

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

---

**Klobučar, Marko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2017**

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

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

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-05**

*Repository / Repozitorij:*



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





SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Marko Klobučar

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

DOKTORSKI RAD

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

Rijeka, 2017.

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Marko Klobučar

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

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2017.

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

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

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

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

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

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

## Sažetak

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

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

### **Ključne riječi**

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



## Summary

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

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

### **Keywords**

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

## Sadržaj

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

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

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

<b>9. Prilozi.....</b>	<b>184</b>
------------------------	------------

## 1. Uvod

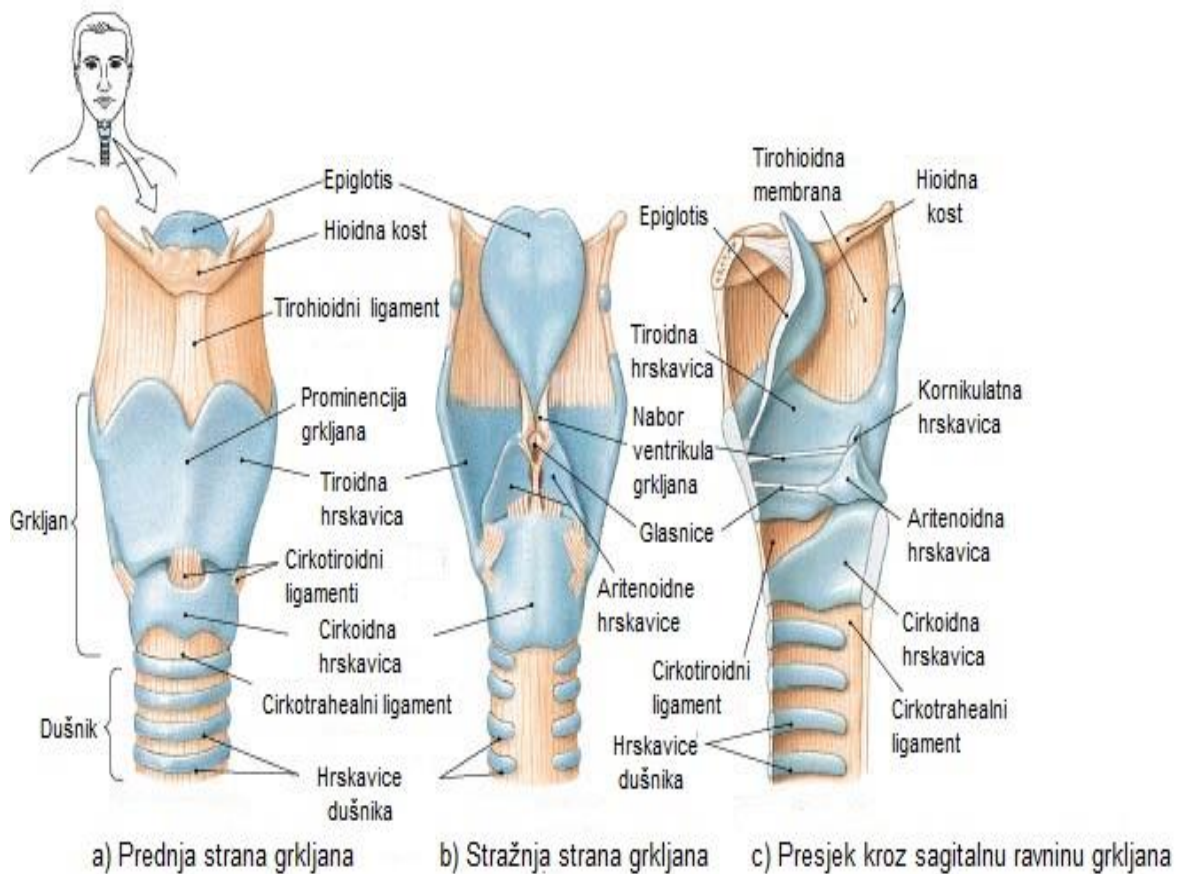
Planocelularni (skvamozni) karcinom grkljana (engl. *LSCC – Laryngeal squamous cell carcinoma*) je najčešći oblik malignog oboljenja područja glave i vrata kojeg rano tijekom progresije bolesti karakterizira učestala pojava metastaza u limfnim čvorovima vrata. Karcinom grkljana najčešće se javlja u muškaraca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

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

### **1.1. Osnove anatomije grkljana**

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





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



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

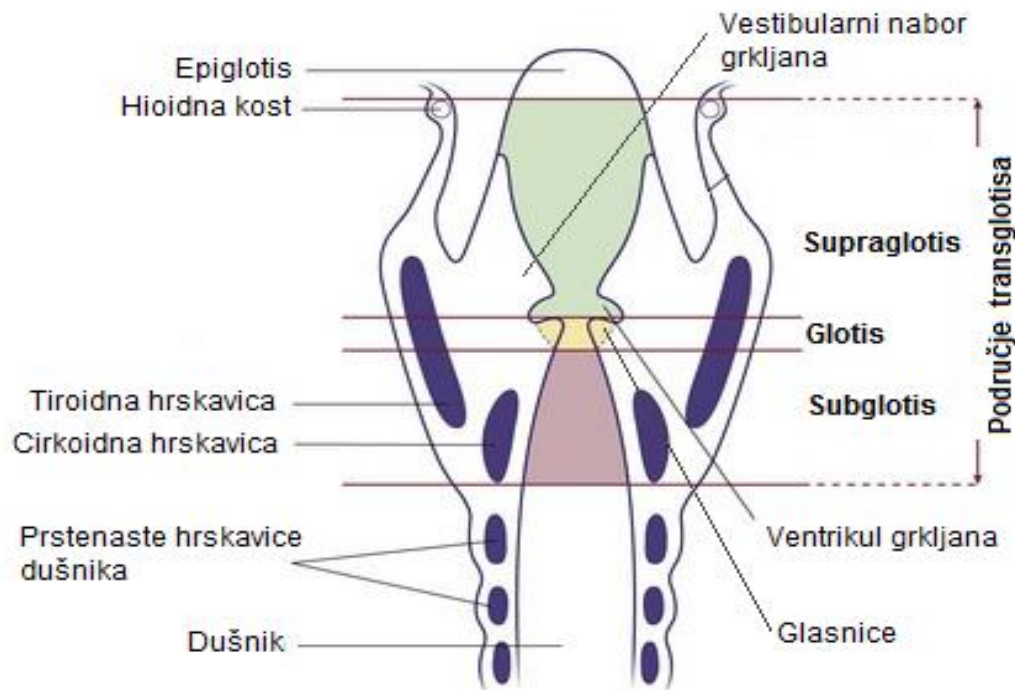
### **1.2.1. Etiologija**

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

### **1.2.2. Klinička lokalizacija**

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

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



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

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

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

Svaki pojedinačni aspekt TNM klasifikacije označava se kao kategorija:

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

Razvrstavanje tumora prema TNM sustavu pruža potpuni opis stvarne rasprostranjenosti bolesti. Klinički stadiji bolesti se obilježavaju brojevima I, II, III i IV te su rezultat zbroja vrijednosti unutar pojedinačnih kategorija TNM sustava (tablica 4). Tako primjerice tumor T<sub>1</sub>, N<sub>0</sub> i M<sub>0</sub> znači da je u I. kliničkom stadiju bolesti.

**Tablica 1.** T klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

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

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

**Tablica 2.** N klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

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

**Tablica 3.** M klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima

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

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

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



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

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

#### 1.2.4. Histopatološko stupnjevanje

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

#### 1.2.5. Širenje i metastaziranje

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

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

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

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

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

#### **1.2.6. Klinički tretman, prognoza i prediktivni faktori**

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

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

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

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

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

### **1.3. Molekularna osnova metastaziranja**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

#### **1.4. Proteomika karcinoma grkljana**

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.5. Uloga polisijalizacije adhezijske molekule neuralnih stanica u procesu kancerogeneze

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

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

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

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

## **2. Ciljevi istraživanja**

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

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Prikupljanje uzoraka tkiva pacijenata**

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

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

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

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

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

**Tablica 6.** Kliničke i patološke osobine pacijenata

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.2.2. Određivanje koncentracije proteina u tkivnim lizatima**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



### **3.2.4. Analiza uzoraka proteina pomoću metode LC-MS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.3. Pretraživanje funkcionalnih proteomskih i genomskih funkcionalnih baza podataka**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Tablica 9.** Uvjeti izoelektričnog fokusiranja

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

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

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

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



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

### **3.6. Priprema uzoraka tkiva tumora za imunohistokemijsku analizu**

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

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

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

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

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

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

## **4. Rezultati**

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

					GN=CSE1L	proteina
HOYHG0_HUMAN	2	2	<0,01	2,	Fragment nekarakteriziranog proteina OS=Homo sapiens PE=4 SV=1	-
SF3A1_HUMAN	2	2	<0,01	2,7	Podjedinica 1 splicing faktora 3A OS=Homo sapiens GN=SF3A1 PE=1 SV=1	Regulacija ekspresije gena
LIMA1_HUMAN	3	3	<0,01	2,8	Izoforma 4 aktin -vezujućeg proteina 1 sa LIM domenom OS=Homo sapiens GN=LIMA1	Organizacija aktinskih filamenata
AP2A1_HUMAN	3	3	<0,01	3,6	Izoforma B podjedinice alfa-1 AP-2 kompleksa OS=Homo sapiens GN=AP2A1	Proces endocitoze, EGFR signalni put, signalizacija putem TRK receptora
SYFB_HUMAN	2	2	<0,01	2,3	Beta podjedinica fenilalanin - tRNK ligaze OS=Homo sapiens GN=FARSB PE=1 SV=3	Regulacija ekspresije gena
APOL2_HUMAN	3	3	<0,01	2,3	Apolipoprotein L2	Metabolizam

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

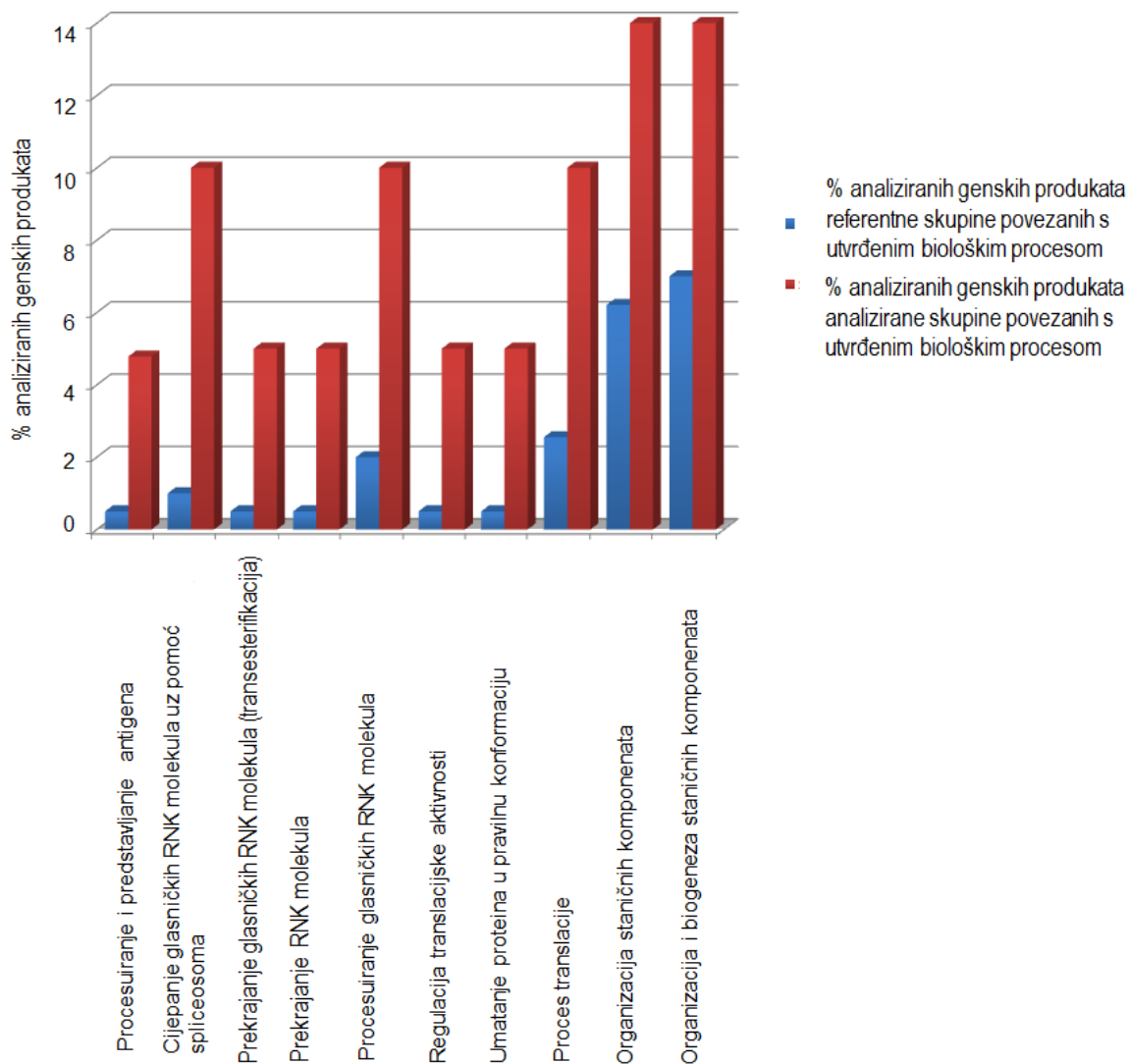
#### 4.2. Bioinformatička analiza rezultata kvantitativnoga proteomskog profila uzoraka metastatskoga tkiva

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

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

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

Utvrđeni najznačajniji biološki procesi povezani su s patogeneza bolesti i procesom metastaziranja uz pomoć klasifikacije platformom PANTHER, a cijeli je set diferencijalno ekspimiranih proteina u tumorskim tkivima analiziran uz pomoć funkcije PANTHER GO-slim (engl. *PANTHER overrepresentation test*). Ova se funkcija koristi statističkim alatima za grupiranje analiziranih skupina genskih produkata u određene ontološke grupe (Gene Ontology) čime se može analizirati status određenoga biološkog procesa. U ovoj su doktorskoj disertaciji proteini s pojačanom razinom ekspresije u tumorskom tkivu analizirani prema unaprijed određenim postavkama platforme PANTHER, a kao referentna skupina gena za usporedbu je korišten genom čovjeka (*Homo sapiens*) s ukupnom referentnom skupinom 20814 gena. PANTHER klasifikacija i statistička analiza pokazala je 10 statistički značajnih ( $p < 0.05$ ) bioloških procesa povezanih s diferencijalno ekspimiranim proteinima u tumorskom tkivu koji su bili povećani najmanje dva puta u odnosu na referentnu skupinu genskih produkata (slika 3, tablica 12). Biološki procesi s najvećom statističkom značajnošću povećani su za više od pet puta u odnosu na referentnu skupinu gena; radi se o procesima procesiranja molekula RNK (npr. procesiranje glasničke RNK molekule uz pomoć tzv. splicesoma i procesiranje molekula ribonukleinskih kiselina putem reakcija transesterifikacije), regulacije translacije, smatanja proteina i procesima povezanim s imunološkim odgovorom (slika 3, tablica 12). Proces čija je aktivnost bila povećana u odnosu na referentnu vrijednost za manje od pet puta su biogeneza i organizacija komponenata unutar stanice (slika 3, tablica 12). Od ukupno 218 analiziranih genskih produkata 47 genskih produkata nije bilo moguće analizirati (tablica 12).

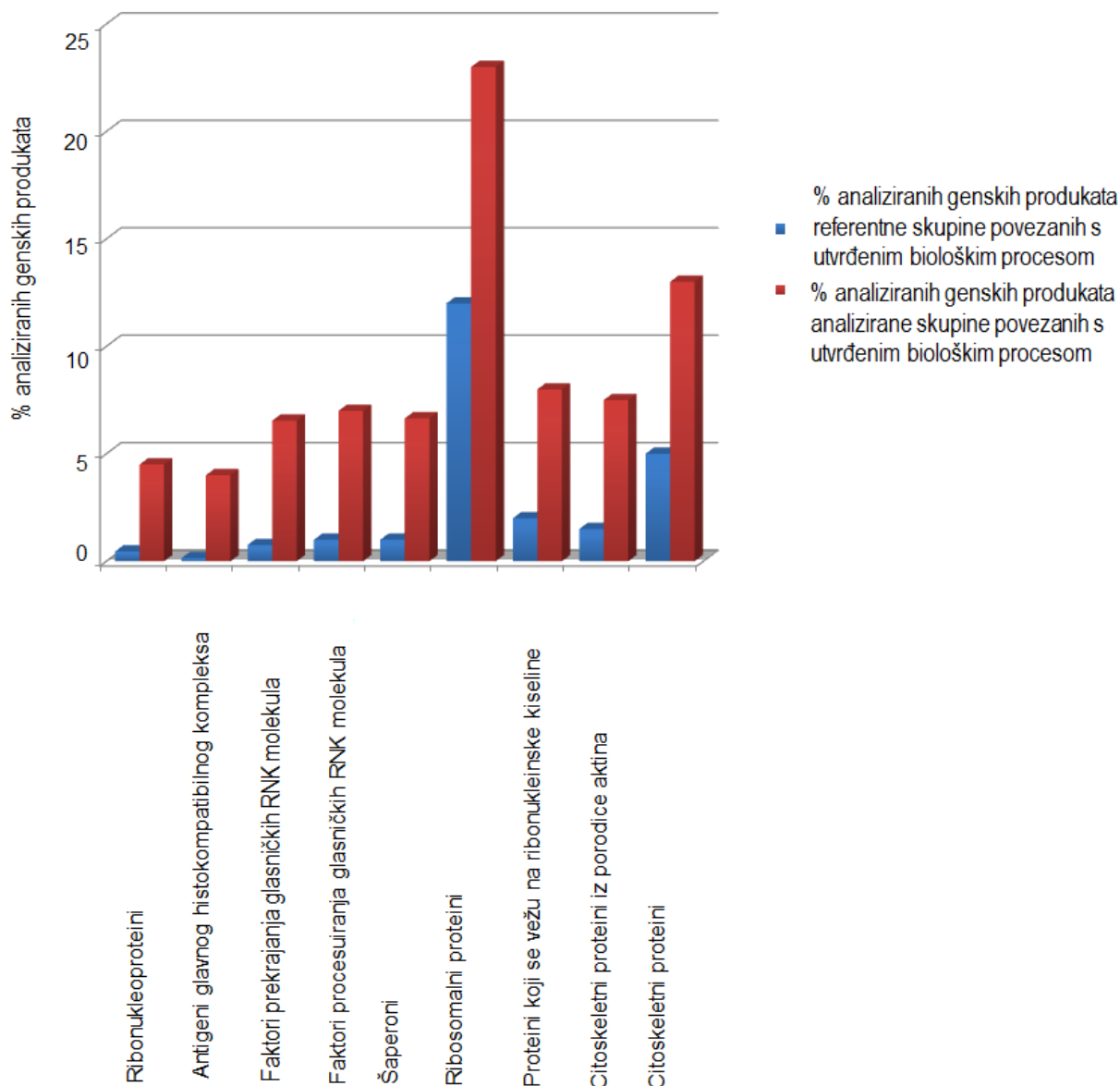


**Slika 3.** Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa pri  $p < 0.05$  u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini tumorskih tkiva (analizirana skupina gena) utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER (engl. *PANTHER overrepresentation test*): stupići prikazuju razinu povećanja procesa u odnosu na iste procese u referentnoj skupini gena/genskih produkata (genom *H.sapiens*). Postotak utvrđenih gena/genskih produkata unutar pojedinoga biološkog procesa je izračunat kao broj analiziranih genskih produkata uvrštenih u određenu kategoriju/ukupan broj analiziranih genskih produkata x 100.

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

<b>PANTHER GO-Slim biološki proces</b>	<b>RS</b>	<b>AS</b>	<b>FC</b>	<b>p-vrijednost</b>
Procesuiranje i predstavljanje antigena (GO:0019882)	56	6	> 5	5.66E-03
Cijepanje glasničkih RNK molekula uz pomoć spliceosoma (GO:0000398)	183	17	> 5	2.00E-09
Prekranje glasničkih RNK molekula putem reakcija transesterifikacije	132	10	> 5	2.61E-04
Prekranje RNK molekula (GO:0008380)	135	10	> 5	3.18E-04
Procesuiranje glasničkih RNK molekula (GO:0006397)	274	17	> 5	8.63E-07
Regulacija translacijske aktivnosti (GO:0006417)	148	8	> 5	3.22E-02
Umatanje proteina u pravilnu konformaciju (GO:0006457)	155	8	> 5	4.39E-02
Proces translacije (GO:0006412)	435	17	3.89	5.45E-04
Organizacija staničnih komponenti (GO:0016043)	1206	27	2.23	1.94E-02
Organizacija i biogeneza staničnih komponenti (GO:0071840)	1316	28	2.12	3.33E-02
Neklasificirani geni/genski produkti	8629	47	0.54	0.00E00

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



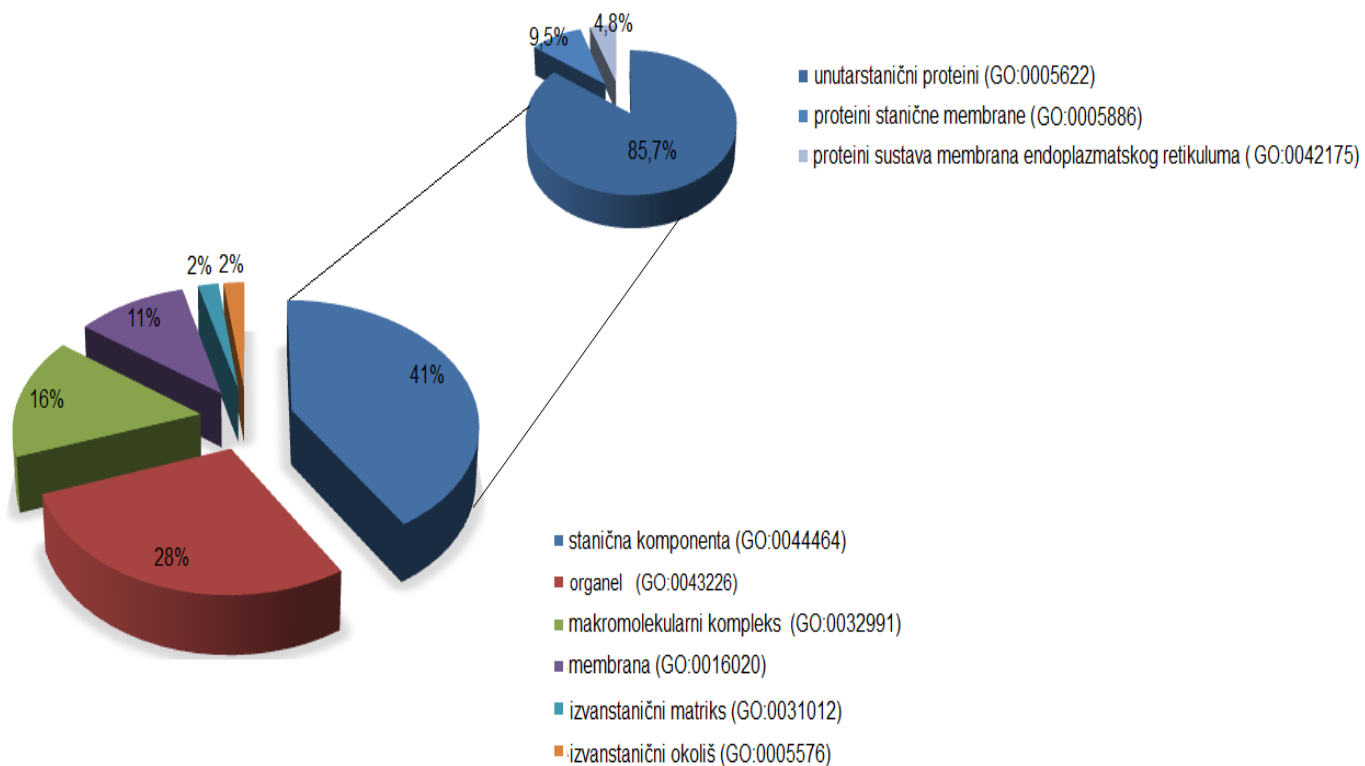
**Slika 4.** Grafički prikaz statistički značajnih razreda proteina PANTHER za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorskim tkivima (analizirana skupina genskih produkata): stupići prikazuju povećanje procesa u odnosu na iste procese u referentnoj skupini gena/genskih produkata (genom *Homo sapiens*). Postotak utvrđenih gena/genskih produkata unutar pojedinoga biološkog procesa izračunat je kao broj analiziranih genskih produkata uvrštenih u određenu kategoriju/ukupan broj analiziranih genskih produkata x 100.

