

Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Ninoslav M. Mitić

Bioinformatička i glikobiohemijska analiza  
modularne organizacije CA125 antigena  
čoveka

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

Faculty of Biology

Ninoslav M. Mitić

Bioinformatic and glycobiochemical analysis  
of human CA125 antigen modular  
organization

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**MENTORI:**

**Dr Aleksandra Korać**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

**Dr Miroslava Janković**, naučni savetnik, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu.

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Aleksandra Korać**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

**Dr Miroslava Janković**, naučni savetnik, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu.

**Dr Bojana Milutinović**, naučni saradnik, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu.

Datum Odbrane:

*Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta 173010 - Strukturna heterogenost i efekti kompleksnih ugljenih hidrata (glikani) kao ključnih komponenti molekuskog raspoznavanja u biološkim sistemima, koji je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.*

*Ova doktorska disertacija izrađena je pod rukovodstvom dr Miroslave Janković, naučnog savetnika INEP-a, kojoj dugujem najveću zahvalnost za neizmerno strpljenje, razumevanje i veliku podršku tokom svih faza izrade ovog rada.*

*dr Aleksandri Korać, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem na savetima i ukupnoj oceni ovog rada.*

*Zahvalnost dugujem i dr Bojani Milutinović, naučnom saradniku INEP-a, na korisnim sugestijama.*

*Takođe se zahvaljujem svim naučnim, stručnim i tehničkim saradnicima instituta, koji su mi pružali podršku i pomoć tokom rada na ovoj tezi.*

*Porodici se najtoplije zahvaljujem na ljubavi, razumevanju i pružanju oslonca, koji mi je toliko značio, tokom svih ovih godina.*

# BIOINFORMATIČKA I GLIKOBIOHEMIJSKA ANALIZA MODULARNE ORGANIZACIJE CA125 ANTIGENA ČOVEKA

## REZIME

CA125 antigen, poznat kao marker seroznog karcinoma ovarijuma, predstavlja ekstracelularni deo mucina 16 (MUC16), koji nastaje njegovom proteolitičkom degradacijom. MUC16 pripada grupi transmembranskih proteina tipa I, i eksprimiran je u velikom broju embrionalnih, ali i adultnih tkiva. Njegovu primarnu strukturu karakteriše prisustvo tri regiona: N-terminalni region i region tandemskih ponovaka, koji su smešteni ekstracelularno, i C-terminalni region, koji se sastoji od transmembranskog dela i kratkog citoplazmatskog repa. Ekstracelularni region je intenzivno glikozilovan, a u intracelularnom regionu se nalazi potencijalno mesto fosforilacije. Fosforilacija predstavlja signal za proteolizu i oslobađanje ekstracelularnog dela molekula (CA125 antigen), koji se kao takav može detektovati u različitim telesnim tečnostima.

Biološka uloga MUC16/CA125, još uvek nije razjašnjena. Dosadašnja ispitivanja funkcije MUC16 (membranska forma) su, uglavnom, bila bazirana na *in vitro* model sistemu ćelija ovarijalnog karcinoma, dok su literaturni podaci o aktivnosti CA125 antigena (solubilna forma) veoma retki. Solubilna forma predstavlja funkcionalni analog i kompetitor membranskoj formi i, u cirkulaciji, ona prva dospeva u kontakt sa različitim tipovima normalnih ili patološki izmenjenih ćelija, ali ne postoje eksperimentalni dokazi o mogućem uticaju na njihovu adhezivnost, kao i imunomodulatorna svojstva.

U ovom radu je ispitivana modularna organizacija MUC16/CA125 na bioinformatičkom i glikobiohemijskom nivou, sa ciljem da se bliže definišu biološki kapacitet i posebnosti prezentacije ovog molekula u kontekstu interaktoma čoveka. Bioinformatička analiza, kao deo strategije za otkrivanje moguće biološke uloge MUC16/CA125, do sada nije korišćena u ispitivanjima ovog antigena. Pored toga, u kontekstu diskretnih bioloških funkcija, bez obzira na izuzetan biomedicinski značaj, ne postoje eksperimentalni podaci o interakcijama MUC16/CA125 sa specifičnim klasama receptora na ćelijama krvnog sistema.

*In silico* analiza modularne organizacije MUC16/CA125, vršena je na osnovu podataka koji su preuzeti sa UniProtKB baze podataka, a koji se odnose na molekul izolovan iz ćelijske linije ovarijalnog karcinoma čoveka, OVCAR-3. Bioinformatička analiza je obuhvatila: određivanje homologije (korišćenjem BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool* alatke); ispitivanje prisustva obrazaca, strukturnih motiva i konzerviranih domena (korišćenjem baza podataka kao što su Bgee: *a dataBase for Gene Expression Evolution* i *Gene Ontology*, CDD, ELM, BLOCKS, InterProScan, MyHits i iProClass); određivanje fizičko-hemijskih osobina, globularnosti i odstupanja od pretpostavljene tercijarne strukture (korišćenjem ProtParam, ProtScale i GLOBPLOT v2.3 alatki); i predviđanje funkcije pomoću alatki koje koriste nekoliko programa: JAJA, ProtFun 2.2 i GeneOntology.

Glikobiohemijska analiza je obuhvatila ispitivanje uticaja CA125 antigena na adhezivnost i agregabilnost eritrocita, kao i moguće interakcije sa različitim tipovima leukocitnih lektina tj. sigleka (*Siglec - sialic acid-binding immunoglobulin (Ig)-like lectin*) i receptora sličnih lektinima tipa C (selektini, DC-SIGN - *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*, MMR - *macrophage mannose receptor*). Ispitivanje efekta CA125 antigena na eritrocite čoveka određivano je u testovima na čvrstoj fazi ili primenom svetlosne mikroskopije. Interakcija CA125 antigena sa leukocitnim receptorima ispitivana je pomoću lektinskog- i imunoblota, kao i u testovima vezivanja i inhibicije na čvrstoj fazi, sa imobilisanim antigenima. Glikobiohemijskom analizom su, pored antigena iz ćelijske linije ovarijalnog karcinoma čoveka (clCA125), bili obuhvaćeni i antigen kancerskog porekla iz pleuralne tečnosti (pfCA125) kao i antigen fetalnog porekla (pCA125), koji se sintetiše tokom trudnoće.

Rezultati *in silico* analize proteinske sekvence MUC16/CA125, stavili su ovaj molekul u kontekst modularnih proteina sa anotiranim ulogom u adheziji i srodnim procesima. Uvid u sekvence koje pokazuju sličnost sa sekvencom MUC16/CA125, pokazao je da se one, uglavnom, nalaze u ekstracelularnom regionu MUC16, koji je bogat serinom i treoninom. Ove sličnosti se nisu mogle povezati sa anotiranim domenima iz dostupnih baza podataka, osim parcijalno, ali statistički značajno sa BLLF1, multidomenom karakterističnim za glikoproteine omotača virusa iz familije *Herpesviridae*. Bioinformatička analiza je ukazala i na moguću korelaciju funkcionalnih aktivnosti, koje se pripisuju domenima bogatim

serinom/treoninom kod identifikovanih proteina u okviru ispitivanih taksona, i moguće funkcije CA125 antigena. Na osnovu dobijenih rezultata, uloga CA125 antigena u procesima adhezije bi mogla uključiti i interakcije posredstvom konzerviranih proteinskih sekvenci, odgovornih za jonski transport, i interakcije sa šećernim supstratima.

Polazeći od mucinske prirode CA125 antigena, kao i fizioloških stanja u kojima je njegova koncentracija u serumu povećana, u prvom delu glikobiohemijske analize, ispitan je uticaj CA125 antigena na eritrocite čoveka. Dobijeni rezultati su ukazali da pCA125 i pfCA125 umereno povećavaju agregaciju eritrocita, i uspešno inhibiraju njihovu adheziju. Za razliku od njih, clCA125 je pokazao neznatan uticaj na modulaciju ovih osobina eritrocita.

Sumarni rezultati drugog dela analize, koja se odnosila na interakcije sa leukocitnim receptorima, pokazali su da CA125, kao ligand, može stupiti u interakcije sa različitim tipovima proteina koji vezuju sijalinsku kiselinu. Pokazano je da postoje specifični obrasci vezivanja sigleka za ispitivane CA125 antigene, kojima se ovi antigeni, uspešnije, razlikuju u odnosu na njihovo poreklo, nego što se to čini na osnovu obrazaca vezivanja biljnih lektina, takođe specifičnih za sijalinsku kiselinu. Najuočljivija razlika je zapažena u odnosu na ligandni kapacitet CA125 antigena fetalnog porekla prema sigleku-7, prisutnom na dendritskim ćelijama, NK (*natural killer cell*) ćelijama, monocitima i CD8<sup>+</sup> T ćelijama i clCA125 antigena kancerskog porekla prema sigleku-9 i sigleku-10, prisutnim na B ćelijama, NK ćelijama, monocitima, neutrofilima i CD8<sup>+</sup> T ćelijama. Za razliku od sigleka, sva tri ispitivana selektina: L-selektin, E-selektin i P-selektin su, na dozno-zavisani način, interagovali sa pfCA125 i u manjoj meri pCA125, ali ne i clCA125. Pored toga, zapaženo je i da je P-selektin reagovao na znatno nižim koncentracijama nego L- i E-selektin. Na osnovu uočenog visokog afiniteta P-selektina, CA125 antigen bi pre stupio u interakcije sa aktiviranim endotelnim ćelijama ili krvnim pločicama, na kojima je ovaj selektin prisutan, nego sa ćelijama na kojima su prisutni drugi tipovi selektina.

Ispitivanje interakcije CA125 antigena i DC-SIGN, koji je eksprimiran na površini dendritskih ćelija (DC) i koji vezuje manan i visoko-manozne glikane kao i glikane sa terminalnim Le<sup>x</sup>/Le<sup>y</sup>/Le<sup>a</sup>/Le<sup>b</sup> antigenima, pokazalo je da on prepoznaje pCA125 i pfCA125 antigen. Rezultati inhibicije su ukazali da je vezivanje DC-SIGN za pCA125 zavisno od prisustva glikana bogatih manozom, za razliku od vezivanja pfCA125, koje je nezavisno od

prisustva N- ili O-glikana, što bi moglo uticati na njegove diskretne receptorske funkcije. Manozni receptor makrofaga (MMR), koji je prisutan na makrofagama i DC i koji vezuje terminalnu manozu i fukozu i SLe<sup>x</sup>, nije reagovao ni sa jednim od ispitivanih CA125 antigena.

Receptori slični lektinima tipa C imaju važnu ulogu u imunskom sistemu, u smislu posredovanja u interakcijama tipa ćelija-ćelija, tj. u međusobnom kontaktu leukocita ili u njihovom kontaktu sa endotelom, kao i u vezivanju patogena. Promene u glikozilaciji liganda za receptore slične lektinima tipa C, direktno utiču na njihovu aktivnost i specifičnost i imaju važne posledice na razvoj, preživljavanje i reaktivnost ćelija krvnog i imunskog sistema. Rezultati ovoga rada ukazuju da bi razlike u strukturi/glikozilaciji CA125 antigena, koje se vezuju za posebna fiziološka i patološka stanja, mogle menjati njegov uticaj na ćelije krvnog sistema čoveka i imati značajne biomedicinske posledice u različitim mikrosredinama. Dalji uvid u prirodu i mehanizme multifunkcionalnosti CA125 antigena zahteva interdisciplinarni pristup baziran na kompleksnim interakcijama koje su posredovane različitim strukturnim domenima.

**Ključne reči:** CA125 antigen, *in silico* analiza, glikobiohemijska analiza, eritrociti, adhezija, leukocitni receptori, sigleci, selektini, DC-SIGN, manozni receptor makrofaga

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Glikobiologija

**UDK broj:** 57.087:[577.112.85:[611.651:616-006.04]](043.3)



## BIOINFORMATIC AND GLYCOBIOCHEMICAL ANALYSIS OF HUMAN CA125 ANTIGEN MODULAR ORGANIZATION

### ABSTRACT

CA125 antigen, a well known tumour marker for serous ovarian cancer, is an extracellular part of the mucin 16 (MUC16) molecule. This antigen arises from proteolytic degradation of MUC16, a type I transmembrane protein, expressed in both embryonal and adult tissue. The primary structure of MUC16 consists of three characteristic parts: an N-terminal region and a series of tandem repeats, which are located extracellularly, and a C-terminal region, which consists of the transmembrane part and a short cytoplasmic tail. The extracellular peptide is extensively glycosylated, and there is a potential phosphorylation site in the intracellular chain. Phosphorylation is a signal for proteolysis and release of the extracellular part of the molecule (CA125 antigen), which can be detected as such in various body fluids.

The biological role of MUC16/CA125 is not yet understood. Previous investigations of MUC16 (membrane form) functions were generally based on *in vitro* cell model systems of ovarian cancer, whereas published data on the activity of CA125 antigen (soluble form) are very rare. The soluble form is a functional analog and competitor to the membrane form, and, in the circulation, it first contacts different types of normal or pathologically altered cells. However, there is no experimental evidence on its possible impact on their adhesion nor immunomodulatory properties.

In this work, the modular organization of human CA125 antigen was analyzed bioinformatically and glycobiochemically, aiming at closer definition of the biological capacity and presentation of this molecule in the context of the human interactome. As part of a strategy to detect a possible biological role for MUC16/CA125, bioinformatics analysis has never been used in studies of this antigen. In addition, in the context of discrete biological functions, regardless of its great biomedical importance, there are no

experimental data on the interactions of MUC16/CA125 with specific classes of receptors on cells of the blood system.

The modular organization of MUC16/CA125, was analyzed *in silico* using data taken from the UniProtKB database, which refers to a molecule isolated from the human ovarian cancer cell line, OVCAR-3. Bioinformatic analysis included: determination of homology (using BLAST, Basic Local Alignment Search Tool Tool); investigation of patterns, structural motifs and conserved domains (using databases such as Bgee: a database for Gene Expression and Gene Ontology Evolution, CDD, ELM, BLOCKS, InterProScan and MyHits iProClass); determination of physical and chemical properties, globularity and deviations from the assumed tertiary structure (using ProtParam, ProtScale and GLOBPLOT v2.3 tools); and function prediction using tools that employ several programs: JAJA, ProtFun 2.2 and GeneOntology.

Glycobiochemical analysis comprised examination of the influence of CA125 on adhesion and aggregation of erythrocytes, as well as on interactions with different types of leukocyte lectins, namely siglecs [sialic acid-binding immunoglobulin (Ig)-like lectin] and C-type lectin-like receptors [selectins, dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1 (DC-SIGN) and macrophage mannose receptor (MMR)]. The effect of CA125 antigen on human erythrocytes was determined using solid phase tests and light microscopy. The interaction of CA125 with leukocyte receptors was investigated employing lectin-blot and immunoblot, as well as binding and inhibition solid phase assays. Cancer antigen isolated from human pleural fluid (pfCA125) and pregnancy-associated antigen (pCA125) were included in the glycobiochemical analysis in addition to antigen from the human ovarian carcinoma cell line (clCA125).

The results of *in silico* analysis placed MUC16/CA125 in the context of modular proteins with an annotated role in adhesion-related processes. They pointed to similarities within extracellular serine/threonine rich regions of MUC16 to protein sequences expressed in evolutionarily distant taxa. No relation to annotated domains from available databases appeared, except for BLLF1, a multidomain characteristic of virus envelope glycoproteins of the Herpesviridae family. Bioinformatics analysis also pointed to a possible correlation between functional activities, which are attributed to serine/threonine rich domains of

proteins identified in the studied taxa, and possible CA125 antigen function. Based on these results, the role of CA125 antigen in adhesion processes could involve interactions through conserved protein sequences responsible for ion transport, and for interactions with sugar substrates.

Considering the mucin nature of CA125 antigen, as well as physiological conditions in which its concentration in serum is increased, the effect of this antigen on human erythrocytes was investigated in the first part of glycochemical analysis. The results showed that pCA125 and pfCA125 moderately increased aggregation of erythrocytes, and successfully inhibited their adhesion. In contrast, clCA125 showed little to no modulation of these properties.

The second part of the glycochemical analysis related to interactions with leukocyte receptors. This showed that, as a ligand, CA125 may interact with different types of proteins that bind sialic acid. Siglecs were found to have specific binding patterns, which more effectively distinguished CA125 antigens of fetal from those of cancer origin, in contrast to the binding patterns of sialic acid-specific plant lectins. The most obvious difference was the ligand capacity of pCA125 antigen towards siglec-7, expressed on dendritic cells, NK (natural killer cells), monocytes and CD8+ T cells, and clCA125 towards siglec-9 and siglec-10 on B cells, NK cells, monocytes, neutrophils and CD8+ T cells. Unlike siglecs, all three investigated selectins: L-selectin, E-selectin and P-selectin, interacted in a dose-dependent manner with pfCA125, and to a lesser extent with pCA125, but not with clCA125. Moreover, P-selectin reacted at significantly lower concentrations than L- or E-selectin. Thus, CA125 antigen would preferentially interact with activated endothelial cells or platelets expressing P-selectin, compared to cells expressing the other types of selectin.

The interaction of CA125 antigen and DC-SIGN, which is specific for mannan, high-mannose glycans and glycans with terminal  $Le^x$  /  $Le^y$  /  $Le^a$  /  $Le^b$  antigens was studied. DC-SIGN is expressed on dendritic cells (DC) and recognized pCA125 and pfCA125 antigen. Inhibition of DC-SIGN binding to pCA125 was dependent on the presence of mannan-rich glycans, in contrast to the binding to pfCA125, which was not affected by the presence of N- or O-linked glycans, all which can modify their discrete receptor functions. Macrophage

mannose receptor (MMR), which is expressed on macrophages and DC, and which binds terminal mannose, fucose and sialyl Le<sup>x</sup>, did not react with any of the tested CA125 antigens.

C-type lectin-like receptors play an important role in the immune system, mediating in cell-cell interactions, *i.e.* contacts between leukocytes or between leukocytes and endothelium, and in the binding of pathogens. Glycosylation changes in ligands for C-type lectin-like receptors directly influence their activity and specificity and have important effects on the development, survival and reactivity of cells of the blood and immune systems. Based on the results of this study, differences in the structure/glycosylation of CA125 antigens associated with different physiological or pathological conditions, could alter their influence on the human blood cells, and have important biomedical implications in different microenvironments. Further insight into the nature and mechanisms of CA125 multifunctionality requires an interdisciplinary approach, based on complex interactions that are mediated by its different structural domains.

**Key words:** CA125 antigen, *in silico* analysis, glycobiochemical analysis, erythrocytes, adhesion, leukocyte receptors, siglecs, selectins, DC-SIGN, macrophage mannose receptor

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Glycobiology

**UDC number:** 57.087:[577.112.85:[611.651:616-006.04]](043.3)

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mucini</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Mucini: opšte odlike i klasifikacija</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1.1. Sekretorni mucini</i>	<i>2</i>
<i>1.1.1.2. Transmembranski mucini</i>	<i>4</i>
<i>1.1.1.3. Evolucija sekretornih i transmembranskih mucina</i>	<i>6</i>
<b>1.1.1.4. MUC16 (CA125)</b>	<b>8</b>
<i>1.1.1.4.1 Muc16 gen</i>	<i>9</i>
<i>1.1.1.4.2 MUC16: Struktura i organizacija domena</i>	<i>10</i>
<b>1.1.1.5. Funkcionalna svojstva mucina</b>	<b>12</b>
<i>1.1.1.5.1. Funkcije mucina u normalnim fiziološkim uslovima</i>	<i>13</i>
<i>1.1.1.5.1.1. Izgradnja fizičke barijere i održavanje homeostaze lokalne mikrosredine</i>	<i>13</i>
<i>1.1.1.5.1.2. Oslobođanje aktivnih molekula iz mukusnih slojeva</i>	<i>14</i>
<i>1.1.1.5.1.3. Odbrana od patogenih mikroorganizama</i>	<i>15</i>
<i>1.1.1.5.1.4. Signalna transdukcija</i>	<i>16</i>
<i>1.1.1.5.2 Funkcija mucina u kanceru</i>	<i>18</i>
<b>1.2. Bioinformatika</b>	<b>23</b>
<b>1.2.1. Pojam i definicija</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2. Ciljevi bioinformatike</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3. Oblasti bioinformatike</b>	<b>24</b>
<b>1.2.4. Primena bioinformatike</b>	<b>25</b>
<b>1.2.5. Ograničenja bioinformatike</b>	<b>26</b>
<b>1.2.6. Baze podataka</b>	<b>26</b>
<i>1.2.6.1. Biološke baze podataka</i>	<i>29</i>
<i>1.2.6.2 Alatkke u bioinformatici</i>	<i>33</i>
<b>2. CILJ</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Materijali</b>	<b>37</b>
<b>3.1.1. Reagensi</b>	<b>37</b>
<b>3.1.2. Uzorci biološkog materijala</b>	<b>39</b>
<i>3.1.2.1 Uzorci placenti prvog trimestra</i>	<i>39</i>
<i>3.1.2.2. Eritrociti</i>	<i>40</i>
<b>3.2. Metode</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1. In silico analiza</b>	<b>40</b>

3.2.1.1. Ispitivanje homologije proteinske sekvence	41
3.2.1.2. Ispitivanje modularne organizacije MUC16	41
3.2.1.3. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina, globularnosti i odstupanja od pretpostavljene tercijarne strukture	43
3.2.1.4. Predikcija funkcije MUC16	44
<b>3.2.2. Glikobiohemijska analiza</b>	<b>44</b>
3.2.2.1. Gel filtracija ekstrakta placente na koloni Sefaroza 4B	44
3.2.2.2. Test agregacije eritrocita	45
3.2.2.3. Test adhezije eritrocita	45
3.2.2.4. Test hemolize	46
3.2.2.5. Testovi vezivanja na čvrstoj fazi	46
3.2.2.5.1. Vezivanje biljnih lektina za imobilisane CA125 antigene	46
3.2.2.5.1.1. Vezivanje SNA ( <i>Sambucus nigra</i> agglutinin) i MAA II ( <i>Maackia amurensis</i> agglutinin II)	46
3.2.2.5.1.1.1. Perjodatni tretman	47
3.2.2.5.1.2. Vezivanje LTL ( <i>Lotus tetragonolobus</i> lektin)	47
3.2.2.5.2. Vezivanje rekombinantnih molekula tipa Fc himera za imobilisane CA125 antigene	48
3.2.2.5.2.1. Vezivanje rekombinantnih humanih sigleka	48
3.2.2.5.2.2. Vezivanje rekombinantnih humanih selektina i DC-SIGN	49
3.2.2.5.2.2.1. Inhibicija vezivanja selektina i DC-SIGN	50
3.2.2.5.3. Vezivanje rekombinantnog humanog manoznog receptora makrofaga (MMR) za CA125 antigen	50
3.2.2.6. CA125 – imunoreaktivnost viralnih antigena	51
3.2.2.7. Obeležavanje CA125 antigena radioaktivnim izotopom joda ( <sup>125</sup> I)	51
3.2.2.8. Dot-blot	52
3.2.2.8.1. Lektinski dot-blot	52
3.2.2.8.2. Imuno dot-blot	53
<b>4. REZULTATI</b>	<b>54</b>
4.1. Bioinformatička analiza sekvence MUC16	54
4.1.1. Ispitivanje homologije sekvence MUC16	54
4.1.1.1. BLAST analiza	54
4.1.1.2. CLUSTALW analiza	58
4.1.2. Ispitivanje prisustva domena i strukturnih motiva	59
4.1.2.1. CDD analiza	59
4.1.2.2. BLOCKS analiza	63
4.1.2.3. Prosite i iProClass analiza	64

4.1.2.4. <i>MyHits</i> analiza	66
4.1.3. Fizičko-hemijske osobine, globularnost i odstupanje od pretpostavljene tercijarne strukture proteinske sekvence MUC16	67
4.1.3.1. <i>ProtParam</i>	67
4.1.3.2. <i>ProtScale</i>	67
4.1.3.3. <i>GLOBPLOT</i>	70
4.1.4. Predikcija funkcije MUC16	71
4.1.4.1. <i>ProtFun</i> analiza	71
4.1.4.2. <i>JAFa</i> analiza	71
4.1.4.3. <i>PFP</i> analiza	75
4.1.4.4. <i>GeneOntology</i> analiza	78
4.2. Glikobiohemijska analiza	80
4.2.1. Uticaj CA125 antigena na eritrocite čoveka	80
4.2.1.1. Uticaj CA125 antigena na agregaciju eritrocita	80
4.2.1.2. Uticaj CA125 antigena na adheziju eritrocita	83
4.2.1.3. Hemoliza eritrocita u prisustvu CA125 antigena	87
4.2.2. Interakcija CA125 antigena sa lektinima i receptorima lektinskog tipa eksprimiranim na ćelijama krvnog sistema čoveka	88
4.2.2.1. Vezivanje sigleka za CA125 antigen	88
4.2.2.2. Vezivanje receptora lektinskog tipa C za CA125 antigen	94
4.2.2.2.1. Vezivanje selektina za CA125 antigen	94
4.2.2.2.2. Vezivanje DC-SIGN za CA125 antigen	97
4.2.2.2.3. Vezivanje MMR za CA125 antigen	102
5. DISKUSIJA	103
5.1. Bioinformatička analiza	103
5.2. Glikobiohemijska analiza	108
6. ZAKLJUČCI	127
7. LITERATURA	131

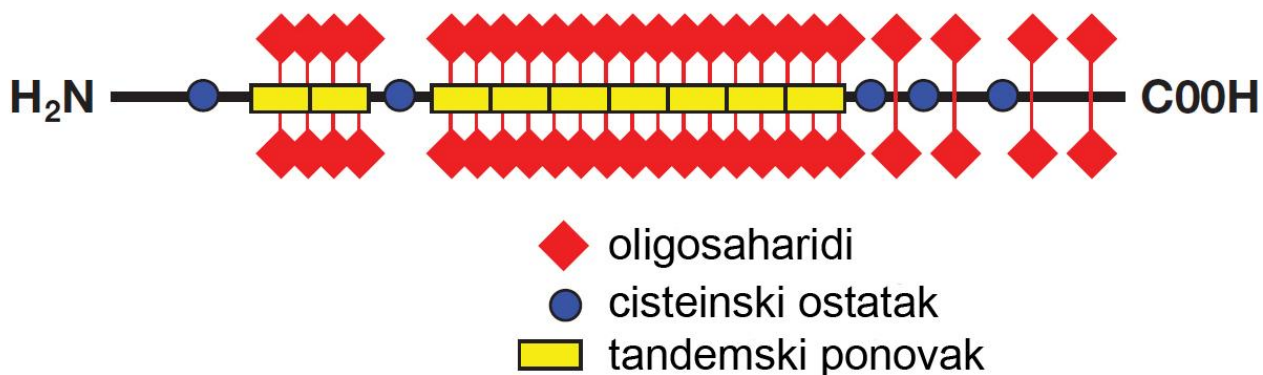
## *1. UVOD*



## 1.1 Mucini

### 1.1.1. Mucini: opšte odlike i klasifikacija

Mucini su glikoproteini velike molekulske mase (masa mucina se kreće i preko  $10^6$  Da), sa visokim sadržajem glikana, pretežno O-tipa. Oni predstavljaju glavnu proteinsku komponentu mukusa - površinskog, zaštitnog sloja epitela (Hollingsworth i Swanson, 2004). Sintetišu se kao monomeri, u formi apomucina, a zatim se posttranslaciono modifikuju intenzivnom glikozilacijom. Zreli molekuli mucina sastoje se iz dva regiona (**slika 1**). Jedan region čine amino- i karboksi-terminalni krajevi, koji su slabo glikozilovani, ali su bogati cisteinom, koji najverovatnije učestvuje u stvaranju disulfidnih veza unutar i između monomera (Kufe, 2009). Drugi region čini centralni deo molekula, koji predstavlja glavnu odliku mucina, kojom se oni razlikuju od drugih molekula (Kufe, 2009). Njega karakteriše veliki broj tandemskih ponovaka (od 10 do 80 aminokiselina), sa visokim sadržajem prolina, treonina i serina (PTS domeni). U okviru PTS domena, na serinskim i treoninskim ostacima, dolazi do intenzivne O-glikozilacije. Glikani N-tipa mogu biti, takođe, prisutni, ali u znatno manjoj meri.



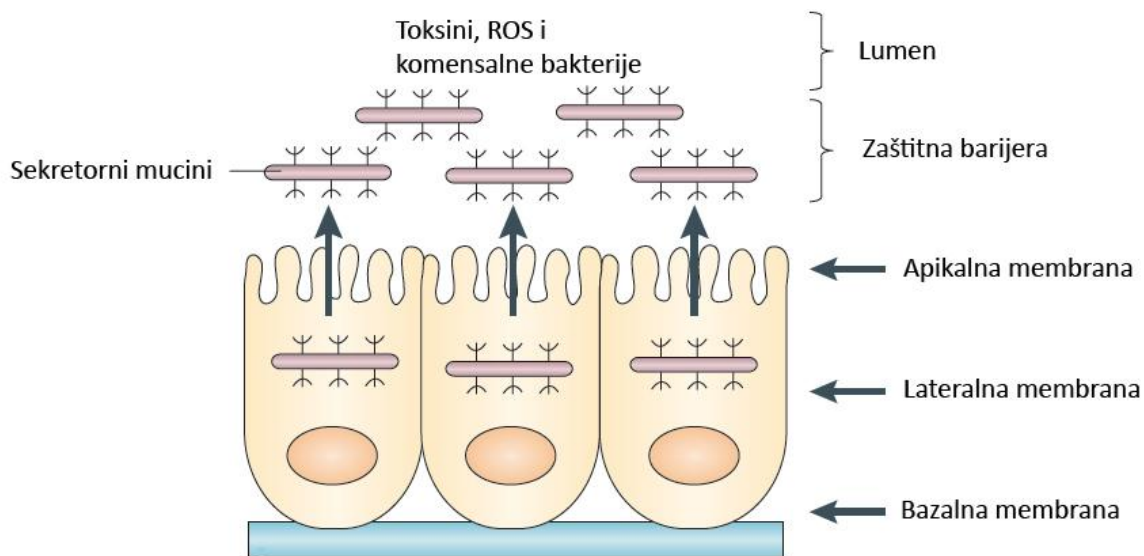
Slika 1. Šematski prikaz strukture monomera mucina.

Familija humanih mucina (MUC) se sastoji od proteina označenih kao MUC1 – MUC21, i svi oni su podklasifikovani u sekretorne i transmembranske mucine. Sekretorni mucini (npr. MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 i MUC19) formiraju fizičku barijeru u formi mukoznog gela. On pruža zaštitu epitelnim ćelijama, koje oblažu respiratorni i gastrointestinalni trakt, kao i površine kanala, koji se nalaze kod organa kao što su jetra, grudi, pankreas i bubrezi. Transmembranski mucini (npr. MUC1, MUC4, MUC13 i MUC16), imaju jedan region koji prolazi kroz membranu i ogromne ekstracelularne domene sa O-glikozilovanim tandemskim ponovcima, koji doprinose strukturi protektivnog mukoznog gela.

#### ***1.1.1.1. Sekretorni mucini***

Postoje dve klase sekretornih mucina: mucini koji formiraju gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 i MUC19) i mucini koji ne formiraju gel (MUC7, MUC9). Njihova uloga se sastoji u zaštiti ćelija od različitih uticaja spoljašnje sredine (bakterije, toksini uneti u organizam, reaktivni oblici kiseonika - ROS, ili proteolitički enzimi u gastrointestinalnom traktu), a mogu i suprimirati inflamatorni odgovor (**slika 2**).

Mucini koji formiraju gel su veliki polimerni molekuli, čiji polipeptidni deo sadrži i preko 5000 aminokiselina. Za razliku od njih, mucini koji ne formiraju gel, su monomeri i imaju manje molekulske mase (Moniaux i sar., 2001, 2004; Van Seunigen, 2008). Sekretorni mucini su kodirani grupom gena koji se nalaze na hromozomskom lokusu 11p15, i smatra se da dele zajedničko poreklo sa *von Willebrand*-ovim faktorom (vWF), glikoproteinom koji omogućava adheziju krvnih pločica za zidove krvnih sudova (Desseyn i sar., 1998, 2000).



**Slika 2. Distribucija sekretornih mucina.**  
 (Preuzeto iz Donald W. Kufe, *Nature Reviews Cancer* 2009.)

Njihova polimerizacija je omogućena prisustvom vWF domena tipa C ili D, kao i domena cisteinskih čvorova, koji su odgovorni za dimerizaciju u endoplazmatičnom retikulumu. Pored toga, ova grupa mucina ima glikozilovane PTS domene, kao i SEA domene. SEA domen je dobio naziv prema proteinima kod kojih je prvi put identifikovan (*Sea urchin sperm protein, Enterokinaza i Agrin*). On se sastoji od oko 120 aminokiselina i uglavnom se javlja kod proteina koje karakteriše visok nivo glikozilacije, a koji su po svojoj funkciji veoma različiti (Bork i Patthy, 1995). Pretpostavlja se da on ima regulatornu funkciju ili funkciju vezivanja bočnih ugljenohidratnih lanaca.

Najbolje proučen sekretorni mucin je MUC2. On je protein gastrointestinalne mukoze, a dovodi se u vezu sa inflamatornim procesima i kancerom. Pokazano je da on sadrži veliki, veoma glikozilovan, centralno postavljen PTS domen, kao i domene bogate cisteinom u

amino- i karboksi-terminalnom regionu. Karboksi-terminalni region ovog molekula doprinosi formiranju homodimera u endoplazmatičnom retikulumu, i nakon O-glikozilacije u Goldžijevom aparatu, MUC2 formira trimere, preko disulfidnih veza na amino-terminusu, koji su otporni na proteaze (Asker i sar., 1998; Herrmann i sar., 1999; Godl i sar., 2002; Lidell i sar., 2003). Smatra se da MUC2 ima ulogu u suprimiranju inflamatornih procesa u crevnom traktu i da to može inhibirati razvoj intestinalnih tumora (Velcich i sar., 2006).

#### ***1.1.1.2. Transmembranski mucini***

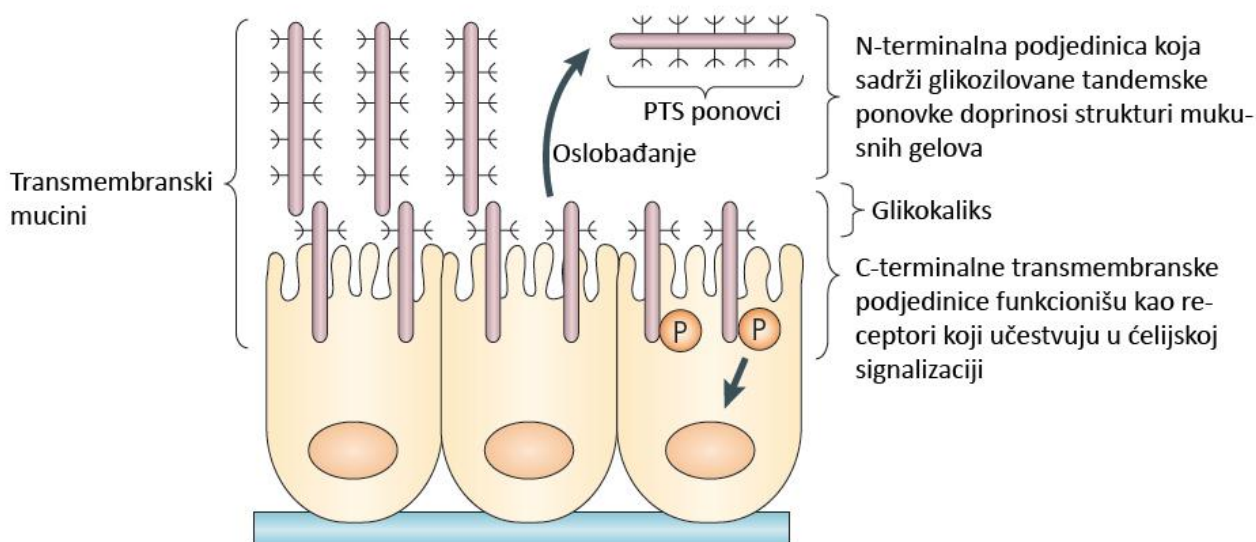
U transmembranske mucine spadaju MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 i MUC20 (Moniaux i sar., 2001, 2004; Van Seunigen, 2008). Njihova veličina varira između 334 aminokiselina (MUC15) do više od 22000 aminokiselina (MUC16). Ovi mucini imaju transmembranski domen i relativno kratak citoplazmatski rep, a SEA domeni su karakteristično locirani između O-glikozilovanih PTS ponovaka i transmembranskog domena.

MUC4, za razliku od drugih transmembranskih mucina, ne poseduje SEA domene, ali ima nidogenski domen, kao i AMOP domen (nađen kod većeg broja proteina a koji korelira sa njihovim adhezivnim svojstvima) i vWF domen u ekstracelularnom regionu (Duraismy i sar., 2006).

MUC13 pokazuje strukturnu sličnost sa MUC4, a sadrži N-terminalne tandemske ponovke, tri domena slična EGF-u (*epidermal growth factor*, epidermalni faktor rasta) i SEA domen. Domen sličan EGF-u, sadrže i MUC3, MUC12 i MUC17 (Duraismy i sar., 2006). Za razliku od njih, MUC16 poseduje veći broj SEA domena, ali ne i domene slične EGF-u.

Aberantna ekspresija MUC4, MUC13 i MUC16 se povezuje sa različitim metastatskim promenama kod čoveka.

Transmembranski mucini se nalaze na apikalnoj membrani epitelnih ćelija, tako da se njihovi glikozilovani tandemski ponovci bogati prolinom, serinom i treoninom (PTS domeni) pružaju iza glikokaliksa (ugljenohidratnog sloja na površini ćelija koji se sastoji od oligosaharidnih komponenata bočnih lanaca glikoproteina i glikolipida prisutnih u membrani ćelija) (slika 3).



**Slika 3. Transmembranski mucini.**

(Preuzeto iz *Donald W. Kufe, Nature Reviews Cancer* 2009.)

MUC1 i MUC4, a moguće i MUC13, su heterodimerni molekuli. Translacijom njihovih RNK nastaju pojedinačni polipeptidi, koji se isecaju, i nastaju amino- i karboksi-terminalne podjedinice, koje formiraju stabilni kompleks u kom nisu međusobno kovalentno vezane.

N-terminalne podjedinice ovih mucina, koje sadrže PTS domene, se mogu osloboditi od transmembranskih podjedinica, koje kao receptori mogu signalizirati prisustvo inflamacije ili drugih promena, u unutrašnjost ćelije. Iako i MUC16 podleže autoproteolitičkom isecanju, nije poznato da li se MUC16 eksprimira kao heterodimerni kompleks, ili se oslobađanje N-terminalnog regiona MUC16 odigrava nakon njegovog pozicioniranja na apikalnoj membrani ćelije (Kufe, 2009).

Jedan od najbolje proučenih transmembranskih mucina je MUC1. On je lokalizovan na apikalnoj membrani normalnih sekretornih epitelnih ćelija (Kufe i sar., 1984). Neoplastičnom transformacijom ovih ćelija, i gubitkom njihove polarizovanosti, ekspresija MUC1 se drastično povećava. Pokazano je da razlika između normalne i aberantne forme MUC1, ne leži u promenama u sekvenci proteina, već u njegovoj glikozilaciji, koja je promenjena kod MUC1, koga sintetišu tumorske ćelije. Glikozilacija tandemskih ponovaka aberantne forme MUC1 je takva da se sastoji od samo jednog šećera, GalNAc (poznatog kao Tn antigen), ili od dva šećera, Gal $\beta$ 1,4GalNAc (poznatog kao T antigen) (Finn, 2008).

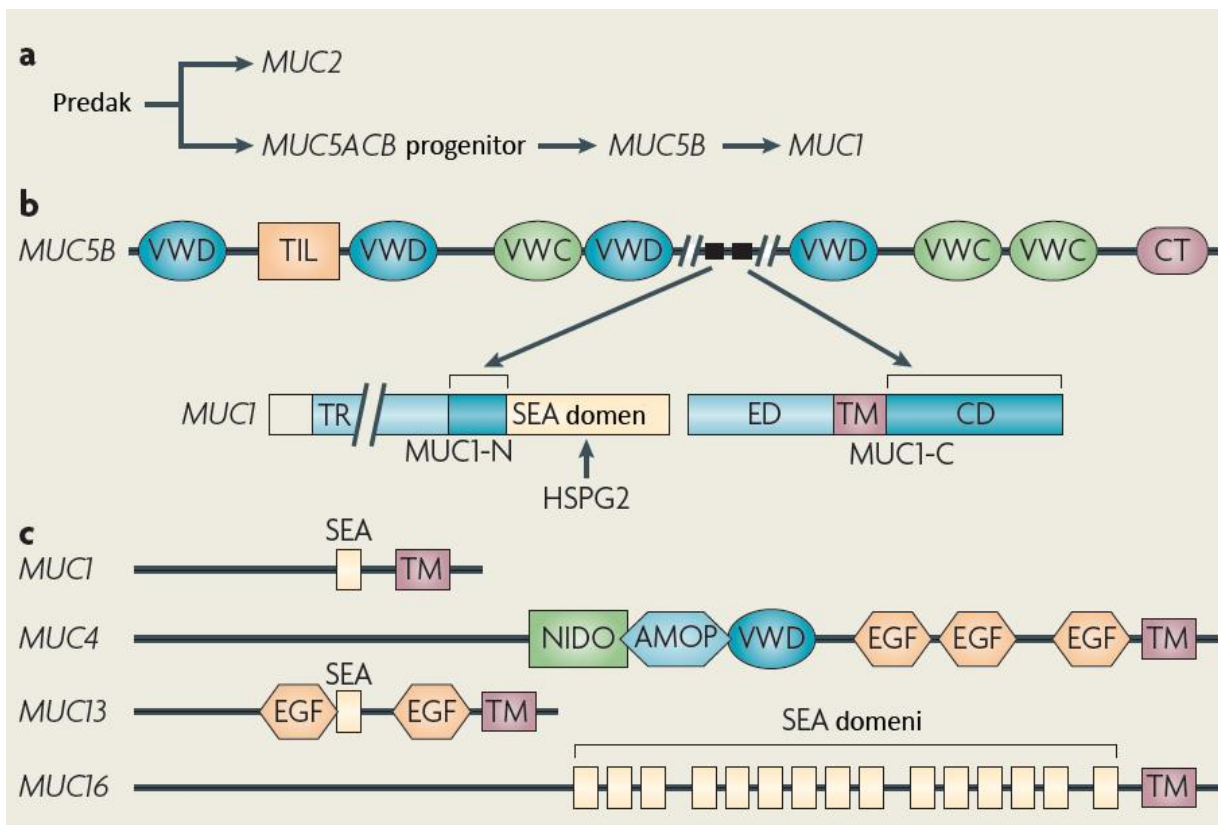
### ***1.1.1.3. Evolucija sekretornih i transmembranskih mucina***

Članovi familije humanih mucina klasifikuju se prema homologiji u njihovoj zajedničkoj biološkoj strukturi tj. PTS domenu, a ne prema njihovoj evoluciji od zajedničkih predačkih gena. Evolucija mucina i njihovih domena prikazana je na **slici 4**.

Dostupni podaci ukazuju da su se sekretorni mucini pojavili rano tokom evolucije metazoa, i da su geni MUC5AC i MUC5B evoluirali od zajedničkog predačkog gena MUC5ACB.

Gen MUC5ACB je nastao od predačkog gena od kog je nastao i MUC2 gen (**slika 4a**) (Duraismy i sar., 2006, 2007; Lang i sar., 2007). Sekvence MUC1 gena, koje se nalaze

uzvodno od njegovih SEA domena, kao i MUC1 citoplazmatski domen (MUC1-CD), evoluirali su od MUC5B gena (**slika 4b**).



**Slika 4. Evolucija sekretornih i transmembranskih mucina.**

(Preuzeto iz Donald W. Kufe, *Nature Reviews Cancer* 2009.)

CT - C-terminalni domen cisteinski čvor; ED - ekstracelularni domen; EGF - epidermalni faktor rasta; TIL - domen bogat cisteinom koji je sličan inhibitoru tripsina; TM - transmembranski domen; TR - tandemski ponovci; vWF - von Willebrand-ov faktor; HSPG2 - heparan-sulfat proteoglikan 2; VWD - vWF domen tipa D; VWC - vWF domen tipa C; NIDO – nidogenski domen; AMOP - adhezioni domen nađen kod MUC4 i drugih proteina; SEA - *Sea urchin sperm protein, Enterokinaza i Agrin*.

Na osnovu analize sekvenci SEA domena, nađeno je da su oni kod MUC1 i MUC13 evoluirali od heparan-sulfat proteoglikana 2 (HSPG2), dok su kod MUC16 evoluirali od agrina (Duraismy i sar., 2006). Nidogenski domen (NIDO) MUC4 je evoluirao od pretka zajedničkog za nidogenski i adhezioni domen nađen kod MUC4 i drugih proteina (AMOP). Osim NIDO, kod MUC4 nađen je i vWF domen tipa D (VWD), koji vodi poreklo od proteina 2 koji sadrži Sushi domen (SUSD2) (**slika 4c**) (Duraismy i sar., 2006).

