

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja R. Goč

**KARAKTERIZACIJA MOLEKULSKIH
VRSTA SPECIFIČNOG ANTIGENA
PROSTATE ČOVEKA PRIMENOM
IMUNOAFINITETNE HROMATOGRFIJE
NA ČIPU**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Сања Р. Гоч

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МОЛЕКУЛСКИХ
ВРСТА СПЕЦИФИЧНОГ АНТИГЕНА
ПРОСТАТЕ ЧОВЕКА ПРИМЕНОМ
ИМУНОАФИНТЕТНЕ
ХРОМАТОГРАФИЈЕ НА ЧИПУ**

докторска дисертација

Београд, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sanja R. Goč

**CHARACTERIZATION OF MOLECULAR
SPECIES OF HUMAN PROSTATE-
SPECIFIC ANTIGEN BY ON-CHIP
IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI:

Dr Bato Korać, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Miroslava Janković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije, INEP

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Bato Korać, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Miroslava Janković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije, INEP

Dr Ljiljana Hajduković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije, INEP

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen 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 prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovaj doktorski rad izrađen je pod rukovodstvom i uz pomoć dr Miroslave Janković, naučnog savetnika INEP-a, kojoj dugujem najveću zahvalnost na stručnoj pomoći i korisnim savetima, strpljenju i razumevanju tokom svih faza izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem dr Bati Koraću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na oceni ovog rada.

Zahvalnost dugujem i dr Ljiljani Hajduković, višem 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.

KARAKTERIZACIJA MOLEKULSKIH VRSTA SPECIFIČNOG ANTIGENA
PROSTATE ČOVEKA PRIMENOM IMUNOAFINITETNE HROMATOGRAFIJE
NA ČIPU

REZIME

Specifičan antigen prostate (*prostate-specific antigen*; PSA) ili kalikrein 3 (hK3), pripada grupi ekstracelularnih serin-zavisnih proteaza iz porodice kalikreina. PSA u najvećoj meri ekspimiraju epitelne ćelije acinusa i duktusa prostate i periuretralne žlezde, a u manjoj meri i neka druga tkiva. PSA je, u normalnim fiziološkim uslovima, prisutan u semenoj tečnosti u izrazito visokoj koncentraciji za razliku od seruma gde je ona veoma niska. Usled narušene strukture prostate, do koje može doći pri različitim poremećajima i oboljenjima, nivo PSA se u sistemsnoj cirkulaciji znatno povećati pa se on koristi kao serumski biomarker. Brojne studije su pokazale da PSA nije, u striktnom smislu, specifičan samo za prostatu, već da ga ekspimiraju i neka hormon-zavisna tkiva žene, pre svega dojka, endometrijum i ovarijum, kako u normalnom, tako i u patološkim stanjima. Ekspresija gena za PSA je, u tkivu prostate, regulisana androgenima, dok je, u ćelijskim linijama kancera dojke ona posredovana aktivacijom receptora za progesteron, androgene, mineralokortikoide i glukokortikoide, ali ne i receptora za estrogene.

PSA je glikoprotein molekulske mase 28,43 kDa, koji sadrži jedan biantenaran lanac N-acetil-laktozaminskog tipa sa sijalinskom kiselinom na krajevima obe grane. Ovi podaci se odnose na kanonsku sekvencu/strukturu enzimski aktivnog molekula PSA. On se u cirkulaciji nalazi u kompleksima sa inhibitorima proteaza kao što je α_1 -antihimotripsin (ACT) ili α_2 -makroglobulin, ali pored njega postoje i molekuli PSA koji nemaju enzimsku aktivnost ili je ona znatno smanjena. Njihova zastupljenost u kompleksima je niska i oni predstavljaju formu slobodnog PSA (fPSA).

Za razliku od ispitivanja PSA formi, njegove pojedinačne molekulske vrste koje pripadaju ovim formama do sada nisu bile predmet sistematske analize. Proteinska vrsta je najmanja strukturna i funkcionalna jedinica proteoma i označava jedan individualan protein iz familije proteina koji kodira pojedinačan gen. Ispitivanje specijacije proteoma i kinetike njegovih proteinskih vrsta se nalazi u fokusu savremenih proteomskih istraživanja. Cilj ove doktorske disertacije je da se ustanovi profil molekulskih vrsta

PSA u subproteomima klinički relevantnih bioloških tečnosti: serum, urin i semena plazma.

U ovom radu su korišćeni uzorci seruma osoba sa benignom hiperplazijom prostate, kancerom prostate, zdravih ženskih osoba i ženskih osoba sa kancerom dojke. Pored toga, ispitani su urin i semena plazma (SP) zdravih muških osoba, kao i prvi internacionalni standard fPSA, koji predstavlja prečišćeni preparat PSA poreklom iz semene plazme. Analizirani su nefrakcionisani uzorci ili uzorci seruma razdvojeni gel filtracijom u frakcije koje sadrže PSA u imunskom kompleksu sa imunoglobulinom M (PSA-IgM), PSA u kompleksu sa ACT (PSA-ACT) ili slobodan PSA (fPSA). Imunoafinitetna hromatografija odgovarajućih frakcija je vršena na biohemijskoj površini koja je dobijena imobilizacijom monoklonskog antitela prema epitopu I molekula PSA, na preaktiviranom proteinskom čipu, PS20. Jonoizmenjivačka hromatografija je vršena na čipu sa inkorporiranim amonijumovim jonima, Q10 ili karboksimetil grupom, CM 10. Detekcija proteina na čipu je bila bazirana na SELDI-TOF (*Surface enhanced laser desorption / ionization – time of the flight*) masenoj spektrometriji, a dobijeni spektri su analizirani primenom softvera *Ciphergen Express Software 3,0*. Za bioinformatičko predviđanje sastava i strukture glikana detektovnih fPSA-imunoreaktivnih vrsta su korišćeni softveri: *PeptideMass*, *GlycanMass* i *GlycoWorkBench*. Alatka *PeptideMass* je bila korišćena za izračunavanje mase peptidnih fragmenata ili celog polipeptidnog lanca PSA na osnovu poznate amnokiselinske sekvence. Alatka *GlycanMass* je korišćena za izračunavanje teorijske mase oligosaharidne strukture koja je pridružena molekulskim vrstama PSA uočenim u odgovarajućim masenim spektrima. Program *GlycoWorkBench* je upotrebljen za crtanje oligosaharidnih struktura PSA glikoforni.

Dobijeni rezultati su pokazali da se fPSA-imunoreaktivne molekulske vrste u serumu, na osnovu molekulske mase i pretpostavljene glikozilacije, mogu grupisati u četiri glikopeptidne grupe: gp28 (26,6-29,6 kDa), gp22 (20,9-23,1 kDa), gp18 (17,1-18,6 kDa) i gp12 (12,2-12,7 kDa). Pored toga, uočeno je prisustvo brojnih molekulskih vrsta na 24-25,7 kDa, 19,8-20,0 kDa i 13,5-16,3 kDa koje bi mogle predstavljati produkte fragmentacije glikozilovanog ili neglikozilovanog zrelog ili „nicked“ PSA.

Procena glikozilacije odgovarajućih molekulskih vrsta, izvršena na osnovu izračunate mase njihovog glikana, ukazala je na postojanje mono-, bi- i triantenarnih oligosaharidnih lanaca u okviru grupe gp28, kao i oligomanoznih struktura u grupi gp18. U grupi gp28, mikroheterogenost se mogla dovesti u vezu sa razlikama u sijalinizaciji, fukozilaciji i prisustvu bisektnog GlcNAc, a u okviru grupe gp18 sa razlikama u broju manosa u oligomanoznom lancu.

Profili fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz fPSA frakcija BPH- i PCa-seruma, su pokazali visok stepen sličnosti, posebno u grupi gp28. Najdominantnija razlika je uočena u slučaju vrste na 27595,81 Da koja je bila prisutna samo kod BPH-seruma i kojoj je pridružen monoantennaran N-glikan. Pored ovoga, prisustvo molekulskih vrsta malih masa, pre svega onih u grupi gp22, bilo je izraženije kod BPH. Najveći broj ovih vrsta je poticao od “*nicked*” PSA koji ima prekid između Lys145/Lys146 (gp18) ili Lys182/Ser183 (gp22).

Pokazano je da u sastav kompleksa sa IgM kod BPH i PCa, predominantno ulaze molekulske vrste “*nicked*” PSA koji ima prekid između Lys145/Lys146, a za koje je procenjeno da sadrže oligomanozni N-glikan. Uočene razlike između BPH i PCa su se odnosile na prisustvo molekulske vrste na 26889,27 Da u PCa PSA-IgM kompleksu, kojoj je pridružena paucimanozna struktura.

Nije dobijen detaljan uvid u molekulske vrste PSA koji se oslobađa iz kompleksa sa ACT, s obzirom na to da su one detektovane kao autoproteolitički fragmenti. Isto važi i za urinarni PSA čiji se profil znatno razlikovao od profila serumskog PSA, a koji su karakterisale dominantne molekulske vrste malih masa koje bi mogle biti rezultat proteolize ili autoproteolize.

Za ekstraprostatičan PSA, u serumu zdravih ženskih osoba kao i ženskih osoba sa kancerom dojke, bilo je karakteristično prisustvo glikopeptidnih i peptidnih grupa u koje su svrstane i molekulske vrste prostatičnog PSA. Najizrazitija razlika se odnosila na gp18, koja je bila prisutna u PCa serumima, a koja nije detektovana u BCa serumima ili je bila na granici detekcije u serumima zdravih ženskih osoba. Procena glikozilacije PSA kod BCa je ukazala na prisustvo tri- i tetraantennarnih lanaca kod molekulskih vrsta na 12,6 kDa, 23,1 kDa i 29,6 kDa koje su bile karakteristične za BCa-serume, a nisu detektovane kod PCa.

Sumarni rezultati ovoga rada dobijeni primenom imunoafinitetne hromatografije na čipu su upotpunili i proširili saznanja o strukturnoj heterogenosti PSA i mogućem biomarkerskom potencijalu njegovih pojedinih molekulskih vrsta. PSA je zajednička biohemijska karakteristika kancera prostate i kancera dojke. Za potpuno razumevanje biološkog značaja njegove heterogenosti i organ-ograničene distribucije, nepochodno je da se precizno opiše identitet i vremenska distribucija svih molekulskih vrsta PSA u različitim subproteomima. Pored dopune bazičnih znanja o strukturi, ispitivanje kompozicije proteinskih vrsta i validacija modifikacija njegovog proteinskog i glikanskog dela su od opšteg interesa i u laboratorijskoj dijagnostici u smislu standardizacije imunometrijskih testova koji se upotrebljavaju za određivanje koncentracije PSA kao serumskog tumorskog markera. Dobijeni rezultati usmeravaju dalji rad ka produkciji antitela koja bi specifično prepoznavala pojedinačne molekulske vrste PSA koje se isključivo/predominantno javljaju u određenim fiziološkim i patološkim stanjima, i koja bi pored primene u dijagnostici mogla imati i poseban značaj u imunoterapiji kancera prostate i dojke.

Ključne reči: Specifičan antigen prostate, molekulska vrsta, imunoafinitetna hromatografija na čipu, SELDI-TOF masena spektrometrija, subproteom, post-translaciona modifikacija, glikozilacija, kancer prostate, benigna hiperplazija prostate, kancer dojke

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Glikobiologija

UDK broj: 616-097:577.114.7:[[611.637:616-006.03]+[611.637:616-066.04]:616-079.4+[611.69:616-006.04]](043.3)

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR SPECIES OF HUMAN
PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN BY ON-CHIP IMMUNOAFFINITY
CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Prostate-specific antigen (PSA), also known as kallikrein-3 (hK3), is an extracellular serine protease belonging to the human kallikrein family. PSA is primarily produced by the epithelial cells of the acini and ducts of the prostate gland and periurethral glands, and to a lesser extent in other tissues. PSA is normally present at high concentration in seminal plasma and very low concentration in serum.

Disrupted normal prostate glandular structure which occurs due to a variety of disorders and diseases may result in elevated level of PSA in circulation, so that PSA can be used as a serum biomarker. A number of previous studies have shown that PSA is also expressed in non-prostatic tissues, especially in some hormon-dependent tissues of women (breast, endometrium and ovary) in both normal and pathological conditions. PSA gene expression is androgen regulated in prostate tissues, while PSA production in breast cancer cell lines is mediated through the action of progesterone, androgen, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors, but not the estrogen receptor. PSA is a 28.4 kDa glycoprotein having a biantennary N-linked oligosaccharide chain of the N-acetylglucosamine type with a sialic acid group at the end of the two branches. These data refer to the canonical sequence / structure of enzymatically active PSA. In circulation, it is complexed with extracellular protease inhibitors, such as α_1 -antichymotrypsin (ACT) or α_2 -macroglobulin. In addition to active PSA, there are molecules of PSA with considerably reduced or no existing enzymatic activity in circulation. They essentially do not form complexes and represent free PSA form (fPSA).

In comparison with these forms, individual molecular species of PSA forms have not been yet systematically investigated. Protein/molecular species is the smallest structural and functional unit of proteome and represents one individual protein from protein family encoded by one, individual gene. In the focus of contemporary proteomic research is speciation of proteome and kinetic of its protein species. The aim of this

doctoral thesis was established the profile of PSA molecular/protein species in subproteomes of clinical relevant biological fluids: serum, urine and seminal plasma.

In this study we have used serum samples of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), as well as, sera of healthy females (HF) and women with breast cancer (BCa). In addition, we have analyzed urine and seminal plasma of healthy males and first international reference material for fPSA which represents purified PSA preparation originating from the seminal plasma. Unfractionated and fractionated serum samples were analyzed. Fractions separated by gel filtration contained PSA complexed with IgM (PSA-IgM), PSA complexed with ACT (PSA-ACT) and free PSA (fPSA). Immunoaffinity chromatography was carried out on biochemical chip surface with immobilized monoclonal antibody for epitope I of PSA, PS20, while ion-exchange chromatography was performed on chip with incorporated quaternized ammonium groups, Q10 or carboxymethyl groups, CM10. On-chip protein detection was based on surface enhanced laser desorption/ionization–time of the flight mass spectrometry (SELDI-TOF/MS), and obtained spectra were analyzed using software Ciphergen Express Software 3.0. Software tools, *PeptideMass*, *GlycanMass* and *GlycoWorkBench* were used for the bioinformatic prediction of glycan composition and structure of detected fPSA-immunoreactive species. *PeptideMass* was utilized for mass calculation of polypeptide fragments or mature peptide chain of PSA on the basis to known amino acid sequence. *GlycanMass* was used to calculate masses of oligosaccharide structures attached to PSA species detected in appropriate mass spectra. *GlycoWorkBench* was used to draw the oligosaccharide structures of PSA glycoforms.

Obtained results have shown that fPSA-immunoreactive species in sera can be grouped according to molecular masses and assumed glycosylation into four glycopeptide groups: gp28 (26.6-29.6 kDa), gp22 (20.9-23.1 kDa), gp18 (17.1-18.6 kDa) and gp12 (12.2-12.7 kDa). In addition, there were numerous fPSA-immunoreactive species at 24-25.7 kDa, 19.8-20.0 kDa and 13.5-16.3 kDa which might represent degradation products of glycosylated/non-glycosylated mature or “*nicked*” PSA.

Glycosylation assessment of selected molecular species, based on their calculated glycan masses, indicated the differences in the presence of mono-, bi- or triantennary oligosaccharide chain in the group gp28, as well as oligomannose structures in the group gp18. Within the group gp28 *i.e.* gp18, microheterogeneity could be related to the

differences in sialylation, fucosylation and the presence of bisected GlcNAc *i.e.* in the number of mannoses in the oligomannose chain, respectively.

fPSA-immunoreactive species of BPH and PCa fPSA fractions showed a high degree of similarity, especially within the group gp28. Molecular species at 27595.81 Da with associated monoantennary N-glycan was only present in BPH sera. It was the most dominant difference between BPH and PCa. In addition, the presence of low molecular mass species within the group gp22 was more pronounced in BPH. The large number of these species originated from “nicked” PSA internally cleaved between Lys145/Lys146 (gp18) or Lys182/Ser183 (gp22).

Molecular species of “nicked” PSA internally cleaved between Lys145/Lys146 were predominantly complexed with IgM, in both, BPH and PCa. It was estimated that these species contained oligomannose N-glycan. The difference between BPH and PCa was reflected in the presence of molecular species at 26889.27 Da in PCa PSA-IgM complex. This species had associated pauci-mannose structure.

The detailed insight into PSA molecular species released from the complex with ACT was not obtained, given that they were considered autoproteolytic fragments. The same was for urinary PSA which profile was notably different in comparison to serum PSA profile. The urinary PSA was characterized by low molecular mass species that could be the result of proteolysis or autoproteolysis.

Extraprostatic PSA in sera of healthy female and women with breast cancer contained the same peptide and glycopeptide groups of molecular species as prostatic PSA. The main difference was found in the case of gp18 group present in PCa sera, but not detected in BCa, or hardly detectable in HF sera. The glycosylation assessment indicated that molecular species at 12.6 kDa, 23.1 kDa and 29.6 kDa, characteristically presented in BCa sera, contained tri- and tetraantennary N-glycan chains. These species did not detect in PCa.

Summarized results of this study were indicated that the knowledge of the structural heterogeneity of PSA and possible biomarker potential of its individual molecular species were complemented and extended by application of on-chip immunoaffinity chromatography. PSA is a common biochemical characteristic of prostate and breast cancer. For a complete understanding of the biological importance of its heterogeneity and organ-limited distribution, it was necessary to accurately describe the identity and

temporal distribution of molecular species in different PSA subproteomes. In addition to the amendments to the basic knowledge about the structure, testing of protein species composition and validation of its protein and glycan modification are of general interest in laboratory diagnosis in terms of standardization immunometric tests used to determine the serum concentration of PSA as a tumor marker. The results obtained in this study directed further research towards the production of antibodies that specifically recognize individual molecular species of PSA that are exclusively/predominantly present in certain physiological and pathological conditions, and that, in addition to applications in diagnosis, could have special significance for immunotherapy of prostate and breast cancer.

Keywords: Prostate-specific antigen, molecular species, on-chip immunoaffinity chromatography, SELDI-TOF mass spectrometry, subproteome, post-translational modification, glycosylation, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, breast cancer.

Scientific field: Biology

Special topic: Glycobiology

UDC number: 616-097:577.114.7:[611.637:616-006.03]+[611.637:616-066.04]:616-079.4+[611.69:616-006.04]](043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Raznovrsnost proteoma	2
1.1.1. Genom kao izvor raznovrsnosti proteoma.....	2
1.1.1.1. Genski polimorfizmi.....	3
1.1.1.2. Alternativni promotori.....	4
1.1.1.3. Editovanje RNK	4
1.1.1.4. Alternativno splajsovanje	5
1.1.2. Post-translacione modifikacije (PTM) kao izvor raznovrsnosti proteoma.....	5
1.1.2.1. Skraćivanje proteina (<i>truncation</i>).....	6
1.1.2.2. Dodavanje malih hemijskih grupa, ugljenih hidrata i lipida	6
1.1.2.2.1. Modifikacije N- i C-krajeva proteina	6
1.1.2.2.1.1. Acilacija.....	6
1.1.2.2.1.2. Alkilacija	7
1.1.2.2.1.3. Glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) sidro	7
1.1.2.2.1.4. Amidacija.....	8
1.1.2.2.2. Modifikacija pojedinačnih bočnih lanaca aminokiselina	8
1.1.2.2.2.1. Fosforilacija.....	8
1.1.2.2.2.2. Glikozilacija.....	8
1.1.2.2.2.3. ADP-ribozilacija.....	10
1.1.2.2.2.4. Karboksilacija.....	11
1.1.2.2.2.5. Hidroksilacija.....	11
1.1.2.2.2.6. Oksidacija	11
1.1.2.2.2.7. Glikacija.....	11
1.1.2.2.2.8. Deamidacija, izomerizacija i racemizacija	12
1.1.2.3. Formiranje disulfidne veze (S-S).....	12
1.1.2.4. Dodavanje proteina.....	12
1.1.3. Protein-protein interakcije kao izvor raznovrsnosti proteoma	13
1.2. PTM u fiziološkim i patofiziološkim stanjima	13
1.2.1. Glikozilacija u patološkim stanjima	16
1.3. PTM kao biomarkeri.....	18
1.4. Dešifrovanje koda post-translacionih modifikacija (PTM kod)	19
1.5. Analiza proteoma.....	21

1.5.1. HPP (<i>Human Proteome Project</i>): mapiranje proteoma čoveka.....	21
1.5.2. Metode za analizu proteoma.....	22
1.5.2.1. Masena spektrometrija (MS)	23
1.5.2.1.1. SELDI-TOF MS (<i>Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry</i>)	24
1.5.3. Eksperimentalna strategija za analizu post-translacionih modifikacija (PTM).....	26
1.6. Specifičan antigen prostate (PSA).....	30
1.6.1. Ekspresija i funkcija PSA.....	30
1.6.2. hKLK3 gen	31
1.6.2.1. Kanonska sekvenca PSA	32
1.6.2.2. Proteini srodni PSA (<i>PSA-related proteins</i> ; PSA-RP).....	32
1.6.2.3. Pretpostavljene strukture proteina kodiranih transkriptima PSA-SV1-5	33
1.6.3. Molekulska struktura PSA.....	33
1.6.3.1. Heterogenost polipeptidnog lanca PSA.....	34
1.6.3.2. Mikroheterogenost oligosaharidnog lanca PSA	35
1.6.4. Biomarkerski potencijal post-translacionih modifikacija PSA	36
2. Cilj	38
3. Materijali i metode.....	41
3.1. Materijali	42
3.1.1. Reagensi.....	42
3.1.2. Uzorci telesnih tečnosti čoveka	43
3.1.2.1. Uzorci semene plazme.....	43
3.1.2.2. Uzorci seruma.....	43
3.1.2.3. Uzorci urina	44
3.2. Metode	44
3.2.1. Određivanje koncentracije slobodnog PSA (fPSA).....	44
3.2.2. Određivanje koncentracije ukupnog PSA.....	44
3.2.3. Određivanje koncentracije CA 15-3	45
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina.....	45
3.2.5. Određivanje koncentracije IgM radijalnom imunodifuzijom (RID)	45
3.2.6. Oslobođanje PSA iz PSA-ACT kompleksa etanolaminom	45
3.2.7. Gel filtracija seruma na koloni <i>Sephacryl S-300</i>	45

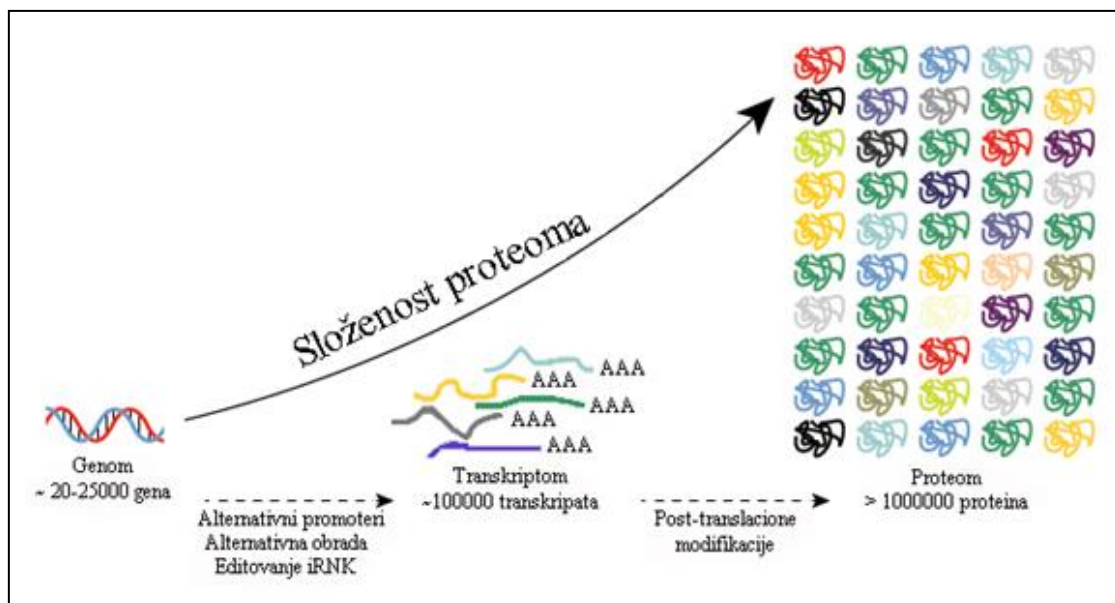
3.2.8. Detekcija imunoglobulina M (IgM)	46
3.2.9. Detekcija PSA-IgM kompleksa	46
3.2.10. Imunoelektroforeza.....	47
3.2.11. Imunoafinitetna hromatografija na PS20 čipu (<i>preactivated surface ProteinChip</i> (PS20)).....	47
3.2.12. Jonoizmenjivačka hromatografija na čipovima: Q10 (<i>strong anion exchange</i>) i CM10 (<i>weak cation exchange</i>).....	47
3.2.13. <i>Surface enhanced laser desorption / ionization – time of the flight</i> masena spektrometrija (SELDI/TOF-MS)	48
3.2.14. <i>Recovery test</i>	48
3.3. Bioinformatičke alatke	48
3.3.1. <i>PeptideMass</i>	48
3.3.2. <i>GlycanMass</i>	49
3.3.3. <i>GlycoWorkBench</i>	49
4. Rezultati.....	50
4.1. Imunoafinitetna hromatografija na čipu: uspostavljanje sistema za profilisanje molekularnih vrsta slobodnog specifičnog antigena prostate (fPSA).....	51
4.1.1. Određivanje analitičkih karakteristika sistema za imunoafinitetnu hromatografiju na čipu.....	51
4.1.1.1. Osetljivost.....	51
4.1.1.2. Linearnost	51
4.1.1.3. Specifičnost	53
4.2. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcija seruma razdvojenih gel filtracijom	56
4.2.1. Razdvajanje serumskih frakcija koje sadrže PSA, gel filtracijom na <i>Sephacryl S-300</i> koloni.....	56
4.2.1.1. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži fPSA..	57
4.2.1.1.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži fPSA.....	58
4.2.1.2. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži PSA-IgM kompleks.....	61

4.2.1.2.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta koje ulaze u kompleks sa IgM	62
4.2.1.3. Profilisanje PSA-imunoreaktivnih vrsta koje ulaze u kompleks sa α_1 -antihimotripsinom (ACT)	63
4.3. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta ekstraprostatičnog PSA	65
4.3.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta ekstraprostatičnog PSA	68
4.4. Katalog molekulskih vrsta slobodnog specifičnog antigena prostate u serumu	69
4.5. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz semene plazme (SP)	71
4.5.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz SP	71
4.6. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz urina	72
4.7. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta u prvom internacionalnom standardu fPSA (1 st IS. 96/668)	74
5. Diskusija	76
6. Zaključci	90
7. Literatura	94

1. Uvod

1.1. Raznovrsnost proteoma

Genom čoveka obuhvata između 20 i 25 hiljada gena, dok je broj posebnih molekulskih vrsta proteina znatno veći i iznosi oko jedan milion (Abdellah i sar., 2004; Jensen, 2004). Na raznovrsnost proteoma, preko povećavanja raznovrsnosti transkriptoma, utiče genski polimorfizam i post-transkripcione modifikacije. Pored ovoga, post-translacione modifikacije (PTM) kojih ima preko 200, generišu izuzetnu različitost, kompleksnost i heterogenost produkata gena (**Slika 1**), a njihovo određivanje je jedan od glavnih izazova u proteomskim istraživanjima (Walsh, 2006). One obuhvataju fosforilaciju, glikozilaciju, lipidaciju, formiranje disulfidnih veza, kao i proteolitičku obradu nascentnog polipeptida ili prekursora u toku stvaranja subjednica ili zrelog, funkcionalno aktivnog proteina.



Slika 1. Izvori raznovrsnosti proteoma. (Izvor: modifikovano prema: <https://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods.html>)

1.1.1. Genom kao izvor raznovrsnosti proteoma

Odnos između gena i proteina je veoma složen, što se ogleda u znatnom širenju molekulske kompleksnosti sa nivoa genoma do nivoa proteoma. Jedan gen može

kodirati veći broj proteina (proteinskih vrsta) zahvaljujući promenama na nivou transkripcije kao i na nivou same iRNK. U osnovi stvaranja različitih iRNK transkripata su procesi: genomska rekombinacija, inicijacija transkripcije na alternativnim promotorima, različit završetak transkripcije, alternativno splajsovanje i editovanje iRNK (Ayoubi i Van de Ven, 1996).

1.1.1.1. Genski polimorfizmi

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP, *single nucleotide polymorphism*) predstavlja oblik varijacije jednog nukleotida (A, G, C ili T) u DNK sekvenci. Ukoliko više od 1% populacije nema isti nukleotid na specifičnoj poziciji u DNK sekvenci, ova varijacija se klasifikuje kao SNP. On je najčešći tip polimorfizma DNK kod čoveka, i do njega može da dođe u kodirajućem ili u nekodirajućem regionu DNK. Ukoliko se SNP javlja u okviru gena, onda se taj gen opisuje kao gen koji ima više od jednog alela, i u tom slučaju on može biti povezan sa varijacijama u aminokiselinskoj sekvenci proteina. Sinonimne varijacije ne dovode do promena u aminokiselinskoj sekvenci, a samim tim ne utiču ni na funkciju proteina. Nesinonimne varijacije, međutim, mogu znatno uticati na stabilnost i uvijanje proteina, na vezivanje liganada, katalitičku aktivnost, post-translacione modifikacije i kapacitet interakcije sa drugim molekulima, i samim tim doprinositi strukturnoj i funkcionalnog raznovrsnosti proteoma (Collins i sar., 1998; Wang i Moulton, 2001; Cavallo i Martin, 2005).

Pored SNP, postoje i DNK polimorfizmi koji potiču od umetanja, brisanja ili tandemskog ponavljanja određene nukleotidne sekvence. Deleciono/insercioni polimorfizam se odnosi na to da jedna alelna varijanta gena u odnosu na drugu sadrži (insercija) ili ne sadrži (delecija) određeni segment gena. Polimorfizam broja uzastopnih ponovaka se odnosi na mikrosatelite (*small number of tandem repeats, SNTRs*) i minisatelite (*various number of tandem repeats, VNTRs*). Mikrosateliti imaju dužinu do deset nukleotida koji se ponavljaju i do nekoliko stotina puta, dok se minisateliti najčešće nalaze u regionu telomere i mogu biti dužine nekoliko hiljada nukleotida (Ayoubi i Van de Ven, 1996; Ramel, 1997; Rodriguez-Murillo i Salem, 2013).

1.1.1.2. Alternativni promotori

Pokazano je da oko 18% ispitivanih gena ima više od jednog mesta započinjanja transkripcije i da ona, najverovatnije, predstavljaju alternativne promotore. Postojanje alternativnih promotora može da dovede do formiranja iRNK koje kodiraju izoforme jednog istog proteina kao i potpuno različite proteine. Do formiranja izoformi proteina koje se razlikuju u N-kraju dolazi usled toga što veći broj 5' egzona sadrži mesto početka transkripcije (ATG), dok su za nastanak skraćenih (*truncated*) izoformi odgovorni intronski promotori. Pored stvaranja transkripata koji se razlikuju po 5' kraju, postojanje alternativnih promotora može, u zavisnosti od pozicije, dovesti i do formiranja iRNK koje kodiraju različite proteine preko alternativnog otvorenog rama čitanja (*Open Reading Frames, ORFs*) ili stvaranjem novih ORF alternativnim splajsovanjem (*Ayoubi i Van de Ven, 1996; Landry i sar., 2003*).

1.1.1.3. Editovanje RNK

Editovanje RNK je post-transkripcioni mehanizam koji dovodi do promene transkribovane sekvence gena. Editovanju podležu iRNK, tRNK i rRNK. Kod sisara su opisana dva tipa editovanja iRNK koja se zasnivaju na nukleotidnoj supstituciji.

Na primeru iRNK za apolipoprotein E (APOE) je pokazano da dezaminacija citozina (C) u uracil (U) dovodi do promene kodona za glutamin (CAA) u stop kodon (UAA) i nastanka izoforme apolipoproteina B (APOB48). Ovo editovanje se dešava u ćelijama creva, dok u jetri ne dolazi do ove supstitucije na nivou iRNK, tako da se kodon (CAA) prevodi u glutamin i sintetiše se izoforma apolipoproteina B (APOB100). Drugi, ujedno i najčešći tip editovanja kod sisara je dezaminacija adenzina (A) u inozin (I) i njoj podleže region dvolančane iRNK (dsRNK). U kodirajućem regionu ovaj tip editovanja može da dovede do zamene jedne aminokiseline drugom aminokiselinom i na taj način do nastanka nove izoforme proteina. Ovom tipu editovanja podležu uglavnom iRNK eksprimirane u centralnom nervnom sistemu koje kodiraju receptore za neurotransmitere ili jonske kanale, i to pre svega serotoniniski receptor 2C (5-HT_{2c}R), kanale za K⁺ i receptor za GABA (γ -aminobuterna kiselina) (*Maas i sar., 2003; Blanc i Davidson, 2003; Farajollahi i Maas, 2010*).

1.1.1.4. Alternativno splajsovanje

Alternativno splajsovanje je vid obrade primarnog transkripta iRNK pri kojem nastaju različite izoforme zrelih iRNK. Ono može biti konstitutivno i regulisano. Konstitutivno splajsovanje se odnosi na to da jedan gen uvek kodira više od jedne izoforme iRNK, dok regulisano podrazumeva da se različiti obrasci splajsovanja dešavaju pri različitim uslovima u ćeliji, tj. u tačno određeno vreme i na tačno određenom mestu. Postoje četiri modela alternativnog splajsovanja: produžavanje egzona usled korišćenja alternativnih 5'- i 3'-mesta splajsovanja u intronima (*exon extended*), uključivanje ili preskakanje kompletnog egzona (*exon skipping*), zadržavanje kompletnog introna (*intron retained*) ili istovremeno alternativno korišćenje dva egzona pri čemu nastaje smeša dve različite iRNK (*Black, 2003; Nilsen i Graveley, 2010*).

1.1.2. Post-translacione modifikacije (PTM) kao izvor raznovrsnosti proteoma

Post-translacione modifikacije se dešavaju u različitim ćelijskim kompartmentima kao što su granulirani endoplazmatični retikulum (gER), Goldžijev aparat, endozomi, lizozomi i sekretorne vezikule. Pored skraćivanja nascentnog polipeptida na N- i C-kraju, glikozilacija i fosforilacija su daleko najčešće modifikacije, dok su one druge, uključujući karboksilaciju, sulfataciju i amidaciju, karakteristične samo za neke proteine. Aminokiseline na određenim pozicijama ili različite specifične ili izmenjene aminokiselinske sekvence/motivi u polipeptidu, predstavljaju signale za njegovu obradu dejstvom proteaza ili, ređe, autoproteolitički. Pored toga, one određuju mesto kovalentnog vezivanja malih hemijskih grupa, lipida, ugljenih hidrata ili malih proteina (*Walsh i sar., 2005; Černý i sar., 2013*).

Najveći deo PTM je enzimski katalizovan, dok do neenzimskih modifikacija dolazi usled neuravnotežene redoks homeostaze i one, same po sebi, mogu uzrokovati dalje narušavanje proteostaze (tj. sintezu, uvijanje, transport, PTM i degradaciju pogrešno uvijenih proteina). PTM mogu odrediti aktivnost, lokalizaciju, poluživot, i interakcije sa drugim proteinima. Za mnoge od njih je poznata zavisnost strukture i funkcije, ali u slučaju kompleksnih modifikacija kao što je glikozilacija, ovaj odnos nije u potpunosti razjašnjen. Izuzev važne uloge u održanju homeostaze organizma, post-translacione modifikacije su odgovorne i za nastanak velikog broja patoloških stanja (*Taylor i Drickammer, 2003; Seo i Lee, 2004; Li i sar., 2010; Trougakos i sar., 2013*).

1.1.2.1. Skraćivanje proteina (*truncation*)

Skraćivanje proteina podrazumeva cepanje (*cleavage*) polipeptidnog lanca na jednom određenom mestu, i ono može biti rezultat autoproteolitičke aktivnosti ili dejstva specifičnih proteaza.

Autoproteoliza je, prvenstveno, odgovorna za uklanjanje intramolekulskih šaperona, a samo relativno mali broj proteina ima kapacitet za autoproteolitičku konverziju inaktivne prekursorne forme u aktivnu formu, kao npr. aspartat-dekarboksilaza i *Hedgehog* protein (*Porter i sar., 1996; Albert i sar., 1998; Chen i Inouye, 2008*). Intramolekulski šaperoni su visoko specifični i jedinstveni propeptidi na N- ili C-kraju proteina (ekstenzije), koji su neophodni za pravilno uvijanje proteina, ali ne i za njihovu funkciju. Oni se uklanjaju autoproteolizom nakon što protein zadobije odgovarajuću konformaciju (*Chen i Inouye, 2008*).

