

Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora poli (ADP-ribozil) polimeraze-1 na stanične linije neuroblastoma

Grubar, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:528738>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Grubar

**Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora poli (ADP-ribozil)
polimeraze-1 na stanične linije neuroblastoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Matulić, na ukazanom povjerenju, bezuvjetnoj podršci i prenesenom znanju i vještinama. Svojom pristupačnošću, savjetima i razumijevanjem učinila je rad u labosu ugodnim i vrijednim iskustvom.

Najljepše hvala Luki i Josipu na pomoći, korisnim savjetima i odličnoj radnoj atmosferi

Također, hvala mojim supatnicima s računalnog modula, Anji, Dunji, Frani i Nebojši na svom optimizmu, smijehu i društvu u menzi. Vi ste mi otkrili da ipak mogu potrošiti sve minute na mobitelu.

Hvala mojoj ekipi, Josipi, Juliji i Marijani na odličnim izlascima, groznim vicevima, vrijednim uspomenama i vjeri u moje sposobnosti, kada je ja nisam imala.

Hvala Mirti, Luki i Paoli na prijateljstvu kroz sve ove godine.

Također, hvala svim ostalim prijateljima na svojoj podršci, zabavi i lijepim uspomenama.

Posebno hvala mojoj obitelji, koja mi je dala snage, kad ju ja nisam imala. Vi ste moja stijena.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora poli (ADP-ribozil) polimeraze-1 na stanične linije neuroblastoma

Martina Grubar

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proces diferencijacije obrnuto je razmjeran staničnom proliferacijskom potencijalu. Kao posljedica te pojave, jedan od mehanizama tumorigeneze je upravo zaustavljanje diferencijacijskih procesa. Pojedine tumorske stanične linije u kulturi mogu se diferencirati, a jedna od tvari koja može potaknuti te procese je retinoična kiselina. U ovom radu diferencijacija se pratila na modelu stanica neuroblastoma koje su se obrađivale retinoičnom kiselinom kroz duži vremenski period. Dok je linija neuroblastoma SH-SY5Y imala sposobnost diferencijacije, druga, neuroglioblastomska linija H4, nije pokazivala morfološke promjene tijekom tretmana. Stanice su se tretirale retinoičnom kiselinom uz i bez prisustva inhibitora poli (ADP-ribozil) polimeraze (PARP-1), enzima koji sudjeluje u procesima remodeliranja kromatina. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj inhibicije PARP-1 na diferencijaciju induciranu retinoičnom kiselinom kod stanica SH-SY5Y te analizirati utjecaj retinoične kiseline i PARP-1 na liniju H4. Mjerenjem proliferacije stanica, duljine neurita i analizom ekspresije gena uključenih u diferencijaciju pokazano je da PARP-1 ne utječe na proces diferencijacije stanica SH-SY5Y. Kod linije H4 utvrđeno je da retinoična kiselina povećava aktivnost urokinaze, enzima uključenog u epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT), dok inhibicija PARP-1 nema utjecaj na njenu aktivnost. Međutim, inhibicija PARP-1 povećala je ekspresiju gena elemenata urokinaznog sustava i signalnog puta TGF- β te krovni transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). Stoga se može zaključiti da bi PARP-1 mogao sudjelovati u procesima reprogramiranja kod stanične linije neuroglioblastoma.

(53 stranice, 12 slika, 5 tablica, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Neuroblastom, retinoična kiselina, PARP-1, diferencijacija, epitelno-mezenhimska tranzicija

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
Suvoditelj rada: mag. mol. biol. Luka Horvat

Ocjenitelji: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
dr. sc. Zlatko Liber, prof.
dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Rad prihvaćen: 4. svibnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Effect of retinoic acid and poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor on neuroblastoma cell lines

Martina Grubar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Differentiation is inversely proportional to cellular proliferation potential. Consequently, one of the mechanisms of tumorigenesis is differentiation arrest. Some tumor cell lines can be differentiated in the cell culture and one of the agents that can induce differentiation is retinoic acid. In this thesis, processes of differentiation were examined on neuroblastoma cell model, which was treated with retinoic acid for a longer period. While neuroblastoma SH-SY5Y cell line was able to differentiate, the other, neuroglioblastoma H4 line, did not show morphological changes during treatment. Cells were treated with retinoic acid in the presence or absence of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) inhibitor, inhibitor of an enzyme that facilitates chromatin remodeling. The aim of this study was to determine the effect of PARP-1 inhibition on retinoic acid induced differentiation of SH-SY5Y cells and analyze the effect of retinoic acid and PARP-1 on H4 line. By measuring cell proliferation, neurite length and by analysis of gene expression involved in differentiation, it was shown that PARP-1 had no effect on SH-SY5Y differentiation. In H4 line it was found that retinoic acid induced urokinase activity. Urokinase is a plasminogen activator, an enzyme which could be involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT). PARP-1 inhibition had no effect on the enzyme activity. However, PARP-1 inhibition increased the expression of urokinase system and TGF- β signaling pathway components' genes, as well as EMT master transcription factors' genes. Therefore, it can be concluded that PARP-1 could take part in reprogramming neuroglioblastoma cell line.

(53 pages, 12 figures, 5 tables, 96 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: Neuroblastoma, retinoic acid, PARP-1, differentiation, epithelial-mesenchymal transition

Supervisor: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Co-supervisor: dipl. ing. mol. biol. Luka Horvat

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Zlatko Liber, Prof.

Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Thesis accepted: May 4, 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Diferencijacija	1
1.1.1. Zaustavljanje diferencijacije kao mehanizam za nastanka tumora	2
1.1.2. Diferencijacijske terapije.....	3
1.1.3. Retinoična kiselina	4
1.1.4. Neuroblastom	5
1.2. Epitelno-mezenhimski tranzicija	5
1.2.1. Sustav aktivacije plazminogena	7
1.3. Poli (ADP) ribozil polimeraza.....	9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Stanične linije.....	13
3.1.2. Otopine i reagensi.....	13
3.1.3. Uređaji	15
3.1.4. Laboratorijsko posuđe i plastika	15
3.2. Metode.....	16
3.2.1. Rad sa stanicama u kulturi	16
3.2.2. Odmrzavanje stanica	16
3.2.3. Određivanje broja stanica.....	16
3.2.4. Presađivanje stanica i tretiranje retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1	17
3.2.5. Praćenje staničnog rasta bojanjem kristal violetom	17
3.2.6. Mjerenje duljine neurita stanica SH-SY5Y	18
3.2.7. Određivanje aktivnosti urokinaznog plazminogenog aktivatora metodom radijalne kazeinolize.....	18
3.2.8. Izolacija i provjera kvalitete RNA.....	19
3.2.9. Reverzna transkripcija RNA u cDNA	21
3.2.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	21
3.2.11. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR).....	23
3.2.12. Statistička analiza	25
4. REZULTATI.....	27
4.1. Utjecaj retinoične inhibitora PARP-1 na diferencijaciju stanica neuroblastoma SH-SY5Y	27

4.1.1. Krivulja rasta stanica SH-SY5Y nakon obrade retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1.....	27
4.1.2. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na duljine neurita stanica SH-SY5Y	28
4.1.3. Semikvantitativna analiza ekspresije gena od interesa u stanicama SH-SY5Y uslijed tretmana s retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1	30
4.2. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na stanice neuroglioblastoma H4	32
4.2.1. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na aktivnost uPA	32
4.2.2. Semikvantitativna i kvantitativna analiza ekspresije gena od interesa u stanicama H4 tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1	34
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČAK	45
7. POPIS LITERATURE	46

1. UVOD

1.1. Diferencijacija

Ljudsko tijelo sadrži preko 10 milijardi stanica (od toga 200-tinjak fenotipski i funkcionalno različitih tipova) koje su potekle iz oplođene jajne stanice te stoga dijele isti genom (Alberts i sur. 2008; Gartner i Hiatt 2012; Chen i Dent 2013.). Proces kojim se stanice s identičnom genetičkom informacijom specijaliziraju kako bi izvršavale različite funkcije naziva se diferencijacija (Pecorino, 2012). Diferencijaciju karakterizira internalizacija vanjskih signala, koja se očituje kroz promjene u ekspresiji gena, organizaciji regulatornih transkripcijskih mreža i epigenetskih potpisa. Transkripcijski faktori su ključni igrači u odgovoru stanica na okolišne signale, a smatra se da su uključeni u svaki aspekt diferencijacije. Naime oni su zaduženi za inicijaciju epigenetskih promjena i usmjerenje loze (engl. *lineage commitment*). Epigenetske modifikacije prilikom diferencijacije uzrokuju prijelaz kromatina iz otvorene u kompaktniju konfiguraciju i obrnuto, čime se mijenja dostupnost genoma transkripcijskoj mašineriji, a time i ekspresija gena. Neke od epigenetskih promjena koje se događaju prilikom usmjerenja stanica ka specifičnoj ulozi su post-translacijske modifikacije histona (npr. metilacija, acetilacija i fosforilacija), modifikacije DNA (npr. metilacija i hidroksimetilacija citozina), pojava histonskih varijanti te djelovanje remodelatora koje mijenja raspored histona (Armstrong i sur. 2013; Chen i Dent 2013).

Procesi diferencijacije kod viših eukariota započinju između stadija morule i rane blastociste. Totipotentne blastomere koje se nalaze na vanjskoj strani morule postaju stanice trofoblasta, a one koje se nalaze u unutrašnjosti morule diferenciraju u unutarnji sloj stanice (engl. *inner cell mass*). Stanice unutarnjeg sloja blastociste su za razliku od blastomera pluripotentne. To znači da mogu diferencirati u mnoge, ali ne sve stanice (ne mogu tvoriti ekstra-embrionalne strukture). Iz pluripotentnih stanica unutarnjeg sloja potječu embrionalne matične stanice (engl. *embryonal stem cells*, ESC). ESC se *in vitro* mogu diferencirati u sve stanice i tkiva embrija te su zbog toga ključni model za razumijevanje ranih stadija razvoja i diferencijacije (Armstrong i sur. 2013; Keller 2005).

Diferencijacija nije ograničena samo na embrionalni razvoj. Matične stanice nalaze i u odraslom organizmu (npr. u folikulu dlake i koštanoj srži). Takve stanice su multipotentne, što znači da mogu diferencirati samo u stanice određenih tkiva. Matične stanice imaju ulogu u održavanju, proizvodnji i zamjeni diferenciranih stanica uslijed ozlijede ili pri fiziološkim uvjetima (Korblin i Estrov 2003; Pecorino 2012). Također diferencijacija nije nužno proces

ograničen na matične stanice. Tako na primjer fibroblasti, mezenhimske stanice potekle iz embrionalnog mezoderma, nisu terminalno diferencirane te stoga mogu proliferirati i diferencirati nakon ozljede tkiva (Kendall i Feghali-Bostwick 2014).

1.1.1. Zaustavljanje diferencijacije kao mehanizam za nastanka tumora

Uspostavljanje ravnoteže između diferencijacije i proliferacije važan je aspekt razvoja, ali i održavanja homeostaze u odraslom organizmu. Ključne karakteristike matičnih stanica su samoobnavljanje, odnosno mogućnost diobe uz zadržavanje nediferenciranog stanja te sposobnost diferencijacije u različite tipove stanica (Pecorino, 2012.). Ta dva procesa strogo su regulirana dvjema skupinama gena: proto-onkogenima i tumor supresorima. Proto-onkogeni potiču staničnu proliferaciju, a u slučaju matičnih stanica zaslužni su za održavanje njihove stalne zalihe u odraslom organizmu. Tumor supresori pak inhibiraju proliferaciju stanica te potiču staničnu diferencijaciju, starenje i smrt (Pardal i sur. 2005; Solozobova i Blattner 2011). Narušavanje odnosa između tih skupina gena u korist proto-onkogenata rezultira nekontroliranom staničnom proliferacijom i zastojem u diferencijaciji.

Tumorske stanice dijele brojne karakteristike s matičnim stanicama: sposobnost samoobnavljanja, migracije, diferencijacije, izbjegavanje apoptoze, ekspresije gena za telomerazu i povećanje aktivnosti membranskih transporterskih proteina. Ta saznanja dovela su do razvoja teorije o nastanku tumora iz matičnih stanica (Wicha i sur. 2006). Matične stanice su dugoživuće, stoga postoji veliki vremenski okvir u kojem se mogu akumulirati mutacije koje uzrokuju gubitak kontrole nad staničnom proliferacijom, a time i nastanak tumora. Druga teorija tvrdi da je jedan od mehanizama nastanka tumora ponovno aktiviranje programa samoobnavljanja odnosno dediferencijacije u diferenciranim stanicama (Pecorino 2012). Otkriće tumorskih matičnih stanica u nekim tipovima tumora potvrđuje spomenute teorije.

Tumorske matične stanice (engl. *cancer stem cells*, CSC) su mala populacija stanica unutar malignih čvrstih tumora koja je zaslužna za inicijaciju, održavanje i metastaziranje tumora (Dragu i sur. 2015). Osim što iniciraju tumore, zahvaljujući sposobnosti aberantne diferencijacije u razne tipove stanica, uzrok su heterogenosti tumora (Wicha i sur. 2006). Uz prethodno spomenute karakteristike matičnih stanica, tumorske matične stanice posjeduju površinske biljege matičnih stanica. Singh i suradnici (2004) su pokazali da ljudske tumorske matične stanice tumora mozga ekspimiraju biljeg neuralnih matičnih stanica CD133. Ekspresija površinskih biljega ovisi o tipu tumora, a osim CD133+ tumorskih matičnih stanice,

pronađene su i one koje među ostalim ekspimiraju CD44, α_6 i β_1 integrin (Wicha i sur. 2006). U tumorskim stanicama također dolazi do poremećaja u regulaciji signalnih puteva koji u normalnih matičnim stanicama reguliraju diferencijaciju i samoobnavljanje. Neki od spomenutih signalnih puteva su Notch, Hedgehog, Wnt/ β -katenin, NF κ B, PTEN i fosfositilinozitol-3-kinazni (PI3K) put (Dragu i sur. 2015).

Stupanj diferencijacije tumora uvelike je povezan s njihovim ponašanjem te je stoga važan prognostički faktor pri histopatološkoj klasifikaciji čvrstih tumora. Manje diferencirani tumori pokazali su se značajno agresivnijim, dakle sklonijim metastaziranju i gubitku strukturne organizacije. Otkriće tumorskih matičnih stanica i napredak u razumijevanju diferencijacijskih procesa u tumorskim stanicama dovela su do razvoja terapija koje bi dovele do povećanja stupnja diferencijacije i zaustavio rast tumora (Jögi i sur. 2012; Sachs 1978).

1.1.2. Diferencijacijske terapije

Klasične protutumorske terapije, radio- i kemo -terapija različitim mehanizmima izazivaju apoptozu proliferirajućih stanica. Budući da tumorske stanice nisu jedine u ljudskom organizmu koje se aktivno dijele, spomenute terapije su iznimno neselektivne. Hematopoetske stanice, stanice epitela probavnog sustava i folikula dlake posebno su pogođene takvim tretmanima. Kao posljedica toga pojavljuju se brojne popratne pojave, među ostalim anemija, čir na želucu i alopecija (Pecorino, 2012). Drugi nedostatak konvencionalnih terapija je moguć povratak tumora nakon tretmana. Tumori obično sadrže genotipski i fenotipski heterogenu populaciju stanica koje različito odgovaraju na kemo- i radio- terapiju. Jedan od razloga relapsa je otpornost prethodno spomenutih tumorskih matičnih stanica na tretman. Stoga je iznimno bitno razviti terapije koje bi uz stanice tumora koje pokazuju pojedine markere diferencijacije ciljale i CSC (Dragu i sur. 2015).

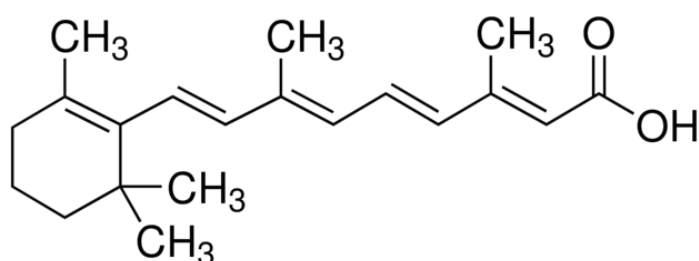
Jedan od mogućih pristupa liječenju tumora, uz manje popratnih pojava i manje prilike za relaps bolesti je diferencijacijska terapija. Diferencijacijska terapija temelji se na pretpostavci da tumor nastaje zastojem u diferencijaciji matičnih stanica ili dediferencijacijom već diferenciranih stanica (Yan i Liu 2016). Diferencijacijski lijekovi reprogramiraju tumorske stanice, aktiviraju diferencijacijske programe transkripcije, inhibiraju proliferaciju, mogu izazvati starenje i apoptozu (Leszczyniecka i sur. 2001; Sell 2005). Neki od spojeva istraženih u kontekstu diferencijacije su inhibitori signalnih puteva, tirozin-kinaza, histonskih deacetilaza, onkogenih mikroRNA (miRNA) te retinoična kiselina.

U ovom radu je za diferencijaciju neuroblastomskih staničnih linija korištena retinoična kiselina.

1.1.3. Retinoična kiselina

Retinoična kiselina, derivat retinola (vitamin A), igra ključnu ulogu u procesima embrionalnog razvoja, razmnožavanja, stanične proliferacije i diferencijacije (Marill i sur. 2003). Steroidne je prirode te stoga kroz staničnu i jezgrinu membranu prolazi procesom slobodne difuzije (Hansen i sur. 2000).