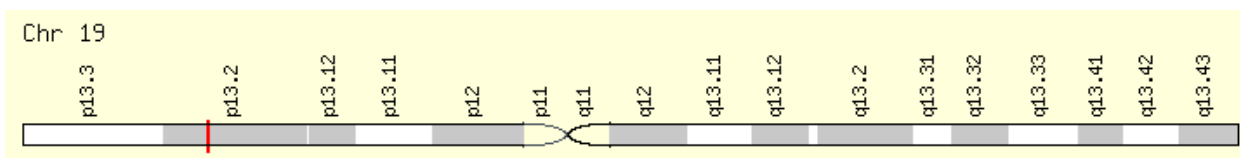
#### ***1.1.1.4. MUC16 (CA125)***

Mucin 16 (MUC16), poznat još i kao CA125 antigen (kancer antigen 125), je primarno identifikovan kao antigen koga prepoznaje antitelo OC125. Zahvaljujući doktorima Robertu Bast i Robertu Knap, kao i njihovom istraživačkom timu, 1981. godine, tehnikom somatske hibridizacije ćelija slezine miša imunizovanih ćelijskom linijom ovarijalnog karcinoma OVCA 433, dobijeno je ovo monoklonsko antitelo (Bast i sar., 1981). Studije koje su usledile, sugerisale su da je CA125 antigen po svojoj strukturi ugljenohidratni epitop, sijalilsaharid u sastavu mucina ili membranski epitop, a njegova ekspresija je dovedena u vezu sa epitelnim kancerom ovarijuma (Hanish i sar., 1985; Nustad i sar., 1998; Yin i sar., 2001). Na osnovu rezultata dobijenih 2001. godine, CA125 antigen je svrstan u familiju mucina i označen kao MUC16 (Yin i sar., 2001). MUC16 je transmembranski protein, koji je u ekstraćelijskom regionu intenzivno glikozilovan, tako da 24-28 % molekulske mase čine ugljeni hidrati, a danas je poznato da CA125 antigen predstavlja njegov ekstraćelijski deo.



#### 1.1.1.4.1 *Muc16* gen

*Muc16* gen je lokalizovan na hromozomu 19 (19p13.2) a ukupna dužina gena iznosi približno 179 kbp (**slika 5**).



**Slika 5. Šematski prikaz hromozoma 19.  
Položaj gena *Muc16*.**

(preuzeto sa <http://www.genecards.org>)

Smatra se da *Muc16* gen najverovatnije sadrži 90 introna, ali postoje neslaganja u vezi sa ukupnim brojem egzona koji ulaze u njegov sastav. Ovo je posledica odsustva/prisustva nekih delova sekvenci (naročito u ponavljajućim regionima) u dostupnim genomskim bazama podataka. Amino-, odnosno karboksi-terminalni domen MUC16 su kodirani sa po 9 egzona smeštenih na 5', odnosno 3' kraju gena. Pretpostavlja se da 5 sukcesivnih egzona kodira svaki tandemski ponovak centralnog regiona, dok su dva poslednja egzona nepreklapajuća i nikad ne podležu transkripciji u isto vreme. *Muc16* gen podleže alternativnom splajsingu, i smatra se da, na taj način, može nastati osam različitih transkripata, koji mogu kodirati osam izoformi proteina. Ekspresija *Muc16* gena je, najverovatnije, regulisana putem dva, uzvodno postavljena gena.

#### 1.1.1.4.2 MUC16: Struktura i organizacija domena

U humanom MUC16 izdvajaju se tri regiona: N-terminalni region i region tandemskih ponovaka, koji su smešteni ekstracelularno, i C-terminalni region, koji se sastoji od transmembranskog dela i kratkog citoplazmatskog repa. S obzirom da mu se N- i C-terminusi nalaze na suprotnim stranama ćelijske membrane, kao i da sadrži jedan transmembranski domen, MUC16 pripada grupi transmembranskih proteina tipa I. Prema dostupnim literaturnim podacima, u sastav MUC16 ulaze 22152 aminokiseline (O'Brien i sar., 2001, 2002; Perez i Gipson, 2008). U ekstracelularnom regionu MUC16 dolazi do intenzivne glikozilacije a prisutni su N-glikani i, naročito O-glikani. Fosforilacijom intracelularnog C-terminusa, indukuje se proteolitičko isecanje i oslobađanje ekstracelularnog domena u ekstracelularni prostor. Sekretorne forme MUC16 mogu međusobno interagovati, preko interlančanih disulfidnih veza, što dovodi do formiranja velikog matriksa nalik gelu, u ekstracelularnom prostoru ili u lumenu sekretornih kanala.

MUC16 može imati 7-60 parcijalno konzerviranih tandemskih ponovaka, u zavisnosti od alternativnog splajsinga, tj. može postojati u većem broju izoformi. Svaki tandemski ponovak se sastoji od 156 aminokiselina (Maeda i sar., 2004). U svakom tandemskom ponovku nalaze se dva konzervirana cisteinska ostatka, koji formiraju disulfidni most, stvarajući tako petlju od 19 aminokiselina, čime se stabilizuje struktura MUC16 (O'Brien i sar., 2001). U regionu tandemskih ponovaka su identifikovani različiti proteinski domeni kao što su: SEA, ankirinski (ANK) i domeni bogati leucinom (*leucine rich repeat* - LRR), kao i mesto podložno proteolizi, koje se nalazi bliže ćelijskoj membrani.

SEA domen obično sadrži 120 aminokiselina, od kojih je 80 visoko konzervirano. MUC16,

za razliku od drugih mucina, sadrži veći broj SEA domena. Ovi domeni pokazuju znatno veći stepen međusobne strukturne homologije nego homologije sa istim domenima kod drugih mucina (Maeda i sar., 2004). Jedan od identifikovanih SEA domena, kod MUC16, smešten je van regiona tandemskih ponovaka (Yin i Lloyd, 2001).

Trodimenzionalna struktura SEA domena, dobijena NMR spektroskopijom, otkriva da je ovaj domen organizovan u vidu jedinstvenog  $\alpha/\beta$  sendviča, sa N- i C-terminusima na istoj strani molekula.  $\alpha/\beta$  sendvič se sastoji iz dva sloja. Prvi sloj se sastoji od četiri  $\beta$ -naborane antiparalelne ploče i jednog kratkog  $\alpha$ -heliksa, dok se drugi sloj sastoji od dva dugačka  $\alpha$ -heliksa i dve kratke  $\beta$ -naborane ploče (Maeda i sar., 2004). Na  $\beta$  ploči SEA domena se nalaze epitopi koje prepoznaju monoklonska antitela prema CA125 antigenu. Postoje dva dominantna epitopa, označena kao A i B, koja prepoznaju OC125 i M11 antitelo. Ostala monoklonska antitela, koja prepoznaju ove epitope, označavaju se kao antitela slična OC125, tj. antitela slična M11.

Ankirinski domeni (ankirinski ponovci, ANK) su jedni od najrasprostranjenijih motiva u prirodi, koji učestvuju u interakcijama protein-protein. Oni se sastoje od oko 33 aminokiseline, koje formiraju dva  $\alpha$ -heliksa i jednu  $\beta$  ploču (Gorina i sar., 1996). Ovi ponovci su nađeni kod velikog broja funkcionalno različitih proteina, kao što su proteini koji započinju transkripciju, regulatori ćelijskog ciklusa, proteini citoskeleta, transporteri jona i proteini koji učestvuju u signalnoj transdukciji.

Domeni bogati leucinom (*leucin rich repeats*, LRR) su proteinski strukturni motivi, koji formiraju  $\alpha/\beta$  potkovicu-nabor, i sastoje se od ponavljajućih nizova od 20-30 aminokiselina (Kobe i Deisenhofer, 1994; Enkhbayar i sar., 2004).  $\alpha/\beta$  potkovicica ima  $\beta$  paralelne ploče

postavljene ka unutrašnjosti potkovice i seriju spoljašnje postavljenih  $\alpha$ -heliksa. Na površinama  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$  ploča dominiraju hidrofilni bočni lanci aminokiselina, dok region između  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$  ploča čini hidrofobno jezgro bogato leucinom. Smatra se da je uloga ovih domena u ostvarivanju interakcija protein-protein (Kobe i Kajava, 2001; Gay i sar., 1991).

Na region tandemskih ponovaka nastavlja se transmembranski deo. Ovaj deo je hidrofoban, zahvaljujući visokom sadržaju lizina. Intracelularni deo C- termina čini 256 aminokiselina, među kojima je i sekvenca RRRKKEGEY, za koju se zna da je potencijalno mesto fosforilacije. Jedan od tirozinskih ostataka u citoplazmatskom repu nalazi se u okviru sekvence YTNP. Ovaj motiv je homolog Src-2 domenu, koji je prisutan u proteinima koji učestvuju u signalnoj transdukciji (Hansen i sar., 1995).

#### ***1.1.1.5. Funkcionalna svojstva mucina***

Organizacija i struktura mucinskog polipeptida, u normalnim, kao i njihove modifikacije u patološkim stanjima, odražavaju veliki broj mogućih funkcija. Osnovna uloga mucina je da održavaju homeostazu, i na taj način omogućavaju ćelijama da opstanu pri promenama uslova spoljašnje sredine. Zahvaljujući strukturi i biohemijskom sastavu, mucini doprinose zaštiti površine, kao i regulaciji lokalne mikrosredine ćelija. Molekularni sastav i formiranje struktura višeg reda, omogućava im i specijalizovane funkcije, kao što je npr. selektivna difuzija HCl u želucu. Osim toga, mucini mogu učestvovati u signalnoj transdukciji i patogenezi kancera, naročito adenokarcinoma.

#### *1.1.1.5.1. Funkcije mucina u normalnim fiziološkim uslovima*

##### *1.1.1.5.1.1. Izgradnja fizičke barijere i održavanje homeostaze lokalne mikrosredine*

Primarna funkcija velikog broja mucina je da zadrže vodu na površinama, koje su izložene sredinskim uticajima, a nisu zaštićene slojevima nepropusnim za vlagu, kao što su slojevi u koži. Intenzivna sijalinizacija u PTS domenima, koja doprinosi jakom negativnom naelektrisanju, omogućava im veliki kapacitet za vezivanje vode. Pored toga što učestvuju u održavanju hidratacije, mucini predstavljaju fizičku barijeru za mikroorganizme i nerastvorne materije, a i konfiguriraju jonski sastav, koncentraciju i dostupnost pojedinih molekula (Hollingsworth i Swanson, 2004). Na ovaj način, mucini održavaju homeostazu lokalne mikrosredine. Njihova funkcija na površini ćelije sastoji se i u selekciji molekula, koja nastaje kao rezultat regulacije efluksa i influksa specifičnih molekula. Ova funkcija mucina se pripisuje njihovim tandemskim ponovcima. Zahvaljujući svojoj stehiometriji, oni omogućavaju lokalno koncentrisanje neutralnih i naelektrisanih oligosaharidnih struktura, koje mogu funkcionisati kao jonoizmenjivači ili mogu omogućiti ili inhibirati difuziju molekula. Na površini epitela želuca, npr., mukus (prvenstveno MUC5AC i MUC6) formira zaštitni sloj i predstavlja barijeru koja selektivno omogućava difuziju HCl (Bhaskar i sar., 1992). Epitelne ćelije želuca luče bikarbonatne jone, koji se zadržavaju u sloju mukusa, i na taj način se stvara gradijent od pH 2 u lumenu želuca, do pH 6-7 na površini epitelnih ćelija (Bhaskar i sar., 1992). HCl interaguje sa slojem mukusa želuca na različite načine, u zavisnosti od pH vrednosti. Injekciranjem HCl u sloj mukusa, na vrednostima iznad pH 4, dolazi do formiranja kanala ili struktura u obliku prstiju kroz koje HCl prolazi, dok na vrednostima ispod pH 4, HCl ne može da prođe kroz mukusni sloj (Bhaskar i sar.,

1992). U želucu, ove karakteristike mucina omogućavaju da HCl, koju sintetišu žlezde, prođe kroz sloj mukusa u lumen, a u isto vreme, predstavljaju barijeru koja onemogućava da izlučena HCl dospe nazad do epitelnih ćelija želuca. Na ovu funkciju mucina značajno utiče njihov nivo sijalinizacije, kao i prisustvo drugih proteina i komponenata u samom mukusu, koji mogu modifikovati njegove biohemijske osobine (Tanaka i sar., 1997; Fujita i sar., 2000). Povećanjem sijalinizacije mucina, u mukusnom sloju želuca, smanjuje se propustljivost protona a povećava se protok HCl.

#### 1.1.1.5.1.2. Oslobođanje aktivnih molekula iz mukusnih slojeva

Kompleksni mucinski gelovi mogu da interaguju i zadržavaju biološki aktivne molekule iz okolne sredine. Po oslobođanju, koje može biti uzrokovano oštećenjem epitela, ovi molekuli mogu pokrenuti inflamatorne procese, popravku oštećenih slojeva mucina ili zaceljivanje epitela. Najbolje okarakterisan primer ovih molekula su faktori tri petlje – *trefoil factors* (TFFs), relativno konzervirana familija peptida koja sadrži motiv tri petlje – *trefoil motif* (TF) (Sands i Podolsky, 1996; Sommer i sar., 1999). TF motiv nastaje kada se formiraju tri petlje, intralančanim disulfidnim vezama između šest konzerviranih cisteinskih ostataka, u konfiguracijama 1-5, 2-4, 3-6. Većina ćelija epitela, koje proizvode mucine, eksprimira TFFs, uključujući epitelne ćelije respiratornog i gastrointestinalnog trakta, pljuvačnih žlezda, očne površine i uterusa (Hoffmann i Jagla, 2002). TFFs se vezuju za D domene mucina i, zahvaljujući svojim biološkim osobinama, doprinose viskozitetu mukusa i obezbeđuju zaštitu epitelnim ćelijama (Hoffmann i Jagla, 2001; Thim i sar., 2002). Po oslobođanju, TFFs pokreću rekonstituciju oštećenog mukusa na mestima njegovog oštećenja (Tran i sar., 1999; Taupin i sar., 1999). Specifične biološke aktivnosti, koje se

povezuju sa TFFs su: anti-apoptoza, podsticanje ćelijske pokretljivosti, kao i podsticanje diferencijacije ćelija (Wright i sar., 1997; Lalani i sar., 1999).

Smatra se da mucini i mukusni gelovi, pored TFFs, mogu da vezuju i otpuštaju citokine, faktore rasta i diferencijacije, kao i medijatore koji učestvuju u inflamaciji. Pokazano je da interleukini čoveka IL-1, IL-4, IL-6 i IL-7, poseduju specifične lektinske aktivnosti (vezivanje ugljenih hidrata) koje im omogućavaju da se vežu za oligosaharide koji su prisutni na PTS domenima mucina (Cebo i sar., 2001). Generalno, molekuli koji se vezuju za mucine, mogu predstavljati biohemijsku barijeru pojedinim ćelijama koje migriraju, a njihovo prisustvo čini i osnovu za pokretanje imunskog odgovora.

Indikatori oštećenja mukusa, mogu biti i sami fragmenti mucina. Ovi fragmenti mogu imati određene biološke aktivnosti, kao npr., fragment MUC7, koji poseduje široki spektar anti-gljivičnih aktivnosti. Pojedine komponente drugih mucina mogu, verovatno, iskazivati kako probiotičku aktivnost, prema normalnoj flori, tako i antimikrobnu aktivnost prema određenim patogenima (Bobek i sar., 2003; Situ i sar., 2003).

#### 1.1.1.5.1.3. Odbrana od patogenih mikroorganizama

Mucini mogu ispoljavati antibakterijska svojstva na više različitih načina. Prostorno organizovan spektar antitela, koja se nalaze u mukusu, doprinosi odbrani od patogenih mikroorganizama. Pokazano je da su ugljenohidratne strukture sekretorne komponente (SC) imunoglobulina (Ig) A, odgovorne za njegovu lokalizaciju u tačno određenim delovima mukusa (Phalipon i sar., 2002). Ova lokalizacija, kao i biohemijska stabilnost kojoj SC doprinosi, neophodna je za antimikrobnu aktivnost sekretornog IgA.

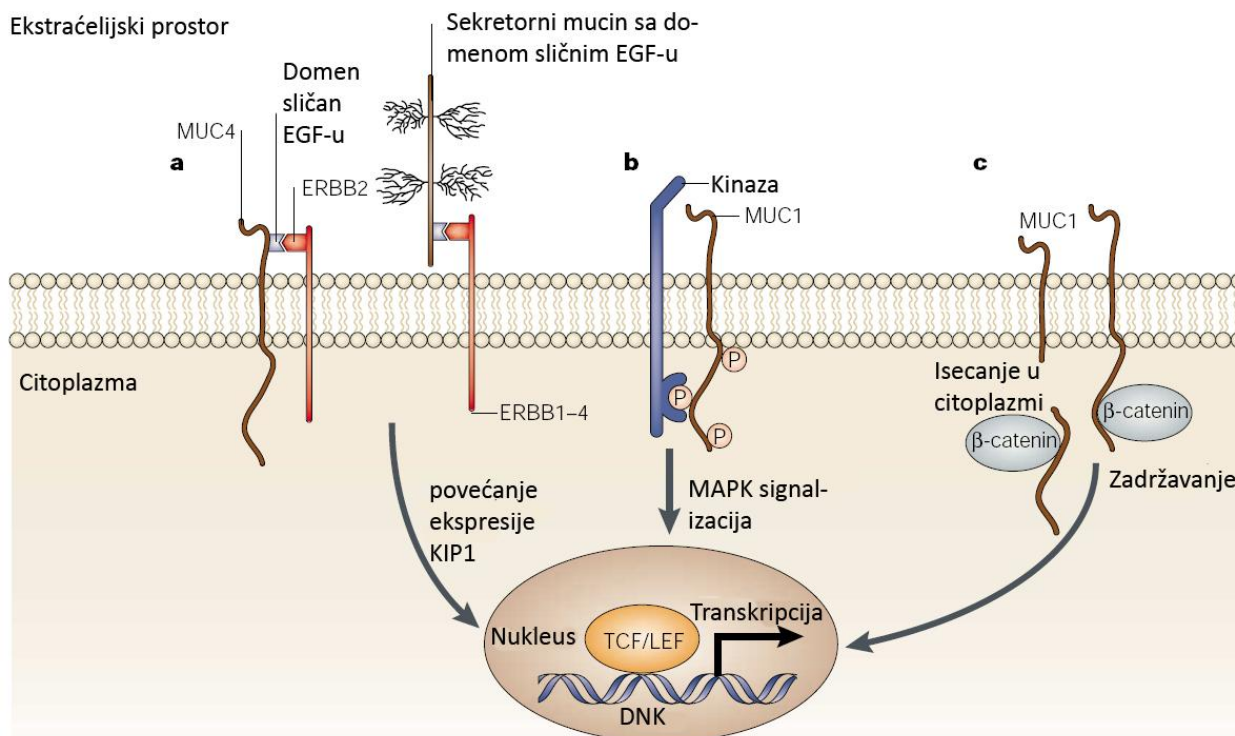
Dostupni podaci ukazuju da terminalni domeni nekih mucina imaju specifičan afinitet za površinu bakterijske ćelije, što može biti povezano sa pokretanjem imunskog odgovora protiv vezanih mikroorganizama. Mehanička svojstva mucina i mukusa omogućavaju im i da, fizički, zarobe potencijalne patogene.

#### 1.1.1.5.1.4. Signalna transdukcija

Mucini mogu da učestvuju u signalnoj transdukciji putem promene konformacije ili promene dostupnosti mesta vezivanja liganada, u njihovim ekstracelularnim domenima (Hollingsworth i Swanson, 2004). Pokazano je da, npr., ekstracelularni domeni MUC4 slični EGF-u, mogu interagovati sa ERBB2 (receptor epidermalnog faktora rasta 2, poznat još kao NEU i HER2) (**slika 6a**). Ovo vezivanje, kao i vezivanje citoplazmatske podjedinice MUC4 za ERBB2, povećava fosforilaciju ERBB2 i indukuje signale ćelijske diferencijacije preko KIP1 inhibitora ciklin-zavisne kinaze (poznatog i kao p27) (Jepson i sar., 2002). Interakcija MUC4-ERBB2, takođe, onemogućava interakciju ERBB2 sa ERBB3, koji signalizira ćelijsku proliferaciju zavisnu od MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) signalnih puteva (Zhu i sar., 2000). Aktivacija MUC1, fosforilacijom njegovog citoplazmatskog repa, takođe, dovodi do promena u MAPK signalizaciji (**slika 6b**). Pored toga, MUC1 može modulirati signalni put  $\beta$ -katenina (**slika 6c**), za koga se zna da reguliše nekoliko gena, koji se dovode u vezu sa proliferacijom i diferencijacijom ćelija. Nakon proteolitičkog isecanja citoplazmatskog repa MUC1, on se zajedno sa  $\beta$ -kateninom može transportovati u nukleus ćelije, i na taj način uticati na transkripciju proteina preko TCF/LEF i/ili drugih transkripcionih faktora. MUC1 može uticati na  $\beta$ -katenin signalni put



i zadržavanjem  $\beta$ -katenina u citosolu, što sprečava njegovu interakciju sa kadherinima ili drugim molekulskim kompleksima.



**Slika 6. Mucini u signalnoj transdukciji.**

(Preuzeto iz Hollingsworth i Swanson, *Nature Reviews Cancer* 2004)

**EGF**, epidermalni faktor rasta; **ERBB**, receptor epidermalnog faktora rasta (*ERBB* ili *EGFR - Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene*)

**KIP1**, inhibitor ciklin-zavisne kinaze. Nakon oštećenja DNK ili anti-mitogenih signala, KIP1 se vezuje za ciklin-zavisne komplekse kinaza, i inhibira njihovu funkciju, čime se zaustavlja ćelijski ciklus. Vezivanje MUC4 za ERBB2 povećava ekspresiju KIP1, što može dovesti do zaustavljanja ćelijskog rasta

**MAPK signalni put.** Mitogenom-aktiviran protein kinazni signalni put se sastoji od nekoliko kinaza, koje reaguju na brojne spoljašnje stimulse, kao što su faktori rasta, faktori diferencijacije i dr.

**TCF-LEF**, transkripcioni faktori

**$\beta$ -katenin** ima ključnu ulogu u prenosu morfogenetskih signala, i reaguje sa nekoliko kadherina (adhezionih molekula na površini membrane) kao i sa citoplazmatskim repom MUC1.

#### *1.1.1.5.2 Funkcija mucina u kanceru*

Ćelije kancera, naročito adenokarcinoma, imaju veoma povećanu ekspresiju aberantnih formi mucina. One nastaju tokom transformacije tumorskih ćelija, kao posledica deregulacije ekspresije proteinskih jezgara mucina, i/ili enzima koji ih modifikuju. Ekspresija različitih oligosaharidnih struktura na tumorskim ćelijama, zajedno sa raznovrsnom glikozilacijom proteinskih jezgara mucina, dovodi do izmenjene interakcije sa velikim brojem potencijalnih liganada (Hollingsworth i Swanson, 2004). Mucini doprinose biološkim osobinama tumora na nekoliko načina. Oni kontrolišu lokalnu mikrosredinu tumorskih ćelija, regulišu njihovu diferencijaciju i proliferaciju, utiču na inflamatorne procese i imunski odgovor, a učestvuju i u supresiji, i/ili invaziji i metastazi.

Ćelije kancera koriste mucine, na sličan način, kao što ih koriste i normalne epitelne ćelije: kao zaštitnu barijeru, ili za kontrolu lokalne molekularne mikrosredine. Mukusni slojevi tumorskih ćelija zadržavaju biološki aktivne molekule, kao što su faktori rasta ili citokini, što im omogućava proliferaciju. Aberantne forme transmembranskih mucina tumorskih ćelija, takođe, kontrolišu lokalnu mikrosredinu, tako što utiču na interakcije između ćelija ili između receptora i solubilnih liganada. Ekstracelularni domeni mucina mogu se, npr., vezati za proteine ili receptore na istoj ćeliji i tako blokirati pristup drugih liganada ovim molekulima. Ovakve autokrine interakcije se dešavaju između EGF domena mucina i ERBB, između oligosaharidnih struktura na tandemskim ponovcima i molekula sličnih lektinima na površini ćelije, i između proteinskih domena različitih mucina i drugih molekula. Na tandemskom ponovku MUC1, tako, postoji mesto koje vezuje ICAM-1, intracelularni adhezioni molekul-1 (član superfamilije imunoglobulinskih adhezioni

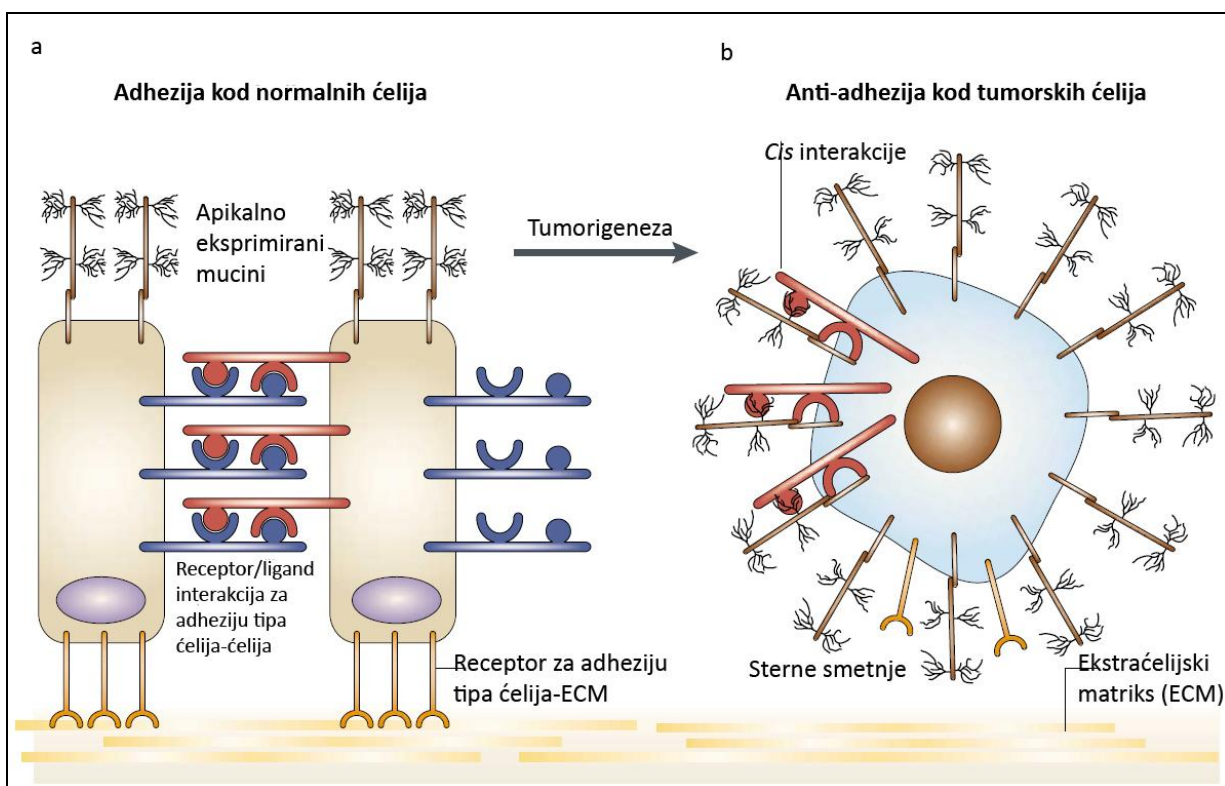
molekula, nađen kod epitelnih ćelija i pojedinih limfocita i monocita) (Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000; Hayashi i sar., 2001; McDermott i sar., 2001; Jepson i sar., 2002).

Značajno povećana produkcija aberantno glikozilovanog MUC1 je nađena kod nekoliko različitih tipova adenokarcinoma. Prve studije MUC1, pokazale su da je njegov citoplazmatski rep fosforilovan, i da promene u ovoj fosforilaciji korelišu sa razlikama u ćelijskoj adheziji (Zrihan-Lichti sar., 1994). Fragment citoplazmatskog repa MUC1 molekula, u asocijaciji sa  $\beta$ -kateninom, kao što je već pomenuto, može se transportovati u nukleus ćelija, što sugeriše da MUC1 može direktno uticati na status transkripcionih koaktivatora  $\beta$ -katenina.

Potencijalni uticaj mucina na supresiju nastanka i rasta tumora, pokazan je na primeru inaktivacije genskog produkta mišijeg Muc2 gena, koji se, uglavnom, eksprimira u crevima. Njegova inaktivacija dovodi do nastanka sojeva miševa, od kojih 65 % spontano razvija tumor tankog creva, kolona i rektuma (Velcich i sar., 2002).

Invazija i metastaza tumora obuhvata veliki broj procesa u kojima se ostvaruju kontakti između tumorskih ćelija koje vrše invaziju, i okolnih tumorskih ćelija i strome. Oni su omogućeni koordiniranom kontrolom ekspresije mucina, proteaza i drugih molekula. Mucini doprinose invaziji i metastazi, tako što konfiguriraju adhezivne i anti-adhezivne osobine tumorskih ćelija, a mogu modulirati i proteolitičku aktivnost. Transmembranski mucini, na apikalnoj površini normalnih epitelnih ćelija, omogućavaju adheziju između ćelija i između ćelija i ekstraćelijskog matriksa (ECM) (**slika 7a**). Kod tumorskih ćelija, aberantne forme mucina, nisu raspoređene samo na apikalnoj strani ćelija, već po njihovoj celoj površini (**slika 7b**). Ovim se, na dva načina, može blokirati adhezija tipa ćelija-ćelija i

ćelija-ECM. S jedne strane, *cis* interakcije između transmembranskih mucina i receptora koji posreduju u adheziji, mogu onemogućiti njihovu interakciju sa drugim ćelijama. S druge strane, transmembranski mucini mogu, sternim smetnjama, nespecifično blokirati adheziju preko njihovih velikih, glikozilovanih tandemskih ponovaka.



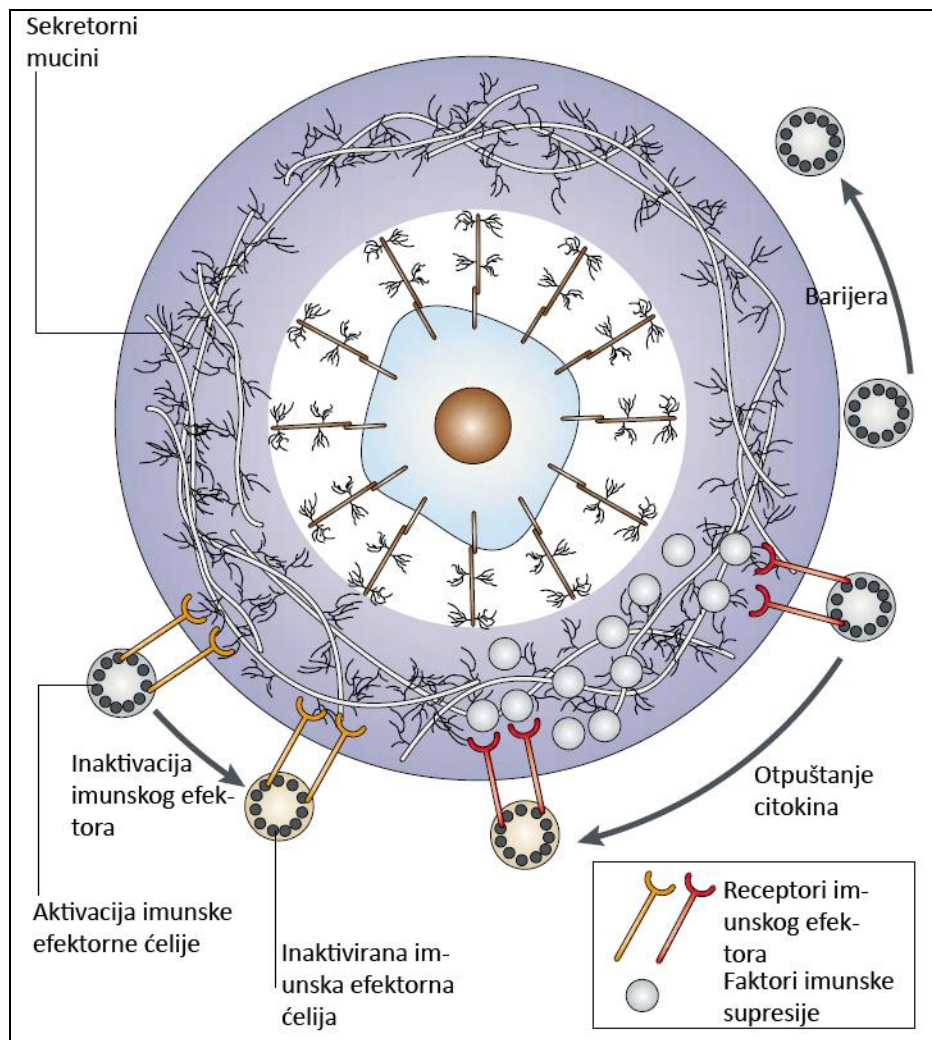
**Slika 7. Transmembranski mucini u interakcijama ćelija-ćelija i ćelija-ECM.**  
 (Preuzeto iz Hollingsworth i Swanson, *Nature Reviews Cancer* 2004)

Adhezivne, kao i anti-adhezivne osobine transmembranskih mucina su najbolje proučene na primeru MUC1. Pokazano je da glikozilovani tandemski ponovci MUC1, putem sternih smetnji doprinose njegovoj anti-adhezivnoj funkciji (Wesseling i sar., 1996). Ovo su potvrdili i nalazi da povećana ekspresija MUC1, smanjuje interakcije tipa ćelija-ćelija i

ćelija-ECM (Ligtenberg i sar., 1992; van de Wiel-van Kemenade i sar., 1995; Kondo i sar., 1998). MUC1 može učestvovati u adhezionim procesima i vezivanjem za ICAM-1, E-selektin i sigleke (*siglecs, sialic-acid-binding immunoglobulin like lectins*) (Zhang i sar., 1996; Nath i sar., 1999; Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000; McDermott i sar., 2001; Hayashi i sar., 2001).

Aberantne forme mucina, takođe, mogu učestvovati u inflamaciji i imunskom odgovoru. Pokazano je da MUC1 može da indukuje apoptozu aktiviranih T ćelija, kao i da ima imunosupresivni efekat na njihovu proliferaciju (Gimmi i sar., 1996; Agrawal i sar., 1998a). MUC1 eksprimiraju aktivirane T ćelije i dendritske ćelije, a pokazano je da pojedine populacije T ćelija Muc1-deficijentnih miševa, imaju defektan razvoj (Agrawal i sar., 1998b; Wykes i sar., 2002). Generalno, povećano koncentrisanje solubilnih mucina, na mestima oko tumora ili na metastatskim lezijama, može praviti barijeru (visoka koncentracija adhezionih liganda i supresornih citokina) za leukocite, i na taj način onemogućiti njihovu aktivaciju i prilaz tumoru (Chan i sar., 1999; Kim i sar., 1999; Cohen i sar., 2001).

Pored ovoga, visoke koncentracije solubilnih mucina u krvotoku, limfnom ili intestinalnom tkivu, mogu uticati na mobilnost i aktivaciju leukocita, u šta su uključene interakcije između selektina i oligosahardnih struktura mucina (**slika 8**) (Chan i sar., 1999; Kim i sar., 1999; Cohen i sar., 2001).



**Slika 8. Anti-imunski i anti-inflamatorni efekti mucina u kanceru.**  
 (Preuzeto iz Hollingsworth i Swanson, *Nature Reviews Cancer* 2004)

Na ovaj način, može se sprečiti prilaz antigen-prezentujućih ćelija, koje su neophodne za aktivaciju imunskog odgovora, ili efektornih ćelija (NK ćelija ili citotoksičnih T limfocita), koje su neophodne da unište tumorske ćelije, ciljnom tkivu (**slika 8**).

## **1.2. Bioinformatika**

### **1.2.1. Pojam i definicija**

Bioinformatika (engleski: *bioinformatics* ili *computational biology*) je oblast nauke koja proučava molekularnu biologiju pomoću statistike i kompjutera. Ona se bavi informatičkim osnovama, kao i beleženjem, organizacijom i analizom bioloških podataka. Prvobitno, bioinformatika se koristila u genomici i genetici, prvenstveno, za čuvanje i obradu rezultata sekvenciranja DNK, ali se danas koristi za mapiranje i analizu sekvenci DNK i proteina, za poređenje različitih sekvenci DNK i proteina, proučavanje njihove funkcije i interakcije, kao i za modeliranje i proučavanje 3-D strukture proteina. Simulacija i proračun bioloških eksperimenata i podataka se naziva i *in silico* (“pomoću kompjutera”) proračun.

Pojam bioinformatika su prvi put uveli Paulien Hogeweg i Ben Hesper 1978. godine istražujući procese u biološkim sistemima (Hogeweg, 1978; Hogeweg i Hesper, 1978).

### **1.2.2. Ciljevi bioinformatike**

Osnovni cilj bioinformatike je da omogući bolje razumevanje ćelije i njenog funkcionisanja na molekularskom nivou. Bioinformatika treba da organizuje podatke tako da istraživači mogu lako da dođu do postojećih informacija, kao i da objave nove podatke; da razvije nove metode i alatke koje pomažu u istraživanju i analizi podataka; kao i da omogući upotrebu ovih alatki za analiziranje podataka i interpretaciju rezultata na biološki značajan način.

### 1.2.3. Oblasti bioinformatike

Bioinformatika obuhvata tehnologije koje koriste kompjutere za čuvanje, nalaženje, manipulaciju i distribuciju informacija/podataka vezanih za biološke makromolekule (DNK, RNK, proteini) (Luscombe *i sar.*, 2001).

Da bi se ispitalo kako se normalna aktivnost ćelija menja u različitim fiziološkim stanjima, kao npr. kod bolesti, biološki podaci se moraju grupisati kako bi se dobila šira slika. Oblasti bioinformatike su se, stoga, razvijale, tako, da danas obuhvataju analizu i interpretaciju različitih podataka, uključujući nukleotidne i proteinske sekvence, proteinske domene i proteinske strukture. Glavne oblasti istraživanja u bioinformatici su: analiza sekvenci, anotacija genoma, „*computational*“ evolucionarna biologija, analiza genske ekspresije i regulacije, analiza proteinske ekspresije, analiza mutacija, komparativna genomika, modeliranje bioloških sistema, predviđanje funkcije i strukture proteina kao i molekularnih interakcija.

Važne poddiscipline bioinformatike obuhvataju razvoj i implementaciju alatki koje omogućavaju uspešno uvođenje različitih tipova informacija, njihovo korišćenje i klasifikaciju, kao i razvoj novih algoritama (matematičkih formula) i statistike sa kojima se može: a) pristupiti odnosima između članova u okviru niza podataka (npr. metode lociranja gena unutar sekvence); b) predvideti struktura i/ili funkcija proteina; c) vršiti grupisanje proteinskih sekvenci u familije srodnih sekvenci.



#### 1.2.4. Primena bioinformatike

Bioinformatika je našla široku primenu u osnovnim genomskim i molekularno-biološkim istraživanjima, u biomedicinskim istraživanjima, kao i u biotehnologiji, forenzici i poljoprivredi.

Bioinformatika ima značajnu primenu u analizama sekvenci. Od kako je, 1977. godine, sekvenciran fag  $\Phi$ -X174, sekvence DNK hiljade organizama su dekodirane i sačuvane u bazama podataka (Sanger i sar.,1977). Informacije o sekvencama su analizirane, kako bi se odredili geni koji kodiraju polipeptide (proteine), RNK geni, regulatorne sekvence, strukturni motivi i ponavljajuće (repetitivne) sekvence. Upoređivanje gena unutar vrste ili između vrsta, sada, može pokazati sličnosti u funkciji proteina, ili odnose između vrsta (korišćenjem molekularne sistematike za konstrukciju filogenetskih stabala). Sa porastom količine podataka, postalo je nepraktično analizirati DNK sekvence manuлно, tako da danas to rade kompjuterski programi kao što je npr. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sar., 1990), koji analizira sekvence, kako bi identifikovao one koje su srodne, ali ne i identične (*sequence alignment*). Jedna varijanta ovog poređenja sekvenci se koristi i za sam proces sekvenciranja (Fleischmann i sar., 1995). Bioinformatika se koristi i za anotaciju sekvenci koje se analiziraju, tako što postoje alatke koje traže gene koje kodiraju proteine, RNK gene i druge funkcionalne sekvence unutar genoma. U genomici, anotacija gena je proces pronalaženja gena i drugih funkcionalnih osobina unutar genoma.

U otkrivanju novih lekova, identifikaciji njihove strukture i moguće funkcije, bioinformatika je našla široku primenu. Na internetu danas postoji veliki broj dostupnih hemijskih podataka, kao što su registrovane hemijske strukture sa stereochemijom, podaci o

sintezama jedinjenja, spektralna analiza supstanci, uključujući i NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) analizu, određivanje čistoće supstanci, kao i određivanje fizičko-hemijskih osobina jedinjenja.

Bioinformatika u glikobiološkim istraživanjima se, koristeći klasične alatke, primenjuje u analizi sekvenci DNK i proteina koji su usko povezani sa ugljenim hidratima: enzima koji učestvuju u sintezi i modifikaciji oligosaharida, ili lektina koji prepoznaju pojedine šećerne epitope. Takođe, bioinformatika se koristi za opis procesa prepoznavanja ugljeni hidrat-protein na atomskom nivou, kao i za opis strukture glikana (Clus-Wilhelm i sar., 2009).

#### **1.2.5. Ograničenja bioinformatike**

Bioinformatika ima i veći broj ograničenja. Ona koristi baze podataka koje sadrže eksperimentalne rezultate, gde se često javljaju greške, kao što su npr. greške u sekvenciranju. Kvalitet predviđanja u bioinformatici (npr. strukture, funkcije i organizacije sekvenci DNK i proteina) zavisi od sofisticiranosti algoritama i kompjuterske tehnologije. Naime, vremenom, sa porastom količine dostupnih podataka, prilikom ispitivanja velikog broja sekvenci došlo je do potrebe uvođenja jednostavnijih algoritama, koji su manje tačni, ali daleko brže daju rezultate. Takođe, ne retko, sami programi i alatke sadrže greške što dodatno ograničava *in silico* istraživanja.

#### **1.2.6. Baze podataka**

Baza podataka (BP) je kompjuterizovana arhiva za čuvanje i organizovanje podataka, tako da se oni lako mogu naći traženjem po različitim kriterijumima. BP sadrže sva znanja iz

date oblasti, koja potiču od različitih izvora.

Glavne osobine BP su: a) većina njih (BP) se mogu naći na internetu tako da se lako mogu pretraživati i dostupni su širim masama; b) uobičajen način pretraživanja BP je pomoću ključnih reči; c) korisnici imaju mogućnost da biraju da li će dobijene podatke samo gledati ili sačuvati na kompjuteru; d) reference dodatno olakšavaju prelaz sa jednih BP na druge.

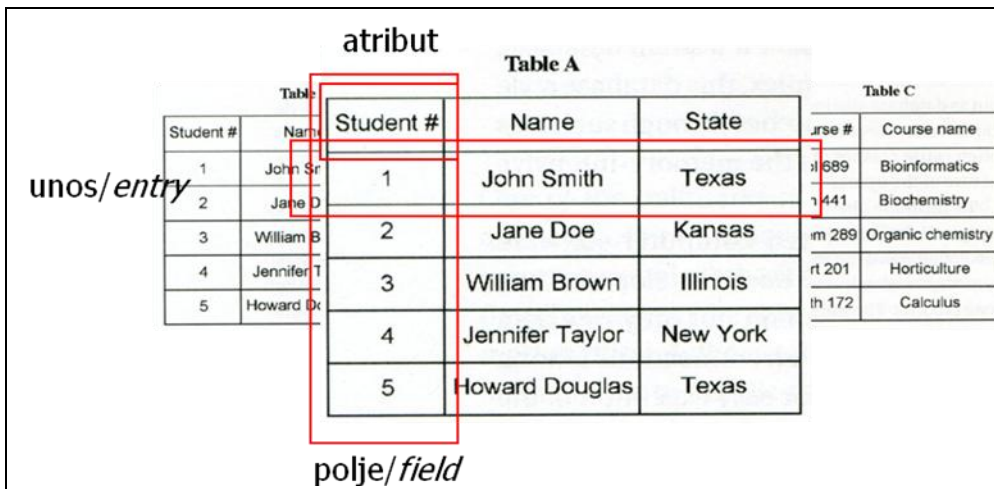
Osnovi pojmovi koji se koriste u bazama podataka su: zapis/unos (*entry*), koji sadrži određen broj polja (*fields*) sa podacima tj. vrednostima (*value*). Nalaženje određenog zapisa (u celosti) u bazi podataka, na osnovu dela informacije, tj. vrednosti određenog polja naziva se pretraživanje (*query*).

BP se prema strukturi podataka i menadžment sistemima, tj. prema načinu čuvanja podataka, dele na: *flat files/format* BP; relacijske BP; objekat-orijentisane BP. *Flat files/format* opisuje bazu podataka kao jedinstvenu datoteku (npr. kao .txt ili .ini; **slika 9**)



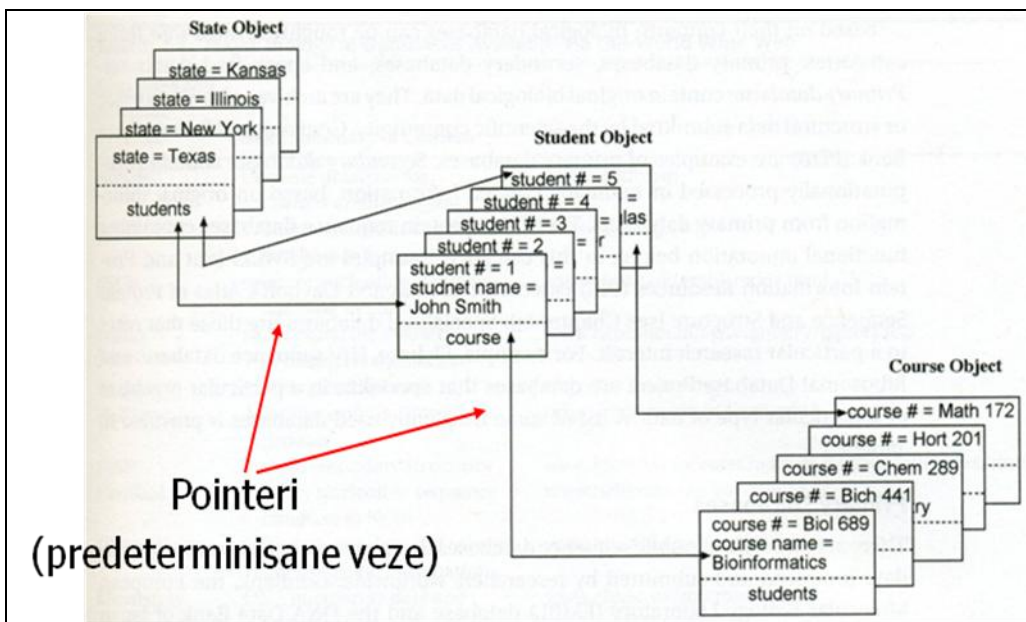
**Slika 9. Izgled BP u *flat files/format* obliku.**

Relacijske BP daju grupe podataka koje su organizovane, i za mnoge ljude lakše za razumevanje (**slika 10**).