U širem smislu, još jedan vid autokatalitičkog skraćivanja polipeptidnog lanca jeste splajsovanje proteina. U pitanju je isecanje unutrašnjeg regiona (intein) prekursorskog proteina i spajanje bočnih sekvenci (N- i C-eksteini). Ovaj proces je katalizovan unutrašnjim domenom inteina (*Hint* domen). Ono što razlikuje splajsovanje proteina od drugih autokatalitičkih procesa je upravo povezivanje eksteina, što ima za rezultat nastanak dva različita proteina (*Perler, 1997; Starokadomskyy, 2007*).

Skraćivanje polipeptidnog lanca koje se odnosi na uklanjanje signalne sekvence ili na intermolekulsko cepanje, vrši se pod dejstvom specifičnih enzima, proteaza. Ubikvitin, koji predstavlja signal za degradaciju proteina, uklanja se intermolekulskim cepanjem, nakon čega se on reciklira, a sam protein se degradira u proteazomu (*Walsh i sar., 2005; Lecker i sar., 2006*).

1.1.2.2. Dodavanje malih hemijskih grupa, ugljenih hidrata i lipida

1.1.2.2.1. Modifikacije N- i C-krajeva proteina

1.1.2.2.1.1. Acilacija

Acilacija je dodavanje acetil- (C_2), miristoil- (C_{14}), i palmitoil- (C_{16}) grupa (*Walsh i sar., 2005*).

Uvođenje acetil grupe (COCH_3) u protein može da se izvrši na N-terminalnoj amino grupi ili ϵ -amino grupi N-terminalnog Lys (N-acetilacija), kao i na hidroksilnu grupu Ser i Thr (O-acetilacija). Acetilacija je enzimski katalizovana, acetiltransferazama. Oko 80% citosolnih proteina eukarota je N-acetillovano (*Zhang i sar., 2002; Walsh i sar., 2005*).

N-miristoilacija se dešava, jedino, na amino grupi N-terminalnog Gly i katalizovana je enzimom N-miristoiltransferazom. Donor grupe je miristoil-CoA. Kako sinteza proteina započinje N-terminalnim Met, preduslov za N-miristoilaciju Gly je ko-translaciona hidroliza $\text{Met}_1\text{-Gly}_2$ peptidne veze koju katalizuje metionin aminopeptidaza.

S-palmitoilacija podrazumeva prenos C_{16} -acil grupe na sulfhidrilnu (-SH) grupu Cys na C-kraju proteina. Ova modifikacija je katalizovana S-palmitoiltransferazom, a donor palmitoil grupe je palmitoil-CoA. Za razliku od miristoilacije koja je ireverzibilna, palmitoilacija je reverzibilna modifikacija (*Resh, 1999; Walsh i sar., 2005*).

1.1.2.2.1.2. Alkilacija

Alkilacija je enzimsko regiospecifično uvođenje metil (C_1) ili izoprenil (farnezil (C_{15}) i geranil-geranil (C_{20}) grupa u protein.

Metilacija N-terminalne amino grupe je retka. Uvođenje metil grupe u protein se najčešće vrši na bočne lance Lys ili Arg. Ova modifikacija je katalizovana metiltransferazama. Pored N-metilacije koja je svakako najčešći tip metilacije, postoji i C-, O- i S-metilacija.

S-prenilacija podrazumeva enzimsko uvođenje lipidnih grupa koje se formiraju elongacijom C_5 izoprenskih jedinica. C_{15} (farnezil) i C_{20} (geranil-geranil) se kovalentno vezuju za SH-grupu Cys na C-kraju proteina dejstvom farnezil- i geranil-geraniltransferaza (*Walsh i sar., 2005; Tejaswita i Cheema, 2011*).

1.1.2.2.1.3. Glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) sidro

Glikozil-fosfatidilinozitol (GPI) sidro je glikolipid koji se dodaje na C-terminalnu karboksilnu grupu proteina. GPI se sastoji iz fosforiletanolamina, tri manoze i glukozamina koje čine jezgro ($\text{Man}_3\text{-GlcN}$) i fosfatidilinozitola (PI). Ova modifikacija proteina predstavlja jedinstven način za vezivanje proteina za plazma membranu. Preko

200 proteina sadrži ovu post-translacionu modifikaciju (*Ikezawa, 2002; Schumacher i sar., 2010*).

1.1.2.2.1.4. Amidacija

Amidacija je dodavanje amidne grupe na C-kraj polipeptidnog lanca. Ona se javlja kod više od 50% biološki aktivnih peptida i peptidnih hormona (*Kim i Seong, 2001*).

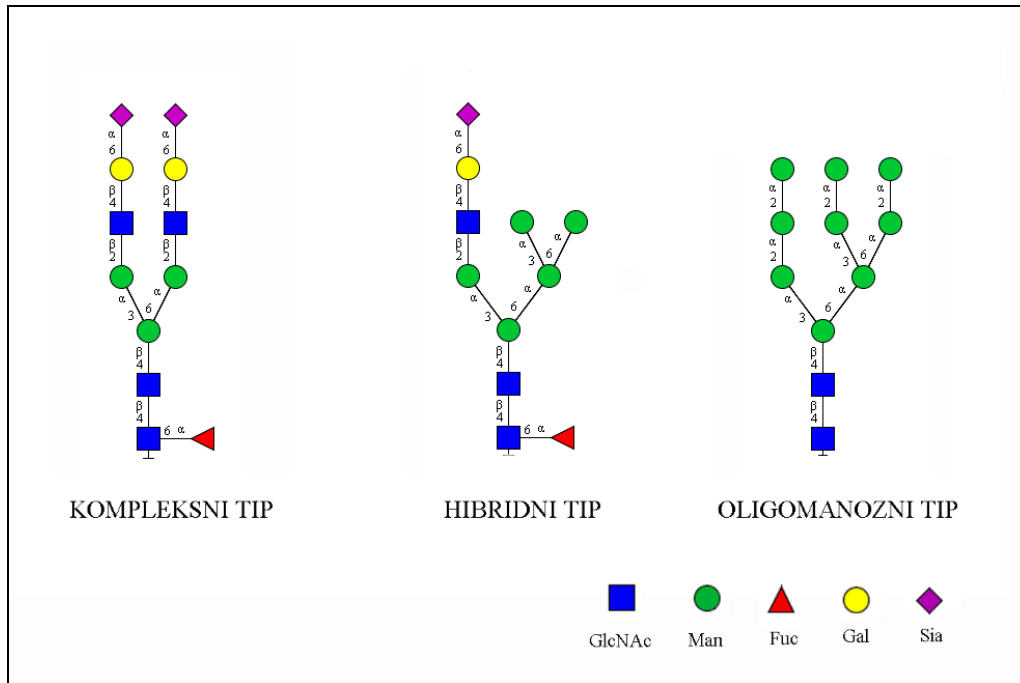
1.1.2.2.2. Modifikacija pojedinačnih bočnih lanaca aminokiselina

1.1.2.2.2.1. Fosforilacija

Fosforilacija je kovalentno dodavanje fosfatne grupe na bočne lance Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asp. Ova modifikacija je reverzibilna i enzimski posredovana i to familijom kinaza koja broji preko 500 članova, odnosno fosfataza koja broji oko 150 članova. Fosforilacija je najčešća modifikacija, na svakih osam, jedan protein je fosforilovan (*Mann i sar., 2002; Walsh i sar., 2005*).

1.1.2.2.2.2. Glikozilacija

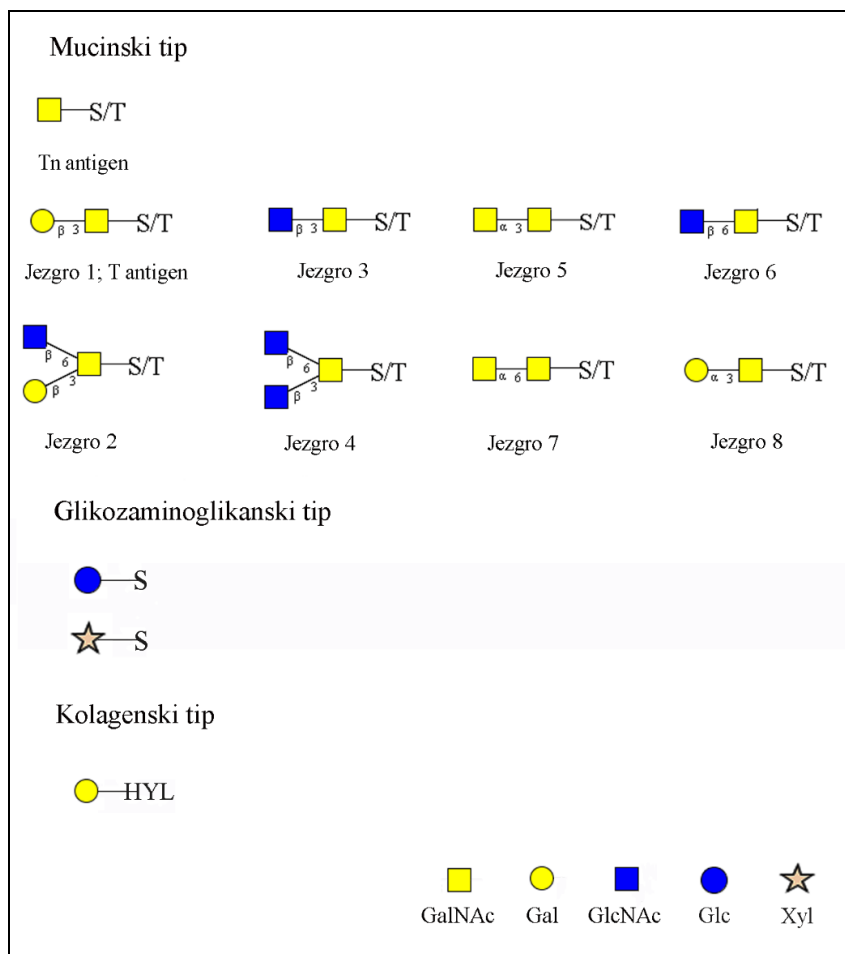
Glikozilacija je ko- i post-translaciona modifikacija koja dovodi do kovalentnog vezivanja oligosaharidnih lanaca za polipeptidnu kičmu proteina. U glikozilaciji učestvuje preko 200 glikoziltransferaza i glikozidaza. Poznata su tri tipa glikozilacije: N-, O- i C-glikozilacija. N-glikozilacija se dešava na NH₂- grupi Asn unutar sekvence Asn-X-Ser/Thr ili ređe Asn-X-Cys, s tim da X može biti bilo koja aminokiselina, izuzev Pro. Sinteza N-glikana započinje u endoplazmatičnom retikulumu, dok se njihova modifikacija dalje nastavlja u Goldžijevom aparatu gde nastaju zreli N-glikanski lanci. N-glikani mogu biti oligomanozni, kompleksni i hibridni, s tim da dele zajedničku strukturu trimanozilnog jezgra GlcNAc₂Man₃ (**Slika 2**) (*Roth, 2002; Walsh i sar., 2005*).



Slika 2. Tipovi N-glikana. GlcNAc: N-acetilglukozamin; Man: manozna; Fuc: fukoza; Gal: galaktoza; Sia: sijalinska kiselina. (Izvor: modifikovano prema: *Stanley i sar., 2009*)

O-glikozilacija se najčešće dešava na OH-grupi Ser ili Thr, obično u sekvenci koja je bogata hidroksi aminokiselinama. Tipovi O-glikana su mucinski, glikozaminoglikanski i kolagenski (**Slika 3**) (*Sharon i Lis, 1997*). Sinteza O-glikana mucinskog tipa započinje kovalentnim vezivanjem N-acetilgalaktozamina (GalNAc) za Ser/Thr. Ova struktura se naziva Tn antigen. Dodavanjem galaktoze (Gal), N-acetilglukozamina (GlcNAc) ili N-acetilgalaktozamina (GalNAc) na Tn-antigen formira se osam karakterističnih struktura jezgara (*Nakayama i sar., 2013*). Sinteza glikozaminoglikanskog tipa O-glikana započinje vezivanjem glukoze (Glc) ili ksiloze (Xyl) za Ser, a kolagenskog tipa vezivanjem galaktoze za hidrosilizin (LysOH). O-glikozilacija se dešava u *cis*-Goldžijevom aparatu (*Brockhausen i sar., 2009*).

C-glikozilacija je kovalentno dodavanje manoze na C₂ indolovog prstena Trp unutar sekvenci W-X-X-W ili W-S/T-X-C ekstracelularnih proteina. U pitanju je najmanje zastupljen tip glikozilacije (*Walsh i sar., 2005*; <http://www.uniprot.org/help/carbohydr>)



Slika 3. Tipovi O-glikana. GalNAc: N-acetilgalaktozamin; Gal: galaktoza; GlcNAc: N-acetilglukozanim; Glc: glukoza; Xyl: ksiloza; S: serin; T: treonin; HYL: hidroksilizin. (Izvor: modifikovano prema: *Brockhausen i sar., 2009; Nakayama i sar., 2013; <http://www.intechopen.com/books/genetic-disorders>*).

1.1.2.2.3. ADP-ribozilacija

ADP-ribozilacija je adicija ADP-ribozil grupa na bočne lance Cys, Arg ili Asn koja je katalizovana ADP-riboziltransferazama. Donor ADP-ribozil grupa je koenzim nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) (*Walsh i sar., 2005*).

1.1.2.2.4. Karboksilacija

Karboksilacija je konverzija glutaminske kiseline (Glu) u γ -karboksiglutamat (Gla). Ona je katalizovana karboksilazama. Ovoj post-translacionoj modifikaciji podležu proteini koji učestvuju u koagulaciji krvi. Blisko pozicionirani γ -karboksiglutamati formiraju helatno mesto za vezivanje dvovalentnih katjona kao što je Ca^{2+} i na taj način se inicira kaskada koagulacije (*Seo i Lee, 2004; Walsh i sar., 2005*).

1.1.2.2.5. Hidroksilacija

Hidroksilacija je reakcija oksidacije koja je katalizovana hidroksilazama. Ova post-translaciona modifikacija je reverzibilna. Ona najčešće dovodi do konverzije prolina u 3-hidroksiprolin ili 4-hidroksiprolin i lizina u 5-hidroksilizin, dok je hidroksilacija Asp, Asn i aromatičnih aminokiselina (Phe, Tyr i Trp) manje zastupljena (*Seo i Lee, 2004*).

1.1.2.2.6. Oksidacija

Oksidacija je najzastupljenija neenzimska modifikacija uzrokovana reaktivnim kiseoničnim (ROS) i azotnim vrstama (RNS) (*Dröge, 2002*). ROS nastaju u redoks reakcijama, a najčešće dolazi do oksidacije aminokiselina Cys i Met pri čemu nastaje disulfid i metionin-sulfoksid, redom. Pored toga, oksidacijom lipida ili ugljenih-hidrata nastaju reaktivne ugljenične vrste (RCS) koje dovode do karbonilacije Pro, Arg, Lys, Thr, Glu i Asp tj, uvođena karbonilne grupe (CO) u protein. Na ovaj način dolazi do stvaranja nefunkcionalnih proteina čija akumulacija dovodi do nastanka neurodegenerativnih bolesti CNS (*Bizzozero, 2009; Tejaswita i Cheema, 2011*).

1.1.2.2.7. Glikacija

Glikacija je neenzimska modifikacija slobodnih amino grupa proteina, lipida i nukleinskih kiselina, redukujućim šećerima ili reaktivnim aldehydima. Finalni produkt glikacije su AGEs (*Advanced Glycation End Products*) čije formiranje prate dve reverzibilne i jedna ireverzibilna reakcija. AGEs čine heterogenu grupu u koju, između ostalih, spadaju N^ε(karboksimetil) lizin, fukozil-lizin i pentozidin (*Cho i sar., 2007; Tsakiri i sar., 2013*).

1.1.2.2.8. Deamidacija, izomerizacija i racemizacija

Deamidacija je hidroliza amidne veze bočnog lanca Gln i Asn pri kojoj dolazi do formiranja karboksilatnog jona Glu i Asp, redom. Izomerizacija se skoro uvek dešava na Asp, Asn, Glu ili Gln. Racemizacija je proces u kome se L-aminokiselina spontano konvertuje u D-aminokiselinu. Ove tri post-translacione modifikacije mogu uticati na strukturu i funkciju proteina s obzirom da ne postoji poznati sistem reparacije modifikovanih aminokiselinskih ostataka (*Robinson i Robinson, 2001; Trougakos i sar., 2013*).

1.1.2.3. Formiranje disulfidne veze (S-S)

Disulfidne veze (S-S) nastaju oksidacijom tiolnih grupa bočnih lanaca Cys. Njihovo formiranje omogućava kovalentno povezivanje proteina ili delova unutar jednog proteina. Disulfidne veze su predominantne u oksidujućim sredinama (ekstracelularni kompartmenti) gde mogu stabilizovati sekretovane proteine (*Walsh i sar., 2005*).

1.1.2.4. Dodavanje proteina

U modifikacije dodavanjem proteina se ubrajaju ubikvitinacija i sumoilacija. Ubikvitinacija se dešava na ϵ -amino grupi Lys ciljanog proteina. U pitanju je dinamičan, koordinisan i multienzimski proces u kom se proteini za degradaciju ili recikliranje obeležavaju malim regulatornim proteinom, ubikvitinom (Ub). Donori ubikvitina su ubikvitil-S-proteini koji uključuju tri klase enzima: E1-enzimi za aktivaciju ubikvitina, E2-enzimi za konjugaciju ubikvitina i E3-ubikvitin ligaze. Prema broju dodatih ubikvitina razlikuje se mono- i poliubikvitinacija (*Tejaswita i Cheema, 2011*). Iako i mono- i poliubikvitinacija dovode do proteolitičke degradacije obeleženog proteina, mehanizmi se prilično razlikuju. Monoubikvitirani proteini se šalju u rane endosome i transportuju do lizozoma u kojima proteaze uzrokuju hidrolitičku degradaciju proteina, dok se poliubikvitirani proteini šalju do proteazoma gde dolazi do proteolitičke degradacije proteina (*Walsh i sar., 2005*).

SUMO proteini (*Small Ubiquitin-Related Modifier*) su proteini slični ubikvitinu koji se kovalentno vezuju za Lys unutar sekvence Ψ KXE gde je Ψ hidrofobna, a X bilo koja aminokiselina. Kod čoveka je potvrđeno postojanje četiri izoforme SUMO-1, SUMO-2,

SUMO-3 i SUMO-4. Sumoilacija uključuje seriju enzimi katalizovanih reakcija. Nasuprot ubikvitinaciji, sumoilacija nije proces tokom kog se proteini obeležavaju za degradaciju. Ona reguliše funkcionalne karakteristike ciljanog proteina kao što su njegova subcelularna lokalizacija i njegove interakcije sa drugim proteinima (*Park-Sarge i Sarge, 2009*).

1.1.3. Protein-protein interakcije kao izvor raznovrsnosti proteoma

Protein-protein interakcije između identičnih, odnosno različitih polipeptidnih lanaca dovode do formiranja oligomera. Oko 35% proteina u ćeliji predstavljaju oligomere. Oni se mogu klasifikovati po tipu subjedinica, uključujući i sličnost između subjedinica (homo i heteromeri), broju subjedinica koje međusobno intereaguju (dimer, trimer, itd.), trajanju interakcija (prolazni i stalni) i stabilnosti interakcija (neobligatorni i obligatorni) (*Nooren i Thornton, 2003*).

Većina oligomernih proteina su homo-oligomeri, dok je prosečno oligomerno stanje celularnih proteina tetramerno. Neki proteini su pronađeni isključivo u oligomernom stanju i njihova konstanta disocijacije je reda veličine 10^{-9} (stalni oligomeri), dok postoje takvi proteini čija oligomerizacija zavisi od uslova sredine i njihova konstanta disocijacije je reda veličine 10^{-6} - 10^{-3} (prelazni oligomeri). Kod obligatornog kompleksa je uočeno da su protomere (strukturna jedinica oligomera koju može da čini jedna subjedinica ili nekoliko njih) same po sebi stabilne strukture. Neobligatorne komplekse najčešće formiraju ko-locirane heterooligomerne strukture. U grupu ovih kompleksa se ubrajaju signalni kompleksi, enzim-inhibitor, antigen-antitelo i receptor-ligand kompleks (*Nooren i Thornton, 2003; Ali i Imperiali, 2005*).

1.2. PTM u fiziološkim i patofiziološkim stanjima

Post-translacione modifikacije se javljaju u fiziološkom kontekstu, ali su karakteristične i za određena patološka stanja, te su od dijagnostičkog značaja u kliničkoj proteomici. Određivanje tipa i lokalizacije promene su od izuzetne važnosti, jer se na taj način dobija uvid u način na koji ćelija brzo odgovara na fiziološke ili patofiziološke stimuluse. Post-translacione modifikacije, generalno, utiču na funkciju proteina preko promena u njegovoj strukturi i dinamici. Međutim, za nastanak bolesti mogu biti odgovorne i mutacije mesta post-translacionih modifikacija (*Li i sar., 2010*).

Potpuna ili ograničena proteoliza je od važnosti za mnoge biološke procese. Proteaze su uključene u embrionalni razvoj, koagulaciju, imunitet, ćelijsku diferencijaciju i smrt, na taj način što uklanjaju oštećene proteine, kontrolišu nivo proteina, aktiviraju prekursore ili menjaju postojeću funkciju proteina. Narušena proteoliza je uključena u nastanak brojnih patoloških stanja, pre svega usled promena u aktivnosti serin-zavisnih proteaza, metaloproteinaza, aspartat- i cistein-proteaza (*Richard, 2005*).

Izmene u aktivnosti serin-zavisnih proteaza dovode do problema sa digestijom, koagulacijom, aktivacijom komplementa, sazrevanjem prohormona, diferencijacijom stem ćelija, ćelijskom signalizacijom i degradacijom supstrata unutar lizozoma. Gubitak aktivnosti enterokinaze koja katalizuje prevođenje tripsinogena u tripsin dovodi do kongenitalnog nedostatka enteropeptidaza i retardacije deteta, hronične dijareje i pojave edema. Kod kancera, povećana aktivnost metaloproteinaza je odgovorna angiogenezu i za invaziju tumora usled degradacije ekstracelularnog matriksa. Smatra se da su aspartat- i cistein-proteaze uključene u mehanizme nastanka neurodegenerativnih bolesti. Kalpain 10 (enzim iz familije cistein proteaza) se dovodi u vezu sa nastankom dijabetesa tipa 2 (*Richard, 2005*).

Post-translacione modifikacije kao što su acetilacija, S-prenilacija i N-miristoilacija zavise od tipa ćelije ili tkiva. Acetilacija reguliše prepoznavanje DNK, protein-protein interakcije i stabilnost proteina. Acetilacija/deacetilacija histona je od izuzetnog značaja zbog njihove uloge u regulaciji gena. Ova modifikacija je katalizovana enzimima histon acetilazom i histon deacetilazom. Narušavanje statusa acetilacije histona utiče na homeostazu ćelije i doprinosi nastanku brojnih bolesti, kao što su inflamatorne bolesti, neurološka oboljenja (šizofrenija i *Huntington*-ova bolest) i kancer (*Seo i Lee, 2004; Tejaswita i Cheema, 2011*). S-palmitoilacija i N-miristoilacija su ko-translacione lipidne modifikacije koje za cilj imaju povećanje hidrofobnosti proteina. One, kao i druge lipidne modifikacije, doprinose prijanjaju mnogobrojnih signalnih molekula za citoplazmatsku stranu plazma membrane. Ove modifikacije imaju ulogu u interakcijama tipa protein-membrana i protein-protein, i esencijalne su za njihovu funkciju. Smanjena ili disfunkcionalna S-palmitoilacija je u vezi sa mnogim bolestima kao što su vaskularna oboljenja izazvana dijabetesom, neurodegenerativna oboljenja, hepatitis C i dr. (*Seo i Lee, 2004; Tejaswita i Cheema, 2011*).

Alkilacija, kao i acilacija služi za uvođenje različitog stepena hidrofobnosti u protein. Pored toga, S-prenilacija je uslov za aktivaciju različitih GTP-aza kuplovanih za ćelijsku membranu, koja je karakteristična za mnoge kancere (*Seo i Lee, 2004; Tejaswita i Cheema, 2011*), dok metilacija proteina ima ogroman značaj u svim fazama razvoja, od embrionalnog do postnatalnog. N-metilacija histona, kao i acetilacija, je od izuzetne važnosti u izmeni strukture hromatina tj. regulaciji ekspresije gena. Pokazano je da metilacija igra važnu ulogu i u brojnim patološkim stanjima kao što su: kancer, *Parkinson*-ova bolest, lipofuscinoza i okluzivne bolesti (*Walsh i sar. 2005; Lv i sar., 2011; Tejaswita i Cheema, 2011*).

Glikozilacija predstavlja jednu od najzastupljenijih post-translacionih modifikacija s obzirom da je preko 70 % proteina čoveka glikozilovano. Glikani su molekuli koji skladište informacije i predstavljaju mesta za razmenu informacija na nivou solubilnih, sekretovanih i membranskih struktura. Ona je izuzetno važna za uvijanje, rastvorljivost i stabilnost proteina, modulaciju aktivnosti enzima i signalnih molekula, prenos signala unutar ćelija i između ćelija i za imunski odgovor (*Spiro, 2002*). Disfunkcionalni glikani mogu dovesti do bolesti, kao što su kancer, ciroza jetre, dijabetes i pogoršanja kod HIV infekcije (*Chandler i Goldman, 2013*). Neenzimska modifikacija, glikacija proteina, lipida i nukleinskih kiselina, uzrokuje izmenu strukture i funkcije proteina. Glikacija je uobičajna u stanjima kao što su dijabetes, kancer (debelog creva, želuca i prostate) i starenje (*Ulrich i Cerami, 2001, Ansari i Rasheed, 2009*).

Pored glikozilacije, fosforilacija je najzastupljenija post-translaciona modifikacija. Fosforilacija, pri normalnim fiziološkim uslovima, igra ključnu ulogu u mnogim procesima, a njen reverzibilan karakter omogućava da deluje kao neka vrsta prekidača u ćeliji. Ona je značajna za regulaciju enzimske aktivnosti. Sve signalne kaskade u kojima se fosforilacija javlja u skoro svakom koraku imaju suštinsku kontrolu nad ćelijskim rastom, preživljavanjem, apoptozom ili odgovorom na različite ekstraćelijske signale. S toga je za održavanje homeostaze ćelije ključno održavanje ravnoteže između aktivnosti protein kinaza i protein fosfataza. Disregulacija fosforilacije/defosforilacije je primećena kod neuroloških oboljenja kao što su *Parkinson*-ova bolest i demencija i kod kancera. Kod kancera pluća je pokazano da dolazi do fosforilacije treonina (T163) Mcl-1 proteina, blokiranja njegove antiapoptotske uloge i tumorigeneze (*Tejaswita i Cheema, 2011*).

Manje zastupljena enzimska modifikacija, ADP-ribozilacija može imati bitnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji (*Seo i Lee, 2004; Walsh i sar., 2005*).

Reakcija oksidacije katalizovana hidroksilazama, tj. hidroksilacija prolina u kolagenu je ključna za sazrevanje kolagenskih vlakana (*Walsh, 2006*). Neki kanceri i metabolički poremećaji su u vezi sa odsustvom hidroksilacije prolina, usled deficita askorbinske kiseline koja je važna za odvijanje ove reakcije. Usled defekta u feniletilamin hidroksilazi, enzimu koji katalizuje konverziju Phe u Tyr, dolazi do nastanka fenilketonurije i hiperfenilalaninemije (*Tejaswita i Cheema, 2011*).

Pri oksidativnom stresu dolazi do produkcije velike količine reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS) koja premašuje kapacitete ćelije za njihovo uklanjanje. Njihova akumulacija dovodi do modifikacija proteina, direktno, pogađajući bočne lance amino kiselina ili, indirektno, modifikujući npr. lipide koji potom mogu reagovati sa amino- ili tiol- grupama proteina, dovodeći do stvaranja nefunkcionalnih proteina (*Trougakos i sar., 2013*). Od svih oksidativnih modifikacija, najčešće dolazi do karbonilacije brojnih amino kiselina (*Trougakos i sar., 2013*) i specifične nitracije Tyr koji, tako modifikovan, služi kao biomarker (*Radi, 2004*). Mnogi poremećaji, kao što su autoimunske bolesti i kancer su posredovane visokom produkcijom reaktivnih vrsta. Deamidacija, izomerizacija i racemizacija mogu uticati na strukturu i funkciju proteina, s obzirom na to da ne postoji poznati sistem reparacije modifikovanih aminokiselinskih ostataka. One su povezane sa pojavom nekoliko bolesti starenja, kao i sa samim starenjem (*Robinson i Robinson, 2001; Trougakos i sar., 2013*).

Ubikvitinacija ima značajnu ulogu u modulaciji ćelijske proliferacije i diferencijacije, autofagocitozi, apoptozi, imunskom odgovoru, reparaciji DNK, odgovoru na stres, ali i u nastanku velikog broja oboljenja i poremećaja, kao što su kancer, neurodegenerativne bolesti, HIV, herpes i oboljenja jetre (*Tejaswita i Cheema, 2011*).

1.2.1. Glikozilacija u patološkim stanjima

Izmenjeni glikozilovani proteini nastaju usled poremećaja u sintezi oligosaharidnih lanaca, a kao rezultat promena u enzimskom statusu ćelije. Do njih može doći na nivou N-glikozilacije ili O-glikozilacije, a opisani su i kombinovani poremećaji (*Michalski, 1996; Durand i Seta, 2000; Spiro, 2002*). Usled strukturnih promena oligosaharidnih lanaca i gubitka ili stvaranja novih mesta glikozilacije, dolazi do nastanka velikog broja

oboljenja i poremećaja (*Li i sar., 2010*). Izmenjena struktura glikoproteina je uočena kod urođenih poremećaja glikozilacije (*congenital disorders of glycosylation, CDG*), deficita adhezije leukocita, dijabetesa, različitih tipova leukemije, kancera, bolesti hematopoeze, u cističnoj fibrozi, intestinalnim inflamacijama, trombozi i dr. (*Taylor i Drickammer, 2003*).

Urođeni poremećaji glikozilacije (CDG) su multisistemska oboljenja sa brojnim kliničkim obeležjima. Oni mogu biti uzrokovani izmenama u sintezi ili obradi N-glikana. Najčešći tip CDG koji je rezultat promene u sintezi N-glikana je CDG Ia. On nastaje kao posledica smanjene aktivnosti fosfomanomutaze 2 koja prevodi manozu-6-fosfat u manozu-1-fosfat (*Schachter, 2001; Eklund i Freeze, 2006; Petković i sar, 2007; Jaeken, 2010*).

Do deficita adhezije leukocita tipa II, dolazi usled nedostatka fukozilovanih glikokonjugata. Nedostatak GDP-fukoze je posledica nefunkcionalnog, ali ispravno subcelularno lokalizovanog Goldžijevog transportera GDP-fukoze (*Helmus i sar., 2006*).

Kod dijabetesa je uočeno povećano prisustvo Ser/Thr-GlcNAc (Tn antigen) u regulatornim proteinima kao posledica povećane ekspresije glutamin:fruktoza-6-fosfat aminotransferaze (*Hanover i sar., 1999*).

Glavna obeležja kancera kod čoveka su preuređeni put biosinteze glikana u Goldžijevom aparatu i aktivacija određenih onkogeni. Tokom kancera dolazi do ekspresije i sekrecije nepotpuno glikozilovanih molekula ili pojave novih antigena. Na nivou oligosaharidnih lanaca, malignu transformaciju prate promene u sijalinizaciji, fukozilaciji, galaktozilaciji, povećano grananje N-glikana, skraćivanje O-glikana mucinskog tipa i neuobičajna ekspresija ili izmenjena struktura antigena krvnih grupa (H, A i B), dok je na enzimskom nivou, poznata smanjena aktivnost fukoziltransferaze (α_2 -FucT) i povećana aktivnost serumskih sijaliltransferaza (ST), serumske fukoziltransferaze (α_3 -FucT) i galaktoziltransferaze (GalT) (*Varki i sar., 2009*). Kod većine kancera, usled promene u ekspresiji α_3 - i α_6 -sijaliltransferaza dolazi do povećane sijalinizacije mucina i antigena krvnih grupa (T i Lewis antigena). Izmene u fukozilaciji nastaju usled povećanog granjanja oligosaharidnih lanaca i promena u aktivnosti fukoziltransferaza. Ove izmene u fukozilaciji utiču na ekspresiju Lewis antigena (Le^b , Le^x i Le^y). Značajnu ulogu u strukturnim izmenama kompleksnog tipa N-

oligosaharidnog lanca imaju tri izoforme enzima N-acetil-glukozamintransferaze (GnT). Povećano β 1,6-grananje kompleksnog tipa N-glikana i pojava terminalnih sekvenci Lewis antigena su uočeni kod nekih kancera i dovode se u vezu sa metastazama i lošom prognozom (Varki i sar., 2009).

1.3. PTM kao biomarkeri

Većina bioloških promena koje prate nastanak bolesti se dešava na nivou proteoma. Detekcija funkcionalnog statusa ćelije putem analize proteoma koji reflektuje kako genski status ćelije, tako i uticaj neposrednog okruženja je, stoga, dragocena u otkriću novih biomarkera (Kalebic i sar., 2002; Tejaswita i Cheema., 2011). Post-translacione modifikacije (PTM), posebno, nude obilje kandidata za dijagnostičke i prognostičke biomarkere za čije ispitivanje se koriste određeni proteomski i genomski pristupi.

Do danas je od strane US FDA (*Food and Drug Administration*) odobreno 109 dijagnostičkih testova koji se zasnivaju na merenju koncentracije proteina, ne uzimajući u obzir njihove strukturne specifičnosti i 18 testova koji su zasnivani na proceni PTM, od kojih 6 detektuju ugljenohidratne strukture α -fetoproteina, glikozilovane forme albumina, alkalne fosfataze specifične za kosti, LDL, CA19-9 i transferina (Anderson, 2010).

Ograničenja za direktnu analizu PTM predstavljaju nedovoljna količina izolovanog korektno obrađenog proteina i postojeća tehnologija. Sa razvojem multipleks platformi i odgovarajućih liganada i antitela za ispitivanja PTM, danas su ovakva ispitivanja lakša i izvodljivija. Iako su mnogi tipovi modifikacija identifikovani, većina nije lokalizovana na dovoljno velikom broju proteina, što onemogućava formiranje baze podataka čijim pretraživanjem bi se moglo izvršiti predviđanje modifikacije na osnovu genske sekvence (Krueger i Srivastava, 2006).

Kako su PTM ključne u brojnim signalnim putevima tokom neoplastične transformacije, analiza diskretnih modifikacija na specifičnim proteinima je od značaja za biologiju kancera i za otkriće novih tumorskih markera. Fosforilacija i glikozilacija, kao najčešće modifikacije proteina zauzimaju primat u ovim istraživanjima. Modifikacija koja nije mnogo ispitivana, ali je detektovana kod brojnih kancera je prenilacija, te farnezilovani proteini predstavljaju potencijalne tumorske markere (Krueger i Srivastava, 2006).

Fosfoproteomika se bavi ispitivanjem statusa fosforilacije signalnih proteina čija aktivacija može doprineti onkogenezi, a shodno tome profilisanje tumorskog fosfoproteoma daje značajan izvor potencijalnih biomarkera.

Glikomika ima za cilj da omogući dijagnostikovanje tumora na osnovu jedinstvenih ugljenohidratnih struktura. Ona zahteva znatno složenije metode za analizu, a razlog leži u hemijskoj strukturi ugljenih hidrata (*Zhang i sar., 2007*).

Danas se glikoproteinski markeri koriste za praćenje dijabetesa, poremećaja glikozilacije i kancera. Za praćenje dijabetesa se koristi glikozilovani hemoglobin, a transferin sa deficitom ugljenih hidrata za dijagnozu naslednih ili stečenih poremećaja glikozilacije i zloupotrebe alkohola. U kancerskoj dijagnostici su danas u primeni glikoproteini: karcino-embrionalni antigen, CEA (kancer debelog creva, dojke i bešike), ugljenohidratni antigen 19-9, CA19-9 (kancer pankreasa i debelog creva), kancerski antigen 15-3, CA15-3 (kancer dojke), kancerski antigen 125, CA125 (kancer jajnika), specifičan antigen prostate, PSA (kancer prostate), α -fetoprotein, AFP (hepatocelularni kancer) i horionski gonadotropin čoveka, hCG (tumor germinativnih ćelija testisa ili jajnika, odnosno, horiokarcinom) (*Kuzmanov i sar., 2013*).

1.4. Dešifrovanje koda post-translacionih modifikacija (PTM kod)

Post-translacione modifikacije, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim PTM, regulišu skoro sve aspekte funkcije proteina. Tačno određene kombinacije kovalentnih modifikacija koje su koordinisano regulisane predstavljaju PTM kodove čije je dešifrovanje od fundamentalnog značaja za razumevanje njihove biološke uloge (*Lothrop i sar., 2013*).