Retinoična kiselina je ligand dvama obiteljima jezgrinih receptora: RAR i RXR. Ti receptori pripadaju skupini jezgrinih hormonskih receptora te djeluju kao transkripcijski faktori ovisni o ligandima. Retinoidni receptori (RAR) posjeduju 3 izotipa (RAR α , RAR β i RAR γ) te vežu sve-trans retinoičnu kiselinu (engl. *all-trans retinoic acid*, ATRA) (Slika 1) i stereoizomere 9-*cis*-RA i 13-*cis*-RA. Retinoidni x receptori također posjeduju 3 izoforme (RXR α , RXR β i RXR γ), ali vežu jedino 9-*cis*-RA (Marill i sur. 2003). RAR i RXR dimeriziraju čineći heteordimer RAR/RXR koji se pokazao najaktivnijim receptorom u skupini (Sun i sur. 2000). U prisustvu retinoične kiseline heterodimer RAR/RXR veže se na specifične sekvence DNA u promotorima ciljnih gena i regulira transkripciju. Te sekvence zovu se elementi odgovora retinoične kiseline (engl. *retinoic acid response element*, RARE) (Mehta 2003). Ukoliko retinoična kiselina nije prisutna u stanici, promotori gena od interesa su utišani deacetilacijom histona (Marill i sur. 2003).



Slika 1. Strukturna formula sve-trans retinoične kiseline. Preuzeto s <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02190269>.

Pokazano je da retinoična kiselina kod nekih tumora aktivira procese diferencijacije. Jedan od najpoznatijih primjera kliničke upotrebe retinoične kiseline je primjena diferencijacijske terapije kod pacijenata oboljelih od akutne promijelocitne leukemije (APL).

Retinoična kiselina potiče diferencijaciju leukemijskih stanica u granulocite te uz kombinaciju s kemoterapijom rezultira remisijom i 80% preživljenjem nakon 5 godina (Tang i Gudas 2011; Pecorino 2012).

1.1.4. Neuroblastom

Neuroblastom je najčešći solidni ekstrakranijalni tumor kod djece. Sadrži heterogenu populaciju stanica koje su potekle od pluripotentnih prekursorskih stanica neuralnog grebena, usmjerenih ka razvoju u stanice simpatičkog živčanog sustava (Mazzocoli i sur. 2016).

Stanične linije neuroblastoma diferencirane retinoičnom kiselinom ustaljen su model za istraživanja u području neuroznanosti. Dugotrajnim tretmanom retinoičnom kiselinom stanice poprimaju značajke neurona: rast neurita, morfološke i biokemijske karakteristike (Agholme i sur. 2010; Cheung i sur. 2009, Abemayor i Sidell 1989). Zato su se pokazale iznimno korisnim za istraživanja neurodegenerativnih bolesti (npr. Alzheimerove i Parkinsonove bolesti), neurotoksičnosti određenih spojeva i ishemije (Cheung i sur. 2009; Xicoy i sur. 2017).

Trenutno se 13-*cis*-retinoična kiselina koristi u terapiji kod pacijenata oboljelih od neuroblastoma visokog rizika. Ona se primjenjuje kao terapija održavanja kod pacijenata s minimalnom rezidualnom bolesti. Ipak, kod više od polovice broja pacijenata, čak i prilikom tretmana retinoičnom kiselinom, dolazi do relapsa bolesti (Almeida i sur. 2016).

1.2. Epitelno-mezenhimska tranzicija

Epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) je zajednički naziv za skup promjena kojim epitelne stanice stječu fenotip mezenhimskih. Uključena je u procese embrionalnog razvoja, zacjeljivanja rana te patološke promjene kao što su fibroza i metastaziranje tumorskih stanica. Prilikom EMT-a dolazi do promjena u međustaničnim interakcijama i interakcijama stanica s ekstracelularnim matriksom (engl. *extracellular matrix*, EMC) čime epitelne stanice gube kontakt s okolnim tkivom. Neke od spomenutih promjena su gubitak stanične polarnosti, pričvrtnih veza (engl. *adherens junctions*), komunikacijskih spojeva (engl. *tight junctions*) i dezmosoma. Mobilnost stanica omogućena je reorganizacijom citoskeleta putem kinaza Rho. Stanice gube citokeratinske intermedijarne filamente u korist nastanka F-aktinskih stresnih vlakana te lamelopodija i filopodija. Stanice mezenhimske fenotipa imaju povećanu sposobnost migracije,

metastaziranja i izbjegavanja apoptoze (Kalluri i Neilson 2003; Kalluri i Weinberg 2009). Mezenhimske stanice također proizvode komponente ECM-a te ga mogu organizirati i remodelirati uz pomoć matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP) (Radisky 2005). EMT sudjeluje u različitim biološkim procesima.

Jedan oblik epitelno-mezenhimske tranzicije sudjeluje u procesu implantacije embrija, embriogenezi i organogenezi. Prilikom implantacije, stanice trofoektoderma prolaze kroz EMT kako bi omogućile usidrenje embrija u endometriju maternice. Epitelne stanice primitivnog tračka u epiblastu također poprimaju svojstva mezenhimskih stanica, a njihovom migracijom započinje proces gastrulacije i nastanka triju zametnih listića. Ovakav oblik EMT ne uzrokuje nastanak fibroza niti invazivnog fenotipa.

Drugi oblik EMT-a uključen je u proces regeneracije tkiva, zacjeljivanje rana i fibrozu organa. Program je aktiviran ozljedom, nakon čega dolazi do dediferencijacije epitelnih stanica u fibroblaste i druge srodne stanice kako bi se rekonstruiralo ozlijeđeno tkivo. Nakon što se upala smiri, EMT se zaustavlja. Ukoliko proces upale traje duže od normalnog, zacjeljivanje rane dovodi do patološke promjene, fibroze i može dovesti do gubitka funkcije organa.

Treći oblik EMT-a povezan je s napredovanjem tumora i njihovim metastaziranjem. Javlja se u neoplastičnim stanicama kod kojih se zbog genetskih i epigenetskih promjena izgubi kontrola nad staničnom proliferacijom. Te stanice, nakon aktiviranja EMT-a sposobne su razgraditi bazalnu membranu te završiti u krvotoku što omogućuje nastanak metastaza podalje od primarnog tumora (Kalluri i Weinberg 2009).

Kod sva tri oblika EMT-a događaju se slične biokemijske promjene i promjene u ekspresiji gena. Proces dediferencijacije potaknut je krovnim transkripcijskim faktorima karakterističnim za mezenhimske stanice, poput SNAIL-a, ZEB-a, Twist-a i Slug-a. Ti transkripcijski faktori vrše represiju gena asociраних s epitelnim stanicama, poput gena za proteine čvrstih i adhezijskih veza (okludin, kladin, E-kadherin i dr.). Štoviše oni istovremeno aktiviraju gene karakteristične za mezenhim kao što su geni sustava MMP i geni za proteine ECM-a (fibronektin, vitronektin i kolagen). Reprogramiranje ekspresije gena tijekom EMT-a regulirano je i vanjskim signalima koji aktiviraju signalne puteve, među ostalim TGF- β , Wnt, i Notch. Transformirajući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β) preko unutarstaničnih efektorskih proteina obitelji SMAD aktivira i povećava ekspresiju krovnih transkripcijskih faktora (Lamouille i sur. 2014). On također aktivira ekspresiju gena za proteine ECM-a te regulira ekspresiju urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA), a signalizacijom preko kinaza Rho, fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI3K) i mitogenom aktiviranih proteinskih

kinaza (MAPK) potiče reorganizaciju aktina i nastanak lamelipodija i filopodija (Ridley i sur. 2011; Derynck i Zhang 2003; Santibanez 2013).

Tumorske stanice koje su prošle kroz program EMT-a pokazuju veliku plastičnost, odnosno sposobnost promjene fenotipa. Naime, EMT je reverzibilan proces te reprogramirane epitelne stanice mogu ponovno povratiti svoj prvotni fenotip u procesu mezenhimsko-epitelne tranzicije (engl. *mesenchymal-epithelial transition*, MET). MET omogućuje stanicama koje su migrirale do svoje ciljne destinacije povratak epitelnog fenotipa i udomaćenje u ciljnom okolišu (Radisky 2005; Kalluri i Weinberg 2009).

1.2.1. Sustav aktivacije plazminogena

Sustav aktivacije plazminogena sastoji se od kaskade enzima koji su uključeni u proces remodeliranja ekstracelularnog matriksa, razgranje fibrina i metastaziranja. Osnovne komponente sustava su plazminogen, dva aktivatora plazminogena, tri inhibitora serinskih proteaza i površinski receptor (Christ i sur. 1999).

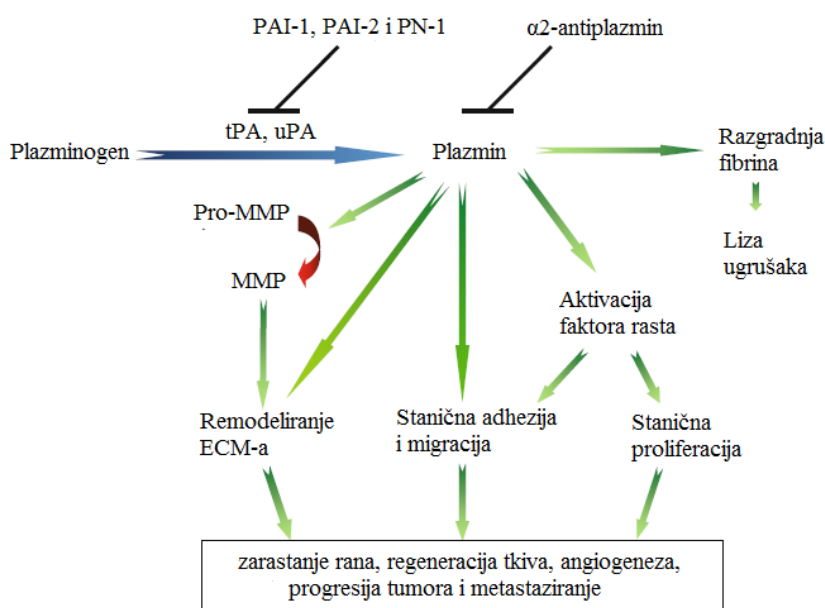
Plazminogen je ekstracelularni proenzim plazmina. Aktivatori plazminogena kataliziraju pretvorbu plazminogena u plazmin cijepanjem jedne peptidne veze. Oslobođeni plazmin je serinska proteaza koja cijepa brojne proteine ECM-a (fibronektin, laminin, vitronektin and proteoglikane) (Danø i sur. 1985). Plazmin također aktivira matriksne metaloproteinaze (MMP) te ujedno aktivira i oslobađa faktore rasta, kao što su TGF- β i epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) (Slika 2). Sustav aktivacije plazminogena stoga, osim u remodeliranju matriksa i metastaziranju, sudjeluje u kontroli staničnog rasta i diferencijacije (Rifkin i sur. 1999).

Budući da je plazmin proteaza širokog spektra, njegova je aktivacija kontrolirana djelovanjem aktivatora plazminogena, također ekstracelularnih serinskih proteaza. Postoje dva tipa, urokinazni i tkivni plazminogeni aktivator (engl. *urokinase plasminogen activator*, uPA i engl. *tissue plasminogen activator*, tPA). uPA se izlučuje u obliku jednolančanog proenzima pro-uPA, kojeg enzimi plazmin, katepsin i kalikrein cijepaju te se oslobađa aktivni dvolančani uPA. Aktivnost tPA je pak gotovo jednaka u jednolančanom i dvolančanom obliku. uPA i tPA se razlikuju u strukturi domena i afinitetu za određene proteine. tPA se aktivira formiranjem fibrina koji čini krvne ugruške, nakon čega ga cijepa što rezultira lizom ugruška. uPA nema

sposobnost lize fibrina te je uključen u aktivaciju plazmina lokaliziranu u određenim tkivima (Christ i sur. 1999).

Aktivacija plazmina regulirana je i trima proteinima iz obitelji serpina: inhibitorom plazminogenkog aktivatora tipa-1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1), inhibitorom plazminogenkog aktivatora tipa-2 (engl. *plasminogen activator inhibitor-2*, PAI-2) i proteazom nekxin-1 (engl. *protease nexin-1*, PN-1). Sva tri proteina inhibiraju i tPA i uPA, ali s različitim afinitetom. PAI-1 se izlučuje u aktivnoj formi, ali se brzo inaktivira. Vezanjem vitronektina i drugih proteina ECM-a stabilizira se aktivna forma. PAI-1, PAI-2 i PN-1 inhibiraju aktivnost uPA kada je slobodna, ali i kada je vezana za urokinazni receptor (uPAR). U slučaju kada je uPA vezana za receptor, inhibicija njene aktivnosti rezultira internalizacijom kompleksa te degradacijom uPA i inhibitora. Receptor se pak reciklira i vraća na površinu stanice (Ulisse i sur. 2009).

Urokinazni receptor (uPAR) je glikolizirani protein ključan u regulaciji proteolize ECM-a, interakcije stanica s ECM-om i staničnoj signalizaciji. Spada u skupinu receptora usidrenih u staničnu membranu pomoću glikozil-fosfatidil inozitola (GPI). Vezanjem i lokaliziranjem uPA i pro-uPA na površini stanice regulira aktivaciju plazmina i remodeliranje ECM-a. Pored uloge u proteolizi, uPAR aktivira signalne puteve koji potiču staničnu proliferaciju, preživljenje, invazivnost i mobilnost. Iako vezanje uPA za uPAR potiče prijenos signala, signalizacija preko uPAR-a je neovisna o proteolizi uPA. Neki od signalnih puteva aktiviranih urokinaznim receptorom su: signalizacija mitogenom-aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK), kinaza Rho, Src te kinaza fokalne adhezije (engl. *focal adhesion kinases*, FAK) (Smith i Marshall 2010). Vitronektin, drugi ligand urokinaznog receptora, također je uključen u staničnu signalizaciju (Kjøller i Hall 2001). Integrini, stanični receptori koji vežu komponente ECM-a te posreduju u adheziji stanica za ECM, koreceptori su uPAR-a te ključni za prijenos unutarstaničnih signala (Ghisso 2002). Povećana ekspresija uPAR i aktivacija signala nizvodno od uPAR povezana je s indukcijom EMT-a (Lester i sur. 2007).



Slika 2. Sustav aktivacije plazminogena. Preuzeto i prerađeno prema Ulisse i sur. 2009.

tPA: tkivni aktivator plazminogena; uPA: urokinazni aktivator plazminogena; PAI: inhibitor aktivacije plazminogena; PN-1: proteaza neksin MMP: matriksne metaloproteinaze.

1.3. Poli (ADP) ribozil polimeraza

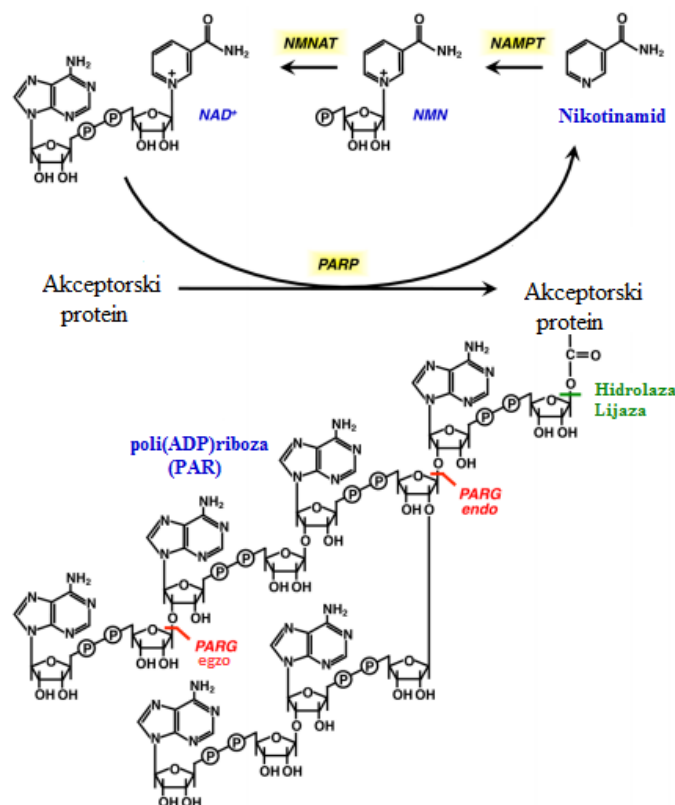
Enzimi iz obitelji poli (ADP-ribozil) polimeraza (PARP) jezgri su proteini, visoko očuvani u sisavaca, zaduženi za održavanje funkcije i strukture kromatina (Jubin i sur. 2016). Oni post-translacijski modificiraju proteine, koristeći nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) kao supstrat za sintezu mono- ili poli (ADP-ribozil) polimera na ciljnom mjestu proteina (Slika 3). Taj proces naziva se poli(ADP-ribozil)acija ili PARPilacija (Lautier i sur. 1993). Negativan naboj novonastalih lanaca poli(ADP)riboze uzrokuju promjenu u aktivnosti modificiranih proteina (Caiafa i sur. 2009). Većinu lanaca poli (ADP) riboze razgrađuje poli (ADP-ribozil) glikohidrolaza (PARG) pomoću svoje egzo- i endo- glikozidazne aktivnosti (Gagne i sur. 2006). Ljudska porodica PARP proteina sadrži 17 članova koji posjeduju karakteristični, visoko očuvani motiv u katalitičkoj domeni (Amé i sur. 2004).