Slika 10. Izgled relacijske BP.

Objekat-orientisane BP su slične relacijskim BP, ali sa modelom podataka, koji je orijentisan prema objektu, gde se klase i objekti vide kao shematski podaci (slika 11).



Slika 11. Izgled BP orijentisane prema objektu.

### ***1.2.6.1. Biološke baze podataka***

Biološke BP (BBP) su kolekcije informacija prirodnih nauka, sakupljenih od objavljene literature, naučnih eksperimenata, tehnoloških eksperimenata i bioinformatičkih analiza. One sadrže informacije iz istraživačkih oblasti genomike, genske ekspresije, proteomike, metabolomike i filogenetike (Altman, 2004). Dizajn, razvoj i stalno osvežavanje bioloških baza podataka predstavlja srž bioinformatike (Bourne, 2005). Informacije u BBP obuhvataju gensku funkciju, strukturu, lokalizaciju (i ćelijsku i hromozomsku), kliničke efekte mutacija, kao i sličnost između bioloških sekvenci i struktura. Biološki podaci u BBP se čuvaju u različitim formatima: u vidu tekstualnih podataka, u vidu sekvenci, proteinske strukture i linkova. Svaki od ovih formata se može naći kod pojedinih baza podataka, npr., formati u obliku teksta se nalaze u PubMed (*U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health*) i OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) bazama, podaci o DNK i proteinskim sekvencama kod GenBank i UniProt, a proteinske strukture kod PDB (*Protein Data Base*), SCOP (*Structural Classification of Proteins*) i CATH (*Protein Structure Classification*) bioloških baza podataka (Murzin i sar., 1995; Berman i sar., 2000; Orengo i sar., 2002).

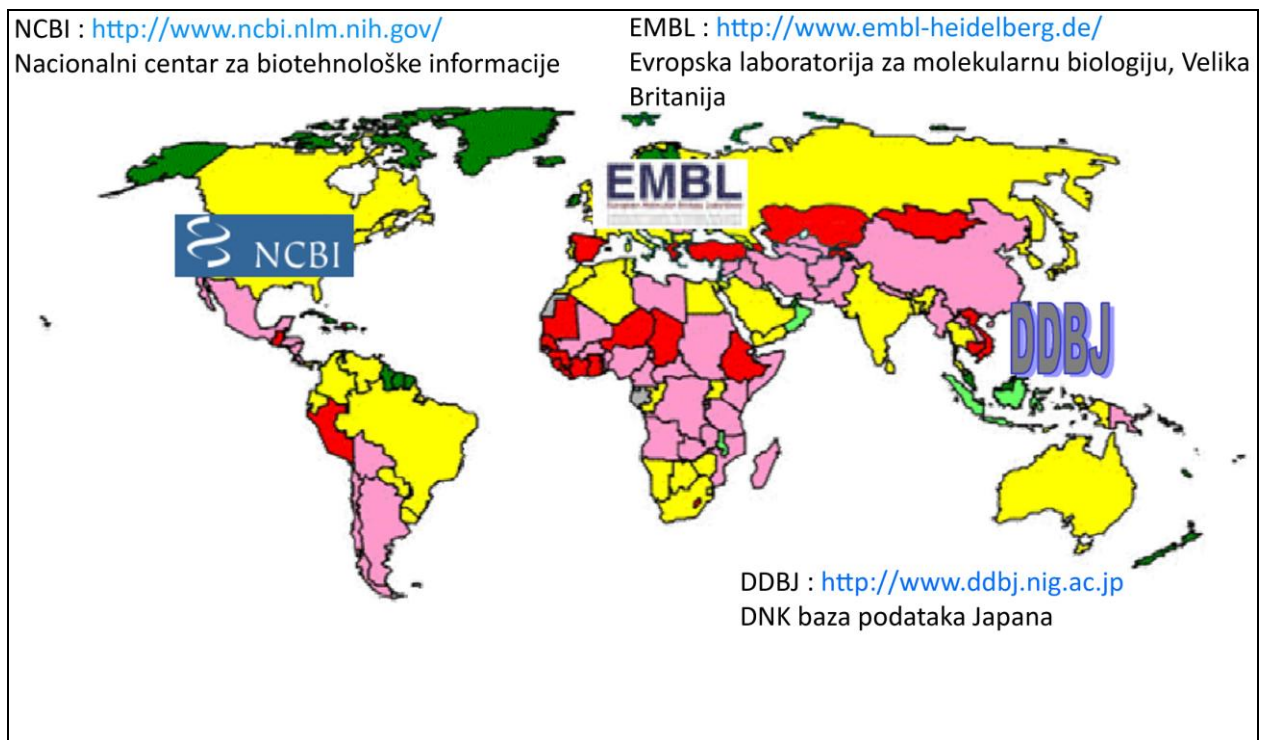
Glavni tipovi bioloških baza podataka prema informacijama koje sadrže prikazani su u **tabeli 1.**

**Tabela 1. Glavni tipovi bioloških baza podataka prema informacijama koje sadrže.**

Tipovi baza podataka (BP)	Informacije koje sadrže
Bibliografske BP	Literatura
Taksonomske BP	Klasifikacija
BP nukleinskih kiselina	DNK informacije
Genomske BP	Informacije o genskim nivoima
BP proteina	Informacije o proteinima
Familije proteina, domeni i funkcionalna mesta	Klasifikacija proteina i identifikacija domena
Enzimi/metabolički putevi	Metabolički putevi

Prema sadržaju BBP se dele na:

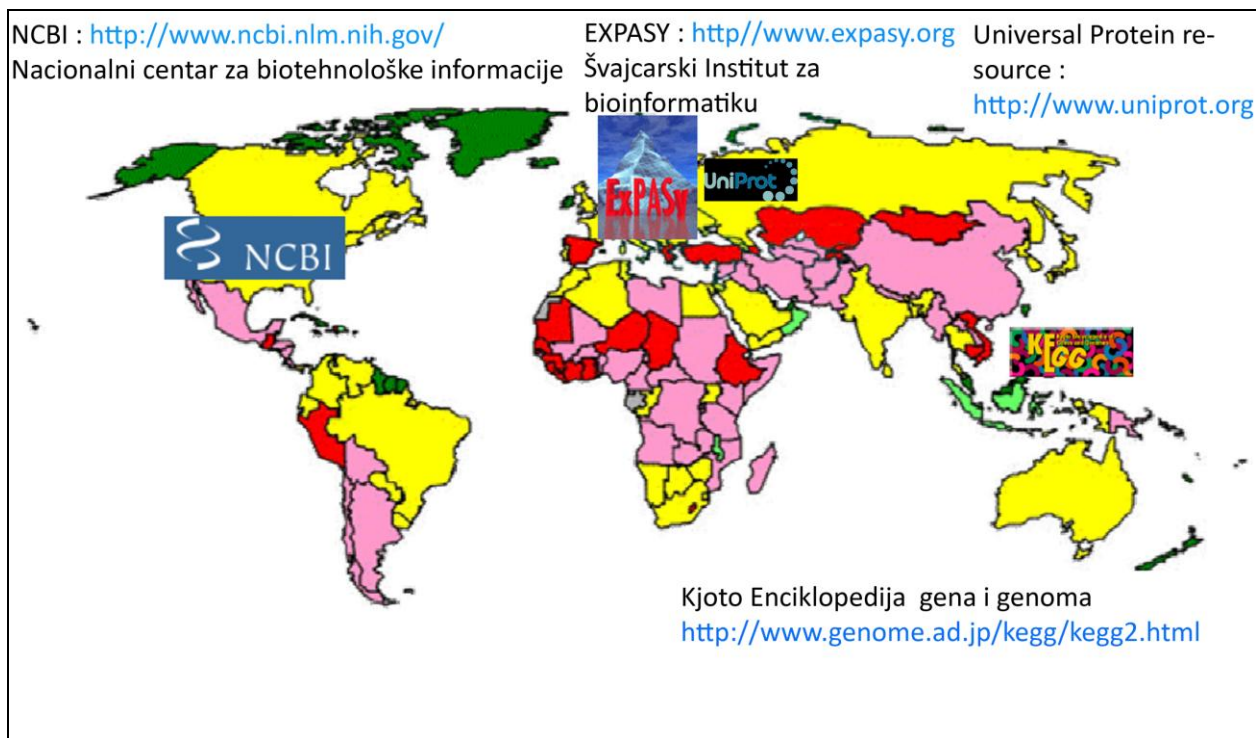
1. Primarne BP, predstavljaju arhive sekvenci i struktura, koje su eksperimentalno dobijene. Primarne BP sa neobrađenim (*raw*) sekvencama nukleinskih kiselina su GenBank, u sklopu NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) BP i DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) (**slika 12**). NCBI je osnovan 1988. godine, a bavi se istraživanjima na polju bioinformatike, razvija alatke za istraživanje genoma i upotpunjava i proširuje biomedicinska istraživanja, kako bi se bolje razumeli molekularni procesi u zdravlju i bolestima čoveka. Primarne BBP proteina su SWISS-Prot (sekvence iz TrEMBL BP - transkribovane nukleotidne sekvence deponovane u EMBL), PIR BP (*Protein Information Resources*), UniProt BP (koja se sastoji od SWISS-Prot+TrEMBL+PIR) (**slika 13**). Primarna BP sa 3-D strukturama bioloških makromolekula (i proteina i nukleinskih kiselina) je PDB (*Protein Data Bank*).



**Slika 12. Primarne baze podataka nukleinskih kiselina.**

Svaka BP prikuplja i obrađuje podatke o novim sekvencama i važne informacije naučnika iz odgovarajućeg geografskog regiona. Na primer, EMBL prikuplja podatke iz Evrope, GenBank iz Amerike. Ove baze podataka se automatski međusobno dopunjavaju sa novo prikupljenim sekvencama svaka 24 sata, tako da sadrže iste informacije. Ove tri baze podataka sarađuju od 1982. godine.

2. Sekundarne BP, poznate i kao baze podataka obrazaca, sadrže rezultate dalje analize podataka iz primarnih BP i tu spadaju: Prosite (*Database of protein domains, families and functional sites*), PRINTS (*Compendium of protein motif fingerprints*), Pfam (*Protein families database*), Blocks, DALI itd (Attwood i sar., 1994; Henikoff i sar., 1999; Finn i sar., 2010; Holm i sar., 2010).



**Slika 13. Baze podataka za analizu proteina i metaboličkih puteva kod različitih organizama.**

UniProt je sveobuhvatan izvor podataka za sekvence proteina i njihovu anotaciju. Uniprot baze podataka su UniProtKB (*UniProt Knowledgebase*), UniRef (*UniProt Reference Clusters*), i UniParc (*UniProt Archive*). UniProt je rezultat saradnje EBI (*European Bioinformatics Institute*), SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) i PIR (*Protein Information Resource*). Kjoto enciklopedija gena i genoma (KEGG) je integrisana baza podataka koja se sastoji od 16 BP koje su podeljene u odnosu na informacije o sistemima, informacije o genomima, i o hemijskim osobinama. Informacije o genomima i hemijskim osobinama, odnose se na molekularne gradivne jedinice živog sveta, a informacije o sistemima se odnose na funkcionalne aspekte bioloških sistema, kao što su ćelija i organizam, koje su izgrađene od gradivnih jedinica.

3. Specijalizovane BP sadrže podatke proistekle iz specifičnih istraživanja ili su fokusirane na određen organizam (mogu se preklapati sa primarnim BP), i tu spadaju: Flybase (*A Database of Drosophila Genes & Genomes*), baza podataka o sekvencama HIV virusa,



RDP (*Ribosomal Database Project*) (Tweedie i sar., 2009; <http://www.hiv.lanl.gov/>; Cole i sar., 2009).

Glavni nedostaci BBP su preveliko oslanjanje na sekvence, duplikacija informacija (NCBI-*National Center for Biotechnology Information* formirao *RefSeq* - sekundarnu BP) i pogrešne anotacije.

#### **1.2.6.2 Alatk u bioinformatici**

Bioinformatičke alatke su softverski programi koji služe za čuvanje i analizu bioloških podataka, iz kojih se, kasnije, mogu generisati biološka znanja. Ove alatke se grubo mogu grupisati u nekoliko kategorija: alatke za proučavanje homologije i sličnosti, alatke za analizu funkcije proteina, analizu strukture i analizu sekvence ([http://www.roseindia.net/bioinformatics/bioinformatics\\_tools.shtml](http://www.roseindia.net/bioinformatics/bioinformatics_tools.shtml)). Glavni izvori bioinformatičkih alatki su NCBI, EBI i ExPASy.

U okviru NCBI, može se naći veliki broj alatki, kao što su *Genbank*, i *Entrez gene*, za pretraživanje gena; *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)*, za dobijanje informacija o naslednim oboljenjima (odnos između genotipa i fenotipa); *RefSeq (Reference sequence collection)*, za pronalaženje sekvenci DNK, RNK i proteina; *BLAST (Basic Alignment Tool)*, za pronalaženje sličnih regiona između sekvenci; kao i *MMDB (The molecular modeling database)*, *PubVAST (Vector Alignment Search Tool)*, *PubChem* i *CDD (Conserved Domain Database)*, za analizu molekulske strukture i funkcije (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/tools/>).

EBI nudi veliki broj alatki za analizu sekvenci proteina i nukleinskih kiselina (*ENA search*, *BLAST*, *PSI-search*, *Ssearch genomes* i *Ssearch proteomes*), za višestruko poravnanje sekvenci (*ClustalW2*, *Clustal Omega*, *WEBPrank*, *T-Coffee*, *MUSCLE*), za analizu funkcije proteina (*InterProScan*, *Pratt*, *Phobius*, *Radar*), za funkcionalnu genomiku (*Gene Expression Atlas*, *EFO Tools*), za molekularnu strukturu (*PDBeFold*, *QuaternaryStructure*) i druge (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>).

ExPASy je SIB-ov portal za bioinformatičke resurse, preko koga se može naći ogroman broj alatki za analizu proteomike, genomike, filogenije, sistemske biologije, populacione genetike, transkriptomike i druge (<http://expasy.org/>).

## *2. CILJ*

CA125 antigen, poznat kao marker seroznog karcinoma ovarijuma, predstavlja ekstracelularni deo mucina 16 (MUC16), koji nastaje njegovom proteolitičkom degradacijom. Biološka uloga MUC16/CA125, još uvek nije razjašnjena. Dosadašnja ispitivanja funkcije MUC16 (membranska forma) su, uglavnom, bila bazirana na *in vitro* model sistemu ćelija ovarijalnog karcinoma, dok su literaturni podaci o aktivnosti CA125 antigena (solubilna forma) veoma retki. Solubilna forma predstavlja funkcionalni analog i kompetitor membranskoj formi i, u cirkulaciji, ona prva dospeva u kontakt sa različitim tipovima normalnih ili patološki izmenjenih ćelija, ali ne postoje eksperimentalni dokazi o mogućem uticaju na njihovu adhezivnost, kao i imunomodulatorna svojstva. S obzirom na izrazitu strukturnu heterogenost i polidomensku organizaciju MUC16/CA125, postoji potreba za interdisciplinarnom analizom njegove multifunkcionalnosti, koja će obuhvatiti interakcije posredovane specifičnim proteinskim i glikanskim domenima.

U ovom radu je ispitivana modularna organizacija MUC16/CA125 na bioinformatičkom i glikobiohemijskom nivou, sa ciljem da se bliže definišu biološki kapacitet i posebnosti prezentacije ovog molekula u kontekstu interaktoma čoveka. Bioinformatička analiza, kao deo strategije za otkrivanje moguće biološke uloge MUC16/CA125, do sada nije korišćena u ispitivanjima ovog antigena. Pored toga, u kontekstu diskretnih bioloških funkcija, bez obzira na izuzetan biomedicinski značaj, ne postoje eksperimentalni podaci o interakcijama MUC16/CA125 sa specifičnim klasama receptora na ćelijama krvnog sistema.

Radi postizanja zadatih ciljeva, neposredni zadaci ovog rada su podeljeni u dve celine. Prva od njih se odnosila na *in silico* analizu modularne organizacije CA125/MUC16, na osnovu podataka o ovom molekulu koji su preuzeti sa *UniProtKB* baze podataka (pristupni broj

Q8WXI7). Određivana je homologija i prisustvo obrazaca, strukturnih motiva i konzerviranih domena, a vršena je i predikcija funkcije na osnovu zadate aminokiselinske sekvence. U tu svrhu, korišćene su BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) alatke i različite baze podataka kao što su *Gene Ontology* i *Bgee*.

Druga celina se odnosi na glikobiohemijsku analizu koja je obuhvatila ispitivanje uticaja CA125 antigena na adhezivnost i agregabilnost eritrocita, kao i moguće interakcije sa različitim tipovima leukocitnih lektina tj. sigleka (*Siglec - sialic acid-binding immunoglobulin (Ig)-like lectin*) i receptora sličnih lektinima tipa C (selektini, DC-SIGN - *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*, MMR - *macrophage mannose receptor*). Glikobiohemijskom analizom su, pored antigena iz ćelijske linije ovarijalnog karcinoma čoveka (clCA125), bili obuhvaćeni i antigen kancerskog porekla iz pleuralne tečnosti (pfCA125) kao i antigen fetalnog porekla (pCA125), koji se sintetiše tokom trudnoće.

### *3. MATERIJALI I METODE*

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Reagensi

#### **Antitela:**

Mišija monoklonska antitela na humani CA125 antigen, klonovi X-306 i X-325, klasa IgG1, afinitivno prečišćena (*Hy Test, PharmaCity, Turku, Finland*)

Kozija biotinizovana antitela na mišiji IgG (H+L) i na mišiji IgM (specifična za mu lanac), afinitivno prečišćena (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

Mišija monoklonska antitela na humane Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>y</sup> i sialil-Lewis<sup>x</sup> antigene, klasa IgM, (*Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany*)

Mišije monoklonsko antitelo na humani hCG, klon 5008-SP-5, klasa IgG1 (*Medix Biochemica, Kauniainen, Finland*)

#### **Antigeni:**

CA125 antigen, A32303H, (*calibrator grade*) iz pleuralne tečnosti čoveka (*Biodesign, Meridian Life Science, Inc., Saco, ME, USA*)

CA125 antigen, A97180H, (*antigen grade*) iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka (*Biodesign, Meridian Life Science, Inc., Saco, ME, USA*)

#### **Biotinizovani biljni lektini:**

LTL (*Lotus tetragonolobus lectin*), SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) i MAA II (*Maackia amurensis agglutinin II*) (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

#### **Rekombinantni lektini:**

Rekombinantni humani manozni receptor makrofaga (*MMR-macrophage mannose receptor*) (CD206), (*R&D Systems, Inc, Minneapolis, Minnesota, USA*)

**Rekombinantni humani molekuli tipa Fc himera:**

DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*) (CD209)/Fc himera, E-selektin (CD62E)/Fc himera, L-selektin (CD62L)/Fc himera, P-selektin (CD62P)/Fc himera, siglec-2 (CD22 $\beta$ )/Fc himera, siglec-3 (CD33)/Fc himera, siglec-6/Fc himera, siglec-7/Fc himera, siglec-9/Fc himera, siglec-10/Fc himera, (*R&D Systems, Inc, Minneapolis, Minnesota, USA*)

**Kompleti reagenasa:**

Elite Vectastain ABC komplet (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

DAB (3,3'-diaminobenzidin) supstrat-komplet (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

**Kompleti za kvantitaciju:**

ELSA CA125 II komplet (*Cis-bio international-Schering, Germany*)

Epstein-Barr Virus (EBV) VCA IgG komplet (*Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany*)

Herpes simplex virus tipa 1 (HSV1) IgG komplet (*Human GmbH, Wiesbaden, Germany*)

**Čvrsta faza:**

Immobilon-PVDF (poliviniliden fluorid) membrana (*Millipore, Bedford, USA*)

Polistirenske ploče MaxiSorp sa 96 bunarića sa zvezdastim dnom (*Nunc, Roskilde, Denmark*)

Polistirenske ploče sa 96 bunarića (*COSTAR, Corning International, New York, USA*)

**Hromatografski medijumi:**

Sefadeks G-75 (*Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden*)

Sefaroza 4B (*Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*)



## **Hemikalije:**

EDTA (natrijumova so etilendiaminotetrasirćetne kiseline) (*Reanal, Budapest, Hungary*)

Glukoza (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)

Goveđi serumski albumin (*bovine serum albumin, BSA*) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)

Heparin (*ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, USA*)

Heparan-sulfat (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)

Manan (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)

Natrijum dodecil sulfat (SDS) (*Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden*)

Natrijum perjodat (*ICN Biomedicals, Cleveland, USA*)

Polietilenglikol, PEG (*Sigma, St. Louis, USA*)

Poli-L-lizin (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*)

Protein A-HRPO konjugat (INEP, Beograd, Srbija)

Radioaktivni izotop joda ( $^{125}\text{I}$ ) (*Institute of isotope Co, Ltd, Budapest, Hungary*)

3,3',5,5' - tetrametilbenzidin (TMB) (*HUMAN GmbH, Wiesbaden, Germany*)

TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) (*ICN - Biomedicals, inc., Aurora, Ohio, USA*)

Sve ostale hemikalije su bile čistoće p.a.

### **3.1.2. Uzorci biološkog materijala**

#### **3.1.2.1 Uzorci placenti prvog trimestra**

Uzorci placenti prvog trimestra, korišćeni u ovom radu, su pribavljeni u skladu sa protokolom za naučno-stručnu saradnju između Instituta za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije i Instituta za primenu nuklearne energije - INEP. Placente su

prikupljene od pacijentkinja koje su se dobrovoljno podvrgle prekidu trudnoće, a starost tkiva je procenjena na 6-12 nedelja, prema datumu poslednje menstruacije. Placente su donete u laboratoriju u hladnom 0.1M fosfatnom puferu pH 7,2 koji sadrži 0,9 % NaCl (PBS) i isprane od krvi i kontaminirajućeg tkiva: decidue i placentnog ležišta.

Pul tkiva placenti prvog trimestra je homogenizovan u 0.1M PBS-u, pH 7,2, homogenizerom Silverstone machines Ltd. (Buckinghamshire, England). Citosolna frakcija je odvojena centrifugiranjem na ultracentrifugi Beckman L8-60M (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA), jedan sat na 36000 rpm. Dobijeni ekstrakt je do upotrebe čuvan na -20°C.

#### **3.1.2.2. Eritrociti**

Ispitivanja su vršena na uzorcima krvi uzetih od zdravih dobrovoljaca sa različitim krvnim grupama, u skladu sa lokalnim standardima i procedurama za rukovanje uzorcima biološkog materijala. Krv je sakupljena u kivete koje sadrže EDTA, a eritrociti su izolovani centrifugiranjem (10 minuta na 2000 rpm) i ispirani tri puta fiziološkim rastvorom. Čelije su izbrojane pomoću Mythic 18 analizatora krvi (CZ diagnostic, France).

### **3.2. Metode**

#### **3.2.1. *In silico* analiza**

Za *in silico* („pomoću kompjutera“) istraživanja, korišćeni su podaci dostupni za humani mucin 16 (MUC16) (*Ovarian cancer-related tumor marker CA125*), pristupni broj IPI00103552 (IPI, *The International Protein Index*), pristupni broj NP\_078966.2 (NCBI

RefSeq, *National Center for Biotechnology Information Reference Sequence*) i pristupni broj Q8WXI7 (*UniProtKB, The Universal Protein knowledgebase*).

Proteinska sekvenca MUC16, preuzeta iz UniProtKB baze podataka (<http://www.uniprot.org>) u FASTA formatu (FAST AYE, FAST ALL, format nukleinskih ili proteinskih sekvenci u obliku teksta, gde su nukleinske kiseline/aminokiseline prikazane kodovima u vidu pojedinačnih slova), je analizirana korišćenjem većeg broja odgovarajućih servera na internetu (<http://www.expasy.org/>). Ovi serveri koriste različite algoritme i metode upoređivanja za analizu sličnosti proteinskih sekvenci i strukturnih motiva.

### **3.2.1.1. Ispitivanje homologije proteinske sekvence**

Za ispitivanje homologije MUC16 sa proteinima koji su deponovani u nr (*non-redundant*) proteinskoj bazi podataka NCBI koja obuhvata GenBank, UniProt, RefSeq, PRF (*Protein Research Foundation*) i PDBSTR (*Protein Data Base Stripped*) korišćene su *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) alatke: *ClustalW2 v1.83* program (*Multiple Sequence Alignment Program*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) i *BLASTP 2.2.20* program (<http://blast.genome.jp/>) (Altschul i sar., 1990; Chenna i sar., 2003). Pretraživanje je vršeno u bazama podataka za sledeće taksonomske kategorije: čovek, virusi, bakterije, gljive i eukariota. Kandidati sa najvećom ocenom su rangirani pod različitim setovima relevantnih parametara (*threshold, matrix, filtering, gapped sequence*).

### **3.2.1.2. Ispitivanje modularne organizacije MUC16**

Za ispitivanje modularne organizacije MUC16 – obrazaca, strukturnih motiva i konzerviranih domena korišćene su različite web alatke koje su povezane sa *Bgee: a dataBase for Gene Expression Evolution* (<http://bgee.unil.ch/bgee/bgee>) i *Gene Ontology*

(GO, <http://www.geneontology.org/>) (Ashburner i sar., 2000; Bastian i sar., 2008). Bgee je baza podataka za pretraživanje i poređenje obrazaca genske ekspresije između animalnih vrsta. GO baza podataka sadrži opise genskih produkata u smislu njihove povezanosti sa biološkim procesima, ćelijskim komponentama i molekulskim funkcijama, bez obzira na biološku vrstu. Konzervirani domeni su funkcionalne jedinice u okviru proteina koje deluju kao gradivni blokovi tokom molekulske evolucije i rekombinuju se u različitim aranžmanima da bi se formirali proteini sa različitim funkcijama. *CDD (Conserved Domain database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), povezuje nekoliko zbirki višestruko poravnatih sekvenci (*multiple sequence alignment*) koje predstavljaju konzervirane domene (Marchler-Bauer i sar., 2004; 2009; 2011). *ELM Server (Eukaryotic Linear Motif*, <http://elm.eu.org/>), je alatka za predviđanje funkcionalnih mesta u eukariotskim proteinima (Puntervol i sar., 2003). Blokovi su višestruko poravnati segmenti (bez gap-ova) koji odgovaraju visoko konzerviranim regionima proteina, a oni su pretraživani pomoću *BLOCKS* ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks\\_search.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks_search.html); <http://motif.genome.jp/>) (Henikoff i Henikoff, 1994). *InterProScan* je alatka koja sumira baze podataka o proteinskim domenima i funkcionalnim mestima (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) (Apweiler i sar., 2001). Ona integriše sledeće baze podataka: Prosite obrasci (biološki značajni obrasci aminokiselina, <http://expasy.org/tools/scanprosite/>) i Prosite profili (familije i strukturni domeni sa ekstremnom divergencijom sekvenci), Pfam (baza podataka familija proteinskih domena), SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, identifikacija i anotacija genetički mobilnih domena i analiza arhitekture domena), PIR superfamilije (*Protein Information*

*Resource*, klasifikacioni sistem koji se bazira na evolutivnim odnosima svih proteina), SUPERFAMILY (baza podataka koja sadrži sve poznate proteinske structure), Gene3D (baza podataka proteinskih sekvenci koja sadrži proteine iz kompletnih genoma koji su grupisani u proteinske familije i kojima su dodeljeni CATH domeni, Pfam domeni i funkcionalne informacije iz KEGG, GO, COG, Affymetrix i STRINGS), PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*; klasifikacioni sistem dizajniran da klasifikuje proteine i njihove gene) i HAMAP (*High-quality Automated and Manual Annotation of microbial Proteomes*, baza podataka koja se koristi za identifikaciju proteinskih familija iz bakterija i *Archaeobacteria*). *MyHits* (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index>) je baza podataka proteinskih domena koja služi za ispitivanje odnosa između proteinske sekvence i pripadajućih motiva (Pagni i sar., 2007). *iProClass database* (<http://pir.georgetown.edu/iproclass/>) je baza podataka koja sumira podatke iz 90 izvora a koji se odnose na familije proteina, funkcije i puteve, interakcije, strukture i strukturne klasifikacije, gene i genome i taksonomiju (Wu i sar., 2001).

### ***3.2.1.3. Ispitivanje fizičko-hemijskih osobina, globularnosti i odstupanja od pretpostavljene tercijarne strukture***

Fizičko-hemijske osobine proteina MUC16 (zastupljenost pojedinih aminokiselina, poluživot molekula, indeks nestabilnosti, GRAVY indeks - koji govori o solubilnosti proteina, indeks alifatičnosti i hidrofobnost) određivane su pomoću *ProtParam* (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) i *ProtScale alatki*, (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) (Gasteiger i sar., 2005).

*GLOBPLOT v2.3* (<http://globplot.embl.de/>) alatka bazirana na Russell/Linding-ovim vrednostima omogućava ispitivanje proteina u smislu identifikacije uređenih/globularnih

regiona, kao i regione koji odstupaju od pretpostavljene tercijarne strukture (*Intrinsic disorder of proteins*) (Linding i sar., 2003). “Neuređeni” regioni često sadrže kratke linearne peptidne motive koji su značajni za proteinsku funkciju, a koji su deponovani u ELM bazi podataka.

#### **3.2.1.4. Predikcija funkcije MUC16**

Predviđanje funkcije MUC16 vršeno je pomoću alatki koje koriste nekoliko programa za predviđanje funkcije proteina na osnovu zadate aminokiselinske sekvence: *JAJA* metaserver (*Joined Assembly of Function Annotations*; <http://jafa.burnham.org/>); *ProtFun 2.2 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>, Jensen i sar., 2002; 2003); *PFP* (*Automated Protein Function Prediction*; <http://dragon.bio.purdue.edu/pfp>; Hawkins i sar., 2006) i *GeneOntology* (*GO*) domeni i termini.

### **3.2.2. Glikobiohemijska analiza**

#### **3.2.2.1. Gel filtracija ekstrakta placente na koloni Sefaroza 4B**

Gel filtracija ekstrakta placenti prvog trimestra je vršena na koloni Sefaroza 4B (36mL). Kolona je uravnotežena i eluirana 0,05 M PBS-om, pH 7,2. Za kalibraciju su korišćeni interni standardi molekulskih masa: BSA (66kDa) i tireoglobulin (660kDa). Na kolonu je nanet 1 mL uzorka, a sakupljene su frakcije zapremine 1 mL. Optička gustina (*optical density*, OD) svake frakcije je izmerena na spektrofotometru CE594 CECIL (Cambridge, England), na talasnim dužinama 280 nm i 260 nm. Paralelno je vršena imunoradiometrijska detekcija CA125 antigena u svakoj frakciji. Frakcije u kojima je detektovan CA125 antigen

su spojene, koncentrovane u PEG-u i dijalizovane 18 sati prema 0,05 M PBS-u, pH 7,2. Uzorci su alikvotirani i čuvani na -20°C do upotrebe.

### **3.2.2.2. Test agregacije eritrocita**

Ispitivanje agregacije eritrocita je vršeno prema metodi Ueda i Takeichi, sa malim modifikacijama (Ueda i Takeichi, 1976; Takeichi, 1977). Na mikroskopske pločice je naneta 0.1 % suspenzija eritrocita ( $1 \times 10^5$  ćelija/25  $\mu$ L), u kapima, a zatim su dodati odgovarajući CA125 antigeni (25  $\mu$ L) u koncentracijskom opsegu od 500 do 20000 IU/mL. Kao referentna kontrola, korišćena je suspenzija ćelija bez dodatih CA125 antigena. Ćelije su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom (Reichert-Jung sa Leica DC150 Digital Camera System, Wetzlar, Germany) u vremenskim intervalima u toku 30 minuta, od strane dva nezavisna posmatrača. Reprezentativna polja su uslikana pomoću fotoaparata Canon s50.

### **3.2.2.3. Test adhezije eritrocita**

Test adhezije eritrocita je rađen prema metodi Tas-a, sa malim modifikacijama (Tas i sar., 1999). Za ovaj test je korišćena 10 % suspenzija eritrocita u 8 mM TRIS-HCl, pH 7,4 koji sadrži 0.1 M NaCl, 0,14 M glukozu, 0,45 mM CaCl<sub>2</sub> i 0,17 mM MgCl<sub>2</sub> (adhezioni pufer). Eritrociti su naneti na staklene pločice ( $1 \times 10^7$  ćelija/25  $\mu$ L/kapi) ili dodati u polistirenske ploče ( $1 \times 10^7$  ćelija/25  $\mu$ L/bunariću) koje su prethodno obložene 0.1 % poli-L-lizinom i blokirane 1 % BSA. Inkubacija je vršena 60 minuta, na sobnoj temperaturi, u prisustvu odgovarajućeg CA125 antigena (50-20000 IU/mL; 12,5  $\mu$ L). Ćelijska suspenzija bez dodatih CA125 antigena je korišćena kao referentna kontrola. Neadherirani eritrociti su uklonjeni nežnim ispiranjem, četiri puta, sa po 200  $\mu$ L adhezionog pufera. Ćelije adherirane

na staklene pločice su posmatrane svetlosnim mikroskopom, na uvećanju 20x i 40x i reprezentativna polja su uslikana. Čelije koje su adherirale na ploče su lizirane destilovanom vodom (50 µL/bunariću). Kao mera ukupnog broja adheriranih ćelija, merena je absorbanca na 405 nm, koristeći čitač ploča 5060-006 (LKB, Austria). Test adhezije u pločama je rađen u duplikatu i izračunata je srednja vrednost +/- SD za tri nezavisno urađena eksperimenta sa različitim serijama uzoraka eritrocita. Rezultati su prikazani kao procenat referentnog uzorka (arbitrarno 100 %).

#### **3.2.2.4. Test hemolize**

Test hemolize je urađen prema metodi Timoshenko-a (Timoshenko i sar., 2003). 1 % suspenzija humanih eritrocita ( $5 \times 10^6$  ćelija/50µL/bunariću) je inkubirana sa 125 µM SDS (225 µL/bunariću) i sa ili bez dodatog odgovarajućeg CA125 antigena (500-2000 IU/mL; 25 µL), 3 sata, na 25°C, uz konstantno mućkanje. Absorbanca na 670 nm je merena u intervalima od 15 minuta.

#### **3.2.2.5. Testovi vezivanja na čvrstoj fazi**

##### *3.2.2.5.1. Vezivanje biljnih lektina za imobilisane CA125 antigene*

##### 3.2.2.5.1.1. Vezivanje SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) i MAA II (*Maackia amurensis agglutinin II*)

Serijska razblaženja CA125 antigena (50 µL/bunariću; 7-500 IU/mL) u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, su adsorbovana na polistirensku ploču, fizičkom adsorpcijom, 18 sati, na +4°C. Neadsorbovani antigeni su uklonjeni aspiriranjem i ispiranjem, tri puta sa 0,3 mL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Slobodna mesta su blokirana 0,5 % BSA u 0,05 M PBS, pH 7,2 (200 µL/bunariću), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, sadržaj je



aspiriran, a ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. U bunariće su dodati biotinizirani lektini: SNA ili MAA II (50 µL/bunariću, 2,5 µg/mL). Nakon inkubacije od dva sata, na sobnoj temperaturi, nevezani biotinizirani lektini su uklonjeni aspiriranjem i ispiranjem tri puta sa 0,3 mL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Dodat je *Vectastain Elite ABC* reagens, koji je posle 30 min inkubacije aspiriran i ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. Dodat je rastvor TMB/substrat, i nakon inkubacije od 10 min, i ispiranja, reakcija je stopirana sa 0,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Izmerena je absorbanca sadržaja svakog bunarića na 450 nm, na Wallac 1420 Multilabel brojaču (Perkin Elmer, Monza, Italy). Nespecifično vezivanje (NSB) je određeno kao vezivanje SNA i MAA II za kontrolne bunariće, na koje nije adsorbovan CA125 antigen.

#### 3.2.2.5.1.1.1. Perjodatni tretman

Imobilisani CA125 antigeni (500 IU/mL) su podvrgnuti blagom perjodatnom tretmanu (Bock i Kelm, 2006). Pre blokiranja, oni su oksidovani 30 min, sa 2 mM NaIO<sub>4</sub> (150 µL/bunariću). Reakcija je stopirana 8 % glicerolom (20 µL/bunariću). Nakon aspiriranja i jednog ispiranja 0,05 M PBS, pH 7,2, antigeni su inkubirani 30 min sa 20 mM NaBH<sub>4</sub> (150 µL/bunariću). Nakon ispiranja, vezivanje biljnih lektina za tretirane imobilisane CA125 antigene je rađeno po gore opisanoj proceduri za netretirane antigene.

#### 3.2.2.5.1.2. Vezivanje LTL (*Lotus tetragonolobus* lektin)

CA125 antigeni (50 µL/bunariću), u serijskim razblaženjima (15-1000 IU/mL), u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, su adsorbovani na polistirensku ploču, fizičkom adsorpcijom, 18 sati, na +4°C. Višak proteina je uklonjen aspiriranjem i ispiranjem tri puta sa 300 µL TSM-a, pH 7,4. Slobodna mesta su blokirana 1 % BSA u TSM puferu, pH 7,4 (200

μL/bunariću), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, sadržaj je aspiriran, a ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. U bunariće je dodat biotinizirani LTL (50 μL/bunariću, 0.07 μg/mL). Nakon inkubacije od jednog sata, na sobnoj temperaturi, nevezani biotinizirani LTL je uklonjen aspiriranjem i ispiranjem tri puta sa 300 μL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Dodati je *Vectastain Elite ABC* reagens, koji je posle 30 min inkubacije aspiriran i ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. Dodata je smeša TMB/supstrat, i nakon inkubacije od 10 minuta, i ispiranja, reakcija je stopirana 0,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Izmerena je absorbanca 450 nm, na Wallac 1420 Multilabel brojaču (Perkin Elmer, Monza, Italy). Nespecifično vezivanje (NSB) je određeno kao vezivanje LTL za kontrolne bunariće, na koje nisu adsorbovani CA125 antigeni.

#### *3.2.2.5.2. Vezivanje rekombinantnih molekula tipa Fc himera za imobilisane CA125 antigene*

##### *3.2.2.5.2.1. Vezivanje rekombinantnih humanih sigleka*

Vezivanje siglek/Fc himera za CA125 antigene, rađeno je prema metodi Bock i Kelm-a, sa malim modifikacijama (Bock i Kelm, 1996). Serijska razblaženja CA125 antigena (50 μL/bunariću), u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, su adsorbovana na polistirensku ploču, 18 sati, na +4°C. Višak proteina je uklonjen aspiriranjem i ispiranjem tri puta sa 0,3 mL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Slobodna mesta su blokirana 0,5 % BSA u 0,05 M PBS, pH 7,2 (200 μL/bunariću), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, sadržaj je aspiriran, a ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. U bunariće je dodato po 50 μL odgovarajućih siglek/Fc himera (2,5 μg/mL) i oni su inkubirani dva sata, na sobnoj temperaturi. Nevezani sigleci su aspirirani i ploča je isprana tri puta. U svaki bunarić je dodato po 50 μL protein

A-HRPO konjugata (0,3 µg/mL). Nakon inkubacije od dva sata i ispiranja, dodat je rastvor TMB/supstrata. Posle 10 min, reakcija je stopirana 0,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i izmerena je absorbanca sadržaja svakog bunarića na 450 nm, na Wallac 1420 Multilabel brojaču. NSB je određeno kao vezivanje sigleka za kontrolne bunariće, bez imobilisanog CA125 antigena.

CA125 antigeni su, paralelno, tretirani perjodatom (kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.5.1.1.1.), i vezivanje sigleka je analizirano na isti način, kao i nativni, netretirani antigeni.

#### 3.2.2.5.2.2. Vezivanje rekombinantnih humanih selektina i DC-SIGN

Serijska razblaženja CA125 antigena (50 µL/bunariću; 4-500 IU/mL) u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, su adsorbovana na polistirensku ploču, fizičkom adsorpcijom, 18 sati, na +4°C. Neadsorbovani antigeni su uklonjeni aspiriranjem i ispiranjem, tri puta sa 300 µL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Slobodna mesta su blokirana 1 % BSA u 0,05 M PBS, pH 7,2, (200 µL/bunariću), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, sadržaj je aspiriran, a ploča je isprana tri puta, sa 20 mM Tris-HCl puferom, pH 7,4, koji sadrži 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> i 2 mM MgCl<sub>2</sub> (TSM pufer). U bunariće su dodati odgovarajući selektini (L-selektin/Fc himera, E-selektin/Fc himera - 5 µg/mL, P-selektin/Fc himera - 0,3 µg/mL), ili DC-SIGN/Fc himera - 5 µg/mL, svi 50 µL/bunariću, rastvoreni u TSM puferu. Nakon inkubacije od tri sata, na sobnoj temperaturi, nevezani lektini su uklonjeni aspiriranjem i ispiranjem tri puta sa 300 µL TSM-a, pH 7,4. U svaki bunarić je dodato po 50 µL protein A-HRPO konjugata (0,3 µg/mL). Nakon dva sata, bunarići su isprani tri puta, sa 0,05 M PBS, pH 7,2 i dodata je smeša TMB/supstrat. Posle 20 minuta, reakcija je stopirana 0,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Izmerena je absorbanca na 450 nm, na Wallac 1420 Multilabel

brojaču (Perkin Elmer, Monza, Italy). Nespecifično vezivanje (NSB) je određeno kao vezivanje lektina za kontrolne bunariće, na koje nisu adsorbovani CA125 antigeni.

#### 3.2.2.5.2.2.1. Inhibicija vezivanja selektina i DC-SIGN

Specifičnost i priroda vezivanja selektina i DC-SIGN za CA125 antigene je analizirana u testu inhibicije. Imobilisani CA125 antigeni (500, 250, 31 IU/mL) su inkubirani sa DC-SIGN, L-selektinom, E-selektinom (50  $\mu$ L/bunariću, 5  $\mu$ g/mL) i P-selektinom (50  $\mu$ L/bunariću, 0.3  $\mu$ g/mL), u prisustvu odgovarajućih inhibitora: manana (50  $\mu$ g/mL), 10 mM EDTA, heparan-sulfata (100  $\mu$ g/mL) ili heparina (1 mg/mL), tri sata, na sobnoj temperaturi. Dalji postupak, koji je uključivao inkubaciju, ispiranja i detekciju vezanih lektina, rađen je po gore opisanoj proceduri (3.2.2.5.2.2.).

#### *3.2.2.5.3. Vezivanje rekombinantnog humanog manoznog receptora makrofaga (MMR) za CA125 antigen*

Serijska razblaženja MMR (0.15-20  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L/bunariću) u 0,05 M karbonatnom puferu, pH 9,5, su adsorbovana na polistirensku ploču, fizičkom adsorpcijom, 18 sati, na +4°C. Neadsorbovani lektin je uklonjen aspiriranjem i ispranjem, tri puta sa 300  $\mu$ L TSM-a, pH 7,4. Slobodna mesta su blokirana 1 % BSA u TSM, pH 7,4 (200  $\mu$ L/bunariću), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, sadržaj je aspiriran, a ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. U bunariće je dodato po 100  $\mu$ L rastvora  $^{125}$ I-CA125 antigena u TSM puferu (300000 cpm/bunariću). Posle šestočasovne inkubacije, sadržaj bunarića je aspiriran, i nakon tri ispiranja sa 300  $\mu$ L 0,05 M PBS-a, pH 7,2, vezana radioaktivnost je merena na Wallac Wizard 1470 automatic  $\gamma$ -brojaču (Perkin Elmer, Waltham, USA).

### **3.2.2.6. CA125 – imunoreaktivnost viralnih antigena**

Za ovaj test su korišćeni imobilisani viralni antigeni iz komercijalno dostupnih testova za dokazivanje Epštajn-Bar virusa (*Epstein-Barr virus, EBV*) i Herpes simplex virusa tipa 1 (HSV1). U bunariće sa imobilisanim antigenom kapsida (CA) Epštajn-Bar virusa ili antigenom Herpes simplex virusa tipa 1 (HSV1), iz ćelijske kulture, dodata su monoklonska anti-CA125 antitela: klon X325 (M-11 slična) i klon X306 (OC-125 slična). Nakon inkubacije od tri sata, na sobnoj temperaturi, sadržaj je aspiriran i ploča je ispirana tri puta sa 0,3 mL 0,05 M PBS-a, pH 7,2. Dodato je biotinizirano kozije antitelo na mišiji IgG i inkubirano jedan sat, a nakon toga je procedura ispiranja ponovljena po istom postupku. Dodato je *Vectastain Elite ABC* reagens, koji je posle 30 min inkubacije aspiriran i ploča je isprana tri puta, po istoj proceduri. Dodato je rastvor TMB/supstrat, i nakon inkubacije od 10 min, i ispiranja, reakcija je stopirana sa 0,16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Izmerena je absorbanca sadržaja svakog bunarića na 450 nm, na Wallac 1420 Multilabel brojaču (Perkin Elmer, Monza, Italy). Kako bi se odredila specifičnost vezivanja antitela, urađen je kontrolni esej sa irelevantnim monoklonskim anti-hCG antitelom, klon 5008-SP-5 (Medix Biochemica, Kauniainen, Finland).