Opšti princip dešifrovanja PTM kodova još uvek nije ustanovljen. Međutim, ono što je poznato je da mnogi proteini imaju regione unutar primarne sekvence koji predstavljaju mete za brojne i često preklapajuće enzimske modifikacije kao što je npr. kompeticija između fosforilacije i O-glikozilacije na Ser i Thr. Pored toga, u velikom broju slučajeva PTM mogu doprineti vezivanju ili aktivaciji drugih proteina npr. promocija ubikvitinacije fosforilacijom, kao i regulaciji proteina (tumorski supresor p53 ili histoni).

Poznato je, takođe, da se obrazac PTM može identifikovati i korelisati sa različitim biološkim stanjima (normalnim fiziološkim stanjem ili oboljenjima, fazama ćelijskog ciklusa i starenjem) (Minguez i sar., 2012; Lothrop i sar., 2013).

Iako smo još uvek daleko od dešifrovanja ovog složenog jezika, primena tandemске masene spektrometrije (MS/MS) i LC-MS nam omogućava dobijanje dovoljno podataka za komparativnu analizu (Minguez i sar., 2012; Lothrop i sar., 2013). MS/MS nam obezbeđuje značajne informacije o sekvenci i modifikacijama proteina preko širokog opsega masa, od kratkih peptida do intaktnog proteina, dok je LC-MS danas dominantna metoda za detekciju i kvantifikaciju dinamike koda kombinovanih PTM (Lothrop i sar., 2013).

Pre više od deset godina, pretpostavljeno je da pojedinačne ili kombinovane PTM repova histona usmeravaju dalji tok dešavanja u ćeliji. Ovaj koncept je označen kao “hipoteza histonskog koda”. Prema njoj, histonski kod čine određene kombinacije post-translacionih modifikacija repova histona (H2A, H2B, H3 i H4) kao što su metilacija, acetilacija, sumoilacija, ubikvitinacija i fosforilacija (Strahl i Allis, 2000). Pokazano je da su acetilacija Lys8 i Lys14 i fosforilacija Ser10 H3 odgovorne za transkripciju, dok trimetilacija Lys9 H3 i acetilacija N-kraja H3 i H4 dovode do represije transkripcije. Acetilacija Lys4 i 12 H4 u S-fazi dovodi do deponovanja histona, a fosforilacija Ser1, Thr119 H2A i Ser10, 28 i Thr3 H3 uzrokuje kondenzaciju hromatinskih vlakana (Jenuwein i Allis, 2001). Pored histonskog koda, ispitani su i tubulinski i p53 kodovi (Lothrop i sar., 2013).

Formirana je baza podataka *PTMcode*, koja sadrži informacije o poznatim i pretpostavljenim vezama između PTM proteina. Ona trenutno sadrži 13 tipova PTM proteina iz 8 različitih eukariotskih vrsta. Trenutno je ispitano 137525 mesta i 401688 funkcionalnih povezanosti kod 25764 proteina (<http://ptmcode.embl.de/index.cgi>).

Dešifrovanje PTM kodova predstavlja veliki izazov, a razvoj metoda za detekciju PTM zasnovanih na masenoj spektrometriji, kao i sve veći broj podataka o modifikacijama proteina, olakšava dalje dešifrovanje molekulskih “bar kodova” (Minguez i sar., 2012).

1.5. Analiza proteoma

1.5.1. HPP (*Human Proteome Project*): mapiranje proteoma čoveka

Projekat sekvenciranja genoma čoveka (*Human Genome Project*; *HGP*) je započet 1990. i trajao je do 2003. godine. Dobijeni rezultati su pokazali da se genom čoveka sastoji iz 3,2 milijarde baznih parova i 20687 gena koji kodiraju proteine. Sekvenciranjem genoma su takođe određeni pozicija, struktura, organizacija i funkcija ovih gena (<http://www.genome.gov/12011238>).

Nakon uspešnog završetka *HGP*, 2010. godine je pokrenut projekat *Human Proteome Project*; *HPP*. Njegov cilj je bio mapiranje proteoma čoveka tj. celokupnog seta proteina potencijalno eksprimiranih u bilo kom od 230 tipova ćelija. *HPP* obuhvata projekte: *Chromosome-based Human Proteome Project*; (*C-HPP*) i *Biology/Disease Human Proteome Project* (*B/D-HPP*). Cilj *C-HPP* je da unapredi razumevanje proteoma čoveka sa fokusom na razumevanju svakog gena na svakom hromozomu, dok *B/D-HPP* stavlja fokus na ispitivanja brojnih oboljenja. U trenutku započinjanja ovog projekta, prema *UniProtKB/Swiss-Prot* bazama podataka, za oko 30% tj. 6000 gena su nedostajali eksperimentalni podaci na proteinskom nivou, dok su za preostale gene, informacije o zastupljenosti, distribuciji, subcelularnoj lokalizaciji, funkciji i interakciji sa drugim biomolekulima bile veoma oskudne. Metodološki, *HPP* je zasnovan na primeni tehnologije masene spektrometrije, monoklonskih i poliklonskih antitela i integrisanih baza podataka (<http://www.thehpp.org/overview.php>).

Primena masene spektrometrije bi trebalo da omogući kompletiranje baza podataka peptida (npr. *Peptide Atlas*) i proširenje SRM (*Selected Reaction Monitoring*) baze uključivanjem splajsing varijanti, SNP i mnogih post-translacionih modifikacija (<http://www.peptideatlas.org> i <http://www.srmatlas.org>). Primena antitela bi trebalo da omogući konstruisanje kompletne mape ili atlasa ekspresije i subcelularne lokalizacije proteina u ćelijama, tkivima i organima tokom razvoja i pri različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Informacije o specifičnosti i primeni korišćenih antitela će biti dostupne na web portalima *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>) i *Antibodypedia* (<http://www.antibodypedia.org>).

HPP se obavezao da će se oslanjati na baze podataka (*UniProtKB/Swiss-Prot*; *PRIDE*; *PeptideAtlas*; *GPMDDB* i *Human Protein Atlas*) i *ProteineXchange* infrastrukturu za

koordinisanje proteomskim podacima kroz globalnu distribuciju podataka preko sistema za razmenu fajlova: *Tranche (Legrain i sar., 2011)*.

Dve nezavisne istraživačke grupe iz Nemačke i Indije su 2014. godine u časopisu *Nature* objavile prvi nacrt mape proteoma čoveka. Oba nacrta su dobijena primenom masene spektrometrije (*Kim i sar., 2014; Wilhelm i sar., 2014*). Dr *Pandey* i saradnici su prvi nacrt mape proteoma dobili proteomskim profilisanjem 30 histološki normalnih tipova tkiva čoveka (17 adultnih, 7 fetalnih tkiva i 6 prečišćenih primarnih hematopoetskih ćelija). Oni su identifikovali proteine koje kodiraju 17294 gena što je oko 84% od ukupnog broja kodirajućih gena. Dobijeni podaci se nalaze u bazi podataka *Human Proteome Map* (<http://www.humanproteommap.org>) (*Kim i sar., 2014*).

Grupa dr *Kustera* je identifikovala proteine koje kodira 19629 gena, što čini oko 92% ukupnog broja kodirajućih gena. Oni su uradili proteomsku analizu 60 tipova tkiva, 13 telesnih tečnosti i 147 kancerskih ćelijskih linija. Sakupljeni podaci se nalaze u *ProteomicsDB* bazi podataka (<http://www.proteomicsdb.org>) (*Wilhelm i sar., 2014*).

Pored ovoga, obe grupe su identifikovale proteine koji potiču od DNK sekvenci za koje se verovalo da su nekodirajuće (*Ezskurdia i sar., 2014*). Nastavak HPP projekta je od značaja za unapređenje razumevanja biologije čoveka na ćelijskom nivou i postavljanje temelja za dalji razvoj dijagnostike, prognostike, terapije i prevencije za brojna oboljenja (*Legrain i sar., 2011*).

1.5.2. Metode za analizu proteoma

Proteomika se definiše kao analiza dela ili svih proteina složenog biološkog sistema u datom trenutku (*Barbosa i sar., 2012*). Ona obuhvata identifikaciju i kvantifikaciju proteina, određivanje njihovih modifikacija, interakcija, aktivnosti i funkcije (*Shi i sar., 2004*). S obzirom na dinamičnost proteoma, koji se menja u zavisnosti od fiziološkog statusa i faze ćelijske diferencijacije (*Barbosa i sar., 2012*), njegovo izučavanje zaheva tehnologije sa visokom osetljivošću, rezolucijom i dinamičkim opsegom (*Patrie i sar., 2012*). Glavne metode za analizu proteoma su: dvodimenzionalna elektroforeza (2-DE), tačna hromatografija (LC) i masena spektrometrija (MS).

2-DE kombinuje izoelektrično fokusiranje (IEF) u prvoj dimenziji sa natrijum-dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) u drugoj dimenziji. Ograničenja 2-DE se odnose na reproducibilnost, nemogućnost detekcije slabo

zastupljenih i hidrofobnih proteina, proteina velike ($M_r > 150$ kDa) i male ($M_r < 10$ kDa) molekulske mase (Chandramouli i Qian, 2009).

Tečnu hromatografiju karakteriše visoka moć rezolucije, reproducibilnost, kompatibilnost sa MS i širok spektar stacionarnih i mobilnih faza. Primena 1D-LC u proteomici je prilično ograničena usled složenosti uzorka i neophodnosti multidimenzionog razdvajanja (Shi i sar., 2004). Za ovo je mnogo pogodnija 2D-LC koja kombinuje jonoizmenjivačku, afinitetnu ili gel hromatografiju sa hromatografijom na reverznoj fazi direktno kuplovanu sa MS ili tandemskom MS (MS^n) (Neverova i Van Eyk, 2005). Multidimenzioni pristup, LC^n -MS/(MS^n) uključuje enzimsku digestiju proteina (proteazama) i dobijanje smeše peptida. MS^n analizom peptida razdvojenih multidimenzionom LC, se dobijaju informacije o aminokiselinskoj sekvenci, pozicijama post-translacionih modifikacija, kao i ranije neotkrivenim splajsing varijantama i izoformama proteina (Annan i Carr, 1997; Neverova i Van Eyk, 2005; Witze i sar., 2007).

Masena spektrometrija, kao centralna tehnologija u proteomici, se odlikuje visokom selektivnošću i osetljivošću (1pg) (Silva i sar., 2013). MS se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju proteina i post-translacionih modifikacija i za detekciju protein-protein interakcija (Abu-Farha i sar., 2008; Silva i sar., 2013). Analiza podataka dobijenih MS, je omogućena specijalizovanim softverima koji pretragom baza podataka o peptidnim sekvencama mogu izvršiti identifikaciju proteina (Chandramouli i Qian, 2009; Cottrel, 2011).

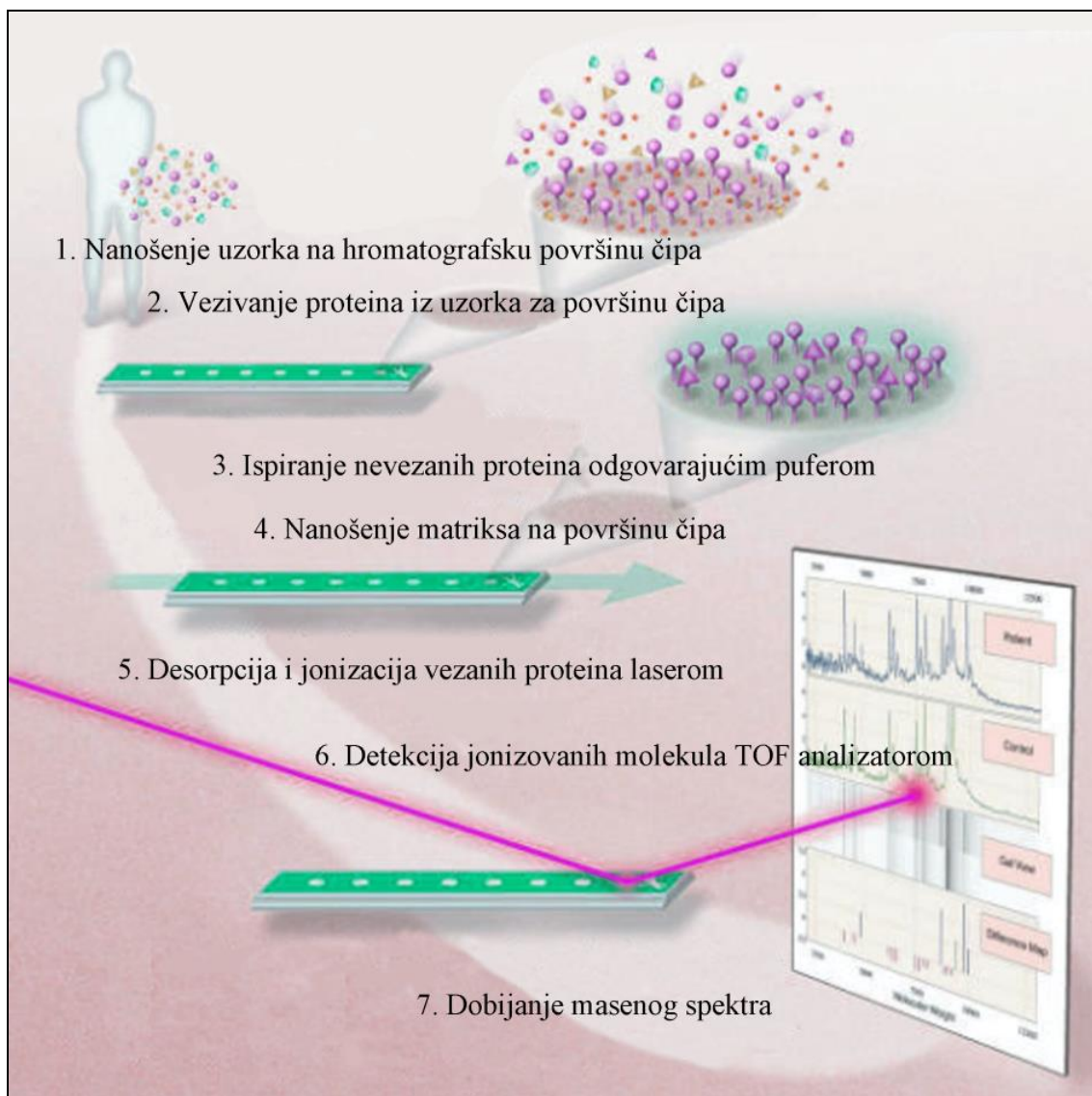
1.5.2.1. Masena spektrometrija (MS)

Masena spektrometrija je tehnika za određivanje mase molekula na osnovu odnosa mase i naelektrisanja njegovog jona (m/z). MS je prvobitno razvijena sa ciljem analize strukture atoma i karakterizacije malih molekula, dok danas predstavlja najmoćniju tehniku za analizu proteoma. Kako su proteini veliki i polarni molekuli, a MS zahteva naelektrisane i gasovite molekule, bilo je neophodno omogućiti njihovo prevođenje u gasovitu fazu i jonizovati ih. To je ostvareno razvojem odgovarajućih jonizacionih tehnika: ESI (jonizacija elektrosprejom) i MALDI (jonizacija/desorpcija laserom potpomognuta matriksom) (Mann i Jensen, 2003; Yates, 2011).

Analiza proteina masenom spektrometrijom uključuje jonizaciju proteina koja može biti praćena njihovom daljom fragmentacijom, razdvajanje jona na osnovu odnosa mase i naelektrisanja, detekciju jona i dobijanje masenog spektra. Jonizacione tehnike koje se najčešće primenjuju su: jonizacija elektronima (*electron ionization; EI*), hemijska jonizacija (*chemical ionization; CI*), bombardovanje brzim atomima (*fast atom bombardment; FAB*), jonizacija/desorpcija laserom potpomognuta matriksom (*matrix assisted laser desorption/ionization-MALDI*), *surface-enhanced laser desorption/ionization- SELDI* i jonizacija elektrosprejom (*electrospray ionization- ESI*). Glavni maseni analizatori koji se koriste u MS su: TOF (*time-of-flight*), kvadrupol (Q) i jonska zamka (IT). *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)* i *Orbitrap* su unapređene verzije IT analizatora (*Barbosa i sar., 2012; Silva i sar., 2013*). Kombinacija masenih analizatora tj. tandemska masena spektrometrija (MS/MS ili MSⁿ) omogućava dobijanje strukturnih informacija fragmentacijom jona prekursora odabranog na osnovu njegove m/z vrednosti (*Edwards, 2011; Silva i sar., 2013*). Fragmenti jona nastaju disocijacijom jona prekursora koja je indukovana njegovom kolizijom sa inertnim gasom (*Collision-Induced Dissociation; CID*), transferom elektrona na višestruko protonovani peptid (*Electron Transfer Dissociation; ETD*) ili hvatanjem niskoenergetskih elektrona od strane višestruko naelektrisanih jona zarobljenih u FT-ICR MS instrumentu (*Electron Capture Dissociation; ECD*) (*Quan i Liu, 2013*). Osnovna karakteristika tandemske MS je visoka selektivnost, a identifikacija molekula se vrši na osnovu m/z vrednosti karakterističnih fragmenata (*Chandramouli i Qian, 2009*).

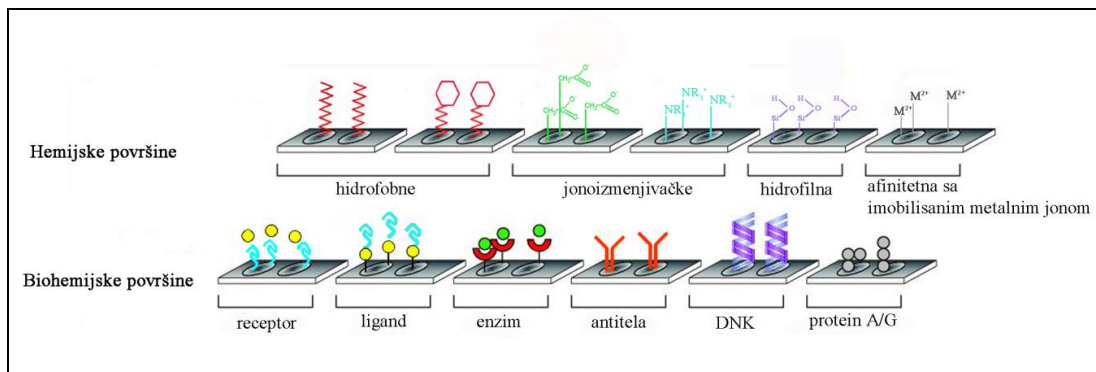
1.5.2.1.1. SELDI-TOF MS (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation–Time of Flight Mass Spectrometry*)

SELDI-TOF MS kombinuje hromatografiju i masenu spektrometriju. Na ovaj način je omogućeno razdvajanje proteina ili peptida iz složenih bioloških uzoraka (serum, ćelijski lizat, tkivni homogenat ili supernatant ćelijske kulture) i njihova MS analiza u jednom koraku (**Slika 4**) (*Hutchens i Yip, 1993; Seibert i sar., 2004*).



Slika 4. Postupak analize proteina/peptida iz bioloških uzoraka SELDI-TOF masenom spektrometrijom. (Izvor: modifikovano prema: *Seibert i sar., 2004*)

Za hromatografiju na čipu, mogu se koristiti različite hemijske i biohemijske površine (**Slika 5**). Hromatografija na klasičnim hemijskim površinama: normalna faza (NP20), hidrofobna površina (H50), anjonski (Q10) i katjonski (CM10) jonoizmenjivač, površina sa imobilisanim jonima metala (IMAC10), je najpodesnija za profilisanje ekspresije proteina. Biohemijske površine predstavljaju pre-aktivirane površine za koje se kovalentno mogu vezati proteini, DNK ili RNK i koje se najčešće primenjuju za ispitivanje interakcija antigen-antitelo, receptor-ligand i DNK- protein (*Seiber i sar., 2004*).



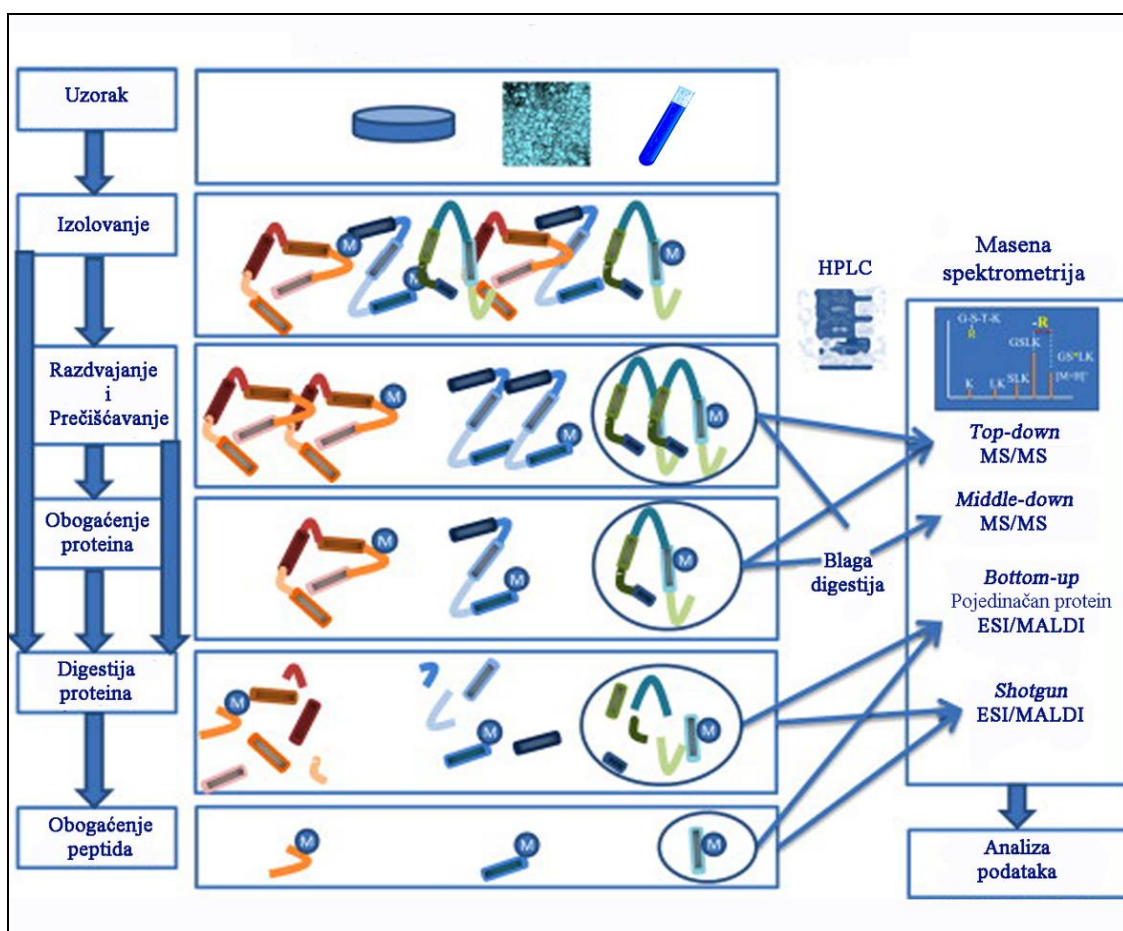
Slika 5. ProteinChip hromatografske površine. (Izvor: modificirano prema: *Seibert i sar., 2004*)

Prednosti SELDI-TOF MS se odnose na minimalne zahteve za prečišćavanjem i razdvajanjem proteina pre MS analize, na dobijanje bioloških informacija iz male količine uzorka bez njegovog obeležavanja, kratak period inkubacije koji redukuje nespecifično vezivanje, automatizaciju i brzinu, reproducibilnost i visoku osetljivost u regionu ispod 30 kDa. Glavna zamerka SELDI-TOF MS se odnosi na nemogućnost identifikacije proteina/peptida. Ovaj nedostatak je prevaziđen povezivanjem sa tandemskim masenim spektrometrom koji omogućava direktno sekvenciranje peptida mase manje od 6 kDa (*Seibert i sar., 2004; Henderson i Sreele, 2005; De Bock i sar., 2010; Liu, 2011*).

1. SELDI-TOF MS u kombinaciji sa čipovima sa pre-aktiviranim biohemijskim površinama za koje se može kovalentno vezati monoklonsko ili poliklonsko antitelo predstavlja tip imunotesta zasnovanog na masenoj spektrometriji. U odnosu na klasične „sendvič“ imunotestove kao što su ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) i IRMA (*immunoradiometric assay*), imunotestovi zasnovani na MS ne zahtevaju obeleženo sekundarno antitelo za detekciju i kvantifikaciju ciljanog proteina, već se oni direktno vrše odgovarajućim masenim spektrometrom. Pored visoke osetljivosti, prednosti ove metode se ogledaju i u mogućnosti detekcije različitih proteinskih varijanti (*Kiernan i sar., 2002; Niederkofler i sar., 2003; Schweigert, 2005; Nedelkov i sar., 2007; Nelson i Borges, 2011; Krastins i sar, 2013; Weiß i sar., 2014*).

1.5.3. Eksperimentalna strategija za analizu post-translacionih modifikacija (PTM)

Eksperimentalna strategija proteomske analize post-translacionih modifikacija (PTM), bez obzira da li se radi o pojedinačnom proteinu ili kompleksnoj smeši proteina, uključuje izolovanje, razdvajanje, prečišćavanje i obogaćenje intaktnog proteina ili odgovarajućih peptida dobijenih enzimskom ili hemijskom degradacijom, identifikaciju PTM Edmanovom degradacijom i/ili masenom spektrometrijom (MS ili MS/MS) i analizu dobijenih podataka odgovarajućim bioinformatičkim alatkama (Slika 6) (Deutzmann, 2004; Shi i sar., 2004; Larsen i sar., 2006; Silva i sar., 2013).



Slika 6. Eksperimentalna strategija za analizu post-translacionih modifikacija proteina. M - modifikacija; HPLC - tečna hromatografija pod visokim protiskom; ESI – jonizacija elektrosprejom; MALDI – jonizacija/desorpcija laserom potpomognuta matriksom. (Izvor: modifikovano prema: Silva i sar., 2013)

Ograničavajući faktor u analizi PTM predstavlja koncentracijski udeo modifikovanog proteina u složenoj smeši proteina. Ovaj problem se prevazilazi kombinovanjem biohemijskih, genetskih ili imunoloških metoda za obogaćenje proteina na osnovu njegovog afiniteta ka različitim ligandima/antitelima (*Mann i Jensen, 2003*). U slučaju fosfoproteina za izolovanje i obogaćenje se koriste afinitetna hromatografija sa imobilisanim metalnim jonom (IMAC), titanijum-dioksid (TiO₂) kolone, specifična hemijska derivatizacija i imunoprecipitacija (*Delom i Chevet, 2006*). Izolovanje i obogaćenje glikoproteina je zasnovano na hidrofilnim interakcijama (*hydrophilic interaction liquid chromatography; HILIC*), interakcijama sa lektinima, ili vezivanjem za hidrazin ili boroničnu kiselinu (*Haslam i sar., 2006; Morelle i Michalski, 2007; Pan i sar., 2011*). Za identifikaciju PTM su neophodni prečišćeni uzorci sa niskim stepenom degradacije i kontaminacije (*Silva i sar., 2013*). Za razdvajanje intaktnog proteina se najčešće primenjuje 2D-elektroforeza, dok HPLC usled visoke rezolucije, reproducibilnosti i kompatibilnosti sa ESI masenom spektrometrijom, predstavlja atraktivan način za razdvajanje, kako, proteina, tako i peptida (*Shi i sar., 2004*).

Modifikovani proteini razdvojeni 2-DE se mogu detektovati specifičnom vizuelizacijom, npr. korišćenjem antitela na fosforilovane aminokiseline ili metaboličkim obeležavanjem, a potom i identifikovati masenom spektrometrijom ili poređenjem rezultata 2-DE pre i posle enzimskog uklanjanja modifikovanih grupa. 2-DE vizuelizacija ima ograničenja usled male količine uzorka, nemogućnosti potpunog razdvajanja svih modifikovanih populacija jednog proteina i ko-migracije dominantnih proteina sa proteinima od interesa (*Mann i Jensen, 2003*).

Za detaljnu karakterizaciju PTM određenog proteina ili smeše proteina, neophodna je njihova enzimaska ili hemijska degradacija. Dobijeni peptidi se razdvajaju HPLC, a daljom primenom Edmanove degradacije ili masene spektrometrije moguće je odrediti masu modifikovanog peptida/proteina. Poređenjem masa modifikovanih peptida/proteina sa masama njihovih standardnih aminokiselinskih sekvenci, moguće je pouzdanije proceniti prirodu modifikacija (*Mann i Jensen, 2003*).

N-terminalno sekvenciranje klasičnom tehnikom Edmanove degradacije se koristi za određivanje proteolitičke i C-terminalne obrade proteina. Modifikovane aminokiseline mogu dovesti do gubitka, smanjenog intenziteta ili izmenjenog retencionog vremena pikova u određenom ciklusu sekvenciranja (*Mann i Jensen, 2003*).

Za identifikaciju PTM masenom spektrometrijom se danas primenjuje “*bottom-up*”, “*top down*” ili “*middle down*” pristup (Shi i sar., 2004; Silva i sar., 2013). “*Bottom-up*” pristup je tradicionalan proteomski pristup za identifikaciju proteina i otkriće PTM. Frakcionisani proteini su proteolitički degradirani, a peptidi se analiziraju LC-MS ili LC-MS/MS. Uzorak koji nije složen se može analizirati bez prethodnog razdvajanja peptida LC, primenom MALDI-TOF masene spektrometrije. „*Top-down*“ pristup podrazumeva jonizaciju i fragmentaciju intaktnog proteina. Fragmentisani joni se potom analiziraju primenom analizatora visoke rezolucije FT-ICR ili *Orbitrap*-om. „*Middle-down*“ je varijanta „*top-down*“ pristupa koja uključuje blagu proteolizu proteina primenom endopeptidaza AspN ili GluC. Dobijeni peptidi se potom sekvenciraju primenom tandemске MS/MS (Patrie i sar., 2012; Silva i sar., 2013). Tandemska MS (MS/MS) se koristi za precizno određivanje prirode PTM, s obzirom na to da često nije dovoljno samo odrediti masu modifikovanog peptida/proteina (Mann i Jensen, 2003; Patrie i sar., 2012). Ona omogućava identifikaciju i lokalizaciju post-translacionih modifikacija zahvaljujući fragmentaciji jona. Njena uspešnost zavisi od brojnih činilaca vezanih za karakteristike fragmenata i stabilnost samih modifikacija. Određivanje tačne aminokiselinske pozicije PTM je moguće kod stabilnih (acetilacija (+42 Da) i metilacije (+14 Da)) i relativno stabilnih (fosforilacija (+80 Da)) modifikacija, dok kod labilnih kao što su O-vezani N-acetilglukozamin (+203 Da) i sulfatacija (+80 Da) to još uvek nije moguće (Mann i Jensen., 2003).

Razvoj tehnika masene spektrometrije je omogućio prevazilaženje problema koji se javljaju pri analizi post-translacionih modifikacija proteina. Masena spektrometrija sa Furijerovom transformacijom (FTMS) i „*top down*“ proteinsko sekvenciranje fragmentisanog intaktnog proteina teorijski omogućava kompletno mapiranje modifikacija u „jednom koraku“ (Mann i Jensen, 2003 ; Patrie i sar., 2012).

Za karakterizaciju PTM na osnovu rezultata dobijenih tandemskom MS se koristi nekoliko bioinformatičkih alatki kao što su: *Mascot* (*Matrixscience*), *Sequest*, *Maxquant* i *Paragon*. Pored toga, za predikciju potencijalnih mesta post-translacionih modifikacija su dostupne alatke kao što su: *NetPhos*, *NetPhosK*, *PredPhospho* (za fosforilaciju) i *NetOGlyc*, *NetNGlyc*, *DictyOGly* i *YinOYang* (za glikozilaciju) (Silva i sar., 2013).

Iako je razvoj novih alatki za analizu PTM značajno doprineo napretku u proteomici i otkriću novih PTM, u velikom broju slučajeva je i dalje neophodna manuelna validacija

rezultata dobijenih MS/MS analizom. Iz tog razloga, a u cilju bolje analize proteomskih podataka, neophodan je dalji razvoj bioinformatičkih alatki.

1.6. Specifičan antigen prostate (PSA)

1.6.1. Ekspresija i funkcija PSA

Specifičan antigen prostate (*prostate-specific antigen*; PSA) ili kalikrein 3 (hK3), pripada grupi ekstracelularnih serin-zavisnih proteaza iz porodice kalikreina (hK). Za razliku od kalikreina 1, hK1 (tkivni kalikrein; urinarni ili pankreasni/renalni kalikrein) i glandularnog kalikreina 2, hK2 (prostatični kalikrein) koji ispoljavaju specifičnost sličnu tripsinu, PSA (hK3) je jedinstven član porodice kalikreina zbog svoje endoproteolitičke aktivnosti koja je slična himotripsinu (*Stenman i sar., 1999a*). Prvi put je identifikovan u semenoj tečnosti 1971. godine i tada je nazvan gama-seminoprotein (*Hara i sar., 1971*), a nakon što je izolovan iz tkiva prostate, 1979. godine, dobija svoj sadašnji naziv (*Wang i sar., 1979*). PSA u najvećoj meri ekspimiraju epitelne ćelije acinusa i duktusa prostate i periuretralne žlezde, a u manjoj meri i neka druga tkiva (*Sumi i sar., 2001*). Prostatični PSA je, normalno, prisutan u semenoj tečnosti u izrazito visokoj koncentraciji od 0,5-5 mg/ml, za razliku od seruma gde se ona kreće do 4 ng/ml (*Satterfield i Welch., 2005*). Usled narušene strukture prostate, do koje može doći pri različitim poremećajima i oboljenjima, nivo PSA se u sistemskej cirkulaciji može znatno povećati (*Pampalakis i sar., 2008; Sarrats i sar., 2010*), a on se može koristiti kao serumski marker za ranu detekciju i praćenje kancera prostate (*Heuzé-Vourc'h i sar., 2002*). Brojne studije su pokazale da PSA nije, u striktnom smislu, specifičan samo za prostatu, već da ga ekspimiraju i neka hormon-zavisna tkiva žene, pre svega dojka, endometrijum i ovarijum, kako u normalnom, tako i u patološkim stanjima. Ovaj ekstraprostatičan PSA je detektovan i u serumu, mleku žene u laktaciji, iscedku iz dojke i cističnoj tečnosti kao i u amnionskoj tečnosti (*Giai i sar., 1995; Yu i Diamandis, 1995; Melegos i Diamandis, 1996; Yu i sar., 1996; Borchert i sar., 1997a; Howarth i sar., 1997; Parish, 1998; Black i Diamandis, 2000; Mannello i Gazzanelli, 2001; Aksoy i sar., 2002*). Ekspresija gena za PSA je, u tkivu prostate, regulisana androgenima, dok je, u ćelijskim linijama kancera dojke ona posredovana aktivacijom receptora za

progesteron, androgene, mineralokortikoide i glukokortikoide, ali ne i receptora za estogene (*Melegos i Diamandis, 1996*).

Uloga PSA kao glavnog proteina semene tečnosti je likvefakcija semenog koaguluma. PSA proteolitički degradira fibronektin i proteine semenih vezikula semenogelin 1 i 2 (SEMG1 i SEMG2). Nastali solubilni fragmenati fibronektina i semenogelina dovode do oslobađanja pokretljivih spermatozoida (*Black i Diamandis, 2000*). Pored ove glavne uloge, prostatični, ali i ekstraprostatični PSA, reguliše interakcije između faktora rasta sličnog insulinu, IGF-1 i jednog od njegovih vezujućih proteina, IGFBP-3, i na ovaj način, utiče na rast ćelije. Stoga, on može biti uključen u abnormalnu proliferaciju i rast tumora. PSA doprinosi razgradnji ekstracelularnog matriksa direktnom degradacijom glikoproteina matriksa, laminina i fibronektina. Pored ovoga, PSA može proteolitički aktivirati latentni transformišući faktor rasta (TGF)- β koji je mitogen osteoblasta i na taj način uticati na rast ćelija kostiju i drugih tkiva (*Parish i sar., 1998; Romanov i sar., 2004*). Pokazano je da PSA učestvuje i u aktivaciji urođenog imunskog odgovora. U ćelijskoj liniji mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC), PSA stimuliše CD14⁺ monocite da sekretuju solubile faktore koji dovode to toga da NK ćelije sekretuju interferon γ (IFN γ) koji je ključan citokin u aktivaciji imunskog odgovora. Ova aktivnost se ne dešava pri uobičajenim serumskim fiziološkim koncentracijama, već zahteva koncentraciju PSA koja je prisutna u epitelnim ćelijama prostate i semennoj tečnosti (*Klyushnenkova i sar., 2004; Kodak i sar., 2006*).