PARP-1 je prvi otkriven član obitelji proteina PARP i jedan od najbolje okarakteriziranih. Osim poznate uloge u popravku oštećenja DNA, otkriveno je da je PARP-1 zaslužan za regulaciju strukture kromatina i transkripcije, stanične smrti i uspostavljanje metilacijskih uzoraka DNA (Krishnakumar i Kraus 2010). Uslijed jednolančanih i dvolančanih lomova, PARP-1 se regrutira do mjesta oštećenja gdje PARPilacijom ciljnih proteina kromatina (posebno histona H1) uzrokuje njegovo odmatanje. DNA tako postaje dostupna enzimima

popravka i transkripcijskoj mašineriji (Jubin i sur. 2016). PARP1 sudjeluje i u autoPARPilaciji, najčešće kao odgovor na oštećenje DNA, čime se inhibira sposobnost vezanja DNA i katalitička aktivnost (D'Amours i sur. 1999).

Osim u popravku oštećenja DNA, PARP-1 je različitim mehanizmima uključen u druge stanične procese. PARP-1 modificiranjem strukture kromatina regulira transkripciju brojnih gena. Naime, veže se za nukleosome, regrutira proteine koji remodeliraju kromatin te modificira histone (Jubin i sur. 2016). Gao i sur. (2009) pokazali su da PARP-1 sudjeluje u regulaciji gena Sox2 i fibroblastnog faktora rasta 4 (FGF4), ključnih u diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica. Osim što regulira transkripciju gena, PARP-1 može direktnom PARPilacijom ciljnih proteina utjecati na transdukciju signala u raznim signalnim putevima. Tako je otkriveno da PARP-1 dodavanjem poli (ADP) riboznih lanaca na SMAD3, efektorski protein TGF- β puta, povećava transkripciju ciljnih gena. Time je PARP-1, preko TGF- β , uključen u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i migraciju tijekom embrionalnog razvoja i održavanja homeostaze u odraslim tkivima (Huang i sur. 2011; Jubin i sur. 2016). PARP-1 je ujedno zaslužan za održavanje uzoraka metilacije DNA, regulirajući ekspresiju i aktivnost DNA metil transferaza. Konačno, pokazano je PARP-1 regulira prekrajanje RNA PARPilirajući samu RNA i proteine uključene u prekrajanje.

Iz navedenog jasno je PARP-1 nije samo senzor oštećenja DNA već je regulacijom ekspresije gena na više razina uključen u procese razvoja i diferencijacije (Jubin i sur. 2016).



Slika 3. Biosinteza NAD⁺ i PAR. Na slici su prikazane kemijske strukture NAD⁺, PAR i metabolita, uz enzime koji kataliziraju sintezu NAD⁺. Enzimska aktivnost PARP-a, PARG-a, hidrolaze i lijaze također su naznačeni. Preuzeto i prilagođeno prema Krishnakumar i Kraus 2010.

NAD⁺: nikotinamid adenin dinukleotid; NMN: nikotinamid monomukleotid; NMNAT: nikotinamid mononukleotid adenililtransferaza; NAMPT: nikotinamid fosforiboziltransferaza; PARP: poli (ADP-ribozil) polimeraza; PARG: poli (ADP-ribozil) glikohidrolaza

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kako bismo bolje razumjeli ulogu PARP-1 u procesima diferencijacije i epitelno-mezenhimske tranzicije kod neuroblastoma i neuroglioblastoma specifični ciljevi ovog rada su bili:

- 1) Utvrditi utjecaj inhibicije PARP-1 na diferencijaciju induciranu retinoičnom kiselinom stanične linije neuroblastoma
- 2) Utvrditi utjecaj inhibicije PARP-1 i tretmana retinoičnom kiselinom stanične linije neuroglioblastoma koja nema sposobnost diferencijacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Stanične linije

Stanična linija ljudskog neuroblastoma SH-SY5Y uspostavljena je klonalnim uzgojem iz parentalne linije SK-N-SH dobivene biopsijom koštane srži pacijentice oboljele od neuroblastoma (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5Y) (Ross i sur. 1983). Stanice SH-SY5Y imaju stabilan kariotip koji se sastoji od 47 kromosoma. Linija posjeduje specifičan biljeg koji se očituje kao trisomija dugog kraka prvog kromosoma. Stanice su uzgajane, odnosno diferencirane prema protokolu kako su opisali Shipley i suradnici (2016).

Stanična linija ljudskog glioblastoma H4 je hipertriploidna linija kod koje broj kromosoma u stanicama varira od 63 do 78. Uočeno je najmanje 16 specifičnih biljega, od kojih prevladavaju delecije. Većina stanica posjeduje dva X i dva Y kromosoma.

3.1.2. Otopine i reagensi

- Dulbeccov modificirani Eaglov medij za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) (Sigma, SAD)
Kompletni medij se priprema dodatkom 10 % fetalnog telećeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Sigma, SAD)
- Dulbeccov modificirani Eaglov medij: medij F12 (DMEM/F12) (Sigma, SAD)
- fiziološka otopina (0,9% NaCl otopljen u destiliranoj vodi)
- fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₂; 1,4 mM K₂HPO₂)
- 0,25% tripsin (Sigma, SAD)
- etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA; Sigma)
- dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) (Sigma, SAD)
- Sve-trans retinoična kiselina (engl. *all-trans retinoic acid*, ATRA) (10 mM radna otopina u DMSO)
- PJ-34 (Sigma, SAD) (10 mM radna otopina u DMSO)
- tripansko plavilo (Gibco, SAD)
- metanol (Kemika, Hrvatska)

- kristal violet (Fluka, Švicarska)
- natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Acros Organics, SAD)
- pufer za lizu stanica (137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA, pH 8,0; 10% glicerol; 1% Triton X-100)
- agaroza (Sigma, SAD)
- Tris (1 M; pH 7,5)
- lizin (Sigma, SAD) (matična otopina 100 mM u 0,1 M Tris; pH 7,5)
- humani plazminogen (Sigma, SAD) (20 mg/mL u 20 mM otopini lizina)
- kazein (8 % otopina u destiliranoj vodi)
- Na-azid (10 % otopina u vodi)
- reagens Bradford
za 1L:
 - 100 mg Coomasie Brilliant Blue G-250
 - 50 ml 95% etanol
 - 100 ml 85% fosforna kiselina
 - deH₂O do ukupnog volumena od 1 L
- TRI Reagents (Sigma, SAD)
- kloroform (Kemika, Hrvatska)
- pufer TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0)
- etidij bromid (engl. *ethidium bromide*, EtBr) (matična otopina) 10 mg/ml
- dNTP (TaKaRa) (radna otopina) 10 mM
- oligo-dT početnice (Roche, Švicarska) 50 pM
- 5X pufer PrimeScript (TaKaRa, SAD)
- inhibitor RNaza (Roche, Švicarska) 40 U
- enzim reverzna transkriptaza (PrimeScript Rtase) (TaKaRa, SAD) 200 U/ μ l
- MgCl₂ (radna otopina) 25 mM
- Taq polimeraza (Sigma, SAD) 5 U/ μ l
- pufer TAE 50x (40 mM TRIS, 2 mM EDTA, 20 mM octena kiselina) (matična otopina)

3.1.3. Uređaji

Pri izradi ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći uređaji: inkubator za uzgoj stanica (Heraus, Njemačka), kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Heraus, Njemačka), centrifuga (Hettich, Njemačka), invertni svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka), vodena kupelj (Julabo, Engleska), mikrovalna pećnica (Gorenje, Slovenija), uređaj za elektroforezu (Bio-Rad, SAD), uređaj za PCR ProFlex PCR System (Applied Biosystems, SAD), uređaj za snimanje gelova pod UV svjetlom KODAK EDAS 290 (Kodak, SAD), spektrofotometar NanoVue, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD), čitač mikrotitarskih pločica Glomax Multi Detection System (Promega, SAD).

3.1.4. Laboratorijsko posuđe i plastika

Pri izradi diplomskog rada korišteno je sljedeće laboratorijsko posuđe i plastika: male i srednje Petrijeve zdjelice (TPP, Švicarska), pločica s 96 bunarića (TPP, Švicarska), staklene pipete, predmetna i pokrovna stakalca, nastavci za mikropipete, mikroepruvete, plastične epruvete volumena 15 mL (TTP, Švicarska), plastični strugač (TPP, Švicarska).

3.2. Metode

3.2.1. Rad sa stanicama u kulturi

Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C i 5% CO₂, u malim te srednjim sterilnim Petrijevim zdjelicama (CytoOne, Starlab, Njemačka) i u plastičnim pločicama s 96 bunarića. Stanice linije H4 rasle su u hranjivom mediju DMEM uz dodatak 10% goveđeg fetalnog seruma. Za potrebe rasta SH-SY5Y stanica, korišten je DMEM/F12 uz dodatak 10% FBS-a.

3.2.2. Odmrzavanje stanica

Prilikom odmrzavanja stanica, vrijeme je odlučujući faktor u njihovom preživljavanju te se se odmrzavaju brzo pri 37 °C. Krioprezervirane stanice su osjetljive pa s njima treba pažljivo rukovati i što brže ih smjestiti u prethodno zagrijan hranjivi medij.

Prije vađenja stanica iz spremnika s tekućim dušikom hranjivi medij je zagrijan u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon zagrijavanja 3 ml medija je stavljeno u sterilne srednje Petrijeve zdjelice. Krioepuvete sa smrznutim stanicama izvađene su iz spremnika s tekućim dušikom i brzo odmrzavane zagrijavanjem u ruci te dodatkom prethodno zagrijanog medija. Koristeći sterilne staklene pipete, stanice su nježno resuspendirane i prenesene u Petrijevu zdjelicu s medijem. Budući da su obje stanične linije adherentnog tipa, nakon što su se stanice prihvale za dno posudice promijenjen je medij kako bi se uklonio krioprezervativ.

3.2.3. Određivanje broja stanica

Za potrebe eksperimenata stanice se trebaju nasaditi u odgovarajućem broju. Da bi se to izvelo, prethodno se mora odrediti broj stanica s kojim se raspolaže. Jedna od metoda brojanja stanica uključuje korištenje boje tripsansko plavilo. Mrtve stanice imaju oštećene membrane te velike i polarne molekule boje mogu prodrijeti u stanice i obojati ih u plavo, dok žive stanice ostanu nebojene.

Stanicama je uklonjen medij te su one isprane s puferom PBS-om kako bi se uklonio zaostali medij sa serumom koji inaktivira tripsin. Ukoliko su se stanice nalazile u srednjim Petrijevim zdjelicama, dodano je 500 µl 0,25% otopine tripsina s 0,5 mM EDTA. EDTA je helator metalnih iona koji veže kalcijeve i magnezijeve ione te se stoga koristi kod staničnih

linija koje se teže odvajaju od podloge. Nakon dodatka tripsina, Petrijeve zdjelice sa stanicama su spremljene u inkubator na 2 minute budući da je tripsin najaktivniji na 37 °C. Nakon što je pod invertnim mikroskopom provjerena djelotvornost tripsinizacije, dodan je medij sa serumom kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina. Stanice su potom dobro resuspendirane i pomiješane s otopinom tripanskog modrila u omjeru 1:1 (40 µl stanične suspenzije s 40 µl boje) te su nanese ispod pokrovnog stakalca Bürker-Turk komorice za brojanje. Pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 400x) izbrojale su se žive stanice te se njihov broj izražen kao broj stanica po mililitru.

Formula za računanje broja stanica u mililitru:

$$\text{Broj stanica po ml} = (\text{broj stanica}/N) \times R \times 1/V$$

Pri čemu je N broj kvadratića komorice u kojima su stanice prebrojane, R je faktor razrjeđenja (u ovom slučaju on iznosi 2) dok je V volumen komorice koji iznosi 10⁻⁴ ml.

3.2.4. Presađivanje stanica i tretiranje retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1

Stanice su nasađene u male Petrijeve zdjelice i uzgajane u 1 ml medija. Prilikom uzgoja, presađivane su svaka 2 do 3 dana kada bi postigle 80 do 90% konfluentnosti. Nakon što je medij nad stanicama usisan vakuum sisaljkom, stanice su se isprale s 2 do 3 ml prethodno zagrijanog PBS-a. PBS se zatim uklonio te se dodalo 200 µl otopine tripsina s 0,5 mM EDTA. Stanice su spremljene u inkubator na 2 minute nakon čega je na invertnom mikroskopu provjereno jesu li se stanice uspješno odignule od podloge. Tripsin se inaktivirao dodatkom 1,8 ml medija te su stanice pažljivo resuspendirane u mediju kako bi se razbile stanične nakupine. Potom je u nove male Petrijeve zdjelice prebačeno 500 µl stanične suspenzije te se u njih dodalo još 500 µl medija.

Inhibitor PARP-1 (PJ-34) i sve-trans retinoična kiselina (ATRA) otapali su se u DMSO u radnoj koncentraciji od 10 mM. Stanice su nakon presađivanja tretirane s 1 µl retinoične kiseline i 2 µl PJ-34. Tretman je ponavljan svakom promjenom medija stanicama ili nakon presađivanja.

3.2.5. Praćenje staničnog rasta bojanjem kristal violetom

Stanice su nasađene u plastične pločice s 96 bunariće volumenu od 100 µl. Nekoliko bunarića ostavljeno praznim za slijepu probu. Sljedeći dan stanice su tretirane te inkubirane kroz određeni period. Nakon odgovarajućeg inkubacijskog perioda pri 37 °C i 5% CO₂, hranjivi

medij uklonjen je vakuum sisaljkom, stanice su isprane PBS-om te fiksirane u 50 μ l 100% metanola tijekom 15 min. Stanice su potom isprane tri puta s PBS-om te im je dodano 50 μ l 0.2% otopine boje kristal-ljubičasto. Boja je dodana i u bunariće za slijepu probu. Nakon inkubacije od 10 min, boja je odstranjena, pločica je isprana 3 puta s deH₂O te ostavljena da se suši na zraku. Nakon što se pločica osušila, boja je otopljena dodavanjem 100 μ l 1%-tne otopine natrijevog dodecilsulfata u svaki bunarić i inkubiranjem na tresilici pri 600 okretaja u min. Apsorbancija je očitana pri valnoj duljini od 595 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Od dobivene apsorbancije za svaki bunarić oduzela se apsorbancija slijepe probe te je izračunata relativna vrijednost apsorbancije u odnosu na kontrolu.

3.2.6. Mjerenje duljine neurita stanica SH-SY5Y

Stanice linije neuroblastoma SH-SY5Y dugotrajnim izlaganjem retinoičnoj kiselini diferenciraju u stanice nalik neuronima. Jedna od najuočljivijih morfološki promjena uslijed diferencijacije koja je ujedno i najjednostavnija za kvantificirati je pojava duljina neurita.

Stanice su uzgajane i trenirane retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 kao što je opisano ranije kroz period od 9 dana. Svaki drugi dan stanice su fotografirane na invertnom mikroskopu.

Duljina neurita mjerena je pomoću softverskog dodatka NeuronGrowth u programu ImageJ. Prosječna duljina izračunata je dijeljenjem ukupne duljine svih neurita s njihovim brojem u vidnom polju. Vrijednosti su izražene u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

3.2.7. Određivanje aktivnosti urokinaznog plazminogenog aktivatora metodom radijalne kazeinolize

Metoda radijalne kazeinolize koristi se za mjerenje aktivnosti urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA). uPA je serinska proteaza koja katalizira aktivaciju zimogena plazminogena u aktivni plazmin. Prilikom uzgoja u kulturi, stanice je izluče u hranjivi medij. Nastali plazmin razgrađuje kazein koji se nalazi u podlozi na koju je nanesen uzorak, te veličina lizirane zone odgovara aktivnosti enzima u uzorku.

Stanice su nasadene u male Petrijeve zdjelice te su one stavljene u inkubator, na 37 °C i 5% CO₂. Sljedeći dan stanice su tretirane s retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. 24 sata od posljednjeg tretmana, odstranjen je medij, stanice su isprane puferom PBS te su 6 sati

inkubirane u 500 μ l medija bez seruma. Medij je potom sakupljen u epruvete i spremljen na -80 °C. Stanice su sastrugane plastičnim strugačem u 100 μ l pufera za lizu te je stanični lizat je potom spremljen na -80 °C.

Agarozna podloga sastojala se od: 2,5% nemasnog mlijeka u prahu (izvor kazeina), 1% agaroze, 5 mg/ml ljudskog plazminogena i 0,1% natrijevog azida u fosfatnom puferu. Dok se podloga polimerizirala, pripremila su se serijska razrjeđenja komercijalnog uPA u rasponu koncentracija od 0,1 do 100 mU. U bunariće izbušene na agaroznoj podlozi je dodano 5 μ l prikupljenog medija kao i serijska razrjeđenja urokinaze. Ploča je ostavljena na radnoj površini 15-ak minuta kako bi medij difundirao u podlogu te je potom 24 sata inkubirana na 37 °C i 5% CO₂. Ploča je potom fotografirana, a promjeri nastalih plakova izmjereni su u programu ImageJ. Komercijalni uPA se koristio za izradu standardne krivulje, kako bi se interpolacijom odredila aktivnost uPA za svaki uzorak u programu Excel (Microsoft, SAD). Uzorci su mjereni u kvadriplikatu te su se vrijednosti statistički obradile u programu R. Koncentracija proteina korištena za normalizaciju vrijednosti urokinazne aktivnosti.

3.2.7.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom Bradford

Koncentracija proteina u staničnim lizatima određena je metodom Bradford. Stanični lizati su najprije razrijeđeni u deH₂O (5 μ l lizata u 95 μ l deH₂O) te je zatim u svaki uzorak dodan 1 ml reagensa Bradford. Slijepe probe pripremljene su dodatkom 1 ml reagensa Bradford u 100 μ l deH₂O. Uzorci su kratko vorteksirani te prebačeni u plastične kivete. Apsorbancija proteinskih uzoraka određena je na spektrofotometru pri 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima dobivena je ekstrapolacijom iz baždarene krivulje apsorbancije albumina iz telećeg seruma (raspon koncentracije od 1 μ g/ μ l do 10 μ g/ μ l).

