	6,49
38	B14	hCG2011852	 CCDC168	784,5	9
39	B15	myosin-8	 MYH8	222,8	5,58
40	B16	Chain A, Crystal And Molecular Structure Of Human Plasminogen Kringle 4 Refined At 1.9-Angstroms Resolution	 PLG	9,0	8,59

\*\*Nije pronađena interakcija u STRING-u.

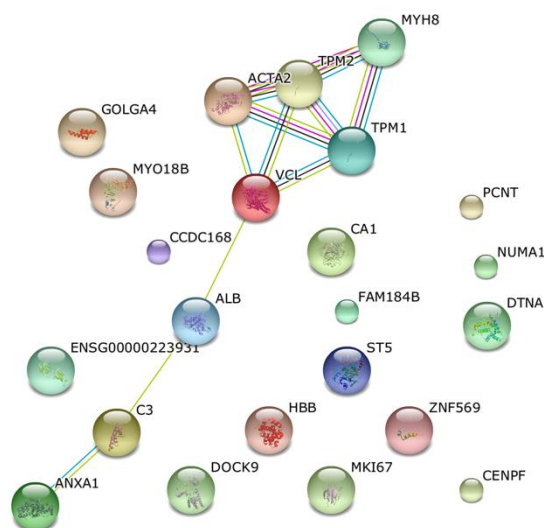
**Tablica 17. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G6 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
56,57	C8,C9	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	 TPM2	32,8	4,66
58	C10	tropomyosin isoform	 TPM1	32,6	4,69
59	C11	complement component C3	 C3	187,0	6,02
60	C12	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	 ALB	69,3	5,92
61	C13	actin prepeptide	 ACTA2	41,9	5,24
62	C14	zinc finger protein 569	 ZNF569	79,5	8,97
63	C15	myosin XVIIIIB, isoform CRA_e	 MYO18B	285,0	6,45
64,79	C16,C22	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,6	5,58
65	C17	dedicator of cytokinesis 9, isoform CRA_i	 DOCK 9	236,2	7,25
66	C18	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
67	C19	vinculin, isoform CRA_a	 VLC	123,7	5,50
68	C20	NuMA protein	 NUMA1	238,2	5,63
69	C21	immunoglobulin heavy chain variable region	 ENSG00000223931	49,2	6,35
		suppression of tumorigenicity 5 protein isoform 2	 ST5	126,4	9,35
70	C22	NuMA protein	 NUMA1	238,3	5,6
71	C23	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	358,5	9,49
72	C24	beta globin	 HBB	159,8	6,74
73	D1	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form	 HBB	159,8	6,74
74	D2	centromere protein F	 CENPF	367,5	5,03
75	D3	KIAA0402	 PCNT	377,8	5,40
75	D3	pericentrin B	 PCNT	377,8	5,40
76	D4	annexin A1, isoform CRA_c	 ANXA1	38,6	6,57
77	D5	dystrobrevin alpha isoform 8	 DTNA	83,8	6,43
77	D5	CTCL tumor antigen se20-7	 GOLGA4	260,9	5,33
78	D6	hypothetical protein LOC27146	 FAM184B	120,9	5,87
79	D7	CENP-F kinetochore protein	 CENPF	367,5	5,03
80	D8	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a	 MKI67	358,4	9,49
81	D8	carbonic anhydrase 1	 CA1	28,8	6,59
82	D10	beta globin chain	 HBB	15,9	6,74
83	D11	beta-hemoglobin	 HBB	15,9	6,74

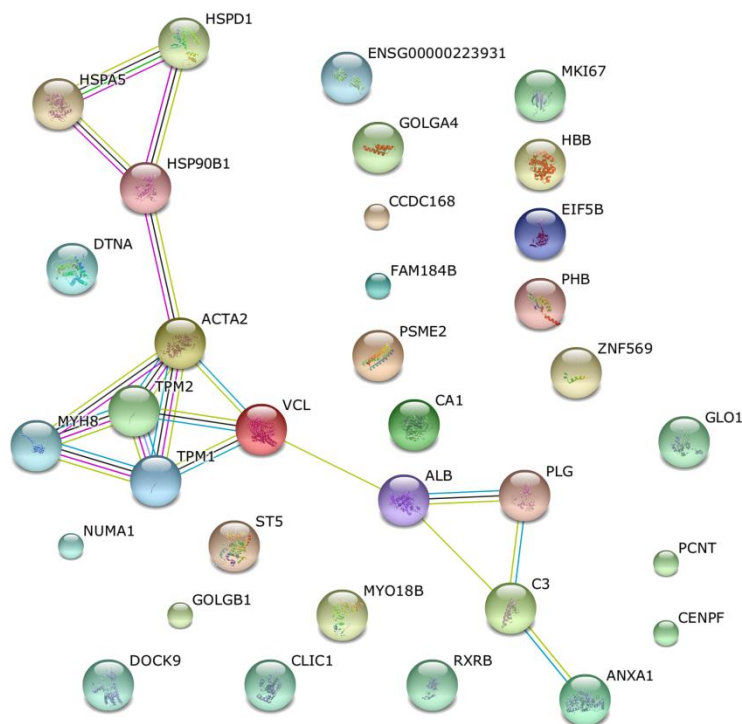
Na slikama 27. i 28. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G6. Na slici 29. nalazi se prikaz interaktoma uzorka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G6.



**Slika 27. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G6. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 16. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.**



**Slika 28. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G6. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 17. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.**



**Slika 29. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G6. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 16. i 17. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.

### **5.5.7. Individualni prikaz alfa G7 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**

Kod alfa G7 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 68. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 10,81 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2cN0M0.
















U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u tri od šest pregledanih cilindara. U desnom režnju prostate tumor je bio prisutan u pet od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćenog materijala do 50%.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Tercijarni gradus 5 bio je prisutan u 10% tumorskog tkiva. Od 15 izoliranih limfnih čvorova jedan je bio zahvaćen tumorskim tkivom. Prema pTNM-u tumor je































klasificiran kao pT3aN1MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obostrana infiltracija vezivne kasule te desno posterolateralno žarišno probijanje i plitko širenje u periprostatično rahlo vezivo. U području resekcijskog ruba prema vratu mokraćnog mjehura tumorsko tkivo dopiralo je do ruba.

Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,01 ng/mL. S obzirom na negativna patohistološka obilježja, uključujući zahvaćenost limfnog čvora tumorom, provedena je *salvage* RT u kombinaciji s ADT. Na područje ležišta prostate aplicirano je 66 Gy u 33 frakcije te je započeta hormonska terapija bikalutamidom u dozi od 150 mg koja je trajala tri godine. Tijekom hormonskog liječenja, vrijednost PSA nakon godinu i dvije godine praćenja iznosila je 0,00 ng/mL. U tablicama 18. i 19. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih kod parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G7 ispitanika.

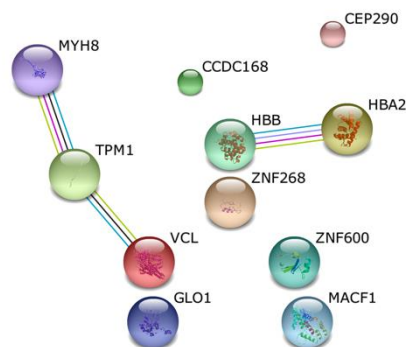
**Tablica 18. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G7 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1,2	A1,A2	tropomyosin isoform	 TPM1	33,0	4,63
3,5	A3,A5	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
4	A4	unnamed protein product	 VLC	100,9	5,35
6	A6	zinc finger protein 600	 ZNF600	83,1	9,4
7	A7	Chain A, Human Glyoxalase I With Benzyl-Glutathione Inhibitor	 GLO1	20,6	5,12
8	A8	ZNF268B	 ZNF268	108,3	9,14
		CLL-associated antigen KW-4 splice variant 2	 ZNF268	108,3	9,14
9	A9	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,7	5,65
11	A11	centrosomal protein 290kDa, isoform CRA_b	 CEP290	290,8	5,76
		prostate cancer antigen T21	 CEP290	62,3	5,41
12	A12	macrophin 1 isoform 2	 MACF1	529,4	5,04
12	A12	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_e	 MACF1	617,7	5,26
13,14	A13,A14	beta-globin	 HBB	16,0	6,74
16	A16	hemoglobin beta chain variant Hb.Sinai-Bel Air	 HBB	11,5	5,65
17	A17	alpha 2 globin variant	 HBA2	15,2	8,72

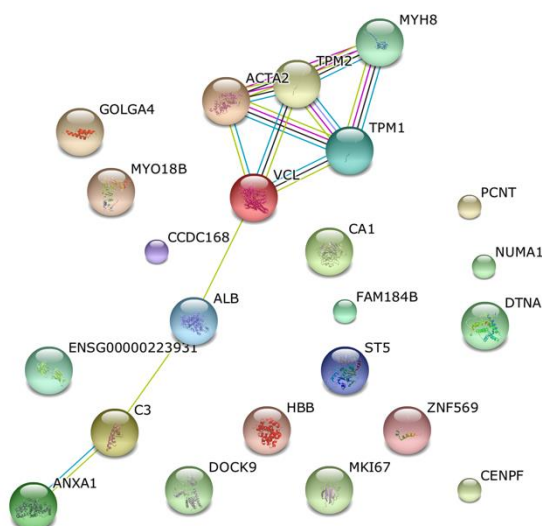
**Tablica 19. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G7 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
56,57	C8,C9	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	 TPM2	32,8	4,66
58	C10	tropomyosin isoform	 TPM1	32,6	4,69
59	C11	complement component C3	 C3	187,0	6,02
60	C12	Chain A, Structure Of Human Serum Albumin With S-Naproxen And The Ga Module	 ALB	69,3	5,92
61	C13	actin prepeptide	 ACTA2	41,9	5,24
62	C14	zinc finger protein 569	 ZNF569	79,5	8,97
63	C15	myosin XVIII B, isoform CRA_e	 MYO18B	285,0	6,45
64,79	C16,C22	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a	 MYH8	222,6	5,58
65	C17	dedicator of cytokinesis 9, isoform CRA_i	 DOCK 9	236,2	7,25
66	C18	hypothetical protein LOC643677	 CCDC168	801,4	8,94
67	C19	vinculin, isoform CRA_a	 VLC	123,7	5,50
68	C20	NuMA protein	 NUMA1	238,2	5,63
69	C21	immunoglobulin heavy chain variable region	 ENSG00000223931	49,2	6,35
		suppression of tumorigenicity 5 protein isoform 2	 ST5	26,4	9,35
70	C22	NuMA protein	 NUMA1	238,3	5,6
71	C23	antigen KI-67 isoform 1	 MKI67	358,5	9,49
72	C24	beta globin	 HBB	159,8	6,74
73	D1	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form	 HBB	159,8	6,74
74	D2	centromere protein F	 CENPF	367,5	5,03
75	D3	KIAA0402	 PCNT	377,8	5,40
75	D3	pericentrin B	 PCNT	377,8	5,40
76	D4	annexin A1, isoform CRA_c	 ANXA1	38,6	6,57
77	D5	dystrobrevin alpha isoform 8	 DTNA	83,8	6,43
77	D5	CTCL tumor antigen se20-7	 GOLGA4	260,9	5,33
78	D6	hypothetical protein LOC27146	 FAM184B	120,9	5,87
79	D7	CENP-F kinetochore protein	 CENPF	367,5	5,03
80	D8	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a	 MKI67	358,4	9,49
81	D8	carbonic anhydrase 1	 CA1	28,8	6,59
82	D10	beta globin chain	 HBB	15,9	6,74
83	D11	beta-hemoglobin	 HBB	15,9	6,74

Na slikama 30. i 31. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G7. Na slici 32. nalazi se prikaz interaktoma uzorka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G7.

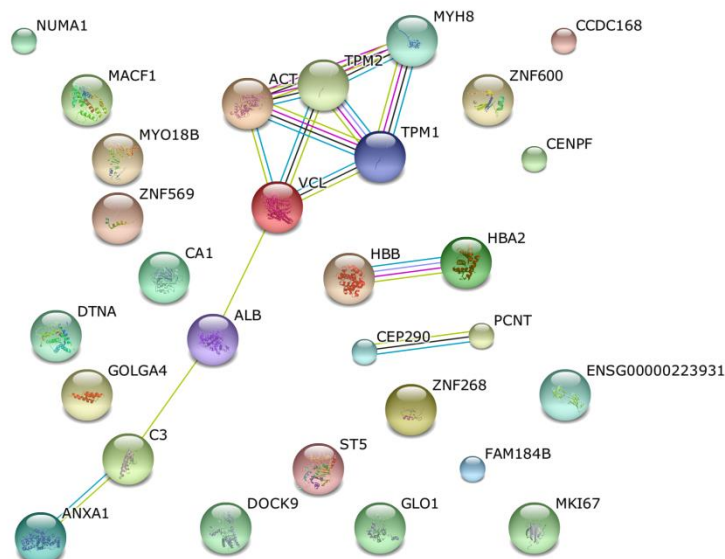


**Slika 30. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G7. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 18. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**



**Slika 31. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G7. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 19. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**





**Slika 32. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G7. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 18. i 19. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.

### **5.5.8. Individualni prikaz alfa G8 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**








Kod alfa G8 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 70. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 8,20 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2aN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara. U desnom režnju prostate tumor je bio prisutan u pet od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 15 do 90%.






U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT2a+N0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: obilna infiltracija kapsule bez jasnih znakova ekstraprostatičnog širenja uz žarišta perineuralne invazije. Tumorsko tkivo dopiralo je žarišno do resekcijskih rubova posterolateralno desno. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,02 ng/mL, nakon godine dana 0,09 ng/mL te 0,35

ng/mL nakon dvije godine kada je provedena *salvage* RT. Na ležište prostate aplicirano je 68 Gy u 34 frakcije. U tablicama 20. i 21. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina nađenih kod parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G8 ispitanika.

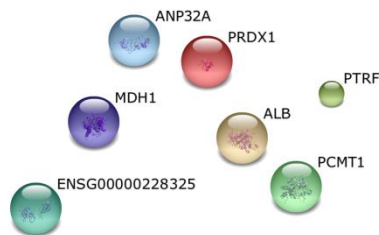
**Tablica 20. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G8 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1	A12	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	 ANP32A	28,5	3,99
4	A9	unnamed protein (polymerase I and transcript release factor)	 PTRF	40,4	5,20
9	A8	L-isoaspartyl/D-aspartyl protein carboxyl methyltransferase	 PCMT1	24,6	6,05
10	A6	Chain L, Crystal Structure Of Fab' From The Hiv-1 Neutralizing Antibody 2f5 In Complex With Its Gp41 Epitope	 ENSG00000228325	23,3	6,48
10	A6	unnamed protein (albumin domain)	 ALB	26,2	6,40
11	A3	peroxiredoxin-1	 PRDX1	22,0	8,27
12	A7	malate dehydrogenase, cytoplasmic isoform 2	 MDH1	36,4	6,91

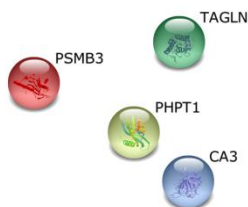
**Tablica 21. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G8 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
13	B1	Chain J, Crystal Structure Of The Mammalian 20s Proteasome At 2.75A	 PSMB3	22,9	6,14
14, 15	A22,A21	anhydrase, carbonic	 CA3	29,4	6,94
16	B7	unnamed protein - Janus/Ocnus domain - phosphohistidine phosphatase	 PHPT1	13,8	5,65
18	B4	smooth muscle protein	 TAGLN	22,4	8,56
19, 20	B3, B2	Transgelin	 TAGLN	22,5	8,87

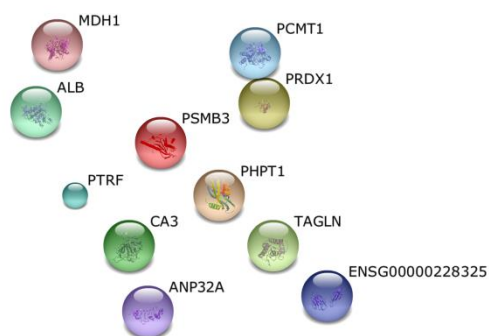
Na slikama 33. i 34. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G8. Na slici 35. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G8.



**Slika 33. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G8. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 20. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**



**Slika 34. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G8. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 21. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**



**Slika 35. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G8. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 20. i 21. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

### 5.5.9. Individualni prikaz alfa G9 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva









Kod alfa G9 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 66. godini života. Najveća prijeterapijska vrijednost PSA iznosila je 10,00 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.






U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). U lijevom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara. U desnom režnju prostate tumor je bio prisutan u četiri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 40 do 80%.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT2cN0MX. Od negativnih patohistoloških obilježja bila je prisutna samo opsežna perineuralna invazija.

Nakon radikalne prostatektomije ispitanik je praćen dvije godine. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,002 ng/mL te 0,00 ng/mL nakon prve i druge godine. U tablicama 22. i 23. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina nađenih kod parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G9 ispitanika.







**Tablica 22. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G9 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
17	C22	apoptosis-inducing factor 2	 AIFM2	40,5	9,16
18	C24	thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase isoform 1	 CRYM	33,7	5,06
20	D11	Chain A, Crystal Structure Of The Human Co-Chaperone P23	 PTGES3	18,6	4,32
21	C21	arginase-2, mitochondrial precursor	 ARG2	38,5	6,00
22	C20	unnamed protein (prostatic acid phosphatase)	 ACPD	44,5	5,89
23	C12	elongation factor Tu	 TUFM	48,0	6,53
24	C15	prostate specific antigen precursor, partial immunoglobulin kappa 4 light chain	**  ENSG0000228325	28,2 24,1	7,70 6,18
25	C16	unnamed protein product Chain A, Crystal Structure Of Recombinant	 CMBL **	28,0 26,5	6,50 6,51

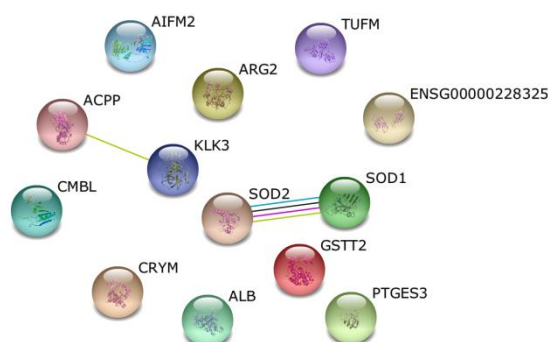
		Human Triosephosphate Isomerase At 2.8 Angstroms Resolution			
26	C17	glutathione S-transferase theta-2	 GSTT2	27,4	5,99
27	C13	manganese superoxide dismutase (MnSOD)	 SOD2	24,7	8,35
28	D1	prostate specific antigen precursor, partial	 KLK3	28,2	7,70
29	D3	Chain F, Atomic Structures Of Wild-Type And Thermostable Mutant Recombinant Human Cu, Zn Superoxide Dismutase	 SOD1	15,7	5,70
32	C14	PRO2044 (albumin)	 ALB	69,3	5,92

\*\*Nije pronađena interakcija u STRING-u.

**Tablica 23. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G9 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

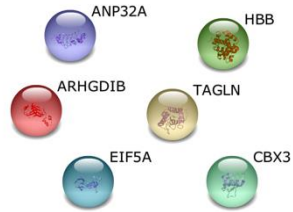
Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
2	B19	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	 ANP32A	28,5	3,99
3	B21	rho GDP-dissociation inhibitor 2	 ARHGDIB	22,9	5,10
6	B22	HP1Hs-gamma	 CBX3	19,7	5,03
8	C9	eukaryotic translation initiation factor 5A-1 isoform B	 EIF5A	16,8	5,08
14	B11	smooth muscle protein	 TAGLN	22,4	8,56
16	B13	hemoglobin beta chain	 HBB	11,0	6,03

Na slikama 36. i 37. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G9. Na slici 38. nalazi se prikaz interaktoma uzorka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G9.

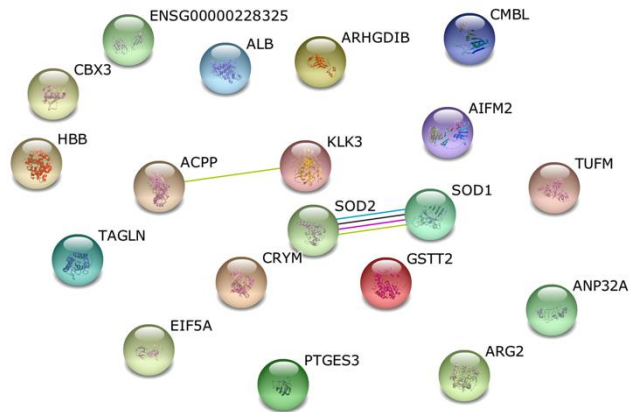


**Slika 36. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G9. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 22. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 37. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G9. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 23. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**



**Slika 38. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G9. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 22. i 23. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr. Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.**

### **5.5.10. Individualni prikaz alfa G10 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva**

Kod alfa G10 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 64. godini života. Najveća prijeterapijska vrijednost PSA iznosila je 5,90 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT2bN0M0.

U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor je bio prisutan u pet od šest pregledanih cilindara s postotkom



zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 70%. U desnom režnju tumor je bio prisutan u jednom od šest pregledanih cilindara. Materijal je bio preoskudan za procjenu zahvaćenosti bioptičkog materijala.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). Prema pTNM-u tumor je klasificiran kao pT2c+N0MX. Od negativnih patohistoloških obilježja prisutan je bio samo žarišno pozitivan resekcijski rub apeksa.

Nakon radikalne prostatektomije ispitanik je praćen dvije godine. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja je iznosila 0,00 ng/mL te se nije mijenjala sve do kraja. U tablicama 24. i 25. nalaze se popisi nađenih diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G10 ispitanika.












**Tablica 24. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G10 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1	H20	set	SET	32,1	4,12
2	H21	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ANP32A	28,5	3,99
4,5	H23,H24	cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	18,6	9,51
6	I1	myosin light chain 2	MYL9	19,8	5,09
		myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	19,7	4,71
7	I2	eukaryotic translation initiation factor 5A-1 isoform B	EIF5A	16,8	5,08
		myosin regulatory light chain 12A	MYL12A	19,7	4,67
12	H18	rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDI2	22,9	5,10
13	H19	glyoxalase-I	GLO1	20,7	5,24
14	H5	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1	CAPZB	30,6	5,69
		cathepsin D preproprotein	CTSD	44,5	6,10
15	H4	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	29,6	5,66
16	J15	platelet-activating factor acetylhydrolase 1B subunit beta isoform a	PAFAH1B2	25,5	5,57
18	H9	UMP-CMP kinase isoform a	**	25,8	8,14
19	H8	glutathione peroxidase	GPX1	21,9	6,15
20	H12	small ubiquitin-related modifier 2 precursor	SUMO2	10,8	5,32
21	H13	beta-glucuronidase precursor (EC 3.2.1.31)	GUSB	74,6	6,54
22	H10	ferritin light subunit, partial	FTL	16,3	5,65
24	H14	prostate specific antigen precursor, partial	KLK3	28,2	7,70

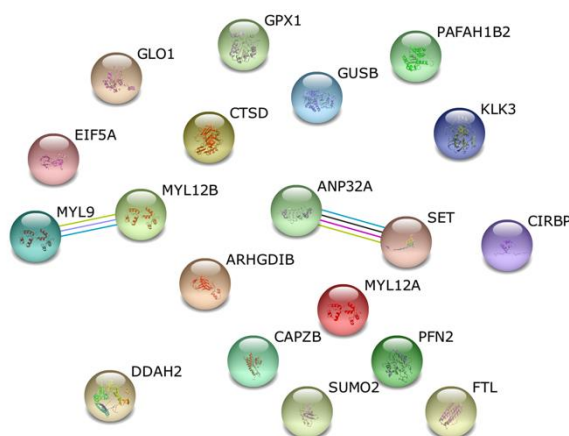
25	H15	profilin-2 isoform b	 PFN2	15,0	5,78
27	H16	RecName: Full=BoIA-like protein 2	 ARHGDI B	10,1	6,07

\*\* Nije pronađena interakcija u STRING-u.

**Tablica 25. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G10 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
28	I14	CGI-150 protein	 GLOD4	54,9	8,99
28, 29	I14, I13	alpha-actin	 ACTA2	42,0	5,23
29	I13	annexin A3	 ANXA3	36,3	5,63
30	I9	unnamed protein product (prostatic acid phosphatase)	 ACPP	44,5	5,89
32	I7	alpha-enolase isoform 1	 ENO1	47,1	7,01
33	I20	nonhistone chromosomal protein HMG-1	 HMGB1	24,9	5,41
34	I23	eukaryotic translation initiation factor 5A-1 isoform B	 EIF5A	16,8	5,08
37	J14	microseminoprotein beta	 MSMB	10,6	5,36
38,40	I17,I16	smooth muscle protein cofilin-1	 TAGLN	22,4	8,56
			 CFL1	18,4	8,22
39	I15	alpha-crystallin B chain	 CRYAB	20,1	6,76

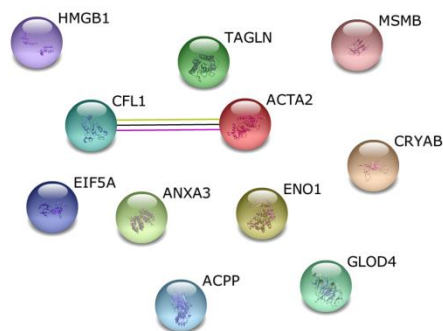
Na slikama 39. i 40. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G10. Na slici 41. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G10.



**Slika 39. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G10. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 24. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

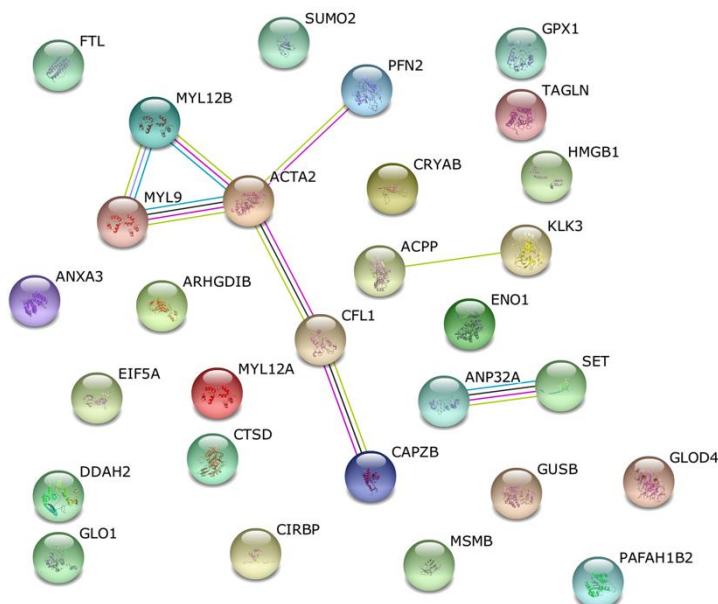
Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.





**Slika 40. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G10. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 25. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 41. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G10. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 24. i 25. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

### 5.5.11. Individualni prikaz alfa G11 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva

Kod alfa G11 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 76. godini života. Najviša prijeternijska vrijednost PSA iznosila je 24,60 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT1cN0M0.






U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara. U desnom režnju prostate tumor je bio prisutan u četiri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćenog materijala od 30 do 80%.













U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate miješanog tipa, acinarnog i duktalnog u omjeru 70:30, Gleason zbroja 7(4+3). Tercijarni gradus 5 bio je prisutan u 10% tumorskog tkiva.

Prema pTNM-u tumor bio je klasificiran kao pT3aN0MX. Prisutna su sljedeća negativna patohistološka obilježja: žarišta ekstraprostatičnog širenja i pozitivni resekcijski rub posterolateralno desno te opsežna perineuralna invazija.













Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,00 ng/mL. Zbog komorbiditeta, uključujući kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, bolesnik je praćen. Vrijednost PSA nakon prve i druge godine praćenja iznosila je 0,10 ng/mL. U tablicama 26. i 27. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G11 ispitanika.




**Tablica 26. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G11 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1	D7	calumenin	 CALU	37,0	4.47
2	A4	laminin-binding protein	 RPSA	31,7	4.84
3	A3	unnamed protein product - SF2p32	 C1QBP	30,8	4.74
4	A16	heme-binding protein 2	 HEBP2	22,8	4.58
5	A19	proapolipoprotein, partial	 APOA1	28,9	5.45

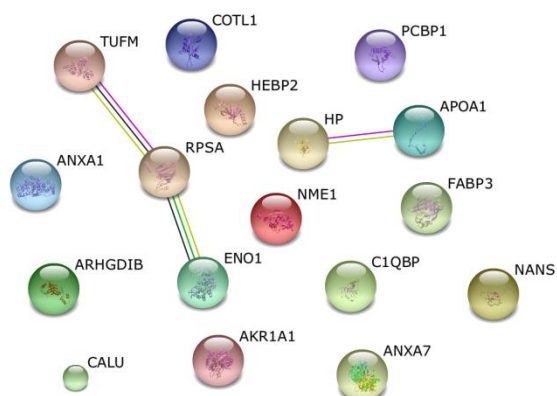
6	A17	rho GDP-dissociation inhibitor 2	 ARHGDI1	22,9	5.10
7	B9	coactosin-like protein	 COTL1	15,9	5.54
8	C6	haptoglobin Hp2	 HP	41,7	6.23
9	C7	Nm23 protein	 NME1	20,3	7.07
10	C5	fatty acid-binding protein	 FABP3	14,7	7.00
11	C22	annexin A7 isoform 1	 ANXA7	50,2	6.25
12	C21	alpha-enolase isoform 1	 ENO1	47,1	7.01
13	C20	elongation factor Tu	 TUFM	49,5	7.70
14	D4	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	 AKR1A1	36,5	6.32
15	D3	unnamed protein product - N-acetylneuraminase like	 NANS	40,2	6.29
16	D2	hnRNP-E1	 PCBP1	37,5	6.66
17	C23	annexin A1	 ANXA1	38,6	6.57

**Tablica 27. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G11 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
18	A14	smooth muscle/nonmuscle myosin light chain kinase	 MYLK	33,4	4.54
18,19	A14,A15	dermatopontin	 DPT	24,0	4.70
20	A8	unnamed protein product - Desmin like	 DES	27,3	6.09
21	A12	alpha-actin	 ACTA2	42,0	5.23
		POTE ankyrin domain family member E	 POTEE	121,2	5.83
22	A20	unnamed protein product	 ACTG2	41,7	5.31
23	A13	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1	 CAPZB	30,6	5.69
24	A19	Chain A, Atpase Domain Of Human Heat Shock 70kda Protein 1	 HSPA1A	41,8	6.69
		unnamed protein product - Hsp 70 kDa	 HSPA8	67,9	5.32
25	C17	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	 GAPDH	36,0	8.26
26,28	C10,C12	smooth muscle protein	 TAGLN	22,4	8.56
27	C11	Homo sapiens p20 protein	 HSPB6	16,8	5.95

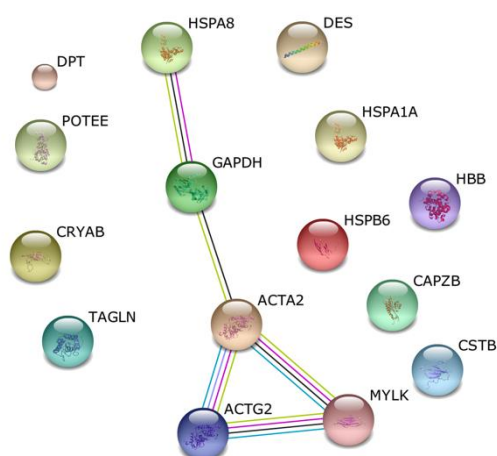
29	C15	alpha-crystallin B chain	 CRYAB	20,1	6.76
30	C13	Chain I, The Refined 2.4 Angstroms X-Ray Crystal Structure Of Recombinant Human Stefin B In Complex With The Cysteine Proteinase Papain: A Novel Type Of Proteinase Inhibitor Interaction	 CSTB	11,1	8.01
31	C14	unnamed protein product - hemoglobin like protein	 HBB	15,9	7.12

Na slikama 42. i 43. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G11. Na slici 44. nalazi se prikaz interaktoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G11.