1.6.2. hKLK3 gen

Porodica gena tkivnih kalikreina je otkrivena 80-tih godina prošlog veka. Prvobitno je smatrano da nju čine samo tri člana: hKLK1, hKLK2 i hKLK3 koji kodira hK3 tj. PSA. Danas se zna da ona ima najmanje 15 gena, koji kodiraju serin-zavisne proteaze čiji aktivni centri sadrže katalitičku trijadu (His, Asp i Ser na odgovarajućim pozicijama), i da je većina njih regulisana steroidnim hormonima (*Black i Diamandis, 2000; Diamandis i sar., 2000; Yousef i Diamandis, 2001*).

Svi kalikreinski geni se nalaze na istom hromozomskom lokusu (19q13.3-q13.4), koji zauzima region od 60-70 kb. Oni dele značajnu sličnost na nivou nukleotidne sekvence i organizacije gena koju karakterišu pet kodirajućih egzona slične ili iste dužine i potpuno konzervirani introni.

Kombinovanjem *Northern blot* analize, molekulskog kloniranja i pretraživanja baze podataka, pokazano je da hKLK3 gen u prostati (tkivu i ćelijskoj liniji kancera prostate) produkuje najmanje 15 transkripata od 0,7 do 6,1 kb. Glavna iRNK od 1,6 kb kodira pre-pro formu hK3, tj. PSA, dok su ostali transkripti rezultat višestrukog splajsovanja ili poliadenilacije. Oni kodiraju „truncated“ formu pre-proPSA (PSA-Tr), pet varijanti PSA koji su označene kao proteini srodni PSA (PSA-RP1-5) i jedan protein koji nije srodan PSA (PSA-LM) (Heuzé i sar., 1999; Heuze-Vourc'h i sar., 2001; Heuze-Vourc'h i sar., 2003).

In silico analiza EST (*Expressed Sequence Tag*) sekvenci, koje pokazuju visok stepen homologije sa PSA i koje sadrže ceo ORF, je dovela do identifikacije pet novih transkripta koji su označeni kao PSA-SV1-5 za koje je pretpostavljeno da mogu kodirati proteine slične PSA. Proteini koje kodiraju transkripti PSA-SV1-4 pokazuju homologiju u N-terminalnom, a PSA-SV5 kodirani protein u C-terminalnom domenu sa kanonskom polipeptidnom sekvencom PSA (Pampalakis i sar., 2008).

1.6.2.1. Kanonska sekvenca PSA

PSA se sintetiše kao pre-proPSA (261 ak) koji sadrži signalnu sekvencu od 17 ak i propeptid od 7 ak. Signalni peptid usmerava protein ka membrani endoplazmatskog retikuluma (ER) gde dolazi do njegovog uklanjanja i nastanka proPSA forme (244 ak). Glikozilacija proPSA se odvija u Goldžijevom aparatu, nakon čega se on transportuje unutar vezikula do plazma membrane gde se sekretuje u lumen duktusa prostate. hK2 je odgovoran za prevođenje proPSA u zreli PSA (237 ak) koji je enzimski aktivan (Sumi i sar., 2001). Ova izoforma je referentna kao kanonska/standardna sekvenca PSA, i u odnosu na nju su opisane ostale izoforme (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07288>).

1.6.2.2. Proteini srodni PSA (*PSA related proteins*; PSA-RP)

Proteini srodni PSA, PSA-RP 1-5 dele isti signalni peptid i mogu se sintetisati kao pre-proforme koje sadrže 238, 180, 218, 220 i 227 aminokiselina, redom. PSA-RP1, PSA-RP2 i PSA-RP5 imaju alternativne C-terminalne regione. PSA-RP1 i PSA-RP2 su u tkivu prostate identifikovani imunohistohemijski i imunoblot analizom. Sekretovani PSA-RP1 i PSA-RP2 su glikoproteini molekulske mase 27 kDa i 25 kDa, redom, koji ne poseduju enzimsku aktivnost usled nedostatka Ser iz katalitičke trijade. PSA-RP3 i

PSA-RP4 usled „*in frame*“ delecije transkripata imaju kraće polipeptidne lance od PSA. PSA-RP3 se odlikuje delecijom od 44 ak (45-88 ak) koja obuhvata mesto glikozilacije Asn45, dok delecija od 42 ak kod PSA-RP4 uključuje Asp96 iz katalitičke trijade i Cys128. Ekspresija PSA-RP3-5 još uvek nije eksperimentalno potvrđena (*Tanaka i sar., 2000; Heuzé-Vourc'h i sar., 2001; Isono i sar., 2002; Heuzé-Vourc'h i sar., 2003; <http://www.uniprot.org/uniprot/P07288>*).

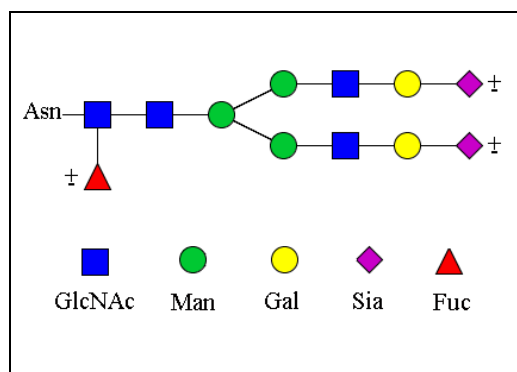
1.6.2.3. Pretpostavljene strukture proteina kodiranih transkriptima PSA-SV1-5

PSA-SV1 transkript je identifikovan u skeletnom mišićnom tkivu i odlikuje se znatno kraćim egzonom III što rezultira novim ORF. On kodira protein koji sadrži 78 ak i čiji je N-terminalni domen isti kao kod klasičnog PSA molekula. PSA-SV2 transkript je identifikovan u ćelijskim linijama kancera prostate i dojke. On kodira protein koji sadrži 199 ak i koji se od klasičnog PSA razlikuje po deleciji 43 ak (nedostatak dela egzona III) i C-terminalnom domenu (alternativni egzon V). On pokazuje visok stepen homologije sa PSA-RP3. Transkripti PSA-SV3 i PSA-SV4 koji kodiraju proteine od 40 ak (prvih 16 ak su identične onima kod klasičnog PSA molekula) i 69 ak, redom, su identifikovani u tkivu prostate. PSA-SV5 transkript je rezultat aktivnosti alternativnih promotora koji su locirani unutar introna II. Protein kodiran PSA-SV5 transkriptom ima C-terminalni domen identičan onom kod klasičnog PSA i odlikuje se nedostatkom His iz katalitičke trijade, te najverovatnije ne poseduje enzimsku aktivnost. U odnosu na druge splajsing varijante PSA, ekspresija PSA-SV5 je specifična za kancer prostate. (*Pampalakis i sar., 2008*). Ekspresija proteina kodiranih transkriptima PSA-SV1-5 još uvek nije eksperimentalno potvrđena.

1.6.3. Molekulska struktura PSA

Uvid u molekulsku strukturu PSA je dobijen analizom preparata izolovanog iz semene plazme metodama *Ion spray* masene spektrometrije (ISMS) i nuklearne magnetne rezonance (NMR). Glavna forma PSA je detektovana na 28430 Da, a minorna na 28284 Da. Na osnovu razlike između eksperimentalno određene i teorijske mase polipeptidnog lanca PSA (26089,17 Da) pretpostavljeno je da je u pitanju glikozilovan protein. NMR analizom je određena struktura glikana koja odgovara jednom biantenarnom lancu N-acetil-laktozaminskog tipa sa sijalinskom kiselinom na krajevima obe grane (**Slika 7**), s

tim da glavna forma PSA sadrži i α 1,6-fukozu (Mr 146 Da) (Bélanger i sar., 1995). Mesto N-glikozilacije je Asn45. Pored mesta N-glikozilacije, opisana su i tri potencijalna mesta O-glikozilacije Ser69, Thr70 i Ser71 (Huber i sar., 1995). PSA sadrži pet disulfidnih veza (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07288>).

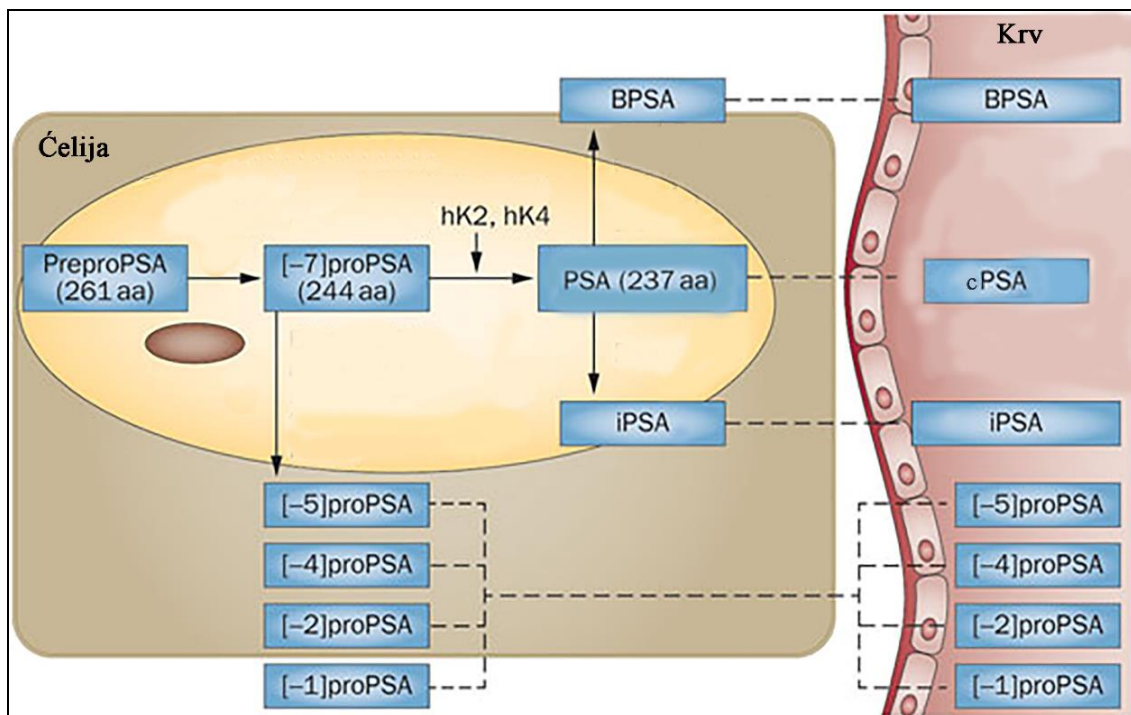


Slika 7. Struktura biantenarnog oligosaharidnog lanca PSA. GlcNAc: N-acetilglukozamin; Man: manoza; Gal: galaktoza; Sia: sijalinska kiselina; Fuc: fukoza. (Izvor: modifikovano prema: Bélanger i sar., 1995)

1.6.3.1. Heterogenost polipeptidnog lanca PSA

Strukturna heterogenost polipeptidnog lanca PSA iz seruma, semene plazme, benignog i malignog tkiva prostate, ispitana je korišćenjem 2DE, masene spektrometrije (MS) i aminokiselinskog sekvenciranja (Jung i sar., 2004; Vermassen i sar., 2012). Ona uključuje „truncated“ proPSA forme, „nicked“ PSA (PSA-N) i intaktni PSA (iPSA). „Truncated“ proPSA forme se odlikuju delimično uklonjenom propeptidnom sekvencom do koje dolazi post-translacionom proteolitičkom degradacijom propeptida. Teorijski može postojati šest „truncated“ proPSA formi, ali su u serumu muškarca pronađene jedino [-1], [-2], [-4] i [-5]proPSA, dok još uvek ne postoje podaci o postojanju [-3] i [-6]proPSA. Ove forme su enzimski neaktivne (Mikolajczyk i sar., 2001; Peter i sar., 2001; Mikolajczyk i Rittenhouse, 2003; Peyromaure i sar., 2005; Tabarés i sar, 2007; Stephan i sar., 2009a; Zhang i Lu, 2012; Lazzeri i sar., 2013). „Nicked“ PSA forme su identične nativnom, zrelom PSA, ali imaju unutrašnje prekide između aminokiselina na pozicijama Arg85-Phe86, Lys145-Lys146 i Lys182-Ser183 i smanjenu enzimsku aktivnost (Isono i sar., 2002; Tabarés i sar, 2007; Stephan i sar., 2009a; Peltola i sar., 2011). Forma sa prekidima između Lys145/Lys146 i

Lys182/Ser183 je označena kao BPSA i ona je karakteristična za BPH (*Mikolajczyk i sar., 2000; Linton i sar., 2003*). Usled prekida, dolazi do narušavanja njene konformacije što je čini neaktivnom i onemogućava formiranje kompleksa sa inhibitorima proteaza (*Isono i sar., 2002; Peltola i sar., 2011*). U serumu i tkivu je prisutna i forma intaktnog PSA (iPSA) koja je identična nativnom, zrelom PSA, nema unutrašnje prekide, ali je ipak neaktivna i ne formira kovalentene komplekse sa inhibitorima proteaza (**Slika 8**) (*Stephan i sar., 2009a*).



Slika 8. Heterogenost polipeptidnog lanca PSA u ćeliji i cirkulaciji. [-1], [-2], [-4] i [-5]proPSA - „truncated“ PSA; PSA - zreo molekul; BPSA - PSA sa unutrašnjim prekidima između Lys145/Lys146 i Lys182/Ser183; iPSA - intaktni PSA; cPSA - PSA u kompleksu sa inhibitorima proteaza: hK2 i hK4 - kalikreini 2 i 4. (Izvor: modifikovano prema: *Guilgunn i sar., 2013*).

1.6.3.2. Mikroheterogenost oligosaharidnog lanca PSA

Mikroheterogenost oligosaharidnog lanca PSA je ispitana u semenoj plazmi, serumu, LNCaP ćelijskoj liniji i urinu primenom lektinskih testova, masene spektrometrije, 2DE

i kapilarne elektroforeze (CE) (*Janković i Kosanović, 2005; Sarrats i sar., 2010; Végvári i sar., 2012; Vermassen i sar., 2012; Vermassen i sar., 2014*)

Razdvajanjem afinitetno prečišćenog PSA iz semene plazme (SP PSA) anjonskom jonoizmenjivačkom hromatografijom, dobijeno je pet frakcija sa različitim izoelektričnim pH (pI). Nakon tretmana neuraminidazom, pI pojedinih frakcija PSA se povećao i pretpostavljeno je da je to rezultat razlike u sadržaju sijalinske kiseline (*Zhang i sar., 1995; Okada i sar., 2001*). MS analizom SP PSA su detektovane izoforme molekulskih masa 26808,9 - 28448,1 Da za koje je pokazano da sadrže N-glikane oligomanoznog, hibridnog i kompleksnog tipa (*Mattsson i sar., 2008*). U SP PSA je dominantna Sia α 2,6Gal (*Tajiri i sar., 2008*).

Pokazano je da serumski PSA osoba sa PCa, u poređenju sa serumskim PSA zdravih i osoba sa BPH ima povećan sadržaj fukoze i Sia α 2,3Gal, što je najverovatnije rezultat uvećane ekspresije α 2,3-sijaliltransferaza. Kancerski urinarni PSA, u poređenju sa serumskim, pokazuje smanjen nivo glikozilacije (*Vermassen i sar., 2012*). Pored ovoga, izoelektrično fokusiranje je pokazalo da PSA iz LNCaP ima viši pI nego normalan PSA, ukazujući na manji sadržaj sijalinske kiseline tj. na prisustvo neutralnih oligosaharida koji imaju povećan sadržaj GlcNAc i Fuc α 1-2Gal koja formira H2 epitop (*Huber i sar., 1995; Peracaula i sar., 2003*).

PSA u LNCaP i kancerskom tkivu, u poređenju sa PSA iz semene plazme, normalnog i benignog tkiva, sadrži multiantenarne N-glikane kompleksnog tipa (*Prakash i Robbins, 2000; Tajiri i sar., 2008*).

1.6.4. Biomarkerski potencijal post-translacionih modifikacija PSA

PSA je prvi tumorski marker odobren od strane FDA (*The Food and Drug Administration*) koji je u kliničkoj upotrebi od 1986. godine (*De Angelis i sar., 2007*). PSA testovi mere koncentraciju ukupnog i slobodnog PSA u uzorku seruma pacijenata. Međutim, PSA se ne može smatrati idealnim tumorskim markerom usled nedostataka koji se odnose na njegovu osetljivost i specifičnost u dijagnostičkoj „sivoj zoni“ (4-10 ng/mL).

U cilju prevazilaženja ovih nedostataka, započeto je ispitivanje biomarkerskog potencijala post-translacionih modifikacija PSA, s obzirom na to da je poznato da

različita fiziološka i patofiziološka stanja ćelija ili tkiva prate i promene u post-translacionim modifikacijama (Schweigert, 2005).

2. Istraživanja su pokazala da je nivo „truncated“ proPSA forme ([2]proPSA) uvećan u serumu i tkivu pacijenata sa kancerom prostate. Danas je komercijalno dostupan imunotest koji određuje nivo [2]proPSA u serumu pacijenata čiji je ukupan PSA u dijagnostičkoj „sivoj zoni“, a za koje se sumnja da imaju kancer prostate (Jansen i sar., 2010; Lazzeri i sar., 2013; <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm309081.htm>).

Za BPSA je pokazano da je dominantno prisutan u tranzicionoj zoni prostate pacijenata obolelih od nodularne benigne hiperplazije (Sumi i sar., 2001). Iako je imunotest za određivanje BPSA uspostavljen, on se ne nalazi u dijagnostičkoj upotrebi (Linton i sar., 2003). Poznato je da izmenjena glikozilacija prati nastanak patofizioloških stanja, tako da je glikozilacija jedna od post-translacionih modifikacija sa najvećim biomarkerskim potencijalom (Huber i sar., 1995; Peracaula i sar., 2003; Vermassen i sar., 2012). Istraživanja usmerena ka profilisanju različitih glikoizoforni PSA normalnog i tumorskog porekla mogu značajno doprineti unapređenju primene PSA u diferencijalnoj dijagnostici bolesti prostate.

2. Cilj

Proteinska vrsta kao najmanja strukturna i funkcionalna jedinica proteoma, originalno, je definisana na hemijsko-molekulskom nivou i označava jedan individualni protein iz familije proteina koga kodira jedan gen. Prihvatanje koncepta specijacije proteoma i kinetike njihovih proteinskih vrsta predstavlja ključan iskorak u savremenim istraživanjima koja za cilj imaju detaljan i precizan opis identiteta i vremenske distribucije svih proteinskih vrsta određenog proteoma. Ispitivanje strukture proteina je, sa analitičke tačke gledišta, veoma zahtevno, a razvoj i primena novih tehnika masene spektrometrije su otvorili brojne mogućnosti za detekciju i definisanje diskretnih razlika u proteinskim vrstama.

PSA, glikoprotein koga karakteriše heterogenost polipeptidnog lanca kao i mikroheterogenost oligosaharidnog lanca, jeste zajednička biohemijska karakteristika kancera prostate i kancera dojke. Za potpuno razumevanje biološkog značaja heterogenosti PSA i njegove organ-ograničene distribucije, neophodno je da se znanje o njegovim molekulskim formama upotpuni podacima o prostatičnim i ekstraprostatičnim molekulskim vrstama. Ovo se posebno odnosi na slobodnu formu PSA koja ima smanjenu enzimsku aktivnost ili je neaktivna. Ona do sada nije bila predmet sistematskog ispitivanja i ne postoji uvid u biološki smisao heterogenosti PSA molekula koji je nefunkcionalan, kao i u značaj smanjenja njegove zastupljenosti u kanceru prostate u poređenju sa benignom hiperplazijom i normalnim fiziološkim stanjem. Pored dopune bazičnih znanja o molekulskoj strukturi, ispitivanje kompozicije proteinskih vrsta nekog biološkog kompartmenta i validacija proteinskih modifikacija koje se javljaju u određenim fiziološkim i patološkim stanjima je, generalno, i od interesa u laboratorijskoj dijagnostici u smislu standardizacije heterogenih bioloških analita u koje se ubrajaju i glikoproteinski tumorski markeri.

Cilj ovoga rada je da se ustanovi profil molekulskih vrsta slobodnog PSA u subproteomima klinički relevantnih bioloških tečnosti: serum, urin i semena plazma. Njihova identifikacija je vršena na osnovu imunoreaktivnosti prema epitopski okarakterisanom antitelu, a nivoi molekulske različitosti su definisani u odnosu na kanonsku aminokiselinsku sekvencu PSA i kompoziciju njegovog kompletnog N-glikana na poziciji Asn45.

Radi postizanja zadatog cilja, neposredni zadaci ovog rada su podeljeni u dve celine. Prva celina se odnosila na uspostavljanje sistema za kvalitativnu analizu molekulskih

vrsta slobodnog PSA zasnovanog na imunoafinitetnoj hromatografiji na čipu i masenoj spektrometriji, u cilju selektivne detekcije vrsta bliskih molekulskih masa. Druga celina se odnosila na profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz odabranih nefrakcionisanih ili frakcionisanih uzoraka poreklom od zdravih osoba, osoba sa benignom hiperplazijom, kancerom prostate i kancerom dojke, primenom uspostavljenog imunotesta zasnovanog na masenoj spektrometriji. U ove svrhe su korišćene metode: adsorpcija na čvrstoj fazi, SELDI-TOF/MS, gel filtracija, jonoizmenjivačka hromatografija i bioinformatičko predviđanje.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Reagensi

- Mišije monoklonsko antitelo na slobodan PSA (fPSA), klon 8A6, klasa IgG_{2a}, afinitetno prečišćeno, (*Hy Test, Turku, Finska*)
- Mišije monoklonsko antitelo na ukupan PSA, klon 8311, klasa IgG_{2a}, (*Medix, Kauinainen, Finska*)
- Poliklonsko antitelo na humani IgM, konjugovano sa alkalnom fosfatazom (*Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Nemačka*)
- ELSA CA 15-3, komplet za određivanje koncentracije CA15-3 (*CisBio Bioassays, Codolet, Francuska*)
- IRMA fPSA, komplet za određivanje koncentracije slobodnog PSA (INEP, Zemun, Srbija)
- IRMA PSA, komplet za određivanje koncentracije ukupnog PSA (INEP, Zemun, Srbija)
- RID IgM ploče za određivanje koncentracije IgM (INEP, Zemun, Srbija)
- *Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska)*
- Polistirenske epruvete sa zvezdastim dnom (Spektar, Čačak, Srbija)
- Polistirenske ploče sa 96 mesta (*NUNC, Roskilde, Danska*)
- Čipovi: NP20 (*Normal Phase ProteinChip*), PS20 (*Strong Preactivated Surface ProteinChip*), CM10 (*Weak Cation Exchange ProteinChip*) i Q10 (*Anion Exchange ProteinChip*) (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*).
- Prvi internacionalni standard fPSA, NIBSC Code 96/668 (*National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, Velika Britanija*)
- Prvi internacionalni standard PSA (90:10), NIBSC Code 96/670 (*National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, Velika Britanija*)
- Standardi molekularskih masa za elektroforezu, *ColorBurst* (miozin, 200 kDa; β-galaktozidaza, 116 kDa; fosforilaza b, 97 kDa; goveđi serumski albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; karbonatna anhidraza, 31 kDa; inhibitor tripsina, 21 kDa; lizozim, 14 kDa; aprotinin, 6 kDa) (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*)
- Standardi za masenu spektrometriju, *ProteinChip All-in-one-protein Standards II* (hirudin BHVK, 6964 Da; goveđi citohrom C, 12230 Da; mioglobin konja,

16951 Da; goveđa karbonatna anhidraza, 29023 Da; enolaza iz *S. cerevisiae*, 46671 Da; goveđi serumski albumin, 66433 Da, goveđi IgG, 147300 Da) (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*)

- Para-nitrofenilfosfat, p-NPP (*Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Nemačka*)
- Sinapinska kiselina, SPA (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*)
- Tris-(hidroksimetil)-aminometan, Tris (*ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohajo, SAD*)
- Goveđi serumski albumin, BSA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD*)

3.1.2. Uzorci telesnih tečnosti čoveka

Uzorci biološkog materijala su dobijeni iz Zavoda za laboratorijsku dijagnostiku INEP, u skladu sa lokalnim etičkim standardima i procedurama rukovanja uzorcima biološkog materijala prema standardu ISO 9001:2008 i SRPS ISO/IEC 17025:2006.

3.1.2.1. Uzorci semene plazme

Parametri uzoraka semene tečnosti koji su korišćeni u ovom radu su, prema kriterijumu Svetske zdravstvene organizacije (WHO), bili u rangu normalnih vrednosti: volumen > 2 ml, likvefakcija < 30 min, broj spermatozoida > 20×10^6 , broj spermatozoida sa normalnom morfologijom > 70% i ukupan broj pokretnih spermatozoida > 50 %. Spermatozoidi i druge ćelije semene tečnosti su uklonjene centrifugiranjem, 20 min na 900 x g. Pul uzoraka semene plazme je formiran od 10 pojedinačnih uzoraka i čuvan na -20 °C do dalje upotrebe.

3.1.2.2. Uzorci seruma

Za ispitivanje su korišćeni uzorci seruma osoba sa benignom hiperplazijom prostate (BPH), kao i osoba sa kancerom prostate (PCa) koji su dijagnostikovani merenjem nivoa PSA, fizičkim pregledom, ultrazvukom i biopsijom. Ispitivani su pojedinačni uzorci seruma (n=8) ili pulovi seruma (n=3), formirani nasumičnim odabirom pojedinačnih BPH- ili PCa-seruma (n=6).

Koncentracije ukupnog PSA u pojedinačnim BPH-serumima su bile u opsegu 0,4-6,8 µg/l, a kod PCa-seruma 21,8-238,4 µg/l. U ispitivanim BPH-pulovima, koncentracije PSA su bile u opsezima: 0,8-5,1 µg/l (za pul I); 0,4-2,5 µg/l (za pul II) i 0,3-5,1 µg/l (za

pul III), a za PCa-pulove: 15,6-776,0 $\mu\text{g/l}$ (za pul I); 35,4-987,2 $\mu\text{g/l}$ (za pul II) i 20,7-3063,3 $\mu\text{g/l}$ (za pul III).

Koncentracije ukupnog PSA u pojedinačnim uzorcima seruma zdravih ženskih osoba ($n=7$) i ženskih osoba ($n=10$) sa povišenim novoom CA 15-3 (37 IU/l - 669 IU/l) su bile u opsegu 0,05 $\mu\text{g/l}$ - 0,50 $\mu\text{g/l}$ i 0,03 $\mu\text{g/l}$ - 0,13 $\mu\text{g/l}$, redom.

3.1.2.3. Uzorci urina

Za ispitivanje su korišćeni uzorci prvog jutarnjeg urina zdravih muškaraca ($n=7$). Nakon centrifugiranja na 2000 x g, dobijeni talog je uklonjen i supernatant je korišćen za dalju analizu. Koncentracije ukupnog PSA u urinima su bile u opsegu 0,15-33 $\mu\text{g/l}$.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje koncentracije slobodnog PSA (fPSA)

Koncentracija fPSA je određena korišćenjem IRMA fPSA kompleta, na sledeći način: u epruvete sa imobilisanim anti-fPSA antitelom je dodato 100 μl uzorka ili standarda i 100 μl obeleženog ^{125}I -anti-PSA antitela. Uzorci su inkubirani 18-20h, na sobnoj temperaturi, uz mućkanje. Nevezana antitela su uklonjena aspiriranjem i ispiranjem 0,01% *Tween*-om (tri puta po 2 ml). Radioaktivnost vezanih antitela je izmerena korišćenjem gama brojača *Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer, Waltham, SAD)*, a koncentracija fPSA je očitana sa odgovarajuće standardne krive.

3.2.2. Određivanje koncentracije ukupnog PSA

Koncentracija ukupnog PSA je određena korišćenjem IRMA PSA kompleta, na sledeći način: u epruvete sa imobilisanim anti-PSA antitelom je dodato 50 μl junećeg seruma, 50 μl uzorka ili standarda i 100 μl obeleženog ^{125}I -anti-PSA antitela. Uzorci su inkubirani 18-20h, na sobnoj temperaturi, uz mućkanje. Nevezana antitela su uklonjena aspiriranjem i ispiranjem 0,01% *Tween*-om (tri puta po 2 ml). Radioaktivnost vezanih antitela je izmerena korišćenjem gama brojača *Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer, Waltham, SAD)*, a koncentracija PSA je očitana sa odgovarajuće standardne krive.

3.2.3. Određivanje koncentracije CA 15-3

Koncentracija CA 15-3 u serumu je određena korišćenjem ELSA CA15-3 kompleta, na sledeći način: u epruvetu sa imobilisanim monoklonskim anti-CA 15-3 antitelom je dodato 300 μ l razblaženog seruma (1:50). Uzorak je inkubiran 1h, na sobnoj temperaturi, uz konstantno mućkanje na 400 rpm. Nakon ispiranja, u epruvetu je dodato 300 μ l 125 I-anti-CA 15-3 antitela, koje je inkubirano 1h, na sobnoj temperaturi uz konstantno mućkanje na 400 rpm. Postupak ispiranja je ponovljen, a radioaktivnost vezanih antitela je izmerena na gama brojaču *Wallac Wizard 1470* (*Perkin Elmer, Waltham, SAD*). Koncentracija CA 15-3 je očitana sa odgovarajuće standardne krive.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorku (c) je određena spektrofotometrijski, na osnovu absorbanci na talasnim dužinama od 280 nm (A_{280}) i 260 nm (A_{260}), po formuli: $c = A_{280} \times 1,55 - A_{260} \times 0,76$. Absorbanca je izmerena na *Victor V3* čitaču (*Perkin Elmer, Monza, Italija*).

3.2.5. Određivanje koncentracije IgM radijalnom imunodifuzijom (RID)

Radijalna imunodifuzija je rađena na 1% agar gelu koji sadrži odgovarajući antiserum (RID ploče, INEP, Srbija). 5 μ l uzorka je dodato u otvore i inkubirano 48 h na sobnoj temperaturi. Vrednosti koncentracija IgM u ispitivanim uzorcima su očitane iz tabele priložene uz RID ploču, a na osnovu izmerenog prečnika (R) precipitinskog prstena.

3.2.6. Oslobođanje PSA iz PSA-ACT kompleksa etanolaminom

U 100 μ l seruma je dodato 100 μ l 0,2 M etanolamina, pH 10,3 (10 μ l 2M etanolamina u 90 μ l 0,05 M PBS, pH 7,2). Nakon tretmana, 24 h na +25 °C, uzorak je neutralisan dodatkom 0,5 M HCl i kao takav korišćen za dalju analizu.

3.2.7. Gel filtracija seruma na koloni *Sephacryl S-300*

Gel filtracija seruma je rađena na koloni *Sephacryl S-300* (1,3 x 25 cm), koja je uravnotežena i eluirana 0,05 M PBS, pH 7,2. Na kolonu je naneto 400 μ l uzorka i sakupljane su frakcije od 1ml. Elucioni profil ukupnih proteina je praćen merenjem

absorbance na 280 nm (A_{280}) i 260 nm (A_{260}), korišćenjem *Victor V3* čitača (*Perkin Elmer, Monza, Italija*). PSA, u serumskim frakcijama razdvojenim gel filtracijom, je detektovan korišćenjem IRMA PSA i IRMA fPSA kompleta kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. i 3.2.2.

3.2.8. Detekcija imunoglobulina M (IgM)

Detekcija IgM u frakcijama seruma razdvojenim gel filtracijom je izvršena nakon njihove adsorpcije na čvrstu fazu (ploča sa 96 bunarića), po sledećoj proceduri. Odgovarajuća frakcija (50 μ l) je dodata u bunarić i inkubirana 18h na 4 °C. Nakon ispiranja 0,05 M PBS, pH 7,2 (tri puta po 300 μ l), slobodna mesta su blokirana 0,5 % BSA (300 μ l), 2h na sobnoj temperaturi. Procedura ispiranja je ponovljena, a u bunarić su potom dodata antitela na humani IgM obeležena alkalnom fosfatazom (50 μ l), koja su inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi. Višak konjugata je uklonjen ispiranjem, nakon čega je dodat supstrat, p-nitrofenilfosfat (50 μ l). Reakcija je zaustavljena 1 M NaOH (50 μ l), a apsorbancija na 405 nm je izmerena korišćenjem *Victor V3* čitača (*Perkin Elmer, Monza, Italija*). Frakcije u kojima je detektovano prisustvo IgM su koncentrovane i korišćene u daljim istraživanjima.

3.2.9. Detekcija PSA-IgM kompleksa

Za detekciju PSA-IgM imunokompleksa, korišćen je test na čvrstoj fazi sa imobilisanim monoklonskim anti-PSA antitelom, klon 8311. Anti-PSA antitelo (250 μ l; 1,2 μ g/ml) je dodato u polistirenske epruvete sa zvezdastim dnom i inkubirano 18 h na 4 °C. Nakon ispiranja 0,05 M PBS pH 7,2 (dva puta po 2 ml), slobodna mesta su blokirana 0,5 % kazeinom (1 ml), 2h na 37 °C. Postupak ispiranja je ponovljen i epruvete su osušene u vakuumu bez zagrevanja. Odgovarajuća frakcija (100 μ l) je dodata u epruvetu sa imobilisanim anti-PSA antitelom i inkubirana 4 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja 0,05 M PBS, pH 7,2 (tri puta po 500 μ l) u epruvetu su dodata antitela na humani IgM obeležena alkalnom fosfatazom (100 μ l). Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi, a nakon ispiranja nevezanog konjugata, dodat je supstrat, p-nitrofenilfosfat (100 μ l). Reakcija je prekinuta dodavanjem 1M NaOH (100 μ l) i apsorbancija je izmerena na 405 nm koristeći *Victor V3* čitač (*Perkin Elmer, Monza, Italija*). Frakcije u kojima je

detektovan imunokompleks PSA-IgM su koncentrovane i korišćene u daljim istraživanjima.

3.2.10. Imunoelektroforeza

Imunoelektroforeza je rađena na 1 % agar gelu prema metodi koju su opisali *Williams i Grabar (Williams i Grabar, 1955)*. 10 µl uzorka (IgM ili PSA-IgM) je podvrgnuto elektroforezi u trajanju od 1,5 h na 4 °C. Po završetku imunoelektroforeze, u kanal u gelu je dodato 100 µL antiseruma (ovčiji anti-humani IgM) i inkubirano 18 h u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi do formiranja precipitinskih linija. Prisustvo IgM, tj. klasa njegovog teškog i tip lakog lanca su procenjeni na osnovu oblika i intenziteta formiranih precipitinskih lukova.

3.2.11. Imunoafinitetna hromatografija na PS20 čipu (*preactivated surface ProteinChip, PS20*)

Monoklonsko antitelo na fPSA (5 µl) je naneto na preaktivirani proteinski čip PS20 i inkubirano, 18-20 h, u vlažnoj komori, na 4 °C. Čip je, potom, ispran 0,05 M PBS, pH 7,2 (tri puta po 5 µl), 1 min uz mućkanje i blokiran 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, (5 µl), 1h u vlažnoj komori. Nakon ponovnog ispiranja, po istoj proceduri, na čip je nanet odgovarajući uzorak (5 µl) koji je inkubiran 2 h, u vlažnoj komori uz mućkanje (150 rpm).

Čip, prethodno ispran 0,05 M PBS, pH 7,2 (tri puta po 5 µl) i destilovanom vodom (dva puta po 5 µl), je ostavljen da se osuši na vazduhu. Nakon dodatka 1 µl matriksa (50% sinapinska kiselina, SPA (acetonitril / dH₂O / trifluorosirćetna kiselina [50% / 49.9% / 0.1%]), čip je osušen i očitavan korišćenjem *ProteinChip Reader, Series 4000, Personal edition (Bio-Rad, SAD)*.

3.2.12. Jonoizmenjivačka hromatografija na čipovima: Q10 (*strong anion exchange*) i CM10 (*weak cation exchange*)

Na površinu čipa sa inkorporiranim amonijumovim jonima (Q10, *Strong Anion Exchange*) ili karboksimetil grupom (CM 10, *Weak Cation Exchange*) je prvobitno nanet 0,05 M Tris-HCl, pH 8 (5 µl), 5 min na sobnoj temperaturi. Postupak je ponovljen još jednom, nakon čega je pufer uklonjen, a na čip je nanet ispitivani uzorak (5 µl).

Inkubacija je vršena 1,5 h u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Svi koraci su izvedeni uz mućkanje na 300 rpm. Čip, prethodno ispran 0,05 M PBS, pH 7,2 (tri puta po 5 µl) i destilovanom vodom (dva puta po 5 µl), je ostavljen da se osuši na vazduhu. Nakon dodatka 1 µl matriksa (50% sinapinska kiselina, SPA (acetonitril / dH₂O / trifluorosirćetna kiselina [50% / 49.9% / 0.1%])), čip je osušen i očitao koršćenjem *ProteinChip Reader, Series 4000, Personal edition (Bio-Rad, SAD)*.