### **3.2.2.7. Obeležavanje CA125 antigena radioaktivnim izotopom joda (<sup>125</sup>I)**

Obeležavanje CA125 antigena, rađeno je po metodi Greenwood-a (Greenwood i sar., 1963) sa 0.5 mCi radioaktivnog izotopa joda (<sup>125</sup>I). Jodovanje je rađeno u prisustvu hloramina T, a reakcija je, nakon 60 sekundi, prekinuta dodavanjem 100 µL L-cisteina, 10 µL KI i 200 µL 0,05 M PBS pufera, pH 7,2 koji je sadržao 0,05 % BSA. Reakciona smeša je naneta na kolonu Sefadeks G-75, i eluiranje je vršeno 0,05 M PBS puferom, pH 7,2 koji je sadržao

0,05 % BSA. Frakcije od 1 mL su sakupljane, pri protoku od 0,5 mL/min. Radioaktivnost eluiranih frakcija (*count per minute, cpm*), merena je na Wallac Wizard 1470 automatic  $\gamma$ -brojaču (Perkin Elmer, Waltham, USA). Frakcije u kojima je detektovan obeležen antigen su spojene i korišćene u daljim eksperimentima.

### **3.2.2.8. Dot-blot**

PVDF membrana je hidrirana 100 % metanolom (10 sekundi), destilovanom vodom (5 minuta), i radnim puferom (5 minuta), i na nju su nanošeni odgovarajući uzorci CA125 antigena (1  $\mu$ L/spotu; 1000-250 IU/mL). Nakon blokiranja 3 % BSA u 0,05 M PBS, pH 7,2, 30 minuta, membrana je osušena i korišćena za dalje analize.

#### **3.2.2.8.1. Lektinski dot-blot**

Lektinski blot je rađen po istom principu kao i testovi vezivanja lektina na čvrstoj fazi. Za lektinski blot je korišćen biotinizovani biljni lektin LTL. Nakon transfera, membrana je inkubirana sa biotinizovanim LTL (0,4  $\mu$ g/mL), 2 sata, na sobnoj temperaturi. Nevezani lektin je uklonjen aspiriranjem i ispiranjem, tri puta po 5 minuta, sa 0,05 M PBS, pH 7,2, a zatim je dodat *Elite Vectastain ABC* reagens, 30 minuta, na sobnoj temperaturi. Detekcija vezanog lektina, nakon ponovnog ispiranja, rađena je pomoću DAB supstrat kompleta, prema uputstvu proizvođača. Inkubacija u rastvoru supstrata za peroksidazu (vodonik peroksida) i hromogena (3',3'-diaminobenzidin, DAB), vršena je do pojave tačaka, nakon čega je membrana isprana u destilovanoj vodi i osušena na sobnoj temperaturi.

#### 3.2.2.8.2. *Imuno dot-blot*

Membrana je inkubirana sa odgovarajućim monoklonskim antitelom na humane Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>y</sup> i sialil-Lewis<sup>x</sup> antigene (razblaženje 1:500), 2 sata, na sobnoj temperaturi. Nevezano antitelo je uklonjeno ispiranjem, tri puta po 5 minuta, sa 0,05 M PBS, pH 7,2. Membrana je zatim inkubirana sa kozijim biotinizovanim antitelima na mišiji IgM (0,5 µg/mL), jedan sat, na sobnoj temperaturi, nakon čega je isprana po istoj proceduri i inkubirana 30 minuta sa *Elite Vectastain ABC* reagensom. Detekcija vezanih antitela je rađena po istoj proceduri kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.8.1.

## *4. REZULTATI*



## 4.1. Bioinformatička analiza sekvence MUC16

### 4.1.1. Ispitivanje homologije sekvence MUC16

#### 4.1.1.1. BLAST analiza

Rezultati ispitivanja sličnosti MUC16, sa sekvencama proteina iz dostupnih baza podataka, pomoću BLASTP 2.2.20 programa, prikazani su na **slici 14** i u **tabeli 2**. Oni su se bazirali na statističkoj značajnosti, koja se izražava na osnovu vrednosti parametra E (*expectation value*) ili parametra S (*bit score*). E vrednost predstavlja statistički indikator, koja se računa po formuli  $E = m \times n \times P$ , gde je: m – broj svih nukleotida/aminokiselina u bazi podataka (BP); n – broj nukleotida/aminokiselina u sekvenci kojom se pretražuje BP; P – verovatnoća da je HSP (*high-scoring segment pair*) poravnanje rezultat slučajnosti. Kako E-vrednost zavisi od veličine baze podataka (kad raste baza podataka, raste i E-vrednost), došlo se na ideju da se ona računa na alternativan način, preko S vrednosti. E-vrednost je mera pouzdanosti S vrednosti. S vrednost je mera sličnosti unete sekvence sa sekvencama u bazi podataka i nezavisna je kako od dužine unete sekvence, tako i od veličine baze podataka. Što je veća vrednost *bit score*-a to je rezultat statistički verovatniji.

Rezultati dobijeni pretragom celokupne NCBI baze podataka proteina *nr-aa* (*non-redundant amino acid*), koja kombinuje ažurirane podatke od GenBank, UniProt, RefSeq, PRF i PDBSTR baza podataka, su pokazali da među prvih 10 pogodaka, sa najvećom sličnošću (većom od 70 %), spadaju sekvence koje su označene kao MUC16 i MUC16-slične (**slika 14**).

Da bi se identifikovali proteini koji imaju manji stepen sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci, ali koji se na osnovu E i S vrednosti statističke značajnosti mogu smatrati

homolozima ili udaljenim homolozima, vršena je analiza sekvenci u pojedinačnim taksonomskim kategorijama. U **tabeli 2** su prikazani rezultati ispitivanja sličnosti aminokiselinske sekvence MUC16/CA125, i sekvenci proteina iz baza podataka za sledeće taksonomske kategorije: virusi, bakterije, gljive i eukariote.

Entry	bits	E-val
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <span>Top 10 ▼</span> <span>Select operation ▼</span> <span>Exec</span> </div>		
1. <a href="#">sp:MUC16_HUMAN</a> [Q8WXI7] RecName: Full=Mucin-16; Short=MUC-16; Al... > <a href="#">sp:MUC16_HUMAN</a> [Q8WXI7] RecName: Full=Mucin-16; Short=MUC-16; AltName: Full=Ovarian cancer-related tumor marker CA125; Short=CA-125; AltName: Full=Ovarian carcinoma antigen CA125;>gp:AF414442_1 [AF414442] ovarian cancer related tumor marker CA125 [Homo sapiens] Length = 22152	3.509e+04	0.0
Score = 3.509e+04 bits (91077), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 18805/22135 (84%), Positives = 18805/22135 (84%)		
2. <a href="#">rs:NP_078966</a> [NP_078966] mucin-16 [Homo sapiens]. > <a href="#">rs:NP_078966</a> [NP_078966] mucin-16 [Homo sapiens]. Length = 14507	2.088e+04	0.0
Score = 2.088e+04 bits (54204), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 11328/14523 (78%), Positives = 11514/14523 (79%), Gaps = 110/14523 (0%)		
3. <a href="#">tr:B5ME49_HUMAN</a> [B5ME49] SubName: Full=Uncharacterized protein; > <a href="#">tr:B5ME49_HUMAN</a> [B5ME49] SubName: Full=Uncharacterized protein; Length = 8998	1.324e+04	0.0
Score = 1.324e+04 bits (34353), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 7245/8983 (80%), Positives = 7254/8983 (80%), Gaps = 2/8983 (0%)		
4. <a href="#">gp:AF361486_1</a> [AF361486] mucin 16 [Homo sapiens] > <a href="#">gp:AF361486_1</a> [AF361486] mucin 16 [Homo sapiens] Length = 6995	9670	0.0
Score = 9670 bits (25093), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 5172/7023 (73%), Positives = 5405/7023 (76%), Gaps = 100/7023 (1%)		
5. <a href="#">rs:XP_002828663</a> [XP_002828663] PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: m... > <a href="#">rs:XP_002828663</a> [XP_002828663] PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: mucin-16-like, partial [Pongo abelii]. Length = 10241	7807	0.0
Score = 7807 bits (20256), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 4320/5616 (76%), Positives = 4424/5616 (78%), Gaps = 13/5616 (0%)		

**Slika 14. Web prikaz BLAST analize sekvence MUC16 (Q8WXI7).**

Membranski glikoprotein (039781)/glikoprotein gp2 (Q6SV6W0) konjskog herpes virusa 1, kao i glikoprotein gp350-220 (E2GKY4) Epštajn-Bar virusa (EBV) su viralni proteini koji su pokazali najveću sličnost sekvence sa ciljanom sekvencom. Gp2 spada u grupu integralnih proteina kapsida virusa i učestvuje u njihovoj reprodukciji (Whittaker i sar., 1990; Wellington i sar., 1996; Learmonth i sar., 2002). Gp350-220 (BLLF1) je najzastupljeniji u omotaču herpes virusa i predstavlja glavni antigen, koji je odgovoran za stimulaciju produkcije neutrališućih antitela *in vivo* (Janz i sar., 2000; Luo i sar., 2012). Njegovo vezivanje za ćelijski receptor CD21, smatra se esencijalnim mehanizmom kojim EBV inficira B limfocite (Tanner i sar., 1987).

Protein, izolovan iz ćelijskog zida *Streptococcus pneumoniae*, koji pripada familiji proteina za usidranje (B2ISC7/Q97P71), i adhezin krvnih pločica bogat serinom (Q4L9P0), koji je izolovan iz *Staphylococcus haemolyticus*, su bakterijski proteini koji imaju sekvencu, koja je slična sekvenci MUC16/CA125. Prema GO anotacijama, B2ISC7/Q97P71 ima aktivnost transmembranskog transportera, dok Q4L9P0 posreduje u vezivanju za specifične ćelije, tj. ispoljava virulentnu aktivnost (<http://www.uniprot.org/uniprot/B2ISC7>; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q4L9P0>; Takeuchi i sar., 2005; Ding i sar., 2009).

U taksonomskoj kategoriji *Fungi*, nađeni su proteini, sa visokom sličnošću sa MUC16/CA125, za koje je poznato da imaju mucinska svojstva. To su: flokulin, Flo11 (E9P8M0) i Muc1p (C8ZAR8), izolovani iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabela 2. Rezultati ispitivanja sličnosti MUC16 (Q8WXI7), sa sekvencama proteina iz dostupnih baza podataka.**

<b>Baza podataka</b>	<b>Pogodak*</b>	<b>Protein</b>	<b>Organizam</b>	<b>Dužina</b>	<b>Sličnost</b>	<b>Score</b>	<b>E-vrednost</b>
Virusi	O39781/ Q6SV6WO	Glikoprotein membrane, gp2	<i>Equine herpesvirus 1</i>	806	25%	295	1e-23
	E2GKY4	Glikoprotein gp350-220	<i>Epstein Barr virus</i>	877	26%	170	3e-9
Bakterije	B2ISC7/ Q97P71	Familija proteina za usidravanje	<i>Streptococcus pneumoniae (strain GSP14)</i>	4695	17%	669	4e-66
	Q4L9PO	Adhezin krvnih pločica bogat serinom	<i>Staphylococcus haemolyticus (strain JCSC1435)</i>	3608	20%	625	5e-61
Gljive	E9P8M0	Flokulin sa ćelijske površine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1630	24%	499	4e-47
	C8ZAR8	Muc1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1576	23%	429	6e-39
Eukariote	E9AEM9	Proteofosfoglikan 5	<i>Leishmania major</i>	17392	18%	1003	6e-105

E-vrednost:  $<1e^{-50}$  - homologija;  $0.01 - 1e^{-50}$  – može biti homologija;  $0.01 - 10$  nije značajna, udaljena homologija;  $>10$  – rezultat slučajnosti ili su toliko udaljene da nije moguće detektovati njihovu srodnost datom metodom

\* pretraživano pomoću BLAST

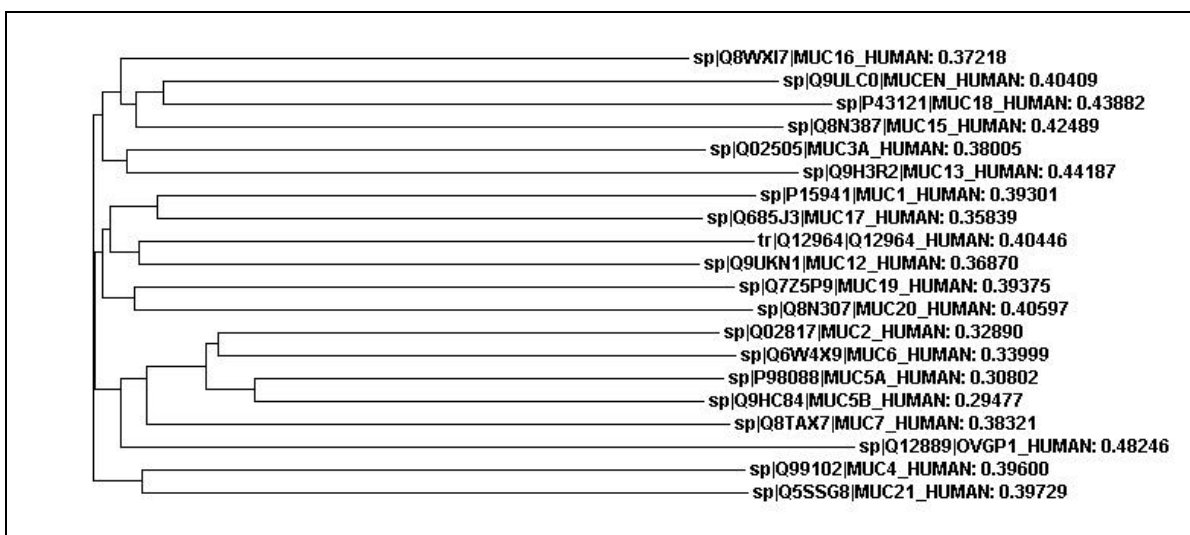
Poznato je da regioni ovih fungalnih proteina, koji su bogati serinom i treoninom, učestvuju u formiranju pseudohifa i u adheziji, vezivanjem polisaharida u prirodnim uslovima i/ili invazivnim rastom na supstratima, bogatim polisaharidima (<http://www.uniprot.org/uniprot/E9P8M0>; <http://www.uniprot.org/uniprot/C8ZAR8>; Lambrechts i sar., 1996; Lo i Dranginis, 1998; Karunanithi i sar., 2010; Veelders i sar., 2010).

Osim ovih proteina, a u okviru taksonomske kategorije *Eukaryota*, identifikovan je proteofosfolikan 5, iz *Leishmania major* (E9AEM9). Ovaj molekul pripada familiji heterogenih polipeptida neobične kompozicije i strukture, i sličan je mucinima. On je najzastupljeniji molekul na površini ćelije promastigota (stadijum ćelije bilo kojeg roda vrste *Leishmania*, kad zadobiju flagele), i poznato je da učestvuje u pričvršćivanju za prenosioca/vektora (Secundino i sar., 2010). Pored toga, on može aktivirati komplement, ali ima slaba imunogena svojstva, tj. ponaša se kao ugljeni hidrat (Aebischer i Harbecke 1999).

#### **4.1.1.2. CLUSTALW analiza**

Kako bi se dobio uvid u homologiju proteinske sekvence MUC16 sa sekvencama drugih poznatih mucina, urađena je ClustalW2 analiza. Ovaj tip analize omogućava izučavanje evolutivnih odnosa između ispitivanih sekvenci, a baziran je na progresivnom poravnanju sekvenci, kod koga su homologe sekvence evolutivno srodne. Dobijeni rezultati su prikazani u formi filograma (**slika 15**). Filogram predstavlja filogenetsko (evolutivno) razgranato stablo (dijagram) koje prikazuje evolutivne odnose između različitih ispitivanih molekula mucina, preko sličnosti i razlika u njihovim sekvencama. Prema filogramu, MUC16 je najviše homolog MUC14 (Endomucin 2, UniProt pristupni broj *Q9ULC0*),

MUC15 (*Q8N387*) i MUC18 (*P43121*). MUC14 i MUC15, prema GO anotacijama, spadaju u potencijalno transmembranske i sekretorne proteine, dok je MUC18 transmembranski protein. Oni učestvuju u adheziji ćelija i adheziji ćelija i ekstraćelijskog matriksa.



**Slika 15. Filogram homologije proteinskih sekvenci humanih mucina.**

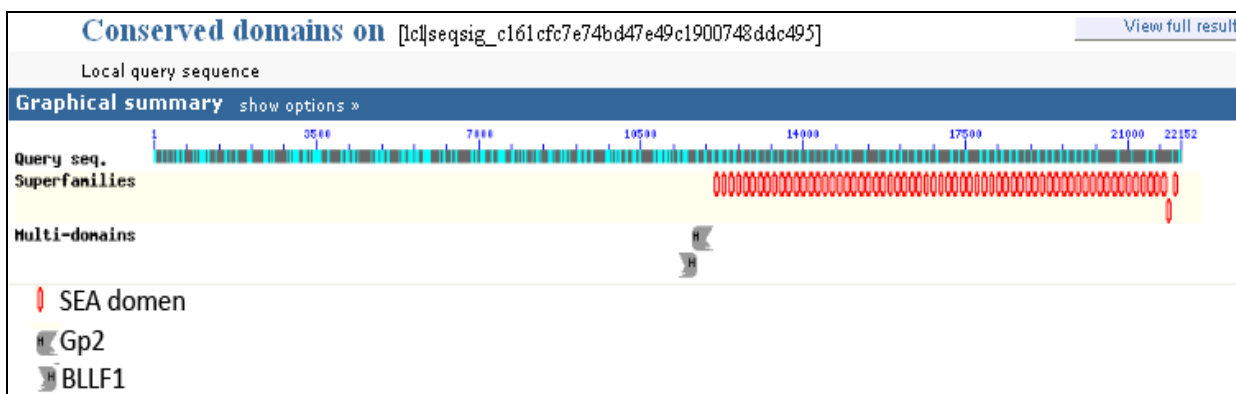
Filogram je konstruisan pomoću CLUSTALW2 programa iz višestruko poravnatih kompletnih sekvenci humanih mucina sa MUC16 (*Q8WXI7*).

#### 4.1.2. Ispitivanje prisustva domena i strukturnih motiva

##### 4.1.2.1. CDD analiza

Rezultati analize prisustva konzerviranih domena u proteinskoj sekvenci MUC16, pomoću CDD v2.26 – 38392 PSSMs (*position-specific scoring matrices*), prikazani su na **slikama 16 i 17**. Pokazano je da proteinska sekvenca MUC16 poseduje veći broj SEA domena (65), a njihovo prisustvo je, takođe, pokazano i *InterProScan* i *ScanProsite* analizom. SEA domen (*Sea urchin sperm protein, Enterokinaza i Agrin*) je ekstracelularni domen koji je O-

glikozilovan. Pretpostavlja se da ima regulatornu funkciju ili funkciju vezivanja ugljenohidratnih bočnih lanaca, a nedavno je dokazana proteolitička aktivnost SEA domena. Poznato je da se ovaj domen nalazi kod humanih mucina MUC1, MUC3, MUC12, MUC13, MUC16 i MUC17.



**Slika 16. Grafički prikaz analize konzerviranih domena u proteinskoj sekvenci MUC16.**

Analiza je vršena pomoću CDD v2.26 – 38392 PSSMs.

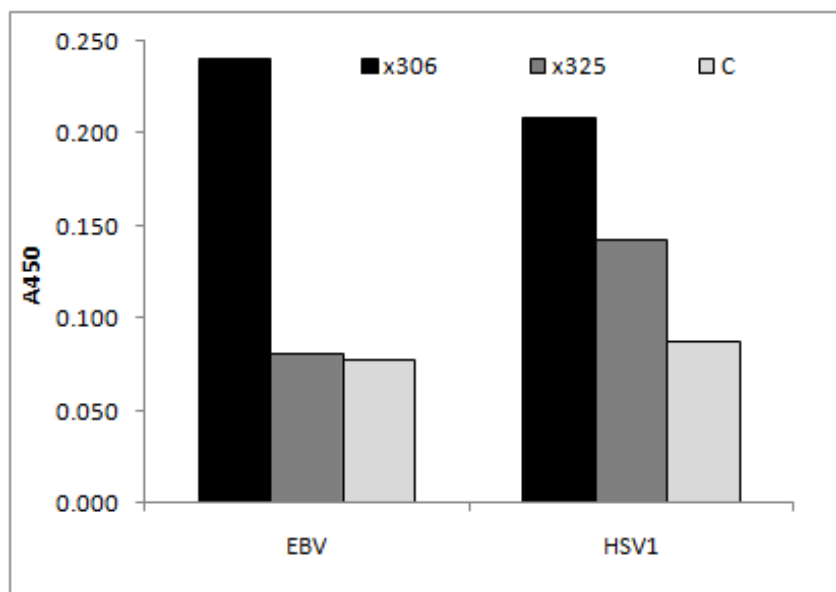
Pored SEA domena, čije su se E-vrednosti kretale od  $3.62e-18$  do  $7.89e-4$ , dobijeni rezultati su ukazali i na prisustvo domena koji bi se, na osnovu E-vrednosti, mogli ubrojati u grupu rezultata koji se definišu kao “mogu se smatrati homologim”. Identifikovana su dva multidomena: domen koji odgovara Pfam familiji glikoproteina 2 (gp2) herpes virusa konja (PF05955), E-vrednost  $2.56e-6$ , i domen koji odgovara Pfam familiji glikoproteina spoljašnjeg omotača herpes virusa, gp350-220 (BLLF1; PF05109), E-vrednost  $4.81e-3$ .

Polazeći od moguće strukturne sličnosti bazirane na prisustvu definisanih konzerviranih domena, eksperimentalna validacija ovog rezultata je vršena na osnovu pretpostavljene CA125-imunoreaktivnosti glikoproteina omotača virusa iz familije *Herpesviridae*.





Rezultati ispitivanja unakrsne reaktivnosti OC125-sličnog i M11-sličnog anti-CA125 antitela sa glikoproteinima kapsida Epštajn Bar virusa (EBV) ili Herpes simplex virusa (HSV1) su prikazani na **slici 18**. OC125-slično antitelo je dalo merljivu reaktivnost prema HSV-1 antigenima, kao i antigenima kapsida EBV. M11-slično antitelo je dalo merljivu reaktivnost samo prema HSV-1 antigenima, ali manju u odnosu na OC125-slično antitelo. Oba antitela su imala daleko slabiju reaktivnost sa antigenima virusa, u odnosu na reaktivnost sa CA125.



**Slika 18. Unakrsna reaktivnost antitela na humani CA125 sa glikoproteinima virusa iz familije Herpesviridae.**

Monoklonska antitela na CA125, klonovi X306 (OC125-slična) i X325 (M11-slična) su inkubirana sa imobilisanim antigenima kapsida Epštajn Bar virusa (EBV) ili antigenima Herpes simplex virusa (HSV1). Detekcija je vršena antitelom na mišiji IgG. Izmerena je absorbanca na 450 nm. Nespecifično vezivanje je određeno korišćenjem irelevantnog monoklonskog antitela na humani horionski gonadotropin (C).

#### 4.1.2.2. BLOCKS analiza

BLOCKS analizom konzerviranih domena i motiva (blokova) u sekvenci humanog MUC16, na osnovu E vrednosti  $6.2e-3$ , nađena je moguća homologija, samo, za motiv sličan cink-prstima (*Zinc-fingers-Znf*), tipa A20 (**tabela 3**).

**Tabela 3. Domeni/strukturni motivi dobijeni BLOCKS analizom proteinske sekvence MUC16.**

Ime domena/strukturnog motiva	BLOCKS	E-vrednost
WSG domen koji vezuje ugljene hidrate	1 od 2	0.11
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> izmenjivač domen, izoforma 1	1 of 12	0.18
dihidroksilna kiselina/6-fosfoglukonat dehidrataza domen	1 of 7	0.88
domen sličan O-glikozil hidrolazi	1 of 7	0.16
motiv bakterijskog formiranja jezgara leda	1 of 12	0.25
motiv vazopresin VIB receptora	1 of 9	0.28
motiv sličan peropsinu	1 of 11	0.31
<u>motiv sličan cink-prstima, tip A20</u>	<u>1 of 3</u>	<u>0.0062</u>
motiv velikog viralnog kapsidnog proteina	1 of 12	0.045
motiv sličan tipu II sekrecionom haperonu SycE Gram-negativnih bakterija	1 of 5	0.28
motiv sličan C-X-C hemokinskom receptoru, tip 5	1 of 8	0.36

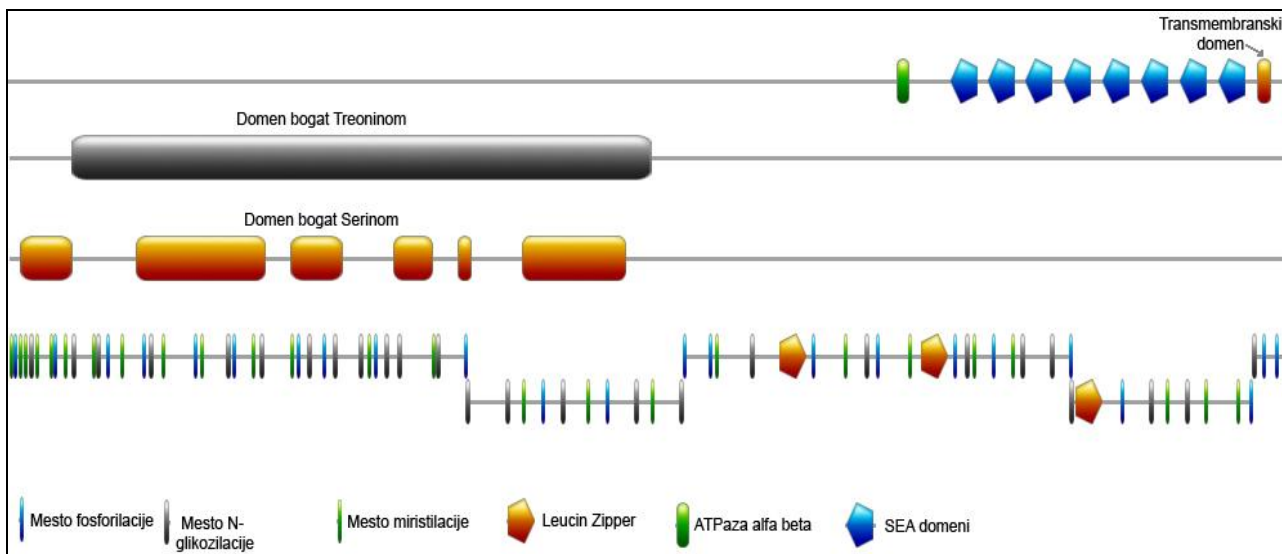
Identifikovan motiv sličan Znf pripada tipu A20, tj. onom koji se nalazi na proteinu A20, inhibitoru ćelijske smrti koji deluje na NF-kappaB aktivaciju (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), preko signalnog puta receptora TNF (*tumor necrosis factor*) (Prasad, 2007). Znf motivi su, generalno, relativno mali proteinski motivi koji omogućavaju kontakte tandemskih ponovaka sa ciljnim molekulom. Neki od ovih domena vezuju cink, ali neki i druge metale, kao što je gvožđe, ili čak i druge molekule (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR002653>).

Za ostale domene i strukturne motive E-vrednost je bila veća od 0.01, što ukazuje da poklapanje nije značajno i moguća je jedino udaljena homologija.

#### **4.1.2.3. Prosite i iProClass analiza**

Prema rezultatima pretraživanja Prosite baze podataka (**slika 19**), MUC16 poseduje 11 SEA domena, region sličan  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinici ATP sintaze (*ATP synthase alpha and beta subunits signature*), kao i strukturne motive sa visokom i često nespecifičnom učestalošću (**tabela 4**). Usaglašen obrazac (*consensus pattern*)  $\alpha$  i  $\beta$  subjedinice ATP sintaze je P - [SAP] - [LIV] - [DNH] - {LKGN} - {F} - {S} - S - {DCPH} - S, gde prvi S ostatak može biti aktivno mesto. Od ukupnog broja pogodaka za ovaj obrazac u UniProtKB/Swiss-Prot bazi podataka (2272 pogodaka u 2272 različitih sekvenci), MUC16 poseduje obrazac PALHEITSSS (aminokiseline od 10348-10357) i ubrajan je u grupu lažno-pozitivnih rezultata.

*iProClass* analizom proteinske sekvence MUC16 pronađeni su isti motivi nađeni Prosite analizom.



**Slika 19.** Šematski prikaz domena/strukturnih motiva dobijenih *ScanProsite* analizom proteinske sekvence MUC16.

**Tabela 4.** Strukturni motivi sa visokom i često nespecifičnom učestalošću dobijeni *ScanProsite* analizom proteinske sekvence MUC16.

Strukturni motivi sa visokom i često nespecifičnom učestalošću	Usaglašen obrazac
mesta bogata serinom	
mesta bogata treoninom	
mesta N-glikozilacije	N - {P} - [ST] - {P} N je mesto glikozilacije
mesta fosforilacije cAMP i cGMP zavisne protein kinaze	[RK](2) - x - [ST] S i T su mesta fosforilacije
mesta fosforilacije protein kinaze C	[ST] - x - [RK] S i T su mesta fosforilacije
mesta fosforilacije kazein kinaze II	[ST] - x(2) - [DE] S i T su mesta fosforilacije
mesta fosforilacije tirozin kinaze, mesta amidacije	RK] - x(2) - [DE] - x(3) - Y or [RK] - x(3) - [DE] - x(2) - Y Y je mesto fosforilacije
mesta N-miristilacije	G - {EDRKHPFYW} - x(2) - [STAGCN] - {P} - G na N terminusu je mesto miristilacije
motiv leucinski rajsferšlus	L - x(6) - L - x(6) - L - x(6) - L

#### 4.1.2.4. MyHits analiza

Analiza MUC16 proteinske sekvence, pomoću različitih parametara za skeniranje motiva i obrazaca u MyHits bazi podataka, je pored domena i motiva dobijenih ScanProsite analizom, ukazala i na motiv koji je sličan motivu kod IFRD (*Interferon-related developmental regulator*), a koji se, na osnovu E vrednosti, može smatrati homologim. Ostali identifikovani domeni su imali E vrednosti, koje su ukazivale da poklapanje nije značajno, ali je moguća daleka homologija (**tabela 5**).

**Tabela 5. Obrasci/strukturni motivi dobijeni MyHits\* analizom proteinske sekvence MUC16.**

Strukturni motivi i obrasci	E vrednost
<u>protein regulator razvića koji je srodan interferonu-IFRD</u>	<u>0.0015</u>
<i>Staphylocoagulase</i> ponovak	0.22
Motivi slični motivima familije CheC proteina. (CheC je fosfataza CheY-P proteina - <i>chemotactic response regulator</i> )	0.83
Protein <i>Borrelia</i> -ponovak	1
PAAR motiv (motiv prisutan obično u parovima kod familije membranskih proteina bakterija)	1.1
Koagulacioni faktor V LSPD ponovak (ime LSPD potiče od konzerviranih aminokiselinskih ostataka u sredini ponovka, u okviru B domena koagulacionog faktora V, koji se iseca neposredno pre njegove aktivacije)	1.7
Motiv proteina LPxTG koji je prisutan na površini Gram-pozitivnih koka ( <i>Gram-positive cocci surface proteins LPxTG motif profile</i> )	2.1
NUMOD3 motiv (vezuje DNK, nađen je kod "homing" endonukleaza i njima srodnim proteinima)	3.3

Obuhvata baze podataka: *PeroxiBase*, *HAMAP*, *PROSITE*, *More* profili, *PROSITE* obrasci - *frequent match producers*, Pfam HMMs - *local models* i Pfam HMMs - *global models*

### **4.1.3. Fizičko-hemijske osobine, globularnost i odstupanje od pretpostavljene tercijarne strukture proteinske sekvence MUC16**

#### **4.1.3.1. ProtParam**

Analiza fizičko-hemijskih osobina sekvence MUC16, izvršena je pomoću *ProtParam* alatke. Ona omogućava izračunavanje različitih fizičkih i hemijskih parametara unete sekvence proteina. U ove parametre spadaju molekulska masa, teorijska izoelektrična tačka, atomski sastav, ekstinkcioni koeficijent, procenjen polu-život, indeks nestabilnosti, indeks alifatičnosti i GRAVY indeks (koji govori o solubilnosti proteina). Dobijeni rezultati prikazani su na **slici 20**. Rezultati pokazuju da je MUC16 sekvenca najbogatija treoninom (15.9 %), serinom (14.8 %), leucinom (9.3 %) i prolinom (8.5 %). Procenjen polu-život molekula MUC16 (vreme koje je potrebno da ostane polovina od ukupnog pula sintetisanog proteina, a koje zavisi od aminokiseline na N-terminusu) je 30 sati (sisarski retikulociti, *in vitro*), 20 sati (kvasac, *in vivo*), 10 sati (*Escherichia coli*, *in vivo*). Indeks nestabilnosti je procenjen na 42.94, što MUC16 klasifikuje u nestabilne proteine. Indeks alifatičnosti (termostabilnost globularnih proteina) MUC16 iznosi 68.32 (ima nisku termostabilnost, što je u saglasnosti sa drugim proteinima koji su bogati serinom i treoninom ( $\alpha$ -amilaza, enolaza, termolizin i alkalna proteaza). GRAVY indeks (solubilnost proteina) iznosi -0.310, što MUC16 svrstava u hidrofilne proteine.

#### **4.1.3.2. ProtScale**

*ProtScale* analiza je, na osnovu procentualno višeg sadržaja negativnih nego pozitivnih vrednosti za aminokiseline, pokazala da je MUC16 najvećim delom hidrofilan (**slika 21**).

**ProtParam****MUC16\_HUMAN (Q8WXI7)**

Mucin-16 (MUC-16) (Ovarian cancer-related tumor marker CA125) (CA-125) (Ovarian carcinoma antigen CA125)

Homo sapiens (Human).

**The parameters have been computed for the following feature:**

FT CHAIN 1 22152 Mucin-16.

The computation has been carried out on the complete sequence (**22152** amino acids).

**Number of amino acids:** 22152

**Molecular weight:** canno

**Theoretical pI:** and

**Amino acid composition:**

CSV format

Ala (A) 998 4.5%	Arg (R) 824 3.7%	Asn (N) 655 3.0%	Asp (D) 696 3.1%
Cys (C) 138 0.6%	Gln (Q) 460 2.1%	Glu (E) 1128 5.1%	Gly (G) 1373 6.2%
His (H) 500 2.3%	Ile (I) 751 3.4%	Leu (L) 2063 9.3%	Lys (K) 574 2.6%
Met (M) 434 2.0%	Phe (F) 560 2.5%	Pro (P) 1893 8.5%	Ser (S) 3287 14.8%
Thr (T) 3533 15.9%	Trp (W) 162 0.7%	Tyr (Y) 412 1.9%	Val (V) 1090 4.9%
Pyl (O) 0 0.0%	Sec (U) 0 0.0%		
(B) 0 0.0%	(Z) 0 0.0%	(X) 621 2.8%	

**Total number of negatively charged residues (Asp + Glu):** 1824

**Total number of positively charged residues (Arg + Lys):** 1398

**Atom composition:**

As there is at least one ambiguous position (B,Z or X) in the sequence considered, the atomic composition cannot be computed.

**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 1513505

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.000, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 1504880

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.000, assuming all Cys residues are reduced

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

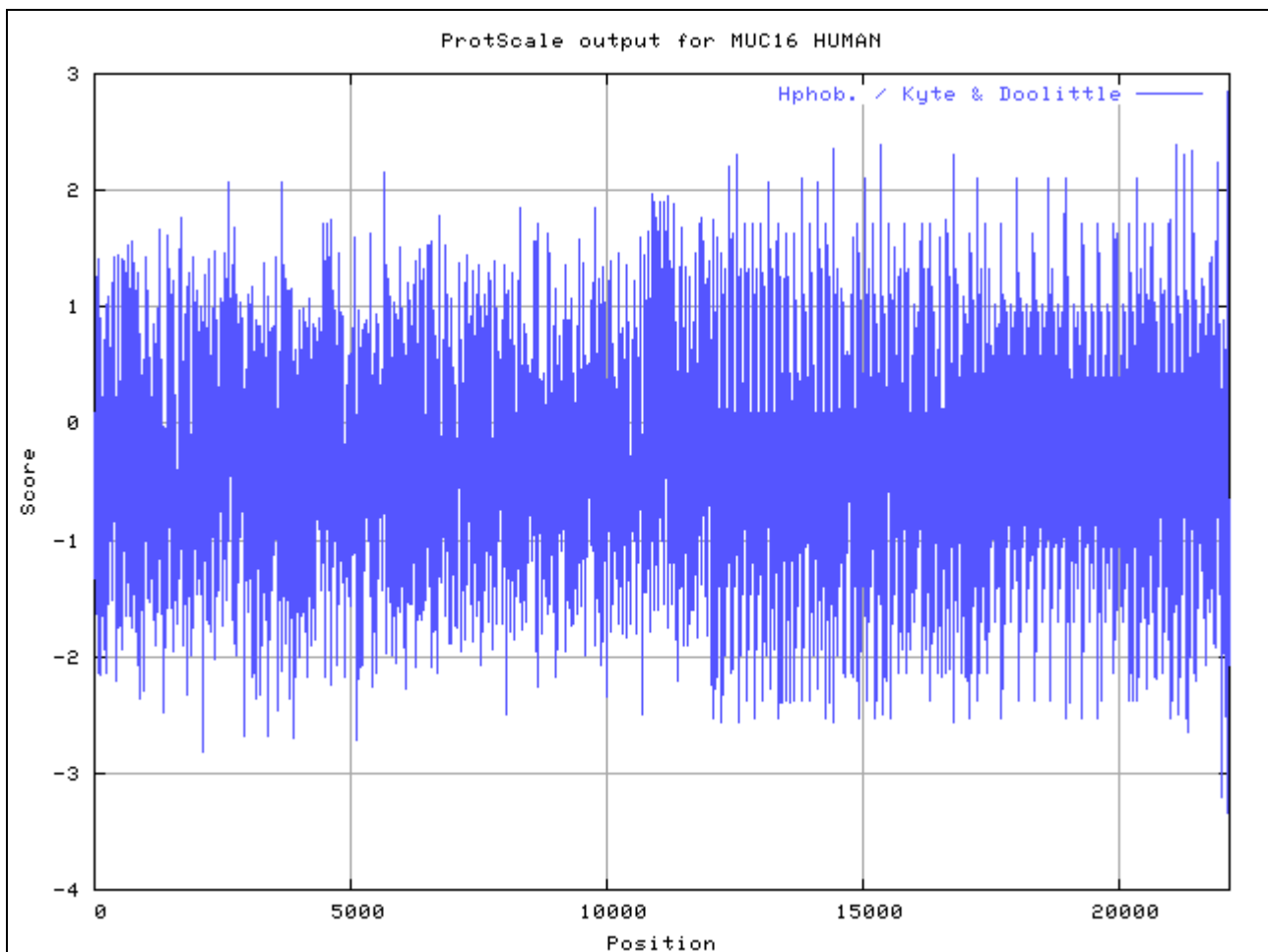
**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 42.94. This classifies the protein as unstable.

**Aliphatic index:** 68.32

**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.310

**Slika 20. Web prikaz rezultata *ProtParam* analize sekvence MUC16.**



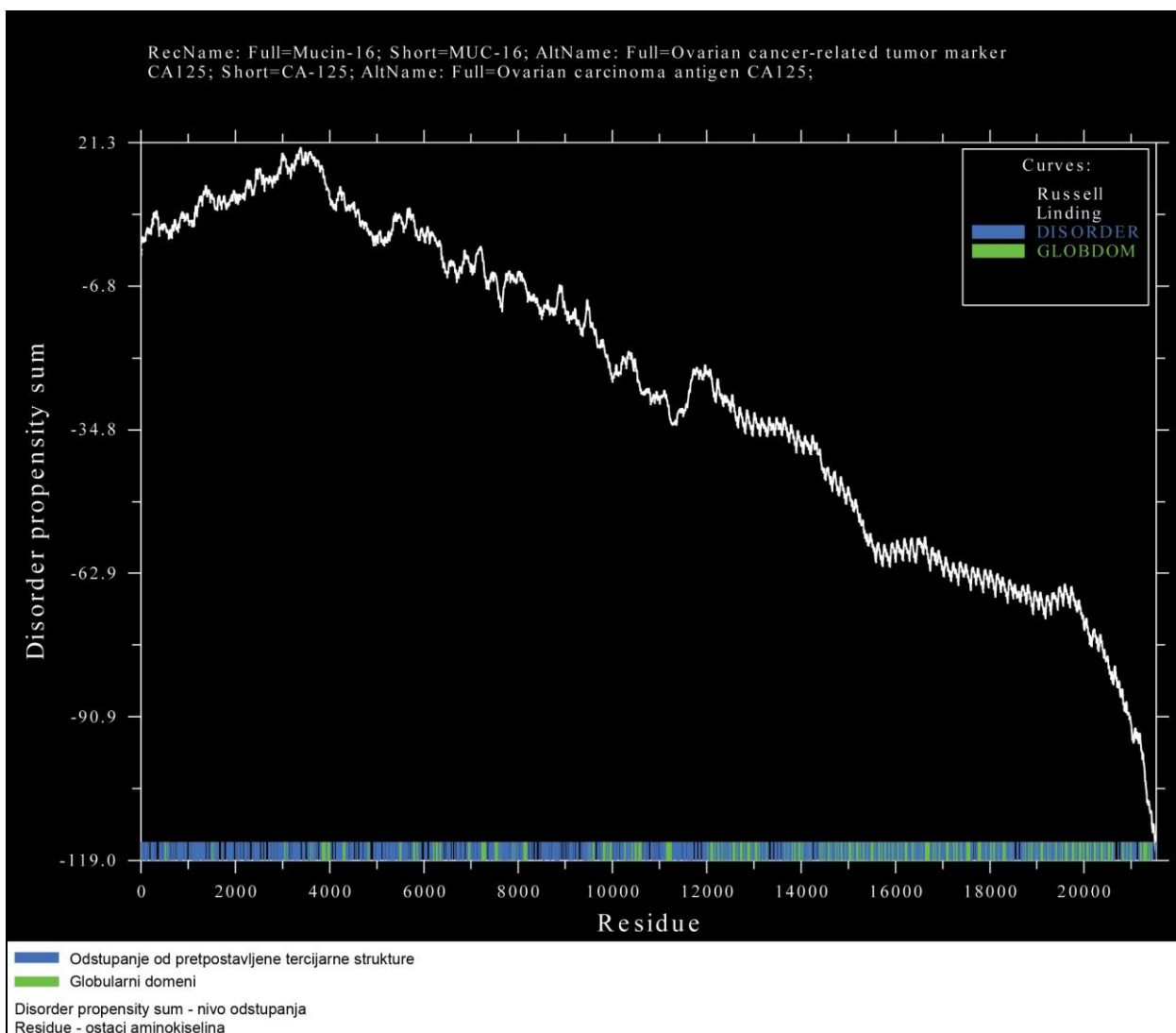
**Slika 21. Hidrofobnost proteinske sekvence MUC16 bazirana na „Kyte i Doolittle“ vrednostima.**

Pozitivne vrednosti predstavljaju aminokiseline koje doprinose hidrofobnosti dok negativne vrednosti predstavljaju aminokiseline koje doprinose hidrofилности proteinske sekvence MUC16. Hphob. / Kyte & Doolittle, individualne vrednosti za 20 aminokiselina su: Ala: 1.800 Arg: -4.500 Asn: -3.500 Asp: -3.500 Cys: 2.500 Gln: -3.500 Glu: -3.500 Gly: -0.400 His: -3.200 Ile: 4.500 Leu: 3.800 Lys: -3.900 Met: 1.900 Phe: 2.800 Pro: -1.600 Ser: -0.800 Thr: -0.700 Trp: -0.900 Tyr: -1.300 Val: 4.200 ; -3.500 ; -3.500 ; -0.490.



#### 4.1.3.3. GLOBPLOT

GLOBPLOT analizom proteinske sekvence MUC16, pokazano je da je odstupanje od pretpostavljene tercijarne strukture najveće u ekstracelularnom regionu (1-12000 aminokiseline), a da je globularnost najviše zastupljena u regionu sekvence koji sadrži SEA domene, transmembranski domen i citoplazmatski rep (12000-22152 aminokiseline) (slika 22).



Slika 22. GLOBPLOT analiza proteinske sekvence MUC16, koja se bazira na Russell/Linding-ovim vrednostima.

#### 4.1.4. Predikcija funkcije MUC16

##### 4.1.4.1. *ProtFun analiza*

Rezultati *ProtFun 2.2* analize funkcije MUC16, na osnovu njegove proteinske sekvence, prikazani su na **slici 23**. Budući da se sekvenca MUC16 sastoji od preko 22000 aminokiselina, što je ekstremno veliki broj, ona je analizirana u delovima od 5000 aminokiselina, usled ograničenja kapaciteta servera. Dobijeni rezultati su prikazani u formi funkcionalnih kategorija gena i genskih produkata i *GeneOntology* kategorija. Verovatnoća za dobijene kategorije je bila, generalno, mala. U okviru funkcionalnih kategorija gena i genskih produkata, sa verovatnoćom 0.560 i šansom 2.305, MUC16 je homolog grupi proteina koji učestvuju u metabolizmu purina i pirimidina, dok je, sa verovatnoćom 0.533 i šansom 1.299, on homolog grupi proteina koji učestvuju u transportu i vezivanju atoma i molekula. MUC16 je, takođe, sa verovatnoćom 0.420 i šansom 1.465, okarakterisan kao enzim nepoznate klase. U okviru *GeneOntology* kategorija, sa verovatnoćom 0.219 i šansom 7.809, MUC16 je homolog grupi strukturnih proteina, a sa verovatnoćom 0.220 i šansom 1.757, homolog proteinima koji učestvuju u regulaciji transkripcije.

##### 4.1.4.2. *JAFa analiza*

*JAFa* analiza sekvence MUC16, prikazana je na u **tabeli 6**. Prikazani GO nivoi označavaju specifičnost GO funkcionalnog termina (što je veći GO nivo, to je i specifičnost GO funkcionalnog termina veća), a odgovarajuće ocene određuju koliko je dobra data anotacija, balansirajući između rezultata predviđanja i servera koji su se saglasili za dati GO funkcionalni termin.

```

##### ProtFun 2.2 predictions #####
>Sequence
# Functional category          Prob      Odds
Amino_acid_biosynthesis      0.024    1.071
Biosynthesis_of_cofactors    0.058    0.808
Cell_envelope                 0.032    0.517
Cellular_processes           0.032    0.432
Central_intermediary_metabolis 0.060    0.945
Energy_metabolism            0.023    0.259
Fatty_acid_metabolism        0.016    1.265
Purines and pyrimidines    => 0.560    2.305
Regulatory_functions         0.252    1.566
Replication_and_transcription 0.132    0.491
Translation                   0.027    0.613
Transport and binding      => 0.533    1.299

# Enzyme/nonenzyme           Prob      Odds
Enzyme                     => 0.420    1.465
Nonenzyme                    0.580    0.813

# Enzyme class              Prob      Odds
Oxidoreductase (EC 1.--.-)  0.024    0.114
Transferase (EC 2.--.-)    0.096    0.279
Hydrolase (EC 3.--.-)     0.068    0.215
Lyase (EC 4.--.-)         0.020    0.430
Isomerase (EC 5.--.-)     0.010    0.321
Ligase (EC 6.--.-)        0.017    0.326

# Gene Ontology category    Prob      Odds
Signal_transducer          0.143    0.667
Receptor                   0.011    0.066
Hormone                    0.001    0.206
Structural protein        => 0.219    7.809
Transporter                0.025    0.230
Ion_channel                0.011    0.195
Voltage-gated_ion_channel  0.005    0.212
Cation_channel             0.010    0.224
Transcription              0.075    0.586
Transcription regulation => 0.220    1.757
Stress_response            0.017    0.196
Immune_response            0.016    0.187
Growth_factor              0.007    0.529
Metal_ion_transport        0.009    0.020

```

**Slika 23. Sumarni web prikaz analize MUC16 sekvence pomoću *ProtFun2.2* servera.**

**Tabela 6. Sumarni prikaz rezultata analize sekvence Q8WXI7 (MUC16/CA125) na Jafa serveru\*.**

Biološki procesi			Molekularna funkcija			Ćelijska komponenta		
GO / GO-nivo	Score	Ime	GO / GO-nivo	Score	Ime	GO / GO-nivo	Score	Ime
0015986 / 6	2.00	ATP sinteza kuplovana sa transportom protona	0004339 / 6	2.00	Hidroliza terminalne D-glukoze vezane $\alpha$ 1,4 vezom	0005886 / 3	1.00	Plazma membrana
0006030 / 6	2.00	Metabolizam hitina	0005524 / 5	1.67	Vezivanje ATP	0016469 / 2	0.67	Veliki proteinski kompleks za katalizu sinteze ili hidrolize ATP-a rotacionim mehanizmom
0000272 / 6	2.00	Katabolizam polisaharida	0008061 / 4	1.33	Vezivanje hitina	0005615 / 2	0.67	Ekstraćelijski prostor
0007160 / 4	1.33	Adhezija ćelije za matriks	0005515 / 2	0.67	Vezivanje proteina			
0007124 / 3	1.00	Rast pseudohifa	0005554 / 1	0.33	Nepoznata molekularna funkcija			
0001403 / 3	1.00	Invazivni rast (sensu <i>Saccharomyces</i> )						

\* pretraživano pomoću <http://jafa.burnham.org>; izabrani rezultati.

Dobijeni rezultati su ukazali na sledeće *GeneOntology* funkcionalne termine (pristupni brojevi): u okviru domena *molekularna funkcija* GO:0004339 (GO nivo 6, ocena 2.00), GO:0005524 (GO nivo 5, ocena 1.67), GO:0008061 (GO nivo 4, ocena 1.33), GO:0005515 (GO nivo 2, ocena 0.67) i GO:0005554 (GO nivo 1, ocena 0.33); u okviru domena *ćelijska komponenta* GO:0005886 (GO nivo 3, ocena 1.00), GO:0016469 (GO nivo 2, ocena 0.67) i GO:0005615 (GO nivo 2, ocena 0.67); i u okviru domena *biološki procesi* GO:0015986 (GO nivo 6, ocena 2.00), GO:0006030 (GO nivo 6, ocena 2.00), GO:0000272 (GO nivo 6, ocena 2.00), GO:0007160 (GO nivo 4, ocena 1.33), GO:0007124 (GO nivo 3, ocena 1.00) i GO:0001403 (GO nivo 3, ocena 1.00).

Termin GO:0004339 (1,4-alfa-D-glukan glukohidrolazna aktivnost) se odnosi na katalizu hidrolize terminalne D-glukoze vezane  $\alpha$ 1,4 vezom, sukcesivno, sa neredukujućih krajeva lanaca, sa oslobađanjem  $\beta$ -D-glukoze. Termin GO:0005524 (vezivanje ATP) se odnosi na selektivno vezivanje za ATP, adenzin 5'-trifosfat. Termin GO:0008061 (vezivanje hitina) se odnosi na selektivnu i nekovalentnu interakciju sa hitinom, linearnim polisaharidom koji se sastoji od N-acetil-D-glukozaminskih ostataka, vezanih  $\alpha$ 1,4 vezom. Termin GO:0005515 (vezivanje aminokiselina proteina), se odnosi na selektivnu i nekovalentnu interakciju sa bilo kojim proteinom ili proteinskim kompleksom (kompleksom dva ili više proteina koji mogu da sadrže i neproteinske molekule). Termin GO:0005554 je termin sa nepoznatom molekularnom funkcijom. GO:0005886 (plazma membrana) termin se odnosi na ćelijsku membranu. GO:0016469 (dvo-sektorni ATP-azni kompleks za transportovanje vodonika, *hydrogen-transporting two-sector ATPase complex*) termin se odnosi na veliki proteinski kompleks koji katalizuje sintezu ili hidrolizu ATP-a rotacionim mehanizmom,

povezanim sa transportovanjem protona kroz membranu. Ovaj kompleks se sastoji od membranskog dela, koji transportuje protone, i citoplazmatskog dela, koji katalizuje sintezu ili hidrolizu ATP-a. Termin GO:0005615 (ekstraćelijski prostor) se odnosi na prostor unutar višećelijskog organizma, koji se nalazi sa spoljne strane plazma membrane i ispunjen je tečnošću. GO:0015986 (ATP sinteza kuplovana sa transportom protona) termin se odnosi na procese transporta protona kroz membranu, koji stvaraju elektrohemisjki potencijal, koji se koristi za sintezu ATP-a. Termin GO:0006030 (proces metabolizma hitina) se odnosi na hemijske reakcije i metaboličke puteve hitina, dok se termin GO:0000272 (katabolizam polisaharida) odnosi na hemijske reakcije i metaboličke puteve, čiji je krajnji rezultat degradacija polisaharida, polimera od 10 i više monosaharida vezanih glikozidnom vezom. GO:0007160 (adhezija ćelije za matriks) termin se odnosi na vezivanje ćelije za ekstraćelijski matriks preko adhezivnih molekula. GO:0007124 (rast pseudohifa) termin se odnosi na obrazac ćelijskog rasta, u uslovima ograničene količine azota i velike količine ugljenika za fermentisanje, kada ćelije postaju izdužene, zadobijaju obrazac unipolarnog pupljenja i ostaju fizički međusobno spojene. Termin GO:0001403 (invazivni rast u nedostatku glukoze) se odnosi na obrazac rasta nađen pri pupljenju haploidnih ćelija, pod određenim uslovima, u kojima ćelije zadržavaju tipično aksijalno pupljenje haploidnih ćelija, ali postaju izdužene i ne uspevaju da se razdvoje posle deobe; primer ovog procesa je nađen kod *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **4.1.4.3. PFP analiza**

Rezultati analize sekvence MUC16, pomoću *PFP: Automated Protein Function Prediction* servera, prikazani su u **tabeli 7**.

**Tabela 7. Predviđeni GO termini za unetu Q8WXI7 (Muc16/CA125) sekvencu\*.**

Biološki procesi			Molekularna funkcija			Ćelijska komponenta		
GO	Score	Definicija	GO	Score	Definicija	GO	Score	Definicija
0006812	5363	Transport katjona	0005515	3567	Vezivanje proteina	0005624	24775	Membranska frakcija
0007155	4679	Adhezija ćelija	0004867	3371	Aktivnost inhibitora endopeptidaze	0005887	4420	Deo membrane
0007275	4273	Razvoj	0004872	3133	Aktivnost receptora	0016020	4305	Membrana
0006929	3310	Ćelijska migracija vezana za supstrat	0004672	2914	Aktivnost protein kinaze	0005622	3129	Intraćelijski
0050652	2664	Biosinteza polisaharidnih lanaca	0004674	2623	Aktivnost Ser/Thr kinaze	0016021	2363	Sastavni deo membrane
0007166	2554	Signalna transd. receptora vezanog za površinu ćelije	0005529	2445	Vezivanje šećera	0005578	2118	Extraćelijski matriks (sensu Metazoa)
0007165	2416	Signalna transdukcija	0005524	2219	Vezivanje ATP	0005634	1939	Nukleus
0006917	2213	Indukcija apoptoze	0008270	2206	Vezivanje jona cinka	0005856	1764	Citoskelet
0008228	2079	Opsonizacija	0003804	2154	Aktivnost koagulacionog faktora Xa	0009897	1633	Spoljna strana membrane
0035162	2071	Embrionalna hematopoeza	0046703	2075	Vez. receptora sličnog rec. NK ćelija	0005615	1531	Ekstraćelijski prostor

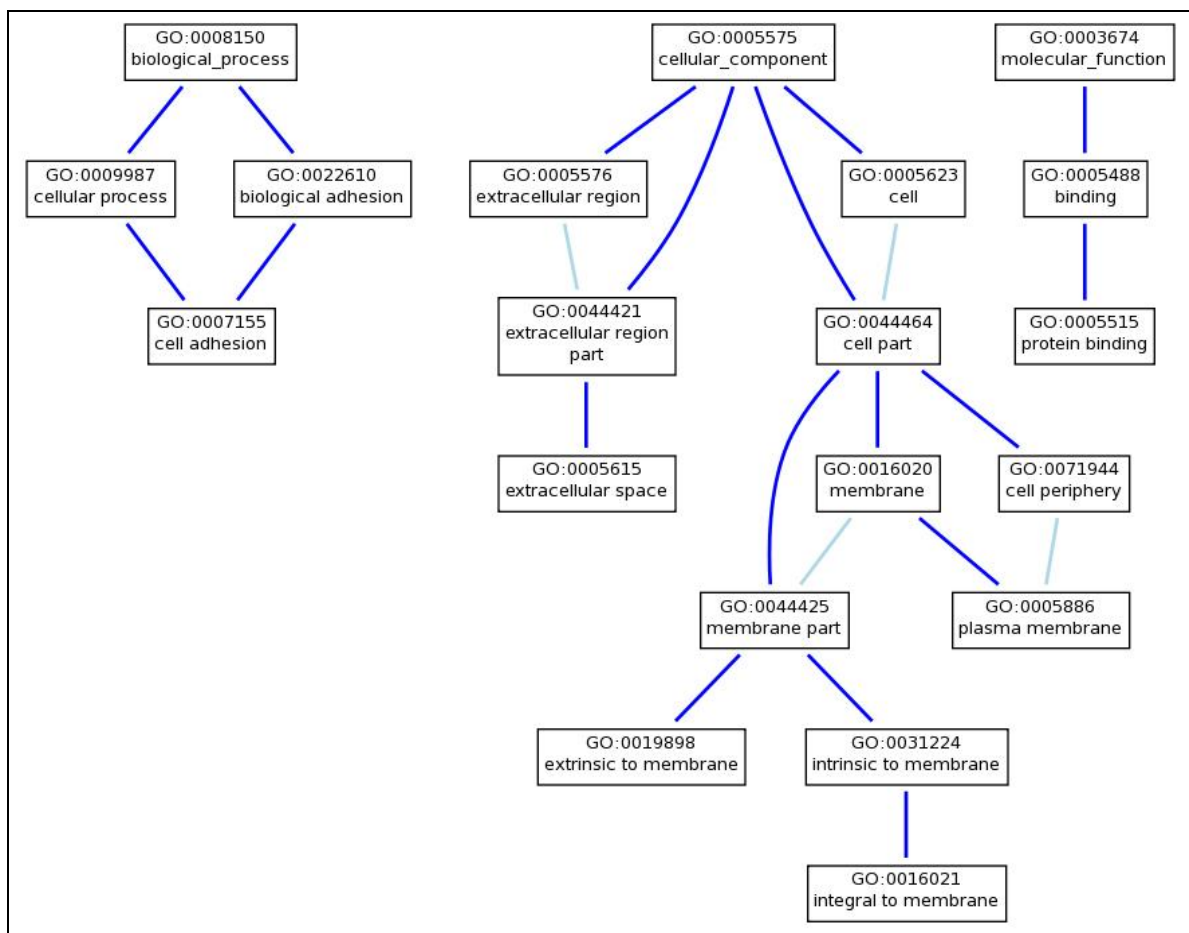
\*pretraživano pomoću <http://dragon.bio.purdue.edu/pfp>; izabrani rezultati.

U okviru GO domena *molekularna funkcija*, pored termina koji su nađeni JAJFA analizom, GO:0005515 (vezivanje proteina) i GO:0005524 (vezivanje ATP), izdvajaju se sledeći *GeneOntology* termini: GO:0004867 (aktivnost inhibitora endopeptidaze, ocena 3371), GO:0004872 (aktivnost receptora, ocena 3113), GO:0004672 (aktivnost protein kinaze, ocena 2914), GO:0004674 (aktivnost Ser/Thr kinaze, ocena 2623), GO:0005529 (vezivanje šećera, ocena 2445), GO:0008270 (vezivanje jona cinka, ocena 2206), GO:0003804 (aktivnost koagulacionog faktora Xa, ocena 2154) i GO:0046703 (vezivanje receptora sličnog receptoru NK ćelija, ocena 2075). U okviru GO domena *ćelijska komponenta*, osim termina koji je nađen JAJFA analizom, GO:0005615 (ekstraćelijski prostor), nađeni su i GO:0005624 (membranska frakcija, ocena 24775), GO:0005887 (deo membrane, ocena 4420), GO:0016020 (membrana, ocena 4305), GO:0005622 (unutarćelijski, ocena 3129), GO:0016021 (sastavni deo membrane, ocena 2363), GO:0005578 (ekstraćelijski matriks, *sensu Metazoa*, ocena 2118), GO:0005634 (nukleus, ocena 1939), GO:0005856 (citoskelet, ocena 1764), GO:0009897 (spoljna strana membrane, ocena 1633). U okviru GO domena *biološki procesi*, nađeni su sledeći termini: GO:0006812 (transport katjona, ocena 5363), GO:0007155 (adhezija ćelija, ocena 4679), GO:0007275 (razvoj, ocena 4273), GO:0006929 (ćelijska migracija vezana za supstrat, ocena 3310), GO:0050652 (biosinteza polisaharidnih lanaca, ocena 2664), GO:0007166 (signalna transdukcija receptora vezanog za površinu ćelije, ocena 2554), GO:0007165 (signalna transdukcija, ocena 2416), GO:0006917 (indukcija apoptoze, ocena 2213), GO:0008228 (opsonizacija, ocena 2079) i GO:0035162 (embrionalna hematopoeza, ocena 2071).



#### 4.1.4.4. GeneOntology analiza

Rezultati *GeneOntology* analize sekvence MUC16, prikazani su na **slici 24**. Dobijeni rezultati, u okviru domena *biološki procesi*, su ukazali da se, pored GO:0007155 (ćelijska adhezija) koji je nađen pomoću PFP, izdvajaju i sledeći termini: GO:0009987 (ćelijski procesi) i GO:0022610 (biološka adhezija).



**Slika 24.** Web prikaz analize MUC16 sekvence u *GeneOntology* bazi podataka.

U okviru domena *ćelijska komponenta*, osim GO:0005615 (ekstraćelijski prostor), koji je nađen pomoću Jafa i PFP, kao i GO:0016020 (membrana) i GO:0016021 (sastavni deo membrane) nađeni pomoću PFP, nađeni su sledeći termini: GO:0005576 (ekstraćelijski region), GO:0005623 (ćelija), GO:0044421 (deo ekstraćelijskog regiona), GO:0044464 (ćelijski deo), GO:0005615 (ekstraćelijski prostor), GO:0071944 (periferni deo ćelije), GO:0044425 (deo membrane), GO:0005886 (plazma membrana), GO:0019898 (spoljašnji deo membrane), GO:0031224 (unutrašnji deo membrane). U okviru domena *molekularna funkcija*, osim GO:0005515 (vezivanje proteina), koji je nađen pomoću Jafa i PFP, nađen je i termin GO:0005488 (vezivanje).

## 4.2. Glikobiohemijska analiza

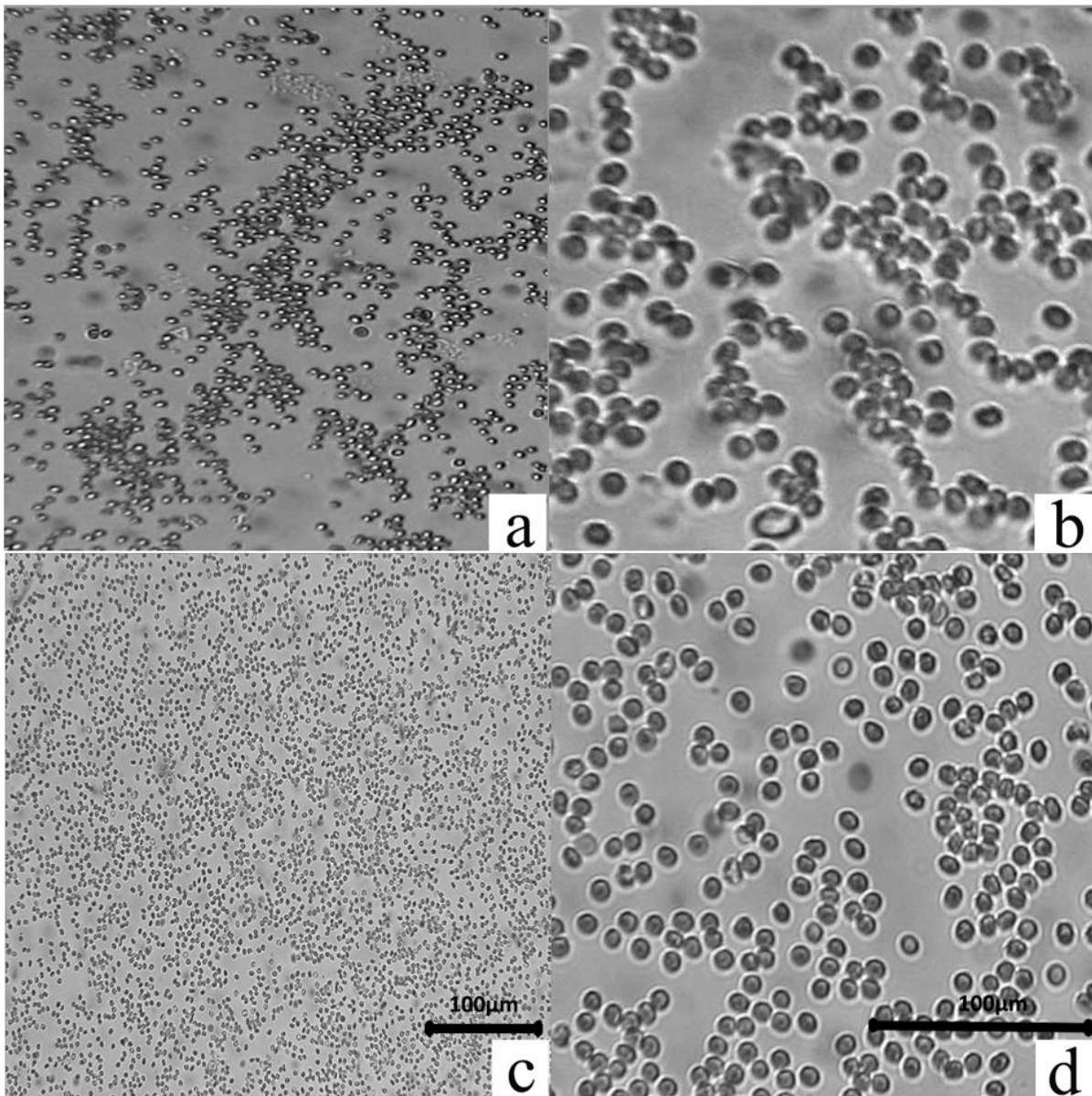
### 4.2.1. Uticaj CA125 antigena na eritrocite čoveka

#### 4.2.1.1. Uticaj CA125 antigena na agregaciju eritrocita

Analiza agregacije je vršena u suspenziji eritrocita, koja je naneta na staklene pločice u vidu kapi. U nju su dodati odgovarajući CA125 antigeni, i nakon inkubacije od 30 minuta, na sobnoj temperaturi, reprezentativna polja sa ćelijama su posmatrana pod svetlosnim mikroskopom pri uvećanju 20 x i 40 x (**slike 25, 26 i 27**).

Za razliku od kontrolnog uzorka, gde su ćelije individualno raspoređene (**slika 25 c, d**), u prisustvu CA125 antigena fetalnog porekla, pCA125 (**slika 25 a, b**), kao i u prisustvu CA125 antigena iz pleuralne tečnosti čoveka, pfCA125 (**slika 26 a-d**) zapaženo je formiranje grozdastih agregata/miniklastera. Individualne ćelije unutar agregata su ostale okrugle, a morfologija formiranih agregata je bila slična u prisustvu oba antigena. Isti efekat na agregaciju eritrocita, postignut je u prisustvu oba antigena, ali pri 40 puta manjoj koncentraciji pCA125 (500 IU/mL), u odnosu na pfCA125 (20000 IU/mL).

Za razliku od pCA125 i pfCA125, CA125 iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka, clCA125 (**slika 27 a, b**), nije imao efekat na agregaciju eritrocita.



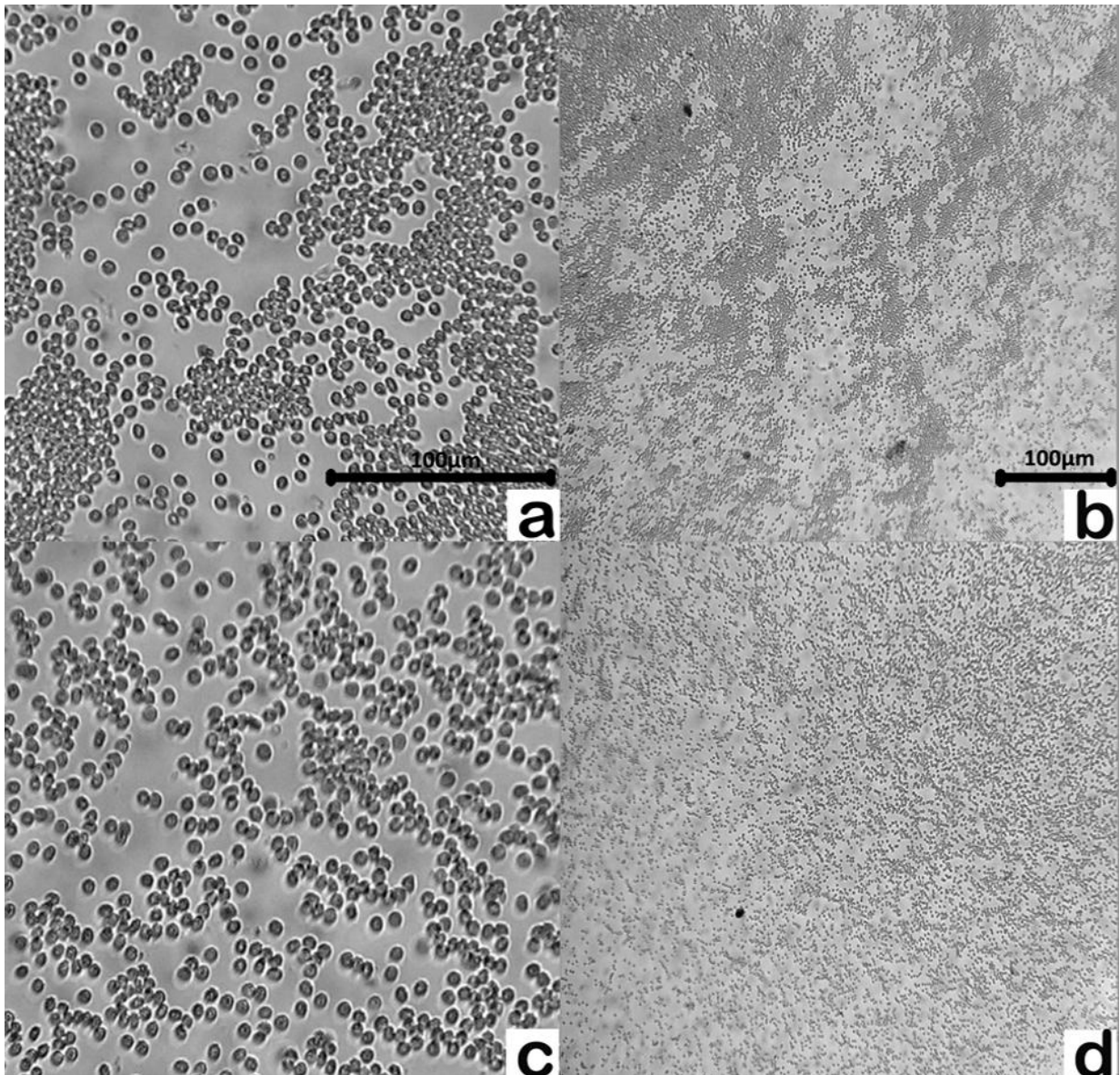
**Slika 25. Uticaj pCA125 antigena na agregaciju eritrocita.**

Suspenzija eritrocita je naneta u vidu kapi, na staklene pločice, a zatim je dodat pCA125. Nakon inkubacije od 30 minuta, na sobnoj temperaturi, ćelije su posmatrane svetlosnim mikroskopom.

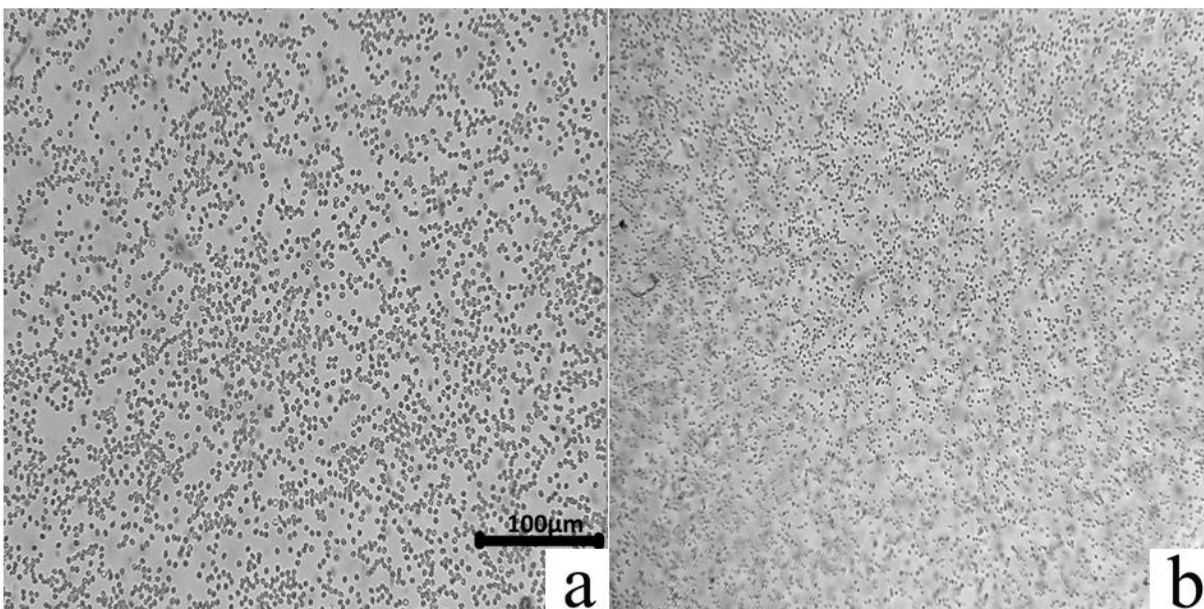
**pCA125** - antigen fetalnog porekla

**(a, b)** 500 IU/mL pCA125

**(c, d)** Suspenzija eritrocita bez dodatog CA125 antigena je korišćena kao kontrola.



**Slika 26. Uticaj pfCA125 antigena na agregaciju eritrocita.**  
**pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera  
(**a, b**) 20000 IU/mL pfCA125  
(**c, d**) 4000 IU/mL pfCA125.



**Slika 27. Uticaj clCA125 antigena na agregaciju eritrocita.**

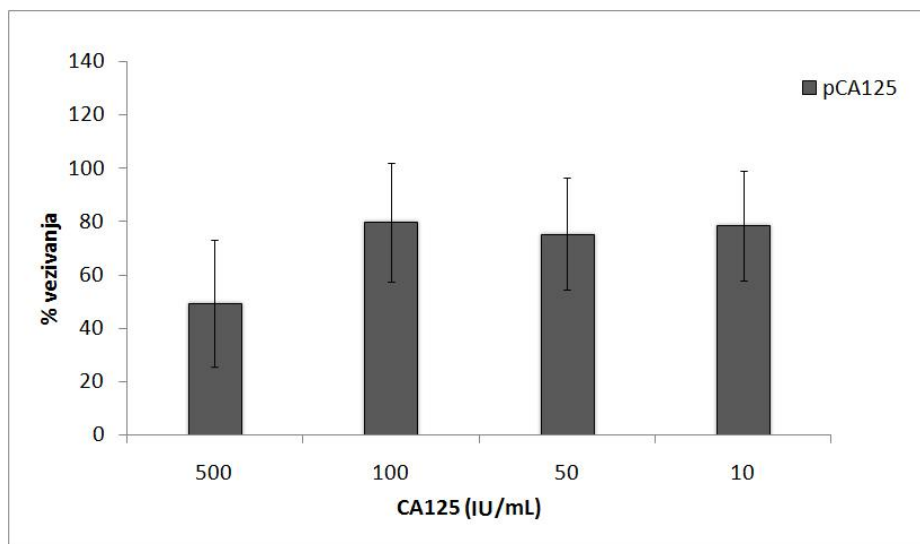
clCA125 - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka

(a) 20000 IU/mL clCA125

(b) 4000 IU/mL clCA125.

#### ***4.2.1.2. Uticaj CA125 antigena na adheziju eritrocita***

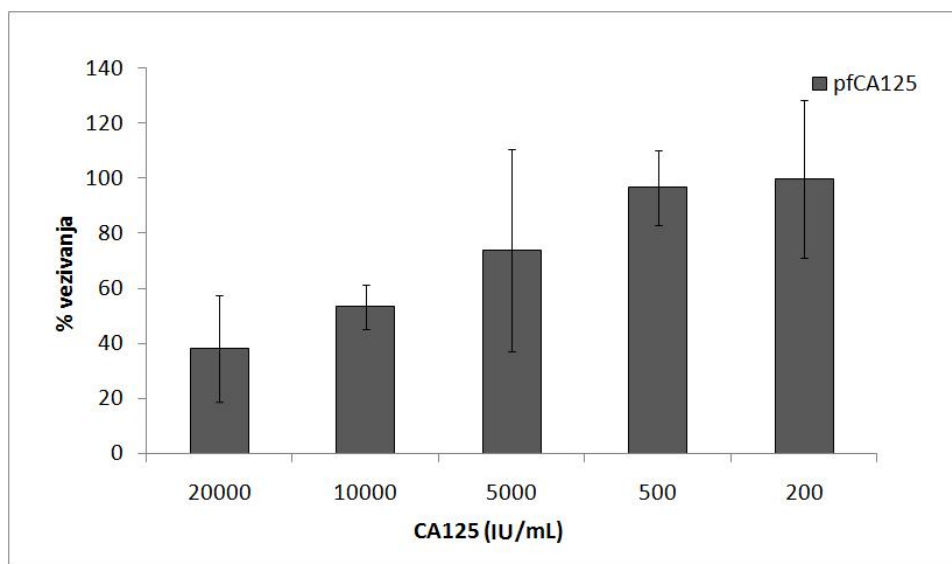
Adhezija eritrocita na polistirenske ploče obložene poli-L-lizinom, u prisustvu CA125 antigena, prikazana je na **slikama 28, 29 i 30**. pCA125 antigen je inhibirao adheziju eritrocita na dozno zavisin način (do 23 % kontrolne vrednosti) (**slika 28**), dok su, pri istim testiranim koncentracijama, pfCA125 (**slika 29**) i clCA125 (**slika 30**) bili znatno manje efikasni (do 83 % i do 85 % kontrolne vrednosti, redom). Na 20 do 40 puta većim koncentracijama, pfCA125 je ispoljio sličan efekat kao pCA125 (do 19 % kontrolne vrednosti), dok je efekat clCA125 i dalje bio mnogo manji (65 % kontrolne vrednosti).



**Slika 28. Uticaj pCA125 antigena na adheziju eritrocita.**

Ploče su obložene poli-L-lizinom, blokirane BSA, a onda su dodati pCA125 antigen i humani eritrociti. Nakon inkubacije, neadherirane ćelije su nežno isprane adhezionim puferom, a adherirane ćelije su lizirane destilovanom vodom. Izmerena je absorbanca na 405 nm, kao mera ukupnog broja adheriranih ćelija. Rezultati su prikazani kao procenat kontrole (broj adheriranih eritrocita bez dodatog pCA125 antigena, arbitrarno 100 %).

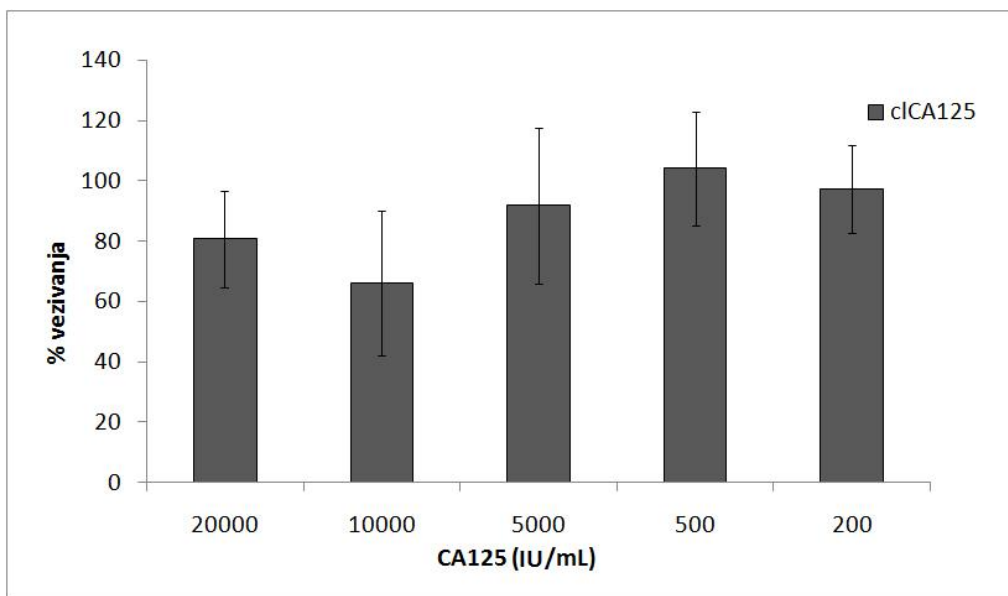
**pCA125** - antigen fetalnog porekla.



**Slika 29. Uticaj pfCA125 antigena na adheziju eritrocita.**

Rezultati su prikazani kao procenat kontrole (broj adheriranih eritrocita bez dodatog pfCA125 antigena, arbitrarno 100 %).

**pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera.



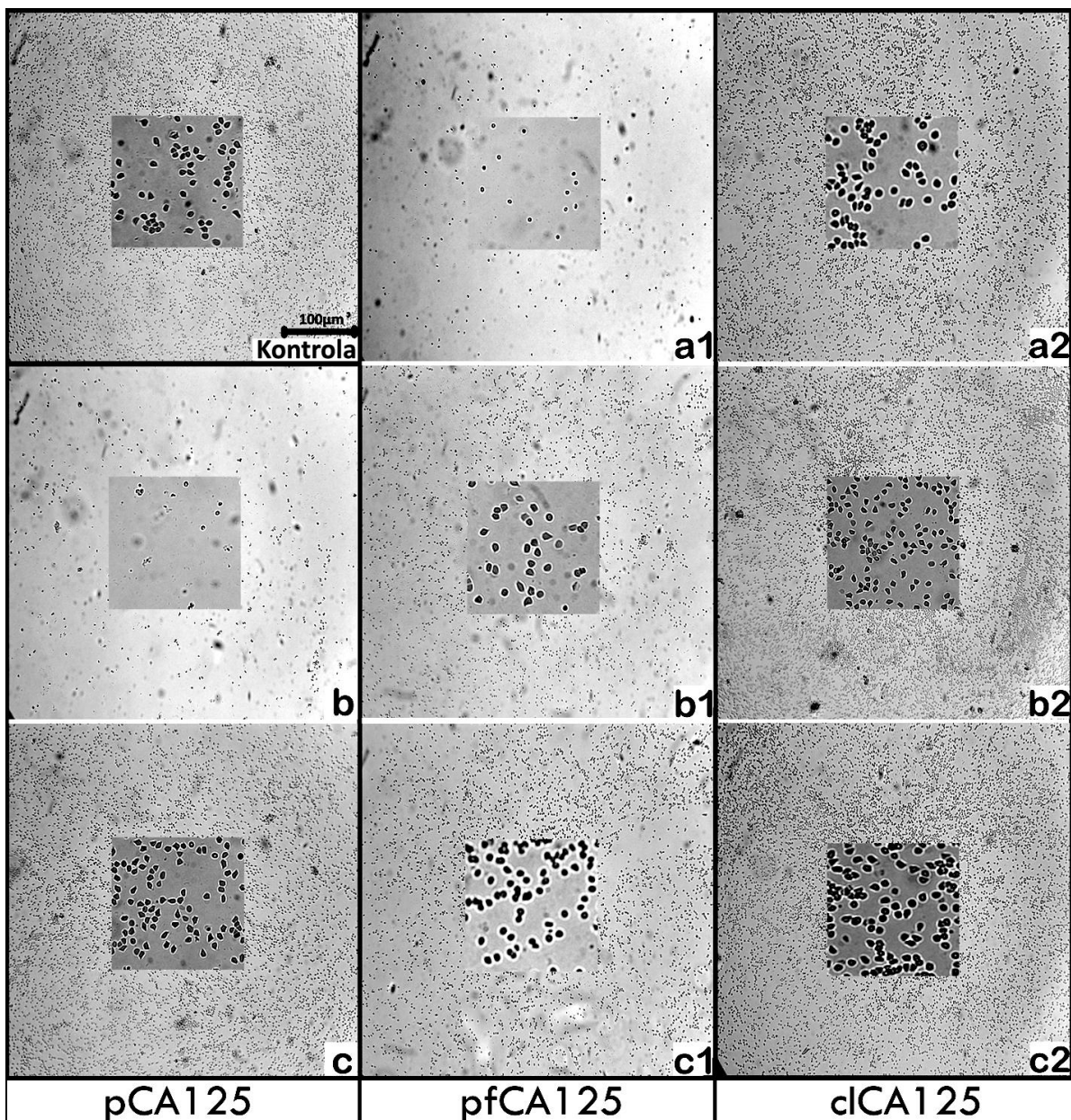
**Slika 30. Uticaj cICA125 antigena na adheziju eritrocita.**

Rezultati su prikazani kao procenat kontrole (broj adheriranih eritrocita bez dodatog cICA125 antigena, arbitrarno 100 %).

**cICA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

Paralelno sa ovim eksperimentima, rađen je test adhezije na staklenim pločicama obloženim poli-L-lizinom, koji je omogućio uvid u izgled i morfologiju adheriranih ćelija (**slika 31**). Dobijeni rezultati su bili u skladu sa efektima zapaženim u testu na polistirenskim pločama.





**Slika 31. Test adhezije eritrocita u prisustvu CA125 antigena.**

Staklene pločice su obložene poli-L-lizinom, blokirane BSA, a onda su dodati odgovarajući CA125 antigeni i eritrociti. Adherirane ćelije su posmatrane svetlosnim mikroskopom pri uvećanju 20 *x* (inserti 40 *x*).

**Kontrola** - adhezija eritrocita bez dodatog CA125 antigena.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla: **b)** 500 IU/mL i **c)** 50 IU/mL

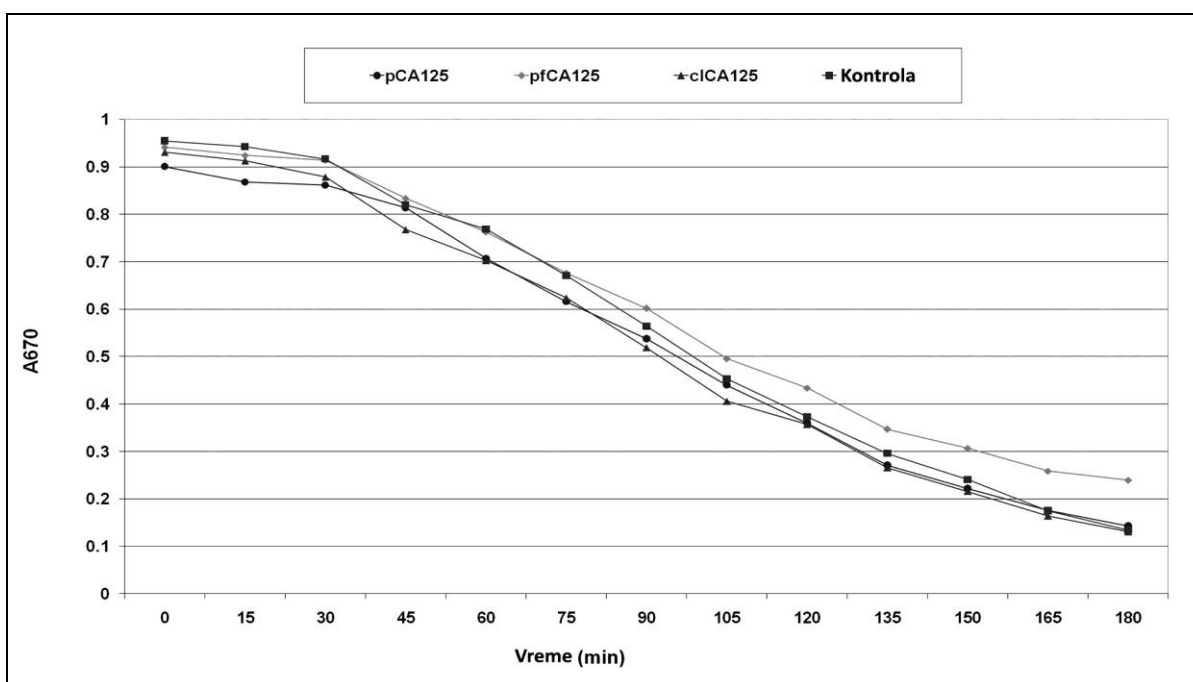
**pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera: **a1)** 20000 IU/mL, **b1)** 5000 IU/mL i **c1)** 500 IU/mL

**clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka: **a2)** 20000 IU/mL, **b2)** 5000 IU/mL i **c2)** 500 IU/mL.

#### 4.2.1.3. Hemoliza eritrocita u prisustvu CA125 antigena

Uticaj CA125 antigena na hemolizu eritrocita, izazvanu SDS-om, prikazan je na **slici 32**.

Nije uočena razlika između kontrole (eritrociti bez dodatih antigena) i eritrocita inkubiranih sa ispitivanim CA125 antigenima, u koncentracijskom opsegu 500-20000 IU/mL.