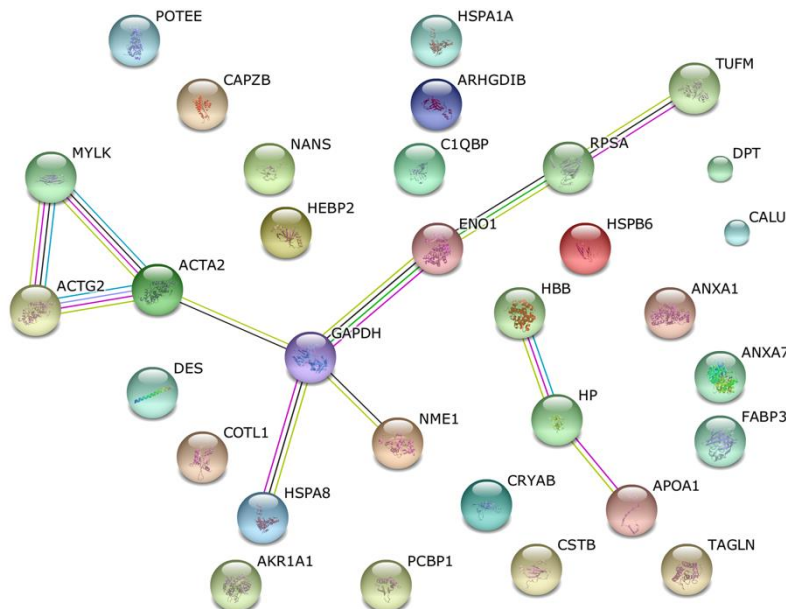
**Slika 42. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G11. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 26. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 43. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G11. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 27. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 44. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G11. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 26. i 27. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.

### 5.5.12. Individualni prikaz alfa G12 ispitanika i njegovih proteomskih profila uzoraka tumorskog i zdravog tkiva

Kod alfa G12 ispitanika radikalna prostatektomija učinjena je u 41. godini života. Najveća prijetepijska vrijednost PSA iznosila je 11,30 ng/mL. Klinički je ispitanik bio klasificiran kao cT1N0M0.

















U biopsiji je nađen adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (3+4). U lijevom režnju prostate tumor nije pronađen niti u jednom od šest pregledanih cilindara. U desnom


























režnju prostate tumor je pronađen u tri od šest pregledanih cilindara s postotkom zahvaćanja bioptičkog materijala od 5 do 20%.

U patohistološkom nalazu pronađen je adenokarcinom prostate Gleason zbroja 7 (4+3). Prema pTNM-u tumor klasificiran je kao pT2cN0MX. Od negativnih patohistoloških obilježja bila je prisutna samo žarišna perineuralna invazija.



















Nakon radikalne prostatektomije ispitanik je praćen dvije godine. Vrijednost PSA nakon četiri mjeseca praćenja iznosila je 0,00 ng/mL te se nije mijenjala sve do kraja. U tablicama 28. i 29. nalaze se popisi diferencijalno eksprimiranih proteina parnih uzoraka tumorskog i zdravog tkiva alfa G12 ispitanika.

**Tablica 28. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku tumorskog tkiva prostate alfa G12 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MALDI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
1	F3	80K-H protein	 PRKCSH	59,2	4.34
2,14	F4,F23	GRP78 precursor, partial	 HSPA 5	72,0	5.03
3	F6	calumenin	 CALU	37,0	4.47
4	F5	vimentin	 VIM	53,6	5.03
5	F7	unnamed protein product - SF2p32	 C1QBP	30,8	4.74
6	F8	heme-binding protein 2	 HEBP2	22,8	4.58
7	F9	myosin regulatory light polypeptide 9 isoform a	 MYL9	19,8	4.80
8	F17	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 isoform 1	 DDAH1	31,1	5.53
8	F17	L-lactate dehydrogenase B chain	 LDHB	36,6	5.71
9	F18	alpha-tubulin	 TUBA1B	50,1	4.94
10	F19	G protein beta subunit	 GNB2	37,3	5.75
10,11	F19,F20	capping protein alpha, partial	 CAPZA 2	32,7	5.58
11	F20	unnamed protein product	 CAPZA1	32,8	5.44
		gamma-actin, partial	 ACTG1	25,8	5.65
12	F15	heme-binding protein 1	 HEBP1	21,0	5.71
13	F22	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1	 PPP1CB	37,1	5.84

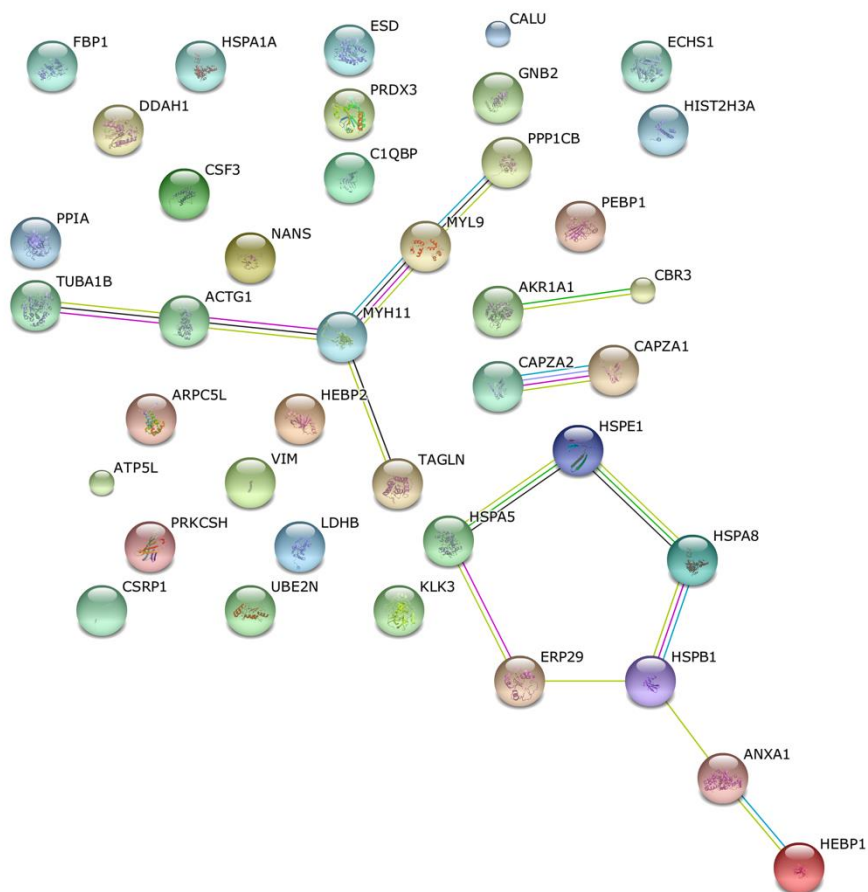
14	F23	carbonyl reductase [NADPH] 3	 CBR3	30,8	5.82
15	F21	endoplasmic reticulum resident protein 29 isoform 1 precursor	 ERP29	28,9	6.77
16	G8	enoyl-CoA hydratase	 ECHS1	31,3	8.34
17	G9	heat shock protein 27	 HSPB1	22,3	7.83
18	G10	Myosin heavy chain (MHY11) (3'partial)	 MYH11	13,0	5.06
19	G11	thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial isoform a precursor	 PRDX3	27,6	7.67
20	F13	Chain A, Structure And Dynamics Of The Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Determined By Nmr Spectroscopy. Loop Mobility In A Four-Helix-Bundle Protein	 CSF3	19,1	5.43
21	F14	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	 UBE2N	17,1	6.13
22	F24	unnamed protein product - N-acetylneuraminase synthase like	 NANS	40,2	6.29
22	F24	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	 AKR1A1	36,5	6.32
23	G1	sialic acid synthase	 NANS	40,2	6.29
24	G3	fructose-1,6-bisphosphatase	 FBP1	36,8	6.54
		annexin A1	 ANXA1	38,6	6.57
25,28	G4,G7	prostate specific antigen precursor, partial	 KLK3	28,2	7.70
26	G5	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	 HSPA8	70,8	5.37
27	G6	Chain A, Atpase Domain Of Human Heat Shock 70kda Protein 1	 HSPA1A	41,8	6.69
28	G7	S-formylglutathione hydrolase	 ESD	31,4	6.54
29	G12	actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	 ARPC5L	16,9	6.15
30	G14	smooth muscle protein	 TAGLN	22,4	8.56
31	G15	Chain A, Cyclophilin A Complexed With Dipeptide Gly-Pro	 PPIA	17,8	7.82
32	G16	cysteine and glycine-rich protein 1 isoform 1	 CSRP1	20,9	7.42
		neuropeptide h3	 PEBP1	20,5	8.90
33	G17	chaperonin 10-related protein	 HSPE1	10,2	8.98
		histone cluster 2, H3, pseudogene 2	 HIST2H3A	15,4	11.27
		ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G	 ATP5L	11,3	9.65

**Tablica 29. Popis diferencijalno eksprimiranih proteina pronađenih u uzorku zdravog tkiva prostate alfa G12 ispitanika, kvantitativno analiziranih računalnim programom PDQuest i kvalitativno spektrometrijom masa.**

Oznaka na gelu	MAL DI	Ime proteina	Identifikacijski broj proteina	Mr (kDa)	pI
34	D16	tropomyosin beta chain isoform 2	 TPM2	32,9	4.63
35	D13	desmin	 DES	53,4	5.21
36	D14	unnamed protein product - Hsp 70kDa like	 HSPA8	45,3	5.50
37	D15	unnamed protein product - Hsp 70kDa like	 HSPA1A/1B	63,8	5.39
38	E7	unnamed protein product - Desmin like	 DES	27,3	6.09
39,41	E2, E16	unnamed protein product - nt binding domain of sugar kinase, actin similar	 ACTG2	41,7	5.31
40	E3	alpha-actin	 ACTA2	42,0	5.23
		actin, alpha, cardiac muscle, isoform CRA_c	 ACTC1	30,2	4.88
42	E19	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle, isoform CRA_d	 MYH11	145,7	5.84
43	E22	alpha-enolase isoform 1	 ENO1	47,1	7.01
44	D18	myosin light chain 2	 MYL9	19,8	5.09
45,46	E6,E5	ferritin light subunit, partial	 FTL	16,3	5.65
47	D23	Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured	 TTR	13,7	5.35
48	E15	unnamed protein product - Cu/Zn superoxide dismutase	 SOD1	15,9	5.70
49,50	E11, E12	smooth muscle protein	 TAGL	22,4	8.56
51	E8	manganese superoxide dismutase (MnSOD)	 SOD2	24,7	8.35
52	E9	unnamed protein product - Iron/manganese superoxide dismutases	 SOD2	24,7	8.66
53	E4	Chain A, U7ub7 Disulfide Variant	 UBC	8	8.69

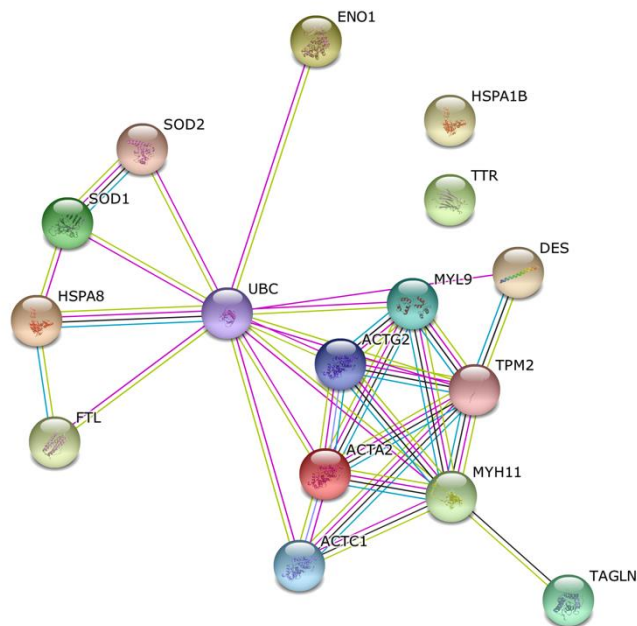
Na slikama 45. i 46. nalaze se razlikovni prikazi interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva i uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G12. Na slici 47. nalazi se prikaz interaktoma uzorka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G12.





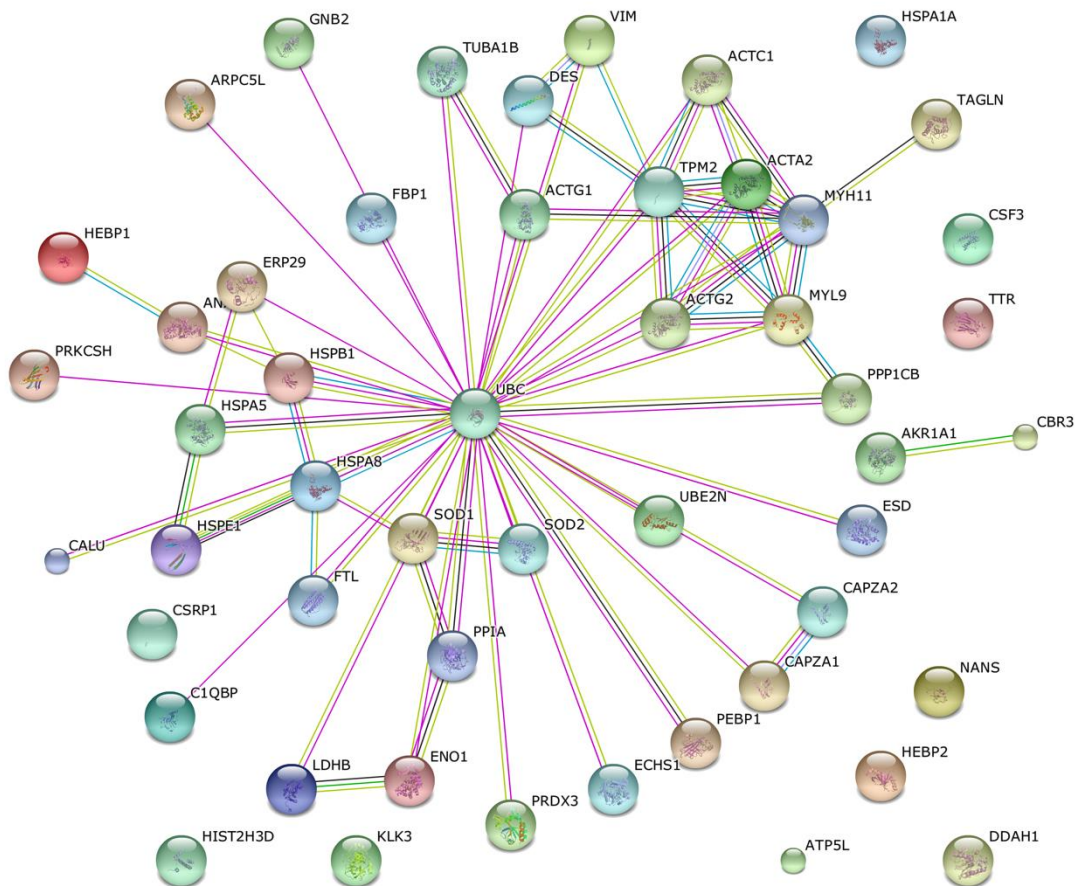
**Slika 45. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka tumorskog tkiva ispitanika alfa G12. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 28. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 46. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzorka zdravog tkiva ispitanika alfa G12. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 29. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBIInr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u priložima.



**Slika 47. Razlikovni prikaz interaktoma proteoma uzoraka tumorskog i zdravog tkiva ispitanika alfa G12. Proteini su označeni imenima iz STRING baze koja se nalaze u tablici 28. i 29. te su povezani s GI pristupnim brojem baze podataka NCBI nr.**

Imena i funkcije svakog proteina su opisani u prilogima.

## 6.RASPRAVA

Rak prostate drugo je najčešće maligno oboljenje u muškaraca starijih od pedesete godine života. Zbog činjenice da je u 2012. godini tumor prostate dijagnosticiran u više od milijun muškaraca u svijetu, proglašen je jednim od javnozdravstvenih problema 21. stoljeća (17).

Još se uvijek ne može razlikovati je li tumor prostate u nekog bolesnika indolentan ili agresivan. Upravo ta nemogućnost procjene stupnja agresivnosti sve do točke evidentne metastatske bolesti (koja je potvrda iste) uzrokuje pretretiranost velikog broja bolesnika. Taj fenomen proteže se kroz sve faze bolesti, tj. od postavljanja dijagnoze, preko odabira vrste liječenja, samog liječenja i do njegovog praćenja. Paralelno, još uvijek ne postoji učinkovito liječenje metastatskih oblika bolesti.

Međudjelovanje epitelnih i stromalnih stanica karakteristično je za prostatu te je temelj njene organogeneze. Sama aktivnost posredovana je androgenim hormonima. Oba procesa također imaju važnu ulogu u razvoju i progresiji karcinoma prostate, a androgeni i u samom liječenju.

Razlikovanje indolentne od agresivne bolesti dodatno je otežano korištenjem PSA kao tumorskog biomarkera. PSA, je enzim "specifičan za tkivo prostate" koji se zbog nepostojanja adekvatnog tumorskog biomarkera koristi u otkrivanju bolesnika s karcinomom prostate, njihovoj stratifikaciji u rizične skupine te u praćenju.

Iako je njegova primjena dovela do revolucije u probiru, desetljeća provođenja istog pokazala su da primjena PSA u 15% muškaraca daje lažno pozitivne rezultate.

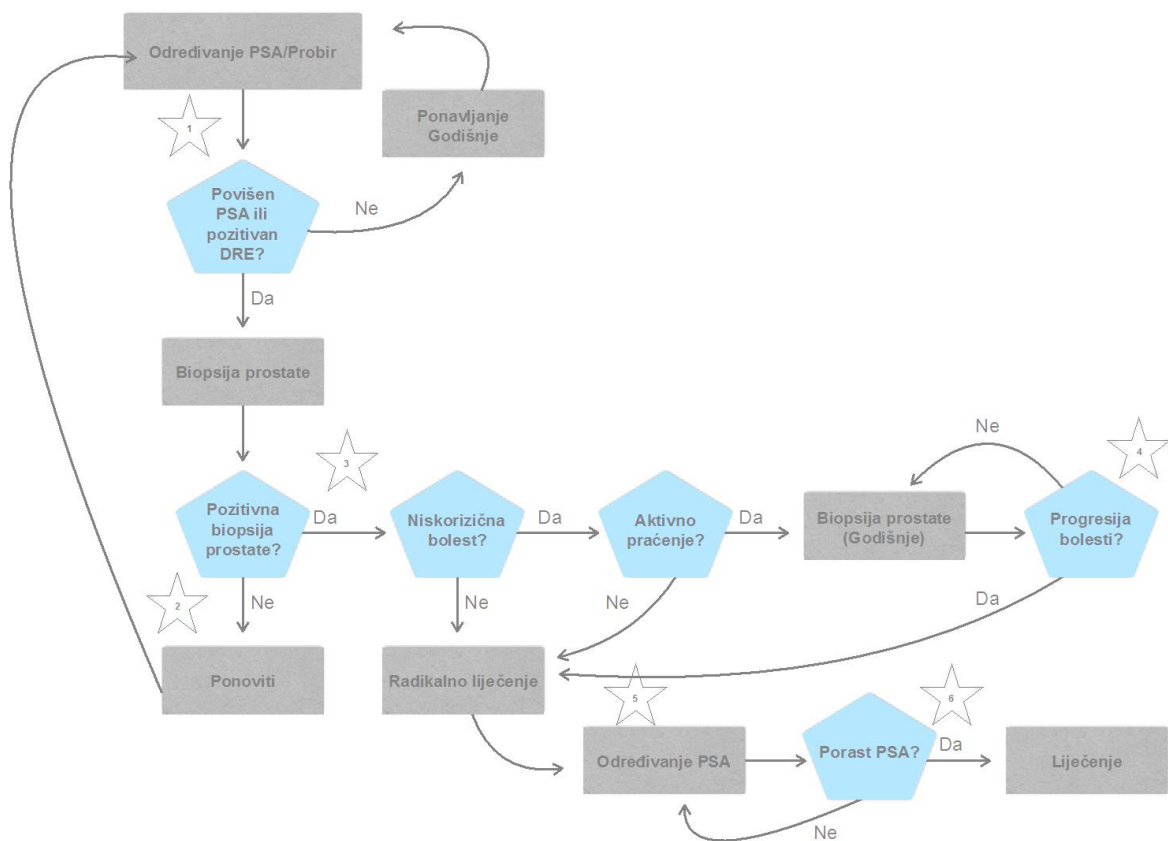
Kod lokalno ograničenih karcinoma prostate, prije odabira optimalnog terapijskog postupka, nužna je procjena rizika povrata bolesti za svakog bolesnika. Pritom je predviđanje ishoda od presudne važnosti za donošenje odluke o početnom terapijskom postupku i njegovoj nadopuni dodatnim oblicima liječenja. Iz proučavanja

ponašanja tumora prostate razvio se čitav niz nomograma i prognostičkih skupina s uporabnom svrhom procjene rizika povrata bolesti. U svakom od tih pomoćnih alata nalazi se vrijednost PSA iz jedne ili više ishodišnih točaka bolesti te se ovdje, za razliku od probira, koristi kao stratifikacijski i prognostički biomarker. I u ovoj ulozi, jednako kao u probiru, PSA se pokazao nedostatnim. Posljedica toga je postojanje širokog spektra bolesnika u pojedinoj prognostičkoj skupini. Usprkos cijelom nizu nastojanja, detaljnija raščlamba, podjela skupina i izrada preciznijih nomograma zasad nije moguća. Smatra se da će tek uvođenje novih radioloških metoda ili molekularnih biomarkera u početni skup varijabli poboljšati preciznost ovih alata.

Zaključno, usprkos velikoj dobiti nakon uvođenja PSA kao biomarkera karcinoma prostate, on zbog svoje specifičnosti za zdravo tkivo prostate nije u potpunosti adekvatan dijagnostičko-probirni, prognostički i stratifikacijski biomarker ove zloćudne bolesti.

Kod klasifikacije tumora prostate potrebni su nam novi biomarkeri, koji bi u svakodnevnom radu omogućili sljedeće (Slika 48.):

1. rano otkrivanje tumora prostate, s većom specifičnošću od PSA, s ciljem smanjenja broja biopsija i bržom rebiopsijom (ponovnom biopsijom) u bolesnika s negativnim rezultatom početne biopsije;
2. pomoć u otkrivanju bolesnika s tumorom prostate koji zahtijevaju promptni početak liječenja;
3. bolje praćenje progresije bolesti u bolesnika za koje se zna da imaju karcinom prostate;
4. precizniju procjenu rizika i rano otkrivanje bolesnika s povratom bolesti nakon liječenja;
5. bolju procjenu učinkovitosti dodatnih oblika liječenja (92).



**Slika 48. Shematski prikaz dijagrama toka dijagnostičkih metoda i postupaka liječenja, koje danas primjenjujemo kod bolesnika s karcinomom prostate. Dijelovi dijagrama toka označeni zvjezdicama predstavljaju ključna mjesta kod kojih bi se primjenom novih molekularnih biomarkera postigao kvalitetniji probir i kasnije predviđanje razvoja bolesti. (Preuzeto i prilagođeno iz Gurel i sur.) (92).**

Proteomske analize dovele su do otkrića cijelog niza mogućih dijagnostičkih biomarkera što dovodi do njihovih sve učestalijeg korištenja u rutinskom kliničkom liječenju. U svrhu povezivanja uzroka s tijekom i liječenjem bolesti, koje bi mogle ukazivati na patološke promjene, primijenjen je proteomski pristup identifikacije i kvantifikacije proteina uz pomoć dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE) u sprezi s spektrometrijom masa.

Korištena je originalna metoda analiza i identifikacije proteoma, tkiva prostate i tumora prostate, koja je doprinijela iznalaženjem kvalitetnije i bogatije mreže

biomarkera (55). Primijenjene nove tehnike u izolaciji proteina omogućile su optimalniju iskorištenost dobivenog materijala i pojednostavile sam proces izolacije i kvantifikacije proteina te proces snimanja spektrometrijom masa.

Prema dosadašnjim literaturnim izvorima najveći dio proteina eksprimiranih u zdravom tkivu prostate naših ispitanika, navedenih u dijelu 5., navedeni literaturni izvori povezuju s karcinomom prostate (73-84) dok se rezultati djelomično razlikuju u nalaženju tumorskih proteina u zdravom tkivu. Naši rezultati mogu se objasniti na način da analizirana tkiva nisu u potpunosti homogena i da se jedino potpunim odvajanjem tumorskih i zdravih stanica može dobiti relevantan razlikovni prikaz, iako je takav postupak moguć samo u teoriji. Također, moguće je da su navedene stanice „zdravog“ tkiva ušle u proces maligne transformacije. Razlog tome je činjenica da se radi o tkivu prostate u kojoj je već prisutan tumor i moguće je da su stanice tzv. "zdravog" tkiva već zadobile mutacije koje vode prema procesu karcinogeneze. U blizini pojedinih zdravih uzoraka u preostalom susjednom tkivu prostate, koje je u cijelosti preuzeto i patohistološki analizirano, nađena su područja prostatične intraepitelne neoplazije (PIN-a). Danas se smatra da je ova promjena prekursor karcinoma prostate te se ne može isključiti niti njezin utjecaj.

Slični rezultati uočeni su i za dio proteina eksprimiranih u malignom tkivu, koji se pripisuju zdravom tkivu. Smatramo da ti proteini služe kao tumorsupresori i da im je svrha zaštita stanice od gore navedenih procesa. Protein p53 je tumorsupresor i ima često povećanu ekspresiju upravo u tumorima (93). Pritom se ne smije isključiti činjenica da su neki od izoliranih proteina onkoproteini. Prema definiciji to su proteini koji su kodirani viralnim onkogenom. Pritom, onkogen može biti svaki gen koji pridonosi preobražaju normalne stanice u tumorsku stanicu u trenutku kada mutira ili je visoko eksprimiran. Nakon što se integrira u genom eukariotske stanice, on sudjeluje u regulaciji ili sintezi proteina koji imaju ulogu u tumorogenom staničnom rastu. U istraživanje je uključeno 12 ispitanika s parnim uzorcima tumorskog i zdravog tkiva i tumorima prostate Gleason zbroja 6(3+3) ili 7(3+4 ili 4+3).

Presjekom diferenciranih proteina načinjena su četiri podskupa (navedena u priložima):

1.) Proteini prisutni pojedinačno u uzorcima zdravog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika (Tablica 30.);

- 2.) proteini prisutni pojedinačno u uzorcima tumorskog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika (Tablica 31.);
- 3.) proteini prisutni u više uzoraka zdravog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika (Tablica 32.);
- 4.) proteini prisutni u više uzoraka tumorskog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika (Tablica 33.).

Dodatno su istražene protein-protein inetrakcije identificiranih proteina uz korištenje programskog alata STRING te je istražena povezanost proteina, koji su pronađeni kao razlikovno eksprimirani, između uzoraka tkiva karcinoma prostate i zdravog tkiva kod istog ispitanika (55). Za svakog ispitanika kreirana su tri interaktoma te je dobiveno 36 razlikovnih prikaza:

- 1.) proteom tumorskog uzorka od ispitanika alfa G1 do alfa G12 (interakcije proteina koji su nadproducirani u tumorskom tkivu);
- 2.) proteom zdravog uzorka od ispitanika alfa G1 do alfa G12 (interakcije proteina koji su nadproducirani u zdravom tkivu ,tj. podproducirani u tumorskom tkivu);
- 3.) kombinacija proteoma tumorskog i zdravog uzorka od ispitanika alfa G1 do alfa G12.

### **6.1. Klasifikacija proteina identificiranih razlikovnim prikazom tumorskog i zdravog tkiva**

Analizom interaktoma ispitanika alfaG1 izdvajaju se tri skupine potencijalnih biomarkera: u prvoj skupini nalaze se proteini prisutni kod više uzoraka, u drugoj se pripadnici signalnih puteva aktiviranih kod karcinoma prostate dok je treća skupina povezana s citoskeletom te modulira motilitet tumorskih stanica. Neki od proteina članovi su svih skupina.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G1 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 12.): vinkulin (VLC), HLA klase II antigen tkivne histokompatibilnosti (HLA DRB1), mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor 1 (MACF1), glioksilaza 1 (GLO1), miozin 8 (MYH8), smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168 (CCDC168), TPM4-ALK fuzijski onkoprotein tip 2 (TPM4).



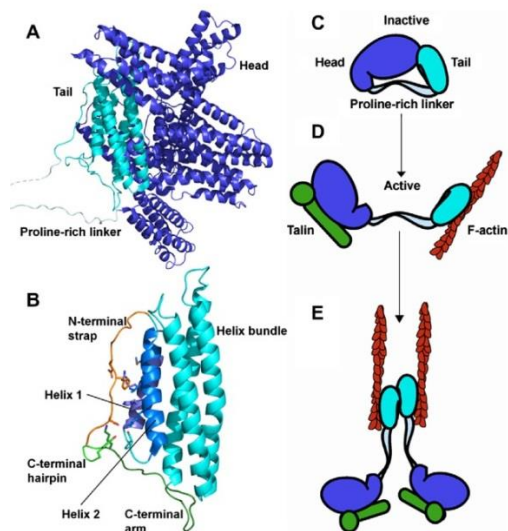
Iz interaktoma vidljiva je aktivnost tri signalna puta važna za patogenezu karcinoma prostate. To su PI3K/AKT, MAPK i Wnt signalni put (Slika 12.-14.). Nadeskpresija vinkulina i TPM4-ALK fuzijskog onkoproteina tip 2, može biti vezana uz aktivnost PI3K/AKT signalnog puta koji kontrolira rast, migraciju, diferencijaciju, preživljenje stanica i radiorezistenciju (Slika 12.,14.). VLC i TPM4 geni su partneri anaplastične limfom kinaze (ALK) te daju fuzijske onkoproteine. Ustanovljeno je da TPM4-ALK onkoprotein sudjeluje u razvoju upalnih miofibroblastičnih tumora (95, 96). ALK je receptor tirozin kinaze koja najčešće aktivira STAT3, PI3K/AKT i MAPK put. PI3K/AKT put aktivira ALK fosforilacijom fosfatidilinozitol 3 kinaze (PI3K). Aktivna PI3K potom generira fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3) na površinu membrane. PIP3 regrutira AKT koja je "glavna" kinaza koja potiče cijeli niz nizvodnih reakcija. Negativni regulator ovog puta je PTEN fosfataza, tumorsupresor koji zauzima značajno mjesto u karcinogenezi prostate.

Nadeskpresija vinkulina nađena je kod ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 (Tablica 32., Slika 12.-17., 27.-32.). Direktna suodnos vinkulina i TPM4-ALK fuzijskog onkoproteina tip 2 nađen je kod ispitanika alfa G1 i alfa G2 (Slika 12.-17.).

Vinkulin je adaptorni protein fokalnih adhezija (engl. *Focal adhesions*) i adherentnih veza (engl. *Adherent junctions*), čije pravilno stvaranje i postojanje je neophodno za motilitet stanica (97). Fokalne adhezije su visokoorganizirani agregat molekula koji se sastoji od nakupljenih adhezijskih receptora integrina koji povezuju unutrašnjost stanice s izvanstaničnim matriksom ili s drugom stanicom te prenose signale iz okoliša (98,99,100,101,102). Unutar fokalnih adhezija nalazi se brojni enzimi i adaptorni proteini, a jedan od njih je i vinkulin (103). Postoji određeni raspored vezanja komponenti fokalnih adhezija nakon vezanja integrina na ligande, a prvi proteini koji se vežu su FAK, talin i paksilin koji potom uzrokuju vezanje i fosforilaciju članova obitelji *Src*. S druge strane vezanje talina pospješuje organizaciju citoskeleta jer se umrežava s vinkulinom i aktinskim citoskeletom.

Nadprodukcija vinkulina i dominantno mjesto u interaktomima ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 znak je njegove prisutnosti u aktivnom obliku kojim kontrolira motilitet stanice (Slika 12.-17., 27., 32., 49.) (104). Aktivira se istovremenim vezanjem talina (liganda koji se veže na glavu) i F-aktina (liganda koji se veže na

rep). Vezanje samo jednog liganda nije dovoljno za potpunu aktivaciju (Slika 49.) (105).