3.2.13. Surface enhanced laser desorption / ionization – time of the flight masena spektrometrija (SELDI/TOF-MS)

Proteinski čipovi su analizirani pomoću SELDI-TOF/MS koristeći *ProteinChip Reader, Series 4000, Personal edition (BioRad, SAD)*. Svi spektri su dobijeni pri 25 kV u modu pozitivnih jona u opsegu molekulskih masa 2,5-250 kDa koristeći 8815 laserskih impulsa po spotu. Korišćena je energija lasera od 6000 nJ. Kalibracija je urađena korišćenjem standarda (*ProteinChip All-in-one protein Standards II.*) Svi spektri su analizirani pomoću softvera *Ciphergen Express Software 3,0 (Bio-Rad, SAD)*.

3.2.14. Recovery test

Recovery test je izveden dodavanjem poznate količine (0,015-0,240 µg) prvog internacionalnog standarda za fPSA (NIBSC Code 96/668) u 0,05 M fosfatni pufer, pH 7,2 koji sadrži 1% goveđi serumski albumin (BSA) i 0,033 M etilen-diamino-tetrasićetnu kiselinu (EDTA). Primenom IRMA fPSA testa su izmerene koncentracije fPSA, kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. *Recovery* vrednost je izračunata na osnovu očekivanih i izmerenih koncentracija fPSA i izražena u procentima (%).

3.3. Bioinformatičke alatke

3.3.1. PeptideMass

Alatka *PeptideMass* je korišćena za izračunavanje mase peptidnih fragmenata ili celog peptidnog lanca PSA na osnovu poznate aminokiselinske sekvence (http://web.expasy.org/peptide_mass).

3.3.2. GlycanMass

Alatka *GlycanMass* je korišćena za izračunavanje teorijske mase oligosaharidne strukture koja je pridružena PSA formama uočenim u odgovarajućim masenim spektrima (<http://web.expasy.org/glycanmass>).

3.3.3. GlycoWorkBench

Program *GlycoWorkBench* je upotrebljen za crtanje oligosaharidnih struktura PSA glikoformi.

4. Rezultati

4.1. Imunoafinitetna hromatografija na čipu: uspostavljanje sistema za profilisanje molekulskih vrsta slobodnog specifičnog antigena prostate (fPSA)

Eksperimentalni sistem za kvalitativnu analizu fPSA je bio zasnovan na direktnom vezivanju ispitivanih uzoraka za odgovarajuće monoklonsko antitelo imobilisano na površinu čipa (čvrsta faza). Detekcija imunoreaktivnih vrsta je vršena SELDI-TOF masenom spektrometrijom. Za uspostavljanje i određivanje analitičkih karakteristika sistema, korišćeni su serumi osoba sa benignom hiperplazijom prostate i kancerom prostate.

4.1.1. Određivanje analitičkih karakteristika sistema za imunoafinitetnu hromatografiju na čipu

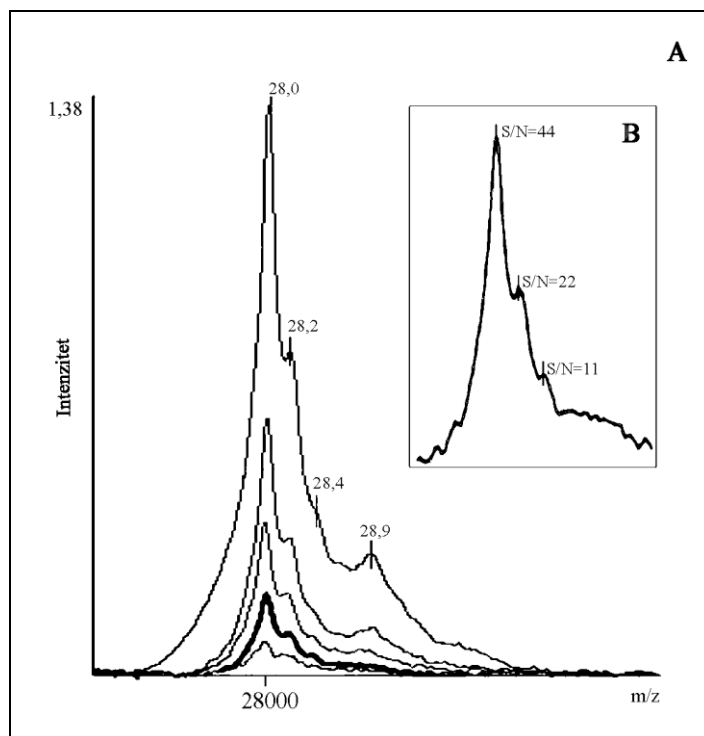
Analitičke karakteristike sistema za imunoafinitetnu hromatografiju na čipu: osetljivost, linearnost i specifičnost, određene su na osnovu izgleda i karakteristika klastera pikova u regionu 27 - 29 kDa. Ove mase odgovaraju masama molekulskih vrsta zrelog PSA.

4.1.1.1. Osetljivost

Najniža koncentracija PSA, pri kojoj se uočava karakterističan klaster pikova sa arbitrarnim vrednostima $S/N > 10$ (*signal to noise ratio*) u regionu 27 - 29 kDa iznosila je 0,046 $\mu\text{g/l}$ i ona je određena kao detekcioni limit (**Slika 9**).

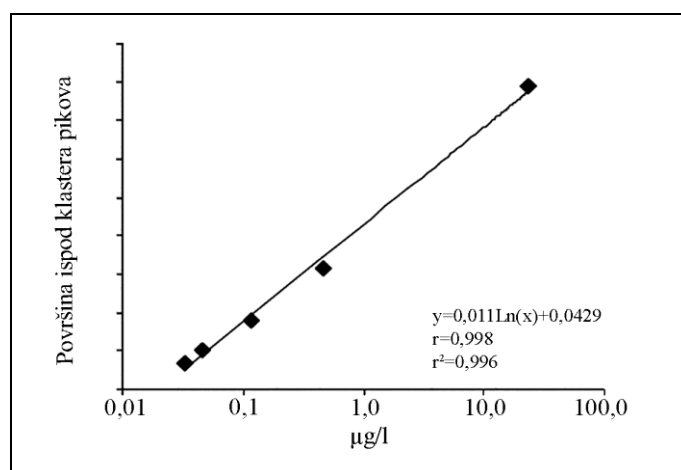
4.1.1.2. Linearnost

Linearnost sistema za imunoafinitetnu hromatografiju na čipu je procenjena na osnovu zavisnosti površine ispod klastera pikova u regionu 27 - 29 kDa i logaritma odgovarajućih koncentracija fPSA (**Slika 10**). Koeficijent korelacije (r) i koeficijent determinacije (r^2) su iznosili 0,998 i 0,995, redom, što je ukazalo da je sistem linearan u testiranom opsegu koncentracija.



Slika 9. Profil serumskih fPSA-imunoreaktivnih vrsta u regionu 27 - 29 kDa.

A) SELDI-TOF maseni spektri fPSA pri koncentracijama: 23,2; 0,464; 0,116; 0,046; 0,003 $\mu\text{g/l}$; B) SELDI-TOF maseni spektar fPSA pri koncentraciji 0,046 $\mu\text{g/l}$, koja je određena kao detekcioni limit; S/N: *signal to noise ratio*; m/z: masa/naelektrisanje

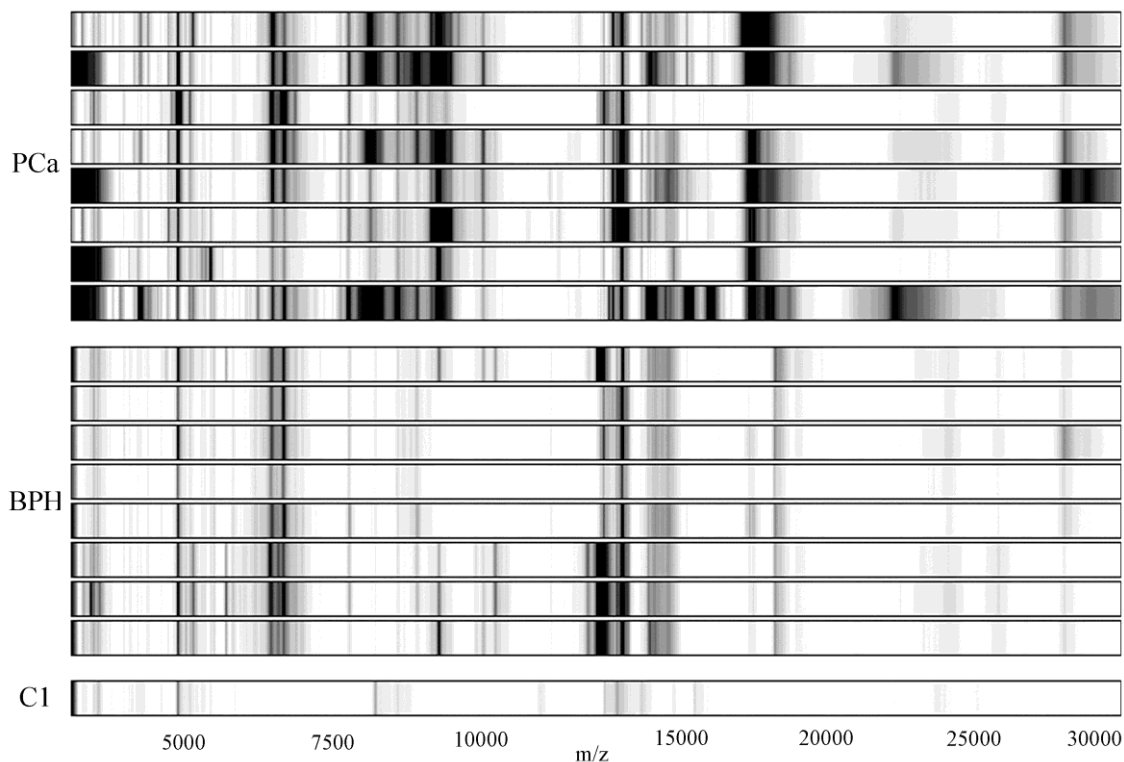


Slika 10. Linearna zavisnost površine ispod klastera pikova u regionu 27 - 29 kDa i koncentracije fPSA. Koeficijent korelacije, r : 0,998; koeficijent determinacije, r^2 : 0,996; $\mu\text{g/l}$ - koncentracija fPSA

4.1.1.3. Specifičnost

Specifičnost uspostavljenog sistema za imunoafinitetnu hromatografiju na čipu je ispitana poređenjem spektara uzoraka seruma sa spektrom kontrolnog čipa, tj. čipa sa imobilisanim monoklonskim anti-fPSA antitelom. Za analizu su korišćeni nefrakcionisani serumi osoba sa BPH i PCa koji se kao takvi koriste u dijagnostičke svrhe.

Reprezentativni spektri fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz seruma osoba sa BPH i PCa, prikazani su na **slici 11**, a u **tabeli 1** je dat zbirni prikaz rezultata imunoafinitetne hromatografije pojedinačnih BPH- i PCa- seruma.



Slika 11. „Gel view“ reprezentativnih masenih spektara fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz nefrakcionisanih seruma u regionu 3 kDa - 30 kDa. PCa: kancer prostate; BPH: benigna hiperplazija prostate; C1- kontrolni čip sa imobilisanim antitelima, uzorak: 0,05 M PBS, pH 7,2; m/z (masa/naelektrisanje); u „gel view“, intenzitet boje traka odgovara intenzitetu pikova

U regionu 27 - 29 kDa, su detektovana najmanje tri pika molekulskih masa: 28060,09 Da, 28230,95 Da i 28914,69 Da, kod PCa-seruma, odnosno 28036,66 Da, 28237,12 Da i

28907,32 Da, kod BPH-seruma. U regionu 19,8-26,6 kDa, detektovane su molekulske vrste PSA koje su bile zastupljenije kod BPH. U spektrima PCa- i BPH-seruma su detektovane i brojne fPSA-imunoreaktivne vrste malih molekulskih masa u regionu 3,2-18,6 kDa.

Prisustvo nespecifičnih pikova je bilo najveće u regionu do 12 kDa (**Slika 11 C1**), i zato on nije razmatran u daljim analizama.

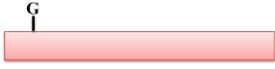



Tabela 1. Zbirni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz BPH- i PCa-seruma

<i>BPH-serum (n=8)</i>		<i>PCa-serum (n=8)</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	<i>FP (%)</i>	<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	<i>FP (%)</i>
<i>m/z</i>		<i>m/z</i>	
12269,70 (12,92; 12251,52 - 12284,01)	87		
		12574,68 (7,13; 12567,40 - 12584,48)	50
12702,68 (7,92; 12692,08 - 12712,18)	62		
		13556,37 (3,67; 13553,36 - 13560,46)	37
14483,31 (19,47; 14455,23 - 14502,52)	88		
		15111,21 (6,05; 15104,17 - 15119,64)	62
		15838,68 (11,25; 15820,37 - 15848,70)	62
16360,27 (15,03; 16347,88 - 16376,98)	37		
17163,93 (38,98; 17139,15 - 17221,93)	50	17145,83 (6,23; 17136,30 - 17151,99)	62
17248,73 (15,91; 17222,51 - 17264,21)	87	17261,27 (19,68; 17225,94 - 17298,33)	100
17375,83 (17,27; 17350,57 - 17391,79)	75	17387,64 (11,93; 17363,93 - 17406,01)	100
17569,31 (15,90; 17558,06 - 17580,55)	25		
		17889,24 (7,83; 17881,21 - 17902,10)	62
18126,24 (8,14; 18110,72 - 18134,44)	100		
		18616,28 (21,14; 18597,03 - 18643,33)	50
19879,00 (13,68; 19863,75 - 19898,43)	62		
		20020,90 (9,92; 20010,60 - 20030,39)	37
20969,63 (48,39; 20913,83 - 21000,00)	37		
22431,18 (6,64; 22421,36 - 22437,69)	75		
23157,89 (60,92; 23121,62 - 23228,22)	37		
24025,26 (9,68; 24018,41 - 24032,10)	25		
25782,46 (26,18; 25739,14 - 25826,47)	100	25792,94 (17,91; 25759,10 - 25810,06)	87
26661,82 (10,03; 26651,00 - 26670,81)	37		
28036,66 (28,12; 27985,22 - 28064,07)	100	28060,09 (15,67; 28029,20 - 28075,61)	100
28237,12 (22,36; 28203,64 - 28258,19)	87	28230,95 (14,63; 28201,42 - 28247,71)	100
28907,32 (55,75; 28796,92 - 28963,52)	87	28914,69 (33,95; 28866,64 - 28960,25)	75


SD: standardna devijacija; m/z: masa/naelektrisanje; FP: frekvencija pika; n: broj pojedinačnih uzoraka; BPH: benigna hiperplazija prostate; PCa: kancer prostate

Na osnovu podataka o teorijskoj masi polipeptidnog i glikanskog dela PSA, kao i o mestima prekida polipeptidnog lanca, detektovane molekulske vrste su označene kao zreo ili „nicked” PSA (**Tabela 2**).

Tabela 2. Šematski prikaz i opis serumskih fPSA-imunoreaktivnih vrsta detektovanih imunoafinitetnom hromatografijom na čipu

Eksperimentalno određena masa		Aminokiselinska sekvenca PSA (teorijska masa)*	Šematski prikaz	Opis
PCa fPSA	BPH fPSA			
28914,69	28907,32	1-237 (26089,17) + G		Zreo glikozilovan PSA molekul
28230,95	28237,12			
28060,09	28036,66			
	26661,82			
25792,94	25782,46	1-182 (20217,31) + G		Glikozilovani "nicked" PSA koji ima prekid između Lys182/Ser183
	24025,26			
	23157,89			
	22431,18			
	20969,63			
20020,90	19879,00	1-145 (16138,52) + G		Glikozilovani "nicked" PSA koji ima prekid između Lys145/Lys146
18616,28	18126,24			
17889,24	17375,83			
17387,64	17248,73			
17261,27	17163,93			
17145,83	17163,93			
	16360,27			
15838,68				
15111,21				
	14483,31			
13556,37		1-85 (9564,06) + G		Glikozilovani "nicked" PSA koji ima prekid između Arg85/Phe86
	12702,68			
12574,68	12269,70			

*Prosečna teorijska masa aminokiselinske sekvence PSA je određena pomoću *PeptideMass* softvera (http://web.expasy.org/peptide_mass).

 polipeptid; G: glikan; PCa fPSA (slobodan PSA iz seruma osobe sa kancerom prostate); BPH fPSA (slobodan PSA iz seruma osobe sa benignom hiperplazijom prostate)

Procenjeno je da bi molekulske vrste u regionu 27 - 29 kDa i na 26,6 kDa, mogle odgovarati zrelom, glikozilovanom PSA. Molekulske vrste u regionima 20,9-23,1 kDa, 17,1-18,6 kDa i 12,2-12,7 kDa bi mogle odgovarati glikozilovanim fragmentima „nicked“ PSA koji ima prekid između Lys182/Ser183, Lys145/Lys146 i Arg85/Phe86,

redom. U regionima 24-25,7 kDa, 19,8-20,0 kDa i 13,5-16,3 kDa se nalazi veći broj fPSA-imunoreaktivnih vrsta koje bi mogle predstavljati produkte fragmentacije glikozilovanog ili neglikozilovanog zrelog ili „*nicked*“ PSA.

Ovako definisane vrste su, u daljem radu, korišćene za tumačenje i prikazivanje rezultata analize različitih uzoraka koji sadrže PSA.

4.2. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcija seruma razdvojenih gel filtracijom

Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta je vršeno u specifičnim frakcijama seruma koje su razdvojene gel filtracijom, i koje sadrže fPSA ili PSA u kompleksima. Molekulske vrste identifikovane u serumskoj frakciji koja sadrži fPSA su korišćene kao referentne za poređenje sa vrstama koje se nalaze u kompleksu sa ACT ili u kompleksu sa imunoglobulinom M (IgM).

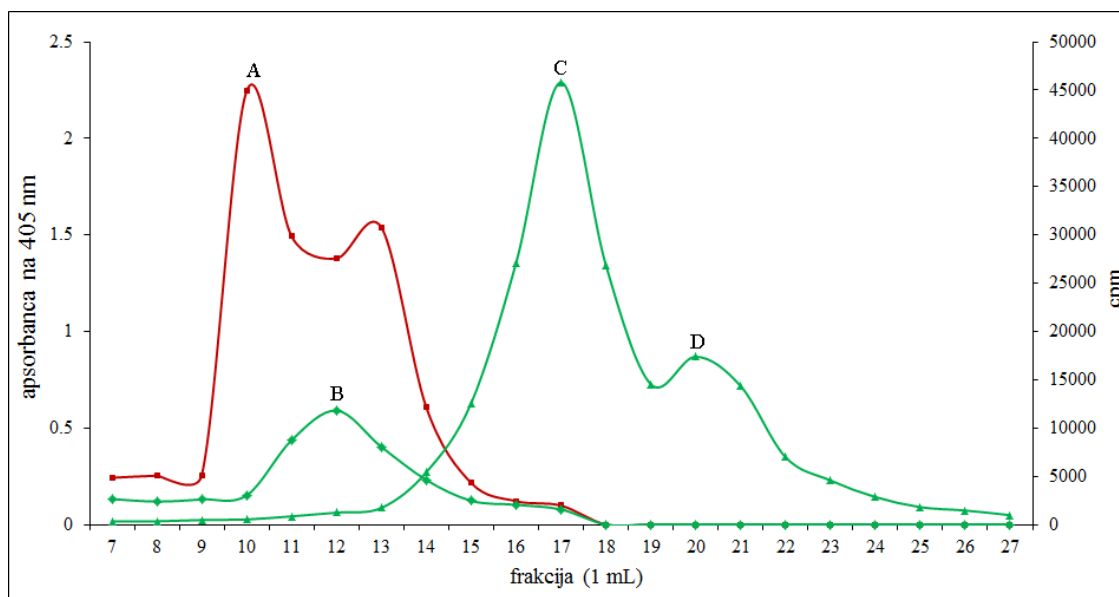
4.2.1. Razdvajanje serumskih frakcija koje sadrže PSA, gel filtracijom na *Sephacryl S-300* koloni

PSA-imunogram frakcija seruma razdvojenih gel filtracijom na *Sephacryl S-300* koloni, prikazan je na **slici 12**. Elucioni profil ukupnog IgM (**Slika 12A**) su karakterisala dva pika od kojih se onaj manje molekulske mase (frakcije 11-13), koja odgovara poziciji monomernog, tj. 7S IgM, delimično preklapao sa elucionim profilom PSA-IgM kompleksa (**Slika 12B**). Prisustvo PSA-IgM kompleksa je detektovano merenjem kombinovane PSA- i IgM-imunoreaktivnosti, u regionu u kojem je detektovan ukupni IgM (frakcije 10-15). Imunoelektroforeza frakcija u kojima je detektovan PSA-IgM, je potvrdila, na osnovu oblika precipitinskih lukova, povezanost PSA-imunoreaktivnosti sa 7S IgM (rezultati nisu prikazani).

PSA-ACT kompleks (**Slika 12C**) i fPSA (**Slika 12D**), detektovani su na osnovu PSA-imunoreaktivnosti, na pozicijama koje odgovaraju njihovim očekivanim molekulskim masama. Frakcije u kojima je detektovan fPSA, kao i frakcije u kojima je detektovan PSA u kompleksu sa IgM su koncentrovane i korišćene za profilisanje molekulskih vrsta PSA, imunoafinitetnom hromatografijom na čipu.

Rezultati dobijeni korišćenjem tri različita pula seruma osoba sa BPH i PCa, nisu pokazali značajne razlike u zastupljenosti PSA-IgM kompleksa. Za razliku od njega, a u

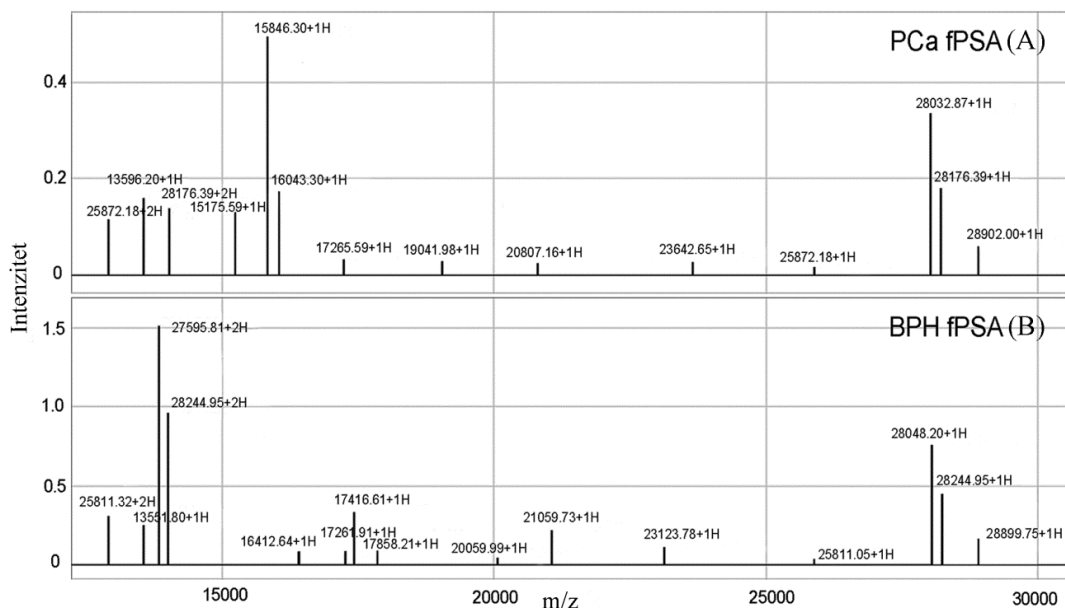
skladu sa serumskim koncentracijama ukupnog PSA, zastupljenost PSA-ACT kompleksa i slobodnog PSA, bila je niža kod BPH-seruma u odnosu na PCa-serum.



Slika 12. Reprezentativni PSA-imunogram pula seruma osoba sa kancerom prostate. Gel filtracija pula PCa-seruma na *Sephacryl S-300* koloni. Elucija je praćena merenjem IgM-imunoreaktivnosti (—) i PSA-imunoreaktivnosti (—) u odabranim frakcijama. Volumen frakcija: 1ml; cpm - counts per minute. A) IgM; B) PSA-IgM (PSA u kompleksu sa IgM); C) PSA-ACT (PSA u kompleksu sa α_1 -antihimotripsinom, molekulska masa ~ 90 kDa); D) fPSA (slobodan PSA, molekulska masa ~ 34 kDa)

4.2.1.1. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži fPSA

Reprezentativni maseni spektri frakcija BPH- i PCa-seruma koje sadrže fPSA prikazani su na **slici 13 (A,B)**. Klaster pikova u regionu 27 - 29 kDa, kao i pik na 25,8 kDa su bili prisutni kod obe ispitivane serumske fPSA frakcije. Glavna razlika je uočena u odnosu na molekulsku vrstu na 27,6 kDa koja je bila prisutna samo kod BPH. U regionu manjih molekulskih masa, detektovane su zajedničke vrste na 13,5 kDa i 17,2 kDa, dok su vrste na 15,8 kDa i 16,0 kDa bile karakteristične za PCa. U poređenju sa nefrakcionisanim serumom (**Slike 11 i 13; Tabela 1**), broj detektovanih vrsta u fPSA frakciji je bio manji, što je posebno uočeno u regionu 17 - 18 kDa.













Slika 13. Reprezentativni maseni spektri fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz fPSA frakcije PCa- i BPH-pulova seruma dobijene gel filtracijom. A) PCa fPSA (slobodan PSA iz PCa-seruma); B) BPH fPSA (slobodan PSA iz BPH-seruma); x-osa: m/z (masa/naelektrisanje); y-osa: intenzitet signala

4.2.1.1.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži fPSA

Kao osnov za procenu glikozilacije molekularskih vrsta fPSA korišćeni su postojeći eksperimentalni podaci za PSA standard, dobijeni masenom spektrometrijom. Oni su pokazali da masa njegovog polipeptidnog dela iznosi 26089,17 Da, a masa fukozilovanog biantenarnog N-glikana iznosi 2352,16 Da. Zbog nedovoljne koncentracije određenih PSA vrsta, potrebne za direktnu analizu, procena glikozilacije vršena je na osnovu teorijske/izračunate mase glikana. Ona je izražena kao razlika između eksperimentalno određene mase pojedinačne molekulske vrste PSA (masa polipeptida i masa glikana) i pridružene teorijske mase odgovarajuće aminokiselinske sekvence PSA (**Tabela 3**).

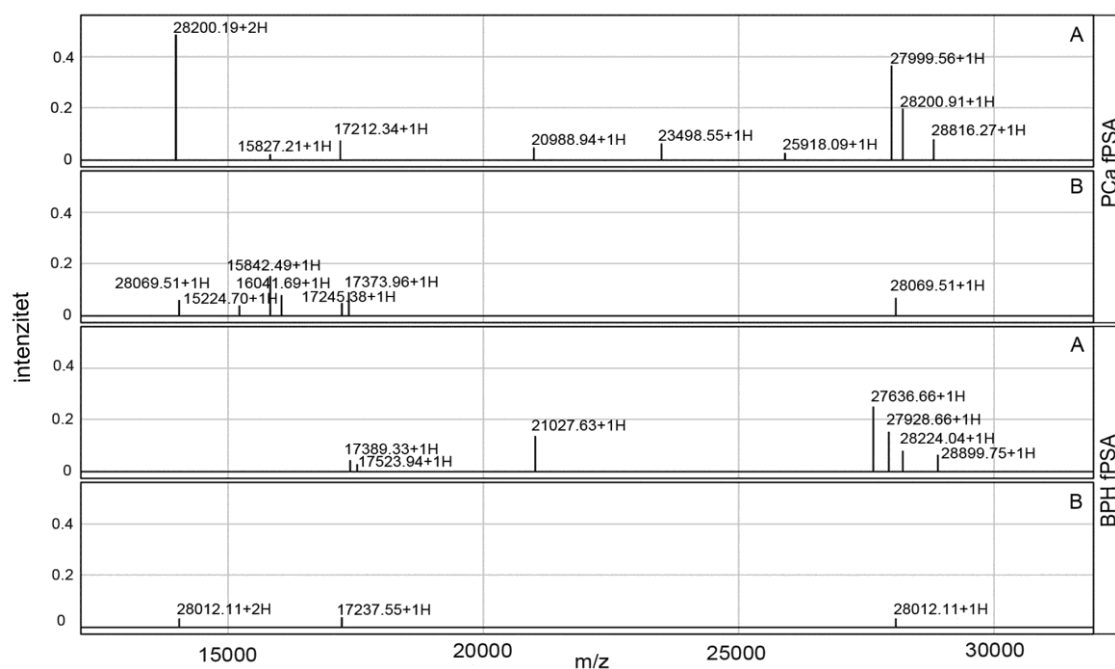
Tabela 3. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži fPSA

Aminokiselinska sekvenca PSA (teorijska masa*)	Eksperimentalno određena masa PSA		Izračunata masa glikana**		Teorijska masa***	Glikan (G)	
	PCa	BPH	PCa	BPH		Pretpostavljeni sastav****	Struktura
1-145 (16138,52)+G	17265,59	17261,91	1123,39	1118,07	1054,96	Man4	
		17416,61		1278,09	1217,11	Man5	
		17858,21		1719,69	1703,53	Man8	
1-237 (26089,17)+G		27595,81		1506,64		NaMan	
					1899,00	NaGnF	
	28032,87	28048,20	1959,03	1943,70		NaA	
					2061,00	NaAF	
	28176,39	28244,95	2087,22	2155,78		NaGnFbi	
					2120,80	NaGnFbi	
	28902,00	28899,75	2812,83	2810,58	2862,60	[NaNa]Na	

*Prosečna teorijska masa aminokiselinske sekvence PSA je određena koristeći *PeptideMass* softver (http://web.expasy.org/peptide_mass); **Masa PSA glikana je izračunata kao razlika između eksperimentalno određene mase PSA i pridružene teorijske mase odgovarajuće proteinske sekvence PSA; *** Teorijska masa glikana je izračunata primenom *GlycanMass* softvera (<http://web.expasy.org/glycanmass>); ****Pretpostavljena struktura glikana je predložena na osnovu poznate strukture kompletnog glikanskog lanca PSA (NaNaf, 2352,16 Da). Korišćena je nomenklatura ustanovljena od strane Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku.

- | | | | | | |
|---|--------------------------|---|--------------|----|---------------|
| ■ | Gn (N-acetilglukozamin) | ● | Man (manoza) | ● | A (galaktoza) |
| ◆ | Na (sijalinska kiselina) | ▲ | F (fukoza) | Bi | bisektni |

Procenjeno je da bi klaster pikova u regionu 27 - 29 kDa mogao odgovarati molekulskim vrstama, koje sadrže fukozilovan ili nefukozilovan monosijalinizovan biantenaran lanac sa terminalnim N-acetilglukozaminom (NaGnF) ili galaktozom (NaA; NaAF). Pored ovoga, moguća je i njihova modifikacija dodavanjem bisektnog glukozamina (NaGnFbi). S obzirom na to da je molekulskoj vrsti na 28902,00 / 28899,75 Da pridružen glikan mase od 2862,60 Da, što je masa veća od mase kompletnog biantenarnog lanca (2352,16 Da), procenjeno je da je, najverovatnije, u pitanju triantenarni oligosaharidni lanac. Molekulska vrsta na 27595,81 Da bi mogla imati sijalinizovan monoantenarni N-glikan. Manozne strukture u formi oligomanoznih lanaca (Man4, Man5 i Man8) su bile karakteristične za vrste na 17265,59/17261,91 Da, 17416,61 Da i 17858,21 Da, redom. Procena glikozilacije je upotpunjena i validirana korišćenjem jonoizmenjivačke hromatografije na čipu. Uzimajući u obzir postojeće podatke o izoelektričnoj tački PSA glikoizoforni (pI 6,9-7,7), odgovarajući uzorci su razdvojeni na anjonskom i katjonskom jonoizmenjivaču na pH 8,0 (**Slika 14**).

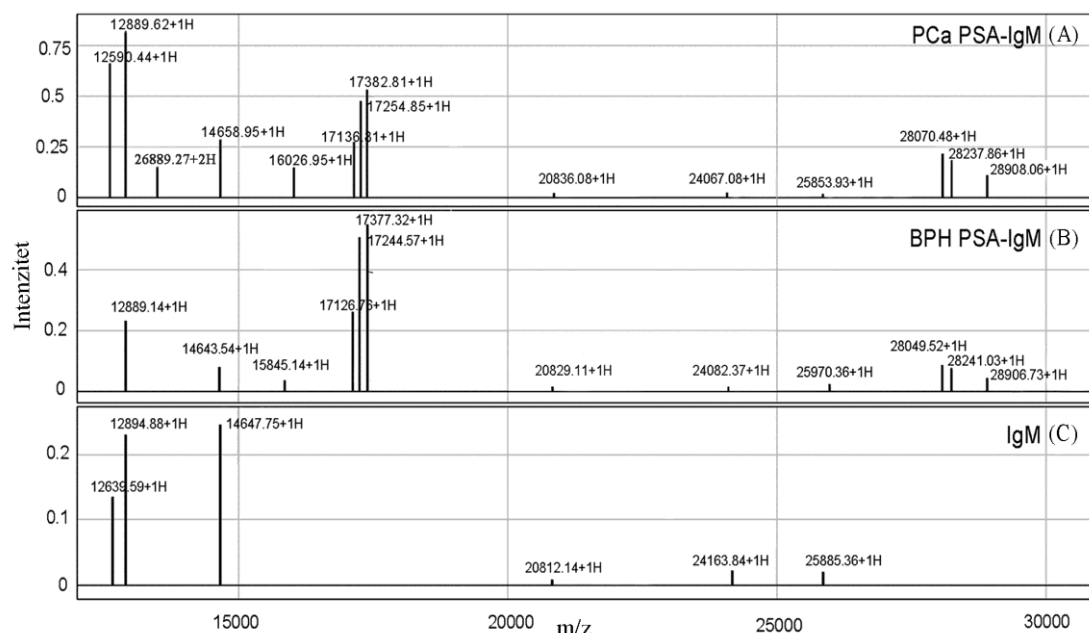


Slika 14. Reprezentativni maseni spektri fPSA frakcija PCa- i BPH-seruma dobijeni jonoizmenjivačkom hromatografijom na čipu. A) anjonski Q10 čip B) katjonski CM10 čip; x-osa: m/z, masa/naelektrisanje; y-osa: intenzitet signala; PCa fPSA (slobodan PSA iz PCa seruma); BPH fPSA (slobodan PSA iz BPH seruma)

Dobijeni rezultati su pokazali da su se vrste u regionu 17 kDa slabo vezale za oba jonoizmenjivača, dok su vrste u regionu 27 - 29 kDa i 27,6 kDa ostvarile jaču interakciju sa anjonskim jonoizmenjivačem. Ovo je bilo u skladu sa pretpostavljenom glikozilacijom datih vrsta koje se međusobno razlikuju po prisustvu sijalinske kiseline.

4.2.1.2. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži PSA-IgM kompleks

Reprezentativni maseni spektri PCa PSA-IgM i BPH PSA-IgM kompleksa, koji su razdvojeni imunoafinitetnom hromatografijom na čipu, prikazani su na **slici 15 (A,B)** dok je na **slici 15C** prikazan spektar IgM, koji je korišćen kao kontrola.



Slika 15. Reprezentativni maseni spektri PSA-IgM kompleksa dobijeni imunoafinitetnom hromatografijom na čipu. A) PCa PSA-IgM: imunski kompleks iz pula PCa-seruma; B) BPH PSA-IgM: imunski kompleks iz pula BPH-seruma; C) IgM: imunoglobulin M; x-osa: m/z (masa/naelektrisanje); y-osa: intenzitet signala

Maseni spektri PSA-IgM kompleksa su bili veoma slični, sa dominantnim klasterima pikova na 17 kDa i u regionu 27 - 29 kDa, kod sva tri ispitivana pula BPH- i PCa-seruma. Fine razlike su uočene kao rezultat povremenog prisustva ili odsustva pojedinih fPSA-imunoreaktivnih vrsta. Njihov zbirni prikaz je dat u **tabeli 4**.

Tabela 4. Zbirni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz frakcije seruma koja sadrži PSA-IgM kompleks

<i>BPH-pul (n=3)</i>		<i>PCa-pul (n=3)</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	<i>FP (%)</i>	<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	<i>FP (%)</i>
<i>m/z</i>		<i>m/z</i>	
15845,14	33		
16054,60	33	16067,44 (72,12; 16021,78 - 16150,58)	100
17135,37 (7,94; 17126,76 - 17142,41)	100	17139,73 (4,13; 17136,81 - 17142,65)	66
17240,76 (22,74; 17216,50 - 17261,52)	100	17243,43 (25,60; 17214,10 - 17261,33)	100
17385,97 (9,54; 17377,32 - 17396,20)	100	17380,86 (2,32; 17378,29 - 17382,81)	100
		26891,72 (3,74; 26889,27 - 26894,18)	66
28073,10 (23,11; 28049,52 - 28095,72)	100	28069,06 (9,99; 28058,44 - 28078,26)	100
28252,69 (32,83; 28227,28 - 28289,75)	100	28243,39 (6,34; 28210,13 - 28282,17)	100
28918,66 (10,44; 28906,73 - 28926,09)	100	28918,53 (49,29; 28875,31 - 28972,21)	100

SD: standardna devijacija; m/z: masa/naelektrisanje; FP: frekvencija pika; n: broj pulova pojedinačnih PCa- i BPH-seruma

Glavna razlika je uočena u prisustvu vrste na 26889,27 Da u spektru PCa PSA-IgM, ali ne i u spektru BPH PSA-IgM (**Slika 15**). Pored toga, uočena je razlika u frekvenciji pikova na 15,8 kDa i 16,0 kDa koja je kod BPH iznosila 33%, a kod PCa 100% (**Tabela 4**).


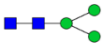
Pored profilisanja PSA-IgM kompleksa na čipu sa imobilisanim monoklonskim antitelom koje specifično prepoznaje fPSA, korišćeno je i monoklonsko antitelo koje istovremeno prepoznaje i slobodni PSA, kao i PSA u kompleksu sa ACT (PSA-ACT). Poređenjem dobijenih spektara nisu uočene značajnije razlike u prisustvu i intenzitetu karakterističnih pikova (rezultati nisu prikazani).

4.2.1.2.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta koje ulaze u kompleks sa IgM

fPSA-imunoreaktivnim vrstama u regionu 27 - 29 kDa su pridruženi bi- ili multiantenarni lanci koji se razlikuju po prisustvu terminalne sijalinske kiseline, dok je vrstama na 17136,81/17126,76 Da, 17254,85/17244,57 i 17382,81/17377,32 Da pridružena oligomanozna struktura tipa Man4 ili Man5, kao što je ranije prikazano za serumsku fPSA frakciju (**Tabela 3**). Procena glikozilacije molekulske vrste na

26889,27 Da koja ulazi u kompleks sa IgM, a koja ranije nije definisana, je prikazana u **tabeli 5**. Pretpostavljeno je da bi ona mogla sadržati paucimanoznu strukturu (MM).

Tabela 5. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivne vrste koja ulazi u kompleks sa IgM

Aminokiselinska sekvencija PSA (teorijska masa*)	Eksperimentalno određena masa PSA		Izračunata masa glikana**		Teorijska masa***	Glikan (G)	
	PCa	BPH	PCa	BPH		Pretpostavljeni sastav****	Struktura
1-237 (26089,11) + G	26889,27		800,16		730,69		
					892,82	MM	

*Prosečna teorijska masa aminokiselinske sekvence PSA je određena koristeći *PeptideMass* softver (http://web.expasy.org/peptide_mass); **Masa PSA glikana je izračunata kao razlika između eksperimentalno određene mase PSA i pridružene teorijske mase odgovarajuće peptidne sekvence PSA; *** Teorijska masa glikana je izračunata primenom *GlycanMass* softvera (<http://web.expasy.org/glycanmass>); ****Pretpostavljena struktura glikana je predložena na osnovu poznate strukture kompletnog glikanskog lanca PSA (NaNaF, 2352,16 Da). Korišćena je nomenklatura ustanovljena od strane Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku.

■ N-acetilglukozamin ● M (manozna)

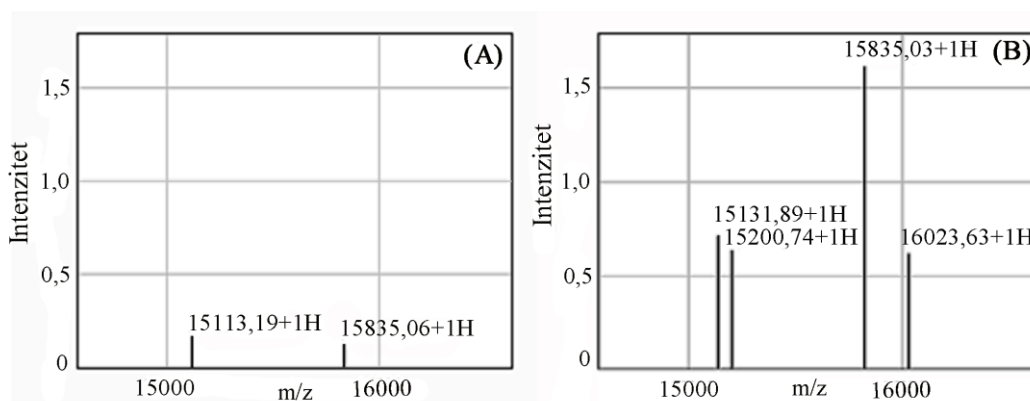
4.2.1.3. Profilisanje PSA-imunoreaktivnih vrsta koje ulaze u kompleks sa α_1 -antihimotripsinom (ACT)

Za analizu molekulskih vrsta PSA koje se nalaze u kompleksu sa α_1 -antihimotripsinom (ACT), korišćeni su nefrakcionisani PCa- i BPH-serumi, tretirani etanolaminom (ETA). U **tabeli 6** je dat uporedni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta u regionu 15-16 kDa u netretiranim i tretiranim PCa- i BPH-serumima, dok je na **slici 16** predstavljen reprezentativan maseni spektar PCa-seruma pre i posle tretmana.

Tabela 6. Zbirni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta u uzorcima seruma pre i posle tretmana etanolaminom

<i>BPH-serum</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	
<i>m/z</i>	
tretirani ETA (n=5)	netretirani (n=5)
15133,04 (5,39; 15128,14-15138,82)	
15222,81 (1,89; 15221,27-15224,92)	
15837,26 (2,45; 15833,59-15839,54)	
16029,75 (3,94; 16025,04-16033,75)	
<i>PCa-serum</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	
<i>m/z</i>	
tretirani ETA (n=5)	netretirani (n=5)
15123,82 (5,90; 15117,80-15131,89)	15111,21 (6,05; 15104,17-15119,64)
15213,61 (6,61; 15203,38-15219,75)	
15833,75 (3,57; 15827,51-15836,53)	15838,68 (11,25; 15820,37-15848,70)
16029,09 (5,30; 16023,63-16037,36)	
16423,07 (15,11; 16411,28-16440,09)	

ETA: etanolamin; n: broj uzoraka; SD: standardna devijacija; m/z: masa/naelektrisanje



Slika 16. Reprezentativan maseni spektar nefrakcionisanog PCa-seruma pre i posle tretmana etanolaminom u regionu 15-16 kDa. A) PCa-serum pre tretmana etanolaminom; B) PCa-serum posle tretmana etanolaminom; x-osa: m/z (masa/naelektrisanje); y-osa: intenzitet signala

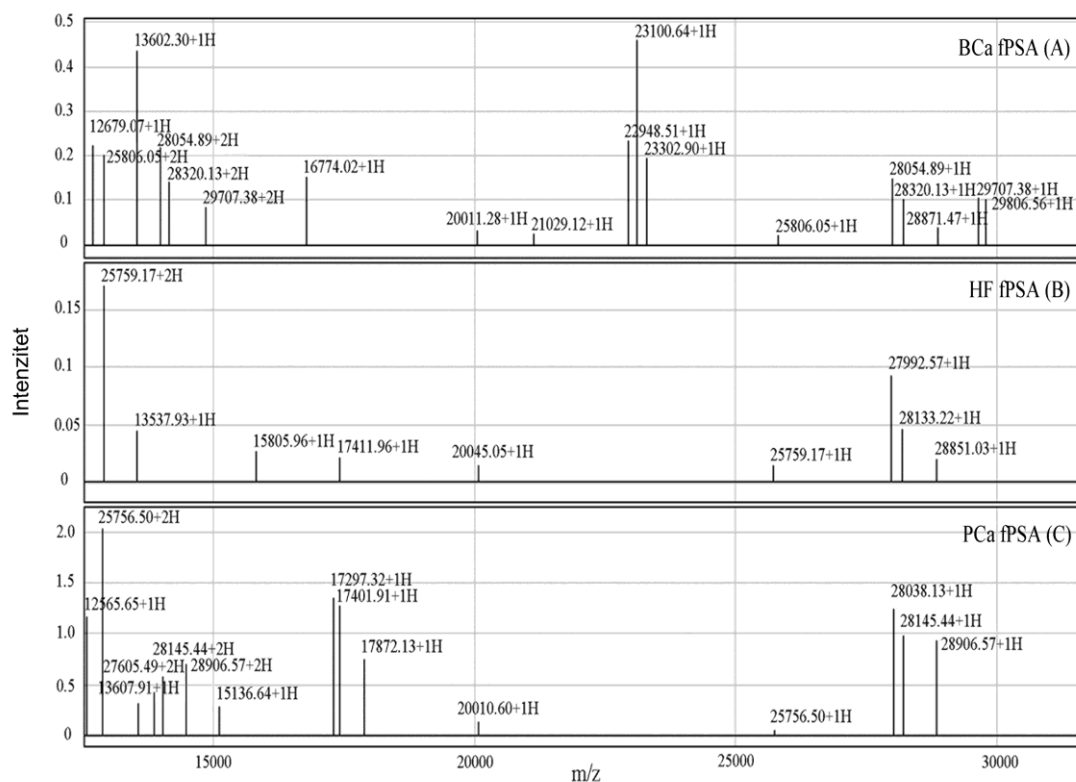
U poređenju sa netretiranim BPH/PCa-serumima, u spektrima tretiranih BPH/PCa-seruma su uočene molekulske vrste na 15133,04/15123,82 Da; 15222,81/15213,61 Da, 15837,26/15833,75 Da i 16029,75/16029,09 Da. U datom regionu (15-16 kDa), kod netretiranih PCa-seruma, su detektovani pikovi niskog intenziteta na 15111,21 Da i

15838,68 Da, dok je kod netretiranih BPH-seruma uočeno potpuno odsustvo bilo kojih molekulskih vrsta (**Tabela 6**). Odsustvo molekulskih vrsta na 15-16 kDa kod netretiranih BPH seruma, može biti rezultat niske koncentracije PSA u ispitivanim uzorcima. S obzirom na to da su ove fPSA-imunoreaktivne vrste malih masa bile znatno izraženije nakon tretmana ETA, one najverovatnije predstavljaju autoproteolitičke produkte enzimski aktivnog PSA, koji se pri baznim uslovima tretmana, oslobađa iz kompleksa.

4.3. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta ekstraprostatičnog PSA

Reprezentativni maseni spektri fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz nefrakcionisanog seruma osobe sa kancerom dojke (BCa) i zdrave ženske osobe (HF) su prikazani na **slici 17 (A,B)**. U cilju poređenja ekstraprostatičnih i prostatičnih molekulskih vrsta, na **slici 17C** je predstavljen ranije okarakterisan profil fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz seruma osobe sa kancerom prostate (PCa). Molekulske mase i frekvencije odgovarajućih pikova detektovanih u spektrima pojedinačnih seruma sve tri ispitivane grupe su prikazane u **tabeli 7**.

U sve tri ispitivane grupe uzoraka seruma (BCa, HF i PCa), bile su prisutne fPSA-imunoreaktivne vrste na 20,0 kDa, 25,8 kDa, i 27 - 28 kDa, dok su one malih molekulskih masa, u regionima 12-13 kDa, 15-16 kDa i 17-18 kDa, bile veoma izražene kod PCa-seruma, a odsutne ili veoma niskog intenziteta kod HF-seruma (frekvencija 67-100%) i BCa-seruma (frekvencija 30-40%). Vrste na 13,5 kDa, 15,8 kDa i 17,3 kDa su detektovane i kod BCa- i kod HF-seruma, dok su one na 12 kDa (frekvencija 30-60 %), 16,7 kDa (frekvencija 50%), 17,8 kDa (frekvencija 30%), 21-23 kDa (frekvencija 40-70 %) i 29 kDa (frekvencija 60%) bile karakteristične za BCa.



Slika 17. Reprezentativni maseni spektri fPSA-imunoreaktivnih vrsta u ženskim i muškim serumima dobijeni imunoafinitetnom hromatografijom na čipu. A) BCa fPSA: fPSA iz seruma osobe sa kancerom dojke (BCa); B) HF fPSA: fPSA iz seruma zdrave ženske osobe (HF); C) PCa fPSA: fPSA iz serum osobe sa kancerom prostate (PCa); x-osa: m/z (masa/naelektrisanje); y-osa: intenzitet signala

Tabela 7. Zbirni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta ekstraprostatičnog PSA

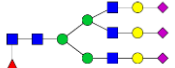


<i>BCa-serum (n=10)</i>		<i>HF-serum (n=7)</i>		<i>PCa-serum (n=7)</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i> <i>m/z</i>	<i>FP</i> <i>(%)</i>	<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i> <i>m/z</i>	<i>FP</i> <i>(%)</i>	<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i> <i>m/z</i>	<i>FP</i> <i>(%)</i>
12561,26 (3,61; 12558,04 - 12565,17)	30			12574,68 (7,13; 12567,40 - 12584,48)	50
12667,64 (6,38; 12661,83 - 12679,64)	60				
13536,04 (5,35; 13529,01 - 13544,10)	90	13544,20 (3,86; 13541,47 - 13546,93)	67	13556,37 (3,67; 13553,36 - 13560,46)	37
				15111,21 (6,05; 15104,17 - 15119,64)	62
15844,54 (20,21; 15826,08 - 15866,14)	30	15826,68 (20,36; 15806,97 - 15847,64)	100	15838,68 (11,25; 15820,37 - 15848,70)	62
16759,61 (23,56; 16717,50 - 16771,13)	50				
				17145,83 (6,23; 17136,30 - 17151,99)	62
				17261,27 (19,68; 17225,94 - 17298,33)	100
17397,76 (36,77; 17357,06 - 17412,89)	40	17386,53 (37,39; 17360,09 - 17412,97)	67	17387,64 (11,93; 17363,93 - 17406,01)	100
17824,65 (4,16; 17821,30 - 17829,30)	30			17889,24 (7,83; 17881,21 - 17902,10)	62
				18616,28 (21,14; 18597,03 - 18643,33)	50
20047,23 (8,00; 20037,02 - 20060,32)	60	20077,92 (12,33; 20069,20 - 20086,64)	67	20020,90 (9,92; 20010,60 - 20030,39)	37
20971,82 (135,27; 20836,53 - 21130,40)	70				
22943,83 (15,08; 22914,76 - 22955,50)	60				
23098,17 (9,50; 23079,07 - 23104,91)	60				
23306,57 (3,24; 23303,02 - 23310,53)	40				
25845,34 (40,85; 25814,57 - 25906,30)	70	25748,76 (93,98; 25666,67 - 25851,27)	100	25792,94 (17,91; 25759,10 - 25810,06)	87
28005,90 (13,59; 27983,81 - 28022,11)	100	28018,28 (23,39; 27993,58 - 28040,09)	100	28060,09 (15,67; 28029,20 - 28075,61)	100
28202,24 (11,42; 28177,41 - 28214,90)	100	28206,23 (23,22; 28184,22 - 28231,68)	100	28230,95 (14,63; 28201,42 - 28247,71)	100
28851,54 (19,16; 28819,32 - 28874,63)	90	28873,80 (19,73; 28852,03 - 28890,50)	100	28914,69 (33,95; 28866,64 - 28960,25)	75
29641,90 (16,27; 29614,96 - 29658,92)	60				
29802,42 (8,79; 29790,64 - 29813,58)	60	12441,99 (9,63; 12435,18 - 12448,80)	67		

SD: standardna devijacija; FP: frekvencija pika; n: broj pojedinačnih seruma; BCa: kancer dojke; HF: zdrava ženska osoba; PCa: kancer prostate

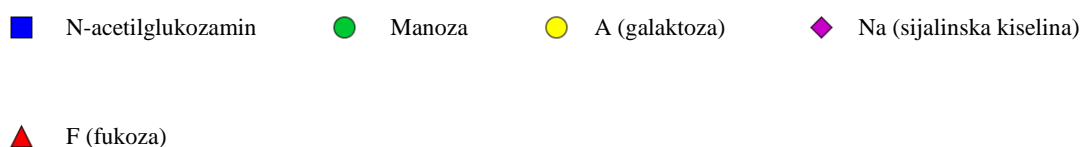
4.3.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta ekstraprostatičnog PSA

Procena glikozilacije molekularskih vrsta ekstraprostatičnog fPSA na 12667,64 Da, 23098,17 Da i 29641,90 Da koje su bile karakteristične za BCa-serume je prikazana u **tabeli 8**. Mase njihovih glikana su iznosile 2880-3552 Da, i kako su one bile veće od mase kompletnog biantenarnog lanca (2352 Da), ovim vrstama su pridruženi tri- ili tetraantenarni N-glikani. Glikozilacija fPSA-imunoreaktivnih vrsta u regionima 28-29 kDa i 17-18 kDa je ranije procenjena i prikazana u **tabeli 3**.

Tabela 8. Procena glikozilacije ekstraprostatičnih fPSA-imunoreaktivnih vrsta

Aminokiselinska sekvenca PSA (teorijska masa [*])	Eksperimentalno određena masa PSA	Glikan (G)			
		Izračunata masa ^{**}	Teorijska masa ^{***}	Pretpostavljeni sastav ^{****}	Struktura
1-85 (9564,06) + G	12667,64	3103,58	3026,76	[NaNa]NaF	
1-182 (20217,31) + G	23098,17	2880,86	2862,60	[NaNa]Na	
1-237 (26089,17)+G	29641,90	3552,73	3503,20	[NaNa][NaNa]F	

*Prosečna teorijska masa aminokiselinske sekvence PSA je određena koristeći *PeptideMass* softver (http://web.expasy.org/peptide_mass); **Masa PSA glikana je izračunata kao razlika između eksperimentalno određene mase PSA i pridružene teorijske mase odgovarajuće peptidne sekvence PSA; ***Teorijska masa glikana je izračunata primenom *GlycanMass* softvera (<http://web.expasy.org/glycanmass>); ****Pretpostavljena struktura glikana je predložena na osnovu poznate strukture kompletnog glikanskog lanca PSA (NaNaf, 2352,16 Da). Korišćena je nomenklatura ustanovljena od strane Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku.



4.4. Katalog molekularnih vrsta slobodnog specifičnog antigena prostate u serumu

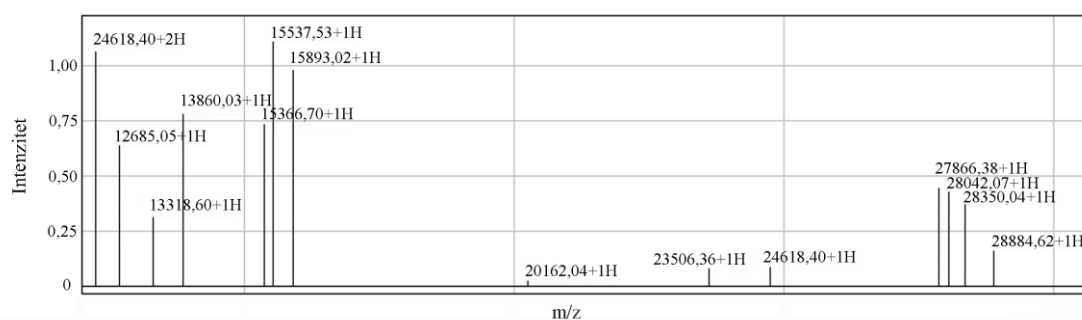
♂				♀				Oznaka
BPH fPSA		PCa fPSA		HF fPSA		BCa fPSA		
SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	
12269,96±13,26	67	12278,15	8					"nicked" PSA Arg85/Phe86
		12571,60±5,77	25	12445,93±2,64	67	12428,96	10	
						12555,38±1,53	30	
12700,31±4,92	58	12703,16±3,09	33	12688,01	33	12664,41±5,04	40	
12850,09	8	12879,39±14,13	42					
13578,59±37,04	25	13587,15±28,40	42	13545,93	33	13585,31±18,36	80	
13784,54	8	13782,50	8			13743,72±71,44	30	
	17	13862,16±9,65	25					
14391,48±90,43	88	14394,90	8					
		15132,85±29,92	42			15094,66	10	
15370,10±7,57	17							
15443,83±2,21	17	15448,08±3,27	17					
15793,06	8	15833,22±16,02	33	15852,85±51,15	67	15865,24±19,91	30	
16210,89±4,37	42					16185,24	10	
16373,08±15,82	33					16329,54±48,63	30	
				16614,01	33	16760,68±6,29	10	
17235,38±16,87	25	17249,11±25,33	67			17258,05±0,63	20	"nicked" PSA Lys145/Lys146
17376,52±14,63	58	17388,09±7,09	75	17359,08	33			
				17424,17	33	17404,09	10	
		17885,36±12,03	42	17830,11	33	17810,04±5,01	30	
		17987,83±96,15	17					
18123,88±5,37	50							
		18599,52±9,72	25			18575,69	10	

Katalog molekularnih vrsta slobodnog specifičnog antigena prostate u serumu

♂				♀				Oznaka
BPH fPSA		PCa fPSA		HF fPSA		BCa fPSA		
SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	SV±SD m/z	FP (%)	
19881,51±4,13	42	19883,40	8					
20187,28	8	20090,77	58	20077,04±28,58	67	20015,18±15,06	50	
20963,90±43,52	25	20977,66	33			20958,39±113,07	40	"nicked" PSA Lys182/Ser183
22425,49±6,47	42	22420,21	8					
23137,69±49,73	33					23097,49±2,88	40	
		23229,81±76,06	33					
						23307,66±15,55	30	
						23801,62±44,72	30	
24042,98±45,79	83	24031,44±80,94	25					
		24534,99±93,42	42					
24620,61±31,77	25					24608,90	10	
25054,01±53,35	33	25000,42±37,52	33			25391,13	10	
25779,20±28,50	67	25776,15±13,29	50	25770,65	33	25781,12±20,34	50	
26648,83±11,31	67							
		27550,19±56,79	25			26850,66±88,92	50	zreo PSA
28041,63±9,35	100	28051,95±15,66	100	28026,04±12,77	100	28015,28±30,26	100	
28173,26±45,12	100	28217,23±28,66	100	28167,59±2,76	67	28168,02±62,21	100	
28923,28±27,20	92	28891,55±29,90	100	28886,13±4,74	67	28848,89±14,80	100	
29658,08	8			29679,30	33	2964504±9,46	40	
		29790,62	8			29788,36±22,95	40	

4.5. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz semene plazme (SP)

Profil fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz nefrakcionisanog pula SP dobijen imunoafinitetnom hromatografijom na čipu, prikazan je na **slici 18**.



Slika 18. Reprezentativan maseni spektar fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz pula semene plazme dobijen imunoafinitetnom hromatografijom na čipu. x-osa: m/z masa/naelektrisanje; y-osa: intenzitet signala

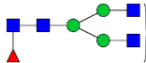
Slično kao u serumima, detektovane su vrste čije molekulske mase odgovaraju masama zrelog PSA, kao i vrste malih molekulskih masa koje odgovaraju fragmentima nastalim proteolitičkom degradacijom ili fragmentima „*nicked*“ PSA. Pod primenjenim eksperimentalnim uslovima, u uzorku nefrakcionisanog pula semene plazme čoveka u regionu 27 - 29 kDa, je detektovan karakterističan klaster od četiri pika molekulskih masa: 27866,38 Da, 28044,07 Da, 28350,04 Da i 28884,62 Da. Poređenjem sa nefrakcionisanim BPH/PCa-serumima, prisustvo fPSA-imunoreaktivnih vrsta na 27866,38 Da i 24618,40 Da je bilo karakteristično jedino za pul SP. Vrsta na 24618,40 Da najverovatnije predstavlja produkt degradacije PSA. Pored njih, detektovane su i brojne fPSA-imunoreaktivne vrste malih molekulskih masa, a najizraženije su bile one u regionima 13-14 kDa i 15-16 kDa.

4.5.1. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz SP

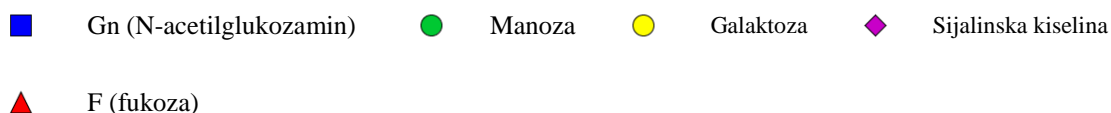
U regionu 27 - 29 kDa, u SP su detektovane vrste koje su prisutne i u serumu, a odgovaraju zreloj PSA, čija je glikozilacija opisana u tabeli 3. U odnosu na serum, u

datom regionu, je uočeno prisustvo karakteristične vrste na 27866,38 Da. Ovoj vrsti može biti pridružen monosijalinizovan biantenarni N-glikan (NaGnF) (**Tabela 9**).

Tabela 9. Procena glikozilacije fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz pula SP

Aminokiselinska sekvencija PSA (teorijska masa*)	Eksperimentalno određena masa PSA	Glikan (G)			
		Izračunata masa**	Teorijska masa***	Pretpostavljeni sastav****	Struktura
1-237 (26089,11) + G	27866,38	1777,21	1899,00	NaGnF	

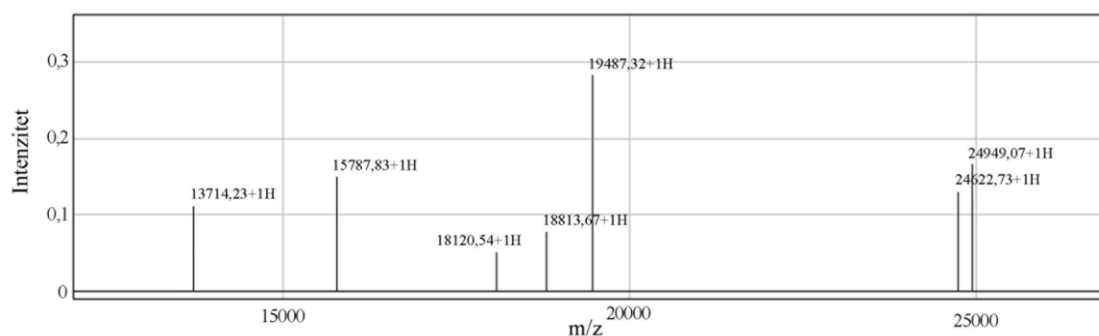
*Prosečna teorijska masa aminokiselinske sekvence PSA je određena koristeći *PeptideMass* softver (http://web.expasy.org/peptide_mass); **Masa PSA glikana je izračunata kao razlika između dobijene mase PSA i pridružene teorijske mase odgovarajuće proteinske sekvence PSA; ***Teorijska masa glikana je izračunata primenom *GlycanMass* softvera (<http://web.expasy.org/glycanmass>); ****Pretpostavljena struktura glikana je predložena na osnovu poznate strukture kompletnog glikanskog lanca PSA (NaNF, 2352,16 Da). Korišćena je nomenklatura ustanovljena od strane Konzorcijuma za funkcionalnu glikomiku.



4.6. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz urina

Reprezentativan maseni spektar fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz urina zdravog muškarca je prikazan na **slici 19**, a prikaz molekulskih masa i frekvencija odgovarajućih pikova detektovanih u spektrima pojedinačnih uzoraka je dat u **tabeli 10**.

Za spektre urinarnih fPSA-imunoreaktivnih vrsta je bilo karakteristično odsustvo pikova u regionu 27 - 29 kDa koji predstavljaju zreli, glikozilovani PSA, a koji su bili prisutni u uzorcima seruma i pulu SP. Nasuprot tome, detektovane su vrste na 18-20 kDa i 24-25 kDa, od kojih je ona na 24,6 kDa uočena i u pulu SP, ali ne i u serumu.



Slika 19. Reprezentativan maseni spektar fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz urina zdravog muškarca. x-osa: m/z masa/naelektrisanje; y-osa: intenzitet signala

Tabela 10. Zbirni prikaz fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz urina zdravih muških osoba

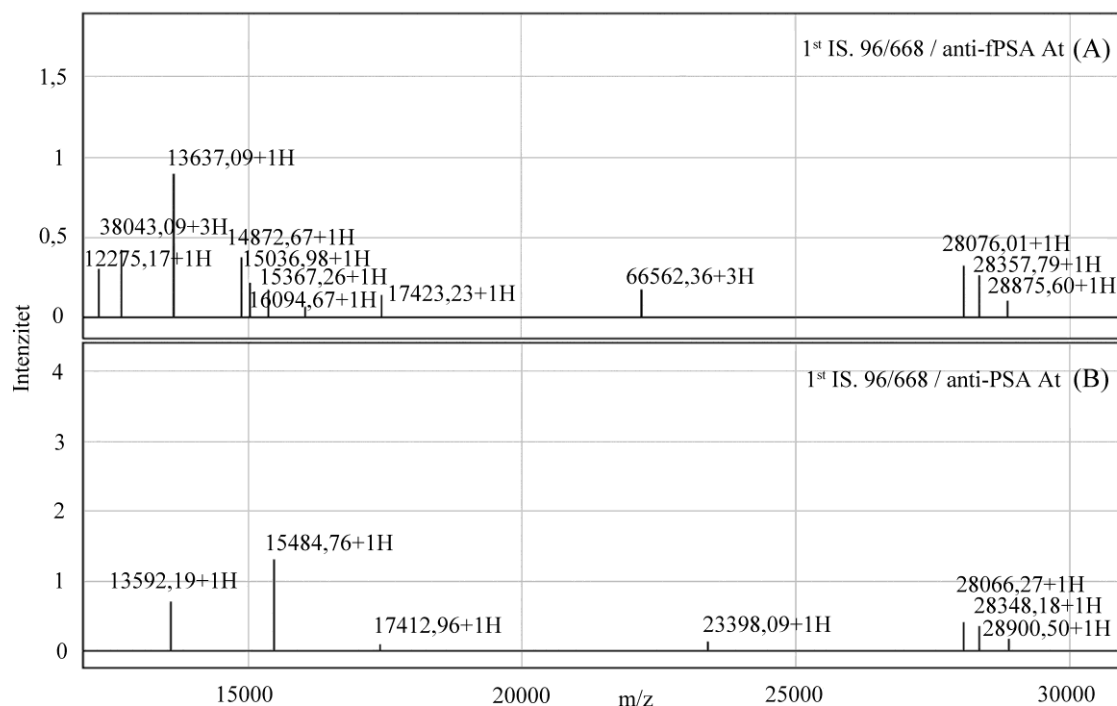
<i>Urin (n=7)</i>	
<i>Srednja vrednost (SD; min-max)</i>	<i>FP (%)</i>
<i>m/z</i>	
13711,28 (11,37; 13689,19-13718,70)	43
13878,44 (7,75; 13871,74-13886,93)	43
15805,52 (13,79; 15789,96-15822,93)	86
16774,96 (15,17; 16759,42-16789,73)	43
17408,23 (10,69; 17400,49-17420,42)	43
18105,68 (12,88; 18097,83-18120,54)	43
19507,22 (18,36; 19487,32-19513,80)	71
21833,20 (136,03; 21787,01-21979,39)	29
24596,86 (31,82; 24560,08-24636,89)	71
24917,05 (36,29; 24876,60-24960,79)	71

SD: standardna devijacija; m/z: masa/naelektrisanje; n: broj pojedinačnih uzoraka; FP: frekvencija pika

U regionu malih molekulskih masa, u poređenju sa SP i serumom, nisu bile prisutne vrste na 17 kDa, koje odgovaraju fragmentima “*nicked*” PSA. U ovom regionu, su međutim, bile prisutne vrste na 13711,28 Da, 13878,44 Da, 15805,52 Da, 16774,96 Da i 17408,23 Da. Vrsta na 15835,03 Da je ranije detektovana u serumima tretiranim ETA i za nju je pretpostavljeno da nastaje autoproteolitičkom degradacijom PSA (**Tabela 6**). Ostale vrste uočene u spektru urina bi, takođe, mogle biti rezultat autoproteolitičke aktivnosti PSA ili proteolitičke degradacije, usled čega nije izvršena procena njihove glikozilacije.

4.7. Profilisanje fPSA-imunoreaktivnih vrsta u prvom internacionalnom standardu fPSA (1st IS. 96/668)

Maseni spektri fPSA-imunoreaktivnih vrsta iz 1st IS. 96/668 dobijeni imunoafinitetnom hromatografijom na čipu sa imobilisanim antitelom na fPSA ili antitelom na ukupni PSA (koje prepoznaje fPSA i PSA u kompleksu), su prikazani na slikama 20 (A, B).



Slika 20. Reprezentativni maseni spektri prvog internacionalnog standarda fPSA (1st IS. 96/668) dobijeni imunoafinitetnom hromatografijom na čipu. A) anti-fPSA At: antitelo na slobodan PSA imobilisano na površini čipa; B) anti-PSA antitelo: antitelo na ukupan PSA imobilisano na površini čipa

Karakterističan klaster pikova u regionu 28-29 kDa koji odgovaraju zrelom PSA je bio prisutan u oba spektra i odgovara onom koji je dobijeni analizom uzoraka BPH/PCa-seruma (Slika 11, Tabela 1). fPSA vrste malih molekulskih masa, u regionima 13-14 kDa i 15-16 kDa su bile izraženije u spektru 1st IS. 96/668 koji je dobijen hromatografijom na čipu sa imobilisanim antitelom na fPSA nego sa antitelom na ukupni PSA. Molekulske vrste u regionu 17-19 kDa kao i vrsta na 25,8 kDa, detektovane kod BPH/PCa-seruma, nisu uočene u spektrima 1st IS. 96/668.

Dobijeni rezultati su upotpunjeni ispitivanjem sledljivosti merenja fPSA u “sandwich” imunoradiometrijskom testu u kome su korišćena ista antitela kao i u imunoafinitetnoj hromatografiji na čipu. Antitelo koje prepoznaje epitop I fPSA je primenjeno kao “capture” antitelo, a antitelo za ukupan PSA kao “tracer”. Recovery vrednost za 1st IS. 96/668 je bila 93 - 119% (Tabela 11)

Tabela 11. Recovery test za 1st IS. 96/668

<i>Ist IS. 96/668 fPSA</i>		<i>Recovery</i> (%)
<i>µg/l</i>		
<i>Očekivana</i>	<i>Dobijena</i>	
0,71	0,73	103
1,25	1,49	119
2,49	2,54	102
6,17	6,21	101
9,80	10,19	104
19,23	17,84	93

5. Diskusija

U ovom radu je uspostavljen nov eksperimentalni sistem za jednostavnu, osetljivu i specifičnu detekciju PSA, čijom primenom su upotpunjena i proširena saznanja o strukturnoj heterogenosti i mogućem biomarkerskom potencijalu njegovih molekulskih vrsta.

Strukturna karakterizacija PSA je u velikoj meri ograničena analitičkim mogućnostima pojedinih tehnika i specifičnošću glikanskog i proteinskog dela molekula koji menjaju njegovo ponašanje u toku elektroforeze i pri različitim hromatografskim tehnikama (*Lodish i sar., 2000*). Pored toga, postoji i značajan problem niskih koncentracija molekulskih vrsta PSA koje se ne mogu izolovati u količinama neophodnim za specifične analize kao npr. analizu glikana. Iz tih razloga se koriste različiti pristupi tj. vrši se analiza pojedinačnih ili spojenih uzoraka sa visokom koncentracijom PSA (PCa-serumi ili semena plazma čoveka) ili uzoraka u kojima je njegova koncentracija povećana imunoadsorpcijom ili oslobađanjem iz kompleksa sa inhibitorima proteaza.

Eksperimentalni sistem koji je korišćen u ovom radu se zasnivao na imunoafinitetnoj hromatografiji na čipu kombinovanoj sa masenom spektrometrijom što je bilo, posebno, pogodno za profilisanje molekulskih vrsta PSA malih masa koje do sada nisu detaljno okarakterisane. Velika osetljivost i visoka rezolucija masene spektrometrije su omogućili detekciju različitih molekulskih vrsta kako u uzorcima koji imaju povišene koncentracije PSA, tako i u onima sa blago povišenim ili niskim, normalnim fiziološkim koncentracijama, bez potrebe za prethodnim obogaćivanjem ili izolovanjem (*Seibert i sar., 2004*).

Sa aspekta analitičkih karakteristika razvijenog sistema za profilisanje molekulskih vrsta PSA, posebno je značajna imunoreaktivnost kao kriterijum za specifičnost detektovanih vrsta. Za identifikaciju i detekciju molekulskih vrsta PSA su do sada uglavnom korišćena različita poliklonska antitela koja prepoznaju ukupan PSA, tj. kako slobodnu formu tako i formu u kompleksu sa ACT. Rezultati ovog ispitivanja se odnose na detekciju slobodnog PSA na osnovu imunoreaktivnosti prema monoklonskom antitelu koje prepoznaje epitop I fPSA. Ovo antitelo prepoznaje zreo PSA i proPSA i ne pokazuje unakrsnu reaktivnost sa PSA-ACT kompleksom. Epitop I je definisan kao kalikreinska petlja u regionu od 80-91 aa (*Piironen i sar., 1998*). Antitelo korišćeno u ovom radu je komercijalno dostupno i jedno je od brojnih antitela prema PSA koje je okarakterisano tokom treće ISOBM TD (*International Society of Oncology and*

Biomarkers Tissue Differentiation) radionice koja je održana 1999. godine (*Stenman i sar., 1999b*).

Prema konceptu specijacije proteoma, primarni produkt translacije tj. inicijalna proteinska vrsta se dalje može menjati u smislu proteolitičke obrade, različitih modifikacija uključujući glikozilaciju, transporta do organela ili izvan ćelije, ili degradacije (*Jungblut i sar., 2008*). Kada je u pitanju PSA, poznato je da tokom biosinteze i obrade, pored inicijalne proteinske vrste, nastaju i vrste koje su rezultat proteolitičke obrade, degradacije ili alternativnog splajsovanja (*Heuzé i sar., 1999; Heuzé-Vourc'h i sar., 2001; Mikolajczyk i sar., 2001; Sumi i sar., 2001; Isono i sar., 2002; Heuzé-Vourc'h i sar., 2003*). Pretpostavlja se da je postojanje različitih zrelih vrsta PSA rezultat razlike u njihovom glikanskom sastavu, iako ni uticaj drugih strukturnih modifikacija ne može biti zanemaren (*Zhang i sar., 1995; Mattsson i sar., 2008*).

Promene u strukturi jednog proteina koje su rezultat različitih modifikacija se, generalno, reflektuju na njegovu masu i mogu se detektovati masenom spektrometrijom bez, a priori, znanja o samoj modifikaciji. Primenom IS-MS (*Ion Spray Mass Spectrometry*) je u preparatu PSA izolovanom iz semene plazme, detektovano prisustvo dve proteinske vrste, glavne na 28430 Da i minorne na 28284 Da (*Bélanger i sar., 1995*). S obzirom na to da je masa PSA polipeptida ranije određena aminokiselinskim i DNK sekvenciranjem (1-237 ak: Mr 26089 Da), razlika, čija je izračunata vrednost iznosila 2352,16 Da, pripisana je masi glikana, tj. pretpostavljeno je da je PSA molekul glikozikovao. NMR analiza je potvrdila i pokazala da on sadrži jedan fukozilovani disijalinizovan biantenaran N-glikan, i ovakav oligosaharidni lanac se i danas uzima kao standard (*Bélanger i sar., 1995*).

Polazeći od ovih načela kao i postojećih podataka o strukturi PSA iz semene plazme, dobijenih masenom spektrometrijom, u ovom radu je vršena analiza proteinskog i procena glikanskog sastava molekulskih vrsta PSA razdvojenih imunoafinitetnom hromatografijom na čipu iz različitih subproteoma. Kao relevantne su korišćene teorijske mase celog polipeptidnog lanca PSA, kao i fragmenata "nicked" PSA. Do sada je pokazano postojanje prekida na pozicijama Arg85/Phe86, Lys145/Lys146 i Lys182/Ser183 (*Zhang i sar., 1995*). Teorijske mase aminokiselinskih sekvenci koje odgovaraju fragmentima 1-85, 1-145 i 1-182 su 9564,06 Da, 16138,52 Da i 20217,31

Da, redom. "Nicked" forme PSA su proteolitički prekinute na odgovarajućim aminokiselinskim pozicijama, ali se zahvaljujući odgovarajućim disulfidnim vezama održava celost molekula (Wu i sar., 2006). Pokazano je da tokom MALDI-TOF/MS analize sintetisanih heterodipeptida koji su povezani disulfidnim vezama dolazi do njihovog raskidanja i detekcije vrsta čije mase odgovaraju monomernim peptidima (Crimmins i sar., 1995). Tačan mehanizma raskida disulfidnih veza tokom MALDI-TOF/MS analize nije poznat, ali se pretpostavlja da je razlog tome upotreba lasera za koga je pokazano da indukuje homolitičko raskidanje disulfidne veze u vodenim rastvorima (Crimmins i sar., 1995). Kako SELDI-TOF/MS tehnologija, takođe, koristi laser za jonizaciju, vrlo je verovatno da je izražena fragmentacija PSA rezultat raskida disulfidnih veza, što je omogućilo indirektan uvid u forme "nicked" PSA.

Primenom uspostavljenog sistema, u frakcionisanim BPH- i PCa-serumima su detektovane molekulske vrste zrelog, glikozilovanog (gp28) fPSA, kao i „nicked" PSA koje imaju prekid između Lys145/Lys146 (gp18) i između Lys182/Ser183 (gp22). Jedina razlika je uočena u gp28 grupi, kao prisustvo vrste na 27595,81 Da kod BPH, ali ne i kod PCa. Nefrakcionisani serumi su se odlikovali sličnim profilima ovih molekulskih vrsta, ali je kod njih bilo izraženije prisustvo vrsta koje bi mogle odgovarati proteolitičkim fragmentima PSA, i to više kod BPH-seruma, nego kod PCa-seruma. U odnosu na postojeće literaturne podatke, dobijen je bolji uvid u vrste bliskih masa u okviru svake peptidne i glikopeptidne grupe (Isono i sar., 2002).

Za razliku od semene plazme, molekulske vrste serumskog PSA nisu detaljno okarakterisane (Isono i sar., 2002). Do sada su analizirana dva pojedinačna uzorka PCa-seruma visoke koncentracije u kojima su detektovane molekulske vrste gp28, p26, gp22, p20, gp18, koje su, takođe, bile prisutne i u ćelijskoj liniji kancera prostate (LNCaP). Što se tiče BPH, podaci se odnose na molekulske vrste PSA iz tkiva, ali ne i iz seruma. Pored onih koje su detektovane u PCa-serumu, pokazano je prisustvo i većeg broja vrsta malih molekulskih masa: p16, gp12, p10 i p6 (Isono i sar., 2002). Pretpostavljeno je da gp12 i p16 vrste potiču od PSA koji ima prekid između Arg85/Asp86, i da su ovakvi obrasci fragmentacije rezultat različite aktivnosti ili zastupljenosti proteolitičkih enzima u PCa i BPH (Takayama i sar., 2000).

Rezultati ovoga rada, dobijeni analizom većeg broja pojedinačnih ili pulovanih PCa-seruma su bili u saglasnosti sa postojećim podacima koji se odnose na intaktni i

„nicked” PSA. Uočene razlike u broju i prisustvu vrsta malih molekulskih masa bi poticale od toga što je primenjena metoda osetljivija, tj. da one nisu mogle biti detektovane u ranijim analizama (*Kosanović i sar., 2011*). Rezultati dobijeni analizom BPH-seruma, u poređenju sa onim dobijenim iz BPH-tkiva (*Isono i sar., 2002*), nisu pokazali značajnu razliku u molekulskim vrstama ni u jednom regionu masa, bez obzira na različit izvor PSA.

Procena glikozilacije detektovanih molekulskih vrsta PSA je izvršena na osnovu izračunate mase njihovih glikana, koja odgovara razlici eksperimentalno određene mase odgovarajuće molekulske vrste PSA i teorijske mase kanonske aminokiselinske sekvence PSA. Ona je korišćena kao polazni i glavni element u bioinformatičkom predviđanju sastava oligosaharidnog lanca, a ovaj pristup je već korišćen kao inicijalni korak pre dalje strukturne analize glikana PSA (*Bélanger i sar., 1995*). Usled ograničenja primenjene metode, eksperimentalna potvrda procenjene glikozilacije je vršena na indirektan način, korišćenjem jonoizmenjivačke hromatografije (*Goč i Janković, 2013*). Ovo je bilo moguće, zbog toga što PSA sadrži samo jedan N-glikan. Molekulskim vrstama, za koje je pretpostavljeno da su produkt proteolitičke aktivnosti, međutim, nisu pridružene glikanske strukture, usled nemogućnosti definisanja njihovih polipeptidnih sekvenci.

Dobijeni rezultati su pokazali da serumske molekulske vrste PSA i kod BPH i PCa sadrže glikanske strukture koje su opisane i kod PSA poreklom iz semene plazme (*Mattsson i sar., 2008; White i sar., 2009*). One obuhvataju fukozilovan ili nefukozilovan disijalinizovan biantenaran (molekulske vrste: 28139,5-28429,6 Da), fukozilovan ili nefukozilovan monosijalinizovan biantenaran N-glikan (molekulske mase: 27627,6-28139,5 Da) i oligo- i paucimanozne strukture (molekulske mase: 26808,9-27295,9 Da) (*Mattsson i sar., 2008*). Uprkos razlikama u metodama i sistemima za detekciju na osnovu kojih su dobijeni podaci koji su korišćeni kao referentni i onih primenjenih u ovom radu, uočena je visoka korelacija dobijenih/eksperimentalno određenih i postojećih/teorijskih podataka o obrascima polipeptidnog i glikanskog dela molekula PSA. Razlike između izračunate i teorijske mase od oko 0,1 kDa, i one bi mogle biti rezultat adukata karakterističnih za masenu spektrometriju.

Procenjeno je da bi molekulske vrste u grupi gp28 mogle sadržati sijalinizovan biantenaran ili triantenaran N-glikan. Kod BPH, u okviru ove grupe, vrsti na 27595,81 Da je pridružen sijalinizovan monoantenaran N-glikan. Što se tiče "nicked" PSA vrsti sa prekidom između Lys145/Lys146, one bi mogle sadržati oligomanozni lanac tipa Man4, Man5 ili Man8.

Procenjena glikozilacija je bila u skladu sa rezultatima jonoizmenjivačke hromatografije koji su pokazali da vrste iz grupe gp28 jače interaguju sa anjonskim izmenjivačem, dok se one iz grupe gp18 slabo vezuju za oba jonoizmenjivača (Goč i Janković, 2013). Ovo bi se moglo dovesti u vezu sa pretpostavljenim sadržajem sijalinske kiseline kod gp28, odnosno neutralnim oligomanoznim glikopeptidima kod gp18.

Iako su dobijeni rezultati pokazali da ne postoje značajne kvalitativne razlike u glikanima pojedinačnih molekulskih vrsta kod BPH i PCa, to nije u suprotnosti sa podacima koji govore o različitoj zastupljenosti pojedinih glikoizoformi kod ovih patoloških stanja (Peracaula i sar., 2003; Tajiri i sar., 2008; Sarrats i sar., 2010), zbog toga što primenjeni sistem nije standardizovan za njihovu kvantitaciju. Do sada, nije rađena karakterizacija glikana pojedinačnih molekulskih vrsta serumskog PSA, već samo postoje podaci o generalnoj promeni oligosaharidnog lanca u smislu fukozilacije, sijalinizacije i prisustva GalNAc kod kancera prostate u poređenju sa BPH i normalnim fiziološkim stanjem (Peracaula i sar., 2003; Kosanović i Janković, 2009; Dwek i sar., 2010). Poznavanje glikozilacije PSA je veoma važno za njegov biomarkerski potencijal (Guilgunn i sar., 2013). Poređenje BPH PSA i PCa PSA profila radi dalje kliničke primene u diferencijalnoj dijagnostici je bilo van obima ovog istraživanja, ali su dobijeni rezultati potvrdili značaj određivanja proteomskog profila PSA, u cilju boljeg razumevanja i objašnjenja biomarkerskog potencijala svih njegovih vrsta.

Pri razmatranju profila molekulskih vrsta PSA, mora se uzeti u obzir koncept proteoma individue (Jungblut i sar., 2008). S obzirom da svaka individua živi u različitom okruženju, zbog jakog uticaja sredine i izrazito dinamičnog karaktera proteoma, svaka od njih produkuje svoj sopstveni proteom. Nastanak kancera prostate prati dodatno usložnjavanje proteoma jedne individue usled strukturnih izmena proteinskih vrsta (Koomen i sar., 2008). Kao posledica toga, u serumu i drugim biološkim tečnostima istovremeno se mogu naći strukturno različiti PSA molekuli koji potiču iz normalnog

tkiva, tkiva pod inflamacijom i neoplastičnog tkiva, a čija zastupljenost i vremenska distribucija može značajno varirati (*Stephan i sar., 2009a*).

Poznato je da strukturni integritet PSA presudno utiče na njegovu biološku aktivnost i sposobnost interakcije sa različitim molekulima. Pored strukturne specifičnosti, za formiranje kompleksa je izuzetno važna i stabilnost vezivanja za ligand. PSA može da gradi kovalentne komplekse sa inhibitorima proteaza (ACT, AMG ili API) i nekovalentne imunske komplekse sa IgG i IgM (*Lilja i sar., 1991; Beneduce i sar., 2008*). Inhibitori interaguju sa PSA kako bi onemogućili njegovu proteolitičku aktivnost, dok biološki smisao postojanja PSA u imunskim kompleksima još uvek nije poznat. Postojeći literaturni podaci pokazuju da molekulska vrsta PSA koja ulazi u kompleks sa ACT ima masu 28580 Da (*Peter i sar., 2000*). Rezultati ovoga rada, dobijeni pod uporedivim eksperimentalnim uslovima, na pulovanim uzorcima seruma su, međutim, pokazali prisustvo dominantnih vrsta u regionu 15-16 kDa i minornih u regionu 28-29 kDa. Ovo ukazuje da nakon osobađanja iz kompleksa, dolazi do strukturnih promena PSA koje ne utiču na njegovu imunoreaktivnost, što je potvrđeno i rezultatima imunometrijske kvantitacije fPSA. Detekcija vrsta na 15-16 kDa bi se mogla dovesti u vezu sa autoproteolitičkom aktivnošću PSA, s obzirom na to da je poznato da u kompleks sa ACT ulazi enzimski aktivan PSA. Molekulske vrste na 15-16 kDa su, takođe, detektovane imunoafinitetnom hromatografijom kod netretiranih seruma, ali kao minorne. Analizom PSA standarda koji sadrži enzimski aktivan molekul, primenom kapilarne elektroforeze na čipu, su, takođe, uočene vrste na 15 kDa za koje je pretpostavljeno da su produkti autoproteolize (*Hynek i sar., 2012*).

Istraživanja na polju biomarkera su, generalno, ukazala na postojanje cirkulišućih imunskih kompleksa kao nove klase tumorskih markera čiji je dijagnostički potencijal uporediv, ako ne i bolji od odgovarajućih slobodnih biomarkera. U ovu klasu, između ostalih, ulaze i kompleksi sa imunoglobulinom M (IgM) koji su pronađeni kod različitih vrsta oboljenja koja obuhvataju i karcinome debelog creva, jetre i prostate. Serumski PSA je pronađen u kompleksu sa IgM, a razlike u zastupljenosti ovog tipa imunokompleksa u stanjima BPH i PCa su ukazale na njegov mogući značaj u diferencijalnoj dijagnostici (*Beneduce i sar., 2007*). Sa biohemijske tačke gledišta, ne postoji uvid u strukturne karakteristike molekula koji interaguju sa IgM. Uzimajući u obzir oligoreaktivnost, multivalentnost i njegovu preferenciju ka ugljenohidratnim

epitopima, postoji mogućnost da IgM selektivno prepoznaje glikoizoforne PSA (*Vollmers i Brändlein, 2007*).

Poređenje molekularnih vrsta PSA detektovanih u cirkulišućim PSA-IgM kompleksima, sa molekularnim vrstama slobodnog PSA, su potvrdili ovu pretpostavku. Molekularne vrste koje odgovaraju gp28 i koje prevashodno sadrže mono- i disijalinizovani biantenarni lanac su, za razliku od fPSA, kod PSA-IgM minorne. Glavne molekularne vrste PCa PSA i BPH PSA detektovane u kompleksu sa IgM su odgovarale gp18 i za njih je pretpostavljeno da sadrže oligomanozne strukture.

Jedina vrsta koja ulazi u imunski kompleks sa IgM, a koja nije detektovana u frakciji slobodnog PSA je uočena u PCa-serumima i ona ima molekularnu masu 26891 Da. Njoj je pridružena paucimanozna struktura. Pretpostavljeno je da ovakva struktura postoji i kod PSA vrsta molekularnih masa 26808,9-27295,8 Da koje čine minornu izoformu (0,6 %) u normalnoj semenoj plazmi (*Mattsson i sar., 2008*). Postojanje paucimanoze kod kancerskog PSA se može povezati sa podacima koji ukazuju na njeno prisustvo i kod drugih tipova kancera (*Zipsera i sar., 2012*). Molekularne vrste PSA u kompleksu sa IgM bi mogle imati dijagnostički potencijal za razlikovanje PCa i BPH, ali se za sada ne može govoriti o prednosti njihove upotrebe u odnosu na molekularne forme (ukupan PSA-IgM ili indeks fPSA/PSA) koje se rutinski koriste u ovu svrhu (*Beneduce i sar., 2007*). Zbog heterogenosti ukupnog PSA-IgM i složenosti primenjene metode, njihov potencijalni značaj bi trebalo biti potvrđen testiranjem različitih tipova uzoraka u drugim tipovima eksperimenata čiji je dizajn pogodan za kliničku upotrebu.

Izuzev potencijalnog značaja u diferencijalnoj dijagnostici, karakterizacija molekularnih vrsta PSA u kompleksu sa IgM bi mogla biti od značaja i za imunoterapiju kancera (*Zani i sar., 2010*). Poznato je da su tumorski ugljenohidratni antigeni stalne mete prirodnih IgM antitela, a da se glavne promene na malignoj ćeliji ogledaju u post-translacionim modifikacijama ugljenohidratnih rezidua glikolipida i glikoproteina na ćelijskoj površini (*Dunn i sar., 2002; Dunn i sar., 2004; Wang, 2012*). Kao prva linija odbrane, IgM ima posebnu poziciju u imunskom sistemu, a odgovor na pitanje da li je vezivanje modifikovanih glikanskih struktura, kao u slučaju PSA, opšti princip, može biti od posebnog kliničkog interesa u dizajniranju različitih pasivnih ili aktivnih vakcina (*Wandall i Tarp, 2009*). Dobijeni rezultati usmeravaju dalja istraživanja ka strukturnom

poređenju različitih tumorskih markera pronađenih u imunskim kompleksima i njihovih slobodnih formi, s ciljem unapređenja detekcije i terapije kancera.

Primenom ultrasenzitivnih metoda za detekciju i merenje PSA, pokazano je da on nije isključivo specifičan za prostatu, već da je u niskim koncentracijama prisutan i kod žena i to, pre svega, u hormon zavisnim tkivima (dojka, ovarijum i endometrijum), kao i u telesnim tečnostima, pri različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima (*Borchert i sar., 1997a; Black i Diamandis, 2000*). Kancer dojke (BCa) i prostate se mogu smatrati homologim kancerima kod žena i muškaraca jer dele slične epidemiološke, genetske i biohemijske karakteristike (*López-Otín i Diamandis, 1998*). Stoga, podaci o PSA formama i strukturnoj specifičnosti njegovih molekulskih vrsta kod kancera dojke mogu pomoći u razumevanju molekulskih i fizioloških procesa koji su, generalno, u vezi sa kancerom ili mehanizmima specifičnim za određeni tip kancera.

U ovom radu je, po prvi put, urađena analiza molekulskih vrsta ekstraprostatičnog PSA poreklom iz seruma zdravih ženskih osoba i onih sa kancerom dojke. Sa strukturnog aspekta, podaci o ekstraprostatičnom PSA su oskudni i jedino ukazuju na postojanje specifične splajsing varijante PSA/KLK3 gena (PSA-SV2), koja je pronađena u ćelijskim linijama kancera prostate i dojke (*Pampalakis i sar., 2008*). Dominantna forma PSA u serumu pacijenata sa kancerom dojke je slobodan PSA (>50 %), i ona najverovatnije potiče iz tumorskog tkiva dojke, dok je PSA-ACT glavna u serumima zdravih ženskih osoba i osoba sa kancerom prostate (*Giai i sar., 1995; Melegos i Diamandis, 1996; Borchert i sar., 1997b*). Kod kancera dojke, PSA se ne vezuje za inhibitore proteaza, čak ni za ACT uprkos njegovom velikom višku u serumu. S obzirom na to da je pokazano da se kancerski ekstraprostatičan PSA ne razlikuje ni na peptidnom i na nivou transkripta od prostatičnog PSA, pretpostavlja se da PSA podleže post-translacionim modifikacijama koje sprečavaju formiranje kompleksa sa ACT ili se nalazi u formi „nicked“ ili proPSA (*Black i Diamandis, 2000*).

Nivoi serumskog PSA su veoma niski i kod zdravih žena i žena sa kancerom dojke (*Yu i sar., 1994; Giai i sar., 1995*). Selekcija uzoraka seruma korišćenih u ovom radu, je izvršena na osnovu povećanog nivoa tumorskog markera dojke CA 15-3 i na osnovu koncentracije ukupnog PSA (> 0,03 µg/l), određene imunoradiometrijskim testom. Bez obzira na unutrašnju heterogenost svake grupe ispitivanih ženskih seruma, uočene su diskretne razlike između profila fPSA vrsta iz BCa-seruma i seruma zdravih žena (HF-

serum), kao i njihove razlike u odnosu na profil fPSA vrsta iz seruma osoba sa PCa. Dobijeni rezultati su, generalno, ukazali na sličnost molekulskih vrsta koje pripadaju gp28 grupi, dok je razlika uočena u vrstama malih molekulskih masa, u regionima 12-13 kDa, 15-16 kDa i 17-18 kDa, koje su prisutne u PCa-serumima, a koje nisu detektovane u BCa-serumima ili su bile na granici detekcije u HF-serumima.

Vrste na 12,6 kDa, 23,1 kDa i 29,6 kDa koje su bile specifične za BCa fPSA bi se, međusobno, mogle razlikovati u glikozilacijskom statusu, iako je pretpostavljeno da sve sadrže multinatene N-glikane. Budući da su uzorci korišćeni u ovom radu imali povišeni CA 15-3, koji se smatra nespecifičnim markerom progresije tumora, dobijeni rezultati su u korelaciji sa podacima o povećanom grananju N-glikana u uznapredovanom kanceru dojke (faze I-IV) (Kyselova i sar., 2008).

Molekulske vrste PSA na 21-23 kDa mogu poticati od „nicked“ PSA koji ima prekid između Lys182/Ser183, dok one na 17 kDa i 12 kDa od „nicked“ PSA sa prekidima između Lys145/146 i Arg85/Phe86, redom. Heterogenosti fPSA takođe doprinose vrste na 25,8 kDa, 20,0 kDa, 15,8 kDa, 13,5 kDa (HF i BCa) i 16,7 kDa (BCa), koje bi mogle odgovarati zreloom neglikozilovanom PSA ili produktima njegove degradacije.

Fiziološki značaj ekstraprostatičnog PSA još uvek nije procenjen (Black i Diamandis, 2000). Veza između prisustva ekstraprostatičnog PSA i dobre prognoze za oporavak kod osoba obolelih od BCa još uvek nije sa sigurnošću potvrđena i objašnjena (Yu i sar., 1995). Ukoliko se, međutim, pođe od pretpostavke da je PSA kod kancera dojke enzimski aktivan, postavljena je hipoteza koja objašnjava njegovu povezanost sa inhibicijom progresije tumora. Pokazano je da PSA, *in vitro*, stimuliše konverziju potentnog estradiola (E2) do manje potentnog estrona (E1) inhibirajući na taj način rast tumora dojke (Black i Diamandis, 2000). Pored toga, postoje podaci o tome da PSA proteolitički degradira protein sličan paratireoidnom hormonu (PTHrP), inhibirajući progresiju kancera dojke, s obzirom na to da PTHrP *in vitro* i *in vivo* stimuliše proliferaciju ćelija kancera dojke. Još jedna potencijalna uloga PSA u inhibiciji tumora se odnosi na sposobnost da proteolitički degradira produkte BRCA1 gena što dovodi do stvaranja peptida koji su inhibitori rasta ćelije (Black i Diamandis, 2000). Novija istraživanja ukazuju na ulogu PSA u aktivaciji imunskog odgovora, ali ona nije još uvek detaljno objašnjena (Klyushnenkova i sar., 2004; Kodak i sar., 2006).

Pored analize molekularskih vrsta serumskog PSA, u ovom radu je ispitan i urinarni PSA. Urinarni PSA (uPSA) proizvodi prostata i periuretralna žlezda i on dospeva u urin direktno, a ne kao rezultat bubrežne filtracije seruma (*Pannek i sar., 1997*). Iako je urin lako dostupan uzorak za analizu i ima veliki potencijal kao dijagnostički fluid, podaci o uPSA su prilično oskudni. Najveći broj istraživanja je bio usmeren ka određivanju koncentracije PSA u urinu u cilju razlikovanja BPH i PCa. Iako dobijeni rezultati nisu ukazali na postojanje značajnih razlika koje bi mogle imati kliničku primenu, pokazana je veza između niske koncentracije uPSA i volumena prostate (*Iwakiri i sar., 1993; Breul i sar., 1994; Pannek i sar., 1997; Shibata i sar., 1997; Hekal, 2013*).

PSA je u urinu prisutan isključivo u slobodnoj formi, a jonoizmenjivačkom hromatografijom se može razdvojiti u četiri izoforme (*Janković i Kosanović, 2005*). Nativnom elektroforezom uPSA je, takođe, razdvojen veći broj njegovih proteinskih vrsta, dok je MALDI-TOF/MS analizom određena masa dominantne vrste koja je iznosila 27756 Da (*Shibata i sar., 1997*). U ovom radu je po prvi put urađeno profilisanje pojedinačnih molekularskih vrsta uPSA. Primenom uspostavljenog eksperimentalnog sistema, u urinu zdravih muškaraca su, predominantno, detektovane vrste malih molekularskih masa (<25 kDa), a odsustvo vrsta u regionu 27-29 kDa, koje odgovaraju zreloom, glikozilovanom PSA je bilo upečatljivo. U poređenju sa serumskim, profil uPSA je pokazao preklapanja u slučaju vrsta malih molekularskih masa na 15,8; 24,6 i 24,9 kDa za koje je pretpostavljeno da su rezultat autoproteolitičke aktivnosti PSA. Poznato je da urin sadrži samo enzimski aktivan PSA, pa bi profil masa urinarnih fPSA-imunoreaktivnih vrsta, najverovatnije, bio rezultat njegove autoproteolitičke aktivnosti (*Pannek i sar., 1997*).

Dobijeni rezultati koji su potvrdili heterogenost molekularskih vrsta PSA nisu bitni samo za razumevanje bazičnih aspekata njegove strukture već mogu imati neposredan i ogroman uticaj na određivanje koncentracije ovog tumorskog markera i uporedivost rezultata laboratorijskih testova. Mnogi od njih koji se nalaze u svakodnevnoj laboratorijskoj primeni, uključujući različite komercijalno dostupne testove za PSA, ustvari određuju koncentraciju različitih analita, ne uzimajući u obzir specifičnost njihove strukture. U svetlu podataka o izraženoj heterogenosti PSA u svakom od ispitivanih subproteoma, kao i međusobnih razlika u zastupljenosti pojedinih

molekulskih vrsta PSA, postavlja se pitanje koje molekulske vrste se, zapravo, određuju dostupnim imunotestovima.

Veliki broj heterogenih analita koji se u kliničkoj hemiji koriste kao tumorski markeri su glikoproteini, ali za većinu njih ne postoje odgovarajući referentni preparati (*Janković i sar., 2008; Janković, 2011*). Referentni preparati su, generalno, deklarirani na osnovu koncentracije analita, ali ne i sadržaja njegovih molekulskih vrsta. Što se tiče heterogenosti glikoproteina, ona se, u stvari, ne može na pravi način reflektovati u sadržaju referentnih preparata (*Bristow i sar., 2005; Sturgeon i Diamandis, 2009*). Uprkos njihovom postojanju, na primer, standardizacija imunotestova za slobodan i ukupan PSA i dalje predstavlja aktuelan problem. Rezultati testiranja od 2007. do 2010. godine su pokazali da varijabilnost između testova različitih proizvođača iznosi od 5 do 40 % (*Vignati i Giovanelli, 2007; Stephan i sar., 2009b; Fillée i sar., 2010*). Prvi test za PSA, označen kao *Tandem-R* test, je kalibrisan primenom internog referentnog preparata PSA čoveka prečišćenog od strane tima *Hybritest-a*. Ovaj industrijski standard je kvantifikovan primenom standardne *Lowry* metode za određivanje ukupnih proteina. Na prvoj *Stanford* konferenciji (1992. godine) i drugoj *Stanford* konferenciji o internacionalnoj standardizaciji PSA (1994. godine), predložena je upotreba primarnog kalibratora koji sadrži 90% prečišćenog PSA koji je u kompleksu sa ACT i 10% slobodnog PSA. Ovaj standard je nazvan 90:10 standard i on je postao osnova za pripremu *WHO (World Health Organization)* referentnih preparata: *NIBSC-WHO 96/670* i *NIBSC-WHO 96/668* koji se danas koriste za standardizaciju imunohemijskih testova za ukupan i slobodan PSA u serumu. Oni su kvantifikovani primenom sofisticiranih metoda, aminokiselinskom analizom i *ESI-MS*. Usled neslaganja u procenjenim koncentracijama PSA u oba referentna preparata, vrednosti ukupnog i slobodnog PSA koje su određene testovima kalibrisanim prema njima su se razlikovale za 20-25% (*Vignati i Giovanelli, 2007; Stephan i sar., 2009b*).

Referentni preparati PSA su napravljeni tako da reflektuju koncentracijski udeo ukupnog i slobodnog PSA u većini seruma sa kancerom prostate, ali ne i određene molekulske forme (*Rafferty i sar., 2000; Link i sar., 2004; Stephan i sar., 2009b; Anderson 2010; Janković, 2011*). Zbog toga je bilo važno sagledati heterogenost formi PSA u referentnom preparatu koji se koristi za standardizaciju testova kao i u samoj semenoj plazmi iz koje se izoluje PSA od koga se priprema referentni preparat i

uporediti je sa heterogenošću PSA u serumu. Dobijeni rezultati su pokazali da je metrološka sledljivost prvog internacionalnog standarda fPSA (1st IS. 96/668), u imunoradiometrijskom testu sa imobilisanim antitelom za fPSA specifičnim za epitop I, bila u okviru očekivanih i prihvatljivih vrednosti. Imunoafinitetna hromatografija na čipu je, međutim, pokazala značajne razlike u zastupljenosti pojedinih molekulskih vrsta fPSA iz semene plazme u poređenju sa onim u BPH- i PCa-serumima.

Pod primenjenim eksperimentalnim uslovima, u semenoj plazmi je detektovan klaster pikova u regionu 28 kDa, koji se sastoji od vrsta na 27866 Da; 28042 Da, 28350 Da i 28884 Da. Profili intaktnih molekulskih vrsta fPSA iz nefrakcionisane SP i referentnog preparata su se razlikovali po prisustvu vrste na 27866 Da koja je detektovana jedino u SP. Kod oba uzorka, u regionu malih molekulskih masa, najizraženije su bile vrste na 12-13 kDa i 15-16 kDa, ali za razliku od SP, u referentnom preparatu, međutim, nisu detektovane vrste koje pripadaju grupi gp18 (*Goč i sar., 2014*).

Klaster fPSA-imunoreaktivnih vrsta referentnog preparata na 28-29 kDa se preklapao sa molekulskim vrstama koje su uočene u istom regionu u masenom spektru uzorka seruma. Glavni pikovi na 17-19 kDa i 25,8 kDa prisutni kod PCa- i BPH-seruma, nisu uočeni u referentnom preparatu. Molekulske vrste PSA na 28-29 kDa su, izgleda, dijagnostički kritične komponente s obzirom da su dominantne (frekvencija pika 75-100%) i u BPH- i u PCa-serumu (*Goč i sar., 2014*). Dobijeni rezultati ukazuju da koncentraciji fPSA u serumu doprinose različite molekulske vrste i da bi sve one mogle biti prepoznate od strane ispitanog i definisanog antitela. Ostaje, međutim, otvoreno pitanje da li u sendvič imunometrijskim testovima sve ove forme može prepoznati i obeleženo antitelo (antitela za detekciju). Uobičajan dizajn imunometrijskog testa podrazumeva kombinaciju para antitela: antitelo za fPSA kao imobilisano antitelo i antitelo za detekciju koje prepoznaje fPSA i PSA-ACT (*Janković i sar., 2005*). Uzimajući u obzir merenje koncentracije PSA u serumu, postavlja se pitanje njegove imunoreaktivnosti tj. da li imunometrijski testovi koji koriste različita monoklonska antitela mogu, ustvari, meriti sve molekulske vrste PSA. One bi usled strukturnih karakteristika mogle ispoljavati razlike u imunoreaktivnosti prema različitim antitelima, što bi za posledicu imalo to da uzorci seruma koji imaju istu koncentraciju fPSA, sadrže, ustvari, različite proporcije pojedinačnih molekulskih vrsta imunoreaktivnog fPSA. Za unapređenje standardizacije testova za PSA je, stoga, neophodno uzeti u obzir

njegovu molekulsku strukturu i načiniti napor za precizno definisanje specifičnosti svih testova koji se koriste za prepoznavanje različitih formi PSA, što bi moglo doprineti prevazilaženju postojećeg problema sa uporedivošću rezultata laboratorijskih testova.

Sumarni rezultati ovoga rada ukazuju da su primenom imunoafinitetne hromatografije na čipu su upotpunjena i proširena saznanja o strukturnoj heterogenosti PSA i mogućem biomarkerskom potencijalu njegovih pojedinih molekulskih vrsta. Oni usmeravaju dalji eksperimentalni rad ka produkciji antitela koja bi specifično prepoznavala pojedinačne molekulske vrste PSA koje se isključivo/predominantno javljaju u određenim fiziološkim i patološkim stanjima, i koja bi pored primene u dijagnostici mogla imati i poseban značaj u imunoterapiji kancera prostate i dojke.

6. Závěry

1. Uspostavljen je sistem za profilisanje molekulskih vrsta PSA koji je zasnovan na imunofinitetnoj hromatografiji na čipu i masenoj spektrometriji. Velika osetljivost i visoka rezolucija omogućavaju detekciju imunoreaktivnih vrsta kako u uzorcima koji imaju visoke koncentracije PSA, tako i u onima sa povišenim ili niskim, normalnim fiziološkim koncentracijama, bez potrebe za prethodnim obogaćivanjem ili izolovanjem.

2. Dobijeni rezultati su pokazali da se fPSA-imunoreaktivne molekulske vrste u serumu, na osnovu molekulske mase i pretpostavljene glikozilacije, mogu grupisati u četiri glikopeptidne grupe: gp28 (26,6-29,6 kDa), gp22 (20,9-23,1 kDa), gp18 (17,1-18,6 kDa) i gp12 (12,2-12,7 kDa). Pored toga, uočeno je prisustvo brojnih molekulskih vrsta na 24-25,7 kDa, 19,8-20,0 kDa i 13,5-16,3 kDa koje bi mogle predstavljati produkte fragmentacije glikozilovanog ili neglikozilovanog zrelog ili „*nicked*“ PSA.

3. Svaka od glikopeptidnih grupa je prisutna bez obzira na patofiziološko stanje prostate. Najveći broj vrsta malih molekulskih masa potiče od „*nicked*“ PSA sa unutrašnjim prekidom između Arg85/Phe86, Lys145/Lys146 ili Lys182/Ser183. Prisustvo molekulskih vrsta malih masa je izraženije kod BPH, posebno onih u grupi gp22.

4. Procenjeno je da se prostatične serumske fPSA-imunoreaktivne molekulske vrste razlikuju u strukturi N-glikana u smislu postojanja mono-, bi- i triantenarnih oligosaharidnih lanaca u okviru grupe gp28, kao i oligomanoznih struktura u okviru grupe gp18. Pretpostavljeno je da mikroheterogenost u grupi gp28 potiče od razlika u sijalinizaciji, fukozilaciji i prisustvu bisektnog GlcNAc, a u grupi gp18 od razlika u broju manosa u oligomanoznom lancu.

5. Razlike između BPH PSA i PCa PSA se odnose na prisustvo molekulske vrste na 27595,81 Da, u frakciji slobodnog PSA kod BPH, i molekulske vrste na 26889,27 Da, u kompleksu sa IgM, kod PCa. Procenjeno je da vrsta na 27595,81 Da sadrži monoantennaran N-glikan, dok vrsta na 26889,27 Da sadrži paucimanoznu strukturu.

6. Ekstraprostatični PSA, u serumu zdravih ženskih osoba kao i ženskih osoba sa kancerom dojke, karakterišu imunoreaktivne vrste na 20,0 kDa, 25,8 kDa i 27 - 28 kDa koje su prisutne i kod PCa. Vrste manjih molekulskih masa, u regionima 12-13 kDa, 15-16 kDa i 17-18 kDa, koje su veoma izražene kod PCa-seruma, su odsutne ili veoma niskog intenziteta kod HF-seruma i BCa-seruma. Molekulske vrste PSA na 12,6 kDa, 16,7 kDa, 21-23 kDa i 29 kDa su karakteristične za BCa.

7. Procena glikozilacije BCa PSA ukazuje na prisustvo tri- i tetraantenarnog lanca kod karakterističnih molekulskih vrsta na 23,1 kDa i 29,6 kDa.

8. Nije dobijen detaljan uvid u molekulske vrste PSA koje se oslobađaju iz kompleksa sa ACT, s obzirom na to da dolazi do strukturnih promena koje su, najverovatnije, rezultat autoproteolitičke aktivnosti. Isto važi i za urinarni PSA, čiji se profil znatno razlikuje od profila serumskog PSA, u smislu da su u njemu dominantne molekulske vrste malih masa koje bi mogle biti rezultat proteolize ili autoproteolize.

9. Strukturna heterogenost molekulskih vrsta PSA može imati neposredan uticaj na određivanje koncentracije ovog tumorskog markera i uporedivost rezultata laboratorijskih testova, s obzirom na to da koncentraciji fPSA u serumu doprinose molekulske vrste koje se razlikuju od onih koje su prisutne u prvom internacionalnom standardu fPSA (1st IS. 96/668).

10. Primenom imunoafinitetne hromatografije na čipu su upotpunjena i proširena saznanja o strukturnoj heterogenosti PSA i mogućem biomarkerskom potencijalu njegovih pojedinih molekulskih vrsta.

11. Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na neophodnost produkcije antitela koja bi specifično prepoznavala pojedinačne molekulske vrste PSA koje se isključivo/predominantno javljaju u određenim fiziološkim i patološkim stanjima, i koja bi pored primene u dijagnostici mogla imati i poseban značaj u imunoterapiji kancera prostate i dojke.

7. Literatura

1. Abdellah Z, Ahmadi A, Shahana A, Aimable M, Ainscough R, Almeida J, et al. Finishing: the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004;**431**:931-45.
2. Abu-Farha M, Elisma F, Figeys D. Identification of protein-protein interactions by mass spectrometry coupled techniques. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2008;**110**:67-80.
3. Aksoy H, Akçay F, Umudum Z, Yildirim AK, Memisogullari R. Changes of PSA concentrations in serum and saliva of healthy women during the menstrual cycle. *Ann Clin Lab Sci*, 2002;**32(1)**:31-6.
4. Albert A, Dhanaraj V, Genschel U, Khan G, Ramjee MK, Pulido R, et al. Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing. *Nat Struct Biol*, 1998;**5(4)**:289-93.
5. Ali MH, Imperiali B. Protein oligomerization: how and why. *Bioorgan Med Chem*, 2005;**13**:5013-20.
6. Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*, 2010;**56(2)**:177-85.
7. Annan RS, Carr SA. The essential role of mass spectrometry in characterizing protein structure: mapping posttranslational modifications. *J Protein Chem*, 1997;**16(5)**:391-402.
8. Ansari NA, Rasheed Z. Non-enzymatic glycation of proteins: from diabetes to cancer. *Biochem (Mosc), Suppl, Ser B Biomed Chem*, 2009;**3(4)**:335-42.
9. Ayoubi TA, Van De Ven WJ. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*, 1996;**10(4)**:453-60.
10. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui AB, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev Assoc Med Bras*, 2012;**58(3)**:366-75.
11. Bélanger A, van Halbeek H, Graves HC, Grandbois K, Stamey TA, Huang L, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate-specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard. *Prostate*, 1995;**27(4)**:187-97.

12. Beneduce L, Prayer-Galetti T, Giustinian AM, Gallotta A, Betto G, Pagano F, et al. Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients. *Cancer Detect Prev*, 2007;**31(5)**:402-7.
13. Bizzozero OA. Protein carbonylation in neurodegenerative and demyelinating CNS diseases. In: Lajtha A, Banik N, Ray S. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. 3th edition*. New York: Springer; 2009. pp. 543-62.
14. Black DL. Mechanism of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003;**72**:291-336.
15. Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 2000;**59(1)**:1-14.
16. Blanc V, Davidson NO. C-to-U RNA Editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J Biol Chem*, 2003;**278**:1395-8.
17. Borchert GH, Giai M, Diamandis EP. Elevated levels of prostate-specific antigen in serum of women with fibroadenomas and breast cysts. *J Natl Cancer Inst*, 1997a;**89(8)**:587-8.
18. Borchert GH, Melegos DN, Tomlinson G, Giai M, Roagna R, Ponzzone R, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen in the serum of women with benign and malignant breast diseases. *Br J Cancer*, 1997b;**76(8)**:1087-94.
19. Breul J, Pickl U, Hartung R. Prostate-specific antigen in urine. *Eur Urol*, 1994;**26(1)**:18-21.
20. Bristow A, Berger P, Bidart JM, Birken S, Norman R, Stenman UH, et al. IFCC working group on hCG: establishment, value assignment, and characterization of new WHO reference reagents for six molecular forms of human chorionic gonadotropin. *Clin Chem*, 2005;**51**:1177-82.
21. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
22. Cavallo A, Martin AC. Mapping SNPs to protein sequence and structure data. *Bioinformatics*, 2005;**21(8)**:1443-50.

23. Černý M, Skalák J, Cerna H, Brzobohatý B. Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *J Proteomics*, 2013;**92**:2-27.
24. Chandler K, Goldman R. Glycoprotein disease markers and single protein-omics. *Mol Cell Proteomics*, 2013;**12**(4):836-45.
25. Chandramouli K, Qian P-Y. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics*, 2009;**2009**:1-23.
26. Chen YJ, Inouye M. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr Opin Struct Biol*, 2008;**18**(6):765-70.
27. Cho SJ, Roman G, Yeboah F, Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. *Curr Med Chem*, 2007;**14**(15):1653-71.
28. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*, 1998;**8**(12):1229-31.
29. Cottrel JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*, 2011;**74**(10):1842-51.
30. Crimmins DL, Saylor M, Rush J, Thoma RS. Facile, in situ matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry analysis and assignment of disulfide pairings in heteropeptide molecules. *Anal Biochem*, 1995;**226**(2):355-61.
31. De Angelis G, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD, Shamel LB, Semjonow A. Twenty years of PSA: from prostate antigen to tumor marker. *Rev Urol*, 2007;**9**(3):113-23.
32. De Bock M, de Seny D, Meuwis MA, Chapelle JP, Louis E, Malaise M, et al. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol*, 2010;**2010**:1-15.
33. Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci*, 2006;**4**:15.
34. Deutzmann R. Structural characterization of proteins and peptides. *Methods Mol Med*, 2004;**94**:269-97.
35. Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2000;**11**(2):54-60.

36. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002;**82(1)**:47-95.
37. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol*, 2002;**3(11)**:991-8.
38. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 2004;**22**:329-60.
39. Durand G, Seta N. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem*, 2000;**46(6 Pt 1)**:795-805.
40. Dwek MV, Jenks A, Leatham AJ. A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. *Clin Chim Acta*, 2010;**411(23-24)**:1935-9.
41. Edwards NJ. Protein identification from tandem mass spectra by database searching. *Methods Mol Biol*, 2011;**694**:119-38.
42. Eklund EA, Freeze HH. The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes. *NeuroRx*, 2006;**3(2)**:254-63.
43. Ezkurdia I, Vázquez J, Valencia A, Tress M. Analyzing the first drafts of the human proteome. *J Proteome Res*, 2014;**13(8)**:3854-5.
44. Farajollahi S, Maas S. Molecular diversity through RNA editing: a balancing act. *Trends Genet*, 2010;**26(5)**:221-30.
45. Fillée C, Tombal B, Philippe M. Prostate cancer screening: clinical impact of WHO calibration of Beckman Coulter access prostate-specific antigen assays. *Clin Chem Lab Med*, 2010;**48**:285-8.
46. Giai M, Yu H, Roagna R, Ponzzone R, Katsaros D, Levesque MA, et al. Prostate-specific antigen in serum of women with breast cancer. *Br J Cancer*, 1995;**72(3)**:728-31.
47. Goč S, Janković M. Evaluation of molecular species of prostate-specific antigen complexed with immunoglobulin M in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Dis Markers*, 2013;**35(6)**:847-55.

48. Goč S, Kosanović M, Golubović S, Hajduković Lj, Janković M. Determination of prostate-specific antigen in serum and a reference material by on-chip immunoaffinity chromatography. *Anal Lett*, 2014;**47(18)**:2919-28.
49. Guilgunn S, Conroy PJ, Saldova R, Rudd PM, O'Kennedy RJ. Aberrant PSA glycosylation - a sweet predictor of prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 2013;**10(2)**:99-107.
50. Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM. Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys*, 1999;**362(1)**:38-45.
51. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. Some physicochemical characteristics of "seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. *Nihon Hoigaku Zasshi*, 1971;**25(4)**:322-4.
52. Haslam SM, North SJ, Dell A. Mass spectrometric analysis of N- and O-glycosylation of tissues and cells. *Curr Opin Struct Biol*, 2006;**16(5)**:584-91.
53. Hekal IA. Urinary prostate specific antigen, usefulness is still a matter of controversy. *Urol Ann*, 2013;**5(2)**:102.
54. Helmus Y, Denecke J, Yakubenia S, Robinson P, Lühn K, Watson DL, et al. Leukocyte adhesion deficiency II patients with a dual defect of the GDP-fucose transporter. *Blood*, 2006;**107(10)**:3959-66.
55. Henderson NA, Sreele RJC. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection. *Surgeon*, 2005;**6**:383-90.
56. Heuzé N, Olayat S, Gutman N, Zani ML, Courty Y. Molecular cloning and expression of an alternative hKLK3 transcript coding for a variant protein of prostate-specific antigen. *Cancer Res*, 1999;**59(12)**:2820-4.
57. Heuzé-Vourc'h N, Leblond V, Courty Y. Complex alternative splicing of the hKLK3 gene coding for the tumor marker PSA (prostate-specific-antigen). *Eur J Biochem*, 2003;**270(4)**:706-14.
58. Heuzé-Vourc'h N, Leblond V, Olayat S, Gauthier F, Courty Y. Characterization of PSA-RP2, a protein related to prostate-specific antigen and encoded by alternative hKLK3 transcripts. *Eur J Biochem*, 2001;**268(16)**:4408-13.

59. Heuzé-Vourc'h N, Leblond V, Olayat S, Gutman N, Arnold F, Courty Y. The hKLK3 gene coding for the tumour marker PSA (prostate-specific antigen) is a multiply spliced gene. *International Society for Preventive Oncology*, 2002.
60. Howarth DJ, Aronson IB, Diamandis EP. Immunohistochemical localization of prostate-specific antigen in benign and malignant breast tissues. *Br J Cancer*, 1997;**75(11)**:1646-51.
61. <http://ptmcode.embl.de/index.cgi>
62. <http://web.expasy.org/glycanmass>
63. http://web.expasy.org/peptide_mass
64. <http://www.antibodypedia.org>
65. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm309081.htm>
66. <http://www.genome.gov/12011238>
67. <http://www.humanproteommap.org>
68. <http://www.intechopen.com/books/genetic-disorders>
69. <http://www.peptideatlas.org>
70. <http://www.proteinatlas.org>
71. <http://www.proteomicsdb.org>
72. <http://www.srmatlas.org>
73. <http://www.thehpp.org/overview.php>
74. <http://www.uniprot.org/help/carbohyd>
75. <http://www.uniprot.org/uniprot/P07288>
76. <https://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods.html>
77. Huber PR, Schmid HP, Mattarelli G, Strittmatter B, van Steenbrugge GJ, Maurer A. Serum free prostate specific antigen: isoenzymes in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Prostate*, 1995;**27(4)**:212-9.
78. Hutchens TW, Yip T. New Desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macro molecules. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1993;**7**:576-80.

79. Hynek D, Krizkova S, Krejcova L, Gumulec J, Ryvolová M, Cernei N, et al. Femtogram electroanalytical detection of prostatic specific antigen by Brdicka reaction. *Int J Electrochem Sci*, 2012;**7**:1749-66.
80. Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull*, 2002;**25**(4):409-17.
81. Isono T, Tanaka T, Kageyama S, Yoshiki T. Structural diversity of cancer-related and non-cancer-related prostate-specific antigen. *Clin Chem*, 2002;**48**(12):2187-94.
82. Iwakiri J, Granbois K, Wehner N, Graves HC, Stamey T. An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol*, 1993;**149**(4):783-6.
83. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. *Ann N Y Acad Sci*, 2010;**1214**:190-8.
84. Janković M, Kosanović M, Hajduković-Dragojlović Lj, Golubović S. Development of immunoradiometric assay for quantitative determination of prostate-specific antigen. *Jugoslov Med Biochem*, 2005;**24**:129-34.
85. Janković M, Kosanović M, Milutinović B. Glycans as a target in the detection of reproductive tract cancers. *J Med Biochem*, 2008;**27**:1-13.
86. Janković M. Glycans as biomarkers: status and perspectives. *J Med Biochem*, 2011;**30**(3):213-23.
87. Janković MM, Kosanović MM. Glycosylation of urinary prostate-specific antigen in benign hyperplasia and cancer: assessment by lectin-binding patterns. *Clin Biochem*, 2005;**38**(1):58-65.
88. Jansen FH, van Schaik RH, Kurstjens J, Horninger W, Klocker H, Bektic J, et al. Prostate-specific antigen (PSA) isoform p2PSA in combination with total PSA and free PSA improves diagnostic accuracy in prostate cancer detection. *Eur Urol*, 2010;**57**(6):921-7.
89. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 2004;**8**(1):33-41.

90. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*, 2001;**293**(5532):1074-80.
91. Jung K, Reiche J, Boehme A, Stephan C, Loening SA, Schnorr D, et al. Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by two-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*, 2004;**50**(12):2292-301.
92. Jungblut PR, Holzhütter HG, Apweiler R, Schlüter H. The speciation of the proteome. *Chem Cent J*, 2008;**2**:16
93. Kalebic T, Verma M, Hanash S. Post-translational protein modification: novel technologies and implications for cancer prevention workshop. *Executive summary workshop organizers*, 2002.
94. Kiernan UA, Tubbs KA, Gruber K, Nedelkov D, Niederkofler EE, Williams P, et al. High-throughput protein characterization using mass spectrometric immunoassay. *Anal Biochem*, 2002;**301**(1):49-56.
95. Kim K-H, Seong BL. Peptide amidation: production of peptide hormones *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnol Bioproc E*, 2001;**6**(4):244-51.
96. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature*, 2014;**509**(7502):575-81.
97. Klyushnenkova EN, Ponniah S, Rodriguez A, Kodak J, Mann DL, Langerman A, et al. CD4 and CD8 T-lymphocyte recognition of prostate specific antigen in granulomatous prostatitis. *J Immunother*, 2004;**27**(2):136-46.
98. Kodak JA, Mann DL, Klyushnenkova EN, Alexander RB. Activation of innate immunity by prostate specific antigen (PSA). *Prostate*, 2006;**66**(15):1592-9.
99. Koomen JM, Haura EB, Bepler G, Sutphen R, Remily-Wood ER, Benson K, et al. Proteomic contributions to personalized cancer care. *Mol Cell Proteomics*, 2008;**7**(10):1780-94.
100. Kosanović M, Goč S, Potpara G, Janković M. On chip immuno-affinity profiling of cancer- and benign hyperplasia-associated free prostate specific antigen. *Dis Markers*, 2011;**31**(2):111-8.
101. Kosanović M, Janković M. Evaluation of the pattern of human serum glycoproteins in prostate cancer. *J Med Biochem*, 2009; **28**(3):184-90.

102. Krastins B, Prakash A, Sarracino DA, Nedelkov D, Niederkofler EE, Kiernan UA, et al. Rapid development of sensitive, high-throughput, quantitative and highly selective mass spectrometric targeted immunoassays for clinically important proteins in human plasma and serum. *Clin Biochem*, 2013;**46(6)**:399-410.
103. Krueger KE, Srivastava S. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. *Mol Cell Proteomics*, 2006;**5(10)**:1799-810.
104. Kuzmanov U, Kosanam H, Diamandis EP. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. *BMC Med*, 2013;**11**:31-45.
105. Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, Goetz JA, Dobrolecki LE, Sledge GW, et al. Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin Chem*, 2008;**54(7)**:1166-75.
106. Landry JR, Mager DL, Wilhelm BT. Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet*, 2003;**19(11)**:640-8.
107. Larsen MR, Trelle MB, Thingholm TE, Jensen ON. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *Biotechniques*, 2006;**40(6)**:790-8.
108. Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G, et al. Serum isoform [-2]proPSA derivatives significantly improve prediction of prostate cancer at initial biopsy in a total PSA range of 2-10 ng/ml: a multicentric European study. *Eur Urol*, 2013;**63(6)**:986-94.
109. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, 2006;**17(7)**:1807-19.
110. Legrain P, Aebersold R, Archakov A, Bairoch A, Bala K, Beretta L, et al. The human proteome project: current state and future direction. *Mol Cell Proteomics*. 2011;**10(7)**:M111.009993.
111. Li S, Iakoucheva LM, Mooney SD, Radivojac P. Loss of post-translational modification sites in disease. *Pac Symp Biocomput*, 2010:337-47.

112. Lilja H, Christensson A, Dahlén U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha1-antichymotrypsin. *Clin Chem*, 1991;**37**:1618-25.
113. Link RE, Shariat SF, Nguyen CV, Farr A, Weinberg AD, Morton RA, et al. Variation in prostate-specific antigen results from 2 different assay platforms: clinical impact on 2304 patients undergoing prostate cancer screening. *J Urol*, 2004;**171**:2234-8.
114. Linton HJ, Marks LS, Millar LS, Knott CL, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD. Benign prostate-specific antigen (BPSA) in serum is increased in benign prostate disease. *Clin Chem*, 2003;**49**(2):253-9.
115. Liu C. The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2011;**2011**:245821.
116. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Protein structure and function. Purifying, detecting, and characterizing proteins. In: *Molecular Cell Biology, 4th edition*. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.
117. López-Otín C, Diamandis EP. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr Rev*, 1998;**19**(4):365-96.
118. Lothrop AP, Torres MP, Fuchs SM. Deciphering post-translational modification codes. *FEBS Lett*, 2013;**587**(8):1247-57.
119. Lv J, Liu H, Su J, Wu X, Liu H, Li B, et al. DiseaseMeth: a human disease methylation database. *Nucl Acids Res*, 2011;1-6.
120. Maas S, Rich A, Nishikura K. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J Biol Chem*, 2003;**278**:1391-4.
121. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 2003;**21**:255-61.
122. Mann M, Ong SE, Grønborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol*, 2002;**20**(6):261-8.
123. Mannello F, Gazzanelli G. Prostate-specific antigen (PSA/hK3): a further player in the field of breast cancer diagnostics?. *Breast Cancer Res*, 2001;**3**:238-43.

124. Mattsson JM, Valmu L, Laakkonen P, Stenman UH, Koistinen H. Structural characterization and anti-angiogenic properties of prostate-specific antigen isoforms in seminal fluid. *Prostate*, 2008;**68(9)**:945-54.
125. Melegos DN, Diamandis EP. Diagnostic value of molecular forms of prostate-specific antigen for female breast cancer. *Clin Biochem*, 1996;**29(3)**:193-200.
126. Michalski JC. Normal and pathological catabolism of glycoproteins. Catabolic pathways. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H. *Glycoproteins and disease. New comprehensive biochemistry*. Amsterdam: Elsevier; 1996. pp. 55-98.
127. Mikolajczyk S, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS, et al. "BPSA," a specific molecular form of free prostate-specific antigen, is found predominantly in the transition zone of patients with nodular benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 2000;**55(1)**:41-5.
128. Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, Kumar A, Saedi MS, Payne JK, et al. A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res*, 2001;**61(18)**:6958-63.
129. Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. *Keio J Med*, 2003;**52(2)**:86-91.
130. Minguez P, Parca L, Diella F, Mende DR, Kumar R, Helmer-Citterich M, et al. Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. *Mol Syst Biol*, 2012;**8**:599.
131. Morelle W, Michalski J-C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols* 2, 2007;1585-602.
132. Nakayama Y, Nakamura N, Tsuji D, Itoh K, Kurosaka A. Genetic diseases associated with protein glycosylation disorders in mammals. In: Maria Puiu. *Genetic disorders*. InTech; 2013. pp. 243-69.
133. Nedelkov D, Phillips DA, Tubbs KA, Nelson RW. Investigation of human protein variants and their frequency in the general population. *Mol Cell Proteomics*, 2007;**6(7)**:1183-7.
134. Nelson RW, Borges CR. Mass spectrometric immunoassay revisited. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011;**22(6)**:960-8.

135. Neverova I, Van Eyk JE. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B*, 2005;**815**:51-63.
136. Niederkofler EE, Tubbs KA, Kiernan UA, Nedelkov D, Nelson RW. Novel mass spectrometric immunoassays for the rapid structural characterization of plasma apolipoproteins. *J Lipid Res*, 2003;**44**(3):630-9.
137. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 2010;**463**:457-63.
138. Nooren IM, Thornton JM. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J*, 2003;**22**(14):3486-92.
139. Okada T, Sato Y, Kobayashi N, Sumida K, Satomura S, Matsuura S, et al. Structural characteristics of the N-glycans of two isoforms of prostate-specific antigens purified from human seminal fluid. *Biochim Biophys Acta*, 2001;**1525**(1-2):149-60.
140. Pampalakis G, Scorilas A, Sotiropoulou G. Novel splice variants of prostate-specific antigen and applications in diagnosis of prostate cancer. *Clin Biochem*, 2008;**41**(7-8):591-7.
141. Pan S, Chen R, Aebersold R, Brentnall TA. Mass spectrometry based glycoproteomics--from a proteomics perspective. *Mol Cell Proteomics*, 2011;**10**(1):R110.003251.
142. Pannek J, Rittenhouse HG, Evans CL, Finlay JA, Bruzek DJ, Cox JL, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 (hK2) in urine are not clinically useful for early detection and staging of prostate cancer. *Urology*, 1997;**50**(5):715-21.
143. Parish DC. Prostate-specific antigen in the breast. *Endocr Relat Cancer*, 1998;**5**:223-9.
144. Park-Sarge OK, Sarge KD. Detection of sumoylated proteins. *Methods Mol Biol*, 2009;**464**:255-65.
145. Patrie SM, Roth MJ, Zhang J. Methods in molecular biology: mass spectrometry of glycoproteins. Top-down mass spectrometry for protein molecular diagnostics and biomarker discovery. In: *Proteomics and metabolomic approaches to biomarker discovery*: Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. pp 313-32.

146. Peltola MT, Niemelä P, Alanen K, Nurmi M, Lilja H, Pettersson KJ. Immunoassay for the discrimination of free prostate-specific antigen (fPSA) forms with internal cleavages at Lys₍₁₄₅₎ or Lys₍₁₄₆₎ from fPSA without internal cleavages at Lys₍₁₄₅₎ or Lys₍₁₄₆₎. *Immunol Method*, 2011;**369(1-2)**:74-80.
147. Peracaula R, Tabarés G, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, et al. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology*, 2003;**13(6)**:457-70.
148. Perler FB. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell*, 1998;**92(1)**:1-4.
149. Peter J, Unverzagt C, Hoesel W. Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical release from the complex with alpha(1)-antichymotrypsin (PSA-ACT). *Clin Chem*, 2000;**46(4)**:474-82.
150. Peter J, Unverzagt C, Krogh TN, Vorm O, Hoesel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Res*, 2001;**61(3)**:957-62.
151. Petković D, Bilić K, Ninković D, Cuk M, Fumić K, Barić I. Congenital disorders of glycosylation and project "Euroglycanet". *Lijec Vjesn*, 2007;**129(8-9)**:286-92.
152. Peyromaure M, Fulla Y, Debré B, Dinh-Xuan AT. Pro PSA: a "pro cancer" form of PSA?. *Med Hypotheses*, 2005;**64(1)**:92-5.
153. Piironen T, Villoutreix BO, Becker C, Hollingsworth K, Vihinen M, Bridon D, et al. Determination and analysis of antigenic epitopes of prostate specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) using synthetic peptides and computer modeling. *Protein Sci*, 1998;**(2)**:259-69.
154. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, et al. Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*, 1996;**86(1)**:21-34.
155. Prakash S, Robbins PW. Glycotyping of prostate specific antigen. *Glycobiology*, 2000;**10(2)**:173-6.
156. Quan L, Liu M. CID, ETD and HCD fragmentation to study protein post-translational modifications. *Mod Chem Appl*, 2013;**1(1)**:1-5.

157. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS*, 2004;**101(12)**:4003-8.
158. Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines DR. Reference reagents for prostate specific-antigen (PSA): Establishment of the first international standards for free PSA and PSA (90:10). *Clin Chem*, 2000;**46**:1310-7.
159. Ramel C. Mini- and microsatellites. *Environ Health Perspect*, 1997;**105(4)**:781-9.
160. Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1999;**1451(1)**:1-16.
161. Richard I. The genetic and molecular bases of monogenic disorders affecting proteolytic systems. *J Med Genet*, 2005;**42(7)**:529-39.
162. Robinson NE, Robinson AB. Deamidation of human proteins. *PNAS*, 2001;**98(22)**:12409-13.
163. Rodriguez-Murillo L, Salem RM. Insertion/deletion polymorphism. In: Gellman MD, Turner JR. *Encyclopedia of behavioral medicine*. New York: Springer; 2013.
164. Romanov VI, Whyard T, Adler HL, Waltzer WC, Zucker S. Prostate cancer cell adhesion to bone marrow endothelium: the role of prostate-specific antigen. *Cancer Res*, 2004;**64(6)**:2083-9.
165. Roth J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev*, 2002;**102(2)**:285-303.
166. Sarrats A, Comet J, Tabarés G, Ramírez M, Aleixandre RN, de Llorens R, et al. Differential percentage of serum prostate-specific antigen subforms suggests a new way to improve prostate cancer diagnosis. *Prostate*, 2010;**70(1)**:1-9.
167. Satterfield MB, Welch MJ. Comparison by LC-MS and MALDI-MS of prostate-specific antigen from five commercial sources with certified reference material 613. *Clin Biochem*, 2005;**38(2)**:166-74.
168. Schachter H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci*, 2001;**58(8)**:1085-104.

169. Schumacher MC, Resenberger U, Seidel RP, Becker CF, Winklhofer KF, Oesterhelt D, et al. Synthesis of a GPI anchor module suitable for protein post-translational modification. *Biopolymers*, 2010;**94(4)**:457-64.
170. Schweigert FJ. Characterisation of protein microheterogeneity and protein complexes using on-chip immunoaffinity purification-mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005;**(1)**:7-15.
171. Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, Meuer J. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip® technology in proteomics research. *Pathol Res Pract*, 2004;**200**:83-94.
172. Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol*, 2004;**37(1)**:35-44.
173. Sharon N, Lis H. Glycoproteins: structure and function. In: Gabius HJ, Gabius S. *Glycosciences: status and perspectives*. Weinheim, Germany: Chapman & Hall; 1997. pp. 133-62.
174. Shi Y, Xiang R, Horváth Cs, Wilkins JA. The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A*, 2004;**2053**:27-36.
175. Shibata K, Kajihara J, Kato K, Hirano K. Purification and characterization of prostate specific antigen from human urine. *Biochim Biophys Acta*, 1997;**1336(3)**:425-33.
176. Silva AMN, Vitorino R, Rosário M, Domingues M, Spickett CM, Domingues P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic Biol Med*, 2013;**65**:925-41.
177. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002;**12(4)**:43R-56R.
178. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
179. Starokadomskyy PL. Protein splicing. *Molecular Biology*, 2007;**41(2)**:278–93.

180. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P. Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol*, 1999a;**9(2)**:83-93.
181. Stenman UH, Paus E, Allard WJ, Andersson I, Andrès C, Barnett TR, et al. Summary report of the TD-3 workshop: characterization of 83 antibodies against prostate-specific antigen. *Tumour Biol*, 1999b;**20(1)**:1-12.
182. Stephan C, Bangma C, Vignati G, Bartsch G, Lein M, Jung K, et al. 20–25% lower concentrations of total and free prostate-specific antigen (PSA) after calibration of PSA assays to the WHO reference materials-analysis of 1098 patients in four centers. *Int J Biol Mark* 2009b;**24**:65-9.
183. Stephan C, Rittenhouse H, Cammann H, Lein M, Schrader M, Deger S, et al. New markers and multivariate models for prostate cancer detection. *Anticancer Res*, 2009a;**29(7)**:2589-600.
184. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000;**403**:41-5.
185. Sturgeon CM, Diamandis EP. Mass spectrometry in cancer diagnostics. In: *Use of tumor markers in clinical practice: quality requirements*. Washington (DC): National Academy of Clinical Biochemistry; 2009. pp. 17-20.
186. Sumi S, Arai K, Yoshida K. Separation methods applicable to prostate cancer diagnosis and monitoring therapy. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001;**764(1-2)**:445-55.
187. Tabarés G, Jung K, Reiche J, Stephan C, Lein M, Peracaula R, et al. Free PSA forms in prostatic tissue and sera of prostate cancer patients: analysis by 2-DE and western blotting of immunopurified samples. *Clin Biochem*, 2007;**40(5-6)**:343-50.
188. Tajiri M, Ohyama C, Wada Y. Oligosaccharide profiles of the prostate-specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach. *Glycobiology*, 2008;**18(1)**:2-8.
189. Takayama TK, Carter CA, Deng T. Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry*, 2001;**40(6)**:1679-87.

190. Tanaka T, Isono T, Yoshiki T, Yuasa T, Okada Y. A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing. *Cancer Res*, 2000;**60(1)**:56-9.
191. Taylor D, Drickammer C. *Introduction to glycobiology, 2nd edition*. Oxford University Press; 2003.
192. Tejaswita MK, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids*, 2011;**2011**:1-13.
193. Trougakos IP, Sesti F, Tsakiri E, Gorgoulis VG. Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J Proteomics*, 2013;**92**:274-98.
194. Tsakiri EN, Iliaki KK, Höhn A, Grimm S, Papassideri IS, Grune T, et al. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med*, 2013;**65**:1155-63.
195. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*, 2001;**56**:1-21.
196. Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation changes in cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
197. Végvári Á, Rezeli M, Sihlbom C, Häkkinen J, Carlsohn E, Malm J, et al. Molecular microheterogeneity of prostate specific antigen in seminal fluid by mass spectrometry. *Clin Biochem*, 2012;**45(4-5)**:331-8.
198. Vermassen T, Speeckaert MM, Lumen N, Rottey S, Delanghe JR. Glycosylation of prostate-specific antigen and its potential diagnostic applications. *Clin Chim Acta*, 2012;**413(19-20)**:1500-5.
199. Vermassen T, Van Praet C, Vanderschaeghe D, Maenhout T, Lumen N, Callewaert N, et al. Capillary electrophoresis of urinary prostate glycoproteins assists in the diagnosis of prostate cancer. *Electrophoresis*, 2014;**35(7)**:1017-24.

200. Vignati G, Giovanelli L. Standardization of PSA measures: a reappraisal and an experience with WHO calibration of Beckman Coulter Access Hybritech total and free PSA. *Int J Biol Markers*, 2007;**22(4)**:295-301.
201. Vollmers HP, Brändlein S. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol*, 2006;**21**:1355-66.
202. Walsh C. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. Englewood, Colo: Roberts and Co. Publishers; 2006.
203. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005;**44(45)**:7342-72.
204. Wandall HH, Tarp MA. Therapeutic cancer vaccines: clinical trials and applications. In: Guo Z, Boons GJ. *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies*. Hoboken NJ: JohnWiley & Sons; 2009. pp. 333–66.
205. Wang D. N-glycan cryptic antigens as active immunological targets in prostate cancer patients. *J Proteomics Bioinform*, 2012;**5**:90-5.
206. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 1979;**17(2)**:159-63.
207. Wang Z, Moulton J. SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat*, 2001;**7(4)**:263-70.
208. Weiß F, van den Berg BH, Planatscher H, Pynn CJ, Joos TO, Poetz O. Catch and measure-mass spectrometry-based immunoassays in biomarker research. *Biochim Biophys Acta*, 2014;**1844(5)**:927-32.
209. White KY, Rodemich L, Nyalwidhe JO, Comunale MA, Clements MA, Lance RS, et al. Glycomic characterization of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in prostate cancer and benign disease seminal plasma fluids. *J Proteome Res*, 2009;**8(2)**:620-30.
210. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Lieberenz M, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 2014;**509(7502)**:582-7.
211. Williams CA, Grabar P. Immunoelectrophoretic studies on serum proteins. III. Human gamma globulin. *J Immunol*, 1955;**74(6)**:404-10.

212. Witze ES, Old WM, Resing KA, Ahn NG. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, 2007;**4(10)**:798-806.
213. Wu P, Koistinen H, Finne P, Zhang WM, Zhu L, Leinonen J, et al. Advances in prostate-specific antigen testing. *Adv Clin Chem*, 2006;**41**:231-62.
214. Yates JR. A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nat Methods*, 2011;**8**:633-7.
215. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev*, 2001;**22(2)**:184-204.
216. Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Giai M, Roagna R, Ponzzone R, et al. Prostate-specific antigen in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, 1996;**40(2)**:171-8.
217. Yu H, Diamandis EP, Sutherland DJ. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem*, 1994;**27(2)**:75-9.
218. Yu H, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem*, 1995;**41(1)**:54-8.
219. Yu H, Giai M, Diamandis EP, Katsaros D, Sutherland DJ, Levesque MA, et al. Prostate-specific antigen is a new favorable prognostic indicator for women with breast cancer. *Cancer Res*, 1995;**55(10)**:2104-10.
220. Zani D, Costa S, Beneduce L, Fassina G, Simeone C, Cosciani Cunico S. Immunity and cancer: the role of PSA-IgM immune complexes for prostate cancer. *Urologia*, 2010;**77(1)**:1-3.
221. Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, et al. Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2002;**1(7)**:500-8.
222. Zhang MZ, Lu YP. From pro-prostate specific antigen, [-2]pro-prostate specific antigen to Beckman Coulter phi: the evolution of new biomarkers for early detection of prostatic carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, 2012;**125(9)**:1643-9.
223. Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH. Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. *Clin Chem*, 1995;**41(11)**:1567-73.

224. Zhang X, Wei D, Yap Y, Li L, Guo S, Chen F. Mass spectrometry-based "omics" technologies in cancer diagnostics. *Mass Spectrom Rev*, 2007;**26(3)**:403-31.
225. Zipsera B, Bello-DeOcampob D, Diestelc S, Mei-Hui T, Schmitzc B. Mannitou monoclonal antibody uniquely recognizes paucimannose, a marker for human cancer, stemness, and inflammation. *J Carbohyd Chem*, 2012;**31**:4-6.

Biografija



Sanja R. Goč je rođena 14.07.1984. godine u Novom Sadu. Diplomirala je 2008. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Departman za hemiju, sa prosečnom ocenom 9,73. Diplomski rad pod nazivom “Sinteza i karakterizacija kompleksa bakra (II) sa piridoksalaminogvanidinom” je uradila na Katedri za opštu i neorgansku hemiju. Iste godine je upisala master studije biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Departman za hemiju, a 2010. godine je odbranila master rad pod nazivom “Hemijska karakterizacija odabranih vrsta roda *Allium L.* (sect. *Codonoprasum*)” koji je uradila na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, upisala je 2010. godine. Od juna 2010. godine je zaposlena u Institutu za primenu nuklearne energije, INEP, na Odeljenju za imunochemiju i glikobiologiju, a u zvanje istraživač-saradnik je izabrana 2011.

Od 2010-2011. godine je učestvovala na projektu B143048 “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 je angažovana na projektu 173010 “Strukturna heterogenost i efekti kompleksih ugljenih hidrata (glikana) kao ključnih komponenti molekularnog raspoznavanja u biološkim sistemima” koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Eksperimentalan deo doktorske disertacije uradila je u Institutu za primenu nuklearne energije, INEP na Odeljenju za imunochemiju i glikobiologiju, pod rukovodstvom dr Miroslave Janković, naučnog savetnika INEP-a.

Do sada je objavila tri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja:

Kosanović M, **Goč S**, Potpara G, Janković M. On chip immuno-affinity profiling of cancer- and benign hyperplasia-associated free prostate specific antigen. *Disease Markers*, 2011;**31**(2):111-18.

Goč S, Janković M. Evaluation of molecular species of prostate-specific antigen complexed with immunoglobulin M in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Disease Markers*, 2013;**35(6)**:847-55.

Goč S, Kosanović M, Golubović S, Hajduković Lj, Janković M. Determination of prostate-specific antigen in serum and a reference material by on-chip immunoaffinity chromatography. *Analytical Letters*, 2014;**47(18)**:2919-28.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сања Р. Гоч

број индекса Б3047/2010

Изјављујем

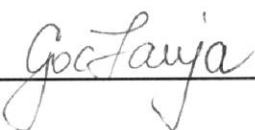
да је докторска дисертација под насловом

„ Карактеризација молекулских врста специфичног антигена простате човека
применом имуноафинитетне хроматографије на чипу “

- 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 докторанда

У Београду, 30.4.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Р. Гоч

Број индекса Б3047/2010

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада “Карактеризација молекулских врста специфичног антигена простате човека применом имуноафинитетне хроматографије на чипу“

Ментори Др Бато Кораћ, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Др Мирослава Јанковић, научни саветник, Универзитет у Београду-Институт за примену нуклеарне енергије-ИНЕП

Потписани/а Сања Р. Гоч

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 докторанда

У Београду, 30.4.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Карактеризација молекулских врста специфичног антигена простате човека

применом имуноафинитетне хроматографије на чипу“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

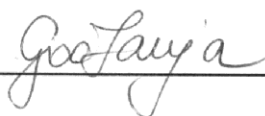
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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 докторанда

У Београду, 30.4.2015.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.