3.2.8. Izolacija i provjera kvalitete RNA

Stanicama se uklonio medij, isprale su se s PBS-om te im se dodalo 500 μ l tripsina kako bi se odvojile od podloge. Nakon 2 minute dodan je 1 ml medija sa serumom kako bi se inaktivirao tripsin, stanice su se resuspendirale te su se suspenzije prebacile u plastične mikroepruvete (Eppendorf). Nakon centrifugiranja uzoraka 3 min na 1300 rpm i temperaturi od 4 °C, medij je pažljivo odsisan i dodano je 450 μ l TRI Reagensa. TRI reagens je smjesa gvanidin tiocijanata i fenola koja otapa RNA, DNA te denaturira proteine. Dodatkom kloroforma dolazi do razdvajanja faza, pri čemu se RNA otopi u vodenoj fazi, proteini u organskoj dok se DNA zadrži u međufazi.

Uzorci se se resuspendirali pa inkubirali 5 min na ledu. Potom je u svaki uzorak dodano 100 µl kloroforma te su se mikroepruvete s lizatom snažno promiješale 20 sekundi. Nakon inkubacije od 10 min na ledu uzorci su se centrifugirali 15 min na 12000 rpm i temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, otopina se razdvojila na gornju (vodenu) i donju (organsku) fazu. Budući da se u njoj nalazila RNA, vodena faza je pažljivo prebačena mikropipetom u novu mikroepruvetu te joj je dodano 250 µl izopropanola. Uzorci su inkubirani 1 sat na -80 °C nakon čega su ponovo centrifugirani 15 min na 12000 rpm i 4 °C. Nakon tog koraka trebao bi se vidjeti talog na dnu epruvete koji predstavlja precipitiranu RNA. Supernatant se izlio, a talog se isprao s 500 µl 75% etanola te su uzorci centrifugirani pri uvjetima spomenutim u prethodnom koraku. Etanol je potom uklonjen mikropipetom te se talog ostavio da se suši otprilike 5 min. Zatim je talog, odnosno RNA otopljen u 30 µl reH₂O bez nukleaza (engl. *nuclease-free water*, Promega, SAD) i pohranjena na -80 °C.

3.2.8.1. Provjera kvalitete RNA

Nakon izolacije, trebala se odrediti koncentracija, čistoća i cjelovitost RNA. Koncentracija i čistoća očitani su na spektrofotometru, mjereći apsorbanciju na 230, 260 i 280 nm na uređaju Nanovue (Thermoscientific, SAD). Uređaj Nanovue kalibrirao se korištenjem 2 slijepe probe, odnosno nanošenjem dva puta po 2 µl reH₂O bez nukleaza u kojoj je otopljen RNA. Potom je nanešeno 2 µl uzorka. Osim masene koncentracije, uređaj je odredio omjer apsorbancije na 260 i 260 nm te omjer apsorbancije na 260 i 230 nm. Prva vrijednost dala je informaciju o onečišćenosti uzorka proteinima dok druga vrijednost informirala o onečišćenosti uzorka solima.

3.2.8.2. Agarozna gel elektroforeza

Integritet RNA i onečišćenje uzorka s genomskom DNA određen je elektroforezom u agaroznom gelu. Pripremljen je 1% agarozni gel otapanjem 0.15 grama agaroze u 15 ml 1x TAE pufera. 1 µl uzorka je pomiješan s 1 µl 6x pufera za nanošenje uzorka te je ukupni volumen nanešen u jažice gela. Elektroforeza se provodila pri konstantnom naponu od 50 V kroz 30 min. Nakon završetka elektroforeze, gel je inkubiran oko 20 min u etidij bromidu. Gel je fotografiran na uređaju za snimanje gelova pod UV svjetlom.

Ukoliko je RNA zadovoljavajuće kvalitete, na gelu bi se trebale razlučiti 2 pruge koje predstavljaju ribosomsku RNA (rRNA). Ako se zamijete pruge u blizini jažica, u uzorcima je prisutna i genomski DNA.

3.2.9. Reverzna transkripcija RNA u cDNA

Za metode semi-kvantitativne lančane reakcije polimerazom i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu bilo je potrebno prepisati RNA u odgovarajuću komplementarnu cDNA.

Prva reakcijska smjesa pripremljena je dodatkom 1 μ l (50 pmola) oligo-dT početnica, 1 μ l 10 mM dNTP-a, 2 μ g RNA (volumen ovisi o koncentraciji izolirane RNA) te reH₂O do volumena od 10 μ l. Smjesa je potom stavljena na 65 °C 5 min nakon čega je naglo ohlađena na ledu. U međuvremenu je pripremljena druga smjesa, koja je pripremljena dodatkom 4 μ l 5x pufera za PCR, 0,5 μ l 40 U inhibitor RNaza, 0,5 μ l 200 U/ μ l enzima reverzne transkriptaze i reH₂O bez nukleaza do 10 μ l. Prvoj reakcijskoj smjesi je zatim dodano 10 μ l druge smjese te je ona stavljena na 42 °C 60 min a potom na 70 °C 15 min. Dobivena cDNA razrijeđena je u 50 μ l reH₂O te pohranjena na -80 °C.

3.2.10. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom korištena je za umnažanje i analizu cDNA određenih gena. Reakcijska smjesa je pripremljena u mikroepruветama od 200 μ l prema Tablici 1. Za svaki gen od interesa rađena je zajednička smjesa reagensa (engl. *master mix*) koja je sadržavala sve komponente osim odgovarajuće cDNA. Uvjeti reakcije ovisni su o korištenim početnicama, a sekvence tih početnica nalaze se u Tablici 2. Svim reakcijama PCR zajednička je bila početna denaturacija u trajanju od 5 min pri 94 °C, zatim denaturacija u ciklusu 30 s na 94 °C te završno produljivanje lanaca u trajanju od 7 min na 72 °C. Temperatura sparivanja ovisila je o sekvenci korištenih početnica. Broj ciklusa u reakcijama PCR za pojedine početnice određen je eksperimentalno, tako da se nalazi u eksponencijalnoj fazi krivulje ovisnosti broja ciklusa i količine produkta. Prvo je umnožena sekvenca gena hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*; HPRT) kako bi se provjerio integritet cDNA te ujednačila koncentracija uzoraka cDNA. Umnažanje sekvence gena HPRT poslužilo je i za kvantifikaciju rezultata umnažanja gena od interesa.

3.2.10.1. Agarozna gel elektroforeza

Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom uzoraka na 1,5% agaroznom gelu. Gel je pripremljen dodatkom 0,75 g agaroze u 50 ml 1x pufera TAE. Nakon što je agaroz otopljen zagrijavanjem u mikrovalnoj peći, dodano je 2 μ l 10 mg/ml. Elektroforeza je

provođena uz napon od 80 V 20 min. Na gel je nanoseno 3 µl uzorka pomiješano s 2 µl pufera za nanošenje uzoraka. Relativna kvantifikacija rezultata vršena je usporedbom gustoće (intenziteta) pruge cDNA pomoću programa ImageJ.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za PCR

Reagensi (radna otopina)	Konačna koncentracija	Volumen (µl)
Pufer za PCR (10x)	1x	1,5
dNTP (2,5 mM)	200 µM	1,2
MgCl ₂ (25 mM)	500 µM	0,3
Početnica 1 (5 µM)	200 nM	0,6
Početnica 2 (5 µM)	200 nM	0,6
cDNA*		1,2
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,04 U/µl	0,1
deH ₂ O		9,6
Ukupni volumen:		15 µl

*cDNA je dobivena reverznom transkripcijom 2 µg RNA te je razrijeđena u 50 reH₂O bez nukleaza za potrebe PCR-a

Tablica 2. Uvjeti reakcije PCR i sekvence početnica.

Korištene početnice		Uvjeti PCR reakcije		
Ime	Sekvenca	Broj ciklusa	Temperatura (°C)	Vrijeme
HPRT	5'-CTGCTGACAAAGATTCAGTGG-3' (F) 5'-CCAAAGATGGTCAAGGTCGC-3' (R)	35	52	30 s
			72	55 s
tPA	5'-CTGGGAAGTGCTGTGAAATA-3' (F) 5'-TTCTGCAGTAGTTGTGGTTC-3' (R)	38	58	30 s
			72	30 s
c-Myc	5'-CTCGGATTCTCTGCTCTCCT-3' (F) 5'-TGATCCAGACTCTGACCTTT-3' (R)	38	58	30 s
			72	30 s
Hes-1	5'-AACACGACACCGGATAAACC-3' (F) 5'-CCGCGAGCTATCTTTCTTCA-3' (R))	38	56	30 s
			72	30 s

Hes-5	5'-ATCAACAGCAGCATCGAG-3' (F) 5'-GTGGTACAGCAGCTTCATC-3' (R)	38	54	30 s
			72	30 s
PARG	5'-TCCAGAATGGGAAAGATGTG-3'(F) 5'-CTCAGCATAGCCTGTGTATTTC-3'(R)	38	56	30 s
			72	30 s
CD133	5'-GCTGTTGATGTCTTTCTGTGTAG -3'(F) 5'-GGAGGGAGTCATCCTTGAATAG -3'(R)	38	58	30 s
			72	30 s

3.2.11. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*RT-qPCR*)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*RT-qPCR*, od engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) precizna je i pouzdana metoda za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju RNA i DNA. Kvantifikacija se temelji na obilježavanju produkata reakcije *PCR* fluorescentnom bojom i njihovom analizom u trenutku nastanka. Naime, zabilježena fluorescencija direktno je proporcionalna količini nastalog produkta. Za obilježavanje produkata koriste se interkalirajuće fluorescencijske boje (npr. SYBR Green I), koje nespecifično obilježavaju novonastalu dvolančanu DNA. Pored fluorescencijskih boja, za specifično obilježavanje sekvenci od interesa koriste se fluorescencijski obilježeni oligonukleotidi, odnosno probe.

Uređaj bilježi broj ciklusa (C_t , engl. *cycle threshold*) u kojem emitirana fluorescencija prijeđe postavljen prag (granicu između nespecifičnog i specifičnog signala). Budući da uzorci s većom koncentracijom cDNA brže prijeđu prag od uzoraka s manjom koncentracijom, C_t vrijednost se stoga koristi za kvantifikaciju ekspresije gena.

Reakcijske smjese za svaki par početnica i za negativnu kontrolu bez kalupa pripremljene su prema Tablici 3. Sekvence korištenih početnica nalaze se u Tablici 4. Za svaki uzorak napravljene su tri tehničke replike. Kao endogena kontrola korišten je gen HPRT. Sekvence korištenih početnica prikazane su u Tablici 4. Reakcijske smjese nanosene su na pločicu s 96 jažica, nakon čega je na pločicu stavljena folija za *qRT-PCR*. Pločica je potom centrifugirana pri 1750 rpm 1 min na 4 °C te stavljena u uređaj *7500 Fast Real-Time PCR System*. Program reakcije nalazi se u Tablici 5. Nakon završetka reakcije, pločica je pohranjena na +4 °C.

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Excel. Za relativnu kvantifikaciju korištena je $\Delta\Delta C_t$ metoda, kod koje se istovremeno mjeri ekspresija endogene kontrole u svrhu normaliziranja ekspresije gena od interesa. Srednje vrijednosti C_t gena od interesa

normalizirane su za srednju vrijednost C_t gena HPRT (endogena kontrola) kako bi se odredila vrijednost ΔC_t za svaki gen u svakom uzorku (za svaki tretman). Potom su srednje vrijednosti ΔC_t za tretirane stanice normalizirane za srednju vrijednost ΔC_t kontrolnih, netretiranih stanice čime je dobivena vrijednost $\Delta\Delta C_t$. Konačno, koristeći vrijednost $\Delta\Delta C_t$ određen je faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*).

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za RT-qPCR. U smjesu negativne kontrole dodaju se svi navedeni sastojci osim cDNA, čiji je volumen nadomješten s reH₂O.

Reagensi (radna otopina)	Konačna koncentracija	Volumen (μl)
SYBR Green PCR MASTER MIX (2x)	1x	10
Početnica 1 (10 μM)	0,3 μM	0,6
Početnica 2 (10 μM)	0,3 μM	0,6
cDNA		1
ReH ₂ O		7.8
Ukupni volumen		20

*cDNA je dobivena reverznom transkripcijom 2 μg RNA koja je razrijeđena u 40 μL reH₂O bez nukleaza za potrebe PCR-a

Tablica 4. Sekvence početnica za RT-qPCR. Sve početnice imale su zajedničku temperaturu sparivanja, koja je iznosila 58 °C.

Ime	Sekvenca
uPA	5'-GGAGATGAAGTTTGAGGTGGAA-3' (F) 5'-CTCCTTGAACGGATCTTCAG-3' (R)
PAI-1	5'-CTGGTGAATGCCCTCTACTTC-3' (F) 5'-TGCTGCCGTCTGATTTGT-3' (R)
uPAR	5'-TTGAAGATCACCAGCCTTACC-3' (F) 5'-GGTAACGGCTTCGGGAATAG-3' (R)

TGF-β	5'-GACACCAACTATTGCTTCAG-3' (F) 5'-AGAAGTTGGCATGGTAGCCC-3' (R)
Zeb-1	5'-GGCAGATGAAGCAGGATGTA-3' (F) 5'-GACAGCAGTGTCTTGTGTTG-3' (R)
Twist-1	5'-CGGAGACCTAGATGTCATTGTTT-3' (F) 5'-ACGCCTGTTTCTTTGAATTTG-3' (R)
Snail-1	5'-CATCTGAGTGGGTCTGGAGGT-3' (F) 5'-CCTGGTCAAGAATTTCAAC-3' (R)
Snail-2	5'-CCTGGTCAAGCATTTCAAC-3' (F) 5'-GAGGATCTCTGGTTGTGGTATG-3' (R)

Tablica 5. Uvjeti reakcije RT-qPCR

	Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme	Ciklus
Aktivacija	Denaturacija	95	10 min	1
PCR	Denaturacija	95	15 s	40
	Sparivanje početnica i produljivanje lanaca	58	1 min	40x
Krivulja taljenja	Denaturacija	95	15 s	1
	Početna temperatura	60	1 min	1
	Konačna temperatura	95	30 s	1

3.2.12. Statistička analiza

Statistička analiza napravljena je pomoću programa R (verzija 3.3.3). Razlike između srednjih vrijednosti tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 određene su analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) koja omogućuje istovremenu usporedbu dvije ili više grupa. Budući da ANOVA ukazuje samo na to postoji li sveukupna razlika između grupa, nakon analize programom ANOVA vrši se jedan od post-hoc testova. Post-hoc testovi daju informacije o tome koje se točno grupe razlikuju. U ovom radu korišten je Duncanov test i razina značajnosti od 5%.

Korišteni kodovi:

```
aov(a ~b, data=c)
```

gdje je *a* zavisna varijabla (odgovor na tretman), *b* je faktor po kojem se podaci svrstavaju u grupe (vrste tretmana), a *c* su rezultati eksperimenta u tabličnoj formi.

```
duncan.test(x, "tretman", alpha = 0.05, console=TRUE)
```

gdje je *x* rezultat analize ANOVA-om, a *alpha* razina značajnosti.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju željeli smo utvrditi utjecaj PARP-1 na diferencijaciju stanica neuroblastoma SH-SY5Y te analizirati utjecaj retinočne kiseline i PARP-1 na liniju neuroblastoma H4 koja se ne može diferencirati.

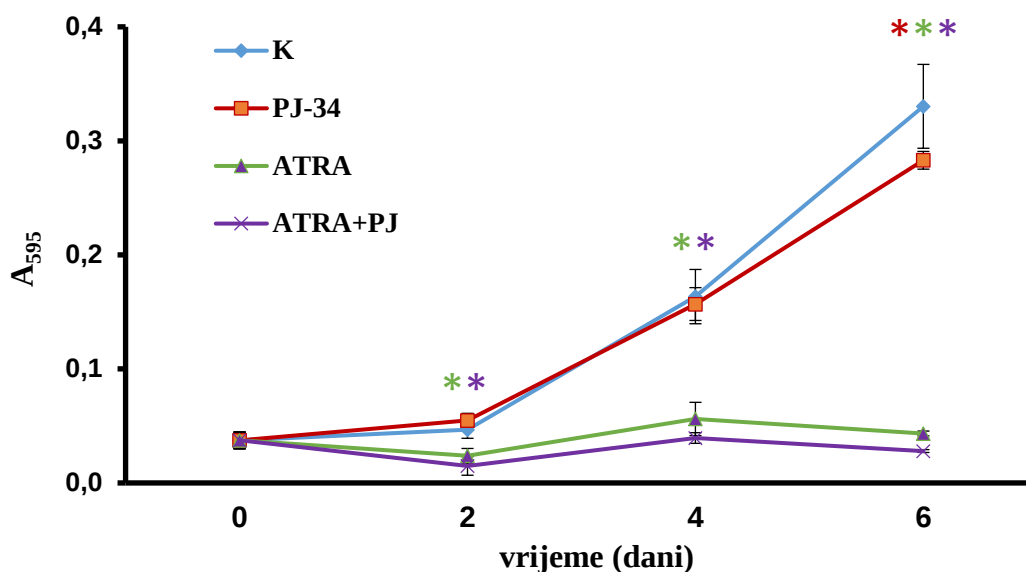
4.1. Utjecaj retinočne inhibitora PARP-1 na diferencijaciju stanica neuroblastoma SH-SY5Y

4.1.1. Krivulja rasta stanica SH-SY5Y nakon obrade retinočnom kiselinom i inhibitorom PARP-1

Stanice neuroblastoma SH-SY5Y mogu se diferencirati tretmanom retinočnom kiselinom. Budući da diferencijacija utječe na sposobnost proliferacije, stanicama tretiranim retinočnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 pratili smo rast bojanjem kristal ljubičastim.