**Slika 49. Struktura aktiviranog vinkulina (A). Diagram kristalne strukture pune dužine vinkulina (B). Inaktivna konformacija vinkulina održava se ineterakcijama između glave i repa (C). Za prelazak vinkulina iz "negativno" u "aktivno" stanje potrebna je istovremena aktivacija talina i F-aktina (D). Aktivni vinkulin veže cijeli niz proteina i ponaša se kao njihov nosač (E). (Preuzeto i prilagođeno iz Thompson i sur.) (104).**

Vinkulin je također i mehanoreceptor koji nakon djelovanja sile na normalne i tumorske stanice sudjeluje u stvaranju unutrašnje sile koja nastaje generiranjem kontraktilnih snaga stanice preko veze RhoA GTPaze-miozina II i filamenata aktina (106,107,108,109). Ulazi u interakciju selektivno i nekovalentno s monomernim ili multimernim formama aktina, aktinskim filamentima, alfa i beta podjedinicama katenina, kadherinom i distroglikanom (109). Oblaže vrhove filamenata aktina i služi kao sidrište te na taj način potiče njihovu polimerizaciju (102,110,111).

Kod ispitanika alfa G1 i alfa G2 te alfa G6 i alfa G7 vidi se veza vinkulina i aktinskog citoskeleta također i iz direktne interakcije s jednom ili više izoformi tropomiozina (Slika 12.-17., 27-32.). Oba proteina spadaju u obitelj sastavnih dijelova aktinskih filamenata. Tropomiozin alfa1 dolazi u četiri izoforme (112). Izoforma 1 je nadeksprimirana u proteomima tumorskih uzoraka ispitanika alfa G1 i alfa G2 (Slika

12., 15., 30.). Izoforma 1 i 2 nadeksprimirane su u proteomima zdravih uzoraka ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 (Slika 12., 16., 28., 31.). Uočeno je da postoji promjena u ekspresiji tropomiozina kod stanica koje se maligno transformiraju, tj. da se u takvim stanicama značajno smanjuje sinteza visoko-Mr izoforma miozina (TPM1, TPM2 i TPM3) što je u skladu s dobivenom nadprodukcijom izoformi TPM1 i TPM2 u proteomu zdravog tkiva navedenih ispitanika (Slika 12.-17., 27.-32.) (113,114).

Vinkulin je u vezi s miozinom 8 (MYH8) te preko njega s ostalim nadeksprimiranim članovima obitelji (MYH1, MYH7), preko tropomiozina uključujući TPM4-ALK fuzijski onkoprotein tip 2 u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G1 te preko albumina u proteomu tumorskog uzorka alfa G7 (Slika 12., 30.) Još bogatija veza vidljiva u proteomima zdravih uzoraka ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 (Slika 13., 16., 28., 31.). Miozin spada u obitelj sastavnih dijelova aktinskih filamenata. Prisutnost tri različite obitelji proteina važnih za citoskelet upućuje na već poznatu činjenicu o njegovom značaju u održavanju motiliteta tumorskih stanica.

Kod ispitanika alfa G1 održana ekspresija miozina u sprezi s nadekspresijom adhezijskih molekula također bi mogla ukazivati na neagresivnu i stabilnu bolest. Naime, smatra se da adhezijske molekule sudjeluju u karcinogenezi prostate i preko dediferencijacije glatkih mišićnih stanica koje se za vrijeme rasta i progresije karcinoma prostate značajno mijenjaju i gube ekspresiju miozina (115,116) (Slika 12.-14.). Kod ispitanika alfa G2 i alfa G7 prisutna je obrnuta situacija, što bi moglo upućivati na agresivnu bolest (Slika 12.-14., 30.-32.).

Unutar mreže interaktoma proteoma tumorskog uzorka ispitanika alfa G1 i ispitanika alfa G7 nalazi se i plazminogen (PLG) (Slika 12., 30.). Sastavni je dio urokinaznog tipa plazminogen aktivator sustava koji je aktivan u sustavu komplementa. Njegovi članovi sudjeluju u proliferaciji, angiogenezi i motilitetu tumorskih stanica te su nađeni u serumu bolesnika s agresivnijim oblicima karcinoma prostate (117).

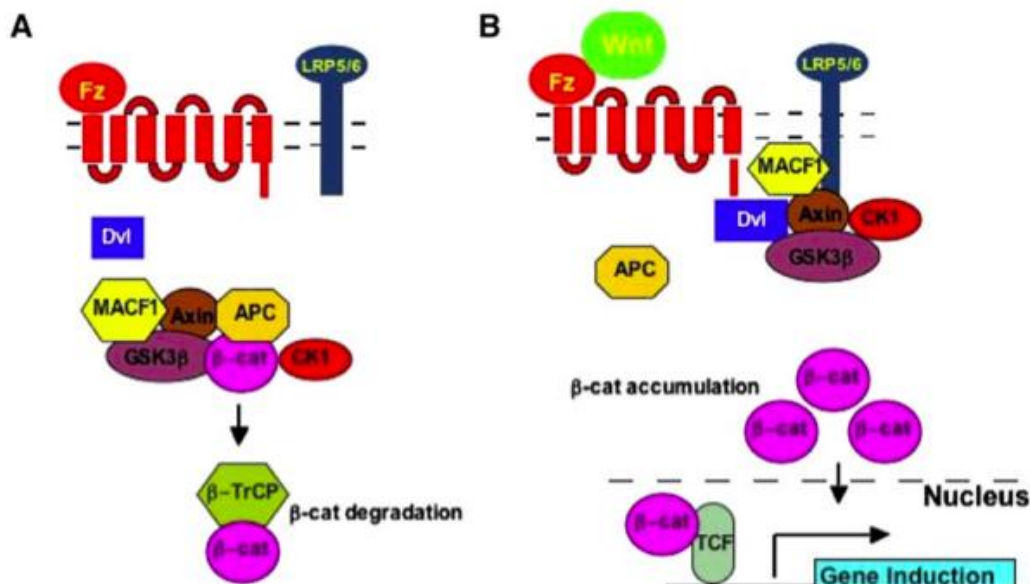
Izvan mreže interaktoma ispitanika alfa G1, iz podskupa nadeksprimiranih proteina kod više ispitanika nađeni su: mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor 1 (MACF1), gliksilaza 1 (GLO1) i smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168 (CCDC168) (Tablica 33).

Protein CCDC 168 također je nadeksprimiran kod ispitanika alfa G2, alfa G6 i alfa G7 te se nalazi izvan mreža interaktoma proteoma tumorskog uzorka (Tablica 33., Slika 15., 27., 30). Funkcija mu je još uvijek nepoznata. Glioksilaza 1 (GLO1) nadeksprimirana je kod ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6, alfa G7 i alfa G10 te se također nalazi izvan mreža interaktoma (Tablica 33., Slika 12.-14., 15.-17., 27.-29., 30.-32., 39.-41.). Enzim je izomeraza čija je primarna biološka funkcija detoksifikacija te je uključena u glioksalatni ciklus. Ona sprečava stanično oštećenje uzrokovano snažnim citotoksičnim metabolitima kao što su metilgliksal i drugi aldehidi, vežući ih na L-glutation (118). Osim detoksifikacije GLO1 je uključena i u proces staničnog rasta, a nadeksprimirana je u androgen-senzitivnim LNCap linijama karcinoma prostate (119,120). Praćenje ispitanika alfa G1, alfa G6 i alfa G10 ukazuje da nakon provedenog dodatnog liječenja ili samo praćenja oni imaju stabilnu i mirnu bolest. Nadprodukcija GLO1 mogla bi ukazivati da je njihova bolest androgen senzitivna te da bi u slučaju kasnijeg porasta vrijednosti PSA, ADT bila uspješan oblik liječenja ovih ispitanika (Tablica 5., Slika 12., 14., 27., 29., 39., 41.). Ispitanici alfa G2 i alfa G7 bili su zbog nepovoljnih patohistoloških karakteristika odmah dalje liječeni (Tablica 5.). Liječenje je uključivalo ADT te nije bilo obilježeno nastankom androgene rezistencije.

Izvan mreže interaktoma proteoma tumorskog uzorka ispitanika alfa G1 nalazi se i protein mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor 1 (MACF1) koji sudjeluje u polarizaciji stanica, tj. u njihovoj migraciji te je sastavni dio Wnt signalnog puta (Slika 12.,14.). Nadeksprimiran je i kod ispitanika alfa G3, alfa G5 i alfa G7 te se također nalazi izvan mreža interaktoma (Tablica 32., Slika 18., 20., 24., 27., 30., 32.).

MACF1 ulazi u interakciju s mrežom aktina i mikrotubula na način da istovremeno veže aktin i "plus" kraj mikrotubula (121,122). Značaj dualne funkcije MACF1 leži u činjenici da mikrotubuli sudjeluju u usmjerenom migraciji stanica, aktivnoj za vrijeme razvoja tkiva, kemotakse i cijeljenja rana. Stanice koje migriraju imaju polariziranu morfologiju s asimetričnom distribucijom signalnih molekula i citoskeleta, ovisno o smjeru kretanja. Mikrotubuli u ovom procesu sudjeluju u odvajanju stanica od njihove podloge, okretanju fokalnih adhezija prema smjeru kretanja, održavanju stanica i postizanju njihove orijentacije (123). U odsutnosti MACF1 nastaju nestabilni mikrotubuli, što uzrokuje nepolariziranost stanica i odsustvo njihove migracije (123).

Wnt signalni put ulazi u interakciju s signalnom kaskadom AR te je jedan od najznačajnijih puteva uključenih u razvoj kastracijski rezistentnog karcinoma prostate (124,125). MACF1 ima ulogu pozitivnog regulatora jer sudjeluje u translokaciji AXIN1 i njegovog pridruženog kompleksa (APC/CTNNB1/ GSK 3 $\beta$ ) iz citoplazme na staničnu membranu (Slika 50.) (126).



**Slika 50. Shematski prikaz kanoničke Wnt signalne kaskade koja uključuje MACF1 protein. (Preuzeto i prilagođeno iz Chen i sur.) (126).**

Smatramo da je nadeksprimiranost MACF1 posljedica povećanog motiliteta i migracije tumorskih stanica, dok aktivnost Wnt puta može biti podloga kasnijeg razvitka kastracijske rezistentne bolesti.

Plektin (PLEC) i kifoskoliozis peptidaza (KY) proteini su vezani uz citoskelet koji su smješteni izvan mreže interaktoma proteoma tumorskog uzorka ispitanika alfa G1 (Slika 12., 14.). Izvan mreže nalazi se i 14-3-3 protein teta (YWHAQ), član obitelji 14-3-3 proteina, čija se uloga u progresiji tumora tek otkriva. Ova obitelj potiče interakcije stanica i izvanstaničnog matriksa kod karcinoma prostate te utječe na motilitet stanica i transendotelnu migraciju *in vivo*. YWHAQ je sastavni dio MAPK puta koji je zajedno s PI3K/AKT signalnim putem dio PTEN karcinogeneze prostate (Slika 12., 14.). Neumrežen u gore navedeni interaktom je i vezikula-vezani

membranski protein 5 (VAMP5) koji daje još jednu potvrdu da se radi o karcinomu prostate jer sudjeluje u GLUT prometu (Slika 12., 14.).

Unutar proteoma ispitanika alfa G1 postoji još jedna poveznica s onkoproteinima, a to je nadekspresija jezgrinog mitotičkog aparata proteina 1 (NUMA1), supstrata aurora A kinaze. Enzim ima karakteristike onkogeno *in vivo*, a njena povećana ekspresija povezana je s višim stupnjevima tumora prostate (Slika 12., 14.).

U mrežama interaktoma zdravih uzoraka ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 postoji suodnos aneksina A1 (ANXA) i plazminogena. U pojedinim slučajevima suodnos je ostvaren preko komponente komplementa C3 (Slika 13., 16., 28., 31.). Potom se u interaktomima oba proteoma uspostavlja veza plazminogena i vinkulina preko albumina (Slika 14., 17., 29., 32.). Smatramo da kod ove skupine ispitanika ANXA ima ulogu tumorsupresora jer je podekspresiran u tumorskom tkivu. Poznato je da ANXA smanjuje vijabilnost stanica i ima proapoptotički učinak. Uzrokuje aktivaciju p38 i *c-Jun* N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinases* - JNK) i pomiče balans provođenja signala od proliferacije prema apoptozi (127). Kod ove grupe ispitanika posredno je u vezi s vinkulinom i mrežom citoskeletnih proteina te smatramo da je negativni regulator njihove dinamike (Slika 14., 17., 29., 32.). Kod invazivnih oblika karcinoma prostate nadekspresiran je, što uzrokuje gubitak adhezijskih molekula za vrijeme epitelno/mezenhimalne tranzicije i potiče metastaziranje (128). Nadekspresiran je u proteomu tumorskog tkiva ispitanika alfa G11 i alfa G12 gdje ima ulogu tumorsupresora (Slika 42., 44., 45., 47.).

Smatramo da kod ispitanika alfa G1 i alfa G7 ulogu tumorsupresora ima centromere protein F (CENPF) (Slika 13., 14., 31., 32.). CENPF spada u ključne regulatore (engl. "*Master regulators*") karcinoma prostate (129,130). To su produkti gena koji imaju veliki broj ciljeva i različito su eksprimirani u uzorcima tumorskog tkiva. CENPF je meta FOXM1 (engl. *Forkhead box M1*) proteina koji je i sam glavni regulator karcinoma prostate. Oba proteina imaju zajedničke ciljeve i sinergijski pokreću agresivni karcinom prostate (130). Kod ispitanika alfa G2 i alfa G6 nadekspresiran je u proteomima tumorskih uzoraka (Tablica 33.). Za konačnu procjenu nedostaje nam ekspresija FOXM1 i mjesto kolokalizacije oba proteina. Naime, uočeno je da povećana ekspresija oba proteina ili njihova jezgrina kolokalizacija vezan s lošijom prognozom bolesnika s karcinomom prostate (130).

Nekonvencionalni miozin-XVIIIIB (MYO18B) nadeksprimiran je u tumorskom tkivu ispitanika alfa G2, alfa G5 i G6 (Tablica 33., Slika 15., 24., 27.), te u zdravom tkivu ispitanika alfa G1, alfa G2, alfa G6 i alfa G7 (Tablica 32., Slika 13., 16., 28., 31.). MYO18B ima ulogu tumorsupresora, kontrolira rast i progresiju tumora, a njegova obnovljena ekspresija može suprimirati neovisan rast pojedinih tumora.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G2 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 15.): vinkulin (VLC), glioksilaza 1 (GLO1), smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168 (CCDC168), TPM4-ALK fuzijski onkoprotein tip 2 (TPM4), centromere protein F (CENPF), nekonvencionalni miozin-XVIIIIB (MYO18B) i tropomiozin alfa 1 (TPM1). Svi proteini iz interaktoma zastupljeni su kod više od jednog tumorskog uzorka.

U samoj mreži interaktoma nalaze se VLC, TPM4 i TPM1 (Slika 15.). Smatramo da je nadekspresija prva dva proteina povezana s aktivnošću PI3K/AKT puta. Geni oba proteina nakon fuzije s ALK genom daju onkoproteine koji sudjeluju u patogenezi tumora. Vinkulin je preko TPM1 u vezi s tropomiozinima, još jednom obitelji aktinskih elemenata. Mreža u interaktomu također upućuje na aktivnost citoskeleta i postojanje povećanog motiliteta tumorskih stanica ispitanika alfa G2. U prilog agresivnijem obliku karcinoma prostate govori i prisutnost GLO1 i CENF proteina. Oba proteina, imaju ulogu u poticanju proliferacije tumorskih stanica karcinoma prostate te se njihova povećana ekspresija javlja kod agresivnijih oblika. CENF je pritom glavni regulator karcinogeneze. Uloga CCDC168 proteina je nepoznata, a MYO18B je jedini tumorsupresor prisutan u interaktomu koji nadeksprimiran suprimira neovisan rast tumora.

U interaktomu zdravog uzorka alfa G2 centralno mjesto zauzima vinkulin koji je preko tropomiozina (TPM1 i TPM2) u vezi s MYH8 (Slika 16.). S druge strane preko albumina i komponente komplekta C3 postoji veza s ANXA1 koji ima ulogu tumorsupresora. Od ostalih proteina izvdaja se NUMA1 koja je supstrat aurora A kinaze, enzima s karakteristikama onkogeni koji je nadeksprimiran kod zloćudnijih oblika karcinoma prostate. S obzirom na podeksprimiranost u tumorskom uzorku ispitanika alfa G2 smatramo da u ovom slučaju ima ulogu tumorsupresora. Također, među onkoproteine spada i supresije tumorogenosti 5 protein (STP5) koji aktivira Rab proteine i sudjeluje u organizaciji citoskeleta i tumorogenosti.

S obzirom na proteine u mreži i postojanje većeg podskupa proteina vezanih za agresivniju formu karcinoma prostate, mišljenja smo da ispitanik alfa G2 ima agresivniji oblik karcinoma prostate, što je u korelaciji brzim porastom PSA nakon operativnog zahvata i progresijom bolesti neposredno nakon završetka dodatnog liječenja (*salvage* RT+ADT) (Tablica 5., Slika 15., 17.).

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G3 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 18.): centrosomalni protein od 290 kDa (CEP290), MACF1, MYH8. Svi proteini nalaze se izvan mreže.

CEP290 i MACF1 su proteini čija je nadekspresija povezana s aktivnošću Wnt signalnog puta koji je kod hormonski "naivnog" karcinoma prostate aktivan u bazalnim progenitorskim stanicama prostate te je odvojen od AR signalizacije. Međudjelovanje ove dvije signalizacije karakteristično je za kastracijski rezistentni karcinom prostate. Uloga CEP290 kod karcinoma prostate je nepoznata. Međutim, poznato je da cilije posreduju u pojačanoj aktivnosti Wnt puta jer se njihova disfunkcionalnost povezuje s porastom invazivnosti karcinoma prostate (131). CEP290 je nadeksprimiran i u proteomu tumorskog ispitanika alfa G7 (Slika 30.). Distonin (DST) je još jedan od citoskeletnih proteina koji veže intermedijarne filamente, aktin i mikrotubule. S obzirom da su MACF1, CEP290, DST, MYH8 nadeksprimirani u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G3, smatramo to posljedicom povećanog motiliteta i migracije tumorskih stanica više nego trenutne aktivnosti Wnt puta kao kod kastracijski rezistentne bolesti. Duže praćenje rasvijetlilo bi da li je povećana ekspresija ovih proteina u početnom stadiju ukazivala na kasniji razvoj kastracijski rezistentne bolesti. NUMA1 je u ovom slučaju nadeksprimirana u proteomu tumorskog uzorka te ima ulogu tumorpromotora. Transgelin (TAGLN) ima ulogu tumorsupresora te s obzirom da je nadeksprimiran upućuje da naš ispitanik ima rani stadij bolesti. On je također aktivan kod kastracijski rezistentnog karcinoma prostate jer sprečava vezanje koaktivatora na AR i njegovu translokaciju u jezgru.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G3 u interaktomu su proteini aktivni u motilitetu spermatozoa, mitozu i transkripciji (Slika 19.). U spermatogenezi sudjeluju apolipoprotein A-1 (APOA1) i semenogelin 1 (SEMG1) te su jedini povezani unutar interaktoma (Slika 19.). SEMG1 oblikuje matriks gela u kojem se nalaze spermatozoe, a skupa s APOA1, kao dijelom SPAX kompleksa,



potiče motilitet spermatozoa i progresivno kretanje sperme. Pri tome APOA1 sudjeluje u metabolizmu kolesterola. Od članova miozinske obitelji nalazi se miozin 1 (MYH1) koji u zajedničkom interaktomu ulazi u mrežu s MYH8 (Slika 19., 20.). Proteini koji sudjeluju u transkripciji su cink prsten protein 141 (ZNF141) i La vezani protein 7 (LARP7) kao njezini negativni regulatori, koji je kočice.

Antigen Ki 67 (MKI67) neophodan je za održavanje proliferacije, a kod ispitanika alfa G3 je podeksprimiran u tumorskom tkivu. Viša ekspresija MKI67 obično je udružena s uznapredovalim i agresivnijim oblicima bolesti. U mitozu je aktivan centrosomalni protein od 135 kDa (CEP135), koji je protein nosač CEP250, a oba proteina sudjeluju u koheziji centriola za vrijeme interfaze. Dio kontrolne točke mitotičkog vrtena je i nukloprotein TPR (TPR). Kod ispitanika alfa G3 ima ulogu tumorsupresora jer je podeksprimiran u tumorskom tkivu. Značajan je jer njegova terminalna domena aktivira onkogene kinaze *met* i *raf*. Aneksin A2 (ANXA2) je još jedan tumorsupresor koji je glavni transporter u svojoj obitelji proteina. Sudjeluje u odgovoru na toplinski stres i metabolizmu kolesterola jednako kao APOA1. Supstrat je za onkokinazu *v-Src* te na taj način regulira dinamiku aktina pri čemu dolazi do reorganizacije aktinskog citoskeleta i razdvajanja fokalnih adhezija.

U zajedničkom interaktomu osim već opisanih interakcija u mrežu ulaze još proteini CEP290 i CEP135 (Slika 20.). Kod ispitanika alfa G3 provedena je *salvage* radioterapija zbog brzog porasta i visoke vrijednosti PSA nakon radikalne prostatektomije i prisutnih ostalih negativnih patohistoloških karakteristika kao što su pozitivan rub, Gleason zbroj 7(3+4). Međutim, snažna aktivnost tumorsupresora i onkoproteina u zdravom uzorku otvara pitanje smjera u kojem će ići bolest, bez obzira što interaktom tumorskog tkiva ne upućuje na agresivniju bolest.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G4 nema članova podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 21.). Unutar mreže nalaze se dva člana obitelji miozina (MYH4 i MYH6) i titin (TTN). Mreža je posljedica funkcije TTN kao velikog proteina koji ima ulogu serin/treonin protein kinaze koja sudjeluje u funkcioniranju i održavanju balansa mikrofilamenata mišićnih i glatkih stanica. U ne-mišićnim stanicama sudjeluje u mitozu. Kod karcinoma prostate također je nađena povišena ekspresija ovog proteina. Izvan mreže nalazi se MYH18B koji ima ulogu tumorsupresora te serin/arginin repetitivnog matriksa protein 2 (SRRM2) koji sudjeluje u pre-mRNA izrezivanju. Nadeksprimiran je i beta lanac

fibrinogena (FGB) koji je sastavni dio homeostaze. Različiti produkti molekula koji sudjeluju u homeostazi imaju ulogu u adheziji i migraciji stanica te su mitogeni. Nepostojanje praktički niti jednog značajnijeg predstavnika maligne alteracije prostate u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G4, osim MYH18B kao univerzalnog tumorsupresora, sugerira nam da se radi o neagresivnoj bolesti, što se vidi i iz praćenja (Tablica 5.).

U mreži interaktoma proteoma zdravog uzorka ispitanika alfa G4 nalaze se mišićni proteini (Slika 22.). To su članovi obitelji tropomiozina (TPM4), miozina (MYH8 i MYH4) te dva velika mišićna proteina TTN i nebulin (NEB) koji sudjeluju u održavanju integriteta i funkcije sarkomere. Nadalje, NEB veže se i stabilizira F-aktin. Od ostalih proteina koji se nalaze izvan mreže, a moduliraju kontrakcije glatkih mišićnih stanica te su u interakciji s aktinom i citoskeletom su: kalponin-1 (CNN1), anikrin-3 (ANK3) i miozin 7B (MYH7B).

CNN1 regulira kontrakcije glatkih mišićnih stanica vežući se na tanke niti citoskeleta. ANK3 je veza membrane s citoskeletom i potreban je za pravilno funkcioniranje skeletnih mišića. Teški lanac MYH7B posjeduje globularnu motornu domenu koja katalizira ATP hidrolizu te ulazi u interakciju s aktinom. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) enzim je glikolize i nitrolizacije koji sudjeluje u transkripciji, transportu RNA, DNA replikaciji, apoptozi i upali. Stimuliranjem vezanja CHP1 potiče udruživanje mikrotubula s membranom, organizaciju i sklapanje citoskeleta. Nadeksprimiran je u proteomu zdravog tkiva ispitanika alfa G11 (Tablica 32., Slika 43.). Protein IGFN1 ima nepoznatu funkciju, MKI67 je pokazatelj proliferacije, a SEMG1 je dio ejakulata. Nadeksprimirana su dva proteina koji sudjeluju u transkripciji. To su cink prsten protein 658 koji posreduje u represiji transkripcije vežući se na cink transkripcijski regulatorni element. Također, sudjeluje i u biogenezi ribosoma. Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M (HNRNPM) aktivan je u izrezivanju RNA te potiče seriju signalnih događaja koji vode tirozinskoj fosforilaciji proteina i indukciji citokina. TAGLN i MYH18B imaju ulogu tumorsupresora. U zajedničkom interaktomu postoji još i veza HNRNPM i SRRM2 (Slika 23.).

Nekoliko elemenata upućuje da bolesnik alfa G4 ima neagresivni oblik bolesti što se vidi u Gleason zbroju i pokazuje daljnje kroz praćenje: podeksprimiranost elemenata citoskeleta u proteomu tumorskog uzorka, podeksprimiranost članova

obitelji proteina mišića koji su u međudjelovanju s istim, podeksprimiranost proteina koji sudjeluju u transkripciji i prisutnost proteina koji imaju ulogu tumorsupresora.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G5 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 24.): MYH18B i MACF1.

Unutar jedine mreže nalaze se samo predstavnici obitelji miozina: MYH8 i miozin 11 (MYH11) (Slika 24.). LIMCH1 i IGFN1 proteini imaju nepoznatu funkciju. MYH18B ima ulogu tumorsupresora, a nadekspresija MACF1 posljedica je povećane pokretljivosti tumorskih stanica. Izvan mreže interaktoma nalazi se još jedan protein koji je vezan s pojedinim dijelovima Wnt signalnog puta - kalmodulin 1 (CALM1). On preko iona kalcija stimulira čitav niz kinaza i fosfataza, ionskih kanala te regulira ciklus centrosoma.

U interaktomu zdravog uzorka ispitanika alfa G5 nalaze se već opisani proteini MYO18B, TPM1 i MKI67. Kao novi pojavljuju se kolagen alfa-5(VI) lanac (COL6A5) koji veže stanice i cink prsten protein 266 (ZNF266) koji regulira transkripciju (Slika 25.). U zajedničkom interaktomu unutar mreže nalaze se samo članovi obitelji miozina i tropomiozina (MYH8, MYH 11 i TPM 1) (Slika 25.).

Interaktomi ispitanika alfa G5 oskudni su, s malim brojem proteina. Oni nisu u međusobnoj interakciji te zbog toga smatramo da ispitanik alfa G5 nema agresivnu bolest te da je dodatnim liječenjem, koje je uključivalo adjuvantnu radioterapiju na temelju negativnih patohistoloških karakteristika, pretretiran. Interaktomi bi bili u korelaciji s Glesonovim zbrojem koji također govori u prilog da se radi o indolentnoj bolesti (Tablica 5., Slika 23.-25.).

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G6 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 27.): GLO1, VCL, CCDC168, MYH8, MYO18B, CENF, HLA DRB1 i PLG.

Prisutne su dvije mreže koje upućuju na aktivnost PI3K/AKT signalnog puta. Jednu čini već u više navrata objašnjena veza proteina VLC i PLG preko albumina. U drugoj mreži nalaze se *heat shock* protein 90 kDa beta član 1 (HSP90B1), 78 kDa glukoza-regulirani protein (GRP78/HSPA5) i *heat shock* protein 60 kDa 1 (HSPD1). HSP90B1 je molekularni pratioc koji s GRP78, članom Hsp70 obitelji proteina, čini Hsp70-Hsp90 kompleks pratioca koji je neophodan za sklapanje i konformalnu regulaciju steroidnih receptora te mnogih drugih proteina. Oba proteina sudjeluju u

endoplazmatski retikulum povezanoj degradaciji. Pritom HSPA5 nepoznatim mehanizmom aktivira PI3K/AKT signalni put. Nadekspresija Hsp70-Hsp90 kompleksa je povezana s promijenjenom ekspresijom njegovih klijenata i posljedičnom aktivacijom AKT. Lošiji ishod bolesnika s karcinomom prostate veže se s poremećenom ekspresijom HSPA5, AR i AKT, a kemo i radiorezistencija s nadekspresijom HSP90B1. HSPD1 ima ulogu u regulaciji proteina u mitohondrijima te ga izlučuju tumorske stanice preko eksosoma koji sudjeluju u progresiji tumora i mitohondrijskoj apoptozi.

Prisutnost već gore opisanih onkoproteina, kao što je MYH18B, koji ima ulogu tumorsupresora, NUMA1 tumorpromotora, CENF glavnog regulatora karcinogeneze prostate upućuje na agresivniji oblik bolesti, što je u korelaciji s Gleasonovim zbrojem i zastupljenošću tercijarnog gradusa 5 u 10% tumorskog tkiva. Kod ispitanika je provedeno dodatno liječenje (na temelju negativnih patohistoloških obilježja) a daljnje praćenje dati će odgovor na to je li bolesnik možda ipak bio kandidat i za primjenu ADT. Od ostalih proteina izvan mreže nađeni su: eukariotski translacije inicijacijski faktor 5B (EIF5B) koji započinje translaciju, potom podjedinica 2 proteasom aktivator kompleksa (PSME2), koja je dio imunoproteasomskog kompleksa koja učinkovito procesira antigene te kloridnog intracelularnog kanala 1 protein (CLIC1) koji formira kanale kloridnih iona i sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa. Također, nadeksprimirana su dva člana Golgin podobitelji. Golgin podobitelji član 1 (GOLGB1) koji sudjeluje u nastanku ukriženih mostova Golgijeva kompleksa, a Golgin A član 4 podobitelji (GOLGA 4) preko interakcije s MACF1 ima ulogu u isporuci transportnih vezikula iz trans-Golgi mreže. Receptor retinoične kiseline RXR-beta (RXRB) regulira ekspresiju gena.

Značajniji onkoprotein je prohibitin (PHB), neophodan za aktivaciju *Raf 1*, proto-onkogen serin/treonin protein kinaze, sastavnog dijela ERK1/2 puta. Sudjeluje u adheziji stanica i njihovoj migraciji na način da ih čini visoko invazivnima. Kofaktor je AR i njegov tumorsupresor. Podedsprimiranost PHB uzrokuje rast tumorskih stanica karcinoma prostate u kastracijskim uvjetima. Smatramo da kod našeg ispitanika u ovom slučaju djeluje protektivno, upućujući na povećanu agresivnost tumora, te štiteći od pojave kastracijski rezistentne bolesti. To objašnjava zašto je kod ispitanika alfa G6 bolest stabilna samo primjenom radioterapije.

U interaktomu zdravog uzorka ispitanika alfa G6 nalazi se već opisana mreža s centralnim mjestom vinkulina koji je s jedne strane snažnim interakcijama povezan s obitelji tropomiozina (TPM1 i TPM2) i miozina (MYH8) i aktina (ACTA2) (Slika 28.). S druge strane, preko ALB i C3 ostvaruje vezu s tumorsupresorom ANXA1. Izvan mreže nalazi se već opisani onkoprotein MYO18B koji ima ulogu tumorsupresora i tumorpromotor NUMA1. Od ostalih proteina koji sudjeluju u karcinogenezi prostate, CENF je nadeksprimiran u zdravom tkivu i jedan je od glavnih regulatora karcinoma prostate dok je MKI67 čimbenik proliferacije. ZNF569 sudjeluje u regulaciji transkripcije, GOLGA4 u transportu u Golgijima, a proteini CCDC168, ENSG00000223931 i FAM184B imaju nepoznatu funkciju. Karbonska anhidraza 1 (CA1) sudjeluje u migraciji i proliferaciji stanica. Osim već spomenutih proteina koji spadaju u citoskeletne, u proteomu se nalazi još i ST5, koji sudjeluje u njegovoj organizaciji, i pericentrin (PCNT), koji uspostavlja mrežu mikrotubula za vrijeme stanične diobe. Izvan mreže smješteni su i DOC9 i DTNA.

U zajedničkom interaktomu ispitanika alfa G6 mreža se dodatno proširuje te se na jednom kraju vinkulin spaja preko aktina s kompleksom Hsp70-Hsp90 molekularnih pratioaca, a sa druge strane preko plazminogena sa ANXA1 (Slika 29.). Nadekspressija Hsp79-Hsp90 kompleksa, veza s citoskeletnim proteinima koji moduliraju pokretljivost stanice te s proteinom ANXA1 ukazuju na stabilnu agresivnu bolest što je u korelaciji s praćenjem bolesnika.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G7 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 30.): VLC, TPM1, CCDC168, MACF1, GLO1, MYH8 i CEP290.

Unutar mreže interaktoma nalazi se, već u više navrata opisana, veza vinkulina s obitelji tropomiozina (TPM1) i miozina (MYH8) (Slika 30.). Od ostalih proteina važnih za motilitet i pokretljivost tumorskih stanica izvan mreže interaktoma prisutan je MACF1. On je negativni regulator Wnt signalnog puta jednako kao i CEP290. GLO1 je važna u detoksifikaciji stanice, protein CCDC168 ima nepoznatu funkciju, a proteini iz obitelji cink prstenastih proteina (ZNF600 i ZNF268) sudjeluju u regulaciji transkripcije. Unutar odvojenog dijela mreže interaktoma nalaze se još i hemoglobin alfa2 (HBA2) i hemoglobin beta (HBB) koji sudjeluju u transportu kisika (Slika 30.).

U interaktomu proteoma zdravog uzorka ispitanika alfa G7 nalazi se mreža s centralnim mjestom vinkulina koji je potom vezan s ANXA1 kao tumorsupresorom i

citoskeletnim proteinima (ACTA2, TPM1, TPM2 i MYH8) (Slika 31.). Nadeksprimirani su NUMA1 i CENF koji osim svojih uloga tumorsupresora ili promotora sudjeluju u staničnoj diobi. NUMA1 se u ranoj mitozu seli u centrosome te organizira diobeno vrteno. CENF se također početkom staničnog ciklusa seli iz citoplazme te ima ulogu u funkcioniranju kinetohore i segregaciji kromosoma. Nadeksprimiran je i PCNT koji također sudjeluje u staničnom ciklusu jer sprečava prerano razdvajanje centrosoma za vrijeme interfaze. Pritom PCNT i ST5 imaju ulogu u organizaciji mikrotubula. CA1 sudjeluje u proliferaciji stanica. Uloga ZNF569, GOLGA4, DOC9 i DTNA već je opisana, a CCDC168, ENSG00000223931 i FAM184B imaju nepoznatu funkciju. Zbog svoje uloge u stvaranju centriola umrežavaju se još dodatno CEP290 i PCNT. Ispitanik alfa G7 ima pozitivan limfni čvor zbog čega je bio kandidat za primjenu *salvage* radioterapije i ADT. U interaktomu tumorskog uzorka vidi se situacija slična interaktomu ispitanika alfa G2, a to je da je prisutan mali broj proteina, od kojeg je većina aktivna u malignoj transformaciji prostate. Pritom su nadeksprimirani kod više tumorskih uzoraka i nisu umreženi. Smatramo da ispitanik alfa G7 ima agresivnu bolest što je u korelaciji s njegovim Gleasonovim zbrojem i pTNM-om. Također, smatramo da je bolest stabilna što se slaže s dobrim odgovorom na primijenjeno liječenje. Razlog tomu možda leži u činjenici da su u proteomu zdravog tkiva nadeksprimirani tumorsupresori koji na neki način drže pod kontrolom pokretljivost tumorskih stanica, a samim time i agresivnost bolesti.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G8 samo je jedan protein, kiseli leucin-bogati jezgri fosfoprotein 32A (ANP32A), nadeksprimiran kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 33.). Niti jedan protein nije u mreži.

ANP32A član je istoimene obitelji koja je regulatorna točka cijelog niza staničnih procesa, s još nedefiniranom ulogom (132,133,134). Članovi ANP32A obitelji djeluju kao "dvosijekli mač" u progresiji tumora, tj. mogu biti tumorsupresori ili promotori (132,133,134).

Uloge ostvaruje posredno djelujući preko onkoproteina te na neki način pojačava njihove konačne funkcije. Međudjelujući s onkoproteinom SET, kao dio INHAT kompleksa, vrši transkripcijsku represiju i potiče put apoptoze koji je neovisan o kaspazama (135). Nadeskpresija ANP32A i SET nađena je još u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G10 (Tablica 33., Slika 39). Vežući se s onkoproteinom protimozinom i Hsp70, potiče unutarnji put apoptoze (136). Kod

karcinoma prostate podeksprimiran ANPA32A vezan je uz nadeksprimirani onkoprotein miR-21 (engl. *MicroRNA-21*) koji potiče transkripciju posredovanu AR i na taj način proliferaciju, preživljavanje, migraciju i agresivnost karcinoma prostate (137). Izvan mreže interaktoma nalazi se peroksiredoksin-1 (PRDX1), polimeraza I i transkripcijski oslobađajući faktor (PTRF), protein-L-izoaspartat (D-aspartat) O-metiltransferaza (PCMT1) i malat dehidrogenaza 1 (MDH1) (Slika 33.). PRDX1 je antioksidativni enzim koji se veže s TLR4/MD-2/CD14 kompleksom što inducira aktivaciju jezgrenog faktora NF- $\kappa$ B i sekreciju citokina iz stanica tumora. Aktivacija TLR4 receptora vezana je s upalom i korelira s rizikom za progresiju karcinoma prostate. Aktivacija NF- $\kappa$ B uzrokuje transkripciju HIF-1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$* ), a posljedično i aktivaciju VEGF-a (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor 1- $\alpha$* ) što uzrokuje stvaranja krvnih žila u tumoru (138,139). PRDX1 se može smatrati onkoproteinom jer potiče proliferaciju endotelnih stanica, migraciju i diferencijaciju stvarajući vezu između kronične upale i karcinogeneze prostate.

MDH1 katalizira reverzibilnu oksidaciju malata u oksalacetat te kao metabolički enzim regulira aktivnost tumorsupresora p53 i apoptozu ovisnu o njemu. Ovaj enzim ulazi u interakciju s HSP90. MDH1 ima ulogu u popravku ili degradaciji oštećenih proteina te je negativni regulator tumorsupresora p53 (140). Održava i funkcionalnu stabilnost Bcl-xL antiapoptotičkog proteina (141). PTRF ima ulogu u nastanku kaveola i regulaciji transkripcije. Kod ispitanika alfa G8 ima protektivni učinak, jer je utvrđeno da njegova nadprodukcija kod karcinoma prostate smanjuje njegov agresivni potencijal.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G8 nalaze se: karbonska anhidraza III (CA3), TAGLN, proteasom podjedinica beta tip-3 (PSMB3) i fosfohistidin fosfataza 1 (PHPT1) (Slika 34.).

CA3 spada u istoimenu obitelj koja reverzibilno hidrira karbon dioksid te proizvodi bikarbonatne i vodikove ione potrebne za održavanje pH homeostaze. Danas se smatra da promjene vrijednosti pH posreduju u nastanku rezistencije na kemoterapeutike. TAGLN se veže na F-aktin i važan je za kontraktilnost stanice. Inhibira metaloproteinazu 9 (MMG) koja sudjeluje u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji, procesu od iznimne važnosti za karcinom prostate (142). Smatra se da je onkoprotein koji ima ulogu tumorsupresora (Tablica 32.). U većini linija tumorskih stanica karcinoma prostate osim u DU145 metastatskoj liniji TAGLN je podproduciran zbog

čega bi se mogao koristiti kao rani biomarker transformacije normalnih u tumorske stanice (143). PSMB3 je dio proteasomalnog kompleksa proteina koji degradira oštećene ili neželjene proteine proteolizom. PHPT1 katalizira reverzibilnu defosforilaciju histidinskih rezidua na proteinima te sudjeluje u reorganizaciji citoskeleta te također negativno regulira CD4 T limfocite.

U zajedničkom interaktomu također nema mreže nadeksprimiranih proteina (Slika 35.). Kod ispitanika alfa G8 vidi se izrazita alteracija metaboličkih puteva, što je već uočeno kod karcinoma prostate. Ove promjene smatraju se podlogom za nastanak rezistencije što bi moglo objasniti polaganu progresiju bolesti koja se javila kod ovog ispitanika nakon dvije godine. Prema interkatomima bolesnika alfa G8 smatramo da ima srednje agresivnu bolest što je korelaciji s Gleasonovim zbrojem 7 (4+3). Razlog tome je prisutna nadprodukcija tri tumorsupresora (ANP32A, PTRF i TGLN), dvaju negativnih regulatora p53 (PCMT1 i MDH1) i proteina PRDX1 koji potiče migraciju endotelnih stanica i angiogenezu.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G9 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 36.): elongacijski faktor Tu (TUFM) i kalikrein-vezana peptidaza 3 (PSA, KLK3). KLK3 ili PSA je enzim koji hidrolizira SEMG 1 i jedini je za sada korišteni biomarker karcinoma prostate. TUFM je građen od tri domene, I i II su fiksirane domene, a III domena rotira se iz GDP u GTP stanje (mt-EFTu GDP *vrs.* mt-EFTu GTP stanje) (144). Protein sudjeluje u elongaciji peptida te posreduje vezanje aminoacil-tRNA na ribosome (145). Skupa s NLR proteinom potiče autofagiju i smanjenje proizvodnje upalnih citokina (146). Unutar interaktoma i izvan mreže nalaze se sljedeći proteini: glutation S-transferaza teta 2 (GSTT2), ketimin reduktaze mu-kristalin (CRYM), arginaza-2 (ARG2), prostanglandin E sintaza 3 (PTGES3), superoksid dismutaza 1 i 2 (SOD1 i SOD2), karboksimetilenbutenolidaza homolog (CMBL), albumin (ALB), apoptoza-inducirajući faktor 2 (AIFM2), prostatična kisela fosfataza (ACPP) i ENSG00000228325 protein koji ima nepoznatu funkciju (Slika 36.). Nadeksprimiran je čitav niz enzima. U obrani stanice od slobodnih radikala sudjeluju SOD1 i SOD2. SOD 2 je glavni antioksidant, međutim, kod tumorskih stanica za vrijeme maligne transformacije, može se dogoditi SOD preokret, te SOD1 postaje glavni enzim. Zatim imamo dva proteina koji imaju ulogu tumorsupresora, AIFM2 i ARG2. AIFM2 je oksidoreduktaza koja sudjeluje u apoptozi preko kontrole homeostaze mitohondrija i



posredujući u p53/TP53 apoptotičkom odgovoru te zbog toga ima ulogu tumorsupresora. Smatra se da ima dualnu ulogu kod karcinoma prostate. Kod agresivnijih oblika je nadeksprimirana, a apoptozu potiče tek kad se u potpunosti aktivira glikolizni metabolizam, a potom postaje tumorpromotor. ARG2 je konačni enzim ciklusa uree, a njena aktivnost je vezana uz proizvodnju poliamina, važnih za rast i razvoj karcinoma prostate. Nadeksprimirana je u AR ovisnim linijama, s tendencijom smanjenja iste, s progresijom bolesti i porastom Gleasonovog zbroja, što je posljedica aktiviranja alternativnih pravaca proizvodnje poliamina. GSST2 katalizira konjugaciju reduciranog glutationa dok je CMBL cistein hidrolaza.

ACPP je enzim koji proizvodi prostata i koji je prije imao mjesto na kojem se danas nalazi PSA. To je nespecifična tirozin i lipid fosfataza povećana kod prisutnosti koštanih sekundarizama. Ostala su još dva enzima koji imaju ulogu onkoproteina. CRYM je enzim koji katalizira redukciju imin veza. Nadeksprimiran je u AR ovisnim linijama karcinoma prostate i tumorskom tkivu te je posljedično podeksprimiran kod terapije antiandrogenima i kastracijski rezistentne bolesti. PTGES3 ili košaperon p23 je još jedan od onkoproteina koji je dio Hsp90 multiproteinskog kompleksa pratioca te su oba proteina kofaktori i pratioci AR. Potiču aktivnost AR u citoplazmi i jezgri. Nadregulirani su i na taj način održavaju bazalnu vrijednost AR za vrijeme niske razine hormona (primjena ADT). Zbog toga karcinom prostate postaje rezistentan.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G9 nalazi se samo jedan protein koji je nadeksprimiran u više uzoraka. To je eukariotski translacije inicijacijski faktor 5A-1 (EIF5A) (Tablica 32., Slika 37.).

EIF5A sudjeluje u elongaciji proteina, organizaciji citoskeleta i tumorsupresor je kao regulator p53/TP53 ovisne apoptoze i apoptoze posredovane  $TNF\alpha$ . Nadeksprimiran je u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G10 (Slika 39.). Ostali proteini koji se pojavljuju u interaktomu, a nalaze se izvan mreže su: TGLN, ANP32 A, kromoboks protein homolog 3 (CBX3), Rho GDP-disocijacijski inhibitor 2 (ARHDGIB) i hemoglobin beta (HBB) (Slika 37.).

ARHDGIB regulira GDP/GTP izmjenu Rho proteina koji imaju ulogu u organizaciji citoskeleta i invaziji tumorskih stanica (147,148). Nadeksprimiran je također u proteomu zdravog uzorka kod ispitanika alfa G10 (Slika 39.) Aktivnost ARHDGIB posredovana je PI3K/AKT signalnim putem te je tumorsupresor kod tumora mokraćnog mjehura, dojke i želuca (149,150,151,152). CBX3 sudjeluje u formiranju

kinetohore, a njegova nadekspresija kod karcinoma prostate korelira s MIK67. U skupini bolesnika s Gleasonovim zbrojem 7 njegova ekspresija bolje korelira s biokemijskim relapsom i od samog zbroja. Smatramo da ispitanik alfa G9 ima srednje agresivnu bolest što je u skladu s jednim prisutnim negativnim pokazateljem, Gleasonovim zbrojem 7 (4+3). Iz zajedničkog interaktoma vidljiva je aktivnost čitavog niza tumorsupresora: AIFM, ARG2, EIF5A, TNGL, ANP32A, ARHGDIB, CRYM i p23 (Slika 38.). Pritome posljednja dva upućuju da se radi o tkivu prostate jer su izravno vezani za funkcioniranje AR. Osim metabolički alteracija nadeksprimirani su i enzimi koji sudjeluju u obrani stanice i proteini s protuupalnim učinkom. Zbog podekspresije CBX3 u tumorskom tkivu smatramo da bolesnik nije ugrožen niti od biokemijskog recidiva bolesti, što je potvrđeno praćenjem.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G10 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 39.): PSA (KLK3) i ANP32A. Najznačajnija veza u interaktomu je ona između ANP32A i proteina SET. Uočeno je da vezanje ANP32A u kompleks sa SET proteinom može dovesti do inaktivacije ANP32A. SET je onkoprotein koji ima sposobnost fuzije s različitim onkogenima te amplifikacije uslijed neposredne kromosomske blizine gena *c-abl*. Također, stupa u interakciju s proteinom Rac-1 (uključenim u migraciju) te p27/Cip1, ciklinom B i GAPDH uključenim u G2/M točku prijelaza staničnog ciklusa (135).

Drugu mrežu u interaktomu čine miozin regulatorni laki lanac 12B (MYL12B) i miozin regulatorni laki polipeptid 9 (MYL9). U interaktomu je još jedan član obitelji, miozin regulatorni laki lanac 12A (MYL12A). Svi sudjeluju u migraciji stanica i citokinezi. Nadalje, ustanovljeno je da je kod karcinoma prostate s lošijom prognozom MYL9 podeksprimiran, što upućuje da kod ispitanika alfa G10 ima protektivnu ulogu. U interaktomu su i proteini vezani uz signalne puteve koji sudjeluju u karcinogenezi prostate. Tako je aktivan ARHGDIB član PI3K/AKT puta i RNA-vezujući protein induciran hladnoćom (CIRBP) kojeg aktiviraju MAPK kinaze. ARHGDIB ima ulogu tumorsupresora, a CIRBP nakon aktivacije potiče sintezu mRNA gena uključenih u proliferaciju (153). Katepsin D (CTSD) je proteaza, jedan od biomarkera invazivnog karcinoma dojke. Njegova nadekspresija je vezana uz stromalne stanice, smatra se parakrinim medijatorom koji potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju kod benignog tkiva prostate (154). Nakon prostatektomije njegova nadekspresija pada, ponovno

se javlja kod metastaskih oblika i upućuje na agresivnu bolest (155). Naekspimirani su i proteini vezani uz citoskelet: profilin-2 (PFN2), F-aktin-zaštitnog proteina podjedinica beta (CAPZB), trombocit-aktivirajući faktor acetilhidrolaza IB podjedinica beta (PAFAH1B2) i EIF5A. Sudjeluju u organizaciji citoskeleta i posljedično djeluju na pokretljivost stanica. Pritom PFN2 izravno suprimira motilitet i invazivnost stanica, a PAFAH1B2 posredno kao antagonist dineina, motora "minus" kraja mikrotubula. EIF5A je također i tumorsupresor. Kao dio metaboličkih alteracija nadekspimirani su: glutation peroksidaza 1 (GPX1), N (G), N (G) - dimetilarginin dimetilaminohidrolaza 2 (DDAH2), GLO1 i beta-glukuronidaza (GUSB). GLO1 je nadekspimirana uslijed obrane tumorskih stanica od reaktivnih oblika metabolizma, GUSB je hidrolaza a GPX1 je također antioksidativni enzim. Aktivnošću DDAH2, nakuplja se dimetilarginin koji se troši za inhibiciju sintetaze dušikovog monoksida. Prestankom inhibicije, stvara se dušikov monoksid koji potiče stvaranje krvnih žila u tumorima jajnika i prostate (156,157). Od ostalih proteina nadekspimiran je još feritin laki lanac (FLN) i onkoprotein mali ubikvitin vezani modifikator 2 (SUMO2). SUMO2 je sastavni dio sumoilacije na način da kovalentno modificira niz jezgrinih proteina koji sudjeluju u različitim procesima. U te proteine spada AR, njegovi koaktivatori i korepresori. Ravnoteža sumoilacije i desumoilacije važna u održavanju homeostaze organizma.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G10 nalaze se sljedeći proteini nadekspimirani kod više uzoraka (Tablica 32., Slika 40.): alfa-kristalin B lanac (CRYAB), aktin (ACTA2), EIF5A izoforma B i TGLN. Svi proteini osim aktina imaju ulogu tumorsupresora. CRYAB održava beta-katenin na membrani i smanjuje ekspresiju nizvodnih onkokinaza (*c-myc*), a nadekspimiran je i u proteomu zdravog tkiva ispitanika alfa G11 (Tablica 32., Slika 43.). Izvan mreže nalazi se još jedan tumorsupresor, alfa-enolaza (ENO1) čija se izoforma veže na *myc* promotor i suprimira transkripciju. Unutar interaktoma u mreži nalaze se samo ACTA2 i kofilin 1 (CFL1) (Slika 40.). To je još jedan protein koji sudjeluje u organizaciji citoskeleta, ali je istovremeno važan za napredak stanice kroz mitozu i citokinezu. Zbog dualnih uloga sudjeluje u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji kod karcinoma prostate. Ostali proteini koji se pojavljuju u interaktomu, a nalaze se izvan mreže su: aneksin (ANXA3), gliksilaza domena sadržavajući protein 4 (GLOD4), ACPP, protein skupine visoke mobilnosti B1 (HMGB1) i beta-mikroseminoprotein (MSMB) (Slika 40.). ANXA3 je član aneksinske obitelji koji sudjeluje u angiogenezi, a

podeksprimiranost se veže uz pojavu radiorezistencije i kemorezistencije. HMGB1 je onkoprotein čiji je intracelularni oblik tumorsupresor, a ekstracelularni oblik veže se na RAGE preko kojeg ulazi u interakciju s AR te se smatra potencijalnim biomarkerom biokemijskog relapsa bolesti nakon prostatektomije. Glavna uloga MSMB je kontrola i poticanje staničnog rasta, a gen koji ga kodira je jedan od kandidata za razvoj raka prostate. Protein se javlja u više SNP varijanti, a neke od njih povezane su s većim rizikom karcinoma prostate. Ekspresija MSMB proporcionalno pada s porastom Gleasonovog zbroja (158).

U zajedničkom interaktomu nalazi se mreža u kojoj centralno mjesto zauzima aktin, a sadržava MYL12B, MYL9, PFN2, CFL1 i CAPZB (Slika 41.). Svi proteini su vezani uz citoskelet, sudjeluju u njegovoj organizaciji i motilitetu stanice. Smatramo da se kod ispitanika alfa G10 radi o srednje agresivnoj bolesti što je u korelaciji s njegovim početnim kliničkim i histopatološkim parametrima, Gleasonovim zbrojem i ishodom. U prilog agresivnosti govori mreža koja upućuje na povećanu pokretljivost stanica. S druge strane nadeksprimiran je čitav niz tumorsupresora: ANPA32, SET, ARHIDGIB, EIF5A, DDAH2, TGLN, CRYAB, ENO1, HMGB1 i MSMB. Također u proteomu tumorskog uzorka nadeksprimiran je skup MYL proteina, koji ima protektivnu ulogu. Vidljiva je aktivnost stromalnih stanica i proteina koji sudjeluju u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji čija se ekspresija gubi kod progresije bolesti.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G11 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 42.): željezo-vezivni protein 2 (HEPB2), ANXA1, alkohol dehidrogenaza (NADP+) (AKR1A1), TUFM, kalumenin (CALU), sijalična kiselina sintaza (NANS) i komplement komponente 1Q subkomponente-vežući protein (CIQBP). Svi osim TUFM nadeksprimirani su i u proteomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G12 (Tablica 33., Slika 45.).

AKR1A1 je redukcijski enzim koji ovisi o NADPH. Posjeduje široku specifičnost za pojedine supstrate i posreduje u nastanku rezistencije na oksidativni stres. ANXA 1 ima ulogu tumorsupresora ili promotora, ovisno o situaciji. NANS sudjeluje u proizvodnji N-acetilneuraminske kiseline i njenih fosforiliranih formi, a HEPB2 u nekrotičnoj smrti stanice za vrijeme različitih tipova stresa. CIQBP je multifunkcionalni protein koji veže C1q komponentu komplementa (159). Regulator je usmjerene migracije stanica raka dojke za vrijeme metastaziranja. Preko aktivnosti

protein kinaze C  $\zeta$ , sudjeluje u kemotaksi nezrelih dendritičkih stanica i neutrofila te preko  $\beta$ -1 integrina u adheziji i širenju endotelnih stanica (160). Nadekspresija CIQBP u korelaciji je s kraćim vremenom povrata bolesti nakon radikalne prostatektomije kod lokaliziranih tumora prostate (161). CALU ima ulogu tumorsupresora koji nakon stabilizacije proteina fibulina-1 inaktivira ERK1/2 signaliziranje i sprečava migraciju stanica (162). Unutar mreže interaktoma nalaze se ENO1, TUFM i 40S ribosomalni protein SA (RPSA) koji sudjeluje u adheziji stanica za bazalnu membranu. Unutar mreže interaktoma nalazi se još APOA1 koji sudjeluje u metabolizmu kolesterola i haptoglobin (HP). Izvan mreže interaktoma proteoma tumorskog tkiva ispitanika alfa G11 nalaze se sljedeći proteini: nukleozid difosfat kinaza A (NME1), ARHGDIB, koaktozinu-nalik protein 1 (COTL1), poli (rC)-vežući protein 1 (PCBP1), aneksin A7 (ANXA7) i masne kiseline-vežući protein (FABP3). ANXA7 je tumorsupresor za kojeg je karakterističan gubitak ekspresija kod androgen rezistentnog karcinoma prostate. COTL1 se veže na aktin i spada u citoskeletne proteine. PCBP1 je partner THAP11 koji ima ulogu supresora staničnog rasta. FABP3 sudjeluje u transprotu dugolančanih masnih kiselina i veže se na citoplazmatski rep  $\alpha$  podjedinice integrina. NME1 je multifunkcionalni enzim koji je istovremeno i metastaza supresor. Iako su studije pokazale njegov potencijal kao metastaza supresora na linijama tumorskih stanica, u stvarnosti je kod nekih tumora s visokim metastaskim potencijalom nadekspresiran. NME1 veže čitav niz proteina (MAPK kinaze, članove TGF- $\beta$  signalnog puta, proteine citoskeleta, G-proteine i transkripcijske komplekse). Uočena je korelacija nadekspresije NM1 u citoplazmi stanica karcinoma prostate i njegove progresije u metastasku bolest.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G11 nalaze se sljedeći proteini nadekspresirani kod više uzoraka (Tablica 32., Slika 43.) TGLN, ACTA2, CRYAB, gamma aktin (ACTG2), GAPDH i dezmin (DES).

TGLN i CRYAB su tumorsupresori, a svi ostali proteini grade citoskelet ili sudjeluju u njegovoj organizaciji. Unutar mreže interaktoma nalaze se: miozin laki lanac kinaza (MYLK), ACTG2, ACTA2, GAPDH i *heat shock* srodnik 71 kDa protein (HSPA8) (Slika 43.). MYLK je enzim koji sudjeluje u kontrakciji glatkih mišićnih stanica i regulaciji aktin-miozin interakcije. Regulira citoskelet te permeabilnost i preživljavanje endotelnih stanica te na taj način utječe na njihovu migraciju. HSPA8 je inhibitor rasta čiju ekspresiju prevenira nadekspresija katepsina D kod invazivnih oblika

tumora (163). Ima protektivnu ulogu koja se aktivira kao odgovor na stres, infekciju ili transfer gena, a ekspresija HSPA8 može biti modulirana promjenama u okolišu ili aktivnošću različitih enzima (164).

Ostali proteini koji se pojavljuju u interaktomu, a nalaze se izvan mreže su: *heat shock* protein beta-6 (HSPB6), CAPZB, Cistatin-B (CSTB), HBB, dermatopontin (DPT), *heat shock* 70kDa protein 1A (HSPA1A) i POTE anikrin domene obitelji član E (POTEE) koji ima nepoznatu funkciju (Slika 43.). Svi na neki način posreduju u motilitetu stanica. HSPB6 sudjeluje u relaksaciji glatkih mišićnih stanica, CAPZB inhibira motilitet, a DPT je aktivan u staničnim adhezijama te inhibira proliferaciju. HSPA1A je molekularni pratioc, osnovni dio Hsp70-Hsp90 kompleksa već opisanog kod ispitanika alfa G6.

U zajedničkom interaktomu nalazi se mreža u kojoj centralno mjesto zauzima GPDH koja se grana u četiri kraka (Slika 44.). U jednom postoji veza s ACTA2, ACTG2 i MLYK proteinom, tj. regulatorima pokretljivosti stanice. Drugi krak čini veza s HSPA8 koji ima protektivnu ulogu i NME1 koji ima ulogu metastaza supresora. Četvrti krak čini veza s ENO1, RPSA i TUFM. Drugi dio mreže oblikuju proteini koji sudjeluju u metabolizmu kolesterola: APOA1, HP i HBB (Slika 44). Smatramo da se kod bolesnika alfa G11 radi o agresivnijem obliku bolesti što je u korelaciji s Gleasonovim zbrojem 7 (4+3) i prisutnosti gradusa 5 u 10% tumorskog tkiva, iako za sada praćenje ne upućuje na isto. Mreža interaktoma je na neki način u ravnoteži između proteina koji moduliraju pokretljivost stanica, utječu na njihov migratorni i metastatski potencijal, a s druge strane nalaze se brojni tumorsupresori (Slika 44). Na agresivniju bolest upućuju proteini aktivni za vrijeme obrane od oksidativnog stresa (HEPB2, AKRA1, HSPA8, HSPA1A), koji sudjeluju u usmjerenom migraciji (C1QBP, RPSA), metastaza supresor (NME1) i cijeli niz građevnih proteina citoskeleta koju utječu na pokretljivost stanice (MYLK, ACTG2, ACTA2, DES, CAPZB, HSPB6, CTL1). S druge strane, relativno stabilna bolest tijekom praćenja najvjerojatnije je posljedica nadekspresije cijelog niza tumorsupresora (ANXA1, TUFM, CALU, TGLN, CRYAB, ANXA7, ARHIDGIB) i inhibitora proliferacije (PCPB1, DPT) (Slika 44). Daljnje praćenje dati će nam odgovor je li bolesnik ipak bio kandidat za agresivnije liječenje.

U interaktomu tumorskog uzorka ispitanika alfa G12 nalaze se sljedeći članovi podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka (Tablica 33., Slika 45.): HEPB2, ANXA1, AKR1A1, KLK3 (PSA), CALU, NANS i CIQBP.

U interaktomu se nalaze dva velika dijela mreže (Slika 45.). Prvi dio grade MYH11, TAGLN, MYL9, serin/treonin protein fosfataza PP1-beta katalitička podjedinica (PP1CB), ACTG1 i tubulin alfa-1b lanac (TUBA1B) (Slika 45.). PP1CB je multifunkcionalni enzim koji sudjeluje u čitavom nizu procesa, a TUBA1B je sastavni dio mikrotubula koji negativno remodelira stanične adhezije i smanjuje migraciju stanica. Drugi dio mreže grade: željezo-vezivni protein 1 (HEBP1), ANXA1, *heat shock* protein beta-1 (HSPB1), HSPA8, 10 kDa *heat shock* protein (HSPE1), HSPA5 i endoplazmatskog retikuluma protein 29 (ERP 29) (Slika 45.). HSPE1 sudjeluje u biogenezi proteina mitohondrija, a HSPB1 ima ulogu u translokaciji aktina u jezgru i razvoju rezistencije na stres. HSPA5 i ERP29 aktivni su u endoplazmatski retikulum povezanoj degradaciji. Pritom je HSPA5 još dio Hsp70-Hsp90 kompleksa pratioca te aktivira PI3K/AKT put, dok ERP29 uspostavlja integritet epitelnih stanica i vodi epitelno-mezenhimalnu tranziciju. U interaktomu proteoma tumorskog uzorka ispitanika alfa G12 izvan mreže nalazi se nadeksprimiran bogat niz proteina (Slika 45). Tako u obrani stanica od oksidativnog stresa sudjeluju: DDAH1, AKR1A1, karbonil reduktaza [NADPH] 3 (CBR3) i tioredoksin-ovisna peroksid reduktaza (PRDX3). Kao metabolička alteracija nadeksprimirani su sljedeći enzimi: L-laktat dehidrogenaze B lanac (LDHB) koja je regulator proliferacije stanica, regulatorna podjedinica glukozidaze 2, podjedinica beta (PRKCSH). Također, nadeksprimirana je S-formilglutation hidrolaza (ESD) koja sudjeluje u detoksifikaciji formaldehida, te izomeraza koja ubrzava savijanje proteina, peptidil-prolil cis-trans izomeraza A (PPIA). Nađena je i povišena ekspresija hidrataze koja obrađuje ravnolančane enoil-CoA tioestere i enzima fruktoza-1,6-bifosfataza 1 (FBP1) koji ograničava glukoneogenezu. Nadeksprimirani su i citoskeletni proteini: aktinu-srodni 2/3 kompleks podjedinica 5-sličan protein (ARPC5L), koji je odgovoran za razgranatost aktinske mreže, dva pridružena proteina F-aktin-zaštitnog proteina podjedinica alfa-1 (CAPZA1), podjedinica alfa-2 (CAPZA2) i vimentin (VIM). VIM spada u intermedijarne elemente koji gradi citoskelet najčešće u mezenhimalnim stanicama. Nadeksprimiran je kod agresivnijih karcinoma prostate. Odgovoran za napredovanje staničnog ciklusa, diferencijaciju i popravak DNA je ubikvitin-konjugirajući enzim E2

N (UBE2N) te također histon H3.2 (HIST2H3A). Nadeksprimirani su i sljedeći proteini: granulocitne kolonije-stimulirajući faktor (CSF3), ATP sintaza podjedinica g (ATP5L), KLK3 (PSA) i cisteinom i glicinom-bogati protein 1 (CSRP1). Onkoprotein fosfatidiletanolamin-vežući protein 1 (PEBP1), inhibitor cijelog niza proteaza i protuonkogen *Raf 1* također je nadeksprimiran. Podekspresija kod karcinoma prostate vezana je za progresiju bolesti. Gvanin nukleotid-vežući protein G(I)/G(S)/G(T) podjedinica beta-2 (GNB2) modulator je u više transmembranskih signalnih sistema.

U interaktomu proteoma zdravog tkiva ispitanika alfa G12 nalaze se sljedeći proteini nadeksprimirani kod više uzoraka (Tablica 32., Slika 46.): TPM2, ACTG2, DES, ACTA2 i TGLN. Osim TGLN koji je tumorsupresor svi su dio citoskeleta i sudjeluju u motilitetu stanice. Unutar interaktoma nalazi se razgranata mreža u kojoj centralno mjesto zauzima poliubikvitin (UBC). Spajanjem mono/polimera UBC za ciljane proteine, ovaj protein sudjeluje u degradaciji proteina, popravku DNA, regulaciji signalnih puteva i staničnog ciklusa, modifikaciji kinaza i endocitozi. Na jednom kraju mreže u vezi je s enzimima koji sudjeluju u obrani stanice od slobodnih radikala (SOD2, SOD1), proteinima koji se aktiviraju kao odgovor na stres ili upalu te su modulirani promjenama u okolišu (HSPA8 i ETL). Na drugim je krajevima mreže UBC vezan s tumorsupresorima. Postoji izravna veza s ENO1 te neizravna s TGLN, također tumorsupresorom, a odvija se preko dijela mreže bogatog interakcijama citoskeletnih proteina koji moduliraju pokretljivost stanice (ACTG2, ACTA2, ACTC1, MYL9, DES, TPM2 i MYL11). U interaktomu izvan mreže nalaze se HSPA1B koji ima nepoznatu funkciju i transtiretin (TTR), protein koji veže tiroidni hormon.

U zajedničkom interaktomu centralno mjesto zauzima UBC (Slika 47.) UBC je mali regulatorni protein koji se veže na različite supstrate. Za vrijeme ubikvitinacije utječe na proteine na različite načine: potiče njihovu degradaciju preko proteosoma, mijenja njihovu lokalizaciju, funkciju i interakciju s drugim proteinima. UBC sudjeluje u sljedećim procesima: procesiranju antigena, apoptozi, biogenezi ribosoma, staničnom ciklusu, DNA transkripciji i popravku, modulaciji staničnih receptora ionskih kanala i sekretornih puteva, održavanju genomske stabilnosti, upali, odgovoru na stres i vanjske modulatore. Mreža u zajedničkom interaktomu posljedica je uloge UBC u svim gore navedenim procesima (Slika 47.). Pritom se multipli broj interakcija nalazi u području veze ENO1 sa SOD i *heat shock* proteinima. Dojam je da



je aktivirana obrana stanice od slobodnih radikala u kombinaciji s odgovorom na stres i upalu. Na drugom kraju mreže nalazi se veza s TGLN i mrežom citoskeletnih proteina koji moduliraju pokretljivost stanice. Razgranata mreža upućuje na agresivnu bolest što je u korelaciji s Gleasonovim zbrojem i dobi bolesnika. S druge strane, zastupljenost cijelog skupa proteina koje nisu pokazatelji karcinogeneze prostate govori u prilog stabilnom obliku bolesti, gdje je agresivnost zasad suprimirana, što je u korelaciji s praćenjem ispitanika alfa G12 (Tablica 5., Slika 47.).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Članove podskupa proteina nadeksprimiranih kod više tumorskih uzoraka identificirali smo kao potencijalne prognostičke čimbenike (biomarkere) raka prostate. To su: vinkulin, mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor 1, glioksilaza 1, smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168, centromere protein F, tropomiozin alfa-1 lanac, miozin XVIII B, TPM4-ALK fuzijski onkoprotein tip 2, plazminogen, kiseli leucin-bogati jezgri fosfoprotein 32A, cink prsten protein 268, centrosomalni protein od 290 kDa, elongacijski faktor Tu, Rho GDP-disocijacijski inhibitor 2, kalumenin i komplement komponenta 1Q subkomponenta-vežući protein.

2. Potencijalni prognostički čimbenici (biomarkeri) su zato jer je rijetko zabilježeno pojavljivanje dvaju ili više njih u proteomskoj analizi tkiva karcinoma prostate.

3. Dio proteina eksprimiranih u malignom tkivu naših ispitanika pripisuje se prema literaturi zdravom tkivu prostate. Razlog različite ekspresije na razini tumorsko/zdravo tkivo je njihova uloga kao onkoproteina. Kada su nadeksprimirani u zdravom tkivu (tj. podeksprimirani su u tumorskom tkivu) imaju ulogu povoljnih prognostičkih čimbenika (npr. proteini transgelin i aneksin A1).

4. Kao prognostičke pokazatelje izdvojili smo još dva podskupa proteina nakon kombinirane analize interaktoma, kliničko-patohistoloških karakteristika, terapijskog ishoda i praćenja naših ispitanika. Prvi podskup čine proteini koji su u interakciji ili su članovi signalnih puteva aktivnih kod karcinoma prostate, a drugi proteini koji sudjeluju i moduliraju pokretljivost tumorskih stanica. Pojedini proteini su članovi više podskupova.

5. Članovi prvog podskupa u interakciji su s PI3K/AKT i MAPK signalnim putem ili su dio Wnt signalnog puta. PI3K/AKT signalni put važan je kod karcinoma prostate jer sudjeluje u nastanku radiorezistencije i jer je njegov negativni regulator PTEN, za kojeg je poznato da je jedan od najvažnijih tumorsupresora karcinoma prostate. MAPK put sudjeluje u prijenosu signala s površine stanice u jezgru dok je Wnt signalizacija važna za nastanak kastracijski rezistentnog karcinoma prostate. Wnt i AR signalizacija se međusobno povezuje. Kod kastracijski rezistentnog karcinoma

prostate međusobno se pojačavaju te potiču transkripciju specifičnih ciljanih gena koji uzrokuju androgen neovisni rast tumora.

6. Drugi podskup prognostičkih čimbenika čine proteini koji su vezani uz citoskelet, a sudjeluju ili moduliraju pokretljivost tumorskih stanica.

7. Iz analize interaktoma u kombinaciji s kliničkim pokazateljima uočili smo da je važan omjer tumorsupresora/promotora nadeksprimiranih u tumorskom tkivu kao i broj nadeksprimiranih tumorsupresora u zdravom tkivu. Što je veći omjer i broj tumorsupresora bolest je stabilnija, iako mreža interaktoma upućuje da ispitanik ima agresivniji karcinom prostate.

8. Interaktomi koji imaju veliki broj proteina koji sudjeluju u karcinogenezi prostate ili drugih tumora, neovisno da li tvore mrežu ili ne, u većoj su prognostičkoj korelaciji s kliničkim pokazateljima te upućuju na agresivnu bolest.

9. Na agresivniji oblik bolesti upućuju i interaktomi s razgranatim mrežama i velikim brojem proteina sudionika karcinogeneze prostate, koji se poklapaju s terapijskim ishodom i praćenjem bolesnika, a ne uvijek s početnom procjenom kliničko-patohistoloških karakteristika.

## 8. SAŽETAK

Rak prostate složena je i izrazito heterogena bolest što znatno otežava razlikovanje indolentnih od agresivnih tumora te predstavlja najvišu prepreku u poboljšanju preživljenja bolesnika s ovom zloćudnom bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je proteomskim analizama, uz pomoć dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE) u sprezi s spektrometrijom masa, otkriti skupinu proteina čija se ekspresija značajno razlikuje kod karcinoma prostate i zdravog tkiva. Uključeno je dvanaest ispitanika s parnim uzorcima zdravog i tumorskog tkiva Gleasonovog zbroja 6(3+3) ili 7 (3+4 ili 4+3). Od ukupnog broja diferencijalno eksprimiranih proteina izdvojeno je njih 18 zbog njihovih specifičnih funkcija koje ih mogu svrstati u potencijalne tumorske biomarkere ili biomarkere zdravog tkiva. To su: vinkulin, mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor 1, glioksalaza 1, smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168, centromere protein F, tropomiozin alfa-1 lanac, miozin XVIII B, TPM4-ALK fuzijski onkoprotein tip 2, plazminogen, kiseli leucin-bogati jezgri fosfoprotein 32A, cink prsten protein 268, centrosomalni protein od 290 KDa, elongacijski faktor Tu, Rho GDP-disocijacijski inhibitor 2, kalumenin, komplement komponenta 1Q subkomponenta-vežući protein, aneksin A1 i transgelin.

Nadalje, uspoređeni su proteomi s pojavom recidiva i primijenjenim onkološkim liječenjem. Kod ispitanika s zloćudnijim oblicima bolesti, koji su otkriveni praćenjem, vidljiva je značajnija ekspresija proteina uključenih u malignu transformaciju. Upotrebom STRING programskog alata, dodatno je istražena povezanost razlikovno produciranih proteina unutar parnih uzoraka svakog ispitanika te je napravljen slikovni prikaz pronađenih proteina. Analiza proteoma pojedinačnih karcinoma prostate otkrila je molekularnu mrežu interakcija na razini proteina koja u kombinaciji s klasičnim kliničko-patohistološkim pokazateljima pruža novi uvid u fenotip i agresivnost tumora svakog ispitanika.

Ključne riječi: karcinom prostate, proteomika, masena spektrometrija, biomarker

## 9. SUMMARY

### Discovering prognostic factors in prostate cancer patients using tumor tissue proteomic analysis

Meliha Solak Mekić

Zagreb, 2019.

The biggest obstacle in improving prostatic carcinoma patients' survival rates today is the difficulty of differentiating between indolent and aggressive tumors, caused by the complex and extremely heterogeneous nature of the disease.

The objective of this research project was to discover a group of proteins with significantly differing expressions between healthy and tumor tissue, using proteomic analysis, and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), together with mass spectrometry. Twelve patients with even samples of healthy and tumor tissue (the Gleason sum: 6(3+3), or 7 (3+4 ili 4+3)) took part. Eighteen differentially expressed proteins were singled out as their specific functions made them classifiable either as potential tumor biomarkers, or healthy tissue biomarkers.

Proteoms were correlated with relapse frequency and applied oncological treatment. In the participants who were observed to have more aggressive disease, the protein expression was visibly stronger for proteins that were part of the malignant transformation. Additionally, we explored and visually showed the connection between differently produced proteins within each patient's sample pair, using STRING software. Individual carcinoma proteom analysis uncovers a molecular protein-level interaction network. Combined with classic clinical-pathohistological indicators, this offers new insight into every participant's tumor phenotype and stage of advancement.

Keywords: prostatic carcinoma, proteomics, mass spectrometry, biomarker

## 10. LITERATURA

1. Šamija M. Rak prostate-najvarijabilniji zloćudni tumor. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, i sur. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92(4):221-36.
3. Staack A, Donjacour A, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation.* 2003;7(7):402-13.
4. Cooke PS, Young P, Cunha GR. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology.* 1991;128(6):2867-73.
5. Donjacour AA, Cunha GR. Induction of prostatic morphology and secretion in urothelium by seminal vesicle mesenchyme. *Development.* 1995;121(7):2199-207.
6. Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol.* 1997;79 Suppl 2:S18-26.
7. Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija.* Kukulja Taradi S, Andreis I, ur. 10 hrv.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
8. Centenera M, Harris JM, Tilley WD. The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Mol Endocrinol.* 2008;22(11):2373-82.
9. Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J. An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol.* 1997;11(2):148-161.
10. Farnsworth WE, Slaunwhite WR jr, Sharma M, Oseko F, Brown JR, Gonder MJ, i sur. Interaction of prolactin and testosterone in the human prostate. *Urol Res.* 1981;9(2):79-88.
11. Nagasawa H. *Prolactin and lesions in breast, uterus and prostate.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.
12. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res.* 1986;46(3):1015-29.

13. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: Structure, function, and association to disease. *Endocr Rev.* 2001;22(2):184-204.
14. Watt KW, Lee PJ, M'Timkulu TM, Chan WP, Loor R. Human prostate specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(10):3166-70.
15. Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K. Characterization of hK4 (prostate), a prostate-specific serine protease: Activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry.* 2001;40(50):15341-48.
16. Li SS, Sharief FS. The prostatic acid phosphatase (ACPP) gene is localized to human chromosome 3q21-q23. *Genomics.* 1993;17(3):765-66.
17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
18. Šekerija M. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2014.godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016.
19. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2004.
20. Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL. Tumors of the Prostate Gland, Seminal Vesicles, Male Urethra and Penis. Washington DC: AFIP; 2000.
21. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2004;17(3):292-306.
22. Shah RB. Current perspectives on the Gleason grading of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(11):1810-6. doi: 10.1043/1543-2165-133.11.1810.
23. Epstein JI, Egevod L, Amin M, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading

- patterns and proposal for a new grading system. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
24. Kyprianou N, Bruckheimer EM, Guo Y. Cell proliferation and apoptosis in prostate cancer: significance in disease progression and therapy. *Histol Histopathol*. 2000;15(4):1211-23. 2000 doi: 10.14670/HH-15.1211.
  25. Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, i sur. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ*. 2001;8(2):192–200.
  26. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol*. 2002;20(13):3001-15.
  27. Gregory CW, He B, Johnson RT Ford OH, Mohler JL, French FS, i sur. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*. 2001;61(11):4315-9.
  28. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, i sur. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004;350(22):2239-46.
  29. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5(10):588–99. doi: 10.1038/ncponc1187.
  30. National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information [Internet]. [pristupljeno 10.05.2017]. Dostupno na: <https://www.cancer.gov/>.
  31. Lovgren J, Valtonen–Andre C, Marsal K, Ljilja H, Lundwall Å. Measurement of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in different body fluids. *J Androl*. 1999;20(3):348-55.
  32. Prostate [Internet]. National Comprehensive Cancer Network [pristupljeno 04.03.2017.]. Dostupno na: [http://www.nccn.org/professionales/physicians\\_gls/PDF/prostate.pdf](http://www.nccn.org/professionales/physicians_gls/PDF/prostate.pdf).
  33. Yossepowitch O, Eggener SE, Serio AM, Carver BS, Bianco FJ Jr, Scardino PT, i sur. Secondary therapy, metastatic progression, and cancer-specific mortality in men with clinically high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Eur Urol*. 2008;53(5):950-9.
  34. Van der Kwast TH, Bolla M, Van Poppel H, Van Cangh P, Vekemans K, Da Pozzo L, i sur. Identification of patients with prostate cancer who benefit from



- immediate postoperative radiotherapy: EORTC 22911. *J Clin Oncol.* 2007;25(27):4178-86.
35. Cheung R, Kamat AM, de Crevoisier R, Allen PK, Lee AK, Tucker SL, i sur. Outcome of salvage radiotherapy for biochemical failure after radical prostatectomy with or without hormonal therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63(1):134-40.
  36. Watson RB, Civantos F, Soloway MS. Positive surgical margins with radical prostatectomy: detailed pathological analysis and prognosis. *Urology.* 1996;48(1):80-90.
  37. Eastham JA, Kattan MW, Riedel E, Begg CB, Wheeler TM, Gerigk C, i sur. Variations among individual surgeons in the rate of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol.* 2003;170(6 Pt 1):2292-5.
  38. Anscher MS, Prosnitz LR. Multivariate analysis of factors predicting local relapse after radical prostatectomy: possible indications for postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;21(4):941-47.
  39. Bolla M, van Poppel H, Collette L, van Cangh P, Vekemans K, Da Pozzo L, i sur; European Organization for Research and Treatment of Cancer. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomized controlled trial (EORTC trial 22911). *Lancet.* 2005;366(9485):572-8.
  40. Thompson IM, Tangen CM, Paradelo J, Lucia MS, Miller G, Troyer D, i sur. Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a randomized clinical trial. *J Urol.* 2009;181(3):956-62. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.032.
  41. Wiegel T, Bottke D, Steiner U, Siegmann A, Golz R, Störkel S, i sur. Phase III postoperative adjuvant radiotherapy after radical prostatectomy compared with radical prostatectomy alone in pT3 prostate cancer with postoperative undetectable prostate-specific antigen: ARO 96-02/AUO AP 09/95. *J Clin Oncol.* 2009;27(18):2924-30. doi: 10.1200/JCO.2008.18.9563.
  42. Boehmer D, Maingon P, Poortmans P, Baron MH, Miralbell R, Remouchamps V, i sur; EORTC radiation oncology group. Guidelines for primary radiotherapy of patients with prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2006;79(3):259-69.
  43. Fowler JE Jr, Brooks J, Pandey P, Seaver LE. Variable histology of anastomotic

- biopsies with detectable prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*. 1995;153(3 Pt 2):1011-4.
44. Poortmans P, Bossi A, Vandeputte K, Bosset M, Miralbell R, Maingon P, i sur; EORTC Radiation Oncology Group. Guidelines for target volume definition in post-operative radiotherapy for prostate cancer, on behalf of the EORTC Radiation Oncology Group. *Radiother Onco*. 2007;84(2):121-7.
  45. Amling CL, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Zincke H. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point? *J Urol*. 2001;165(4):1146-51.
  46. Stephenson AJ, Shariat SF, Zelefsky MJ, Kattan MW, Butler EB, Teh BS, i sur. Salvage radiotherapy for recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *JAMA*. 2004;291(11):1325-32.
  47. Gamulin M. *Salvage* radioterapija. U: Šamija M. Zbornik radova 1. znanstvenog sastanka Tumori prostate s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb; 2013 Pro 6; Zagreb, Hrvatska. Zagreb: Zaklada Onkologija, HAZU razred za medicinske znanosti; 2013. Str. 35-49.
  48. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, i sur. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996;14(1):61-5.
  49. Wilkins MR, Appel RD, Van Eyk JE, Chung MC, Görg A, Hecker M, i sur. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics*. 2006;6(1):4-8.
  50. Hanash SM. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: Current status. *Electrophoresis*. 2000;21(6):1202-9.
  51. Kruse U, Bantscheff M, Drewes G, Hopf C. Chemical and pathway proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(10):1887-901. doi: 10.1074/mcp.R800006-MCP200.
  52. Celis JE, Moreira JM. Clinical Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(10):1779. doi: 10.1074/mcp.E800010-MCP200.
  53. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:49-79. doi: 10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.
  54. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-21.

55. Skenderović A. Primjena proteomske analize u indentifikaciji biomarkera karcinoma prostate. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2013.
56. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: W. H. Freeman; 2008.
57. Gallagher S, Chakavarti D. Staining Proteins in Gels. J Vis Exp. 2008;(17):760. doi: 10.3791/760.
58. Skoog DA, Holler FJ, Nieman. Principles of Instrumental Analysis. Philadelphia: Saunders College Publishing; 1998.
59. Galić N. Spektrometrija masa – za kolegij Instrumentalne analitičke metode II (interna skripta). Zagreb; 2004. str. 50.
60. Smith RM, Busch KL. Understanding mass spectra: a basic approach. [S.I.]: John Wiley & Sons Ltd; 1999.
61. Applied Biosystem [Internet]. [pristupljeno 02.01.2017.]. Dostupno na: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home.html>.
62. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, i sur. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988;2(3):151-53.
63. Ionization maldi. National high magnetic field laboratory [Internet]. [pristupljeno 04.05.2017.]. Dostupno na: [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_maldi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html).
64. Galić N, Cindrić M. Analiza proteina spektrometrijom masa. Kem. Ind. 2008;57(5):231-43.
65. Bordoli R, Carruthers R, Cotrell J, Hoyers J, Hughes C, Kapp E, i sur. Automated protein identification using ESI-MS-MS. U: Bordoli R, ur. Proceedings the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. Santa Fe: American Society for Mass Spectrometry; 1999. str. 50.
66. Meyer EF. The first years of the Protein Data Bank. Protein Sci. 1997;6(7):1591-7.
67. O'Donovan C, Martin MJ, Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A, Apweiler R. High-quality protein knowledge resource: SWISS-PROT and TrEMBL. Brief Bioinform. 2002;3(3):275-84.

68. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67.
69. Paweletz CP, Liotta LA, Petricoin EF. New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: laser capture microdissection and tissue proteomics. *Urology*. 2001;57(4 Suppl 1):160–3.
70. Paliouras M, Zaman N, Lumbroso R, Kapogeorgakis L, Beitel LK, Wang E, et al. Dynamic rewiring of the androgen receptor protein interaction network correlates with prostate cancer clinical outcomes. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(10):1020-32. doi: 10.1039/c1ib00038a.
71. Khamis ZI, Iczkowski KA, Sahab ZJ, Sang QX. Protein profiling of isolated leukocytes, myofibroblasts, epithelial, basal, and endothelial cells from normal, hyperplastic, cancerous, and inflammatory human prostate tissues. *J Cancer*. 2010;1:70-9.
72. Partin AW, Getzenberg RH, CarMichael MJ, Vindivich D, Yoo J, Epstein JI, et al. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res*. 1993;53(4):744-46.
73. Zheng Y, Xu Y, Ye B, Lei J, Weinstein MH, O'Leary MP, et al. Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery. *Cancer*. 2003;98(12):2576-82.
74. Ummanni R, Junker H, Zimmermann U, Venz S, Teller S, Giebel J, et al. Prohibitin identified by proteomic analysis of prostate biopsies distinguishes hyperplasia and cancer. *Cancer Lett*. 2008;266(2):171-85. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.047.
75. Alaiya AA, Al-Mohanna M, Aslam M, Shinwari Z, Al-Mansouri L, Al-Rodayan M, et al. Proteomics-based signature for human benign prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2011;38(4):1047-57. doi: 10.3892/ijo.2011.937.
76. Skvortsov S, Schäfer G, Stasyk T, Fuchsberger C, Bonn GK, Bartsch G, et al. Proteomics profiling of microdissected low- and high-grade prostate tumors identifies lamin a as a discriminatory biomarker. *J Proteome Res*. 2011;10(1):259-68. doi: 10.1021/pr100921j.

77. Howard EW, Leung SC, Yuen HF, Chua CW, Lee DT, Chan KW, i sur. Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(5):497-508. doi: 10.1007/s10585-008-9157-3.
78. Tan SS, Ahmad I, Bennett HL, Singh L, Nixon C, Seywright M, i sur. GRP78 up-regulation is associated with androgen receptor status, Hsp70-Hsp90 client proteins and castrate-resistant prostate cancer. *J Pathol*. 2011;223(1):81-7. doi: 10.1002/path.2795.
79. Bennett HL, Fleming JT, O'Prey J, Ryan KM, Leung HY. Androgens modulate autophagy and cell death via regulation of the endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 78/BiP in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2010;1:e72. doi: 10.1038/cddis.2010.50.
80. Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, Naitou H, Maeda N, Koizumi F, i sur. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer*. 2010;127(11):2685-98. doi:10.1002/ijc.25276.
81. Castilla C, Congregado B, Conde JM, Medina R, Torrubia FJ, Japón MA, i sur. Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. *Urology*. 2010;76(4):1017.e1-6. doi: 10.1016/j.urology.2010.05.045.
82. Johansson B, Pourian MR, Chuan YC, Byman I, Bergh A, Pang ST, i sur. Proteomic comparison of prostate cancer cell lines LNCaP-FGC and LNCaP-r reveals heatshock protein 60 as a marker for prostate malignancy. *Prostate*. 2006;66(12):1235-44.
83. Khan AP, Poisson LM, Bhat VB, Fermin D, Zhao R, Kalyana-Sundaram S, i sur. Quantitative proteomic profiling of prostate cancer reveals a role for miR-128 in prostate cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(2):298-312. doi:10.1074/mcp.M900159-MCP200.
84. Christensen E, Evans KR, Ménard C, Pintilie M, Bristow RG. Practical approaches to proteomic biomarkers within prostate cancer radiotherapy trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(3):375-85. doi: 10.1007/s10555-008-9139-6.
85. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, i sur. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000; 21(6):1037-53.

86. Molloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem.* 2000;280(1):1-10.
87. Patton WF. Detection technologies in proteome analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002;771(1-2):3-31.
88. Butorac A, Mekić MS, Hozić A, Diminić J, Gamberger D, Nišavić M, i sur. Benefits of selective peptide derivatization with sulfonating reagent at acidic pH for facile matrix-assisted laser desorption/ionization de novo sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2016;30(14):1687-94. doi: 10.1002/rcm.7594.
89. Lewis JK, Wei J, Siuzdak G. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. U: Meyers RA, ur. *Encyclopedia of analytical chemistry.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000. str. 5880-94.
90. de Hoffmann E., Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2007.
91. An overview of the College of American Pathologist Cancer Checklists. College of American Pathologists [Internet]. [pristupljeno 03.03.2017.]. Dostupno na: [http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/Overview\\_CAP\\_Cancer\\_Checklists\\_090115.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/Overview_CAP_Cancer_Checklists_090115.pdf).
92. Cheng L, Eble JN. *Molecular Surgical Pathology.* New York: Springer Science+Buisiness Media; 2013.
93. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics.* 3. izd. Oxford: Oxford University Press; 2012.
94. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, i sur. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D447-52. doi:10.1093/nar/gku1003.
95. Schmidt EM, Gu S, Anagnostopoulou V, Alevizopoulos K, Föllner M, Lang F, i sur. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor. *FEBS J.* 2012;279(7):1231-42. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08515.x.
96. Lawrence B, Perez-Atayde A, Hibbard MK, Rubin BP, Dal Cin P, Pinkus JL, i sur. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2000;157(2):377-84.
97. Xu W, Baribault H, Adamson ED. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 1998;125(2):327-37.

98. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
99. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987;48(4):549-54.
100. Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*. 2009;23(4):397-418. doi:10.1101/gad.1758709.
101. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):288-300. doi: 10.1038/nrm2871.
102. Millard M, Odde S, Neamati N. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics*. 2011;1:154-88.
103. Ezzell RM, Goldmann WH, Wang N, Parasharama N, Ingber DE. Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp Cell Res*. 1997;231(1):14-26.
104. Thompson PM, Tolbert CE, Campbell SL. Vinculin and metavinculin: oligomerization and interactions with F-actin. *FEBS Lett*. 2013;587(8):1220-9. doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.042.
105. Winkler J, Lünsdorf H, Jockusch BM. The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *J Struct Biol*. 1996;116(2):270-7.
106. Zhao XH, Laschinger C, Arora P, Szászi K, Kapus A, McCulloch CA. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 10):1801-9.
107. Golddyn AM, Rioja BA, Spatz JP, Ballestrem C, Kemkemer R. Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 20):3644-51. doi: 10.1242/jcs.054866.
108. Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, O'Brien ET, Superfine R, Burridge K. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol*. 2011;13(6):722-7. doi: 10.1038/ncb2254.
109. Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 1996;133(6):1403-15.
110. Goldmann WH, Ingber DE. Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and rac-dependent lamellipodia formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(2):749-55.

111. Wen KK, Rubenstein PA, DeMali KA. Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure. *J Biol Chem.* 2009;284(44):30463-73. doi: 10.1074/jbc.M109.021295.
112. Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):41-7.
113. Raval GN, Bharadwaj S, Levine EA, Willingham MC, Geary RL, Kute T, i sur. Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. *Oncogene.* 2003;22(40):6194-203.
114. Gunning P, O'Neill G, Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev.* 2008(1);88:1-35. doi:10.1152/physrev.00001.2007.
115. Wong YC, Tam NN. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation.* 2002;70(9-10):633-45.
116. Algaba F, Arce Y, Fernández S, Oliver A, Alcaraz A. Adhesion molecules expression as a potential marker of prostate cancer aggressivity. A TMA study of radical prostatectomy specimens. *Arch Ital Urol Androl.* 2006;78(4):130-4.
117. Li Y, Cozzi PJ. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(6):521-27.
118. Birkenmeier G, Stegemann C, Hoffmann R, Günther R, Huse K, Birkemeyer C. Posttranslational modification of human glyoxalase 1 indicates redox-dependent regulation. *PLoS One.* 2010;5(4):e10399. doi:10.1371/journal.pone.0010399.
119. Kalapos MP. On the promine/retine theory of cell division: now and then. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1426(1):1-16.
120. Baunacke M, Horn LC, Trettner S, Engel KM, Hemdan NY, Wiechmann V, i sur. Exploring glyoxalase 1 expression in prostate cancer tissues: targeting the enzyme by ethyl pyruvate defangs some malignancy-associated properties. *Prostate.* 2014;74(1):48-60. doi:10.1002/pros.22728.
121. Leung CL, Sun D, Liem RK. The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1-n (dystonin) in neurons. *J Cell Biol.* 1999; 144:435-46.



122. Leung CL, Sun D, Zheng M, Knowles DR, Liem RK. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J Cell Biol.* 1999;147(6):1275-86.
123. Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 2005;15(2):76-83.
124. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127(3):469-80.
125. Yokoyama NN, Shao S, Hoang BH, Mercola D, Zi X. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(1):27-44.
126. Chen HJ, Lin CM, Lin CS, Perez-Olle R, Leung CL, Liem RK. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev.* 2006;20(14):1933-45.
127. Hsiang CH, Tunoda T, Whang YE, Tyson DR, Ornstein DK. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. *Prostate.* 2006;66(13):1413-24.
128. Bizzarro V, Belvedere R, Migliaro V, Romano E, Parente L, Petrella A. Hypoxia regulates ANXA1 expression to support prostate cancer cell invasion and aggressiveness. *Cell Adh Migr.* 2017;11(3):247-260. doi:10.1080/19336918.2016.1259056.
129. Lokody I. Signalling: FOXM1 and CENPF: co-pilots driving prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(7):450-1. doi: 10.1038/nrc3772.
130. Aytes A, Mitrofanova A, Lefebvre C, Alvarez MJ, Castillo-Martin M, Zheng T, et al. Cross-species regulatory network analysis identifies a synergistic interaction between FOXM1 and CENPF that drives prostate cancer malignancy. *Cancer Cell.* 2014;25(5):638-51. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.017.
131. Hassounah NB, Nagle R, Saboda K, Roe DJ, Dalkin BL, McDermott KM. Primary cilia are lost in preinvasive and invasive prostate cancer. *PLoS One.* 2013;8(7):e68521. doi: 10.1371/journal.pone.0068521.
132. Reilly PT, Yu Y, Hamiche A, Wang L. Cracking the ANP32 whips: important functions, unequal requirement, and hints at disease implications. *Bioessays.* 2014;36(11):1062-71. doi: 10.1002/bies.201400058.

133. Kadkol SS, Brody JR, Pevsner J, Bai J, Pasternack GR. Modulation of oncogenic potential by alternative gene use in human prostate cancer. *Nat Med.* 1999;5(3):275-9.
134. Kadkol SS, El Naga GA, Brody JR, Bai J, Gusev Y, Dooley WC, i sur. Expression of pp32 gene family members in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;68(1):65-73.
135. Seo SB, Macfarlan T, McNamara P, Hong R, Mukai Y, Heo S, i sur. Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J Biol Chem.* 2002;277(16):14005-10.
136. Shen SM, Yu Y, Wu YL, Cheng JK, Wang LS, Chen GQ. Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):419-26. doi: 10.1093/carcin/bgp320.
137. Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, Läuter J, Rosolowski M, Tomm JM, i sur. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene.* 2011;30(26):2975-85. doi: 10.1038/onc.2011.15.
138. Riddell JR, Bshara W, Moser MT, Sperryak JA, Foster BA, Gollnick SO. Peroxiredoxin 1 Controls Prostate Cancer Growth through Toll-Like Receptor 4 Dependent Regulation of Tumor Vasculature. *Cancer research.* 2011;71:1637-46.
139. Riddell JR, Maier P, Sass SN, Moser MT, Foster BA, Gollnick SO. Peroxiredoxin 1 Stimulates Endothelial Cell Expression of VEGF via TLR4 Dependent Activation of HIF-1 $\alpha$ . *PLoS One.* 2012;7(11):e50394. doi: 10.1371/journal.pone.0050394.
140. Lee J-C, Kang S-U, Jeon Y, Park JW, You JS, Ha SW, i sur. Protein L-isoaspartyl methyltransferase regulates p53 activity. *Nat Commun.* 2012;3:927. doi: 10.1038/ncomms1933.
141. Cimmino A, Capasso R, Muller F, Sambri I, Masella L, Raimo M, i sur. Protein Isoaspartate Methyltransferase Prevents Apoptosis Induced by Oxidative Stress in Endothelial Cells: Role of Bcl-XI Deamidation and Methylation. *PLoS One.* 2008;3(9):e3258. doi: 10.1371/journal.pone.0003258.

142. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):482-6. doi: 10.1016/j.biocel.2008.02.011.
143. Prasad PD, Stanton JA, Assinder SJ. Expression of the actin-associated protein transgelin (SM22) is decreased in prostate cancer. *Cell Tissue Res* 2010;339(2):337-47. doi: 10.1007/s00441-009-0902-y.
144. Hunter SE, Spremulli LL. Interaction of mitochondrial elongation factor Tu with aminoacyl-tRNAs. *Mitochondrion.* 2004;4(1):21-9.
145. Valente L, Shigi N, Suzuki T, Zeviani M. The R336Q mutation in human mitochondrial EFTu prevents the formation of an active mt-EFTu.GTP.aa-tRNA ternary complex. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):791-5. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.002.
146. Lei Y, Wen H, Ting JP. The NLR protein, NLRX1, and its partner, TUFM, reduce type I interferon, and enhance autophagy. *Autophagy.* 2013;9(3):432-3. doi: 10.4161/auto.23026.
147. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(2):133-42.
148. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature.* 2000;406(6795):532-5.
149. Gildea JJ, Golden WL, Harding MA, Theodorescu D. Genetic and phenotypic changes associated with the acquisition of tumorigenicity in human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27(3):252-63.
150. Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF Jr. Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3800-6.
151. Hu LD, Zou HF, Zhan SX, Cao KM. Biphasic expression of RhoGDI2 in the progression of breast cancer and its negative relation with lymph node metastasis. *Oncol Rep.* 2007;17(6):1383-9.
152. Shida A, Fujioka S, Takahashi N, Aoki H, Okamoto T, Mitsumori N, et al. Reduced expression of Rho GDP dissociation inhibitor 2 mRNA is associated with lymph node metastasis in gastric carcinoma. *Oncol Lett.* 2013;6(2):463-7.

153. Artero-Castro A, Callejas FB, Castellvi J, Kondoh H, Carnero A, Fernández-Marcos PJ, i sur. Cold-Inducible RNA-Binding Protein Bypasses Replicative Senescence in Primary Cells through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Activation. *Mol Cell Biol.* 2009;29(7):1855-68. doi: 10.1128/MCB.01386-08.
154. Pruitt FL, He Y, Franco OE, Jiang M, Cates JM, Hayward SW. Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium. *Prostate.* 2013;73(5):476-88. doi: 10.1002/pros.22589.
155. Hara I, Miyake H, Yamanaka K, Hara S, Kamidono S. Serum cathepsin D and its density in men with prostate cancer as new predictors of disease progression. *Oncol Rep.* 2002;9(6):1379-83.
156. Kim YS, Hwan Do J, Bae S, Bae DH, Shick Ahn W. Identification of differentially expressed genes using an annealing control primer system in stage III serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer.* 2010;10:576. doi: 10.1186/1471-2407-10-576.
157. Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, Santangelo R, Cardile V, Barbagallo I, i sur. The DDAH/NOS pathway in human prostatic cancer cell lines: antiangiogenic effect of L-NAME. *Int J Oncol.* 2010;39(5):1303-10. doi: 10.3892/ijo.2011.1107.
158. Whitaker HC, Warren AY, Eeles R, Kote-Jarai Z, Neal DE. The potential value of microseminoprotein-beta as a prostate cancer biomarker and therapeutic target. *Prostate.* 2010;70(3):333-40. doi: 10.1002/pros.21059.
159. Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EI, Willis AC, Reid KB. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J Exp Med.* 1994;179(6):1809-21.
160. Zhang X, Zhang F, Guo L, Wang Y, Zhang P, Wang R, i sur. Interactome Analysis Reveals that C1QBP (complement component 1, q subcomponent binding protein) Is Associated with Cancer Cell Chemotaxis and Metastasis. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(11):3199-209. doi: 10.1074/mcp.M113.029413.
161. Amamoto R, Yagi M, Song Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, Naito S, i sur. Mitochondrial p32/C1QBP is highly expressed in prostate cancer and is associated with shorter prostate-specific antigen relapse time after radical prostatectomy. *Cancer Sci.* 2011;102(3):639-47. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01828.x.

162. Wang Q, Shen B, Chen L, Zheng P, Feng H, Hao Q, et al. Extracellular calumenin suppresses ERK1/2 signaling and cell migration by protecting fibulin-1 from MMP-13-mediated proteolysis. *Oncogene*. 2015;34(8):1006-18. doi: 10.1038/onc.2014.52.
163. Nirdé P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, et al. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(1):117-27. doi: 10.1038/onc.2009.311.
164. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*. 1998;80(2):183-201.

## 11. ŽIVOTOPIS

Meliha Solak Mekić, dr.med, specijalist radioterapije i onkologije, rođena je u Livnu 18. rujna 1976. godine. Maturirala je u V. gimnaziji u Zagrebu. Diplomirala je u rujnu 2001. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Obavezni pripravnički staž obavila je u OB "Sveti duh" nakon čega je 2002. položila državni ispit. Od 2001. do 2003. bila je znanstveni novak u Klinici za ginekologiju i porodništvo OB "Sveti duh". 2009. godine je položila specijalistički ispit iz radioterapije i onkologije i od tada radi na Zavodu za radioterapiju i internističku onkologiju Klinike za tumore. Udana je i majka dvoje djece.

## PRILOZI

**Tablica 30. Proteini prisutni pojedinačno u uzorcima zdravog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika. Identificirani su pretragom baze podataka NCBI nr.**

Ispitanik	Oznaka na gelu	Ime proteina
ZZ	59	complement component C3
ZZ	61	actin prepeptide
ZZ	62	zinc finger protein 569
ZZ	65	dedicator of cytokinesis 9, isoform CRA_i
ZZ	67	vinculin, isoform CRA_a
ZZ	68	NuMA protein
ZZ	69	immunoglobulin heavy chain variable region
ZZ	69	suppression of tumorigenicity 5 protein isoform 2
ZZ	73	Chain B, Human Hemoglobin A Mutant Beta H63w Carbonmonoxy-Form
ZZ	74	centromere protein F
ZZ	75	KIAA0402
ZZ	75	pericentrin B
ZZ	76	annexin A1, isoform CRA_c
ZZ	77	dystrobrevin alpha isoform 8
ZZ	77	CTCL tumor antigen se20-7
ZZ	78	hypothetical protein LOC27146
ZZ	79	CENP-F kinetochore protein
ZZ	81	carbonic anhydrase 1
ZZ	82	beta globin chain
ZZ	83	beta-hemoglobin
alfa G3	24	Tpr
alfa G3	24	HDCMA18P protein, isoform CRA_b
alfa G3	31	proapolipoprotein
alfa G3	32,33	Chain A, Structure Of Human Annexin A2 In The Presence Of Calcium Ions
alfa G3	34	hCG2027094
alfa G3	34	antigen KI-67 isoform
alfa G3	35	hCG1640777, isoform CRA_b
alfa G3	36	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_d
alfa G3	37	zinc finger protein 718
alfa G3	37	Chain B, T-To-T(High) Quaternary Transitions In Human Hemoglobin: Deshis146beta Deoxy Low-Salt
alfa G4	1	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2
alfa G4	1	tropomyosin 4-anaplastic lymphoma kinase fusion protein
alfa G4	5	nebulin, isoform CRA_d
alfa G4	10	calponin-1
alfa G4	18	myosin, heavy polypeptide 7B, cardiac muscle, beta, isoform CRA_c
alfa G4	20	zinc finger protein 658
alfa G4	22	hemoglobin subunit alpha
alfa G4	24	myosin-4
alfa G4	27	ankyrin G
alfa G4	28	M4 protein deletion mutant
alfa G5	54	Collagen alpha-5(VI) chain
alfa G5	55	ZNF266 protein
alfa G8	13	Chain J, Crystal Structure Of The Mammalian 20s Proteasome At 2.75A
alfa G8	14,15	anhydrase,carbonic
alfa G8	16	unnamed protein - Janus/Ocnus domain - phosphohistidine phosphatase
alfa G8	2	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
alfa G8	3	rho GDP-dissociation inhibitor 2
alfa G8	6	HP1Hs-gamma

alfa G8	16	hemoglobin beta chain
alfa G10	28	CGI-150 protein
alfa G10	29	annexin A3
alfa G10	30	unnamed protein product - prostatic acid phosphatase
alfa G10	33	nonhistone chromosomal protein HMG-1
alfa G10	37	microseminoprotein beta
alfa G10	38	cofilin-1
alfa G11	18	smooth muscle/nonmuscle myosin light chain kinase
alfa G11	18,19	dermatopontin
alfa G11	21	POTE ankyrin domain family member E
alfa G11	23	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1
alfa G11	24	Chain A, Atpase Domain Of Human Heat Shock 70kda Protein 1
alfa G11	24	unnamed protein product - Hsp 70 kDa like
alfa G11	27	Homo sapiens p20 protein
alfa G11	30	Chain I, The Refined 2.4 Angstroms X-Ray Crystal Structure Of Recombinant Human Stefin B In Complex With The Cysteine Proteinase Papain: A Novel Type Of Proteinase Inhibitor Interaction
alfa G11	31	unnamed protein product - beta-globin like protein
alfa G12	35	desmin
alfa G12	36	unnamed protein product - Hsp 70kDa like
alfa G12	37	unnamed protein product - Hsp 70kDa like
alfa G12	40	actin, alpha, cardiac muscle, isoform CRA_c
alfa G12	42	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle, isoform CRA_d
alfa G12	44	myosin light chain 2
alfa G12	45,46	ferritin light subunit, partial
alfa G12	47	Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured
alfa G12	48	unnamed protein product - Cu/Zn superoxide dismutase
alfa G12	51	manganese superoxide dismutase (MnSOD)
alfa G12	52	unnamed protein product - Iron/manganese superoxide dismutases
alfa G12	53	Chain A, U7ub7 Disulfide Variant

**Tablica 31. Proteini prisutni pojedinačno u uzorcima tumorskog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika. Identificirani su pretragom baze podataka NCBIInr.**

Ispitanik	Oznaka na gelu	Ime proteina
alfa G7	6	zinc finger protein 600
alfa G7	8	ZNF268B
alfa G7	11	prostate cancer antigen T21
alfa G7	16	hemoglobin beta chain variant Hb.Sinai-Bel Air
alfa G7	17	alpha 2 globin variant
alfa G7	13,14	beta-globin
alfa G6	18	golgin-245
alfa G6	19	heat shock protein gp96 precursor
alfa G6	19	tumor rejection antigen (gp96) 1
alfa G6	20	BiP protein
alfa G6	21	mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1
alfa G6	25	giantin
alfa G6	26	antigen KI-67 isoform 1
alfa G6	27	Chain A, Crystal Structure Of A Soluble Dimeric Form Of Oxidised Clic1



---

alfa G6	27	nuclear chloride channel
alfa G6	28	PSME2
alfa G6	29	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1
alfa G6	30	prohibitin
alfa G1	43	kyphoscoliosis peptidase, isoform CRA_b
alfa G1	44	complement component 3, isoform CRA_a
alfa G1	45	Chain A, Complement C3b In Complex With Factor H Domains 1-4
alfa G1	46	beta-myosin heavy chain
alfa G1	47	tropomyosin 3, isoform CRA_d
alfa G1	48	PES1
alfa G1	49	Chain A, 14-3-3 Protein Theta (Human) Complexed To Peptide
alfa G1	50	pectin isoform 1e
alfa G1	54	vesicle-associated membrane protein 5
alfa G1	54	MHC class II antigen
alfa G3	61	dystonin, isoform CRA_k
alfa G3	64	nuclear mitotic apparatus protein 1
alfa G5	60	smooth muscle myosin heavy chain
alfa G5	62	hypothetical protein, isoform CRA_c
alfa G5	69	calmodulin
alfa G4	31	Chain B, Crystal Structure Of Human Fibrinogen
alfa G4	35	KIAA0324 protein
alfa G4	36	Full=Myosin-6
alfa G4	39	myosin-like protein
alfa G8	4	Unnamed protein - Polymerase I and transcript release factor
alfa G8	9	L-isoaspartyl/D-aspartyl protein carboxyl methyltransferase
alfa G8	10	Chain L, Crystal Structure Of Fab' From The Hiv-1 Neutralizing Antibody 2f5 In Complex With Its Gp41 Epitope
alfa G8	10	Unnamed protein - albumin domain
alfa G8	11	peroxiredoxin-1
alfa G8	12	malate dehydrogenase, cytoplasmic isoform 2
alfa G9	17	apoptosis-inducing factor 2
alfa G9	18	thiomorpholine-carboxylate dehydrogenase isoform 1
alfa G9	20	Chain A, Crystal Structure Of The Human Co-Chaperone P23
alfa G9	21	arginase-2, mitochondrial precursor
alfa G9	22	unnamed protein (prostatic acid phosphatase)
alfa G9	24	immunoglobulin kappa 4 light chain
alfa G9	25	unnamed protein product (Esterase_lipase, Dienelactone hydrolase)
alfa G9	25	Chain A, Crystal Structure Of Recombinant Human Triosephosphate Isomerase At 2.8 Angstroms Resolution. Triosephosphate Isomerase Related Human Genetic Disorders And Comparison With The Trypanosomal Enzyme
alfa G9	26	glutathione S-transferase theta-2
alfa G9	27	manganese superoxide dismutase (MnSOD)
alfa G9	29	Chain F, Atomic Structures Of Wild-Type And Thermostable Mutant Recombinant Human Cu, Zn Superoxide Dismutase
alfa G9	32	PRO2044 - albumin
alfa G10	1	set
alfa G10	4,5	cold-inducible RNA-binding protein
alfa G10	6	myosin light chain 2
alfa G10	6	myosin regulatory light chain 12B
alfa G10	7	eukaryotic translation initiation factor 5A-1 isoform B
alfa G10	7	myosin regulatory light chain 12A
alfa G10	14	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1
alfa G10	14	cathepsin D preproprotein
alfa G10	15	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
alfa G10	16	platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta isoform a
alfa G10	18	UMP-CMP kinase isoform a
alfa G10	19	glutathione peroxidase
alfa G10	20	small ubiquitin-related modifier 2 precursor
alfa G10	21	beta-glucuronidase precursor

---

---

alfa G10	22	ferritin light subunit, partial
alfa G10	25	profilin-2 isoform b
alfa G10	27	BolA-like protein 2
alfa G11	2	laminin-binding protein
alfa G11	5	proapolipoprotein, partial
alfa G11	7	coactosin-like protein
alfa G11	8	haptoglobin Hp2
alfa G11	9	Nm23 protein
alfa G11	10	fatty acid-binding protein
alfa G11	11	annexin A7 isoform 1
alfa G11	12	alpha-enolase isoform 1
alfa G11	16	hnRNP-E1
alfa G12	1	80K-H protein
alfa G12	2,14	GRP78 precursor, partial
alfa G12	4	vimentin
alfa G12	7	myosin regulatory light polypeptide 9 isoform a
alfa G12	8	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 isoform 1
alfa G12	8	L-lactate dehydrogenase B chain
alfa G12	9	alpha-tubulin
alfa G12	10	G protein beta subunit
alfa G12	10,11	capping protein alpha, partial
alfa G12	11	unnamed protein product
alfa G12	11	gamma-actin, partial
alfa G12	12	heme-binding protein 1
alfa G12	13	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit isoform 1
alfa G12	14	carbonyl reductase [NADPH] 3
alfa G12	15	endoplasmic reticulum resident protein 29 isoform 1 precursor
alfa G12	16	enoyl-CoA hydratase
alfa G12	17	heat shock protein 27
alfa G12	18	Myosin heavy chain (MHY11) (3'partial)
alfa G12	19	thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial isoform a precursor
alfa G12	20	Chain A, Structure And Dynamics Of The Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Determined By Nmr Spectroscopy. Loop Mobility In A Four-Helix-Bundle Protein
alfa G12	21	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
alfa G12	23	fructose-1,6-bisphosphatase
alfa G12	26	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1
alfa G12	27	Chain A, Atpase Domain Of Human Heat Shock 70kda Protein 1
alfa G12	28	S-formylglutathione hydrolase
alfa G12	29	actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein
alfa G12	30	smooth muscle protein
alfa G12	31	Chain A, Cyclophilin A Complexed With Dipeptide Gly-Pro
alfa G12	32	cysteine and glycine-rich protein 1 isoform 1
alfa G12	32	neuropolypeptide h3
alfa G12	33	chaperonin 10-related protein
alfa G12	33	histone cluster 2, H3, pseudogene 2
alfa G12	33	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G

---

**Tablica 32. Proteini prisutni u više uzoraka zdravog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika. Identificirani su pretragom baze podataka NCBIInr.**

Ispitanik	Oznaka na gelu	Ime proteina
ZZ	58	tropomyosin isoform
alfa G5	50	
alfa G3	25	semenogelin I, isoform CRA_b
alfa G4	14	semenogelin I
alfa G8	18	smooth muscle protein - transgelin
alfa G11	26,28	
alfa G12	49,50	
alfa G4	16	transgelin
alfa G8	19,20	
alfa G9	14	
alfa G10	40	
alfa G9	8	eukaryotic translation initiation factor 5A-1 isoform B
alfa G10	34	
alfa G10	28	alpha-actin
alfa G11	21	
alfa G12	40	
alfa G10	39	alpha-crystallin B chain
alfa G11	29	
alfa G11	20	unnamed protein product - Desmin like
alfa G12	38	
alfa G11	22	unnamed protein product - nt binding domain of sugar kinase, actin similar
alfa G12	39,41	
alfa G4	9	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
alfa G11	25	
ZZ	56,57	tropomyosin beta chain isoform 2
alfa G12	34	
ZZ	71	antigen KI-67 isoform 1
alfa G4	2	
ZZ	80	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67, isoform CRA_a
alfa G5	46	

**Tablica 33. Proteini prisutni u više uzoraka tumorskog tkiva od alfa G1 do alfa G12 ispitanika. Identificirani su pretragom baze podataka NCBIInr.**

Ispitanik	Oznaka na gelu	Ime proteina
alfa G1	32	Glyoxalase I
alfa G2	32	
alfa G6	32	
alfa G7	7	Chain A, Human Glyoxalase I With Benzyl-Glutathione Inhibitor
alfa G10	13	
alfa G1	4	Vinculin
alfa G2	4	
alfa G6	4	
alfa G7	4	
alfa G1	3,5	hypothetical protein LOC643677

---

alfa G2	3	
alfa G6	3,5	
alfa G7	3,5	
alfa G3	60,64	macrophin 1 isoform 2
alfa G5	66	
alfa G7	12	
alfa G5	66	microtubule-actin cross-linking factor 1 isoform a
alfa G1	53	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_i
alfa G7	12	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_e
alfa G3	65	microtubule-actin crosslinking factor 1, isoform CRA_b
alfa G1	35	fetal-myosin heavy chain (1437 AA)
alfa G3	45	
alfa G6	35	
alfa G1	9	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal, isoform CRA_a
alfa G5	72	
alfa G7	9	
alfa G2	1,2	tropomyosin isoform
alfa G7	1,2	
alfa G1	8	CLL-associated antigen KW-4 splice variant 2
alfa G7	8	
alfa G3	69	centrosomal protein 290kDa, isoform CRA_b
alfa G7	11	
alfa G1	34	MHC class I promoter binding protein
alfa G6	34	
alfa G2	36	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
alfa G6	36	
alfa G2	37	MYO18B protein
alfa G6	37	
alfa G5	65	
alfa G5	70	
alfa G1	38	unnamed protein hCG2011852
alfa G6	38	
alfa G1	39,51	myosin-8
alfa G6	39	
alfa G1	40	Chain A, Crystal And Molecular Structure Of Human Plasminogen Kringle
alfa G6	40	4 Refined At 1.9-Angstroms Re
alfa G1	41	TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2
alfa G2	41	
alfa G8	1	acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
alfa G10	2	
alfa G9	24	prostate specific antigen precursor, partial
alfa G9	28	
alfa G10	24	
alfa G12	25,28	
alfa G9	23	elongation factor Tu
alfa G11	13	
alfa G11	1	calumenin
alfa G12	3	
alfa G11	3	unnamed protein product - SF2p32
alfa G12	5	
alfa G11	4	heme-binding protein 2
alfa G12	6	
alfa G11	14	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]
alfa G12	22	
alfa G11	15	unnamed protein product - N-acetylneuraminate synthase like
alfa G12	22,23	
alfa G11	17	annexin A1
alfa G12	24	

---

Imena proteina i njihove funkcije po redoslijedu pojavljivanja u interaktomima:

VLC

Vinkulin sudjeluje u adheziji stanica i vezanju mikrofilamenata aktina na membranu. Ima ulogu u staničnoj morfologiji i migraciji (1134 aa).

MYH 1

Miozin 1 (Miozin teški lanac, skeletni mišić, odrasli 1) nalazi se u skeletnim mišićima i ima ulogu u njihovoj kontrakciji (1939 aa).

ZNF268

Cink prsten protein 268 (cink prsten protein HZF3, ZNF 268) ima ulogu u regulaciji transkripcije (947 aa).

YWHAQ

Tirozin 3 monooksigenaze/triptofan 5-monooksigenaze aktivacijski protein (14-3-3 protein *teta*) ima ulogu u regulaciji širokog spektra općih i specijaliziranih signalnih puteva. Nakon prepoznavanja fosfoserinskog ili fosfotreoninskog motiva veže se na cijeli niz proteina te uzrokuje modulaciju njihove aktivnosti (245 aa).

C3

Komponenta komplementa C3 sudjeluje u aktivaciji sustava komplementa (glavnom i alternativnom). Nakon aktivacije kovalentno se veže na karbohidrate ili imuno agregate na površini stanice (1663 aa).

VAMP5

Vezikula-vezani membranski protein 5 (Miobrevin) ima ulogu u miogenezi, prvenstveno u fuziji mioblasta i/ili GLUT 4 prometu (116 aa).

PLG

Plazminogen (Aktivacijski peptid, Angiostatin, Plazmin teški lanac A) ima ulogu u čitavom nizu fizioloških procesa (embrionalni razvoj, remodeliranje tkiva, upala, širenje tumora). Sudjeluje u razgrađivanju fibrina na površini krvnih ugrušaka te aktiviranju i cijepanju više faktora zgrušavanja i komponenti komplementa (810 aa).

CCDC168

Smotana-uzvojnica domena-sadržavajući protein 168 čija je funkcija nepoznata (2452 aa).

PLEC

Plektin je protein iz skupine spektraplakina. Sudjeluje u vezanju intermedijarnih filamenata za mikrotubule i mikrofilamente te u njihovom sidrenju za dezmosome ili

hemidezmosome. Ima ulogu, osim stabilizacije citoskelta, i u njegovoj dinamici. Veže protein mišića(aktin) za njegove mambranske komplekse (4684 aa).

#### TPM4

Tropomiozin 4 je jedna od izoformi tropomiozina. Veže se na filamente aktina u mišićnim i drugim stanicama. U glatkim mišićnim stanicama tvori kompleks s troponinom te sudjeluje u njihovoj kontrakciji. U ostalim stanicama stabilizira aktinski citoskelet (284 aa).

#### PES1

Pescadillo homolog 1 je komponenta PeBoW kompleksa koji je potreban za sazrijevanje ribosomalnih RNA (28S i 5.8S) i formiranje ribosoma 60S (588 aa).

#### MYH7

Miozin teški lanac 7 ima ulogu u kontrakciji srčanog mišića (1935 aa).

#### HLA-DRB1

HLA klase II antigen je antigen tkivne histokompatibilnosti (299 aa).

#### MACF1

Mikrotubul-aktin ukriženo-vežući faktor (Aktin ukriženo-vežuće obitelji protein 7) ima ulogu u vezanju proteina citosketa. Na N terminalnu domenu veže aktin te istovremeno na C terminalnu domenu veže mikrotubule. Pripada obitelji ukriženo-vežućih proteina jer može vezati aktin za druge citoskeletne proteine. Ima važnu ulogu u stabilizaciji mikrotubula na stanični korteks, što je posredovano ERBB2. Djeluje kao pozitivni regulator Wnt receptora, dijela istoimenog signalnog puta, koji je značajan kod karcinoma prostate. Ima aktivnosti ATPaze, reguliranu aktinom i neophodan je za kontroliranje sastava i dinamike fokalnih adhezija. Može igrati ulogu u isporuci transportnih vezikula koje sadrže GPI povezane proteine iz trans-Golgi mreže, preko njegove interakcije s GOLGA 4. Ima ključnu ulogu u cijeljenju rana i migraciji epidermalnih stanica (5938 aa).

#### TPM3

Tropomiozin 3 je izoforma tropomiozina (285 aa).

#### GLO1

Glioksilaza 1 (EC 4.4.1.5, Laktoilglutation liaza, S-D-laktoilglutation metilglioksal liaza) enzim koji katalizira konverziju hemimerkaptala koji je formiran od metilglioksala i glutaciona u S-laktoilglutation. Smatra se da potiče proliferaciju stanica, ali sam mehanizam djelovanja je nepoznat (184 aa).

## RXRB

Receptor retinoične kiseline RXR-beta (Retinoid X receptor beta); pripada podobitelji 2 nuklearnog receptora, grupa B član 2. Smatra se da regulira ekspresiju gena u mnogim biološkim procesima (537 aa).

## NUMA1

Jezgrin mitotičkog aparata protein 1 (SP-H antigen) je strukturna komponenta jezgre te sudjeluje u mitozu. Protein je smješten u jezgri otkud se u ranoj mitozu seli u centrosome. Ima ulogu u organizaciji i stabilizaciji diobenog vrtena od rane mitoze do anafaze. Za vrijeme rane mitoze sudjeluje u vezanju mikrotubula diobenog vrtena na centrosom gdje ostaje do kraja anafaze kada se ponovno vraća u jezgru. Ustanovljeno je da je NUMA supstrat aurora A kinaze u PC-3 stanicama karcinoma prostate. To je serin-treonin kinaza koja ima karakteristike onkogena *in vivo* čija je povećana ekspresija povezana s višim supnjevim tumorima prostate (2115aa).

## MYH8

Miozin 8 (Miozin teški lanac, skeletni mišić, perinatalni, MyHC-perinatalni) je perinatalna izoforma miozina koja se nalazi u skeletnim mišićima i sudjeluje u njihovoj kontrakciji (1937 aa).

## KY

Kifoskoliozis peptidaza (EC 3.4.-.-) je proteaza uključena u funkciju, sazrijevanje i stabilizaciju neuromuskularnih veza. Enzim je vezan uz citoskelet, sudjeluje u cijepanju mišićno-specifičnih proteina (npr. FLNC) i neophodan je za uredan rast mišića (661 aa).

## ACTA2

Aktin (Glatki mišić aorte, Staničnog rasta-inhibirajućeg gena 46 protein) ima ulogu u motilitetu stanica i specifičan je za glatke mišićne stanice aorte (377 aa).

## CA1

Karbonska anhidraza 1 (EC 4.2.1.1, Karcinom renalnih stanica vezani antigen G 250) je enzim koji ima ulogu reverzibilne hidracije karbon dioksida te sudjeluje u regulaciji pH. Smatra se da sudjeluje u proliferaciji stanica i transformaciji te ima ulogu potencijalnog novog biomarkera tumora cerviksa (459 aa).

## ANXA1

Aneksin A1 (Fosfolipaze A2 inhibitorni protein) veže kalcij i fosfolipide. Regulira aktivnost fosfolipaze 2, potiče fuziju membrane i sudjeluje u egzocitozi. Ovisno o vrsti tumora ima ulogu tumorpromotora ili supresora. Nadeksprimiran je u tumorima

želuca, žučnjaka, dojke, pluća i penisa, a podeksprimiran je u tumorima usne šupljine. Kod posljednjih, smatra se potencijalnim biomarkerom slabo-diferenciranih planocelularnih karcinoma te čimbenikom koji može izdvojiti bolesnika s dobrim odgovorom na liječenje najčešće korištenim kemoterapijskim protokolom. Pojačana aktivnost nalazi se u gliomima i posredovana je s FoxM1. Kod karcinoma prostate i njegovih prekanceroznih lezija je podeksprimiran, a učinak na agresivnost samog tumora još uvijek nije u potpunosti objašnjen (346 aa).

#### FAM184B

Obitelj s sličnošću sekvence 184, član B čija je funkcija nepoznata (1060 aa).

#### TPM1

Tropomiozin 1 alfa je izoforma tropomiozina (284 aa).

#### ALB

Albumin ima sposobnost vezanja vode, elektrolita, masnih kiselina, hormona, bilirubina i lijekova. Glavna mu je uloga u regulaciji osmotskog tlaka krvi (609 aa).

#### ST5

Supresije tumorogenosti 5 protein, izoforma 2 (DENN domena-sadržavajući protein 2B, ST5) potiče izmjenu GDP u GTP uzrokujući konverziju inaktivnih Rab proteina vezanih s GDP-om u aktivni GTP oblik. Smatra se da sudjeluje u organizaciji citoskeleta i tumorogenosti (1137 aa).

#### ZNF569

Cink prsten protein 569 (Kreppel C2H2-tip cink-prsten protein 569); Smatra se da sudjeluje u regulaciji transkripcije (686 aa).

#### HBB

Hemoglobin beta sudjeluje u transportu kisika (147 aa).

#### MYO18B

Nekonvencionalni miozin-XVIIIIB (TRAFAC razred miozin-kinezin ATPaze, Miozin) sudjeluje u unutarstaničnom prometu u mišićnim stanicama, za vrijeme smještaja u citoplazmi. Nakon ulaska u jezgru, regulira mišićno-specifične gene. Smatra se da ima ulogu u kontroli razvoja tumora i njegove progresije. Obnovljena ekspresija u stanicama karcinoma pluća suprimira njihov neovisan rast (2567 aa).

#### GOLGA4

Golgi autoantigen (Golgin podobitelj A član 4, Trans-Golgi p230); Ima ulogu u vezikularnom transportu iz trans-Golgi mreže preko interakcije s MACF1 (2230 aa).



## PCNT

Pericentrin (Pericentrin-B); Sastavni dio centrosoma koji sudjeluju u početnoj uspostavi mreže mikrotubula za vrijeme mejoze i mitoze. Sudjeluje u formiranju mreže mikrotubula kao sastavni dio pericentriolnog materijala (zajedno s DISC 1). Smatra se da inhibira aktivnost NEK2 i da na taj način sprečava prerano razdvajanje centrosoma za vrijeme interfaze (3336 aa).

## TPM2

Tropomiozin 2 je izoforma tropomiozina (284 aa).

## CENPF

Centromere protein F (Mitozin, Kinetohore protein CENPF) ima ulogu u funkcioniranju kinetohore i segregaciji kromosoma u mitozu. Za vrijeme interfaze smješten je u citoplazmi. Predstavlja vezu između reciklirajućih vezikula i mreže mikrotubula, vežući se za STX4 i SNAP25 te na taj način regulira recikliranje membrane. Smatra se potencijalnim inhibitorom RB proteina za vrijeme embrionalnog razvoja, tj. dijeljenja i proliferacije stanica. Preko C kraja sudjeluje u regulaciji DNA sinteze i potiče progresiju staničnog ciklusa. Ima potencijalnu ulogu u regulaciji skeletne miogeneze i diferencijacije stanica u embriogenezi. Preko C kraja sudjeluje u regulaciji DNA sinteze, stoga potiče progresiju staničnog ciklusa. Ima potencijalnu ulogu u regulaciji skeletne miogeneze i diferencijaciji stanica za vrijeme embriogeneze (3114 aa).

## MKI67

Antigen Ki-67, neophodan za održavanje proliferacije (3256 aa).

## DOCK9

Prenositelj od citokineze proteina 9 (Cdc42 gvanin nukleotid razmjene faktor zizimin 1) je gvanin nukleotid-razmjenjujući faktor koji aktivira Cdc42 zamjenjujući vezani GDP za slobodni GTP. Prekomjerna ekspresija inducira nastanak filopodia (2068 aa).

## DTNA

Distrobrevin-alfa (Distrofinu srodan protein 3); smatra se da sudjeluje u nastanku i održavanju stabilnosti sinapsi. Sudjeluje u formiranju klastera nikotinsko-acetilkolinskih receptora (743 aa).

## ENSG00000223931

nepoznat protein (97 aa).

## DST

Distonin (230/240 kDa bulozni pemfigoid antigen) ima ulogu veznog protein citoskeleta te integrira intermedijarne filamente, aktin i mikrotubule u mrežu citoskeleta. Potreban za sidrenje intermedijarnih elemenata u aktinski skelet u mišićnim i živčanim stanicama te za unutrašnju stranu hemidezmosoma u epitelnim stanicama. Može se samoagregirati i formirati filamente ili dvodimenzionalnu mrežu (5171 aa).

#### TAGLN

Transgelin (Glatkog mišića protein 22-alfa, SM22-alfa) veže se na F-aktin i važan je za kontraktilna obilježja stanice. Sudjeluje u interakcija posredovanim vezanjem kalcija i ima ulogu tumorsupresora. Sudjeluje u apoptozi aktivacijom i translokacijom p53 iz jezgre u citoplazmu. Razine transgelina često su smanjene u linijama tumorskih stanica dok su povećane tijekom starenja što upućuje na njegovu ulogu kod donošenja sudbinskih odluka stanice. Inhibira metaloproteinazu 9 (MMP9) koja ima ulogu u metastaziranju i epitelno-mezenhimalnoj tranziciji. Kod karcinoma prostate ekspresija transgelina pada kako bolest progredira. Sprečava vezanje koaktivatora na AR i njegovu translokaciju u jezgru kod kastracijski rezistentnog oblika bolesti (201 aa).

#### CEP290

Centrosomalni protein od 290 kDa (Bardet-Biedl sindrom 14 protein); Smješten u centrosomima i cilijama gdje je dio kompleksa važnog za tkivno-specifičnu ciliogenezu. Ima ulogu u regulaciji transporta i sastavu cilijarne membrane. Veže se na minus kraj mikrotubula i aktivira ATP4 posredovanu transkripciju. Primarne cilije suprimiraju Wnt signalni put. Kod karcinoma prostate su disfunkcionalne te se smatra da posreduju pojačanu aktivnost Wnt puta (2479 aa).

#### APOA1

Apolipoprotein A-I sudjeluje u reverznom transportu kolesterola iz tkiva u jetru. Potiče refleks kolesterola iz tkiva i kofaktor je lecithin kolesterol acetiltransferaze. Preko SPAX kompleksa, čiji je član, sudjeluje u aktiviranju motileteta spermatozoa (267 aa).

#### ZNF141

Cink prsten protein 141 je represor koji sudjeluje u regulaciji transkripcije. Ima ulogu u razvoju ekstremiteta (474 aa).

#### CEP135

Centrosomalni protein od 135 kDa (Centrosomalni protein 4) ima ulogu protein nosača za vrijeme rane biogeneze centriola. Platforma je za CEP250 te na taj način sudjeluje u centriol-centriol koheziji za vrijeme interfaze (1140 aa).

#### LARP7

La-vezani protein 7 (P-TEFb-interakcije protein za stabilnost 7SK); Ima ulogu negativnog transkripcijskog regulatora, koji djeluje preko 7SK RNP sustava. Unutar 7SK RNP kompleksa, pozitivni transkripcijsko-elongacijski factor b (P-TEFb) je u inaktivnom obliku, na taj način sprečavajući RNA polimeraze II fosforilaciju i posljedičnu transkripcijsku elongaciju (582 aa).

#### ANXA2

Aneksin A2 (Placentni antikoagulantni protein IV, PAP-IV) ima ulogu transportera u aneksinskoj obitelji. Vezan je na membranu, a regulira ga kalcij. Veže dva iona kalcija s velikim afinitetom, a taj učinak pojačavaju anionski fosfolipidi. Sudjeluje u odgovoru na toplinski stres. Veže se na članove obitelji niske gustoće lipidnih receptora te ima ulogu u regulaciji homeostaze kolesterola iz plazme. Supstrat je za *v-Src* i regulator je dinamike aktina. Ta je uloga važna kod transformacije stanica posredovane *v-Src* koja uključuje reorganizaciju aktinskog citoskeleta i razdvajanje fokalnih adhezija (357 aa).

#### TPR

Nukleoprotein TPR je komponenta kompleksa jezgrine pore (engl. *Nuclear pore complex* - NPC) koji je neophodan za promet molekula kroz jezgrinu membranu. Ima ulogu u kontrolnoj točki mitotičkog vretena. Njegova N terminalna domena sudjeluje u aktivaciji onkogenih kinaza. Tpr homolozi aktiviraju *met* i *raf* (2363 aa).

#### SEMG1

Semenogelin 1 je predominantni protein ejakulata. Sudjeluje u oblikovanju matriksa gela u kojem se nalaze spermatozoe te se smatra da može pridonijeti aktivaciji progresivnih pokreta sperme (462aa).

#### MYH4

Miozin 4 (Miozin teški lanac, skeletni mišić, fetalni) ima ulogu u kontrakciji skeletnih mišića (1939 aa).

#### SRRM2

Serin/arginin repetitivni matriks protein 2 (SR-vezani nuklearnog matriksa protein od 300 kDa) sudjeluje u pre-mRNA izrezivanju. Može djelovati prije ili za vrijeme prvog katalitičkog koraka odvajanja katalitičkog centra spliceosoma. To radi na način da

stabilizira katalitički centar ili položaj RNA supstrata (zbog sličnosti). Veže se na RNA (2752 aa).

#### FGB

Fibrinogen beta lanac (Fibrinopeptid B) ima dva seta od tri različita lanca (alfa, beta i gama). Gama lanac sadrži glavno mjesto vezanja receptora trombocita. Konverzija fibrinogena u fibrin posredovana je proteazom trombinom koji cijepanjem lanaca uzrokuje nastanak monomera koji se polimeriziraju i stvaraju netopljivi fibrinski matriks. Konverzija u konačnu formu ugruška posredovana je faktorom XIIIa koji katalizira vezanje alfa i gama lanaca različitih monomera. Fibrin ima ključnu ulogu u homeostazi jer je jedan od osnovnih sastojaka krvnih ugrušaka. Sudjeluje u cijeljenju rana na način da vodi migraciju stanica za vrijeme reepitelizacije. Važan za ishod trudnoće. Potiče antibakterijski odgovor. Različiti produkti cijepanja fibrinogena i fibrina imaju ulogu u adheziji i migraciji stanica, posjeduju vazokonstriktorna i kemotaktička obilježja te su mitogeni za više tipova stanica (491 aa).

#### TTN

Titin (Rabdomiosarkoma antigen MU-RMS-40.14, EC 2.7.11.1) ima ulogu serin/treonin protein kinaze, a enzimska aktivnost posredovana je fosforilacijom na Tyr-32341 i vezanjem kalcija/kalmodulina na C terminalni regulatorni rep molekule što uzrokuje vezanje ATP-a. Sastavni je dio i sudjeluje u funkcioniranju glatkih mišićnih stanica. Osigurava vezu na razini pojedinih mikofilamenata te na taj način pomaže održavanju finog balansa sila između dva pola sarkomere. U ne-mišićnim stanica ima ulogu u kondenzaciji kromosoma i njihovoj segregaciji za vrijeme mitoze. Za vrijeme interfaze može vezati mrežu lamina za kromatin ili jezgri aktin ili oboje (33423 aa).

#### MYH6

Miozin 6 (Miozin teški lanac, srčani mišić alfa izoforma, MyHC-alfa) ima ulogu u mišićnim kontrakcijama (1939 aa).

#### GAPDH

Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (EC 1.2.1.12, Peptidil-cistein S-nitrozilaze GAPDH, EC 2.6.99.-) je enzim koji posjeduje aktivnost glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze i nitrozilaze. Ključan je enzim glikolize i katalizira konvertiranje D-glicerinaldehid 3 fosfata (G3P) u 3 fosfo-D-gliceroil fosfat. Kao nitrozilaza posreduje u cistein S-nitrozilaciji proteina u jezgri (SIRT1, HDAC2 i PRKDC). Na taj način sudjeluje u različitim aktivnostima u jezgri kao što su transkripcija, transport RNA, DNA

replikacija i apoptoza. Posreduje u organizaciji i sklapanju citoskeleta. Stimulira vezanje CHP1 za mikrotubule te na taj način potiče udruživanje mikrotubula i membrane. Sudjeluje i u upalnim procesima (335 aa).

#### HBA1

Hemoglobin alfa 1 sudjeluje u transportu kisika (142 aa).

#### CNN1

Kalponin-1 (Kalponin H1, glatki mišić) ima ulogu u regulaciji i modulaciji kontrakcija glatkih mišića. Veže se na tanke filamente kao što su aktin, kalmodulin, troponin C i tropomiozin. Interakcija s aktinom sudjeluje u inhibiciji Mg-ATPazne aktivnosti aktomiozina (297 aa).

#### MYH7B

Miozin 7B (Miozin teški lanac 7B, srčani mišić beta izoforma) sastavni je dio miozina II koji je građen od dva teška lanca i četiri laka lanca. Teški lanac poseduje globularnu motornu domenu koja katalizira ATP hidrolizu te ulazi u interakciju s aktinom (1983 aa).

#### ANK3

Anikrin-3 (Anikrin-G) u skeletnim je mišićima potreban za pravilan smještaj DMD i betaDAG1. Spada u skupinu proteina koji vežu membranu s citoskeletom. Smatra se da sudjeluje u održavanju/ciljanju ionskih kanala i molekula staničnih adhezija u Ranvierovom čvoru i početnim aksonalnim segmentima. Sudjeluje u regulaciji reapsorpcije renalnog Mg (2+) (4377 aa).

#### HNRNPM

Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M sudjeluje u izrezivanju RNA. Ima ulogu receptora karcinoembrionalnog antigena u Kupfferovim stanicama te može potaknuti seriju signalnih događaja koji vode tirozinskoj fosforilaciji proteina i indukciji citokina (IL-1  $\alpha$ , IL-6, IL-10 i TNF  $\alpha$ ) (730 aa).

#### IGFN1

Imunoglobulinu nalik i fibronektin tip III domena-sadržavajući protein 1 (KY-međudjelujući protein 1); nepoznata funkcija (3708 aa).

#### ZNF658

Cink prsten protein 658 posreduje represiju transkripcije u odgovoru na cink. Vezanjem na cink transkripcijski regulatorni element, smješten u promotorskoj regiji, sudjeluje u represiji nekoliko gena. Osiguravajući dovoljnu zalihu cinka, kordinira procese koji ovise o njemu u ribosomima te ima ulogu u njihovoj biogenezi (1059 aa).

## NEB

Nebulin je veliki mišićni protein za kojeg se smatra da je uključen u održavanje strukturnog integriteta sarkomere i membranskog sistema povezanog s miofibrilama. Veže i stabilizira F-aktin (8525 aa).

## LIMCH1

LIM i kalponin homologne domene 1 protein; nepoznata funkcija (1083 aa).

## CALM1

Kalmodulin 1, preko iona  $Ca^{2+}$ , posreduje u kontroli velikog broja enzima, ionskih kanala i drugih proteina. Među enzime koji su stimulirani ovim kompleksom ubraja se čitav niz kinaza i fosfataza. Sudjeluje u genetičkom putu koji regulira ciklus centrosoma i njegovu progresiju kroz citokinezu. Vezan je i s pojedinim dijelovima Wnt signalnog puta (149 aa).

## MYH11

Miozin 11 (Miozin teški lanac, glatkog mišića izoforma) sudjeluje u kontrakciji glatkih mišićnih stanica (1979 aa).

## COL6A5

Kolagen alfa-5(VI) lanac (von Willebrand faktor A domena-sadržavajući protein 4) ima ulogu veze između stanica (2615 aa).

## ZNF266

Cink prsten protein 266 (cink prsten protein HZF1) ima ulogu u regulaciji transkripcije (549 aa).

## PSME2

Proteasom aktivator kompleks podjedinica 2 (Aktivator multikatalitičke proteaze podjedinica 2) je podjedinica imunoproteasomskog kompleksa i neophodna je za učinkovito procesiranje antigena (239 aa).

## EIF5B

Eukariotski translacije inicijacijski faktor 5B (Translacije inicijacijski faktor IF-2, EC 3.6.5.3) je GTPaza koja ima ulogu u započinjanju translacije. Enzim katalizira sjednjenje 40S i 60S podjedinica koje tvore 80S inicijacijski kompleks sa metionin-tRNA kao inicijatorom. Vezanjem GTP-a i hidrolizom dolazi do konformacijskih promjena enzima što ga čini aktivnim za produktivne interakcije s ribosomima. Nakon formiranja inicijacijskog kompleksa, dolazi do oslobađanja enzima što je preduvjet za formiranje elongacijsko-nadležnih ribosoma (1220 aa).

## HSP90B1

*Heat shock* protein 90 kDa beta član 1 (Endoplazmin) ima ulogu molekularnog pratioca koji sudjeluje u procesiranju i transportu proteina koji se izlučuju. Vežanjem s CNPY3 postaje neophodan za funkcioniranje Toll-receptora. Ima ulogu u endoplazmatski retikulum povezanoj degradaciji (engl. *Endoplasmic reticulum associated degradation* - ERAD) te ima aktivnost ATP-aze. Promijenjena ekspresija pronađena je kod gastrointestinalnih i oralnih karcinoma te kod karcinoma dojke, pluća, prostate i osteosarkoma. Povišena ekspresija često je u korelaciji s rezistencijom na kemoterapijsko i radioterapijsko liječenje te progresijom bolesti i posljedičnim kraćim preživljenjem (803 aa).

#### PHB

Prohibitin inhibira sintezu DNA te ima ulogu u regulaciji proliferacije. Mehanizam djelovanja je još uvijek nepoznat te se ne zna je li posredovan samim proteinom ili njegovom mRNA. Smatra se da ima ulogu u regulaciji mitohondrijske respiracijske aktivnosti i u starenju. Prohibitin je neophodan za Ras-potaknutu Raf1-aktivaciju te adheziju stanica i njihovu migraciju. Smatra se da ima ulogu u metastaziranju na način da čini tumorske stanice visoko invazivnim. Uočena je njegova veza s agresivnijim metastatskim oblicima bolesti kod karcinoma dojke, prostate, jednjaka, želuca, ne-malih stanica pluća, nadbubrežne žlijezde i nazofarinksa. Kofaktor je AR i tumorsupresor te njegov gubitak uzrokuje rast tumorskih stanica karcinoma prostate u kastracijskim uvjetima i posljedični nastanak kastracijski rezistentnog karcinoma prostate (272 aa).

#### HSPA5

78 kDa glukoza-regulirani protein (GRP 78, Endoplazmatski retikulum luminalni Ca<sup>2+</sup>-vežući protein grp78) smatra se da ima ulogu u olakšavanju sklapanja multimernih proteinskih kompleksa u endoplazmatskom retikulumu. Putem interakcije s DNAJC10 sudjeluje u pravilnom nabiranju proteina i degradaciji proteina koji to nisu. Član je Hsp 70 obitelji proteina. Ima ulogu posrednika u karcinogenezi prostate posredovanoj gubitkom Ptena te nepoznatim mehanizmom aktivira PI3K/AKT signalni put. Povećana ekspresija kod karcinoma prostate GRP78 povezana je s promijenjenom ekspresijom proteina klijenata Hsp70-Hsp90 kompleksa te aktivacijom AKT. Sam kompleks Hsp70-Hsp90 je kompleks pratitelja koji je neohodan za sklapanje i konformalnu regulaciju mnogih proteina, uključujući i steroidne receptore. Sudjeluje i u odgovoru endoplazmatskog retikuluma na stres. Poremećena ekspresija GRP78,

AR i AKT kod neliječenih karcinoma prostate u korelaciji je s lošijim ishodom (654 aa).

#### HSPD1

*Heat shock* protein 60 kDa, mitohondrijski (Mitohondrijskog matriksa protein P1) sudjeluje u ulasku mitohondrijskih proteina i stvaranju makromolekularnih kompleksa. Može poticati pravilno te zaustaviti nepravilno sklapanje polipeptida koji nastaju za vrijeme stresa u matriksu mitohondrija. Izlučuju ga tumorske stanice preko eksosoma, imunološki aktivnih mikrovezikula za koje se smatra da sudjeluju u progresiji tumora i mitohondrijskoj apoptozi (573 aa).

#### GOLGB1

Golgin podobitelj B član 1 (372 kDa Golgi kompleks-povezani protein, GCP372); smatra se da sudjeluje u nastanku intercisternalnih ukriženih mostova Golgijeva kompleksa (3259 aa).

#### CLIC1

Kloridnog intracelularnog kanala 1 protein (Regulatorni nuklearni klorid ion kanala protein) utiskuje se u membrane i formira kanale kloridnih iona. Insercija u kanale je redoks-regulirana, a aktivnost kanala ovisi o vrijednosti pH. Sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa (241 aa).

#### HBA2

Hemoglobin alfa2 sudjeluje u transportu kisika (142 aa).

#### ZNF600

Cink prsten protein 600 ima ulogu u regulaciji transkripcije (722 aa).

#### PRDX1

Peroksiredoksin-1 (EC 1.11.1.15, Tioiredoksin-ovisna peroksid reduktaza 2) sudjeluje u redoks regulaciji stanice (reducira perokside) na način da reducira ekvivalente koji nastaju preko tiorredoksin, a ne glutaredoksin sistema. Aktivno mjesto je redoks aktivni Cys-52 koji oksidira u Cys-SOH. Potom Cys-SOH ulazi u interakciju s Cys-173-SH druge podjedinice te formira intramolekularni disulfid s konkomitantnom homodimernom formacijom. Enzim se regenerira redukcijom disulfida uz pomoć tiorredoksina. Smatra se da sudjeluje u eliminaciji peroksida koji nastaju za vrijeme metabolizma, tj. ima antioksidativnu (protektivnu) ulogu u stanici. Također, regulacijom intracelularne koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, smatra se da sudjeluje u signalnim kaskadama faktora rasta i TNF  $\alpha$ . Sudjeluje u postmitotskoj motor-neuron



diferencijaciji, regulirajući upravljačku sposobnost GDPD5, redukcijom intramolekularnih disulfidnih veza (199 aa).

#### PTRF

Polimeraza I i transkripcijski oslobađajući faktor (Kavin-1) ima ulogu u formiranju i nastanku kaveola. Neophodan je za sekvestraciju pokretnog kaveolina u nepokretne kaveole. Sudjeluje u regulaciji transkripcije. Smatra se da modificira metabolizam lipida i ekspresiju gena reguliranu inzulinom. Kod tumora gušterače i prostate njegova aktivnost često ovisi o aktivnosti kaveolina-1. Uočeno je da nadprodukcija u linijama karcinoma prostate je vezana s smanjenjem agresivnog potencijala dok se potprodukcija u stromi javlja u sprezi s progresijom karcinoma prostate (390 aa).

#### PCMT1

Protein-L-izoaspartat (D-aspartat) O-metiltransferaza (EC 2.1.1.77, Protein L-izoaspartil/D-aspartil metiltransferaza) je enzim koji katalizira metil esterifikaciju L-izoaspartil i D-aspartil rezidua peptida i proteina koje nastaju spontanom raspadom normalnih L-aspartil i L-asparaginil rezidua. Na taj način ima ulogu u popravku ili degradaciji oštećenih proteina. Smatra se da sudjeluje u protektivnim mehanizmima tijekom nastanka Alzheimerove bolesti (285 aa).

#### ENSG00000228325

nepoznata funkcija (130 aa).

#### ANP32A

Kiseli leucin-bogati jezgri fosfoprotein 32 A (Potentni toplotno-stabilni protein fosfataze 2A inhibitor I1PP2A) je protein koji sudjeluje u cijelom nizu staničnih procesa uključujući proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu (ovisnu/neovisnu o kaspazama), inhibiciju protein fosfataze 2A, regulaciju trgovine i stabilnosti mRNA (u suradnji s ELAV1) te inhibiciju acetiltransferaza kao dijela INHAT (engl. *Inhibitor of histone acetyltransferases* - INHAT) kompleksa. Sudjeluje u represiji transkripcije posredovanoj E4F1. Za obitelj ANAP32 proteina nije još u potpunosti dokazano djeluju li kao tumorsupresori ili promotri. Sve više se nameće hipoteza da ova obitelj ima ulogu "dvosjeklog mača" u progresiji tumora. S obzirom na ulogu članova obitelji u apoptozi posredovanoj kaspazama, u stanicama s intaktnim apoptotičkim putevima njihova pojačana ekspresija može posredovati redukciju tumora. S druge strane, pojačana ekspresija u stanicama s defektnim apoptotičkim putevima omogućuje proliferativnu prednost selektivnom ekspresijom ciljanih gena, tj. omogućuje progresiju tumora (249 aa).

## MDH1

Malat dehidrogenaza, citoplazmatska (EC 1.1.1.37, Diiodofenilpiruvat reduktaza EC 1.1.1.96) katalizira reverzibilnu oksidaciju malata u oksalacetat, koristeći NAD/NADH kofaktor sistem u ciklusu limunske kiseline. Regulira aktivnost tumorsupresora p53 kao metabolički enzim. Za vrijeme nedostatka glukoze stabilizira i transaktivira p53 te regulira apoptozu ovisnu o ovom tumorsupresoru. Sudjeluje u interakciji s HSP90 i MPP3 (352 aa).

## PSMB3

Proteasom podjedinica beta tip-3 (EC 3.4.25.1, Proteasom komponenta C10-II) dio je proteasoma koji je multikatalitički kompleks proteinaza. Kompleks ima oblik prstena (20S) sa strukturom jezgre koja se sastoji do četiri prstena 28 neidentičnih podjedinica. Pritom su dva prstena sastavljena od sedam alfa podjedinica, a dva prstena od sedam beta podjedinica. Njegovo obilježje je sposobnost cijepanja peptida s Arg, Phe, Tyr, Leu i Glu aminokiselinama koje su pridružene napuštajućim grupama. Pritom je potrebna normalna ili tek neznatna bazična vrijednost pH. Proteasom posjeduje ATP-ovisnu proteolitičku aktivnost (205 aa).

## PHPT1

Fosfohistidin fosfataza 1 (EC 3.1.3.-) katalizira reverzibilnu defosforilaciju histidinskih rezidua na proteinima. Smatra se da sudjeluje u reorganizaciji citoskeleta posredovanoj aktinom. Negativno regulira CD4 T stanice (125 aa).

## CA3

Karbonska anhidraza 3 (EC 4.2.1.1, Karbonat dehidrataza III) je enzim koji reverzibilno hidrira karbon dioksid. Razlikuje se od drugih članova obitelji po niskoj aktivnosti karbon dioksid hidrataze, rezistenciji na inhibitor acetazolamid i predominantnoj ekspresiji u jetri muškaraca. Nadeksprimiran je u linijama SK-Hep1 karcinoma jetre što uzrokuje povećanu invazivnost tumorskih stanica (260 aa).

## GSTT2

Glutation S-transferaza teta 2 (EC 2.5.1.18, GST-razred-teta-2); enzim katalizira konjugaciju reduciranog glutationa u širok spektar egzogenih i endogenih hidrofobičnih elektrofila. Ima aktivnost sulfataze. Smatra se da sudjeluje u karcinogenezi (244 aa).

## CRYM

Ketimin reduktaze mu-kristalin (EC 1.5.1.25, NADP-regulirani tiroidni-hormon-vežući protein) je enzim koji katalizira redukciju imin veza u moždanim supstratima koje

moгу uključivati cistationin ketimin i lantionin ketimin. Veže tiroidni hormon koji je jaki reverzibilni inhibitor. Smatra se da sudjeluje u regulaciji slobodne intracelularne koncentracije trijodtironina i pristupa njegovim jezgrinim receptorima. Ekspresija je posredovana androgenima te je nadeksprimiran u stanicama AR pozitivnih linija karcinoma prostate te u tumorskom tkivu. Posljedično, podeksprimiran je nakon primjene antiandrogena u stanicama linija karcinoma prostate te u tkivu bolesnika s kastracijski rezistentnim karcinomom prostate (314 aa).

#### ARG2

Arginaza-2, mitohondrijska (EC 3.5.3.1, Bubrežni-tip arginaze) je finalni enzim ciklusa uree koji cijepa L-arginin u ureu i ornitin čineći ga dostupnim ornitin dekarboksilazi koja ga konvertira u poliaminske spojeve kao što su putrescin, spermidin i spermin. Postoje dvije izoforme ovog enzima. Arginaza-2 smještena je u mitohondrijima te se smatra da regulira metabolizam arginina izvan ciklusa uree i modulira sintezu dušikovog oksida, tj. smanjuje njegovu proizvodnju. Zapravo, enzim funkcionira kao regulator bioraspoloživosti L-arginina za sintezu dušikovog oksida. Ima ulogu u fiziologiji seksualnosti. Smatra se da je povećana aktivnost enzima vezana uz održavanje potrebnih razina poliamina nepohodnih za rast i razvoj tumora. Prostata i njezine izlučevine imaju najveće razine poliamina od svih tkiva. Za vrijeme razvoja karcinoma prostate poliaminski omjer (spermidin/spermin) te aktivnost enzima poliaminskog puta (uključujući ornitin dekarboksilazu) povišeni su. Nadeksprimirana je u androgen ovisnim linijama karcinoma prostate te se smatra potencijalnim biomarkerom ranog karcinoma prostate. Uočen je gradijent ekspresije enzima, s tendencijom smanjenja iste, od benignijih prema zloćudnijim promjenama te ovisno o Gleason zbroju. Smatra se da je gubitak ekspresije enzima u nediferenciranom karcinomu prostate vezan uz veću razinu poliamina proizvedenih alternativnim putevima (354 aa).

#### PTGES3

Prostaglandin E sintaza 3 (EC 5.3.99.3, Citosolična prostaglandin E2 sintaza, cPGES, ko-pratioc p23) je enzim koji katalizira oksidoredukciju prostaglandin endoperoksida H<sub>2</sub> u prostaglandin E2. Molekularni je pratioc koji prekida aktivnost transkripcijskih regulatornih kompleksa posredovanih receptorima na način da promiče njihovo rastavljanje. To radi svojim smještajem na elementima genoma koji sudjeluju u odgovoru (engl. *Genomic response elements*) za koje se veže na način kako to inače rade hormoni. Uz Hsp 90 sastavni je dio kompleksa koji je potreban za

nastanak aktivne telomeraze. Osim njegove primarne uloge, kao pratioca Hsp 90, enzim može djelovati i na aktivnost više steroidnih receptora, uključujući AR. Hsp 90 i p23 ključne su komponente stabilizacijskog kompleksa za vrijeme smještaja AR receptora u citoplazmi te u stanju bez vezanog liganda. Smatra se da p23 potiče aktivnost AR u citoplazmi i u jezgri. U citoplazmi povećava kapacitet AR za vezanje liganda u odsutnosti hormona, dok u jezgri povećava zauzimanje ciljnih promotora AR. Zajedno s Hsp 90 spada u kofaktore i pratiocce AR koji su nadregulirani te održavaju bazalnu aktivnost AR za vrijeme niske razine hormona (primjena ADT), zbog čega karcinom prostate postaje kastracijski rezistentan. Razina p 23 povećana je kod liječenja androgenima i antiandrogenima te se smatra da povećava motilitet stanica karcinoma prostate. Time se objašnjava korelacija povećane razine nuklearnog p23 u uzorcima biopsije prostate kod tumora niskog gradusa i lošijeg preživljenja. Danas je p23 jedna od ciljnih meta u liječenju karcinoma prostate (160 aa).

#### SOD1

Superoksid dismutaza 1 (EC 1.15.1.19) je enzim koji uništava radikale koji se proizvode u stanicama i toksični su za biološke sustave. Aktivnost SOD 1 je značajno povećana kod raka dojke. Smatra se da stanice raka dojke prolaze kroz SOD preokret za vrijeme maligne transformacije jednako analogiji kadherin preokreta koji se događa za vrijeme epitelno mezenhimalne tranzicije. SOD 2 je glavni antioksidant čija je aktivnost značajno smanjena u raku dojke te se prepostavlja da ga zamjenjuje SOD1 (154 aa).

#### CMBL

Karboksimetilenbutenolidaza homolog (EC 3.1.-.-) je cistein hidrolaza koja najčešće cijepa cikličke estere te aktivira pojedine lijekove (245 aa).

#### AIFM2

Apoptoza-inducirajući faktor 2 (EC 1.-.-.-, Apoptoza-inducirajući faktor homologni mitohondrija-povezani induktor smrti); oksidokreduktaza koja posreduje u p53/TP53 ovisnom apoptotičkom odgovoru. Djeluje kao efektor mitohondrija neovisan o kaspazi te na taj način sudjeluje u apoptozi. Veže se za DNA. Može pridonijeti zastoju rasta induciranom genotoksinima (373 aa).

#### KLK3

Kalikrein-vezana peptidaza 3 (EC 3.4.21.77, Prostata specifični antigen, PSA, Gamma-seminoprotein, seminin) je enzim koji hidrolizira semenogelin-1 te uzrokuje

razgradnju ugrušaka ejakulata. Zasad je jedini poznati biomarker karcinoma prostate (261 aa).

#### TUFM

Elongacijski faktor Tu, mitohondrijski (EF-Tu, P43) potiče GTP-posredovano vezanje aminoacetil-tRNA na A-mjesto ribosoma za vrijeme sinteze proteina (455 aa).

#### ACPP

Prostatična kisela fosfataza (EC 3.1.3.2, PAP, Tiamin monofosfataza, TMPaze) je nespecifična tirozin fosfataza koja defosforilira cijeli niz supstrata kod kiselih uvjeta (pH 4-6) uključujući alkil, aril, acil ortofosfat monoestere i fosforilirane proteine. Također, ima aktivnost lipid fosfataze (418 aa).

#### SOD2

Superoksid dismutaza 2 (Mn), mitohondrijska (EC 1.15.1.1) je enzim koji uništava superoksid anion radikale koji se proizvode u stanicama i koji su toksični za biološke sustave (222 aa).

ENSG00000228325 nepoznata funkcija (130aa).

#### ARHGDIB

Rho GDP-disocijacijski inhibitor 2 (Rho GDI 2, Rho-GDI beta) regulira izmjenu GDP/GTP na Rho proteinima na način da inhibira disocijaciju GDP od njih te posljedično veže GTP na njih. Zbog veze s članovima Rho obitelji sudjeluje u regulaciji reorganizacije aktinskog citoskeleta. Sudjeluje u progresiji tumora te se smatra da regulira citokinezu. Tumorsupresor je karcinoma mokraćnog mjehura. Promijenjena ekspresija nađena je i kod tumora pluća, jajnika, dojke, želuca i jetre. Kod više vrsta tumora aktivnost je poredovana preko PI3K/Akt signalnog puta (201 aa).

#### CBX3

Kromoboks protein homolog 3 (Heterokromatin protein 1 homolog gamma, HP1 gamma) stabilizira kromatin i sudjeluje u formiranju funkcionalne kinetohore. Uključen je u transkripcijsko utišavanje u heterokromatin-nalik kompleksima. Nadeksprimiran je kod PIN-a visokog gradusa, lokaliziranog i metastatskog karcinoma prostate što korelira s ekspresijom Ki67. Postoji bolja korelacija njegove ekspresije s pojavom biokemijskog relapsa, nego što je to slučaj s Gleasonovim zbrojem, osobito u skupini bolesnika s Gleasonovim zbrojem 7 (183 aa).

#### EIF5A

Eukariotski translacijski inicijacijski faktor 5A-1 (eIF-5A1, eukariotski inicijacijski faktor 5A izoform 1, eIF-5A) ima ulogu u ravoju mozga i diferencijaciji matičnih stanica skeletnih mišića. Veže se na mRNA i sudjeluje u translacijskoj elongaciji. Važan u dinamici aktina i progresiji staničnog ciklusa. Također sudjeluje u raspadu mRNA i putu odgovora na stres i održanju integriteta staničnog zida. Regulator je p53/TP53-ovisnoj i apoptozi poredovanoj TNF  $\alpha$  (184 aa).

#### MYL12A

Miozin regulatorni laki lanac 12A (Miozin regulatorni laki lanac 2) preko fosforilacije regulira kontraktilnost glatkih mišićnih i ne-mišićnih stanica. Smatra se da sudjeluje u kretanju stanica i citokinezi (171 aa).

#### CTSD

Katepsin D (EC 3.4.23.5) je kisela proteaza koja je aktivna u staničnom raspadu proteina. Sudjeluje u metastaziranju i angiogenezi raka dojke te je zbog toga gen katepsina D sastavni dio mikročipova koji se koriste u testiranju invazivnosti tumora dojke. Kod karcinoma prostate smatra se parakrinim medijatorom kojeg izlučuju stanice strome te na taj način potiče tumorogenezu (412 aa).

#### MYL12B

Miozin regulatorni laki lanac 12B (Miozin regulatorni laki lanac 2-B) preko fosforilacije regulira kontraktilnost glatkih mišićnih i ne-mišićnih stanica. Smatra se da sudjeluje u kretanju stanica i citokinezi (172 aa).

#### PFN2

Profilin-2 utječe na strukturu citoskeleta. Veže se na aktin te u niskim koncentracijama potiče njegovu polimerizaciju, dok je u visokim sprečava. Suprimira protruzije membrane, motilitet i invaziju stanica. Podelksprimiranost je vezana s lošijom prognozom bolesnika s oralnim karcinomima i tumorima dojke (140 aa).

#### CAPZB

F-aktin-zaštitnog proteina podjedinica beta (CapZ beta) veže se, neovisno o  $\text{Ca}^{2+}$ , na brzorastuće krajeve filamenata aktina te blokira izmjenu podjedinica na njima. Kodira ga gen koji spada u skupinu koja utječe na organizaciji citoskeleta i posljedično na motilitet stanica. Za razliku od drugih zaštitinih proteina, ne razdvaja aktinske filamente (277 aa).

#### MYL9

Miozin regulatorni laki polipeptid 9 (Miozin regulatorni laki lanac 2); Modulirajući ATP-aznu aktivnost glava miozina regulira kontrakciju mišića. Dokazano je da je njegova

fosforilacija ključ migracije stanica na solidnim supstratima. Povišena ekspresija i fosforilacija je nađena kod tumora jetre i dojke a smanjena kod tumora kolona, mokraćnog mjehura i prostate. Podeskrimiran je u stanicama strome i kod karcinoma prostate s negativnijim kliničko-patološkim obilježjima (172 aa).

#### GUSB

Beta-glukuronidaza (EC 3.2.1.31, Beta-G1) je hidrolaza koja razgrađuje glikozaminoglikane uključujući heparan sulfat, dermatan sulfat i hondritin-4,6-sulfat. Enzim formira homotetramer koji je lokaliziran u lizosomima (651 aa).

#### CIRBP

RNA-vezujući protein induciran hladnoćom (RNA-vezujući protein bogat glicinom) se eksprimira na hladnoći u uvjetima šoka, a u tumorskim stanicama i pri tjelesnoj temperaturi. Translacijski je aktivator i represor. Ima protektivnu ulogu prilikom odgovora na genotoksični stres na način da stabilizira transkripte gena koji su uključeni u preživljavanje. Smatra se neophodnim u supresiji proliferacije stanica induciranoj hladnoćom. Kod karcinoma prostate i kolorektuma aktivira se putem MAPK kinaza (172 aa).

#### SET

Protein SET (Inhibitor granzima A-aktivirane DNaze) je multifunkcionalni protein koji sudjeluje u apoptozi, transkripciji i nastanku kompleksa nukleosoma. Također je pratioc histona. Obje izoforme proteina sudjeluju u acetilaciji histona i nukleosoma. Ciljna meta inhibicije je histon H4, a posljedica iste je utišavanje HAT ovisne transkripcije te prevencija aktivne demetilacije DNA. Također, obje izoforme stimuliraju DNA replikaciju adenovirusnog genoma i potentni su inhibitori protein fosfataze 2A. Za njega se veže inhibitor 2 navedenog enzima koji je nadeksprimiran kod karcinoma prostate i koji inhibira popravak DNA. Izoforma 2 sprečava apoptozu preko inhibicije granzim-A (GZMA) DN-aze, NME1. Ima sposobnost fuzije s različitim onkogenima te amplifikacije zbog neposredne kromosomske blizine gena *c-abl*. Stupa u interakciju s proteinom *Rac-1* koji sudjeluje u migraciji i proteinima uključenim u različite faze staničnog ciklusa (290 aa).

#### DDAH2

N (G), N (G) - dimetilarginin dimetilaminohidrolaza 2 (EC 3.5.3.18, dimetilarginaza-2) je enzim koji pretvara dimetilarginin u dimetilamin i L-citrulin. Inače, dimetilarginin je inhibitor sintetaze dušikovog monoksida. Za vrijeme oksidativnog stresa, dolazi do inhibicije enzima, posljedičnog nakupljanja supstrata dimetilarginina u stanicama,

lučenja citokina i inhibicije sinteze dušikovog monoksida. Prestankom inhibicije stvara se dušikov monoksid koji potiče tumorsku angiogenezu. Nadeksprimiran je kod karcinoma jajnika i prostate (285 aa).

#### FTL

Feritin laki lanac je protein koji skadišti željezo u topivom, netoksičnom obliku koji se može brzo koristiti. Također ima ulogu u dopremi željeza stanicama. Nadeksprimiran je kod tumorskih stanica dojke rezistentnih na citostatike (175 aa).

#### SUMO2

Mali ubikvitin vezani modifikator 2 (Ubikvitinu-nalik protein SMT3B, Smt3B) sudjeluje u SUMOilaciji koja se odvija preko enzimatske kaskade koju čine E1, E2 i E3 ligaze što uzrokuje kovalentnu konjugaciju SUMO proteina (SUMO 1, 2 i 3) na ciljne supstrate, stvarajući podlogu za protein-protein interakciju. Ciljni supstrati su proteini PIAS1-4, RANBP2 i CBX4, s kojima se veže kovalentno, a aktivnost je potaknuta E3 ligazama. SUMOilacija na taj način regulira važne stanične procese, a nastale postranslacijske modifikacije lizinskih rezidua proteina imaju važne uloge u staničnom transportu, DNA replikaciji i popravku, mitozu i prijenosu signala. Polimerni SUMO 2 lanci su također osjetljivi na poliubikvitinaciju koja funkcionira kao signal za degradaciju modificiranih proteina putem proteosoma (95 aa).

#### GPX1

Glutation peroksidaza 1 (EC 1.11.1.9) je antioksidativni enzim koji sudjeluje u detoksifikaciji od vodikovog peroksida. Štiti hemoglobin u eritrocitima od oksidativnog raspada (203 aa).

#### PAFAH1B2

Trombocit-aktivirajući faktor acetilhidrolaza IB podjedinica beta (EC 3.1.1.47, PAF acetilhidrolaza 30 kDa podjedinica) je katalitička podjedinica enzima koja inaktivira trombocit-aktivirajući faktor. Antagonistički djeluje na aktivnost dineina, proteina koji je motor "minus" kraja mikrotubula (229 aa).

#### CRYAB

Alfa-kristalin B lanac (Renalnog karcinoma antigen NY-REN-2) ima aktivnost nalik aktivnosti proteina pratitelja. Za vrijeme stresa sprečava agregaciju cijelog niza proteina. Smatra se tumorsupresorom. Uočeno je da inhibira internalizaciju E-kadherina u citoplazmu te na taj način održava B-katenin na membrani što dovodi do smanjene razine ekspresije nizvodnih ciljeva (ciklin D-1 i *c-myc*) (175 aa).

#### ENO1



Alfa-enolaza (EC 4.2.1.11, 2-fosfo-D-glicerat hidro-laza) je multifunkcionalni enzim koji ima ulogu u glikolizi i cijelom nizu procesa uključujući kontrolu rasta, toleranciju hipoksije i alergijski odgovor. Ima ulogu receptora i aktivatora plazminogena na površini nekoliko vrsta stanica (leukociti, neuroni). Sudjeluje u fibrinolitičkom sustavu i u proizvodnji imunoglobulina. Izoforma MBP1, koja nastaje alternativnim izrezivanjem, veže se na *myc* promotor i suprimira transkripciju. Smatra se tumorsupresorom (434 aa).

#### ANXA3

Aneksin A3 (Inozitol 1,2-ciklička fosfat 2-fosfohidrolaza) je inhibitor fosfolipaze A2 i cijepa cikličku vezu inozitol 1,2-cikličkog fosfata što omogućuje nastanak inozitol-1-fosfata. Posjeduje antikoagulantna svojstva i sudjeluje u angiogenezi. Niske razine ekspresije vežu se uz pojavu radiorezistencije i kemorezistencije. Sudjeluje u karcinogenezi tumora pluća, žučnog mjehura, jajnika i nazofarinksa (323 aa).

#### GLOD4

Glioksilaza domena sadržavajući protein 4 ima ulogu inhibitora rasta stanica hepatocelularnog karcinoma. Podesprimiran je u tkivu ovog tumora u usporedbi s ne-tumorskim tkivom kod istog ispitanika (298 aa).

#### CFL1

Kofilin 1 veže se na F-aktin i izlaže pH osjetljivu depolimerizacijsku aktivnost F-aktina. Sudjeluje u organizaciji i regulaciji aktinskog citoskeleta. Važan je za napredak stanice kroz mitozu i citokinezu. Radi rez na aktinskim filamentima omogućujući monomerima aktina da se vežu na nastalo račvište, što omogućuje recikliranje aktina na vodećim krajevima lamelipodija prostatičnih epitelnih stanica za vrijeme epitelno-mezenhimalne tranzicije. Sudjeluje u premještanju atipičnog kemokinskog receptora ACKR2 iz endosomalnog odjeljka na staničnu membranu i na taj način potiče ulazak kemokina u stanicu i njihovu degradaciju (166 aa).

#### HMGB1

Protein skupine visoke mobilnosti B1 (Visoke mobilnosti grupe protein 1) je multifunkcionalni i redoks osjetljivi protein koji ima više uloga u različitim staničnim odjeljcima i izvanstaničnom prostoru. Tako se ponaša kao nuklearni protein u stanicama i kao upalni medijator u izvanstaničnom prostoru. U jezgri je jedan od glavnih kromatin-vezanih ne-histonskih proteina koji imaju ulogu DNA pratioca te sudjeluju u replikaciji, transkripciji, remodeliranju kromatina, DNA popravljanju i održavanju genomske stabilnosti. Smatra se univerzalnim biosenzorom za

nukleinske kiseline. Nakon otpuštanja u ekstracelularni prostor veže se s cijelim nizom proteina i aktivira stanicu preko angažmana s multiplim staničnim receptorima. U tom se okolišu ponaša kao kemokin, citokin i promotor imunološke tolerancije. Tako ekstracelularni oblik potiče proliferaciju, upalu, metabolizam energije, angiogenezu te inhibira antitumorski imunitet domaćina, što su sve osobine koje potiču tumorogenezu. Ima ulogu onkogeni i tumorsupresora za vrijeme razvoja i liječenja tumora. Pritom je intracelularni oblik tumorsupresor, uloga koja je vezana uz njegovu sposobnost održavanja genomske stabilnosti za vrijeme rasta tumora. Njegov gubitak inhibira autofagiju i potiče apoptozu. Supresija autofagije potiče tumorogenezu i potiče aktivnost antitumorske terapije. Jedan je od osnovnih liganda ekstracelularnog receptora za uznapredovale glikacijske završne produkte (engl. *Receptor for advanced glycation endproducts* - RAGE) te preko te veze posreduje cijeli niz svojih aktivnosti. Također RAGE čini platformu preko koje ulazi u interakciju s drugim receptorima. Smatra se da ovaj protein također ima ulogu u razvoju karcinoma prostate. Centralno mjesto zauzima njegova interakcija s AR i RAGE. Nadekspimiran je kod karcinoma prostate te se smatra potencijalnim biomarkerom biokemijskog recidiva nakon radikalne prostatektomije. Sve se više naglašava njegova uloga kao ciljnih mete antitumorskog liječenja (215 aa).

#### MSMB

Beta-mikroseminoprotein (Prostata sekretorni protein od 94 aminokiseline, PSP94) se nalazi u sekretu prostate i ekspimiran je u benignom i maligno promjenjenom prostatičnom epitelu. Glavna uloga mu je kontrola i poticanje staničnog rasta, a gubitkom enzima stanice dobivaju sposobnost nekontroliranog rasta. Podekspimiran je u uzorcima tkiva i seruma karcinoma prostate. Gen koji kodira ovaj protein smatra se jednim od kandidata za razvoj karcinoma prostate (114 aa).

#### NM1

Nukleozid difosfat kinaza A (EC 2.7.4.6, Tumor metastatskog procesa-povezani protein) je protein koji ima glavnu ulogu u sintezi nukleozid trifosfata koji nisu ATP. Ima ulogu više enzima uključujući nukleozid-difosfat kinaze, serin/treonin-specifične protein kinaze, geranil i farnesil pirofosfat kinaze, histidin protein kinaze i 3'-5' eksonukleaze. S obzirom na tako veliku enzimsku aktivnost, sudjeluje u proliferaciji, diferencijaciji i razvoju stanice, provođenju signala, endocitozi posredovanoj G receptorima i ekspresiji gena. Neophodan je za neuralni razvoj. Ima aktivnost metastaza supresora. Protein je kodiran Nm23-H1 genom koji je jedan od najranije

otkrivenih metastaza supresor gena. Za ovu skupinu gena smatra se, za razliku od tumorsupresora, da imaju mogućnost kontrole metastatske bolesti *in vivo* neovisno o primarnom tumoru. Sam mehanizam se događa na razini proteina. Uočeno je da povećana ekspresija NME1 u metastatskim linijama stanica (melanoma, raka dojke, prostate, kolona, jetre, usne šupljine) smanjuje motilitet stanica u *in vitro* esejima te metastatski potencijal u xenograft modelima, pritom bez utjecaja na veličinu tumora. S druge strane, nađeno je da njegova povećana ekspresija povećava metastatski potencijal neuroblastoma, osteosarkoma i hematoloških maligniteta. Sam mehanizam djelovanja je nepoznat. NME1 veže proteine uključujući male G protein komplekse, transkripcijske komplekse, Map kinaze, TGF-beta signalni put i citoskelet. Smatra se da je njegova antimetastaska aktivnost posredovana vezanjem i inaktivacijom proteina. Kod karcinoma prostate ekspresija NME1 utječe na motilitet stanica. Postoji korelacija visokih razina NME1 u citoplazmi stanica te progresije karcinoma prostate u metastatsku bolest te se smatra da bi mogao biti negativni prognostički biomarker (177 aa).

#### HEBP2

Željezo-vezivni protein 2 (Placentalni protein 23, PP23) potiče tranziciju mitohondrijske permeabilnosti i nekrotičnu smrt stanice za vrijeme različitih tipova stresa (205 aa).

#### NANS

Sijalična kisela sintaza (EC 2.5.1.56, EC 2.5.1.57, N-acetilneuraminske kiseline fosfat sintaza) proizvodi N-acetilneuraminsku kiselinu i 2-keto-3-deoksi-D-glicero-D-galaktononičnu kiselinu te sudjeluje u proizvodnji njihovih fosforiliranih formi (359 aa).

#### CIQBP

Komplement komponente 1Q subkomponente-vežući protein (Mitohondrijskog matriksa protein p32) je multifunkcionalni protein koji sudjeluje u biogenezi ribosoma, regulaciji apoptoze i transkripcije, upalnim procesima i pre-mRNA izrezivanju. Na površini stanice ima ulogu endotelnog receptora za proteine plazme koji sudjeluju u komplement i kalikrein-kinin kaskadi. Receptor je za C1q i inhibira C1. Oblik površine stanice zahtjeva usidranje transmembranskih proteina neophodnih za nizvodno signaliziranje i smatra se da bi moglo biti specifično za tip stanice ili njezin odgovor. Sudjeluje u kemotaksiji nezrelih dendritičnih stanica i neutrofila. S obzirom da je receptor C1q, predloženo je da njegova signalizacija ide preko CD209/DC-SIGN kod nezrelih dendritičkih stanica te preko integrina  $\alpha$ -4/ $\beta$ -1 za vrijeme invazije trofoblasta i

integrina  $\beta$ -1 za vrijeme adhezije i širenja endotelnih stanica. Sudjeluje u inhibiciji urođenog imunog odgovora, odvija preko PI3K/AKT/PKB puta te u mitohondrijskog translaciji, sazrijevanju nuklearnih ribosoma, izrezivanju RNA i apoptozi. Aktivan u imunom odgovoru protiv virusa i bakterija (282 aa).

#### COTL1

Koaktozinu-nalik protein 1 veže se na F-aktin te nema izravnog učinka na njegovu depolimerizaciju. Sudjeluje u sintezi leukotriena (142 aa).

#### PCBP1

Poli (rC)-vežući protein 1 (Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein E1) se veže na jednolančane nukleinske kiseline i to prvenstveno na oligo dC. Partner je DNA vežućeg čimbenika THAP11 za kojeg se smatra da ima ulogu supresora staničnog rasta (356 aa).

#### AKR1A1

Alkohol dehidrogenaza (NADP+) (EC 1.1.1.2, Aldo-keto reduktaze obitelji 1 član A1) je enzim koji katalizira redukciju različitih aromatskih i alifatskih aldehida u njihove odgovarajuće alkohole. Reakcija ovisi o NADPH. Također, katalizira redukciju mevaldata u mevaloničnu kiselinu i gliceraldehida u glicerol. Posjeduje široku specifičnost za pojedine supstrate. Tako, *in vitro* njegovi supstrati mogu biti sukcinski semialdehidi, 4-nitrobenzaldehidi, 1,2-naftokinoni, metilglioksal i D-glukoronična kiselina. Sudjeluje u aktiviranju prokarcinogena i metabolizmu ksenobiotika i lijekova uključujući antraciklinske citostatike. Posreduje u nastanku rezistencije na oksidativni stres (325 aa).

#### RPSA

40S ribosomalni protein SA (Višestruke otpornosti na lijekove povezani protein MGr1-Ag) je neophodan za sastav i stabilnost 40S podjedinice ribosoma. Također je ne-integrinski receptor za laminin na staničnoj membrane. Sudjeluje u adheziji stanica za bazalnu membranu i posljedičnoj aktivaciji nizvodnih signalnih puteva. Ima ulogu u determinaciji sudbine stanice i morfogenezi tkiva. Nadeksprimiran je kod karcinoma kolona i u linijama raka pluća. Jedno se vrijeme smatralo da bi njegovo određivanje u tkivu karcinoma prostate nakon radikalne prostatektomije moglo biti neovisan predikcijski čimbenik biokemijskog recidiva u bolesnika s lokaliziranim oblicima bolesti. Rezultati nisu potvrđeni u uzorcima biopsija (295 aa).

#### HP

Haptoglobin (Zonulin) omogućuje rastavljanje međustaničnih tijesnih veza te na taj način sudjeluje u propusnosti crijeva (406 aa).

#### ANXA7

Aneksin A7 je kalcij/fosfolipid vežući protein koji potiče fuziju membrane i sudjeluje u egzocitozi. Sudjeluje u tumorogenezi glioblastoma i karcinoma želuca i jetre. Kod karcinoma prostate ima ulogu tumorsupresora. Gubitak ekspresije javlja se kod androgen rezistentnog karcinoma prostate (488 aa).

#### FABP3

Masne kiseline-vežući protein (Srčani-tip masne kiseline-vežućeg proteina, H-FABP) sudjeluje u transport dugolančanih masnih kiselina i njihovih acil-CoA estera. Veže se izravno na citoplazmatski rep  $\alpha$  podjedinice integrina. Utječe na odgovor tumorskih stanica na gefitinib, tirozin-kinazni inhibitor koji se koristi u liječenju raka pluća (133 aa).

#### CALU

Kalumenin (IEF SSP 9302) sudjeluje u regulaciji karboksilacije multiplih N-terminalnih glutamatnih rezidua. Inhibira gamma-karboksilazu GGCX (323 aa).

#### HSPB6

*Heat shock* protein beta-6 (*Heat shock* 20 kDa-nalik protein p20) ima ulogu u relaksaciji glatkih mišićnih stanica (160 aa).

#### HSPA8

*Heat shock* srodnik 71 kDa protein (Lipopolisaharid-vezani protein 1, LAP-1) ima ulogu pratitelja i represora transkripcijske aktivacije. Inhibira aktivnost CITED1 kao transkripcijskog koaktivatora na Smad- posredovanu transkripciju. Sastavni je dio spliceosoma, dio je njegove integralne komponente PRP19-CDC5L. Neophodan je za aktiviranje pre-mRNA izrezivanja. Posreduje u upalnom odgovoru zbog svoje veze s bakterijskim liposaharidom (646 aa).

#### CSTB

Cistatin-B (Jetreni tiol proteinaze inhibitor) ima ulogu reverzibilnog inhibitora katepsina L, H i B (98 aa).

#### ACTG2

Aktin, citoplazmatski 2 (Glatkog mišića gamma-aktin) je sastavni dio adherentnih veza te sudjeluje u različitim vrstama motiliteta stanice (376 aa).

#### MYLK

Miozin laki lanac kinaza, glatki mišić (EC 2.7.11.18, Kinaza-vezani protein, KRP) je kalcij/kalmodulin ovisni enzim koji sudjeluje u kontrakciji glatkih mišićnih stanica preko fosforilacije lakih lanaca miozina. Također, preko svoje ne-kinazne aktivnosti regulira interakcije aktina i miozina. Sudjeluje u cijelom nizu procesa uključujući regulaciju permeabilnosti i preživljenja endotelnih stanica, apoptozi fibroblasta, cijeljenju rana i upalnom odgovoru. Neophodna je za održavanje gastrointestinalnog motiliteta te sudjeluje u procesu rasta astrocita i različitim aktivnostima živčanog sustava. Posreduje RhoA-ovisno pupanje membrane. Potiče migraciju stanica, uključujući i tumorske stanice, te se smatra da na taj način sudjeluje u metastatskom procesu. Sudjeluje u regulaciji citoskeleta za vrijeme mitoze (1914 aa).

#### DPT

Dermatopontin (Tirozinom-bogat kiseli matriksa protein, TRAMP) posreduje u adhezijama na površini stanica koje se ostvaruju preko integrina. Potiče TGFB1 aktivnost te inhibira proliferaciju stanica. Može poslužiti kao veza između površine stanice kožnih fibroblasta i ekstracelularnog matriksa. Ubrzava formiranje fibrila i stabilizira ih na niskim temperaturama (201 aa).

#### DES

Dezmin je intermedijarni filament koji se nalazi u mišićnim stanicama. U glatkim mišićnim stanicama tvori mrežu koja spaja miofibrile međusobno i s membranom plazme (470 aa).

#### HSPA1A

*Heat shock* 70kDa protein 1A (*Heat shock* 70 kDa protein 1, HSP70-1) je pratioc. U suradnji s drugim pratiocima stabilizira već postojeće proteine protiv agregacije i posreduje sklapanje novih translahiranih polipeptida u citosolu i staničnim organelima. Pratioci sudjeluju u ovim procesima zbog njihove sposobnosti da prepoznaju nenativne konformacije drugih proteina. Neophodan za STUB1-posredovanu ubikvitinaciju i degradaciju FOXP3 u regulatornim T-stanicama za vrijeme upale (641 aa).

#### POTEE

POTE anikrin domene obitelji član E (Prostate, jajnika, testisa-eksprimirani proteini na kromosomu 2); nepoznata funkcija (1075 aa).

#### HEBP1

Željezo-vezivni protein 1 (p22HBP) veže slobodne porfirogene koji mogu biti prisutni u stanici (189 aa).

## VIM

Vimentin spada u klasu III intermedijarnih elemenata. Sastavni je dio citoskeleta u mnogim vrstama ne-epitelnih stanica, osobito u mezenhimalnim stanicama. Nadeksprimiran je kod agresivnijih oblika karcinoma (466 aa).

## CSF3

Granulocitne kolonije-stimulirajući faktor (G-CSF, Pluripoietin) je citokin koji ima ulogu u hematopezi. Kontrolira proizvodnju, diferencijaciju i funkciju granulocita i monocita-makrofaga u krvi (207 aa).

## LDHB

L-laktat dehidrogenaze B lanac (EC 1.1.1.27, Renalnog karcinoma antigen NY-REN-46) je regulator proliferacije stanica. Smatra se prediktorom odgovora karcinoma dojke na kemoterapiju (334 aa).

## HSPE1

10 kDa *heat shock* protein (Rane-trudnoće faktor, EPF) je eukariotski CPN10 homolog. U kompleksu s CPN60 je neophodan za biogenezu proteina mitohondrija. U prisustvu Mg-ATP veže se za CPN60 i suprimira njegovu ATP-aznu aktivnost. Nadeksprimiran je kod karcinoma jajnika i debelog crijeva (102 aa).

## HSPB1

*Heat shock* protein beta-1 (Estrogen-regulirani 24 kDa protein) nastaje kao posljedica stresa u okolišu stanica i razvojnih promjena. Ima ulogu u translokaciji aktina iz citoplazme u jezgru i razvoju rezistencije na stres (205 aa).

## PRKCSH

Glukozidaze 2 podjedinica beta (Protein kinaze C substrat 60.1 kDa protein teški lanac) je regulatorna podjedinica glukozidaze 2. Gubitak njegove funkcije važan je u razvoju policistične bolesti jetre (528 aa).

## ARPC5L

Aktinu-srodni 2/3 kompleks podjedinica 5-sličan protein (Arp 2/3 kompleks 16 kDa podjedinica 2) je komponenta Arp 2/3 kompleksa koji sudjeluje u regulaciji polimerizacije aktina i jedan je od posrednika nastanka razgranate aktinske mreže (153 aa).

## PEBP1

Fosfatidiletanolamin-vežući protein 1 (*Raf* kinaze inhibitor protein) veže ATP, opioide, fosfatidiletanolamin. Inhibitor je serin proteaza te inhibira trombin, neuropsin, kimotripsin, tkivni tip aktivatora plazminogena i elastaze. Inhibira kinaznu aktivnost

RAF1 protonkoga na način da sprečava njegovu aktivaciju. Njegova ekspresija je važna u molekularnoj subklasifikaciji karcinoma dojke. Povećana ekspresija kod karcinoma prostate veže se uz progresiju bolesti (187 aa).

#### ERP29

Endoplazmatskog retikuluma protein 29 sudjeluje u obradi sekretornih proteina u ER. Ima ulogu u uspostavljanju integriteta epitelnih stanica te se smatra čimbenikom koji vodi epitelno-mezenhimalnu tranziciju i potiče zaustavljanje staničnog rasta raka dojke (261 aa).

#### CAPZA1

F-aktin-zaštitnog proteina podjedinica alfa-1 (CapZ alfa-1) veže se, neovisno o  $Ca^{2+}$ , na brzorastuće krajeve filamenata aktina te blokira izmjenu podjedinica na njima (286 aa).

#### DDAH1

N(G),N(G)-dimetilarginin dimetilaminhidrolaza 1 (EC 3.5.3.18, Dimetilargininaza-1) ima ulogu u stvaranju dušikova oksida. Hidrolizira inhibitore dušik oksid sintaze, tj. N(G),N(G)-dimetil-L-arginin (ADMA) i N(G)-monometil-L-arginin (MMA). Povećana ekspresija potiče proliferaciju endotela i angiogenezu (285 aa).

#### CBR3

Karbonil reduktaza [NADPH] 3 (EC 1.1.1.184, Kratki lanac dehidrogenaze/reduktaze obitelji 21C član 2); Enzim ima nisku NADPH-ovisnu oksidoredukcijsku aktivnost prema 4-benzoilpiridinu i menadionu. Njegova ekspresija je regulirana preko Nrf2 koji je ključni regulator odgovora na oksidativni stres u kulturama tumorskih stanica (277 aa).

#### PPP1CB

Serin/treonin protein fosfataza PP1-beta katalitička podjedinica (EC 3.1.3.53, EC 3.1.3.16, PP-1B) je fosfataza koja je povezana s preko 200 regulatornih proteina s svrhom nastanka visokospecifičnih holoenzima koji defosforiliraju čitav niz bioloških meta. Sudjeluje u diobi stanice, metabolizmu glikogena, kontraktilnosti mišića, sintezi proteina, regulaciji ionske provodljivosti i plastičnosti sinapsa (327 aa).

#### PRDX3

Tioredoxin-ovisna peroksid reduktaza, mitohondrijska (EC 1.11.1.15, Antioksidant protein 1, AOP-1) je enzim koji sudjeluje u redoks regulaciji stanice te štiti osjetljive enzime od oksidativnih oštećenja (256 aa).

#### ATP5L



ATP sintaza podjedinica g, mitohondrijska (ATPaze podjedinica g) producira ATP iz ADP-a u prisutnosti protonskog gradijenta kroz membranu. Gradijent nastaje od elektron transportnih kompleksa respiratornog lanca (103 aa).

#### GNB2

Gvanin nukleotid-vežući protein G(I)/G(S)/G(T) podjedinica beta-2 (G protein podjedinica beta-2) sudjeluje kao modulator u više transmembranskih signalnih sistema (340 aa).

#### UBE2N

Ubikvitin-konjugirajući enzim E2 N (EC 2.3.2.23,) je enzim koji katalizira sintezu nekanoničnih 'Lys-63'-vezanih poliubikvitin lanaca. Ovaj tip poliubikvitinacije ne dovodi do degradacije proteina u proteosomima. Enzim posreduje u transkripcijskoj aktivaciji ciljnih gena te ima ulogu u kontroli napredovanja staničnog ciklusa i diferencijaciji. Također, sudjeluje u popravku DNA i pomaže stanicama da prežive nakon oštećenja DNA. Sudjeluje u poliubikvitinaciji PCNA kao odgovoru na genotoksični stres, što je neophodno za popravak DNA. U dogovoru s TRIM5 generira poliubikvitinske lance koji dovode do ekspresije NF-kappaB i MAPK-osjetljivih upalnih gena (152 aa).

#### ACTG1

Aktin, citoplazmatski 2 (Gamma-aktin) sudjeluje u različitim oblicima pokretljivosti stanice i sastavni je dio adherentnih veza (375 aa).

#### TUBA1B

Tubulin alfa-1b lanac (Tubulin alfa-ubikvitarni lanac) sastavni je dio mikrotubula. Veže dva mola GTP-a, jedan na izmjenjivo mjesto beta lanca i jedan na neizmjenjivo mjesto alfa lanca. Njegovom acetilacijom i interakcijama pod utjecajem ARHGAP21 (negativni regulator Rho-GTPaza koje reguliraju međustanične adhezije) sudjeluje u njihovom remodeliranju te na taj način utječe na migraciju stanica i epitelno-mezenhimalnu tranziciju (451 aa).

#### CSR1

Cisteinom i glicinom-bogati protein 1 (Epididimisa luminalni protein 141) ima ulogu u neuralnom razvoju (193 aa).

#### CAPZA2

F-aktin-zaštitnog proteina podjedinica alfa-2 (CapZ alfa-2) veže se, neovisno o  $Ca^{2+}$ , na brzorastuće krajeve filamenata aktina te blokira izmjenu podjedinica na njima. Za razliku od drugih zaštitinih proteina, ne razdvaja aktinske filamente (286 aa).

#### ECHS1

Enoil-CoA hidrataza, mitohondrijska (EC 4.2.1.17) je enzim koji obrađuje ravnolančane enoil-CoA tioestere, od C4 do najmanje C16 (290 aa).

#### FBP1

Fruktoza-1,6-bifosfataza 1 (EC 3.1.3.11, D-fruktoza-1,6bifosfat 1-fosfohidrolaza 1) katalizira hidrolizu fruktoza 1,6-bifosfata u fruktoza 6-fosfat u prisustvu dvovalentnih kationa. Enzim ograničava glukoneogenezu (338 aa).

#### ESD

S-formilglutation hidrolaza (EC 3.1.2.12, Metilumbeliferil-acetat deacetilaza, EC 3.1.1.56) je serin hidrolaza koja je uključena u detoksifikaciju formaldehida (282 aa).

#### HIST2H3A

Histon H3.2 (Histon H3/m) je temeljni dio nukleosoma te zbog toga ima ulogu u regulaciji transkripcije, popravku i replikaciji DNA te stabilnosti kromosoma (136 aa).

#### PPIA

Peptidil-proлил cis-trans izomeraza A (EC 5.2.1.8, Ciklosporin A-vežući protein) ubrzava savijanje proteina (165 aa).

#### TTR

Transtiretin (Prealbumin) je tiroidni hormon vežući protein koji sudjeluje u transportu tiroksina iz krvi u mozak (147 aa).

#### ACTC1

Aktin, alfa srčani mišić 1 (Alfa-srčani aktin) sudjeluje u različitim oblicima pokretljivosti stanice (377 aa).

#### UBC

Poliubikvitin C postoji u dvije forme. U jednoj je slobodan, a u drugoj se kovalentno veže za druge proteine. Spajanjem njegovih mono/polimera za ciljane proteine sudjeluje u cijelom nizu staničnih procesa uključujući degradaciju proteina, popravku DNA, regulaciji staničnog ciklusa i signalnih puteva, modifikaciji kinaza i endocitozi (685 aa).

#### HSPA1A/1B

*Heat shock* 70kDa protein 1A/1B; Nepoznata uloga (641 aa).