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

<b>PANTHER razred proteina</b>	<b>RS</b>	<b>AS</b>	<b>FC</b>	<b>p-vrijednost</b>
Ribonukleoproteini (PC00201)	51	6	> 5	3.09E-03
Antigeni glavnoga histokompatibilnog kompleksa (PC00149)	46	5	> 5	2.33E-02
Faktori prekrajanja glasničkih RNK molekula (PC00148)	121	11	> 5	1.16E-05
Faktori procesuiranja glasničkih RNK molekula (PC00147)	166	12	> 5	3.32E-05
Šaperoni (PC00072)	196	12	> 5	1.88E-04
Ribosomalni proteini (PC00202)	225	10	4.43	2.22E-02
Proteini koji se vežu na ribonukleinske kiseline (PC00031)	859	36	4.17	9.23E-11
Citoskeletni proteini iz porodice aktina(PC00041)	395	13	3.28	4.26E-02
Citoskeletni proteini (PC00085)	806	24	2.97	4.91E-04
Neklasificirani geni/genski produkti	9675	58	0.60	0.00E0

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

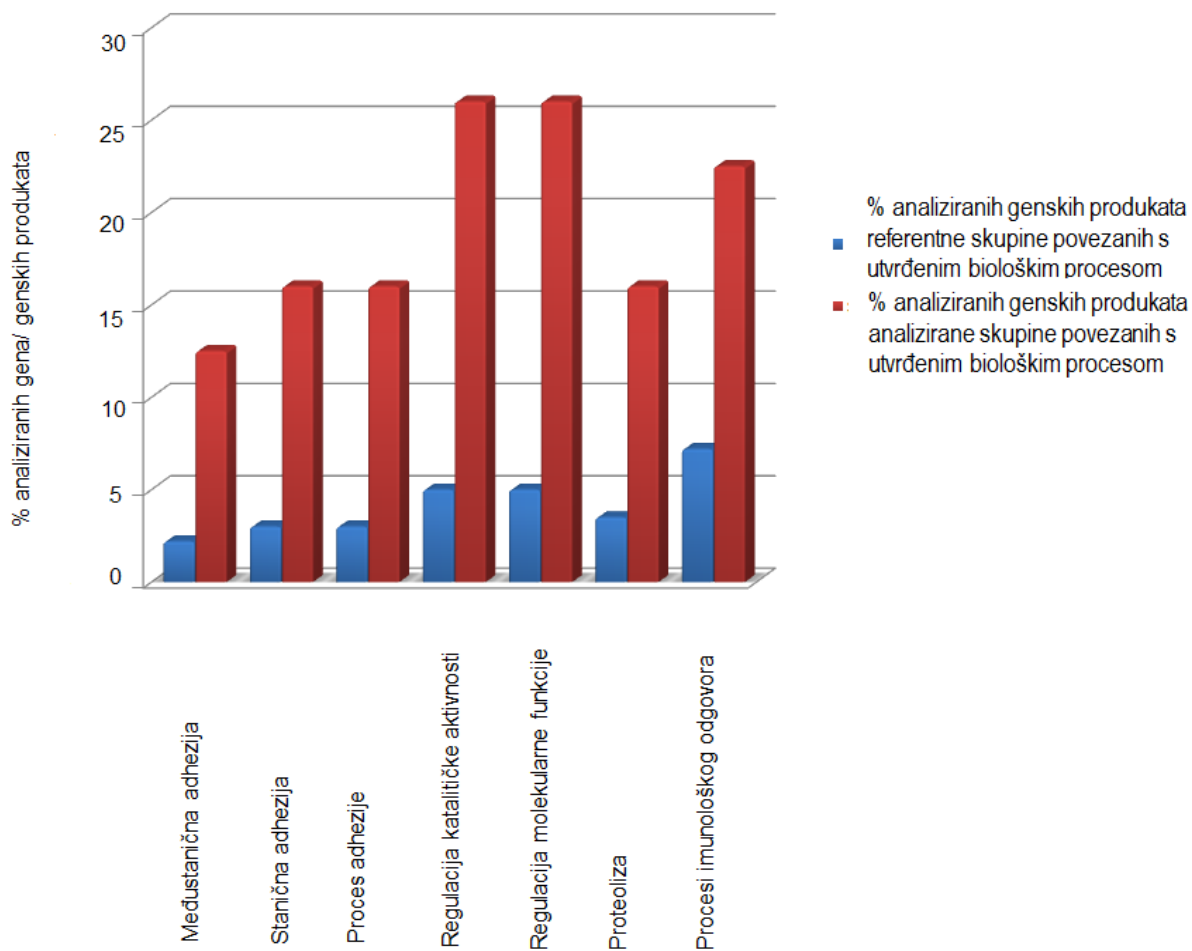




**Slika 5.** Grafički prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskim tkivima prema staničnoj lokalizaciji (broj proteina koji pripada određenoj ontološkoj kategoriji stanične lokalizacije je izražen u postotku).

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

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

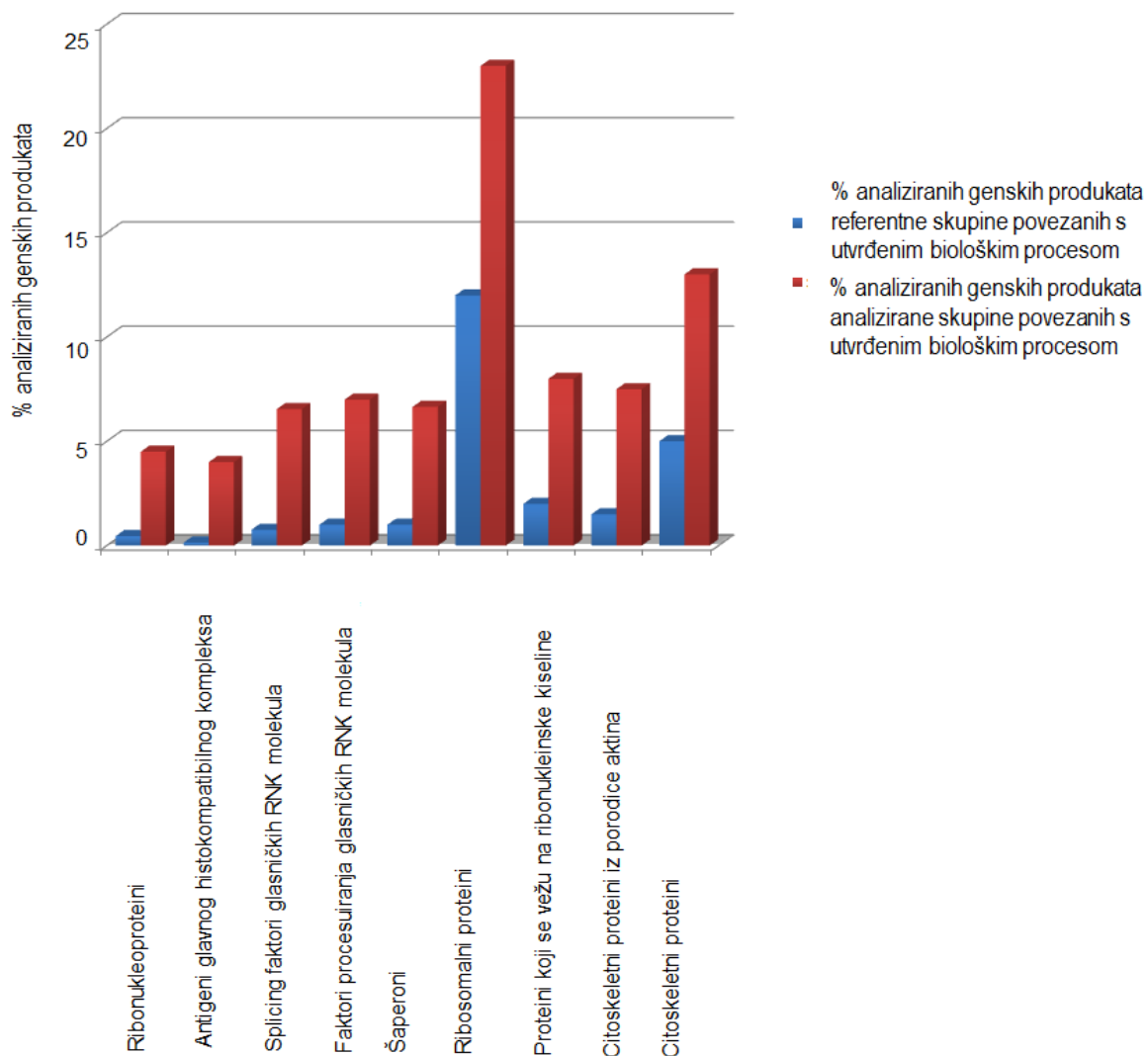


**Slika 6.** Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorom nezahvaćenim tkivima utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER: stupići prikazuju povećanje procesa u odnosu na iste procese u referentnoj skupini genskih produkata (genom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

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

<b>PANTHER GO-slim biološki proces</b>	<b>RS</b>	<b>AS</b>	<b>FC</b>	<b>p-vrijednost</b>
Međustanična adhezija (GO:0016337)	391	8	> 5	5.29E-03
Stanična adhezija (GO:0007155)	579	10	> 5	2.03E-03
Proces adhezije (GO:0022610)	606	10	> 5	3.01E-03
Regulacija katalitičke aktivnosti (GO:0050790)	1073	16	4.93	1.97E-05
Regulacija molekularne funkcije (GO:0065009)	1096	16	4.82	2.62E-05
Proteoliza (GO:0006508)	719	10	4.60	1.28E-02
Procesi imunološkog odgovora (GO:0002376)	1391	14	3.33	1.28E-02
Neklasificirani geni/genski produkti	8629	16	0.61	0.00E00

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

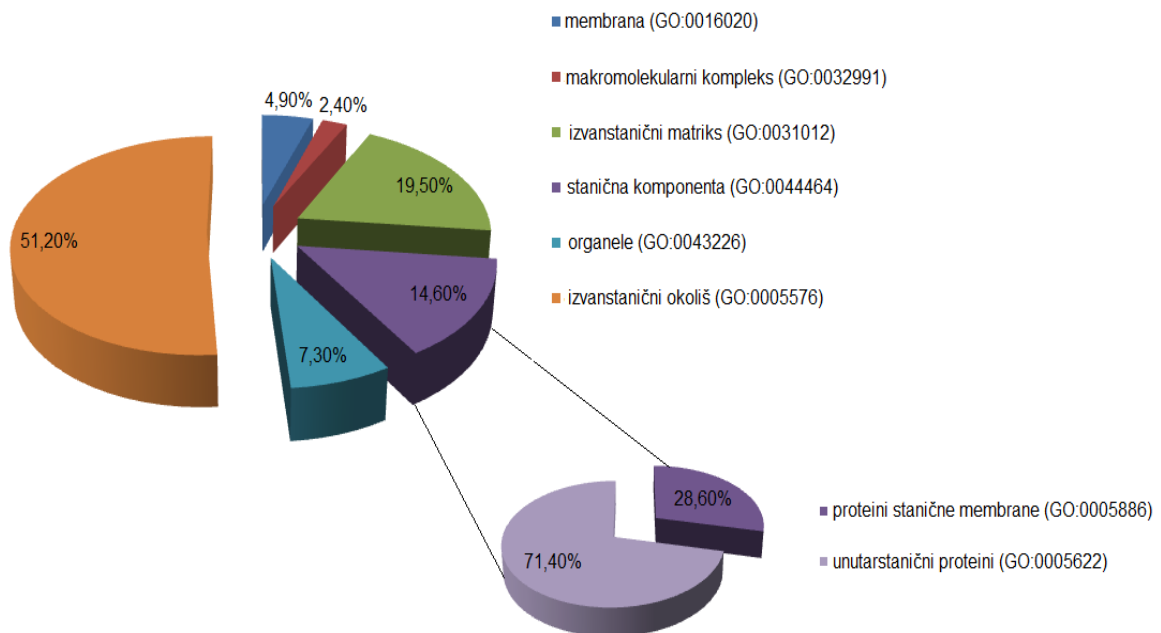


**Slika 7.** Grafički prikaz statistički značajnih razreda proteina za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorom nezahvaćenim tkivima pomoću klasifikacije PANTHER i njihovo povećanje u odnosu na iste razrede proteina u referentnoj skupini genskih produkata (genom *Homo sapiens*). Postotak utvrđenih gena/genskih produkata vezanih uz pojedini biološki proces izračunat je kao: broj analiziranih genskih produkata uvrštenih u određenu kategoriju/ukupan broj analiziranih genskih produkata x 100.

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

<b>Razred proteina PANTHER</b>	<b>RS</b>	<b>AS</b>	<b>FC</b>	<b>p-vrijednost</b>
Komponente komplement sustava (PC00078)	51	5	> 5	1.12E-04
Inhibitori serinskih proteaza (PC00204)	119	11	> 5	2.03E-11
Inhibitori proteaza (PC00191)	245	14	> 5	4.33E-12
Proteini izvanstaničnog matriksa (PC00102)	380	8	> 5	3.97E-03
Transportni proteini (PC00219)	400	7	> 5	4.24E-02
Modulatori enzimske aktivnosti (PC00095)	1346	15	3.68	1.82E-03
Neklasificirani geni/genski produkti	9675	14	0.48	0.00E00

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



**Slika 8.** Grafički prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima prema staničnoj lokalizaciji (broj proteina koji pripada određenoj ontološkoj kategoriji stanične lokalizacije je izražen u postotku).

S obzirom da je identifikacija proteina masenom spektrometrijom i naknadna bioinformatička analiza pokazala velik broj proteina i signalnih puteva koji su uključeni u razvoj i biologiju metastatskoga planocelularnog karcinoma larinksa, odabrane su



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

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

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

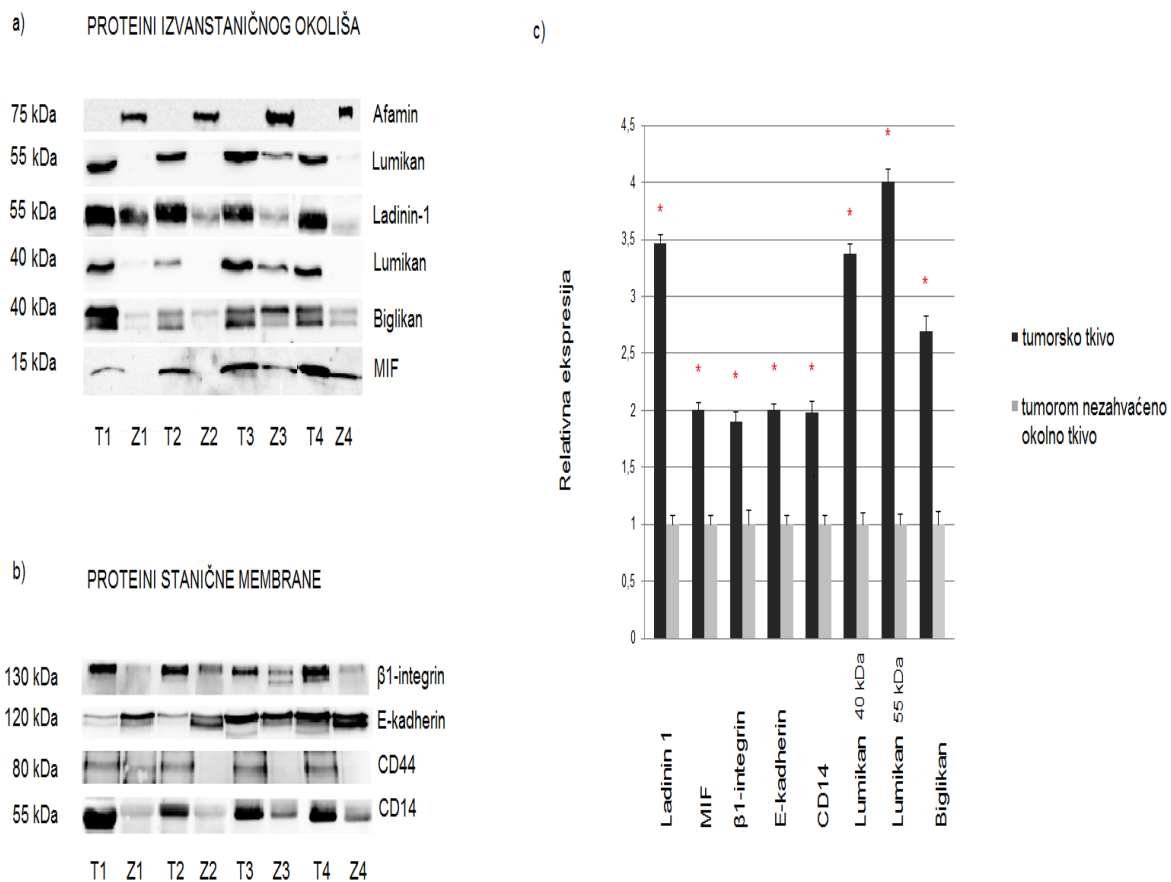
- proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (membranski proteini E-kadherin i  $\beta$ 1 integrin, unutarstanični protein vimentin, inaktivirani oblik Src kinaze i aktivirani oblik  $\beta$ -katenina)
- signalni put nuklearnog faktora kapa B (aktivirani oblik p65 podjedinice nuklearnog faktora kapa B; p65 Nf $\kappa$ B i protein RANKL (engl. *RANKL-Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) faktor inhibicije migracije makrofaga-MIF
- signalni put MAPK (aktivirani oblik p38 proteina, pp38)
- proces promjena citoskeleta ( $\alpha$ -tubulin, i  $\beta$ -aktin)

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

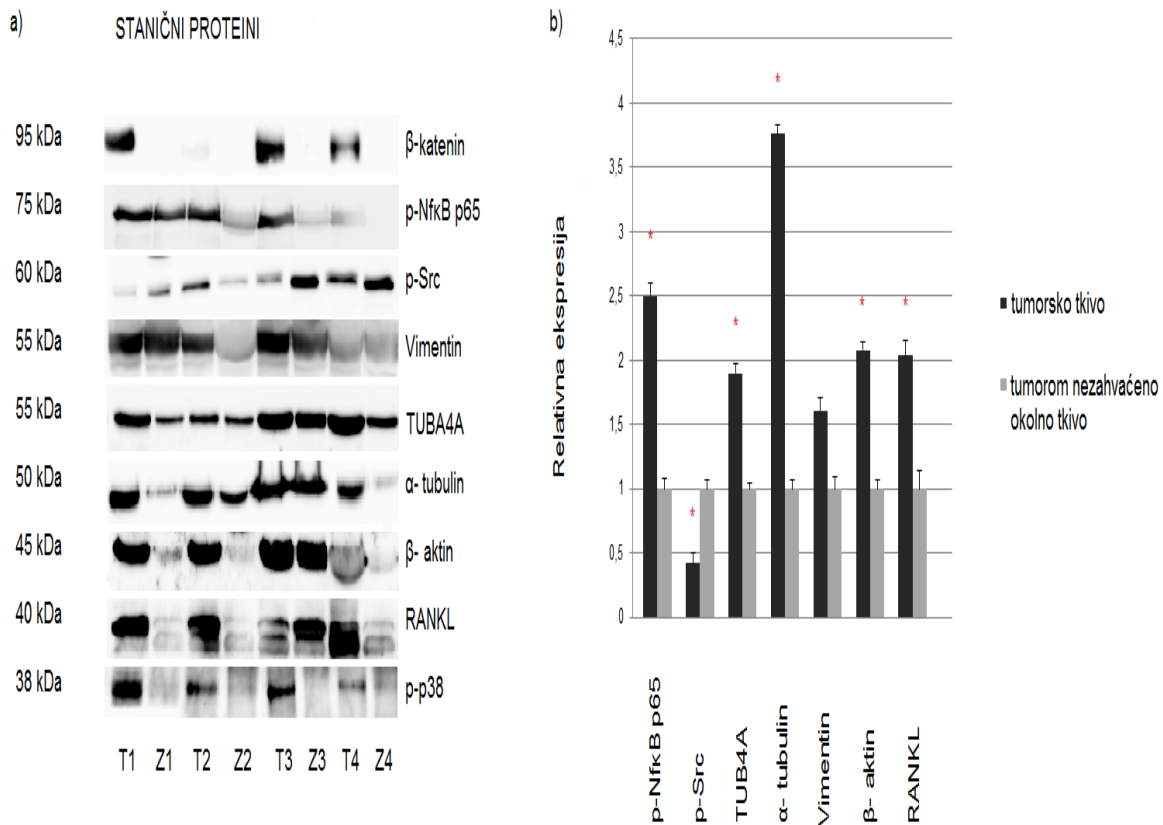
#### **4.3.1. Rezultati analize ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tkiva nezahvaćenih tumorom tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s metastatskim planocelularnim karcinomom grkljana**

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

Analiza ekspresije odabranih signalnih proteina je pokazala statistički značajno povećanje ekspresije ( $p < 0.05$ ) svih analiziranih proteina u tkivima tumora metastatskog oblika bolesti u odnosu na tumorom nezahvaćena tkiva s izuzetkom citoskeletnog proteina vimentina i inaktiviranog oblika Src kinaze (slika 10). Razina ekspresije vimentina je isto tako bila povećana u tumorskom tkivu, ali bez statističke značajnosti, dok je razina ekspresije inaktivnog oblika Src kinaze bila statistički značajno snižena ( $p < 0.05$ ) u tumorskom tkivu (slika 10).



**Slika 9.** Primjer rezultata analize ekspresije afamina, lumikana, ladinina-1, biglikana, MIF,  $\beta$ 1-integrina, E-kadherina, CD44 i CD14 u tumorskom tkivu četiri pacijenta s metastatskim karcinomom grkljana metodom *Western blot* u izvanstaničnom okolišu (a) i staničnoj membrani (b) i normalizirani rezultati u odnosu na pripadajuće tumorom nezahvaćeno tkivo (relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardana devijacija) (c). Kemiluminiscentni signal proteina afamina je detektiran samo u uzorcima pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva, dok je signal CD44 proteina detektiran samo u uzorcima primarnih metastatskih tumora (razina relativne ekspresije nije prikazana na slici). Statistički značajna promjena ( $p < 0,05$ ) je označena zvjezdicom. Kratice: T 1-4 – uzorci tkiva primarnih tumora 4 različita pacijenta s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata ; Z 1-4 –uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata. Rezultati za ekspresiju afamina, ladinina-1, CD14 i MIF su u skladu s rezultatima proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa.