Na pločicu s 96 bunarića nasadili smo 5×10^3 stanica po bunariću. Stanice smo tretirali 10 μ M retinočnom kiselinom, 20 μ M PJ-34 i njihovom kombinacijom, u triplicatu. Dio stanica smo fiksirali 2. i 4. dan, a 6. dan, nakon fiksacije, obojali smo sve stanice kristal ljubičastim te izmjerili apsorbanciju na spektrofotometru.

Iz rezultata prikazanih na Slici 4, već se kod drugog dana tretmana moglo uočiti smanjenje proliferacije za oko 50% kod stanica tretiranih retinočnom kiselinom (zasebno i u kombinaciji s PJ-34) u odnosu na kontrolu. 6. dan tretmana uočeno je smanjenje proliferacije od oko 90%. Tretman inhibitorom PARP-1 nije pokazao značajnu inhibiciju proliferacije do 6. dana, kada je zabilježeno smanjenje proliferacije od oko 15%.



Slika 4. Utjecaj retinoične kiseline i PJ-34 na rast stanica SH-SY5Y. Stanice SH-SY5Y tretirane su 2, 4 i 6 dana 10 μ M retinoičnom kiselinom i/ili 20 μ M PJ-34. Stanični rast kvantificiran je bojanjem kristal ljubičastim. Stanice su nasađene i tretirane u triplikatima. Standardne devijacije označene su omeđenim crnim linijama. * Statistički značajno u odnosu na kontrolu. **K**: kontrola; **PJ-34**: inhibitor PARP-1; **ATRA**: retinoična kiselina

4.1.2. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na duljine neurita stanica SH-SY5Y

Stanice neuroblastoma SH-SY5Y pokazuju morfološke promjene, kao što su promjena oblika stanice i rast neurita, uslijed tretmana retinoičnom kiselinom (Mazzacoli i sur. 2016).

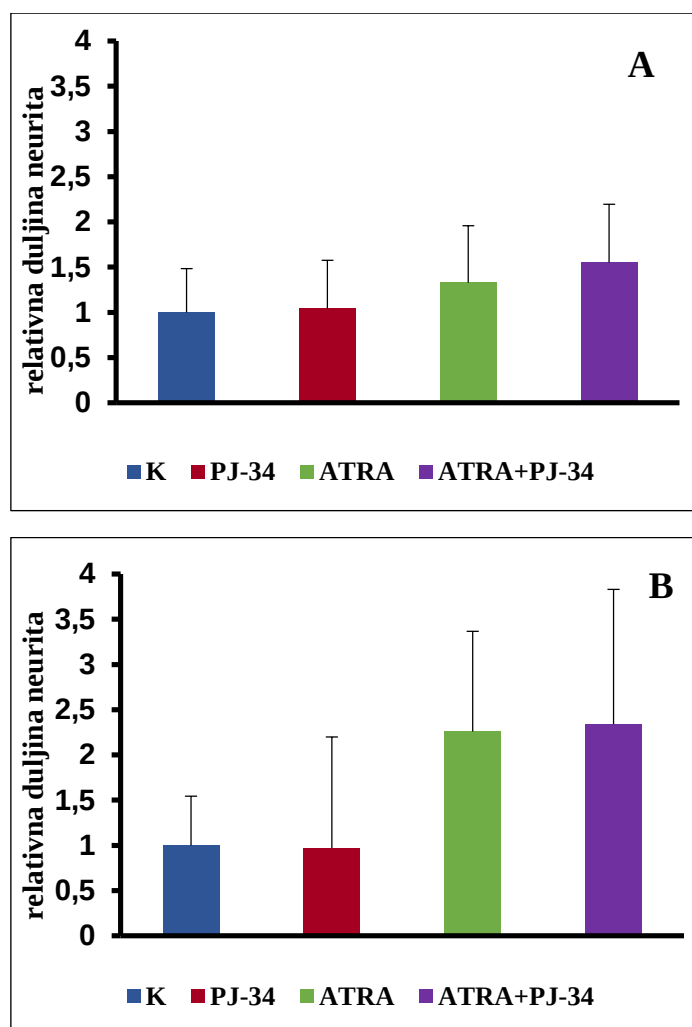
Kako bismo istražili utjecaj inhibicije aktivacije PARP-1 na proces diferencijacije linije SH-SY5Y, stanice smo tretirali s 10 μ M retinoičnom kiselinom i s 20 μ M inhibitorom PARP-1, pojedinačno i u kombinaciji, kroz 9 dana. Nasadili smo 2×10^5 stanica u male Petrijeve zdjelice i svaki drugi dan im mijenjali medij ili presadili ako bi posve ispunile zdjelice.

Tijekom tretmana, stanice kojima je dodana retinoična kiselina morfološki su se mijenjale, diferencijacijom su stanicama izrastali neuriti. Fotografirali smo ih na invertnom mikroskopu, a duljine neurita izmjerili smo u programu ImageJ.

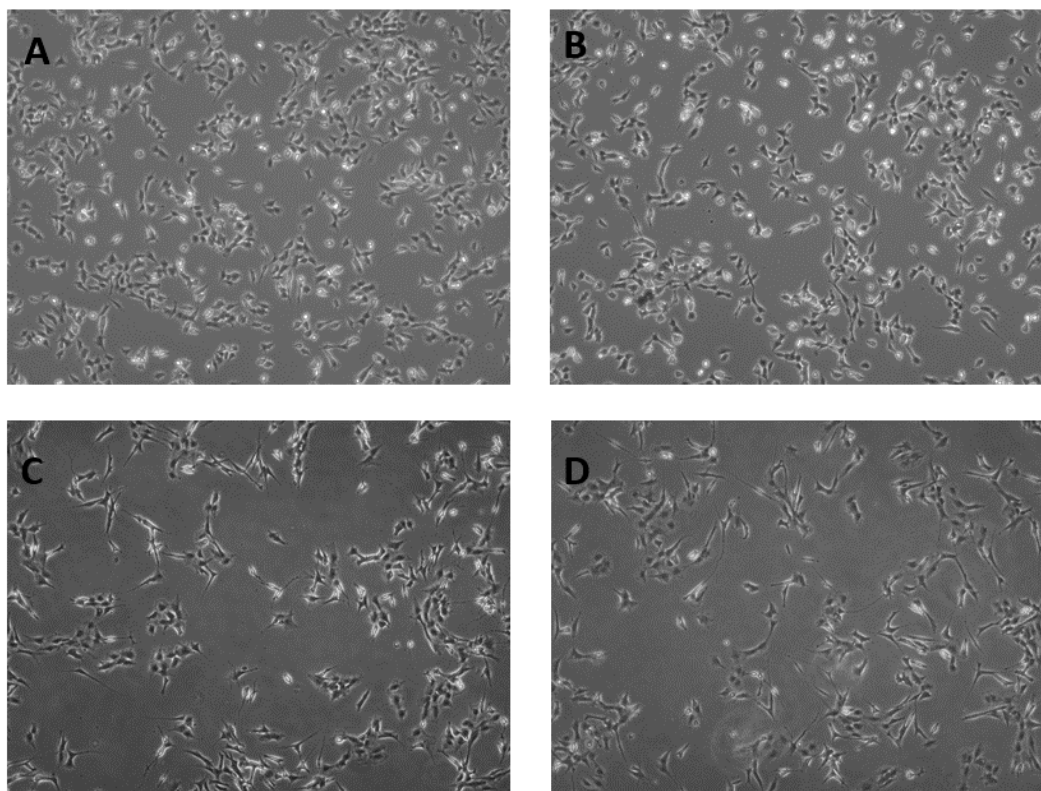
Već nakon jednog dana tretmana povećanje u duljini neurita iznosilo je oko 50% kod stanica tretiranih retinoičnom kiselinom (zasebno i u kombinaciji) (Slika 5A), a nakon sedam dana duljina neurita se kod istih stanica povećala za oko 250% u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (Slika 5B). Tretman inhibitorom PJ-34 nije uzrokovao značajne promjene u

duljini neurita. Duljine neurita uvelike variraju budući da njihov rast nije uniforman te su stoga standardne devijacije iznimno velike.

Tretman retinoičnom kiselinom je, osim na duljinu neurita vidno utjecao na oblik i veličinu stanica i njihov rast (Slika 6).



Slika 5. Duljina neurita stanica SH-SY5Y tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice su tretirane 10 μ M ATRA-om, 20 μ M PJ-34 te njihovom kombinacijom kroz 9 dana. Stanice su potom fotografirane na invertnom mikroskopu. Duljine neurita izmjerene su u programu ImageJ te su vrijednosti izražene kao relativne duljine u odnosu na kontrolu. A) Stanice tretirane 1 dan B) Stanice tretirane 7 dana. **K**: kontrola; **PJ-34**: inhibitor PARP-1; **ATRA**: retinoična kiselina



Slika 6. Morfološke promjene stanica SH-SY5Y nakon tretmana s retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 kroz 7 dana. Stanice su tretirane 7 dana 10 μ M ATRA, 20 μ M PJ-34 te njihovom kombinacijom, nakon čega su snimljene pod invertnim mikroskopom pod povećanjem od 400 puta **A)** Stanice bez tretmana; **B)** Stanice tretirane inhibitorom PARP-1; **C)** Stanice tretirane retinoičnom kiselinom; **D)** Stanice tretirane retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1

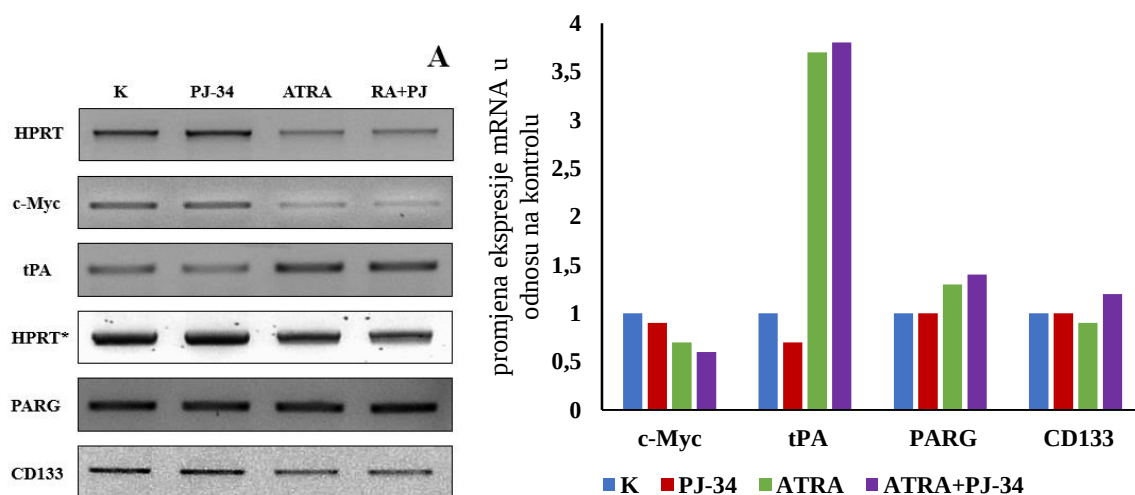
4.1.3. Semikvantitativna analiza ekspresije gena od interesa u stanicama SH-SY5Y uslijed tretmana s retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1

Kod stanica SH-SY5Y tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 pratila se ekspresija niza gena za koje se pretpostavljalo da bi im se ekspresija mogla promijeniti procesima diferencijacije. Analizirani su geni c-Myc, tPA, PARG i CD133.

c-Myc je onkogen koji u većini tipova stanica utječe na povećanje proliferacije (a time i zastoj u diferencijaciji) dok je povećana aktivnost tPA (tkivni plazminogeni aktivator) kod linije SH-SY5Y znak diferencijacije stanica (Neuman i sur. 1989; Eilers i Eisenman 2008). PARG hidrolizira lance poli (ADP) riboze kojima je PARP-1 modificirao proteine (Davidovic i sur. 2001). Stoga smo htjeli istražiti mijenja li se njegova ekspresija nakon inhibicije PARP-1. CD133 je biljeg neuralnih matičnih stanica, a njegova ekspresija daje uvid u stanje diferenciranosti stanica (Ross i sur. 2015; Wu i Wu 2009).

Nasadili smo 2×10^5 stanica u male Petrijeve zdjelice te ih tretirali kroz 9 dana s $10 \mu\text{M}$ retinoičnom kiselinom, s $20 \mu\text{M}$ inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Zatim smo izolirali RNA te je potom reverznom transkripcijom prepisali u cDNA. Reakcijom *PCR* umnožili smo sekvence gena od interesa. Produkt reakcije *PCR* gena HPRT koristili smo za normalizaciju rezultata, a promjene u ekspresiji gena izrazili smo u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

Na Slici 7 su prikazani rezultati. Obrada stanica retinoičnom kiselinom smanjila je ekspresiju cMyc za oko 40% i povećala ekspresiju tPA za oko 370%. Ekspresija gena PARG se povećala za oko 40%, dok se ekspresija CD133 nije se bitno promijenila. Sličan je uzorak kod kombiniranog tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Tretman samim inhibitorom PARP-1 nije bitno mijenjao ekspresiju niti jednog od ispitivanih gena.



Slika 7. Ekspresije gena od interesa kod stanica SH-SY5Y tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice su tretirane 10 dana $10 \mu\text{M}$ ATRA, $20 \mu\text{M}$ PJ-34 te njihovom kombinacijom. RNA je izolirana i prepisana u cDNA. Sekvence gena c-Myc, tPA, PARG i CD133 umnožene su lančanom reakcijom polimerazom. **A)** Gel elektroforeza produkata reakcije *PCR*. **B)** Ekspresija gena izražena u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Vrijednosti su dobivene denzitometrijskom analizom fotografija gela te su normalizirane u odnosu na kontrolni gen HPRT. **K:** kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina; **HPRT:** hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza; **tPA:** tkivni plazminogeni aktivator; **PARG:** poli (ADP-ribozil) glikohidrolaza; **CD133:** prominin 1

4.2. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na stanice neuroglioblastoma H4

4.2.1. Utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na aktivnost uPA

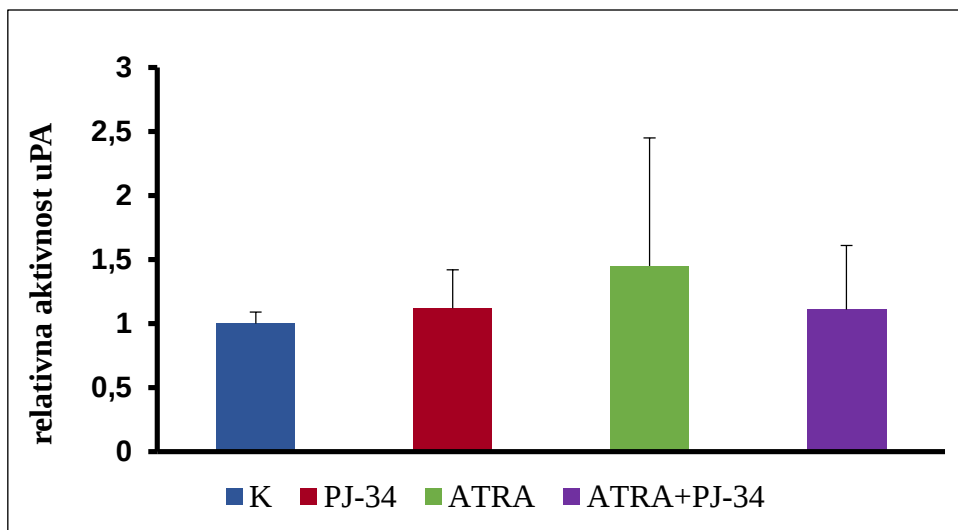
U drugom dijelu istraživanja ispitali smo utjecaj retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na stanice neuroglioblastoma H4. Naime, Madunić i suradnici (2014) su pokazali da tretman inhibitorom PARP-1, uz alkilirajuće oštećenje, potiče ekspresiju gena za urokinazni plazminogeni aktivator (uPA) kod srodne linije glioblastoma. Potaknuti time, metodom radijalne kazeinolize ispitali smo aktivnost uPA u stanicama H4 nakon obrade retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1.

Za proučavanje utjecaja retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 na aktivnost uPA proveli smo dva eksperimenta. U prvom smo nasadili 2×10^5 stanica te ih tretirali 24 sata s 10 μM retinoičnom kiselinom, s 20 μM inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Potom smo im dodali hranjivi medij DMEM bez seruma te nakon 6 sati inkubacije prikupili smo kondicionirani medij. U drugom eksperimentu, kondicionirani medij smo prikupili nakon 14 dana tretmana. Aktivnost urokinaze ispitana je nanošenjem kondicioniranog medija na agaroznu podlogu koja je sadržavala kazein, susprst lizina, te mjerenjem promjera liziranih zona. Slike 8 i 9 pokazuju rezultate ovih eksperimenata.

Tijekom uzgoja stanica i tretmana nije primijećen zastoj u proliferaciji niti pojava morfoloških promjena.

