SVEUČILIŠTE U RIJECI FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Iris Car Kubaska

KARAKTERIZACIJA PROTEOMA I SEKRETOMA VEMURAFENIB-REZISTENTNIH STANICA RAKA DEBELOG CRIJEVA S BRAFV600E MUTACIJOM POMOĆU KOMPLEMENTARNIH METODA TEMELJENIH NA SPEKTROMETRIJI MASA

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Iris Car Kubaska

KARAKTERIZACIJA PROTEOMA I SEKRETOMA VEMURAFENIB-REZISTENTNIH STANICA RAKA DEBELOG CRIJEVA S BRAFV600E MUTACIJOM POMOĆU KOMPLEMENTARNIH METODA TEMELJENIH NA SPEKTROMETRIJI MASA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Mirela Sedić Komentor: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT

Iris Car Kubaska

THE PROTEOME AND SECRETOME CHARACTERISATION OF VEMURAFENIB-RESISTANT COLON CANCER CELLS HARBOURING BRAFV600E MUTATION USING COMPLEMENTARY MASS SPECTROMETRY-BASED APPROACHES

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2025.

Mentor rada: dr. sc. Mirela Sedić

Komentor rada: prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2025. godine na Fakultetu biotehnologije i razvoja lijekova Sveučilišta u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

- 1. XXXX
- 2. XXXX
- 3. XXXX

Zahvala

- Istraživanja provedena u okviru ove doktorske disertacije financirana su sljedećim projektima: HRZZ 2018-01 3900 "Rasvjetljavanje mehanizama rezistencije na terapiju raka debelog crijeva s mutacijom BRAF pomoću integriranog -omics pristupa" (voditeljica projekta M. Sedić); uniri-biomed-18-76 1209 (projekt Sveučilišta u Rijeci) "Molekularne karakteristike povezane s BRAFV600E mutacijom u odnosu na divlji tip BRAF kolorektalnog karcinoma" (voditeljica projekta M. Sedić); EPIC-XS -FGCZ-1009 "Combined proteomic approach to elucidate the mechanisms underlying acquired resistance to vemurafenib in BRAFV600E–mutant colon cancer cells" EPIC-XS, grant agreement ID 823839 funded by the Horizon 2020 programme of the European Union, projekt u suradnji s Functional Genomics Center Zurich (voditeljica projekta M. Sedić).
- U istraživanjima u sklopu ove doktorske disertacije korištena je oprema i infrastruktura Centra za primijenjenu bioantropologiju Instituta za antropologiju u Zagrebu koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj, projekt KK.01.1.1.02.0002 pod nazivom Centar za primijenjenu bioantropologiju.

Sažetak

Rak debelog crijeva treći je najučestalije dijagnosticiranih tip raka te drugi najčešći uzrok smrti u razvijenim zemljama. To je heterogena bolest koju karakteriziraju različite epigenetske i genetske promjene. Svega 15 % dijagnosticiranih slučajeva raka debelog crijeva će nositi mutaciju BRAFV600E koja se povezuje nižom stopom preživljenja i sa slabijim odgovorom na kemoterapiju. S ciljem poboljšanja terapije razvijen je vemurafenib, malomolekulski specifični inhibitor BRAFV600E mutiranog proteina. Njegov je učinak bio značajan u bolesnika s BRAFV600E mutiranim melanomom međutim, kod bolesnika s BRAFV600E mutiranim rakom debelom crijeva je učinak bio minimalan te praćen s razvojem rezistencije. Najčešći mehanizam razvoja rezistencije je kroz reaktivaciju signalizacije putem EGFR-a unutar MAPK signalnog puta što za svoju posljedicu ima preživljenje raka. Rezistentne stanice izlučuju različite molekule u svoj okoliš te cjelokupni izlučeni biomaterijal naziva sekretomom. Literaturno je opisano da sadržaj sekretoma može utjecati na okolno tkivo pripremajući ga nastanak metastaza. Na temelju navedenoga, potrebno je istražiti unutar- i izvanstanični proteinski sadržaj stanica raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E s ciljem boljeg razumijevanja razvoja rezistencije te pronalaska novih terapijskih strategija.

U ovoj doktorskoj disertaciji su istražene razlike proteoma i sekretoma parentalnih, vemurafenib-osjetljivih stanica s vemurafenib-rezistentnim stanicama BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva. Analize proteinskog sadržaja su provedene korištenjem dviju komplementarnih metoda masene spektrometrije: robusnija dvodimenzionalna gel elektroforeza spregnuta s MALDI-TOF masenom spektrometrijom i osjetljivija tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom. Bioinformatička analiza sekretoma je pokazala da su procesi povezani s regulacijom DNA replikacije i homeostazom endoplazmatskog retikuluma, poglavito odgovorom na pogrešno smotane proteine, prisutniji kod vemurafenib-rezistentnih stanica u odnosu na vemurafenib-osjetljive stanice. Nadalje, *in silico* analize ekspresije odabranih proteinskih meta u tumorskom tkivu su pokazale da su proteini RPA1 i HSP70 povezani s BRAFV600E mutiranim rakom što može upućivati na njihovu ulogu u tom specifičnom podtipu raka. Bioinformatička analiza proteoma vemurafenib-osjetljivih i -rezistentnih stanica je identificirala ezrin, protein aktinskog citoskeleta, kao potencijalnu metu u savladavanju rezistencije. Inhibicija ezrina specifičnim inhibitorom uz istovremenu inhibiciju vemurafenibom je iskazala pro-apoptotski i anti-proliferativni učinak kroz sniženu ekspresiju proteina CD44 i sniženu AKT-c-Myc signalizaciju. Inhibicija ezrina i BRAFV600E proteina je provedena i u vemurafenib-rezistentnim stanicama melanoma gdje je također viđen isti učinak.

Zaključno, rezultati ove doktorske disertacije na razini staničnog sekretoma i proteoma upućuju proteinske mete kao što su RPA1, HSP70 i ezrin kao potencijalno uključene u razvoj rezistencije na vemurafenib u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva te bi mogli poslužiti kao moguće buduće terapijske mete.

Ključne riječi: rak debelog crijeva, BRAFV600E mutacija, vemurafenib, rezistencija, sekretom, masena spektrometrija.

Summary

Colon cancer is the third most frequently diagnosed type of cancer and the second most common cause of death in developed countries. It is a heterogeneous disease characterized by various epigenetic and genetic changes. Only 15% of diagnosed colon cancer cases will carry the BRAFV600E mutation, which is associated with a lower survival rate and poorer response to chemotherapy. With the aim of improving therapy, vemurafenib, a small molecule specific inhibitor of BRAFV600E mutated protein, was developed. Its effect was significant in patients with BRAFV600E mutated melanoma, however, in patients with BRAFV600E mutated colon cancer, the effect was minimal and accompanied by the development of resistance. The most common mechanism of resistance development is through the reactivation of EGFR signaling within the MAPK signaling pathway, which results in cancer survival. Resistant cells secrete various molecules into their environment, and the entire secreted biomaterial is called the secretome. It has been described in the literature that the content of the secretome can affect the surrounding tissue, preparing it for the formation of metastases. Based on the above, it is necessary to investigate the intra- and extracellular protein content of colon cancer cells with BRAFV600E mutation with the aim of better understanding the development of resistance and finding new therapeutic strategies.

In this doctoral dissertation, the differences between the proteome and secretome of parental, vemurafenib-sensitive cells and vemurafenib-resistant cells of BRAFV600E mutated colon cancer were investigated. Protein content analyzes were performed using two complementary mass spectrometry methods: more robust two-dimensional gel electrophoresis coupled with MALDI-TOF mass spectrometry and more sensitive liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Bioinformatics analysis of the secretome showed that processes related to the regulation of DNA replication and homeostasis of the endoplasmic reticulum, especially the response to misfolded proteins, are more present in vemurafenibresistant cells compared to vemurafenib-sensitive cells. Furthermore, in silico analyzes of the expression of selected protein targets in tumor tissue showed that RPA1 and HSP70 proteins are associated with BRAFV600E mutated cancer, which may indicate their role in that specific subtype of cancer. Bioinformatic analysis of the proteome of vemurafenib-sensitive and -resistant cells identified ezrin, a protein of the actin cytoskeleton, as a potential target in overcoming resistance. Inhibition of ezrin by a specific inhibitor with simultaneous inhibition by vemurafenib showed a pro-apoptotic and anti-proliferative effect through decreased CD44 protein expression and decreased AKT-c-Myc signaling. The inhibition of ezrin and

BRAFV600E protein was also performed in vemurafenib-resistant melanoma cells where the same effect was also observed.

In conclusion, the results of this doctoral dissertation at the level of cellular secretome and proteome indicate protein targets such as RPA1, HSP70 and ezrin as potentially involved in the development of resistance to vemurafenib in BRAFV600E mutated colon cancer and could serve as possible future therapeutic targets.

Key words: colon cancer, BRAFV600E mutation, vemurafenib, resistance, secretome, mass spectrometry.

Sadržaj

1	Uv	Uvod1					
	1.1	Ral	k debelog crijeva	1			
	1.1	.1	Razvoj raka debelog crijeva	1			
	1.2	Mu	tacija BRAFV600E	3			
	1.2.1		BRAFV600E mutirani protein	3			
	1.2 rak	2.2 ka del	Klinička, patološka i molekularna obilježja BRAFV600E-mutirano belog crijeva	g 6			
	1.2 mu	2.3 Itacijo	Molekularni podtipovi tumora debelog crijeva s BRAFV600 om	E 7			
1.2.4 Ken mutacijom			Kemoterapija i razvoj rezistencije u raku debelog crijeva s BRAFV600 om	E 9			
	1.3	Seł	<retom1< td=""><td>5</td></retom1<>	5			
	1.3	8.1	Uloga sekretoma1	5			
	1.3	8.2	Načini izlučivanja biomolekula1	5			
	1.3	8.3	Uloga sekretoma u rezistenciji raka2	0			
	1.4 meta	oraba metoda masene spektrometrije za pronalazak novih proteinski ega2	h 2				
	1.4.1		Uporaba metoda masene spektrometrije u istraživanju proteoma 2	2			
	1.4	1.2	Uporaba metoda masene spektrometrije u istraživanju sekretoma 2	3			
2	Hip	ootez	e i ciljevi rada2	5			
3	Ma	terija	ıli i metode 2	6			
	3.1	Sta	nični modeli2	6			

	3.2	Raz 26	zvoj vemurafenib-rezistentne RKO stanične linije raka debelog c	rijeva			
	3.3	Prik	upljanje kondicioniranog medija za analizu sekretoma	27			
	3.4 sekre	Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) i analiza slika gelova staničnog etoma					
3.5 Dvodi proteoma			odimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) i analiza slika gelova stan	ičnog 28			
	3.6	Ana	liza MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom	29			
3.7 Analiza uzoraka staničnog sekretoma i proteoma pomoću kromatografije spregnutom masenim spektrometrom (LC-MS/MS)				inske 30			
	3.7	.1	Priprema uzoraka staničnog sekretoma za LC-MS/MS analizu	30			
3.7		.2	Priprema uzoraka staničnog proteoma za LC-MS/MS analizu	30			
	3.7	.3	Prikupljanje LC-MS/MS podataka staničnog sekretoma	31			
	3.7	.4	Prikupljanje LC-MS/MS podataka staničnog proteoma	31			
	3.7	.5	Analiza podataka LC-MS/MS	32			
	3.8	Bioi	nformatička analiza staničnog sekretoma	33			
	3.9	Bioi	nformatička analiza staničnog proteoma	34			
	3.9	.1	Rekonstrukcija i analiza mreže pomoću STRING-a	34			
	3.9	.2	Rekonstrukcija i analiza mreža pomoću platforme Cytoscape	35			
	3.10	Tes	t vijabilnosti stanica	36			
	3.11	We	stern Blot analiza	36			
	3.12	Kva	ntitativni PCR u stvarnom vremenu	37			
	3.13	Det	ekcija apoptoze korištenjem Annexin V FITC testa	38			
4	Rez	zultat	i	39			

. . .

4.2.2 Povećana ekspresija ezrina povezana je s fenotipom otpornim na vemurafenib u BRAFV600E-mutiranim RKO stanicama raka debelog crijeva 77

5.2 Karakteristične promjene na razini staničnog proteoma u BRAFV600Emutiranim stanicama raka debelog crijeva koje su rezistentne na vemurafenib 98

6	Zaključak	101
7	Popis literature	102
8	Popis slika	124
9	Popis tablica	127
10	Prilozi	128
11	Životopis	158

1 Uvod

1.1 Rak debelog crijeva

Podatci Svjetske zdravstvene organizacije pokazuju da je rak debelog crijeva treći najčešće dijagnosticirani tip raka u razvijenim zemljama te drugi najčešći uzrok smrti među malignim oboljenjima (1–3). Prateći svjetski trend, podatci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) također ukazuju da je rak debelog crijeva prema stopi mortaliteta na drugom mjestu, uz zabrinjavajući trend porasta za jedan posto godišnje (4). Unatoč dostupnim preventivnim programima usmjerenim na probir i rano otkrivanje raka debelog crijeva (5), ovaj je tip raka među najučestalijima u Hrvatskoj te prema podatcima HZJZ-a od njega prosječno oboli gotovo 3.400 ljudi godišnje (6,7).

1.1.1 Razvoj raka debelog crijeva

Veći broj slučajeva raka debelog crijeva, njih 80 %, sporadične je prirode, a nastaje kao rezultat okolišnih čimbenika i životnog stila kao što su sjedilački način života, pretjerana konzumacija alkohola, nekvalitetna prehrana, pretilost i pušenje. Faktori koji također utječu na razvoj raka debelog crijeva su crijevna disbioza, oksidativni stres i kronična upala (8,9). Preostali, manji broj slučajeva uzrokovan je nasljednim genetskim promjenama među koje se ubraja nasljedni nepolipozni rak debelog crijeva ili Lynchov sindrom i obiteljska adenomatozna polipoza (10).

1.1.1.1 Genetske i epigenetske promjene u razvoju raka debelog crijeva

Razvoj raka debelog crijeva započinje akumulacijom postupnih promjena u genetskom materijalu koje stanica mehanizmima popravka DNA ne uspije ukloniti (9). Posljedično, one uzrokuju mutacije u genima odgovornim za rast i diobu stanice te se razvijaju benigne novotvorine, poznatije kao benigni polipi, koje s vremenom postaju maligne (11).

Na genetskoj i epigenetskoj razini mehanizmi koji prate i potiču razvoj raka debelog crijeva su kromosomska nestabilnost, mikrosatelitska nestabilnost (MSI, engl. *microsatellite instability*) i fenotip metiliranih CpG otoka (9,12). Kromosomska nestabilnost uzrokuje promjene strukture i broja kopija kromosoma (insercije, delecije) koje rezultiraju promijenjenim kariotipom. Najčešće pogađaju tumor-supresorske gene čija inaktivacija pogoduje daljnjem malignom razvoju (9). MSI posljedica je mutacija u genima *MLH1, MSH2, MSH6* i *PMS2* koji čine sustav za popravak pogrešno sparenih baza u DNA (engl. *mismatch repair genes*, MMR) (9,13). Mikrosateliti su kratki segmenti DNA, najčešće dužine dva do šest nukleotida, koji se mogu nalaziti u egzonskim i intronskim dijelovima gena. Zbog svoje brojnosti u genomu, ta su područja podložnija greškama u replikaciji, stoga uzrokuju MSI (14).

Na epigenetskoj razini promjene se očituju kao pojava metiliranih CpG otoka (CIMP, engl., *CpG island methylator phenotype*). DNA metilacija utječe na gene uključene u širok spektar bioloških funkcija (popravak DNA, apoptoza), a uzrokuje utišavanje transkripcije. Najizraženiji je učinak unutar promotorskih regija tumor-supresorskih gena i gena MMR sustava (15). Posebice je važno transkripcijsko utišavanje gena *MLH1* zbog toga što dovodi do razvoja fenotipa MSI (16), događaja koji se smatra ključnim okidačem malignih procesa u razvoju raka debelog crijeva (17).

1.1.1.2 Histološke promjene u razvoju raka debelog crijeva

Ne uzimajući u obzir nasljedni tip raka debelog crijeva, literaturno su opisana dva načina razvoja sporadičnog oblika raka, konvencionalni put razvoja i nazubljeni put razvoja (12). Osnovu za razvoj raka čini nastanak polipa, protruzija sluznice debelog crijeva (11). Prateći sekvenciju adenom-karcinom, polipi akumuliraju genetske i epigenetske promjene te ulaze u stadij karcinoma (18). Literaturno je prihvaćena klasifikacija polipa u tri kategorije: hiperplastični polipi, koji uključuju hiperplastične polipe vrčastih stanica i mikrovezikularne hiperplastične polipe (MVHP); sesilne nazubljene lezije i tradicionalne nazubljene adenome (19).

Konvencionalni put razvoja slijedi velika većina sporadičnih slučajeva (80 %) te je taj put usko povezan s kromosomskom nestabilnosti. Na genskoj razini karakteriziraju ga mutacije gena APC, SMAD4 i TP53 u tubularnom adenomu, kao i mutacija gena KRAS u tubuloviloznom adenomu (12). Prisutna je i pojačana aktivacija WNT signalnog puta (19). Histološki, navedene mutacije su češće prisutne u hiperplastičnim polipima vrčastih stanica i tradicionalnim nazubljenim adenomima. Hiperplastični polipi vrčastih stanica karakterizirani su izduljenim kriptama koje u pravilu nisu nazubljene, mogu se naći u blizini tradicionalnih nazubljenih adenoma, a 40-50 % polipa sadrži mutirani KRAS gen (12). Tradicionalni nazubljeni adenom čini 5 % svih nazubljenih adenoma. Histološki imaju oblik izduljenih, viloznih polipa, a nazubljenost se očituje kao tanki prorez (19). Većina (50-70 %) tradicionalnih nazubljenih adenoma ima mutirani KRAS gen te su češći na lijevoj strani debelog crijeva. Imaju niži CIMP status, mikrosatelitno su stabilni (MSS, engl. microsatellite stability), iskazuju višu razinu displazije koju prate aktivacija WNT signalnog puta i mutacije u TP53 genu. Manji broj (20-40 %) tradicionalnih nazubljenih adenoma ima mutaciju gena BRAF uz prethodno navedene genetske i epigenetske promjene (12).

Nazubljeni put slijedi manji broj (20-30 %) sporadičnih slučajeva raka debelog crijeva i usko je vezan za CIMP, MSI, a grana se u dva smjera ovisno o prisutnim prekursorskim lezijama i mutacijskom statusu gena *BRAF* i *KRAS*. Lezije koje vode u ovaj put razvoja dijele se na MVHP i sesilne nazubljene lezije. MVHP imaju oblik kripti nalik na lijevak s vidljivim nazubljenjima u gornjoj polovici (19), dok sesilne

nazubljene lezije imaju oblik blago povišenih mukoznih područja s nazubljenjima koje sežu do baznih dijelova kripti. Akumulacijom promjena, sesilne nazubljene lezije mijenjanju svoj izgled prema displastičnom s gušćim rasporedom izduljenih i razgranatijih kripti, dosežući malignu transformaciju. Većina slučajeva raka debelog crijeva razvija se putem sesilnih nazubljenih lezija (18). One čine četvrtinu svih nazubljenih lezija malignog potencijala, a ostatak čine benigne nazubljene lezije. Molekularna obilježja MVHP i sesilnih nazubljenih lezija djelomično se preklapaju pa obje lezije mogu imati viši CIMP status uz mutirani BRAF gen (12). Sesilne nazubljene lezije dodatno karakterizira divlji tip KRAS gena i pojačana aktivacija WNT signalnog puta koju se uz mutirani BRAF smatra ključnom u ovom putu razvoja raka (19,20). Literaturno je opisano da mutirani BRAF fosforilira proteine povezane s pojačanom DNA metilacijom, što potencijalno objašnjava viši CIMP status uočen u bolesnika s BRAF mutiranim rakom debelog crijeva (21,22). Sličnu karakterizaciju visokog CIMP statusa s MSI iskazuje i nasljedni Lynchov sindrom. Međutim, za taj je sindrom prisutnost BRAF mutacija isključujući faktor (23), stoga se može smatrati da se rak debelog crijeva s BRAF mutacijom razvio kroz nazubljeni put (19).

1.2 Mutacija BRAFV600E

1.2.1 BRAFV600E mutirani protein

Obitelj RAF proteina čine tri serin/treonin kinaze, ARAF, BRAF i CRAF (poznat i kao RAF1), među kojima je v-raf virusni onkogen mišjeg sarkoma homolog B, poznatiji kao BRAF protein, najpotentnija kinaza (24,25). *BRAF* gen lociran je na kromosomu 7 (7q34) te kodira citoplazmatsku serin/treonin kinazu.

Član je signalnog puta MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*), kojeg čine proteinske kinaze RAS/RAF/MEK/ERK. Sadrži tri očuvane regije (engl. *conserved region*, CR) prikazane na slici 1. niže: CR1 i CR2 na N-terminalnom kraju te CR3 na C-terminalnom kraju. CR1 sadrži RAS-GTP vezujuću domenu, CR2 je serinima i treoninima obogaćena vezna domena, a CR3 je serin/treonin katalitička domena (9,13).



Slika 1. Prikaz domena BRAF proteina. BRAF protein u svojoj strukturi sadrži tri očuvane regije (engl. *conserved regions*, CR), RAS-vezujuću domenu CR1, regulatornu domenu CR2 te kinaznu domenu CR3. Unutar kinazne domene nalazi se mutacija BRAFV600E.

Signalizacija MAPK signalnim putem kaskadnog je tipa (slika 2.), započinje interakcijom liganda epidermalnog faktora rasta (EGF, engl. epidermal growth factor) s receptorom epidermalnog faktora rasta (EGFR, engl. epidermal growth factor receptor) pri čemu dolazi do njegove aktivacije. Aktiviran EGFR uz pomoć adaptornih proteina protein 2 vezan za receptor faktora rasta (GRB2, engl. growthfactor-receptor bound protein 2) i son of sevenless (SOS, nema prijevod na hrvatski) aktivira kinazu virusnog štakorskog sarkoma s vezanim gvanozin-trifosfatom (RAS-GTP, engl. rat sarcoma virus – guanosine triphosphate) (26). Vezana za membranu, kinaza RAS-GTP stupa u interakciju s citosolnom i inaktivnom kinazom BRAF, a nastali se kompleks usmjerava prema staničnoj membrani. RAS-GTP protein se vezuje za RAS-vezujuću domenu u sklopu N-terminalne regije pri čemu dolazi do fosforiliranja aktivacijske petlje i otpuštanja autoinhibitorne interakcije između domena CR1 i CR3 (27). Autoinhibicija BRAF proteina služi kao mehanizam regulacije kinazne aktivnosti. Promjenom konformacije i oslobađanjem CR3 kinazne domene, BRAF protein sada može stvarati homo- ili heterodimere s članovima RAF obitelji proteina. CR3 kinazna domena sadrži dva dijela, N-terminalnu petlju za vezanje fosfata zvanu P-petlja (engl. Phosphate-binding loop, P-loop) i C-terminalni dio koji vezuje proteinski supstrat kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom 1/2 (ERK, engl. extracellular signal-regulated kinase 1/2) i MAPK/ERK kinazu 1/2 (MEK, engl. MAPK/ERK kinase 1/2 ili mitogen-activated protein kinase kinase) (13). Na kraju kaskade, kinaze MEK1/2 fosforiliraju kinaze ERK1/2 pri čemu se stimuliraju transkripcijski faktori c-MYC, c-FOS, c-JUN (28) uključeni u procese diferencijacije, proliferacije, preživljenja ili apoptoze (13). U normalnim fiziološkim uvjetima aktivirane kinaze ERK1/2 negativnom povratnom spregom reguliraju aktivaciju receptorskih tirozin kinaza, najčešće EGFR, i snižavaju aktivnost RAS proteina. Precizna regulacija MAPK i drugih signalnih putova ključna je u održavanju normalnog fiziološkog stanja organizma (29,30). Perturbacije u signalizaciji

uzrokovane mutacijom proteina mogu dovesti do razvoja različitih patoloških stanja (31).



Slika 2. Prikaz signalnog puta MAPK.

lako ostale izoforme RAF proteina sudjeluju u istim fiziološki važnim procesima, BRAF izoforma je najčešće mutirana, a točan razlog za to još nije dovoljno istražen. Mutacije BRAF proteina moguće je svrstati u tri klase prema ovisnosti o RAS proteinu, kinaznoj aktivnosti i statusu dimerizacije (32). Prva klasa uključuje BRAF mutacije koje su RAS-neovisne, uzrokuju jaku kinaznu aktivnost i djeluju kao monomeri, a predstavnici su mutacije BRAFV600E i BRAV600K. Drugu klasu čine RAS-neovisni dimeri slabije kinazne aktivnosti te se tu ubrajaju BRAFG469A i BRAFK601E. Treću klasu čine RAS-ovisni dimeri najslabije kinazne aktivnosti, a predstavnici su BRAFD594G i BRAFD594N (24,32).

Mutacija BRAFV600E čini preko polovice identificiranih BRAF mutacija (> 55 %) i najčešća je (> 90 %) mutacija unutar prve klase (33,34). Bolesnici s mutacijom BRAFV600E čine između 10-15 % dijagnosticiranih slučajeva metastatskog raka debelog crijeva te imaju lošiju prognozu u odnosu na bolesnike s divljim tipom BRAF (24). Mutacija BRAFV600E nastaje kao posljedica transverzije nukleobaze timina s adeninom na poziciji 1799 (T1799A) unutar kinazne domene proteina (slika 1.) (27) u egzonu 15 zbog čega u sintezi proteina dolazi do zamjene aminokiseline valin za glutaminsku kiselinu na kodonu 600 (V600E) unutar aktivacijske petlje kinazne domene (35). Valin je nepolarna aminokiselina te ona stvara hidrofobne interakcije između P-petlje i aktivacijske petlje koje divlji tip BRAF proteina održavaju inaktivnim. Zamjena valina za negativno nabijenu glutaminsku kiselinu elektrostatski oponaša naboj fosfata (27), a posljedica promjene jest nastanak konstitutivno aktivne kinaze BRAFV600E (13) koja je 500 puta aktivnija od divljeg tipa BRAF proteina (36).

1.2.2 Klinička, patološka i molekularna obilježja BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva

Ranije opisane genetske i epigenetske promjene utječu na malignu progresiju BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva, osobito putem nazubljenog puta razvoja raka (37). Izražena povezanost između CIMP fenotipa i BRAFV600E mutacije literaturno je dokumentirana (38,39). Mutirana kinaza BRAFV600E kroz MAPK signalni put potiče fosforilaciju transkripcijskog represora MAFG te on uzrokuje transkripcijsko utišavanje gena *MLH1* pogodujući CIMP fenotipu (12).

Utišavanje tumor-supresorskih gena i gena MMR sustava, poglavito MLH1, metilacijom promotorskih regija doprinosi razvoju MSI (40). Karakteristično za tumore s izraženim MSI, utišani sustav MMR gena doprinosi većem opterećenju tumora mutacijama zbog nedostatnog popravljanja grešaka nastalih u replikaciji (41). Translacija mutiranih proteina rezultira ekspresijom tumorskih neoantigena (42) koji pojačavaju imunogeničnost BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva što dovodi do veće infiltracije tumorskog mikrookruženja limfocitima (13,43). Rak debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom pokazuje sličnosti s MSI rakom debelog crijeva te se ta klinička i patološka obilježja većinom manifestiraju kod žena starije dobi kao desnostrana lezija, mucinozne i slabije diferencirane histologije s višom razinom tumor-infiltrirajućih limfocita (TIL, engl. tumor-infiltrating lymphocyte). Češće je detektiran u uznapredovanom stadiju s metastazama u limfnim čvorovima i peritoneumu (12), dok su plućne metastaze rjeđe zabilježene (24). Prisutnost MSI u BRAFV600E-mutiranom raku debelog crijeva povezuje se s povoljnijom prognozom u usporedbi s bolesnicima koji iskazuju mikrosatelitnu stabilnost (MSS) i BRAFV600E-mutirani metastatski rak debelog crijeva (44,45).

Tradicionalno se smatralo da su KRAS i BRAF mutacije međusobno isključive kada se analiziraju metodama sekvenciranja standardne osjetljivosti. Međutim, sada je potvrđeno da je istodobna prisutnost BRAFV600E i KRAS mutacija u raku debelog crijeva moguća, iako rijetka, te je povezana s agresivnijom bolešću (46–50). Nedavna studija pokazala je da niskofrekventne KRAS mutacije koegzistiraju s

BRAFV600E mutacijom u tumorskim tkivima bolesnika s rakom debelog crijeva (51). Ovi rijetki subklonovi mogu biti prisutni, ali mogu imati slabiji rast u usporedbi s klonovima koji nose samo mutirani BRAF. Međutim, selektivni pritisak terapije usmjerene na BRAF može poboljšati proliferacijski potencijal dvostruko mutiranih klonova, dok istovremeno smanjuje vijabilnost stanica koje nose samo mutirani BRAF, što dovodi do dominacije dvostruko mutiranih klonova rezistentnih na terapiju. Doista, analiza biopsija tumora bolesnika s BRAFV600E-mutiranim rakom debelog crijeva, prikupljenih prije početka terapije usmjerene na BRAF otkrila je da više od 50 % ima KRAS mutacije niske učestalosti (51).

1.2.3 Molekularni podtipovi tumora debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom

U dosadašnjoj literaturi opisane su različite molekularne podjele BRAFV600E mutacije i raka debelog crijeva s ciljem da sistematizacija heterogenosti ovog tipa raka olakša postavljanje dijagnoze kao i publiciranje rezultata.

Analizom razlika u ekspresiji gena opisana je klasifikacija molekularnih podtipova BRAFV600E mutacije (BM) u dva podtipa, BM1 i BM2 (52).

Trećina bolesnika s BRAFV600E mutiranim rakom debelog crijeva spada u BM1 podtip. Karakterizira ga pojačana aktivacija gena povezanih s imunološkim odgovorom (infiltracija makrofaga, aktivacija putova TNF-α/NF-κB, IL-2/STAT5 i IL6/JAK/STAT3), angiogenezom, apoptozom i epitelno-mezenhimalnom tranzicijom. Uz navedeno, eksperimentalno je pokazana pojačana aktivacija KRAS/AKT puta i deregulacija mTOR/4EBP1 signalnog puta (53). Nasuprot tome, preostale dvije trećine bolesnika spadaju u podtip BM2. Karakterizira ga različita aktivacija gena povezanih s metaboličkim procesima (glikoliza), deregulacija gena staničnog ciklusa i kontrolnih točaka staničnog ciklusa (niže razine ciklina-D1, više razine ciklin ovisne kinaze 1 (CDK1, engl. *cyclin-dependent kinase 1*)). Kod nijednog podtipa nije primijećena značajna razlika u aktivaciji EGFR proteina (13,52). Bolesnici s BM1 podtipom češće imaju lošiju prognozu u odnosu na one s BM2 podtipom (24,53). Međutim, treba uzeti u obzir da je BM klasifikacija neovisna o CIMP i MSI statusu, faktorima koji značajno utječu na razvoj ove bolesti (13).

Analizom podataka dobivenih transkriptomskim analizama šest različitih studija, članovi Konzorcija za tipiziranje raka debelog crijeva (CRCSC, engl. *the Colorectal Cancer Subtyping Consortium*) predložili su četiri molekularna podtipa raka debelog crijeva i njihovu zastupljenost: CMS1 (14 %) (CMS, engl. *consensus molecular subtype*) – MSI, imunološki; CMS2 (37 %) – kanonski; CMS3 (13 %) – metabolički; CMS4 (23 %) – mezenhimalni (54).

Podtip CMS1 temeljno karakterizira snažna aktivacija imunološkog sustava te MSI fenotip (12). Analize su pokazale da tumori ovog podtipa imaju jaču translaciju proteina uključenih u popravak DNA zbog defektnog sustava MMR gena te visok CIMP status što je konzistentno MSI fenotipu (55). Pored toga, ovaj podtip iskazuje i visok CIMP status (54). Nadalje, Thanki i suradnici navode da se prekursorske lezije ovog podtipa razvijaju nazubljenim putem karcinogeneze uz slabiju signalizaciju transformirajućeg faktora rasta β (TGF- β , engl. *transforming growth factor* β) (56). Uz CMS1 vežu se i mutacije BRAFV600E proteina i aktivacija signalnih putova MAPK, receptora tirozin kinaze (RTK, engl. receptor tyrosine kinases) i Janus kinaze - prijenosnika signala i aktivatora transkripcije (JAK-STAT, engl. Janus kinase -Signal Transducer and Activator of Transcription) (12). Analiza ekspresije gena pokazala je da CMS1 ima pojačanu ekspresiju gena povezanih s imunološkim odgovorom i infiltratom T-limfocita (57) te pojačanu aktivaciju signalnih putova uključenih u izbjegavanje imunološkog odgovora (58). Drugi u nizu, CMS2, još se naziva kanonskim podtipom jer prati konvencionalni put karcinogeneze (56), a obilježava ga signalizacija putem MYC i WNT-β signalnih putova (12). CMS2 karakterizira povećana kromosomska nestabilnost popraćena gubitkom tumorsupresorskih gena te dobitkom kopija onkogena (54). Analizom genske ekspresije pokazana je povišena regulacija nizvodnih meta WNT i MYC te povišena ekspresija eritroblastičnog onkogena B-2/humani receptor epidermalnog faktora rasta 2 (ERBB2/HER2, engl. erythroblastic oncogene B-2/human epidermal growth factor receptor 2), inzulinu sličnog faktora rasta 2 (IGF-2 engl. insulin-like growth factor 2) i ciklina (59). Također, ovi tumori imaju mutirani gen TP53 (56). Podtip CMS3 obilježava metaboličko reprogramiranje i deregulirani putovi s povećanom aktivnosti glutaminolize i lipidogeneze te deregulacija epitelnih procesa (56). Ovaj podtip također pokazuje kromosomsku nestabilnost, ali ima niži CIMP status. Uz ovaj podtip veže se mutacija gena KRAS te, kao i CMS1, ima pojačanu aktivnost putova MAPK i RTK (54). Analizom obogaćivanja genskog seta pokazano je da ovaj podtip prate metaboličke promjene, kao što je metabolizam lipida, povezane s KRAS aktivirajućom mutacijom (60). Posljednji, mezenhimalni, podtip CMS4 prati pojačana aktivacija TGF-β signalizacije, angiogeneza i stromalna invazija (12). Slično kao CMS2 i CMS3, CMS4 je karakteriziran kromosomalnim nestabilnostima te inaktivacijom TP53 gena (56). Analizom obogaćivanja genskog seta pokazana je pojačana aktivacija gena poveznih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom, angiogenezom, remodeliranjem matriksa, sustavom komplementa i aktivacijom signalnog puta TGF- β (54).

Iz kliničke perspektive najlošije preživljenje nakon pojave recidiva imaju bolesnici s podtipovima CMS1 i CMS4, dok je za CMS2 pokazano da imaju značajno višu stopu

preživljenja nakon pojave recidiva (54). Mutirani BRAFV600E protein najzastupljeniji je unutar podtipa CMS1 (45 %) (12,24) što se može pripisati MSI fenotipu ovog podtipa, a u manjem je obujmu zastupljen u CMS2 (5 %), CMS3 (10 %) i CMS4 (10 %). Bolesnici klasificirani kao BM1 i BM2 najviše su bili zastupljeni u CMS1 podtipu (70 %) te CMS4 (17 %), a najmanje u CMS3 (5 %) i CMS2 (2 %) (13).

1.2.4 Kemoterapija i razvoj rezistencije u raku debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom

Standardna se kemoterapija koristi u svrhu ograničavanja širenja i smanjivanja veličine raka. Može uključivati monoterapiju ili kombiniranu terapiju širokog spektra lijekova kao što su 5-fluorouracil (5-FU), inhibitor DNA replikacije (61), kapecitabin (CAP, engl. capecitabine), nukleozidni metabolički inhibitor (62), oksaliplatina (OX, engl. oxaliplatin), disruptor DNA replikacije (63), irinotekan (IRI), inhibitor DNA topoizomeraze I (64) ili leukovorin, analog folata (65). Većina bolesnika prvu dijagnozu dobiva u kasnijim stadijima bolesti te im se u prvoj liniji liječenja indiciraju kombinacije standardnih kemoterapeutika. Primjerice, to su FOLFIRI (5-FU, leukovorin i irinotekan), FOLFOX (5-FU, leukovorin i oksaliplatina), FOLFOXIRI (5-FU, leukovorin, oksaliplatina i irinotekan), CAPIRI (kapecitabin i irinotekan) ili CAPOX (kapecitabin i oksaliplatina) (66). Primjena navedenih kombinacija kemoterapeutika može doprinijeti smanjenju veličine tumora ili usporavanju njegovog rasta, međutim, potrebno je istaknuti da sama primjena kemoterapije nosi niz nepoželjnih učinaka na cjelokupni organizam, kao što je sistemska toksičnost. Uz to, niz različitih čimbenika može utjecati na djelotvornost kemoterapije što se može očitovati kao niska stopa odgovora na terapiju te razvoj rezistencije na terapiju (67). Dvostruka ili trostruka kemoterapija u kombinaciji s ciljanom terapijom bevacizumabom koji je usmjeren na receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGFR, engl. vascular endothelial growth factor receptor) koristi se kao prva linija liječenja BRAFV600E-mutiranog metastatskog raka debelog crijeva (68).

1.2.4.1 Monoterapija vemurafenibom i mehanizmi rezistencije

Ciljana terapija BRAFV600E kinaze uključuje primjenu jednog od tri do sada klinički odobrena BRAF inhibitora: vemurafeniba, dabrafeniba i enkorafeniba. Sva tri inhibitora kompetitivno i selektivno ciljaju ATP-vezujuću domenu unutar monomerne forme mutiranog BRAF proteina (57). Važno je, međutim, napomenuti da su vemurafenib i dabrafenib inhibitori prve generacije, a enkorafenib druge generacije BRAF inhibitora zbog čega ispoljavaju razlike u toksikološkim profilima. Tako se vemurafenib i dabrafenib povezuju s probavnim tegobama kao što su dijareja i povraćanje, u odnosu na enkorafenib koji snažnije ispoljava negativno neurološko djelovanje (30).

Vemurafenib je razvijen kao ciljani inhibitor BRAFV600E kinaze te ga je u kolovozu 2011. godine američka Agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. Food and Drug Administration) odobrila za liječenje metastatskog melanoma. Gotovo 50 % dijagnosticiranih slučajeva melanoma nosi BRAF mutaciju (69), od čega više od 70 % nosi BRAFV600E mutaciju (70). Odobravanju je prethodila klinička studija BRIM-3 čiji su rezultati na bolesnicima s metastatskim BRAFV600E mutiranim melanomom bili klinički značajni. Naime, pokazali su da je vemurafenib, u odnosu na dakarbazin (alkilirajući anti-neoplastični agens), značajno poboljšao stopu ukupnog preživljenja (84 % u odnosu na 64 %) i preživljenja bez progresije bolesti (5.3 mjeseca u odnosu na 1.6 mjeseci) (71,72). Temeljem pozitivnih rezultata kliničke studije BRIM-3, Kopetz i suradnici proveli su pilot-studiju monoterapije vemurafenibom u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva koji imaju mutaciju BRAFV600E (51). Monoterapija vemurafenibom kod ove populacije bolesnika iskazala je ograničenu učinkovitost te je samo 5 % bolesnika imalo djelomičan odgovor na terapiju, a medijan preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja iznosili su 2.1, odnosno 7.7 mjeseci (51). Primaran razlog nezadovoljavajuće učinkovitosti vemurafeniba leži u razvoju rezistencije. Među prvim mehanizmima razvoja rezistencije na terapiju vemurafenibom opisana je reaktivacija povratne sprege MAPK signalnog puta prikazane na slici 3. (73). Inhibicija proteina BRAFV600E prekida ERK-posredovanu negativnu povratnu spregu koja regulira aktivnost EGFR uslijed čega dolazi do ponovne aktivacije i pojačane signalizacije preko EGFR. Signalna se kaskada nastavlja zaobilazeći inhibirani monomerni BRAFV600E na dva načina. Prvim načinom RAS kinaza fosforilira RAF izoformu CRAF koja nizvodno aktivira MEK1/2 kinazu (slika 3. a) (74,75), ili se stvara heterodimer BRAFV600E-CRAF putem kojega se nastavlja aktivacija nizvodnih kinaza (slika 3. b) (30,76).



Slika 3. Razvoj kemorezistencije na BRAFV600E inhibitor vemurafenib. Uslijed inhibicije proteina BRAFV600E prekida se ERK1/2-posredovana negativna povratna sprega koja regulira aktivnost receptora EGFR. (a) Nedostatak povratne sprege aktivira receptor EGFR te se signalizacija MAPK signalnom kaskadom nastavlja zaobilazeći inhibirani protein BRAFV600E na način da kinaza RAS fosforilira CRAF izoformu ili (b) se stvaraju heterodimeri BRAFV600E-CRAF koji nastavljaju nizvodnu signalizaciju.

Rak debelog crijeva u odnosu na melanom ispoljava specifične molekularne značajke koje imaju ulogu u razvoju rezistencije na vemurafenib (51). Naime, stanice melanoma potječu iz neuralnog grebena gdje je ekspresija *EGFR* gena manja u odnosu na stanice raka debelog crijeva pa je i učinak povratne sprege preko EGFR manji. Zbog toga je inhibitorni učinak vemurafeniba snažniji kod stanica melanoma. S druge strane, rak debelog crijeva razvija se iz epitelnih stanica gdje je ekspresija *EGFR* gena značajno veća (57), što djelomično objašnjava razlike u odgovoru na vemurafenib između melanoma i karcinoma debelog crijeva (73). Kemorezistencija može se razviti i putem sekundarnih signalnih putova, primjerice, Chen i suradnici su na *in vitro* modelima pokazali da prilikom monotretmana vemurafenibom BRAFV600E-mutiranih stanica raka debelog crijeva dolazi do hiperaktivacije MAPK-neovisnog signalnog puta WNT/β-katenin/FAK (77). Rezultati navedenog istraživanja predlažu da bi inhibicija mutiranog BRAF proteina uz istovremenu inhibiciju FAK kinaze mogla predstavljati potencijalnu novu terapiju za BRAFV600E-

mutirani rak debelog crijeva (77). Također, slična istraživanja *in vitro* pokazala su da tretman stanica raka debelog crijeva vemurafenibom može dovesti do razvoja rezistencije kroz PI3K i AKT signalni put (78).