**Slika 32. Vremenski tok hemolize eritrocita indukovane SDS-om.**

Suspenzija eritrocita je inkubirana sa 125  $\mu$ M SDS u prisustvu odgovarajućeg CA125 antigena (500 IU/mL), na 25°C, uz konstantno mućkanje. Absorbanca na 670 nm je merena u intervalima od 15 minuta.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla

**pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera

**clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka

**Kontrola** - suspenzija eritrocita inkubirana sa 125  $\mu$ M SDS bez dodatog CA125 antigena.

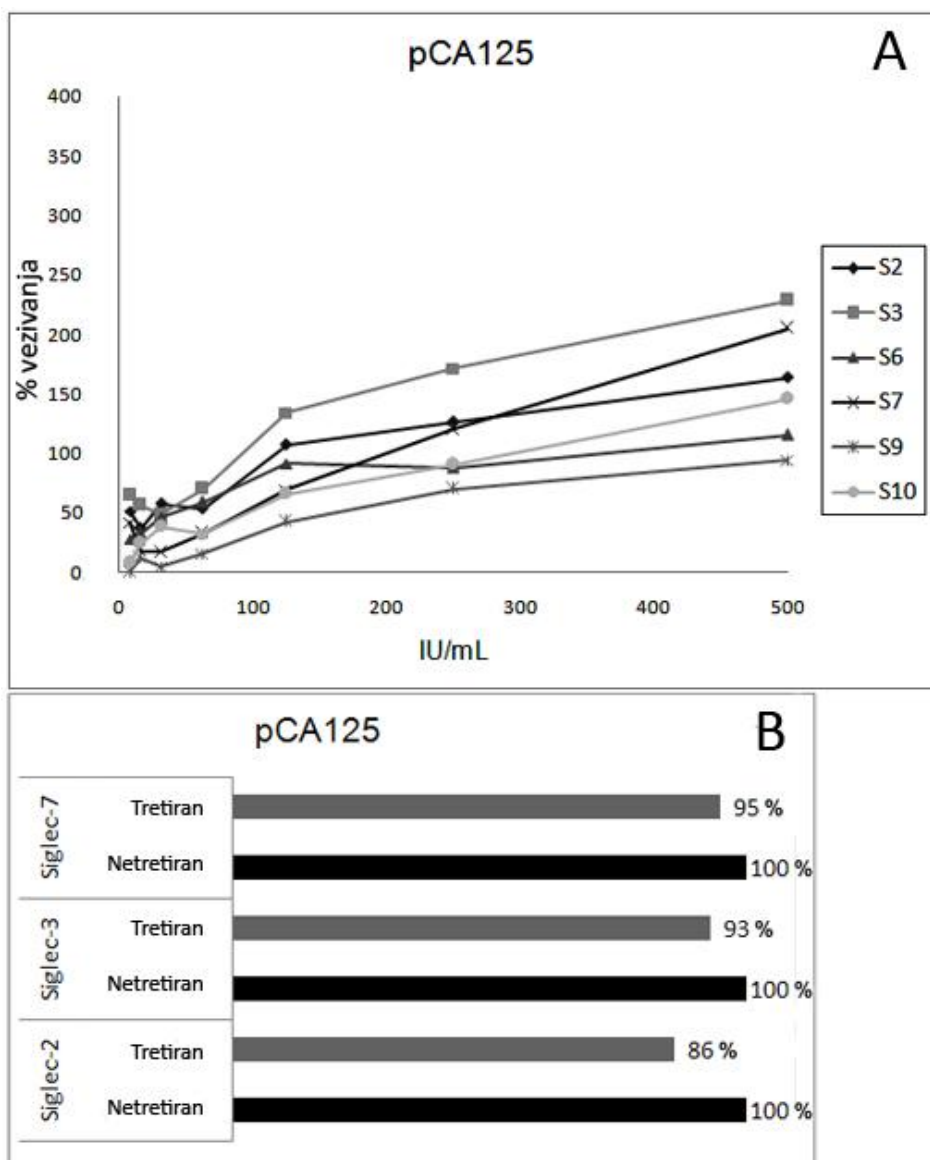
## **4.2.2. Interakcija CA125 antigena sa lektinima i receptorima lektinskog tipa C, eksprimiranim na ćelijama krvnog sistema čoveka**

### ***4.2.2.1. Vezivanje sigleka za CA125 antigen***

Ispitivanje vezivanja sigleka za CA125 antigene različitog porekla, vršeno je u testovima na čvrstoj fazi. Dobijeni rezultati su prikazani na **slikama 33, 34 i 35**. Svi testirani sigleci su pokazali sličnu, umerenu reaktivnost sa pCA125. Međutim, na višim koncentracijama antigena (125-500 IU/mL), siglek-3 i siglek -7, i u manjoj meri siglek-2, bili su reaktivniji od drugih sigleka (**Slika 33, A**). Perjodatni tretman pCA125, redukovao je vezivanje sigleka-2, sigleka-3 i sigleka-7 za 14 %, 7 % i 5 %, redom (**Slika 33, B**).

Za razliku od pCA125, najveći nivo vezivanja za pfCA125, pokazali su siglek-2 i siglek-3, i u manjoj meri siglek-6 (**Slika 34, A**). Perjodatni tretman ovog antigena je smanjio vezivanje sigleka-2 za 18 %, sigleka-3 za 20 % i sigleka-6 za 3 % (**Slika 34, B**).

Siglek-9 i siglek-10 su pokazali izrazitu selektivnost za clCA125 antigen (**Slika 35, A**). U odnosu na pCA125 i pfCA125, perjodatni tretman clCA125 antigena je u znatnoj meri uticao na nivo vezivanja sigleka-9 i sigleka-10, tj. doveo je do redukcije vezivanja za 40 %, odnosno 56 %, redom (**Slika 35, B**).



**Slika 33. Vezivanje sigleka za pCA125 antigen.**

Imobilisani pCA125 antigen (7-500 IU/mL) je inkubiran sa odgovarajućim siglek-Fc himerama, nakon čega su vezani lektini detektovani protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

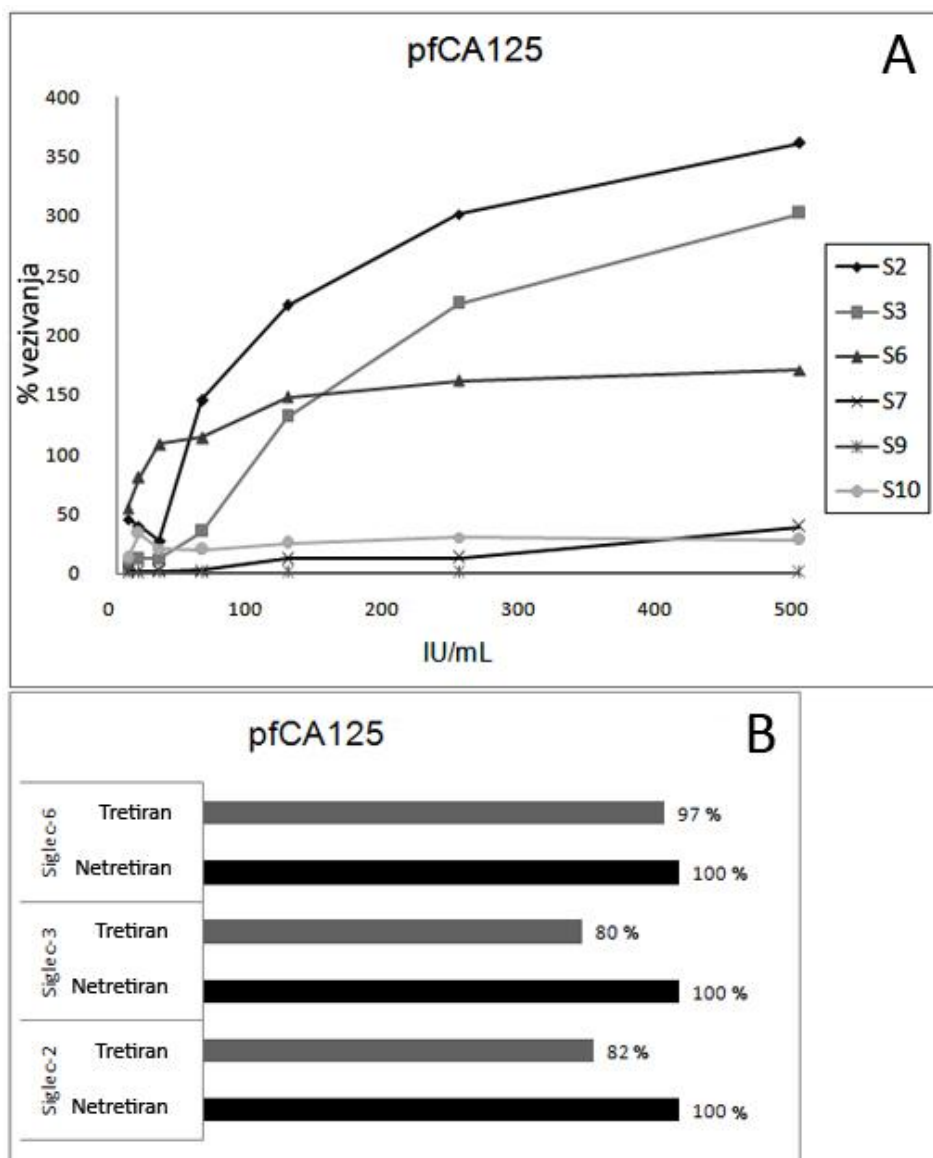
**Panel A:** Nativni pCA125 antigen; vezivanje sigleka je izraženo u procentima, u odnosu na nespecifično vezivanje.

**Panel B:** pCA125 antigen (500 IU/mL) tretiran perjodatom; vezivanje siglek-Fc himera je izraženo kao procenat vezivanja za nativni pCA125 antigen.

Prikazani procenti su srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta. Standardna greška se kreće od 4 %-13 % (podaci nisu prikazani).

pCA125 - antigen fetalnog porekla.

S2 - siglek-2; S3 - siglek-3; S6 - siglek-6; S7 - siglek-7; S9 - siglek-9; S10 - siglek-10.



**Slika 34. Vezivanje sigleka za pfCA125 antigen.**

Imobilisani pfCA125 antigen (7-500 IU/mL) je inkubiran sa odgovarajućim siglek-Fc himerama, nakon čega su vezani lektini detektovani protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

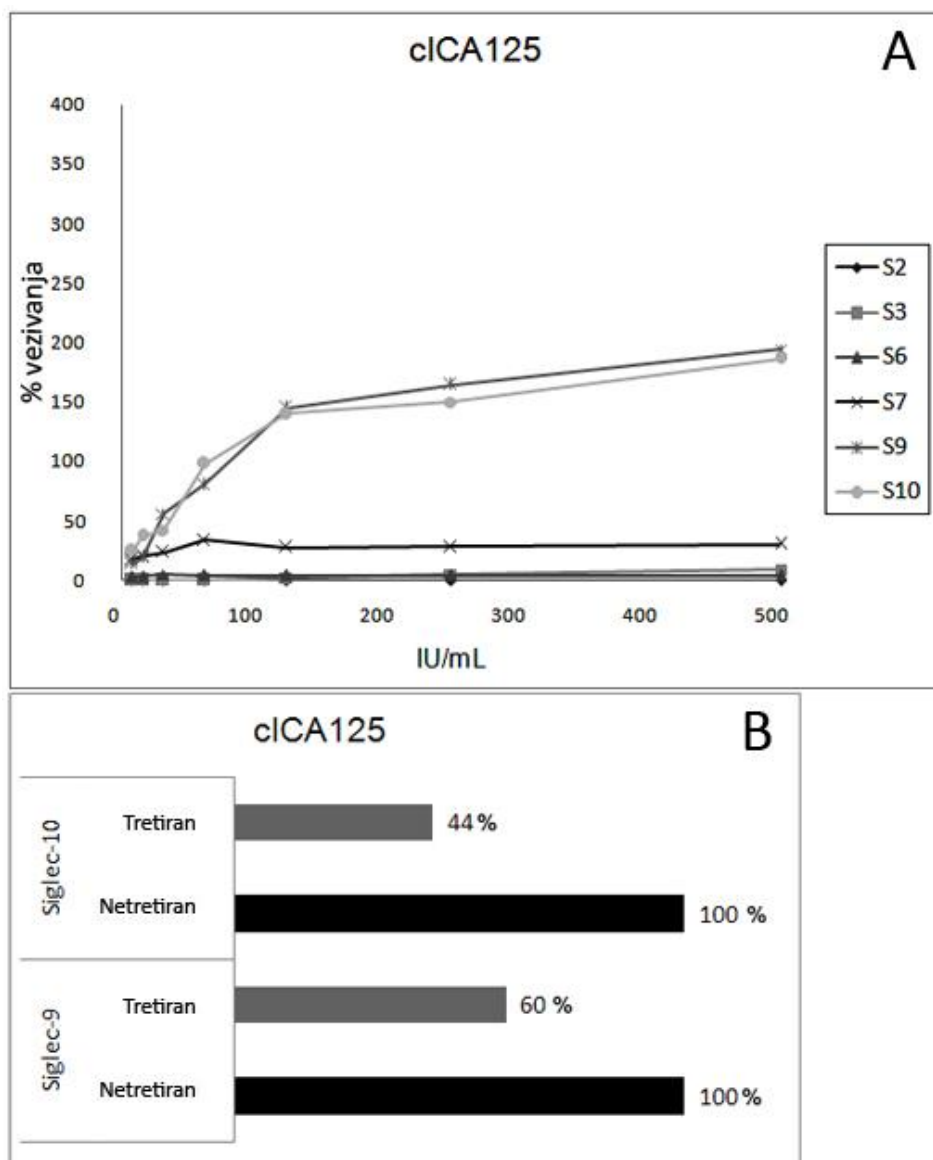
**Panel A:** Nativni pfCA125 antigen; vezivanje sigleka je izraženo u procentima, u odnosu na nespecifično vezivanje.

**Panel B:** pfCA125 antigen (500 IU/mL) tretiran perjodatom; vezivanje siglek-Fc himera je izraženo kao procenat vezivanja za nativni pfCA125 antigen.

Prikazani procenti su srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta. Standardna greška se kreće od 6 %-10 % (podaci nisu prikazani).

pfCA125 - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera.

S2 - siglek-2; S3 - siglek-3; S6 - siglek-6; S7 - siglek-7; S9 - siglek-9; S10 - siglek-10.



**Slika 35. Vezivanje sigleka za clCA125 antigen.**

Imobilisani clCA125 antigen (7-500 IU/mL) je inkubiran sa odgovarajućim siglek-Fc himerima, nakon čega su vezani lektini detektovani Protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**Panel A:** Nativni clCA125 antigen; vezivanje sigleka je izraženo u procentima, u odnosu na nespecifično vezivanje.

**Panel B:** clCA125 antigen (500 IU/mL) tretiran perjodatom; vezivanje siglek-Fc himera je izraženo kao procenat vezivanja za nativni clCA125 antigen.

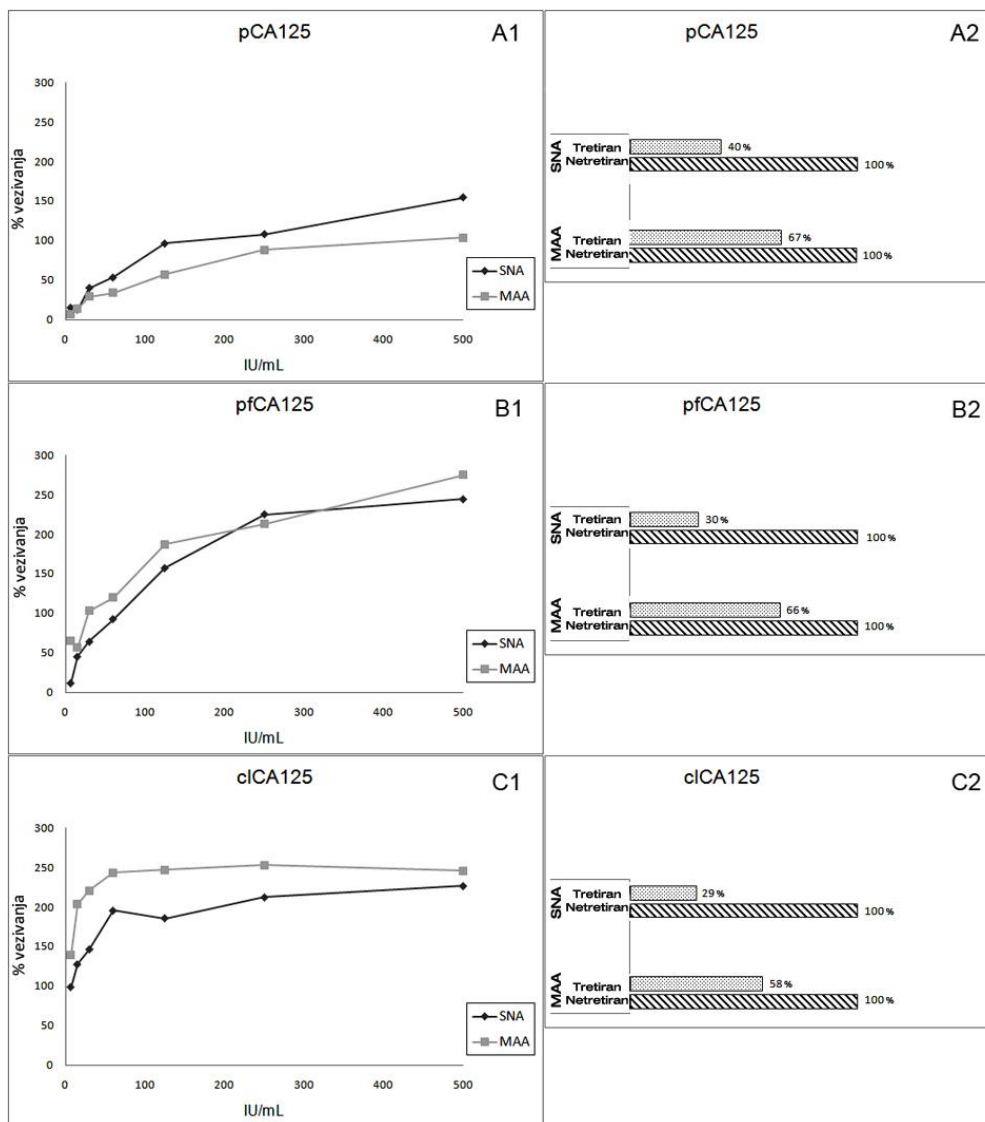
Prikazani procenti su srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta. Standardna greška se kreće od 5 %-12 % (podaci nisu prikazani).

clCA125 - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

S2 - siglek-2; S3 - siglek-3; S6 - siglek-6; S7 - siglek-7; S9 - siglek-9; S10 - siglek-10.

Polazeći od specifičnosti sigleka, paralelno sa ovim eksperimentima, ispitivana je i reaktivnost biljnih lektina: SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), koji vezuje sialinsku kiselinu (Sia) u položaju Sia<sub>2,6</sub>Gal/GalNAc, i MAA II (*Maackia amurensis agglutinin II*), koji vezuje Sia u položaju Sia<sub>2,3</sub>Galβ<sub>1,4</sub>GlcNAc/Glc.

Vezivanje SNA i MAA II, za imobilisane CA125 antigene, prikazano je na **slici 36, A1-C1**. Krive vezivanja lektina za pCA125 (**Slika 36, A1**) i pfCA125 (**Slika 36, B1**) su bile slične u celom testiranom koncentracijskom opsegu, bez obzira na ispitivani lektin, ali sa većim maksimalnim nivoom za pfCA125. Razlika je, takođe, uočena i u odnosu na doznu zavisnost, tj. saturacija vezivanja SNA i MAA II je postignuta na znatno nižim koncentracijama za clCA125 (**Slika 36, C1**). Vezivanje MAA II za clCA125 je bilo veće od vezivanja SNA, ali nije prelazilo maksimalni nivo dobijen za pfCA125. Perjodatni tretman je redukovao vezivanje SNA za 60-70 %, bez obzira na ispitivani antigen (**Slika 36, A2-C2**) i MAA II za 33-42 % (**Slika 36, A2-C2**).



**Slika 36. Vezivanje SNA i MAA II za CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni (7-500 IU/mL) su inkubirani sa biotinizovanim lektinima: SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) ili MAA II (*Maackia amurensis* agglutinin II), dva sata, na sobnoj temperaturi. Nevezani materijal je aspiriran i ispran, a zatim je dodat *Vectastain Elite ABC* reagens i rastvor TMB/supstrata. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**Paneli A1, B1, C1:** Nativni CA125 antigeni; vezivanje SNA i MAA II je izraženo u procentima, u odnosu na nespecifično vezivanje.

**Paneli A2, B2, C2:** CA125 antigeni tretirani perjodatom (500 IU/mL); vezivanje SNA i MAA II je izraženo kao procenat vezivanja za native CA125 antigene. Prikazani procenti su srednje vrednosti dva nezavisna eksperimenta. Standardna greška se kretala od 5 %-17 % (podaci nisu prikazani).

**pCA125** - antigen fetalnog porekla, **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera, **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.



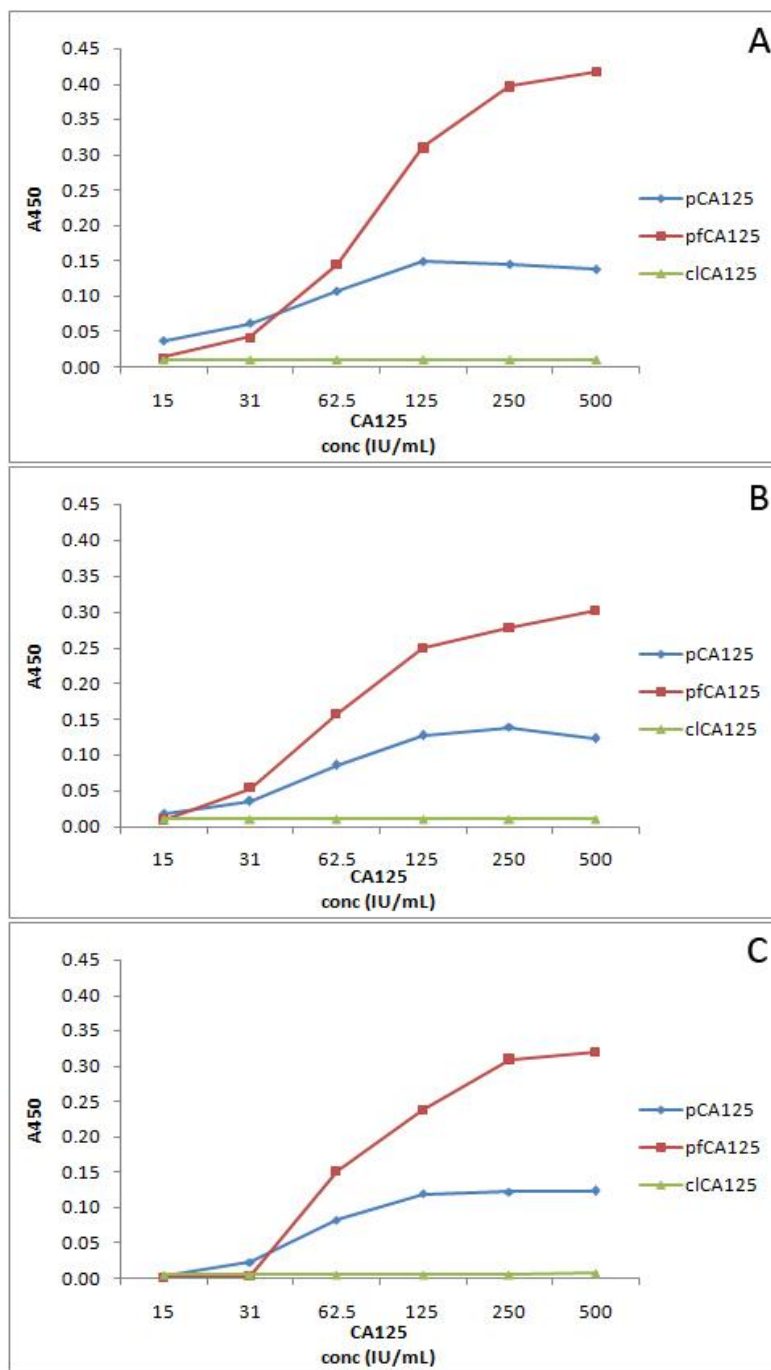
#### **4.2.2.2. Vezivanje receptora lektinskog tipa C za CA125 antigen**

Za ovo ispitivanje su korišćeni sledeći receptori: L-selektin, eksprimiran na leukocitima, E-selektin, eksprimiran na ćelijama endotela, P-selektin, eksprimiran na ćelijama endotela i krvnim pločicama, DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*), eksprimiran na dendritskim ćelijama i manozni receptor makrofaga, MMR (*macrophage mannose receptor*). Interakcija je testirana u sistemima na čvrstoj fazi, korišćenjem imobilisanih CA125 antigena i rekombinantnih molekula tipa himera, koji se sastoje od lektinskog domena, CRD (*carbohydrate recognition domain*) i Fc fragmenta IgG.

##### **4.2.2.2.1. Vezivanje selektina za CA125 antigen**

Krive vezivanja L-, E- i P-selektina za CA125 antigene različitog porekla, su prikazane na **slici 37, A-C**. Utvrđeno je da sva tri selektina reaguju sa pfCA125 i, u manjoj meri, sa pCA125, ali ne i sa clCA125 antigenom (**slika 37, A-C**). U poredjenju sa L- i E-selektinom, koji su reagovali pri koncentraciji 5 µg/mL, P-selektin je postigao isti efekat na nižoj koncentraciji, 0,3 µg/mL (**slika 37, B i C**). Vezivanje selektina za pCA125 i pfCA125 antigene nije se, međutim, moglo inhibirati heparan sulfatom, heparinom, kao ni helirajućim agensom EDTA (rezultati nisu prikazani). S obzirom da su selektini, između ostalog, specifični za sialil-Lewis<sup>x</sup> antigen (SLe<sup>x</sup>), njegovo prisustvo je ispitivano korišćenjem odgovarajućeg monoklonskog antitela. Lektinski blot ispitivanih CA125 antigena, je pokazao da se antitelo na SLe<sup>x</sup> antigen vezuje na dozno zavisani način za pCA125, dok se za pfCA125 i clCA125 ne vezuje (**slika 38**).

U testu na polistirenskoj ploči, ovo antitelo se, takođe, vezuje za pCA125 antigen, i u mnogo manjoj meri za pfCA125 (**slika 39**).



**Slika 37. Vezivanje L-, E- i P-selektina za imobilisani CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa selektin-Fc himera tri sata, na sobnoj temperaturi. Detekcija je vršena protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

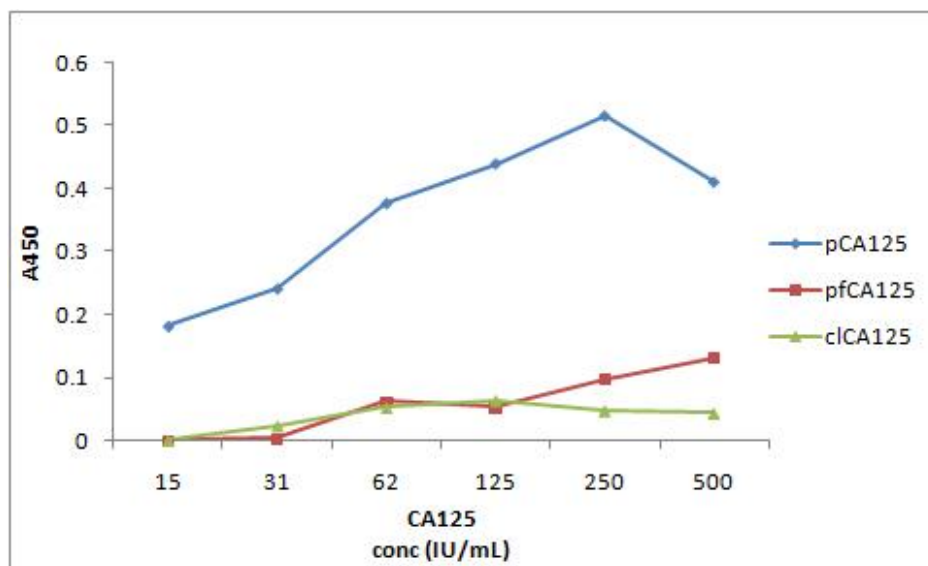
L-selektin (A); E-selektin (B); P-selektin (C).

conc (IU/mL)	1000	500	250
pCA125	+++	++	+
pfCA125	+ -	-	-
clCA125	-	-	-

anti-SLe<sup>x</sup>

**Slika 38. Detekcija SLe<sup>x</sup> epitopa na CA125 antigenu.**

Imobilisani CA125 antigeni (1000-250 IU/mL) su inkubirani sa monoklonskim antitelom na SLe<sup>x</sup>, 2 sata, na sobnoj temperaturi, nakon čega je detekcija vršena sekundarnim biotinizovanim antitelom u sistemu sa *Vectastain ABC* reagensom. Rezultati su vizuelizovani pomoću DAB reagensu.



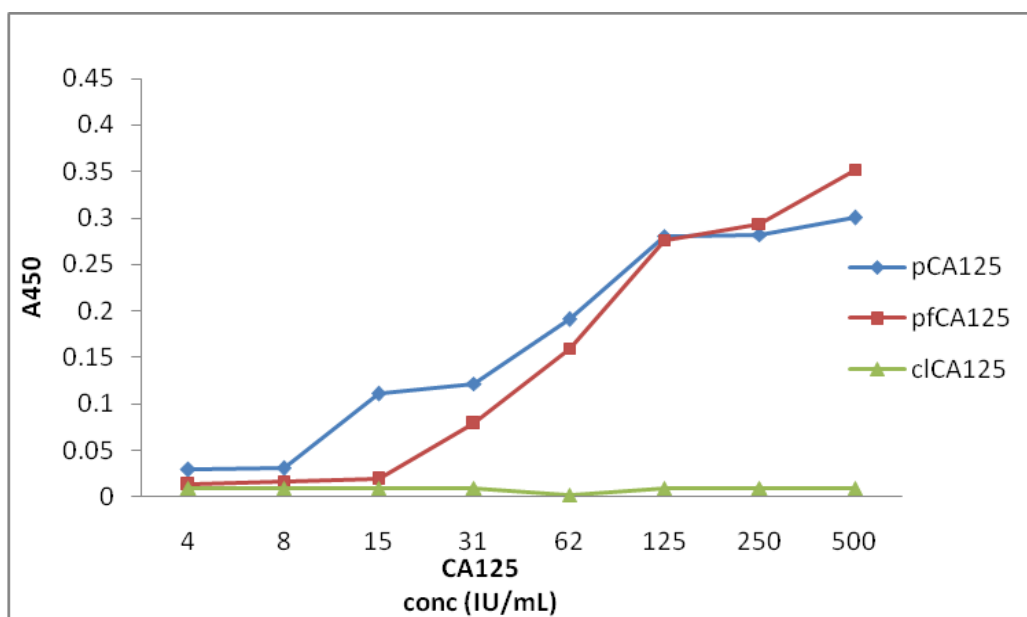
**Slika 39. Vezivanje anti-SLe<sup>x</sup> za CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa antitelom na SLe<sup>x</sup> epitop, tri sata, na sobnoj temperaturi. Detekcija je vršena sekundarnim biotinizovanim antitelom u sistemu sa *Vectastain ABC* reagensom. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

#### 4.2.2.2.2. Vezivanje DC-SIGN za CA125 antigen

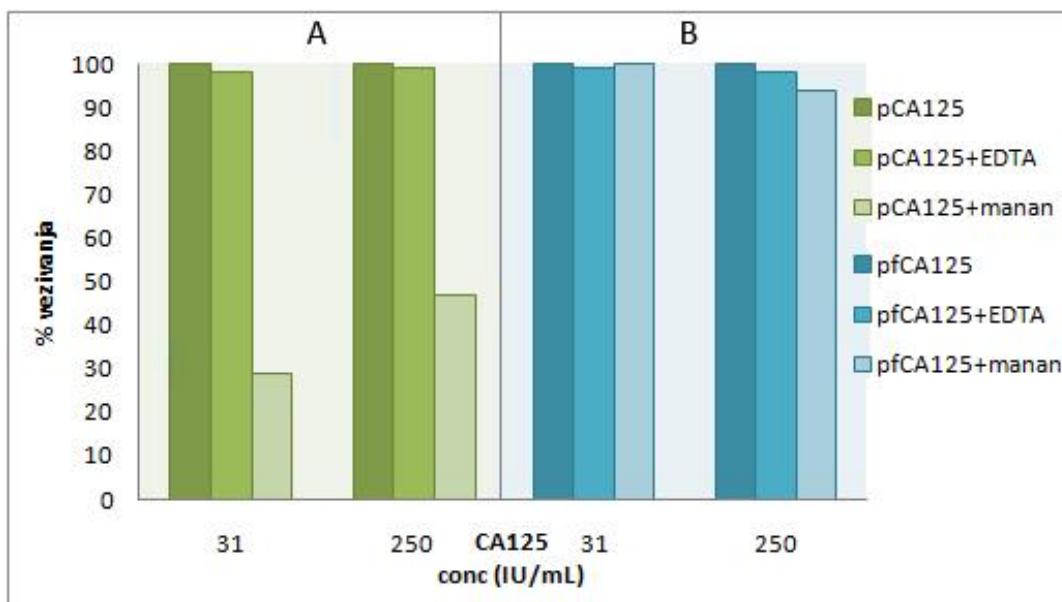
Vezivanje DC-SIGN za imobilisane CA125 antigene je prikazano na **slici 40**. Ustanovljeno je vezivanje za pCA125 i pfCA125 antigen, dok reakcija sa clCA125 nije uočena. Krive vezivanja DC-SIGN za pCA125 i pfCA125 antigene su pokazale međusobnu sličnost u testiranom koncentracijskom opsegu, ali je u testu inhibicije, međutim, uočena razlika u odnosu na tip inhibitora (**slika 41, A-B**).



**Slika 40. Vezivanje DC-SIGN za imobilisani CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa DC-SIGN-Fc himera, tri sata, na sobnoj temperaturi, nakon čega je vezani lektin detektovan protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.



**Slika 41. Inhibicija vezivanja DC-SIGN za imobilisani CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa DC-SIGN-Fc himera, sa ili bez dodatka odgovarajućeg inhibitora, dva sata, na sobnoj temperaturi. Detekcija vezanog lektina je vršena protein A-HRPO. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

Vezivanje je izraženo u procentima, u odnosu na vezivanje CA125 antigena u odsustvu inhibitora

(A) **pCA125** - antigen fetalnog porekla; (B) **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera.

Dok se vezivanje za pCA125 antigen, moglo inhibirati mananom (55-70 %), vezivanje za pfCA125 je bilo u potpunosti očuvano (slika 41). Pored ovoga, helirajući agens nije pokazao efekat ni u jednom slučaju (slika 41).

Rezultati ispitivanja vezivanja DC-SIGN za CA125 antigene su upotpunjeni analizom prisustva specifičnih ugljenohidratnih struktura, koje bi mogle biti odgovorne za lektinsko prepoznavanje. Polazeći od specifičnosti DC-SIGN za manan i terminalne Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) ali i Lewis<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>) antigene, njihovo prisustvo je analizirano korišćenjem monoklonskih antitela na Lewis antigene, kao i LTL (*Lotus tetragonolobus* lektin), biljnog lektina specifičnog za Le<sup>x</sup> i Le<sup>y</sup>.

Antitela na Le<sup>x</sup> i Le<sup>y</sup> antigene, u dot-blotu, su se vezala za pCA125 antigen, i u manjoj meri za clCA125, dok se nisu vezivala za pfCA125 (**slika 42**).

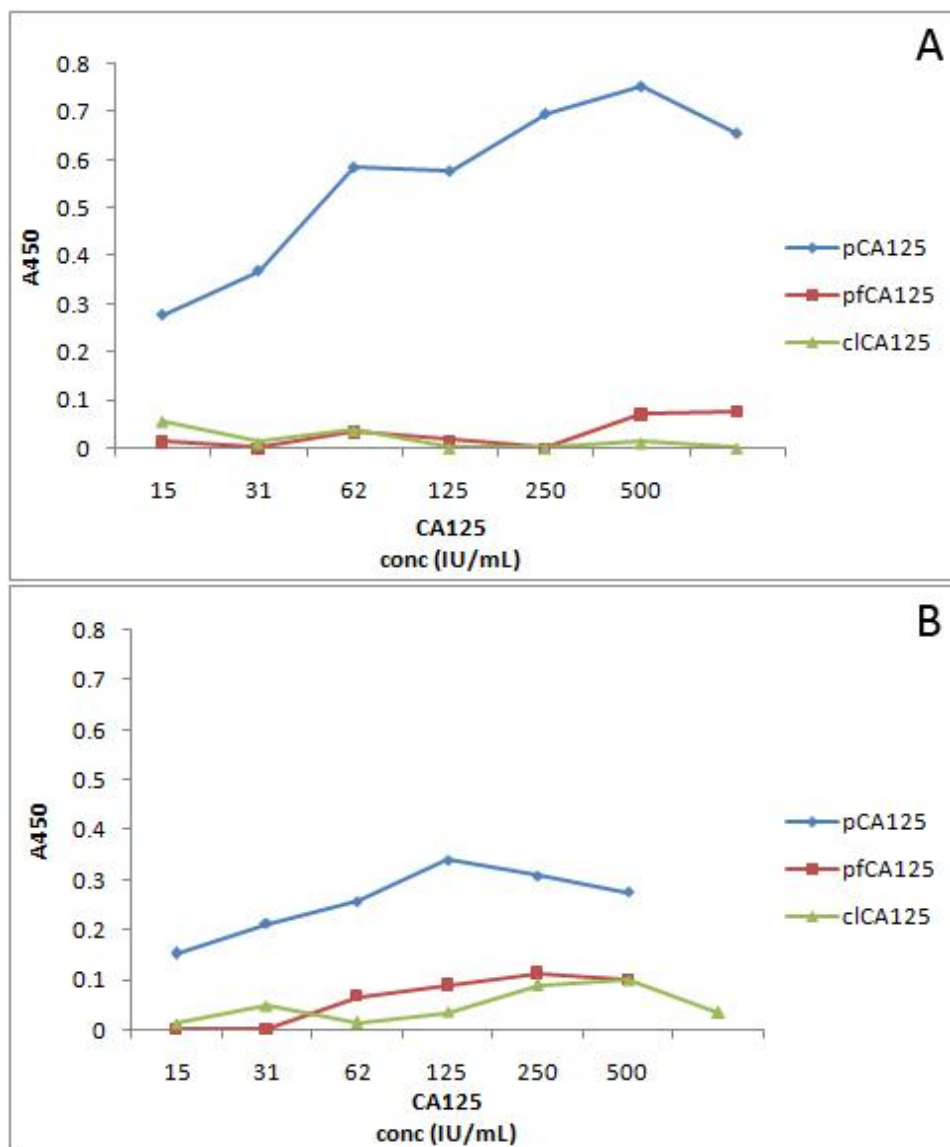
conc (IU/mL)	1000	500	250	1000	500	250
pCA125	+++	++	+	+++	++	++
pfCA125	-	-	-	-	-	-
clCA125	++	+	-	+	+-	-
	anti-Le <sup>x</sup>			anti-Le <sup>y</sup>		

**Slika 42. Detekcija Le<sup>x</sup> i Le<sup>y</sup> epitopa na CA125 antigenu.**

Imobilisani CA125 antigeni (1000-250 IU/mL) su inkubirani sa odgovarajućim monoklonskim antitelima, 2 sata, na sobnoj temperaturi, nakon čega je detekcija vršena sekundarnim biotinizovanim antitelom u sistemu sa *Vectastain* ABC reagensom. Rezultati su vizuelizovani pomoću DAB reagensa.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

U testu na polistirenskoj ploči, oba antitela su se vezala za pCA125 antigen (anti-Le<sup>x</sup>>anti-Le<sup>y</sup>). Vezivanje anti-Le<sup>y</sup> za pfCA125 i clCA125 je bilo veoma nisko, a anti-Le<sup>x</sup> nije dalo merljivu reakciju (**slika 43**).

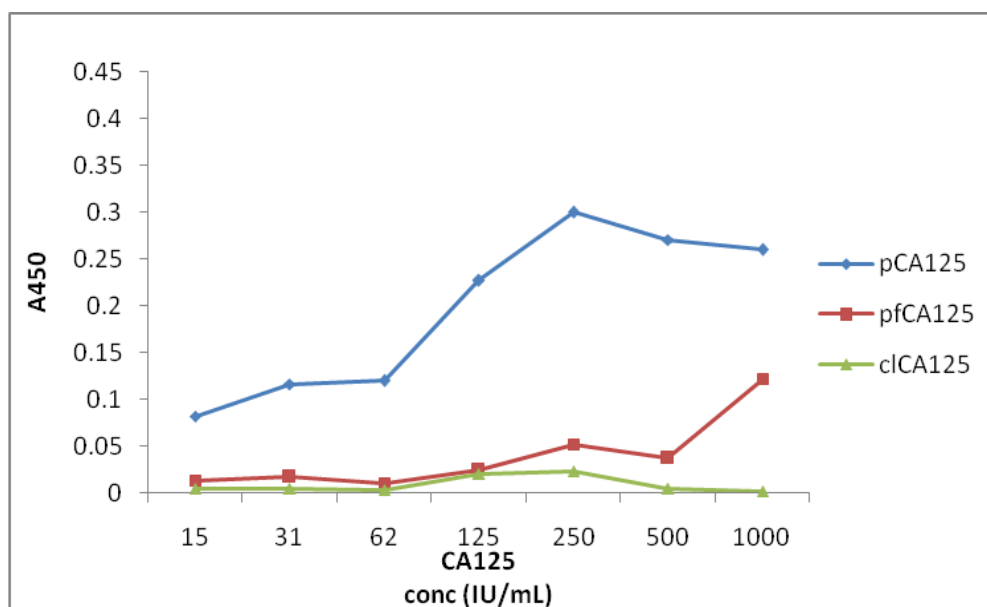


**Slika 43. Vezivanje antitela na Le<sup>x</sup> i Le<sup>y</sup> epitope za CA125 antigen.**

Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa antitelima na Le<sup>x</sup> (A) ili Le<sup>y</sup> (B) epitope, tri sata, na sobnoj temperaturi. Detekcija je vršena sekundarnim biotinilizovanim antitelom u sistemu sa Vectastain ABC reagensom. Izmerena je absorbancija na 450 nm.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

Paralelno sa ovim, u dot-blotu je pokazano da se LTL vezuje na dozno zavisian način za pCA125 i u manjoj meri za clCA125, ali ne i za pfCA125 (rezultati nisu prikazani). U testu na čvrstoj fazi, LTL se vezuje dozno zavisno za pCA125 i u manjoj meri za pfCA125, ali ne i za clCA125 (slika 44).



**Slika 44. Vezivanje LTL (*Lotus tetragonolobus* lektina) za CA125 antigen.**

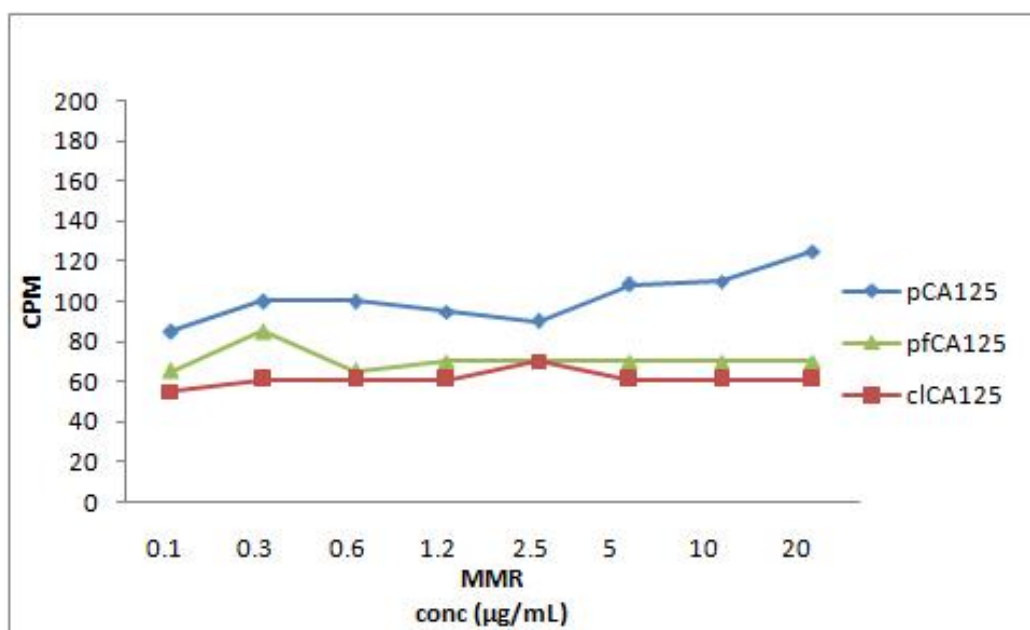
Imobilisani CA125 antigeni su inkubirani sa LTL, jedan sat, na sobnoj temperaturi. Detekcija je vršena Vectastain ABC reagensom. Izmerena je absorbanca na 450 nm.

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.



#### 4.2.2.2.3. Vezivanje MMR za CA125 antigen

Vezivanje MMR za CA125 antigene je ispitivano u testu sa obeleženim antigenima. Dobijeni rezultati su pokazali da, pod datim eksperimentalnim uslovima, MMR ne vezuje ni jedan od ispitivanih antigena (slika 45).



**Slika 45. Vezivanje imobilisanog MMR za CA125 antigen.**

Imobilisani MMR je inkubiran sa radioaktivno obeleženim CA125 antigenima, 6 sati, na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmerena vezana radioaktivnost (CPM, *count per minute*).

**pCA125** - antigen fetalnog porekla; **pfCA125** - antigen iz pleuralne tečnosti osoba obolelih od ovarijalnog kancera; **clCA125** - antigen iz ćelijske linije ovarijalnog kancera čoveka.

## *5. DISKUSIJA*

## 5.1. Bioinformatička analiza

Većina ekstracelularnih proteina u koje spadaju i mucini, sastavljena je od multiplih modula, tj. nezavisnih gradivnih jedinica koje se mogu naći kod funkcionalno različitih proteina. Prisustvo ovih modula, tj. njihova genomska organizacija jeste rezultat kombinovanja gena/egzona. U nekim slučajevima, moduli zadržavaju sličnu funkciju kod različitih proteina, ali se često koriste i kao strukturni obrasci, pa ovaj biološki princip može dovesti do njihove nove funkcije.

U ispitivanju ovakvih proteina, poseban značaj imaju bioinformatičke alatke i kompleksne baze podataka, koje čuvaju informacije dobijene razdvajanjem molekula u manje celine kao što su: domeni/moduli, obrasci, strukturni motivi, konzervirani domeni i slično. Kompjuterske simulacije i predviđanja, kao neizostavan deo interdisciplinarne analize modularnih proteina, tako, mogu dati značajan uvid u njihovu organizaciju, evoluciju i moguću funkciju i asocijaciju sa drugim proteinima. Dobijeni rezultati *in silico* analize proteinske sekvence MUC16/CA125, doveli su ovaj molekul u kontekst modularnih proteina sa anotiranom ulogom u adheziji i srodnim procesima.

Iako je CA125 svrstan u familiju mucina, na osnovu rezultata parcijalnog kloniranja sekvence, on se zbog svojih neobičnih svojstava, kao što je kompozicija N-glikana, ne uklapa u potpunosti ni u jednu od mucinskih klasa. U skladu sa ovim su i dobijeni rezultati koji su ukazali da nije nađena značajnija homologija sekvence MUC16 sa drugim sekvencama koje su svrstane u familiju mucina, ili u druge proteinske familije. Što se tiče prisustva specifičnih domena/obrazaca, detektovani su regioni koji pokazuju udaljenu homologiju sa motivima koji su slični tzv. cink-prstima-*Znf* motivima, kao i motiv sličan

motivu kod IFRD (*Interferon-related developmental regulator*). Postoji veliki broj superfamilija Znf motiva koji variraju kako u sekvenci i strukturi, tako i u sposobnosti vezivanja ciljnih molekula (Laity, 2001), a što se tiče IFRD, pretpostavlja se da on može imati ulogu u signalnoj transdukciji (Latif i sar., 1997) i procesima rane hematopoeze (Buanne i sar., 1998).

Prethodno poređenje sekvenci okarakterisanih mucinskih domena: SEA (*Sea urchin sperm protein, Enterokinaza i Agrin*), NIDO (nidogenski domen), AMOP (adhezioni domen nađen kod MUC4 i drugih proteina) i VWD (*von Willebrand-ov faktor-vWF domen tipa D*) je pokazalo da MUC16/CA125 ima posebno mesto u odnosu na druge transmembranske mucine. Utvrđeno je da je on evoluirao zasebno, pre razdvajanja ptica i sisara, i da, kao takav, ima homologe u ne-sisarskim vrstama (Duraismy i sar., 2006). Zato je u cilju boljeg razumevanja ligandnog kapaciteta CA125 antigena i njegove interpretacije u smislu biološke relevantnosti, polazna tačka daljih ispitivanja bila moguća evolutivna konzerviranost njegovih strukturnih/funkcionalnih domena.

Dobijeni rezultati su ukazali na povezanost/sličnost MUC16/CA125 sa modularnim proteinima iz evolutivno udaljenih taksonomskih kategorija, na osnovu sledećih GO domena: ćelijska komponenta (GO:0005575), biološki proces (GO:0008150) i molekularna funkcija (GO:0003674). Njihove zajedničke karakteristike su obuhvatile ekstraćelijsku lokalizaciju i učešće u različitim tipovima adhezionih procesa, koji se baziraju na interakcijama protein-protein ili protein-ugljeni hidrat.

Ove sličnosti se nisu mogle povezati sa anotiranim domenima iz dostupnih baza podataka, osim parcijalno, ali statistički značajno sa BLLF1, multidomenom karakterističnim za

glikoproteine omotača virusa iz familije *Herpesviridae* – herpes virusi (Marchler-Bauer i sar., 2011). Uvid u sekvence koje pokazuju sličnost sa sekvencom MUC16/CA125, pokazao je da se one, uglavnom, nalaze u ekstracelularnom regionu MUC16, koji je bogat serinom i treoninom. Tandemski ponovci, čija se sekvenca odlikuje visokim sadržajem serina i treonina i intenzivnom O-glikozilacijom, prisutni su kod svih mucina. Oni mogu biti i delovi epitopa, koje prepoznaju antitela na mucine. Za CA125/MUC16, tako, postoje dve klase monoklonskih antitela, koja prepoznaju dva različita epitopa u okviru ovih tandemskih ponovaka: OC125/OC125-slična antitela i M11/M11-slična antitela (O'Brien i sar., 2001; Yin i Lloyd, 2001; Yin i sar., 2002).

Imajući u vidu rezultate dobijene *in silico* analizom, kao i to da je kod nekih pacijenata sa različitim tipovima limfoma B ćelija povećana koncentracija CA125, što se dovodi u vezu sa infekcijom EBV (*Epstein-Barr virus*), ispitivana je unakrsna reaktivnost anti-CA125 antitela (OC125-sličnih i M11-sličnih) sa glikoproteinima virusa iz familije *Herpesviridae* (Bailey i sar., 2003; Hsieh i sar., 2007). OC125-slična, ali ne i M11-slična antitela, dala su merljivu reaktivnost prema antigenima kapsida EBV, ali daleko slabiju u odnosu na reaktivnost sa CA125. Za razliku od ovoga, oba antitela su dala merljivu reaktivnost sa HSV-1 antigenima, s tim da je OC125-slično antitelo pokazalo malo veću reaktivnost, u odnosu na M11-slično antitelo.

Poznat je fenomen da organizmi koji nisu filogenetski bliski, mogu posedovati antigene koji su strukturno slični (Albert i sar., 1999; Rose i Mackay, 2000; Welsh i Fujinami, 2007). Dosadašnja ispitivanja su ukazala na unakrsnu reaktivnost EBV antigena i antigena ovčijih i konjskih eritocita, a postoje i eksperimentalni pokazatelji o unakrsnoj reaktivnosti

antigena iz familije *Candida* i humanih ovarijalnih karcinoma (Schneider i sar., 1998; Hsieh i sar., 2007).

Pokazano je da 4 % od 600 ispitivanih monoklonskih antitela na različite viruse imaju unakrsnu reaktivnost sa tkivom zdravih domaćina (Srinivasappa i sar., 1986). Poznato je, takođe, i da se heterologa imunost može indukovati čak i veoma kratkom sekvencom (npr. šest aminokiselina), zajedničkom za antigene virusa i domaćina. Biološki smisao ovakve unakrsne reaktivnosti, tj. heterologe imunosti uopšte, nije poznat, kao ni to da li ona može imati neke posledice na funkciju odgovarajućih antigena.

Korišćenje BLAST alatke, kao deo strategije za određivanje postojanja opisanih strukturnih/funkcionalnih domena, polazi od osnovne pretpostavke da, što je jedna sekvenca sličnija drugoj sekvenci, to su sličnije i njihove funkcije (Punta i Ofran, 2008; Sleator i Walsh, 2010). Homologija, međutim, ne znači uvek i sličnost u funkciji. Stoga su, pored BLAST alatki, za bioinformatičku analizu CA125 antigena korišćeni softveri za predviđanje funkcije, koji se baziraju i na funkcionalnim terminima u GO (*Gene Ontology*) bazi podataka. Dobijeni rezultati su ukazali na nekoliko GO termina, koji su bili u skladu sa rezultatima BLAST analize.

U GO domenu *molekularna funkcija*, GO termin: vezivanje (GO:0005488), odnosi se na vezivanje nukleotida purina (GO:0017076), jona metala/jona (GO:0046872/GO:0043197) ili šećera (GO:0005529). Predviđena sposobnost vezivanja šećera se odnosi na 1,4 alfa D-glukan (GO:0004339) i hitin (GO:0008061) (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0004339>; <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0008061>). Pored toga, u GO domenu *biološki procesi*, GO termin: ćelijski proces

(GO:0009987) se odnosi na adheziju tipa ćelija-matriks (GO:0007160), a GO termin: fiziološki proces (GO:0007582) se odnosi na rast ćelije (GO:0016049), transport (GO:0006810) i metabolizam (GO:0008152). GO:0016049 je bliže opisan GO terminom: invazivni rast (GO:0001403). Za GO:0006810, anotiran je GO termin: transport katjona (GO:0006812), kao što je npr. transport protona povezan sa ATP sintezom (GO:0015986), dok je za GO:0008152, anotiran GO termin: metabolizam polisaharida (GO:0000272) (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0006812>; <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0015986>).

Bioinformatička analiza je ukazala na moguću korelaciju funkcionalnih aktivnosti, koje se pripisuju domenima bogatim serinom/treoninom kod identifikovanih proteina u okviru ispitivanih taksona, i funkcije CA125 antigena. Ovi domeni, npr., kod identifikovanih proteina kvasca, predstavljaju senzore za ekstraćelijski osmotski pritisak, a kod transmembranskih mucina, u koje spada i CA125, imaju ulogu u monitoringu ekstraćelijskog gradijenta jona i pH (Lo i Dranginis, 1998; Tatebayashi i sar., 2007; Pelaseyed i Hansson, 2011). Ove pretpostavke se mogu potkrepiti postojećim eksperimentalnim podacima, koji ukazuju na vezu između adhezije i transporta jona. Pokazano je da, lokalno, ekstraćelijski nivo pH vrednosti na mestima fokalne adhezije tumora, moduliše jačinu ćelijske adhezije, u smislu da veća koncentracija protona dovodi do jače adhezije i smanjenja migracije (Özkucur i sar., 2010). Ovi procesi mogu uključiti različite molekule, a eksperimenti su potvrdili postojanje proteina, koji ima 40 % identičnu aminokiselinsku sekvencu kao beta subjedinica Na/K-ATPaze, i koga prepoznaju antitela na ovu subjedinicu (Gloor i sar., 1990). Smatra se da adhezivne ili anti-adhezivne osobine

nekih molekula mogu poticati od njegovog uticaja na različite sisteme za transport, kao što su npr. jonske pumpe, kanali ili nosači (Gloor i sar., 1990). Pored toga, dobijeni rezultati sugerišu moguću vezu filamentoznog rasta i formiranja pseudohifa, koji se ostvaruju preko interakcija tipa šećer-supstrat, i polarizovanog rasta i usmerenog kretanja, u kojima učestvuju mucini, u toku normalnog ili neoplastičnog rasta (Cullen i Spraguen, 2002; Bozzuto i sar., 2010).

Vršeno je više eksperimenata u kojima je pokazano da MUC16/CA125 antigen učestvuje u adhezivnim procesima tokom progresije kancera ili embrionalnog razvića, ali odgovarajući mehanizmi nisu, još uvek, u potpunosti razjašnjeni (Seelenmeyer i sar., 2003; Rump i sar., 2004; Patankar i sar., 2005; Gipson i sar., 2008). Na osnovu dobijenih rezultata, uloga CA125 antigena u procesima adhezije bi mogla uključiti i interakcije posredstvom konzerviranih proteinskih sekvenci, odgovornih za jonski transport, i interakcije sa šećernim supstratima, ali o tome ne postoje eksperimentalni podaci. S obzirom da funkcija proteina ima mnogo različitih aspekata, rezultati bioinformatičke analize bi se mogli razmatrati na nivou generalnih principa, na osnovu kojih su različiti proteini, koji mogu biti, a u ovom slučaju i jesu filogenetski udaljeni, srodni na nivou određene GO kategorije (Sleator i Walsh, 2010).

## **5.2. Glikobiohemijska analiza**

Polazeći od mucinske prirode CA125 antigena, kao i fizioloških stanja u kojima je njegova koncentracija u serumu povećana, u prvom delu glikobiohemijske analize, ispitan je uticaj



CA125 antigena na agregaciju, adheziju i hemolizu eritrocita čoveka, o čemu ne postoje literaturni podaci.

Proces agregacije eritrocita uključuje tri koraka: formiranje kratkih linearnih „*rouleaux*“ (*fr. rolne*) od nekoliko ćelija, formiranje dugih „*rouleaux*“ a zatim i razgranatih mreža (Shiga i sar., 1983; Barshtein i sar., 2000). U normalnim fiziološkim uslovima, u zavisnosti od uslova protoka, eritrociti u krvnim sudovima kontinuirano agregiraju i razdvajaju se, a pokazuju i slabe interakcije sa drugim ćelijama krvnog sistema (Barshtein i sar., 2000). U patološkim stanjima, kao što su dijabetes, srpasta anemija, hronična inflamacija ili kancer, ovi procesi se menjaju u zavisnosti od promene membrane eritrocita ili komponenata plazme, pa može doći do povećane agregabilnosti i adhezije za endotelne ćelije i komponente subendotelnog matriksa (Chien i Jan, 1973; Stoltz i Donner, 1987; Jones, 1990).

Mucini u cirkulaciji, generalno, imaju prokoagulatornu ulogu i povećavaju agregabilnost i adhezivnost ćelija krvi (Wahrenbrock i sar., 2003). U ovom radu je nađeno da pCA125 i pfCA125, umereno, povećavaju agregaciju eritrocita, i uspešno inhibiraju njihovu adheziju, a ovi efekti su bili ispoljeni pri znatno nižim koncentracijama pCA125 (do 3,6 puta) u odnosu na pfCA125. Za razliku od njih, clCA125 je pokazao neznatan uticaj na modulaciju ispitivanih osobina eritrocita. Uočeni efekti CA125 antigena na agregaciju i adheziju nisu bili povezani sa osmotskom osetljivošću eritrocita, što je potvrđeno u testu hemolize.

Na površini eritrocita su eksprimirani funkcionalno različiti membranski proteini, uključujući i veliki broj adhezivnih molekula, koji imaju značajnu ulogu u razvoju eritrocita i njihovom odgovoru na spoljašnje stimulse (Steck, 1974; Telen, 2005). S druge strane,

poznato je da CA125 antigen sadrži SEA domene za koje se smatra da učestvuju u regulaciji i vezivanju ugljenohidratnih struktura, kao i ankirinske i leucinom-bogate ponovke, koji učestvuju u protein-protein interakcijama (Sedgwick i Smerdon, 1999; Bennett i Baines, 2001; Maeda i sar., 2004). Pored toga, od ranije je poznato da se CA125 antigeni kancerskog porekla (pfCA125 i clCA125), kao i CA125 antigen fetalnog porekla (pCA125), razlikuju po strukturi proteinskog i glikanskog dela molekula (Janković i Tapušковиć, 2005; Janković i Milutinović, 2008). Imajući sve ovo u vidu, dobijeni rezultati se mogu korelirati sa podacima o tome da mucinska supresija ćelijske agregacije ne mora biti samo posledica njihovog negativnog naelektrisanja i prisustva sijalinske kiseline, budući da tretman neuraminidazom ne dovodi do njene inhibicije (Ligtenberg i sar., 1992). Pretpostavlja se da ona može biti uzrokovana i njihovom rigidnom strukturom, koja maskira ćelijske površinske molekule i na taj način razbija interakcije sa makromolekulima na susednim ćelijama. Sve ovo ostavlja otvoreno pitanje da li se uočeni efekti CA125 antigena, na eritrocite čoveka, javljaju usled interakcija protein-protein, protein-ugljeni hidrat, ili uključuju oba tipa.

Kada je u pitanju cirkulacija, posebno u malim krvnim sudovima, agregacija i adhezivnost su ključne osobine eritrocita, kako sa biološkog, tako i sa medicinskog aspekta (Chien i Jan, 1973). Ranije studije su pokazale da su tokom trudnoće, aglutinacija i agregacija eritrocita povećane, kako u normalnim, tako i u nekim patološkim stanjima, kao što su npr. hipertenzija i preeklampsija (El Bouhmadi i sar., 2000; Gamzu i sar., 2001). Pored toga, pretpostavlja se da su, tokom maligne transformacije, promene u strukturi i sintezi mucina povezane sa oštećenjima vaskularnog tkiva i poremećajima u cirkulaciji (Higes-Pascual i

sar., 2005; Borowski i sar., 2005). Što se tiče CA125 antigena, postoje podaci koji ukazuju na korelaciju visokog nivoa ovog tumorskog markera i rekurentnog ishemijskog moždanog udara kod pacijenata sa ovarijalnim malignitetima (Jovin i sar. 2005).

Smeša abnormalnih kancerskih mucina i njihovih fragmenata može se otpustiti sa ćelije i naći u visokoj koncentraciji u serumu, a adhezivna i agregirajuća svojstva ovakvih mucina, u velikoj meri, mogu uticati na homotipske i heterotipske ćelijske interakcije, koje su značajne za metaboličke, transportne i imunološke procese (Chan i sar., 1999; Kufe, 2009).

Budući da kancerski mucini imaju vezujuća mesta za selektine, lektine eksprimirane na leukocitima, krvnim pločicama i vaskularnom endotelu, njihove interakcije mogu inicirati koagulopatije i formiranje mikrotrombova (Tedder i sar., 1995; Wahrenbrock i sar., 2003), a mucini, u tom slučaju, mogu delovati kao matrica na kojoj se agregiraju aktivirani trombociti (Wahrenbrock i sar., 2003). Zato je neophodno da se pored uticaja na eritrocite, ispita i moguća veza CA125 antigena sa drugim ćelijama krvnog sistema, posebno onim koje eksprimiraju specifične lektinske receptore, uključene kako u adhezivne tako i u imunološke reakcije.

Zbog ekstenzivne glikozilacije, kao i specifičnog ugljenohidratnog sastava, mucini u cirkulaciji mogu biti prepoznati od strane različitih klasa leukocitnih receptora (Borsig i sar., 2001; Wahrenbrock i sar., 2003; Chen i sar., 2012). Među potencijalnim mucinskim receptorima posebno mesto zauzimaju lektini, proteini koji vezuju ugljene hidrate, kao i brojni receptori lektinskog tipa. Sijalinska kiselina, važna strukturna determinanta mucina koja utiče na njihova fizička i funkcionalna svojstva, može delovati kao ligand, ali i kao

sredstvo koje maskira različite antigene determinante koje stupaju u interakcije sa ovim receptorima od kojih su od posebnog značaja sigleci (*Siglec*), podgrupa lektina tipa I kao i selektini, podgrupa lektina tipa C (Tedder i sar., 1995; Varki i Angata, 2006; Varki i sar., 2009).

Sigleci obuhvataju proteine koji nisu antitela i T-ćelijski receptori, a koji prepoznaju ugljene hidrate preko domena sličnog imunoglobulinu (Varki i Angata, 2006). Oni se dele u dve subgrupe, evolutivno konzervirani sigleci u koje spadaju siglek-1, siglek-2 i siglek-4 i subgrupa sigleka koji su slični sigleku-3 tj. CD33, u koje spadaju siglek-3 i siglek-5 - siglek-13 (Varki i Angata, 2006). Smatra se da sigleci prepoznaju sijalinsku kiselinu u različitim tipovima veze i pozicije u oligosaharidnom lancu. Dok evolutivno konzervirani sigleci pokazuju specifičnost prema tačno definisanim ugljenohidratnim strukturama, sigleci slični CD33, mogu prepoznati različite strukturne varijante sijalinske kiseline (Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000; Blixt i sar., 2003).

U ovom radu, interakcija CA125 antigena različitog porekla i sigleka, ispitivana je u testu na čvrstoj fazi korišćenjem rekombinantnih himernih lektina. Ovi lektini se sastoje od domena koji vezuje ugljene hidrate i Fc regiona humanog IgG, a zbog moguće polimerizacije, njihov afinitet za sijalinsku kiselinu se višestruko uvećava, u odnosu na native sigleke (Crocker i Kelm, 1996). Ovakav eksperimentalni sistem je izabran zbog činjenice da su na površini ćelije, koja je prekrivena mnogobrojnim sijaloglikanima, sigleci "maskirani" *cis* ligandima, i da je za njihovu interakciju sa drugim molekulima/ćelijama u *trans* položaju neophodno "demaskiranje" tj. aktivacija, koja se dešava samo u određenim fiziološkim stanjima (Razi i Varki, 1998; Varki i Angata, 2006).

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da postoje specifični obrasci vezivanja sigleka za ispitivane CA125 antigene, kojima se ovi antigeni uspješnije razlikuju u odnosu na njihovo poreklo, nego što se to čini na osnovu obrazaca vezivanja biljnih lektina, takođe, specifičnih za sijalinsku kiselinu (Sia). Naime, od ranije je poznato da je kod CA125 antigena, nađena Sia u oba tipa veze sa Gal/GalNAc, ali da su profili vezivanja biljnih lektina SNA (koji specifično prepoznaje Sia<sub>2,6</sub>Gal/GalNAc) i MAA II (specifično prepoznaje Sia<sub>2,3</sub>Galβ1,4GlcNAc/Glc) međusobno slični (Janković i Milutinović., 2008).

Pod datim eksperimentalnim uslovima, svi testirani sigleci su pokazali detektabilan nivo vezivanja za pCA125. Siglek-2, siglek-3 i siglek-7 su se nešto više vezali za pCA125 antigen u poređenju sa drugim ispitivanim siglecima. Za razliku od toga, pokazano je da su siglek-2 i siglek-3 visoko selektivni za pfCA125, sa većim ukupnim vezivanjem u odnosu na pCA125, dok su siglek-9 i siglek-10 visoko selektivni za clCA125. Sve ove interakcije su u manjoj ili većoj meri bile osetljive na blagi perjodatni tretman, koji dovodi do isecanja glicerolu-sličnog dela molekula sijalinske kiseline (Bock i Kelm, 2006).

Literaturni podaci pokazuju da siglek-2 prepoznaje samo Sia<sub>2,6</sub>Gal, čime se njegova specifičnost dovodi u vezu sa lektinom SNA (Powell i Varki, 1994; Collins i sar., 1997; Varki i Angata, 2006). Uprkos tome što perjodatni tretman liganada inhibira vezivanje oba lektina, značaj prezentacije Sia demonstriran je u ispitivanjima, u kojima je pokazano da oni na različit način aglutiniraju eritrocite ljudi sa različitim krvnim grupama (Brinkman-Van der Linden i sar., 2002). Nađeno je da SNA vezuje Sia nezavisno od prisustva 9-O-acetil grupa, za razliku od sigleka-2, čije je vezivanje blokirano njenom 9-O-acetilacijom (Sjoberg i sar., 1994; Brinkman-Van der Linden i sar., 2002). Vezivanje sigleka-2 za

pCA125 i pfCA125, moglo bi biti u korelaciji i sa podacima o postojanju placentnog IgG sa lektinskom aktivnošću, koji je identifikovan kao ligand za CA125, a koji sa siglekom-2 deli visoki afinitet za ugljenohidratne strukture glikoproteina fetuina (Bock i Kelm, 2006; Milutinović i sar., 2010).

Siglek-2, najvećim afinitetom, vezuje Sia2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, dok siglek-7, za koji je, takođe, pokazano da prepoznaje pCA125, najvećim afinitetom vezuje Sia2,6Gal $\beta$ 1,4Glc (Angata i Varki, 2000). Siglek-3 ima veći afinitet za Sia2,6Gal nego za Sia2,3Gal, prepoznaje sijalil-Tn antigen, a u fiziološkim uslovima, njegovo vezivanje za ove epitope može donekle biti inhibirano 9-O-acetilacijom (Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000; Blixt i sar., 2003). Siglek-6, koji je po strukturi sličan sigleku-3, takođe interaguje sa Sia2,6Gal i veoma selektivno vezuje sijalil-Tn antigen (Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000). Za razliku od drugih sigleka, blagi tretman perjodatom ne utiče na aktivnost sigleka-6, što je bilo u skladu sa rezultatima dobijenim za pfCA125 (Brinkman-Van der Linden i Varki, 2000; Brinkman-Van der Linden i sar., 2002).

clCA125 antigen je, kao ligand, imao potpuno drugačije karakteristike u poređenju sa pCA125 i pfCA125, koji su pokazali sličnost u obrascu vezivanja sigleka. Siglek-9 i siglek-10, ali ne i drugi sigleci, vezali su clCA125 antigen visokim afinitetom. Siglek-9 i siglek-10 prepoznaju i Sia2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc i Sia2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, ali preferiraju Sia2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, koja je prisutna na N-glikanima (Blixt i sar., 2003). Dodatak fukoze i formiranje SLe<sup>x</sup> u potpunosti inhibira siglek-10, dok to nema efekta na aktivnost sigleka-9. Vezivanje sigleka-9 i sigleka-10 je bilo osetljivo na perjodatni tretman, za razliku od

vezivanja MAA II, što je u skladu sa literaturnim podacima o specifičnostima ovih lektina (Brinkman-Van der Linden i sar., 2002).

Za razliku od pCA125 i pfCA125, glikozilacija clCA125 je detaljno analizirana hemijskim metodama koje, u poređenju sa ovde korišćenim, dovode do degradacije molekula. Ranija ispitivanja su pokazala da je sijalinizacija N-glikana clCA125 niska, i da nijedan glikan ne nosi više od jedne Sia (Wong i sar., 2003). Ovo bi moglo biti u korelaciji sa dobijenim rezultatima, s obzirom da siglek-9 i siglek-10 preferiraju monosijalinizovane N-glikane (Blixt i sar., 2003). Međutim, iako je prisustvo Le<sup>x</sup> prethodno dokazano na clCA125, na osnovu dobijenih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi da on sadrži sijalinizovanu formu Le<sup>x</sup> tj. SLe<sup>x</sup> (Wong i sar., 2003).

Dobijeni rezultati se odnose na direktno vezivanje sigleka i CA125 antigena u *in vitro* uslovima, lišeno ćelijskog konteksta u kome se ovi molekuli nalaze, a koji ga može favorizovati ili ometati. Interakcija sigleka i CA125 antigena se može, s jedne strane, posmatrati sa aspekta detekcije njegovih specifičnih glikoformi. Dakle, bez obzira na to koji su njihovi prirodni ligandi, sigleci su pokazali potencijal za diskriminaciju CA125 antigena različitog porekla, što bi bilo od posebnog biomedicinskog značaja za formulaciju specifičnih testova za detekciju i praćenje ginekoloških maligniteta. S druge strane, jedan isti siglek može biti prisutan kod više tipova leukocita (Varki i Angata, 2006), ali distribucija može biti i specifična za određeni tip ćelija, pa bi se potencijal sigleka da interaguju sa CA125 antigenima različitog porekla, mogao dovesti u vezu sa određenim biološkim funkcijama.

Smatra se da sigleci imaju ulogu u regulisanju ćelijske aktivacije u imunskom sistemu, u smislu da deluju kao inhibitorni tj. imunosupresivni receptori. Balansiranje između pozitivne i negativne signalizacije, bazira se na glikanskoj kompoziciji liganada za sigleke. Smatra se da glikani normalnih epitelnih ćelija imaju supresivni efekat na održavanje homeostaze koja se narušava u toku karcinogeneze, kada se sintetišu glikani koji nemaju ligandni kapacitet za pojedine sigleke (Miyazaki i sar., 2012).

Interakcija MUC16/CA125 i endogenih klasa humanih lektina nije detaljno analizirana, ni u *in vitro* ni u *in vivo* sistemima. Rezultati ovoga rada su jasno ukazali na razliku u ligandnom kapacitetu CA125 antigena kancerskog i fetalnog porekla, ali su oba antigena, u odnosu na ekspresiju reaktivnih sigleka (siglek-2, siglek-3, siglek-7, siglek-9 i siglek-10), mogla interagovati sa većim brojem istih tipova leukocita. Siglek-2/CD22 je selektivno eksprimiran na zrelih B-ćelijama, mada najnoviji podaci govore o njegovom prisustvu na bazofilima (Crocker i Varki, 2001; Varki i Angata, 2006). Nasuprot tome, siglek-3/CD33 je prisutan na monocitima/dendritskim ćelijama i makrofagama (Crocker i Varki, 2001; Varki i Angata, 2006). Siglek-9 i siglek-10, koji su pokazali interakciju sa clCA125, eksprimirani su na površini B ćelija, NK ćelija, monocita (Crocker i Varki, 2001; Varki i Angata, 2006). Na neutrofilima je prisutan samo siglek-9, a na bazofilima siglec-10. Siglek-7 koji je pokazao delimičnu selektivnost prema pCA125 eksprimiran je na CD8<sup>+</sup> subsetu T ćelija, monocitima i dendritskim ćelijama. Nedavno je, siglek-9, identifikovan kao receptor za MUC16 na humanim NK ćelijama, B ćelijama i monocitima (Belisle i sar., 2010).

Postoje podaci o tome da CA125 antigen može imati inhibitorni efekat na aktivnost komplementa i citotoksičnu funkciju NK (*natural killer*) ćelija, a pretpostavlja se da se ovi



efekti ostvaruju posredstvom bisektnih biantenarnih N-glikana CA125 antigena (el Ouagari i sar., 1995; Yoshimura i sar., 1996; McDonnel i sar., 2003; Patankar i sar., 2005). Na osnovu ovih podataka, izneta je pretpostavka o mogućoj dualnoj imunološkoj ulozi CA125 antigena u toku maligne transformacije (Patankar i sar., 2005), kao i o njegovoj ulozi u modulaciji imunskog odgovora u toku humane reprodukcije (Clark i sar., 1996a; 1996b; 1997).

Pored sigleka, u cirkulatornom sistemu postoji još jedna specifična grupa proteina koji vezuju Sia. To su selektini (CD62), kalcijum-zavisni lektini tipa C, koji obuhvataju L-selektin, E-selektin i P-selektin. L-selektin (*CD62L, Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 1 - LECAM-1*) je transmembranski receptor leukocita, E-selektin (*CD62E, endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 - ELAM-1*) je eksprimiran na endotelnim ćelijama, koje su aktivirane citokinima tokom inflamatornog procesa, a P-selektin (*CD62P, Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 3 - LECAM-3*) je nađen u  $\alpha$ -granulama krvnih pločica, kao i u Weibel-Palade-ovim telašcima endotelnih ćelija.

U ovom radu, interakcija između selektina i CA125 antigena različitog porekla je ispitivana u testu na čvrstoj fazi, korišćenjem rekombinantnih himernih lektina, po istom modelu kao u i slučaju sigleka. Smatra se da dizajn eksperimentalnog sistema može, u većoj ili manjoj meri, odražavati realnu situaciju, u kojoj selektini, *in vivo*, vezuju svoje oligosaharidne ligande. Zbog toga, interakcije selektina i potencijalnih liganada, koje se detektuju u multivalentnim erezima, u kojima se signali veštački, višestruko amplifikuju npr. imunokompleksima, ne moraju imati biološki značaj (Varki, 1994). U tu svrhu, kao

prikladnije, trebalo bi koristiti interakcije detektovane metodama npr. imunoprecipitacije ili afinitetne hromatografije, koje se zasnivaju na korišćenju monomernih solubilnih selektina (Varki, 1994).

Dobijeni rezultati su pokazali da sva tri ispitivana selektina vezuju, na dozno zavisani način, pCA125 i u manjoj meri pCA125, ali ne i clCA125. Pored toga, zapaženo je da je P-selektin reagovao na znatno nižim koncentracijama (16 puta manjim), nego L- i E-selektin. Poznato je da selektini dele zajedničku specifičnost prema SLe<sup>x</sup> determinanti, NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc i da ona, i srodne determinante, u zavisnosti od tipa ćelija i tkiva, ispoljavaju značajnu molekularnu heterogenost. Korišćenjem monoklonskog antitela, prisustvo SLe<sup>x</sup> antigena, je jasno potvrđeno na pCA125, a nizak, ali detektabilan, nivo reakcije je uočen i sa pCA125. Ovo je u skladu sa podacima koji govore da sama SLe<sup>x</sup> determinanta ne predstavlja efikasan ligand za selektine, već su srodni sijalinizovani i fukozilovani laktozamini neophodne komponente da bi selektini prepoznali svoje ligande kod ljudi (Varki, 1994; Malý i sar., 1996).

U poređenju sa drugim glikozilovanim ligandima, malo se zna o molekularnim mehanizmima koji su relevantni za vezivanje sijalinizovanih glikana (Kelm i sar., 1998). Svim proteinima koji vezuju sijalinsku kiselinu, za njeno prepoznavanje je neophodno prisustvo negativno naelektrisane karboksilne grupe, dok potreba za intaktnim, nemodifikovanim lancem glicerola van prstena (C-7 do C-9), varira u zavisnosti od lektina do lektina. On je, tako, bitan za interakcije sa siglecima, dok je neobavezan za interakcije sa selektinima. Šta više, selektini tolerišu zamenu sijalinske kiseline nekim drugim negativno naelektrisanim glikotopom, kao što su sulfo-strukture.

Pretpostavlja se da postoji više različitih tipova mogućih visoko afinitetnih interakcija selektina sa ligandima (Varki, 1994). Moguća je multivalentna prezentacija liganada i selektina na intaktnim ćelijama, agregacija više selektina za ligand, postojanje većeg broja vezujućih mesta na selektinu, sinergizam peptidnog dela liganda i glikanskih epitopa, a najverovatnije se vezivanje liganada dešava preko grupisanih saharida - „*clustered saccharide patch*“ (Norgard i sar., 1993; Varki, 1994).

Za razliku od sigleka koji nisu vezivali CA125 antigene tretirane perjodatom, što je govorilo u prilog interakcija baziranih na prepoznavanju ugljenih hidrata, interakcija selektina i CA125 antigena se nije mogla inhibirati helirajućim agensom EDTA, kao ni heparin sulfatom ili heparinom, što ostavlja otvoreno pitanje o njenoj prirodi. Ranijim istraživanjima je pokazano da EDTA, kao i heparin, ne moraju, nužno, da dovedu do inhibicije vezivanja selektina za njihove ligande (Varki, 1994; Koenig i sar., 1998). Dok L-selektin, npr. za vezivanje, zahteva mikromolarni nivo slobodnog  $\text{Ca}^{2+}$ , to nije slučaj sa P-selektinom. Pored toga, oba selektina mogu imati mesta za prepoznavanje sulfonovanih liganada, koja nisu striktno zavisna od  $\text{Ca}^{2+}$  jona (Skinner i sar., 1991; Suzuki i sar., 1993; Varki, 1994; Koenig i sar., 1998). Jedno od objašnjenja za ovaj fenomen bi moglo biti ligand-zavisna aktivacija ili „indukovana prilagođenost“ („*induced-fit*“), gde je  $\text{Ca}^{2+}$  neophodan pri inicijalnom vezivanju, ali ne i pri kasnijem održavanju kompleksa (Varki, 1994). Alternativno,  $\text{Ca}^{2+}$  može formirati vrlo jak (visoko afinitetan) kompleks sa ligandom posle inicijalnog vezivanja, koji se potom teško može ukloniti a da ne bude dugo vremena izložen helirajućem agensu.

Kao što je već istaknuto, selektini imaju složenu ugljenohidratnu specifičnost uslovljenu prirodom aktivnog mesta i mogućnošću njegovog konformacionog prilagođavanja različitim ligandima. Stoga postoje značajne razlike u inhibitornom potencijalu heparina i srodnih struktura, čiji ugljenohidratni sastav ne odgovara sastavu definisanih selektinskih liganada (Varki, 1994; Koenig i sar., 1998). Njihov inhibitorni potencijal, tako, varira u zavisnosti da li se vezivanje vrši za sulfo- ili sijalo-grupe.

Selektini, koji su svrstani u familiju CAM proteina (*cell adhesion molecules*), svoju adhezionu sposobnost ispoljavaju u konstitutivnom navođenju limfocita, u inflamatornim procesima i metastazi (Cotran i sar., 1999; Ley, 2003). Malo se zna o ligandima za selektine, a do sada je identifikovano nekoliko molekula. Primarni ligand za P-selektin, koji specifično prepoznaje O-vezane glikane jezgra tipa 2 koji nose SLe<sup>x</sup>, je PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) (Norgard i sar., 1993; Furie i Furie, 1995). Jedan od prvih pronađenih liganda za E-selektin, koji prepoznaje SLe<sup>x</sup>, dvostruko fukozilovan SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup>, 3'-sulfo Le<sup>x</sup>, 3'-sulfo Le<sup>a</sup>, GalNAc-Le<sup>x</sup> (fukozilovani lacdiNAc ili LDNF) i VIM-2 (laktozaminski lanac tipa II sa terminalnom Sia $\alpha$ 2,3 i  $\alpha$ 1,3 vezanom fukozom na unutrašnjem GlcNAc), je glikoprotein ESL-1 (*E-selectin-ligand-1*) (Varki i sar., 2009). L-selektin vezuje GlyCAM-1 (*glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*), CD34 (sialomucin), MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) i PCLP, transmembranski sijalomucin koji je sličan podokaliksину (Imai i sar., 1991; Lasky i sar., 1992; Hemmerich i sar., 1994; Varki i sar., 2009).

Dostupni literaturni podaci govore da, generalno, solubilni mucini ili mucini na površini tumorskih ćelija, mogu reagovati sa selektinima, i na taj način učestvovati u koagulacionim

i/ili imunomodulatornim procesima (Borsig i sar., 2001, 2002; Wahrenbrock i sar., 2003). Što se tiče MUC16, najnovija istraživanja su pokazala da ovaj molekul, eksprimiran na ćelijama kancera pankreasa, predstavlja funkcionalni ligand za L-selektin i E-selektin, ali ne i za P-selektin (Chen i sar., 2012). Ovo je, delimično, u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu, a neslaganja mogu poticati od razlika u poreklu/glikozilaciji ispitivanih antigena, kao i primenjenim eksperimentalnim sistemima. Za razliku od sigleka, od kojih se neki tipovi vezuju za antigen fetalnog porekla, a sasvim drugi za antigen kancerskog porekla, selektini su vezali oba tipa antigena, ali kancerski u većoj meri nego fetalni antigen. Na osnovu uočenog visokog afiniteta P-selektina, CA125 antigen kancerskog porekla bi pre stupio u interakcije sa aktiviranim endotelnim ćelijama ili krvnim pločicama, na kojima je ovaj selektin prisutan, nego sa ćelijama na kojima su prisutni drugi tipovi selektina. Interakcija CA125 antigena i P-selektina bi, na taj način, mogla biti značajan element u regrutovanju tumorskih ćelija u ciljne organe. Vezivanje krvnih pločica za tumorske ćelije koje metastaziraju, odvija se na mestu gde primarni tumor vrši invaziju vaskularnog sistema (Aigner i sar., 1998). Tumorske ćelije u tranzitu kroz cirkulaciju, stižu u ciljni organ, gde se mogu kotrljati na aktiviranom endotelu pre no što bivaju uhvaćene i počnu da proliferišu. CA125 antigen bi mogao, analogo, drugim ligandima za P-selektin da potpomogne kotrljanje tumorske ćelije po endotelu (Aigner i sar., 1998).

Pored sijalinske kiseline, za glikoligandni kapacitet CA125 antigena, važne su i druge strukture, koje bi, u cirkulaciji, mogle stupati u interakcije sa receptorima lektinskog tipa. Za ovo ispitivanje su, kao potencijalno značajni, izabrani: DC-SIGN (*CD209*, *Dendritic*

*cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*) i MMR (CD206), manozni receptor makrofaga. DC-SIGN je kalcijum-zavisni lektin tipa C, na površini dendritskih ćelija (DC), koji vezuje manan i visoko-manozne glikane, kao i glikane sa terminalnim Le<sup>x</sup>/Le<sup>y</sup>/Le<sup>a</sup>/Le<sup>b</sup> antigenima, dok se ne vezuje za sulfo/SLe<sup>x</sup> (Geijtenbeek i sar., 2000a; Mitchell i sar., 2001; van Die i sar., 2002; Appelmelk i sar., 2003). MMR je, takođe, lektin tipa C, koji je prisutan na makrofagama i DC. Osim terminalne manoze, MMR vezuje i fukozu i SLe<sup>x</sup> (Marttila-Ichihara i sar., 2008; García-Vallejo i van Kooyk, 2009).

Rezultati detekcije ugljenohidratnih struktura, koje bi mogle biti odgovorne za lektinski tip receptorskog prepoznavanja CA125 antigena, pokazali su da su one prisutne kod svih ispitivanih antigena. Nivo reaktivnosti antitela na Lewis glikotope/LTL je zavisio, međutim, od primenjenog eksperimentalnog sistema, što se može dovesti u vezu sa podacima o uticaju orijentacije i dostupnosti reaktanata na afinitetne interakcije (Tang i sar., 1998). Ovakva zavisnost se mogla odraziti i na test vezivanja DC-SIGN, kojim je pokazana dozno-zavisna reakcija sa pCA125 i pfCA125, ali ne i sa clCA125. Njena inhibicija mananom, međutim, postignuta je samo u slučaju pCA125. Ovo je u skladu sa saopštenim rezultatima inhibicije interakcije DC-SIGN sa različitim glikoproteinskim ligandima. Pokazano je da je vezivanje DC-SIGN za ICAM-2 i ICAM-3, zavisno od prisustva glikana bogatih manozom, tj. da se može inhibirati mananom, za razliku od vezivanja gp120 glikoproteina omotača HIV-1, koje je nezavisno od njegovih N- ili O-glikana (Curtis i sar., 1992; Geijtenbeek i sar., 2000a; b; c; Geijtenbeek i sar., 2002).

Dok je DC-SIGN, koji specifično vezuje visoko-manozne glikane, pod datim eksperimentalnim uslovima reagovao sa CA125 antigenom, MMR, koji preferira manozu u

terminalnom položaju, nije vezao ni jedan od ispitivanih antigena. Poznato je da glikanska kompozicija CA125 antigena varira u zavisnosti od porekla tj. izvora. CA125 antigen izolovan iz ćelijske linije OVCA433, tako, ima daleko viši sadržaj manoze od CA125 antigena iz ćelijske linije OVCAR-3 (Davis i sar., 1986), koji nosi O-vezane glikane koji su bogati Le<sup>x</sup> i Le<sup>y</sup> antigenima, kao i visoko-manozne N-glikane, koji su slični onim na gp120 glikoproteinu kapsida virusa HIV-a (Mizuochi i sar., 1990; Lloyd i sar., 1997; Kui Wong i sar., 2003). Pored ovoga, pokazano je da CA125 antigen iz amnionske tečnosti ima znatno nižu zastupljenost manoze u odnosu na CA125 antigen iz ćelijske linije OVCAR-3 (Janković i Milutinović, 2008).

Lektini tipa C, generalno, poseduju veći broj vezujućih mesta, čiji afinitet zavisi od malih, finih razlika u sastavu i razgranatosti glikana njihovih liganada. Primarno vezujuće mesto za manozu, kod DC-SIGN, homologo je primarnim vezujućim mestima drugih lektina, koji, takođe, specifično prepoznaju ovaj saharid (Geijtenbeek i sar., 2002). Visoka selektivnost DC-SIGN ili drugih lektina tipa C za pojedine ligande, kao i mehanizam vezivanja, omogućen je i postojanjem sekundarnih vezujućih mesta (Geijtenbeek i sar., 2002). Nedavno je pokazano da se DC-SIGN razlikuje od drugih C-tip lektina po izrazitom grupisanju njegovih monomernih formi, čime se formira tetramerni motiv u obliku kalema (*coiled-coil motif*), koji povećava selektivnost vezivanja ovog lektina za ligande (Mitchell i sar., 2001).

Poznato je da DC-SIGN i MMR, mogu interagovati sa nekim epitelnim mucinima i ćelijama tumorskog porekla (Chieppa i sar., 2003; Monti i sar., 2004; Ruggetti i sar., 2005; García-Vallejo i van Kooyk, 2009; Allavena i sar., 2010). Nađeno je da DC-SIGN deluje

kao receptor za transmisiju mukoznih patogena uključujući i HIV virus. Mucin 6 iz semene plazme, kao i MUC1 iz majčinog mleka, identifikovani su kao molekuli koji se vezuju za DC-SIGN, i na taj način dovode do inhibicije transfera virusa iz dendritskih ćelija u T ćelije (Saeland i sar., 2009; Stax i sar., 2009). Što se tiče manoznog receptora, utvrđeno je da on vezuje MUC1 i tumorski mucin TAG-72 (*tumor-associated glycoprotein-72*). Pored toga, tumorski mucini uključujući i CA125, kod ljudi, mogu indukovati njegovu internalizaciju, i aktivirati imunosupresivni fenotip u tumorskim makrofagama (Allavena i sar., 2010). Poznato je da ekspresija DC-SIGN predstavlja rani odgovor imunog sistema majke na implantaciju embriona, i da su pojedini podtipovi DC, koji se javljaju samo u toku trudnoće, uključeni u perifernu toleranciju, imaju visok nivo proliferacije i nalaze se u upadljivom kontaktu sa podtipovima NK ćelija (Kämmerer i sar., 2003; Breburda i sar., 2006). Uočeno vezivanje pCA125 antigena za DC-SIGN bi, na osnovu ovoga, moglo imati veze sa pretpostavkom da CA125 antigen štiti embrion od napada imunskog sistema majke (Clark i sar., 1996a; 1996b; 1997).

Receptori slični lektinima tipa C imaju važnu ulogu u imunskom sistemu, u smislu posredovanja u interakcijama tipa ćelija-ćelija, tj. u međusobnom kontaktu leukocita ili u njihovom kontaktu sa endotelom, i u vezivanju patogena. Selektini, tako, učestvuju u ćelijskoj adheziji i migraciji, i iniciranju mnogih kritičnih interakcija među ćelijama krvnog sistema. Visok nivo SLe<sup>x</sup> na neutrofilima može biti odgovoran za inicijalno vezivanje za E- i P-selektine na endotelnim ćelijama, i iniciranje procesa kotrljanja (*rolling*). Pokazano je da svaki organ poseduje sopstveni obrazac glikana bogatih SLe<sup>x</sup> ili sulfo-SLe<sup>x</sup>, što sugerije



da svaki organ ima svoj jedinstveni glikanski kod koji je odgovoran za selektivni promet leukocita (Renkonen i sar., 2002).

Nasuprot selektinima, MMR i srodni receptori su specijalizovani za vezivanje i uklanjanje patogena. Između selektina i MMR, nalazi se DC-SIGN koji, međutim, ima dualnu funkciju, i u adheziji i u prepoznavanju patogena i aktivaciji njihove fagocitoze (Cambi i Figdor, 2003). Pored ovoga, interakcija DC-SIGN sa ICAM-2 reguliše kotrljanje DC preko mirujućeg i aktiviranog endotela *in vitro*, kao i transmigraciju DC u periferna tkiva, što ukazuje da DC-SIGN ima ključnu ulogu u procesu specifične migracije DC (Geijtenbeek i sar., 2000; van Kooyk i Geijtenbeek, 2002).