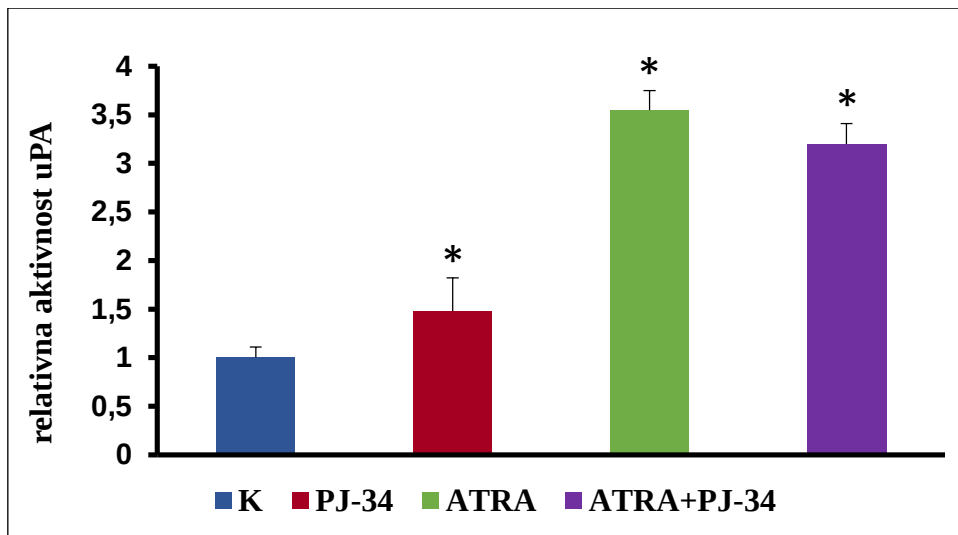
Rezultati radijalne kazeinolize kod stanica H4 tretiranih 24 sata nisu pokazali statistički značajne razlike (Slika 8).

Nakon 14 dana tretmana uočili smo povećanje aktivnosti uPA za oko 300 % uslijed obrade retinoičnom kiselinom. Sličan rezultat dobiven i kombiniranim tretmanom. Inhibicija PARP-1 dovela je do povećanja od oko 40 % u aktivnosti uPA (Slika 9).



Slika 8. Aktivnost urokinaze kod stanica neuroglioblastoma H4 tretiranih 24 sata retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice H4 tretirane su s 10 μ M retinoičnom kiselinom, s 20 μ M inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Nakon 24 sata obrade, medij je zamijenjen za medij bez seruma koji je sakupljen nakon idućih 6 sati. Aktivnost urokinaze određena je metodom radijalne kazeinolize. Aktivnost uPA normalizirana je prema količini proteina i izražena kao relativna aktivnost u odnosu na kontrolu. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. Standardne devijacije označene su omeđenim crnim linijama.

K: kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina



Slika 9. Aktivnost urokinaze kod stanica neuroglioblastoma H4 tretiranih 14 dana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice H4 tretirane su s 10 μ M retinoičnom kiselinom, s 20 μ M inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Nakon 14 dana obrade medij je zamijenjen za medij bez seruma koji je sakupljen nakon idućih 6 sati. Aktivnost urokinaze određena je metodom radijalne kazeinolize. Aktivnost uPA normalizirana je prema količini proteina i izražena kao relativna aktivnost u odnosu na kontrolu. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. Standardne devijacije označene su omeđenim crnim linijama.

K: kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina

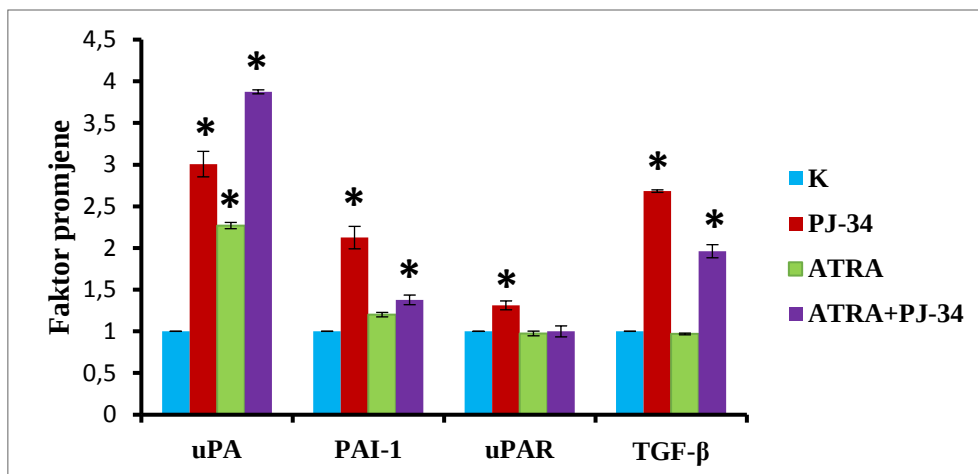
4.2.2. Semikvantitativna i kvantitativna analiza ekspresije gena od interesa u stanicama H4 tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1

Budući da su stanice H4 pokazale promjene u aktivnosti urokinaze nakon dugotrajnog tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1, analizirana je ekspresija pojedinih gena kod tretiranih stanica. Stanice su tretirane 10 μ M retinoičnom kiselinom, s 20 μ M inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom 9 dana. Iz stanica je izolirana RNA, prepisana u cDNA, te analizirana metodama klasičnog i *qPCR*-a.

Prvo smo analizirali ekspresiju gena sustava urokinaznog aktivatora plazminogena: uPA, PAI-1 i uPAR metodom *qPCR*. Rezultati eksperimenta prikazani su na Slici 10. Uslijed tretmana retinoičnom kiselinom ekspresija uPA bila je povećana preko 2 puta te preko 3 puta nakon obrade inhibitorom PARP-1. Kod kombiniranog tretmana ekspresija uPA bila je povećana oko 4 puta. Tretman inhibitorom PARP-1 povećao je ekspresiju PAI-1 i uPAR, dok je povećanje ekspresije nakon zajedničkog tretmana primijećeno samo kod PAI-1 i to značajno manje nego nakon zasebnog tretmana inhibitorom PARP-1.

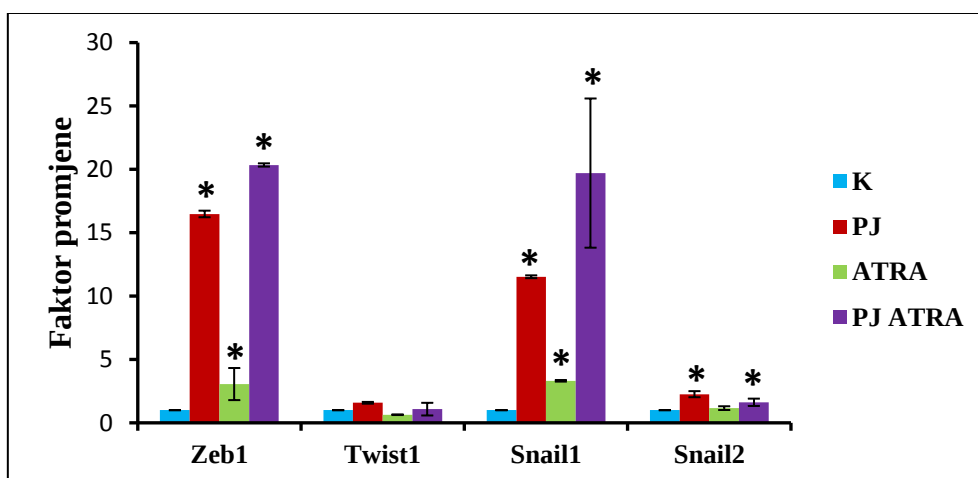
Novija istraživanja su pokazala da sustav uPA može biti reguliran krovnim transkripcijskim faktorima koji potiču stanicu na promjene iz epitelnog u mezenhimski fenotip (EMT). Takvi programi omogućuju tumorskim stanicama sposobnost metastaziranja. Stanice smo tretirali retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 kroz 9 dana te smo ispitali ekspresiju krovnih gena EMT, Zeb1, Twist, Snail1 i Snail2. Rezultati su prikazani na Slici 11. Zaseban tretman inhibitorom PARP-1 doveo je do povećanja ekspresije svih ispitanih gena osim Twist1. Najveći utjecaj primijećen je kod Zeb1, koji je povećan oko 20 puta, i Snail1, koji je povećan oko 10 puta. Obrada retinoičnom kiselinom povećala je ekspresiju Zeb1 i Snail1 oko 3 puta. Kombinirani tretman inhibitorom PARP-1 i retinoičnom kiselinom doveo je do većeg povećanja ekspresije gena Zeb1 i Snail1 nego zaseban tretman inhibitorom PARP-1.

Jedan od signalnih sustava povezanih s pokretanjem EMT preko regulacije krovnih transkripcijskih faktora i elemenata sustava uPA je put TGF- β (Morisson i sur. 2013; Lang i sur. 2014). Stanice smo tretirali kroz 9 dana retinoičnom kiselinom, inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom te smo ispitali ekspresiju gena TGF- β . Rezultati su prikazani na Slici 10. Obrada retinoičnom kiselinom nije pokazala utjecaj na ekspresiju TGF- β . Stanice tretirane inhibitorom PARP-1 su imale 3 puta povećanu ekspresiju TGF- β , dok je kombinirani tretman doveo do povećanja od oko 2 puta.



Slika 10. Ekspresije gena uPA sustava i TGF- β u stanicama H4 tretiranih ATRA-om i PJ-34. Stanice su tretirane 9 dana 10 μM retinoičnom kiselinom, 20 μM inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Potom je izolirana RNA te prepisana u cDNA metodom reverzne transkripcije. Relativna kvantifikacija ekspresije napravljena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Ispitani su geni uPA, PAI-1, uPAR i TGF-β. Kao endogena kontrola korišten je gen HPRT, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolu.

K: kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina; **uPA:** urokinazni plazminogeni aktivator; **PAI-1:** inhibitor aktivatora plazminogena-1, **uPAR:** receptor uPA; **TGF-β:** transformirajući faktor rasta β



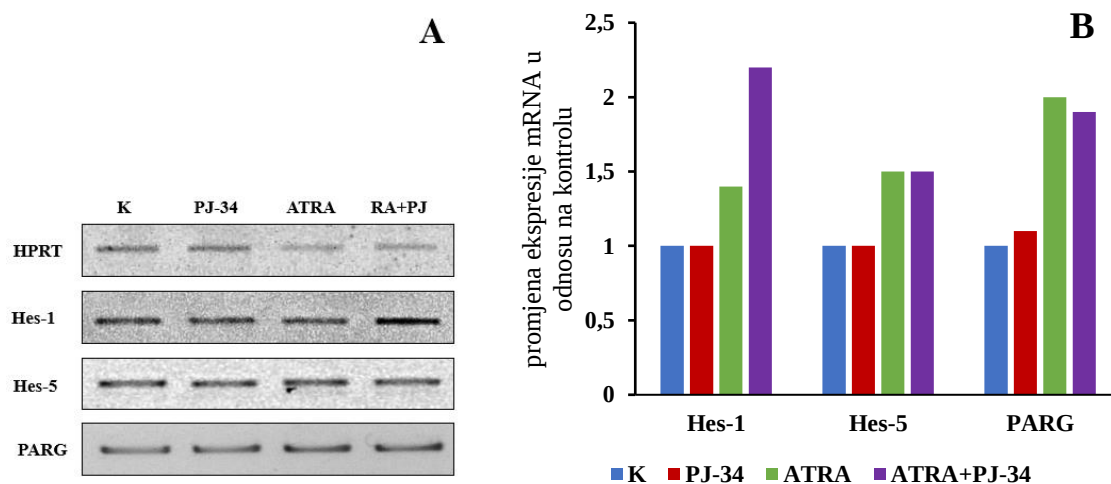
Slika 11. Ekspresije gena krovnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije kod stanica H4 tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice su tretirane 9 dana 10 μM retinoičnom kiselinom, 20 μM inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Potom je izolirana RNA te prepisana u cDNA metodom reverzne transkripcije. Relativna kvantifikacija ekspresije napravljena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Ispitani su geni Zeb1, Twist1, Snail1 i Snail2. Kao endogena kontrola korišten je gen HPRT, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolu.

K: kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina; **Zeb1:** od engl *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*

Signalni put Notch sudjeluje u procesima diferencijacije živčanih stanica (Zhou i sur. 2010). Pokazano je da retinoična kiselina u nekim staničnim linijama može utjecati na promjenu ekspresiju nizvodnih elemenata puta Notch (Ying i sur. 2011). Stoga smo analizirali ekspresiju nizvodnih elemenata puta Notch, Hes-1 i Hes-5 kod stanica H4 tretiranih retinoičnom kiselinom, inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Rezultati analize ekspresije metodom *PCR* su prikazani na Slici 12.

Stanice tretirane inhibitorom PARP-1 nisu pokazale razlike u ekspresiji Hes-1 i Hes-5. Zaseban tretman retinoičnom kiselinom je doveo do povećanja ekspresije i Hes-1 i Hes-5 za oko 50%. Kombinacija retinoične kiseline i inhibitora PARP-1 je povećala ekspresiju Hes-1 za oko 200%, dok je kod Hes-5 pokazala rezultate slične djelovanju same retinoične kiseline.

Utjecaj inhibicije PARP-1 na ekspresiju gena PARG ispitali smo i kod stanične linije H4 nakon tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Rezultati su prikazani na Slici 12. Rezultati analize ekspresije gena PARG kod linije H4 slični su rezultatima dobivenim kod linije SH-SY5Y. Inhibitor PARP-1 nije utjecao na ekspresiju gena PARG. Retinoična kiselina povećala njegovu ekspresiju 2 puta, a sličan rezultat dobiven je i kombiniranim tretmanom.



Slika 12. Ekspresije gena aktiviranih putem Notch i PARG u stanicama H4 tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. Stanice su tretirane 9 dana 10 μ M ATRA, 20 μ M PJ-34 te njihovom kombinacijom. RNA je izolirana i prepisana u cDNA. Sekvence gena Hes-1, Hes-5 i PARG umnožene su lančanom reakcijom polimerazom. **A)** Gel elektroforeza produkata lančane reakcije polimerazom. **B)** Ekspresija gena izražena u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Vrijednosti su dobivene denzitometrijskom analizom fotografija gela te su normalizirane u odnosu na kontrolni gen HPRT. **K:** kontrola; **PJ-34:** inhibitor PARP-1; **ATRA:** retinoična kiselina; **HPRT:** hipoksantin-guanin fosforibozil transferaza; **Hes-1:** od engl. *Hairy/Enhancer of split genes*; **Hes-5:** od engl. *Hairy/Enhancer of split genes*; **PARG:** poli (ADP-ribozil) glikohidrolaza

5. RASPRAVA

Neuroblastom je najčešće dijagnosticirana neoplazma tijekom ranog djetinjstva. Čak 15% smrti djece izazvanih tumorima uzrokovane su neuroblastomom (Brodeur i Maris 2006; Maris i sur. 2007). Također, dugoročno preživljavanje kod pacijenata s visokorizičnim oblikom bolesti, iako povećano zadnjih godina, iznosi samo oko 40% (Matthay i sur. 1999). Neuroblastomi mogu biti vrlo heterogeni. Vjerojatnost izlječenja uvelike ovisi o dobi kada je bolest dijagnosticirana, o raširenosti tumora i njegovoj biologiji (Maris i sur. 2007). Liječenje derivatima retinoične kiseline povećalo je preživljenje. Međutim, dugotrajna terapija retinoičnom kiselinom, dijelom zbog njene farmakokinetike, ali i zbog drugih biokemijskih faktora, dovodi do razvoja otpornosti na terapiju. Stoga se aktivno istražuje mogućnost upotrebe drugih lijekova u kombinaciji s retinoičnom kiselinom kako bi se postigla maksimalna terapijska učinkovitost (Cimmino i sur. 2015).

Inhibitori PARP-1 već se koriste kao protutumorski lijekovi kod tumora koji imaju defektni sustav popravka oštećenja DNA (Rouleau i sur. 2010). Osim u popravku oštećenja DNA, otkriveno je da PARP-1 sudjeluje u regulaciji ekspresije gena, diferencijaciji stanica i razvoju, što ukazuje na postojanje drugih terapijskih mogućnosti (Jubin i sur. 2016).

Prvi cilj našeg istraživanja bio je utvrditi utječe li inhibicija PARP-1 na diferencijaciju stanične linije neuroblastoma. Naime, htjeli smo bolje razumjeti proces diferencijacije neuroblastoma retinoičnom kiselinom te istražiti može li kombinirani tretman s inhibitorima PARP-1 povećati učinkovitost retinoične kiseline. Proces diferencijacije stanica pratili smo mjerenjem proliferacije, duljine neurita i ekspresije gena uključenih u diferencijaciju stanica SH-SY5Y koje imaju sposobnost diferencijacije (Shipley i sur. 2016). Budući da je diferencijacija obrnuto proporcionalna staničnom proliferacijskom potencijalu, mjerili smo proliferaciju stanica tijekom tretmana retinoičnom kiselinom, inhibitorom PARP-1 i njihovom kombinacijom. Već nakon drugog dana tretmana inhibicija proliferacije kod stanica tretiranih retinoičnom kiselinom (zasebno i u kombinaciji) iznosila je oko 50 %, a nakon 6 dana tretmana čak oko 90 % u odnosu na neobrađene stanice. Inhibicija PARP-1 nije dovela do značajne promjene u proliferaciji stanica. Također, nismo primijetili statistički značajne razlike između stanica tretiranih s retinoičnom kiselinom i onih tretiranih s kombinacijom retinoične kiseline i inhibitora PARP-1.