1.2.4.2 Kombinirane terapije

Zbog slabe kliničke učinkovitosti monoterapije BRAF inhibitorom u liječenju BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva kao posljedice razvoja kemorezistencije, provedena su klinička istraživanja učinka dualnih i triplet terapija. Kombinirane terapije su za svoje mete imale BRAFV600E protein i potencijalne mete za dokidanje kemorezistencije.

Kako je već spomenuto, glavni razlog za razvoj primarne rezistencije na vemurafenib u kolorektalnom karcinomu aktivacija je povratne sprege preko EGFR koja dovodi do ponovne aktivacije signalnog puta MAPK što rezultira trajnom proliferacijom stanica unatoč inhibiciji BRAF. Potaknuti ovim otkrićem, kombinirane terapije inhibitorima EGFR i BRAF klinički su ispitane u bolesnika s BRAFV600E-mutiranim metastatskim rakom debelog crijeva (79-83). Klinička studija BEACON bila je prvo randomizirano ispitivanje faze III koje je pokazalo značajno dulje ukupno preživljenje i višu stopu odgovora za kombiniranu terapiju temeljenu na anti-EGFR protutijelu cetuksimabu i BRAFV600E inhibitoru enkorafenibu, s ili bez MEK inhibitora binimetiniba, u usporedbi sa standardnom terapijom u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom koji su imali progresiju bolesti nakon jedne ili dvije prethodne linije liječenja (82). Rezultati ovog kliničkog ispitivanja doveli su do odobrenja kombinacije cetuksimaba i enkorafeniba od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) i Europske agencije za lijekove (EMA) 2020. godine kao novog standarda skrbi za refraktorni BRAFV600E metastatski rak debelog crijeva. Provedene pretkliničke studije dualne terapije inhibitorima BRAF i EGFR proteina pokazale su pozitivne rezultate (74), stoga je provedeno i kliničko istraživanje lb/II faze dualne terapije vemurafenibom i EGFR inhibitorom erlotinibom. Rezultati istraživanja pokazali su dobro toleriranje terapije s uobičajenim štetnim događajima povezanima s monoterapijom pojedinog kemoterapeutika. S obzirom na nedostatan učinak terapije i progresije bolesti, u sklopu studije istraženi su i mogući mehanizmi rezistencije. Analiza cirkulirajuće tumorske DNA sugerirala je amplifikacije MET gena kao mogući mehanizam razvoja rezistencije na ispitanu terapiju (83). Sličan pristup dualnoj terapiji koristili su Yaeger i suradnici u svojoj pilotstudiji inhibicije BRAF i EGFR proteina. Koristeći vemurafenib i EGFR inhibitor panitumumab pokazali su da ovaj pristup ispoljava manju kožnu toksičnost bez razvijanja sekundarnih tumora kao što je karcinom skvamoznih stanica. Rezultati su pokazali regresiju tumora u 10 od 12 bolesnika te stabilnu bolest u trajanju od šest

mjeseci. Kombinacija vemurafeniba i panitumumaba u nedovoljnoj je mjeri postigla inhibiciju ERK signalizacije što se očitovalo progresijom raka debelog crijeva unutar godine dana (79). Sljedeća meta u MAPK signalnom putu, u kliničkoj studiji koju su proveli Corcoran i suradnici (84), jest dualna inhibicija BRAV600E i MEK kinaza. Iako je dualnom terapijom postignuta inhibicija MAPK signalnog puta, stupanj inhibicije nije dovoljan za značajnije djelovanje terapije. Corcoran i suradnici zaključuju da je cjelokupni učinak dualne terapije, promatran kroz stopu preživljenja bez progresije bolesti, bio nedovoljan navodeći stopu od 3.5 mjeseci u odnosu na 9.4 mjeseci u melanomu. Analizom razine inhibicije MAPK signalnog puta pokazano je da je ona bila nedostatna zbog čega je bolest napredovala (84).

Moguća objašnjenja slabijeg kliničkog učinka leže u alternativnim mehanizmima razvoja rezistencije neovisnim o MAPK uslijed inhibicije BRAFV600E, primjerice, zbog reaktivacije signalnog puta PI3K/AKT. Naime, *in vitro* studije pokazale su da prilikom monoterapije vemurafenibom tumorske stanice raka debelog crijeva imaju pojačanu aktivaciju signalnog puta PI3K/AKT u odnosu na stanice melanoma sa zajedničkom mutacijom BRAFV600E (74,78). Kombinirane terapije s inhibitorima BRAFV600E i PI3K inducirale su značajnije razine apoptoze u uvjetima *in vitro*, međutim, učinak nije dovoljan zbog aktivacije drugih signalnih putova, primjerice Src signalnog puta (85). Ruiz-Saenz i suradnici pokazali su da Src signalni put svoj protumorski učinak u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva ispoljava neovisno o signalizaciji ERK puta (86).

Razvoj rezistencije putem MET signalizacije primijećen je u *in vitro* modelima (87) kao i prethodnim studijama (83) koje su koristile dualnu terapiju BRAF i EGFR inhibitora. Pietrantonio i suradnici postulirali su da zamjena EGFR inhibitora za ALK/MET inhibitor krizotinib, uz zadržavanje vemurafeniba, može postići bolji klinički benefit. Rezultati su pokazali dobru toleranciju terapijske kombinacije bez ispoljavanja značajne toksičnosti, ističući važnost istraživanja različitih terapijskih pristupa liječenju BRAF mutiranog raka debelog crijeva (87).

S ciljem postizanja boljeg kliničkog učinka, do sada je provedeno i nekoliko kliničkih studija u kojima su ispitani učinci triplet kombinacija. Ispitana se kombinacija sastojala od dva ciljana inhibitora, BRAF inhibitora vemurafeniba i EGRF inhibitora cetuksimaba, uz jedan standardni kemoterapeutik, irinotekan. Ispitanici su dobro tolerirali navedenu kombiniranu terapiju, učinak je u odnosu na monoterapiju vemurafenibom i dualnu terapiju cetuksimabom i irinotekanom bio klinički značajniji, odnosno pokazana je bolja stopa odgovora na terapiju (88). Nastavno na navedenu studiju provedena je druga faza kliničkog ispitivanja u kojoj je određeno da uključivanje vemurafeniba uz cetuksimab i irinotekan dovodi do poboljšanja stope

preživljenja bez napretka bolesti. Nažalost, učinak nije bio dugotrajan te je zamijećena reaktivacija MAPK puta (89) i veća toksičnost u vidu neutropenije, anemije i mučnine (90). Slično tome, triplet kombinacija koja je uključivala inhibitore MEK, BRAF i EGFR povećala je preživljenje oboljelih od metastatskog raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E, no uz pojavu nepoželjnih učinaka poput tremora, anemije i infekcija urinarnog trakta (91). Istraživanja učinka vemurafeniba u *in vitro* uvjetima pokazala su pojačanu aktivaciju PI3K/AKT signalnog puta (73), stoga je ispitana triplet kombinacija inhibitora BRAFV600E, EGFR i PI3K (92). Postignuti učinak u pretkliničkim uvjetima bio je obećavajući zbog čega je provedeno i kliničko istraživanje na bolesnicima oboljelima od metastatskog, BRAF-mutiranog raka debelog crijeva. Uspoređena s dualnom terapijom inhibitorima BRAFV600E i EGFR, triplet kombinacija bila je učinkovitija, ali i toksičnija te su bolesnici ispoljavali ozbiljne nuspojave poput dijareje i hiperglikemije (16,93–95).

Za liječenje metastatskog raka debelog crijeva s nedostatnim sustavom *MMR* gena i MSI odobren je inhibitor proteina programirane stanične smrti (PD-1, engl. *programmed cell death protein*) PD-1 inhibitor, pembrolizumab (96). S obzirom na to da BRAF mutacija iskazuje snažnu korelaciju s MSI i posljedičnim višim imunim infiltratom (97), u sklopu SEAMARK studije trenutačno se ispituje triplet kombinacija inhibitora BRAF, EGFR i PD-1 inhibitora (98,99).

Signalizacija putem ERK kinaze ključna je točka kemorezistencije te u tijeku više kliničkih studija koje istražuju djelotvornost inhibicije ERK kinaze. Od interesa je HERKULES-3 klinička studija u kojoj se ulažu napori u istraživanje triplet inhibicije BRAFV600E, EGFR i ERK proteina u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva (100).

Unatoč raznolikoj paleti kombinacija terapija za liječenje raka debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom, i dalje se nameće potreba za otkrićem novih terapijskih strategija koje bi pobolišale ishod oboljelih od metastatskog raka debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom. Studije koju su proveli Ahronian i suradnici (101) te Corcoran i suradnici (73) ukazuju na ovisnost BRAF mutiranog raka debelog crijeva o reaktivaciji MAPK signalnog puta različitim mehanizmima rezistencije. Temeljem dosadašnjih saznanja daljnja su istraživanja nužna s ciljem boljeg razumijevanja procesa i molekularnih obilježja povezanih s razvojem kemorezistencije te dizajniranje novih farmakoloških liječenju neophodna za pristupa u kemorezistentnog BRAF-mutiranog raka debelog crijeva.

1.3 Sekretom

Pored procesa na staničnoj razini u patogenezi raka debelog crijeva važna je i komunikacija između stanica i njihovog mikrookoliša. Tjalsma i suradnici prvi su upotrijebili riječ sekretom kao naziv za skup svih biomolekula koje neka stanica izlučuje u međustanični prostor (102). Izlučene biomolekule mogu preći u tjelesne tekućine, primjerice u krvotok i urin, čime postaju dostupne za detekciju neinvazivnom metodom tekuće biopsije (103). Sekretorni proteini se stoga mogu koristiti za stratifikaciju bolesnika s rakom debelog crijeva koji mogu imati koristi od ciljane terapije s BRAF inhibitorima. Osim toga, proteinski biljezi izlučeni iz stanica raka u krv mogli bi pomoći u identifikaciji i dizajnu novih farmakoloških strategija za prevladavanje otpornosti na inhibiciju BRAFV600E, osobito kada uzorci tumorskog tkiva nisu lako dostupni.

1.3.1 Uloga sekretoma

Stanični sekretom čine proteini (enzimi, faktori rasta, citokini), lipidi, DNA materijal, vezikule i druge biomolekule koje izlučuju stanice. Sekrecija biomolekula odgovor je stanice na unutarnje i vanjske kemijske i mehaničke podražaje (104). Sekretom jest medijator u komunikaciji između samih stanica te stanica i izvanstaničnog matriksa, čime se postiže autokrina i parakrina regulacija staničnih procesa diferencijacije, proliferacije, preživljenja i smrti (105,106).

Uočeno je da tijekom razvoja tumora tumorske stanice komuniciraju s ostalim stanicama u svom mikrookolišu, primjerice endotelnim i imunološkim stanicama, pri čemu stvaraju okoliš pogodan za daljnju malignu progresiju u primarnom mjestu nastanka (107,108) i u pre-metastatskim nišama (109). Farhan i suradnici uočili su da MAPK signalni put ima važan utjecaj na put izlučivanja, dominantno modulacijom vezikula obloženih s kompleksom omotačnih proteina (COPII, engl. *coat protein complex II*) i transporta proteina od endoplazmatskog retikuluma ka Golgijevom aparatu (110). Pored toga, Lunavat i suradnici istražili su utjecaj tretmana vemurafenibom na neklasični vezikularni put izlučivanja u BRAFV600E mutiranim stanicama melanoma te su primijetili značajne promjene u proteinskom i ribonukleinskom sadržaju vezikula (111). Saznanja provedenih istraživanja dodatno ističu važnost proučavanja sekretoma BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva s ciljem otkrivanja novih terapijskih meta.

1.3.2 Načini izlučivanja biomolekula

Načini izlučivanja bioaktivnih molekula stanice se dijele na klasični i neklasični put izlučivanja (105).

1.3.2.1 Klasični put izlučivanja

Klasični ili konvencionalni put izlučivanja metoda je transporta transmembranskih i sekretornih proteina te je specifična za proteine koji na svom N-kraju sadrže signalni peptid. On sadrži tri regije: pozitivno nabijenu n-regiju N-kraja varijabilne duljine, središnju h-regiju koja sadrži najmanje sedam hidrofobnih aminokiselinskih ostataka i c-regiju C-kraja koja može sadržavati između tri i sedam polarnih aminokiselinskih ostataka (112–114). Prisustvo signalnog peptida u proteinu ukazuje na to da će protein ući u put izlučivanja, ali ne nužno da će i biti izlučen u izvanstanični prostor ako protein nizvodno od signala sadrži transmembranske zavojnice (115).

Klasični put izlučivanja sastoji se od endoplazmatskog retikuluma, izlaznih mjesta endoplazmatskog retikuluma (ERES, engl. *endoplasmic reticulum exit sites*), intermedijarnog odjeljka između ER i Golgijeva aparata (ERGIC, engl. *endoplasmic reticulum-Golgi-intermediate compartment*), Golgijeva aparata, trans-Golgijeve mreže i nosača proteina za njihova krajnja odredišta (104,116).



Slika 4. Klasični put izlučivanja. Kompleks ribosoma i peptida prepoznaje čestica za prepoznavanje signala i usmjerava ih u ER kroz translokon (1.). Proteini pravilne konformacije izlaze iz ER u COPII obloženim vezikulama na ERES mjestima (2.). Na putu do Golgijeva aparata vezikule prolaze kroz ERGIC (3.). U Golgijevu aparatu proteini prolaze posttranslacijske modifikacije, pakiraju se u sekretorne vezikule (4.) i u trans-Golgijevoj mreži se vezikule sortiraju prema krajnjem odredištu (5.). Vezikule određene za izlučivanje citoskeletom se transportiraju do plazmatske membrane (6.) ER – endoplazmatski retikulum, ERES – izlazna mjesta endoplazmatskog retikuluma, ERGIC - intermedijarni odjeljak između endoplazmatskog retikuluma i Golgijeva aparata.

Kao što je prikazano na slici 4., izlučivanje započinje translacijom proteina koji sadrže signalni peptid u ribosomima. U citosolu signalni peptid prepoznaje multimerni kompleks nazvan čestica za prepoznavanje signala (SRP, engl. *signal*

recognition particle) i veže se za njega. Čin vezanja privremeno zaustavlja translaciju kompleks ribosoma s nastajućim proteinom te navodi do membrane endoplazmatskog retikuluma (ER) (117,118). Kompleks ribosoma i SRP se potom vezuje za transmembranski SRP receptor, a nastajući protein kotranslacijski je usmjeren iz ribosoma u translokon (119). Translokon je proteinski kanal lociran u membrani ER, građen od kompleksa proteina Sec61 te on omogućuje ulazak proteina u lumen ER (120). Kompleks signalne peptidaze u ER lumenu odcjepljuje signalni peptid, a molekularni šaperoni pomažu proteinu u postizanju pravilne konformacije (112). Proces izlučivanja proteina prilagođava se signalima koje stanica prima u svom okolišu. Ako dođe do pomaka ravnoteže prema pojačanoj translaciji i izlučivanju proteina, moguće je izazvati stanje ER stresa, odnosno zasićenja molekularne mašinerije zaslužne za pravilno smatanje proteina. Posljedice ER stresa mogu dovesti do razvoja različitih patoloških stanja, uključujući rak (121,122), čemu se suprotstavlja stanični obrambeni mehanizam zvan odgovor na nesmotane proteine (UPR engl. unfolded protein response). UPR mehanizam pojačava transkripciju gena proteina uključenih u translaciju i smatanje proteina (123). Izlasku proteina provjereno pravilne konformacije iz ER-a posreduju COPII obložene vezikule. Vezikule pupaju na ERES-u, specifičnim izlaznim mjestima na membrani ER (124). COPII obložene vezikule zatim vrše anterogradni transport proteina do ERGIC-a i potom Golgijeva aparata (125,126). U Golgijevom aparatu budući sekretorni proteini prolaze posttranslacijske modifikacije kao što su fosforilacija i glikozilacija. U sklopu trans-Golgijeve mreže konstitutivno izlučeni proteini, primjerice komponente izvanstaničnog matriksa i faktori rasta, pakiraju se u sekretorne vezikule, proteini koje izlučuju specijalizirane stanice pri stimulaciji, kao što su crijevne vrčaste stanice ili stanice gušterače, pakiraju se u sekretorne granule, a proteini predodređeni za endolizosomalni odjeljak pakiraju se u klatrinom obložene vezikule (116). Sukladno tome, unutar trans-Golgijeve mreže dolazi do sortiranja granula i vezikula prema njihovim krajnjim odredištima koja mogu biti izvanstanični prostor, plazmatska membrana, lizosomi ili endosomi (127,128). Sadržaj sekretornih vezikula i granula koji će biti izlučen transportira se niz stanični citoskelet do plazmatske membrane. Ondje može doći do uklapanja vezikule i transmembranskih proteina u plazmatsku membranu ili izlučivanja proteina u izvanstanični prostor (105, 116).

1.3.2.2 Neklasični put izlučivanja

Neklasični ili nekonvencionalni put izlučivanja proteina neovisan je o Golgijevom aparatu, a služi izlučivanju proteina koji u svojoj strukturi ne sadrže signalni peptid te izlučivanju proteina koji pored unutarstaničnih imaju i izvanstanične funkcije. Uz navedeno, neklasični način izlučivanja može biti potaknut uvjetima stresa kojima je

stanica izložena (129). Iako je u literaturi opisan velik broj mehanizama izlučivanja, moguće ih je kategorizirati u nevezikularne i vezikularne mehanizme izlučivanja te su oni prikazani na slici 5. (105,129). Važno je napomenuti da pojedini proteini mogu koristiti različite načine neklasičnog izlučivanja te da odabir puta izlučivanja ovisi o fiziološkim uvjetima stanice (130).



Slika 5. Prikaz neklasičnih putova izlučivanja. Nevezikularni načini izlučivanja proteina koji ne sadrže signalni peptid obuhvaća membranske kanale (1.) i ABC transportere (2.). Vezikularni načini izlučivanja uključuju transport biomolekula putem endolizosomalnog sustava, autofagosoma i mikrovezikula. Tijekom sazrijevanja endosomalna membrana se invaginira i uzima citosolni sadržaj te nastaju multivezikularna tjelešca. Ona se mogu spojiti s plazmatskom membranom i izlučiti svoj sadržaj u obliku egzosoma (3.) ili se mogu spojiti s lizosomom. Lizosomalni enzimi razgrađuju sadržaj te se potom vezikula spaja s plazmatskom membranom (4.). Lizosomi se mogu spojiti i s autofagosomom, razgraditi njegov sadržaj i spajanjem s membranom ga izlučiti (5.). Alternativno, autofagosomi mogu izravno izlučiti svoj sadržaj u izvanstanični prostor spajanjem s membranom (6.). Plazmatska membrana može izlučiti citosolni sadržaj procesom pupanja pri čemu nastaju

mikrovezikule (7.) Proteini koji u svojoj strukturi sadrže signalni peptid ili transmembransku domenu mogu se izlučiti putem lizosomalnih vezikula (8.).

Nevezikularni mehanizam izlučivanja proteina obuhvaća izlučivanje koje je posredovano membranskim kanalima i transporterima ATP-vezujuće kazete (ABC transporterima, od engl. *ATP-binding cassette transporters*) (105,131).

Izlučivanje neovisno o transporterima svojstveno je različitim klasama proteinima, ali je svima zajedničko da zaobilaze Golgijev aparat (slika 5.1.) te imaju nekoliko zajedničkih točaka (130). Proces izlučivanja započinje translacijom proteina u citoplazmi nakon čega su, ovisno o funkciji koju obavljaju, posttranslacijski modificirani. Sljedeći je korak vezivanje za lipide i interakcija s enzimima koji osiguravaju završnu konformacijsku promjenu, primjerice monomerni se proteini vezuju u polimerne, nakon čega slijedi njihovo izlučivanje u izvanstanični prostor (131). Takav način izlučivanja koriste proteini faktor rasta fibroblasta-1 (FGF1, engl. fibroblast growth factor 1) i faktor rasta fibroblasta-2, (FGF2, engl. fibroblast growth factor 2). FGF1 prati inicijalne korake u izlučivanju, ali tvori multiproteinski kompleks s različitim proteinima. Nastali kompleks destabilizira plazma membranu i proteini su izlučeni u izvanstanični prostor (132). Translatirani FGF2 vezuje se za membranski lipid te ta interakcija pokreće oligomerizaciju proteina. Za razliku od FGF1, oligomerni FGF2 stvara vlastitu membransku poru kojom se translocira u izvanstanični prostor nakon čega se disocira i veže za ciline receptore (129,133). Manii broj sekretornih proteina koristi ABC transportere (slika 5.2.) za svoje izlučivanje (134). Primjer proteina koji se izlučuje putem ABC transportera je apurinska/apirimidinska endonukleaza 1/redoks faktor 1 (APE1/Re-1, engl. endonuclease-1/redox apurinic/apyrimidinic factor-1). Lee suradnici i eksperimentalno su pokazali da se posttranslacijski acetilirani APE1/Ref-1 koristi ABCA1 transmembranski transporter u svom izlučivanju, međutim, točan mehanizam izlučivanja nije dovoljno istražen (135). Izlučivanjem putem ABC transportera neizravno se koristi protein toplinskog šoka 70 (HSP70, engl. heat shock protein 70) gdje su ABC transporteri ključni u ulasku HSP70 u endolizosomalne vezikule putem kojih on biva izlučen (131).

Vezikularni mehanizmi izlučivanja najčešći su oblici neklasičnog izlučivanja, a uključuju transport proteina i ostalih biomolekula putem vezikula endolizosomalnog sustava, autofagosoma i mikrovezikula (105,131).

Endolizosomalni sustav stanice razgrađuje i reciklira sadržaj staničnog mikrookoliša, plazma membranu i usko je vezan za procese autofagije. Sastavnice sustava su endosomi, lizosomi i autofagosomi (136). Tijekom sazrijevanja, endosomalna se membrana invaginira, uzima citosolni sadržaj te nastaju vezikule nazvane

multivezikularna tjelešca. Tjelešca se potom mogu spojiti s plazmatskom membranom i otpustiti svoj sadržaj u obliku egzosoma (slika 5.3.) u stanični okoliš. Alternativno, tjelešca se u citoplazmi mogu spojiti s lizosomima, čiji enzimi dodatno razgrade luminalni sadržaj tjelešca, a sadržaj se izluči spajanjem lizosoma s plazma membranom (slika 5.4.). Lizosomi svoj materijal za razgradnju mogu dobiti i putem autofagije, procesa kojeg stanice koriste za razgradnju staničnih organela i dobivanja energije (131). U klasičnom putu autofagije, autofagosom se spaja s lizosomom, sadržaj se vezikula razgrađuje pomoću lizosomalnih enzima, a krajnji produkti se izlučuju spajanjem autofagolizosoma s plazma membranom (slika 5.5.). Autofagosomalni put izlučivanja koji ne uključuje spajanje s lizosomima, tzv. sekretorna autofagija (slika 5.6.) novoopisani je mehanizam neklasičnog izlučivanja. Sekretornom autofagijom sadržaj se autofagosoma izravno izlučuje u izvanstanični prostor, ali precizni mehanizmi koji reguliraju proces još nisu dovoljno istraženi (137,138). Mikrovezikule su, uz egzosome, jedan od načina izlučivanja proteina pri čemu oni ostaju unutar membranske strukture do spajanja s drugim stanicama u mikrookolišu. Veličinom su u rasponu od 100 do 1000 nm što ih čini većim od egzosoma čiji je raspon od 30 do 150 nm (131). Proces nastajanja mikrovezikula započinje porastom unutarstanične koncentracije kalcijevih iona što uzrokuje promjene u fosfolipidnom sastavu plazmatske membrane. Nastale promjene potiču depolimerizaciju aktinskog citoskeleta, plazmatska membrana počinje pupati, a nastala mikrovezikula otpuštena je u izvanstanični prostor (slika 5.7.) (139).

Uz opisane načine izlučivanja postoje proteini koji u svojoj strukturi sadrže signalni peptid ili transmembransku domenu, ali u svom izlučivanju zaobilaze Golgijev aparat (slika 5.8.). Iako točan mehanizam izlučivanja ovog puta nije još u potpunosti razjašnjen, smatra se da se nalazi na sjecištu između nevezikularnog i vezikularnog načina izlučivanja te da ga potiču uvjeti stresa. Pretpostavlja se da proteini nakon translacije i provjere konformacije u ER, napuštaju ER putem vezikula te se spajaju s endolizosomalnim sustavom ili se izravno spajaju s plazmatskom membranom (130,140).

1.3.3 Uloga sekretoma u rezistenciji raka

Procesi povezani s razvojem raka mogu utjecati na sastav staničnog sekretoma u korist pojačane ekspresije strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa i signalnih proteina s ulogom u proliferaciji i metastaziranju (141). Sadržaj sekretoma tumorskih stanica može poticati ekspresija gena koja potiču preživljenje i onih koji spriječavaju apoptotzu te utjecati na stanične mehanizme implicirane u razvoju kemorezistencije, primjerice efluks pumpe i detoksificirajuće enzime (142–144). Uz navedeno, stanice tumora putem sekretoma djeluju i na fibroblaste, stanice izvanstraničnog matriksa pri čemu ih mogu transformirati u fibroblaste povezane s rakom (od engl. *cancer*-

associated fibroblasts) te imunološke stanice makrofage, koje mogu transformirati u makrofage povezane s rakom. Navedeni utjecaji stanica tumora dalje pogoduju progresiji tumora i razvoju kemorezistencije (145,146).

U kontekstu razvoja kemorezistencije, posebno na vemurafenib, kod tumora s BRAFV600E mutacijom literatura navodi nekoliko primjera. Istraživanje na stanicama karcinoma štitnjače s mutacijom BRAF, koje su imale razvijenu rezistenciju na inhibitor Src kinaze dasatinib, pokazalo je da rezistentne stanice razvijaju invazivniji fenotip koji je bio praćen promjenama sekretoma uključujući povećanu ekspresiju proupalnih citokina, naročito IL-1ß, kao i proinvazivnih metaloproteinaza matriksa (147). Kako IL-1ß preko autokrine sprege potiče invaziju preko FAK kinaze, kombinirana inhibicija FAK i Src kinaza uzrokuje sinergističku inhibiciju rasta i invazije te indukciju apoptoze stanica karcinoma štitnjače s mutacijom BRAF. Prema istraživanju Lunavata i suradnika, tretman BRAFV600E mutiranih stanica melanoma s vemurafenibom inducira izlučivanje vezikula čiji sadržaj potiče aktivaciju puta preživljenja u susjednim stanicama (111). Neki od tih izlučenih čimbenika koji potiču rast identificirani su u sličnoj studiji u sekretomu stanica melanoma otpornih na BRAF inhibitor gdje je endotelin-1 identificiran kao molekularni čimbenik koji doprinosi parakrinoj zaštiti rezistentnih stanica od inhibicije BRAF (148). Slično tome, Obenauf i suradnici u svom su istraživanju pokazali da tretman stanica melanoma vemurafenibom pokreće složenu mrežu sekretornih signala. Naime, u pokusu ko-kultiviranja stanica ljudskog melanoma otpornih na vemurafenib s osjetljivim stanicama tretiranim vemurafenibom uočeni su signali s dvojakom ulogom: u senzibilnim su stanicama poticali preživljenje, a u rezistentnim su stanicama stimulirali rast, diseminaciju i metastaziranje pojačanom aktivacijom AKT signalnog puta, što doprinosi nepotpunoj regresiji tumora. Dualnom inhibicijom BRAFV600E proteina i sekundardnog AKT signalnog puta, Obenauf i suradnici postigli su usporavanje proliferacije rezistentne stanične linije i demonstrirali utjecaj sekretornih signala u razvoju kemorezistencije (149). Nalazi ovih studija ukazuju da BRAFV600E mutirane stanice reagiraju na stres izazvan BRAF inhibitorom pojačanim izlučivanjem propreživljavajućih i antiapoptotskih faktora.

Istraživanja sekretoma u svrhu razjašnjavanja njegovog utjecaja na komunikaciju između stanica tumora i njihovog neposrednog mikrookoliša doprinijela su i pokretanju kliničkih ispitivanja komponenti sekretoma. Primjerice, IRAFU studija u drugoj je fazi ispitivala djelovanje inhibitora citokina IL-1 α i IL-1 β u bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva. Rezultati studije pokazali su stabilizaciju bolesti i dobru toleranciju u bolesnika (150). S druge strane, klinička studija utjecaja bevacizumaba, monoklonalnog protutijela na vaskularni endotelni faktor rasta

(VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) rezultirala je uključivanjem bevacizumaba u kemoterapeutski režim liječenja raka debelog crijeva (151).

Stoga analiza sekretoma može predstavljati izvor za nove, potencijalno terapijski relevantne, signalne molekule i procese koji se zbivaju između tumorske stanice i njezina mikrookoliša, a čije farmakološko ciljanje može pospješiti odgovor na kemoterapiju.

1.4 Uporaba metoda masene spektrometrije za pronalazak novih proteinskih meta i biljega

1.4.1 Uporaba metoda masene spektrometrije u istraživanju proteoma

U tome pogledu metode proteomike temeljene na spektrometriji masa imaju veliki potencijal s obzirom na mogućnost identifikacije novih biljega razvoja raka, rezistencije i potencijalnih terapijskih meta.

Povezivanjem metode dvodimenzionalne poliakrilamidne gel elektroforeze (engl. two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2DE-PAGE) s masenom spektrometrijom temeljenom na matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom uz analizator vremena preleta (engl. matrix assisted laser desorption ionization - time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) usporedeni su stanični proteomi između stanične linije raka debelog crijeva DLD-1 s 5-FU rezistentnom inačicom DLD-1 linije. Proteini pojačano izraženi u DLD-1/5-FU staničnoj liniji analizirani su MALDI-TOF masenom spektrometrijom te je postulirano da doprinose razvoju rezistencije na 5-FU zaštitom stanica od oštećivanja DNA (152). Koristeći isti metodološki pristup, Sakai i suradnici usporedili su fosfoproteom i proteom stanične linije raka debelog crijeva DLD-1 naspram stanica rezistentnih na DLD-1/5-FU te su utvrdili pojačanu ekspresiju antiapoptotskih proteina. Utišavanje proteina povećalo je odgovor rezistentne linije na tretman 5-fluorouracilom (153,154). Guo i suradnici uporabom 2DE-PAGE u kombinaciji s MALDI-TOF/TOF masenim spektrometrom analizirali su ukupni proteom stanične linije raka debelog crijeva HT-29 sa stečenom rezistencijom na oksaliplatinu u odnosu na senzibilne stanice HT-29 pri čemu su identificirali poli(C)-vezujući protein 1 kao potencijalni biljeg rezistencije na oksaliplatinu (155).

Osim 2-DE/MALDI spektrometrije masa, metoda tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography coupled with mass spectrometry*, LC-MS) također se pokazala uspješnom u istraživanju molekularnih obilježja razvoja raka te razvoja kemorezistencije.

Koristeći 2DE-PAGE povezan s LC-MS istražene su razlike u izričaju proteina između stanične linije normalnog tkiva sluznice debelog crijeva, NCM460, i stanične linije primarnog raka, SW480. Rezultati studije pokazali su pojačanu ekspresiju proteina retikulokalbina i kalumenina u stanica raka u odnosu na stanice normalne sluznice. Retikulokalbin i kalumenin su uključeni u procese migracije i invazije, stoga su predloženi kao nova molekularna obilježja razvoja raka debelog crijeva (156).

Koristeći LC-MS metodu, O'Connell i suradnici su istraživali rezistenciju na docetaksel kod stanica raka prostate te su uspoređivali ukupne proteome triju osjetljivih staničnih linija s njihovim rezistentnim klonovima. Pokazano je da je protein HSP70 pojačano izražen u ispitanim docetaksel-rezistentnim staničnim linijama raka prostate. HSP70 sprječava stresom induciranu apoptozu te je stoga predložen kao nova terapijska meta u liječenju raka prostate (157). Sličnim metodološkim pristupom Tam i suradnici usporedili su proteome osjetljivih staničnih linija raka debelog crijeva, DLD-1 i HCT116, s njihovim FOLFOX-rezistentnim inačicama. Bioinformatička analiza podataka otkrila je da su proteini povezani s aktinskim citoskeletom i ribosomalnim procesima značajno pojačano izraženi u rezistentnim stanicama. Ovo istraživanje proširilo je dosadašnje spoznaje o mehanizmima koji stoje u pozadini razvoja kemorezistencije, pružajući nove uvide u molekularne promjene koje doprinose otpornosti na lijekove (158). Paulitschke i suradnici primijenili su kvantitativni LC-MS bez obilježavanja (LFQ LC-MS, engl. label-free quantitative LC-MS) kako bi usporedili proteom osjetljivih stanica melanoma s proteomom stanica rezistentnih na BRAF inhibitore. Identificirali su 15 proteina pojačano izraženih u rezistentnim linijama, među kojima su izdvojili kavin-1 kao potencijalni biljeg BRAF rezistencije (159).

1.4.2 Uporaba metoda masene spektrometrije u istraživanju sekretoma

Metode proteomike temeljene na spektrometriji masa pokazale su se vrlo uspješnim u istraživanju sekretoma tumorskih stanica.

Korištenjem kombiniranog pristupa elektroforeze u natrijevom dodecilsulfatnom poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE engl. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel*) spregnute s MALDI-TOF masenom spektrometrijom, Wu i suradnici istražili su i usporedili sekretome više od 20 staničnih linija, uključujući i sekretom raka debelog crijeva. Tim pristupom identificirali su protein-2 posrednik odgovora na kolapsin (CRMP-2, engl. *collapsin response mediator protein-2*) kao protein svojstven sekretomu raka debelog crijeva te su ga predložili kao novi potencijalni biljeg (160).

Soloveva i suradnici koristili su sekretom i izvanstanične vezikule staničnih linija raka debelog crijeva Caco2, HCT116 i HT-29 u istraživanju mogućih novih biljega za detekciju raka debelog crijeva. Pomoću metode LC-MS istražili su proteinski sadržaj
sekretoma te su identificirali nekoliko desetaka pojačano izraženih proteina. Bioinformatičkom analizom pokazano je da su identificirani proteini pojačano zastupljeni u procesima povezanima s metaboličkim reprogramiranjem i metastaziranjem (161).

S druge strane, Xue i suradnici koristili su metodu LC-MS kako bi analizirali i usporedili sekretom staničnih linija raka debelog crijeva SW480, porijeklom iz primarnog tumora, i SW620, metastaze limfnog čvora. U njihovom su radu identificirani proteini TFF3 i GDF15 kao potencijalni biljezi za predviđanje metastatskog potencijala raka debelog crijeva. Xue i suradnici naglašavaju da je istraživanje staničnog sekretoma pristupačniji način za otkrivanje mogućih biljega koji bi se mogli dalje koristiti u farmakološkim i kliničkim istraživanjima (162).

Osim u prognostičke svrhe, istraživanje sekretoma pokazalo se korisnim i u otkrivanju novih meta za dokidanje kemorezistencije tumorskih stanica. Tako su, primjerice, Yao i suradnici proveli profiliranje sekretoma senzibilne i rezistentne stanične linije raka dojke MCF-7 koristeći metodu 1D gel elektroforeze povezane s LC-MS te su identificirali interleukin-18 kao potencijalnu farmakološku metu za dokidanje razvoja rezistencije na doksorubicin kod raka dojke (163).

Slično tome, Shin i suradnici usporedili su sekretom 5-FU rezistentne stanične linije raka debelog crijeva SNU-C4 s roditeljskom, 5-FU osjetljivom staničnom linijom, kako bi identificirali potencijalne prediktore rezistencije na 5-FU. U istraživanju su koristili tekućinsku kromatografiju spregnutu s MALDI-TOF masenom spektrometrijom te identificirali proteine s povećanom ili smanjenom ekspresijom u rezistentnoj liniji u odnosu na osjetljivu. Među njima se ističe metabolički enzim piruvat kinaza M2 čija povećana ekspresija može dovesti do poremećaja regulacije glikolize, stoga je predložen kao mogući biljeg razvoja kemorezistencije (164).

2 Hipoteze i ciljevi rada

Hipoteze su ove doktorske disertacije:

- Stanični proteom i sekretom stanica raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E koje su razvile otpornost na BRAF inhibitor vemurafenib pokazuju specifične razlike u odnosu na parentalne stanice osjetljive na tretman vemurafenibom.
- Identifikacija specifičnih molekularnih obilježja rezistencije na BRAF inhibitor vemurafenib omogućit će odabir novih terapijski relevantnih meta i molekularnih procesa unutar stanica i u njihovom mikrookolišu kao temelj za dizajniranje novih kombiniranih terapija za liječenje oboljelih od raka debelog crijeva kod kojih BRAF inhibitori nisu polučili željeni uspjeh u liječenju.

Ciljevi su ove doktorske disertacije:

- Optimizirati protokole za izolaciju i separaciju proteina ukupnog staničnog proteoma i sekretoma stanica raka debelog crijeva RKO koje imaju mutaciju BRAFV600E.
- Provesti komparativno profiliranje proteoma i sekretoma osjetljivih stanica RKO u odnosu na stanice RKO koje imaju stečenu rezistenciju na vemurafenib uz pomoć metoda MALDI-TOF/TOF MS i LC-MS/MS.
- Integrirati rezultate spektrometrije masa za analizu proteoma i sekretoma te valorizirati i odabrati relevantne proteinske mete, stanične procese i putove vezane za razvoj rezistencije uz pomoć metoda bioinformatike.
- Validirati ključne mete i procese vezane za rezistenciju na razini gena i proteina.
- Istražiti ulogu ključnih proteinskih meta i staničnih procesa u regulaciji rezistencije na vemurafenib.
- Predložiti novu strategiju za dokidanje rezistencije na vemurafenib u stanicama raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E temeljenu na kombiniranom tretmanu s inhibitorom ključnih proteinskih meta i vemurafenibom.

3 Materijali i metode

3.1 Stanični modeli

Stanična linija ljudskog raka debelog crijeva RKO s mutacijom BRAFV600E kupljena je od organizacije American Type Cell Culture (*American Type Cell Culture*, Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države) i održavana u Eagleovom minimalnom esencijalnom mediju (EMEM, *Eagle's Minimum Essential Medium,* Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) s dodanim 10 % fetalnim goveđim serumom (FBS, engl. *fetal bovine serum*), 2mM L-glutamina (Capricorn Scientific, Njemačka) i 100 U/mL penicilina (Capricorn Scientific, Njemačka), 100 µg/mL streptomicina (Capricorn Scientific, Njemačka) u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ pri 37°C.

Stanična linija ljudskog melanoma A375 koja nosi mutaciju BRAFV600E i linija derivirana iz A375 otporna na vemurafenib bili su ljubazan dar dr. sc. Maje Sabol i njezine istraživačke grupe s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Stanice su održavane u Dulbeccovom modificiranom Eagle mediju (Capricorn Scientific, Njemačka) s dodanim 10 % FBS (Capricorn Scientific, Njemačka), 2 mM L-glutamina (Capricorn Scientific, Njemačka), 100 U/mL penicilina (Capricorn Scientific, Njemačka), 100 µg/mL streptomicina (Capricorn Scientific, Njemačka) i 1 mM natrijevog piruvata (Capricorn Scientific, Njemačka) u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ na 37 °C.

3.2 Razvoj vemurafenib-rezistentne RKO stanične linije raka debelog crijeva

Vemurafenib-rezistentna stanična linija RKO razvijena je izlaganjem osjetljive parentalne stanične linije uzastopno rastućim koncentracijama vemurafeniba (šifra PLX4032, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, SAD) u periodu od šest mjeseci do postizanja razvoja stabilne rezistencije na klinički relevantnu koncentraciju (11.52 µM). Uspostavljeni rezistentni fenotip potvrđen je MTT testom proliferacije u kojem je pokazan deseterostruki porast IC50 vrijednosti u odnosu na IC50 vrijednost osjetljive stanične linije RKO te mikroskopskom evaluacijom stanične morfologije prema prethodno opisanom istraživanju (165).

3.3 Prikupljanje kondicioniranog medija za analizu sekretoma

Stanice su nasađene u gustoći od 4×10⁶ u Petrijeve zdjelice promjera 100 mm u odsustvu vemurafeniba te su uzgajane 48 sati pri standardnim uvjetima rasta. Stanice su potom isprane tri puta s fosfatima puferiranom fiziološkom otopinom (PBS, engl. *phosphate buffered saline*, PAN-Biotech, Aidenbach, Njemačka), dva puta s EMEM medijem i inkubirane jedan sat u mediju bez dodanog FBS-a. Nakon inkubacije medij je uklonjen te je dodan svježi medij bez dodanog FBS-a i stanice su uzgajane još 24 sata. Kondicionirani je medij potom prikupljen, centrifugiran 10 minuta pri 500 RPM i 4°C te dekantiran u novu epruvetu. Potom je centrifugiran pri 3000 RPM i 4°C u trajanju od 15 minuta i dekantiran u novu epruvetu. Paralelno, adherirane stanice odvojene su od podloge tripsinom i njihova vijabilnost je ispitana tripanskim modrilom. Kao selekcijski kriterij za nizvodne proteomske analize prihvaćena je vijabilnost stanica iznad 95 %.

Proteini izlučeni u sekretomu taloženi su dodatkom 2 %-tnog natrijevog deoksikolata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u kondicionirani medij pri 4°C u trajanju od 30 minuta, a zatim je dodana triklorooctena kiselina (Sigma-Aldrich, SAD). Smjesa je lagano pomiješana i inkubirana jedan sat na ledu. Proteini su taloženi centrifugiranjem pri 15.000 g, 20 minuta pri 4°C, a preostali supernatant uklonjen je dekantiranjem. Proteinskom peletu dodan je ohlađeni tetrahidrofuran (Sigma-Aldrich, SAD), smjesa je vorteksirana do potpunog otapanja peleta te inkubirana pet minuta pri -20°C. Ponovljen je postupak od centrifugiranja do inkubacije. Proteini su taloženi centrifugiranjem pri 15.000 g, 20 minuta pri 4°C, preostali je supernatant dekantiran, a proteinski je pelet posušen. Kvantifikacija proteina provedena je koristeći Qubit[™] kit za analizu proteina na Qubit fluorimetru prema uputama proizvođača (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

3.4 Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) i analiza slika gelova staničnog sekretoma

Ukupno 300 µg proteina otopljeno je u 125 µL 2-DE rehidratacijskog pufera sastava: 7M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 2M tiourea (Sigma-Aldrich, SAD), 4 % (w/v) CHAPS deterdžent (Sigma-Aldrich, SAD), 10 % (w/v) ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, SAD) i 0.2 % (w/v) BioLyte® 3/10 amfolit (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD). Otopljeni uzorci proteina naneseni su na ReadyStrip[™] IPG trake duljine 7 cm i pH raspona 4-7 (BIO-RAD, SAD) te pokriveni mineralnim uljem (BIO-RAD, SAD). Izoelektrično fokusiranje provedeno je na uređaju PROTEAN IEF cell (BIO-RAD, SAD) pri sljedećim uvjetima: aktivna rehidratacija pri 50 V u trajanju od 14 sati, 250 V brzo 20 minuta, 4.000 V postepeno 1 sat i 4.000 V brzo u trajanju od 15.000 Vh . Proteini su u drugoj dimenziji razdvojeni na 12 %-tnom SDS-PAGE gelu pri 200 V u trajanju od 1 sat koristeći Mini-PROTEAN Tetra Cell sustav (BIO-RAD, SAD). Gelovi su obojani s Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, SAD) bojom preko noći, oprani s miliQ vodom te slikani na uređaju ChemiDoc XRS+ Imager (BIO-RAD, SAD). Analiza slika gelova odrađena je koristeći softver SameSpots v5.0 (TotalLab, Newcastle na Tyneu, Ujedinjeno Kraljevstvo). Pokus je proveden u tri zasebna biološka ponavljanja za svaki uvjet. Statistički značajne promjene u količini proteina između uvjeta određene su ANOVA analizom praćenom *post hoc* Tukeyevim testom.

3.5 Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) i analiza slika gelova staničnog proteoma

Osjetljive RKO stanice i stanice otporne na vemurafenib nasađene su u Petrijeve zdjelice od 100 mm u gustoći od 1×10⁶ stanica i uzgajane 48 sati pri standardnim uvjetima. Stanice su zatim lizirane uporabom pufera za lizu sastava: 7M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 2M tiourea (Sigma-Aldrich, SAD), 4 % (w/v) CHAPS deterdžent (Sigma-Aldrich, SAD), 10 % (w/v) DTT (Sigma-Aldrich, SAD) s dodatkom koktela inhibitora proteaze (Roche, Basel, Švicarska). Ukupno 700 µg proteina otopljeno je 2-DE rehidratacijskom puferu sastava: 7M urea (Sigma-Aldrich, SAD), 2M tiourea (Sigma-Aldrich, SAD), 4 % (w/v) CHAPS deterdžent (Sigma-Aldrich, SAD), 10 % (w/v) DTT (Sigma-Aldrich, SAD) i 0.2 % (w/v) BioLyte® 3/10 amfolit (BIO-RAD, SAD). Uzorci su naneseni na 17 cm duge pH 3-10NL ReadyStrip™ IPG trake (BIO-RAD, SAD) i prekriveni mineralnim uljem (BIO-RAD, SAD). Izoelektrično fokusiranje provedeno je pomoću PROTEAN IEF sustava (BIO-RAD, SAD) pri sljedećim uvjetima: aktivna rehidratacija pri 50 V tijekom 14 sati, 250 V postupno 30 minuta, 500 V postupno 30 minuta, 1.000 V postupno 30 minuta, 10.000 V postupno tijekom 3 sata i 10.000 V brzo tijekom 43.000 Vh. U drugoj dimenziji proteini su razdvojeni 12 % SDS-PAGE gelovima PROTEAN II XL stanica (BIO-RAD, SAD). Gelovi su obojeni Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, SAD) bojom preko noći nakon čega je slijedilo ispiranje u miliQ vodi. Slike gela snimljene su ChemiDoc XRS+ Imager sustavom (BIO-RAD, SAD), a analiza slike provedena je pomoću Progenesis SameSpots v5.0 (TotalLab, UK). Pokus je izveden u tri pojedinačna biološka ponavljanja za svaki tip stanice. Provedene su ANOVA analize praćene post hoc Tukeyevim testom kako bi se identificirale statistički značajne razlike u obilju proteina između skupova podataka.

3.6 Analiza MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom

Priprema uzoraka staničnog proteoma i sekretoma za analizu MALDI-TOF/TOF masenim spektrometrom provedena je na niže opisani način.

Proteinske točke od interesa izrezane su iz gelova, a Coomassie boja uklonjena je acetonitrilom (Honeywell, Charlotte, NC, SAD) i 100 mM amonijevim bikarbonatom (Sigma-Aldrich, SAD) te su uzorci u potpunosti osušeni u vakuum koncentratoru. Proteini su digestirani tripsinom u gelu tako da su inkubirani u 50 mM amonijevom bikarbonatu s 10 ng/µL tripsinom (razina čistoće za sekvenciranje, Promega, Madison, WI, SAD) na 4°C preko noći. Supernatant je prikupljen u čistu tubicu, a triptički peptidi ekstrahirani su inkubacijom prvo u smjesi otopina 65 % acetonitrila/5 % mravlje kiseline popraćeno s trešnjom i soniciranjem te potom inkubacijom u miliQ vodi i 100 % acetonitrilom s trešnjom i soniciranjem. Prikupljeni su supernatanti osušeni u vakuum koncentratoru, otopljeni u 0.1 % trifluorooctenoj kiselini i pročišćeni s C18 ZipTip kolonama u tipsu (MerckMillipore, Burlington, MA, SAD) prema uputama proizvođača. Svaki je uzorak pomiješan s otopinom matrice koja sadrži α-cijano-4-hidroksicimetnu kiselinu (0.3 g/L CHCA u otopini (v/v) 2:1 etanol:aceton) u omjeru 1:10. Ukupno je jedan mikrolitar priređene smjese uzorka i matrice nanesen na MALDI pločicu (model AnchorChip 800 µm, Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Smjesa uzorka i matrice puštena je da se posuši i kristalizira pri sobnoj temperaturi.

Analiza masenim spektrometrom provedena je na UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF masenom spektrometru (Bruker Daltonics, Njemačka) u reflektorskom načinu rada u rasponu m/z od 700 do 3500 Da. Generirani maseni spektri vanjski su kalibirani smjesom standarda kalibracijskih peptida i standarda kalibracijskih proteina I (Bruker Daltonics, Billerica, MA, SAD) u omjeru 1:5. Softver FlexControl v3.4 (Bruker Daltonics, SAD) korišten je za generiranje, prikupljanje i obradu masenih spektara. FlexAnalysis v3.4 (Bruker Daltonics, SAD) korišten je za pretraživanje baze podataka proteina. Proteini su identificirani korištenjem MASCOT v2.4.1 tražilice (Matrix Science, London, UK) prema sljedećim uvjetima: enzim: tripsin; stabilne modifikacije: karbamidometilacija na cisteinu; promjenjive modifikacije: oksidacija na metioninu; proteinska masa: neograničena; tolerancija mase peptida: ±50 ppm; maksimalan broj krivo pocijepanih veza: 2.

3.7 Analiza uzoraka staničnog sekretoma i proteoma pomoću tekućinske kromatografije spregnutom masenim spektrometrom (LC-MS/MS)

3.7.1 Priprema uzoraka staničnog sekretoma za LC-MS/MS analizu

Za svaki uzorak kondicioniranog medija uzet je volumen koji odgovara 20 µg proteina i dodan je 20 %-tni natrijev dodecilsulfat do konačne koncentracije od 4 %. Uzorci su kuhani 10 minuta pri 95°C uz trešnju od 800 RPM na termotresilici (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Uzorci proteina reducirani su s 5 mM DTT u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi te alkilirani s 15 mM jodoacetamidom pri 50°C u trajanju od 30 minuta u mraku. Uzorci su potom obrađeni korištenjem metode poboljšanog pripremanja uzorka u jednoj epruveti (SP3, engl. single-pot solid-phase enhanced sample preparation 3) (166,167). Ukratko, pročišćavanje proteina, digestija i pročišćavanje peptida provedeno je u KingFisher Flex sustavu (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) s karboksilatom modificiranim magnetskim česticama (GE Life Sciences, Chicago, IL, SAD; GE65152105050250, GE45152105050250). Magnetske kuglice kondicionirane su prema uputama proizvođača tako da su isprane 3 puta vodom u koncentraciji od 1 µg/µL. Uzorci su razrijeđeni u 100 %-tnom etanolu do krajnje koncentracije od 50 % etanola. Magnetske kuglice, otapala za ispiranje i uzorci naneseni su na pločice s 96 jažica i umetnuti u KingFisher robot. U robotu su izvršeni sljedeći koraci: prikupljanje magnetskih kugla od posljednjeg ispiranja, vezanje proteina na kuglice, ispiranje kuglica u 80 %-tnom etanolu, digestija proteina preko noći na 37°C u omjeru tripsin:protein 1:50 u 50 mM trietilamonijevom bikarbonatu te eluiranje peptida s magnetskih kuglica s miliQ vodom. Supernatant prikupljen prilikom digestije proteina i vodena elucija peptida pomiješane su i potpuno osušene te je uzorak ponovno otopljen u 15 µL pufera za masenu spektrometriju sastava 3 % acetonitrila/0.1 % mravlje kiseline.

3.7.2 Priprema uzoraka staničnog proteoma za LC-MS/MS analizu

Stanice su lizirane u puferu koji je sadržavao 4 % natrijevog dodecilsulfata prije kuhanja pri 95 °C u trajanju od 10 minuta. Dvadeset µg proteina uzeto je i reducirano s 5 mM DTT tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je uslijedila alkilacija s 15 mM jodoacetamidom pri 50 °C tijekom 30 minuta u mraku. Uzorci su obrađeni korištenjem metode poboljšanog pripremanja uzorka u jednoj epruveti (SP3) (166). Pročišćavanje proteina, probava i čišćenje peptida provedeni su korištenjem KingFisher Flex sustava (Thermo Fisher Scientific, SAD) i karboksilatom modificiranih magnetskih čestica (GE Life Sciences, SAD; GE65152105050250, GE45152105050250) kako je prethodno opisano (168). Nakon obrade, peptidi su

ponovno otopljeni u 15 µL MS pufera uzorka sastava 3 % acetonitrila/0,1 % mravlje kiseline.

3.7.3 Prikupljanje LC-MS/MS podataka staničnog sekretoma

Analiza je provedena na Q Exactive HF masenom spektrometru (ThermoFisher Scientific, SAD) opremljenim s Digital PicoView izvorom iona (New Objective, Littleton, MA, SAD) i povezanim s M-Class UPLC sustavom (Waters, Milford, MA, SAD). Sastav otapala za kanal A bila je 0.1 % mravlja kiselina, a za kanal B 0.1 % mravlja kiselina/99.9 % acetonitril. Kolona je temperirana na 50°C. Za svaki su uzorak 2 µL peptida nanesena na komercijalno dostupnu ACQUITY UPLC M-Class Symmetry C18 Trap kolonu (100Å, 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters, SAD) povezanu s ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 kolonom (100Å, 1.8 µm, 75 µm x 250 mm, Waters, SAD). Protok otapala bio je 300 nL/min. Koraci su u tekućinskoj kromatografiji bili sljedeći: 3 minute 5 % B, gradijent od 5 % do 24 % B u trajanju od 80 minuta, gradijent od 24 % do 36 % B u trajanju od 10 minuta. Kolona je isprana podizanjem na 95 % B u trajanju od 10 minuta prije postavljanja uvjeta za nanošenje uzoraka. Uzorci su nasumično analizirani. Maseni je spektrometar radio u načinu rada ovisnom o podatcima (engl. data-dependent mode, DDA) za top 12 najjačih iona koristeći Xcalibur (tune verzija 2.9), voltaža raspršivanja bila je 2.3 kV, radiofrekvencija lijevka iona bila je na 60 %, a temperatura kapilare 275°C. Maseni spektri cijelog područja prikupljeni su u području od 350 do 1.500 m/z u rezoluciji 120.000 pri 200 m/z nakon akumulacije do razine 100.000 potrebne za postizanje automatske kontrole pojačavanja (engl. automatic gain control, AGC) ili nakon maksimalnog vremena injektiranja od 50 ms. Prekursori s intenzitetom iznad 4.500 odabrani su za MS/MS. Ioni su izolirani koristeći kvadrupolni maseni filter s prozorom izolacije od 1.2 m/z i fragmentirani visokoenergetskom kolizijskom disocijacijom (engl. higher-energy collisional dissociation, HCD) normalizirane energije kolizije od 28 %. MS2 spektri prikupljeni su pri rezoluciji od 35.000 i maksimalnom vremenu injektiranja od 54 ms. Uključeno je praćenje naboja i pojedinačno nabijena stanja neodređenog naboja, a stanja s više od sedam naboja isključena su iz analize. Prekursori su masa prethodno odabrani za MS/MS mjerenje također isključeni. Uzorci su analizirani koristeći interne kalibrante pri m/z 371.1012 i 445.1200. Prikupljeni podatci obrađeni su na lokalnom laboratorijskom sustavu za menadžment informacija (LIMS, engl. laboratory information management system).

3.7.4 Prikupljanje LC-MS/MS podataka staničnog proteoma

Analiza masene spektrometrije provedena je na Q Exactive HF masenom spektrometru (Thermo Scientific) opremljenom izvorom Digital PicoView (New Objective, SAD) i spojenom na M-Class UPLC (Waters, SAD). Za svaki uzorak, 2 µL peptida naneseno je na komercijalnu ACQUITY UPLC M-klasu Symmetry C18 trap

kolonu (100Å, 5 µm, 180 µm × 20 mm, voda), a zatim ACQUITY UPLC M-klasu HSS T3 kolonu (100Å , 1.8 µm, 75 µm × 250 mm, Waters, SAD). Peptidi su eluirani pri brzini protoka od 300 nL/min s gradijentom od 5 % do 24 % B u 80 minuta i 24 % do 36 % B u dodatnih 10 minuta. Kolona je očišćena nakon ciklusa povećanjem na 95 % B i držanjem 95 % B 10 minuta prije ponovnog uspostavljanja uvjeta punjenja. Uzorci su mjereni slučajnim redoslijedom. Maseni spektrometar radio je u DDA načinu rada za prvih 12 najzastupljenijih iona pomoću Xcalibura (verzija 2.9) s naponom raspršivanja postavljenim na 2.3 kV, RF razinom lijevka na 60 %, i temperaturom grijane kapilare na 275 °C. MS spektri punog skeniranja (350-1500 m/z) dobiveni su pri rezoluciji od 120.000 pri 200 m/z nakon akumulacije do ciljne vrijednosti AGC od 100.000 ili za maksimalno vrijeme ubrizgavanja od 50 ms. Prekursori intenziteta iznad 4.500 odabrani su za MS/MS i podvrgnuti dinamičkom isključivanju od 30 s. loni su izolirani korištenjem kvadrupolnog masenog filtra s izolacijskim prozorom od 1.2 m/z i fragmentirani pomoću HCD korištenjem normalizirane energije sudara od 28 %. MS2 spektri snimljeni su pri rezoluciji od 35.000 i maksimalnom vremenu ubrizgavanja od 54 ms. Omogućen je pregled stanja napunjenosti, a isključena su pojedinačno nabijena stanja, stanja neodređenog naboja i stanja s viša od sedam naboja. Podatci proteomike masene spektrometrije obrađeni su korištenjem lokalnog sustava LIMS (169).

3.7.5 Analiza podataka LC-MS/MS

Analiza podataka prikupljenih metodom LC-MS/MS izvedena je na isti način za podatke staničnog proteoma i sekretoma.

Prikupljene neobrađene MS podatke obradio je MaxQuant (verzija 1.6.2.3) nakon čega je uslijedila identifikacija proteina pomoću integrirane tražilice Andromeda (169). Spektri su pretraženi prema referentnom proteomu Uniprot Homo sapiensa (taksonomija 9606, kanonska verzija od 9. srpnja 2019.), spojenim s njegovom obrnutom bazom podataka fasta i uobičajenim kontaminantima proteina. Karbamidometilacija cisteina postavljena je kao fiksna modifikacija, dok su oksidacija metionina i acetilacija N-terminalnog proteina postavljene kao varijabilne. Specifičnost enzima postavljena je na tripsin/P dopuštajući minimalnu duljinu peptida od sedam aminokiselina i maksimalno dva propuštena cijepanja. Korištene su zadane postavke pretraživanja MaxQuant Orbitrap. Maksimalna stopa lažnog otkrivanja (FDR, engl., false discovery rate) postavljena je na 0.01 za peptide i 0.05 za proteine. Omogućena je kvantifikacija bez oznake (engl. label-free quantification) i primijenjen je dvominutni prozor za podudaranje između ciklusa. U MaxQuant predlošku eksperimentalnog dizajna svaka se datoteka drži zasebno u eksperimentalnom dizajnu kako bi se dobile pojedinačne kvantitativne vrijednosti. Omjer promjene (FC, engl. fold change) vrijednost proteina izračunat je na temelju

vrijednosti intenziteta. Skup funkcija implementiranih u R paketu SRMService (170) korišten je za filtriranje proteina s dva ili više peptida i za normalizaciju podataka s modificiranom robusnom transformacijom z-rezultata i za izračunavanje p-vrijednosti pomoću t-testa sa skupnom varijancom. Ako nedostaju sva mjerenja proteina u jednom od uvjeta, izračunat je pseudo omjer promjene zamjenjujući nedostajući prosjek grupe s prosjekom od 10 % najmanjeg intenziteta proteina u tom stanju.

Proteomski podatci masene spektrometrije pohranjeni su u ProteomeXchange Consortium preko PRIDE [http://www.ebi.ac.uk/pride] partnerskog repozitorija s identifikatorom skupa podataka PXD042499 za stanični proteom, odnosno PXD039766 za stanični sekretom.

3.8 Bioinformatička analiza staničnog sekretoma

Analiza ontologije gena (engl. gene ontology, GO) provedena je u svrhu rasvjetljavanja bioloških funkcija identificiranih proteina (171,172). Analiza je funkcionalnu pomoću DAVID platforme provedena za anotaciju (https://david.ncifcrf.gov/) (173,174), a GO termini s p < 0,05 smatrani su statistički značajni. Identifikacija uključenih signalnih putova provedena je pomoću Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (175) i Reactome baze podataka (176). Protein – protein interakcijske (PPI) mreže izrađene su pomoću online platforme Search Tool for Retrieval of Interacting Genes (STRING v11.0) (177) sa snagom pouzdanosti 0,900 (najviša pouzdanost). PPI mreža je vizualizirana i obrađena u softveru Cytoscape v3.9.1 (178). Svaki čvor u interakcijskoj mreži predstavlja sve iteracije proteina, uključujući sve moguće post-translacijske modifikacije, a veze između čvorova predstavljaju interakcije proteina koje sudjeluju u određenoj biokemijskoj funkciji ili signalnom putu. U svrhu identifikacije značajnih modula unutar PPI mreže korišten je dodatak Molecular Complex Detection (MCODE) (179), a za identifikaciju proteinskih klastera mreže je korišten dodatak cytoHubba (180).

In silico validacija odabranih kandidata proteina na razini mRNA je napravljena u setu podataka *PanCancer Atlas* unutar baze podataka *The Cancer Genome Atlas* (TCGA; adenokarcinom debelog crijeva), dostupno unutar online platforme *cBioPortal for Cancer Genomics*. Validacija na razini proteinske ekspresije napravljena je na javno dostupnim podatcima *Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium* (CPTAC), također unutar cBioPortala (181,182). Analiza ukupne ekspresije odabranih proteina na histološkim uzorcima napravljena je na podatcima CPTAC i *International Cancer Proteogenome Consortium* (ICPC) bazama podataka

unutar portala University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis (UALCAN) (183).

3.9 Bioinformatička analiza staničnog proteoma

3.9.1 Rekonstrukcija i analiza mreže pomoću STRING-a

STRING bazu podataka (STRING Consortium) (184) čine SIB – Švicarski institut za bioinformatiku, CPR – Novo Nordisk Foundation Center za istraživanje proteina i EMBL – Europski laboratorij za molekularnu biologiju. STRING baza podataka integrira i statistički potvrđuje težine interakcija protein-protein iz više pouzdanih izvora i uključuje 24.584.628 proteina i 3.123.056.667 ukupnih interakcija proteina (s 530.027.879 interakcija sa srednjom ili boljom pouzdanošću (rezultat ≥ 0.400)). U STRING bazi podataka svaka protein-protein interakcija označena je s jednim ili više "bodova". Važno je napomenuti da ti rezultati ne ukazuju na snagu ili specifičnost interakcije, već su oni pokazatelji pouzdanosti, koliko je vjerojatno da STRING procjenjuje da je interakcija istinita s obzirom na dostupne dokaze. Svi rezultati rangirani su od 0 do 1, pri čemu je 1 najveća moguća pouzdanost. Rezultat od 0.5 znači da bi otprilike svaka druga interakcija mogla biti pogrešna, odnosno lažno pozitivna.

U STRING *evidence view*, specifičnom načinu prikazivanja interakcija, svaki rub predstavlja ocijenjeni dokaz o specifičnoj i značajnoj funkcionalnoj povezanosti između dva proteina koji doprinose zajedničkoj funkciji (ne nužno fizička interakcija). Interakcije mogu biti poznate (eksperimentalno utvrđene, dohvaćene iz odabranih baza podataka) ili predviđene iz susjedstva genoma, genske fuzije i supojavljivanja gena, koekspresije, zajedničkog spominjanja u literaturi ili homologije proteina, a označene su pripadajućom bojom. U prikazu pouzdanosti jedan ponderirani rub predstavlja kombinirane rezultate dokaza (*evidence score*). U ovoj analizi koristili smo pročišćene podatke postavljajući visoki STRING prag interakcijskog rezultata od >0.7. Proteini različito izraženi u rezistentnim naspram osjetljivih stanica (log2(FC) i p-vrijednosti < 0.05) iz LC-MS/MS i MALDI-TOF MS proteomskih podataka korišteni su za generiranje mreže na temelju svih dokaza o interakciji proteina/gena koji su dostupni iz baze podataka STRING. Svi nepovezani čvorovi zanemareni su u prikazu. Tablice s popisom svih povezanih čvorova i kombinirani rezultati svih rubova uvezeni su u softver Cytoscape 3.8.2.

U rekonstruiranim i analiziranim mrežama čvorovi predstavljaju sve proteine koje kodira jedan gen (uključujući splice izoforme ili posttranslacijske modifikacije). Lokacija čvorova u mreži odgovara indeksu centralnosti čvora, tako da su čvorovi s najjačim utjecajem na mrežu prikazani u središnjem dijelu mreže.

Kao dio STRING-ove funkcionalne analize, odabrane funkcionalne kategorije projicirane su na mrežu putem obojanih čvorova navedenih u odabranoj ontološkoj kategoriji: GO Biološki proces, KEGG putovima ili Reactomeu. Za definiranje mrežnih modula s najjačom međusobnom povezanosti izvršeno je K-means klasteriranje čvorova pomoću STRING-integriranog alata za klasteriranje. STRING analiza funkcionalnog obogaćenja mreže korištena je za određivanje funkcionalnih grupa u KEGG i terminima GO bioloških procesa, specifičnim za svaku mrežu.

3.9.2 Rekonstrukcija i analiza mreža pomoću platforme Cytoscape Cytoscape 3.8.2 (185) korišten je za određivanje topoloških karakteristika povezanosti proteina od interesa u rekonstruiranoj mreži.

Aplikacijom "Analiziraj mrežu" dohvaćane su topološke karakteristike mreže u odnosu na svaki čvor unutar mreže. *Edge-weighted Spring Embedded Layout* primijenjen je za demonstraciju aspekata povezanosti mreže izračunatih pomoću STRING-a. *Prefuse Force Directed OpenCL Layout* (s odabranom opcijom *Edge Betweenness*) korišten je za provedbu demonstracije povezivosti čvora.

Topološka analiza mreže podrazumijevala je analizu sljedećih karakteristika. Prosječna duljina puta definirana je kao prosječan broj koraka duž najkraće staze za sve moguće parove mrežnih čvorova te je to mjera učinkovitosti prijenosa informacija u mreži. *Betweenness centrality* kvantificira koliko puta čvor djeluje kao most duž najkraćeg puta između dva druga čvora. Blizinska centralnost (engl. *Closeness centrality*) način je otkrivanja čvorova koji mogu vrlo učinkovito širiti informacije u grafu. Blizinska centralnost čvora mjeri njegovu prosječnu udaljenost od svih ostalih čvorova. Čvorovi s visokim rezultatom blizine imaju najkraću udaljenost od svih ostalih čvorova. Koeficijent klasteriranja mjera je stupnja do kojeg čvorovi u grafu imaju tendenciju skupljanja zajedno. Ekscentricitet pokazuje koliko putanja varira od kružne te su veći ekscentriciteti manje zakrivljeni.

Broj čvorova korištenih u ovoj analizi bio je relativno malen, međutim, povezanost je premašila očekivanu na temelju prosječne/nasumične povezanosti svih proteina zabilježenih u bazi podataka STRING i imala je pouzdanost povezivanja od 10⁻¹⁶ s oko 50 % veza koje premašuju očekivani broj u svakoj rekonstruiranoj mreži. Na ovu ocjenu nije utjecala prisutnost ili odsutnost skupa proteina relevantnih za otpornost dodanih u proširenim mrežama, što sugerira snažnu funkcionalnu međupovezanost većine različito izraženih proteina otkrivenih proteomskom analizom.

3.10 Test vijabilnosti stanica

Vijabilnost stanica procijenjena je pomoću MTT testa. Ukratko, stanice su nasađene na mikrotitarske pločice s 96 jažica pri gustoći od 3.000 stanica po jažici. Sljedeći su dan stanice tretirane odabranim ispitivanim agensima u pet deseterostrukih serijskih razrjeđenja (u rasponu od 10^{-4} do 10^{-8} µM) i inkubirane 72 sata. MTT test proveden je prema uputama proizvođača (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon 72-satnog perioda tretmana stanice su inkubirane s MTT reagensom 3 sata u mraku nakon čega je uslijedio dodatak dimetil sulfoksida (Sigma-Aldrich, SAD). Apsorbancija je mjerena korištenjem Tecan SPARK višemodnog čitača mikropločica (Tecan Life Sciences, Männedorf, Švicarska) na 570 nm. Inhibitorne i letalne koncentracije (IC50 odnosno LC50) izračunate su uporabom linearne regresijske analize.

Kombinirani tretmani rezistentne stanične linije RKO provedeni su korištenjem pet dvostrukih serijskih razrjeđenja koncentracija vemurafeniba IC50 (55,81, 27,91, 13,96, 6,98 i 3,49 μ M) u kombinaciji s tri dvostruka razrjeđenja koncentracija IC50 inhibitora ezrina (NSC305787; MedChemExpress, SAD) (6,44, 3,22 i 1,61 μ M), a kombinirani tretmani rezistentne stanične linije A375 provedeni su upotrebom pet dvostrukih serijskih razrjeđenja koncentracija IC50 vemurafeniba (54,50, 27,25, 13,63, 6,81 i 3,41 μ M) u kombinaciji s tri dvostruka razrjeđenja IC50 koncentracija inhibitora ezrina (68, 34 i 17 μ M). Nakon tretmana tijekom 72 sata preživljenje stanica procijenjeno je korištenjem MTT testa kao što je gore opisano. Indeks kombinacije (CI) izračunat je pomoću softvera CompuSyn (186). Vrijednosti indeksa kombinacije (CI) koje odgovaraju < 1, = 1 i > 1 ukazuju na sinergiju, aditivnost, odnosno antagonizam. Svaki pokus izveden je kao tetraplikat u tri biološka pokusa.

3.11 Western Blot analiza

Za Western blot analizu, stanice su nasađene u mikropločice sa šest jažica u gustoći od 1.5 × 10⁵ stanica po jažici i uzgajane tijekom navedenog razdoblja u prisutnosti, odsutnosti ili kombinaciji vemurafeniba i inhibitora ezrina. Nakon inkubacije stanice su lizirane korištenjem RIPA pufera sastava: 25 mM Tris-HCI (pH 7.4, Sigma-Aldrich, SAD), 1 % NP-40 (Sigma-Aldrich, SAD), 0.5 % natrijevog deoksikolata (Sigma-Aldrich, SAD), 0.1 % SDS (Sigma-Aldrich, SAD), 150 mM natrijeva klorida (Sigma-Aldrich, SAD) dopunjenog koktelima inhibitora fosfataza (Roche, Švicarska) i koktelima inhibitora proteaza (Roche, Švicarska). Ukupno 50 µg proteina razdvojeno je na 12 % SDS-PAGE gelovima i preneseno na PVDF membrane (BIO-RAD, SAD). Membrane su blokirane u 5 % goveđem serumskom albuminu (BSA, engl., *bovine serum albumin*; PAN-Biotech, Njemačka) pripremljenom u trisom puferiranoj otopini s dodanim Tween20 deterdžentom (TBST, engl. *tris-buffered saline with Tween20*)

i inkubirane s primarnim antitijelima protiv ezrina, kaveolina, CD44 i c-MYC (sva razrijeđena u omjeru 1:1000, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, SAD) i fosfo-ezrin T567 (razrjeđenje 1:1000; St. John's Laboratory, London, Ujedinjeno Kraljevstvo) preko noći na 4°C. Sljedećeg dana membrane su isprane TBST puferom i ispitane sekundarnim kozjim protutijelima usmjerenima na zečja protutijela (u razrjeđenju 1:2000, Cell Signaling Technologies, SAD).

Proteinske trake vizualizirane su pomoću Amersham[™] ECL[™] Prime Western blotting reagensa za detekciju (Cytiva, Little Chalfont, UK) i Amersham Imager 600 (GE Healthcare, SAD). Relativna ekspresija proteina analizirana je u QuantityOne 1-D Analysis softveru (BIO-RAD, SAD). Intenziteti proteinskih traka normalizirani su u odnosu na intenzitet ukupnog proteina za svaki pojedinačni uzorak. Ukratko, prije inkubacije s protutijelima membrane su obojene Coomassie bojom i vizualizirane pomoću Amersham Imager 600 (GE Healthcare, SAD). Dobivene su slike denzitometrijski analizirane kako bi se odredila ukupna količina nanesenog proteina za svaki uzorak. Obojene membrane su zatim temeljito isprane s TBST-om kako bi se uklonila boja, a potom su blokirane i inkubirane s protutijelima na gore opisani način. Denzitometrijski podatci proteina od interesa normalizirani su prema ukupnoj količini nanesenog proteina. Svi eksperimenti izvedeni su u tri biološka replikata. Statistička analiza izvedena je pomoću ANOVA (p < 0.05).

3.12 Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu

Ekstrahirana je ukupna stanična RNA iz dva neovisna eksperimenta pomoću RNeasy Mini kita (Qiagen, Hilden, Njemačka) i kvaliteta ekstrahirane RNA potvrđena je elektroforezom (RNA ScreenTape Analysis, Agilent TapeStation 4200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Nakon kontrole kvalitete određena je koncentracija ekstrahirane RNA (Qubit RNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD). 1 µg RNA tretirano je s DNazom I (DNase I, Thermo Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Dva mikrolitra RNA tretirane DNazom (200 ng) obrnuto je transkribirano (FIREScript® RT cDNA synthesis KIT, Solis Bodyne, Tartu, Estonija). Za analizu ekspresije kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu (qPCR) cDNA je razrijeđena u H₂O (omjer 1:1) i 1 µL korišteno je u reakciji sa Sybr Green reagensom (Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix with Low ROX , Agilent, SAD) na Agilent AriaMx Real-Time PCR sustavu 5 (Agilent, SAD). Sve reakcije izvedene su u triplikatu, a ekspresija EZR gena normalizirana je na kućni gen GAPDH metodom $\Delta\Delta$ Ct. Tablica 1. prikazuje popis korištenih početnica (Macrogen, Maastricht, Nizozemska).

Tablica 1. Popis korištenih početnica.

Primer	Sequence (5'-3')	Ta/°C
For_EZR	TGTGGTACTTTGGCCTCCAC	60
Rev_EZR	TCTCCTTCCTGACCTCCTGG	60
For_GAPDH	TCAAGGCTGAGAACGGGAAG	60
Rev_GAPDH	CGCCCCACTTGATTTTGGAG	60

3.13 Detekcija apoptoze korištenjem Annexin V FITC testa

RKO stanice rezistentne na vemurafenib i A375 stanice rezistentne na vemurafenib nasađene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica u gustoći od 6.000 stanica po jažici i 24 sata nakon nasađivanja tretirane su odgovarajućim kombinacijama tretmana. RKO stanice rezistentne na vemurafenib tretirane su vemurafenibom (27.91 μ M), inhibitorom ezrina (1.61 μ M) i njihovom kombinacijom, dok su stanice A375 rezistentne na vemurafenib tretirane vemurafenibom (27.25 μ M), inhibitorom ezrina (17 μ M) i njihovom kombinacijom. Nakon 48 sati tretmana stanice su isprane i obojene Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection kitom (ab14085, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) prema uputama proizvođača. Slike su snimljene pomoću ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging sustava (Molecular Devices, San Jose, CA, SAD) korištenjem objektiva Nikon 20x Ph1 S Plan Fluor ELWD (Nikon, Tokio, Japan) ispod 50 μ m proreza IXConfocal modula geometrije diska.

Slike istog vidnog polja dobivene su pod propusnim svjetlom (TL50), FITC i Cy3 filtrima, različiti kanali spojeni su u ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, SAD) i stanice su prebrojane i podijeljene u kategorije (nepogođene stanice, rana apoptoza, kasna apoptoza/nekroza).

4 Rezultati

4.1 Profiliranje sekretoma BRAFV600E-mutiranih stanica raka debelog crijeva sa stečenom rezistencijom na BRAF inhibitor vemurafenib

4.1.1 Optimizacija uvjeta uzgoja stanica za skupljanje sekretoma

Prikupljanje staničnog sekretoma iz kondicioniranog medija za proteomske analize izazovno je zbog smanjene stanične vijabilnosti s obzirom na to da uvjeti uzgoja bez dodanog seruma za prikupljanje sekretoma općenito izazivaju stanični stres koji može dovesti do apoptoze. Zbog toga je važno optimirati uvjete uzgoja kao što su gustoća nasađivanja stanica i vrijeme inkubacije u uvjetima bez dodanog seruma kako bi se osiguralo da prikupljeni sekretom odražava stvarnu biologiju stanica raka, a ne staničnu smrt uzrokovanu uvjetima uzgoja. Vemurafenib-osjetljive RKO stanice uzgajane su u uvjetima bez dodanog seruma u periodima od 6, 12, 24, 36, 48 i 72 sata, a njihova vijabilnost provjeravana je testom isključenja tripanskog modrila (prikazano na slici 6.).



Slika 6. Morfološke promjene osjetljivih RKO stanica uzgajanih u uvjetima bez dodanog seruma. Stanice su nasađene pri gustoći nasađivanja od 1x10⁶ na Petrijevu zdjelicu od 100 mm, a njihova morfologija ispitana je svjetlosnim mikroskopom (10x povećanje) u naznačenim vremenskim točkama.

Istaknute promjene u staničnoj morfologiji i gustoći vidljive su nakon 48 sati inkubacije, a nakon 72 sata inkubacije u uvjetima bez dodanog seruma vidljiva je promjena stanične morfologije u sferične stanice što upućuje na proces apoptoze (slika 6.).



Slika 7. Kvantifikacija vijabilnih osjetljivih stanica RKO nakon uzgajanja u uvjetima bez dodanog seruma. Preživljavanje stanica mjereno je testom isključivanja tripanskog modrila kako bi se istražio učinak različitih vremena inkubacije na preživljavanje stanica.

Stanična je vijabilnost najviša pri 24 sata gdje doseže 97 %, a od 36 sati inkubacije prema 72 sata značajno opada (slika 7.). Na temelju ovih saznanja odabran je period inkubacije u trajanju od 24 sata kao optimalan za prikupljanje sekretoma za nizvodne analize što odgovara prijašnjoj studiji u kojoj je pokazano da kinetika sekrecije proteina, neovisno o načinu sekrecije, doseže svoj vrhunac između 24 i 48 sati inkubacije (187).

Zatim smo istražili utjecaj različitih gustoća nasađivanja stanica na staničnu vijabilnost tijekom 24-satnog perioda inkubacije u mediju bez dodanog seruma. Zaključili smo da stanice održavaju 95 %-tnu vijabilnost pri gustoći od 4 x 10⁶ stanica (slika 8.a) što je prihvatljiva razina vijabilnosti za analize sekretoma *in vitro* staničnih kultura (188). Mikroskopskom provjerom dodatno je potvrđeno da pri gustoći od 4 x 10⁶ stanice ne mijenjaju svoju morfologiju u usporedbi sa stanicama pri manjim gustoćama nasađivanja (slika 8.b) pa je stoga ova gustoća nasađivanja uzeta kao standard za sve daljnje pokuse.



Slika 8. Optimizacija gustoće nasađivanja osjetljivih RKO stanica za prikupljanje sekretoma prije nizvodnih proteomskih analiza. Stanice su nasađene u tri različite gustoće kako je naznačeno i rasle su 24 sata u mediju bez seruma. (a) Preživljavanje stanica mjereno je testom isključenja tripanskog modrila, (b) a morfologija stanica praćena je svjetlosnim mikroskopom pri 10x povećanju.

Zamjena staničnog medija s medijem bez dodanog seruma uzrokuje stanični stres zbog nedostatka faktora rasta i ostalih proteina koji podržavaju normalan rast stanica. Zbog toga je potrebno adaptirati stanice na uvjete bez seruma izravno ili uz nekoliko koraka. Kako bi istražili način na koji proces adaptacije utječe na sekretom RKO stanica, provedena su dva načina adaptacije:

- 1. stanicama je medij uklonjen, adherirane stanice su isprane s PBS-om, dodan je stanični medij bez seruma i stanice su uzgajane 24 sata;
- stanicama je uklonjen medij, provedena je jednosatna predinkubacija u mediju bez dodanog seruma koji je potom uklonjen i stanicama je dodan svježi medij bez seruma u kojem su uzgajane 24 sata.

Prikupljeni stanični sekretomi analizirani su pomoću 2-DE gel elektroforeze (slika 9.). Lijevi panel slike 9. prikazuje prvi način adaptacije na medij bez seruma, a desni panel drugi način adaptacije. U desnom panelu vidljivo je da sekretom sadrži više proteinskih točaka u odnosu na lijevi panel, posebice proteinskih točaka manje molekularne težine vidljivih u donjoj regiji gela, stoga je drugi način adaptacije implementiran u protokol za prikupljanje sekretoma za sve daljnje proteomske analize.



Slika 8. Učinak postupka prilagodbe na uvjete rasta bez seruma na kvalitetu sekretoma osjetljivih RKO stanica. U izravnoj adaptaciji stanice su izravno prebačene iz medija koji je sadržavao serum u medij bez seruma nakon opsežnog ispiranja s PBS-om da bi se uklonio serum i uzgajane su 24 sata (lijevi panel). U adaptaciji s jednosatnom predinkubacijom stanicama je uklonjen medij sa serumom, isprane su PBS-om te im je dodan medij bez seruma. Nakon jednog sata medij je uklonjen, a stanicama je dodan svježi medij bez dodanog seruma u kojemu su uzgajane sljedeća 24 sata (desni

panel). Stanični su sekretomi obiju adaptacija prikupljeni i analizirani pomoću 2-DE gel elektroforeze, a dobiveni gelovi su vizualno pregledani.

4.1.2 Komparativna analiza sekretoma osjetljivih i vemurafenib-rezistentnih stanica raka debelog crijeva RKO s mutacijom BRAFV600E temeljena na masenoj spektrometriji

Nakon optimizacije uvjeta uzgoja stanica za prikupljanje sekretoma, provedene su analize sekretoma osjetljivih stanica u odnosu na vemurafenib-rezistentne RKO stanice koristeći dva komplementarna pristupa, 2-DE gel elektroforezu (pH 4-7) spregnutu s MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom i kvantitativni LC-MS/MS bez označavanja. 2-DE/MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom identificirana su 23 diferencijalno izražena proteina sa statističkom značajnošću (p <0.05), od kojih je devet pojačano, a 14 smanjeno izraženo u sekretomu rezistentnih stanica (Tablice 1. i 2. u Prilogu). Kvantitativnom LC-MS/MS analizom bez označavanja identificirana su 282 diferencijalno izražena proteina (p <0.05, log2(FC) >1), od kojih je 201 pojačano, a 81 smanjeno izražen u sekretomu rezistentnih stanica (Tablice 3. i 4. u Prilogu).

4.1.3 Bioinformatička analiza sekretoma BRAFV600E-mutiranih RKO stanica raka debelog crijeva

Podatci masenih spektrometrija objedinjeni su kako bi se dobili potpuni popisi pojačano i smanjeno izraženih proteina te su potom analizirani koristeći bioinformatičke alate u svrhu integracije podataka i biološke interpretacije.

4.1.3.1 Pojačano izraženi proteini sekretoma

4.1.3.1.1 Funkcionalna analiza i analiza signalnih putova

Provedene su GO i KEGG funkcionalne analize te analiza signalnih putova koristeći platformu DAVID. Za kriterij odabira postavljena je statistička značajnost (p < 0.05) dobivenih rezultata. Dodatne analize signalnih putova napravljene su koristeći REACTOME bazu podataka. Slike 10.a-c prikazuju 10 najvažnijih GO termina podijeljenih u tri kategorije – biološki procesi, molekularne funkcije i stanična komponenta. Na slikama 10.d-e prikazano je 10 najvažnijih signalnih putova prema bazama podataka KEGG i REACTOME za pojačano izražene proteine sekretoma. Unutar kategorije 'biološki procesi' proteini vemurafenib-rezistentnih stanica najviše su zastupljeni u procesima povezanim s DNA replikacijom i unutarstaničnim transportom proteina (slika 10.a). U kategoriji 'molekularne funkcije' proteini su najzastupljeniji u procesima proteinskog vezanja, RNA vezanja i ATP vezanja (slika 10.b), dok su u kategoriji 'stanične komponente' najprisutniji u citosolu, citoplazmi i

jezgri (slika 10.c). Prijašnjim studijama pokazano je da neklasično izlučeni proteini čine znatni udio sekretoma staničnih linija raka te da mnogi proteini, koji se uobičajeno mogu pronaći unutar unutarstaničnih organela, mogu također biti izlučeni u stanični sekretom (187,189). KEGG analizom staničnih putova pokazano je da su proteini pojačano zastupljeni u putovima koji reguliraju DNA replikaciju i metaboličke procese uključujući metabolizam aminokiselina (glicin, serin i treonin) i metabolizam nukleotidnih šećera (slika 10.d). REACTOME analiza (slika 10.e) pokazala je da su pojačano izraženi proteini značajno zastupljeni u signalnim putovima povezanim s DNA replikacijom, prekrajanjem mRNA i biosintezom serina.

Temeljem ovih rezultata može se zaključiti da promijenjena regulacija replikacije DNA i metabolizma aminokiselina čine važne značajke sekretoma vemurafenibrezistentnih stanica raka debelog crijeva mutacijom BRAFV600E.





Slika 9. Prikaz 10 najvažnijih GO pojmova (a-c) i signalnih putova (d-e) obogaćenih pojačano izraženih proteina povezanih s rezistencijom na vemurafenib u RKO stanicama raka debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E. Samo oni GO pojmovi i putovi s p <0.05 smatrani su statistički značajnima. Metab. – metabolizam, ATP – adenozin-trifosfat.

4.1.3.1.2 Mreža interakcija između proteina (PPI) i analiza modula

Alat STRING korišten je za analizu PPI mreža seta podataka pojačano izraženih proteina. Pri analizi je kao uvjet postavljen najviši interakcijski kriterij od 0.900, a dobivena PPI mreža uvezena je u softveru Cytoscape gdje je vizualizirana i obrađena dostupnim alatima. Tablica 2. sadrži osnovne podatke PPI mreže (prikazane na slici 11.a) pojačano izraženih proteina sekretoma dobivene alatom STRING.

Tablica 2. Prikaz podataka PPI mreže pojačano izraženih proteina staničnog sekretoma.

Podatci	Rezultat
Broj čvorova	208
Broj rubova	128
Prosječni broj interakcijskih čvorova	1.23
Prosječni koeficijent lokalnog klasteriranja	0.344
p-vrijednost obogaćene PPI mreže	8.66 · 10 ⁻¹⁵

Kako bi se identificirali klasteri, odnosno područja veće međusobne povezanosti proteina u PPI mreži, korišten je MCODE dodatak softveru Cytoscape. MCODE omogućuje identifikaciju najvažnijih modula u mreži koristeći kriterije prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Odabrane postavke za analizu PPI mreže u MCODE dodatku.

MCODE kriteriji odabira	Vrijednosti
MCODE vrijednost	≥ 4
Broj čvorišta	≥ 4
Granična vrijednost klasteriranja	= 2
k-core	= 2
Maksimalna dubina mreže	100

Analizom modula otkriven je jedan značajan modul (slika 11.b) s MCODE vrijednosti 7.429 koji sadržava 8 čvorišta i 26 rubova. Cytoscape dodatak cytoHubba korišten je za analizu čvorišnih proteina u mreži (slika 11.c). Središnji, čvorišni proteini mreže rangirani su prema vrijednostima maksimalne centralnosti klike (MCC, engl. *Maximal Clique Centrality*) (slika 11.d). Proteini s najvišim MCC vrijednostima odabrani su za daljnje *in silico* validacije, a to su proteini: protein održavanja minikromosoma 3 (MCM3, engl. *Minichromosome Maintenance Complex* 3), flap endonukleaza 1 (FEN1, engl. *Flap endonuclease* 1), protein održavanja minikromosoma 5 (MCM5),

protein održavanja minikromosoma 2 (MCM2), protein održavanja minikromosoma 6 (MCM6), nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA, engl. *proliferating cell nuclear antigen*) i replikacijski protein A, 70 kDa DNA-vezujuća podjedinica (RPA1, engl. *replication protein A1 70 kDa DNA-binding subunit*). Svi odabrani čvorišni proteini smatraju se ključnim u replikaciji i popravku DNA što ponovno naglašava važnost ovih procesa za razvoj kemorezistencije kod BRAF-mutiranog raka debelog crijeva.



Slika 10. Konstrukcija i modularna analiza PPI mreže reguliranih proteina i identifikacija čvorišnih proteina. PPI mreža kreirana je u alatu STRING i vizualizirana u softveru Cytoscape (a). MCODE dodatak Cytoscapea korišten je za modularnu analizu PPI mreže gdje je identificiran jedan značajan modul (b). Cytoscape dodatak cytoHubba primijenjen je za identifikaciju čvorišnih proteina na temelju algoritma MCC (c). Rubovi predstavljaju protein-protein asocijacije. Crveni čvorovi predstavljaju proteine s visokim MCC vrijednostima, dok žuti i plavi čvorovi predstavljaju proteine s niskim MCC vrijednostima (c). Proteini s visokim MCC vrijednostima odabrani za daljnje *in silico* analize (d). MCC - engl. *Maximal Clique Centrality*.

4.1.3.1.3 In silico validacija odabranih čvorišnih proteina iz PPI mreže pojačano izraženih

proteina

Biološka važnost čvorišnih proteina zatim je potvrđena u kontekstu specifičnog BRAF-mutiranog genotipa kako bi se identificirali proteini s mogućom translacijskom vrijednošću.

Ekspresija gena koji kodiraju odabrane čvorišne proteine analizirana je u tumorskom tkivu 48 bolesnika s BRAFV600E mutiranim rakom debelog crijeva u odnosu na 478 uzoraka tumora koju ne nose tu mutaciju unutar seta podataka adenokarcinoma debelog crijeva (*Colorectal Adenocarcinoma, PanCancer Atlas*) u bazi podataka *the Cancer Genome Atlas* (TCGA) koristeći *cBioPortal for Cancer Genomics* online platformu. Unutar odabranih gena statistički značajna (p <0.05) pojačana ekspresija mRNA uočena je samo za RPA1, MCM5 i FEN1 u BRAF-mutiranim uzorcima tumora u usporedbi s nemutiranom grupom uzoraka (slike 12.a, 13.a i 14.a). Od ta tri proteina, pojačane razine proteina uočene su samo za RPA1 u BRAFV600E tumorskim uzorcima u usporedbi s nemutiranom grupom uzoraka, ali bez postizanja statističke značajnosti (slike 12.b, 13.b i 14.b), kao što je vidljivo iz razina proteina izmjerenih masenom spektrometrijom dostupnih u bazi podataka CPTAC.

Analiza profila ekspresije proteina provedena je u alatu UALCAN na temelju histologije tumora korištenjem podataka o raku debelog crijeva iz studije CPTAC. Analizom je otkriveno da je samo ekspresija proteina RPA1 značajno povećana kod mucinoznog u odnosu na nemucinozni tip raka debelog crijeva (slike 12.c, 13.c i 14.c). Mucinozna histologija smatra se značajkom BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva (190).

Analiza preživljenja izrađena je u cBioPortal online platformi te je pokazano da, za razliku od MCM5 i FEN1, pojačana ekspresija mRNA proteina RPA1 korelira s kraćim medijanom ukupnog preživljenja bolesnika s BRAFV600E-mutiranim adenokarcinomom i mucinoznim adenokarcinomom debelog crijeva (slike 12.d, 13.d i 14.d). Zajedno, dobiveni rezultati ukazuju na onkogenu ulogu RPA1 proteina u BRAF-mutiranom raku debelog crijeva te sugeriraju da pojedinačna ekspresija RPA1

može biti posebna značajka kemorezistentnog fenotipa BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva.





	Ukupni broj slučajeva	Broj događaja	Ukupni medijan mjeseci (95% CI)
(A) -0.97-0.98	15	4	83.24 (38.07 - NA)
(B) 1.09-2.86	16	5	49.41 (37.02 - NA)

Slika 11. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog kandidata proteina RPA1 (replikacijski protein A1) u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije RPA1 na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Ekspresija proteina RPA1 analizirana je u različitim histološkim tipovima raka debelog crijeva (normalnom, mucinoznom i nemucinoznom) u skupu podataka CPTAC korištenjem portala za analizu podataka UALCAN gdje Z-vrijednosti predstavljaju standardna odstupanja od medijana u uzorcima za zadani tip raka (c). Analiza medijana ukupnog preživljenja RPA1 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (d). Prikazana je povezanost između ekspresije RPA1 mRNA (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke, log(RNASeqV2RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.

d)





b)

c)

Ekspresija proteina MCM5 u raku debelog crijeva



Usporedba	Statistička značajnost
Normalni vs Mucinozni	4.089E-07
Normalni vs Nemucinozni	7.044E-25
Mucinozni vs Nemucinozni	2.149E-01



	Ukupni broj slučajeva	Broj događaja	Ukupni medijan mjeseci (95% CI)
(A) -1.72-0.75	15	2	NA
(B) 0.95-2.48	16	7	49.41 (38.07 - NA)

Slika 12. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata MCM5 (komponenta kompleksa održavanja minikromosoma 5) u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije MCM5 na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Ekspresija proteina MCM5 također je analizirana u različitim histološkim tipovima raka debelog crijeva (normalnom, mucinoznom i nemucinoznom) u skupu podataka CPTAC korištenjem portala za analizu podataka UALCAN gdje Z-vrijednosti predstavljaju standardna odstupanja od medijana u uzorcima za zadani tip raka (c). Analiza medijana ukupnog preživljenja MCM5 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (d). Prikazana je povezanost između ekspresije mRNA MCM5 (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log RNASeqV2RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.

d)





b)

c)

Ekspresija proteina FEN1 u raku debelog crijeva



Usporedba	Statistička značajnost
Normalni vs Mucinozni	3.140E-12
Normalni vs Nemucinozni	7.331E-35
Mucinozni vs Nemucinozni	2.280E-01



Slika 13. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata FEN1 BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije FEN1 na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Ekspresija proteina FEN1 također je analizirana u različitim histološkim tipovima raka debelog crijeva (normalnom, mucinoznom i nemucinoznom) u skupu podataka CPTAC korištenjem portala za analizu podataka UALCAN gdje Z-vrijednosti predstavljaju standardna odstupanja od medijana u uzorcima za zadani tip raka (c). Analiza medijana ukupnog preživljenja FEN1 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (d). Prikazana je povezanost između ekspresije FEN1 mRNA (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log RNASeqV2RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.

4

83.24 (38.07 - NA)

(B) 0.71-2.30

16

4.1.3.2 Smanjeno izraženi proteini sekretoma

4.1.3.2.1 Funkcionalna analiza i analiza signalnih putova

Slično pojačano izraženim proteinima sekretoma provedene su GO i KEGG funkcionalne analize te analiza signalnih putova koristeći platformu DAVID za smanjeno izražene proteine. Kao kriterij odabira GO termina i signalnih putova uzeta je statistička značajnost (p <0,05). Dodatne analize signalnih putova napravljene su koristeći REACTOME bazu podataka. Slike 15.a-c prikazuju 10 najvažnijih GO termina podijeljenih u tri kategorije – biološki procesi, molekularne funkcije i stanična komponenta. Na slikama 15.d-e prikazano je 10 najvažnijih signalnih putova prema bazama podataka KEGG i REACTOME za smanjeno izražene proteine sekretoma.

Smanjeno izraženi proteini bili su više zastupljeni u biološkim procesima povezanima sa smatanjem proteina, angiogenezom, regulacijom stanične proliferacije, apoptozom i staničnom adhezijom (slika 15.a). Unutar molekularne funkcije, smanjeno izraženi proteini pretežito su bili zastupljeni u procesima povezanim s vezanjem integrina, proteaza i šaperona, aktivnošću disulfidne izomeraze (šaperon endoplazmatskog retikuluma koji sudjeluje u odgovoru na nesmotane proteine), vezanjem nerazmotanih proteina, vezanjem homotipskih proteina i vezanjem enzima (slika 15.b). Unutar skupine stanične komponente, smanjeno izraženi proteini bili su zastupljeni u endoplazmatskom retikulumu, staničnoj površini i izvanstaničnom prostoru (slika 15.c). KEGG analizom signalnih putova otkriveni su statistički najznačajniji signalni putovi povezani sa smanjeno izraženim proteinima, a najvažniji su kaskada komplementa i koagulacije te procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu (slika 15.d). REACTOME analizom signalnih putova kao statistički najznačajnijim putem identificirana je organizacija izvanstaničnog matriksa (slika 15.e).

Ovi rezultati upućuju da bi molekularni faktori uključeni u smatanje proteina i njihovo procesiranje u endoplazmatskom retikulumu te odgovor na nerazmotane proteine mogli predstavljati istaknutu značajku smanjeno izraženog sekretornog fenotipa stanica raka debelog crijeva otpornih na vemurafenib s mutacijom BRAFV600E.





Slika 14. Ontologija gena i analiza puta obogaćivanja niza podataka smanjeno izraženih proteina povezanih s rezistencijom na vemurafenib u RKO stanicama raka debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E. Samo oni GO pojmovi i putovi s p <0,05 smatrani su statistički značajnima. Prikazano je 10 najvažnijih GO pojmova i putova, osim kod KEGG gdje je prikazano 8 najvažnijih procesa. PDI – protein-disulfid izomeraza, ER – endoplazmatski retikulum, ERGIC – intermedijarni odjeljak između ER i Golgijeva aparata, ATF6 – aktivirajući transkripcijski faktor 6 (engl. *Activating transcription factor* 6).

4.1.3.2.2 PPI mreža i analiza modula

Alat STRING korišten je za izradu PPI mreže seta podataka smanjeno izraženih proteina. Dobivena PPI mreža uvezena je u softver Cytoscape gdje je vizualizirana
i obrađena dostupnim alatima. Pri analizi je kao uvjet postavljen najviši interakcijski kriterij od 0.900. Tablica 4. sadrži osnovne podatke PPI mreže (prikazane na slici 16.a) smanjeno izraženih proteina sekretoma dobivene alatom STRING.

Podatci	Rezultat
Broj čvorova	87
Broj rubova	53
Prosječni broj interakcijskih čvorova	1.22
Prosječni koeficijent lokalnog klasteriranja	0.329
p-vrijednost obogaćene PPI mreže	< 1.0×10 ⁻¹⁶

Tablica 4. Prikaz podataka PPI mreže pojačano izraženih proteina staničnog sekretoma

Kako bi se identificirali klasteri, odnosno područja veće međusobne povezanosti proteina u PPI mreži, korišten je MCODE dodatak softveru Cytoscape. MCODE omogućuje identifikaciju najvažnijih modula u mreži koristeći kriterije prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Odabrane postavke za analizu PPI mreže u MCODE dodatku.

MCODE kriteriji odabira	Vrijednosti
MCODE vrijednost	≥ 4
Broj čvorišta	≥ 4
Granična vrijednost klasteriranja	= 2
k-core	= 2
Maksimalna dubina mreže	100

MCODE analiza mreže identificirala je jedan statistički značajan modul koji se sastoji od šest čvorova i 12 rubova (MCODE vrijednost: 4.8) (slika 16.b). CytoHubba analiza pokazala je 10 čvorišnih proteina u statistički značajnom modulu (slika 16.c), od kojih je pet visoko rangirano prema MCC vrijednostima (slika 16.d) te su to protein toplinskog šoka 70 kDa 5, poznat i kao protein reguliran glukozom 78 kDa (engl. *heat shock 70 kDa protein 5 –* HSPA5, *78 kDa glucose-regulated protein –* GRP78), protein toplinskog šoka 90 beta član obitelji 1 (engl. *heat shock protein 90 beta family member 1 –* HSP90B1), protein disulfid-izomeraza A4 (engl. *protein disulfide isomerase family A member 4 –* PDIA4), kalretikulin (engl. *calreticulin –* CALR) i beta-1 podjedinica integrina (engl. *integrin subunit beta 1 –* ITGB1). Osim ITGB1, membranskog receptora uključenog u staničnu adheziju, ostali se visokorangirani čvorišni proteini nalaze u ER gdje imaju funkciju regulatora smatanja i povezivanja proteina i modulatora ER stresa i odgovora na nerazmotane proteine, što sugerira

da ER funkcija ima važnu ulogu u razvoju kemorezistencije u BRAF-mutiranom raku debelog crijeva.



Slika 15. Konstrukcija i modularna analiza PPI mreže proteina sa smanjenom razinom ekspresije i identifikacija čvorišnih proteina. PPI mreža kreirana je u STRING-u i vizualizirana u softveru Cytoscape (a). MCODE dodatak Cytoscape korišten je za modularnu analizu PPI mreže pri čemu je identificiran jedan značajan modul (b). Cytoscape dodatak cytoHubba primijenjen je za identifikaciju čvorišnih proteina na temelju algoritma MCC (c). Rubovi predstavljaju protein-protein asocijacije.

Crveni čvorovi predstavljaju proteine s visokim MCC rezultatom, dok žuti čvorovi predstavljaju proteine s niskim MCC rezultatom (c). Proteini s visokim MCC rezultatima odabrani su za daljnje *in silico* analize (d). MCC - engl. *Maximal Clique Centrality.*

4.1.3.2.3 In silico validacija odabranih čvorišnih proteina iz PPI mreže smanjeno izraženih

proteina

Bioinformatička analiza pet najviše rangiranih čvorišnih proteina otkrila je njihovu statistički značajnu (p <0.5; q <0.05) pojačanu ekspresiju na razini mRNA u tumorima bolesnika oboljelih od BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva u odnosu na nepromijenjenu skupinu (slike 17.a-21.a). Iznimka je PDIA4 gdje nije postignuta statistička značajnost. Suprotna situacija primijećena je na razini proteina gdje je ekspresija tih pet proteina u tumorskim uzorcima niža u BRAF-mutiranim tumorima u odnosu na nepromijenjenu skupinu, ali bez statističke značajnosti (slike 17.b-21.b). Ovi rezultati sugeriraju da deregulacija u ER homeostazi može potencijalno pratiti BRAF-mutirani genotip. Važno je naglasiti da je niža razina mRNA proteina *HSPA5/GRP78*, HSP90B1, PDIA4, CALR i ITGB1 asocirana s nižim medijanom ukupnog preživljenja, posebno za HSPA5 gdje je ta korelacija postigla statističku značajnost (slike 17.c-21.c). Stoga, smanjena bi razina HSPA5 mogla biti klinički važna za praćenje razvoja kemorezistencije kako bi se predvidio klinički ishod u BRAF-mutiranom raku debelog crijeva.



	Ukupni broj slučajeva	Broj događaja	Ukupni medijan mjeseca (95% CI)
(A) -1.67-0.56	15	7	37.02 (22.03 - NA)
(B) 0.88-3.22	16	2	83.24 (38.07 - NA)

Slika 16. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata HSPA5/GRP78 u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije *HSPA5/GRP78* na razini mRNA

(a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Analiza medijana ukupnog preživljenja HSPA5/GRP78 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (a). Prikazana je povezanost između ekspresije mRNA *HSPA5/GRP78* (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log(RNA Seq V2 RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.



	Ukupan broj slučajeva	Broj događaja	Ukupni medijan mjeseca (95% CI)
(A) -0.75-0.28	15	6	49.41 (37.02 - NA)
(B) 0.31-3.29	16	3	83.24 (38.07 - NA)

Slika 17. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata HSP90B1 u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije *HSP90B1* na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću

cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Analiza medijana ukupnog preživljenja HSP90B1 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (c). Prikazana je povezanost između ekspresije mRNA *HSP90B1* (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log(RNA Seq V2 RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.



Slika 18. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata PDIA4 u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije *PDIA4* na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću

cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Analiza medijana ukupnog preživljenja PDIA4 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (c). Prikazana je povezanost između ekspresije mRNA *RPA1* (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log(RNA Seq V2 RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljavanja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.



Slika 19. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata CALR u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije *CALR* na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Analiza medijana ukupnog preživljenja CALR-a u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu

podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (c). Prikazana je povezanost između ekspresije *CALR* mRNA (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log(RNA Seq V2 RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.



	Ukupan broj slučajeva	Broj događaja	Ukupni medijan mjeseca (95% CI)
(A) -1.77-0.04	15	4	49.41 (37.02 - NA)
(B) 0.08-2.30	16	5	83.24 (38.07 - NA)

Slika 20. *In silico* validacija i analiza preživljavanja odabranog kandidata proteina ITGB1 u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Procjena ekspresije *ITGB1* na razini mRNA (a) i proteina (b) u skupu podataka o kolorektalnom adenokarcinomu (TCGA, PanCancer Atlas) pomoću

cBioPortal online platforme. Analiza ekspresije provedena je u 48 uzoraka raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s 478 uzoraka bez mutacije BRAF (nepromijenjena skupina). Analiza medijana ukupnog preživljenja ITGB1 u 31 slučaju adenokarcinoma debelog crijeva u skupu podataka TCGA PanCancer Atlas pomoću cBioPortala (c). Prikazana je povezanost između ekspresije mRNA *ITGB1* (z-rezultati ekspresije mRNA u odnosu na sve uzorke (log(RNA Seq V2 RSEM)) i vjerojatnosti ukupnog preživljenja pri čemu su uspoređivane skupine bolesnika s rakom debelog crijeva s visokom i niskom ekspresijom mRNA.

4.2 Analiza proteoma vemurafenib-rezistentnih stanica raka debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom

Provedene su proteomske analize stanica osjetljivih na vemurafenib (RKO) i stanica rezistentnih na vemurafenib (RKOr) koristeći dva komplementarna pristupa temeljena na masenoj spektrometriji koji uključuju 2DE-PAGE u nelinearnom rasponu pH vrijednosti 3-10 spregnut MALDI/TOF-TOF masenom spektrometrijom i LFQ LC-MS/MS analizom. Rezultati 2-DE/MALDI-TOF/TOF analize masene spektrometrije identificirali su 127 različito izraženih proteina (engl. *differentially expressed proteins*, DEP) između osjetljivih i rezistentnih stanica sa statističkom značajnošću (p <0.05) među kojima je 59 bilo pojačano, a 68 smanjeno izraženo u rezistentnim stanicama (Tablica 5. u Prilogu). Podatci iz LC-MS/MS analize otkrili su 125 DEP-ova (p <0.05, log2(FC) >1) među kojima je 78 bilo pojačano, a 47 smanjeno izraženo u rezistentnim stanicama (Tablice 6. i 7. u Prilogu).

4.2.1 Bioinformatička analiza proteoma BRAFV600E-mutiranih RKO stanica raka debelog crijeva

Proteini identificirani 2-DE/MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom i LC-MS/MS analizom rangirani su na temelju podataka o razlikama u ekspresiji. Proteini s log2(FC) i p-vrijednostima <0.05 kombinirani su i bioinformatički analizirani u svrhu pronalaska i odabira novih proteinskih meta povezanih s razvojem rezistencije na vemurafenib u RKO stanicama raka debelog crijeva. Ovaj odabir pretpostavlja da se ključni proteini mogu identificirati na temelju dosega proteinske funkcionalne povezanosti i njihove centralnosti u PPI mrežu.

Protein-protein interakcijska mreža (slika 22.a) za proteine s pozitivnim FC omjerom podvrgnuta je analizi klasteriranja te paralelno mapiranju ontologijama "GO – Biološke funkcije" kako bi se otkrili potencijalni funkcionalni moduli. Kao što se može vidjeti na slici 22.a, funkcije povezane s kaskadom RAF/MAP kinaze središnje su u PPI mreži povezujući module mreže s visoko umreženim čvorovima proteina pojačano zastupljenima u kategorijama ribosomske biogeneze (tamnožuta),

organizacije aktinskog citoskeleta i pozitivne regulacije pokretljivosti (zeleno), ciljanja vezikula (smeđe) i regulirane egzocitoze (svijetloplavo). Procesi biosinteze nukleotida (tamnoljubičasto), regulacije tranzicije stanične fazne (ljubičasto) i odgovor na gladovanje (žuto) najmanje su modularni te su povezani s drugim dijelovima PPI mreže.

Najveća meta-grupa međusobno povezanih i unakrsno mapiranih funkcionalnih čvorova, središnja za PPI mrežu, imala je osobito jaku povezanost s dinamikom citoskeleta (kretanje, egzocitoza, ciljanje vezikula).

Detaljnija analiza mrežne arhitekture imala je za cilj odabrati proteine s najizraženijom razlikom u ekspresiji te one s najjačim dosegom koji bi mogli biti osobito važni za razvoj rezistencije na vemurafenib i stoga bi mogli predstavljati nove farmakološke mete. Utvrđeno je da je šest od top 25 različito izraženih proteina, prema analizi masenom spektrometrijom, integrirano u mrežu i stoga su odabrani za daljnju analizu povezanosti pri čemu su dva najbolje rangirana proteina iz MALDI-MS analize, ezrin (EZR) i aldolaza A (ALDOA, engl. *aldolase A*) te dva proteina s niskom diferencijalnom ekspresijom, ali vizualno snažnom mrežnom povezanosti, serin/treoninska kinaza Raf-1 (RAF1) i protein 10 koji sadrži domenu disintegrina i metaloproteinaze (ADAM10, engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase domaincontaining protein 10*) dodani ovom popisu prioritetnih kandidata (slika 22.b).



b)

Naziv proteina	Average shortest path length	Betweenness centrality	Closeness centrality	Clustering coefficient	Eccentricity
CAV1	3.154	0.146	0.317	0.114	6
ADAM10	3.579	0.040	0.279	0.255	11
EZR	3.274	0.013	0.306	0.273	11
RAF1	3.222	0.011	0.310	0.527	14
ALDOA	3.709	0.011	0.269	0.422	10
ABHD5	7.352	0.012	0.136	0.000	3
PTPRF	3.847	0.000	0.259	1.000	2
PODX	4.259	0.000	0.235	1.000	2
MPRIP	3.576	0.000	0.279	1.000	8
HERCA	4.334	0.000	0.231	1.000	9

#šifra	Opis šifre	Vidljiv broj gena	Pozadinski broj gena	Snaga	False discovery rate	Proteini
hsa04145	Phagosome	13	145	0.78	0.00014	ATP6V1E1, ATP6V1A, ITGA5, ENSG00000258947, HGS, LAMP1, ACTB, TFRC, HLA-C, HLA-A, HLA-B, ACTG1, SEC22B
hsa04810	Regulation of actin cytoskeleton	15	205	0.69	0.00014	RAF1, ACTN4, IQGAP1, IQGAP2, ITGA5, ACTB, EZR, PIP5K1A, TMSB4X, ACTN1, PPP1CB, DIAPH1, BCAR1, CFL1, ACTG1
hsa04510	Focal adhesion	13	197	0.65	0.0011	RAF1, ACTN4, ITGA5, PARVA, CAV1, ACTB, FLNA, ARHGAP5, ACTN1, PPP1CB, DIAPH1, BCAR1, ACTG1
hsa04144	Endocytosis	14	242	0.59	0.0016	ARFGAP3, VPS35, KIF5B, HGS, RAB11B, CAV1, TFRC, CAPZA2, PIP5K1A, HLA-C, SNX2, HLA-A, HLA-B, ITCH
hsa05416	Viral myocarditis	7	56	0.92	0.0017	CAV1, ACTB, HLA-C, HLA-A, HLA-B, EIF4G2, ACTG1
hsa05205	Proteoglycans in cancer	12	195	0.62	0.0023	RAF1, IQGAP1, ITGA5, CAV1, CAMK2D, ACTB, EZR, FLNA, PPP1CB, CD44, CD63, ACTG1
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	9	112	0.73	0.0025	ACTN4, GNAI2, ACTB, EZR, ARHGAP5, ACTN1, CTNND1, BCAR1, ACTG1
hsa04612	Antigen processing and presentation	7	66	0.85	0.0028	PSME2, HSPA5, CTSB, HLA-C, HLA-A, HLA-B, TAPBP
hsa00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6	48	0.92	0.0035	PMM2, GMPPB, GFPT1, GMPPA, PGM1, UAP1L1
hsa04520	Adherens junction	7	71	0.82	0.0035	ACTN4, IQGAP1, ACTB, PTPRF, ACTN1, CTNND1, ACTG1

c)

d)



Slika 21. Bioinformatička analiza integriranih proteomskih podataka dobivenih pomoću 2-DE/MALDI-TOF/TOF MS i LC-MS/MS za odabir novih proteinskih meta i staničnih procesa relevantnih za razvoj rezistencije na vemurafenib u BRAFV600E mutiranim RKO stanicama raka debelog crijeva. (a) Mreža interakcija između proteina različito izraženih u RKO stanicama BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva rezistentnim vemurafenib. PPI analiza uključivala je pojačano izražene proteine identificirane pomoću 2-DE/MALDI-TOF/TOF MS i/ili LC-MS/MS analize. Čvorovi označavaju proteine, a rubovi kombiniranom rezultatu interakcija proteina (>0.7). KMeans klasteriranje čvorova (top 10 klastera)

provedeno je kako bi se identificirali obrasci interakcija proteina u PPI mreži. Isprekidane linije prikazuju rubove koji povezuju klastere. Klasteri proteina odabrane GO funkcionalne kategorije označeni su sljedećim bojama: GO:0006903 ciljanje vezikula (p = 0.0018) - smeđa; GO:0042866 proces biosinteze piruvata (p = 0.0459) - tamnoplava; GO:0042254 biogeneza ribosoma (p = 2.39 × 10^{-5}) – tamnožuta; GO:0030036 organizacija aktinskog citoskeleta (p = 1.50×10^{-6}) – zelena; GO:0042594 odgovor na gladovanje (p = 0.0083) – žuta; GO:0045055 regulirana egzocitoza (p = 1.39×10^{-8}) – plava; GO:0009165 proces biosinteze nukleotida (p = 0.00059) – tamnoljubičasta; GO:0040017 pozitivna regulacija lokomocije (7.12 × 10⁻⁵) - svijetlo zelena; GO:1901987 regulacija faznog prijelaza staničnog ciklusa (p = 0.0146) – ljubičasta; HSA-5673001 kaskada RAF/MAP kinaze (p = 0.0299) - crvena. (b) Cytoscape analiza topoloških karakteristika odabranih proteina. Plavo označeni proteini predstavljaju one unutar top 25 diferencijalno izraženih proteina prema log2(FC) s p <0.05. EZR i ALDOA – pri vrhu diferencijalno izraženih proteina u MALDI podatcima. (c) Analiza pojačano zastupljenih proteina KEGG puta. (d) Mreža rekonstruirana u alatu STRING pokazuje međupovezanost proteina EZR, CAV1, RAF1, ADAM10 i CD44 te ključnih funkcija uključenih u rak debelog crijeva. Mrežne postavke: 0.7 pouzdanost, prikaz pouzdanosti. Bojama su označene povezanosti proteina s odabranim GO funkcionalnim kategorijama (bioloških funkcija, staničnih komponenti) i KEGG putova: crvena - GO:0072584 kaveolinom posredovana endocitoza (0,00053); plava – GO:2000641 regulacija prijenosa ranog endosoma u kasni endosom (0.0029); ljubičasta – GO:0070161 sidrena spojnica (1.12×10^{-5}) ; svijetloplava – GO:0005925 fokalna adhezija (1.12×10^{-5}) ; tamnozelena - GO:0098805 cijela membrana (0.00053); magenta - GO:0016323 bazolateralna plazma membrana (0.00091); narančasta – GO:0045121 membranska splav (0.0015); limeta zelena - GO:0005901 kaveola (0.0354); žuta - GO:0005902 mikrovili (0.0399); smeđa - hsa05218, melanom (8.75×10^{-9}) ; siva – hsa05210 rak debelog crijeva (8.75×10^{-9}) .

Nakon generiranja PPI mreže različito izraženih proteina u alatu STRING, analizirali smo topologiju rekonstruirane PPI mreže pomoću softvera Cytoscape kako bismo suzili odabir cilja za naknadnu eksperimentalnu validaciju (Slika 22.b). Topološke karakteristike koje smo uzimali u obzir bile su: prosječna najkraća duljina puta (engl. *average shortest path length*) – prosječan broj koraka duž najkraćeg puta za sve moguće parove čvorova unutar mreže, centralnost međupoloženosti (engl. *betweenness centrality*) – mjera koja kvantificira važnost čvora na temelju toga koliko najkraćih putova između drugih čvorova prolazi kroz taj čvor, centralnost bliskosti (engl. *closeness centrality*) – prosječna udaljenost (inverzna udaljenost) čvora od svih ostalih čvorova način je za otkrivanje čvorova koji mogu vrlo učinkovito širiti informacije kroz mrežu, koeficijent klasteriranja (engl. *clustering coefficient*) – stupanj do kojeg čvorovi u mreži imaju tendenciju zajedničkog klasteriranja, ekscentričnost (engl. *eccentricity*) – mjera odstupanja kombiniranih putova odabranog čvora od cirkularnosti pri čemu veća ekscentričnost ukazuje na izduženije, manje zakrivljene putanje.

Temeljem topološke analize prikazanoj na slici 22.b, proteini RAF1, kaveolin-1 (CAV1) i EZR proizašli su kao najvažniji čvorovi prema parametrima prosječno najkraćeg puta, što znači da se informacije učinkovitije prenose kroz te čvorove u rekonstruiranoj PPI mreži. Navedeno dobro odgovara visokom poretku CAV1 i EZR

prema topološkim karakteristikama centralnosti međupoloženosti i centralnost bliskosti, odnosno RAF1 i EZR prema karakteristici ekscentričnost. ADAM10 nalazi se na drugom mjestu prema centralnosti međupoloženosti i ekscentričnost te je odmah uz prva tri u poretku prema ostalim karakteristikama. Prema ovim rezultatima možemo zaključiti da od unaprijed odabranih čvorova, CAV1, EZR, RAF1 i ADAM10 imaju najkraću udaljenost do svih ostalih čvorova i središnji položaj u dobro povezanom dijelu mreže pri čemu su CAV1 i EZR također najbolje rangirani diferencijalno izraženi proteini identificirani koristeći dvije različite proteomske metode.

Analiza pojačano zastupljenih proteina unutar KEGG termina (slika 22.c) pomoću alata STRING pokazala je da je najveći dio identificiranih proteina, čija je ekspresija veća u rezistentnim stanicama, značajno obogaćen unutar procesa regulacije aktinskog citoskeleta s ezrinom. Ista analiza također je otkrila relevantnost proteina klastera diferencijacije 44 (CD44, engl. *Cluster of differentiation 44*), klasificiranog unutar procesa "proteoglikani u raku", u povezanosti s rezistencijom na vemurafenib (Slika 22.c). CD44, koji je također prekomjerno izražen u rezistentnim stanicama, molekula je stanične adhezije za koju se zna da stupa u interakciju s ezrinom i stvara kompleks koji ima važnu ulogu u regulaciji interakcija tumora i endotela, stanične migracije, stanične adhezije, progresije tumora i metastaza (191).

Mreža prikazana na slici 22.d rekonstruirana je iz odabranih funkcija te pokazuje snažnu integraciju s funkcijama uključenim u rak debelog crijeva i melanoma putem proteina AKT1, EGFR i MAPK3 (slika 22.d). Funkcionalno mapiranje ove mreže pomoću ontologija "GO – Biološke funkcije" i "GO – Stanične komponente" sugerira zajedničku uključenost EZR i CAV1 u različite faze endocitoze i membranskog prometa, kao i funkcionalnih procesa povezanih s membranskim splavima te bazolateralnim membranskim sidrištima i mjestima fokalne adhezije. EZR i CD44 također su definirani kao jedine funkcije u mreži povezane s mikrovilima (Slika 22.d).

Zaključno, bioinformatička analiza stavlja naglasak na EZR i CAV1 kao visoko rangirane proteine koji su značajno povezani s rezistencijom na vemurafenib u stanicama raka debelog crijeva.

4.2.2 Povećana ekspresija ezrina povezana je s fenotipom otpornim na vemurafenib u BRAFV600E-mutiranim RKO stanicama raka debelog crijeva

Rezultati bioinformatičke analize potaknuli su nas da se dodatno ispita uključenost ezrina i kaveolina-1 u posredovanju u rezistenciji na vemurafenib u RKO stanicama raka debelog crijeva. Ezrin je član obitelji proteina ezrin/radiksin/moezin, a djeluje kao poveznica između plazma membrane i aktinskog citoskeleta (192). Ezrin je prisutan u zatvorenom neaktivnom stanju u citoplazmi i aktivira se konformacijskom promjenom izazvanom fosforilacijom pri čemu je fosforilacija na treoninu-567 (T567) neophodna za vezanje na citoskelet F-aktina i omogućuje povezivanje citoskeleta aktina sa staničnom membranom (193,194). Uočena je povećana razina ekspresije ukupnog proteina ezrina u rezistentnim u odnosu na osjetljive RKO stanice u bazalnim uvjetima (u odsutnosti vemurafeniba) (slika 23.a), iako bez statističke značajnosti. Izloženost vemurafenibu u koncentraciji od 3 µM, što odgovara IC50 koncentraciji vemurafeniba izmjerenoj u osjetljivim RKO stanicama, izazvala je značajan porast ukupne razine ezrina u rezistentnim stanicama u odnosu na osjetljive RKO stanice nakon 24 i 48 sati, a isti se trend nastavio i nakon tretmana od 72 sata (slika 23.a).

Zanimljivo je da je razina fosfo-ezrina (T567) pokazala nešto drugačiji uzorak ekspresije u odnosu na ukupni ezrin i nije se značajno razlikovala između rezistentnih i osjetljivih stanica u osnovnim uvjetima (slika 23.b). Međutim, tretman vemurafenibom povećao je razinu fosfo-ezrina u rezistentnim stanicama u usporedbi s osjetljivim stanicama nakon 48 i 72 sata, iako bez statističke značajnosti (slika 23.b).



Slika 22. Western blot analiza ekspresije proteina ezrin (a) i njegove fosforilirane forme fosfo-ezrin (T567) (b) u osjetljivim i vemurafenib-rezistentnim RKO stanicama. Ekspresija je ispitana u bazalnim

uvjetima bez tretmana vemurafenibom i u uvjetima tretmana s niskom koncentracijom vemurafeniba (3 µM) tijekom vremenskog perioda od 24, 48 i 72 sata. Relativna ekspresija odabranih proteina mjerena je denzitometrijskom analizom pomoću softvera QuantityOne. Ukupna normalizacija proteina provedena je kako je opisano u poglavlju "Materijali i metode". Podatci predstavljaju srednju vrijednost i standardnu devijaciju dobivenu iz tri neovisna biološka eksperimenta. Statistička značajnost (p <0.05) označena je zvjezdicom. K – netretirana kontrola.

Slično tome, dulja vremena uzgoja (48 i 72 sati) izazvala su značajniju pojačanu ekspresiju gena *EZR1* u rezistentnim stanicama u bazalnim uvjetima, a isti obrazac ekspresije održan je kada su stanice bile tretirane vemurafenibom (slika 24.).



Slika 23. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu pokazao je relativni porast ekspresije gena *EZR1* u vemurafenib-rezistentnim stanicama (R-K) u odnosu na vemurafenib-osjetljive stanice (P-K) u bazalnim uvjetima tijekom perioda od 24, 48 i 72 sata. Isti obrazac primijećen je u vemurafenib-rezistentnim stanicama (R-V) u odnosu na vemurafenib-osjetljive stanice (P-V) u uvjetima tretmana niskom koncentracijom (3µM) vemurafeniba tijekom istog vremenskog perioda.

Kaveolini su obitelj membranskih proteina uključenih u formiranje invaginacija plazma membrane nazvanih kaveolama koje igraju važnu ulogu u staničnom prometu i unutarstaničnoj signalizaciji često putem izravne interakcije sa specifičnim partnerima za vezanje (195). CAV1, najbolje karakterizirana izoforma ove obitelji u smislu njegove uloge u raku, može funkcionirati ili kao supresor tumora ili promotor tumora, ovisno o vrsti raka, staničnom kontekstu i uvjetima (195). Identificirana je

povećana razina ekspresije proteina CAV1 u rezistentnim RKO stanicama u usporedbi s osjetljivim stanicama uzgojenim bez vemurafeniba (slika 25.), što potvrđuje proteomske nalaze koji pokazuju pojačanu ekspresiju CAV1 u rezistentnim stanicama.

Izloženost vemurafenibu povećala je razine ekspresije CAV1 u osjetljivim stanicama s vrhuncem nakon 72 sata, dok je porast ekspresije CAV1 u rezistentnim stanicama izazvan vemurafenibom bio mnogo manjeg opsega. S obzirom na njegovu dvostruku ulogu u raku koja CAV1 daje i anti- i proapoptotsku funkciju, ovaj je protein isključen kao pretpostavljena meta za suzbijanje rezistencije na vemurafenib iz daljnjih *in vitro* validacijskih studija.



Slika 24. Analiza ekspresije proteina kaveolin-1 u osjetljivim i rezistentnim stanicama RKO. Ekspresija proteina ispitana je u bazalnim uvjetima te u uvjetima niske koncentracije vemurafeniba (3 µM) u periodima od 24, 48 i 72 sata. K – netretirana kontrola.

Zaključno, pojačana ekspresija ezrina na razini gena i proteina predlaže se kao inherentna značajka fenotipa otpornog na vemurafenib koja bi se mogla dodatno pojačati tretmanom niskim dozama vemurafeniba. 4.2.3 Farmakološka inhibicija ezrina putem NSC305787 povećava odgovor rezistentnih RKO stanica raka debelog crijeva na vemurafenib i podudara se sa smanjenjem ekspresije CD44 i inhibicijom AKT/c-Myc signalizacije

Bioinformatička analiza te analize na razini proteina i gena identificirale su ezrin kao obećavajuću metu, stoga je istražena mogućnost povećanja osjetljivosti rezistentnih RKO stanica na vemurafenib ciljanjem ezrina.

Kako bi se testirala ova hipoteza, rezistentne su stanice tretirane s pet različitih koncentracija vemurafeniba (počevši od IC50 koncentracije do 4 različite subtoksične koncentracije) u kombinaciji s tri koncentracije farmakološkog inhibitora ezrina NSC305787 na IC50 i dvije subtoksične koncentracije te je izmjeren antiproliferativni učinak kombiniranog tretmana pomoću MTT testa. Selektivni inhibitor ezrina NSC305787 eksperimentalni je tretman protiv raka koji je do sada ispitan samo u pretkliničkim studijama koje su pokazale da NSC305787 ima prihvatljivu toksičnost i farmakokinetičke profile u mišjim modelima (196).

Provedeni pokusi pokazali su da je farmakološka inhibicija ezrina značajno povećala inhibitornu aktivnost vemurafeniba na rast rezistentnih RKO stanica u ovisnosti o koncentraciji u usporedbi s monotretmanom vemurafenibom (slika 26.a). Inhibitor ezrina uspio je povećati osjetljivost rezistentnih stanica na vemurafenib čak i pri niskim subtoksičnim koncentracijama.

Kako bi se odredila priroda odgovora za svaku testiranu kombinaciju tretmana u rezistentnim RKO stanicama, vrijednosti indeksa kombinacije (CI, engl. *combination index*) izračunata je pomoću softvera CompuSyn, gdje je CI <1, =1 i >1 označavao sinergizam, aditivni učinak odnosno antagonizam. Iznenađujuće, CI za većinu testiranih kombinacija tretmana bio je iznad 1, što ukazuje na antagonizam lijeka. Međutim, jedan kombinirani tretman sa subtoksičnim koncentracijama inhibitora ezrina od 1.61 μ M (1/4 IC50) i vemurafeniba od 27.91 μ M (1/2 IC50) proizveo je aditivni antiproliferativni učinak u rezistentnim RKO stanicama s CI = 1.0 (slika 26.b).

Navedeni kombinirani tretman stoga je odabran za sva naknadna mehanistička ispitivanja u rezistentnim RKO stanicama raka debelog crijeva.



26.31±1.17 *

Tretman	IC50 (μM)
Vemurafenib	55.81±4.83
Ezrin inhibitor	6.44±0.54
EZRi (IC50) + VEM	<1
EZRI (1/2 IC50) + VEM	11.62±5.97 *

b)

a)

EZRi (μM)	VEM (µM)	Kombinacijski indeks
1.61	3.49	2.0
1.61	6.98	91.4
1.61	13.95	7.4
1.61	27.91	1.0
3.22	3.49	2.3
3.22	6.98	2.3
3.22	13.95	1.9

Slika 25. Antiproliferativni učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u RKO stanicama raka debelog crijeva otpornim na vemurafenib nakon 72 sata tretiranja. (a) Učinak kombiniranog tretmana u ovisnosti o koncentraciji na staničnu vijabilnost mjeren MTT testom proliferacije. Vrijednosti IC50 izračunate su linearnom regresijskom analizom, a rezultati su statistički obrađeni ANOVA-om, Tukey post-hoc testom (p <0.05) i označeni zvjezdicom. Podatci su dobiveni iz tri neovisna biološka eksperimenta. (b) Kombinacijski indeks (CI) izračunat je za svaku kombinaciju tretmana iz krivulja inhibicije rasta korištenjem softvera CompuSyn prema postupku opisanom u poglavlju "Materijali i metode". Podatci su dobiveni iz tri neovisna biološka eksperimenta. Crvenom je bojom označena kombinacija tretmana koja ima aditivni antiproliferativni učinak te je ona uzeta za daljnja ispitivanja.

EZRi (1/4 IC50) + VEM

Zatim je istražen učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina na indukciju apoptoze pri kombinaciji njihovih koncentracija koje proizvode aditivni učinak, kao što je gore opisano. Kao što je vidljivo na slici 27., došlo je do izraženog smanjenja u postotku nezahvaćenih stanica istovremeno s izraženim povećanjem u postotku kasnih apoptotskih/nekrotičnih stanica u kombiniranom tretmanu u usporedbi s pojedinačnim lijekovima vemurafenibom ili inhibitorom ezrina, što ukazuje na to da se inhibitorni učinak vemurafeniba na preživljenje rezistentnih RKO stanica povećava inhibicijom ezrina.



Netretirane



VEM (27.91 µM)



EZRi (1.61 µM)





VEM (27.91 µM) + EZRi (1.61 µM)



Slika 26. Proapoptotski učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u staničnoj liniji RKO raka debelog crijeva otpornoj na vemurafenib nakon razdoblja

tretmana od 48 sati. (a-d) Reprezentativne slike aneksin V testa provedenog za detekciju apoptoze kada su stanice tretirane jednim tretmanom ili njihovom kombinacijom u navedenim koncentracijama tijekom 48 sati. Slike dobivene konfokalnim mikroskopom snimljene su pri povećanju od 20x: (a) netretirane stanice; (b) stanice tretirane vemurafenibom (VEM); (c) stanice tretirane inhibitorom ezrina (EZRi); (d) stanice tretirane dualnim tretmanom (VEM + EZRi); (e) kvantifikacija postotka nezahvaćenih stanica (Ann-/PI-), ranih apoptotskih stanica (Ann+/PI-) i kasnih apoptotskih/primarno nekrotičnih stanica (Ann+/PI+). Podatci su reprezentativni za dva neovisna biološka pokusa izvedena u dva ponavljanja. Ann (Aneksin V); PI (propidij jodid). Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost + SD. Broj vidnih polja bio je osam za sve tretmane u oba ponavljanja. Napravljena je dvosmjerna ANOVA s Tukeyjevim post-hoc testom, a samo su najvažniji rezultati između skupina označeni s tri zvjezdice ($p \le 0.001$), odnosno ns za nepostizanje statističke značajnosti.

Otkriće da kombinacija vemurafeniba i inhibitora ezrina u odabranim subtoksičnim poboljšava antiproliferativnu i proapoptotsku koncentracijama aktivnost vemurafeniba u rezistentnim RKO stanicama potaknulo je daljnja istraživanja kako potencijalni mehanizam koji stoji iza uočenog bi se istražio učinka kemosenzibilizacije. Analiza PPI mreže u STRING (slika 22.d) ukazala je na međupovezanost ezrina s CD44, što je u skladu s literaturnim podatcima prema kojima se ezrin veže na molekulu stanične adhezije CD44 koja je uključena u migraciju stanica raka i metastaze (191).

Iz analizirane PPI mreže proizašla je još jedna potencijalna proteinska meta AKT, komponenta PI3K/AKT signalnog puta koju aktivira ezrin u različitim vrstama raka (196) za koju je prethodno dokazano da posreduje *de novo* otpornost na vemurafenib u RKO stanicama koje izražavaju BRAFV600E (197). Uz navedeno, ekspresija c-Myc procijenjena je u kombiniranom antiproliferativnom učinku na temelju prethodnih otkrića koja pokazuju da ezrin pozitivno regulira razine c-Myc proteina u stanicama raka prostate aktiviranjem AKT signalnog puta nizvodno od ezrina koji kontrolira ekspresiju c-Myc na razini gena i proteina (198).

Dobiveni eksperimentalni podatci jasno su pokazali da je kombinirani tretman vemurafenibom i inhibitorom ezrina značajno smanjio razine ekspresije proteina CD44 u usporedbi s oba tretmana s jednim lijekom (slika 28.). Slično tome, kombinirani je tretman inducirao značajno smanjenje u razinama fosfo-AKT (Ser473), što ukazuje na ukidanje aktivnosti AKT u usporedbi s pojedinačnim tretmanima i netretiranim stanicama. Sličan regulacijski obrazac ekspresije proteina primijećen je za c-Myc čija je razina značajno smanjena u kombiniranom tretmanu u odnosu na pojedinačne tretmane (slika 28.).



Slika 27. Western blot analiza ciljnih proteina potencijalno povezanih s učinkom kemosenzibilizacije kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u RKO stanicama raka debelog crijeva otpornim na vemurafenib nakon razdoblja tretmana od 72 sata. Relativna ekspresija odabranih proteina mjerena je denzitometrijskom analizom pomoću softvera QuantityOne. Ukupna normalizacija proteina provedena je kako je opisano u poglavlju "Materijali i metode". Podatci predstavljaju srednju vrijednost i standardnu devijaciju dobivenu iz tri neovisna biološka eksperimenta, a razine statističke značajnosti označene su jednom zvjezdicom (p <0.05) ili tri zvjezdice (p <0.001). K (netretirane/kontrolne stanice), VEM (vemurafenib/27.91 μ M), EZRi (inhibitor ezrina/1.61 μ M), VEM + EZRi (27.91 μ M vemurafenib + 1.61 μ M inhibitor ezrina).

Ukratko, povećani učinak vemurafeniba u rezistentnim RKO stanicama induciran inhibitorom ezrina bio je popraćen sniženom regulacijom ekspresije CD44 i inhibicijom AKT/c-Myc signalizacije.

4.2.4 Povećana ekspresija ezrina prati razvoj rezistencije na vemurafenib u stanicama melanoma A375 koje nose mutaciju BRAFV600E

In vitro ispitivanja uključenosti ezrina u rezistenciju na vemurafenib u BRAFV600Emutiranim RKO stanicama raka debelog crijeva potaknula su nas da se ispita igra li ezrin ulogu u stečenoj rezistenciji na BRAFV600E inhibiciju kod drugih BRAFV600E mutiranih karcinoma kao što je melanom. Prethodni literaturni podatci pružaju dokaze o ulozi aktinskog citoskeleta u posredovanju adaptivne otpornosti na vemurafenib u BRAFV600E-mutiranim stanicama melanoma (199,200).

Znajući da je ezrin uključen u regulaciju organizacije aktinskog citoskeleta, analizirane su razine ekspresije ukupnog ezrina i fosfo-ezrina (T567) u stanicama melanoma A375 osjetljivih i rezistentnih na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E. Analize razine ekspresije provedene su u bazalnim uvjetima i nakon izlaganja 0.8 μ M vemurafeniba, koncentraciji koja odgovara IC50 koncentraciji vemurafeniba izmjerenoj u osjetljivim stanicama melanoma tijekom 72 sata (slika 29.).

Zamijećen je trend povećanja ukupne razine ezrina i značajnog povećanja razine ekspresije fosfo-ezrina u stanicama melanoma otpornima na vemurafenib u bazalnim uvjetima (slika 29.). Zanimljivo je da je tretman vemurafenibom izazvao umjereno povećanje ukupne razine ekspresije ezrina u rezistentnim stanicama u odnosu na osjetljive stanice melanoma bez ikakvog posebnog učinka na ekspresiju fosfo-ezrina između osjetljivih i rezistentnih stanica.

Sumarno, ovi rezultati pokazuju da je povećana ekspresija proteina ezrina povezana s fenotipom otpornim na vemurafenib u stanicama melanoma s mutiranim BRAFV600E.



Slika 28. Western blot analiza ekspresije ezrina u stanicama A375 melanoma osjetljivim na vemurafenib (roditeljskim) i otpornim na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E u odsutnosti i u prisutnosti 0.8 μM vemurafeniba tijekom 72 sata. Relativna ekspresija proteina ukupnog ezrina i ezrina fosforiliranog na treoninu 567 mjerena je denzitometrijskom analizom pomoću softvera QuantityOne. Ukupna normalizacija proteina provedena je kako je opisano u poglavlju "Materijali i metode". Podatci predstavljaju srednju vrijednost i standardnu devijaciju dobivenu iz tri neovisna biološka eksperimenta, a statistička značajnost (p <0.05) označena je zvjezdicom. K označava netretirane (kontrolne) stanice.

4.2.5 Farmakološka inhibicija ezrina pomoću NSC305787 pojačava antiproliferativne i pro-apoptotičke učinke vemurafeniba u rezistentnim stanicama melanoma A375 na sinergistički način

Zatim je procijenjena sposobnost inhibitora ezrina NSC305787 da pojača antiproliferativne učinke vemurafeniba i učinke protiv preživljavanja u stanicama melanoma A375 sa stečenom rezistencijom na vemurafenib. Očekivano, inhibitor ezrina pojačao je anti-proliferativni učinak vemurafeniba čak i u niskom subtoksičnom rasponu koncentracija (slika 30.a). Nadalje, testirano je devet kombinacija toksičnih i subtoksičnih koncentracija vemurafeniba i NSC305787 u pogledu njihove sposobnosti da smanje sposobnost preživljenja rezistentnih stanica melanoma.

Iznenađujuće, pokazano je da sve testirane kombinacije koncentracija dvaju agensa ispoljavaju sinergijski učinak inhibicije rasta na stanice melanoma rezistentne na vemurafenib u rasponu njihovih subtoksičnih koncentracija (slike 30.a, 30.b). Među njima, najjači sinergijski anti-proliferativni učinak potaknut je dvjema subtoksičnim koncentracijama vemurafeniba (3,41 μ M i 27,25 μ M što odgovara 1/16 IC50 odnosno 1/2 IC50) u kombinaciji s jednom subtoksičnom koncentracijom inhibitor ezrina (17 μ M što odgovara 1/4 IC50) (slika 30.b).



Koncentracija vemurafeniba (µM)

Tretman	IC50 (µM)		
Vemurafenib	54.54±8.27		
Ezrin inhibitor	68±10.52		
EZRi (IC50) + VEM	< 3.41		
EZRi (1/2 IC50) + VEM	13.37±3.13*		
EZRi (1/4 IC50) + VEM	31.97±8.48*		

b)

a)

VEM (µM)	EZRi (µM)	Kombinacijski indeks
3.41	17.0	0.34
3.41	34.0	0.62
3.41	3.41	3.41
6.82	34.0	0.65
6.82	68.0	0.97
13.63	34.0	0.53
13.63	68.0	0.90
27.25	17.0	0.31
27.25	34.0	0.47

Slika 29. Anti-proliferativni učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u stanicama melanoma A375 otpornima na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E nakon razdoblja tretiranja od 72 sata. (a) Učinak kombiniranog tretmana u ovisnosti o

90

koncentraciji na vijabilnost stanica mjeren MTT testom proliferacije. Vrijednosti IC50 izračunate su linearnom regresijskom analizom, a rezultati su statistički obrađeni ANOVA-om, Tukey post-hoc testom (p <0.05) i označeni zvjezdicom. Podatci su dobiveni iz tri neovisna biološka eksperimenta. (b) Kombinacijski indeks (CI) izračunat je za svaku kombinaciju lijekova iz krivulja inhibicije rasta korištenjem softvera CompuSyn prema postupku opisanom u poglavlju "Metode i materijali". Podatci su dobiveni iz tri neovisna biološka eksperimenta. Crvenom bojom označene su kombinacije koncentracija koje imaju najjači sinergijski učinak.

Kombinacija 27,25 µM vemurafeniba i 17 µM NSC305787 s najnižim kombinacijskim indeksom dodatno je procijenjena zbog svoje sposobnosti povećanja apoptoze izazvane vemurafenibom u rezistentnim stanicama melanoma (slike 31.a-d). Rezultati testa aneksin V otkrili su da je tretman rezistentnih stanica A375 kombinacijom vemurafeniba i inhibitora ezrina potpuno uklonio nezahvaćenu populaciju stanica u usporedbi s vemurafenibom. Važno je da je kombinirani tretman izazvao značajan porast populacije kasnih apoptotskih/nekrotičnih stanica u odnosu na tretman s pojedinačnim agensima, posebice s vemurafenibom (slika 31.e).

Zaključno, ovi rezultati pokazuju da inhibicija ezrina pojačava proapoptotski učinak vemurafeniba u rezistentnim stanicama melanoma A375.



Slika 30. Pro-apoptotski učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u staničnoj liniji A375 melanoma otpornoj na vemurafenib nakon 48-satnog razdoblja tretiranja. (a-d) Reprezentativne slike testa aneksin V provedenog za detekciju apoptoze kada su stanice tretirane bilo jednim agensom ili njihovom kombinacijom u navedenim koncentracijama tijekom 48 sati. Slike dobivene konfokalnim mikroskopom snimljene su pri povećanju od 20x: (a) netretirane stanice; (b) stanice tretirane vemurafenibom (VEM); (c) stanice tretirane inhibitorom ezrina (EZRi); (d) stanice tretirane dualnim tretmanom (VEM + EZRi); (e) kvantifikacija postotka nezahvaćenih stanica (Ann-/PI-), ranih apoptotskih stanica (Ann+/PI-) i kasnih apoptotskih/primarno nekrotičnih stanica (Ann+/PI+). Podatci su reprezentativni za dva neovisna biološka pokusa izvedena u dva ponavljanja. Ann (Aneksin V); PI (propidij jodid). Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost \pm SD. Broj vidnih polja bio je 8 za sve tretmane u oba ponavljanja. Dvosmjerna ANOVA s Tukeyevim post-hoc testom samo su najvažniji rezultati između skupina označeni s tri zvjezdice (p ≤0.001).

5 Rasprava

5.1 Karakteristike sekretoma BRAFV600E-mutiranih stanica raka debelog crijeva sa stečenom rezistencijom na BRAF inhibitor vemurafenib

U ovoj disertaciji po prvi je put uspoređen sekretomski profil vemurafenib-osjetljivih RKO stanica u odnosu na vemurafenib-rezistentne RKO stanice raka debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E. Iako je slična studija napravljena na modelu BRAFV600E-mutiranih stanica melanoma (201), trenutačno nema dostupnih literaturnih podataka o sekretomskim značajkama povezanim sa stečenom rezistencijom na BRAFV600E inhibitore u raku debelog crijeva. Važnost ove disertacije leži u primijenjenom metodološkom pristupu koji se temelji na kombiniranju dviju komplementarnih proteomskih platformi, 2-DE/MALDI TOF/TOF MS i LC-MS/MS, čime se osigurala povećana pokrivenost proteina i zaobišla ograničenja inherentna svakom individualnom analitičkom pristupu.

Optimizacijom metode prikupljanja sekretoma, u vidu jednosatne predinkubacije stanica u staničnom mediju bez dodanog FBS-a, omogućeno je da u nizvodnim analizama ne bude gubitaka informacija o proteinima manje molekulske težine, što je osobito važno za analizu robusnijom metodom 2-DE/MALDI TOF/TOF masene spektrometrije.

Bioinformatička analiza proteina pojačano izraženih u rezistentnim stanicama identificiranih kombiniranim metodama masene spektrometrije otkrila je uključenost procesa replikacije i popravka DNA u razvoju rezistencije na vemurafenib. Identificirani proteini su visoko rangirani čvorišni proteini unutar PPI mreže te, jako lokalizirani u jezgri, ovi su proteini otkriveni u sekretomu stanica raka debelog crijeva. Ovo otkriće pokazuje dobru podudarnost s nedavnom studijom koja je pružila dokaze da su nuklearni proteini koji reguliraju replikaciju DNA i popravak obogaćeni unutar neklasično izlučenih proteina iz različitih vrsta stanica raka (189). Prethodno istraživanje na stanicama raka dojke sugeriralo je da se nekoliko jezgrinih proteina izlučuje kroz egzosome, jedan od najbolje opisanih neklasičnih sekretornih putova (187), što bi također moglo djelomično objasniti zašto su detektirani nuklearni proteini u sekretomu stanica raka. Još jedno objašnjenje zašto se nuklearni proteini mogu naći u sekretomima staničnih linija raka dolazi iz prethodnih otkrića koja pokazuju sposobnost nekih proteina sekretoma klasificiranih kao nuklearnih prema ontologiji gena da promijene svoju staničnu lokalizaciju u citoplazmi i izvanstaničnom prostoru (187,189).

Prethodno je dokazana uloga replikacije DNA u mehanizmima koji reguliraju razvoj rezistencije stanica raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E na MEK inhibitor selumetinib (202). Pokazalo se da je do stjecanja rezistencije na inhibitore MEK došlo zbog *de novo* amplifikacije BRAFV600E kao rezultata replikacije DNA tijekom produljenog tretmana selumetinibom (202). Ista je studija također otkrila da je smanjenje učestalosti replikacije DNA tijekom tretmana selumetinibom suzbilo pojavu rezistentnih klonova. S obzirom na to da je MEK glavni posrednik onkogenog BRAF proteina u MAPK signalnom putu, ne možemo isključiti mogućnost da je isti mehanizam uključen u razvoj otpornosti na BRAF inhibitor vemurafenib u RKO stanicama raka debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E.

Sustav licenciranja replikacije DNA kontrolira replikaciju DNA osiguravajući da se kromosomska DNA duplicira točno jednom prije nego što dođe do diobe stanica, čime se održava integritet genoma. Prethodne studije pružile su mnoštvo dokaza u prilog ulozi čimbenika licenciranja replikacije kao onkogena koji reguliraju nastanak i napredovanje raka. Nekoliko faktora licenciranja replikacije DNA, uključujući MCM2, MCM3, MCM5 i MCM6, pokazalo se statistički značajno pojačano izraženo u sekretomu RKO stanica rezistentnih na vemurafenib, što pruža dodatne dokaze u prilog prethodno pokazane uloge kompleksa replikativne helikaze MCM2-7, koji je jezgra kompleksa licenciranja inicijacije replikacije u stečenoj kemorezistenciji. Primjerice, pokazalo se da je produljena aktivnost MCM2 povezana s rezistencijom na vemurafenib u stanicama melanoma (203). Slična studija u stanicama melanoma ovisnim o BRAF inhibitoru otkrila je smanjenje MCM2, MCM3 i MCM5 nakon prekidanja tretiranja lijekom u korelaciji sa smanjenom vijabilnošću stanica koja je posljedica prekida tretmana (204), što ukazuje na važnu ulogu ovih čimbenika licenciranja replikacije DNA u mehanizmima rezistencije stanica melanoma otpornih na BRAF inhibitor.

Osim čimbenika licenciranja replikacije DNA, za nekoliko drugih proteina uključenih u proces replikacije DNA također je otkriveno da su povećani u sekretomu rezistentnih RKO stanica uključujući FEN1, PCNA i RPA1. Međutim, među svim tim proteinima, RPA1 se ističe kao najrelevantniji iz perspektive kliničke translacije s obzirom na to da je povećana ekspresija proteina RPA1 u uzorcima tumora adenokarcinoma debelog crijeva TCGA bila povezana s genotipom BRAFV600E i histologijom mucinoznog adenokarcinoma karakterističnog za tumore koji nose BRAF mutaciju. Važno je da je povećana ekspresija RPA1 na razini gena također bila u korelaciji s lošim ishodima preživljavanja u bolesnika s mutiranim BRAFV600E s adenokarcinomom debelog crijeva i mucinoznim adenokarcinomom debelog crijeva. Ovo zapažanje proizašlo iz *in silico* analiza podupire prethodno objavljenu mogućnost korištenja proteina RPA1 kao prognostičkog čimbenika u bolesnika s

rakom debelog crijeva pri čemu je povećana ekspresija proteina RPA1 bila značajno povezana s kraćim ukupnim preživljenjem (205). Budući da se pokazalo da RPA1 djeluje kao onkogen tijekom razvoja raka debelog crijeva (206), mogao bi potencijalno poslužiti kao dijagnostički pokazatelj raka debelog crijeva. Konkretno, ovi podatci otvaraju mogućnost korištenja cirkulirajućeg RPA1 za praćenje odgovora na terapiju kod BRAF-mutiranog raka debelog crijeva. Ovu bi mogućnost trebalo dodatno ispitati u kliničkoj studiji.

Prijašnje istraživanje na stanicama raka debelog crijeva pokazalo je povezanost između razina proteina RPA1 i brzine sinteze DNA s obzirom na to da je smanjenje aktivnosti replikacije DNA *in vitro* kao rezultat inhibicije sinteze DNA izazvane tirapazaminom (TPZ) bilo povezano sa smanjenjem razina proteina RPA1 u citoplazmatskim ekstraktima stanica tretiranih TPZ (207). Štoviše, dodavanje rekombinantnog RPA1 u ekstrakte stanica tretiranih TPZ-om uspjelo je vratiti aktivnost replikacije DNA do razine kontrole, što sugerira da RPA1 posreduje u učincima kemoterapijskih agensa koji inhibiraju replikaciju DNA.

Sukladno ovim saznanjima, pretpostavljamo da bi povećane razine proteina RPA1 otkrivene u sekretomu rezistentnih RKO stanica mogle biti potencijalno indikativne za aberantnu replikaciju DNA koja dopušta trajnu proliferaciju rezistentnih stanica pod produljenom izloženošću vemurafenibu. Doista, prethodno se pokazalo da RPA1 potiče proliferaciju stanica raka debelog crijeva, budući da je knockdown RPA1 značajno smanjio stopu stanične proliferacije, dok je prekomjerna ekspresija RPA1 značajno povećala stopu proliferacije stanica raka debelog crijeva (208). Važno je da je knockdown RPA1 pojačao antiproliferativni učinak oksaliplatine u stanicama raka debelog crijeva, što se može pripisati inhibiciji sinteze DNA dokazane smanjenim brojem stanica u S fazi (208). Sve u svemu, ovi nalazi pokazuju da bi RPA1 mogao poslužiti kao nova meta za kemosenzibilizaciju kod raka debelog crijeva. Ova je hipoteza već dokazana u BRAF-mutiranom raku debelog crijeva pokazujući da knockdown RPA1 povećava citotoksične učinke 5fluorouracila (5-FU) u BRAFV600E-mutiranim HT-29 stanicama raka debelog crijeva značajnim smanjenjem proliferativne sposobnosti stanica izmjerene testom stvaranja kolonija i poticanjem apoptoze koju inducira 5-FU (206).

Osim u posredovanju na učinak kemoterapije, proteinska mašinerija uključena u replikaciju DNA igra važnu ulogu kao nizvodni efektor citotoksičnih učinaka zračenja u BRAF-mutiranim stanicama raka debelog crijeva. Primjerice, zračenje izaziva dozno-ovisan porast razine ekspresije proteina RPA70 vezanog za kromatin u RKO stanicama (209). Važno je također navesti da smanjena razina proteina KIN17 koji je uključen u replikaciju DNA poboljšava radioosjetljivost RKO stanica.
Stoga bi se koncept temeljen na interferenciji s proteinima replikacije DNA mogao pokazati korisnim za poboljšanje učinkovitosti kemoterapije u tretmanu BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva. U tom kontekstu, ciljanje na RPA1 može predstavljati novu i obećavajuću strategiju za prevladavanje rezistencije na inhibiciju BRAF kod raka debelog crijeva.

Smanjeno izraženi proteini identificirani u sekretomu rezistentnih RKO stanica uglavnom su bili povezani sa staničnom adhezijom i funkcijom ER povezanom sa smatanjem i obradom proteina u ER i UPR.

Bioinformatička analiza utvrdila je da je pet najznačajnijih čvorišnih proteina uključeno u ER stres i UPR (HSPA5, HSP90B1, PDIA4 i CALR) te staničnu adheziju (ITGB1). Zanimljivo otkriće proizašlo iz dodatnih *in silico* analiza bilo je povezano sa značajno povišenim razinama mRNA triju ER proteina povezanih sa stresom, uključujući *HSPA5, HSP90B1* i *CALR* kod raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E u usporedbi s nepromijenjenom skupinom u skupu podataka o adenokarcinomu debelog crijeva TCGA, dok su suprotni obrasci ekspresije otkriveni na njihovim razinama proteina.

Ova opažanja predlažu da bi abnormalna regulacija funkcije ER mogla biti povezana s genotipom BRAFV600E kod raka debelog crijeva. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim nalazima koji pokazuju da onkogeni BRAF izaziva kronični ER stres u BRAF-mutiranim stanicama raka debelog crijeva (210). Pored toga, UPR je prethodno identificiran kao put značajno povezan s podskupinom raka debelog crijeva s mutiranim BRAF-om s lošom prognozom (210).

lako su smanjene razine ekspresije mRNA nekoliko proteina povezanih s UPR-om identificiranih u ovoj disertaciji bile povezane s nižim srednjim ukupnim preživljenjem bolesnika s mutiranim BRAF karcinomom debelog crijeva, samo je za HSPA5 ta korelacija bila statistički značajna. Na temelju ovih *in silico* rezultata, predlažemo da bi smanjena razina izlučenog HSPA5 mogla biti potencijalni pokazatelj ishoda liječenja raka debelog crijeva s BRAF mutacijom.

HSPA5 ili protein reguliran glukozom 78 kDa (GRP78) član je obitelji proteina toplinskog šoka koji se nalazi u endoplazmatskom retikulumu. Djeluje kao ključni regulator UPR-a i apoptotičkog mehanizma povezanog s ER-om (211). GRP78 regulira UPR tako što se veže i deaktivira ER senzore stresa u uvjetima bez stresa. Kada se krivo smotani proteini akumuliraju u ER-u, što dovodi do stresa ER-a, GRP78 se veže za pogrešno namotane proteine, otpušta UPR senzore i pokreće UPR. Heijmans i suradnici (212) pokazali su da je smanjenje ili inaktivacija GRP78 induciralo UPR u stanicama raka debelog crijeva LS174T i sugerirali da smanjenje

GRP78 može poslužiti kao pouzdan model za proučavanje signalizacije ER stresa. lako je GRP78 uglavnom lokaliziran u lumenu ER. ER stres potiče translokaciju subfrakcije GRP78 na površinu stanice i njegovu sekreciju (211). Temeljem rezultata ovih studija pretpostavljamo da smanjena ekspresija HSPA5 izlučenog u kondicioniranom mediju iz RKO stanica rezistentnih na vemurafenib može biti indikacija aktivacije UPR-a koja je posljedica ER stresa tijekom dugotrajne izloženosti vemurafenibu. Prethodno je pokazano da inhibicija GRP78 izaziva ER stres i apoptozu u panelu BRAFV600E mutiranih staničnih linija raka debelog crijeva. Slično, smanjena ekspresija proteina GRP78 smanjila je održivost BRAF mutiranih stanica raka debelog crijeva (210,213), što ukazuje da BRAF mutirane stanice raka debelog crijeva ovise o preživljavanju o UPR-u. Znajući da aktivacija UPR-a, koja proizlazi iz kontinuirane izloženosti blagom ER stresu, omogućuje preživljavanje stanica (210,213,214), predlažemo da bi regulacija HSPA5 u rezistentnim RKO stanicama mogla biti dio adaptivnog odgovora na kronični stres izazvan dugotrajnim izlaganjem niskoj koncentraciji (11,52 µM) vemurafeniba što potiče rast rezistentnih stanica.

Potrebne su daljnje studije kako bi se potvrdila uključenost ER stresa i UPR-a u razvoju rezistencije na vemurafenib i kako bi se razjasnila uloga cirkulirajućeg GRP78 u mehanizmima rezistencije na lijekove kod BRAF mutiranog raka debelog crijeva.

Povećana razina izlučenog RPA1 proteina identificirana je u ovoj studiji kao istaknuta sekretorna značajka fenotipa otpornog na vemurafenib u BRAFV600E mutiranim stanicama raka debelog crijeva. Također, dodatna in silico analiza pokazala je da je povećana razina izlučenog RPA1 proteina molekularna karakteristika tumora bolesnika s BRAFV600E mutiranim rakom debelog crijeva povezana s nepovoljnim ishodom preživljenja. Stoga bi povećana ekspresija izlučenog RPA1 proteina mogla predstavljati važan prognostički čimbenik i potencijalnu novu metu za kemosenzibilizaciju u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva. Isto tako, smanjena ekspresija sekretornog proteina HSPA5/GRP78 pojavila se u ovoj studiji kao važna značajka povezana s kemorezistentnim fenotipom, što je također u in silico analizama povezano s BRAFV600E genotipom i lošim stopama preživljenja u bolesnika s rakom debelog crijeva. Ovi nalazi zahtijevaju daljnju validaciju na kliničkim uzorcima, što je trenutačno ograničeno malim brojem bolesnika s metastatskim rakom debelog crijeva koji primaju terapiju inhibitorima BRAFV600E u nacionalnim kliničkim centrima, a što bi moglo pružiti dodatnu kliničku potporu ovim nalazima zbog relativno niske učestalosti BRAFV600E mutacije u populaciji bolesnika s rakom debelog crijeva i visokih troškova terapije. Kako bi se riješili ovi izazovi, bit će potrebne multicentrične studije validacije.

S obzirom na to da mehanizmi koji stoje u osnovi primarne rezistencije na inhibitore BRAFV600E u metastatskom raku debelog crijeva s BRAF mutacijom nisu u potpunosti razjašnjeni zbog heterogenosti odgovora na lijekove koja proizlazi iz molekularne heterogenosti BRAFV600E mutiranog raka debelog crijeva (52) te s obzirom na to da trenutačno nema utvrđenih biljega koji predviđaju primarnu rezistenciju na anti-BRAF terapiju u raku debelog crijeva (215), ovi nalazi mogu postaviti temelje za buduće studije kako bi se identificirali klinički relevantni kandidati proteinskih biljega u krvi s prediktivnom vrijednosti koji bi mogli usmjeriti kliničko liječenje bolesnika s rakom debelog crijeva na anti-BRAF terapiji. To je posebno važno za bolesnike s kirurški inoperabilnom bolešću i agresivnom bolešću s metastazama kod kojih tumorsko tkivo nije lako dostupno. Cirkulirajući biljezi, poput proteina RPA1 i HSPA5/GRP78, mogli bi stoga imati važnu ulogu u praćenju odgovora na inhibitore BRAF i usmjeravanje kliničkog odlučivanja kod oboljelih od raka debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom.

5.2 Karakteristične promjene na razini staničnog proteoma u BRAFV600E-mutiranim stanicama raka debelog crijeva koje su rezistentne na vemurafenib

U drugom dijelu disertacije fokus je bio stavljen na razlike u profilu unutarstaničnog proteoma stanica RKO osjetljivih i rezistentnih na tretman vemurafenibom.

Podatci različito eksprimiranih proteina identificiranih dvjema komplementarnim proteomskim tehnologijama, koje uključuju 2-DE gel elektroforezu spregnutu s MALDI-TOF MS i LC-MS/MS, bili su integrirani i zatim podvrgnuti bioinformatičkim analizama za interpretaciju bioloških podataka i identifikaciju ključnih proteina i putova povezanih s rezistencijom na vemurafenib. Dobiveni rezultati otkrili su organizaciju aktinskog citoskeleta kao jednu od najznačajnijih značajki fenotipa otpornog na vemurafenib i ukazali na ezrin, poveznicu između proteina stanične membrane i aktinskog citoskeleta kao najrelevantniju pretpostavljenu proteinsku metu za farmakološku intervenciju. Posebno smo potvrdili vremenski ovisan porast ekspresije ezrina na razini gena i proteina u stanicama raka debelog crijeva otpornim na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E u uvjetima bez i nakon izlaganja niskim koncentracijama vemurafeniba. Važno je istaknuti da je farmakološka inhibicija ezrina inhibitorom NSC305787 pojačala anti-proliferativne i pro-apoptotske učinke

vemurafeniba u rezistentnim stanicama na aditivan način, što je bilo popraćeno smanjenjem ekspresije CD44 i supresijom AKT/c-Myc signalizacije koja potiče preživljenje stanica.

Prethodne studije na sličan su način izvijestile o ulozi pojačane ekspresije ezrina u mehanizmima koji leže u osnovi rezistencije na kemoterapiju kod različitih tipova raka, uključujući rak dojke (216–218), karcinom pločastih stanica jezika (219) i osteosarkom (220), te su pokazale da supresija ezrina genetskom ili farmakološkom manipulacijom može povećati kemoterapijsku osjetljivost. Iako je visoka razina ekspresije ezrina prethodno bila u korelaciji s invazijom raka debelog crijeva, metastazama i lošijom prognozom ukazujući na ulogu ezrina u patogenezi raka debelog crijeva (221,222), do sada nisu objavljeni podatci o njegovoj ulozi u modulaciji odgovora i razvoju rezistencije na kemoterapiju kod raka debelog crijeva. Zanimljivo je da je visoka ekspresija ezrina prethodno bila u korelaciji sa statusom mutacije BRAFV600E u raku debelog crijeva s obzirom na to da je pojačano imunohistokemijsko bojanje ezrina pronađeno pretežno u tumorima s mutiranim BRAFV600E (52 %) u usporedbi s tumorima divljeg tipa BRAF (17 %) (223). Ova otkrića koja ukazuju na ulogu ezrina kao nove mete za kemosenzibilizaciju kod raka debelog crijeva s mutacijom BRAFV600E mogu biti osobito relevantna u svjetlu nedavnih kliničkih dokaza koji pokazuju kratkoročnu učinkovitost klinički odobrene kombinirane terapije s EGFR/BRAF inhibitorima u bolesnika s BRAFV600Emutiranim metastatskim rakom debelog crijeva zbog brzog razvoja rezistencije (224), što zahtijeva razvoj novih terapijskih strategija za BRAFV600E-mutirani rak debelog crijeva. U tom smislu, inhibitori ezrina mogli bi se dalje istraživati unutar pretkliničkih i kliničkih studija kao adjuvanti BRAF inhibitorima u liječenju BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva.

Zapažanje da je ezrin, poveznica između aktina i staničnog citoskeleta, pojačano izražen u rezistentnim stanicama raka debelog crijeva motiviralo nas je da ispitamo njegovu moguću uključenost u posredovanje otpornosti na vemurafenib u stanicama melanoma s obzirom na to da je uloga organizacije i preoblikovanja aktinskog citoskeleta prethodno dokazana u prijelazu od osjetljivog na vemurafenib-rezistentni fenotip u BRAFV600E mutiranom melanomu *in vitro* (225,226). Vezano uz navedeno, eksperimentalno smo ustanovili povećane razine ezrina u stanicama melanoma otpornim na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E u uvjetima bez tretmana i u prisutnosti niske koncentracije vemurafeniba (0,8 µM). Važno je istaknuti da je kombinacija inhibitora ezrina NSC305787 i vemurafeniba u niskim subtoksičnim koncentracijama pokazala sinergijske učinke inhibicije rasta i induciranja apoptoze u rezistentnim stanicama, što ukazuje na ulogu ezrina u regulaciji rezistencije na vemurafenib kod BRAFV600E mutiranog melanoma.

Zaključno, u ovoj disertaciji otkriveno je da je ezrin uključen u rezistenciju na vemurafenib kod BRAFV600E-mutiranog raka debelog crijeva i melanoma. Zanimljivo je primijetiti da je kombinirani tretman s inhibitorom ezrina i vemurafenibom izazvao različite modalitete citostatskih učinaka ispoljavanjem sinergijskog učinka u melanomu naspram aditivnog učinka u stanicama raka debelog crijeva. Ovo odstupanje moglo bi se, barem djelomično, pripisati različitom genetskom podrijetlu i različitoj inherentnoj osjetljivosti ova dva tipa stanica raka na testirane lijekove, što je i rezultiralo odabirom različitog raspona koncentracija lijekova testiranih na te dvije stanične linije. Ipak, BRAFV600E-mutirane stanice raka debelog crijeva i stanice melanoma dijele neke molekularne sličnosti koje prate prijelaz na fenotip otporan na lijekove koji bi mogao proizaći iz zajedničkog genotipa BRAFV600E kao i iz zajedničkog BRAFV600E-usmjerenog transkripcijskog regulatornog puta koji posreduje u epigenetskom utišavanju prethodno opaženom kod raka debelog crijeva i melanoma (227).

6 Zaključak

Glavne značajke sekretoma povezane sa stečenom rezistencijom na BRAF inhibitor vemurafenib u BRAFV600E-mutiranim stanicama raka debelog crijeva otkrivene u ovoj doktorskoj disertaciji uključuju deregulaciju replikacije DNA i funkcije endoplazmatskog retikuluma. Vezano za potencijalnu kliničku translaciju dobivenih rezultata, najznačajniji sekretorni proteini povezani sa stjecanjem kemorezistentnog fenotipa su RPA1 i HSPA5/GRP78, koji su uključeni u regulaciju replikacije DNA, odnosno u induciranje odgovora na nepravilno smotane proteine. Specifično, povišena ekspresija RPA1 i smanjena ekspresija HSPA5/GRP78 najvažnije su sekretorne značajke rezistentnih stanica. Nadalje, ove su značajke u dodatnim in silico analizama također bile specifično povezane s BRAFV600E genotipom i lošim ishodima preživljenja bolesnika oboljelih od karcinoma debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom. Ovi bi rezultati trebali biti dodatno funkcionalno potvrđeni, a njihov prognostički potencijal dalje istražen u budućim kliničkim studijama na bolesnicima s BRAFV600E mutiranim rakom debelog crijeva. Budući da je obrazac ekspresije mRNA RPA1 i HSPA5/GRP78 u tumorskim tkivima bolesnika s rakom debelog crijeva u in silico analizama povezan s BRAFV600E mutacijom, mogućnost ekstrapolacije ovih nalaza i njihovih kliničkih implikacija na druge solidne tumore koji imaju BRAFV600E mutaciju, poput primjerice melanoma, također bi trebala biti dodatno istražena.

Temeljem rezultata analiza proteomskog sadržaja RKO stanica raka debelog crijeva osjetljivih i rezistentnih na vemurafenib prikazanih u ovoj disertaciji, predlaže se da bi se inhibicija ezrina mogla dalje testirati i istražiti kao nova strategija za dokidanje rezistencije na BRAF inhibitore. Doista, ovi rezultati pokazuju da je povećana ekspresija ezrina povezana s rezistentnim fenotipom u BRAFV600E-mutiranim stanicama raka debelog crijeva i melanoma te da se farmakološkom inhibicijom ezrina značajno povećava odgovor rezistentnih stanica na vemurafenib u uvjetima *in vitro*. Ovi bi rezultati mogli potaknuti daljnje pretkliničke i kliničke studije koje bi istražile učinkovitost kombiniranog tretmana s BRAF inhibitorima i farmakološkim agensima koji ciljaju ezrinom regulirani aktinski citoskelet kao novi terapijski pristup u liječenju refraktornih tumora s BRAFV600E mutacijom.

7 Popis literature

- 1. Cancer Today [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://gco.iarc.who.int/today/
- 2. Colorectal cancer [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer
- 3. What is Colorectal Cancer [Internet]. Digestive Cancers Europe. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://digestivecancers.eu/colorectal-what/
- 4. Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencijanezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/
- 5. Odsjek za koordinaciju programa probira raka debelog crijeva [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://www.hzjz.hr/odsjek-za-program-ranog-otkrivanja-raka-kolona/
- 6. Epidemiologija raka debelog crijeva u Hrvatskoj [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencijanezaraznih-bolesti/epidemiologija-raka-debelog-crijeva-u-hrvatskoj/
- 7. Rak debelog crijeva [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Naslovna. Available from: https://program-rakdc.com.hr/
- Salva de Torres C, Baraibar I, Saoudi González N, Ros J, Salva F, Rodríguez-Castells M, et al. Current and Emerging Treatment Paradigms in Colorectal Cancer: Integrating Hallmarks of Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2024 Jan;25(13):6967.
- 9. Molina-Cerrillo J, San Román M, Pozas J, Alonso-Gordoa T, Pozas M, Conde E, et al. BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. Cancers (Basel). 2020 Jun 14;12(6):1571.
- 10. Shaikh R, Bhattacharya S, Prajapati BG. Microsatellite instability: A potential game-changer in colorectal cancer diagnosis and treatment. Results in Chemistry. 2024 Jan 1;7:101461.
- Li Q, Luo H, Wang W, Mo YQ, Luo Q, Wang L, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy | Signal Transduction and Targeted Therapy. Sig Transduct Target The [Internet]. 2024 Oct 7 [cited 2025 Jun 2];9(266). Available from: https://www.nature.com/articles/s41392-024-01953-7

- 12. Fanelli GN, Dal Pozzo CA, Depetris I, Schirripa M, Brignola S, Biason P, et al. The heterogeneous clinical and pathological landscapes of metastatic Brafmutated colorectal cancer. Cancer Cell Int. 2020;20:30.
- 13. Guerrero RM, Labajos VA, Ballena SL, Macha CA, Lezama MS, Roman CP, et al. Targeting BRAF V600E in metastatic colorectal cancer: where are we today? Ecancermedicalscience. 2022;16:1489.
- 14. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. Acta Biomed. 2018 Dec 17;89(9-S):97–101.
- 15. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. Gastroenterology. 2007 Jan;132(1):127–38.
- Kanat O, Ertas H, Caner B. Contemporary treatment approaches for metastatic colorectal cancer driven by BRAF V600 mutations. World J Gastrointest Oncol. 2020 Oct 15;12(10):1080–90.
- 17. Niv Y. Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2007 Mar 28;13(12):1767–9.
- 18. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. Gastroenterology. 2020 Jan;158(2):291–302.
- 19. Crockett SD, Nagtegaal ID. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. Gastroenterology. 2019 Oct;157(4):949-966.e4.
- 20. Rad R, Cadiñanos J, Rad L, Varela I, Strong A, Kriegl L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. Cancer Cell. 2013 Jul 8;24(1):15–29.
- Fang M, Hutchinson L, Deng A, Green MR. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016 Feb 2;113(5):1250–5.
- 22. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. Gut. 2004 Aug;53(8):1137–44.
- 23. Molinari F, Signoroni S, Lampis A, Bertan C, Perrone F, Sala P, et al. BRAF mutation analysis is a valid tool to implement in Lynch syndrome diagnosis in

patients classified according to the Bethesda guidelines. Tumori. 2014;100(3):315–20.

- 24. Gu R, Fang H, Wang R, Dai W, Cai G. A comprehensive overview of the molecular features and therapeutic targets in BRAFV600E-mutant colorectal cancer. Clin Transl Med. 2024 Jul;14(7):e1764.
- 25. Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. Int J Mol Sci. 2019 Oct 28;20(21):5369.
- 26. Song Y, Chen M, Wei Y, Ma X, Shi H. Signaling pathways in colorectal cancer: implications for the target therapies. Mol Biomed. 2024 Jun 7;5(1):21.
- Cope N, Novak B, Candelora C, Wong K, Cavallo M, Gunderwala A, et al. Biochemical Characterization of Full-Length Oncogenic BRAFV600E together with Molecular Dynamics Simulations Provide Insight into the Activation and Inhibition Mechanisms of RAF Kinases. Chembiochem. 2019 Nov 18;20(22):2850–61.
- 28. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. Exp Ther Med. 2020 Mar;19(3):1997–2007.
- 29. Zaman A, Wu W, Bivona TG. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. Cancers (Basel). 2019 Aug 16;11(8):1197.
- Pan JH, Zhou H, Zhu SB, Huang JL, Zhao XX, Ding H, et al. Development of small-molecule therapeutics and strategies for targeting RAF kinase in BRAFmutant colorectal cancer. Cancer Manag Res. 2018;10:2289–301.
- 31. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2011 Jun;12(6):594–603.
- Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, et al. BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. Cancer Cell. 2015 Sep 14;28(3):370–83.
- Owsley J, Stein MK, Porter J, In GK, Salem M, O'Day S, et al. Prevalence of class I-III BRAF mutations among 114,662 cancer patients in a large genomic database. Exp Biol Med (Maywood). 2021 Jan;246(1):31–9.
- Schirripa M, Biason P, Lonardi S, Pella N, Pino MS, Urbano F, et al. Class 1, 2, and 3 BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Detailed Clinical, Pathologic, and Molecular Characterization. Clin Cancer Res. 2019 Jul 1;25(13):3954–61.

- 35. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell. 2004 Mar 19;116(6):855–67.
- 36. Strickler JH, Wu C, Bekaii-Saab T. Targeting BRAF in metastatic colorectal cancer: Maximizing molecular approaches. Cancer Treat Rev. 2017 Nov;60:109–19.
- 37. East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. Gut. 2017 Jul;66(7):1181–96.
- 38. Tapial S, Olmedillas-López S, Rueda D, Arriba M, García JL, Vivas A, et al. Cimp-Positive Status is More Representative in Multiple Colorectal Cancers than in Unique Primary Colorectal Cancers. Sci Rep. 2019 Jul 19;9(1):10516.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet. 2006 Jul;38(7):787–93.
- 40. Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFG to mediate the CpG Island Methylator phenotype. Mol Cell. 2014 Sep 18;55(6):904–15.
- Kayhanian H, Goode E, Sclafani F, Ang JE, Gerlinger M, Gonzalez de Castro D, et al. Treatment and Survival Outcome of BRAF-Mutated Metastatic Colorectal Cancer: A Retrospective Matched Case-Control Study. Clin Colorectal Cancer. 2018 Mar;17(1):e69–76.
- 42. Motta R, Cabezas-Camarero S, Torres-Mattos C, Riquelme A, Calle A, Figueroa A, et al. Immunotherapy in microsatellite instability metastatic colorectal cancer: Current status and future perspectives. J Clin Transl Res. 2021 Aug 26;7(4):511–22.
- 43. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019 Jun;16(6):361–75.
- 44. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. J Natl Cancer Inst. 2013 Aug 7;105(15):1151–6.
- 45. Napolitano S, Ciardiello D, Cioli E, Martinelli E, Troiani T, Giulia Zampino M, et al. *BRAFV600E* mutant metastatic colorectal cancer: Current advances in

personalized treatment and future perspectives. Cancer Treatment Reviews. 2025 Mar 1;134:102905.

- Afrăsânie VA, Gafton B, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Miron L, Rusu C, et al. The Coexistence of RAS and BRAF Mutations in Metastatic Colorectal Cancer: A Case Report and Systematic Literature Review. J Gastrointestin Liver Dis. 2020 Jun 3;29(2):251–6.
- 47. Zelli V, Parisi A, Patruno L, Cannita K, Ficorella C, Luzi C, et al. Concurrent RAS and RAS/BRAF V600E Variants in Colorectal Cancer: More Frequent Than Expected? A Case Report. Front Oncol. 2022;12:863639.
- Larki P, Gharib E, Yaghoob Taleghani M, Khorshidi F, Nazemalhosseini-Mojarad E, Asadzadeh Aghdaei H. Coexistence of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. Cell J. 2017;19(Suppl 1):113–7.
- Deshwar A, Margonis GA, Andreatos N, Barbon C, Wang J, Buettner S, et al. Double KRAS and BRAF Mutations in Surgically Treated Colorectal Cancer Liver Metastases: An International, Multi-institutional Case Series. Anticancer Res. 2018 May;38(5):2891–5.
- 50. Vittal A, Middinti A, Kasi Loknath Kumar A. Are All Mutations the Same? A Rare Case Report of Coexisting Mutually Exclusive KRAS and BRAF Mutations in a Patient with Metastatic Colon Adenocarcinoma. Case Rep Oncol Med. 2017;2017:2321052.
- 51. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2015 Dec 1;33(34):4032–8.
- 52. Barras D, Missiaglia E, Wirapati P, Sieber OM, Jorissen RN, Love C, et al. BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression. Clin Cancer Res. 2017 Jan 1;23(1):104–15.
- 53. Angerilli V, Fontana E, Lonardi S, Sbaraglia M, Borelli B, Munari G, et al. Intratumor morphologic and transcriptomic heterogeneity in V600EBRAFmutated metastatic colorectal adenocarcinomas. ESMO Open. 2021 Aug;6(4):100211.
- 54. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015 Nov;21(11):1350–6.

- 55. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VMJ, Liipo TKE, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. Br J Cancer. 2015 Jun 9;112(12):1966–75.
- 56. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. Int Biol Biomed J. 2017;3(3):105–11.
- 57. Guerrero P, Albarrán V, San Román M, González-Merino C, García de Quevedo C, Moreno J, et al. BRAF Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer and Mechanisms of Resistance: A Review of the Literature. Cancers. 2023 Jan;15(21):5243.
- Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov. 2015 Jan;5(1):43–51.
- 59. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2017 Feb;17(2):79–92.
- 60. Saliakoura M, Konstantinidou G. Lipid Metabolic Alterations in KRAS Mutant Tumors: Unmasking New Vulnerabilities for Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2023 Jan;24(2):1793.
- 61. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer. 2003 May;3(5):330–8.
- 62. Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. Clin Ther. 2005 Jan;27(1):23-44.
- Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. Br J Cancer. 2004 Nov 29;91(11):1931–46.
- Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. Ann Oncol. 2002 Dec;13(12):1841– 51.
- 65. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. N Engl J Med. 2004 Jun 3;350(23):2343–51.

- 66. Grothey A, Fakih M, Tabernero J. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. Ann Oncol. 2021 Aug;32(8):959–67.
- 67. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Sig Transduct Target Ther. 2020 Mar 20;5(1):1–30.
- You XH, Jiang YH, Fang Z, Sun F, Li Y, Wang W, et al. Chemotherapy plus bevacizumab as an optimal first-line therapeutic treatment for patients with right-sided metastatic colon cancer: a meta-analysis of first-line clinical trials. ESMO Open. 2020 Jan 1;5(2):e000605.
- 69. Kim G, McKee AE, Ning YM, Hazarika M, Theoret M, Johnson JR, et al. FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation. Clin Cancer Res. 2014 Oct 1;20(19):4994–5000.
- Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 2012 Jun 15;18(12):3242–9.
- 71. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011 Jun 30;364(26):2507–16.
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med. 2012 Feb 23;366(8):707–14.
- Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFRmediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. Cancer Discov. 2012 Mar;2(3):227–35.
- 74. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature. 2012 Jan 26;483(7387):100–3.
- 75. Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. Cancers (Basel). 2020 Nov 3;12(11):3236.
- Ciombor KK, Strickler JH, Bekaii-Saab TS, Yaeger R. BRAF-Mutated Advanced Colorectal Cancer: A Rapidly Changing Therapeutic Landscape. J Clin Oncol. 2022 Aug 20;40(24):2706–15.

- 77. Chen G, Gao C, Gao X, Zhang DH, Kuan SF, Burns TF, et al. Wnt/β-Catenin Pathway Activation Mediates Adaptive Resistance to BRAF Inhibition in Colorectal Cancer. Mol Cancer Ther. 2018 Apr;17(4):806–13.
- Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Bradley WD, Lee RJ, et al. Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAFmutant colorectal cancer. Cancer Res. 2012 Feb 1;72(3):779–89.
- 79. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, Reidy DL, Kemeny N, Wolinsky T, et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. Clin Cancer Res. 2015 Mar 15;21(6):1313–20.
- van Geel RMJM, Tabernero J, Elez E, Bendell JC, Spreafico A, Schuler M, et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic BRAF-Mutant Colorectal Cancer. Cancer Discov. 2017 Jun;7(6):610–9.
- 81. Corcoran RB, André T, Atreya CE, Schellens JHM, Yoshino T, Bendell JC, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer. Cancer Discov. 2018 Apr;8(4):428–43.
- Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. N Engl J Med. 2019 Oct 24;381(17):1632–43.
- 83. Tan L, Tran B, Tie J, Markman B, Ananda S, Tebbutt NC, et al. A Phase Ib/II Trial of Combined BRAF and EGFR Inhibition in BRAF V600E Positive Metastatic Colorectal Cancer and Other Cancers: The EVICT (Erlotinib and Vemurafenib In Combination Trial) Study. Clin Cancer Res. 2023 Mar 14;29(6):1017–30.
- 84. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, Kwak EL, Ryan DP, Bendell JC, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2015 Dec 1;33(34):4023–31.
- Mao M, Tian F, Mariadason JM, Tsao CC, Lemos R, Dayyani F, et al. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. Clin Cancer Res. 2013 Feb 1;19(3):657–67.
- Ruiz-Saenz A, Atreya CE, Wang C, Pan B, Dreyer CA, Brunen D, et al. A reversible SRC-relayed COX2 inflammatory program drives resistance to BRAF and EGFR inhibition in BRAFV600E colorectal tumors. Nat Cancer. 2023 Feb;4(2):240–56.

- 87. Pietrantonio F, Oddo D, Gloghini A, Valtorta E, Berenato R, Barault L, et al. MET-Driven Resistance to Dual EGFR and BRAF Blockade May Be Overcome by Switching from EGFR to MET Inhibition in BRAF-Mutated Colorectal Cancer. Cancer Discov. 2016 Sep;6(9):963–71.
- Hong DS, Morris VK, El Osta B, Sorokin AV, Janku F, Fu S, et al. Phase IB Study of Vemurafenib in Combination with Irinotecan and Cetuximab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer with BRAFV600E Mutation. Cancer Discov. 2016 Dec;6(12):1352–65.
- 89. Kopetz S, Guthrie KA, Morris VK, Lenz HJ, Magliocco AM, Maru D, et al. Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406). J Clin Oncol. 2021 Feb 1;39(4):285–94.
- Lee HM, Morris V, Napolitano S, Kopetz S. Evolving Strategies for the Management of BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. Oncology (Williston Park). 2019 Jun 19;33(6):206–11.
- 91. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle PJ, Elez E, et al. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. J Clin Oncol. 2019 Jun 10;37(17):1460–9.
- Caponigro G, Cao ZA, Zhang X, Wang HQ, Fritsch CM, Stuart DD. Abstract 2337: Efficacy of the RAF/PI3Kα/anti-EGFR triple combination LGX818 + BYL719 + cetuximab in BRAFV600E colorectal tumor models. Cancer Research. 2013 Apr 15;73(8_Supplement):2337.
- 93. Sundar R, Hong DS, Kopetz S, Yap TA. Targeting BRAF-Mutant Colorectal Cancer: Progress in Combination Strategies. Cancer Discov. 2017 Jun;7(6):558–60.
- 94. Huijberts SCFA, Boelens MC, Bernards R, Opdam FL. Mutational profiles associated with resistance in patients with BRAFV600E mutant colorectal cancer treated with cetuximab and encorafenib +/- binimetinib or alpelisib. Br J Cancer. 2021 Jan;124(1):176–82.
- van Geel RMJM, Tabernero J, Elez E, Bendell JC, Spreafico A, Schuler M, et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic BRAF-Mutant Colorectal Cancer. Cancer Discov. 2017 Jun;7(6):610–9.

- André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. N Engl J Med. 2020 Dec 3;383(23):2207–18.
- 97. Taieb J, Lapeyre-Prost A, Laurent Puig P, Zaanan A. Exploring the best treatment options for BRAF-mutant metastatic colon cancer. Br J Cancer. 2019 Sep;121(6):434–42.
- Kopetz S, Bekaii-Saab TS, Yoshino T, Chung CH, Zhang X, Tabernero J. SEAMARK: Randomized phase 2 study of pembrolizumab + encorafenib + cetuximab versus pembrolizumab alone for first-line treatment of BRAF V600Emutant and microsatellite instability-high (MSI-H)/mismatch repair deficient (dMMR) metastatic colorectal cancer (CRC). JCO. 2022 Jun;40(16_suppl):TPS3634–TPS3634.
- Elez E, Kopetz S, Tabernero J, Bekaii-Saab T, Taieb J, Yoshino T, et al. SEAMARK: phase II study of first-line encorafenib and cetuximab plus pembrolizumab for MSI-H/dMMR BRAFV600E-mutant mCRC. Future Oncol. 2024 Apr;20(11):653–63.
- 100. Piercey O, Tie J, Hollande F, Wong HL, Mariadason J, Desai J. BRAFV600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Current Evidence, Future Directions, and Research Priorities. Clin Colorectal Cancer. 2024 Sep;23(3):215–29.
- 101. Ahronian LG, Sennott EM, Van Allen EM, Wagle N, Kwak EL, Faris JE, et al. Clinical acquired resistance to RAF inhibitor combinations in BRAF-mutant colorectal cancer through MAPK pathway alterations. Cancer Discov. 2015 Apr;5(4):358–67.
- 102. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijl JM. Signal peptidedependent protein transport in Bacillus subtilis: a genome-based survey of the secretome. Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Sep;64(3):515–47.
- 103. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, et al. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. Mol Cancer. 2022 Mar 18;21(1):79.
- 104. Farhan H, Rabouille C. Signalling to and from the secretory pathway. J Cell Sci. 2011 Jan 15;124(Pt 2):171–80.
- 105. da Cunha BR, Domingos C, Stefanini ACB, Henrique T, Polachini GM, Castelo-Branco P, et al. Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. J Cancer. 2019;10(19):4574–87.

- 106. Sun H, Meng Q, Shi C, Yang H, Li X, Wu S, et al. Hypoxia-Inducible Exosomes Facilitate Liver-Tropic Premetastatic Niche in Colorectal Cancer. Hepatology. 2021 Nov;74(5):2633–51.
- 107. Hanash S, Schliekelman M. Proteomic profiling of the tumor microenvironment: recent insights and the search for biomarkers. Genome Medicine. 2014 Feb 27;6(2):12.
- 108. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer. 2004 Nov;4(11):839–49.
- 109. Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer implications for future improvements in cancer care. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Oct;15(10):617–38.
- 110. Farhan H, Wendeler MW, Mitrovic S, Fava E, Silberberg Y, Sharan R, et al. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. J Cell Biol. 2010 Jun 14;189(6):997–1011.
- 111. Lunavat TR, Cheng L, Einarsdottir BO, Olofsson Bagge R, Veppil Muralidharan S, Sharples RA, et al. BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 18;114(29):E5930–9.
- 112. Liaci AM, Steigenberger B, Telles de Souza PC, Tamara S, Gröllers-Mulderij M, Ogrissek P, et al. Structure of the human signal peptidase complex reveals the determinants for signal peptide cleavage. Mol Cell. 2021 Oct 7;81(19):3934-3948.e11.
- 113. Nielsen H, Tsirigos KD, Brunak S, von Heijne G. A Brief History of Protein Sorting Prediction. Protein J. 2019 Jun;38(3):200–16.
- 114. Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. Nat Biotechnol. 2022 Jul;40(7):1023–5.
- 115. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara D, editor. Protein Function Prediction: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer; 2017 [cited 2025 Jun 2]. p. 59–73. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6
- 116. Viotti C. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. Methods Mol Biol. 2016;1459:3–29.

- 117. Janda CY, Li J, Oubridge C, Hernández H, Robinson CV, Nagai K. Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. Nature. 2010 May 27;465(7297):507–10.
- 118. Akopian D, Shen K, Zhang X, Shan S ou. Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. Annu Rev Biochem. 2013;82:693–721.
- 119. Kunze M, Berger J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. Front Physiol. 2015;6:259.
- 120. Rapoport TA, Li L, Park E. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2017 Oct 6;33:369–90.
- 121. Zhang W, Shi Y, Oyang L, Cui S, Li S, Li J, et al. Endoplasmic reticulum stress a key guardian in cancer. Cell Death Discov. 2024 Jul 30;10(1):1–16.
- 122. Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. Annu Rev Pathol. 2008;3:399–425.
- 123. Autophagy and Protein Secretion ScienceDirect [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002228362030067X
- 124. D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. Biochim Biophys Acta. 2013 Nov;1833(11):2464–72.
- 125. Gorur A, Yuan L, Kenny SJ, Baba S, Xu K, Schekman R. COPII-coated membranes function as transport carriers of intracellular procollagen I. J Cell Biol. 2017 Jun 5;216(6):1745–59.
- 126. Jensen D, Schekman R. COPII-mediated vesicle formation at a glance. J Cell Sci. 2011 Jan 1;124(Pt 1):1–4.
- 127. Gu F, Crump CM, Thomas G. Trans-Golgi network sorting. Cell Mol Life Sci. 2001 Jul;58(8):1067–84.
- 128. Néel E, Chiritoiu-Butnaru M, Fargues W, Denus M, Colladant M, Filaquier A, et al. The endolysosomal system in conventional and unconventional protein secretion. J Cell Biol. 2024 Sep 2;223(9):e202404152.
- 129. Dimou E, Nickel W. Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion. Curr Biol. 2018 Apr 23;28(8):R406–10.

- 130. Maricchiolo E, Panfili E, Pompa A, De Marchis F, Bellucci M, Pallotta MT. Unconventional Pathways of Protein Secretion: Mammals vs. Plants. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2022 Apr 28 [cited 2025 Jun 2];10. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmentalbiology/articles/10.3389/fcell.2022.895853/full
- 131. Cohen MJ, Chirico WJ, Lipke PN. Through the back door: Unconventional protein secretion. Cell Surf. 2020 Dec;6:100045.
- 132. Prudovsky I, Kumar TKS, Sterling S, Neivandt D. Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: problem and methods of study. Int J Mol Sci. 2013 Feb 8;14(2):3734–72.
- 133. La Venuta G, Zeitler M, Steringer JP, Müller HM, Nickel W. The Startling Properties of Fibroblast Growth Factor 2: How to Exit Mammalian Cells without a Signal Peptide at Hand. J Biol Chem. 2015 Nov 6;290(45):27015–20.
- 134. Cocozza F, Grisard E, Martin-Jaular L, Mathieu M, Théry C. SnapShot: Extracellular Vesicles. Cell. 2020 Jul 9;182(1):262-262.e1.
- 135. Lee YR, Joo HK, Lee EO, Cho HS, Choi S, Kim CS, et al. ATP Binding Cassette Transporter A1 is Involved in Extracellular Secretion of Acetylated APE1/Ref-1. Int J Mol Sci. 2019 Jun 28;20(13):3178.
- 136. Hussein NA, Malla S, Pasternak MA, Terrero D, Brown NG, Ashby CR, et al. The role of endolysosomal trafficking in anticancer drug resistance. Drug Resist Updat. 2021 Jul;57:100769.
- 137. Cavalli G, Cenci S. Autophagy and Protein Secretion. Journal of Molecular Biology. 2020 Apr 3;432(8):2525–45.
- 138. Gonzalez CD, Resnik R, Vaccaro MI. Secretory Autophagy and Its Relevance in Metabolic and Degenerative Disease. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:266.
- 139. Zhu S, Li S, Yi M, Li N, Wu K. Roles of Microvesicles in Tumor Progression and Clinical Applications. Int J Nanomedicine. 2021 Oct 18;16:7071–90.
- 140. Gee HY, Kim J, Lee MG. Unconventional secretion of transmembrane proteins. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2018 Nov 1;83:59–66.
- 141. Robinson JL, Feizi A, Uhlén M, Nielsen J. A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. Cell Reports. 2019 Mar 5;26(10):2622-2635.e5.

- 142. Madden EC, Gorman AM, Logue SE, Samali A. Tumour Cell Secretome in Chemoresistance and Tumour Recurrence. Trends Cancer. 2020 Jun;6(6):489–505.
- 143. Bian X, Xiao YT, Wu T, Yao M, Du L, Ren S, et al. Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. Mol Cancer. 2019 Mar 30;18(1):50.
- 144. To KK, Tong CW, Wu MM, Yan W. Abstract 3814: Overcoming multidrug resistance (MDR) in colorectal cancer by modulating exosome-mediated transfer of MDR transporter regulatory machineries. Cancer Research. 2019 Jul 1;79(13_Supplement):3814.
- 145. Zhang T, He Z, Qi X, Zhang Y, Liu Y, Jin L, et al. 5-Fluorouracil resistant CRC cells derived exosomes promote cancer-associated fibroblasts secreting more CXCL12. J Cancer. 2024;15(11):3441–51.
- 146. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. Cancer Sci. 2020 Sep;111(9):3142–54.
- 147. Kessler BE, Mishall KM, Kellett MD, Clark EG, Pugazhenthi U, Pozdeyev N, et al. Resistance to Src inhibition alters the BRAF-mutant tumor secretome to promote an invasive phenotype and therapeutic escape through a FAK>p130Cas>c-Jun signaling axis. Oncogene. 2019 Apr;38(14):2565–79.
- 148. Smith MP, Rowling EJ, Miskolczi Z, Ferguson J, Spoerri L, Haass NK, et al. Targeting endothelin receptor signalling overcomes heterogeneity driven therapy failure. EMBO Mol Med. 2017 Aug;9(8):1011–29.
- 149. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. Nature. 2015 Apr 16;520(7547):368–72.
- 150. Isambert N, Hervieu A, Rébé C, Hennequin A, Borg C, Zanetta S, et al. Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): a single-arm phase 2 study. Oncoimmunology. 2018;7(9):e1474319.
- 151. Deng T, Zhang L, Liu X jian, Xu J ming, Bai Y xian, Wang Y, et al. Bevacizumab plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRI) as the second-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer, a multicenter study. Med Oncol. 2013 Dec;30(4):752.
- 152. Tanaka S, Sakai A, Kimura K, Yoshida H, Fushitani H, Ogata A, et al. Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer

cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Int J Oncol. 2008 Aug;33(2):361–70.

- 153. Corbo C, Cevenini A, Salvatore F. Biomarker discovery by proteomics-based approaches for early detection and personalized medicine in colorectal cancer. Proteomics Clin Appl. 2017 May;11(5–6).
- 154. Sakai A, Otani M, Miyamoto A, Yoshida H, Furuya E, Tanigawa N. Identification of phosphorylated serine-15 and -82 residues of HSPB1 in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells by proteomics. J Proteomics. 2012 Jan 4;75(3):806–18.
- 155. Guo J, Zhu C, Yang K, Li J, Du N, Zong M, et al. Poly(C)-binding protein 1 mediates drug resistance in colorectal cancer. Oncotarget. 2017 Jan 5;8(8):13312–9.
- 156. Ludvigsen M, Thorlacius-Ussing L, Vorum H, Moyer MP, Stender MT, Thorlacius-Ussing O, et al. Proteomic Characterization of Colorectal Cancer Cells versus Normal-Derived Colon Mucosa Cells: Approaching Identification of Novel Diagnostic Protein Biomarkers in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2020 May 14;21(10):3466.
- 157. O'Connell K, Prencipe M, O'Neill A, Corcoran C, Rani S, Henry M, et al. The use of LC-MS to identify differentially expressed proteins in docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. Proteomics. 2012 Jul;12(13):2115–26.
- 158. Tam SY, Islam Khan MZ, Chen JY, Yip JHY, Yan HY, Tam TY, et al. Proteomic Profiling of Chemotherapy Responses in FOLFOX-Resistant Colorectal Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2023 Jun 8;24(12):9899.
- 159. Paulitschke V, Eichhoff O, Gerner C, Paulitschke P, Bileck A, Mohr T, et al. Proteomic identification of a marker signature for MAPKi resistance in melanoma. EMBO J. 2019 Aug 1;38(15):e95874.
- 160. Wu CC, Chen HC, Chen SJ, Liu HP, Hsieh YY, Yu CJ, et al. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. PROTEOMICS. 2008;8(2):316–32.
- 161. Soloveva N, Novikova S, Farafonova T, Tikhonova O, Zgoda V. Secretome and Proteome of Extracellular Vesicles Provide Protein Markers of Lung and Colorectal Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2025 Jan;26(3):1016.

- 162. Xue H, Lü B, Zhang J, Wu M, Huang Q, Wu Q, et al. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. J Proteome Res. 2010 Jan;9(1):545–55.
- 163. Yao L, Zhang Y, Chen K, Hu X, Xu LX. Discovery of IL-18 as a novel secreted protein contributing to doxorubicin resistance by comparative secretome analysis of MCF-7 and MCF-7/Dox. PLoS One. 2011;6(9):e24684.
- 164. Shin YK, Yoo BC, Hong YS, Chang HJ, Jung KH, Jeong SY, et al. Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance. Electrophoresis. 2009 Jun;30(12):2182–92.
- 165. Grbčić P, Fučkar Čupić D, Gamberi T, Kraljević Pavelić S, Sedić M. Proteomic Profiling of BRAFV600E Mutant Colon Cancer Cells Reveals the Involvement of Nucleophosmin/c-Myc Axis in Modulating the Response and Resistance to BRAF Inhibition by Vemurafenib. Int J Mol Sci. 2021 Jun 8;22(12):6174.
- 166. Leutert M, Rodríguez-Mias RA, Fukuda NK, Villén J. R2-P2 rapid-robotic phosphoproteomics enables multidimensional cell signaling studies. Mol Syst Biol. 2019 Dec;15(12):e9021.
- 167. Hughes CS, Foehr S, Garfield DA, Furlong EE, Steinmetz LM, Krijgsveld J. Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. Mol Syst Biol. 2014 Oct 30;10(10):757.
- 168. Türker C, Akal F, Joho D, Panse C, Barkow-Oesterreicher S, Rehrauer H, et al. B-Fabric: the Swiss Army Knife for life sciences. In: Türker, C; Akal, F; Joho, D; Panse, C; Barkow-Oesterreicher, S; Rehrauer, H; Schlapbach, R (2010) B-Fabric: the Swiss Army Knife for life sciences In: Proceedings of the 13th International Conference on Extending Database Technology, Lausanne, Switzerland, 22 March 2010 - 26 March 2010, 717-720 [Internet]. Lausanne, Switzerland: University of Zurich; 2010 [cited 2025 Jun 2]. p. 717–20. Available from: https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/43378/
- 169. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008 Dec;26(12):1367–72.
- 170. Wolski W, Panse C, Grossmann J, Kook. protViz/SRMService [Internet]. protViz; 2021 [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://github.com/protViz/SRMService
- 171. Gene Ontology Consortium, Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, Cherry JM, Drabkin HJ, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. Genetics. 2023 May 4;224(1):iyad031.

- 172. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000 May;25(1):25–9.
- 173. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009 Jan;4(1):44–57.
- 174. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). Nucleic Acids Res. 2022 Jul 5;50(W1):W216–21.
- 175. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 1;28(1):27–30.
- 176. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, Milacic M, Rothfels K, Senff-Ribeiro A, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. Nucleic Acids Res. 2022 Jan 7;50(D1):D687–92.
- 177. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D605–12.
- 178. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 2003 Nov;13(11):2498–504.
- 179. Bader GD, Hogue CWV. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. BMC Bioinformatics. 2003 Jan 13;4:2.
- 180. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. BMC Syst Biol. 2014;8 Suppl 4(Suppl 4):S11.
- 181. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012 May;2(5):401–4.
- 182. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013 Apr 2;6(269):pl1.
- 183. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor

Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. Neoplasia. 2017 Aug;19(8):649–58.

- 184. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D605–12.
- 185. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D607–13.
- 186. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 2010 Jan 15;70(2):440–6.
- 187. Villarreal L, Méndez O, Salvans C, Gregori J, Baselga J, Villanueva J. Unconventional Secretion is a Major Contributor of Cancer Cell Line Secretomes. Mol Cell Proteomics. 2013 May;12(5):1046–60.
- 188. Angi M, Kalirai H, Prendergast S, Simpson D, Hammond DE, Madigan MC, et al. In-depth proteomic profiling of the uveal melanoma secretome. Oncotarget. 2016 Aug 2;7(31):49623–35.
- 189. De Morais JA, Zelanis A. Bioinformatic reanalysis of public proteomics data reveals that nuclear proteins are recurrent in cancer secretomes. Traffic. 2022 Feb;23(2):98–108.
- 190. Grassi E, Corbelli J, Papiani G, Barbera MA, Gazzaneo F, Tamberi S. Current Therapeutic Strategies in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. Front Oncol. 2021;11:601722.
- 191. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. Crit Rev Oncol Hematol. 2003 May;46(2):165–86.
- 192. Ezrin Phosphorylation at T567 Modulates Cell Migration, Mechanical Properties, and Cytoskeletal Organization [Internet]. [cited 2025 Jun 2]. Available from: https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/435
- 193. Zhu L, Zhou R, Mettler S, Wu T, Abbas A, Delaney J, et al. High turnover of ezrin T567 phosphorylation: conformation, activity, and cellular function. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Sep;293(3):C874-884.

- 194. Zhang X, Flores LR, Keeling MC, Sliogeryte K, Gavara N. Ezrin Phosphorylation at T567 Modulates Cell Migration, Mechanical Properties, and Cytoskeletal Organization. Int J Mol Sci. 2020 Jan 9;21(2):435.
- 195. Quest AFG, Lobos-Gonzalez L, Nunez S, Sanhueza C, Fernandez JG, Aguirre A, et al. The Caveolin-1 Connection to Cell Death and Survival. Current Molecular Medicine. 13(2):266–81.
- 196. Lipreri da Silva JC, Vicari HP, Machado-Neto JA. Perspectives for Targeting Ezrin in Cancer Development and Progression. Future Pharmacology. 2023 Mar;3(1):61–79.
- 197. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Bradley WD, Lee RJ, et al. Antitumor Activity of BRAF Inhibitor Vemurafenib in Preclinical Models of BRAF-Mutant Colorectal Cancer. Cancer Research. 2012 Jan 31;72(3):779–89.
- 198. Chuan YC, Iglesias-Gato D, Fernandez-Perez L, Cedazo-Minguez A, Pang ST, Norstedt G, et al. Ezrin mediates c-Myc actions in prostate cancer cell invasion. Oncogene. 2010 Mar 11;29(10):1531–42.
- 199. Kim MH, Kim J, Hong H, Lee S, Lee J, Jung E, et al. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. The EMBO Journal. 2016 Mar;35(5):462–78.
- 200. Radić M, Vlašić I, Jazvinšćak Jembrek M, Horvat A, Tadijan A, Sabol M, et al. Characterization of Vemurafenib-Resistant Melanoma Cell Lines Reveals Novel Hallmarks of Targeted Therapy Resistance. Int J Mol Sci. 2022 Aug 31;23(17):9910.
- 201. Tabolacci C, Cordella M, Mariotti S, Rossi S, Senatore C, Lintas C, et al. Melanoma Cell Resistance to Vemurafenib Modifies Inter-Cellular Communication Signals. Biomedicines. 2021 Jan 15;9(1):79.
- 202. Channathodiyil P, May K, Segonds-Pichon A, Smith PD, Cook SJ, Houseley J. Escape from G1 arrest during acute MEK inhibition drives the acquisition of drug resistance. NAR Cancer. 2022 Dec;4(4):zcac032.
- 203. Gad SA, Ali HEA, Gaballa R, Abdelsalam RM, Zerfaoui M, Ali HI, et al. Targeting CDC7 sensitizes resistance melanoma cells to BRAFV600E-specific inhibitor by blocking the CDC7/MCM2-7 pathway. Sci Rep. 2019 Oct 2;9(1):14197.
- 204. Li B, Kong X, Post H, Raaijmakers L, Peeper DS, Altelaar M. Proteomics and Phosphoproteomics Profiling of Drug-Addicted BRAFi-Resistant Melanoma Cells. J Proteome Res. 2021 Sep 3;20(9):4381–92.

- 205. Givalos N, Gakiopoulou H, Skliri M, Bousboukea K, Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, et al. Replication protein A is an independent prognostic indicator with potential therapeutic implications in colon cancer. Mod Pathol. 2007 Feb;20(2):159–66.
- 206. Zhu Y, Yi Y, Bai B, Li L, You T, Sun W, et al. The silencing of replication protein A1 induced cell apoptosis via regulating Caspase 3. Life Sci. 2018 May 15;201:141–9.
- 207. Peters KB, Wang H, Brown JM, Iliakis G. Inhibition of DNA replication by tirapazamine. Cancer Res. 2001 Jul 15;61(14):5425–31.
- 208. Li S, Xu K, Gu D, He L, Xie L, Chen Z, et al. Genetic variants in RPA1 associated with the response to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer. J Gastroenterol. 2019 Nov;54(11):939–49.
- 209. Despras E, Miccoli L, Créminon C, Rouillard D, Angulo JF, Biard DSF. Depletion of KIN17, a Human DNA Replication Protein, Increases the Radiosensitivity of RKO Cells. rare. 2003 Jun;159(6):748–58.
- 210. Forsythe N, Refaat A, Javadi A, Khawaja H, Weir JA, Emam H, et al. The Unfolded Protein Response: A Novel Therapeutic Target for Poor Prognostic BRAF Mutant Colorectal Cancer. Mol Cancer Ther. 2018 Jun;17(6):1280–90.
- 211. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. Nat Rev Cancer. 2014 Apr;14(4):263–76.
- 212. Heijmans J, van Lidth de Jeude JF, Koo BK, Rosekrans SL, Wielenga MCB, van de Wetering M, et al. ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response. Cell Rep. 2013 Apr 25;3(4):1128–39.
- 213. Xing X, Li Y, Liu H, Wang L, Sun L. Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis. Acta Histochemica. 2011 Dec 1;113(8):777–82.
- 214. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. PLoS Biol. 2006 Nov;4(11):e374.
- 215. Randon G, Intini R, Cremolini C, Elez E, Overman MJ, Lee J, et al. Tumour mutational burden predicts resistance to EGFR/BRAF blockade in BRAFmutated microsatellite stable metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer. 2022 Jan;161:90–8.

- 216. Hoskin V, Ghaffari A, Laight BJ, SenGupta S, Madarnas Y, Nicol CJB, et al. Targeting the Ezrin Adaptor Protein Sensitizes Metastatic Breast Cancer Cells to Chemotherapy and Reduces Neoadjuvant Therapy–induced Metastasis. Cancer Res Commun. 2022 Jun 17;2(6):456–70.
- 217. Sun X, Tang F, Liu Y, Du Y, He Y, Zhang G, et al. Loss of HAS2 Confers Acquired Antiestrogen Resistance By Upregulating Ezrin Expression In ER-Positive Breast Cancer [Internet]. 2022 [cited 2023 May 30]. Available from: https://www.researchsquare.com
- 218. Sun X, Tang F, Guo Q, Liu Y, He Y, Du Y, et al. HAS2-Ezrin-ER axis plays a role in acquired antiestrogen resistance of ER-positive breast cancer. Front Pharmacol. 2022;13:1031487.
- 219. Zhang S, Ma H, Zhang D, Xie S, Wang W, Li Q, et al. LncRNA KCNQ1OT1 regulates proliferation and cisplatin resistance in tongue cancer via miR-211-5p mediated Ezrin/Fak/Src signaling. Cell Death Dis. 2018 Jul 3;9(7):1–16.
- 220. Liu Q, Xu B, Zhou W. Correlation between chemotherapy resistance in osteosarcoma patients and PAK5 and Ezrin gene expression. Oncol Lett. 2018 Jan;15(1):879–84.
- 221. Wang HJ, Zhu JS, Zhang Q, Sun Q, Guo H. High level of ezrin expression in colorectal cancer tissues is closely related to tumor malignancy. World J Gastroenterol. 2009 Apr 28;15(16):2016–9.
- 222. Patara M, Santos EMM, Coudry R de A, Soares FA, Ferreira FO, Rossi BM. Ezrin expression as a prognostic marker in colorectal adenocarcinoma. Pathol Oncol Res. 2011 Dec;17(4):827–33.
- 223. Slik K, Kurki S, Korpela T, Carpén O, Korkeila E, Sundström J. Ezrin expression combined with MSI status in prognostication of stage II colorectal cancer. PLoS One. 2017;12(9):e0185436.
- 224. Xu T, Wang X, Wang Z, Deng T, Qi C, Liu D, et al. Molecular mechanisms underlying the resistance of BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer to EGFR/BRAF inhibitors. Ther Adv Med Oncol. 2022;14:17588359221105022.
- 225. Kim MH, Kim J, Hong H, Lee S, Lee J, Jung E, et al. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. EMBO J. 2016 Mar 1;35(5):462–78.
- 226. Parker R, Vella LJ, Xavier D, Amirkhani A, Parker J, Cebon J, et al. Phosphoproteomic Analysis of Cell-Based Resistance to BRAF Inhibitor Therapy in Melanoma. Front Oncol. 2015 May 15;5:95.

227. Fang M, Hutchinson L, Deng A, Green MR. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Feb 2;113(5):1250–5.

8 Popis slika

Slika 1. Prikaz domena BRAF proteina 4
Slika 2. Prikaz signalnog puta MAPK 5
Slika 3. Razvoj kemorezistencije na BRAFV600E inhibitor vemurafenib
Slika 4. Klasični put izlučivanja
Slika 5. Prikaz neklasičnih putova izlučivanja18
Slika 6. Morfološke promjene osjetljivih RKO stanica uzgajanih u uvjetima bez
dodanog seruma
Slika 7. Kvantifikacija vijabilnih osjetljivih stanica RKO nakon uzgajanja u uvjetima
bez dodanog seruma
Slika 9. Učinak postupka prilagodbe na uvjete rasta bez seruma na kvalitetu
sekretoma osjetljivih RKO stanica
Slika 10. Prikaz 10 najvažnijih GO pojmova (a-c) i signalnih putova (d-e) obogaćenih
pojačano izraženih proteina povezanih s rezistencijom na vemurafenib u RKO
stanicama raka debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E
Slika 11. Konstrukcija i modularna analiza PPI mreže reguliranih proteina i
identifikacija čvorišnih proteina. PPI mreža kreirana je u alatu STRING i vizualizirana
u softveru Cytoscape
Slika 12. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog kandidata proteina
RPA1 (replikacijski protein A1) u BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva 52
Slika 13. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata
MCM5 (komponenta kompleksa održavanja minikromosoma 5) u BRAFV600E
mutiranom raku debelog crijeva
Slika 14. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata
FEN1 BRAFV600E mutiranom raku debelog crijeva
Slika 15. Ontologija gena i analiza puta obogaćivanja niza podataka smanjeno
izraženih proteina povezanih s rezistencijom na vemurafenib u RKO stanicama raka
debelog crijeva koje nose mutaciju BRAFV600E59

Slika 16. Konstrukcija i modularna analiza PPI mreže proteina sa smanjenom razinom ekspresije i identifikacija čvorišnih proteina. PPI mreža kreirana je u Slika 17. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata Slika 18. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata Slika 19. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata Slika 20. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog proteina kandidata Slika 21. In silico validacija i analiza preživljavanja odabranog kandidata proteina Slika 22. Bioinformatička analiza integriranih proteomskih podataka dobivenih pomoću 2-DE/MALDI-TOF/TOF MS i LC-MS/MS za odabir novih proteinskih meta i staničnih procesa relevantnih za razvoj rezistencije na vemurafenib u BRAFV600E Slika 23. Western blot analiza ekspresije proteina ezrin (a) i njegove fosforilirane forme fosfo-ezrin (T567) (b) u osjetljivim i vemurafenib-rezistentnim RKO stanicama.

Slika 26. Antiproliferativni učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u RKO stanicama raka debelog crijeva otpornim na Slika 27. Proapoptotski učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u staničnoj liniji RKO raka debelog crijeva otpornoj na Slika 28. Western blot analiza ciljnih proteina potencijalno povezanih s učinkom kemosenzibilizacije kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u RKO stanicama raka debelog crijeva otpornim na vemurafenib nakon Slika 29. Western blot analiza ekspresije ezrina u stanicama A375 melanoma osjetljivim na vemurafenib (roditeljskim) i otpornim na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E u odsutnosti i u prisutnosti 0.8 µM vemurafeniba tijekom 72 Slika 30. Anti-proliferativni učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u stanicama melanoma A375 otpornima na vemurafenib koje nose mutaciju BRAFV600E nakon razdoblja tretiranja od 72 Slika 31. Pro-apoptotski učinak kombiniranog tretmana vemurafenibom i inhibitorom ezrina NSC305787 u staničnoj liniji A375 melanoma otpornoj na vemurafenib nakon

9 Popis tablica

Tablica 1. Popis korištenih početnica. 38
Tablica 2. Prikaz podataka PPI mreže pojačano izraženih proteina staničnog
sekretoma
Tablica 3. Odabrane postavke za analizu PPI mreže u MCODE dodatku
Tablica 4. Prikaz podataka PPI mreže pojačano izraženih proteina staničnog
sekretoma60
Tablica 5. Odabrane postavke za analizu PPI mreže u MCODE dodatku 60
Tablica 6. Pojačano izraženi proteini u sekretomu stanične linije RKO rezistentne
na vemurafenib identificirani MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom 128
Tablica 7. Smanjeno izraženi proteini u sekretomu stanične linije RKO rezistentne
na vemurafenib identificirani MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom 128
Tablica 8 Pojačano izraženi proteini rezistentne stanične linije raka debelog crijeva
RKO identificirani pomoću LC-MS/MS 129
Tablica 9 Smanjeno izraženi proteini rezistentne stanične linije raka debelog crijeva
RKO identificirani pomoću LC-MS/MS 137
Tablica 10 Pojačano i smanjeno izraženi proteini rezistentne stanične linije raka
debelog crijeva RKO identificirani pomoću 2DE-MALDI-TOF/TOF masene
spektrometrije141
Tablica 11 Pojačano izraženi proteini unutarstaničnog proteoma rezistentne RKO
linije identificirani pomoću LC-MS/MS 153
Tablica 12 Smanjeno izraženi proteini unutarstaničnog proteoma rezistentne RKO
linije identificirani pomoću LC-MS/MS 156

10 Prilozi

Tablica 6. Pojačano izraženi proteini u sekretomu stanične linije RKO rezistentne na vemurafenib identificirani MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom.

Broj proteinske točke	Broj proteinske točke (BIOCENTAR)	Stanična linija	UNIPROT pristupni ID	UNIPROT ID	Naziv proteina	Score	Pokrivenost sekvence (%)	Broj peptida
625	37	RKO-R	O00622	CCN1_HUMAN	CCN family member 1	78	23	8
1487	38	RKO-R	Q6FI18	CYR61_HUMAN	Protein CYR61	103.18	9.4	3
1335	39	RKO-R	P09104	ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	68	25	9
1308	40	RKO-R	O94985	CSTN1_HUMAN	Calsyntenin-1	236.94	3.4	3
1105	41	RKO-R	O94985	CSTN1_HUMAN	Calsyntenin-1	128	18	18
1117	44	RKO-R	P09211	GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	94	45	7
681	45	RKO-R	P61916	NPC2_HUMAN	NPC intracellular cholesterol transporter 2	88	41	7
466	46	RKO-R	P12004	PCNA_HUMAN	Proliferating cell nuclear antigen	162	35	11
1407	48	RKO-R	P22314	UBA1_HUMAN	Ubiquitin-like modifier- activating enzyme 1	138	18	19

Tablica 7. Smanjeno izraženi proteini u sekretomu stanične linije RKO rezistentne na vemurafenib identificirani MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom

Broj proteinske točke	Broj proteinske točke (BIOCENTAR)	Stanična linija	UNIPROT pristupni ID	UNIPROT ID	Naziv proteina	Score	Pokrivenost sekvence (%)	Broj peptida
1499	2	RKO	P02766	TTHY_HUMAN	Transthyretin	197	73	12

1452	4	RKO	P00734	THRB_HUMAN	Prothrombin	107	28	13
1475	5	RKO	P02766	TTHY_HUMAN	Transthyretin	67	29	5
1439	10	RKO	P00734	THRB_HUMAN	Prothrombin	83	26	11
1405	11a	RKO	P00734	THRB_HUMAN	Prothrombin	104	25	14
1450	12	RKO	P02748	CO9_HUMAN	Complement component C9	147	30	18
1435	15	RKO	P02766	TTHY_HUMAN	Transthyretin	77	64	9
1338	17	RKO	P0C0L5	CO4B_HUMAN	Complement C4-B	99.97	1.1	1
1376	18	RKO	P02766	TTHY_HUMAN	Transthyretin	113	64	7
1484	24	RKO	P0C0L5	CO4B_HUMAN	Complement C4-B	115.47	1.8	3
201	25	RKO	O95399	UTS2_HUMAN	Urotensin-2	31	50	3
1445	28	RKO	P02748	CO9_HUMAN	Complement component C9	64	15	11
1445	28	RKO	P08238	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	64	12	9
					Endoplasmic reticulum			
1441	32	RKO	P11021	BIP_HUMAN	chaperone BiP	243	41	23

Tablica 8 Pojačano izraženi proteini rezistentne stanične linije raka debelog crijeva RKO identificirani pomoću LC-MS/MS

Staničn a linija	UNIPROT pristupni ID	UNIPROT ID	Naziv proteina	Log2FC	p vrijednos t	Broj peptida
RKO-R	P30043	BLVRB_HUMAN	Flavin reductase (NADPH)	1.001	3.45E-03	9
RKO-R	O00764	PDXK_HUMAN	Pyridoxal kinase	1.004	8.84E-03	12
RKO-R	P52294	IMA5_HUMAN	Importin subunit alpha-5	1.007	9.33E-03	6
RKO-R	P10768	ESTD_HUMAN	S-formylglutathione hydrolase	1.007	1.58E-03	13
RKO-R	P25205	MCM3_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM3	1.011	5.72E-03	19
RKO-R	P62253	UB2G1_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1	1.017	1.04E-02	3
RKO-R	P27816	MAP4_HUMAN	Microtubule-associated protein 4	1.022	1.74E-03	26
RKO-R	O14841	OPLA_HUMAN	5-oxoprolinase	1.027	6.75E-04	36
RKO-R	P63244	RACK1_HUMAN	Receptor of activated protein C kinase 1	1.028	3.10E-04	23

RKO-R	Q9P258	RCC2_HUMAN	Protein RCC2	1.030	2.87E-03	20
RKO-R	Q8NC51	PAIRB_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	1.040	7.66E-03	16
RKO-R	O43447	PPIH_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	1.048	2.74E-03	7
RKO-R	P52306	GDS1_HUMAN	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1	1.050	9.12E-03	14
RKO-R	P61978	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1.052	1.49E-03	21
RKO-R	P43490	NAMPT_HUMAN	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	1.052	3.79E-04	29
RKO-R	Q9NR45	SIAS_HUMAN	Sialic acid synthase	1.053	7.02E-04	19
RKO-R	P09012	SNRPA_HUMAN	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	1.053	5.93E-03	5
RKO-R	Q9H3P7	GCP60_HUMAN	Golgi resident protein GCP60	1.054	1.52E-03	8
RKO-R	O95394	AGM1_HUMAN	Phosphoacetylglucosamine mutase	1.059	4.19E-03	24
RKO-R	P05198	IF2A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	1.060	6.51E-04	21
RKO-R	Q9BQ67	GRWD1_HUMAN	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	1.061	2.86E-03	7
RKO-R	Q96C19	EFHD2_HUMAN	EF-hand domain-containing protein D2	1.063	1.76E-03	12
RKO-R	Q5T4S7	UBR4_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	1.064	8.36E-03	35
RKO-R	P11908	PRPS2_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	1.068	8.96E-03	11
RKO-R	P22234	PUR6_HUMAN	Multifunctional protein ADE2	1.072	5.10E-04	26
RKO-R	P35080	PROF2_HUMAN	Profilin-2	1.072	1.09E-03	7
RKO-R	Q9NR30	DDX21_HUMAN	Nucleolar RNA helicase 2	1.083	2.55E-03	18
RKO-R	P41227	NAA10_HUMAN	N-alpha-acetyltransferase 10	1.085	7.02E-03	14
RKO-R	Q9GZZ1	NAA50_HUMAN	N-alpha-acetyltransferase 50	1.087	6.64E-03	7
RKO-R	Q86UE4	LYRIC_HUMAN	Protein LYRIC	1.087	1.40E-03	15
RKO-R	Q01970	PLCB3_HUMAN	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	1.090	4.98E-03	34
RKO-R	Q00796	DHSO_HUMAN	Sorbitol dehydrogenase	1.091	8.00E-04	16
RKO-R	Q13277	STX3_HUMAN	Syntaxin-3	1.094	6.43E-03	5
RKO-R	O60506	HNRPQ_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	1.095	1.70E-03	25
RKO-R	P52565	GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1.100	1.95E-04	12
RKO-R	Q13098	CSN1_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 1	1.101	2.14E-03	16
RKO-R	Q9Y6E2	BZW2_HUMAN	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	1.102	6.34E-03	22
			L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-			
	Q9NRN7	ADPPT_HUMAN	phosphopantetheinyl transferase	1.104	6.38E-03	7
RKO-R	O14980	XPO1_HUMAN	Exportin-1	1.107	4.13E-04	42
RKO-R	O14929	HAT1_HUMAN	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	1.111	1.29E-03	10

RKO-R	O60841	IF2P_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5B	1.111	1.86E-03	40
RKO-R	Q9UHX1	PUF60_HUMAN	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	1.119	6.07E-03	14
RKO-R	O43670	ZN207_HUMAN	BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207	1.122	8.16E-03	6
RKO-R	P26196	DDX6_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	1.129	3.83E-04	14
RKO-R	Q14566	MCM6_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM6	1.132	2.21E-03	24
RKO-R	P46940	IQGA1_HUMAN	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1.133	1.92E-04	70
RKO-R	Q14155	ARHG7_HUMAN	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	1.138	7.61E-03	8
RKO-R	P52597	HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	1.142	3.20E-03	14
RKO-R	P31948	STIP1_HUMAN	Stress-induced-phosphoprotein 1	1.143	1.85E-03	61
RKO-R	Q96EK5	KBP_HUMAN	KIF1-binding protein	1.144	3.92E-03	8
RKO-R	O00115	DNS2A_HUMAN	Deoxyribonuclease-2-alpha	1.145	1.20E-03	9
RKO-R	P49588	SYAC_HUMAN	AlaninetRNA ligase, cytoplasmic	1.145	4.63E-03	17
RKO-R	P43243	MATR3_HUMAN	Matrin-3	1.148	3.47E-04	6
RKO-R	P33992	MCM5_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM5	1.150	2.10E-03	10
RKO-R	P40121	CAPG_HUMAN	Macrophage-capping protein	1.151	2.68E-04	12
			Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha Lamina-associated			
	P42166	LAP2A_HUMAN	polypeptide 2, isoforms beta/gamma	1.156	5.01E-03	8
RKO-R	O60701	UGDH_HUMAN	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1.159	1.37E-03	11
RKO-R	P54577	SYYC_HUMAN	TyrosinetRNA ligase, cytoplasmic	1.162	6.44E-03	34
RKO-R	P61081	UBC12_HUMAN	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	1.164	3.08E-04	8
RKO-R	P04085	PDGFA_HUMAN	Platelet-derived growth factor subunit A	1.164	4.11E-03	2
RKO-R	P38571	LICH_HUMAN	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	1.171	6.95E-03	7
RKO-R	Q06124	PTN11_HUMAN	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	1.175	5.22E-03	21
RKO-R	P09874	PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1.178	1.16E-03	44
RKO-R	P06730	IF4E_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4E	1.182	1.24E-03	7
RKO-R	P61019	RAB2A_HUMAN	Ras-related protein Rab-2A	1.182	2.03E-03	11
RKO-R	Q14240	IF4A2_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-II	1.185	5.56E-03	25
RKO-R	Q01415	GALK2_HUMAN	N-acetylgalactosamine kinase	1.187	4.42E-03	7
RKO-R	Q08211	DHX9_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase A	1.197	1.85E-04	32
RKO-R	Q5VYK3	ECM29_HUMAN	Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	1.197	1.89E-03	55
RKO-R	O43776	SYNC_HUMAN	AsparaginetRNA ligase, cytoplasmic	1.206	2.94E-04	26
RKO-R	O43175	SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1.207	1.40E-03	12
RKO-R	Q9Y5A9	YTHD2_HUMAN	YTH domain-containing family protein 2	1.213	4.70E-03	8
-------	--------	-------------	--	-------	----------	----
RKO-R	Q9Y617	SERC_HUMAN	Phosphoserine aminotransferase	1.214	3.44E-05	22
			ATP-dependent RNA helicase DDX3X ATP-dependent RNA			
RRU-R	O00571	DDX3X_HUMAN	helicase DDX3Y	1.217	1.36E-04	12
RKO-R	Q96CN7	ISOC1_HUMAN	Isochorismatase domain-containing protein 1	1.228	6.47E-04	6
RKO-R	O95456	PSMG1_HUMAN	Proteasome assembly chaperone 1	1.230	4.23E-04	9
RKO-R	O43583	DENR_HUMAN	Density-regulated protein	1.235	7.78E-04	9
RKO-R	Q9NRV9	HEBP1_HUMAN	Heme-binding protein 1	1.242	4.86E-03	8
RKO-R	Q13451	FKBP5_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	1.246	7.47E-03	11
RKO-R	O43598	DNPH1_HUMAN	2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1	1.252	5.06E-03	7
RKO-R	P09668	CATH_HUMAN	Pro-cathepsin H	1.258	6.00E-03	14
RKO-R	Q9BUL8	PDC10_HUMAN	Programmed cell death protein 10	1.261	9.27E-03	6
RKO-R	Q05682	CALD1_HUMAN	Caldesmon	1.265	7.53E-03	23
RKO-R	P20839	IMDH1_HUMAN	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 1	1.272	3.53E-03	6
RKO-R	Q9UBQ0	VPS29_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	1.276	4.63E-05	4
RKO-R	Q9H074	PAIP1_HUMAN	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	1.279	2.12E-04	8
RKO-R	P78330	SERB_HUMAN	Phosphoserine phosphatase	1.295	3.83E-04	9
RKO-R	P36871	PGM1_HUMAN	Phosphoglucomutase-1	1.298	6.10E-04	32
RKO-R	Q6IN85	P4R3A_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	1.302	1.87E-03	10
RKO-R	Q14166	TTL12_HUMAN	Tubulintyrosine ligase-like protein 12	1.307	5.86E-04	26
RKO-R	O43390	HNRPR_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	1.308	2.09E-04	26
RKO-R	Q9Y263	PLAP_HUMAN	Phospholipase A-2-activating protein	1.315	8.85E-03	19
RKO-R	O14979	HNRDL_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	1.316	1.85E-03	11
RKO-R	Q09161	NCBP1_HUMAN	Nuclear cap-binding protein subunit 1	1.321	5.79E-03	24
RKO-R	Q9UBW8	CSN7A_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 7a	1.323	6.07E-03	6
RKO-R	Q15436	SC23A_HUMAN	Protein transport protein Sec23A	1.328	3.33E-03	20
RKO-R	Q86XP3	DDX42_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDX42	1.335	1.43E-03	18
RKO-R	Q13045	FLII_HUMAN	Protein flightless-1 homolog	1.336	4.82E-03	15
RKO-R	Q12874	SF3A3_HUMAN	Splicing factor 3A subunit 3	1.340	7.78E-03	9
RKO-R	Q9UKD2	MRT4_HUMAN	mRNA turnover protein 4 homolog	1.341	8.18E-03	7
RKO-R	P23193	TCEA1_HUMAN	Transcription elongation factor A protein 1	1.344	8.03E-04	17
RKO-R	Q92900	RENT1_HUMAN	Regulator of nonsense transcripts 1	1.353	9.89E-03	21

RKO-R	P08243	ASNS_HUMAN	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	1.360	1.53E-04	28
RKO-R	Q96QK1	VPS35_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	1.371	4.36E-04	27
RKO-R	Q9UNN5	FAF1_HUMAN	FAS-associated factor 1	1.386	1.32E-04	12
RKO-R	P47755	CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	1.388	1.53E-05	16
RKO-R	Q9UBE0	SAE1_HUMAN	SUMO-activating enzyme subunit 1	1.402	6.42E-06	10
RKO-R	P34896	GLYC_HUMAN	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	1.403	1.30E-03	14
RKO-R	Q99426	TBCB_HUMAN	Tubulin-folding cofactor B	1.408	2.88E-04	7
RKO-R	075717	WDHD1_HUMAN	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	1.411	3.14E-05	10
RKO-R	Q9UJU6	DBNL_HUMAN	Drebrin-like protein	1.414	3.99E-03	14
RKO-R	Q9Y5K6	CD2AP_HUMAN	CD2-associated protein	1.416	1.74E-03	12
RKO-R	Q13510	ASAH1_HUMAN	Acid ceramidase	1.421	1.19E-03	23
RKO-R	Q9BXP5	SRRT_HUMAN	Serrate RNA effector molecule homolog	1.428	4.43E-03	14
RKO-R	O14964	HGS_HUMAN	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	1.443	8.76E-04	14
RKO-R	P50570	DYN2_HUMAN	Dynamin-2	1.456	3.93E-03	14
RKO-R	P39748	FEN1_HUMAN	Flap endonuclease 1	1.474	1.41E-03	11
RKO-R	Q7Z4W1	DCXR_HUMAN	L-xylulose reductase	1.487	1.54E-03	6
RKO-R	P53004	BIEA_HUMAN	Biliverdin reductase A	1.487	2.14E-04	15
RKO-R	Q9BVG4	PBDC1_HUMAN	Protein PBDC1	1.490	1.32E-03	8
RKO-R	Q96DI7	SNR40_HUMAN	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	1.495	1.54E-03	7
RKO-R	P49736	MCM2_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM2	1.495	1.25E-04	21
RKO-R	Q8NBF2	NHLC2_HUMAN	NHL repeat-containing protein 2	1.498	5.37E-04	7
RKO-R	O43592	XPOT_HUMAN	Exportin-T	1.504	1.36E-03	17
RKO-R	P55060	XPO2_HUMAN	Exportin-2	1.504	1.61E-05	37
RKO-R	Q8WTS6	SETD7_HUMAN	Histone-lysine N-methyltransferase SETD7	1.510	9.07E-03	6
RKO-R	P18754	RCC1_HUMAN	Regulator of chromosome condensation	1.513	2.24E-04	17
RKO-R	P42285	MTREX_HUMAN	Exosome RNA helicase MTR4	1.525	2.64E-03	19
RKO-R	P60891	PRPS1_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	1.537	3.53E-04	13
RKO-R	Q14C86	GAPD1_HUMAN	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	1.541	1.15E-03	14
RKO-R	P55327	TPD52_HUMAN	Tumor protein D52	1.542	3.55E-03	12
RKO-R	O43252	PAPS1_HUMAN	Bifunctional 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthase 1	1.559	9.94E-05	12
RKO-R	Q92499	DDX1_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDX1	1.567	2.76E-04	28
RKO-R	O00429	DNM1L_HUMAN	Dynamin-1-like protein	1.573	8.14E-05	20

RKO-R	Q93008	USP9X_HUMAN	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	1.578	3.31E-04	21
RKO-R	Q7Z6M1	RABEK_HUMAN	Rab9 effector protein with kelch motifs	1.582	1.70E-03	11
RKO-R	P49419	AL7A1_HUMAN	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	1.589	6.32E-03	13
RKO-R	Q6FI81	CPIN1_HUMAN	Anamorsin	1.593	4.90E-03	13
RKO-R	P61764	STXB1_HUMAN	Syntaxin-binding protein 1	1.597	1.07E-03	22
RKO-R	P56537	IF6_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 6	1.603	3.21E-06	9
RKO-R	Q92841	DDX17_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	1.607	9.95E-05	26
RKO-R	P49914	MTHFS_HUMAN	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	1.617	6.85E-04	3
RKO-R	Q9H0D6	XRN2_HUMAN	5-3 exoribonuclease 2	1.640	6.96E-03	14
RKO-R	P27694	RFA1_HUMAN	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	1.644	5.35E-04	24
RKO-R	Q8WW12	PCNP_HUMAN	PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	1.645	2.62E-03	5
RKO-R	Q14008	CKAP5_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 5	1.646	1.33E-03	38
RKO-R	Q9UHD8	SEPT9_HUMAN	Septin-9	1.655	6.79E-03	7
RKO-R	Q02880	TOP2B_HUMAN	DNA topoisomerase 2-beta	1.669	7.11E-03	7
RKO-R	Q15198	PGFRL_HUMAN	Platelet-derived growth factor receptor-like protein	1.682	1.56E-03	8
RKO-R	Q13620	CUL4B_HUMAN	Cullin-4B	1.689	1.87E-04	12
RKO-R	O60313	OPA1_HUMAN	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	1.699	3.94E-04	21
RKO-R	Q9HAB8	PPCS_HUMAN	Phosphopantothenatecysteine ligase	1.702	1.47E-04	9
RKO-R	Q9H3H3	CK068_HUMAN	UPF0696 protein C11orf68	1.703	3.27E-03	8
RKO-R	P32929	CGL_HUMAN	Cystathionine gamma-lyase	1.704	7.05E-05	15
RKO-R	Q9NZM1	MYOF_HUMAN	Myoferlin	1.708	9.72E-04	9
RKO-R	P30519	HMOX2_HUMAN	Heme oxygenase 2	1.710	9.08E-03	8
RKO-R	P02545	LMNA_HUMAN	Prelamin-A/C	1.715	1.64E-05	47
RKO-R	Q92734	TFG_HUMAN	Protein TFG	1.716	5.91E-04	8
RKO-R	O75191	XYLB_HUMAN	Xylulose kinase	1.725	1.27E-03	9
RKO-R	Q01085	TIAR_HUMAN	Nucleolysin TIAR	1.734	2.16E-04	5
RKO-R	Q8N335	GPD1L_HUMAN	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	1.768	1.41E-04	6
RKO-R	Q9Y570	PPME1_HUMAN	Protein phosphatase methylesterase 1	1.770	6.55E-04	12
RKO-R	Q13428	TCOF_HUMAN	Treacle protein	1.776	1.31E-03	42
RKO-R	Q9GZN8	CT027_HUMAN	UPF0687 protein C20orf27	1.781	1.05E-03	4
RKO-R	P22059	OSBP1_HUMAN	Oxysterol-binding protein 1	1.789	1.88E-04	19
RKO-R	Q8WXX5	DNJC9_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 9	1.793	1.66E-04	7

RKO-R	Q9BWS9	CHID1_HUMAN	Chitinase domain-containing protein 1	1.850	1.70E-04	17
RKO-R	Q9Y520	PRC2C_HUMAN	Protein PRRC2C	1.858	1.35E-04	11
RKO-R	Q02241	KIF23_HUMAN	Kinesin-like protein KIF23	1.863	4.06E-03	18
RKO-R	Q9Y646	CBPQ_HUMAN	Carboxypeptidase Q	1.863	1.07E-03	10
RKO-R	O75146	HIP1R_HUMAN	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	1.870	7.27E-04	11
RKO-R	Q05086	UBE3A_HUMAN	Ubiquitin-protein ligase E3A	1.871	1.02E-03	12
RKO-R	P36915	GNL1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein-like 1	1.891	7.30E-05	6
RKO-R	Q14919	NC2A_HUMAN	Dr1-associated corepressor	1.894	5.00E-06	3
RKO-R	O15305	PMM2_HUMAN	Phosphomannomutase 2	1.941	5.24E-04	10
RKO-R	P53041	PPP5_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 5	1.947	3.88E-03	10
RKO-R	Q9UI26	IPO11_HUMAN	Importin-11	1.949	2.75E-04	10
RKO-R	Q96QR8	PURB_HUMAN	Transcriptional activator protein Pur-beta	1.995	3.64E-04	7
RKO-R	O60749	SNX2_HUMAN	Sorting nexin-2	2.003	3.97E-04	13
RKO-R	P48745	CCN3_HUMAN	CCN family member 3	2.004	1.90E-04	13
RKO-R	Q01658	NC2B_HUMAN	Protein Dr1	2.006	1.08E-04	4
RKO-R	O15347	HMGB3_HUMAN	High mobility group protein B3	2.073	4.33E-03	7
RKO-R	Q96BP3	PPWD1_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein	2.093	2.16E-03	9
RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein	2.093 2.103	2.16E-03 2.63E-03	9 11
RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10	2.093 2.103 2.127	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04	9 11 16
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70	2.093 2.103 2.127 2.138	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04	9 11 16 22
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06	9 11 16 22 19
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04	9 11 16 22 19 13
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05	9 11 16 22 19 13 15
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.323	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03	9 11 16 22 19 13 15 24
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.323 2.492	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07	9 11 16 22 19 13 15 24 231
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN ATL1_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6 Q9NZQ7	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN ATL1_HUMAN PD1L1_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1 Programmed cell death 1 ligand 1	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985 3.348	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06 4.73E-04	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7 10
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6 Q9NZQ7 Q99988	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN ATL1_HUMAN PD1L1_HUMAN GDF15_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1 Programmed cell death 1 ligand 1 Growth/differentiation factor 15	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985 3.348 3.588	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06 4.73E-04 9.39E-06	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7 10 18
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6 Q9NZQ7 Q99988 Q9UQ52	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN PLEC_HUMAN ATL1_HUMAN GDF15_HUMAN CNTN6_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1 Programmed cell death 1 ligand 1 Growth/differentiation factor 15 Contactin-6	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985 3.348 3.588 NA	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06 4.73E-04 9.39E-06 NA	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7 10 18 16
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6 Q9NZQ7 Q99988 Q9UQ52 Q6WCQ1	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN ATL1_HUMAN GDF15_HUMAN CNTN6_HUMAN MPRIP_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1 Programmed cell death 1 ligand 1 Growth/differentiation factor 15 Contactin-6 Myosin phosphatase Rho-interacting protein	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985 3.348 3.588 NA NA	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06 4.73E-04 9.39E-06 NA NA	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7 10 18 16 4
RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R RKO-R	Q96BP3 P54920 Q9HCE1 Q9UH65 Q12959 Q8N1F7 Q14627 P53992 Q15149 Q8N6G6 Q9NZQ7 Q99988 Q9UQ52 Q6WCQ1 O95084	PPWD1_HUMAN SNAA_HUMAN MOV10_HUMAN SWP70_HUMAN DLG1_HUMAN NUP93_HUMAN I13R2_HUMAN SC24C_HUMAN PLEC_HUMAN PLEC_HUMAN PD1L1_HUMAN GDF15_HUMAN CNTN6_HUMAN PRS23_HUMAN	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein Alpha-soluble NSF attachment protein Helicase MOV-10 Switch-associated protein 70 Disks large homolog 1 Nuclear pore complex protein Nup93 Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 Protein transport protein Sec24C Plectin ADAMTS-like protein 1 Programmed cell death 1 ligand 1 Growth/differentiation factor 15 Contactin-6 Myosin phosphatase Rho-interacting protein Serine protease 23	2.093 2.103 2.127 2.138 2.158 2.230 2.302 2.302 2.302 2.323 2.492 2.985 3.348 3.588 NA NA NA	2.16E-03 2.63E-03 7.80E-04 8.17E-04 5.16E-06 2.53E-04 1.56E-05 4.95E-03 3.53E-07 3.81E-06 4.73E-04 9.39E-06 NA NA NA	9 11 16 22 19 13 15 24 231 7 10 18 16 4 3

RKO-R	Q02083	NAAA_HUMAN	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase	NA	NA	2
RKO-R	Q96D46	NMD3_HUMAN	60S ribosomal export protein NMD3	NA	NA	2
RKO-R	Q9BTW9	TBCD_HUMAN	Tubulin-specific chaperone D	NA	NA	2

Tablica 9 Smanjeno izraženi proteini rezistentne stanične linije raka debelog crijeva RKO identificirani pomoću LC-MS/MS.

Stanična linija	UNIPROT pristupni ID	UNIPROT ID	Naziv proteina	Log2FC	p vrijednost	Broj peptida
RKO	Q16610	ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	-4.437	6.49E-08	18
RKO	Q9BY76	ANGL4_HUMAN	Angiopoietin-related protein 4	-4.334	4.43E-08	12
RKO	Q8NBJ7	SUMF2_HUMAN	Inactive C-alpha-formylglycine-generating enzyme 2	-4.235	4.84E-06	10
RKO	P10646	TFPI1_HUMAN	Tissue factor pathway inhibitor	-4.031	5.49E-08	12
RKO	P21980	TGM2_HUMAN	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	-3.449	1.94E-07	26
RKO	Q8NBJ5	GT251_HUMAN	Procollagen galactosyltransferase 1	-3.171	5.24E-05	21
RKO	P50281	MMP14_HUMAN	Matrix metalloproteinase-14	-2.716	4.15E-05	10
RKO	Q6NW40	RGMB_HUMAN	RGM domain family member B	-2.698	2.40E-06	11
RKO	P02751	FINC_HUMAN	Fibronectin	-2.679	6.27E-03	16
RKO	P29279	CCN2_HUMAN	CCN family member 2	-2.660	1.84E-07	25
RKO	Q6ZNF0	ACP7_HUMAN	Acid phosphatase type 7	-2.611	3.26E-05	22
RKO	P15884	ITF2_HUMAN	Transcription factor 4 Transcription factor 12	-2.569	9.56E-05	2
RKO	P54709	AT1B3_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	-2.291	1.84E-04	8
RKO	P05121	PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1	-2.274	1.31E-06	30
RKO	O14786	NRP1_HUMAN	Neuropilin-1	-2.240	1.96E-05	22
RKO	Q99574	NEUS_HUMAN	Neuroserpin	-2.238	1.10E-05	10
RKO	Q9Y240	CLC11_HUMAN	C-type lectin domain family 11 member A	-2.206	7.27E-06	19
RKO	P15018	LIF_HUMAN	Leukemia inhibitory factor	-2.201	2.36E-05	7
RKO	P46531	NOTC1_HUMAN	Neurogenic locus notch homolog protein 1	-2.190	3.63E-04	18
RKO	Q99567	NUP88_HUMAN	Nuclear pore complex protein Nup88	-2.101	1.32E-03	2
RKO	P48509	CD151_HUMAN	CD151 antigen	-2.091	2.66E-04	5
RKO	P11717	MPRI_HUMAN	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	-2.055	5.18E-05	73
RKO	Q969H8	MYDGF_HUMAN	Myeloid-derived growth factor	-2.009	9.32E-05	4
RKO	Q8IV33	K0825_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0825	-1.980	5.66E-03	2
RKO	P01130	LDLR_HUMAN	Low-density lipoprotein receptor	-1.942	8.51E-04	28

			Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1,			
RKO	P55809	SCOT1_HUMAN	mitochondrial	-1.879	1.22E-05	14
RKO	O00161	SNP23_HUMAN	Synaptosomal-associated protein 23	-1.855	3.33E-05	8
RKO	Q9NQ94	A1CF_HUMAN	APOBEC1 complementation factor	-1.846	3.17E-04	2
RKO	Q02818	NUCB1_HUMAN	Nucleobindin-1	-1.846	8.10E-05	40
RKO	Q7LBC6	KDM3B_HUMAN	Lysine-specific demethylase 3B	-1.830	3.45E-03	2
RKO	Q92859	NEO1_HUMAN	Neogenin	-1.816	8.08E-06	42
RKO	Q13162	PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4	-1.806	2.22E-03	16
RKO	Q9H078	CLPB_HUMAN	Caseinolytic peptidase B protein homolog	-1.780	7.33E-04	2
RKO	Q9GZN4	BSSP4_HUMAN	Brain-specific serine protease 4	-1.759	1.63E-04	8
RKO	Q9UBX8	B4GT6_HUMAN	Beta-1,4-galactosyltransferase 6	-1.730	2.32E-03	5
RKO	Q6UWB1	I27RA_HUMAN	Interleukin-27 receptor subunit alpha	-1.686	3.16E-03	4
RKO	P61225	RAP2B_HUMAN	Ras-related protein Rap-2b	-1.680	1.23E-04	7
RKO	P42574	CASP3_HUMAN	Caspase-3	-1.652	1.31E-05	2
RKO	Q03405	UPAR_HUMAN	Urokinase plasminogen activator surface receptor	-1.577	4.66E-04	14
RKO	P55145	MANF_HUMAN	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	-1.550	5.61E-03	13
RKO	P11021	BIP_HUMAN	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	-1.471	9.39E-05	47
RKO	Q8N573	OXR1_HUMAN	Oxidation resistance protein 1	-1.432	8.75E-04	3
RKO	Q99523	SORT_HUMAN	Sortilin	-1.424	7.14E-04	16
RKO	Q9HAV7	GRPE1_HUMAN	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	-1.395	7.97E-03	8
RKO	P05067	A4_HUMAN	Amyloid-beta precursor protein	-1.393	1.92E-04	31
RKO	P05091	ALDH2_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-1.373	1.07E-03	17
RKO	P27797	CALR_HUMAN	Calreticulin	-1.365	7.73E-05	21
RKO	Q14520	HABP2_HUMAN	Hyaluronan-binding protein 2	-1.359	1.60E-03	4
RKO	P60520	GBRL2_HUMAN	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	-1.354	1.48E-03	4
RKO	Q8NBS9	TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5	-1.350	9.04E-05	20
RKO	O75390	CISY_HUMAN	Citrate synthase, mitochondrial	-1.335	1.14E-03	11
RKO	P01033	TIMP1_HUMAN	Metalloproteinase inhibitor 1	-1.327	2.05E-04	10
			Ras-related protein Rap-1b Ras-related protein Rap-1b-like			
RKO	P61224	RAP1B_HUMAN	protein	-1.307	3.28E-03	13
RKO	Q9Y4D7	PLXD1_HUMAN	Plexin-D1	-1.291	2.77E-03	2
RKO	Q9BS26	ERP44_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 44	-1.289	2.74E-03	16

RKO	P14625	ENPL_HUMAN	Endoplasmin	-1.262	7.81E-04	33
RKO	Q9NW13	RBM28_HUMAN	RNA-binding protein 28	-1.253	3.06E-04	4
RKO	P16070	CD44_HUMAN	CD44 antigen	-1.226	7.51E-04	8
RKO	Q96AY3	FKB10_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	-1.221	9.26E-03	10
RKO	P08174	DAF_HUMAN	Complement decay-accelerating factor	-1.203	2.72E-04	12
RKO	P30101	PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	-1.188	2.50E-04	43
RKO	P13667	PDIA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A4	-1.186	1.86E-04	43
RKO	P29317	EPHA2_HUMAN	Ephrin type-A receptor 2	-1.164	2.16E-03	28
RKO	P30040	ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 29	-1.163	5.66E-03	6
RKO	P10809	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	-1.146	5.23E-03	45
RKO	P62633	CNBP_HUMAN	Cellular nucleic acid-binding protein	-1.140	2.59E-03	7
RKO	Q9Y2U8	MAN1_HUMAN	Inner nuclear membrane protein Man1	-1.135	5.57E-03	2
			Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B			
RKO	Q9GZQ8	MLP3B_HUMAN	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2	-1.131	8.82E-04	2
RKO	P09382	LEG1_HUMAN	Galectin-1	-1.127	4.98E-03	8
			Complement component 1 Q subcomponent-binding protein,			
RKO	Q07021	C1QBP_HUMAN	mitochondrial	-1.125	2.58E-03	9
RKO	P05556	ITB1_HUMAN	Integrin beta-1	-1.123	4.15E-03	13
RKO	Q96Q15	SMG1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase SMG1	-1.108	9.56E-04	3
RKO	P29966	MARCS_HUMAN	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	-1.099	5.46E-04	11
			Glutaminefructose-6-phosphate aminotransferase			
RKO						
	O94808	GFPT2_HUMAN	[isomerizing] 2	-1.082	2.38E-03	6
RKO	O94808 P40818	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	-1.082 -1.053	2.38E-03 2.30E-03	6 2
RKO RKO	O94808 P40818 Q14247	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin	-1.082 -1.053 -1.048	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03	6 2 11
RKO RKO RKO	O94808 P40818 Q14247 Q9H9H4	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN VP37B_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	-1.082 -1.053 -1.048 -1.039	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03 7.14E-03	6 2 11 6
RKO RKO RKO	O94808 P40818 Q14247 Q9H9H4	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN VP37B_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin Vacuolar protein sorting-associated protein 37B Casein kinase II subunit alpha 3 Casein kinase II subunit	-1.082 -1.053 -1.048 -1.039	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03 7.14E-03	6 2 11 6
RKO RKO RKO RKO	O94808 P40818 Q14247 Q9H9H4 Q8NEV1	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN VP37B_HUMAN CSK23_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin Vacuolar protein sorting-associated protein 37B Casein kinase II subunit alpha 3 Casein kinase II subunit alpha	-1.082 -1.053 -1.048 -1.039 -1.013	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03 7.14E-03 1.53E-03	6 2 11 6 4
RKO RKO RKO RKO RKO	O94808 P40818 Q14247 Q9H9H4 Q8NEV1 Q14162	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN VP37B_HUMAN CSK23_HUMAN SREC_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin Vacuolar protein sorting-associated protein 37B Casein kinase II subunit alpha 3 Casein kinase II subunit alpha Scavenger receptor class F member 1	-1.082 -1.053 -1.048 -1.039 -1.013 -2.248	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03 7.14E-03 1.53E-03 0	6 2 11 6 4 8
RKO RKO RKO RKO RKO RKO	O94808 P40818 Q14247 Q9H9H4 Q8NEV1 Q14162 Q9NQ30	GFPT2_HUMAN UBP8_HUMAN SRC8_HUMAN VP37B_HUMAN CSK23_HUMAN SREC_HUMAN ESM1_HUMAN	[isomerizing] 2 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 Src substrate cortactin Vacuolar protein sorting-associated protein 37B Casein kinase II subunit alpha 3 Casein kinase II subunit alpha Scavenger receptor class F member 1 Endothelial cell-specific molecule 1	-1.082 -1.053 -1.048 -1.039 -1.013 -2.248 -4.061	2.38E-03 2.30E-03 7.91E-03 7.14E-03 1.53E-03 0 0	6 2 11 6 4 8 7

Tablica 10 Pojačano i smanjeno izraženi proteini rezistentne stanične linije raka debelog crijeva RKO identificirani pomoću 2DE-MALDI-TOF/TOF masene spektrometrije.

Status ekspre sije u RKOr	p- vrijedn ost	Fold Chan ge	Uniprot ID	Pristupni broj	Naziv proteina	Gen	MW	рІ	MASC OT rezult at	Broj peptida	Pokriven ost sekvenc e (%)
1	0.049	3.1	ACTB_HUM AN	P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	4205 2	5.2 9	102	13	32
↑ (0.049	3.1	ACTG_HUM AN	P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	4210 8	5.3 1	102	13	32
1	0.025	1.9	RBM26_HU MAN	Q5T8P6	RNA-binding protein 26	RBM26	1139 27	9.2 1	28	4	3
↑	0.007	1.8	D11L8_HUM AN	A8MPP1	Putative ATP- dependent RNA helicase DDX11- like protein 8	DDX11L 8	1029 44	7.2 8	31	4	6
1	0.012	1.7	ZN879_HU MAN	B4DU55	Zinc finger protein 879	ZNF879	6613 2	9.6 3	25	4	10
1	0.047	1.6	ACSS3_HU MAN	Q9H6R3	Acyl-CoA synthetase short- chain family member 3, mitochondrial	ACSS3	7535 8	8.8 4	30	5	11
1	0.013	1.6	TIM21_HUM AN	Q9BVV7	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim21	TIMM21	2852 7	9.7 3	42	4	27

1	0.037	1.6	EF1A1_HU MAN	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	5045 1	9.1	45	7	23
↑	0.013	1.6	PDE9A_HU MAN	076083	High affinity cGMP- specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A	PDE9A	6947 5	5.8 5	50	8	16
1	0.009	1.6	PPIE_HUMA N	Q9UNP9	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase E	PPIE	3369 5	5.4 1	44	4	16
↑	0.027	1.4	TOM34_HU MAN	Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOMM3 4	3493 7	9.1 2	57	5	28
1	0.036	1.4	CQ100_HU MAN	A8MU93	Uncharacterized protein C17orf100	C17orf1 00	1305 0	11. 57	53	5	66
1	0.02	1.4	COF1_HUM AN	P23528	Cofilin-1	CFL1	1871 9	8.2 2	60	6	50
Î	0.03	1.4	ALDOA_HU MAN	P04075	Fructose- bisphosphate aldolase A	ALDOA	3985 1	8.3	135	18	58
Î	0.04	1.3	CBR1_HUM AN	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	3064 1	8.5 5	87	9	39
Î	0.049	1.3	NDKB_HUM AN	P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	NME2	1740 1	8.5 2	51	6	41
1	0.003	1.3	AK1A1_HU MAN	P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1	AKR1A1	3689 2	6.3 2	80	10	39
1	0.003	1.3	PDE1A_HU MAN	P54750	Calcium/calmoduli n-dependent 3',5'- cyclic nucleotide	PDE1A	6144 1	5.7 2	60	9	27

					phosphodiesterase						
					1A						
↑	0.049	1.3	HPRT_HUM AN	P00492	Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltran sferase	HPRT1	2479 2	6.2 1	77	11	50
↑	0.025	1.3	KCNH5_HU MAN	Q8NCM2	Potassium voltage- gated channel subfamily H member 5	KCNH5	1129 46	7.5 1	41	8	15
1	0.046	1.3	AMPL_HUM AN	P28838	Cytosol aminopeptidase	LAP3	5653 0	8.0 3	123	19	39
1 1	0.044	1.2	MPP2_HUM AN	Q14168	MAGUK p55 subfamily member 2	MPP2	6488 2	6.3 2	47	7	19
↑ (0.002	1.2	SIAS_HUMA N	Q9NR45	Sialic acid synthase	NANS	4073 8	6.2 9	77	8	33
↑	0.032	1.2	PP1B_HUM AN	P62140	Serine/threonine- protein phosphatase PP1- beta catalytic subunit	PPP1CB	3796 1	5.8 4	120	13	40
1	0.037	1.2	TPIS_HUMA N	P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	3105 7	5.6 5	73	8	29
↑	0.034	1.2	ANXA1_HU MAN	P04083	Annexin A1	ANXA1	3891 8	6.5 7	122	17	56
1	0.043	1.2	CH60_HUM AN	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	6118 7	5.7	176	20	39

1	0.036	1.1	BIP_HUMA N	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	7240 2	5.0 7	264	31	47
↑	0.047	1.6	CNN3_HUM AN	Q15417	Calponin-3	CNN3	3656 2	5.6 9	42	5	24
↑ (0.043	1.2	CH60_HUM AN	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	6118 7	5.7	93	14	31
Ť	0.043	1.2	FAKD3_HU MAN	Q14CZ7	FAST kinase domain-containing protein 3, mitochondrial	FASTKD 3	7689 5	8.6 3	60	9	22
1	0.036	1.1	BIP_HUMA N	P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5	7240 2	5.0 7	247	33	53
↑ (0.002	1.7	ARL1_HUM AN	P40616	ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1	2051 8	5.6 3	39	4	40
1	0.002	1.5	TET5C_HU MAN	Q5VWP2	Terminal nucleotidyltransfer ase 5C	TENT5C	4548 6	5.4 5	42	9	28
↑	0.004	1.4	ANX10_HU MAN	Q9UJ72	Annexin A10	ANXA10	3782 3	5.1 3	36	7	22
↑ (0.005	1.4	FKB1B_HU MAN	P68106	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase FKBP1B	FKBP1B	1188 9	8.6 2	40	6	52
1	0.007	1.3	HNRH1_HU MAN	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNP H1	4948 4	5.8 9	94	16	59

1	0.008	1.3	UAP1L_HU	Q3KQV9	UDP-N-	UAP1L1	5756	5.9	90	19	39
			MAN		acetylhexosamine		5	4			
					pyrophosphorylase						
					-like protein 1						
1	0.014	1.4	K1C9_HUM	P35527	Keratin, type I	KRT9	6225	8.7	81	15	44
			AN		cytoskeletal 9		5	2			
1	0.017	1.5	EZRI_HUMA	P15311	Ezrin	EZR	6948	5.9	150	34	46
			Ν				4	4			
↑	0.018	1.5	DJB11_HU	Q9UBS4	DnaJ homolog	DNAJB1	4077	5.8	53	12	32
			MAN		subfamily B	1	4	1			
					member 11						
1	0.02	1.3	K2C1_HUM	P04264	Keratin, type II	KRT1	6617	8.1	43	12	23
			AN		cytoskeletal 1		0	5			
^	0.02	1.6		006220	Pocombining	DDDI	5624	6 9	12	0	24
	0.02	1.0	N	00000	hinding protein	IXDF J	3034	0.0	43	9	24
					suppressor of		0				
					hairless						
↑	0.02	1.5	SSAS1 HU	Q7Z2R9	Putative	SSBP3-	1098	12.	48	6	61
1			MAN		uncharacterized	AS1	8	15		C C	
					protein SSBP3-						
					AS1						
1	0.025	1.7	CC28B_HU	Q9BUN5	Coiled-coil domain-	CCDC28	2225	5.2	29	4	24
			MAN		containing protein	В	1	3			
					28B						
1	0.025	1.5	LYAR_HUM	Q9NX58	Cell growth-	LYAR	4404	9.5	38	6	25
			AN		regulating		4	7			
					nucleolar protein						
↑	0.026	1.5	KIF28_HUM	B7ZC32	Kinesin-like protein	KIF28P	1090	8.6	66	21	25
			AN		KIF28P		98	8			
	1				1		1	1			

1	0.027	1.4	LIPA3_HUM AN	O75145	Liprin-alpha-3	PPFIA3	1339 84	5.5 3	64	22	30
↑	0.028	1.7	K1C9_HUM AN	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	6225 5	5.1 4	40	8	29
1	0.03	1.3	K2C1_HUM AN	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	6617 0	8.1 5	68	15	34
↑	0.031	1.4	TBB5_HUM AN	P07437	Tubulin beta chain	TUBB	5009 5	4.7 8	189	27	57
↑	0.032	1.3	PSME2_HU MAN	Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2	2755 5	5.5 4	112	16	58
1	0.035	1.3	MYH4_HUM AN	Q9Y623	Myosin-4	MYH4	2239 02	5.6 5	64	24	20
<u>↑</u>	0.04	1.3	PP14B_HU MAN	Q96C90	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	PPP1R1 4B	1601 5	4.7 5	41	5	51
↑	0.041	1.2	SARNP_HU MAN	P82979	SAP domain- containing ribonucleoprotein	SARNP	2371 3	6.1	32	5	25
Ļ	0.001	1.5	F227A_HUM AN	F5H4B4	Protein FAM227A	FAM227 A	6700 2	9.3 9	33	9	28
Ļ	0.004	1.2	CP3A7_HU MAN	P24462	Cytochrome P450 3A7	CYP3A7	5777 6	9.1 6	44	13	31
Ļ	0.006	1.3	FABPH_HU MAN	P05413	Fatty acid-binding protein, heart	FABP3	1490 6	6.2 9	47	5	64

Γ	\downarrow	0.006	1.6	MPPB_HUM	O75439	Mitochondrial-	PMPCB	5507	6.3	41	7	23
				AN		processing		3	8			
						peptidase subunit						
						beta						
	\downarrow	0.007	1.4	ATG12_HU	O94817	Ubiquitin-like	ATG12	1521	5.0	42	4	18
				MAN		protein ATG12		8	1			
F	↓	0.008	1.4	HNRPK_HU	P61978	Heterogeneous	HNRNP	5123	5.3	86	19	41
				MAN		nuclear	К	0	9			
						ribonucleoprotein K						
	\downarrow	0.008	1.5	FABPH_HU	P05413	Fatty acid-binding	FABP3	1490	6.2	43	4	54
				MAN		protein, heart		6	9			
F	Ļ	0.008	1.8	KIF28_HUM	B7ZC32	Kinesin-like protein	KIF28P	1090	8.6	46	15	20
	•			AN		KIF28P		98	8			
-	1	0.011	1 1		D40500	Histiding, tDNA		5750	0 5	40	10	21
	Ŷ	0.011	1.4		F49590		HAR32	2109	0.0	40	10	21
				AN		niyase,		3	2			
-	1	0.017	15			Putative beta-		8726	80	24	3	34
	Ŷ	0.017	1.5		AONIAOU	defensin 1084	84	0720	0.9	24	5	54
						delensin 100A	07					
	\downarrow	0.017	1.7	MIC60_HUM	Q16891	MICOS complex	IMMT	8402	6.0	35	6	12
				AN		subunit MIC60		5	8			
F	\downarrow	0.018	1.5	THIL_HUMA	P24752	Acetyl-CoA	ACAT1	4545	8.9	35	7	31
				Ν		acetyltransferase,		6	8			
						mitochondrial						
	\downarrow	0.022	1.2	SMAD2_HU	Q15796	Mothers against	SMAD2	5318	6.1	52	8	31
				MAN		decapentaplegic		5	3			
L						homolog 2						
1	\downarrow	0.024	1.4	ACTB_HUM	P60709	Actin, cytoplasmic	ACTB	4205	5.2	110	17	44
1				AN		1		2	9			
L								1				

Ļ	0.031	1.2	GCP2_HUM AN	Q9BSJ2	Gamma-tubulin complex component 2	TUBGC P2	1030 96	6.3 8	48	15	29
Ļ	0.036	1.5	HSPB1_HU MAN	P04792	Heat shock protein beta-1	HSPB1	2282 6	5.9 8	51	9	53
Ļ	0.039	1.6	HSPB3_HU MAN	Q12988	Heat shock protein beta-3	HSPB3	1706 9	5.6 6	38	5	44
Ļ	0.041	1.6	CF298_HU MAN	P57076	Cilia- and flagella- associated protein 298	CFAP29 8	3337 4	6.9 9	34	8	26
Ļ	0.043	1.2	ETDC_HUM AN	A0A1B0G VM5	Embryonic testis differentiation protein homolog C	ETDC	6853	10. 18	36	4	62
↓	0.045	1.4	MIC60_HUM AN	Q16891	MICOS complex subunit MIC60	IMMT	8402 5	6.0 8	29	5	10
Ļ	0.043	1.9	K1C9_HUM AN	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	6225 5	5.1 4	60	10	26
Ļ	0.022	1.7	EXOS6_HU MAN	Q5RKV6	Exosome complex component MTR3	EXOSC6	2850 3	6.0 6	40	4	22
Ļ	0.017	1.7	RLP24_HU MAN	Q9UHA3	Probable ribosome biogenesis protein RLP24	RSL24D 1	1989 3	9.9 9	35	4	19
Ļ	0.029	1.7	FICD_HUM AN	Q9BVA6	Protein adenylyltransferas e FICD	FICD	5191 6	7.3 1	24	4	9
Ļ	0.006	1.7	ZRAB3_HU MAN	Q5FWF4	DNA annealing helicase and endonuclease ZRANB3	ZRANB3	1248 23	8.7 4	33	6	10

Ļ	0.028	1.7	TOM34_HU MAN	Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOMM3 4	3493 7	9.1 2	46	5	27
Ļ	0.018	1.7	KIF12_HUM AN	Q96FN5	Kinesin-like protein KIF12	KIF12	7181 3	9.1 9	30	5	15
Ļ	0.048	1.7	F227A_HUM AN	F5H4B4	Protein FAM227A	FAM227 A	6700 2	9.3 9	39	6	19
Ļ	0.038	1.6	TEX51_HU MAN	A0A1B0G UA7	Testis-expressed protein 51	TEX51	1922 9	7.5 9	50	4	33
Ļ	0.016	1.6	SPB9_HUM AN	P50453	Serpin B9	SERPIN B9	4300 4	5.6 1	27	6	20
Ļ	0.006	1.5	AP1M2_HU MAN	Q9Y6Q5	AP-1 complex subunit mu-2	AP1M2	4819 2	8.2 2	41	7	18
Ļ	0.012	1.4	CBR1_HUM AN	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	3064 1	8.5 5	115	12	60
Ļ	0.029	1.4	K1C9_HUM AN	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	6225 5	5.1 4	58	9	24
Ļ	0.024	1.4	K1C9_HUM AN	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	KRT9	6225 5	5.1 4	61	9	25
Ļ	0.01	1.4	MRP1_HUM AN	P33527	Multidrug resistance- associated protein 1	ABCC1	1729 07	6.7 1	41	10	10
\downarrow	0.011	1.4	SEM4A_HU MAN	Q9H3S1	Semaphorin-4A	SEMA4A	8466 1	6.3 8	30	4	7

Ļ	0.014	1.4	XAGE3_HU MAN	Q8WTP9	X antigen family member 3	XAGE3	1235 2	4.4	35	4	34
Ļ	0.025	1.4	ACADM_HU MAN	P11310	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM	4701 5	8.6 1	51	7	21
Ļ	0.042	1.4	TWF2_HUM AN	Q6IBS0	Twinfilin-2	TWF2	3975 1	6.3 7	68	8	34
Ļ	0.031	1.4	PSD13_HU MAN	Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	4320 3	5.5 3	105	12	36
Ļ	0.044	1.4	GFPT1_HU MAN	Q06210	Glutamine fructose-6- phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFPT1	7955 5	6.6 6	50	12	21
Ļ	0.02	1.3	ROA3_HUM AN	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNP A3	3979 9	9.1	100	15	34
Ļ	0.031	1.3	SYDC_HUM AN	P14868	AspartatetRNA ligase, cytoplasmic	P14868	5749 9	6.1 1	70	8	20
Ļ	0.049	1.3	CPNE3_HU MAN	O75131	Copine-3	CPNE3	6094 7	5.6	85	12	19
Ļ	0.006	1.3	MIC60_HUM AN	Q16891	MICOS complex subunit MIC60	IMMT	8402 6	6.0 8	142	16	30
Ļ	0.038	1.3	FSCN1_HU MAN	Q16658	Fascin	FSCN1	5512 3	6.8 4	153	19	45

\downarrow	0.003	1.3	APT_HUMA	P07741	Adenine	APRT	1976	5.7	93	8	62
			N		phosphoribosyltran		6	8			
					sferase						
\downarrow	0.017	1.3	TRM44_HU	Q8IYL2	Probable tRNA	TRMT44	8594	6.9	40	6	10
			MAN		(uracil-O(2)-)-		4	8			
					methyltransferase						
\downarrow	0.027	1.3	TBB5_HUM	P07437	Tubulin beta chain	TUBB	5009	4.7	80	12	30
			AN				5	8			
\downarrow	0.014	1.3	IPYR_HUM	Q15181	Inorganic	PPA1	3309	5.5	44	7	35
			AN		pyrophosphatase		5	4			
		1.0		500004		501104	0.400		407	45	50
Ļ	0.022	1.3		P30084	Enoyl-CoA	ECHS1	3182	8.3	137	15	50
			AN		nyuratase,		3	4			
	0.000	4.0		014047			2000	0.0	70	10	
Ļ	0.033	1.3	LASP1_HU	Q14847	LIM and SH3	LASP1	3009	0.0	79	12	33
			MAN		domain protein T		1	1			
\downarrow	0.035	1.2	GLU2B_HU	P14314	Glucosidase 2	PRKCS	6035	4.3	168	21	36
			MAN		subunit beta	н	7	3			
1	0.041	12		000623	Prohibitin	PHB2	2084	55	145	1/	67
¥	0.041	1.2	N	Q33023	TIONDUIT	11102	2304	7	145	14	07
								'			
\downarrow	0.046	1.2	PRDX3_HU	P30048	Thioredoxin-	PRDX3	2801	7.6	48	4	24
			MAN		dependent		7	7			
					peroxide						
					reductase,						
					mitochondrial						
\downarrow	0.002	1.2	FA50A_HU	Q14320	Protein FAM50A	FAM50A	4021	6.3	64	10	31
			MAN				6	9			
\downarrow	0.041	1.2	INT1_HUMA	Q8N201	Integrator complex	INTS1	2463	5.7	43	11	6
			N		subunit 1		66	7			

\downarrow	0.047	1.2	PDIA1_HUM	P07237	Protein disulfide-	P4HB	5748 0	4.7 6	100	12	28
			,				Ŭ	Ŭ			
\downarrow	0.019	1.1	PITH1_HUM	Q9GZP4	PITH domain-	PITHD1	2439	5.4	126	9	45
			AN		containing protein 1		1	7			
\downarrow	0.047	1.1	PRDX2_HU	P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	2204	5.6	162	11	51
			MAN				9	6			
\downarrow	0.025	1.1	HSPB1_HU	P04792	Heat shock protein	HSPB1	2282	5.9	206	16	67
			MAN		beta-1		6	8			
\downarrow	0.042	1.1	LDHA_HUM	P00338	L-lactate	LDHA	3695	8.4	96	20	44
			AN		dehydrogenase A		0	4			
1	0.042	1 1		D07255			2000	75	02	16	12
↓ ↓	0.042	1.1	MAN	F07355	Annexin Az	AINAAZ	8	7.5	92	10	43
Ţ	0.012	1.7	DC1L1 HU	Q9Y6G9	Cytoplasmic	DYNC1L	5682	6.0	37	7	24
•			MAN		dynein 1 light	11	9	1			
					intermediate chain						
					1						
\downarrow	0.047	1.2	AMERL_HU	Q6DCA0	AMMECR1-like	AMMEC	3504	9.1	51	6	26
			MAN		protein	R1L	8	8			
							1	1			

Stanična	LINIPROT ID i pristuppi broj	Naziv protoina		n vrijodnost	Broj
linija		Naziv proteina	LUYZFU	p vrijednost	peptida
RKOR	sp P35754 GLRX1_HUMAN	Glutaredoxin-1	NA	NA	4
RKOR	sp Q15833 STXB2_HUMAN	Syntaxin-binding protein 2	NA	NA	7
RKOR	sp Q14627 I13R2_HUMAN	Interleukin-13 receptor subunit alpha-2	4.295	8.88E-09	11
RKOR	sp Q5SVZ6 ZMYM1_HUMAN	Zinc finger MYM-type protein 1	3.616	1.06E-04	3
RKOR	sp P62328 TYB4_HUMAN	Thymosin beta-4	3.517	2.52E-06	5
RKOR	sp Q9NZQ7 PD1L1_HUMAN	Programmed cell death 1 ligand 1	3.353	2.17E-08	5
RKOR	sp Q03135 CAV1_HUMAN	Caveolin-1	3.183	6.27E-07	5
RKOR	sp Q9BV73 CP250_HUMAN	Centrosome-associated protein CEP250	3.019	1.24E-04	21
RKOR	sp Q8NC26 ZN114_HUMAN	Zinc finger protein 114	2.889	7.13E-04	6
RKOR	sp Q8WTS1 ABHD5_HUMAN	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase ABHD5	2.857	4.97E-07	6
RKOR	sp O94851 MICA2_HUMAN	[F-actin]-monooxygenase MICAL2	2.780	1.10E-08	18
RKOR	sp O00592 PODXL_HUMAN	Podocalyxin	2.627	2.16E-07	7
RKOR	sp Q6WCQ1 MPRIP_HUMAN	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	2.512	1.15E-06	14
RKOR	sp Q9Y446 PKP3_HUMAN	Plakophilin-3	2.201	4.80E-06	13
RKOR	sp Q5T0N5 FBP1L_HUMAN	Formin-binding protein 1-like	2.187	5.53E-04	7
RKOR	sp Q16527 CSRP2_HUMAN	Cysteine and glycine-rich protein 2	2.115	3.92E-07	7
RKOR	sp Q14554 PDIA5_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A5	1.988	2.89E-04	4
RKOR	sp Q6NZI2 CAVN1_HUMAN	Caveolae-associated protein 1	1.983	6.90E-08	11
RKOR	sp P10586 PTPRF_HUMAN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	1.922	5.83E-04	12
RKOR	sp O14578 CTRO_HUMAN	Citron Rho-interacting kinase	1.896	5.91E-04	11
RKOR	sp P23634 AT2B4_HUMAN	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	1.814	2.33E-04	12
RKOR	sp Q9NZM1 MYOF_HUMAN	Myoferlin	1.781	8.05E-07	79
RKOR	sp O15021 MAST4_HUMAN	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	1.733	4.61E-05	3
RKOR	sp P51159 RB27A_HUMAN	Ras-related protein Rab-27A Ras-related protein Rab-27B	1.726	2.90E-04	4
RKOR	sp Q8N1G2 CMTR1_HUMAN	Cap-specific mRNA (nucleoside-2-O-)-methyltransferase 1	1.707	3.07E-04	11
RKOR	sp Q5GLZ8 HERC4_HUMAN	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	1.655	4.77E-07	14
RKOR	sp Q8IWW6 RHG12_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 12	1.587	4.57E-08	8
RKOR	sp Q9NRA2 S17A5_HUMAN	Sialin	1.547	5.63E-05	2

 Tablica 11
 Pojačano izraženi proteini unutarstaničnog proteoma rezistentne RKO linije identificirani pomoću LC-MS/MS

RKOR	sp Q14244 MAP7_HUMAN	Ensconsin	1.514	1.95E-06	10
RKOR	sp Q96GA3 LTV1_HUMAN	Protein LTV1 homolog	1.513	3.29E-03	5
RKOR	sp O43852 CALU_HUMAN	Calumenin	1.485	3.26E-06	15
RKOR	sp P09493 TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	1.479	1.01E-04	18
RKOR	sp P30530 UFO_HUMAN	Tyrosine-protein kinase receptor UFO	1.448	3.76E-06	12
RKOR	sp Q712K3 UB2R2_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R2	1.424	2.26E-03	5
RKOR	sp P07311 ACYP1_HUMAN	Acylphosphatase-1	1.397	2.51E-06	5
RKOR	sp O95486 SC24A_HUMAN	Protein transport protein Sec24A	1.388	5.27E-05	10
RKOR	sp Q13017 RHG05_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 5	1.388	8.77E-04	7
RKOR	sp Q06481 APLP2_HUMAN	Amyloid-like protein 2	1.384	4.52E-03	3
RKOR	sp Q5T9L3 WLS_HUMAN	Protein wntless homolog	1.371	3.91E-03	3
RKOR	sp O14672 ADA10_HUMAN	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	1.367	2.92E-04	6
RKOR	sp Q86SE8 NPM2_HUMAN	Nucleoplasmin-2	1.362	3.82E-03	2
RKOR	sp Q3KQV9 UAP1L_HUMAN	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1	1.360	2.78E-06	14
RKOR	sp Q9NYP9 MS18A_HUMAN	Protein Mis18-alpha	1.352	1.04E-03	4
RKOR	sp P10321 1C07_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain	1.336	1.42E-04	15
RKOR	sp Q9Y5V3 MAGD1_HUMAN	Melanoma-associated antigen D1	1.313	7.79E-04	4
RKOR	sp Q4G148 GXLT1_HUMAN	Glucoside xylosyltransferase 1	1.310	1.45E-04	3
RKOR	sp P50895 BCAM_HUMAN	Basal cell adhesion molecule	1.305	7.18E-04	8
RKOR	sp P56537 IF6_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 6	1.296	1.34E-05	9
RKOR	sp Q9BRP1 PDD2L_HUMAN	Programmed cell death protein 2-like	1.293	1.44E-03	4
RKOR	sp Q99519 NEUR1_HUMAN	Sialidase-1	1.292	1.73E-04	6
RKOR	sp P53634 CATC_HUMAN	Dipeptidyl peptidase 1	1.282	2.10E-03	8
RKOR	sp Q9Y5Y0 FLVC1_HUMAN	Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	1.264	7.32E-04	3
RKOR	sp P56945 BCAR1_HUMAN	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	1.253	2.18E-03	4
RKOR	sp Q9UGJ0 AAKG2_HUMAN	5-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	1.248	3.82E-03	8
RKOR	sp Q8NDA8 MROH1_HUMAN	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1	1.242	1.19E-03	5
RKOR	sp Q96IJ6 GMPPA_HUMAN	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha	1.225	1.50E-03	10
RKOR	sp Q9HAD4 WDR41_HUMAN	WD repeat-containing protein 41	1.225	2.39E-06	5
RKOR	sp P30466 1B18_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain	1.206	5.03E-05	11
RKOR	sp Q9BQ75 CMS1_HUMAN	Protein CMSS1	1.191	4.20E-04	5
RKOR	sp P08962 CD63_HUMAN	CD63 antigen	1.181	4.56E-07	3

RKOR	sp Q69YQ0 CYTSA_HUMAN	Cytospin-A	1.180	1.13E-04	5
RKOR	sp Q15149 PLEC_HUMAN	Plectin	1.175	4.65E-07	297
RKOR	sp O95070 YIF1A_HUMAN	Protein YIF1A	1.157	1.46E-03	2
RKOR	sp Q13277 STX3_HUMAN	Syntaxin-3	1.147	4.15E-03	4
RKOR	sp Q8NEM2 SHCBP_HUMAN	SHC SH2 domain-binding protein 1	1.119	1.14E-03	6
RKOR	sp 075487 GPC4_HUMAN	Glypican-4	1.117	1.52E-03	7
RKOR	sp Q7Z2K6 ERMP1_HUMAN	Endoplasmic reticulum metallopeptidase 1	1.108	5.72E-05	3
PKOP		Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like			
RNOR	sp Q9UHR4 BI2L1_HUMAN	protein 1	1.075	3.71E-08	12
RKOR	sp P10619 PPGB_HUMAN	Lysosomal protective protein	1.072	7.68E-04	4
RKOR	sp Q12959 DLG1_HUMAN	Disks large homolog 1	1.071	2.94E-03	10
RKOR	sp Q13303 KCAB2_HUMAN	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	1.069	4.33E-05	10
RKOR	sp Q71UM5 RS27L_HUMAN	40S ribosomal protein S27-like	1.069	8.35E-05	6
RKOR	sp Q13509 TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain	1.064	1.76E-05	22
RKOR	sp Q96EB6 SIR1_HUMAN	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1	1.052	1.38E-03	2
RKOR	sp Q9Y639 NPTN_HUMAN	Neuroplastin	1.047	2.17E-04	6
RKOR	sp Q5JVS0 HABP4_HUMAN	Intracellular hyaluronan-binding protein 4	1.026	5.55E-04	3
RKOR	sp Q9Y6M7 S4A7_HUMAN	Sodium bicarbonate cotransporter 3	1.014	3.92E-05	5
RKOR	sp Q9Y4P1 ATG4B_HUMAN	Cysteine protease ATG4B	1.006	9.47E-04	7

Stanična	UNIPROT ID i pristupni broj	Naziv proteina	Log2FC	p vrijednost	Broj peptida
linija	,	•	•	. ,	,,,,
RKO	sp Q52LW3 RHG29_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 29	-1.006	1.54E-07	49
RKO	sp Q7Z333 SETX_HUMAN	Probable helicase senataxin	-1.012	1.92E-03	11
RKO	sp Q92945 FUBP2_HUMAN	Far upstream element-binding protein 2	-1.019	1.88E-04	19
RKO	sp Q13505 MTX1_HUMAN	Metaxin-1	-1.033	3.17E-03	3
RKO	sp Q53H96 P5CR3_HUMAN	Pyrroline-5-carboxylate reductase 3	-1.036	1.30E-03	9
RKO	sp Q9ULJ3 ZBT21_HUMAN	Zinc finger and BTB domain-containing protein 21	-1.038	2.55E-04	12
RKO	sp Q9Y2Q3 GSTK1_HUMAN	Glutathione S-transferase kappa 1	-1.071	4.31E-03	5
RKO	sp Q9Y2H0 DLGP4_HUMAN	Disks large-associated protein 4	-1.071	1.89E-03	3
RKO	sp Q92896 GSLG1_HUMAN	Golgi apparatus protein 1	-1.076	2.80E-06	28
RKO	sp Q92597 NDRG1_HUMAN	Protein NDRG1	-1.105	6.93E-04	6
RKO	sp Q9NZ08 ERAP1_HUMAN	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	-1.116	9.46E-04	4
RKO	sp Q8TEW0 PARD3_HUMAN	Partitioning defective 3 homolog	-1.117	1.72E-06	7
RKO	sp Q969X5 ERGI1_HUMAN	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	-1.119	3.48E-06	9
RKO	sp P46100 ATRX_HUMAN	Transcriptional regulator ATRX	-1.133	1.13E-03	4
RKO	sp Q15942 ZYX_HUMAN	Zyxin	-1.136	7.59E-04	11
RKO	sp O14745 NHRF1_HUMAN	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	-1.180	1.90E-03	5
RKO	sp Q16666 IF16_HUMAN	Gamma-interferon-inducible protein 16	-1.193	4.54E-07	39
RKO	sp P09382 LEG1_HUMAN	Galectin-1	-1.224	3.22E-05	7
RKO	sp Q8NI60 COQ8A_HUMAN	Atypical kinase COQ8A, mitochondrial	-1.239	3.82E-03	5
RKO	sp Q00537 CDK17_HUMAN	Cyclin-dependent kinase 17	-1.241	2.04E-04	8
RKO	sp O15226 NKRF_HUMAN	NF-kappa-B-repressing factor	-1.247	7.94E-06	16
RKO	sp P45973 CBX5_HUMAN	Chromobox protein homolog 5	-1.275	4.10E-07	7
RKO	sp Q9Y232 CDYL_HUMAN	Chromodomain Y-like protein	-1.315	4.57E-03	5
RKO	sp O15173 PGRC2_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 2	-1.346	3.34E-03	5
RKO	sp P50453 SPB9_HUMAN	Serpin B9	-1.367	1.47E-07	19
RKO	sp Q8IVL0 NAV3_HUMAN	Neuron navigator 3	-1.405	6.25E-06	30
RKO	sp Q96QF0 RAB3I_HUMAN	Rab-3A-interacting protein	-1.466	1.86E-06	4

 Tablica 12 Smanjeno izraženi proteini unutarstaničnog proteoma rezistentne RKO linije identificirani pomoću LC-MS/MS

RKO	sp P05412 JUN_HUMAN	Transcription factor AP-1		4.05E-04	9
RKO	sp Q03154 ACY1_HUMAN	Aminoacylase-1	-1.529	1.27E-04	2
RKO	sp Q9H4F1 SIA7D_HUMAN	Alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3-N-acetyl- galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase		3.05E-04	3
RKO	sp Q14202 ZMYM3_HUMAN	Zinc finger MYM-type protein 3		7.27E-04	4
RKO	sp Q8TD30 ALAT2_HUMAN	Alanine aminotransferase 2	-1.564	1.11E-07	7
RKO	sp Q6DT37 MRCKG_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma	-1.572	1.86E-04	3
RKO	sp Q9Y371 SHLB1_HUMAN	Endophilin-B1	-1.634	1.39E-04	4
RKO	sp P42025 ACTY_HUMAN	Beta-centractin	-1.713	2.59E-03	9
RKO	sp Q7L8J4 3BP5L_HUMAN	SH3 domain-binding protein 5-like	-1.725	1.68E-03	3
RKO	sp Q8N8S7 ENAH_HUMAN	Protein enabled homolog	-1.767	3.45E-06	10
RKO	sp P37275 ZEB1_HUMAN	Zinc finger E-box-binding homeobox 1	-1.815	8.50E-05	6
RKO	sp P09601 HMOX1_HUMAN	Heme oxygenase 1	-1.870	1.53E-04	14
RKO	sp P29966 MARCS_HUMAN	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	-1.952	6.11E-05	5
RKO	sp Q99541 PLIN2_HUMAN	Perilipin-2	-2.098	3.27E-05	17
RKO	sp Q08AF3 SLFN5_HUMAN	Schlafen family member 5	-2.452	2.63E-05	7
RKO	sp O94979 SC31A_HUMAN	Protein transport protein Sec31A	-2.652	4.54E-11	9
RKO	sp Q9P2Q2 FRM4A_HUMAN	FERM domain-containing protein 4A	-2.657	2.40E-09	5
RKO	sp Q499Z4 ZN672_HUMAN	Zinc finger protein 672	-2.837	2.39E-06	7
RKO	sp Q9Y426 C2CD2_HUMAN	C2 domain-containing protein 2	-3.086	4.67E-09	12
RKO	sp P21980 TGM2_HUMAN	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	-3.126	9.49E-09	31

11 Životopis

Iris Car Kubaska

Telefonski broj: (+385) 992420506 (Mobilni telefon)

E-adresa: irisxcar@gmail.com

Adresa: Vinodolska 25, 51260, Crikvenica, Hrvatska (Kućna)

RADNO ISKUSTVO

SREDNJA ŠKOLA DR. ANTUNA BARCA – CRIKVENICA, HRVATSKA

NASTAVNICA KEMIJE – 09/2023 – TRENUTAČNO

• Zaduženja uključuju planiranje i provedbu teorijske i praktične nastave kemije u smjerovima opća gimnazija i ekonomija.

• Aktivno surađujem s drugim nastavnicima u kreiranju i provođenju projekata u području STEM-a.

INSTITUT ZA ANTROPOLOGIJU – ZAGREB, HRVATSKA

ASISTENTICA - 11/2021 - 09/2023

• Samostalno sam radila poslove vezane uz rad i opremanje laboratorija (tražila sam ponude, pisala narudžbenica prema zahtjevima radnog mjesta, komunicirala s dobavljačima rokove isporuke, odabirala i opremala laboratorija potrebnim uređajima prema dobivenom budžetu i potrebnim specifikacijama.

• Unutar laboratorija sam bila zadužena za vođenje evidencije financija projekta na kojem sam radila, vodila sam inventuru laboratorijskog materijala, opreme i kemikalija te sam bila zadužena za zbrinjavanje kemijskog i biološkog otpada.

• Planirala sam, provodila i analizirala rezultate pokusa vezanih uz doktorsku disertaciju (rad s in vitro staničnim kulturama, imunoblotting) i pomagala pri provođenju pokusa na Institutu (LC-MS analize).

• Implementirala sam i educirala kolege radu sa staničnim kulturama, in vitro esejima proliferacije te western blotu.

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU SVEUČILIŠTA U RIJECI – RIJEKA, HRVATSKA

ASISTENTICA - 03/2019 - 11/2021

• U timu sam radila poslove vezane uz rad i opremanje laboratorija (tražila sam ponude, pisala narudžbenica, komunicirala s dobavljačima rokove isporuke, bila sam zadužena za zbrinjavanje kemijskog i biološkog otpada)

• Planirala sam, provodila i analizirala rezultate pokusa vezanih uz doktorsku disertaciju (rad s *in vitro* staničnim kulturama, MALDI-TOF maseni spektrometrija proteinskih i N-glikanskih uzoraka).

• Pripremala sam i sudjelovala u izvođenju nastave na kolegijima za diplomski studij (laboratorijski rad sa studentima l održavanje seminara).

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU SVEUČILIŠTA U RIJECI – RIJEKA, HRVATSKA

DEMONSTRATORICA - 05/2015 - 06/2017

• U svojstvu demonstratora sam sudjelovala na kolegiju "Analitička kemija" prof.dr.sc. Jasminke Giacometti gdje sam pripremala I pokazivala laboratorijske vježbe za studente preddiplomskog studija "Biotehnologija i istraživanje lijekova". Priprema je uključivala pripremu otopina, laboratorijskog posuđa i uređaja za vježbe na kolegiju.

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

10/2019 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

DOKTOR ZNANOSTI Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova

Doktorski sveučilišni studij "Medicinska kemija"

Doktorski rad "Karakterizacija proteoma i sekretoma vemurafenib-rezistentnih stanica raka debelog crijeva s BRAFV600E mutacijom pomoću komplementarnih metoda temeljenih na spektrometriji masa" izrađuje se pod mentorstvom dr.sc. Mirele Sedić i komentorstvom prof.dr.sc. Sandre Kraljević Pavelić.

Područje studija Interdisciplinarno područje

10/2016 - 01/2019 Rijeka

MAG.BIOTECH. IN MED. Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci

Korištene metode: HPLC analiza korištenjem afinitetne monolitne kolone, SDS-PAGE, MALDI-TOF masena spektrometrija, analiza masenih spektara proteina i glikana pomoću baza podataka MASCOT i GlycoMod.

Diplomski rad Analiza N-glikoma IgG u serumu štakora;

mentor: prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

10/2013 - 09/2016 Rijeka

BACC.BIOTECH. ET PHARM.INV. Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci

Korištene tehnike: SDS-PAGE, Western blot

Konačna ocjena Magna cum laude

Diplomski rad Molekularni mehanizmi nastanka trombocita;

mentor izv.prof.dr.sc. Antonija Jurak Begonja

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: HRVATSKI

Drugi jezici:

RAZUMIJEVANJE GOVOR PISANJE

	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	Pisanje
ENGLESKI	C1	C1	C1	C1	C1
NJEMAČKI	C1	C1	C1	C1	C1
NIZOZEMSKI	A2	A2	A2	A2	A2

VJEŠTINE

Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word)

Bioinformatika (Gene Ontology, KEGG, STRING, DAVID, Cytoscape, Reactome)

Google Suite (Doc, Slides, Form, Sheet, Drive)

Specijalizirani program (QuantityOne, Bruker software, Skyline, CompuSyn)

PUBLIKACIJE

2024 - Proteomic study of medicinal mushroom extracts reveals antitumor mechanisms in an advanced colon cancer animal

model via ribosomal biogenesis, translation, and metabolic pathways

Boris Jakopovic, Anita Horvatić, Jurica Baranasic, **Iris Car**, Nada Oršolić, Ivan Jakopovich, Mirela Sedić, Sandra Kraljević Pavelić

Ime časopisa: Frontiers in pharmacology | **Svezak, izdanje i stranice**: Volume 15 - 2024 | **Izdavač**: Frontiers Media SA

2024 - Coumarin-modified ruthenium complexes: Synthesis, characterization, and antiproliferative activity against human cancer cells

Silvio Jakopec, Lejla F. Hamzic, Luka Bočkor, **Iris Car**, Berislav Perić, Srećko I. Kirin, Mirela Sedić, Silvana Raić-Malić

Ime časopisa: Archiv der pharmazie | **Svezak, izdanje i stranice**: Volume 357, Issue 9 | **Izdavač**: Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft - Willey

2023 - Ezrin Inhibition Overcomes Acquired Resistance to Vemurafenib in BRAFV600E-mutated Colon Cancer and Melanoma Cells In Vitro

Car, I.; Dittmann, A.; Vasieva, O.; Bočkor, L.; Grbčić, P.; Piteša, N.; Klobučar, M.; Kraljević Pavelić, S.; Sedić, M. Ezrin Inhibition Overcomes Acquired Resistance to Vemurafenib in BRAFV600E-Mutated Colon Cancer and Melanoma Cells In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.***2023**, *24*, 12906. https://doi.org/10.3390/ijms241612906

2023 - Secretome Screeninf of BRAFV600E-mutated Colon Cancer Cells Resistant to Vemurafenib **Car, I**.; Dittmann, A.; Klobučar, M.; Grbčić, P.; Kraljević Pavelić, S.; Sedić, M. Secretome Screening of BRAFV600E-Mutated Colon Cancer Cells Resistant to Vemurafenib. *Biology* **2023**, *12*, 608. https://doi.org/10.3390/biology12040608

2021 - N-glycans as Biomarkers in Chronic Disease

Car, I., Klobučar, M.

poglavlje u knjizi: "Novel Perspectives in Economics of Personalized Medicine and Healthcare Systems", Publisher: NOVA Science Publishers, Hauppauge, NY, 11788 USA; Publication Date: December 17, 2021.;

DOI: https://doi.org/10.52305/IMRM1661.

2021 - Different expression of lumican glycoforms in non-metastatic and metastatic laryngeal squamous cell carcinoma

Car, I., Visentin, S., Đanić, D., Klobučar, M.; Publication date 01.03.2021.; Journal Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis; Volume 57; Issue 1; Pages 114-121; DOI: https://doi.org/10.21860/medflum2021_365329

2020 - Mass spectrometry-based glycomic profiling of the total IgG and total proteome N-glycomes isolated from follicular fluid

Klobučar, M., Dević Pavlić, S., **Car, I.**, Smiljan Severinski, N, Tramišak Milaković, T., Radojčić Badovinac, A., Kraljević Pavelić, S.;

Biomolecular Concepts, Publication date: 25.10.2020.; Volume 11, Issue 1, Pages 153-171, Publisher De Gruyter, DOI: <u>https://doi.org/10.1515/bmc-2020-0015</u>.