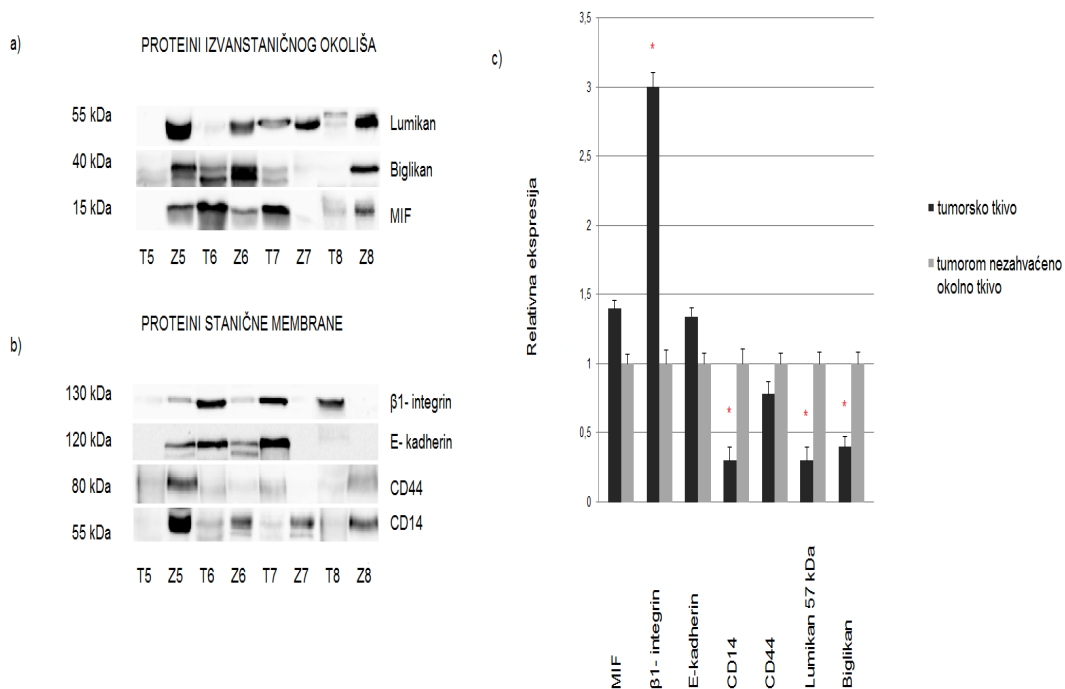
**Slika 10.** Primjer rezultata analize ekspresije  $\beta$ -katenina, p-Nf $\kappa$ B p65, p-Src, vimentina, TUBA4A,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -aktina, RANKL, p-p38 u tumorskom tkivu četiri pacijenta s metastatskim karcinomom grkljana metodom *Western blot* (a) i normalizirani rezultati u odnosu na pripadajuće tumorom nezahvaćeno tkivo (relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardana devijacija) (b). Ekspresija  $\beta$ -katenina i pp38 detektirana je samo u primarnim metastatskim tumorima (razina relativne ekspresije nije prikazana na slici). Statistički značajna ( $p < 0,05$ ) promjena u razini relativne ekspresije proteina označena je zvjezdicom. Kratice: T 1-4 – uzorci tkiva primarnih tumora 4 različita pacijenta pacijenta sa dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata; Z 1-4 –uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata. Razina relativne ekspresije alfa-4a lanca tubulina -TUBA4A u skladu je sa rezultatima proteomskog profiliranja uz pomoć spektrometrije masa.

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

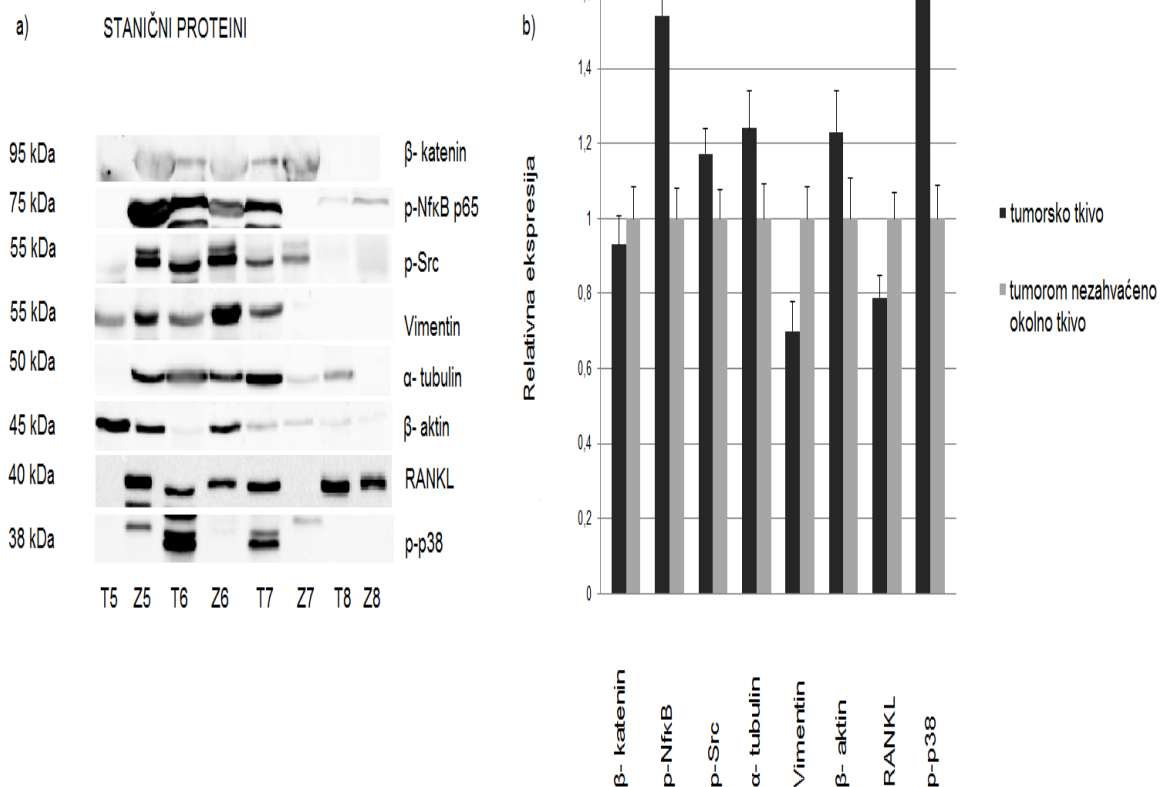
Analiza ekspresije odabranih proteinskih meta u uzorcima tumorskih tkiva i tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s nemetastatskim planocelularnim karcinomom larinksa je provedena na tkivima četiri pacijenta, a statistički smanjena ekspresija ( $p < 0.05$ ) je utvrđena za CD14 antigen i lumikan (slika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

Uz prethodno je navedene proteine na uzorcima tkiva pacijenata s nemetastatskom bolesti ispitana i razina relativne ekspresije malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa biglikana, proteina stanične membrane (E-kadherin,  $\beta$ 1-integrin i CD44 antigen) i staničnih proteina koji uključuju inaktivirani oblik Src-kinaze, aktivirani oblik p38 proteina,  $\beta$ -katenina i aktivirani oblik p65 podjedinice nuklearnog faktora kapa B te citoskeletne proteine vimentin,  $\alpha$  tubulin i  $\beta$ -aktin. U uzorcima tkiva primarnih tumora statistički značajna povećana razina ekspresije utvrđena je jedino u slučaju membranskog proteina  $\beta$ 1-integrina (slika 11), dok je za p65 podjedinicu Nf kapa B proteina, inaktivan oblik Src-kinaze, aktivirani oblik p-38 proteina i citoskeletne proteine  $\alpha$  tubulin i  $\beta$ -aktin utvrđen statistički beznačajan porast razine relativne ekspresije (slika 12). Suprotno rezultatima *Western blot* analize razine relativne ekspresije proteina kod uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od metastatske bolesti, u

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



**Slika 11.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina stanične membrane lumikana, biglikana i MIF (a) te proteina izoliranih iz uzoraka tumorskih i pripadajućih, tumorom nezahvaćenih tkiva  $\beta$ -integrina, E-kadherina, CD44 i CD14 (b) u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata te normalizirani rezultati u odnosu na pripadajuće tumorom nezahvaćeno tkivo (relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardna devijacija) (c). Ekspresiju proteina afamina i ladinina -1 nije bilo moguće utvrditi. Statistički značajna ( $p < 0,05$ ) promjena u razini relativne ekspresije proteina je označena zvjezdicom. Kratice: T 5-8 – primarni tumori; Z 5-8 – pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva.



**Slika 12.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina  $\beta$ -katenina, p-Nf $\kappa$ B p65, p-Src, vimentina,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -aktina, RANKLA i p-p38 u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg, tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata te normalizirani rezultati u odnosu na pripadajuće tumorom nezahvaćeno tkivo (relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardana devijacija) (c). Ekspresiju alfa-4a lanca tubulina nije bilo moguće utvrditi. Statistički značajna ( $p < 0,05$ ) promjena u razini relativne ekspresije proteina označena je zvjezdicom. Kratice: T 5-8 – uzorci primarnih tumora; Z 5-8 – uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata

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

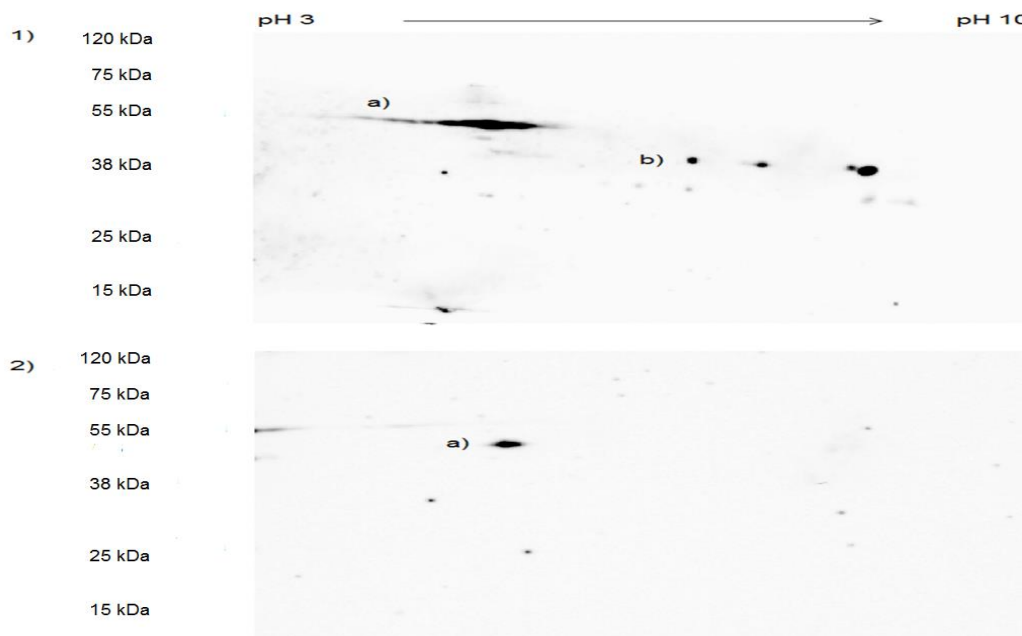
Lumikan je proteoglikan izvanstaničnog okoliša i pripada porodici malih proteoglikana čije proteinske osnovice približne molekularne mase od 40 kDa sadrže konzervirane ponavljajuće leucinske regije [181]. Uz proteoglikansku formu lumikana kod koje je proteinska osnovica kovalentno modificirana negativno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

U svrhu utvrđivanja postojanja različitih glikoformi lumikana i njihovog doprinosa procesu kancerogeneze i metastaziranja planocelularnog karcinoma grkljana u ovom je doktorskom radu uz pomoć 2-DE imunoblot analize ispitana ekspresija lumikana u ukupnom proteinskom lizatu svih uzoraka tumorskih i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od metastatske i nematstatske bolesti. Uz to je zbog utvrđivanja približne vrijednosti izoelektričnih točaka detektiranih glikoformi lumikana na istim uzorcima analizirana i ekspresija  $\alpha$ -tubulina čija teorijska izoelektrična točka iznosi 4,8.

U uzorcima tumorskih tkiva pacijenata s metastatskom bolesti utvrđeno je postojanje dvaju oblika lumikana: (1) glikoziliranog oblika približne molekularne mase od 55 kDa, što je prema dosadašnjoj literaturi najvjerojatnije glikoproteinska forma

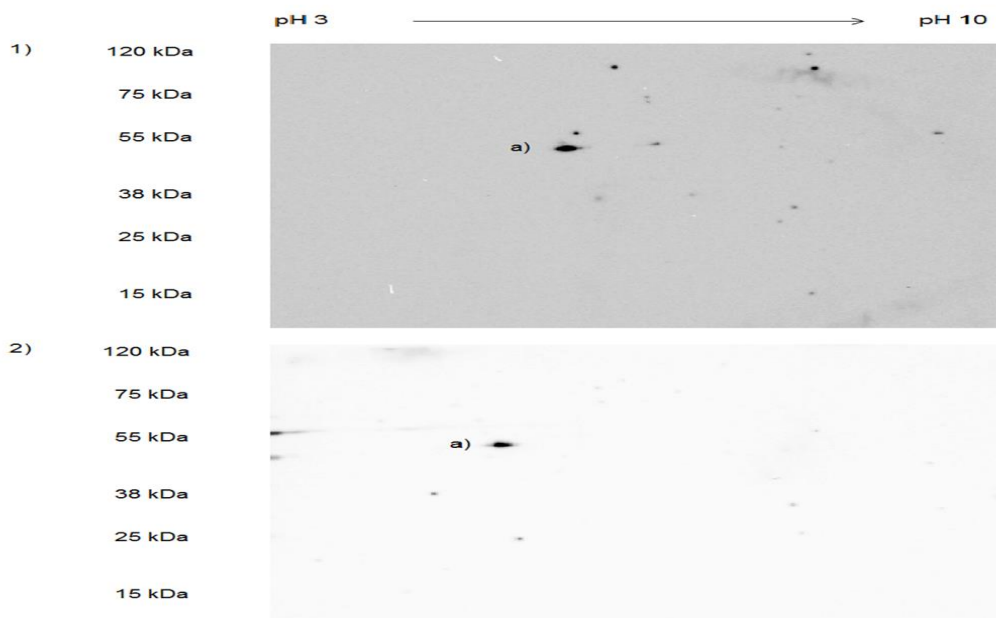


lumikana, i (2) neglikozilirane proteinske osnovice lumikana molekularne mase od 40 kDa. U odnosu na detektiranu proteinsku točku  $\alpha$ -tubulina je proteinska točka glikoziliranog oblika lumikana detektirana na širokom rasponu nižih pH vrijednosti gela (približno između pH 3 do 5; slika 13.). Ovo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



**Slika 13.** Primjer rezultata dvodimenzionalne imunoblot analize lumikana. 1) ekspresija glikoziliranog (1.a) i neglikoziliranog (1.b) oblika lumikana i 2) ekspresija  $\alpha$ -tubulina (2.a) u tumorskim tkivima pacijenata s metastatskom bolesti.

Ekspresija lumikana u tkivima pacijenata s nemetastatskom bolesti utvrđena je samo u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima. U tim je uzorcima detektirana samo ekspresija lumikana u obliku glikoproteina molekularne veličine od 55 kDa i izoelektrične točke približne vrijednosti od 6 što je određeno prema vrijednosti izoelektrične točke  $\alpha$ -tubulina (slika 14). Ovaj rezultat je suprotan rezultatu dobivenom u tumorima pacijenata s metastatskom bolesti, a prati ga i odsustvo neglikozilirane proteinske osnovice lumikana u uzorcima istih tkiva. Ovaj rezultat ukazuje na doprinos različitih formi lumikana procesu kancerogeneze ovisno o stadiju bolesti. Isto tako je vrijednost izoelektrične točke detektiranog oblika lumikana u ukupnom proteinskom lizatu izoliranom iz pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata s nemetastatskom bolesti u skladu s teorijskom vrijednošću izoelektrične točke lumikana, što ukazuje na odsustvo negativno nabijenih ugljikohidratnih ostataka u glikanskom dijelu molekule. Lumikan s negativno nabijenim ugljikohidratnim ostacima u glikanskom dijelu molekule prisutan je u tumorima pacijenata s metastatskom bolesti.



**Slika 14.** Primjer rezultata dvodimenzionalne imunoblot analize lumikana. 1) ekspresija glikoziliranog (1.a) oblika lumikana i 2) ekspresija  $\alpha$ -tubulina (2.a) u tumorskim tkivima pacijenata s nemetastatskom bolesti

#### **4.5. Ekspresija polisijaliziranog oblika NCAM-molekule u sekcijama primarnih tumora pacijenata s metastatskim i nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana**

Analiza ekspresija polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica provedena je imunohistokemijskom metodom u sekcijama primarnih tumora pacijenata s metastatskim i nemetastatskim planocelularnim karcinomom grkljana. Rezultati ukazuju na različitu lokalizaciju i razinu ekspresije PSA-NCAM (slika 15). Naime, može se utvrditi da je u tkivima tumora prisutna difuzna i ograničena PSA-NCAM ekspresija u otočićima tumorskih stanica koja je obično praćena jačim intenzitetom bojanja (slika 15). Ekspresija PSA-NCAM utvrđena je u citoplazmi i izvanstaničnom prostoru tumorskih stanica (slika 15), u zoni intenzivne keratinizacije unutar tumorske mase (slika 15.) i gotovo u svim slučajevima u području upalne reakcije vezane uz tumor. Isto tako se u određenim slučajevima reakcija na PSA-NCAM vidjela i u bazalnom sloju stanica zdravog epitela koji se nalazi neposredno uz tumorsku masu (slika 15). Unutar metastatske skupine uzoraka tkiva primarnih tumora, ekspresija PSA-NCAM nije utvrđena kod četiri uzorka (31 %), dok je reakcija bojanja bila slabo pozitivna u jednom (8 %), umjereno pozitivna u 6 (46 %) i jako pozitivna u tri (15 %) uzorka tumorskih tkiva (slika 16). Ekspresija u histološki neizmijenjenom epitelu neposredno uz tumorsku masu metastatske skupine uzoraka je utvrđena u sedam uzoraka (54 %) od kojih su tri pokazivala slabo pozitivnu (43 %) i četiri (57 %) jaku pozitivnu reakciju (slika 16). U nemetastatskoj skupini uzoraka tumorskih tkiva pozitivna PSA-NCAM reakcija nije utvrđena u jednom slučaju (6 %), dok su slabe, umjerene i jako pozitivne reakcije redom utvrđene u četiri (22 %), sedam (39 %) i šest (33 %) slučajeva (slika 16). Nadalje, PSA-NCAM imunoreaktivnost histološki neizmijenjenog epitela neposredno uz tumorsku masu nemetastatske skupine uzoraka tkiva tumora nije utvrđena u šest (33 %), dok su slabe i umjerene PSA-NCAM reakcije utvrđene u pet (28 %) i šest (33 %) slučajeva oboljelih (slika 16). Statistička analiza nije pokazala značajnu povezanost između kliničko-patoloških parametara (T-stupnja tumora i gradusa tumora) i razine PSA-NCAM ekspresije što je analizirano preko parametra IRS za svaki uzorak (engl. *IRS-immunoreactivity scoring system*) (tablice 16,17,19, 20). Nadalje, treba napomenuti da je trend rasta razine PSA-NCAM ekspresije bez statističke značajnosti ( $p>0.05$ )

zamijećen u skupini histološki slabo diferenciranih tumora gradusa III (slika 16). Uz to, statistiĉki znaĉajna razlika nije utvrđena između IRS vrijednosti za okolni, histološki neizmijenjeni epitel (tablica 21) koji se nalazi neposredno uz tumor i IRS vrijednosti metastatskih primarnih tumora. Suprotno tomu je statistiĉki znaĉajna ( $p < 0.05$ ) povećana razina PSA-NCAM ekspresije u odnosu na okolni histološki neizmijenjeni epitel utvrđena u uzoraka primarnih tumora koji nisu metastazirali u limfne ĉvorove vrata (slika 16).

**Tablica 16.** T-stupanj i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s nemetastatskom bolesti.

Uzorak	T-stupanj	IRS vrijednost
1.	T1	2
2.	T2	2
3.		3
4.		3
5.		1
6.		2
7.		3
8.	T3	2
9.		3
10.		0
11.		3

12.		2
13.		1
14.	T4	2
15.		1
16.		3
17.		2
18.		1

**Tablica 17.** Histološki gradus i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s nemetastatskom bolesti.

Uzorak	Gradus tumora	IRS vrijednost
1.	I	2
2.		0
3.		2
4.		1
5.	II	1
6.		3
7.		2

8.		3
9.		1
10.		3
11.		3
12.		2
13.		1
14.		2
15.	III	2
16.		2
17.		3
18.		3

**Tablica 18.** IRS vrijednosti za primarne tumore i pripadajuće histološki neizmijenjene epitelne komponente neposredno uz tumorsku masu kod nemetastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana.

Uzorak	Tumor	Histološki neizmijenjena epitelna komponenta neposredno uz primarni tumor
	IRS vrijednost	IRS vrijednost
1.	2	0

2.	2	1
3.	2	0
4.	1	0
5.	3	3
6.	2	1
7.	3	2
8.	0	0
9.	3	2
10.	2	2
11.	1	1
12.	3	2
13.	3	2
14.	1	1
15.	2	0
16.	1	0
17.	2	1
18.	3	2

**Tablica 19.** T-stupanj i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.

Uzorak	T-stupanj	IRS vrijednost
1.	T1	2
2.	T2	2
3.		0
4.		2
5.		2
6.		2
7.	T3	2
8.		0
9.		3
10.		0
11.		3
12.		0
13.	T4	1

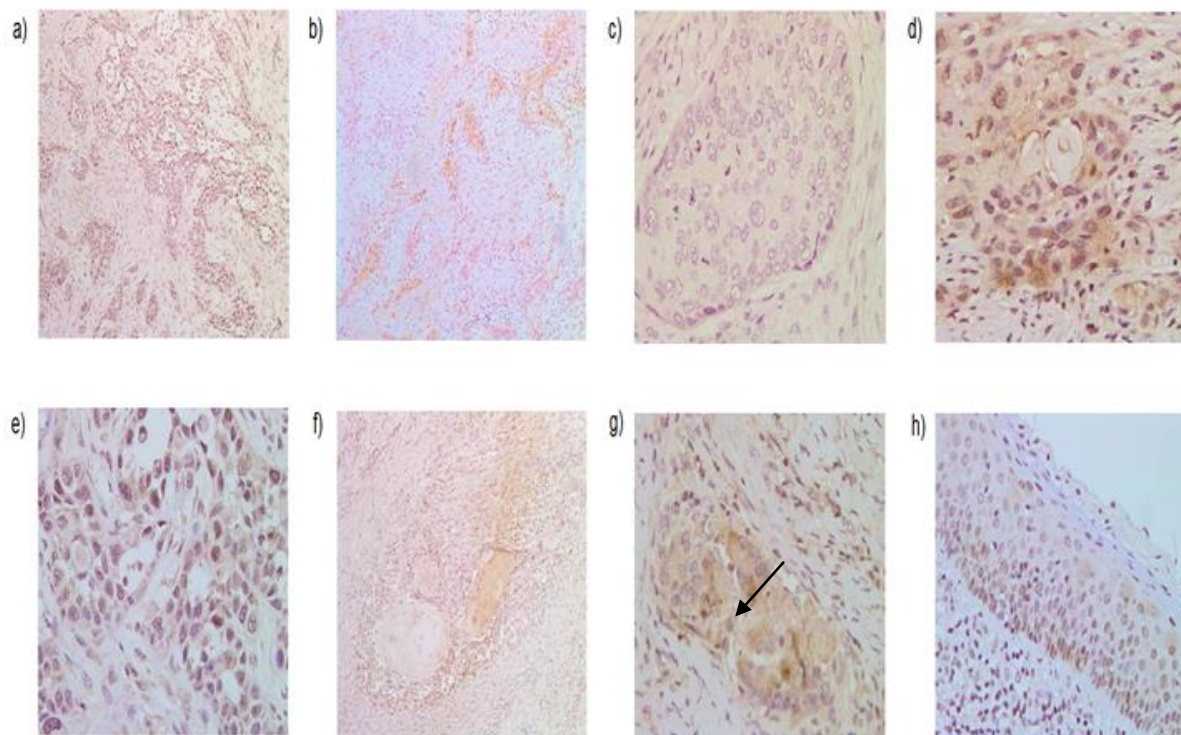


**Tablica 20.** Histološki gradus i pripadajuća izračunata IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.

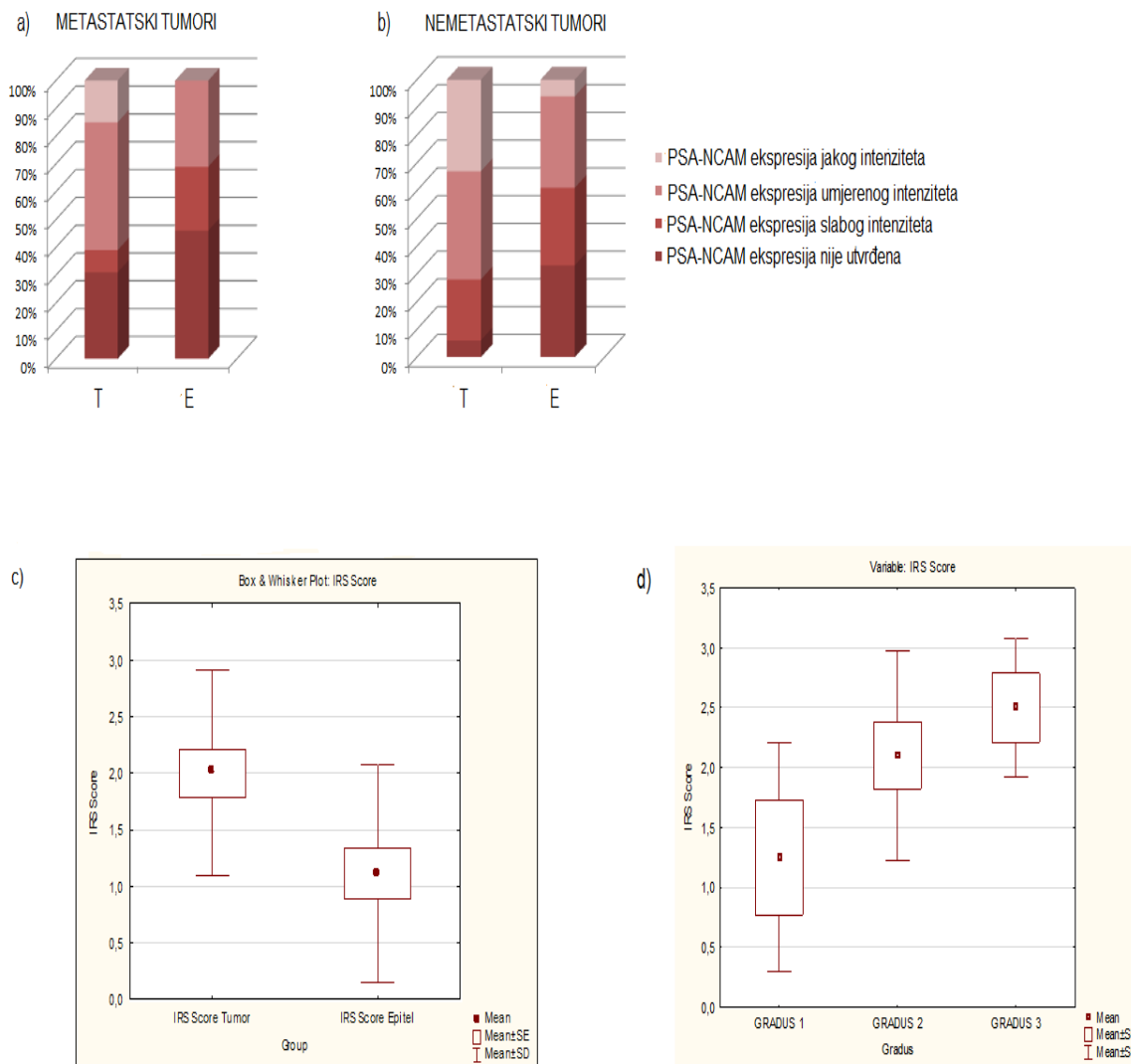
Uzorak	Gradus tumora	IRS vrijednost
1.	I	2
2.		2
3.		2
4.	II	0
5.		3
6.	III	3
7.		0
8.		3
9.		0
10.		2
11.		1
12.		0
13.		2

**Tablica 21.** IRS vrijednosti uzoraka sekcija primarnih tumora i pripadajuće okolne histološki neizmijenjene epitelne komponente neposredno uz tumorsku masu pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.

Uzorak	Tumor	Histološki neizmijenjena epitelna komponenta neposredno uz primarni tumor
	IRS vrijednost	IRS vrijednost
1.	2	1
2.	2	1
3.	0	0
4.	3	2
5.	0	0
6.	2	2
7.	2	1
8.	1	0
9.	0	0
10.	3	2
11.	2	2
12.	0	0
13.	2	0



**Slika 15.** Reprezentativne slike imunohistokemijske analize PSA-NCAM ekspresije (imunohistokemijska reakcija je vidljiva kao smeđe obojenje) u uzorcima sekcija primarnih tumora pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana. (a) Difuzna PSA-NCAM ekspresija jakog intenziteta, povećanje 100x (b) PSA-NCAM ekspresija jakog intenziteta ograničena na otočiće tumorskih stanica, povećanje 100x (c) PSA-NCAM ekspresija slabog intenziteta kod planocelularnog karcinoma grkljana, povećanje 400x (d) PSA-NCAM ekspresija jakog intenziteta u citoplazmi tumorskih stanica, povećanje 400x (e) citoplazmatska PSA-NCAM ekspresija jakog intenziteta u sekciji tumorskog tkiva, povećanje 400x (f) PSA-NCAM ekspresija u zoni intenzivne keratinizacije unutar tumorske mase, povećanje 100x (g) PSA-NCAM ekspresija infiltrata imunskih stanica vezanih uz tumor (označeno strelicom), povećanje 100x (h) PSA-NCAM ekspresija u histološki neizmijenjenom epitelu neposredno uz tumorsku masu, povećanje 400x.



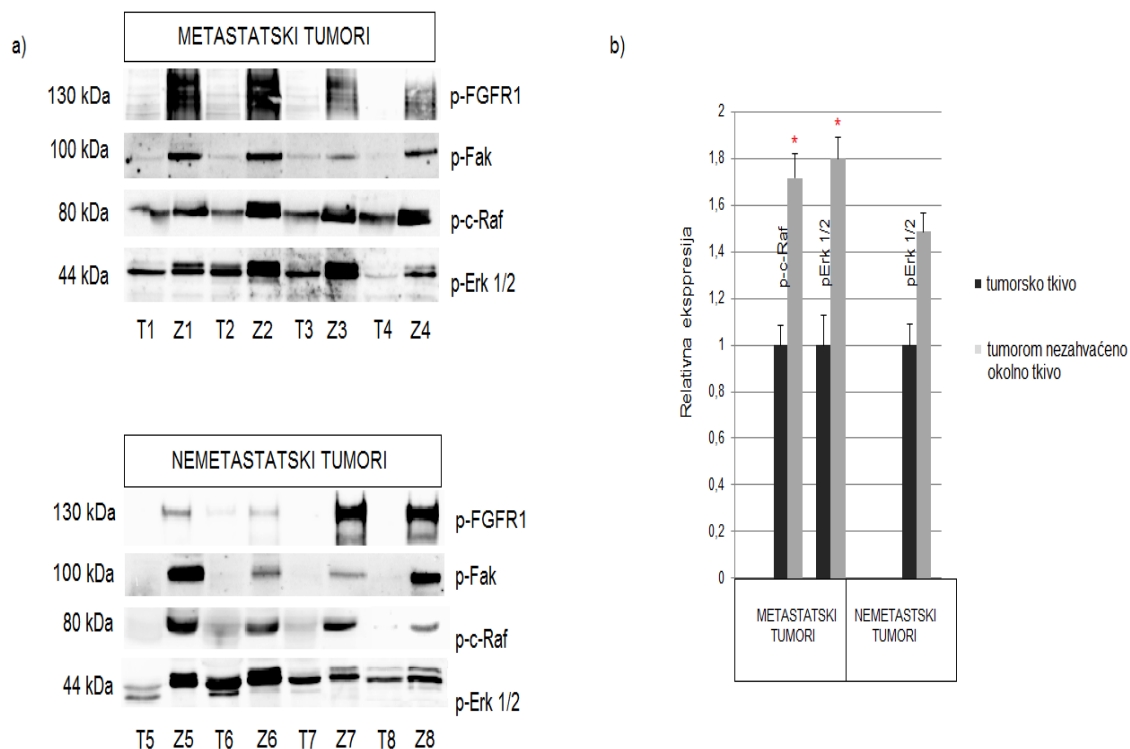
**Slika 16.** Grafički prikaz IRS vrijednosti izraženih u postotku uzoraka tumorskih tkiva s PSA-NCAM ekspresijom jakog, umjerenog i slabog intenziteta u tumorskom tkivu (T) i okolnoj histološki neizmijenjenoj epitelnoj komponenti neposredno uz tumorsku masu (E) za pacijente s dijagnosticiranim metastazama (a) i bez dijagnosticiranih metastaza (b). Statistički značajna razlika je utvrđena ( $p < 0.05$ ) između IRS vrijednosti tumorskih tkiva i pripadajućih histološki neizmijenjenih epitelnih komponenti uzoraka pacijenata, koji nisu imali dijagnosticirane metastaze, što je prikazano kao Whisker-Box plot (c). Whisker-Box plot prikaz trenda porasta razine ekspresije PSA-NCAM ( $p > 0.05$ ) u tkivima primarnih tumora histološkog gradusa III.

#### 4.5.1. Rezultati analize ekspresije polisijalotransferaze IV, siglek-11 i aktivacije signalnog puta receptora za faktore rasta fibroblasta1

Poznato je kako sintezu lanca polisijaline kiseline na NCAM-molekuli provode dva visoko specifična enzima iz porodice sijalotransferaza, točnije polisijalotransferaze II i IV čija je ekspresija prostorno i vremenski regulirana [185]. Budući da su prethodne studije ukazale na povezanost ekspresije polisijalotransferaze II s progresijom malignih oboljenja [186], u ovom je istraživanju u uzorcima tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva četvero pacijenata s metastatskom bolesti i četvero pacijenata s nemetastatskom bolesti analizirana ekspresija manje istraženog enzima, odnosno polisijalotransferaze IV koji je za razliku od polisijalotransferaze II kontinuirano eksprimiran u brojnim tkivima odraslih [187]. Rezultati pokazuju kako je razina ekspresije polisijalotransferaze statistički značajno povećana ( $p < 0,05$ ) u svim uzorcima tumorskog tkiva (uključujući primarne tumore s metastazama u limfnim čvorovima vrata i bez metastaza) u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena okolna tkiva (slika 18). U prethodnim istraživanjima je pokazano kako polisijalizacija NCAM-molekule ima negativan učinak na staničnu diferencijaciju induciranu putem signalizacije MAPK/Erk (engl. *MAPK/Erk - Mitogen-activated protein kinase signaling pathway*) i aktivacije receptora za faktore rasta fibroblasta FGFR (engl. *FGFR- Fibroblast growth factor receptors*) [188, 189]. Osim toga je poznato kako homofilne NCAM- interakcije induciraju razvoj i diferencijaciju neurona putem aktivacije nerekseptornih tirozin-kinaza, primjerice fokalne adhezijske kinaze (engl. *Fak- Focal adhesion kinase*) i Fyn kinaze, a sve to prati aktivacija signalnog puta MAPK/Erk [147, 190]. Uz to, fokalna adhezijska kinaza (Fak) može direktno ući u interakciju s receptorima za faktore rasta fibroblasta FGFR i uzrokovati njihovu aktivaciju, a posljedično i nizvodnu staničnu signalnu kaskadu MAPK/Erk  $\frac{1}{2}$  [191]. Stoga je analiziran učinak polisijalizacije NCAM u tumorima na aktivaciju fokalne adhezijske kinaze i signalnog puta MAPK/Erk kojeg pokreće receptor za faktore rasta fibroblasta 1 (FGFR1) u uzorcima tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva četvero pacijenata s metastatskom bolesti i četvero pacijenata s nemetastatskom bolesti. U svrhu toga analizirana je ekspresija aktivnog oblika fokalne adhezijske kinaze (pFak-Tyr397), receptora za faktore rasta fibroblasta (pFGFR1) i komponenti MAPK / Erk  $\frac{1}{2}$  signalnog puta koje uključuju aktivan oblik c-

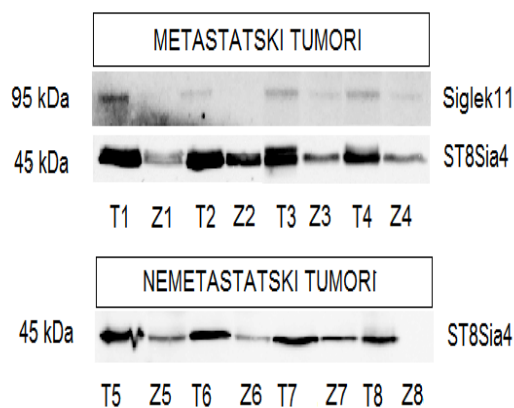
Raf (p-c-Raf) i Erk  $\frac{1}{2}$  kinaza (engl. *Erk  $\frac{1}{2}$ - Extracellular signal-regulated kinases  $\frac{1}{2}$ , Erk  $\frac{1}{2}$ ). Rezultati pokazuju kako u tumora pacijenata s metastatskom i nemetastatskom bolesti nisu aktivirani fokalna adhezijska kinaza i receptor za faktore rasta fibroblasta 1, ali je njihova razina ekspresije povećana u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima (slika 17). Sličan obrazac ekspresije je utvrđen za aktiviranu kinazu c-Raf, koja je u tkivima metastatskih tumora imala statistički značajno smanjenu razinu relativne ekspresije ( $p < 0,05$ ) u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva, dok je ekspresija aktivirane kinaze c-Raf u uzorcima tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata detektirana samo u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima (slika 17). Isto tako je statistički značajno snižena ekspresija fosforiliranih oblika kinaza Erk $\frac{1}{2}$  utvrđena u uzorcima tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od metastatske bolesti (slika 17). Uz to je trend povećanja ( $p > 0,05$ ) razine relativne ekspresije kinaza Erk $\frac{1}{2}$  uočen i u uzorcima pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata oboljelih od nemetastatskog oboljenja (slika 17).*

Siglek-11 je nedavno otkriveni transmembranski protein koji pripada CD33-srodnoj podporodici Siglek imunoglobulinskih lektina (engl. *Sialic acid-binding Ig superfamily lectins -Siglecs*) [192]. Siglek-11 se nalazi na površini imunskih stanica uključenih u urođeni imunski odgovor, odnosno na makrofagima u različitim tkivima i mikroglija stanicama živčanog sustava gdje se specifično veže na lance polisijaline kiseline prisutne na površini navedenih stanica putem svojih izvanstaničnih N-terminalnih varijabilnih domena [193]. Vežanjem liganda, odnosno polisijaline kiseline na N-terminalnu varijabilnu domenu Siglek-11 proteina, uzrokuje aktivaciju citoplazmatskih ITIM (engl. *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) inhibitornih domena molekule, a posljedično i Src kinaze što smanjuje produkciju proinflamatornih citokina i inhibira proces fagocitoze mikroglija stanica [194, 195]. U ovom je radu poveznica između polisijalizacije NCAM i urođenoga imunološkog odgovora stoga analizirana upravo određivanjem stupnja ekspresije Siglek-11 proteina. Prema rezultatima je ekspresija Siglek-11 proteina utvrđena samo u uzorcima tkiva metastatskih tumora, dok u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima i uzorcima tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od nemetastatske bolesti ekspresija Siglek-11 proteina nije utvrđena (slika 18).

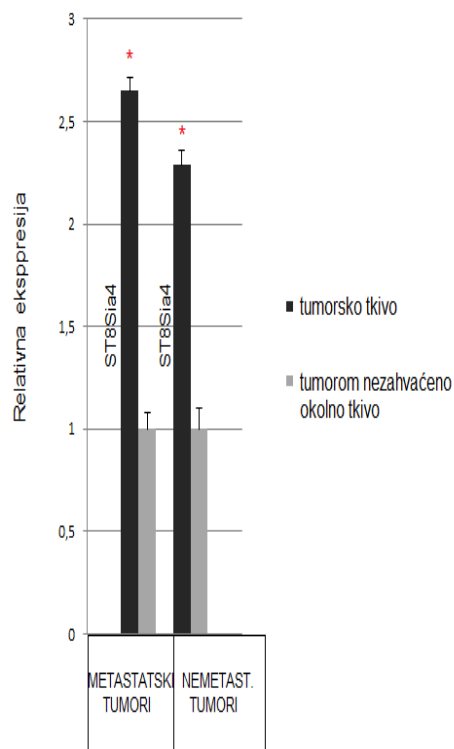


**Slika 17.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina p-FGFR1, p-Fak, p-c-Raf i Erk $\frac{1}{2}$  četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima i četiri uzorka tumorskog tkiva te pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima (a). Relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardna devijacija (b). Statistički značajna ( $p < 0.05$ ) promjena u razini relativne ekspresije proteina je označena zvjezdicom. Kratice: T 1-4 – uzorci tkiva primarnih tumora četiri različita pacijenta s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata; Z 1-4 – uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata; T 5-8 – uzorci primarnih tumora; Z 5-8 – uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata. Ekspresija p-FGFR1 i p-Fak proteina je detektirana samo u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata oboljelih od metastatske i nemetatske bolesti (razina relativne ekspresije nije grafički prikazana). U nemetatskim tumorima p-c-Raf detektiran je samo u uzorcima pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata (razina relativne ekspresije nije grafički prikazana).

a)



b)



**Slika 18.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina Siglek-11 i ST8Sia4 u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima i četiri uzorka tumorskog tkiva te pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima (a). Relativna ekspresija izražena kao prosječna normalizirana denzitometrijska vrijednost ekspresije kemiluminiscentnih signala + standardna devijacija (b). Statistički značajna ( $p < 0.05$ ) promjena u razini relativne ekspresije proteina je označena zvjezdicom. Kratice: T 1-4 – uzorci tkiva primarnih tumora četiri različita pacijenta s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata; Z 1-4 – uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata; T 5-8 – uzorci primarnih tumora; Z 5-8 – uzorci pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva istih pacijenata. Kemiluminiscentni signal Siglek-11 je detektiran samo u tumorskim tkivima pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata (razina relativne ekspresije nije grafički prikazana).



## 5. Rasprava

Metastaziranje u limfne čvorove vrata događa se rano tijekom patogeneze planocelularnog karcinoma grkljana. Unatoč uznapredovalim metodama liječenja i dijagnoze metastaziranje se i dalje smatra najgorim prognostičkim faktorom u oboljelih. Metastaziranje je složen proces povezan s izmijenjenom ekspresijom i funkcijom molekula važnih za održavanje normalne tkivne homeostaze što uzrokuje progresivno zadobivanje malignog fenotipa stanica raka i indukciju procesa, primjerice epitelno-mezenhimalne tranzicije, povećane pokretljivosti tumorskih stanica te angio- i limfoangiogeneze [196, 197]. U ovom je istraživanju za analizu ukupnoga proteomskog profila ekspresije primarnih tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana sa i bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima u usporedbi s pripadajućim okolnim tumorom nezahvaćenim tkivom korištena proteomska metoda profiliranja koja se temelji na separaciji peptidnih frakcija uz pomoć nano-tekućinske kromatografije (nLC) i identifikaciji proteina uz pomoć elektrosprej ionizacije i masene spektrometrije (ESI-MS/MS). Ukupno je utvrđeno 289 statistički značajno diferencijalno eksprimiranih proteina, od kojih je 219 bilo povećano eksprimirano, a 69 smanjeno eksprimirano u uzorcima primarnih tkiva tumora pacijenata oboljelih od metastatske bolesti. Analizom biološke uloge proteina s povećanom razinom ekspresije u tumorskim tkivima je uz pomoć podataka iz baze proteina Uniprot utvrđeno kako su ti proteini uključeni u mnoge biološke procese povezane s metastaziranjem (primjerice strukturne promjene citoskeleta, pojačani imunološki odgovor, promjene izvanstaničnog matriksa, angiogeneza, epitelno-mezenhimalne tranzicije) i popravkom oštećenja DNK. Isto tako su proteini s povećanom razinom ekspresije u tkivima metastatskih primarnih tumora uključeni u različite stanične signalne puteve koji su aktivni tijekom kancerogeneze planocelularnih karcinoma glave i vrata, primjerice stanična signalizacija posredovana epidermalnim receptorima za faktore rasta i receptorima Trk B te signalizacija NfKb [107, 198]. Nadalje je klasifikacija proteina uz pomoć platforme PANTHER pokazala kako su proteini s povećanom razinom ekspresije u tumorskim tkivima povezani s biološkim procesima koji uključuju različite oblike procesiranja glasničke RNK molekule, smatanje proteina u pravilnu konformaciju, pojačani imunološki odgovor, a čija je poremećena ekspresija već prije utvrđena u

patogenezi i progresiji mnogih malignih oboljenja [199-201]. Suprotno tomu, PANTHER analiza najznačajnijih bioloških procesa povezanih s proteinima, koji su imali sniženu razinu ekspresije u tumorskim tkivima, pokazala je kako isti sudjeluju u procesima poput pojačane stanične adhezije i u imunološkom odgovoru što je u skladu s pojačanim upalnim procesima tijekom kancerogeneze [202-204].

Proces metastaziranja uključuje višestruke interakcije tumorskih stanica sa svojim mikrokolišem što za posljedicu ima promjenu u razini ekspresije membranskih proteina na površini tumorskih stanica i stanica domaćina te narušavanje dinamičke ravnoteže izvanstaničnog matriksa [124]. Karakteristično za pokretanje metastatske kaskade je upravo smanjena međustanična adhezija i promjena u interakcijama između tumorskih stanica i molekula izvanstaničnog matriksa [205]. Smatra se kako ovaj proces rezultira disocijacijom stanica raka od primarnog tumora i stjecanje invazivnoga staničnog fenotipa koji omogućava ulazak tumorskih stanica u cirkulaciju i stvaranje metastaza na drugom mjestu u organizmu. Da bi se pokrenuo ovaj proces stanice raka moraju prijeći bazalnu membranu, specijaliziranu strukturu izvanstaničnog matriksa, koja se nalazi ispod epitelnih i endotelnih stanica te je odgovorna za staničnu signalizaciju proliferacije, rasta i diferencijacije [206]. Nekoliko prethodnih istraživanja je pokazalo kako upravo stanje bazalne membrane ima važnu ulogu u progresiji i metastaziranju planocelularnog karcinoma grkljana [207, 208]. U ovom su doktoratu identificirani i diferencijalno eksprimirani proteini u uzorcima tumorskih tkiva, koji su povezani s ovim procesom poput matriks-metaloproteinaze bazigin, otprije poznatog biomarkera progresije planocelularnog karcinoma grkljana [209]. Nadalje, u uzorcima tumorskih tkiva pacijenata oboljelih od metastatske bolesti je utvrđena povećana razina ekspresije nekoliko proteina bazalne membrane poput različitih podjedinica laminina (primjerice podjedinice laminina beta-3 i gama-2) i izoforme kolagena 4 alfa-1 (XII) lanca. Naime, poznato je kako komponente bazalne membrane poput laminina i kolagena ulaze u interakciju s  $\beta$ 1-integrinskim i srodnim receptorima na površini stanice što za posljedicu ima aktivaciju nizvodnih signalnih kaskada uključenih u regulaciju stanične proliferacije i preživljavanja [210]. Integrini su posebno važni za održavanje stabilne međustanične adhezije i adhezije između stanica i bazalne membrane te promjene u njihovoj ekspresiji, primjerice povećana razina ekspresije  $\beta$ 1-integrina može narušiti stabilne međustanične interakcije što

pogoduje progresiji tumora i metastaziranju [211]. U skladu s tim je i u ovom radu potvrđena povećana razina ekspresije  $\beta$ 1-integrina u uzorcima tkiva primarnih metastatskih i nemetastatskih tumora u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva. Nadalje, po prvi je puta u uzorcima tumorskih tkiva utvrđena povećana razina ekspresije ladinina-1, proteina koji je sastavni dio bazalne membrane. Doprinos ladinina-1 progresiji tumora i metastaziranju može biti povezan s njegovom ulogom u regulaciji procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije kod planocelularnog karcinoma grkljana [212] što potvrđuju i rezultati *Western blot* analize gdje ekspresija ladinina-1 nije utvrđena u uzorcima tumorskih i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata bez dijagnosticirane metastaze u limfnim čvorovima vrata.

Narušena strukturalna i funkcionalna dinamika molekula izvanstaničnog matriksa je važan čimbenik koji doprinosi progresiji mnogih malignih oboljenja [213]. Navedene promjene u kompoziciji i strukturi izvanstaničnog matriksa utječu na biokemijske osobine izvanstaničnog matriksa i induciraju onkogene signalne putove posredovane faktorima rasta. Posljedično dolazi do maligne transformacije tumorskih stanica i njihove invazije u tkivo, ali i do promjene u ponašanju stromalnih stanica domaćina, koje naposljetku doprinose stvaranju metastatske niše i promoviraju procese povezane s lokalnom invazijom i metastaziranjem tumora što uključuje pojačanu sekreciju citokina, matriks-metaloproteinaza i izlučivanje faktora angiogeneze [124, 214]. U skladu s tim je u uzorcima tumorskih tkiva pacijenata s metastatskom bolešću utvrđena povećana razina ekspresije komponenti izvanstaničnog matriksa izoforme 4 proteina tencina čija je povećana razina ekspresije u prethodnim istraživanjima povezana s invazivnošću malignih tvorbi poput karcinoma gušterače [215] i malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa lumikana. Lumikan održava strukturalnu homeostazu tkiva putem regulacije fibrilogeneze kolagena [216] i ima važnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije, migracije i upalnih procesa [217]. Ovisno o strukturalnoj formi u kojoj je prisutan lumikan ima različite funkcije, a može doprinijeti procesu kancerogeneze brojnih malignih oboljenja poticanjem stanične signalizacije [182, 218]. Uloga lumikana dosad nije opisana u kancerogenezi planocelularnih karcinoma glave i vrata. U ovom je radu utvrđena ekspresija dvaju oblika lumikana, glikoziliranog oblika s negativno nabijenim šećernim ostacima i neglikozilirane

proteinske jezgre lumikana. Ekspresija neglikoziliranog oblika lumikana nije utvrđena u uzorcima tumora i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata. Stoga se može zaključiti da je u metastaziranju planocelularnog karcinoma grkljana važno analizirati ekspresiju obje forme lumikana jer je glikozilirana forma s negativnim ugljikohidratnim ostacima bila prisutna samo u metastatskoj bolesti. Naime, brojna su istraživanja pokazala kako proteoglikani izvanstaničnog matriksa zbog prisutnosti negativno nabijenih glikozilaminokiselinskih ostataka na sebe mogu vezati različite citokine i faktore rasta čime bi se teoretski mogla objasniti pojačana stanična proliferacija i progresija tumora [219, 220]. Nadalje, pokazano je kako povećana ekspresija proteinske osnovice lumikana može i inhibirati pravilnu fibrilogenezu kolagena [221] te negativno utjecati na pravilan prostorni raspored kolagenskih fibrila što je potaknulo invaziju stanica raka dojke i gušterače u okolno tkivo [222, 223]. Kod metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana povećana ekspresija neglikozilirane proteinske osnovice lumikana narušava organizaciju kolagenskih fibrila tijekom patogeneze te na taj način doprinosi lokalnoj invaziji tumora u okolne strukture. Isto tako ovaj mali proteoglikan izvanstaničnog matriksa u skladu s podacima iz znanstvene literature djeluje kao endogeni ligand različitih receptora na površini stanice i tako posreduje aktivaciju različitih staničnih signalnih kaskada [219]. Naime, istraživanja su pokazala kako vezanje slabo glikozilirane forme i proteinske osnovice lumikana na CD14 receptor imunskih stanica makrofaga i neutrofila može potaknuti nizvodno stanično signaliranje NfκB i produkciju proupalnih citokina poput interleukina 1 beta i TNF alfa (engl. TNF  $\alpha$ - *Tumor necrosis factor alpha*). Ovaj je proces posredovan interakcijom CD14 i receptora TLR (engl. *TLR- Toll like receptor*) na površini imunskih stanica što pospješuje imunski odgovor i daljnju infiltraciju imunskih stanica raznih oboljenja [224, 225]. Poznato je kako tumori iskorištavaju signale imunskih, stromalnih i endotelnih stanica domaćina, koje se nalaze u tumorskom mikrokolišu u svrhu autokrine regulacije i metastaziranja, a ti su signali primjerice citokini i faktori rasta [226]. U ovom je istraživanju tako pokazana povećana razina ekspresije CD14, što dosad nije opisano u znanstvenoj literaturi u kontekstu kancerogeneze planocelularnog karcinoma grkljana i komponenata NfκB signalizacije poput NF-κB liganda (RANKL) i aktivirane p65 podjedinice NF-κB proteina. Dakle, radi se o molekulama i procesima koji doprinose metastaziranju u limfne čvorove

planocelularnog karcinoma grkljana. Za patogenezu i nekih drugih malignih oboljenja je važan i CD14, primjerice karcinoma želuca [227] ili mokraćnog mjehura kod kojeg povećana razina ekspresije CD14 korelira s pojačanom produkcijom citokina tumorskih stanica i polarizacijom imunskih stanica domaćina što rezultira imunosupresijom [228].

Što se tiče ekspresije biglikana, također malog proteoglikana izvanstaničnog matriksa, utvrđen je sličan rezultat kao za lumikan, a ekspresija biglikana je utvrđena samo u tumorima koji su metastazirali. U normalnim fiziološkim uvjetima biglikan je važan za očuvanje strukture izvanstaničnog matriksa, no uslijed vanjskih stresnih čimbenika poput oštećenja tkiva, biglikan se proteolitičkim cijepanjem otpušta iz izvanstaničnog matriksa i postaje endogeni ligand receptora TLR na površini imunskih stanica [229]. Analogno lumikanu aktivacijom receptora TLR inducira se snažan imunski odgovor posredovan unutarstaničnom signalizacijom NfκB i produkcijom proupalnih citokina čime se potiče infiltracija imunskih stanica na mjesto upale. Upalni proces koji potiče progresiju tumora učestala je pojava kod planocelularnih karcinoma glave i vrata [230] te postoji mogućnost kako povećana razina ekspresije biglikana također doprinosi povećanoj infiltraciji imunskih stanica na mjesto primarnog tumora planocelularnog karcinoma grkljana slično kao tijekom normalnog procesa upale. Ovu hipotezu potvrđuje rezultat povećane razine ekspresije biglikana i komponenata signaliranja NfκB u uzorcima metastatskih tkiva primarnih tumora. Iako uloga biglikana dosad još nije istražena u kancerogenezi planocelularnog karcinoma grkljana, brojne studije potvrđuju doprinos povećane ekspresije biglikana procesu metastaziranja brojnih drugih malignih oboljenja [231, 232].

Isto tako treba istaknuti da je u ovom radu utvrđena povećana ekspresija proteina CD44 u uzorcima metastatskih primarnih tumora što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja planocelularnog karcinoma grkljana [233]. Naime, radi se o molekuli koja potiče adheziju bazalnih stanica karcinoma dojke na endotel krvnih žila i uzrokuje aktivaciju β1-integrinskih receptora što potiče proces ekstravazacije malignih oboljenja [234]. Tako su Shi i sur. [235] utvrdili kako CD44 ulazi u interakciju s receptorom CD74 za faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) na površini stanica fibroblasta što rezultira formiranjem kompleksa CD44/CD74/MIF koji posreduje

transdukciju signala induciranog s MIF i nizvodnu aktivaciju Erk  $\frac{1}{2}$  kinaza. Ista je skupina autora pokazala kako tretman stanica s MIF aktivira protein tirozinske kinaze Src samo kod onih stanica koje eksprimiraju CD74 i CD44 što znači da je aktivnost kinaze Src potrebna za MIF induciranu aktivaciju Erk  $\frac{1}{2}$  putem CD44. Ovaj zaključak potvrđuju i otkrića prethodnih istraživanja u kojima je pokazano kako kinaza Src ulazi u interakciju s citoplazmatskom domenom CD44 [236]. Isto tako brojna istraživanja pokazuju kako MIF i njegov receptor CD74 imaju važnu ulogu u progresiji planocelularnih karcinoma glave i vrata [237, 238] što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja u kojem je u uzorcima metastatskih tumorskih tkiva utvrđena značajno povećana ekspresija proteina CD74, točnije njegove izoforme gama lanca HLA histokompatibilnog antigena i MIF kao i aktiviranog oblika kinaze Src u usporedbi s pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima i tkivima nemetastatskih primarnih tumora. Iako je razina ekspresije aktiviranih kinaza Erk $\frac{1}{2}$  bila smanjena u primarnim metastatskim i nemetastatskim tumorskim tkivima u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva, rezultati ovog istraživanja ipak jasno ukazuju na važnost staničnog signaliranja posredovanog MIF i CD44 proteinima u patogenezi planocelularnog karcinoma grkljana. Važno je napomenuti da je ekspresija MIF povezana i s patogeneзом drugih malignih oboljenja. Primjerice je utvrđeno da inhibicija receptora za MIF CD74 blokira invazivni fenotip stanica karcinoma prostate DU-145 u uvjetima *in vitro* [239]. Nadalje, studija Lee i sur. je pokazala da MIF utječe na povećanje razine ekspresije integrinskog dimera  $\alpha\beta 3$  i aktivaciju NF- $\kappa$ B u staničnoj liniji hondrosarkoma što naposljetku potiče migraciju tumorskih stanica [240]. Ista je studija pokazala da se specifičnom inhibicijom NF- $\kappa$ B signala smanjuje MIF-om inducirana ekspresija integrinskog receptora te posljedično i migracija tumorskih stanica. Slično tomu, u ovom je istraživanju u tkivima primarnih tumora, koji su metastazirali, utvrđena značajno povećana razina ekspresije komponenti NF- $\kappa$ B stanične signalizacije, točnije RANKL liganda i aktivirane podjedinice p-65 Nf- $\kappa$ B što jasno ukazuje na važnost aktivacije Nf- $\kappa$ B signalnog puta u metastatskom karcinomu grkljana. Na aktivaciju navedenoga signalnog puta upućuje i ekspresija aktiviranog oblika kinaze p38, koji je detektiran samo u tkivima tumora, koji su metastazirali, dok u uzorcima tumorskih i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata nije utvrđena značajna razlika u ekspresiji p38. Kinaza p38 kao i njoj srodne kinaze poznati su

kofaktori, koji reguliraju aktivaciju signaliranja NfκB [241], što kod planocelularnog karcinoma grkljana implicira pospješivanje procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT).

Naime, poznato je kako se procesi slični EMT javljaju tijekom maligne transformacije tumorskih stanica i utječu na invazivnost tumora. Epitelno- mezenhimalna tranzicija može biti inducirana različitim onkogenim signalnim putevima posredovanim Src kinazama, integrinskim receptorima i signaliranjem Wnt/ β- katenin [242]. EMT je proces koji uključuje otpuštanje međustaničnih spojnica i gubitak staničnog polariteta što je praćeno smanjenjem razine ekspresije stanične adhezijske molekule E- kadherin, otpuštanjem proteina β- katenina iz međustaničnih spojnica i povećanjem razine ekspresije citoskeletnog proteina vimentina [85]. Navedeni gubitak proteina E- kadherina narušava stabilne međustanične spojnice, a to pospješuje kretanje tumorskih stanica. Proteomsko profiliranje uz pomoć spektrometrije masa je u ovoj studiji pokazalo značajnu deregulaciju proteina u uzorcima tkiva metastatskih tumora koji su sastavni dio međustaničnih spojnica poput adhezijske molekule spojnica A i izoforme 3B dezmozokolina 3. Stoga je u ovoj studiji istraženo postojanje EMT analizom ekspresije E- kadherina, β- katenina i vimentina. Rezultati analize su u skladu s postojećim istraživanjima, a u uzorcima metastatskih tumora je utvrđena smanjena razina ekspresije E- kadherina praćena povećanjem razine ekspresije proteina β- katenina i vimentina u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva. Suprotno tomu, značajna razlika u ekspresiji navedenih proteina nije utvrđena između uzoraka tkiva nemetastatskih primarnih tumora i pripadajućih tumorom nezahvaćenih tkiva što bi moglo upućivati na važnost EMT u progresiji i metastaziranju planocelularnog karcinoma grkljana [243]. Osim što je kod epitelno- mezenhimalne tranzicije integritet međustaničnih spojnica narušen, dolazi i do reorganizacije aktinskog citoskeleta i pojačane sekrecije enzima matriks- metaloproteinaza odgovornih za razgradnju molekula izvanstaničnog matriksa što naposljetku doprinosi povećanoj pokretljivosti i invaziji tumorskih stanica. Tijekom ovog procesa dolazi do povezivanja aktinskih i miozinskih filamenata (miozin II) u specijalizirane kontraktilne strukture, tzv. stresna vlakanca, koje povezuju filamente aktina s izvanstaničnim matriksom putem integrinskih receptora i drugih adaptor proteina. U ovom istraživanju proteini identificirani u metastatskim tumorima pokazuju

kako postoji narušen status citoskeletnih proteina što bi moglo uzrokovati ireverzibilne promjene povezane s pojačanom migracijom i invazijom tumorskih stanica. To osobito pokazuju povećana razina ekspresije citoskeletnih proteina  $\beta$ -aktina,  $\alpha$ -tubulina i lanca alfa-4A tubulina u uzorcima metastatskih tkiva primarnih tumora u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva. Isto tako je alfa-4A lanac tubulina modificiran posttranslacijskim modifikacijama (poput acetilacije i nitrozilacije) i kao takav je uključen u patogenezu raznih oboljenja i poremećaja poput astenozospermije [244]. Osim toga je pokazano kako je povećana razina ekspresije alfa-4A lanca tubulina povezana s rezistentnošću tumorskih stanica na palitaksel u *in vitro* uvjetima [245]. Rezultati ovog istraživanja su po prvi puta pokazali povećanu razinu ekspresije alfa-4A lanca tubulina samo u uzorcima metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana što jasno upućuje na važan doprinos povećane razine ekspresije alfa-4A lanca tubulina procesu metastaziranja planocelularnog karcinoma grkljana. Ova je tvrdnja u skladu s postojećim istraživanjima na drugim tumorima, primjerice stanicama raka dojke za koje je u *in vitro* uvjetima utvrđeno kako povećana razina ekspresije alfa-4A lanca tubulina korelira s invazivnom migracijom tumorskih stanica [246].

Premda molekularni mehanizmi odgovorni za regulaciju dinamike F-aktina tijekom procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije nisu potpuno razjašnjeni, poznato je da postoje neki regulatorni proteini uključeni u ovaj proces, primjerice protein moezin [247]. U ovom radu je utvrđena povećana razina ekspresije moezina u uzorcima metastatskih primarnih tumora u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva što je u skladu s istraživanjem Wang i sur. [248] u kojem je utvrđeno značajno povećanje razine ekspresije moezina u tumorskim tkivima karcinoma grkljana u odnosu na pripadajuću histološki neizmijenjenu normalnu mukozu. Isto tako je u uzorcima metastatskih tumora utvrđena povećana razina ekspresije i nekoliko drugih proteina odgovornih za regulaciju dinamike aktinskog skeleta poput profilina-1 i fascina što je prethodno već utvrđeno kod planocelularnog karcinom grkljana [249, 250]. Potrebno je istaknuti da je u ovom istraživanju po prvi puta u uzorcima okolnih tumorom nezahvaćenih tkiva metastatskih primarnih tumora grkljana utvrđena povećana razina ekspresije proteina afamina, serumskog albumina koji specifično veže vitamin E. Iako je povećana razina ekspresije afamina prethodno utvrđena u



serumu pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika [251], ne postoje podaci u znanstvenoj literaturi o uključenosti afamina u patogenezu planocelularnog karcinoma grkljana. Isto tako su brojna istraživanja pokazala da se koncentracija afamina u serumu pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika smanjuje s progresijom bolesti [251, 252]. Nadalje, istraživanje Aktas i sur. [253] je pokazalo da koncentracija afamina u serumu pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika značajno raste nakon tretmana pacijenata. Prava dijagnostička uloga afamina kod planocelularnog karcinoma grkljana bi se mogla utvrditi određivanjem koncentracije afamina u serumu pacijenata s različitim kliničkim stupnjem bolesti.

S obzirom da je ekspresija adhezijske molekule neuralnih stanica utvrđena kod planocelularnih karcinoma glave i vrata [254, 255], u ovom je doktorskom radu u sekcijama metastatskih i nemetastatskih primarnih tumora pacijenata te uzorcima proteinskih lizata korištenih za analizu pomoću spektrometrije masa istražena ekspresija polisijaliziranog oblika NCAM. Ponovna se ekspresija polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica inače smatra onkofetalnim antigenom odgovornim za progresiju i metastatsku diseminaciju mnogih malignih oboljenja poput neuroblastoma, Wilmsovog tumora te karcinoma malih i velikih plućnih stanica [160]. Općenito je prihvaćeno kako modifikacija molekule NCAM polisijalinskom kiselinom doprinosi smanjenoj adheziji tumorskih stanica zbog elektrostatske, polianionske prirode polisijalinske kiseline [256]. Budući da je polisijalizacija proces reguliran na razini transkripcije aktivacijom dvaju visoko specifičnih enzima polisijalotransferaze II i IV [257], u ovom je istraživanju u metastatskim i nemetastatskim primarnim tumorima te pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima istražena ekspresija polisijalotransferaze IV, enzima koji je kontinuirano eksprimiran u tkivima odraslih i odgovoran za sintezu dugih lanaca polisijalinske kiseline na molekuli NCAM [187]. U odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva je analiza relativne ekspresije polisijalotransferaze IV pokazala je značajno povećanje ekspresije u metastatskim i nemetastatskim primarnim tumorima. Iako brojna istraživanja upućuju na povezanost ekspresije polisijalotransferaze II i sinteze polisijalinske kiseline kod različitih tumora [160], rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na uključenost polisijalotransferaze IV u sintezu polisijalinske kiseline na molekuli NCAM kod planocelularnog karcinoma grkljana. Ovaj je rezultat u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je utvrđeno

kako polisijalotferaza IV ima vodeću ulogu u polisijalizaciji NCAM-molekule kod stanica glioma [258] i da simultana ekspresija polisijalotferaza II i IV kod neuroblastoma korelira s polisijalizacijom adhezijske molekule neuralnih stanica [259]. Nedavno objavljeno istraživanje je isto tako pokazalo da je isključivo reekspresija gena za polisijalotferazu IV uključena u sintezu polisijalinske kiseline u kliničkim uzorcima raka dojke [260].

Ekspresija PSA-NCAM je u ovom istraživanju bila varijabilnog intenziteta, odnosno većinom ograničena na izvanstanični prostor i citoplazmu tumorskih stanica. Sličan uzorak ekspresije polisijaline kiseline prethodno je utvrđen u uzorcima različitih zdravih i tumorskih tkiva čovjeka [261]. Ovaj rezultat također upućuje na povećanu unutarstaničnu sintezu polisijalinske kiseline unutar Golgijevog aparata što je prethodno pokazano kod stanične linije karcinoma malih plućnih stanica [262] ali i na povećanu polisijalizaciju enzima polisijalotferaza [263], što značajno pospješuje katalitičku efikasnost enzima prilikom sinteze ostataka polisijalinske kiseline na NCAM-molekuli. Imunoreaktivnost PSA-NCAM zabilježena je i na području upalnog infiltrata vezanog uz tumorsku masu. Ovo je u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala ekspresiju polisijaliziranog oblika NCAM molekule kod raznih ljudskih i mišjih imunskih stanica [264, 265]. Semikvantitativna analiza ekspresije PSA-NCAM nije pokazala značajnu povezanost između imunoreaktivnosti PSA-NCAM i kliničko-patoloških parametara pacijenata (T- i N- stupanj te histološki gradus tumora), vjerojatno zbog heterogenosti skupine uzoraka. Jača je imunoreaktivnost PSA-NCAM zamijećena u sekcijama primarnih tumora, koji nisu metastazirali, štoviše PSA-NCAM ekspresija nije utvrđena u 31 % slučajeva metastatskih sekcija u odnosu na 6 % sekcija nemetastatskih primarnih tumora. Stoga je moguće da osim generalnog doprinosa migraciji tumorskih stanica PSA-NCAM ekspresija na neki način potiče metaplastičnu transformaciju tumorskih stanica na što ukazuju i rezultati drugih znanstvenih istraživanja [186, 266].

Ekspresija PSA-NCAM, koja je utvrđena u ovom radu u sekcijama primarnih planocelularnih karcinoma grkljana, nije bila ujednačena i bila je vidljiva u malim nakupinama tumorskih stanica ili kao disperzni uzorak, koji je obuhvaćao velik broj tumorskih stanica. što je slično rezultatima ekspresije PSA-NCAM kod glioblastoma [267]. Uz to je ista grupa autora predložila da tumorske stanice, koje ekspimiraju

PSA-NCAM, mogu biti tumorske progenitorske stanice sposobne za inicijaciju tumora ili bi mogle predstavljati nediferenciranu grupu tumorskih stanica u procesu metaplastične transformacije. Ovu hipotezu potvrđuje PSA-NCAM imunoreaktivnost koja je utvrđena u histološki neizmijenjenoj sluznici neposredno uz tumorsku masu sekcija pacijenata oboljelih od metastatske i nemetastatske bolesti i trend porasta razine PSA-NCAM ekspresije utvrđen u histološki slabo diferenciranim primarnim tumorima gradusa III. Za razliku od metastatskih primarnih tumora je semikvantitativna imunohistokemijska analiza razine PSA-NCAM ekspresije pokazala značajnu razliku u razini ekspresije PSA-NCAM između nemetastatskih primarnih tumora i pripadajuće histološki neizmijenjene sluznice unutar sekcije tkiva. Slično tomu, PSA-NCAM reekspresija je zamijećena u respiratornom epitelu pacijenata oboljelih od kronične opstruktivne bolesti pluća (engl. *COPD - Chronic obstructive pulmonary disease*) i povezana je sa zaštitom od citotoksičnog učinka neutrofilnih izvanstaničnih komponenti [268]. Slično kao kod planocelularnog karcinoma grkljana glavni faktor rizika povezan s razvojem COPD-a je konzumacija duhanskih proizvoda [269], pa se može pretpostaviti da dugotrajno izlaganje karcinogenima prisutnima u duhanu može inducirati PSA-NCAM reekspresiju u sluznici grkljana. Budući da je polisijalizacija prostorno i vremenski reguliran proces nužan za pravilan stanični razvoj i diferencijaciju [270], velika je vjerojatnost da poremećena PSA-NCAM ekspresija može negativno utjecati na normalnu homeostazu sluznice narušavanjem homofilnih i heterofilnih NCAM interakcija, uslijed čega dolazi do promjene u nizu staničnih signalnih kaskada, koje doprinose razvoju malignosti [147, 190]. Sličan učinak PSA-NCAM ekspresije je opisan u studiji Schreiber i sur. [271] u kojoj je navedena skupina autora utvrdila da ekspresija polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica putem supresije stanične adhezije posredovane E-kadherinom doprinosi procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije kod stanične linje karcinoma gušterače u *in vitro* uvjetima.

Nadalje, sve je više dokaza, koji ukazuju da je PSA-NCAM ekspresija uključena u inhibiciju stanične diferencijacije i sazrijevanja, što bi moglo imati važnu ulogu u patologiji planocelularnog karcinoma grkljana, jer generalno histološki slabo diferencirani tumori koreliraju s lošijom prognozom oboljelih. Primjerice, poznato je da PSA-NCAM putem modulacije staničnog signaliranja posredovano NCAM molekulom

inhibira uranjenu diferencijaciju i sazrijevanje neuralnih stanica [272] te da ima važnu ulogu u diferencijaciji progenitor stanica jetre [273]. Nadalje, brojna istraživanja pokazuju kako polisijalizacija NCAM molekule uzrokuje inhibiciju heterofilnih FGFR-NCAM interakcija, a posljedično i nizvode MAPK/Erk $\frac{1}{2}$  signalizacije odgovorne za diferencijaciju stanica neuroblastoma, rabdosarkoma i PSA-NCAM transfeciranih normalnih fibroblasta [188, 274, 275]. Važna uloga signalizacije MAPK/Erk  $\frac{1}{2}$  u regulaciji staničnog ciklusa epitelnih stanica i fibroblasta je dobro dokumentirana [276] što dodatno potvrđuju dokazi o njevoj ulozi u regulaciji pravilne hondrogeneze i diferencijacije progenitornih epitelnih stanica dušnika [277]. Uz sve navedeno je ekspresija receptora FGF 1 i 2 utvrđena u stanicama respiratornog epitela [278] gdje je signaliranje putem FGF receptora uključeno u popravak oštećenja epitelnih stanica pluća [279]. Rezultati razine relativne ekspresije aktiviranih oblika FGFR1, c-Raf, Erk $\frac{1}{2}$  i Fak proteina utvrđenih u ovom istraživanju jasno ukazuju na to da polisijalizacija NCAM molekule zaustavlja staničnu signalizaciju MAPK/Erk  $\frac{1}{2}$  posredovanu receptorima FGFR1 u uzorcima tkiva metastatskih i nemetastatskih primarnih tumora. Vezanje liganda na FGF receptor 1 uzrokuje njegovu dimerizaciju, što za posljedicu ima autofosforilaciju receptora na nekoliko tirozinskih ostataka uključujući Tyr 653/654, koja je nužna za katalitičku aktivnost receptora i njima posredovanu inicijaciju nizvodnih unutarstaničnih signalnih puteva [280-282]. U ovom je istraživanju analiza ekspresije aktiviranog FGF receptora 1 pokazala izostanak signala u metastatskim i nemetastatskim tkivima primarnih tumora u odnosu na pripadajuća tumorom nezahvaćena tkiva. Nadalje je poznato da je aktivnost c-Raf kinaze nužna za inicijaciju MAPK/Erk  $\frac{1}{2}$  signalne kaskade [283, 284]. U skladu s tim je u ovom radu utvrđena upravo značajno povećana razina c-Raf kinaze u pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima u odnosu na metastatske i nemetastatske primarne tumore. Sličan je uzorak ekspresije utvrđen za aktivirane kinaze Erk  $\frac{1}{2}$ . Navedeni su rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima, u kojima je uklanjanje ostataka polisijaline kiseline sa NCAM molekule pomoću enzima Endo N uzrokovalo aktivaciju receptora FGF i nizvodno Erk  $\frac{1}{2}$  signaliranje, koje je uključeno u diferencijaciju i proliferaciju staničnih linija neuroblastoma i rabdosarkoma [188, 189, 274]. Ovo potvrđuje prethodno navedenu hipotezu da je polisijalizacija adhezijske molekule neuralnih stanica uključena u smanjenu diferencijaciju stanica planocelularnog karcinoma grkljana, a time i u održavanje malignoga invazivnog

staničnog fenotipa. Slično tomu je istraživanje Ramosa i sur. pokazalo da je FGF1-MAPK/Erk signaliranje inducirano pomoću heparina poništilo proces epitelno-mezenhimalne tranzicije alveolarnih epitelnih stanica i miofibroblasta uzrokovanog pomoću tretmana stanica s transformirajućim faktorom rasta beta 1 (engl. *TGFβ1-Transforming growth factor beta 1*) što potvrđuje važnost FGF-FGFR staničnog signaliranja u održanju normalne epitelne homeostaze [285]. Nadalje je pojačana razina ekspresije TGFβ1 utvrđena u gotovo 80 % slučajeva planocelularnih karcinoma glave i vrata, a brojne studije upućuju da pojačana ekspresija TGFβ1 inducira proces epitelno-mezenhimalne tranzicije kod staničnih linija planocelularnih karcinoma glave i vrata [114, 286]. Na temelju rezultata ovog istraživanja i podataka iz znanstvene literature može se pretpostaviti da ekspresija PSA-NCAM molekule kod planocelularnog karcinoma grkljana inhibira stanično signaliranje posredovano receptorima FGF i teoretski narušava normalnu staničnu homeostazu potrebnu za održanje integriteta sluznice. Na to ukazuju i rezultati studije Wang i sur. [287] u kojoj je kod stanične linije raka dojke zamijećena povećana razina ekspresije polisijalinske kiseline tijekom procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije inducirane putem TGFβ1.

Suprotno prethodnim istraživanjima analize relativne razine ekspresije aktiviranog oblika fokalne adhezijske kinaze (Fak) u tkivima planocelularnog karcinoma grkljana [288, 289] u ovom je istraživanju ekspresija Fak utvrđena samo u svim pripadajućim tumorom nezahvaćenim tkivima. Poznato je da se Fak-kinaza može aktivirati različitim faktorima rasta poput FGF (engl. *FGF- fibroblast growth factor*) i PDGF (engl. *PDGF- platelet derived growth factor*) [290-292] i da izolirani fokalni adhezijski kompleksi sadrže FGF receptore 1 [293]. Nadalje, Fak-kinaza može izravno ući u interakciju s FGF receptorima i uzrokovati aktivaciju receptora i nizvodne stanične MAPK/Erk ½ signalne kaskade što sprečava diferencijaciju stanica miofibroblasta [293]. Postoji mogućnost da se sličan proces odvija u planocelularnom karcinomu grkljana što potvrđuju rezultati ovog istraživanja.

Kod planocelularnih karcinoma glave i vrata se često javlja jaka dezmostična reakcija u tumorskoj stromi koju karakterizira infiltracija miofibroblasta aktiviranih od strane tumorskih stanica putem TGF β1 [294]. Ovi miofibroblasti imaju tendenciju nakupljanja uz invazivnu frontu tumora i doprinose malignosti oboljenja [124, 295]. Stoga rezultati ovog istraživanja potvrđuju tezu kako polisijalizacija NCAM-molekule

planocelularnog karcinoma grkljana indirektno utječe na koncentraciju liganda FGF-receptora u tumorskom mikrokolišu i tako regulira diferencijaciju miofibroblasta. Slično tomu, istraživanje Ono i sur. [296] je pokazalo da polisijalizacija adhezijske molekule neuralnih stanica negativno utječe na aktivnost FGF- receptora koji bi inače mogli doprinijeti diferencijaciji miofibroblasta kod malignih oboljenja.

Naposljetku postoje brojni dokazi koji ukazuju kako molekule ugljikohidrata prisutne na površini tumorskih stanica, pa tako i polisijalinska kiselina, doprinose kontroli stanica imunosnog sustava domaćina od strane tumora [297, 298]. Isto tako je istraživanje Wanga i sur. [299] pokazalo kako su interakcija između proteina Siglek-11 mikroglija stanica i ostataka polisijalinske kiseline na površini neuronalnih stanica uzgajanih u kokulturi ublažili neurotoksičan učinak mikroglija stanica na neuralne stanice. Ekspresija Siglek-11 je utvrđena i u makrofaga prisutnih u raznim tkivima [194], a poznato je da mnoga maligna oboljenja, pa tako i planocelularni karcinomi glave i vrata učestalo uzrokuju polarizaciju makrofaga prisutnih u tumorskom mikrokolišu iz proupalnog fenotipa (fenotip M1) u antiupalni fenotip (fenotip M2) [300]. Ovakvi makrofazi M2-fenotipa imaju slabu tumoricidnu aktivnost, a doprinose progresiji bolesti i metastaziranju tako da privlačenjem novih fibroblasta na mjesto upale [301] i potiču angiogenezu i promjene u izvanstaničnom okolišu. U skladu s prethodno navedenim je u ovom istraživanju ekspresija Siglek-11 utvrđena samo u uzorcima tkiva primarnih tumora, koji su metastazirali, što ukazuje na mogućnost interakcije između Siglek-11 na površini tkivnih makrofaga i polisijaliziranog oblika NCAM-molekule kod uznapređovalog oblika oboljenja. Ova bi interakcija mogla biti među ključnim čimbenicima koji omogućavaju izbjegavanje imunosnog odgovora domaćina, ali i polarizaciju makrofaga.

## 6. Zaključci

- U uzorcima tkiva svih analiziranih planocelularnih karcinoma larinksa utvrđena je povećana razina ekspresije proteina ladinina-1, lumikana, antigena diferencijacije monocita CD-14 i alfa-4A lanaca tubulina- TUBA4A. Navedeni kandidati dio su staničnih signalnih putova CD44- $\beta$ 1 integrinske signalne okosnice inducirane faktorom inhibicije migracije makrofaga-MIF i signalnog puta nuklearnog faktora kapa  $\beta$ .
- U uzorcima pripadajućih, tumorom nezahvaćenih tkiva porijeklom iz pacijenata oboljelih od metastatske bolesti (naravno uz primarni tumor) utvrđena je povećana razina proteina afamina za razliku od takvih uzoraka pacijenata oboljelih samo od primarnih tumora.
- Proteini izvanstaničnog matriksa lumikan i biglikan pokazuju značajne razlike u metastatskim planocelularnim karcinomima larinksa. Biglikan ima povećanu razinu ekspresije isključivo u uzorcima tkiva primarnih tumora koji su metastazirali. Lumikan u tumorskim tkivima pacijenta s metastatskom bolešću za razliku od onih koji nemaju metastaze, dolazi u dva oblika - glikoproteinskoj formi s negativno nabijenim ugljikohidratnim ostacima i neglikoziliranoj proteinskoj osnovici.
- Ekspresija glikoproteina adhezijske molekule neuralnih stanica (NCAM) utvrđena je u metastatskim i nemetastatskim primarnim tumorima grkljana. Ekspresija polisijaliziranog oblika adhezijske molekule neuralnih stanica (PSA-NCAM) utvrđena je u histološki neizmijenjenoj normalnoj mukozni neposredno uz metastatske ( $p > 0.05$ ) i nemetastatske ( $p < 0.05$ ) primarne tumore.
- U uzorcima tkiva svih analiziranih primarnih planocelularnih tumora grkljana potvrđena je smanjena ekspresija komponenti staničnog signaliranja posredovanog receptorom FGFR1.

- Polisijalotransferaza IV (ST8Sia4) koja obavlja sijalizaciju NCAM povećano je eksprimirana i u uzorcima tkiva metastatskih kao i nemetastatskih primarnih tumora.
- Povećana razina Siglek 11 utvrđena je isključivo u uzorcima tkiva metastatskih primarnih tumora.



## 7. Popis literature

- [1]. Thiagarajan B: Anatomy of Larynx A Review. Online J Otolaryngol. 2015, 5(Supplement 1): 1-12
- [2]. Rosen AC, Simpson B: Operative Techniques in Laryngology. Springer 2008, Part A:3-8.
- [3]. Noordzij JP, Ossoff RH: Anatomy and physiology of the larynx. Otolaryngol Clin North Am. 2006, (1):1-10
- [4]. Dankbaar J.W, Pameijer FA. Vocal cord paralysis: anatomy, imaging and pathology. Insights Imaging 2014, 5(6): 743–751.
- [5]. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. International journal of cancer 2001, 94(2):153-156.
- [6]. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu JQ, Thun MJ: Cancer statistics, 2007. Ca-Cancer J Clin 2007, 57(1):43-66.
- [7]. Döbrossy L: Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. Cancer Metastasis Rev. 2005, 24(1):9-17.
- [8]. Tomasino RM, Bazan V, Daniele E, Nuara R, Morello V, Tralongo V, Leto G, Russo A: Biological characterization of laryngeal squamous-cell carcinoma. Anticancer research 1996, 16(4B):2257-2267.
- [9]. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A: Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. Cancer treatment reviews 2006, 32(7):504-515.
- [10]. Rafferty MA, Fenton JE, Jones AS: The history, aetiology and epidemiology of laryngeal carcinoma. Clin Otolaryngol 2001, 26(6):442-446.
- [11]. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P: Epidemiology of laryngeal cancer. Oral Oncol 1996, 32B(5):293-305.

- [12]. Derienzo DP, Greenberg SD, Fraire AE: Carcinoma of the Larynx - Changing Incidence in Women. *Arch Otolaryngol* 1991, 117(6):681-684.
- [13]. Dal Maso L, Torelli N, Biancotto E, Di Maso M, Gini A, Franchin G, Levi F, La Vecchia C, Serraino D, Polesel J: Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur J Epidemiol* 2016, 31(4):385-393.
- [14]. Zhang Y, Wang RX, Miao LM, Zhu LB, Jiang HB, Yuan H: Different Levels in Alcohol and Tobacco Consumption in Head and Neck Cancer Patients from 1957 to 2013. *Plos One* 2015, 10(4).
- [15]. Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncology* 2000, 36(3):256-263.
- [16]. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM: Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001, 7(6):349-354.
- [17]. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, Delmoral A, Lehmann W et al: Cancer of the Larynx Hypopharynx, Tobacco and Alcohol - Iarc International Case-Control Study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International journal of cancer* 1988, 41(4):483-491.
- [18]. de Almeida AA, Bandeira CM, Goncalves AJ, Araujo AJ: Nicotine dependence and smoking habits in patients with head and neck cancer. *J Bras Pneumol* 2014, 40(3):286-293.
- [19]. Maier H, Tisch M: Epidemiology of laryngeal cancer: Results of the Heidelberg case-control study. *Acta Oto-Laryngol* 1997:160-164.
- [20]. Ahrens W, Jockel KH, Patzak W, Elsner G: Alcohol, Smoking, and Occupational Factors in Cancer of the Larynx - a Case-Control Study. *Am J Ind Med* 1991, 20(4):477-493.

- [21]. Santi I, Kroll LE, Dietz A, Becher H, Ramroth H: Occupation and educational inequalities in laryngeal cancer: the use of a job index. *Bmc Public Health* 2013, 13.
- [22]. Gale N, Gnepp DR, Poljak M, Strojan P, Cardesa A, Helliwell T, Sifrer R, Volavsek M, Sandison A, Zidar N: Laryngeal Squamous Intraepithelial Lesions: An Updated Review on Etiology, Classification, Molecular Changes, and Treatment. *Adv Anat Pathol* 2016, 23(2):84-91.
- [23]. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M: *AJCC Cancer Staging Manual (6th Edition)*. Springer 2002, Part II: 17-89.
- [24]. Joshi VM, Wadhwa V, Mukherji SK: Imaging in laryngeal cancers. *The Indian journal of radiology & imaging* 2012, 22(3):209-226.
- [25]. Reidenbach MM: The paraglottic space and transglottic cancer: anatomical considerations. *Clinical anatomy* 1996, 9(4):244-251.
- [26]. Chu EA, Kim YJ: Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngologic clinics of North America* 2008, 41(4):673-695, v.
- [27]. Thompson L: World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, nose, & throat journal* 2006, 85(2):74.
- [28]. Blitzer A: Mechanisms of Spread of Laryngeal Carcinoma. *B New York Acad Med* 1979, 55(9):813-821.
- [29]. Hirabayashi H, Koshii K, Uno K, Ohgaki H, Nakasone Y, Fujisawa T, Syouno N, Hinohara T, Hirabayashi K: Extracapsular Spread of Squamous-Cell Carcinoma in Neck Lymph-Nodes - Prognostic Factor of Laryngeal-Cancer. *Laryngoscope* 1991, 101(5):502-506.
- [30]. Oosterkamp S, de Jong JMA, Van den Ende PL, Manni JJ, Dehing-Oberije C, Kremer B: Predictive value of lymph node metastases and extracapsular extension for the risk of distant metastases in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2006, 116(11):2067-2070.

- [31]. Devaney SL, Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO: Pathologic detection of occult metastases in regional lymph nodes in patients with head and neck cancer. *Acta Oto-Laryngol* 2000, 120(3):344-349.
- [32]. Rinaldo A, Devaney KO, Ferlito A: Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Orl J Oto-Rhino-Lary* 2004, 66(1):38-41.
- [33]. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK: Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 1996, 122(6):644-648.
- [34]. Medina JE, Ferlito A, Robbins KT, Silver CE, Rodrigo JP, de Bree R, Rinaldo A, Elsheikh MN, Weber RS, Werner JA: Central compartment dissection in laryngeal cancer. *Head & neck* 2011, 33(5):746-752.
- [35]. Danic D, Milicic D, Prgomet D, Leovic D: Prognostic factors in carcinoma of the larynx: relevance of DNA ploidy, S-fractions and localization of the tumour. *The Journal of laryngology and otology* 1999, 113(6):538-541.
- [36]. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S, Perez CA: Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2001, 111(6):1079-1087.
- [37]. Allen CT, Law JH, Dunn GP, Uppaluri R: Emerging insights into head and neck cancer metastasis. *Head Neck-J Sci Spec* 2013, 35(11):1669-1678.
- [38]. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP: Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. *International journal of cancer* 2005, 114(5):806-816.
- [39]. Yucel OT, Yilmaz T, Unal OF, Turan E: Distant metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 1999, 18(3):285-288.

- [40]. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, Vanderwaal I, Snow GB: Recurrence at the Primary Site in Head and Neck-Cancer and the Significance of Neck Lymph-Node Metastases as a Prognostic Factor. *Cancer* 1994, 73(1):187-190.
- [41]. Lippman SM, Hong WK: Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1989, 17(3):691-694.
- [42]. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH: Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head & neck* 2002, 24(2):198-206.
- [43]. Leon X, Quer M, Diez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J: Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head & neck* 1999, 21(3):204-210.
- [44]. Argiris A, Eng C: Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer treatment and research* 2003, 114:15-60.
- [45]. Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB et al: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24(22):3693-3704.
- [46]. Terrell JE, Fisher SG, Wolf GT, Grp VALCS: Long-term quality of life after treatment of laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol* 1998, 124(9):964-971.
- [47]. Lango MN: Multimodal Treatment for Head and Neck Cancer. *Surg Clin N Am* 2009, 89(1):43-+.
- [48]. Wirth LJ, Posner MR: Recent advances in combined modality therapy for locally advanced head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Tar* 2007, 7(7):674-680.
- [49]. Chawla S, Carney AS: Organ preservation surgery for laryngeal cancer. *Head Neck Oncol* 2009, 1.

- [50]. Forastiere AA, Weber RS, Trotti A: Organ Preservation for Advanced Larynx Cancer: Issues and Outcomes. *J Clin Oncol* 2015, 33(29):3262-+.
- [51]. Yao M, Epstein JB, Modi BJ, Pytynia KB, Mundt AJ, Feldman LE: Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 2007, 43(3):213-223.
- [52]. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. *Lancet* 2008, 371(9625):1695-1709.
- [53]. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG et al: Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* 2006, 368(9538):843-854.
- [54]. Kaanders JH, van Daal WA, Hoogenraad WJ, van der Kogel AJ: Accelerated fractionation radiotherapy for laryngeal cancer, acute, and late toxicity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1992, 24(3):497-503.
- [55]. Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE: The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22(9):1743-1752.
- [56]. Posner MR: Paradigm shift in the treatment of head and neck cancer: The role of neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist* 2005, 10:11-19.
- [57]. Kurzweg T, Mockelmann N, Laban S, Knecht R: Current treatment options for recurrent/metastatic head and neck cancer: a post-ASCO 2011 update and review of last year's literature. *Eur Arch Oto-Rhino-L* 2012, 269(10):2157-2167.
- [58]. Colevas AD: Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006, 24(17):2644-2652.
- [59]. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M et al: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 2004, 350(19):1937-1944.

- [60]. Specenier P, Vermorken JB: Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics : targets & therapy* 2013, 7:77-90.
- [61]. Griffin S, Walker S, Sculpher M, White S, Erhorn S, Brent S, Dyker A, Ferrie L, Gilfillan C, Horsley W et al: Cetuximab plus radiotherapy for the treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Health technology assessment* 2009, 13 Suppl 1:49-54.
- [62]. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D et al: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2008, 359(11):1116-1127.
- [63]. Barnes L, Eveson WJ, Reichart P, Sidransky D: *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, 2005. IARC Press 2005. pp: 107-162
- [64]. Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ, Slijper M: Protein biomarker discovery for head and neck cancer. *Journal of proteomics* 2010, 73(10):1790-1803.
- [65]. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians 2012, 62(1):10-29.
- [66]. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC: Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical pathology* 2006, 59(5):445-453.
- [67]. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, Pevsner J, Westra WH, Califano J: A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(8):3058-3064.
- [68]. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W et al: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996, 56(11):2488-2492.

- [69]. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004, 33(6):317-322.
- [70]. Kim MM, Califano JA: Molecular pathology of head-and-neck cancer. *International journal of cancer* 2004, 112(4):545-553.
- [71]. Stadler ME, Patel MR, Couch ME, Hayes DN: Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematology/oncology clinics of North America* 2008, 22(6):1099-1124, vii.
- [72]. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D: Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994, 54(5):1156-1158.
- [73]. Nevins JR: The Rb/E2F pathway and cancer. *Human molecular genetics* 2001, 10(7):699-703.
- [74]. Harbour JW, Dean DC: The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development* 2000, 14(19):2393-2409.
- [75]. Denaro N, Lo Nigro C, Natoli G, Russi EG, Adamo V, Merlano MC: The Role of p53 and MDM2 in Head and Neck Cancer. *ISRN otolaryngology* 2011, 2011:931813.
- [76]. Saunders ME, MacKenzie R, Shipman R, Fransen E, Gilbert R, Jordan RC: Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999, 5(9):2455-2463.
- [77]. Wang X, Pavelic ZP, Li YQ, Wang L, Gleich L, Radack K, Gluckman JL, Stambrook PJ: Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical molecular pathology* 1995, 48(5):M256-259.
- [78]. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai JW, Funkhouser WK, Smith J, Vick K: P16 and p53 protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002, 8(11):3445-3453.



- [79]. Hanken H, Grobe A, Cachovan G, Smeets R, Simon R, Sauter G, Heiland M, Blessmann M: CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Oral Invest* 2014, 18(1):269-276.
- [80]. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: Head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2001, 345(26):1890-1900.
- [81]. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE: Mechanisms of Invasion in Head and Neck Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2015, 139(11):1334-1348.
- [82]. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1):57-70.
- [83]. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation* 2009, 119(6):1438-1449.
- [84]. Guarino M, Rubino B, Ballabio G: The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007, 39(3):305-318.
- [85]. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ: Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of dental research* 2013, 92(2):114-121.
- [86]. Harris TJ, Tepass U: Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, 11(7):502-514.
- [87]. Harris TJ: An introduction to adherens junctions: from molecular mechanisms to tissue development and disease. *Sub-cellular biochemistry* 2012, 60:1-5.
- [88]. Smith A, Teknos TN, Pan Q: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013, 49(4):287-292.
- [89]. Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J: E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *International journal of cancer* 2005, 114(5):779-790.

- [90]. Nguyen PT, Kudo Y, Yoshida M, Kamata N, Ogawa I, Takata T: N-cadherin expression is involved in malignant behavior of head and neck cancer in relation to epithelial-mesenchymal transition. *Histology and histopathology* 2011, 26(2):147-156.
- [91]. Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI: Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer research* 2008, 28(2B):1355-1359.
- [92]. Zhang JL, Cheng Q, Zhou Y, Wang Y, Chen XM: Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: Correlations with poor prognosis. *Oral Oncology* 2013, 49(11):1043-1050.
- [93]. Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, Abemayor E, Dubinett SM, St John MA: Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *American journal of otolaryngology* 2012, 33(1):6-13.
- [94]. Smith A, Teknos TN, Pan QT: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2013, 49(4):287-292.
- [95]. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ: Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma. *Journal of dental research* 2013, 92(2):114-121.
- [96]. Cortesina G, Martone T: Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma. review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2006, 26(6):317-25.
- [97]. Streuli CH: Integrins as architects of cell behavior. *Molecular biology of the cell* 2016, 27(19):2885-2888.
- [98]. Dyce OH, Ziober AF, Weber RS, Miyazaki K, Khariwala SS, Feldman M, Ziober BL: Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Laryngoscope* 2002, 112(11):2025-2032.
- [99]. Nakahara S, Miyoshi E, Noda K, Ihara S, Gu J, Honke K, Inohara H, Kubo T, Taniguchi N: Involvement of oligosaccharide changes in alpha5beta1 integrin in a

cisplatin-resistant human squamous cell carcinoma cell line. *Mol Cancer Ther.* 2003, 2(11):1207-14.

[100]. Wang D, Muller S, Amin AR, Huang D, Su L, Hu Z, Rahman MA, Nannapaneni S, Koenig L, Chen Z et al: The pivotal role of integrin beta1 in metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012, 18(17):4589-4599.

[101]. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P: The CD44 protein family. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1998, 30(3):299-305.

[102]. Yüce I, Bayram A, Çağlı S, Canöz O, Bayram S, Güney E: The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of supraglottic laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2011, 32(2):141-6.

[103]. Wang SJ, Wong G, de Heer AM, Xia W, Bourguignon LY: CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 2009, 119(8):1518-1530.

[104]. Gao W, Zhang C, Feng Y, Chen G, Wen S, Huangfu H, Wang B: Fascin-1, ezrin and paxillin contribute to the malignant progression and are predictors of clinical prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Plos One* 2012, 7(11):e50710.

[105]. Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, de Bock GH, Kluin PM, Schuurin E, van der Wal JE: Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. *British journal of cancer* 2008, 98(5):950-955.

[106]. Walk EL, Weed SA: Recently identified biomarkers that promote lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)* 2011, Feb 22;3(1):747-72.

[107]. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS: Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009, 45(4-5):324-334.

[108]. Kalyankrishna S, Grandis JR: Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24(17):2666-2672.

- [109]. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L: Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002, 62(24):7350-7356.
- [110]. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, Feng L, Wang J, Holsinger FC, Yu D et al: TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2010, 29(14):2047-2059.
- [111]. Zhu L, Werner JA, Mandic R: Implications of tropomyosin-related kinase B (TrkB) in head and neck cancer. *Anticancer research* 2007, 27(5A):3121-3126.
- [112]. Yan M, Xu Q, Zhang P, Zhou XJ, Zhang ZY, Chen WT: Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *Bmc Cancer* 2010, 10:437.
- [113]. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Nonaka M, Asahina I: Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis. *Oral Oncol* 2009, 45(3):241-246.
- [114]. Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ: Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res* 2004, 64(13):4405-4410.
- [115]. Schottdorf EM: Resistance to Radiotherapy and Targeted Molecular Therapies in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck, Preclinical Data and New Approaches. *Curr Signal Transd T* 2012, 7(3):254-264.
- [116]. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE: Mechanisms of Invasion in Head and Neck Cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2015, 139(11):1334-1348.
- [117]. Yuce I, Bayram A, Cagli S, Canoz O, Bayram S, Guney E: The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of

supraglottic laryngeal carcinoma. American journal of otolaryngology 2011, 32(2):141-146.

[118]. Zhang HY, Liu M, Sun Y, Lu JG: MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer. Eur Arch Oto-Rhino-L 2009, 266(9):1427-1434.

[119]. Paksoy M, Hardal U, Caglar C.: Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement. J Cancer Res Clin Oncol. 2011, 137(9):1371-7

[120]. Niu G, Chen XY: Vascular Endothelial Growth Factor as an Anti-Angiogenic Target for Cancer Therapy. Current drug targets 2010, 11(8):1000-1017.

[121]. Neuchrist C, Erovcic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M: Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. Head Neck-J Sci Spec 2003, 25(6):464-474.

[122]. Nix P, Lind M, Greenman J, Stafford N, Cawkwell L: Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer. Ann Oncol 2004, 15(5):797-801.

[123]. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC, Harris AL, Grp TAR: Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol 2002, 53(5):1192-1202.

[124]. Markwell SM, Weed SA: Tumor and stromal-based contributions to head and neck squamous cell carcinoma invasion. Cancers 2015, 7(1):382-406.

[125]. Koontongkaew S: The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. Journal of Cancer 2013, 4(1):66-83.

[126]. Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, Kannagi R: Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx 2010, 37(4):488-495.

- [127]. Vynios DH, Theocharis DA, Papageorgakopoulou N, Papadas TA, Mastronikolis NS, Goumas PD, Stylianou M, Skandalis SS: Biochemical changes of extracellular proteoglycans in squamous cell laryngeal carcinoma. *Connective tissue research* 2008, 49(3):239-243.
- [128]. Boersema PJ, Kahraman A, Picotti P: Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. *Current opinion in biotechnology* 2015, 34:162-170.
- [129]. Rezende TM, de Souza Freire M, Franco OL: Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. *Cancer* 2010, 116(21):4914-4925.
- [130]. Issaq H, Veenstra T: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques* 2008, 44(5):697-698, 700.
- [131]. Kondo T: Tissue proteomics for cancer biomarker development: laser microdissection and 2D-DIGE. *BMB reports* 2008, 41(9):626-634.
- [132]. Wu CC, MacCoss MJ: Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Current opinion in molecular therapeutics* 2002, 4(3):242-250.
- [133]. Chahrour O, Cobice D, Malone J: Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2015, 113:2-20.
- [134]. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA: Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011, 11(4):535-553.
- [135]. Chen G, Pramanik BN: Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug discovery today* 2009, 14(9-10):465-471.
- [136]. Melle C, Ernst G, Schimmel B, Bleul A, Koscielny S, Wiesner A, Bogumil R, Moller U, Osterloh D, Halbhuber KJ et al: Biomarker discovery and identification in laser microdissected head and neck squamous cell carcinoma with ProteinChip technology, two-dimensional gel electrophoresis, tandem mass spectrometry, and immunohistochemistry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2003, 2(7):443-452.

- [137]. Wang Z, Jiang L, Huang C, Li Z, Chen L, Gou L, Chen P, Tong A, Tang M, Gao F et al: Comparative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 2008, 7(9):1639-1650.
- [138]. Wu Z, Doondeea JB, Gholami AM, Janning MC, Lemeer S, Kramer K, Eccles SA, Gollin SM, Grenman R, Walch A et al: Quantitative chemical proteomics reveals new potential drug targets in head and neck cancer. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 2011, 10(12):M111 011635.
- [139]. Ralhan R, Desouza LV, Matta A, Tripathi SC, Ghanny S, Gupta SD, Bahadur S, Siu KWM: Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008, 7(6):1162-1173.
- [140]. Zha C, Jiang XH, Peng SF: iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis on S100 Calcium Binding Protein A2 in Metastasis of Laryngeal Cancer. *Plos One* 2015, 10(4).
- [141]. Li L, Zhang ZW, Wang CY, Miao L, Zhang JP, Wang JS, Jiao BH, Zhao SW: Quantitative Proteomics Approach to Screening of Potential Diagnostic and Therapeutic Targets for Laryngeal Carcinoma. *Plos One* 2014, 9(2).
- [142]. Croce MV, Price MR, Segal-Eiras A: Association of a alpha1 acidic glycoprotein and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Pathology oncology research* : POR 2001, 7(2):111-117.
- [143]. Saussez S, Decaestecker C, Mahillon V, Cludts S, Capouillez A, Chevalier D, Vet HK, Andre S, Toubreau G, Leroy X et al: Galectin-3 upregulation during tumor progression in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2008, 118(9):1583-1590.
- [144]. Gustafsson H, Franzen L, Grankvist K, Anniko M, Henriksson R: Glycoprotein tumour markers in head and neck neoplasms--a consecutive study on CA-50, CA 19-9, and CEA. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1988, 114(4):394-398.

- [145]. Jeannon JP, Stafford FW, Soames JV, Wilson JA. Altered MUC1 and MUC2 glycoprotein expression in laryngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001, 124(2):199-202.
- [146]. Maness PF, Schachner M: Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience* 2007, 10(1):19-26.
- [147]. Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E: Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *Journal of neurochemistry* 2005, 94(5):1169-1179.
- [148]. Walmod PS, Kolkova K, Berezin V, Bock E: Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 2004, 29(11):2015-2035.
- [149]. Dallerac G, Rampon C, Doyere V: NCAM Function in the Adult Brain: Lessons from Mimetic Peptides and Therapeutic Potential. *Neurochem Res* 2013, 38(6):1163-1173.
- [150]. Cavallaro U, Christofori G: Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004, 4(2):118-132.
- [151]. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J: CD56(bright) natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009, 126(4):458-465.
- [152]. Barthels D, Vopper G, Boned A, Cremer H, Wille W: High Degree of Ncam Diversity Generated by Alternative Rna Splicing in Brain and Muscle. *Eur J Neurosci* 1992, 4(4):327-337.
- [153]. Weledji EP, Assob JC: The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Annals of medicine and surgery* 2014, 3(3):77-81.
- [154]. Close BE, Colley KJ: In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(51):34586-34593.



- [155]. Mccoy RD, Vimr ER, Troy FA: Cmp-Neunac-Poly-Alpha-2,8-Sialosyl Sialyltransferase and the Biosynthesis of Polysialosyl Units in Neural Cell-Adhesion Molecules. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260(23):2695-2699.
- [156]. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H: Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiological reviews* 2014, 94(2):461-518.
- [157]. Bonfanti L, Theodosis DT: Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell adhesion & migration* 2009, 3(1):43-50.
- [158]. Angata K, Fukuda M: Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 2003, 85(1-2):195-206.
- [159]. Heimburg-Molinaro J, Lum M, Vijay G, Jain M, Almogren A, Rittenhouse-Olson K: Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 2011, 29(48):8802-8826.
- [160]. Tsuchiya A, Lu WY, Weinhold B, Boulter L, Stutchfield BM, Williams MJ, Guest RV, Minnis-Lyons SE, MacKinnon AC, Schwarzer D et al: Ncam and Psa-Ncam Modulate Hepatic Progenitor Cell Behavior during Liver Development and Regeneration. *J Hepatol* 2013, 58:S15-S16.
- [161]. Falconer RA, Errington RJ, Shnyder SD, Smith PJ, Patterson LH: Polysialyltransferase: A New Target in Metastatic Cancer. *Curr Cancer Drug Tar* 2012, 12(8):925-939.
- [162]. Heimburg-Molinaro J, Lum M, Vijay G, Jain MT, Almogren A, Rittenhouse-Olson K: Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 2011, 29(48):8802-8826.
- [163]. Rutishauser U: Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9(1):26-35.
- [164]. Sato C, Kitajima K: Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Front Cell Neurosci* 2013, 7.

- [165]. Han XM, Aslanian A, Yates JR: Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 2008, 12(5):483-490.
- [166]. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL: Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 2003, 24(1):3-12.
- [167]. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2003, 337(1-2):11-21.
- [168]. Finehout EJ, Lee KH: An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 2004, 32(2):93-100.
- [169]. Aebersold R, Goodlett DR: Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews* 2001, 101(2):269-295.
- [170]. Coon JJ, Syka JE, Shabanowitz J, Hunt DF: Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis. *BioTechniques* 2005, 38(4):519, 521, 523.
- [171]. Kapp E, Schutz F: Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* 2007, Chapter 25:Unit25 22.
- [172]. Pitt JJ: Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 2009, 30(1):19-34.
- [173]. Banerjee S, Mazumdar S: Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry* 2012, 2012:282574.

- [174]. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S: Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical chemistry* 2006, 78(7):2113-2120.
- [175]. Kall L, Storey JD, MacCoss MJ, Noble WS: Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *Journal of proteome research* 2008, 7(1):29-34.
- [176]. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC: Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 2014, 6(3):160.
- [177]. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ: The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Meth* 2008, 172(2):250-254.
- [178]. Rabilloud T, Lelong C: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of proteomics* 2011, 74(10):1829-1841.
- [179]. Quartu M, Serra MP, Boi M, Ibba V, Melis T, Del Fiacco M: Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human trigeminal ganglion and brainstem at prenatal and adult ages. *BMC neuroscience* 2008, 9.
- [180]. Ramos-Vara JA: Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in molecular biology* 2011, 691:83-96.
- [181]. Fedchenko N, Reifenrath J: Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol* 2014, 9.
- [182]. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN: Lumican, a Small Leucine-rich Proteoglycan. *IUBMB life* 2008, 60(12):818-823.
- [183]. Brezillon S, Pietraszek K, Maquart FX, Wegrowski Y: Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins. *Febs Journal* 2013, 280(10):2369-2381.

- [184]. Zhou Q, Park SH, Boucher S, Higgins E, Lee K, Edmunds T: N-linked oligosaccharide analysis of glycoprotein bands from isoelectric focusing gels. *Anal Biochem.* 2004, 335(1):10-6.
- [185]. Barrabés S, Sarrats A, Fort E, De Llorens R, Rudd PM, Peracaula R. Effect of sialic acid content on glycoprotein pI analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2010, 31(17):2903-12.
- [186]. Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K et al: Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000, 60(11):3072-3080.
- [187]. Angata K, Nakayama J, Fredette B, Chong K, Ranscht B, Fukuda M: Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule - Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(11):7182-7190.
- [188]. Seidenfaden R, Krauter A, Schertzinger F, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H: Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Molecular and cellular biology* 2003, 23(16):5908-5918.
- [189]. Eggers K, Werneburg S, Schertzinger A, Abeln M, Schiff M, Scharenberg MA, Burkhardt H, Muhlenhoff M, Hildebrandt H: Polysialic acid controls NCAM signals at cell-cell contacts to regulate focal adhesion independent from FGF receptor activity. *Journal of cell science* 2011, 124(19):3279-3291.
- [190]. Hinsby AM, Berezin V, Bock E: Molecular mechanisms of NCAM function. *Frontiers in bioscience* 2004, 9:2227-2244.
- [191]. Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L, Masur SK: FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation (vol 20, pg 1006, 2006). *Faseb Journal* 2006, 20(9):1573-1573.

- [192]. Varki A: Natural ligands for CD33-related Siglecs? *Glycobiology* 2009, 19(8):810-812.
- [193]. Angata T, Kerr SC, Greaves DR, Varki NM, Crocker PR, Varki A: Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(27):24466-24474.
- [194]. Angata T, Kerr SC, Greaves DR, Varki NM, Crocker PR, Varki A: Cloning and characterization of human Siglec-11 - A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(27):24466-24474.
- [195]. Wang Y, Neumann H: Alleviation of Neurotoxicity by Microglial Human Siglec-11. *Journal of Neuroscience* 2010, 30(9):3482-3488.
- [196]. Weber GF: Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer letters* 2008, 270(2):181-190.
- [197]. Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F: Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med.* 2007,13(12):535-41.
- [198]. Lee J, Jiffar T, Kupferman ME: A novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Plos One* 2012, 7(1):e30246.
- [199]. Wang GS, Cooper TA: Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews Genetics* 2007, 8(10):749-761.
- [200]. Shilo A, Siegfried Z, Karni R: The role of splicing factors in deregulation of alternative splicing during oncogenesis and tumor progression. *Molecular & cellular oncology* 2015, 2(1):e970955.
- [201]. Li XM, Zhang KZ, Li ZH: Unfolded protein response in cancer: the Physician's perspective. *J Hematol Oncol* 2011, 4.

- [202]. Cox TR, Eler JT: Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms* 2011, 4(2):165-178.
- [203]. Chovatiya R, Medzhitov R: Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell* 2014, 54(2):281-288.
- [204]. Carey SP, Charest JM, Reinhart-King CA: Forces During Cell Adhesion and Spreading: Implications for Cellular Homeostasis. *Stud Mechanobiol Tis* 2011, 4:29-69.
- [205]. Guan X: Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica Sinica B* 2015, 5(5):402-418.
- [206]. Kelley LC, Lohmer LL, Hagedorn EJ, Sherwood DR: Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. *The Journal of cell biology* 2014, 204(3):291-302.
- [207]. Antonelli AR, Nicolai P, Cappiello J, Peretti G, Molinari Tosatti MP, Rosa D, Grigolato PG, Favret M, Maroccolo D: Basement membrane components in normal, dysplastic, neoplastic laryngeal tissue and metastatic lymph nodes. *Acta Otolaryngol* 1991, 111(2):437-443.
- [208]. Hagedorn H, Schreiner M, Wiest I, Tubel J, Schleicher ED, Nerlich AG: Defective basement membrane in laryngeal carcinomas with heterogeneous loss of distinct components. *Human pathology* 1998, 29(5):447-454.
- [209]. Rosenthal EL, Shreenivas S, Peters GE, Grizzle WE, Desmond R, Gladson CL: Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2003, 113(8):1406-1410.
- [210]. Yurchenco PD: Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011, 3(2).
- [211]. Gimond C, van Der Flier A, van Delft S, Brakebusch C, Kuikman I, Collard JG, Fassler R, Sonnenberg A: Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of

GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *The Journal of cell biology* 1999, 147(6):1325-1340.

[212]. Motoki K, Megahed M, LaForgia S, Uitto J: Cloning and chromosomal mapping of mouse laminin, a novel basement membrane zone component. *Genomics* 1997, 39(3):323-330.

[213]. Lu PF, Weaver VM, Werb Z: The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology* 2012, 196(4):395-406.

[214]. Koontongkaew S: The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Journal of Cancer* 2013, 4(1):66-83.

[215]. Cox TR, Ertel JT: Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms* 2011, 4(2):165-178.

[216]. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H: Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *The Journal of cell biology* 1998, 141(5):1277-1286.

[217]. Nikitovic D, Papoutsidakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biol.* 2014, 35:206-14.

[218]. Schaefer L, Iozzo RV: Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation. *Curr Opin Genet Dev* 2012, 22(1):56-57.

[219]. Iozzo RV, Schaefer L: Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *Febs Journal* 2010, 277(19):3864-3875.

[220]. Yeh LK, Chen WL, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WWY, Tseng SCG, Liu CY: Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005, 46(2):479-486.

- [221]. Stamov DR, Mullner A, Wegrowski Y, Brezillon S, Franz CM: Quantitative analysis of type I collagen fibril regulation by lumican and decorin using AFM. *J Struct Biol* 2013, 183(3):394-403.
- [222]. Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ: Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *Bmc Med* 2006, 4.
- [223]. Pan S, Chen R, Stevens T, Bronner MP, May D, Tamura Y, McIntosh MW, Brentnall TA: Proteomics Portrait of Archival Lesions of Chronic Pancreatitis. *Plos One* 2011, 6(11).
- [224]. Wu F, Vij N, Roberts L, Lopez-Briones S, Joyce S, Chakravarti S: A novel role of the lumican core protein in bacterial lipopolysaccharide-induced innate immune response. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282(36):26409-26417.
- [225]. Lohr K, Sardana H, Lee S, Wu F, Huso DL, Hamad AR, Chakravarti S: Extracellular matrix protein lumican regulates inflammation in a mouse model of colitis. *Inflammatory bowel diseases* 2012, 18(1):143-151.
- [226]. Quail DF, Joyce JA: Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 2013, 19(11):1423-1437.
- [227]. Li K, Dan Z, Hu X, Gesang L, Ze Y, Bianba Z: CD14 regulates gastric cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion in vitro. *Oncology reports* 2013, 30(6):2725-2732.
- [228]. Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, Contreras-Trujillo H, Volkmer AK, Scheeren FA, Volkmer JP, Weissman IL: CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, 112(15):4725-4730.
- [229]. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser H, Marsche G, Young M, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ: The matrix component biglycan is proinflammatory



and signals through toll-like receptor-4 and-2 in macrophages. *N-S Arch Pharmacol* 2006, 372:21-21.

[230]. Bonomi M, Patsias A, Posner M, Sikora A: The Role of Inflammation in Head and Neck Cancer. *Inflammation and Cancer* 2014, 816:107-127.

[231]. Gu XH, Ma YG, Xiao JD, Zheng HX, Song C, Gong YH, Xing XJ: Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers. *Clin Exp Med* 2012, 12(3):195-199.

[232]. Wang B, Li GX, Zhang SG, Wang Q, Wen YG, Tang HM, Zhou CZ, Xing AY, Fan JW, Yan DW et al: Biglycan expression correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric cancer. *Experimental biology and medicine* 2011, 236(11):1247-1253.

[233]. Esteban F, Bravo JJ, Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Gil-Motoya JA: Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer research* 2005, 25(2A):1115-1121.

[234]. McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJ: CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget* 2015, 6(34):36762-36773.

[235]. Shi XR, Leng L, Wang T, Wang WK, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E et al: CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006, 25(4):595-606.

[236]. Taher TEI, Smit L, Griffioen AW, SchilderTol EJM, Borst J, Pals ST: Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases - Association with p56(lck) in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(5):2863-2867.

[237]. Kindt N, Preillon J, Kaltner H, Gabius HJ, Chevalier D, Rodriguez A, Johnson BD, Megalizzi V, Decaestecker C, Laurent G et al: Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and experimental studies. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2013, 139(5):727-737.

- [238]. Kindt N, Lechien JR, Nonclercq D, Laurent G, Saussez S: Involvement of CD74 in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2014, 140(6):937-947.
- [239]. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL: Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* 2006, 177(12):8730-8739.
- [240]. Lee CY, Su MJ, Huang CY, Chen MY, Hsu HC, Lin CY, Tang CH: Macrophage migration inhibitory factor increases cell motility and up-regulates alphavbeta3 integrin in human chondrosarcoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 2012, 113(5):1590-1598.
- [241]. Hoesel B, Schmid JA: The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 2013, 12:86.
- [242]. Larue L, Bellacosa A: Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005, 24(50):7443-7454.
- [243]. Li JJ, Zhang GH, Yang XM, Li SS, Liu X, Yang QT, Li Y, Ye J: Reduced E-cadherin expression is associated with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2012, 39(2):186-192.
- [244]. Bhagwat S, Dalvi V, Chandrasekhar D, Matthew T, Acharya K, Gajbhiye R, Kulkarni V, Sonawane S, Ghosalkar M, Parte P. Acetylated  $\alpha$ -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility. *Fertil Steril*. 2014, 101(1):95-104
- [245]. Banerjee A. Increased levels of tyrosinated alpha-, beta(III)-, and beta(IV)-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 26;293(1):598-601
- [246]. Boggs AE, Vitolo MI, Whipple RA, Charpentier MS, Goloubeva OG, Ioffe OB, Tuttle KC, Slovic J, Lu Y, Mills GB et al: alpha-Tubulin acetylation elevated in metastatic and basal-like breast cancer cells promotes microtentacle formation, adhesion, and invasive migration. *Cancer Res* 2015, 75(1):203-215.

- [247]. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL: Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular biology of the cell* 2011, 22(24):4750-4764.
- [248]. Wang X, Liu M, Zhao CY: Expression of ezrin and moesin related to invasion, metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Genetics and molecular research : GMR* 2014, 13(3):8002-8013.
- [249]. Li L, Zhang Z, Wang C, Miao L, Zhang J, Wang J, Jiao B, Zhao S: Quantitative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for laryngeal carcinoma. *Plos One* 2014, 9(2):e90181.
- [250]. Durmaz A, Kurt B, Ongoru O, Karahatay S, Gerek M, Yalcin S: Significance of fascin expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *The Journal of laryngology and otology* 2010, 124(2):194-198.
- [251]. Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, Lenhard M, Lingenhel A, Fineder L, Buchner H, Stieber P: Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009, 18(4):1127-1133.
- [252]. Jackson D, Craven RA, Hutson RC, Graze I, Lueth P, Tonge RP, Hartley JL, Nickson J, Rayner SJ, Johnston C et al: Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13(24):7370-7379.
- [253]. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Heubner M: Utility of Mesothelin, L1CAM and Afamin as Biomarkers in Primary Ovarian Cancer. *Anticancer research* 2013, 33(1):329-336.
- [254]. Vural E, Hutcheson J, Korourian S, Kechelava S, Hanna E: Correlation of neural cell adhesion molecules with perineural spread of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryng Head Neck* 2000, 122(5):717-720.
- [255]. McLaughlin RB, Montone KT, Wall SJ, Chalian AA, Weinstein GS, Roberts SA, Wolf PF, Weber RS: Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell

carcinoma of the head and neck: A predictor of propensity toward perineural spread. *Laryngoscope* 1999, 109(5):821-826.

[256]. Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE: Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion (vol 280, pg 137, 2005). *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(24):23424-23424.

[257]. Galuska SP, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Muhlenhoff M, Geyer H: Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(1):17-28.

[258]. Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M: Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology* 2005, 15(9):887-894.

[259]. Hildebrandt H, Becker C, Gluer S, Rosner H, Gerardy-Schahn R, Rahmann H: Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Res* 1998, 58(4):779-784.

[260]. Wang X, Li X, Zeng YN, He F, Yang XM, Guan F: Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *International journal of molecular medicine* 2016, 37(1):197-206.

[261]. Nakano TA, Steirer LM, Moe GR: The expression profile of De-N-acetyl Polysialic acid (NeuPSA) in normal and diseased human tissue. *J Biol Chem.* 2011, 286(46):40343-53.

[262]. Scheidegger P, Papay J, Zuber C, Lackie PM, Roth J: Cellular site of synthesis and dynamics of cell surface re-expression of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Eur J Biochem.* 1994, 225(3):1097-103.

[263]. Close BE, Wilkinson JM, Bohrer TJ, Goodwin CP, Broom LJ, Colley KJ :The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: Posttranslational processing and role of

autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 2001, 11(11):997-1008.

[264]. Stamatos NM, Zhang L, Jokilammi A, Finne J, Chen WH, El-Maarouf A, Cross AS, Hankey KG: Changes in polysialic acid expression on myeloid cells during differentiation and recruitment to sites of inflammation: Role in phagocytosis. *Glycobiology* 2014, 24(9):864-879.

[265]. Drake PM, Nathan JK, Stock CM, Chang PV, Muench MO, Nakata D, Reader JR, Gip P, Golden KPK, Weinhold B et al: Polysialic Acid, a Glycan with Highly Restricted Expression, Is Found on Human and Murine Leukocytes and Modulates Immune Responses. *J Immunol* 2008, 181(10):6850-6858.

[266]. Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Inui K, Oyanagi H, Yamada T et al: Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001, 61(4):1666-1670.

[267]. Amoureux MC, Coulibaly B, Chinot O, Loundou A, Metellus P, Rougon G, Figarella-Branger D: Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines. *Bmc Cancer* 2010, 10.

[268]. Ulm C, Saffarzadeh M, Mahavadi P, Muller S, Prem G, Saboor F, Simon P, Middendorff R, Geyer H, Henneke I et al: Soluble polysialylated NCAM: a novel player of the innate immune system in the lung. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013, 70(19):3695-3708.

[269]. Huang RY, Wei YY, Hung RJ, Liu G, Su L, Zhang RY, Zong XC, Zhang ZF, Morgenstern H, Bruske I et al: Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium. *Ebiomedicine* 2015, 2(11):1677-1685.

[270]. Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ: Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev* 2007, 56(1):101-118.

- [271]. Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Muhlenhoff M, Adler G, Wedlich D, Menke A: Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 2008, 134(5):1555-1566.
- [272]. Burgess A, Wainwright SR, Shihabuddin LS, Rutishauser U, Seki T, Aubert I: Polysialic Acid Regulates the Clustering, Migration, and Neuronal Differentiation of Progenitor Cells in the Adult Hippocampus. *Developmental neurobiology* 2008, 68(14):1580-1590.
- [273]. Tsuchiya A, Lu WY, Weinhold B, Boulter L, Stutchfield BM, Williams MJ, Guest RV, Minnis-Lyons SE, MacKinnon AC, Schwarzer D et al: Polysialic Acid/Neural Cell Adhesion Molecule Modulates the Formation of Ductular Reactions in Liver Injury. *Hepatology* 2014, 60(5):1727-1740.
- [274]. Conchonaud F, Nicolas S, Amoureux MC, Menager C, Marguet D, Lenne PF, Rougon G, Matarazzo V: Polysialylation increases lateral diffusion of neural cell adhesion molecule in the cell membrane. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282(36):26266-26274.
- [275]. Seidenfaden R, Krauter A, Hildebrandt H: The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction. *Neurochem Int* 2006, 49(1):1-11.
- [276]. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G: MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol-Cell Ph* 1999, 277(4):C652-C664.
- [277]. Boucherat O, Nadeau V, Berube-Simard FA, Charron J, Jeannotte L: Crucial requirement of ERK/MAPK signaling in respiratory tract development (vol 141, pg 3197, 2015). *Development* 2015, 142(21):3801-3801.
- [278]. Hughes SE: Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997, 45(7):1005-1019.

- [279]. Guzy RD, Stoilov I, Elton TJ, Mecham RP, Ornitz DM. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015, 52(1):116-28.
- [280]. Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J: Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular and cellular biology* 1996, 16(3):977-989.
- [281]. Reilly JF, Mickey G, Maher PA: Association of fibroblast growth factor receptor 1 with the adaptor protein Grb14 - Characterization of a new receptor binding partner. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(11):7771-7778.
- [282]. Kovalenko D, Yang XH, Nadeau RJ, Harkins LK, Friesel R: Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(16):14087-14091.
- [283]. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A et al: Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Bba-Mol Cell Res* 2007, 1773(8):1263-1284.
- [284]. Lavoie H, Therrien M: Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2015, 16(5):281-298.
- [285]. Ramos C, Becerril C, Montano M, Garcia-De-Alba C, Ramirez R, Checa M, Pardo A, Selman M: FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *Am J Physiol-Lung C* 2010, 299(2):L222-L231.
- [286]. Levy L, Hill CS: Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, 17(1-2):41-58.

- [287]. Wang X, Li X, Zeng YN, He F, Yang XM, Guan F: Enhanced expression of polysialic acid correlates with malignant phenotype in breast cancer cell lines and clinical tissue samples. *International journal of molecular medicine* 2016, 37(1):197-206.
- [288]. Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ: Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003, 113(11):1944-1948.
- [289]. Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD: Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol* 2007, 133(2):145-150.
- [290]. Klint P, Claesson-Welsh L: Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1999, 4:D165-177.
- [291]. Hunger-Glaser I, Fan RS, Perez-Salazar E, Rozengurt E: PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: Dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation. *Journal of cellular physiology* 2004, 200(2):213-222.
- [292]. Plopper GE, Mcnamee HP, Dike LE, Bojanowski K, Ingber DE: Convergence of Integrin and Growth-Factor Receptor Signaling Pathways within the Focal Adhesion Complex. *Molecular biology of the cell* 1995, 6(10):1349-1365.
- [293]. Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L, Masur SK: FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation. *Faseb Journal* 2006, 20(7):1006-+.
- [294]. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, Thomas GJ: Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British journal of cancer* 2004, 90(4):822-832.



- [295]. Routray S, Sunkavali A, Bari KA: Carcinoma-associated fibroblasts, its implication in head and neck squamous cell carcinoma: a mini review. *Oral Dis* 2014, 20(3):246-253.
- [296]. Ono S, Hane M, Kitajima K, Sato C: Novel regulation of fibroblast growth factor 2 (FGF2)-mediated cell growth by polysialic acid. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287(6):3710-3722.
- [297]. Monzavi-Karbassi B, Pashov A, Kieber-Emmons T: Tumor-Associated Glycans and Immune Surveillance. *Vaccines* 2013, 1(2):174-203.
- [298]. Bull C, den Brok MH, Adema GJ: Sweet escape: sialic acids in tumor immune evasion. *Biochimica et biophysica acta* 2014, 1846(1):238-246.
- [299]. Wang Y, Neumann H: Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010, 30(9):3482-3488.
- [300]. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P: Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006, 42(6):717-727.
- [301]. Pollard JW: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2004, 4(1):71-78.

## 8. Životopis

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime Marko Klobučar

Adresa Zatišje 8F, 10 000 Zagreb

Telefon 01 3775 492

Mobilni telefon 099 2075 788

E-mail mklobucar@biotech.uniri.hr

Godina rođenja 1984.

---

### OBRAZOVANJE

Datum stjecanja diplome: travanj 2009.

Mjesto: Zagreb, Hrvatska

Ustanova: Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Sveučilište u Zagrebu

Zvanje: diplomirani inženjer biologije

---

### RADNO ISKUSTVO

- ožujak 2009. – kolovoz 2009. Suradnik na PHARE projektu Natura 2000 ,Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb
- rujan 2009. – lipanj 2010. Stjecanje iskustva u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu, Zavod za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ Zagreb
- listopad/studenj 2010. Suradnik na projektu „Ispitivanje i praćenje kakvoće vode za HE Gojak i HE Lešće 2010.godine“

- lipanj 2011- Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, znanstveni novak/  
asistent

---

## **STRANI JEZICI**

Čitanje Pisanje Govor

Engleski Izvrsno Izvrsno Izvrsno

Njemački Dobro Dobro Dobro

---

## **ZNANJA I VJEŠTINE**

Tehničke sposobnosti Osnove rada na računalu; Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Corel, Internet (pretraživanje podataka, e-mail)

---

## **OSOBNI INTERESI:**

Proteomika, glikoproteomika, spektrometrija masa, biokemija

---

## **Objavljeni radovi u časopisima indeksiranim u bazama podataka Current Contents i SCI Expanded**

1. Benci K, Mandić L, Suhina T, Sedić M, Klobučar M, Kraljević Pavelić S, Pavelić K, Wittine K, Mintas M. Novel coumarin derivatives containing 1,2,4-triazole, 4,5 dicyanoimidazole and purine moieties: synthesis and evaluation of their cytostatic activity. *Molecules*. 2012;17(9):11010-25.
2. Meščić A, Harej A, Klobučar M, Glavač D, Cetina M, Pavelić SK, Raić-Malić S. Discovery of New Acid Ceramidase-Targeted Acyclic 5-Alkynyl and 5-Heteroaryl Uracil Nucleosides. *ACS Med Chem Lett*. 2015, 5;6(11):1150-5.

3. Kraljević Pavelić S, Klobučar M, Sedić M, Micek V, Gehrig P, Grossman J, Pavelić K, Vojniković B. UV-induced retinal proteome changes in the rat model of age-related macular degeneration. *Biochim Biophys Acta* .2015;1852(9):1833-45.
  4. Klobučar M , Sedić M , Gehrig P , Grossmann J , Bilić M , Kovač-Bilić L, Pavelić K, Kraljević Pavelić S. Basement membrane protein laminin-1 and the MIF-CD44- $\beta$ 1 integrin signaling axis are implicated in laryngeal cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1938-54.
- 

#### **Kongresna priopćenja (sažeci) u CC časopisu:**

1. Benci K, Mandić L, Suhina T, Sedić M, Klobučar M, Kraljević Pavelić S, Pavelić K, Wittine K, Mintas M. Novel coumarin derivatives containing 1,2,4-triazole, 4,5 dicyanoimidazole and purine moieties: synthesis and evaluation of their cytostatic activity. // XXII<sup>nd</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC 2012) : abstracts / Ortućzar, Natalia (ur.).Berlin : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. 379-379 (poster,sažetak,znanstveni)
- 

#### **Sažeci u zbornicima skupova:**

1. Mirela Sedić, Sandra Kraljević Pavelić, Marko Klobučar, Peter Gehrig, Paolo Nanni, Lana Kovač Bilić, Mario Bilić, Drago Prgomet, Ralph Schlapbach, Krešimir Pavelić, Jasna Peter-Katalinić. A proteomic approach to unravel molecular alterations underlying laryngeal cancer. FEBS+ 3 Meeting" From molecules to life and back", 2012 (poster,međunarodna recenzija, sažetak,znanstveni)
2. Dina Rešetar, Marko Klobučar, Sandra Kraljević Pavelić, Nicole Engel, Martina Marchetti-Deschmann, Jasna Peter-Katalinić, Mladenka Malenica-Staver, Gunter Allmaier. High throughput analytical platforms for Adriatic-brand food quality and authenticity-Croatian dry-cured ham analysis. Summer Course for

Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine (7; 2013)  
(poster, sažetak, znanstveni)

3. Petra Grbčić, Ivana Tomljanović, Marko Klobučar, Sandra Kraljević Pavelić, Mirela Sedić. Dual inhibition of sphingosine kinase 1/2 enhances antitumor activity of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. // Renaissance Tuscany // Ciocco in Lucca (Barga), Italy; 6.-11.03.2016. Gordon Research Conference Glycolipid and Sphingolipid Homeostasis and Function in Health and Disease. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Anja Harej, Marko Klobučar, Sandra Kraljević Pavelić. Evaluation of antiproliferative effect of 2,6,7-trihydroxy-9-phenyl-3H-xanthene-3-one derivatives in vitro. 12th Central European Oncology Congress, Croatian Society of Oncology's Best of ASCO® Conference; 22-25.06.2015. (poster, sažetak, znanstveni)

---

#### **Boravci u inozemnim istraživačkim laboratorijima**

1. 01.07.-15.08. 2010. Gost istraživač na Sveučilišnoj klinici Eppendorf, Hamburg (Odjel za kliničku kemiju; Laboratorij za masenu spektrometriju).
2. 21.11.-31.12. 2011 Gost istraživač na Sveučilišnoj klinici Eppendorf, Hamburg (Odjel za kliničku kemiju; Laboratorij za masenu spektrometriju).

## 9. Prilozi

### a) Popis tablica:

**Tablica 1.** T klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima.13

**Tablica 2.** N klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima..15

**Tablica 3.** M klasifikacija planocelularnog karcinoma grkljana prema AJCC kriterijima..15

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

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

**Tablica 6.** Kliničke i patološke osobine pacijenata.

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

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

**Tablica 9.** Uvjeti izoelektričnog fokusiranja.

**Tablica 10.** Popis identificiranih proteina s povećanom razinom ekspresije u tumorskim tkivima pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana.

**Tablica 11.** Popis identificiranih proteina s povećanom razinom ekspresije zabilježenom u okolnomu tumorom nezahvaćenom tkivu pacijenata oboljelih od metastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana.

**Tablica 12.** Statistički značajni biološki procesi pri  $p < 0,05$  u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorskim tkivima utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER.

**Tablica 13.** Statistički značajni ( $p < 0,05$ ) razredi diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskim tkivima pacijenata utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER.

**Tablica 14.** Statistički značajni ( $p < 0,05$ ) biološki procesi, u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tumorom nezahvaćenim tkivima, utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER.

**Tablica 15.** Statistički značajni ( $p < 0,05$ ) razredi proteina za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorom nezahvaćenim tkivima pacijenata utvrđeni uz pomoć klasifikacije PANTHER.

**Tablica 16.** T-stupanj i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s nemetastatskom bolesti.

**Tablica 17.** Histološki gradus i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s nemetastatskom bolesti.

**Tablica 18.** IRS vrijednosti za primarne tumore i pripadajuće histološki neizmijenjene epitelne komponente neposredno uz tumorsku masu nemetastatskoga planocelularnog karcinoma grkljana.

**Tablica 19.** T-stupanj i pripadajuća IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.

**Tablica 20.** Histološki gradus i pripadajuća izračunata IRS vrijednost uzoraka sekcija primarnih tumora pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.

**Tablica 21.** IRS vrijednosti uzoraka sekcija primarnih tumora i pripadajuće okolne histološki neizmijenjene epitelne komponente neposredno uz tumorsku masu pacijenata s dijagnosticiranim metastazama u limfnim čvorovima vrata.



## **b) Popis slika:**

**Slika 1.** Sustav hrskavica i membrana grkljana.

**Slika 2.** Podjela planocelularnih karcinoma grkljana s obzirom na njihovu anatomsku lokalizaciju.

**Slika 3.** Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa pri  $p < 0,05$  u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini tumorskih tkiva (analizirana skupina gena) utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER,

**Slika 4.** Grafički prikaz statistički značajnih razreda proteina PANTHER za diferencijalno eksprimirane proteine u tumorskim tkivima.

**Slika 5.** Grafički prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorskim tkivima prema staničnoj lokalizaciji.

**Slika 6.** Grafički prikaz statistički značajnih bioloških procesa u koje su uključeni diferencijalno eksprimirani proteini u tkivima nezahvaćenim tumorom utvrđenih uz pomoć klasifikacije PANTHER.

**Slika 7.** Grafički prikaz statistički značajnih razreda proteina za diferencijalno eksprimirane proteine u tkivima nezahvaćenim tumorom pomoću klasifikacije PANTHER.

**Slika 8.** Grafički prikaz diferencijalno eksprimiranih proteina u tumorom nezahvaćenim tkivima prema staničnoj lokalizaciji.

**Slika 9.** Primjer rezultata analize ekspresije afamina, lumikana, ladinina-1, biglikana, MIF,  $\beta$ 1-integrina, E-kadherina, CD44 i CD14 u tumorskom tkivu četiri pacijenta s metastatskim karcinomom grkljana metodom *Western blot*.

**Slika 10.** Primjer rezultata analize ekspresije  $\beta$ -katenina, p-Nf $\kappa$ B p65, p-Src, vimentina, TUBA4A,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -aktina, RANKL, p-p38 u tumorskom tkivu četiri pacijenta s metastatskim karcinomom grkljana metodom *Western blot*.

**Slika 11.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina stanične membrane lumikana, biglikana i MIF (a) te proteina izoliranih iz uzoraka tumorskih i pripadajućih, tumorom nezahvaćenih tkiva  $\beta$ -integrina, E-kadherina, CD44 i CD14 u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata.

**Slika 12.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina  $\beta$ -katenina, p-NfkB p65, p-Src, vimentina,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -aktina, RANKLA i p-p38 u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg, tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima vrata.

**Slika 13.** Primjer rezultata dvodimenzionalne imunoblot analize lumikana.

**Slika 14.** Primjer rezultata dvodimenzionalne imunoblot analize lumikana.

**Slika 15.** Reprezentativne slike imunohistokemijske analize PSA-NCAM ekspresije u uzorcima sekcija primarnih tumora pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma grkljana.

**Slika 16.** Grafički prikaz IRS vrijednosti izraženih u postotku uzoraka tumorskih tkiva s PSA-NCAM ekspresijom jakog, umjerenog i slabog intenziteta u tumorskom tkivu (T) i okolnoj histološki neizmijenjenoj epitelnoj komponenti neposredno uz tumorsku masu (E) za pacijente s dijagnosticiranim metastazama i bez dijagnosticiranih metastaza .

**Slika 17.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina p-FGFR1, p-Fak, p-c-Raf i Erk $\frac{1}{2}$  četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima i četiri uzorka tumorskog tkiva te pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata s dijagnosticiranim metastazama.

**Slika 18.** Primjer rezultata analize ekspresije proteina Siglek-11 i ST8Sia4 u četiri uzorka tumorskog tkiva i pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata bez dijagnosticiranih metastaza u limfnim čvorovima i četiri uzorka tumorskog tkiva te pripadajućeg tumorom nezahvaćenog tkiva pacijenata s dijagnosticiranim metastazama

**c) Popis kratica:**

AJCC -engl. *The American Joint Committee on Cancer*

BDNF- engl. *BDNF- Brain-derived neurotrophic factor*

CD 14- antigen diferencijacije monocita

CID-kolizijom inducirana disocijacija (engl. *CID- collision-induced dissociation*)

*COPD*- kronična opstruktivna bolest pluća (engl. *COPD - Chronic obstructive pulmonary disease*)

DAB- diaminobenzidin tetrahidroklorid

2-DE- dvodimenzionalna gel elektroforeza (engl. *2-DE Two-dimensional gel electrophoresis*)

DTT- ditiotreitol

EGFR- receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *EGFR – Epidermal growth factor receptor*)

EMT- epitelno-mezenhimalna tranzicija (engl. *EMT- Epithelial–mesenchymal transition*)

Erk ½ – kinaze 1 i 2 regulirane izvanstaničnim signalima (engl. *Erk ½ - Extracellular signal–regulated kinases 1 and 2*)

ESI- elektrosprej ionizacija (engl. *ESI-Electrospray ionisation*)

Fak –fokalna adhezijska kinaza (engl. *Fak- Focal adhesion kinase*);

FDR- pogrešna stopa detekcije (engl. *FDR -False discovery rate*)

FGF- faktor rasta fibroblasta (engl. *FGF- Fibroblast growth factor*)

FGFR1- receptor za faktore rasta fibroblasta 1( engl. *FGFR1- Fibroblast growth factor receptor 1*)

HGFR- receptor za hepatocitni faktor rasta (engl. *HGFR- Hepatocyte growth factor receptor*)

HPLC- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *HPLC - High performance liquid chromatography*)

IAA- iodoacetamid

IPG- imobilizirani pH gradijent (engl. *IPG- Immobilised pH gradient*)

IRS- sustav bodovanja imunoreaktivnosti (engl. *IRS - immunoreactivity scoring system*)

iTRAQ- engl. *iTRAQ- Isobaric tags for relative and absolute quantification*

JAK –STAT- engl. *JAK-STAT- Janus kinase and Signal transducer and activator of transcription signaling pathway*

LC- tekućinska kromatografija (engl. *LC- Liquid chromatography*)

LC-MS- masena spektrometrija spregnuta tekućinskom kromatografijom (engl. *LC-MS - Liquid chromatography – mass spectrometry*)

LSCC- engl. *LSCC – Laryngeal squamous cell carcinoma*

LTQ- linearna ionska stupica (engl. *LTQ- Linear trap quadropole*)

MALDI- matriksom pomognuta laser desorpcija/ionizacija (engl. *MALDI- matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MAPK (MAPK/Erk) - engl. *MAPK - Mitogen-activated protein kinase pathway*

MIF – faktor inhibicije migracije makrofaga (engl. *MIF-Macrophage migration inhibitory factor*)

MMP- matriksmetaloproteinaza (engl. *MMP- Matrix metalloproteinase*)

MS-spektrometrija masa (engl. *MS - Mass spectrometry*)

MS/MS- *tandemska spektrometrija masa* (engl. *MS/MS- Tandem mass spectrometry*)

NCAM - adhezijska molekula neuralnih stanica (engl. *NCAM -Neural cell adhesion molecule*)

nLC- nano-tekućinska kromatografija

NfkB - nuklearni faktora kapa B (engl. *NfkB- Nuclear factor kappa B*)

p-fosforilirani oblik proteina

PANTHER- engl. *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*

PDGF- engl. *PDGF- platelet derived growth factor*

PI3K (PI3K/Akt) - engl. *PI3K- Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase pathway*

PSA- polisijalinska kiselina (engl. *PSA-Polysialic acid*)

PSA-NCAM - polisijalizirani oblika adhezijske molekule neuralnih stanica (engl. *PSA-NCAM Polysialylated neural cell adhesion molecule*)

PVDF- polivinidilenflourid

RANKL- engl. *RANKL-Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*

RT- radioterapija

S- serin

Ser-serin

SDS- natrij dodecil sulfat (engl. *SDS- Sodium dodecyl sulfate*)

SDS PAGE- natrij dodecil sulfat denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *SDS PAGE- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SI- intenzitet bojanja (engl. *SI- Staining intensity*)

SPT- Sekundarni primarni tumor (engl. *SPT-Secondary primary tumor*)

ST8Sia II - polisijalotransferaza II

ST8Sia IV- polisijalotransferaza IV

TLR- engl. *Toll like receptor*

TFA- tri-flourooctena kiselina

TGF $\alpha$ - transformirajući faktor rasta alfa (engl. *TGF $\alpha$  - Transforming growth factor  $\alpha$* )

TGF- $\beta$  1- transformirajući faktor rasta beta 1 (engl. *TGF $\beta$ 1- Transforming growth factor beta 1*)

Thr-treonin

TNF alfa- engl. *Tumor necrosis factor alpha*

TOF - engl. *Time of flight*

TrkB- neurotropinski receptor B (engl. *TrkB- Tropomyosin receptor kinase B*)

TUBA4A - alfa 4A lanac tubulina

Tyr- tirozin

UICC- engl. *Union for International Cancer Control*

VEGF- endotelni faktor rasta (engl. *VEGF – Vascular endothelial growth factor*)

Y- tirozin