Morfološke promjene stanica nastale diferencijacijom kvantificirali smo mjerenjem duljine neurita. Diferencijacijom stanice neuroblastoma poprimaju karakterističan izdužen

oblik i izrastaju dugi, razgranati neuriti (Mazzacoli i sur. 2016). Stanice tretirane retinoičnom kiselinom već su prvi dan pokazale rast neurita u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, dok je 7. dan tretmana duljina neurita bila povećana za dva i pol puta u odnosu na kontrolu. Nakon 7. dana daljnji tretman nije uzrokovao promjenu morfologije. Cheung i suradnici (1991), koji su tretirali stanice s istom koncentracijom retinoične kiseline, ali u mediju s manjim postotkom seruma, također su uočili pojavu neurita 24 sata nakon tretmana, a nakon 7. dana nisu uočili daljnje promjene u njihovoj duljini. Obrada stanica samo inhibitorom PARP-1 nije uzrokovao morfološke promjene stanica, dok su stanice tretirane kombinacijom inhibitora PARP-1 i retinoične kiseline imale neurite jednake duljine kao i one tretirane samo retinoičnom kiselinom. Standardne devijacije duljine neurita bile su iznimno velike, budući da njihov rast ne prati normalnu distribuciju.

Proces diferencijacije stanica potvrdile su promjene u ekspresiji pojedinih gena. Pratili smo ekspresiju gena c-Myc, tPA, PARG i CD133. Transkripcijski faktor c-Myc regulira procese proliferacije i diferencijacije stanica te sudjeluje u regulaciji staničnog metabolizma. Uključen je u regulaciju kontrole staničnog ciklusa, sinteze proteina i metabolizma tumora, a pokazano je i da inhibira ekspresiju nekih tumor supresorskih gena (Eilers i Eisenman 2008). U većini staničnih tipova utječe na povećanje razine transkripcije i proliferaciju, a njegova inhibicija na smanjenje stope rasta. Kod stanica neuroblastoma SH-SY5Y provjerili smo ekspresiju gena c-Myc u nediferenciranim stanicama, stanicama diferenciranim retinoičnom kiselinom kroz 9 dana, kao i u stanicama obrađenim inhibitorom PARP-1. Stanice diferencirane retinoičnom kiselinom, bilo uz istovremeni tretman inhibitorom PARP-1 ili bez njega, imale su ekspresiju c-Myc smanjenu za oko 40% u odnosu na nediferencirane stanice. Tretman inhibitorom PARP-1 nije bitno mijenjao ekspresiju c-Myc.

Diferencijaciju stanica smo također pratili mjerenjem ekspresije tkivnog plazminogenog aktivatora (tPA). tPA ima ulogu u razgradnji fibrina prisutnog u krvnim ugrušcima, ali potencijalno sudjeluje i u diferencijaciju živčanih stanica. Naime Neuman i suradnici (1989) su pokazali da je diferencijacija stanične linije SH-SY5Y trima spojevima (retinoičnom kiselinom, forbol esterima i neuralnim faktorom rasta) popraćena povećanjem aktivnosti tPA. Forbol esteri su inducirali povećanje ekspresije urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA), koji je uključen u stanični invazivni rast i razgradnju tkiva. Retinoična kiselina inhibirala je indukciju uPA izazvanu forbol esterima. Mi smo pokazali da retinoična kiselina pojačava ekspresiju gena za tPA za oko 4 puta, što je u suglasnosti s radom Neumana i suradnika (1989). Stanice tretirane samo inhibitorom PARP-1 pokazale su smanjenje

ekspresije tPA za 30 % u odnosu na kontrolne stanice. Kod obrade stanica kombinacijom inhibitora PARP-1 i retinoične kiseline nije primijećena razlika u ekspresiji tPA, u odnosu na zaseban tretman retinoičnom kiselinom.

Također smo usporedili ekspresiju gena PARG kod diferenciranih i nediferenciranih stanica neuroblastoma, nakon tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1. PARG hidrolizira poli (ADP) ribozilne lance kojima je PARP-1 posttranslacijski promijenio proteine i time čini modifikaciju izazvanu PARP-1 reverzibilnom (Davidovic i sur. 2001). Tako PARG zajedno s PARP-1 sudjeluje u remodeliranju kromatina. U uvjetima diferencijacije i inhibicije PARP-1 kod stanične linije SH-SY5Y pokazali smo da sama inhibicija PARP-1 nije utjecala na ekspresiju PARG na razini mRNA, ali smo uočili da se njegova ekspresija povećala tretmanom retinoičnom kiselinom. Moguće je stoga da PARG sudjeluje u procesu diferencijacije stanica SH-SY5Y. Le May i suradnici (2012) pokazali su da PARG djeluje kao transkripcijski koaktivator gena ovisnih o aktivaciji receptora retinoične kiseline.

Kod diferenciranih stanica neuroblastoma analizirali smo i ekspresiju proteina CD133. Površinski glikoprotein CD133 je u mozgu gotovo jedinstveno karakteristika matičnih stanica te ga se može definirati kao njihov marker (Wu i Wu 2009). Singh i suradnici (2004) su otkrili da u nekoliko tipova tumora mozga stanice pozitivne na CD133 imaju sposobnost samoobnavljanja, diferencijacije i regeneracije tumora nakon ksenotransplantacije u modelne organizme. U našem istraživanju nismo uočili promjenu u ekspresiji CD133 u procesu diferencijacije. Ross i suradnici (2015) su pokazali da je ekspresija gena CD133 kod stanica N-tipa neuroblastoma (kojima pripada i linija SH-SY5Y) gotovo 5 puta manja nego kod stanica I-tipa. Stanice N-tipa i I-tipa neuroblastoma razlikuju se u morfologiji, biokemiji i sposobnosti metastaziranja. Dok stanice N-tipa eksprimiraju markere neuralnih stanica te su umjereno tumorigene, stanice I-tipa su iznimno tumorigene, sklone metastaziranju te posjeduju karakteristike matičnih stanica. Nakon što su Ross i suradnici (2015) stanične linije I-tipa potom diferencirali retinoičnom kiselinom, ekspresija CD133 se smanjila, ali ne i utišala. Stoga je moguće da nismo primijetili nikakav učinak zato što je ekspresija spomenutog gena u liniji SH-SY5Y već na niskoj razini.

Na temelju spomenutih rezultata možemo zaključiti da PARP-1 ne utječe na proces diferencijacije linije neuroblastoma SH-SY5Y, dok ih retinoična kiselina očekivano diferencira. Ipak, ključno je istaknuti da stanice različitih tipova neuroblastoma mogu biti specifične po setu gena koji eksprimiraju. Tako npr. dok se povećana aktivnost tkivnog plazminogenetskog aktivatora (tPA) uslijed tretmana retinoičnom kiselinom kod stanične linije SH-SY5Y smatra se jednim od znakova diferencijacije, kod srodne linije neuroblastoma SK-N-SH, koja se ne

može diferencirati, ekspresija tPA potaknuta retinoičnom kiselinom uključena je u procese invazivnog rasta kroz rekonstruiranu bazalnu membranu *in vitro*. Moguće je dakle da retinoična kiselina kod nekih staničnih tipova neuroblastoma povećava malignost (Tiberio i sur. 1997).

Drugi cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj PARP-1 i retinoične kiseline na staničnu liniju neuroglioblastoma koja ne pokazuje morfološke promjene diferencijacije. Stanice neuroglioblastoma H4 tretirali smo retinoičnom kiselinom, inhibitorom PARP-1 te njihovom kombinacijom kroz 14 dana. Tijekom uzgoja stanica nismo primijetili da je došlo do zastoja rasta stanici niti smo uočili morfološke znakove diferencijacije. Kako bismo utvrdili dolazi li ipak do promjena u ekspresiji pojedinih gena i proteina, mjerili smo aktivnost urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) nakon 24 sata i 14 dana tretmana. Dok nakon jednog dana tretmana nije bilo bitnih promjena u enzimskoj aktivnosti, nakon dva tjedna obrade retinoičnom kiselinom i njenom kombinacijom s inhibitorom PARP-1 aktivnost se povećala tri puta. Zato smo analizirali ekspresiju gena uključenih u regulaciju aktivnosti uPA. Također, potaknuti rezultatima aktivnosti uPA, analizirali smo ekspresiju gena krovnih transkripcijskih faktora i komponenti signalnih puteva uključenih u inicijaciju epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). Naime, tumorske stanice kroz proces EMT poprimaju svojstva stanica vezivnog tkiva koja im omogućavaju invazivni rast i metastaziranje, a u nekim slučajevima, ovi su procesi povezani s razvojem otpornosti na citostatike (Voulgari i Pintzas 2009). Sustav uPA ima važnu ulogu u remodeliranju ECM-a, a time i sa staničnom invazivnošću i metastaziranjem, te može biti element epitelno-mezenhimske tranzicije (Christ i sur. 1999; Smith i Marshall 2010). Aktivnost uPA se lokalizira njegovim vezanjem za receptor uPAR, a inhibira vezanjem inhibitora PAI-1, PAI-2 i PN-1 (Ullisse i sur. 2009). Analiza ekspresije mRNA uPA, uPAR i PAI-1 kod stanica neuroglioblastoma tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 kroz 9 dana pokazala je promjene u ekspresiji u odnosu na netretirane stanice. Ekspresija uPA bila je povećana preko 2 puta nakon obrade retinoičnom kiselinom te preko 3 puta nakon tretmana inhibitorom PARP-1. Zajednički tretman doveo je do povećanja ekspresije uPA oko 4 puta. Inhibicija PARP-1 je također povećala ekspresiju PAI-1 i uPAR dok je povećana ekspresija uslijed kombiniranog tretmana uočena je samo kod PAI-1, te je značajno manja od ekspresije uočene kod zasebnog tretmana s inhibitorom PARP-1. Rezultati upućuju da je inhibicija PARP-1 a kroz duži vremenski period izazvala povećanje ekspresije i uPA i PAI-1 mRNA, ali, moguće zbog usklađenog porasta i enzima i njegovog inhibitora, na razini aktivnosti enzima nije bilo povećanja u odnosu na kontrolu. Slični su rezultati dobiveni kod stanica glioblastoma (Madunić i sur. 2014) gdje inhibicija PARP-1 nije povećala aktivnost uPA, iako je djelovala na razinu

ekspresije mRNA komponenti sustava. Mogućnost utjecaja inhibicije PARP-1 na urokinazni sustav pokazana je međutim kod stanica glioblastoma obrađenim tvarima koje oštećuju DNA gdje je utjecala na porast urokinazne aktivnosti (Madunić i sur. 2014). PARP-1 može utjecati na sustav uPA preko regulacije transkripcije elemenata signalnih puteva uključenih u regulaciju uPA i PAI-1, kao što su Sp1, NFkB, p53, Ets-1 i AP1 (Wang i sur. 1998; Lengyel i sur. 1996; Huang i sur. 2009; Nagamine i sur. 2005; Shetty i sur. 2008; Legrand i sur. 2013). Regulacija razine i aktivnosti svih elemenata sustava uPA je iznimno složena (Nagamine i sur. 2005). Količina proteina u stanici nije uvijek razmjerna stopi transkripcije mRNA zbog mehanizama regulacije degradacije mRNA ili inhibicije translacije (Vogel i sur. 2010). PAI-1, npr. ima takve mehanizme regulacije (Nagamine i sur. 2005). Zanimljivo je kako u tijekom staničnog reprogramiranja u epitelno-mezenhimskoj tranziciji postoji koordinacija ekspresije proteina uPA i PAI-1, što utječe na ukupnu razinu aktivnosti (Sánchez-Tilló i sur. 2013). Stoga bi se Western analizom trebala provjeriti razina ekspresije proteina elemenata sustava uPA nakon spomenutih tretmana. Time bi dobili bolji uvid u regulaciju transkripcije i translacije prilikom EMT-a.

Osim sustava uPA kod stanica neuroglioblastoma H4 dugotrajno tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1, analizirali smo i aktivnost nekoliko signalnih puteva kod netretiranih i tretiranih stanica. Jedan od njih je bio signalni put Notch, inače uključen je u brojne fiziološke procese, kao što je određivanje stanične sudbine prilikom embrionalnog razvoja i razvoja tkiva. Put Notch ima ulogu i u procesima diferencijacije živčanog tkiva (Zhou i sur. 2010), ali i tumorigeneze gdje je povezan s procesima proliferacije, EMT i stjecanja otpornosti na terapeutike (Lai 2004; Capaccione i Pine 2013). Aktivacija ovog puta utječe na povećanje ekspresije niza gena, od kojih su najčešće mete transkripcijski faktori Hes-1 i Hes-5. Inhibicija PARP-1 nije utjecala na transkripciju gena Hes-1 i Hes-5. Retinoična kiselina je dovela do povećanja ekspresije i Hes-1 i Hes-5 što bi upućivalo na aktivaciju signalnog puta Notch. Aktivacija ovog puta u nekim je tumorima poticala proliferaciju i sprječavala apoptozu (Rizzo i sur. 2008). S druge strane, Ying i suradnici (2011) su pokazali da je kod tumorskih matičnih stanica glioblastoma retinoična kiselina smanjila ekspresiju gena obitelji Hes i Hey. Stanice su prestale proliferirati te su pokazivale morfološke znakove diferencijacije (Ying i sur. 2011).

Drugi signalni put kojeg smo istražili je put TGF- β . TGF- β je ključni aktivator EMT. Regulira diferencijaciju, migraciju, proliferaciju i preživljavanje stanica (Acloque i sur. 2009; Massague 2008). Ima ulogu tumor supresora u normalnim stanicama i nekim tumorima u njihovoj ranoj fazi, budući da povećava ekspresiju inhibitora staničnog ciklusa i PAI-1.

Međutim, u kasnijim fazama razvoja tumora potiče invaziju i metastaziranje, poticanjem epitelno-mezenhimske tranzicije i angiogeneze (Morrison i sur. 2013). Put TGF- β je povezan i s djelovanjem PARP-a. Naime, Pu i suradnici (2014) su uočili da je inaktivacija PARP-1 ciljanom delecijom dovela je do povećanja ekspresije proteina TGF- β i SMAD što je koreliralo s indukcijom EMT. PARP-1 je modificirao transkripcijski faktor Smad (koji se nalazi nizvodno od receptora TGF- β) te tako modulirao aktivnost ovog puta. Kod stanica H4 tretiranih inhibitorom PARP-1 došlo je do povećanja ekspresije gena TGF- β , dok tretman retinoičnom kiselinom nije utjecao na ovaj put. Ovi rezultati su u skladu s radom Lang i suradnici (2014) koji su pokazali imunohistokemijskom metodom da signalni put TGF- β povećava razinu proteina uPA i PAI-1. Stoga je moguće da PARP-1 utječe na ekspresiju elemenata sustava uPA preko regulacije transkripcije TGF- β .

Budući da se urokinazni sustav smatra dijelom programa EMT, ispitali smo i ekspresiju krovnih transkripcijskih faktora EMT-a. Istraživanja su pokazala da tumorske matične stanice pokazuju veliku plastičnost i, procesom EMT, pod utjecajem signala iz okoliša, mijenjaju fenotip i dobivaju svojstva metastaziranja. Krovni transkripcijski faktori za EMT utječu na promjenu ekspresije niza nizvodnih gena, gena uključenih u održavanje međustaničnih kontakata, stanične polarnosti, strukture citoskeleta, razgradnje ECM-a. Također reprimiraju gene karakteristične za epitelne stanice, a povećavaju ekspresiju onih karakterističnih za vezivno tkivo (Puisieux i sur. 2014). Kod stanica neuroblastoma H4 dugotrajno tretiranih retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 ispitali smo ekspresiju krovnih gena EMT, Zeb1, Twist1, Snail1 i Snail2. Sama inhibicija PARP-1 dovela je povećanja ekspresije 3 gena, Zeb1, Snail1 i Snail2, ali najveći utjecaj primijećen je kod Zeb1 i Snail1. Retinoična kiselina jedino je povećala ekspresiju gena Zeb1, značajno manje nego što je to učinila inhibicija PARP-1. Kombinacija djelovanja inhibitora PARP-1 i retinoične kiseline uzrokovala je veće povećanje ekspresije Zeb1 i Snail1 nego djelovanje samog inhibitora PARP-1. Kod gena Zeb1 to bi se moglo pripisati mogućem aditivnom učinku dvaju tretmana., ali kod Snail1 retinoična kiselina nije pokazala nikakav utjecaj, a standardna devijacija rezultata ekspresije kod kombiniranom tretmana iznimno je velika. Stoga bi se taj rezultat trebao uzeti sa zadržkom. Svi spomenuti geni regulirani su, među ostalim, i signalnim putem TGF- β (Morisson i sur. 2013) Stoga moguće da je povećanje ekspresije TGF- β uslijed inhibicije PARP-1 u našem istraživanju rezultiralo aktivacijom transkripcije krovnih transkripcijskih faktora EMT-a. U literaturi nalazimo niz istraživanja koja potvrđuju ulogu spomenutih transkripcijskih faktora u promociji EMT. Tako su Myung i suradnici (2014) pokazali da je inhibicija ekspresije gena Snail uzrokovala smanjenje proliferacije, vijabilnosti i invazivnosti stanica glioblastoma. Joseph i suradnici

(2014) pokazali su da TGF- β može potaknuti pojavu fenotipa mezehimskih stanica kod stanične linije glioblastoma. Također, dokazali su da taj proces uključuje i aktivaciju proteina SMAD2 i ZEB1. Sánchez-Tilló i suradnici (2013) pokazali su da ZEB1 potiče ekspresiju uPA te inhibira ekspresiju PAI-1. Njihovi rezultati ukazuju na to da bi promjene u sustavu uPA mogle biti posljedica promjena signaliziranja TGF- β , te odgovorne za migraciju i invazivnost stanica tumora posredovanu aktivnošću transkripcijskog faktora ZEB1. Rodríguez i suradnici (2013) su pak pokazali da je inhibicija PARP-1 kod metastatskog melanoma uzrokovala smanjenje ekspresije gena Snail1 i vimentina, te je povezana sa smanjenjem metastatskog potencijala stanica melanoma. Stoga je moguće da inhibicija PARP-1, kao i tretman retinoičnom kiselinom, pokazuje različite učinke kod različitih tumora.