Promene u glikozilaciji liganada za receptore slične lektinima tipa C, direktno utiču na njihovu aktivnost i specifičnost i imaju važne posledice na razvoj, preživljavanje i reaktivnost ćelija krvnog i imunskog sistema. Fiziološki i patološki uslovi koji utiču na izmenu glikozilacije, tako, indirektno utiču i na adhezivna i *homing* svojstva leukocita, i njihovu sposobnost da vezuju patogene. U normalnim fiziološkim uslovima, receptori slični lektinima tipa C deluju u smislu kontrole urođene imunosti i očuvanja homeostaze. U patološkim uslovima, posebno u tumorskoj mikrosredini, u kojoj su prisutni strukturno izmenjeni molekuli, oni dolaze u kontakt sa različitim potencijalnim ligandima, koji mogu ometati aktivaciju protektivnog imunskog odgovora i favorizovati širenje tumora.

Rezultati ovoga rada ukazuju da bi razlike u strukturi/glikozilaciji CA125 antigena, koje se vezuju za posebna fiziološka i patološka stanja, mogle menjati njegov uticaj na ćelije krvnog sistema čoveka i imati značajne biomedicinske posledice u različitim mikrosredinama. Dalji uvid u prirodu i mehanizme multifunkcionalnosti CA125 antigena

zahteva interdisciplinarni pristup baziran na kompleksnim interakcijama koje su posredovane različitim strukturnim domenima.

## *6. ZAKLJUČCI*

### **Bioinformatička analiza**

Rezultati *in silico* analize proteinske sekvence MUC16/CA125, stavili su ovaj molekul u kontekst modularnih proteina sa anotiranom ulogom u adheziji i srodnim procesima.

Pokazana je homologija u sekvenci domena bogatih serinom/treoninom kod MUC16/CA125 i proteina iz evolutivno udaljenih taksona, kao i prisustvo sekvence slične konzerviranom multidomenu glikoproteina omotača virusa iz familije *Herpesviridae*.

Na osnovu korelacije sa vezujućim svojstvima homologih sekvenci, CA125 antigen bi mogao biti uključen u vezivanje/transport jona i proteina, kao i u interakcije sa ugljenohidratnim komponentama.

### **Glikobiohemijska analiza**

CA125 antigen ispoljava efekte na eritrocite čoveka, u smislu umerenog povećanja agregabilnosti i efikasnog smanjenja adhezivnosti na arteficijelne podloge. CA125 antigen fetalnog porekla je, u tom smislu, potentniji od CA125 antigena kancerskog porekla.

Modulacija ispitivanih svojstava eritrocita nije bila povezana sa osmotskom osetljivošću, a sudeći na osnovu strukturnih domena CA125 antigena kao i receptorskog sastava membrane eritrocita, mogla bi se bazirati na interakcijama protein-protein i protein-ugljeni hidrat.

CA125 antigen poseduje ligandni kapacitet za interakcije sa siglecima, lektinima tipa I koji vezuju sijalinsku kiselinu u različitim tipovima veze i pozicije u oligosaharidnom lancu. Siglek-2, iz podgrupe evolutivno konzerviranih sigleka, i siglek-3, siglek-7, siglek-9 i siglek-10, iz podgrupe sigleka koji su slični CD33, su selektivno (u većoj ili manjoj meri ili ekskluzivno), interagovali sa fetalnim i kancerskim CA125 antigenima.

Uočeni obrasci vezivanja sigleka omogućavaju jasnu diferencijaciju porekla CA125 antigena, za razliku od obrazaca vezivanja biljnih lektina, takođe, specifičnih za sijalinsku kiselinu. Sa aspekta detekcije specifičnih glikoformi CA125 antigena, njegova interakcija sa siglecima, može biti od posebnog biomedicinskog značaja, kako za formulaciju specifičnih testova za detekciju, tako i za praćenje ginekoloških maligniteta.

Specifična distribucija sigleka na površini različitih tipova leukocita i njihov selektivni potencijal za interakciju sa CA125 antigenima različitog porekla, mogao bi se dovesti u vezu sa modulacijom njihove funkcije koja, između ostalog, uključuje i regulisanje ćelijske aktivacije u imunskom sistemu. Glikanska kompozicija CA125 antigena koja se menja u različitim fiziološkim stanjima bi, u tom smislu, mogla uticati na imunosupresivna svojstva sigleka ometanjem aktivacije protektivnog imunskog odgovora i favorizovanjem širenja tumora.

Diverzitet sialinske kiseline, važne strukturne determinante CA125 antigena, odgovoran je i za njegov ligandni potencijal za vezivanje selektina (CD62), receptora sličnih lektinima tipa C. Analiza distribucije specifičnih glikotopa koji bi mogli uticati na aktivnost selektina, kao i ispitivanje prirode interakcije u testovima inhibicije, pokazali su da se ona bitno razlikuje od interakcije sa siglecima.

Selektin-L, selektin-E i selektin-P su vezivali CA125 antigen kancerskog porekla u većoj meri nego CA125 antigen fetalnog porekla. Sva tri selektina su reagovala na isti način, ali je afinitet P-selektina bio izrazito veći.

CA125 antigen kancerskog porekla bi, na osnovu razlika u afinitetu selektina, pre stupio u interakcije sa aktiviranim endotelnim ćelijama ili krvnim pločicama, na kojima je prisutan P-selektin, što bi mogao biti značajan element u regrutovanju tumorskih ćelija u ciljne organe.

Uočena je razlika u molekularnoj osnovi interakcije DC-SIGN (*CD209, Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1*), kalcijum-zavisnog lektina tipa C, na površini dendritskih ćelija, i CA125 antigena fetalnog i kancerskog porekla, koja se najverovatnije zasniva na korišćenju različitih vezujućih mesta. Interakcija sa CA125 antigenom fetalnog porekla je zavisna od prisustva glikana bogatih manozom, tj. može se inhibirati mananom, dok je reakcija sa antigenom kancerskog porekla nezavisna od njegovih N- ili O-glikana.

Dualna funkcija DC-SIGN, u procesu specifične migracije DC, koja je zavisna od ugljenohidratne kompozicije odgovarajućih liganada, ili u procesu prepoznavanja patogena, koja ne zavisi od glikanskog sastava, mogla bi se, na osnovu karakteristika interakcije sa CA125 antigenom, specifično menjati u zavisnosti od promene njegove strukture.

Bez obzira na sličnosti sa DC-SIGN, u afinitetu prema visoko manoznim glikanskim strukturama, MMR (CD206), manozni receptor makrofaga, kalcijum-zavisni lektin tipa C, koji je prisutan na makrofagama i DC, nije vezao ni jedan od ispitivanih CA125 antigena.

Promene u glikozilaciji liganada za receptore lektinskog tipa C, direktno utiču na njihovu aktivnost i specifičnost i imaju važne posledice na razvoj, preživljavanje i reaktivnost ćelija krvnog i imunskog sistema. Rezultati ovoga rada ukazuju da bi razlike u strukturi/glikozilaciji CA125 antigena, koje se vezuju za posebna fiziološka i patološka stanja, mogle menjati njegov uticaj na ćelije krvnog sistema čoveka i imati značajne biomedicinske posledice u različitim mikrosredinama.

## *7. LITERATURA*



**Aebischer T, Harbecke D, Ilg T.** Proteophosphoglycan, a major secreted product of intracellular *Leishmania mexicana* amastigotes, is a poor B-cell antigen and does not elicit a specific conventional CD4<sup>+</sup> T-cell response. *Infect Immun*, 1999; **67(10)**:5379-5385.

**Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM.** The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today*, 1998; **4**:397-403.

**Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM.** Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nature Med*, 1998; **4**:43-49.

**Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, Ley K.** CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J*, 1998; **12(12)**:1241-1251.

**Albert LJ, Inman RD.** Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med*, 1999; **341(27)**:2068-2074.

**Alberts B.** Leukocyte functions and percentage breakdown. In: **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell. 4th edition.* New York: Garland Science; 2002.

**Allavena P, Chieppa M, Bianchi G, Solinas G, Fabbri M, Laskarin G, Mantovani A.** Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin Dev Immunol*, 2010; **2010**:547179.

**Altman RB.** Building successful biological databases. *Brief Bioinform*, 2004; **5 (1)**:4-5.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990; **215(3)**:403-410.

**Angata Tand Varki A.** Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiol*, 2000; **10**:431-438.

**Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.; *J Immunol*, 2003; **170(4)**:1635-1639.

**Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, Biswas M, Bucher P, Cerutti L, Corpet F, Croning MD, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Hermjakob H, Hulo N, Jonassen I, Kahn D, Kanapin A, Karavidopoulou Y, Lopez R, Marx B, Mulder NJ, Oinn TM, Pagni M, Servant F, Sigrist CJ, Zdobnov EM.** The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res*, 2001; **29(1)**: 37-40.

**Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 2000; **25(1)**:25-29.

**Asker N, Axelsson MA, Olofsson S O, Hansson GC.** Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, 1998; **273**:18857–18863.

**Attwood TK, Beck ME, Bleasby AJ, Parry-Smith DJ.** PRINTS - A database of protein motif fingerprints. *Nucl Acids Res*, 1994; **22 (17)**:3590-3596.

**Bairey O, Blickstein D, Stark P, Prokocimer M, Nativ HM, Kirgner I, Shaklai M.** Serum CA 125 as a prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2003; **44(10)**:1733-1738.

**Barshtein G, Wajnblum D, Yedgar S.** Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophys J*, 2000; **78(5)**:2470-2474.

**Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC.** Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest*, 1981; **68(5)**:1331–1337.

**Bastian F, Parmentier G, Roux J, Moretti S, Laudet V, Robinson-Rechavi M.** Bgee: Integrating and Comparing Heterogeneous Transcriptome Data Among Species. in *DILS: Data Integration in Life Sciences. Lecture Notes in Computer Science* 2008; **5109**: 124-131.

**Belisle JA, Horibata S, Jennifer GA, Petrie S, Kapur A, André S, Gabius HJ, Rancourt C, Connor J, Paulson JC, Patankar MS.** Identification of Siglec-9 as the

receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Mol Cancer*, 2010; **9**:118.

**Bennett V, and Baines AJ.** Spectrin- and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*, 2001; **81**:1353-1392.

**Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE.** The Protein Data Bank. *Nucl Acids Res*, 2000; **28**:235-242.

**Bhaskar KR, Garik P, Turner BS, Bradley JD, Bansil R, Stanley HE, LaMont JT.** Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature*, 1992; **360**:458-461.

**Blixt O, Collins BE, van den Nieuwenhof IM, Crocker PR, Paulson JC.** Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem*, 2003; **278**:31007-31019.

**Bobek LA, Situ H.** MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; **47**:643-652.

**Bock N, and Kelm S.** Binding and inhibition assays for Siglecs, in: *Glycobiology protocols*, Brockhausen I. Ed., Humana Press, Totowa, 2006, pp.359-375.

**Bork P, Patthy L.** The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci*, 1995; **4**:1421-1425.

**Borowski A, Ghodsizad A.** Gams E. Stroke as a first manifestation of ovarian cancer. *J Neurooncol*, 2005; **71(3)**:267-269.

**Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A.** Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; **98(6)**:3352-3357.

**Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A.** Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; **99(4)**:2193-2198.

**Bourne P.** Will a biological database be different from a biological journal?. *PLoS Comput Biol*, 2005; **1(3)**:179-181.

**Bozzuto G, Ruggieri P, Molinari A.** Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanita*, 2010; **46(1)**:66-80.

**Breburda EE, Dambaeva SV, Slukvin II, Golos TG.** Selective distribution and pregnancy-specific expression of DC-SIGN at the maternal-fetal interface in the rhesus macaque: DC-SIGN is a putative marker of the recognition of pregnancy. *Placenta*, 2006; **27(1)**:11-21.

**Brinkman-Van der Linden ECM, and Varki A.** New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem*, 2000; **275**:8625–8632.

**Brinkman-Van der Linden ECM, Sonnenburg JL, Varki A.** Effects of sialic acid substitutions on recognition by *Sambucus nigra* agglutinin and *Maackia amurensis* hemagglutinin. *Anal Biochem*, 2002; **303**:98-104.

**Buanne P, Incerti B, Guardavaccaro D, Avvantaggiato V, Simeone A, Tirone F.** Cloning of the human interferon-related developmental regulator (IFRD1) gene coding for the PC4 protein, a member of a novel family of developmentally regulated genes. *Genomics*, 1998; **51(2)**:233-242.

**Cambi A, and Figdor CG.** Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*, 2003; **15(5)**:539-546.

**Cebo C, Dambrouck T, Maes E, Laden C, Strecker G, Michalski J-C, Zanetta J-C.** Recombinant human interleukins IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem*, 2001; **276**:5685–5691.

**Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS.** Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer*, 1999; **82**:721–726.

**Chen SH, Dallas MR, Balzer EM, Konstantopoulos K.** Mucin 16 is a functional selectin ligand on pancreatic cancer cells. *FASEB J*, 2012; **26(3)**:1349-1359.

**Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD.** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, 2003; **31(13)**:3497-3500.

**Chien S, and Jan KJ.** Ultrastructural basis of rouleaux formation. *Microvasc Res*, 1973; **5**:155-166.

**Chieppa M, Bianchi G, Doni A, Del Prete A, Sironi M, Laskarin G, Monti P, Piemonti L, Biondi A, Mantovani A, Introna M, Allavena P.** Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol*, 2003; **171(9)**:4552-4560.

**Clark GF, Oehninger S, Patankar MS, Koistinen R, Dell A, Morris HR, Koistinen H, Seppälä M.** A role for glycoconjugates in human development: the human feto-embryonic defence system hypothesis. *Hum Reprod*, 1996a; **11(3)**:467-473.

**Clark GF, Oehninger S, Seppälä M.** Role for glycoconjugates in cellular communication in the human reproductive system. *Mol Hum Reprod*, 1996b; **2(7)**:513-517.

**Clark GF, Patankar MS.** Opinion: Hu-FEDS: in search of 'universal self'. *Mol Hum Reprod*, 1997; **3(11)**:985-987.

**Cohen PA, Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE, Finke JH, Koski GK, Czerniecki BJ, Shu S.** T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. *Crit Rev Immunol*, 2001; **21**:215–248.

**Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM.** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res*, 2009; **37**: 141-145.

**Collins BE, Kiso M, Hasegawa A, Tropak MB, Roder JC, Crocker PR, Schnaar RL.** Binding specificities of the sialoadhesin family of I-type lectins – sialic acid linkage and substructure requirements for binding of myelin-associated glycoprotein, Schwann cell myelin protein and sialoadhesin. *J Biol Chem*, 1997; **272**:16889–16895.

**Cotran RS, Kumar V, Collins T.** In: Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th edition. Philadelphia, Pa, WB Saunders Co, 1999. Page 1425.

**Crocker PR, and Kelm S.** In Weir's Handbook of Experimental Immunology (Herzenberg, L. A., Weir, D. M., and Blackwell, C., eds.) Blackwell Sciences, Cambridge; 1996. pp. 166.1-166.11.

**Crocker PR, and Varki A.** Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol*, 2001; **22(6)**:337-342.

**Cullen PJ, Sprague GF Jr.** The roles of bud-site-selection proteins during haploid invasive growth in yeast. *Mol Biol Cell*, 2002; **13(9)**:2990-3004.

**Davis HM, Zurawski VR Jr, Bast RC Jr, Klug TL.** Characterization of the CA125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 1986; **46(12)**:6143-6148.

**Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, Laine A.** Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol Biol Evol*, 2000; **17**:1175–1184.

**Desseyn JL, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Degand P, Laine A.** Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J Mol Evol*, 1998; **46**:102–106.

**Ding F, Tang P, Hsu MH, Cui P, Hu S, Yu J, Chiu CH.** Genome evolution driven by host adaptations results in a more virulent and antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *BMC Genomics*, 2009; **10**:158.

**Duraisamy S, Kufe T, Ramasamy S, Kufe D.** Evolution of the human MUC1 oncoprotein. *Int. J. Oncology*, 2007; **31**:671–677.

**Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D.** Distinct evolution of the human carcinoma associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16. *Gene*, 2006; **373**:28–34.

**El Bouhmadi A, Laffargue F, Brun JF.** Aggregability and disaggregability of erythrocytes in women suffering from ovarian cancer: evidence for an increased disaggregation threshold. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000; **22**:91-97.

**el Ouagari K, Teissié J, Benoist H.** Glycophorin A protects K562 cells from natural killer cell attack. Role of oligosaccharides. *J Biol Chem*, 1995; **270(45)**:26970-26975.

**Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, Matsumoto T, Matsushima N.** Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins*, 2004; **54(3)**:394–403.

**Finn OJ.** Immunological weapons acquired early in life win battles with cancer late in life. *J Immunol*, 2008; **181**:1589–1592.

**Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A.** The Pfam protein families database. *Nucl Acids Res Datab*, 2010; **38**:211-222.

**Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM.** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 1995; **269(5223)**:496–512.

- Friedl P, Weigelin B.** Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol.* 2008; **9(9)**:960-969.
- Fujita T, Ohara S, Sugaya T, Saigenji K, Hotta K.** Effects of rabbit gastrointestinal mucins and dextran on hydrochloride diffusion in vitro. *Comp Biochem Physiol B*, 2000; **126**:353–359.
- Furie B and BC Furie.** The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost*, 1995; **74(1)**:224-227.
- Gahmberg CG, Valmu L, Tian L, Kotovuori P, Fagerholm S, Kotovuori A, Kantor C, Hilden T.** Leukocyte adhesion--a fundamental process in leukocyte physiology. *Braz J Med Biol Res.* 1999; **32(5)**:511-517.
- Gamzu R, Rotstein R, Fusman R, Zeltser D, Berliner AS, Kupferminc MJ.** Increased erythrocyte adhesiveness and aggregation in peripheral venous blood of women with pregnancy-induced hypertension. *Obstet & Gynecol*, 2001; **98**:307-312.
- García-Vallejo JJ, and van Kooyk Y.** Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. *Immunol Rev.* 2009; **230(1)**:22-37.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins, MR, Appel RD, Bairoch A.** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker. Ed: *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 2005. pp. 571-607.
- Gay NJ, Packman LC, Weldon MA, Barna JC.** A leucine-rich repeat peptide derived from the Drosophila Toll receptor forms extended filaments with a beta-sheet structure. *FEBS Lett*, 1991; **291(1)**:87–91.
- Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, van Kooyk Y.** DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol.* 2000b; **1(4)**:353-357.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y.** DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000c; **100(5)**:587-597.

**Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG.** Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000a; **100(5)**:575-585.

**Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y.** Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem*. 2002; **277(13)**:11314-11320.

**Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Park SY, Watanabe M, Gong J, Hayes DF, Kufe DW, Nadler LM.** Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nature Med*, 1996; **2**: 1367–1370.

**Gipson IK, Blalock T, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Allcorn S, Stavreus-Evers A, Gemzell K.** MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod*, 2008; **78(1)**:134-142.

**Gloor S, Antonicek H, Sweadner KJ, Pagliusi S, Frank R, Moos M, Schachner M.** The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase. *J Cell Biol*, 1990; **110(1)**:165-174.

**Godl K, Johansson ME, Lidell ME, Mörgelin M, Karlsson H, Olson FJ, Gum JR Jr, Kim YS, Hansson GC.** The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J Biol Chem*, 2002; **277**:47248–47256.

**Gorina S, Pavletich NP.** Structure of the p53 Tumor Suppressor Bound to the Ankyrin and SH3 Domains of 53BP2. *Science*, 1996; **274**:1001-1005.

**Greenwood PC, Hunter MW and Glover S.** The preparation of <sup>131</sup>I labelled growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem* 1963; **89**:114–120.

**Hanish F-G, Uhlenbruck G, Dienst C, Stottrop M, Hippauf E.** CA125 and CA19-9: two cancer-associated sialylsaccharide antigens on a mucus glycoprotein from human milk. *Eur J Biochem*, 1985; **149**:323-330.



**Hansen JE, Lund O, Engelbrecht J, Bohr H, Nielsen JO, Hansen JE.** Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Biochem J*, 1995; **308(3)**:801-813.

**Harada N, Iijima S, Kobayashi K, Yoshida T, Brown WR, Hibi T, Oshima A, Morikawa M.** Human IgG<sub>1</sub>Fc binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J Biol Chem*, 1997; **272**:15232–15241.

**Hawkins T, Luban S, Kihara D.** Enhanced automated function prediction using distantly related sequences and contextual association by PFP. *Protein Sci*, 2006; **15(6)**:1550-1556.

**Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, Hinoda Y, Imai K.** MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion*, 2001; **63**:87–92.

**Hemmerich S, Rosen SD.** 6'-sulfated sialyl Lewis x is a major capping group of GlyCAM-1. *Biochemistry*, 1994; **33(16)**:4830-4835.

**Henikoff S, Henikoff JG.** Protein family classification based on searching a database of blocks". *Genomics*, 1994; **19**:97-107.

**Herrmann A, Davies JR, Lindell G, Mårtensson S, Packer NH, Swallow DM, Carlstedt I.** Studies on the “insoluble” glycoprotein complex from human colon. Identification of reduction-insensitive MUC2 oligomers and C-terminal cleavage. *J Biol Chem*, 1999; **274**, 15828–15836.

**Higes-Pascual F, Tello-Blasco S, Fernández-Santos A, Hernández-García M.** Cerebral ischaemia secondary to non-bacterial thrombotic endocarditis as the presenting symptom of an ovarian tumour. *Rev Neurol*, 2005; **41(7)**:404-408.

**Hoffmann W, Jagla W, Wiede A.** Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*, 2001; **16**:319–334.

**Hoffmann W, Jagla W.** Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol*, 2002; **213**:147–181.

**Hogeweg P, Hesper B.** Interactive instruction on population interactions. *Comput Biol Med*, 1978; **8**:319-327.

**Hogeweg P.** Simulating the growth of cellular forms. *Simulation*, 1978; **31**:90-96.

**Hollingsworth MA, Swanson BJ.** Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*, 2004; **4(1)**:45-60.

Holm L, Rosenström P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucl Acids Res*, 2010; **38**: 545-549.

Hsieh WC, Chang Y, Hsu MC, Lan BS, Hsiao GC, Chuang HC, Su IJ. Emergence of anti-red blood cell antibodies triggers red cell phagocytosis by activated macrophages in a rabbit model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Pathol*, 2007; **170**(5):1629-1639.

<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0004339>

<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0008061>

<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0006812>

<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term-details.cgi?term=GO:0015986>

<http://bgee.unil.ch/bgee/bgee>

<http://blast.genome.jp/>

[http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks\\_search.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blocks_search.html)

<http://dragon.bio.purdue.edu/pfp>

<http://elm.eu.org/>

<http://expasy.org/>

<http://expasy.org/tools/protparam.html>

<http://expasy.org/tools/protscale.html>

<http://expasy.org/tools/scanprosite/>

<http://globplot.embl.de/>

<http://jafa.burnham.org/>

<http://motif.genome.jp/>

<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index>

<http://pir.georgetown.edu/iproclass/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR002653>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.geneontology.org/>

<http://www.hiv.lanl.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/tools/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

[http://www.roseindia.net/bioinformatics/bioinformatics\\_tools.shtml](http://www.roseindia.net/bioinformatics/bioinformatics_tools.shtml)

<http://www.uniprot.org>

<http://www.uniprot.org/uniprot/B2ISC7>

<http://www.uniprot.org/uniprot/C8ZAR8>

<http://www.uniprot.org/uniprot/E9P8M0>

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q4L9P0>

**Imai Y, Singer MS, Fennie C, Lasky LA, Rosen SD.** Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol*, 1991; **113(5)**:1213-1221.

**Jankovic MM, and Milutinovic BS.** Glycoforms of CA125 antigen as a possible cancer marker. *Cancer Biomark*, 2008; **4(1)**:35-42.

**Janković MM, and Tapusković BS.** Molecular forms and microheterogeneity of the oligosaccharide chains of pregnancy-associated CA125. *Hum Reprod*, 2005; **20(9)**:2632-2638.

**Janz A, Oezel M, Kurzeder C, Mautner J, Pich D, Kost M, Hammerschmidt W, Delecluse HJ.** Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, 2000; **74(21)**:10142-10152.

**Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CA, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S.** Ab initio prediction of human orphan protein function from post-translational modifications and localization features. *J Mol Biol*, 2002; **319**:1257-1265.

**Jensen LJ, Stærfeldt HH, Brunak S.** Prediction of human protein function according to Gene Ontology categories. *Bioinfor*, 2003; **19**:635-642.

**Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, Carraway KL.** Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific

phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene*, 2002; **21**:7524–7532.

**Jones JG**. New aspects of red cell aggregation. *J R Soc Med*, 1990; **83(10)**:663–664.

**Jovin TG, Boosupalli V, Zivković SA, Wechsler LR, Gebel JM**. High titers of a CA-125 may be associated with recurrent ischemic strokes in patients with cancer. *Neurol*, 2005; **64(11)**:1944-1945.

**Kam JL, Regimbald LH, Hilgers JH, Hoffman P, Krantz MJ, Longenecker BM, Hugh JC**. MUC1 synthetic peptide inhibition of intercellular adhesion molecule-1 and MUC1 binding requires six tandem repeats. *Cancer Res*, 1998; **58**:5577–5581.

**Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kämpgen E**. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol*, 2003; **162(3)**:887-896.

**Kannagi R**. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol*, 2002; **12**:599–608.

**Karunanithi S, Vadaie N, Chavel CA, Birkaya B, Joshi J, Grell L, Cullen PJ**. Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Curr Biol*, 2010; **20(15)**:1389-1395.

**Kelm S, Brossmer R, Isecke R, Gross HJ, Strenge K, Schauer R**. Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur J Biochem*, 1998; **255(3)**:663-672.

**Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A**. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol*, 1999; **155**:461–472.

**Kobayashi K, Ogata H, Morikawa M, Iijima S, Harada N, Yoshida T, Brown WR, Inoue N, Hamada Y, Ishii H, Watanabe M, Hibi T**. Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut*, 2002; **51**:169–176.

**Kobe B, Deisenhofer J.** The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 1994; **19(10)**: 415–421.

**Kobe B, Kajava AV.** The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, 2001; **11(6)**:725–732.

**Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A.** Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest*, 1998; **101(4)**:877-889.

**Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K.** Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 1998; **58**:2014–2019.

**Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J.** Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma*, 1984; **3**:223–232.

**Kufe DW.** Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 2009; **9(12)**:874-885.

**Kui Wong N, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, Morris HR, Clark GF, Dell A, Patankar MS.** Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J Biol Chem*. 2003; **278(31)**:28619-28634.

**Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685.

**Laity JH, Lee BM, Wright PE.** Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*. 2001; **11(1)**:39-46.

**Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS, Koumarianou A, Playford R, Stamp GW.** Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab Invest*, 1999; **79**:537–546.

**Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS.** Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; **93(16)**:8419-8424.

**Lang T, Hansson GC, Samuelsson T.** Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc Natl Acad Sci*, 2007; **104**, 16209–16214.

**Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD.** An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell*, 1992; **69(6)**:927-938.

**Latif F, Duh FM, Bader S, Sekido Y, Li H, Geil L, Zbar B, Minna JD, Lerman MI.** The human homolog of the rodent immediate early response genes, PC4 and TIS7, resides in the lung cancer tumor suppressor gene region on chromosome 3p21. *Hum Genet*, 1997; **99(3)**:334-341.

**Learmonth GS, Love DN, Wellington JE, Gilkerson JR, Whalley JM.** The C-terminal regions of the envelope glycoprotein gp2 of equine herpesviruses 1 and 4 are antigenically distinct. *Arch Virol*, 2002; **147(3)**:607-615.

**Ley K.** The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, 2003; **9(6)**:263-268.

**Lidell, ME, Johansson MEV, Orgelin MM, Asker N, Gum JR, Kim YS, Hansson GC.** The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in Chinese-hamster ovary cells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells. *Biochem J*, 2003; **372**:335–345.

**Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J.** Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res*, 1992; **52(8)**:2318-2324.

**Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ.** GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res*, 2003; **31(13)**:3701-3708.

**Lloyd KO, Yin BW, Kudryashov V.** Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *Int J Cancer*. 1997; **71(5)**:842-850.

**Lo WS, and Dranginis AM.** The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 1998; **9(1)**:161-171.

**Luo B, Liu M, Chao Y, Wang Y, Jing Y, Sun Z.** Characterization of Epstein-Barr virus gp350/220 gene variants in virus isolates from gastric carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Arch Virol*, 2012; **157(2)**:207-216.

**Maeda T, Inoue M, Koshiha S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Motoda Y, Kobayashi A, Hiroyasu F, Shirouzu M, Terada T, Hayami N, Ishizuka Y, Shinya N, Tatsuguchi A, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T, Yokoyama S.** Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16). *J Biol Chem*, 2004; **279**(13):13174-13182.

**Malý P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB.** The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell*, 1996; **86**(4):643-653.

**Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH.** CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 2009; **37**: 205-210.

**Marchler-Bauer A, Bryant SH.** D-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*, 2004; **32**: 327-331.

**Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH.** CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 2011; **39**(Database issue):D225-229.

**Marttila-Ichihara F, Turja R, Miiluniemi M, Karikoski M, Maksimow M, Niemelä J, Martinez-Pomares L, Salmi M, Jalkanen S.** Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking. *Blood*. 2008; **112**(1):64-72.

**McDermott KM, Crocker PR, Harris A, Burdick MD, Hinoda Y, Hayashi T, Imai K, Hollingsworth MA.** Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells. *Int J Cancer*, 2001; **94**:783–791.

**McDonnel AC, Van Kirk EA, Austin KJ, Hansen TR, Belden EL, Murdoch WJ.** Expression of CA-125 by progestational bovine endometrium: prospective regulation and function. *Reprod*, 2003; **126(5)**:615-620.

**Milutinovic BS, Mitic NM, Jankovic MM.** Identification of pregnancy-associated CA125-reactive protein as carbohydrate-binding IgG. *Arch Biochem Biophys*, 2010; **499**:69-76.

**Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K.** A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*. 2001; **276(31)**:28939-28945.

**Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura YI, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R.** Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol*, 2012; **188(9)**:4690-4700.

**Mizuochi T, Matthews TJ, Kato M, Hamako J, Titani K, Solomon J, Feizi T.** Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem*. 1990; **265(15)**:8519-8524.

**Moniaux N, Andrianifahanana M, Brand RE, Batra SK.** Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *B J Canc*, 2004; **91**:1633-1638.

**Moniaux N, Nollet S, Porchet N, Degand P, Laine A and Aubert J-P.** Structural organization and clasification of the human genes. *Front Biosci*, 2001; **6**:1192-1206.

**Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, Pontillo M, Mercalli A, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L.** Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> regulatory dendritic cell. *J Immunol*, 2004; **172(12)**:7341-7349.



**Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C.** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, 1995; **247**:536-540.

**N. Bock and S. Kelm,** Binding and inhibition assays for Siglecs, in: *Glycobiology protocols*, I. Brockhausen, Ed., Humana Press, Totowa, 2006. pp.359-375.

**Nath D, Hartnell A, Happerfield L, Miles DW, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Crocker PR.** Macrophage-tumour cell interactions: identification of MUC1 on breast cancer cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin. *Immunology*, 1999; **98**:213–219.

**Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A.** Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*, 1993; **268(17)**:12764-12774.

**Nustad K, Onsurd M, Jansson B, Warren D.** CA125- epitopes and molecular size. *Int J Biol Mark*, 1998; **13**:196–199.

**O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K.** The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biol*, 2002; **23(3)**:154-169.

**O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L.** The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol*, 2001; **22(6)**:348-366.

**Orengo CA, Bray JE, Buchan DW, Harrison A, Lee D, Pearl FM, Sillitoe I, Todd AE, Thornto JM.** The CATH protein family database: a resource for structural and functional annotation of genomes. *Proteomics*, 2002; **2**:11-21.

**Ozkucur N, Perike S, Sharma P, Funk RH.** Persistent directional cell migration requires ion transport proteins as direction sensors and membrane potential differences in order to maintain directedness. *BMC Cell Biol*, 2011; **12**:4.

**Pagni M, Ioannidis V, Cerutti L, Zahn-Zabal M, Jongeneel CV, Hau J, Martin O, Kuznetsov D, Falquet L.** MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res*, 2007; **35 (Web Server issue)**:433-437.

**Patankar MS, Jing Y, Morrison JC, Belisle JA, Lattanzio FA, Deng Y, Wong NK, Morris HR, Dell A, Clark GF.** Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*, 2005; **99(3)**:704-713.

**Pelaseyed T, Hansson GC.** CFTR anion channel modulates expression of human transmembrane mucin MUC3 through the PDZ protein GOPC. *J Cell Sci*, 2011; **124(18)**:3074-3083.

**Perez BH, Gipson IK.** Focus on Molecules: human mucin MUC16. *Exp Eye Res*, 2008; **87(5)**:400-401.

**Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B.** Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity*, 2002; **17**:107–115.

**Pineo GF, Brain MC, Gallus AS, Hirsh J, Hatton MW, Regoeczi E.** Tumors, mucus production, and hypercoagulability. *Ann N Y Acad Sci*, 1974; **230**:262–270.

**Pineo GF, Regoeczi E, Hatton MW, Brain MC.** The activation of coagulation by extracts of mucus: a possible pathway of intravascular coagulation accompanying adenocarcinomas. *J Lab Clin Med*, 1973; **82**:255–266.

**Powell LD and Varki A.** The oligosaccharide binding specificities of CD22 $\beta$ , a sialic acid-specific lectin of B cells. *J Biol Chem*, 1994; **269**:10628-10636.

**Prasad AS.** Zinc: mechanisms of host defense. *J Nutr*. 2007; **137(5)**:1345-1349.

**Punta M, Ofran Y.** The rough guide to in silico function prediction, or how to use sequence and structure information to predict protein function. *PLoS Comput Biol*, 2008; **4(10)**:e1000160.

**Puntervoll P, Linding R, Gemünd C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, Martin DM, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferrè F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Küster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R, Gibson TJ.** ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003; **31**:3625-3630.

**Razi N, and Varki A.** Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; **95(13)**:7469-7474.

**Renkonen J, Tynninen O, Häyry P, Paavonen T, Renkonen R.** Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am J Pathol*, 2002; **161(2)**:543-550.

**Rose NR, Mackay IR.** Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2000; **57(4)**:542-551.

**Rughetti A, Pellicciotta I, Biffoni M, Bäckström M, Link T, Bennet EP, Clausen H, Noll T, Hansson GC, Burchell JM, Frati L, Taylor-Papadimitriou J, Nuti M.** Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *J Immunol*, 2005; **174(12)**:7764-7772.

**Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A.** Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*, 2004; **279(10)**:9190-9198.

**Sack GH Jr, Levin J, Bell WR.** Trousseau's syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasms: clinical, pathophysiologic, and therapeutic features. *Medicine (Baltimore)*, 1977; **56(1)**:1-37.

**Saeland E, de Jong MA, Nabatov AA, Kalay H, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol Immunol*, 2009; **46(11-12)**:2309-2316.

**Sands BE, Podolsky DK.** The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol*, 1996; **58**:253-273.

**Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M.** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 1977; **265** (5596): 687-695.

**Schneider J, Moragues D, Martínez N, Romero H, Jimenez E, Pontón J.** Cross-reactivity between *Candida albicans* and human ovarian carcinoma as revealed by monoclonal antibodies PA10F and C6. *Br J Cancer*, 1998; **77(6)**:1015-1020.

**Secundino N, Kimblin N, Peters NC, Lawyer P, Capul AA, Beverley SM, Turco SJ, Sacks D.** Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol*, 2010; **12(7)**:906-918.

**Sedgwick SG, and Smerdon SJ.** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, 1999; **24(8)**:311-316.

**Seelenmeyer C, Wegehangel S, Lechner J, Nickel W.** The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci*, 2003; **116(7)**:1305-1318.

**Shiga T, Imaizumi K, Harada N, Sekiya M.** Kinetics of rouleaux formation using TV image analyzer. I. Human erythrocytes. *Am J Physiol*, 1983; **245(2)**:H252-H258.

**Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK.** Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res*, 2004; **64(2)**:622-630.

**Situ H, Wei G, Smith CJ, Mashhoon S, Bobek LA.** Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. *Biochem J*, 2003; **375**:175–182.

**Sjoberg ER, Powell LD, Klein A, Varki A.** Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 $\beta$  can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol*, 1994; **126**:549-562.

**Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC.** GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glyicans. *J Biol Chem*, 1991; **266(9)**:5371-5374.

**Sleator RD, Walsh P.** An overview of in silico protein function prediction. *Arch Microbiol*, 2010; **192(3)**:151-155.

**Sommer P, Blin N, Gott P.** Tracing the evolutionary origin of the TFF-domain, an ancient motif at mucus surfaces. *Gene*, 1999; **236**:133–136.

**Srinivasappa J, Saegusa J, Prabhakar BS, Gentry MK, Buchmeier MJ, Wiktor TJ, Koprowski H, Oldstone MB, Notkins AL.** Molecular mimicry: frequency of reactivity of monoclonal antiviral antibodies with normal tissues. *J Virol*, 1986; **57(1)**:397-401.

**Stax MJ, van Montfort T, Sprenger RR, Melchers M, Sanders RW, van Leeuwen E, Repping S, Pollakis G, Speijer D, Paxton WA.** Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4(+) T-lymphocytes. *Virology*, 2009; **391(2)**:203-211.

**Steck TL.** The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol*, 1974; **62(1)**:1-19.

**Stoltz JF, and Donner M.** Hemorheology: importance of erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol*, 1987; **7**:3–14.

**Suzuki Y, Toda Y, Tamatani T, Watanabe T, Suzuki T, Nakao T, Murase K, Kiso M, Hasegawa A, Tadano-Aritomi K, Ishizuka I, Miyasaka M.** Sulfated glycolipids are ligands for a lymphocyte homing receptor, L-selectin (LECAM-1), Binding epitope in sulfated sugar chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; **190(2)**:426-434.

**Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC, Hiramatsu K.** Whole-genome sequencing of staphylococcus haemolyticus uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol*, 2005; **187(21)**:7292-7308.

**Tanaka S, Podolsky DK, Engel E, Guth PH, Kaunitz JD.** Human spasmolytic polypeptide decreases proton permeation through gastric mucus in vivo and in vitro. *Am J Physiol*, 1997; **272**:G1473–G1480.

**Tang W, Miura T, Nakata M, Kojima N, Mizuochi T.** Binding specificities of lectins to immobilized glycoproteins and oligosaccharides differ from those of immobilized lectins to oligosaccharides. *Acta Med Okayama*, 1998; **52(6)**:311-318.

**Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E.** Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell*, 1987; **50(2)**:203-213.

**Tas SW, Klickstein LB, Barbashov SF, Nicholson-Weller A.** C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion. *J Immunol*, 1999; **163(9)**:5056-5063.

**Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H.** Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J*, 2007; **26(15)**:3521-3533.

**Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK.** The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest*, 1999; **103**:R31–R38.

**Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P.** The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, 1995; **9(10)**:866-873.

**Telen MJ.** Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules. *Transfus Med Rev*, 2005; **19(1)**:32-44.

**Thim L, Madsen F, Poulsen SS.** Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest*, 2002; **32**:519–527.

**Timoshenko AV, Gorudko IV, Maslakova OV, André S, Kuwabara I, Liu FT, Kaltner H, Gabius HJ.** Analysis of selected blood and immune cell responses to carbohydrate-dependent surface binding of proto- and chimera-type galectins. *Mol Cell Biochem*, 2003; **250(1-2)**:139-149.

**Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS.** Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut*, 1999; **44**:636–642.

**Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, McQuilton P, Marygold S, Millburn G, Osumi-Sutherland D, Schroeder A, Seal R, Zhang H.** The FlyBase Consortium. FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucl Acids Res*, 2009; **37**: 555-559.

**Ueda MJ, and Takeichi M.** Two mechanisms in cell adhesion revealed by effects of divalent cations. *Cell Struct Funct*, 1976; **1**:377–388.

**van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJ, Hilkens J, Figdor CG.** Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *J Immunol*, 1993; **151**:767–776.

**Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuning I, Renes IB, Einerhand AW.** MUC2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 2006; **1**:117–129.

**van Die I, van Vliet SJ, Schiphorst WECM, Bank CMC, Appelmelk B, Nyame AK, Cummings RD, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y.** The dendritic cell specific C-type lectin DC-SIGN recognizes Lewis x, a major glycan epitope of *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Glycobiol*. 2002, **12**:641-642.

**van Kooyk Y, and Geijtenbeek TB.** A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev*, 2002; **186**:47-56.

**Van Seunigen I.** The epithelial mucins: structure-function. Roles in cancer and inflammatory disease. Research Signpost, Kerala, India, 2008.

**Varki A, and Angata T.** Siglecs - the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiol*, 2006; **16(1)**:1-27.

**Varki A.** Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91(16)**:7390-7397.

**Varki A.** Selectins. In: **Cummings RD, Lowe JB**, Ed. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Chapter 26.

**Varki A.** Sialic acids. In: **Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME**, editors. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Chapter 15.

**Varki A.** Trousseau's Syndrome: Multiple Definitions and Multiple Mechanisms (Invited Review). *Blood*, 2007; **110**:1723-1729.

**Veelders M, Brückner S, Ott D, Unverzagt C, Mösch HU, Essen LO.** Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; **107(52)**:22511-22516.

**Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L.** Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science*, 2002; **295**:1726–1729.

**von der Lieth C-W, Lütteke T, Martun F.** Bioinformatics for glycobiology and glycomics: an introduction. Wiley-Blackwell, 2009.

**Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A.** Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest*, 2003; **112(6)**:853-862.

**Wellington JE, Allen GP, Gooley AA, Love DN, Packer NH, Yan JX, Whalley JM.** The highly O-glycosylated glycoprotein gp2 of equine herpesvirus 1 is encoded by gene 71. *J Virol*, 1996; **70(11)**:8195-8198.

**Welsh RM, Fujinami RS.** Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. *Nat Rev Microbiol*, 2007; **5(7)**:555-563.

**Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J.** A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell–cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell*, 1996; **7**:565–577.

**Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J.** Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*, 1995; **129**:255–265.

**Whittaker GR, Wheldon LA, Giles LE, Stocks JM, Halliburton IW, Killington RA, Meredith DM.** Characterization of the high Mr glycoprotein (gP300) of equine herpesvirus type 1 as a novel glycoprotein with extensive O-linked carbohydrate. *J Gen Virol*, 1990; **71(10)**:2407-2416.

**Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L.** Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett*, 1997; **408**:121–123.

**Wu CH, Huang H, Nikolskaya A, Hu Z, Barker WC.** The iProClass integrated database for protein functional analysis. *Comput Biol Chem*. 2004; **28(1)**:87-96.

**Wu CH, Xiao C, Hou Z, Huang H, Barker WC.** iProClass: an integrated, comprehensive and annotated protein classification database. *Nucleic Acids Res*, 2001; **29(1)**:52-54.

**Wykes M, MacDonald KP, Tran M, Quin RJ, Xing PX, Gendler SJ, Hart DN, McGuckin MA.** MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 2002; **72**:692–701.

**Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO.** Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer*, 2002; **98(5)**:737-740.

**Yin BW, Lloyd KO.** Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*, 2001; **276(29)**:27371-27375.

**Yoshimura M, Ihara Y, Ohnishi A, Ijuhin N, Nishiura T, Kanakura Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N.** Bisecting N-acetylglucosamine on K562 cells suppresses natural killer cytotoxicity and promotes spleen colonization. *Cancer Res*, 1996; **56(2)**:412-418.

**Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ.** Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* 1969;**30**:148-152.



**Zhang K, Baeckstrom D, Brevinge H, Hansson GC.** Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leukocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *J Cell Biochem*, 1996; **60**:538–549.

**Zhu X, Price-Schiavi SA, Carraway KL.** Extracellular regulated kinase (ERK)-dependent regulation of sialomucin complex/rat Muc4 in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 2000; **19**:4354–4361.

**Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O, Keydar I, Wreschner DH.** Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. *FEBS Lett*, 1994; **356**:130–136.



Ninoslav M. Mitić, rođen je 06.04.1982. godine u Beogradu (Srbija). Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Biologija), upisao je školske 2001/2002 godine. Diplomirao je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9.31, a diplomski rad pod nazivom „Antibakterijsko dejstvo 2-alkiliden-4-oksotiazolidina i ekstrakta ljuspica semena heljde (*Fagopyrum esculentum Moench.*)“ uradio je u Odeljenju za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Školske 2007/2008 godine upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Biologija ćelija i tkiva. Od 2007. godine je zaposlen u Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, na Odeljenju za imunohemiju i glikobiologiju, a u zvanje istraživač saradnik izabran je 2010. godine.

Od 2007. do 2010. godine učestvovao je na projektu B 143048 „Glikani kao molekularni markeri ćelijske funkcije: ekspresija, mikroheterogenost i biosignalna svojstva“ koji je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od 2011. godine angažovan je na projektu 173010 „Strukturna heterogenost i efekti kompleksnih ugljenih hidrata (glikani) kao ključnih komponenti molekuskog raspoznavanja u biološkim sistemima“ koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradio je u Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, na Odeljenju za imunohemiju i glikobiologiju, pod rukovodstvom dr Miroslave Janković, naučnog savetnika.

Do sada je objavio 4 naučna rada u časopisima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Нинослав М. Митић

број уписа ВО 070002

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биоинформатичка и гликобиохемијска анализа модуларне

организације СА125 антигена човека“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанта**

У Београду, 20.09.2012.

Митић Нинослав

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Нинослав М. Митић

Број уписа ВО 070002

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада „Биоинформатичка и гликобиохемијска анализа модуларне организације СА125 антигена човека“

Ментори Др Александра Кораћ, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Мирослава Јанковић, научни саветник, Институт за примену нуклеарне енергије - ИНЕП, Универзитет у Београду

Потписани Нинослав М. Митић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 20.09.2012.

Митић Нинослав

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биоинформатичка и гликобиохемијска анализа модуларне

---

организације СА125 антигена човека“

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 20.09.2012.

Милош Анчић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.