Analiza ekspresije gena kod stanica neuroglioblastoma H4 nakon dugotrajnog tretmana retinoičnom kiselinom i inhibitorom PARP-1 potvrdila je da ove stanice ne odgovaraju na tretman retinoičnom kiselinom promjenom proliferacije (podaci nisu pokazani) i indukcijom diferencijacije, međutim, pokazano je da dugotrajna obrada stanica uzrokuje promjene ekspresije. Povećana je aktivnost sustava uPA. Inhibicija PARP-1 nije utjecala na promjenu aktivnosti uPA, ali jest na razinu ekspresije uPA i PAI-1, TGF- β te krovnih gena EMT. Stanično specifičan ishod djelovanja TGF- β može biti posljedica pojave da pojedini geni gube sposobnost odgovaranja na signale puta TGF- β uslijed promjena strukture kromatina u procesu tumorigeneze (Chen i sur. 2001).

Dosadašnja istraživanja dovela su do brojnih napredaka u liječenju tumora. Međutim, oni još uvijek predstavljaju veliki zdravstveni problem diljem svijeta. Jedan od izazova prilikom liječenja tumora je njihova heterogenost, kako između pacijenata, tako i između staničnih populacija u samom tumoru (<https://www.nature.com/subjects/tumour-heterogeneity>; Zugazagoitia i sur. 2016). U našem istraživanju ukazali smo na ograničenja primjene retinoične kiseline kao diferencijacijske terapije kod pacijenata oboljelih od različitih tipova neuroblastoma. Naime mi smo pokazali da, iako kod jedne linije neuroblastoma retinoična kiselina potiče diferencijaciju, kod druge linije, koja se ne može diferencirati retinoičnom kiselinom, ona potencijalno ima ulogu u staničnoj invazivnosti. Stoga je nužno bolje razumjeti biologiju tumora, ali i pronaći alternativne mehanizme diferencijacije linija rezistentnih na retinoičnu kiselinu. Također, pokazali smo da inhibicija PARP-1, jedan od pristupa liječenja nekih tumora, potiče proces epitelno-mezehimске tranzicije kod stanične linije neuroglioblastoma. Ona djeluje preko aktivacije signalnog puta TGF- β , povećanja transkripcije krovnih transkripcijskih faktora EMT-a i elemenata urokinaznog sustava. Ipak postojanje

dokaza da inhibicija PARP-1 kod nekih tumora uzrokuje zastoj u EMT-u ukazuje na moguće razlike u mehanizmu djelovanja inhibitora PARP-1 kod različitih tumora. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razjasnio utjecaj PARP-1 u procesu epitelno-mezenhimske tranzicije neuroglioblastoma.

6. ZAKLJUČAK

1. Retinoična kiselina potiče proces diferencijacije kod stanične linije neuroblastoma SH-SY5Y. Ona inhibira rast stanica te potiče pojavu morfoloških karakteristika diferencijacije, kao što su rast neurita i promjena oblika stanice. Stanice tretirane retinoičnom kiselinom pokazuju obrazac ekspresije gena karakterističan za proces diferencijacije, kao što je smanjenje ekspresije gena c-Myc i povećanje ekspresije gena tPA.
2. Inhibicija aktivnosti PARP-1 ne utječe na diferencijaciju stanica SH-SY5Y. Ne uzrokuje zastoj u proliferaciji, pojavu morfoloških znakova diferencijacije niti bitno utječe na ekspresiju gena ključnih u procesu diferencijacije neuroblastoma. U kombinaciji s retinoičnom kiselinom ne dovodi do povećanja efikasnosti obrade.
3. Retinoična kiselina ne potiče proces diferencijacije kod stanične linije neuroglioblastoma H4; tijekom dugotrajne obrade stanice ne pokazuju morfološke karakteristike diferencijacije niti smanjenje proliferacije. Retinoična kiselina dovodi do povećanja aktivnosti urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA), a time i stanične invazivnosti.
4. Inhibicijom PARP-1 kod stanica H4 povećava se ekspresija komponenti sustava urokinaznog aktivatora plazminogena, uPA i PAI-1, ali ne i aktivnost urokinaze. Povećava se i ekspresija mRNA TGF- β i krovnih transkripcijskih faktora epitelnomezencehimske tranzicije Zeb-1, Twist, Snail-1 i Snail-2. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se bolje razumio mehanizam regulacije sustava uPA.

7. POPIS LITERATURE

- Abemayor E, Sidell N (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Env Heal Perspect* **80**: 3–15.
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* **119**: 1438–1449.
- Agholme L, Lindström T, Kgedal K, Marcusson J, Hallbeck M (2010). An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimer's Dis* **20**: 1069–1082.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Rafi M, Roberts K, Walter P (2008). Molecular biology of the cell. *Garl Sci, New York* .
- Almeida VR, Vieira IA, Buendia M, Brunetto AT, Gregianin LJ, Brunetto AL, *i sur* (2016). Combined Treatments with a Retinoid Receptor Agonist and Epigenetic Modulators in Human Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol* doi:10.1007/s12035-016-0250-3.
- Amé JC, Spenlehauer C, Murcia G De (2004). The PARP superfamily. *BioEssays* **26**: 882–893.
- Armstrong L (2013). Epigenetics. Garland Science, New York
- Brodeur GM, Maris JM (2006). Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Caiafa P, Guastafierro T, Zampieri M (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J* **23**: 672–678.
- Capaccione KM, Pine SR (2013). The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis* **34**: 1420–1430.
- Chen CR, Kang Y, Massague J (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor β growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 992–999.
- Chen T, Dent SYR (2013). Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet* **15**: 93–106.
- Cheung YT, Lau WKW, Yu MS, Lai CSW, Yeung SC, So KF, *i sur* (2009). Effects of all-trans-

- retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* **30**: 127–135.
- Christ G, Kostner K, Zehetgruber M, Binder BR, Gulba D, Huber K (1999). Plasmin activation system in restenosis: Role in pathogenesis and clinical prediction? *J Thromb Thrombolysis* **7**: 277–285.
- Cimmino F, Pezone L, Avitabile M, Acierno G, Andolfo I, Capasso M, *i sur* (2015). Inhibition of hypoxia inducible factors combined with all-trans retinoic acid treatment enhances glial transdifferentiation of neuroblastoma cells. *Sci Rep* **5**: 11158.
- Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985) Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* **44**: 139–266
- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**: 7–13.
- Dragu DL, Necula LG, Bleotu C, Diaconu CC, Chivu-Economescu M (2015). Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells* **7**: 1185–201.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577–584.
- Eilers M, Eisenman RN (2008). Myc' s broad reach. *Genes Dev* **22**: 2755–2766.
- Gao F, Kwon SW, Zhao Y, Jin Y (2009). PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation. *J Biol Chem* **284**: 22263–22273.
- Gartner LP, Hiatt JL (2012). Color Atlas and Text of Histology. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Ghisso JAA (2002). Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* **21**: 2513–2524.
- Hansen L, Sigman C, Andreola F, Ross S, Kelloff G, Luca L De (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**: 1271–1279.
- Huang D, Wang Y, Yang C, Liao Y, Huang K (2009). Angiotensin II promotes poly(ADP-ribosyl)ation of c-Jun/c-Fos in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* **46**: 25–32.

- Huang D, Wang Y, Wang L, Zhang F, Deng S, Wang R, *et al* (2011). Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 is Indispensable for Transforming Growth Factor- β Induced Smad3 Activation in Vascular Smooth Muscle Cell. *PLoS One* **6**: 14–16.
- Jiang BH, Tseng WL, Li HY, Wang ML, Chang YL, Sung YJ, *et al* (2015). Poly(ADP-Ribose) polymerase 1: Cellular pluripotency, reprogramming, and tumorigenesis. *Int J Mol Sci* **16**: 15531–15545.
- Jögi A, Vaapil M, Johansson M, Pålman S (2012). Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci* **117**: 217–24.
- Joseph JV, Conroy S, Tomar T, Eggens-Meijer E, Bhat K, Copray S, *et al* (2014). TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis* **5**: e1443.
- Jubin T, Kadam A, Gani AR, Singh M, Dwivedi M, Begum R (2016). Poly ADP-ribose polymerase-1: Beyond transcription and towards differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 1–13doi:10.1016/j.semcdb.2016.07.027.
- Kalluri R, Neilson EG (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112**: 1776–1784.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420–1428.
- Keller G (2005). Embryonic stem cell differentiation : emergence of a new era in biology and medicine. 1129–1155doi:10.1101/gad.1303605.).
- Kendall RT, Feghali-Bostwick CA (2014). Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol* **5 MAY**: 1–13.
- Kjøller L, Hall A (2001). Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J Cell Biol* **152**: 1145–1157.
- Korblin, M, Estrov Z (2003). Adult stem cells for tissue repair: a new therapeutic concept. *N Engl J Med* **349**: 570-582.
- Krishnakumar R, Kraus WL (2010). The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol Cell* **39**: 8–24.

- Lai EC (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**: 965–73.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 178–196.
- Lang DS, Marwitz S, Heilenkötter U, Schumm W, Behrens O, Simon R, *i sur* (2014). Transforming growth factor-beta signaling leads to uPA/PAI-1 activation and metastasis: A study on human breast cancer tissues. *Pathol Oncol Res* **20**: 727–732.
- Legrand AJ, Choul-Li S, Spriet C, Idziorek T, Vicogne D, Drobecq H, *i sur* (2013). The Level of Ets-1 Protein Is Regulated by Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Cancer Cells to Prevent DNA Damage. *PLoS One* **8**
- LeMay N, Iltis I, Amé JC, Zhovmer A, Biard D, Egly JM, *i sur* (2012). Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase Regulates Retinoic Acid Receptor-Mediated Gene Expression. *Mol Cell* **48**: 785–798.
- Lengyel E, Gum R, Stepp E, Juarez J, Wang H, Boyd D (1996). Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by an ERK1-dependent signaling pathway in a squamous cell carcinoma cell line. *J Cell Biochem* **61**: 430–443.
- Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL (2007). uPAR induces epithelial–mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol* **178**: 425–436.
- Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB (2001). Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* **90**: 105–156.
- Madunić J, Antica M, Cvjetko P, Požgaj L, Matulić M (2014). Modulation of urokinase plasminogen activator system by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition. *Cytotechnology* **68**: 783–794.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG (2003). Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Curr Drug Metab* **4**: 1–10.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007). Neuroblastoma. *Lancet* **369**: 2106–2120.
- Massagué J (2008). TGFb in cancer. *Cell* **134**: 215–230.
- May N Le, Iltis I, Amé JC, Zhovmer A, Biard D, Egly JM, *i sur* (2012). Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase Regulates Retinoic Acid Receptor-Mediated Gene Expression. *Mol Cell*

48: 785–798.

- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, *i sur* (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**: 1165–73.
- Mazzoccoli C, Ruggieri V, Tataranni T, Agriesti F, Laurenzana I, Fratello A, *i sur* (2016). N-acetylaspartate (NAA) induces neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cell line and sensitizes it to chemotherapeutic agents. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.8454.
- Mehta K (2003). Retinoids as regulators of gene transcription. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, **17**(1): 1-12.
- Morisson CD, Parvani JG, Schiemann WP (2013). The Relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET Programs.pdf. *Cancer Lett* **341**: 1–22.
- Myung JK, Choi SA, Kim SK, Wang KC, Park SH (2014). Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* **7**: 1977–1987.
- Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P (2005). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost* **93**: 661–675.
- Neuman T, Stephens RW, Salonen EM, Timmusk T, Vaheri A (1989). Induction of Morphological Differentiation of Human Neuroblastoma Cells is Accompanied by Induction of Tissue-Type Plasminogen Activator. *J Neurosci Res* **23**: 274–281.
- Pardal R, Molofsky A, He S, Morrison S (2005). Stem Cell Self-Renewal and Cancer Cell Proliferation Are Regulated by Common Networks That Balance the Activation of Proto-oncogenes and Tumor Suppressors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **LXX**: .
- Pecorino L (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford.
- Pu H, Horbinski C, Hensley PJ, Matuszak EA, Atkinson T, Kyprianou N (2014). PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis. *Carcinogenesis* **35**: 2592–2601.
- Puisieux A, Brabletz T, Caramel J (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription

- factors. *Nat Cell Biol* **16**: 488–94.
- Radisky DC (2005). Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* **118**: 4325–4326.
- Ridley AJ (2011). Life at the leading edge. *Cell* **145**: 1012–1022.
- Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* **107**: 80–5.
- Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L (2008). Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene* **27**: 5124–5131.
- Rodríguez MI, Peralta-Leal A, O’Valle F, Rodriguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, *i sur* (2013). PARP-1 Regulates Metastatic Melanoma through Modulation of Vimentin-induced Malignant Transformation. *PLoS Genet* **9**: .
- Roleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* **10**: 293–301.
- Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* **71**: 741–7.
- Ross RA, Walton JD, Han D, Guo H-F, Cheung N-K V. (2015). A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. *Stem Cell Res* 2015 **15**: 419–426.
- Sachs L (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature* **274**: 535-539.
- Sánchez-Tilló E, Barrios O De, Siles L, Amendola PG, Darling DS, Cuatrecasas M, *i sur* (2013). ZEB1 promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1. *Clin Cancer Res* **19**: 1071–1082.
- Santibanez JF (2013). Transforming Growth Factor-Beta and Urokinase-Type Plasminogen Activator : Dangerous Partners in Tumorigenesis — Implications in Skin Cancer. *ISRN Dermatol* **2013**: 26 str.
- Sell S (2005). Leukemia: stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. *Stem Cell Rev* **1**: 197–205.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, *i sur* (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821–5828.

- Shetty P, Velusamy T, Bhandary YP, Shetty RS, Liu MC, Shetty S (2008). Urokinase expression by tumor suppressor protein p53: A novel role in mRNA turnover. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**: 364–372.
- Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp* 1–12doi:10.3791/53193.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, *i sur* (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**: 396–401.
- Smith H, Marshall C (2010). Regulation of cell signalling by {uPAR.}. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 23–36.
- Solozobova V (2011). P53 in Stem Cells. *World J Biol Chem* **2**: 202.
- Sun SY, Wan H, Yue P, Hong WK, Lotan R (2000). Evidence that retinoic acid receptor β induction by retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Biol Chem* **275**: 17149–17153.
- Tang XH, Gudas LJ (2011). Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol* **6**: 345–364.
- Tiberio A, Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR (1997). Retinoic acid-enhanced invasion through reconstituted basement membrane by human SK-N-SH neuroblastoma cells involves membrane-associated tissue-type plasminogen activator. *Int J cancer* **73**: 740–8.
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9(1): 32-71.
- Vogel C, Abreu R de S, Ko D, Le S-YY, Shapiro BA, Burns SC, *i sur* (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. TL - 6. *Mol Syst Biol* **6 VN-re**: 400.
- Voulgari A, Pintzas A (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1796**: 75–90.
- Wang X, Ohnishi K, Takahashi a, Ohnishi T (1998). Poly(ADP-ribosyl)ation is required for p53-dependent signal transduction induced by radiation. *Oncogene* **17**: 2819–2825.

- Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006). Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. *Cancer Res* **66**: 1883–1890.
- Wu Y, Wu PY (2009). CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells Dev* **18**: 1127–1134.
- Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* **12**: 10.
- Yan M, Liu Q (2016). Differentiation therapy: A promising strategy for cancer treatment. *Chin J Cancer* **35**: 10–12.
- Yang L, Huang K, Li X, Du M, Kang X, Luo X, *i sur* (2013). Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 as a cell cycle regulator through modulating Sp1 mediated transcription in human hepatoma cells. *PLoS One* **8**: e82872.
- Ying M, Wang S, Sang Y, Sun P, Lal B, Goodwin C, *i sur* (2011). NIH Public Access. *Oncogene* **30**: 3454–3467.
- Zhou ZD, Kumari U, Xiao ZC, Tan EK (2010). Notch as a molecular switch in neural stem cells. *IUBMB Life* **62**: 618–623.
- Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther* **38**: 1551–1566.

Web izvori:

<http://www.mpbio.com/product.php?pid=02190269>

<https://www.nature.com/subjects/tumour-heterogeneity>

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI:

Ime i prezime: Martina Grubar
Datum i mjesto rođenja: 1. srpnja 1992., Šibenik
Adresa: Zrinsko-Frankopanska 26, 23000 Zadar
Telefon: 023/211-863, 098 196-6805
E-mail: martina.grubar.42@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2014. – 2017. **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)
2011. – 2014. **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

DODATNO OBRAZOVANJE I ISKUSTVO

- listopad 2016. – prosinac 2016. **Erasmus stručna praksa**
University of Edinburgh, Centre for regenerative medicine
Projekt: Thymistem
Mentorica: Prof Clare Blackburn
- travanj 2016. – listopad 2016. **Izrada diplomskog rada**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
- listopad 2015. – travanj 2016. **Modul Računalna biologija**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju
- veljača 2014. – lipanj 2014. **Laboratorijska praksa**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za mikrobiologiju
Mentorica: prof. dr. sc. Dijana Škorić
- veljača 2012. **Noć biologije**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet