

# Uloga signalnog puta TGFbeta u regulaciji sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora

---

**Puljić, Dominik**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:200670>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**Dominik Puljić**

**Uloga signalnog puta TGF $\beta$  u regulaciji  
sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

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

*U prvom redu, želim se zahvaliti mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Matulić što svoj poziv obavlja izvanredno kao što njena titula kaže. Najiskrenije hvala na nesebično prenesenom znanju i vještinama koje će mi pomoći i u labosu i u životu. Neizmjereno hvala na razumijevanju i strpljenju sa mnom u teškim životnim vremenima.*

*Iako još nema titulu izvanrednog, u svom radu sa studentima je itekako izvanredan. Najljepše hvala asistentu Luki koji me najviše učio vršenju apostolata kroz posao, poticao kad je negdje zapelo i savjetovao kad god je trebalo.*

*Nadalje, hvala svim zaposlenicima Biološkog odsjeka koji su mi uljepšali studiranje i povećali moju ljubav prema toliko čudesno stvorenom svijetu. Kroz studij sam se naučio diviti svemu stvorenom na molekularnoj razini i to me danas čini jako sretnim.*

*Veliko hvala svim mojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene cijelo vrijeme studiranja, pomagali mi i bodrili me da ustrajem i borim se kad je bilo najteže.*

*Posebno hvala mojoj seki Dominiki, burazeru Ivanu i našem anđelu na Nebu koji nas sve zajedno čuva. Vi ste moja snaga. Voli vas vaš brajo.*

*Neizmjereno hvala mojoj majci Zdravki i ocu Domagoju na daru života. Bez vaše ljubavi i otvorenosti životu ja sad ne bi bio tu gdje jesam. Voli vas vaš sin.*

*A najviše hvala dragome Bogu koji me jedini može istinski razumijeti. Hvala na svemu što sam prošao jer me to učinilo boljim čovjekom. Veselim se svemu što me još čeka.*

*Ovaj rad posvećujem svojoj budućoj obitelji i Sv. Josipu u znak zahvale.*

*„Prije, kada je ljudsko znanje-znanost-bilo vrlo ograničeno, činilo se vrlo mogućim da samo jedan učen pojedinac može stati u obranu i načiniti apologiju naše Svete Vjere. Danas, s proširenjem i produbljenjem moderne znanosti, potrebno je da apologeti podijele posao kako bi na svim područjima znanstveno branili Crkvu. Ti se...ne možeš činiti nevještim pred tom obvezom.“*

*(Put, Sv. Josemaría Escrivá)*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Uloga signalnog puta TGF $\beta$ u regulaciji sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora**

Dominik Puljić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Urokinazni plazminogeni aktivator izvanstanična je proteaza koja sudjeluje u procesima razgradnje izvanstaničnog matriksa te može biti regulirana sustavom koji upravlja procesima epitelno-mezenhimske tranzicije. Procesi tranzicije često su regulirani putem TGF $\beta$  koji potiče ekspresiju gena tipičnih za mezenhimski fenotip, kao i migraciju. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu signalnog puta TGF $\beta$  u regulaciji sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA) i u mehanizmu djelovanja natrijevog salicilata na promjenu aktivnosti uPA kod nekoliko staničnih linija tumora. Uzgojene su stanice glioblastoma transficirane plazmidom sa sekvencom za TGF $\beta$  koje su imale veću aktivnost urokinaze u odnosu na roditeljske, brže su migrirale, ali su im stopa proliferacije i morfologija bile nepromijenjene. Analizom proteina nije detektirano povećanje ekspresije urokinaze, ali jest njenog inhibitora. Inhibicija receptora TGF $\beta$  smanjila je bazalnu aktivnost urokinaze glioblastomskih stanica, kao i aktivnost induciranu obradom natrijevim salicilatom. Kod drugih dviju staničnih linija inhibicija puta TGF $\beta$  nije smanjila aktivnost urokinaze. Zaključeno je da TGF $\beta$  može sudjelovati u regulaciji sustava urokinaze, na stanično specifičan način.

(68 stranica, 25 slika, 2 tablice, 91 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: TGF $\beta$ , urokinazni plazminogeni aktivator, epitelno-mezenhimska tranzicija, natrijev salicilat

Voditelj rada: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Neposredni voditelj rada: Luka Horvat, mag. biol. mol.

Ocjenitelji: Dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Rad prihvaćen: 19. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **The role of the TGF $\beta$ signaling pathway in regulation of urokinase plasminogen activator system**

Dominik Puljić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Urokinase plasminogen activator is an extracellular protease involved in the processes of extracellular matrix remodelling which is supposed to be regulated by mechanism of epithelial-mesenchymal transition. These processes can be regulated by TGF $\beta$  which induce expression of genes typical for mesenchymal phenotype, as well as migration. The aim of this investigation was to establish the role of TGF $\beta$  signalling pathway in urokinase plasminogen activator (uPA) system regulation and in the mechanism of uPA activity changes caused by sodium salicylate in several tumour cell lines. We analysed glioblastoma cells transfected with plasmid containing TGF $\beta$  sequence and found higher urokinase activity and increased migration in comparison with parental cells, but proliferation rate and morphology were unchanged. Protein analysis did not reveal increase in urokinase expression but plasminogen inhibitor expression was upregulated. TGF $\beta$  receptor inhibition decreased the basal urokinase activity in glioblastoma cells, as well as activity induced by sodium salicylate treatment. In two other cell lines TGF $\beta$  signalling inhibition did not decrease urokinase activity. It was concluded that TGF $\beta$  can participate in urokinase system regulation, but in a cell specific way.

(68 pages, 25 figures, 2 tables, 91 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: TGF $\beta$ , urokinase plasminogen activator, epithelial-mesenchymal transition, sodium salicylate

Supervisor: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Assistant Supervisor: Luka Horvat, dipl. ing. mol. biol.

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. Nada Oršolić, Prof.

Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Thesis accepted: September 19, 2018

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa.....	1
1.2. Sustav plazminogenog aktivatora .....	2
1.2.1. Aktivacija plazmina preko sustava uPA .....	3
1.3. Sustav urokinaznog plazminogenog aktivatora .....	4
1.3.1. Regulacija sustava uPA .....	5
1.4. Signalni put transformirajućeg faktora rasta $\beta$ .....	7
1.4.1. Funkcije signalnog puta TGF $\beta$ .....	7
1.4.2. Komponente signalnog puta TGF $\beta$ .....	9
1.4.3. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na metastaziranje .....	11
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1. Uzgoj stanica u kulturi .....	14
3.1.1. Stanične linije .....	14
3.1.2. Odmrzavanje stanica.....	14
3.1.3. Presađivanje stanica.....	14
3.2. Brojanje stanica pomoću hemocitometra .....	15
3.3. Obrada stanica .....	15
3.4. Praćenje staničnog rasta metodom bojanja kristal ljubičastim.....	16
3.5. Testovi migracije stanica.....	16
3.5.1. Test „zarastanja“ .....	16
3.5.2. Test migracije u komoricama .....	17
3.6. Uzgoj i izolacija plazmida.....	18
3.6.1. Spektrofotometrijska provjera kvalitete plazmidne DNA .....	20
3.7. Transfekcija stanica.....	20

3.8. Izolacija i provjera kvalitete RNA.....	20
3.8.1. Provjera kvalitete RNA gel elektroforezom .....	21
3.9. Obrnuto prepisivanje RNA u cDNA .....	22
3.9.1. Lančana reakcija polimerazom ( <i>PCR</i> ).....	22
3.9.2. Provjera uspješnosti reakcije <i>PCR</i> gel elektroforezom .....	23
3.10. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu ( <i>RT-qPCR</i> ).....	23
3.11. Određivanje aktivnosti uPA metodom radijalne kazeinolize .....	25
3.12. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	26
3.13. Analiza proteina metodom <i>Western blot</i> .....	26
3.13.1. Razdvajanje proteina SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu.....	26
3.13.2. Prijenos proteina na membranu i imunodetekcija .....	27
3.14. Statistička obrada podataka .....	28
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>29</b>
4.1. Utjecaj inhibicije signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica A1235 .....	29
4.1.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS .....	29
4.1.2. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s MNNG.....	30
4.2. Karakterizacija stanične linije A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$ .....	31
4.2.1. Analiza ekspresije TGF $\beta$ u stanicama TA metodom <i>RT-qPCR</i> .....	31
4.2.2. Usporedba morfolgije roditeljskih stanica A1235 i stanica TA .....	32
4.2.3. Krivulja rasta roditeljskih stanica A1235 i stanica TA.....	33
4.2.4. Utjecaj TGF $\beta$ na aktivnost uPA kod roditeljskih stanica A1235 i stanica TA.....	33
4.3. Utjecaj natrijevog salicilata na stanice TA.....	34
4.3.1. Utjecaj natrijevog salicilata na aktivnost uPA kod stanica TA .....	34
4.3.2. Utjecaj natrijevog salicilata na ekspresiju TGF $\beta$ i proteina urokinaznog sustava.....	36
4.3.3. Utjecaj natrijevog salicilata na migraciju stanica TA.....	38
4.3.3.1. Analiza migracije stanica TA testom migracije u komoricama .....	38
4.3.3.2. Analiza migracije stanica TA testom „zarastanja“ .....	38



4.3.4. Analiza ekspresije gena u stanicama A1235 i TA metodom <i>RT-qPCR</i> .....	40
4.4. Utjecaj TGF $\beta$ iz kondicioniranog medija na aktivnost uPA kod stanica A1235 .....	41
4.5. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica A1235.....	43
4.6. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica A2182 .....	44
4.6.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS .....	44
4.6.2. Utjecaj TGF $\beta$ na aktivnost uPA kod stanica A2182.....	45
4.6.3. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica A2182.....	46
4.7. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231 .....	47
4.7.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS .....	47
4.7.2. Utjecaj TGF $\beta$ na aktivnost uPA kod stanica MDA MB-231.....	48
4.7.3. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica MDA MB-231 .....	49
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>51</b>
5.1. Uloga TGF $\beta$ u regulaciji sustava uPA.....	51
5.2. Uloga TGF $\beta$ u mehanizmu djelovanja NaS na promjenu sustava uPA .....	54
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>58</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>59</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>68</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Remodeliranje izvanstaničnog matriksa

Izvanstanični matriks (engl. *extracellular matrix*; ECM) trodimenzionalna je struktura prisutna u svim tkivima i esencijalna je za život. Svaki organ ima ECM s jedinstvenim sastavom ovisnim o karakteristikama stanica koje ga proizvode. Uloga ECM nije samo pružanje fizičke potpore za integritet i elastičnost tkiva, nego je to dinamična struktura u interakciji sa stanicama koja se stalno remodelira i kontrolira homeostazu tkiva (Hynes 2009). Tristotinjak proteina poput proteoglikana, kolagena i glikoproteina tvori srž ECM. Postoje i mnogi proteini povezani s ECM koji nisu dio same strukture ECM, ali su važni za njegovo remodeliranje. To su faktori rasta, citokini, mucini, lektini, galektini, semaforini, pleksini i modificirajući enzimi uključeni u umrežavanje. Postoje dva glavna tipa ECM koji se razlikuju s obzirom na lokaciju i sastav. To su intersticijski matriks koji okružuje stanice vezivnog tkiva i bazalna membrana kao posebni oblik koja okružuje i razdvaja različite vrste tkiva i organa (Bonnans i sur. 2014).

Komponente ECM koje imaju ulogu liganda ulaze u interakciju sa staničnim membranskim receptorima te tako sudjeluju u regulaciji adhezije, migracije, proliferacije, apoptoze, preživljenja ili diferencijacije. ECM može lokalno osloboditi faktore rasta poput epidermalnog ili fibroblastnog faktora rasta, ili molekule WNT, amfiregulina i transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ; TGF $\beta$ ). ECM može otpuštati male molekule nastale cijepanjem strukturnih proteina te tako regulirati svoju arhitekturu i utjecati na ponašanje stanica (Hynes 2009). Povrh toga, stanice stalno remodeliraju ECM putem sinteze, degradacije i kemijskih modifikacija strukturnih molekula. Ovi procesi su složeni i moraju biti strogo regulirani radi održavanja homeostaze tkiva i zacijeljivanja ozljeda, budući da bi u protivnom moglo doći do patoloških stanja i ubrzanja progresije bolesti te nastanka tumora (Frantz i sur. 2010; Lu i sur. 2011).

Proteini ECM mogu biti pocijepani proteazama iz različitih obitelji proteaza. Tu spadaju metaloproteinaze, adamalizini, meprini te aspartatne, cisteinske, serinske i treoninske proteaze (Bonnans i sur. 2014). Najvažniju ulogu među njima imaju matriksne metaloproteinaze (MMP) čija je aktivnost niska u normalnim uvjetima, ali se povećava tijekom popravka ili remodeliranja tkiva te u bolesnom ili upaljenom tkivu. Većina MMP se izlučuje u obliku zimogena koji se aktivira proteolitičkim cijepanjem ili oksidacijom tiolne

skupine. MMP mogu degradirati sve proteine ECM i time imaju ključne uloge u organogenezi i morfogenezi. Njihova je aktivnost zato posebno kontrolirana tkivnim inhibitorima MMP. Osim matriksnih metaloproteinaza, u remodeliranju ECM važni su enzimi katepsini iz obitelji serinskih, cisteinskih i aspartatnih proteaza te enzim plazmin iz obitelji serinskih proteaza (Lu i sur. 2011).

## 1.2. Sustav plazminogenorskog aktivatora

Serinska proteaza plazmin nastaje iz jednolančanog glikoproteina plazminogena. Plazminogen se luči u jetri i u inaktivnom obliku cirkulira krvlju u relativno velikim koncentracijama (oko 2  $\mu\text{M}$ ). Prisutan je kao zimogen u plazmi i u međuprostornim tekućinama gdje mu koncentracija može biti povećana zbog upale ili ozljede (Fuchs i sur. 1996). Sastoji se od aktivacijskog peptida na N-kraju, domene serinske proteaze te pet domena „*kringle*“ odgovornih za vezanje supstrata i interakciju plazminogena s proteinima na površini stanice. Plazminogen mijenja konformaciju povezivanjem sa staničnim receptorima i time olakšava aktivaciju (Syrovets i sur. 2012).

Plazminogen prelazi u plazmin putem cijepanja peptidne veze Arg561-Val562 djelovanjem plazminogenorskog aktivatora (Robbins i sur. 1967). Postoje dva tipa plazminogenorskog aktivatora, tkivni (tPA) otkriven u tkivnom ekstraktu i urokinazni (uPA) otkriven u urinu (Dano i sur. 1985). Budući da je plazmin snažna proteaza i ima široki spektar supstrata, mogao bi nekontrolirano razgraditi različite proteine da nije strogo reguliran aktivacijom plazminogenorskog aktivatora (Aguirre Ghiso i sur. 1999). Aktivacija plazminogena putem njegovih specifičnih aktivatora jedan je od načina kontrole funkcije plazmina. U krvotoku, plazminogen se aktivira preko tPA i odgovoran je za lizu ugrušaka fibrina. Osim intravaskularne fibrinolize, tPA sudjeluje i u procesima ovulacije, regulaciji plastičnosti mozga i trombolizi. U popravku ozljeđenih tkiva ili u okolišu tumora, plazmin se aktivira preko sustava uPA (Andreasen i sur. 2000). Sustav uPA primarno je uključen u proteolizu i remodeliranje tkiva tijekom procesa embriogeneze, zarastanja rana, stanične migracije te invazije i metastaziranja. Stanična migracija i remodeliranje tkiva dva su događaja strogo povezana s razvojem i širenjem tumora (Conese i Blasi 1995; Crippa 2007).

Glavne uloge plazmina su otapanje ugrušaka i degradacija proteina izvanstaničnog matriksa. Međutim, plazmin može također aktivirati matriksne metaloproteinaze kao što su MMP-1, MMP-3 i MMP-9 i faktore rasta TGF $\beta$ , bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*) i VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*). Većina ovih molekula su zarobljene unutar

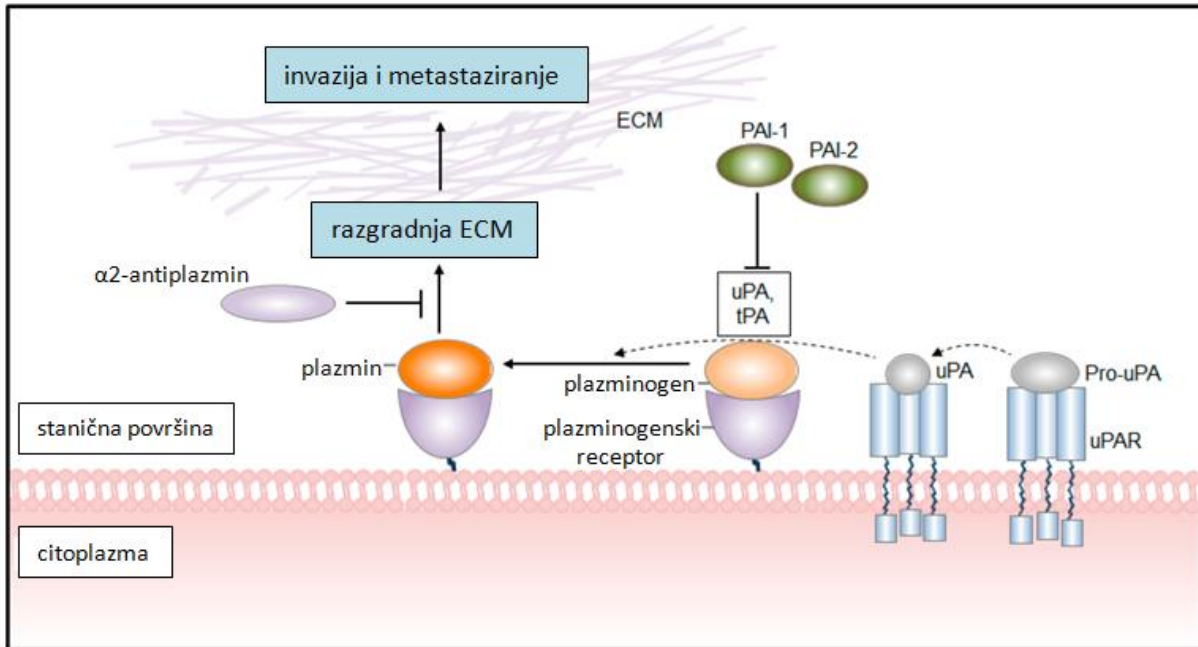
ECM u inaktivnom obliku pa se oslobađaju degradacijom ECM i time se olakšava njihovo vezanje za receptore (Rifkin i sur. 1999). Osim proteolitičke aktivnosti, plazmin može aktivirati unutarstanične signalne puteve i tako utjecati na stanične procese. Poznato je da plazmin inducira agregaciju neutrofila, proliferaciju hepatocita, kemotaksiju monocita, migraciju endotelnih stanica i ekspresiju proupalnih gena i gena faktora rasta putem aktivacije signalnih puteva JAK1/STAT, ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), p38 mitogenom aktiviranih kinaza (MAPK) i nuklearnog faktora NF- $\kappa$ B (Li i sur. 2007; Didiasova i sur. 2014).

### **1.2.1. Aktivacija plazmina preko sustava uPA**

U invaziji i metastaziranju tumorskih stanica, plazmin se aktivira preko urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA). Poput plazminogena, uPA se također sintetizira i izlučuje kao zimogen (pro-uPA) i aktivira se vezanjem na svoj stanični receptor uPAR (Schmitt i sur. 1992). Dakle, proces aktivacije plazminogena putem sustava uPA uključuje uPA koji može biti vezan za svoj receptor i njegovu interakciju s plazminogenom. Plazmin vezan na staničnoj površini olakšava invaziju tumorskih stanica razarajući ECM (Slika 1.) (Didiasova i sur. 2014). Vezanje plazminogena i nastanak plazmina nije ograničen samo na staničnu površinu. Mnoge komponente izvanstaničnog matriksa, kao što su fibrin, lamin i fibronektin, sposobni su vezati plazminogen (Syrovets i Simmet 2004).

Fiziološka regulacija sustava plazminogena zasniva se na brojnim proteazama i inhibitorima proteaza. Glavni inhibitor ove kaskade je  $\alpha$ 2-antiplazmin koji blokira samo aktivnost slobodnog plazmina, dok ostavlja netaknutim plazmin vezan za površinu (Slika 1.). Sustav plazminogena može također biti reguliran na razini inhibicije aktivacije plazminogena putem serpina kao inhibitora serinskih proteaza (engl. *serine protease inhibitor*). Tu spadaju dva inhibitora plazminogenog aktivatora PAI-1 i PAI-2 (engl. *plasminogen activator inhibitor*). PAI-1 je inhibitor dvolančanog i jednolančanog tPA i uPA dok PAI-2 pokazuje inhibitornu ulogu uglavnom prema uPA i manje je efektivan u inhibiciji tPA (Didiasova i sur. 2014). PAI-1 je zastupljeniji u plazmi i izlučuje se kao aktivna antiproteaza. Brzo se konvertira u latentni oblik osim ako se ne stabilizira vezanjem na plazmatski ili matriksni vitronektin. PAI-2 se izlučuje kao glikozilirani protein, ali većinom se nagomilava unutar stanice. Naime, njegovo izlučivanje nije efikasno budući da PAI-2 nema signalni peptid za cijepanje. Smatra se da PAI-2 unutar stanice inhibira proteaze uključene u citolizu posredovanu faktorom TNF (engl. *tumor necrosis factor*). Fiziološka uloga PAI-2 u regulaciji

izvanstanične proteolize nije u potpunosti razjašnjena (Conese i Blasi 1995). Dva druga serpina, proteinaza neksin 1 (PN-1) i inhibitor proteina C su također sposobni blokirati aktivnost uPA, ali njihov doprinos je manje relevantan u odnosu na PAI-1 i PAI-2 (Ulisse i sur. 2009).



**Slika 1. Sustav plazminogenog aktivatora.** Plazminogen se veže za svoj receptor i prelazi u plazmin aktivacijom putem plazminogenih aktivatora uPA i tPA. Plazmin vezan na staničnoj površini olakšava invaziju tumorskih stanica razarajući izvanstanični matriks. Proteolitička aktivnost uPA i plazmina kontrolirana je inhibitorima plazminogenog aktivatora PAI-1 i PAI-2, odnosno putem  $\alpha 2$ -antiplazmina. *Preuzeto i prilagođeno prema Didiasova i sur. 2014.*

**uPA:** urokinazni plazminogeni aktivator; **Pro-uPA:** proenzim uPA; **uPAR:** receptor uPA; **tPA:** tkivni aktivator plazminogena; **PAI-1/2:** inhibitor plazminogenog aktivatora-1/2; **ECM:** izvanstanični matriks

### 1.3. Sustav urokinaznog plazminogenog aktivatora

Sustav uPA sastoji se od serinske proteaze uPA, urokinaznog receptora uPAR te dva inhibitora iz obitelji inhibitora serinskih proteaza PAI-1 i PAI-2 (Ulisse i sur. 2009). Urokinazni tip plazminogenog aktivatora ili urokinaza visokospecifična je izvanstanična serinska proteaza koja se luči u obliku jednolančanog proenzima uPA i cijepanjem postaje aktivna dvolančana proteaza. Tako aktivirana može se vezati na urokinazni receptor, a specifični inhibitori, PAI-1 i PAI-2, kontroliraju njezinu enzimatsku aktivnost (Conese i Blasi 1995).

Sustav uPA sudjeluje u brojnim fiziološkim i patološkim procesima među kojima su najvažniji remodeliranje izvanstaničnog matriksa, migracija i invazija stanica, intravazacija i ekstravazacija u procesu metastaziranja. Osnovna funkcija uPA je cijepanje plazminogena u plazmin, proteazu koja može degradirati ECM i aktivirati kolagenaze. Budući da je plazmin snažna proteaza i ima široki spektar supstrata, mogao bi nekontrolirano razgraditi različite proteine da nije strogo reguliran aktivacijom urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA). Zato je sustav uPA reguliran na razini transkripcije gena uPA, proizvodnje proteina, lokalizacije aktivnosti kao i njegove inhibicije i degradacije (Aguirre Ghiso i sur. 1999). Inhibitori PAI-1 i PAI-2 također imaju kompleksnu regulaciju na razini transkripcije i aktivacije (Nagamine i sur. 2005). Nedavna istraživanja pokazuju da ravnoteža između uPA i PAI-1 određuje konačnu aktivnost uPA i može biti regulirana preko krovnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) (Sanchez-Tillo i sur. 2013). Sustav uPA također je reguliran preko brojnih signalnih puteva aktiviranih različitim faktorima rasta. Dominantna regulacija gena uPA ovisi o mitogenom aktiviranim proteinskim kinazama (MAPK) kao i putevima preživljenja fosfatidil-inozitol-3 kinaze (engl. *phosphatidyl inositol 3-kinase*; PI3K). Inhibitor PAI-1 je također reguliran preko signalnog puta transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (Irigoyen i sur. 1999).

### 1.3.1. Regulacija sustava uPA

Urokinaza je kodirana genom *PLAU* čija je transkripcija regulirana s nekoliko regulatornih elemenata na 5' regiji gena na kojoj postoje vezujuća mjesta za sveprisutni transkripcijski faktor Sp1. Faktor Sp1 je zaslužan za konstitutivnu ekspresiju gena *uPA* u različitim tipovima ljudskih stanica. Njegova transkripcija i vezanje na DNA mogu biti povećani fosforilacijom preko puteva MAPK Erk i JNK (c-Jun N-terminalna kinaza) (Benasciutti i sur. 2004). Za indukciju ekspresije gena *PLAU* također su važne dvije regulatorne regije visokokonzervirane u genomima svinje, miša i čovjeka koje se aktiviraju forbol esterima PMA (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*) ili FGF-2 (engl. *fibroblast growth factor-2*). Prva regulatorna regija je inducibilni pojačivač koji se sastoji od mjesta Ets (PEA3)/AP1<sub>A</sub> uzvodno i mjesta AP1<sub>B</sub> nizvodno. Između njih nalazi se regija medijatora COM (engl. *cooperation mediator*) koja sadrži mjesta vezanja za različite proteine poznate kao pojačivači ekspresije uPA (D'Orazio i sur. 1997; Verde i sur. 1988). Nizvodno od mjesta AP1<sub>B</sub> postoji nekoliko mjesta vezanja faktora nalik NF- $\kappa$ B, kao i elementi negativne regulacije koji podešavaju aktivnost pojačivača (Guerrini i sur. 1996). Druga regulatorna regija je mjesto AP1/Ets smješteno u obrnutoj orijentaciji. Mjesto AP1 prepoznaje kompleks

transkripcijskih faktora AP1, sastavljen od homodimera Jun ili heterodimera Jun i Fos, čije je vezanje na DNA inducirano fosforilacijom putem MAPK. MAPK mogu biti aktivirane putem raznih signala uključujući faktore rasta (FGF-2, HGF i IGF-1), citokine (TNF i CSF-1) te reorganizacijom citoskeleta koja pak vodi do aktivacije puta FAK/Src/Ras/Erk (Lengyel i sur. 1995; Nagamine i sur. 2005).

Vezanje uPA na receptor uPAR usidrenim u staničnoj membrani glikozil-fosfatidilinozitolnim sidrom, lokalizira njegovu proteolitičku aktivnost na površini stanice. Vezanje uPA na uPAR pokreće i brojne druge funkcije, uzrokovane interakcijom kompleksa uPA-uPAR s drugim molekulama stanične površine ili ECM. Tako npr. preko povezanosti s integrinima i vitronektinom sudjeluje u migraciji i adheziji stanica (Crippa 2007). Mnoge različite vrste stanica mogu sintetizirati uPA i u patološkim i nepatološkim uvjetima kao odgovor na specifične vanjske podražaje. Također je poznato da je degradacija uPA višestupanjski proces koji uključuje brojne druge molekule. Aktivan uPA vezan na receptor se ne internalizira te ostaje na površini stanice. Proteolitička aktivnost uPA vezanog na uPAR blokira se inhibitorom PAI-1 koji se veže na dvolančani uPA. Zatim se kompleks uPA-uPAR-PAI-1 internalizira, te se uPA degradira. Urokinazni receptor uPAR se potom endocitira i reciklira na staničnu površinu (Chen i sur. 1990; Conese i Blasi 1995).

Budući da vezanje PAI-1 potiče internalizaciju površinskog kompleksa uPA/uPAR, time PAI-1 može preko uPA potaknuti unutarstanične signalne puteve (Cubelis i sur. 1990). Ta uloga PAI-1 važna je regulatorna komponenta višestaničnih procesa koji uključuju stanično remodeliranje kao npr. angiogenezu, zacjeljivanje rana i metastaziranje. Povećana ekspresija PAI-1 dovodi do brojnih patoloških stanja kao što su hipertromboza u krvnim žilama, nefropatija u bubrezima i keloidni ožiljci u koži (Lijnen 2005). Dakle, biološka uloga PAI-1 nije ograničena samo na regulaciju aktivacije plazminogena putem plazminogenih aktivatora. Zbog njegovog velikog afiniteta za izvanstanični protein vitronektin, PAI-1 može ometati interakciju vitronektina i njegovog liganda integrina  $\alpha\beta_3$  (Seiffert i Smith 1997). PAI-1 je eksprimiran u gotovo svim tipovima stanica, a najviše u endotelnim stanicama, adipocitima i hepatocitima. Zbog raznolikosti tipova stanica u kojima je PAI-1 induciran i biološke uloge inhibitora, njegova ekspresija je kontrolirana putem raznih signala, uključujući steroidne i peptidne hormone, citokine te mehaničke i okolišne stresne uvjete. Najviše istraženi čimbenici su transformirajući faktor rasta  $\beta$ , inzulin i hipoksija (Nagamine 2008). PAI-1 je jedna od najpoznatijih meta transformirajućeg faktora rasta  $\beta$ . Promotor PAI-1 ima mjesta vezanja Sp1 te SMAD-3, nizvodnog elementa puta TGF $\beta$  (Datta i sur. 2000).

## 1.4. Signalni put transformirajućeg faktora rasta $\beta$

### 1.4.1. Funkcije signalnog puta TGF $\beta$

Homeostaza tkiva i organa u organizmu zahtijeva uravnotežene interakcije između stanica i mreže izlučenih proteina poznate kao ECM. Ove kooperativne interakcije uključuju i brojne citokine i faktore rasta koji djeluju preko specifičnih receptora na površini stanice. Kad je ravnoteža između stanica i ECM narušena može doći do bolesti. Ovo je jasno vidljivo u interakcijama posredovanim molekulom TGF $\beta$ . Faktor TGF $\beta$  je član porodice dimernih faktora rasta koja uključuje proteine BMP (engl. *bone morphogenic proteins*), aktivine, faktore veg-1 te inhibine. Svi ovi faktori dijele klaster konzerviranih cisteinskih domena povezanih intramolekularnim disulfidnim vezama u zajednički cisteinski „čvor“ (Massague 1998; Tang i sur. 2003).

Djelovanje TGF $\beta$  vrlo je raznoliko ovisno o tipu stanice, uvjetima te staničnom miljeu koji upravlja ishodom odgovora. U normalnim stanicama, TGF $\beta$  regulira proliferaciju i diferencijaciju stanica, apoptozu, razvoj embrija, zarastanje rana i angiogenezu. Povećanje ili smanjenje proizvodnje TGF $\beta$  povezano je s brojnim bolestima, kao što su npr. arteroskleroza i fibroza bubrega, jetre i pluća. TGF $\beta$  osim inhibicije stanične proliferacije može i potaknuti stanični rast, može pojačati pluripotentnost matičnih stanica kao i njihovu diferencijaciju, suprimirati rast premalignih stanica, ali i pojačati metastaziranje (Blobe i sur. 2000; Ikushima i Miyazono 2010).

Mutacije u genima za TGF $\beta$ , njegovih receptora ili unutarstaničnih signalnih molekula povezanih s putem TGF $\beta$ , važne su u patogenezi bolesti, naročito u tumorima i nasljednoj hemoragičnoj telangiektaziji (Blobe i sur. 2000; Massague 2012). U prijelazu iz fiziološkog u patološki fenotip, TGF $\beta$  može imati funkciju i kao tumorski supresor i kao promotor. Iako je ova dvojaka uloga TGF $\beta$  u tumorima još uvijek slabo objašnjena, poznato je da su stadij progresije i stanični kontekst ključni faktori (Ikushima i Miyazono 2010).

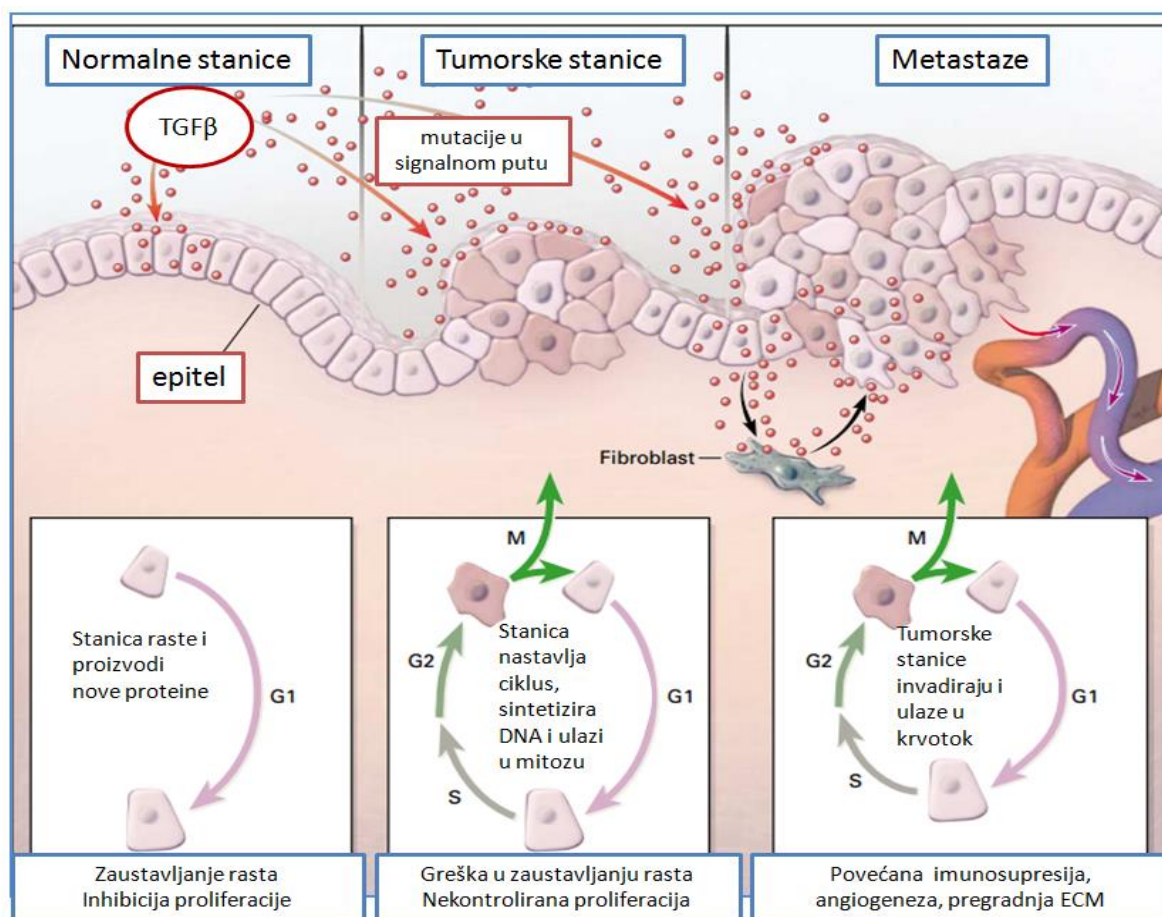
Stanice u proliferaciji prolaze kroz ciklus podijeljen na četiri faze: G1, S, G2 i M fazu (Slika 2.). TGF $\beta$  regulira staničnu proliferaciju na stanično-specifičan način. U normalnim stanicama, preko signalnog puta TGF $\beta$  zaustavlja se stanični ciklus u fazi G1 kako bi se inhibirala proliferacija, inducirala diferencijacija ili potakla apoptoza. TGF $\beta$  zaustavlja stanični ciklus stimulirajući proizvodnju p15, inhibitora kinaze ovisne o ciklinima, te inhibirajući funkciju ili proizvodnju esencijalnih regulatora ciklusa, npr. kinaza ovisnih o



ciklinima, cdk 2 i 4 te ciklina A i E. Ove promjene rezultiraju smanjenom fosforilacijom proteina retinoblastoma i zaustavljanje progresije kroz stanični ciklus (Ravitz i Wenner 1997).

Tijekom transformacije normalne u tumorsku stanicu, različite komponentne signalnog puta TGF $\beta$  mutiraju, što čini stanicu rezistentnom na inhibiciju rasta putem TGF $\beta$ . Takve tumorske stanice nekontrolirano proliferiraju te tako povećavaju proizvodnju TGF $\beta$  (Slika 2.). Takav TGF $\beta$  djelujući na okolne stromalne stanice, imunosne stanice, te endotelne i stanice glatkih mišića, uzrokuje imunosupresiju i angiogenezu te povećava invaziju tumora (Blobe i sur. 2000).

TGF $\beta$  je jedan od najvažnijih regulatora proizvodnje i predgradnje ECM jer utječe na adhezivna obilježja ECM putem dva glavna mehanizma. Prvo, TGF $\beta$  stimulira fibroblaste (Slika 2.) i ostale stanice da proizvode proteine ECM i proteine stanične adhezije kao što su kolagen, fibronektin i integrini. Drugo, TGF $\beta$  smanjuje proizvodnju enzima koji degradiraju ECM kao što su kolagenaza, heparinaza i stromelizin, a povećava proizvodnju proteina PAI-1 i TIMP koji inhibiraju enzime za degradaciju ECM. U tumorskim stanicama povećana je proizvodnja TGF $\beta$ , ali se povećava i invazija stanica zbog porasta proteolitičke aktivnosti (Massague 1990; Maehara i sur. 1999).



**Slika 2. Uloge transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ) u normalnim i tumorskim stanicama.** U normalnim stanicama, preko signalnog puta TGF $\beta$  zaustavlja se stanični ciklus u fazi G1 kako bi se inhibirala proliferacija, inducirala diferencijacija ili potakla apoptoza. Tijekom transformacije normalne u tumorsku stanicu, različite komponentne signalnog puta TGF $\beta$  su mutirane, što čini stanicu rezistentnom na inhibiciju rasta putem TGF $\beta$ . Takve tumorske stanice nekontrolirano proliferiraju kao i okolne stromalne stanice (fibroblasti) te tako povećavaju proizvodnju TGF $\beta$ . Takav TGF $\beta$  djelujući na okolne stromalne stanice, imunostne stanice, te endotelne i stanice glatkih mišića, uzrokuje imunosupresiju i angiogenezu te povećava invaziju tumora. *Preuzeto i prilagođeno prema Blobe i sur. 2000.*

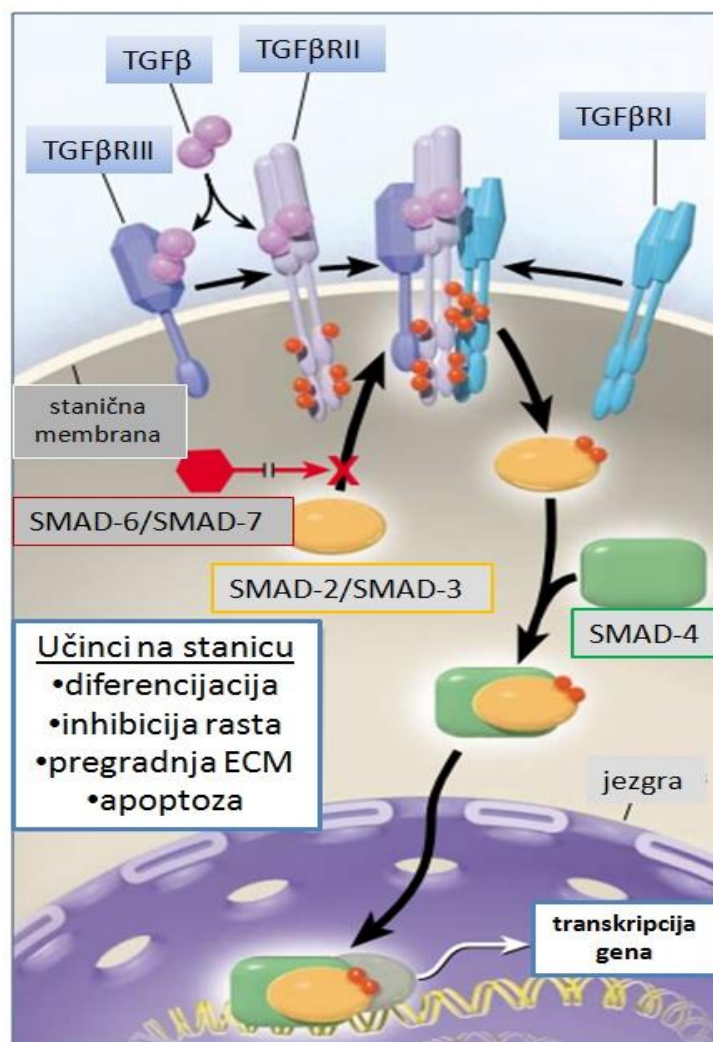
#### 1.4.2. Komponente signalnog puta TGF $\beta$

Transformirajući faktor rasta  $\beta$  i srodni citokini djeluju na većinu tipova stanica, kontrolirajući proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Postoje tri izoforme faktora rasta TGF $\beta$  i svaka je kodirana svojim genom i tkivno-specifično ekspimirana te posebno regulirana u razvojnim procesima (Taipale i sur. 1998). Izoforme se razlikuju po afinitetu vezanja za receptore TGF $\beta$ . TGF $\beta$  se sintetizira kao prekursorski propeptid. TGF $\beta$  se izrezuje iz propeptida još u stanici no ostaje vezan za odrezani dio propeptida nekovalentnim vezama.

Nakon što se izluči, većina TGF $\beta$  se skladišti u ECM u kompleksu s proteinom LTBP (engl. *latent TGF $\beta$  binding protein*). Vezanje TGF $\beta$  na LTBP disulfidnim vezama sprječava njegovo vezanje na receptore. Postoje četiri vrste LBTP i kodirani su posebnim genima i tkivno-specifično su eksprimirani (Sinha i sur. 1998). Oslobođanje TGF $\beta$  iz kompleksa vrši se pomoću matriksnog glikoproteina trombospondina-1 koji mijenja konformaciju LTBP. TGF $\beta$  se može aktivirati i pomoću plazmina koji ga otcijepљуje iz kompleksa. Budući da su TGF $\beta$  i njegovi receptori prisutni u većini stanica, ova aktivacija ključni je korak regulacije u djelovanju TGF $\beta$  (Crawford i sur. 1998).

U kanonskom signalnom putu, biološki aktivan ligand TGF $\beta$  prenosi signal do jezgre posredstvom aktivacije receptora (TGF $\beta$ R). TGF $\beta$ R je heterodimer sastavljen od dva tipa receptora, TGF $\beta$ RI i TGF $\beta$ RII (Kretschmar i Massague 1998). Receptori sadrže serin/treoninsku kinaznu domenu u unutarstaničnom dijelu te aktiviraju nizvodne molekule SMAD fosforilacijom (Piek i sur. 1999; Massague 2012). U izvanstaničnom prostoru TGF $\beta$  se veže ili na TGF $\beta$ RIII koji ga zatim predstavlja TGFR $\beta$ II ili direktno na TGFR $\beta$ II na staničnoj membrani. Aktivirani TGF $\beta$ RII potakne stvaranje kompleksa s TGF $\beta$ RI koji se aktivira fosforilacijom od strane TGF $\beta$ RII (Slika 3.). Receptori u kompleksu zajedno fosforiliraju nizvodne proteine transduktore SMAD-2 i SMAD-3. Fosforilirani SMAD-2 ili SMAD-3 s koreceptorom SMAD-4 stvara kompleks koji ulazi u jezgru i aktivira transkripciju ciljnih gena pokrećući tako brojne biološke procese (Massague i sur. 2000; Derynck i Zhang 2003). Inhibitori SMAD-6 i SMAD-7 su negativni regulatori signalnog puta TGF $\beta$ . Oni suprimiraju fosforilaciju SMAD-2 i SMAD-3 blokirajući njihovu interakciju s TGF $\beta$ RI. SMAD-7 sudjeluje u negativnoj povratnoj vezi u regulaciji putova TGF $\beta$ , budući da je također ciljni gen signalnog puta (Boon i sur. 2007).

U nekanonskom signalnom putu, kompleks TGF $\beta$  i receptora prenosi signal preko drugih faktora, kao što su kinaze aktivirane mitogenom npr. Erk, JNK i p38 MAPK, PI3K, faktori povezani s TNF 4/6 (engl. *TNF receptor-associated factor*; TRAF4/6) i obitelj malih GTPaza Rho (Shi i Massague 2003). Aktivirane MAPK mogu regulirati transkripciju bilo putem direktne interakcije s jezgrinim proteinima SMAD ili putem nizvodnih proteina. Povrh toga, aktivirane kinaze JNK/p38/Erk djeluju zajedno s proteinima SMAD u regulaciji apoptoze i proliferacije, dok na metastaziranje, angiogenezu i stanični rast djeluju kroz druge transkripcijske faktore kao što su c-Jun i ATF. Put RhoA/ROCK aktiviran putem TGF $\beta$  inducira sintezu aktinskih vlakana tijekom epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) (Morrison i sur. 2013; Costanza i sur. 2017).



**Slika 3. Signalni put transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ).** TGF $\beta$  se veže ili na TGF $\beta$ RIII koji ga predstavlja TGF $\beta$ RII ili direktno na TGF $\beta$ RII. Aktivirani TGF $\beta$ RII veže i fosforilira TGF $\beta$ RI i time stimulira njihovu protein kinaznu aktivnost. Aktivirani TGF $\beta$ RI zatim fosforilira transkripcijski faktor SMAD-2 ili SMAD-3 koji se onda veže na SMAD-4. Kompleks proteina SMAD seli iz citoplazme u jezgru gdje djeluje na brojne transkripcijske faktore koji reguliraju transkripciju gena. *Preuzeto i prilagođeno prema Blobe i sur. 2000.* **TGF $\beta$ :** transformirajući faktor rasta  $\beta$ ; **TGF $\beta$ RI/II/III:** receptor TGF $\beta$  tip I/II/III; **ECM:** izvanstanični matriks; **SMAD-2/3/4/6/7:** transkripcijski faktori porodice smad; **SMAD-2/3:** nizvodni transkripcijski faktori; **SMAD-4:** kofaktor transkripcijskih faktora SMAD-2 i SMAD-3; **SMAD-6/7:** inhibitorni transkripcijski faktori.

### 1.4.3. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na metastaziranje

Tumorske stanice prolaze nekoliko procesa tijekom metastaziranja odnosno stvaranja sekundarnih tumora. To su invazija, intravazacija, prijenos, ekstravazacija i kolonizacija metastaza. Interakcija tumorskih stanica s tumorskim mikrokolišem utječe na sposobnost metastaziranja pojedinačne tumorske stanice. Subpopulacija tumorskih matičnih stanica (engl.

*cancer stem cells*; CSCs) u primarnom tumoru također utječe na metastatski potencijal. Posebno su važne interakcije primarnog tumora s udaljenim mjestima putem signalnih molekula za stvaranje budućih mjesta metastaziranja (Pecorino 2012).

TGF $\beta$  ima važnu ulogu u metastaziranju jer stimulira invazivni i metastatski potencijal epitelnih stanica. Osnovni proces kojim TGF $\beta$  potiče staničnu migraciju i može povećati metastaziranje je epitelno-mezenhimska tranzicija (EMT). To je proces reprogramiranja kojim stanice epitelnog fenotipa poprimaju karakteristike mezenhimskih, uključujući proizvodnju komponenata izvanstaničnog matriksa, kao i lučenje izvanstaničnih proteaza (Lamouille i sur. 2014). Krovni transkripcijski faktori karakteristični za mezenhimske stanice su TWIST-1 (transkripcijski faktor porodice twist), ZEB-1 (engl. *Zinc Finger E-Box Binding factor 1*), SNAIL-1 i SNAIL-2 (transkripcijski represori porodice snail). Oni utišavaju ekspresiju gena za proteine povezane s epitelnim fenotipom, npr. kladine, okludine te E-kadherine, a aktiviraju ekspresiju gena za proteine povezane s mezenhimskim fenotipom, npr. proteina izvanstaničnog matriksa i matriksne metaloproteinaze. Takve stanice razgrađuju bazalnu membranu i ulaze u krvotok što im omogućuje metastaziranje (Slika 2.) (Massague 2012; Sanchez-Tillo i sur. 2013).

Razvoj metastaza uključuje i širenje tumorskih matičnih stanica (CSCs). To je mala subpopulacija stanica sposobnih za samoobnavljanje i širenje tumora (Pecorino 2012). Zbog ovih svojstava također se nazivaju tumor inicirajuće stanice, a njihovo postojanje prvi je otkrio Lapidot sa suradnicima 1994. godine. EMT omogućuje tumorskim matičnim stanicama povećanje rezistencije na kemoterapiju i povećanje sposobnosti migracije. Kako ove stanice imaju veliku sposobnost plastičnosti, ponovnom promjenom fenotipa poprimaju opet svojstva matičnosti, sposobnost samoobnavljanja, proliferacije i inicijacije novih tumora (Thiery i sur. 2009). Ova svojstva omogućuju uspješno uspostavljanje sekundarnih tumora sastavljenih od heterogenih tumorskih stanica na udaljenim mjestima (Brabletz i sur. 2005; Mani i sur. 2008).

Metastaziranje je smrtonosni korak u progresiji tumora, budući da otprilike 90 % pacijenata oboljelih od tumora umire od metastaza koje se šire različitim procesima (Sporn 1996). Stoga je ključno proučavati molekularne mehanizme metastaziranja kako bi se mogli ciljati novim terapijama.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Procesi metastaziranja povezani su sa sposobnostima stanice da migrira i promijeni fenotip, tj. prolazi proces epitelno-mezenhimske tranzicije. EMT je regulirana signalnim putem TGF $\beta$  koji preko krovnih transkripcijskih faktora određuje stanični fenotip. Mezenhimski je fenotip i sposobnost migracije povezana s izlučivanjem izvanstaničnih proteaza, kojima pripada urokinazni plazminogenski aktivator.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu signalnog puta TGF $\beta$  u regulaciji urokinaznog sustava i njegovu moguću značajnost u mehanizmu djelovanja natrijevog salicilata na promjenu urokinaznog sustava kod staničnih linija A1235, MDA MB-231 i A2182.

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

- (1) karakterizacija stanične linije A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$
- (2) analiza urokinazne aktivnosti u stanicama kojima je povećana ili smanjena signalizacija puta TGF $\beta$
- (3) analiza utjecaja inhibicije signalnog puta TGF $\beta$  na promjenu urokinazne aktivnosti kod staničnih linija A1235, MDA MB-231 i A2182 nakon tretmana natrijevim salicilatom
- (4) analiza utjecaja natrijevog salicilata na promjenu urokinazne aktivnosti i migraciju stanica A1235 transficiranih plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$ .

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Uzgoj stanica u kulturi**

##### **3.1.1. Stanične linije**

Tumorske stanične linije korištene u ovom istraživanju su glioblastomska linija A1235, linija tumora pluća A2182 i tumora dojke MDA MB-231. Sva su tri tipa staničnih linija ljudske tumorske stanice adherentnog tipa. Stanične linije A1235 i A2182 dobivene su iz laboratorija dr. S. A. Aaronsona (Giard i sur. 1973), a stanična linija MD MB-231 je komercijalno dostupna preko zbirke ATCC (*American Type Culture Collection*, SAD). Stanice se uzgajaju u Dulbeccovom modificiranom Eaglovom mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM; Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich, SAD), pri temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

##### **3.1.2. Odmrzavanje stanica**

Budući da se tumorske stanične linije čuvaju smrznute u spremniku s tekućim dušikom na -196 °C, potrebno ih je pažljivo odmrznuti. Odmrzavanje stanica je bitno izvršiti naglo zbog mogućeg oštećenja krioprezerviranih stanica kristalićima leda koji nastaju pri sporom odmrzavanju. Medij DMEM sa serumom se prethodno zagrije na 37 °C u vodenoj kupelji i u 5 mL zagrijanog hranjivog medija dodaju se odmrznute stanice. Budući da medij za smrzavanje stanica sadrži krioprezervativ dimetil-sulfoksid (DMSO; Sigma-Aldrich, SAD), potrebno je da se stanicama, nakon što se prihvate za podlogu Petrijeve zdjelice (TPP, Švicarska), zamijeni medij za svježi. Petrijeve zdjelice se zatim pohrane u inkubator (Heraeus Heracell 150, Njemačka) u vlažnoj atmosferi pri 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>.

##### **3.1.3. Presađivanje stanica**

Sva tri tipa staničnih linija A1235, MDA MB-231 i A218 su ljudske tumorske stanice adherentnog tipa. Stanice su uzgajane u malim i srednjim sterilnim Petrijevim zdjelicama te plastičnim pločicama s 24 i 96 bunarića (TPP, Švicarska) u sterilnim uvjetima u inkubatoru pri 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>. Sve stanične linije su rasle u mediju DMEM sa serumom. Stanice su održavane u kulturi redovitim presađivanjem uz pomoć 0,25 % otopine tripsina (Sigma-Aldrich, SAD) koji služi za odvajanje adherentnih stanica od podloge.

Prije tripsinizacije stanice se isperu s 2 ml fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) zbog uklanjanja ostataka komponenti seruma koje bi inaktivirale tripsin. Stanicama u srednjim Petrijevim zdjelicama se doda 500 µl 0,25 % otopine tripsina s 0,5 mM etilendiaminotetraocetnom kiselinom (EDTA). Nakon odvajanja stanica od podloge, tripsin se inaktivira dodatkom medija DMEM sa serumom, a koncentracija stanica odredi brojanjem.

### 3.2. Brojanje stanica pomoću hemocitometra

Hemocitometar je predmetno stakalce s ucrtanom mrežicom. Budući da je volumen stanične suspenzije iznad mrežice standardiziran, prema broju stanica na kvadratićima izračuna se koncentracija stanica u suspenziji. Stanice se prethodno razrijede otopinom tripanskog modrila u omjeru 1:1. Tripansko modrilo pomaže u određivanju vijabilnosti stanica tj. razlikovanju živih od mrtvih stanica jer se oboje samo mrtve stanice zbog narušene stanične membrane i nemogućnosti egzocitiranja boje, dok žive stanice ostaju neobojene.

Broj stanica u jednom mililitru računa se po formuli:  $Nst/ml = \frac{Nst}{N\blacksquare} \times R \times \frac{1}{V}$

Pri čemu je  $Nst/ml$  broj stanica po mililitru,  $Nst/N\blacksquare$  ukupan broj stanica podijeljen brojem kvadratića u kojima su stanice prebrojene,  $R$  je faktor razrjeđenja i iznosi 2 budući da je razrjeđenje 1:1, a  $V$  je volumen komorice koji iznosi 10<sup>-4</sup> ml. Stanice se zatim razrijede medijem prema koncentraciji potrebnoj za nasađivanje.

### 3.3. Obrada stanica

Stanice su tretirane natrijevim salicilatom (NaS; Kemika, Hrvatska) otopljenim u destiliranoj vodi (deH<sub>2</sub>O) do radne koncentracije 15 mM ili alkilirajućim agensom N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom (MNNG) otopljenim u 96 % etanolu (Kefo, Slovenija) do radne koncentracije 5 µM. Kako bi se ispitala uloga TGFβ, stanice su tretirane inhibitorom receptora TGFβ (TGFβRI) pojedinačno i u kombinaciji s ostalim agensima. Inhibitor receptora TGFβ (MedChem Express, SAD) je otopljen u dimetil-sulfoksidu u radnoj koncentraciji 4 µM. Utjecaj TGFβ ispitan je tretiranjem stanica kondicioniranim medijem, tj. medijem u kojem su prethodno rasle stanice A1235 s povećanom ekspresijom TGFβ (stanice TA). Stanice su tretirane komercijalnim uPA (Leo Pharmaceutical Products, Danska) otopljenim u mediju DMEM do radne koncentracije 1x10<sup>-3</sup> U/ml.



### 3.4. Praćenje staničnog rasta metodom bojanja kristal ljubičastim

Metoda bojanja kristal ljubičastim se koristi za detekciju stanične vijabilnosti ili citotoksičnosti lijekova. Boja kristal ljubičasta se veže na genomsku DNA pa se tako može mjeriti rast stanica u kulturi. Budući da se mrtve stanice prilikom ispiranja odlijepe, ostanu pričvršćene samo obojane vijabilne stanice. Obojenje je direktno proporcionalno staničnoj biomasi i može se spektrofotometrijski mjeriti na valnoj duljini od 595 nm ( $A_{595}$ ).

U plastične pločice s 96 bunarića nasadi se  $5 \times 10^4$  stanica po bunariću u volumenu od 100  $\mu$ l i inkubira na 37 °C i 5 %  $\text{CO}_2$ . Zadnji stupac bunarića se ostavi praznim za negativnu kontrolu. Nakon 24 sata vakuum sisaljkom se ukloni hranjivi medij samo u prvom stupcu bunarića, stanice se isperu PBS-om te fiksiraju s 50  $\mu$ l 100 % hladnog metanola (Kemika, Hrvatska). Nakon 15 minuta fiksacije na sobnoj temperaturi, stanice se isperu dva puta s PBS-om. Stanice su na taj način fiksirane 6 dana za redom. Zadnji dan, sve se stanice oboje s 50  $\mu$ l 0,2 % otopine boje kristal ljubičasta (Fluka, Švicarska) otopljene u 2 % etanolu. Nakon 10 minuta inkubacije na miješalici, stanice se tri puta isperu s  $\text{deH}_2\text{O}$  te ostave sušiti 10 minuta. Nakon sušenja, u sve bunariće se doda 100  $\mu$ l 1 % otopine natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS; Acros Organics, SAD) i inkubira 15 minuta na miješalici. Konačno se na čitaču mikrotitarskih pločica *Glomax Multi Detection System* (Promega, SAD) očita apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm. Od dobivenih vrijednosti apsorbancija za svaki bunarić oduzme se vrijednost apsorbancije negativne kontrole (prazni bunarići s 1 % SDS-om). Izračunate relativne vrijednosti apsorbancija u odnosu na kontrolu se, u računalnom programu *Excel* (MS Office 2007, Microsoft, SAD) prikažu kao linijski grafikon odnosa apsorbancije  $A_{595}$  u vremenskom periodu od 6 dana.

### 3.5. Testovi migracije stanica

#### 3.5.1. Test „zarastanja“

Test „zarastanja“ (engl. *scratch test*) jednostavna je metoda za mjerenje migracije stanica *in vitro*. Temelji se na činjenici da će, nakon stvaranja umjetne „ogrebotine“ (engl. *scratch*) na konfluentnoj jednoslojnoj staničnoj kulturi, stanice na krajevima ogrebotine migrirati. Proces „zarastanja“ napreduje dok se ponovo ne uspostavi konfluentnost.

Stanice se nasade u male Petrijeve zdjelice i kad narastu u konfluentnu kulturu, pomoću sterilnog nastavka za mikropipete za volumen 10-100  $\mu$ l naprave se tri paralelne „ogrebotine“ staničnog sloja. Nakon toga se stanicama odsiše medij i doda 1 ml svježeg medija DMEM sa serumom. U jednu seriju malih Petrijevih zdjelica se doda i 15  $\mu$ l natrijevog salicilata kako bi se pratio njegov utjecaj na stopu migracije stanica. Stanice se fotografiraju na invertnom mikroskopu *Olympus IX73* (Tokio, Japan) i vrate u inkubator. Poslije 24 sata inkubacije, stanice se fotografiraju na istim mjestima kao prethodnog dana. Na taj način se može usporediti veličina „ogrebotine“ prije i poslije migracije stanica, a za preciznije kvantificiranje stope migracije koristi se računalni program *ImageJ* (National Institutes of Health, SAD). Vrijednosti veličina „ogrebotine“ se normaliziraju u odnosu na netretiranu kontrolu te se u programu *Excel* prikazuju kao linijski grafikon odnosa postotka „zarastanja“ u vremenskom periodu od 24 sata.

### **3.5.2. Test migracije u komoricama**

Test migracije u komoricama se izvodi u posebnim komoricama s porama na dnu (engl. *transwell chamber*). Stanice se nasade u mediju bez seruma u komorice s porama određene veličine ovisno na kojim stanicama se radi test migracije. Stanicama se, tijekom određenog vremenskog perioda, dopusti migracija kroz pore prema bunariću s medijem DMEM s 10 % fetalnog telećeg seruma.

Stanice se razrijede u mediju bez seruma tako da im koncentracija bude  $2 \times 10^5$  stanica po ml. U pločicu s 24 bunarića stave se komorice s porama veličine 8  $\mu$ m (*Boyden transwell chamber*; Brand, Njemačka), u komorice se stavi 100  $\mu$ l medija bez seruma i 200  $\mu$ l stanične suspenzije. U bunariće u koje se prenesu komorice stavi se medij sa serumom, tako da su komorice donjim dijelom uronjene u medij. Stanice migriraju prema mediju sa serumom kroz pore. Nakon 24 sata inkubacije, komorice se odvoje i isperu dva puta u PBS-u. Potom se 2 minute fiksiraju u 4 % formaldehidu (T.T.T., Hrvatska). Nakon ispiranja u PBS-u, komorice se 20 minuta permeabiliziraju s hladnim metanolom. Metanol se zatim ukloni, a komorice dva puta isperu u PBS-u te se 15 minuta inkubiraju u boji 0,2 % kristal ljubičasta. Nakon sljedeća dva ispiranja u PBS-u, pamučnim štapićem se obriše gornja strana komorice, a donja strana skenira.

### 3.6. Uzgoj i izolacija plazmida

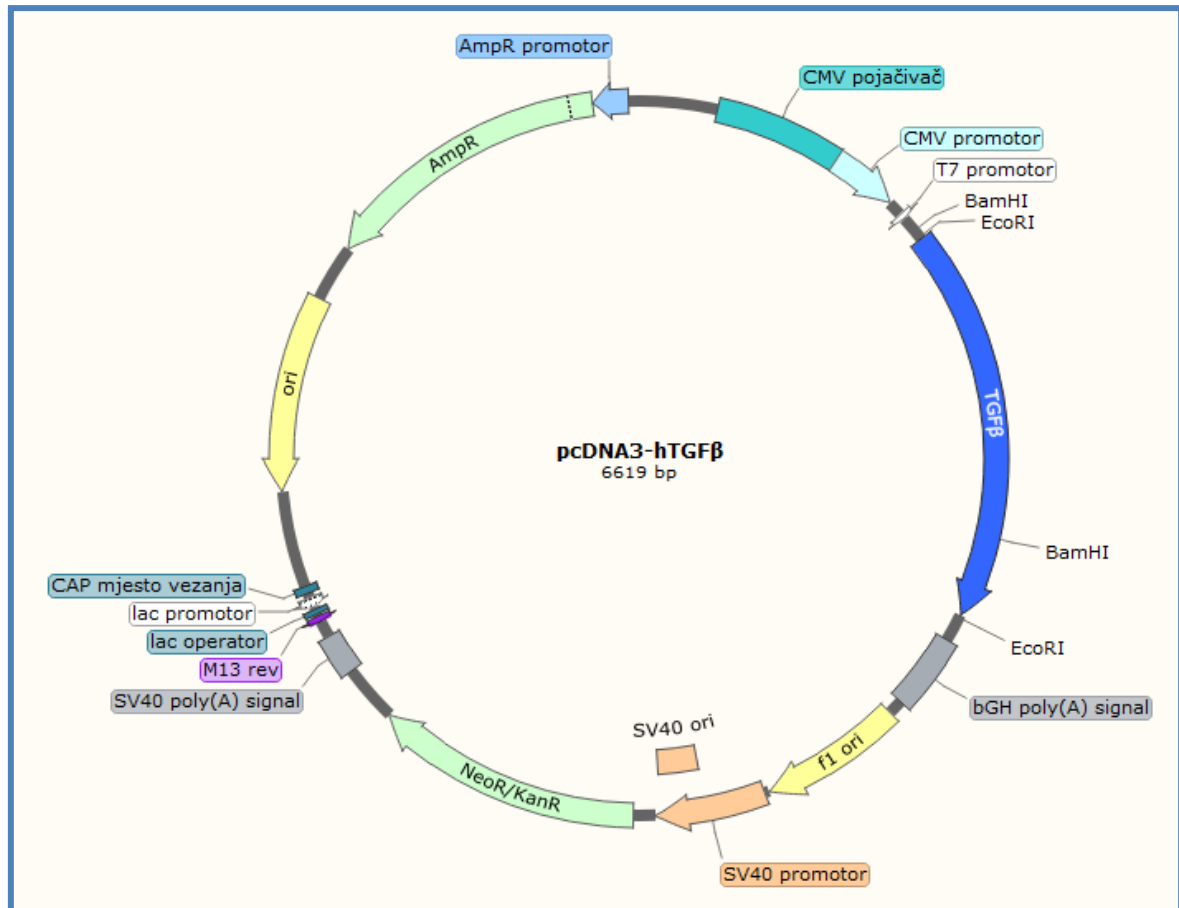
Procesom transformacije strana DNA se unosi u kompetentne bakterijske stanice. Stabilni transformanti se probiru na selektivnim podlogama ovisno o biljegu na unesenoj DNA. Plazmidne DNA koji se koriste za transfekciju eukariotskih stanica umnože se i izoliraju iz kompetentnih bakterija *E. coli*.

Ekspresijskim plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$  (Slika 4.) transformiraju se elektrokompetentne bakterije *E. coli* soj DH5 $\alpha$  pomoću elektroporatora *MicroPulser*<sup>TM</sup> (BioRad, SAD). Za elektroporaciju se koriste elektroporacijske kivete promjera 1 mm (Roth, Njemačka) i pulsna voltaža od 1,5 kV. Nakon inkubacije 1 sat u mediju LB (*Luria-Bertani*; Roth, Njemačka), transformirane bakterije se nasade na selekcijsku čvrstu hranjivu podlogu načinjenu od 15 ml tekućeg medija LB, 5 g agara (Roth, Njemačka) i 100 ng/ml ampicilina. Od bakterijskih kolonija koje narastu na selekcijskoj čvrstoj hranjivoj podlozi, uzme se jedna kolonija i nasadi u 3 ml tekućeg medija LB uz dodatak ampicilina i ostavi preko noći na 37 °C uz konstantno miješanje pri 300 rpm. Iz prekonoćne bakterijske kulture se izolira plazmidna DNA pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju *Wizard*<sup>®</sup> *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD).

Bakterije iz prekonoćne kulture se centrifugiraju 3 minute na 10 000 rpm. Na talog bakterija se doda 250  $\mu$ l otopine za resuspendiranje stanica (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNaza A), a zatim 250  $\mu$ l otopine za lizu stanica (0,2 M NaOH; 1 % SDS) i 4 puta naglo okrene mikroeprevetu. Potom se stanični lizat inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Kada se otopina djelomično razbistri, doda se 10  $\mu$ l otopine s alkalnom proteazom i ponovno 4 puta okrene mikroeprevetu i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, doda se 350  $\mu$ l otopine za neutralizaciju (4,09 M gvanidin hidroklorid; 0,759 M kalij acetat; 2,12 M ledena octena kiselina; pH 4,2) i ponovo okrene 4 puta, a zatim 10 minuta centrifugira na 14 000 rpm pri sobnoj temperaturi.

Kolona za pročišćavanje plazmidne DNA (engl. *spin column*; Promega, SAD) se stavi u kolonu za sakupljanje (engl. *collection tube*; Promega, SAD). Potom se 850  $\mu$ l supernatanta prebaci u kolonu za pročišćavanje i 1 minutu centrifugira na 14 000 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon što se ukloni sakupljeni sadržaj i ponovo spoje obje kolone, doda se 750  $\mu$ l otopine za ispiranje (60 % etanol; 60 mM kalij acetat; 8,3 mM Tris-HCl; 0,04 mM EDTA) te 1 minutu centrifugira na 14 000 rpm pri sobnoj temperaturi. Ukloni se sakupljeni sadržaj te se na isti način ponovi ispiranje s 250  $\mu$ l otopine za ispiranje i 2 minute centrifugira na 14 000

rpm. Kolona za pročišćavanje plazmida se prebaci u sterilnu mikroepruvetu i doda se 100  $\mu$ l deH<sub>2</sub>O očišćene od nukleaza (engl. *nuclease-free water*, Promega, SAD). Nakon centrifugiranja 1 minutu na 14 000 rpm pri sobnoj temperaturi, plazmidna DNA se sakupi u mikroepruvetu i pohrani na -20 °C.



**Slika 4. Mapa ekspresijskog plazmida pcDNA3-hTGFβ s ugrađenom sekvencom TGFβ.**

**AmpR**: gen za rezistenciju na ampicilin; **CMV** (citomegalovirus) **pojačivač i promotor**: služe za konstitutivnu ekspresiju gena u animalnim stanicama; **T7 promotor**: mjesto vezanja T7 RNA polimeraze; **BamHI** i **EcoRI**: mjesta cijepanja restrikcijskih enzima; **TGFβ**: sekvenca transformirajućeg faktora rasta  $\beta$ ; **BGH poly (A) signal**: terminacijska sekvenca gena goveđeg hormona rasta; **f1 ori**: ishodište replikacije bakteriofaga f1 (engl. *origin of replication*); **SV40 ori**: ishodište replikacije velikog T antigena virusa SV40 (engl. *Simian virus 40*); **SV40 promotor**: služi za ekspresiju gena u animalnim stanicama; **NeoR/KanR**: gen za rezistenciju na neomicin/kanamicin; **SV40 poly (A) signal**: SV40 terminacijska sekvenca; **M13 rev**: nizvodna početnica u genu *lacZ*; **lac operator**: mjesto vezanja represora u lac operonu; **lac promotor**: mjesto vezanja RNA polimeraze iz *E.coli*; **CAP mjesto vezanja**: mjesto vezanja katabolita (engl. *catabolite activator protein*).

### 3.6.1. Spektrofotometrijska provjera kvalitete plazmidne DNA

Spektrofotometrija je metoda kvantifikacije biomolekula mjerenjem apsorpcije svjetla na određenoj valnoj duljini. Koncentracija i čistoća DNA mjere se spektrofotometrom *NanoVue* (GE Healthcare Life Sciences, Kanada). Prije nanošenja 2  $\mu\text{l}$  uzorka, uređaj se mora baždariti vodom očišćenom od nukleaza. Koncentracije nukleinskih kiselina se određuju mjerenjem apsorpcije na valnoj duljini od 260 nm ( $A_{260}$ ), a proteina na valnoj duljini od 280 nm ( $A_{280}$ ). Iz omjera  $A_{260}/A_{280}$  dobije se uvid u čistoću izolirane plazmidne DNA tj. količinu preostalih proteina. U dobro pročišćenih otopina taj omjer treba iznositi između 1,8 i 2,0.

### 3.7. Transfekcija stanica

Transfekcija je proces unošenja strane nukleinske kiseline u eukariotsku stanicu. Stanice A1235 se transficiraju plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$  pomoću kompleta *Xfect<sup>TM</sup> Transfection Reagent* (TaKaRa, SAD). Dan prije transfekcije, u sterilnu plastičnu pločicu s 24 bunarića nasadi se  $6 \times 10^4$  stanica u 250  $\mu\text{L}$  medija DMEM sa serumom. Tako se postiže 50-70 % konfluentnost stanica idući dan. Na dan transfekcije, vorteksira se polimer *Xfect*. U mikroepreveti se razrijedi 1  $\mu\text{g}$  plazmida s puferom *Xfect* tako da konačni volumen bude 25  $\mu\text{L}$ . Potom se smjesa vorteksira 5 sekundi. Razrijeđenoj plazmidnoj DNA doda se 0,3  $\mu\text{L}$  polimera *Xfect* i vorteksira 10 sekundi. Potrebna je inkubacija 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se stvorili kompleksi plazmidne DNA i polimera *Xfect*. Otopina se dodaje kap po kap na stanice. Idući dan stanice se presade u bočice od 25  $\text{cm}^2$ . Nakon 48 sati od transfekcije stanicama se dodaje genetin u koncentraciji 400 ng/mL (G418; Calbiochem, SAD). Stanice se uzgajaju dva tjedna uz promjenu medija da bi narasle kolonije.

### 3.8. Izolacija i provjera kvalitete RNA

Iz Petrijevih zdjelica se vakuum sisaljkom ukloni medij, stanice se tripsiniziraju i sakupe centrifugiranjem. Na stanični talog se doda 500  $\mu\text{l}$  TRI reagensa (Sigma-Aldrich, SAD) uz resuspendiranje. Nakon 5 minuta inkubacije na ledu, u mikroeprevetu se doda 100  $\mu\text{l}$  hladnog kloroforma (Kemika, Hrvatska) i snažno vorteksira 15 sekundi. Smjesa se centrifugira 15 minuta na 12 000 rpm pri 4 °C. Prilikom centrifugiranja, razdvoje se organska (donja) faza u kojoj su otopljeni proteini, međufaza u kojoj se nalazi DNA, te vodena (gornja) faza u kojoj je otopljena RNA. Mikropipetom se vodena faza prebaci u novu mikroeprevetu u

koju se zatim doda 250  $\mu$ l izopropanola (Kemika, Hrvatska). Smjesa se inkubira 30 minuta na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga centrifugira 15 minuta na 12 000 rpm pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant se ukloni, a RNA se ispere s 500  $\mu$ l 75 % etanola. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 12 000 rpm pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , talog RNA se osuši na zraku otopi u 30  $\mu$ l vode bez RNaza i pohrani na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon izolacije, potrebno je odrediti koncentraciju, kvalitetu i čistoću RNA. Koncentracija i čistoća izolirane RNA su određene pomoću spektrofotometra *NanoVue*, a kvaliteta analizira pomoću gel elektroforeze.

### **3.8.1. Provjera kvalitete RNA gel elektroforezom**

Kvaliteta izolirane RNA se provjeri elektroforezom u 1 % agaroznom gelu u 1x puferu TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0). U jažice gela se mikropipetom nanese po 1  $\mu$ l uzorka pomiješanog s 1  $\mu$ l pufera za nanošenje uzoraka (0,25 % bromfenol-plavo u vodi (w/v), 30 % glicerol). Nakon 30 minuta gel elektroforeze pri naponu od 50 V, gel se ostavi 15 minuta u vodenoj otopini etidijevog bromida (EtBr; 10 mg/ml). Etidijev bromid interkalira između baza nukleinskih kiselina koje, nakon osvjetljavanja UV-svjetlom, apsorbiraju i predaju energiju etidijevom bromidu koji pri tome zrači u crveno-narančastom spektru. Zbog tog se gel fotografira pod UV-svjetlom na uređaju KODAK EDAS 290 (Kodak, SAD).

Budući da je izolacija TRI reagensom izolacija ukupne stanične RNA, na dnu gela se nalaze male prijenosne RNA (engl. *transfer RNA*, tRNA), a iznad njih dvije jasno odijeljene pruge ribosomske RNA (28S i 18S rRNA) koje su najviše zastupljene u ukupnoj staničnoj RNA. U slučaju da je RNA onečišćena zaostalom genomskom DNA, pojavi se pruga na samom vrhu gela, a kod degradirane RNA brisevi duž cijele jažice. Samo RNA zadovoljavajuće koncentracije, čistoće i kvalitete se koristi za obrnuto prepisivanje.

### 3.9. Obrnuto prepisivanje RNA u cDNA

RNA se procesom obrnutog prepisivanja prevodi u cDNA koja može biti kalup u lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*).

U mikroepreveti se pripremi prva reakcijska smjesa od 1  $\mu$ l deoksiribonukleotida (dNTP; 10 mM; Sigma-Aldrich, SAD), 1  $\mu$ l oligo d(T) početnica (50 pM; Roche, Švicarska), 2  $\mu$ g RNA i vode očišćene od RNaza do ukupnog volumena od 10  $\mu$ l. Kako bi se uspješno denaturirala RNA, smjesa se inkubira 5 minuta na 65 °C u uređaju za reakciju *PCR* (Applied Biosystems, SAD). Za to vrijeme se u drugoj mikroepreveti pripremi druga reakcijska smjesa od 4  $\mu$ l 5x pufera za *PCR* (TaKaRa, SAD), 0,5  $\mu$ l 200 U/  $\mu$ l reverzne transkriptaze (*Prime Script Rtase*; TaKaRa, SAD), 0,5  $\mu$ l 40 U/ $\mu$ l inhibitora RNaza (Applied Biosystems, SAD) i 5  $\mu$ l vode očišćene od RNaza tako da ukupni volumen bude 10  $\mu$ l. Druga reakcijska smjesa se dodaje prvoj i inkubira 60 minuta na 42 °C, a potom 15 min na 70 °C. Nakon obrnutog prepisivanja, u smjesu je dodano 20  $\mu$ l vode bez RNaza. Tako dobivena cDNA se pohrani na -80 °C.

#### 3.9.1. Lančana reakcija polimerazom (*PCR*)

Lančana reakcija polimerazom je metoda u molekularnoj biologiji kojom je moguće u svega nekoliko sati dobiti milijarde identičnih kopija nekog ciljanog fragmenta DNA. Reakcijska se smjesa sastoji od 1,5  $\mu$ l 10x pufera za *PCR* (Sigma-Aldrich, SAD), 0,3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM; Sigma-Aldrich, SAD), 0,3  $\mu$ l dNTP (10 mM, Sigma-Aldrich, SAD), 0,3  $\mu$ l uzvodne početnice (10  $\mu$ M), 0,3  $\mu$ l nizvodne početnice (10 $\mu$ M), 1,2  $\mu$ l cDNA te vode do konačnog volumena od 15  $\mu$ l. Netom prije nego što se doda 1,2  $\mu$ l cDNA, dodaje se 0,1  $\mu$ l Taq polimeraze (5 U/ $\mu$ l; Sigma-Aldrich, SAD).

Uspješnost reakcije obrnutog prepisivanja i integritet cDNA se provjeri lančanom reakcijom polimeraze pomoću početnica za gen hipoksantin-guanin fosforiboziltransferazu (engl. *hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase; HPRT*). Uzvodna početnica (engl. *forward primer, F*) za gen *HPRT* je 5'-TGCTCGAGATGTGATGAAGG-3', a nizvodna (engl. *reverse primer, R*) je 5'-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3'. U programu reakcije *PCR*, poslije jednog ciklusa početne denaturacije cDNA 30 sekundi na 94 °C, slijedi 37 ciklusa denaturacije 5 minuta na 94 °C, vezanja početnica 30 sekundi na 58 °C te 30 sekundi produljivanja lanaca na 72 °C. Reakcija *PCR* okončava završnim produljivanjem lanaca u trajanju 7 min na od 72 °C.

### 3.9.2. Provjera uspješnosti reakcije PCR gel elektroforezom

Uspješnost umnažanja gena *HPRT* lančanom reakcijom polimerazom provjeri se elektroforezom. Netom prije izlijevanja gela u kadicu uređaja za elektroforezu, u gel se doda 2,5 µl etidijevog bromida. U prvu jažicu se doda 2,5 µl standardne DNA (*PCR ladder*; New England Biolabs, SAD). U ostale jažice na gelu se doda 4 µl uzorka pomiješanih s 2 µl pufera za nanošenje uzoraka. Elektroforeza se provodi 25 minuta uz stalni napon od 80 V.

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

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*RT-qPCR*, engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) precizna je metoda za kvantifikaciju nukleinskih kiselina. Produkti reakcije *RT-qPCR* obilježeni su fluorescencijskom bojom i analiziraju se dok nastaju. Boja *SYBR Green* se interkalira u novonastalu dvolančanu DNA pri čemu se emitira fluorescencija razmjerna količini produkta. Kod relativne kvantifikacije određuje se razlika u razini ekspresije između dva uzorka. Uređaj *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD) bilježi broj ciklusa, tzv. vrijednost  $C_t$  (engl. *cycle threshold*) potrebnih da reakcija uđe u eksponencijalnu fazu. Vrijednost  $C_t$  se koristi za kvantifikaciju ekspresije ispitivanih gena.

Srednja vrijednost  $C_t$  svakog ciljanog gena se prvo normalizira u odnosu na srednju vrijednost  $C_t$  endogene kontrole u istom uzorku prema formuli :

$$\Delta C_t = C_t (\text{ciljani}_{\text{gen}}) - C_t (\text{endogena\_kontrola}).$$

Tako se dobije vrijednost  $\Delta C_t$  ciljanih gena analiziranih uzoraka koja se zatim normalizira u odnosu na  $\Delta C_t$  kontrolnih uzoraka prema formuli:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{ciljani}_{\text{gen}}) - \Delta C_t (\text{kontrolni\_uzorak})$$

Na taj se način dobiju vrijednosti  $\Delta \Delta C_t$  između grupa analiziranih uzoraka i pomoću njih se izračuna faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*). Faktor promjene nam govori koliko je puta različita razina ekspresije određenog gena u jednoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu (Livak i Schmittgen 2001).

Svaka pojedinačna reakcijska smjesa se sastoji od 7,5 µl smjese 2x *SYBR Green* (engl. *SYBR Green PCR MASTER MIX*; Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,25 µl uzvodne početnice (10 µM), 0,25 µl nizvodne početnice (10 µM), 6 µl vode i 1 µl cDNA. Za negativnu kontrolu se dodaju svi sastojci reakcijske smjese osim cDNA, čiji se volumen nadomjesti vodom.



Sekvence korištenih početnica su prikazane u Tablici broj 1. Sve korištene početnice imaju temperaturu vezanja 58 °C. Za svaki uzorak naprave se dvije tehničke replike, a kao endogena kontrola se koristi gen hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (*HPRT*). Reakcija se odvija na pločici s 96 bunarića (engl. *MicroAMP Fast 96-well reaction plate*; Applied Biosystems, SAD) koja se pažljivo prekrije ljepljivom folijom za *RT-qPCR* (engl. *Optical Adhesive Covers*; Applied Biosystems, SAD) te se 3 minute centrifugira pri 1500 rpm na 4 °C i zatim stavi u uređaj *7500 Fast Real-Time PCR System*. Poslije jednog ciklusa početne denaturacije cDNA 10 minuta na 95 °C, slijedi 40 ciklusa denaturacije 15 sekundi na 95 °C te vezanja početnica i produljivanja lanaca 1 minutu na 58 °C. Dobivene vrijednosti se obrade u računalnom programu *Excel*. Metodom  $\Delta\Delta C_t$  za relativnu kvantifikaciju se izračuna faktor promjene ekspresije gena i prikaže u obliku histograma.

### Tablica 1. Ispitivani geni i sekvence početnica za RT-qPCR.

F: uzvodna početnica (engl. *forward primer*); R: nizvodna početnica (engl. *reverse primer*). Sve početnice imaju temperaturu vezanja na 58 °C. ***HPRT***: hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza; ***PAI-1/2***: inhibitori aktivatora plazminogena-1/2; ***SMAD-4/7***: transkripcijski faktori porodice smad; ***SNAIL-1/2***: transkripcijski represori porodice snail; ***TGFβ***: transformirajući faktor rasta β; ***TWIST-1***: transkripcijski faktor porodice twist; ***uPA***: urokinazni plazminogeni aktivator; ***uPAR***: receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora; ***ZEB-1***: engl. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*.

Korištene početnice	
Ime	Sekvenca
<b><i>HPRT</i></b>	F: 5'-CTTTGCTGACCTGCTGGATT-3' R: 5'-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3'
<b><i>PAI-1</i></b>	F: 5'-CTGGTGAATGCCCTCTACTTC-3' R: 5'-TGCTGCCGTCTGATTTGT-3'
<b><i>PAI-2</i></b>	F: 5'-GCAGATCCAGAAGGGTAGTTATC-3' R: 5'-TTGATTGCAGAGCTGAGAGAG-3'
<b><i>SMAD-4</i></b>	F: 5'-CGCGGTCTTTGTACAGAGTTA-3' R: 5'-GATGACACTGACGCAAATCAA-3'
<b><i>SMAD-7</i></b>	F: 5'-ACCCGATGGATTTTCTCAAACC-3' R: 5'-GCCAGATAATTCGTTCCCCCT-3'
<b><i>SNAIL-1</i></b>	F: 5'-TCTAGGCCCTGGCTGCTACA-3' R: 5'-CATCTGAGTGGGTCTGGAGGT-3'
<b><i>SNAIL-2</i></b>	F: 5'-CCTGGTCAAGAAGCATTTC AAC-3' R: 5'-GAGGATCTCTGGTTGTGGTATG-3'
<b><i>TGFβ</i></b>	F: 5'-GACACCAACTATTGCTTCAG'-3' R: 5'-AGAAGTTGGCATGGTAGCCC-3'

<b><i>TWIST-1</i></b>	F: 5'-CGGAGACCTAGATGTCATTGTTT-3' R: 5'-ACGCCTGTTTCTTTGAATTTG-3'
<b><i>uPA</i></b>	F: 5'-GGAGATGAAGTTTGAGGTGGAA-3' R: 5'-CTCCTTGGAACGGATCTTCAG-3'
<b><i>uPAR</i></b>	F: 5'-TTGAAGATCACCAGCCTTACC-3' R: 5'-GGTAACGGCTTCGGGAATAG-3'
<b><i>ZEB-1</i></b>	F: 5'-GGCAGATGAAGCAGGATGTA-3' R: 5'-GACAGCAGTGTCTTGTGTTG-3'

### 3.11. Određivanje aktivnosti uPA metodom radijalne kazeinolize

Urokinazni plazminogeni aktivator ili urokinaza, enzim je koji cijepa plazminogen u plazmin. To svojstvo je temelj metode radijalne kazeinolize kojom određujemo aktivnost uPA. Budući da je uPA izvanstanična proteaza, mjeri se proteolitička sposobnost medija u kojem su stanice rasle u kulturi. Uzorci se nanose u bunariće na agaroznoj ploči u kojoj se kao supstrat nalazi plazminogen, kao i kazein koji je supstrat nastalog plazmina. Veličine radijalno liziranih zona se usporede s veličinom lizirane zone urokinaze poznate koncentracije. Tako se odredi aktivnost urokinaznog plazminogenog aktivatora u uzorku.

Prvi dan se nasadi  $1 \times 10^5$  stanica u male Petrijeve zdjelice, a sljedeći dan stanice se obrađuju kemikalijama ili sakupljenim kondicioniranim medijem. Nakon 24 sata tretiranja, stanice se isperu PBS-om i inkubiraju još 6 sati u 500  $\mu$ l medija bez seruma. Medij se centrifugira na 2200 rpm pri 4 °C i dobiveni supernatant se pohrani na -80 °C. Na stanice se doda 100  $\mu$ l pufera za izolaciju proteina (1 % Triton X-100; 10 % glicerol; 137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA; pH 8,0) i sastružu se plastičnim strugačem (TPP, Švicarska). Stanični lizat se pohrani na -80 °C. Za radijalnu kazeinolizu se pripremi ploča s agaroznom podlogom s izbušenim bunarićima za nanošenje uzoraka. Agarozna podloga se sastoji od 2 % agaroze otopljene u deH<sub>2</sub>O, 8 % nemasnog mlijeka u prahu (Delikat-Gramm, Italija) kao izvora kazeina otopljenog u PBS-u, 5  $\mu$ g/ml plazminogena (Sigma-Aldrich, SAD) i 0,1 % natrijevog azida (Kemika, Hrvatska). U bunariće se nanese 5  $\mu$ l kondicioniranog medija te serijska razrjeđenja komercijalnog uPA (*Leo Pharmaceutical Products*, Danska) od 0,1 mU do 100 mU. Nakon 30 minuta, srednja Petrijeva zdjelica se prenese u inkubator na 37 °C. Nakon 24 sata inkubacije, u programu *ImageJ* se izmjere promjeri liziranih zona. Serijska razrjeđenja uPA poznatih koncentracija u programu *Excel* daju baždarnu krivulju preko koje se odrede aktivnosti uPA za svaki uzorak. Za normalizaciju vrijednosti aktivnosti uPA koriste se koncentracije proteina izmjerene metodom po Bradfordu.

### 3.12. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Jedna od metoda za kvantitativno određivanje staničnih proteina je kolorimetrijska metoda po Bradfordu. Metoda se temelji na obojenju otopljenih proteina s reagensom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB G-250; Roth, Njemačka). Reagens *CBB* je sivo-smeđa anionska boja koja ima maksimum apsorbancije pri 465 nm, no kad se veže za pozitivno nabijene aminokiseline u proteinima, maksimum se pomiče na 595 nm i otopina postaje plava. Što je intenzitet boje jači, to je i koncentracija proteina u otopini veća.

Stanični lizati skladišteni pri -80 °C se odmrznu i centrifugiraju 15 minuta na 12 000 rpm pri 4 °C. Potom se 2 µl supernatanta razrijedi u 38 µl deH<sub>2</sub>O i za reakciju se uzima 10 µl. Naprave se serijska razrjeđenja 0,1 µg/µl albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA; Sigma-Aldrich, SAD) u rasponu koncentracija od 1 µg/µl do 10 µg/µl. Negativna kontrola su bunarići bez dodanog BSA. U svaki bunarić se doda 100 µl reagensa *Bradford* (0,02 g CBB G-250, 10 ml 95 % etanol, 20 ml 85 % fosforna kiselina i deH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 200 mL). Na spektrofotometru *Glomax Multi Detection System* se očitaju apsorbancije pri 595 nm. Serijska razrjeđenja BSA poznatih koncentracija daju standardnu krivulju u programu *Excel* preko koje se odrede koncentracije proteina za svaki uzorak.

### 3.13. Analiza proteina metodom *Western blot*

Metoda *Western blot* se koristi za identifikaciju, kvantifikaciju i određivanje veličine određenog proteina i odnosa proteina u kompleksnoj proteinskoj masi na osnovi vezanja specifičnog antitijela.

#### 3.13.1. Razdvajanje proteina SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje proteina SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) temelji se na putovanju negativno nabijenih denaturiranih proteina prema pozitivnoj anodi. Natrijev dodecilsulfat je anionski deterdžent koji denaturira i oblaže proteine negativnim nabojem. Glavni faktor razdvajanja proteina u električnom polju je molekularna masa, odnosno veličina proteina. Uzorcima proteina doda se 6x pufer za nanošenje uzoraka (225 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) glicerol, 2 mM SDS; 0,02 % (w/v) bromfenol-plavo, 1 % β-merkaptioetanol) te se 5 minuta inkubiraju pri 95 °C. Uzorci se potom kratko centrifugiraju i ostave na led do nanošenja na gel. Prije pripreve gela za razdvajanje uzoraka, složi se

aparatura za vertikalnu elektroforezu *Biometra Eco-Mini* (Biometra, Njemačka). Prvo se izlije 10 %-tni donji gel za razdvajanje uzoraka sastavljen od 2,95 ml deH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 30 % akrilamida (Acros Organics, Belgija), 1,9 ml Tris-HCl-a (1,5 M; pH 8,8) te 75 µl 10 % SDS-a. Proces polimerizacije gela aktivira dodatak 75 µl 10 % amonijevog persulfata (APS; Acros Organics, Belgija) i 5 µl TEMED-a (N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamin; Acros Organics, Belgija). Gornji gel za sabijanje uzoraka se sastoji od 4,1 ml deH<sub>2</sub>O, 1 ml 30 % akrilamida, 0,75 ml Tris-HCl-a (1 M; pH 6,8), 60 µl 10 % SDS-a, 60 µl 10 % amonijevog persulfata i 5 µl TEMED-a.

Nakon polimerizacije, cijela konstrukcija se stavi u kadnicu i uroni u pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicin, 0,1 % SDS; pH 8,3). U prvu jažicu se nanese 5 µl markera *PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619* (Thermo Fisher Scientific, SAD), a u ostale jažice uzorci proteina. Elektroforeza se odvija na 140 V dok uzorci ne dođu do kraja gornjeg gela za sabijanje, a zatim se voltaža povisi na 180 V kroz 90 minuta.

### **3.13.2. Prijenos proteina na membranu i imunodetekcija**

Nakon elektroforeze, gel se stavi u 1x pufer za prijenos (48 mM Tris-HCl; 39 mM glicin; 0,037 % SDS; 20 % metanol; pH 8,3). Izreže se *PVDF* membrana (engl. *polyvinylidene difluoride*; Roche, Švicarska) i kratko namoči u metanol, a zatim i u 1x puferu za prijenos. Spužvice i filter papiri se također namoče u 1x puferu za prijenos. U kazeti za prijenos se složi „sendvič“ sljedećim redoslijedom: spužvica-2 filter papira-gel-*PVDF* membrana-2 filter papira-spužvica. Prijenos proteina s gela na membranu se odvija 120 minuta uz stalnu jakost struje od 380 mA. Kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu, gel se oboji u otopini CBB R-250 (engl. *Coomassie brilliant blue*, Roth, Njemačka).

Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na površinu membrane, membrana se blokira 60 minuta u 5 % otopini nemasnog mlijeka u prahu u puferu TBST (1M Tris-HCl, pH 7,5; 4M NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20). Nakon blokiranja, membrana se kratko ispere u puferu TBST i stavi preko noći na inkubaciju u otopini primarnog antitijela razrijeđenog (1:300 do 1:1000) u 0,5 % nemasnog mlijeka u puferu TBST. Primarna antitijela su navedena u Tablici 2. Sljedeći dan se membrana ispire 3 puta po 15 minuta u puferu TBST. Nakon ispiranja, slijedi 60 minuta inkubacije u otopini odgovarajućeg sekundarnog antitijela konjugiranim s enzimom peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP).

Korištena sekundarna antitijela (Sigma-Aldrich, SAD) su porijeklom iz kože i razrijeđena su 1: 30 000 u 0,5 % nemasnog mlijeka u puferu TBST. Nakon 60 minuta inkubacije, membrana se ispiri 3 puta po 15 minuta u puferu TBST.

Za vizualizaciju proteina kemiluminiscencijom koristi se otopina *Clarity Western ECL Substrate* (BioRad, SAD), jednakih udjela otopine peroksidaze i luminola s vodikovim peroksidom. Tako pripremljena otopina se nakapa na onoj strani membrane gdje se nalaze proteini i inkubira 5 minuta. Potom se membrana izloži rendgenskom filmu, 5-60 min, te film razvije u razvijaju i fiksira. Membrana *PVDF* se može ispirati kako bi se uklonila vezana antitijela i ponovno inkubirati u novom primarnom antitijelu ili obojiti bojom *amido black* (Sigma-Aldrich, SAD). Postupak uklanjanja vezanih antitijela se sastoji od dva ispiranja po 10 minuta u puferu za uklanjanje antitijela (7,5 g glicina; 0,5 g SDS; 5 ml Tween 20; dopuniti deH<sub>2</sub>O do 500 ml; pH 2,2), zatim dva ispiranja po 10 minuta u PBS-u i na kraju dva ispiranja po 10 minuta u puferu TBST.

**Tablica 2. Popis korištenih primarnih antitijela.**

**uPA:** urokinazni plazminogeni aktivator; **PAI-1:** inhibitor aktivatora plazminogena-1; **TGFβ-1:** transformirajući faktor rasta β; **β-aktin:** biljeg količine proteina

Antigen	Molekularna masa	Razrjeđenje	Domaćin	Proizvođač
<b>uPA</b>	33 kDa i 55 kDa	1:750	kunić	Santa Cruz
<b>PAI-1</b>	47 kDa	1:1000	miš	Becton-Dickinson
<b>TGFβ-1</b>	13 kDa i 25 kDa	1:300	miš	Santa Cruz
<b>β-aktin</b>	43 kDa	1:1000	miš	Sanza Cruz

**3.14. Statistička obrada podataka**

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina određenog broja replika, a odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je u obliku standardne devijacije. Usporedba kontrole i tretmana napravljena je Studentovim T-testom u programu *Excel* (MS Office 2007, Microsoft, SAD).

## **4. REZULTATI**

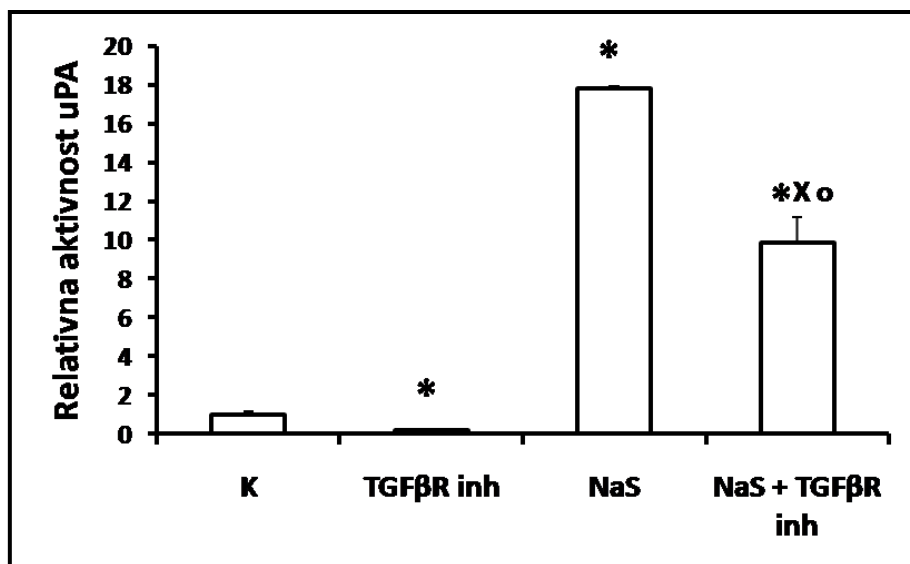
Kako su dosadašnja istraživanja pokazala da obrada stanica tumora različitim kemoterapeuticima može povećati ili inhibirati aktivnost urokinaze, cilj ovog rada bio je utvrditi ulogu TGF $\beta$  u regulaciji urokinaznog sustava te njegovu moguću ulogu u mehanizmu djelovanja natrijevog salicilata. Kao model istraživanja poslužile su nam stanice humanog glioblastoma A1235 za koje je pokazano da nakon tretmana natrijevim salicilatom povećavaju aktivnost urokinaze (Matulić i Brdar 2002), te stanice tumora pluća A2182 i dojke MDA MB-231 kod kojih natrijev salicilat inhibira urokinaznu aktivnost (Madunić i sur. 2017).

### **4.1. Utjecaj inhibicije signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica A1235**

#### **4.1.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS**

Budući da stanice A1235 nakon tretmana natrijevim salicilatom povećavaju aktivnost uPA (Matulić i Brdar 2002), ispitali smo ulogu TGF $\beta$  u regulaciji urokinaznog sustava. Stanice A1235 smo tretirali s 4  $\mu$ M inhibitorom receptora TGF $\beta$ , s 15 mM natrijevim salicilatom te njihovom kombinacijom. Nakon 24 sata od početka tretmana stanice smo inkubirali 6 sati u mediju bez seruma i u tom kondicioniranom mediju odredili aktivnost uPA radijalnom kazeinolizom.

Rezultati (Slika 5.) su pokazali da inhibitor receptora TGF $\beta$  smanjuje aktivnost urokinaze u odnosu na netretirani uzorak. Natrijev salicilat je povećao aktivnost urokinaze oko 15 puta, a u kombinaciji s inhibitorom receptora TGF $\beta$  aktivnost uPA je smanjena za oko 50%.



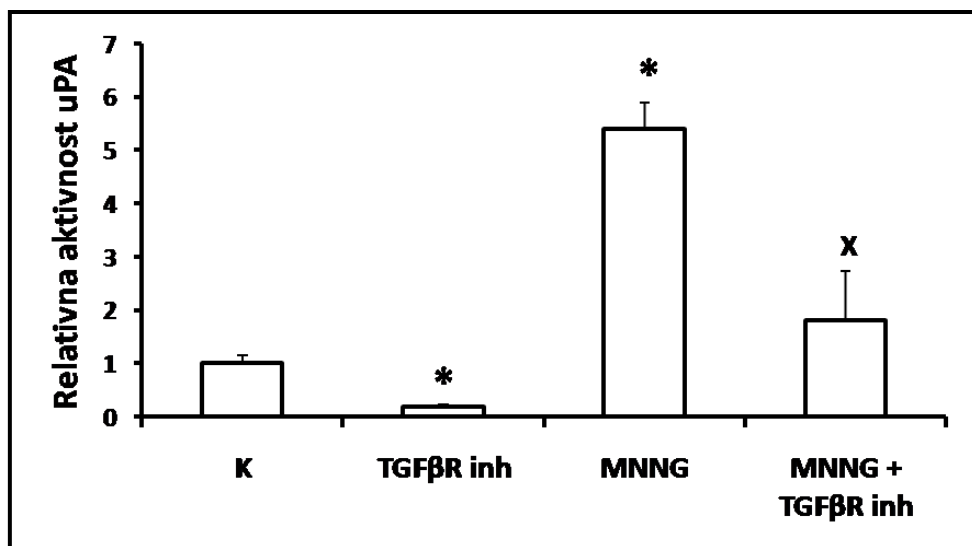
**Slika 5. Aktivnost urokinaze kod stanica A1235 tretiranih natrijevim salicilatom i inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice A1235 su tretirane s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, s 15 mM natrijevim salicilatom te njihovom kombinacijom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** netretirane stanice A1235; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ; **NaS:** natrijev salicilat. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; ° statistički značajna razlika u odnosu na **TGFβR inh**; ° statistički značajna razlika u odnosu na **NaS** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2. Utjecaj inhibicije receptora TGFβ na aktivnost uPA nakon tretmana s MNNG

Budući da su dosadašnja istraživanja pokazala da stanice A1235 nakon tretmana s alkilirajućim agensom N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom (MNNG) povećavaju aktivnost uPA (Brdar i Matulić 1988), istražili smo ulogu inhibicije receptora TGFβ u tim procesima. Stanice A1235 smo tretirali s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, s 5 μM MNNG te njihovom kombinacijom. Nakon 24 sata od početka tretmana te dodatnih 6 sati inkubacije u mediju bez seruma, u kondicioniranom mediju smo odredili aktivnost uPA radikalnom kazeinolizom.

Rezultati (Slika 6.) su pokazali da stanice nakon tretmana s MNNG povećavaju aktivnost uPA oko 5 puta. Inhibitor receptora TGFβ je smanjio bazalnu aktivnost urokinaze, a u kombinaciji s MNNG inhibirao aktivnost uPA za oko 60 %.



**Slika 6. Aktivnost urokinaze kod stanica A1235 tretiranih s MNNG i inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice A1235 tretirane su s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, s 5 μM MNNG te njihovom kombinacijom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** netretirane stanice A1235; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ; **MNNG:** N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; **x** statistički značajna razlika u odnosu na MNNG prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

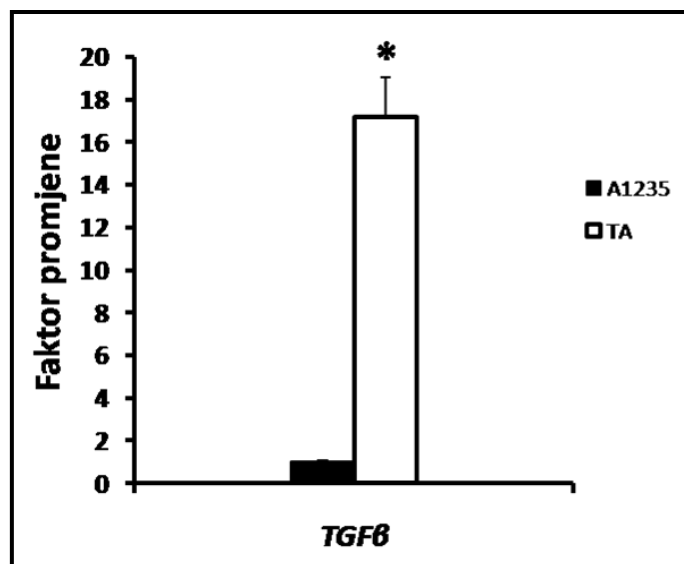
## 4.2. Karakterizacija stanične linije A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGFβ

Utjecaj signalnog puta TGFβ u stanicama humanog glioblastoma A1235 željeli smo ispitati tako da povećamo ekspresiju TGFβ unosom ekspresijskog plazmida pcDNA3-hTGFβ sa sekvencom TGFβ (Slika 4.). Staničnu liniju A1235 transficiranu plazmidom pcDNA3-hTGFβ uzgojili smo kao trajnu liniju u uvjetima selekcije antibiotikom kojeg kodira plazmid kroz dva tjedna i nazvali je TA. Kod stabilnih transfektanata TA analizirali smo ekspresiju TGFβ na razini RNA i proteina.

### 4.2.1. Analiza ekspresije TGFβ u stanicama TA metodom RT-qPCR

Iz roditeljskih stanica A1235 te stanica TA izolirali smo RNA, obrnuto prepisali u cDNA te metodom RT-qPCR analizirali ekspresiju gena *TGFβ*. Rezultati (Slika 7.) su pokazali 17 puta veću razinu ekspresije *TGFβ* kod stanica TA u odnosu na roditeljske stanice.

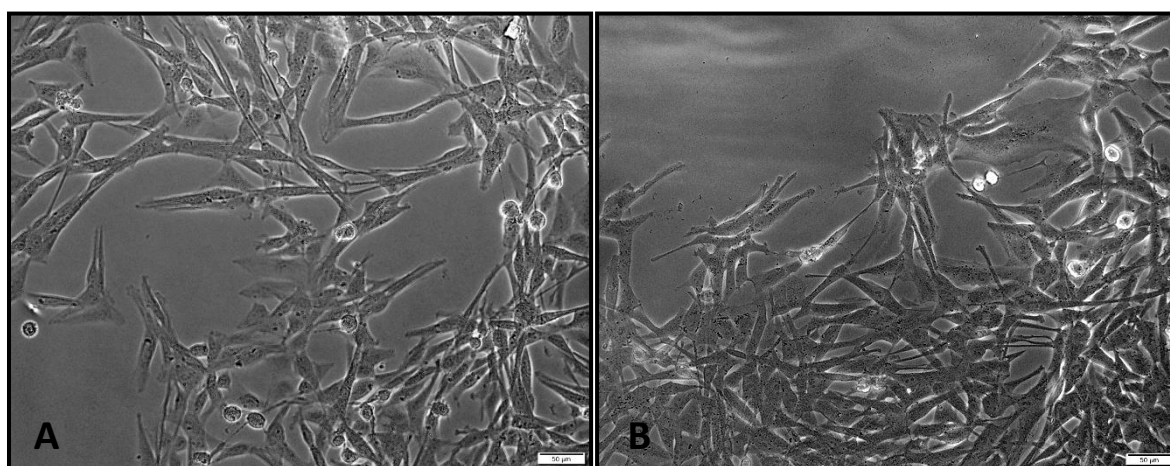




**Slika 7. Ekspresija gena *TGFβ* u stanicama A1235 i TA.** Izolirana RNA iz staničnih linija A1235 i TA obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena *TGFβ* napravljena je metodom *RT-qPCR*. Gen *HPRT* je korišten kao endogena kontrola, a faktori promjene ekspresije gena *TGFβ* izraženi su u odnosu na kontrolne roditeljske stanice A1235. **A1235:** roditeljske stanice humanog glioblastoma; **TA:** stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGFβ; **TGFβ:** transformirajući faktor rasta β; \* statistički značajna razlika u odnosu na A1235 prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.2. Usporedba morfolgije roditeljskih stanica A1235 i stanica TA

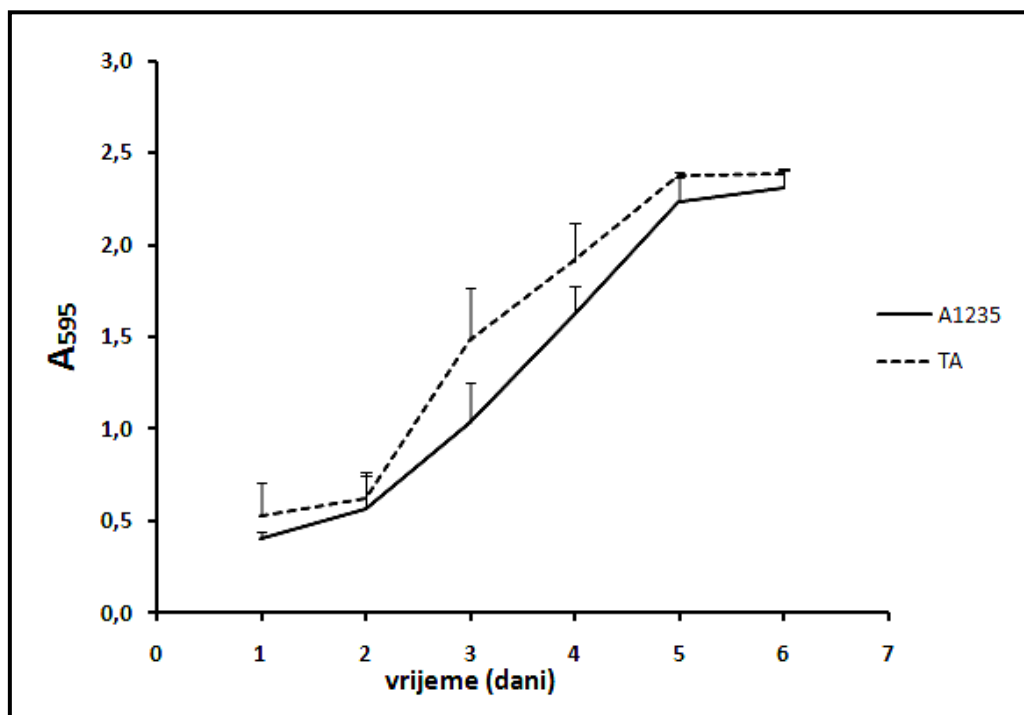
Analiza stanica TA svjetlosnom mikroskopijom pokazala je da nema morfoloških razlika između roditeljskih stanica A1235 i stanica TA (Slika 8.).



**Slika 8. Morfolgija stanica A1235 i TA.** A) roditeljske stanice humanog glioblastoma A1235; B) stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGFβ. Mikrografije su napravljene pri povećanju 100X. Oznaka na slici pokazuje dužinu od 50 μm.

#### 4.2.3. Krivulja rasta roditeljskih stanica A1235 i stanica TA

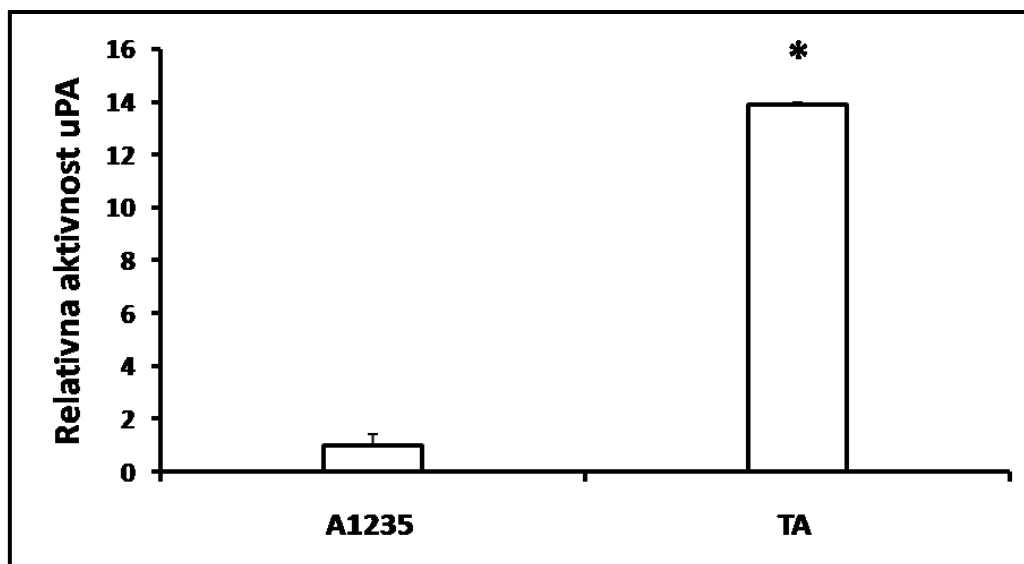
Kako TGF $\beta$  ima ulogu tumor supresora kod normalnih stanica (Alberts i sur. 2008), istražili smo njegov utjecaj na rast stanica TA. Rast stanica pratili smo metodom bojanja kristal ljubičastim te uspoređivali apsorbanciju boje obojenih uzoraka stanica kroz 6 dana. Rezultati (Slika 9.) su pokazali da nema razlike u rastu roditeljskih stanica A1235 i stanica TA.



**Slika 9. Krivulja rasta roditeljskih A1235 i stanica TA.** Nasađeno je  $5 \times 10^4$  stanica po bunariću na pločici s 96 bunarića. Nakon svakog dana, fiksiran je jedan nasađeni red. Zadnji dan stanice su obojane kristal ljubičastim i stanični rast kvantificiran spektrofotometrijski. **A1235:** roditeljske stanice humanog glioblastoma; **TA:** stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$ ; **A<sub>595</sub>:** apsorbancija boje na valnoj duljini 595 nm.

#### 4.2.4. Utjecaj TGF $\beta$ na aktivnost uPA kod roditeljskih stanica A1235 i stanica TA

Kako bismo provjerali utjecaj povećane ekspresije TGF $\beta$  na promjenu aktivnosti uPA nasadili smo stanice A1235 i TA i nakon 24 sata, metodom radijalne kazeinolize, odredili aktivnost urokinaze u njihovom kondicioniranom mediju. Rezultati (Slika 10.) su pokazali znatno veće povećanje aktivnosti urokinaze kod stanica TA.



**Slika 10. Aktivnost urokinaze roditeljskih stanica A1235 i stanica TA.** Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednost roditeljskih stanica. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**A1235:** roditeljske stanice humanog glioblastoma; **TA:** stanice A1235 transficirane plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$ . \*statistički značajna razlika u odnosu na roditeljske stanice humanog glioblastoma prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

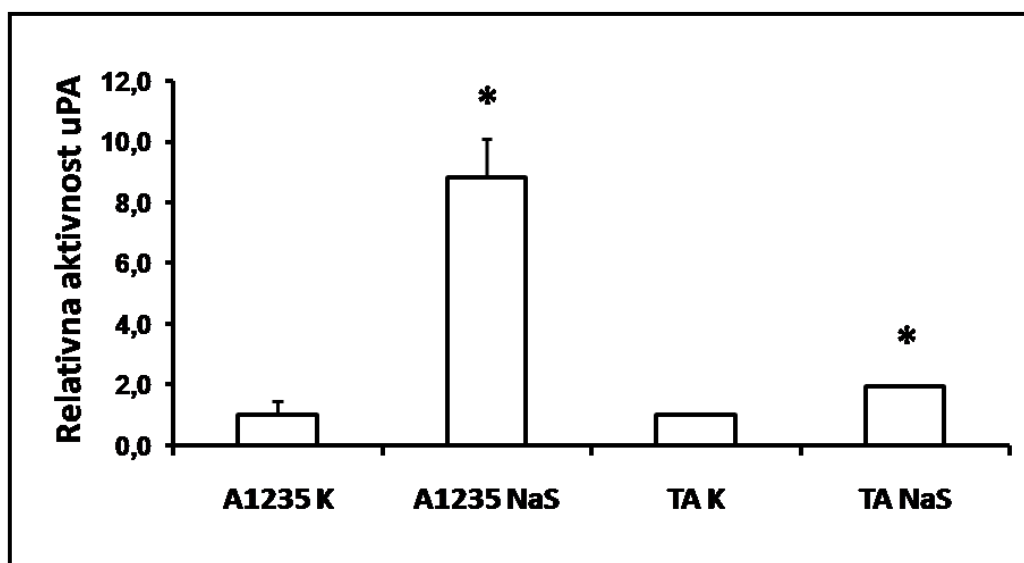
### 4.3. Utjecaj natrijevog salicilata na stanice TA

#### 4.3.1. Utjecaj natrijevog salicilata na aktivnost uPA kod stanica TA

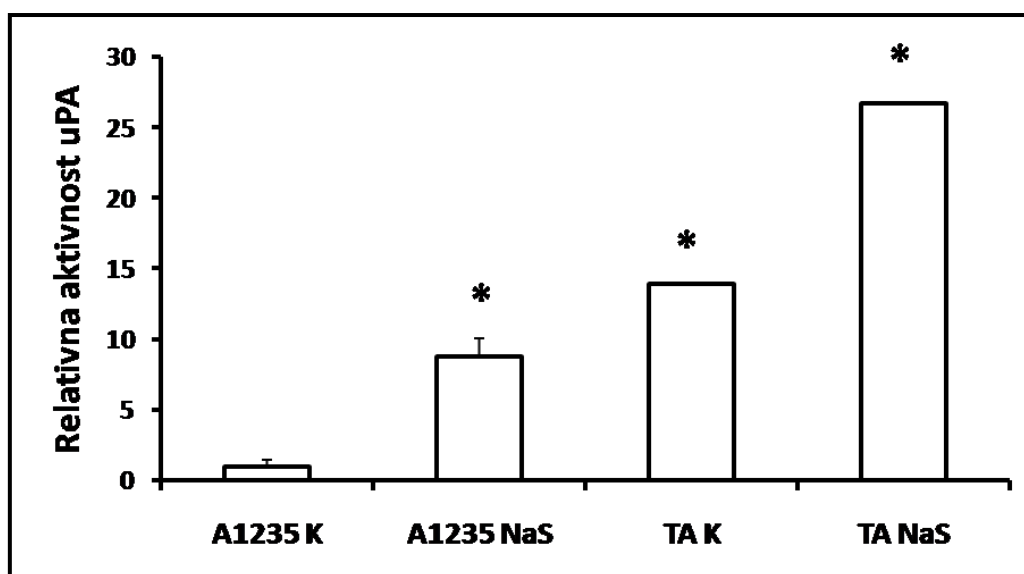
Kako je povećanjem ekspresije TGF $\beta$  u stanicama TA porasla i aktivnost uPA, ispitali smo utjecaj natrijevog salicilata na njih. Stanice A1235 i TA smo tretirali s 15 mM natrijevim salicilatom i u kondicioniranom mediju odredili aktivnost uPA.

Urokinazna aktivnost nakon tretmana natrijevim salicilatom je prikazana na Slici 11. Rezultati (Slika 11 A.) su prikazani kao vrijednosti u odnosu na istovrsne netretirane uzorke. Stanice TA, iako pokazuju porast aktivnosti, on je manji nego kod roditeljskih stanica. Na Slici 11 B. aktivnost je prikazana u odnosu na vrijednosti netretiranih roditeljskih stanica, te je vidljivo da natrijev salicilat znatno povećava apsolutnu aktivnost uPA kod stanica TA.

A



B



**Slika 11. Aktivnost urokinaze roditeljskih stanica A1235 i stanica TA tretiranih natrijevim salicilatom.** Stanice su tretirane s 15 mM natrijevim salicilatom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti vlastite pripadajuće netretirane kontrole (A) ili netretirane kontrole roditeljskih stanica A1235 (B). Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**A1235 K:** netretirane roditeljske stanice A1235; **TA K:** netretirane stanice TA; **NaS:** natrijev salicilat. \*statistički značajna razlika u odnosu na vlastitu pripadajuću netretiranu kontrolu (A) ili netretiranu kontrolu roditeljskih stanica A1235 (B) prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

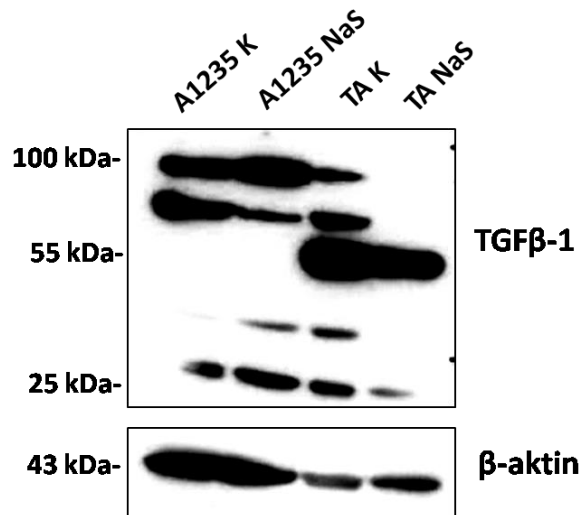
#### 4.3.2. Utjecaj natrijevog salicilata na ekspresiju TGF $\beta$ i proteina urokinaznog sustava

Kako je aktivnost urokinaznog plazminogenog aktivatora regulirana ekspresijom uPA i inhibitora PAI-1 na razini RNA i proteina (Konakova i sur. 1998), analizirali smo ekspresiju njihovih RNA i proteina, kod roditeljskih stanica i stanica TA, te kod stanica obrađenih natrijevim salicilatom. Stanice A1235 i TA smo tretirali s 15 mM NaS i nakon 24 sata iz staničnog lizata izolirali proteine te ih analizirali metodom *Western blot*.

Analiza ekspresije TGF $\beta$ -1 (Slika 12.) u lizatima stanica pokazala je prisutnost različitih oblika TGF $\beta$ -1. Protein se inače može javiti u obliku monomera (13 kDa), homodimera (25 kDa) i heterodimera u vezi s TGF $\beta$ -2 (48 kDa). Inaktivni nepocijepani oblik TGF $\beta$ -1 ima 44 kDa. Rezultati (Slika 12.) su pokazali promjenu ekspresije pojedinih oblika TGF $\beta$  kod stanica A1235 tretiranih s natrijevim salicilatom u odnosu na netretirane. Također, povećana je ekspresija kod netretiranih stanica TA u odnosu na netretirane A1235 s izrazito ekspresijom oblika od oko 60 kDa što bi moglo predstavljati protein TGF $\beta$  prepisan s plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$ . Kod netretiranih stanica TA uočavamo povećanu razinu ekspresije TGF $\beta$ -1 u odnosu na tretirane s natrijevim salicilatom.

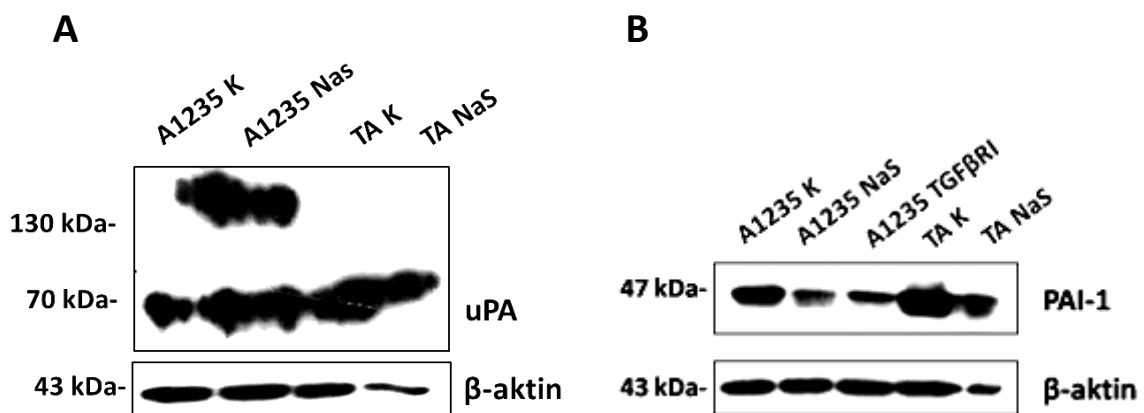
Kod stanica A1235 i TA analizirali smo ekspresiju proteina uPA u staničnim lizatima (Slika 13 A.). Protein uPA ima masu 55 kDa, a pocijepani, ali aktivni oblik 33 kDa. Receptor uPA može imati molekularnu masu u rasponu 55-60 kDa. Uočavamo proteinske vrpce veće od 130 kDa koje vrlo moguće predstavljaju kompleks uPA-PAI-1. Na razini proteina nije vidljiva značajna razlika u količini uPA kod netretiranih stanica A1235 i onih tretiranih salicilatom. Razlike kod stanica TA, u odnosu na roditeljske stanice, vidljive su u izostanku visokomolekulskih vrpce pozitivnih na uPA.

Ekspresija inhibitora PAI-1 (47 kDa) je kod stanica A1235 tretiranih s natrijevim salicilatom i inhibitorom receptora TGF $\beta$  smanjena u odnosu na netretirane stanice A1235 (Slika 13 B.). Kod stanica TA uočavamo povećanje ekspresije PAI-1 u odnosu na roditeljske stanice, dok smanjenje ekspresije pod utjecajem NaS nije statistički značajno.



**Slika 12. Ekspresija proteina TGF $\beta$ -1 kod stanica A1235 i TA tretiranih s NaS.** Stanice A1235 i TA su tretirane s 15 mM NaS i nakon 24 sata sakupljeni su stanični lizati. Protein TGF $\beta$ -1 je identificiran metodom *Western blot*. Kao kontrola nanošenja korištena je ekspresija  $\beta$ -aktina.

**A1235 K:** netretirane stanice A1235; **TA K:** tretirane stanice TA; **NaS:** natrijev salicilat; **TGF $\beta$ -1:** transformirajući faktor rasta  $\beta$ ;  **$\beta$ -aktin:** biljeg količine proteina



**Slika 13. Ekspresija proteina urokinaznog sustava kod stanica A1235 i TA tretiranih s NaS.** Stanice A1235 i TA su tretirane s 15 mM NaS i nakon 24 sata sakupljeni su stanični lizati. Proteini urokinaznog sustava uPA (**A**) i PAI-1 (**B**) su identificirani metodom *Western blot*. Kao kontrola nanošenja korištena je ekspresija  $\beta$ -aktina.

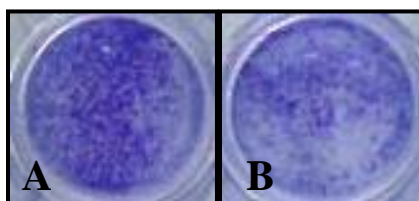
**A1235 K:** netretirane stanice A1235; **TA K:** tretirane stanice TA; **NaS:** natrijev salicilat; **TGF $\beta$ RI:** inhibitor receptora TGF $\beta$ ; **uPA:** urokinazni plazminogeni aktivator; **PAI-1:** inhibitor aktivatora plazminogena-1;  **$\beta$ -aktin:** biljeg količine proteina

### 4.3.3. Utjecaj natrijevog salicilata na migraciju stanica TA

Budući da  $TGF\beta$  može regulirati migraciju stanica, ispitali smo može li povećana ekspresija u stanicama TA utjecati na migraciju stanica te njegovu ovisnost o mehanizmu djelovanja natrijevog salicilata. Migraciju stanica TA ispitali smo testom migracije u komoricama i testom „zarastanja“.

#### 4.3.3.1. Analiza migracije stanica TA testom migracije u komoricama

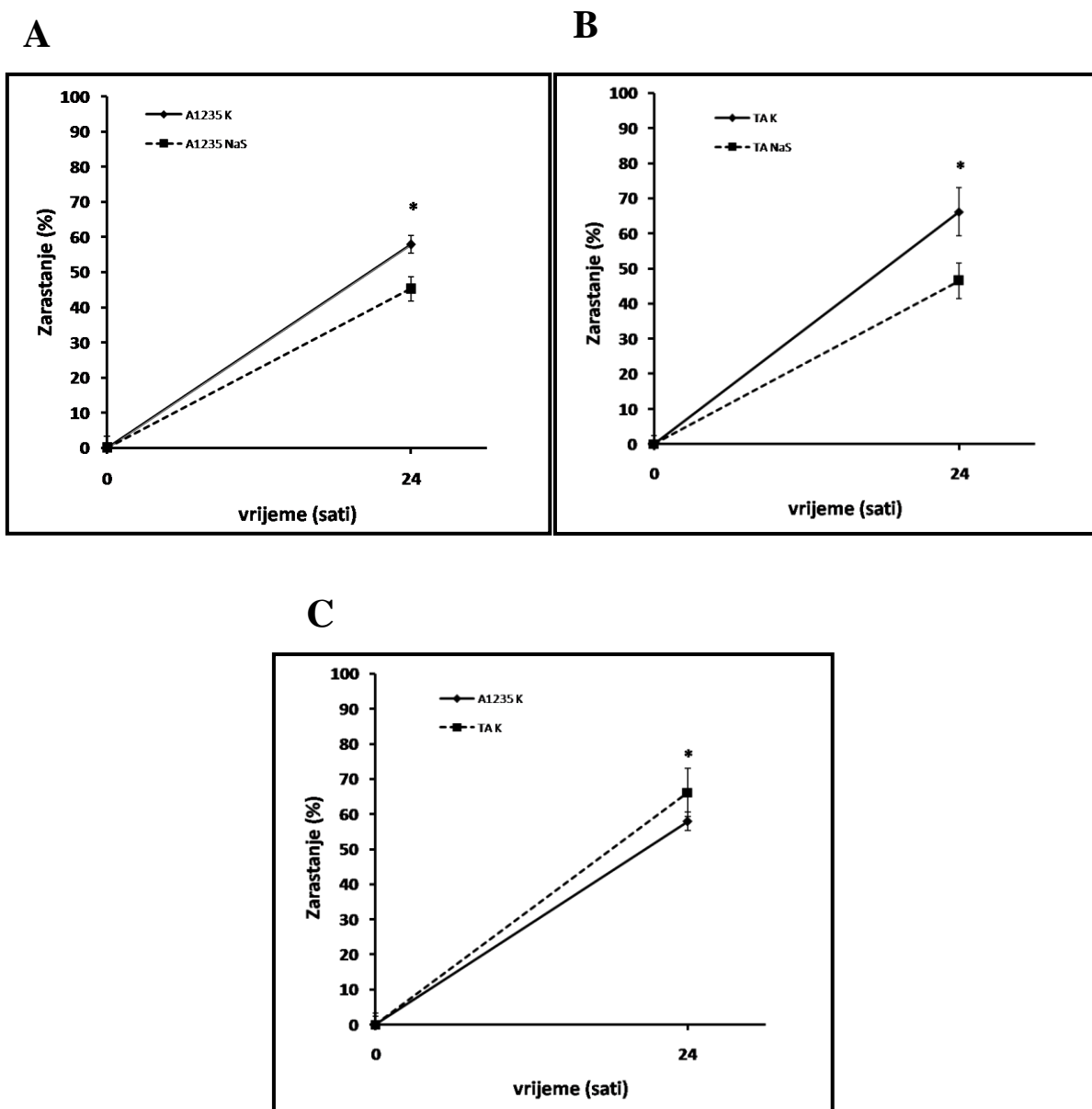
U komorice s medijem bez seruma nasadili smo stanice TA. Jednu komoricu smo tretirali s 15 mM natrijevim salicilatom, a drugu ostavili kao kontrolnu. Stanice su 24 sata migrirale kroz pore na komorici prema mediju sa serumom, potom smo ih fiksirali i obojali kristal ljubičastim. Rezultati su pokazali smanjenje migracije kod stanica TA tretiranih s natrijevim salicilatom (Slika 14B.).



**Slika 14. Migracija stanica TA u komoricama.** A) netretirane stanice TA; B) stanice TA tretirane natrijevim salicilatom. U komorice s medijem bez seruma su nasadene stanice TA i tretirane su s 15 mM NaS. Nakon 24 sata migracije, stanice su fiksirane i obojane kristal ljubičastim.

#### 4.3.3.2. Analiza migracije stanica TA testom „zarastanja“

Kako bismo proveli test „zarastanja“ stanica, napravili smo tri paralelne umjetne „ogrebotine“ na konfluentnim jednoslojnim staničnim kulturama A1235 i TA. U jednu seriju smo dodali i 15 mM natrijevog salicilata kako bi se pratio njegov utjecaj na stopu migracije stanica. Stanice smo fotografirali prije i nakon 24 sata migracije i usporedili postotak „zarastanja“ stanica A1235 i TA te ovisnost migracije o natrijevom salicilatu. Rezultati (Slika 15 A. i 15 B.) su pokazali da natrijev salicilat kod obje stanične linije smanjuje migraciju, tj. tretirane stanice sporije „zarastaju“. Uspoređujući netretirane stanične linije međusobno (Slika 15 C.) uočavamo da stanice TA brže „zarastaju“ od roditeljskih stanica A1235.



**Slika 15. Postotak „zarastanja“ stanica A1235 i TA. A)** postotak „zarastanja“ stanica A1235 ovisno o NaS; **B)** postotak „zarastanja“ stanica TA ovisno o NaS; **C)** usporedba postotka „zarastanja“ netretiranih stanica A1235 i TA. Na konfluentnom sloju stanica A1235 i TA napravljena je "ogrebotina" i izmjereno smanjenje udaljenosti granica ogrebotine nakon 24 sata. Stanice su tretirane s 15 mM NaS. Vrijednosti veličina „ogrebotine“ su normalizirane u odnosu na netretiranu kontrolu (0 sati).

**A1235 K:** netretirane stanice A1235; **TA K:** netretirane stanice TA; **NaS:** natrijev salicilat; \*statistički značajna razlika u odnosu na pripadajuću netretiranu kontrolu nakon 24 sata migracije (**A i B**) ili odnos roditeljskih stanica A1235 i stanica TA nakon 24 sata migracije (**C**) prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

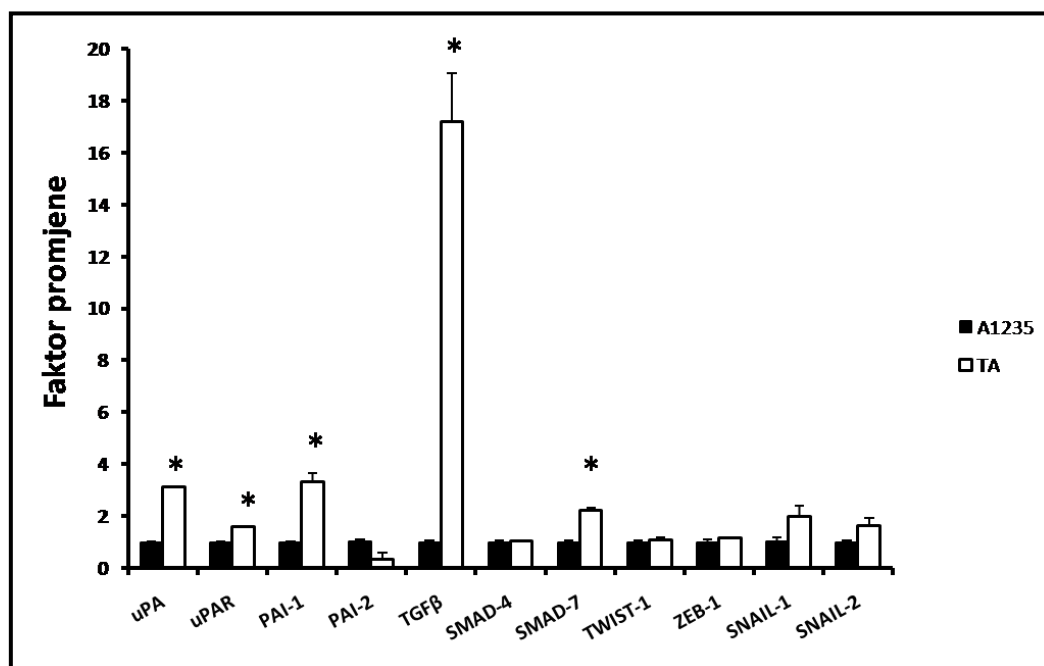


#### 4.3.4. Analiza ekspresije gena u stanicama A1235 i TA metodom *RT-qPCR*

Stanice TA usporedili smo s njihovim roditeljskim sojem i na razini ekspresije gena urokinaznog sustava, signalnog puta TGF $\beta$  i krovnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije. Iz stanica A1235 i TA izolirali smo RNA, obrnuto prepisali u cDNA te metodom *RT-qPCR* analizirali ekspresiju gena.

Rezultati (Slika 16.) su pokazali povećanu ekspresiju gena *uPA*, *uPAR* i *PAI-1*, dok je ekspresija *PAI-2* smanjena kod stanica TA u odnosu na stanice A1235. Od ispitivanih gena signalnog puta TGF $\beta$ , *SMAD-4* nije imao promjene u razini ekspresije, *SMAD-7* je blago porastao kod stanica TA, a *TGF $\beta$*  je bio 17 puta više eksprimiran u odnosu na A1235.

Nedavna istraživanja (Sánchez-Tilló i sur. 2013) su pokazala da aktivnost uPA može biti regulirana preko krovnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije, a koji su pak regulirani preko TGF $\beta$ . Ispitali smo krovne transkripcijske faktore *TWIST-1*, *ZEB-1*, *SNAIL-1* i *SNAIL-2*. Rezultati (Slika 16.) nisu pokazali velike promjene u ekspresiji u odnosu na roditeljski soj.



**Slika 16.** Ekspresija gena urokinaznog sustava, signalnog puta TGF $\beta$  i krovnih transkripcijskih faktora epitelno-mezenhimske tranzicije u stanicama A1235 i TA. Izolirana RNA iz staničnih linija obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena napravljena je metodom *RT-qPCR*. Gen *HPRT* je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolne roditeljske stanice A1235.

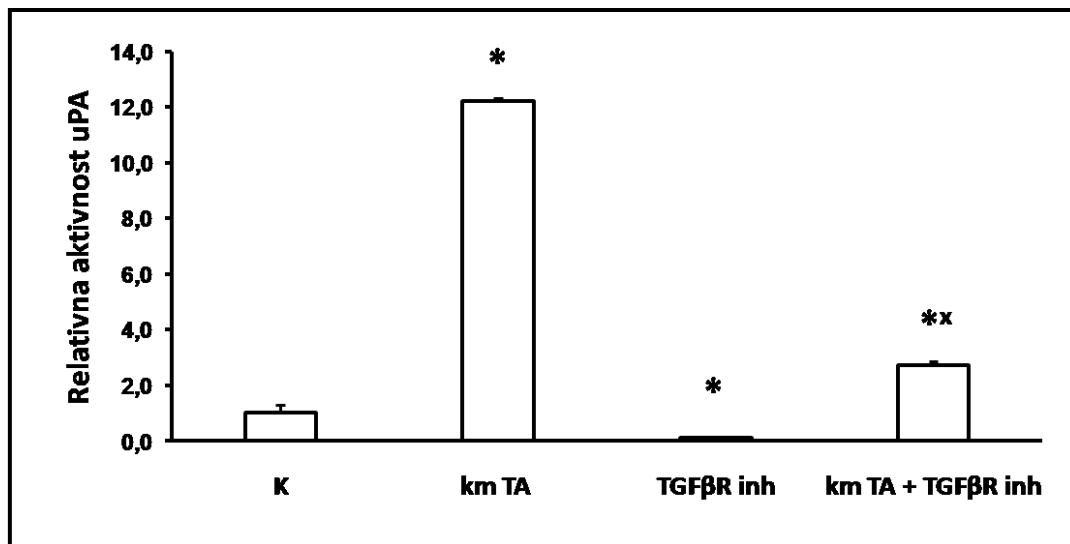
**A1235**: roditeljske stanice A1235; **TA**: stanice TA; **uPA**: urokinazni plazminogeni aktivator; **uPAR**: receptor uPA; **PAI-1/2**: inhibitori aktivatora plazminogena-1/2; **TGFβ**: transformirajući faktor rasta β; **SMAD-4/7**: transkripcijski faktori porodice smad; **TWIST-1**: transkripcijski faktor porodice twist; **ZEB-1**: engl. *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*; **SNAIL-1/2**: transkripcijski represori porodice snail; \* statistički značajna razlika u odnosu na **A1235** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.4. Utjecaj TGFβ iz kondicioniranog medija na aktivnost uPA kod stanica A1235**

Nakon što smo pokazali da stanice TA luče veće količine TGFβ u medij u kojem rastu, sakupljali smo takav kondicionirani medij za obradu roditeljskih stanica A1235. Kako bismo dokazali da inhibitor receptora TGFβ inhibira povećanu ekspresiju TGFβ i time smanjuje aktivnost uPA kod stanica TA, stanice smo tretirali s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ i sakupljeni medij analizirali radijalnom kazeinolizom.

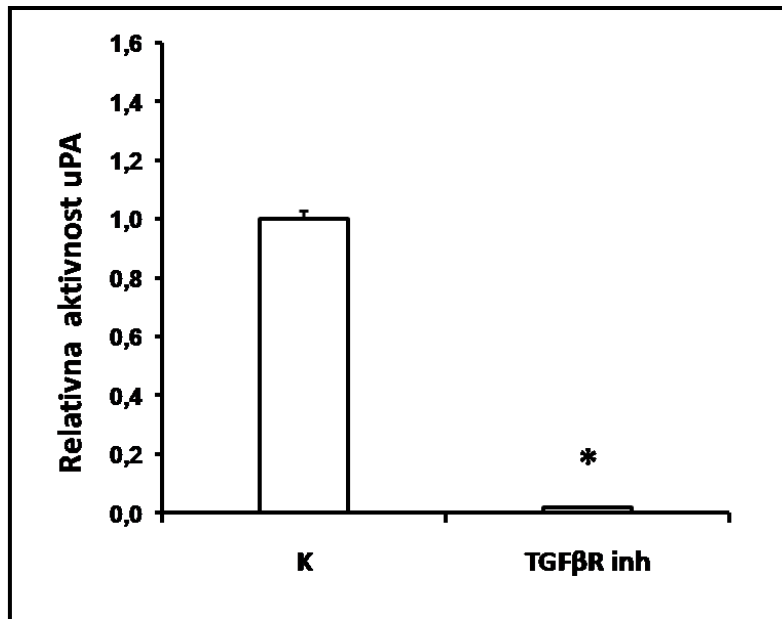
Stanice A1235 su uzgojene u mediju kondicioniranom rastom stanica TA, tj. mediju s povećanom koncentracijom TGFβ. Usporedno smo uzgajali kontrolne stanice A1235 u mediju roditeljskih stanica A1235. Pojedine kulture smo tretirali s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ. Nakon 24 sata od tretmana te dodatnih 6 sati inkubacije u mediju bez seruma, sakupili smo medije i radijalnom kazeinolizom analizirali aktivnost uPA.

Rezultati (Slika 17.) su potvrdili prethodne rezultate u kojima je inhibitor receptora TGFβ smanjio aktivnost uPA i kod kontrolnih i kod stanica s kondicioniranim medijem s TGFβ. Medij s povećanom količinom TGFβ izazvao je povećanje aktivnosti urokinaze kod roditeljskih stanica. Usporedan eksperiment sa stanicama TA tretiranim inhibitorom receptora TGFβ pokazao je da inhibicija receptora inhibira aktivnost urokinaze (Slika 18).



**Slika 17. Aktivnost urokinaze kod stanica A1235 tretiranih kondicioniranim medijem stanica TA i inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice A1235 uzgajane su u kondicioniranom mediju stanica TA s povećanim lučenjem TGFβ. Kontrolne i stanice uzgojene u kondicioniranom mediju tretirane su s 4 μM inhibitor receptora TGFβ. Aktivnost urokinaze određena je radijalnom kazeinolizom i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** roditeljske stanice A1235 u vlastitom kondicioniranom mediju; **km TA:** roditeljske stanice A1235 u kondicioniranom mediju stanica TA; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; \*x statistički značajna razlika u odnosu na **km TA** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

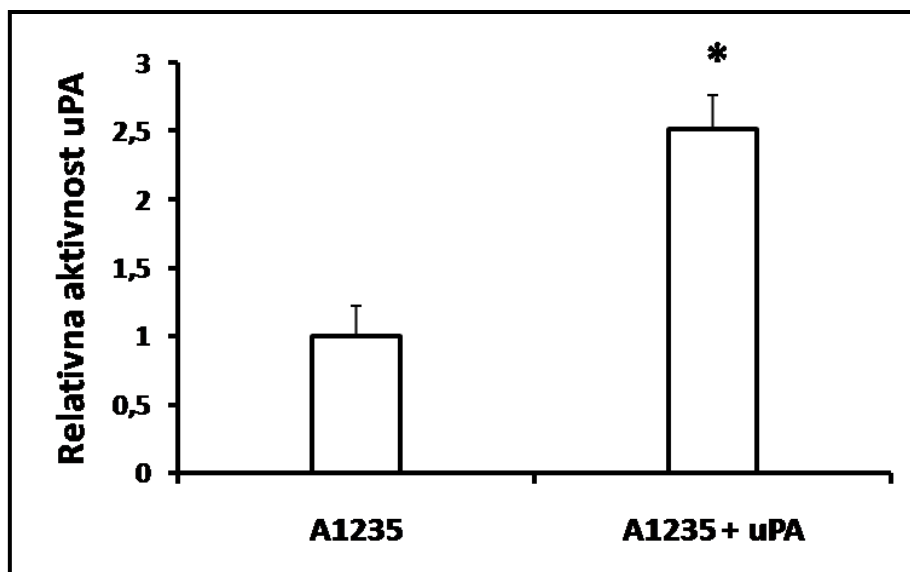


**Slika 18. Aktivnost urokinaze kod stanica TA tretiranih inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice TA tretirane su s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** netretirane stanice TA; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.5. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica A1235

Kondicionirani medij stanica TA može, osim TGFβ, sadržavati i povećanu količinu aktivne urokinaze, te povratnom signalnom vezom preko receptora uPA potaknuti ekspresiju uPA (Konakova i sur. 1998). Zato smo stanice A1235 tretirali komercijalnom urokinazom u koncentraciji od  $1 \times 10^{-3}$  U/ml.

Nakon 24 sata od tretmana stanice smo isprali i inkubirali u mediju bez seruma, dodatnih 6 sati. Aktivnost urokinaze smo odredili metodom radijalne kazeinolize. Rezultati (Slika 19.) su ukazali na povećanu aktivnost urokinaze nakon tretmana komercijalnom urokinazom.



**Slika 19. Aktivnost urokinaze kod stanica A1235 tretiranih komercijalnim uPA.** Stanice A1235 su tretirane komercijalnim uPA ( $1 \times 10^{-3}$  U/ml). Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **A1235:** netretirane stanice A1235; **A1235 + uPA:** stanice A1235 tretirane s komercijalnim urokinaznim plazminogenim aktivatorom. \*statistički značajna razlika u odnosu na **A1235** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

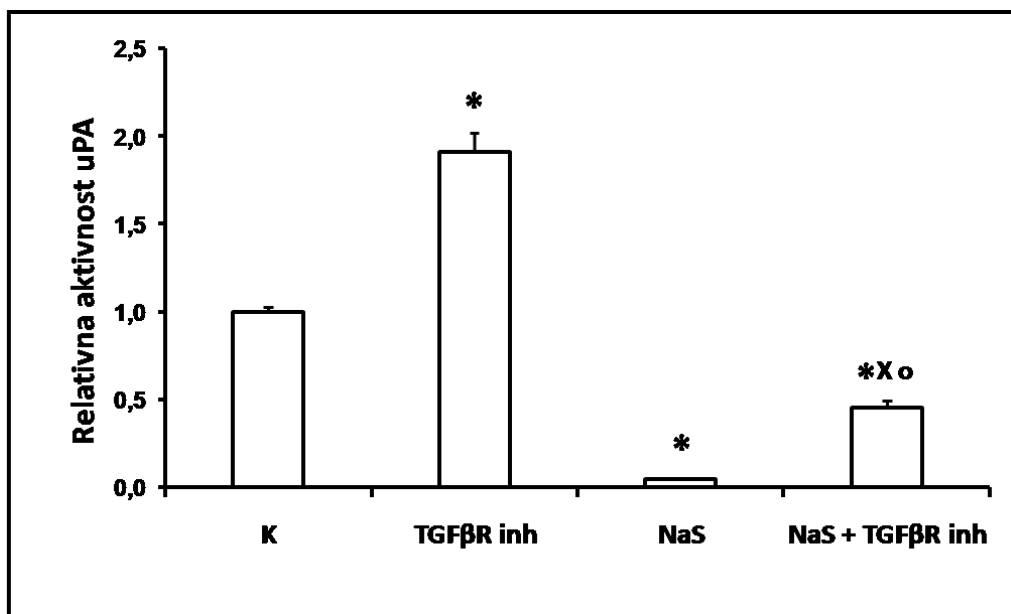
#### 4.6. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica A2182

Stanice karcinoma pluća A2182 nakon tretmana natrijevim salicilatom smanjuju aktivnost uPA (Madunić i sur. 2017), te smo ispitali ima li TGF $\beta$  ulogu u tim procesima.

##### 4.6.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS

Ulogu inhibicije TGF $\beta$  na aktivnost uPA u stanicama A2182 ispitali smo tretiranjem kontrolnih stanica i stanica tretiranih s NaS s  $4 \mu\text{M}$  inhibitorom receptora TGF $\beta$ . Nakon 24 sata tretmana, metodom radijalne kazeinolize odredili smo aktivnost uPA.

Rezultati (Slika 20.) su pokazali da inhibitor receptora TGF $\beta$  kod stanica A2182 povećava aktivnost urokinaze. U kombinaciji s natrijevim salicilatom aktivnost uPA je smanjena. Također su potvrđeni rezultati dosadašnjih istraživanja da sam natrijev salicilat smanjuje aktivnost urokinaze kod stanica A2182.



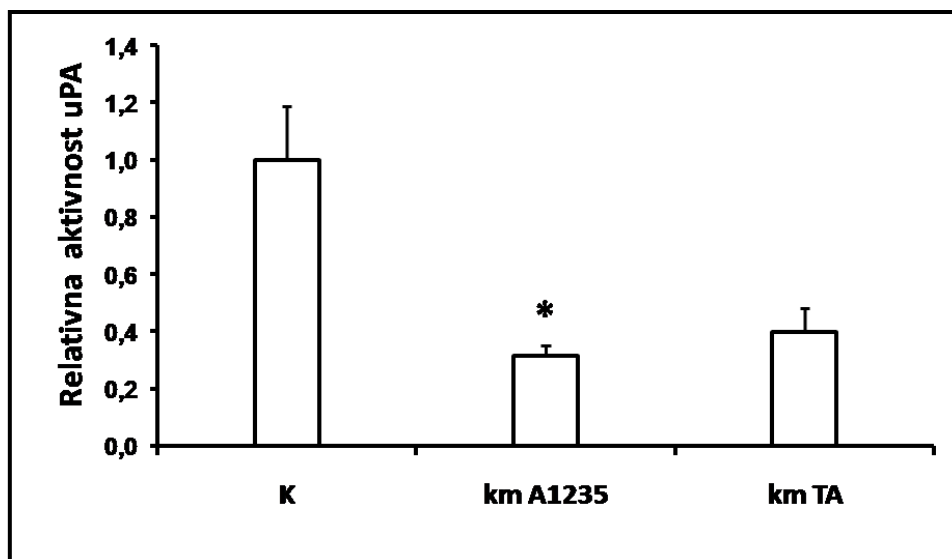
**Slika 20. Aktivnost urokinaze kod stanica A2182 tretiranih natrijevim salicilatom i inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice A2182 tretirane su s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, s 15 mM natrijevim salicilatom te njihovom kombinacijom kroz 24 sata. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** netretirane stanice A2182; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ; **NaS:** natrijev salicilat. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; ° statistički značajna razlika u odnosu na **TGFβR inh**; ° statistički značajna razlika u odnosu na **NaS** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.2. Utjecaj TGFβ na aktivnost uPA kod stanica A2182

Budući da stanice TA luče veće količine TGFβ u medij u kojem rastu, koristili smo taj kondicionirani medij za obradu stanica A2182. Kao kontrola su se koristile kulture stanica A2182 s kondicioniranim medijem roditeljskih stanica A1235. Aktivnost urokinaze odredili smo radijalnom kazeinolizom.

Rezultati (Slika 21.) su pokazali da nema znatne razlike u aktivnosti uPA bez obzira u kojem kondicioniranom mediju su stanice rasle.

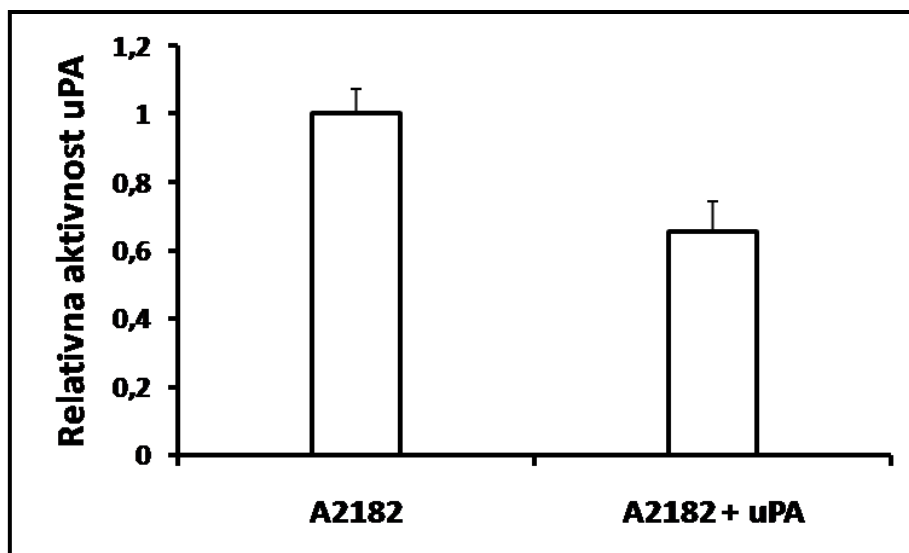


**Slika 21. Aktivnost urokinaze kod stanica A2182 tretiranih kondicioniranim medijem stanica A1235 i stanica TA.** Na stanice A2182 dodan je kondicionirani medij stanica A1235 i TA. Aktivnost urokinaze predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** stanice A2182 u vlastitom mediju; **km A1235:** stanice A2182 u kondicioniranom mediju stanica A1235; **km TA:** stanice A2182 u kondicioniranom mediju stanica TA. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.3. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica A2182

Radi ispitivanja učinka povratnih veza u regulaciji urokinaznog sustava, stanice A2182 smo također tretirali komercijalnim uPA radne koncentracije  $1 \times 10^{-3}$  U/ml kroz 24 sata, te ispitali radijalnom kazeinolizom.

Rezultati (Slika 22.) su pokazali da dodatak komercijalnog uPA znatno ne mijenja aktivnost urokinaze kod stanica A2182.



**Slika 22. Aktivnost urokinaze kod stanica A2182 tretiranih s komercijalnim uPA.** Stanice A2182 tretirane su komercijalnim uPA ( $1 \times 10^{-3}$  U/ml). Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **A2182:** netretirane stanice A2182; **A2182 + uPA:** stanice A2182 tretirane s komercijalnim urokinaznim plazminogenim aktivatorom.

#### **4.7. Utjecaj signalnog puta TGF $\beta$ na aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231**

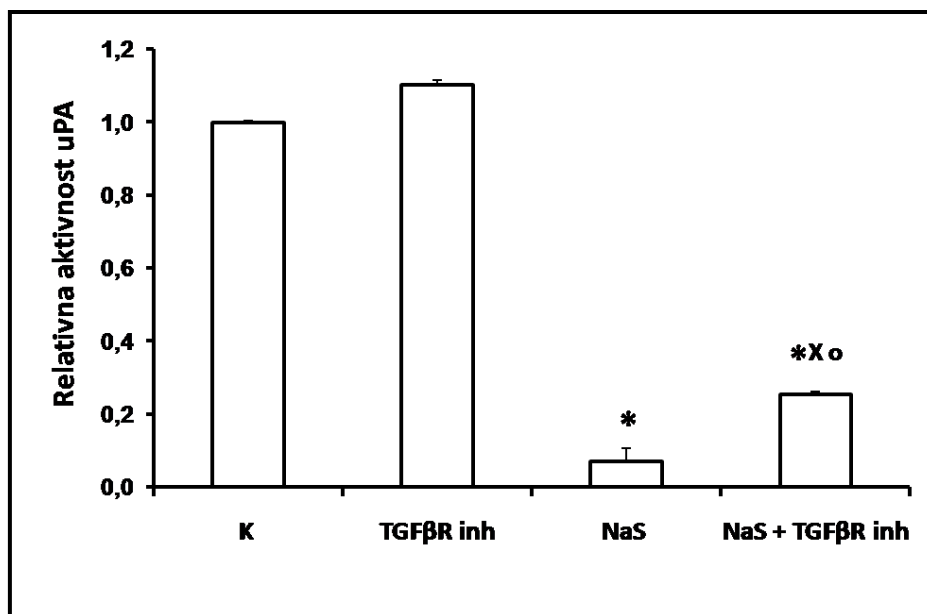
Kako stanice MDA MB-231 također nakon tretmana natrijevim salicilatom smanjuju aktivnost uPA (Madunić i sur. 2017), ispitali smo ulogu TGF $\beta$  u tim procesima.

##### **4.7.1. Utjecaj inhibicije receptora TGF $\beta$ na aktivnost uPA nakon tretmana s NaS**

Ispitali smo utjecaj inhibicije puta TGF $\beta$  na aktivnost uPA u stanicama MDA MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom. Stanice MDA MB-231 smo tretirali s 4  $\mu$ M inhibitorom receptora TGF $\beta$ , s 15 mM natrijevim salicilatom te njihovom kombinacijom. Nakon 24 sata tretmana, u kondicioniranom smo mediju metodom radijalne kazeinolize odredili aktivnost uPA.

Rezultati (Slika 23.) su pokazali da inhibicija receptora TGF $\beta$  neznatno povećava aktivnost uPA, a natrijev salicilat znatno smanjuje. Njihovom kombinacijom dolazi do smanjenja aktivnosti uPA, u usporedbi s kontrolom.





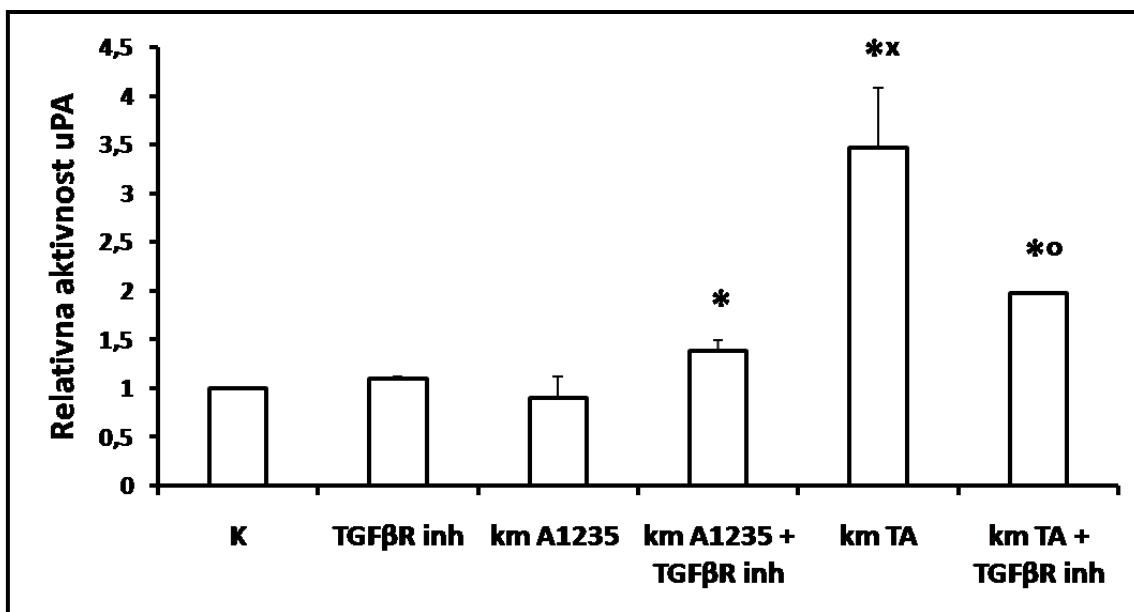
**Slika 23. Aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231 tretiranih natrijevim salicilatom i inhibitorom receptora TGFβ.** Stanice MDA MB-231 tretirane su s 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, 15 mM natrijevim salicilatom te njihovom kombinacijom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** netretirane stanice MDA MB-231; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ; **NaS:** natrijev salicilat. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; \* statistički značajna razlika u odnosu na **TGFβR inh**; ° statistički značajna razlika u odnosu na **NaS** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7.2. Utjecaj TGFβ na aktivnost uPA kod stanica MDA MB-231

Kako bismo utvrdili sudjeluje li TGFβ u mehanizmu djelovanja natrijevog salicilata na smanjenje aktivnosti uPA, stanicama MDA MB-231 smo dodali kondicionirane medije stanica A1235 i TA. Za dodatnu analizu uloge TGFβ, stanicama smo dodali inhibitor receptora TGFβ, pojedinačno i u kombinacijama s kondicioniranim medijima. Promjene aktivnosti urokinaze smo ispitali metodom radijalne kazeinolize.

Rezultati (Slika 24.) su pokazali da inhibicija receptora TGFβ nije bitno utjecala na urokinaznu aktivnost stanica MDA MB-231. Povećana koncentracija TGFβ u kondicioniranom mediju stanica TA povećala je aktivnost urokinaze. Inhibitor receptora TGFβ smanjio je tako povećanu aktivnost uPA.



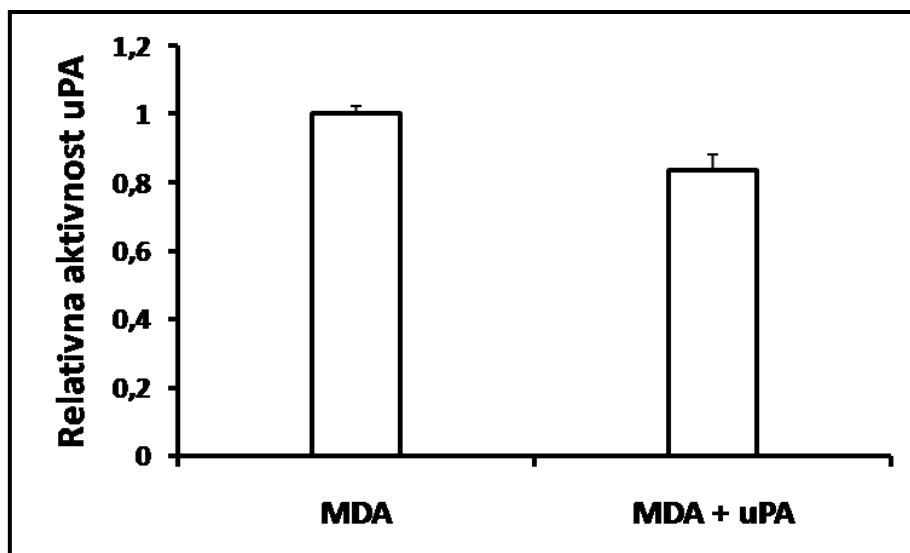
**Slika 24.** Aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231 tretiranih kondicioniranim medijem stanica A1235 i stanica TA te inhibitorom receptora TGFβ. Stanice MDA MB-231 tretirane su kondicioniranim medijem stanica A1235 i TA, 4 μM inhibitorom receptora TGFβ, te njihovim kombinacijama. Aktivnost urokinaze određena radijalnom kazeinolizom i prikazana kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**K:** stanice MDA MB-231 u vlastitom mediju; **TGFβR inh:** inhibitor receptora TGFβ; **km A1235:** stanice MDA MB-231 u kondicioniranom mediju roditeljskih stanica A1235; **km TA:** stanice MDA MB-231 u kondicioniranom mediju stanica TA. \*statistički značajna razlika u odnosu na **K**; <sup>x</sup> statistički značajna razlika u odnosu na **km A1235**; <sup>o</sup> statistički značajna razlika u odnosu na **km A1235 + TGFβR inh** prema Student T-testu ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7.3. Utjecaj komercijalnog uPA na aktivnost uPA kod stanica MDA MB-231

Kako bismo ispitali učinak povratnih veza u regulaciji urokinaznog sustava, stanice MDA MB-231 smo također tretirali komercijalnim uPA radne koncentracije  $1 \times 10^{-3}$  U/ml, kroz 24 sata. Urokinaznu aktivnost smo odredili metodom radijalne kazeinolize.

Rezultati (Slika 25.) su pokazali da dodatak komercijalnog uPA znatno ne mijenja aktivnost urokinaze stanica MDA MB-231.



**Slika 25. Aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231 tretiranih komercijalnim uPA.** Stanice MDA MB-231 tretirane su s komercijalnim uPA ( $1 \times 10^{-3}$  U/ml). Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika.

**MDA:** netretirane stanice MDA MB-231; **MDA + uPA:** stanice MDA MB-231 tretirane s komercijalnim urokinaznim plazminogenim aktivatorom.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Uloga TGF $\beta$ u regulaciji sustava uPA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi ulogu signalnog puta TGF $\beta$  u regulaciji sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora. Naime, urokinaza kao izvanstanična proteaza sudjeluje u procesima razgradnje izvanstaničnog matriksa i mogla bi biti regulirana sustavom koji upravlja procesima epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). Neki od tih procesa regulirani su signalnim putem TGF $\beta$  koji potiče ekspresiju gena tipičnih za mezenhimski fenotip, preko krovnih transkripcijskih faktora EMT (Sánchez-Tilló i sur. 2013; Moustakes i Heldin 2016). S druge strane, TGF $\beta$  sudjeluje u regulaciji sustava uPA kod keratinocita i niza drugih tipova tumorskih stanica (Iglesias i sur. 2000; Santibanez i sur. 2002a; Santibanez i sur. 2002b). Put TGF $\beta$  nizvodnim transkripcijskim faktorima može kontrolirati ekspresiju i urokinaze, njenih inhibitora i receptora, a dominantan je porast ekspresije PAI-1 putem transkripcijskih faktora SMAD (Datta i sur. 2000; Chen i sur. 2001). Urokinaza može, kao izvanstanična proteaza, povećati djelovanje TGF $\beta$  aktivacijom latentnog oblika ovog faktora (Lyons i sur. 1990; Annes i sur. 2003).

U našim istraživanjima kao model su poslužile stanice humanog glioblastoma. Ovim smo stanicama povećali ekspresiju TGF $\beta$  unosom ekspresijskog plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$  sa sekvencom TGF $\beta$ . Staničnu liniju A1235 transficiranu plazmidom uzgojili smo kao trajnu liniju i nazvali je TA te analizirali ekspresiju TGF $\beta$  na razini RNA i proteina. Ekspresija TGF $\beta$  kod stanica TA u odnosu na roditeljske stanice A1235 bila je 17 puta veća. Od ostalih ispitivanih gena signalnog puta TGF $\beta$ , SMAD-4, kofaktor transkripcijskih faktora SMAD-2 i SMAD-3, nije imao promjene u razini ekspresije, a SMAD-7, inhibitorski transkripcijski faktor u negativnoj povratnoj vezi, blago je porastao kod stanica TA. Na razini proteina bila je povećana ekspresija oblika TGF $\beta$  od oko 60 kDa što bi moglo predstavljati protein TGF $\beta$  prepisan s plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$  kod stanica TA. Ostale vrpce prikazuju prisutnost različitih oblika TGF $\beta$  koji se javlja u obliku monomera, homodimera i heterodimera. Također, različite varijante TGF $\beta$  su moguće zbog posttranslacijskih modifikacija proteina i cijepanja propeptida iz neaktivnog u aktivni oblik (Crawford i sur. 1998; Kang i sur. 2009).

Iako je u stanicama TA pokazana ekspresija proteina s plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$ , sekvenciranje plazmida je, međutim, pokazalo da su u kloniranoj sekvenci prisutne točkaste mutacije i insercija jedne baze koja uzrokuje pomak okvira čitanja (Prilog I.). Kompjutorska

*in silico* analiza sekvence aminokiselina translatiranih s plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$  pokazala je da je, zbog pojave preuranjenog STOP kodona, kodirajuća sekvenca od 300 aminokiselina, umjesto originalnih 360, te da je samo prvih 260 aminokiselina homologno TGF $\beta$ -1 (Prilog II.). Tako bi protein ekspimiran s plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$  imao masu od oko 33 kDa, a njegovi dimeri oko 60 kDa. Također je usporedba proteinskih domena TGF $\beta$ 1 pokazala da je s plazmida prepisan samo N terminalni dio odgovoran za vezanje za inhibitorski protein LTBP (engl. *latent TGF $\beta$  binding protein*), dok dio odgovoran za aktivaciju receptora nedostaje. Inače, vezanje TGF $\beta$  na LTBP disulfidnim vezama sprječava njegovo vezanje na receptore (Sinha i sur. 1998). Analiza ekspresije RNA stanica TA pokazala je višestruko povećanje ekspresije TGF $\beta$  budući da se početnice vežu za RNA promijenjenu samo u nekoliko točkastih mutacija. Međutim, usprkos deletiranom obliku proteina, stanice TA su pokazale promjene u ekspresiji niza proteina. Zaključeno je da bi to ipak mogla biti posljedica djelovanja TGF $\beta$  zbog mogućeg kompetitivnog vezanja deletiranog oblika za inhibitorski protein LTBP koje bi omogućilo oslobađanje endogenog TGF $\beta$  u medij i tako indirektnog povećanja njegove koncentracije.

Morfološki nije bilo razlika u izgledu roditeljskih i stanica TA. Kako TGF $\beta$  ima ulogu tumor supresora kod normalnih stanica i zaustavlja staničnu proliferaciju (Blobe i sur. 2000; Alberts i sur. 2008) istražili smo njegov utjecaj na rast stanica TA i nije bilo razlike u rastu u odnosu na kontrolne stanice.

Stanice TA su imale povećanu aktivnost urokinaze u odnosu na roditeljske. Proteolitička aktivnost uPA posljedica je ekspresije uPA i izlučivanja proenzima iz stanice, ali i prisutnosti inhibitora PAI-1. Zbog toga smo analizirali ekspresiju ovih molekula na razini RNA i proteina, kod roditeljskih stanica i stanica TA. Analize na razini RNA su pokazale povećanu ekspresiju gena *uPA*, *uPAR* i *PAI-1*, dok je ekspresija *PAI-2* smanjena kod stanica TA u odnosu na roditeljske. Na razini proteina nismo dobili znatno povećanje uPA niti smo detektirali visokomolekulski kompleks uPA-uPAR. Detektirana je povećana ekspresija inhibitora PAI-1. Put TGF $\beta$  inače dovodi do povećanja ekspresije PAI-1 čiji promotor sadrži sekvence za vezanje proteina SMAD (Datta i sur. 2000). Budući da smo eksperiment radili na staničnim lizatima, moguće je da TGF $\beta$  utječe na otpuštanje urokinaze iz stanica i time dovodi do povećanja njene aktivnosti.

Kako bismo detaljnije upoznali ulogu TGF $\beta$  u regulaciji sustava uPA, proveli smo eksperimente s inhibitorom receptora TGF $\beta$ . Kod roditeljskih stanica A1235 inhibitor smanjuje aktivnost uPA, ali i ekspresiju inhibitora PAI-1. Proveli smo usporedan eksperiment na stanicama TA tretiranim inhibitorom receptora TGF $\beta$  koji je isto tako pokazao da inhibicija receptora smanjuje aktivnost urokinaze. Također smo uzgojili stanice A1235 u mediju kondicioniranom rastom stanica TA. Taj medij je izazvao povećanje aktivnosti urokinaze kod roditeljskih stanica.

Kondicionirani medij stanica TA može, osim TGF $\beta$ , sadržavati i povećanu količinu aktivne urokinaze, koja povratnom signalnom vezom preko receptora uPA može potaknuti ekspresiju uPA (Konakova i sur. 1998). Isto tako, pokazano je da urokinaza može cijepanjem proteina koji čuvaju TGF $\beta$  u latentnom obliku povećati aktivnost ovog faktora rasta (Annes i sur. 2003). Stanice A1235 smo stoga tretirali komercijalnom urokinazom, da bismo vidjeli je li povećanje aktivnosti urokinaze posljedica povećanja TGF $\beta$  ili posljedica ekspresije uPA. Dobiveni rezultati su ukazali na povećanu urokinaznu aktivnost nakon tretmana komercijalnom urokinazom.

U drugom dijelu rada analizirali smo promjene urokinazne aktivnosti stanica tumora dojke MDA MB-231 i tumora pluća A2182 nakon modulacije signalnog puta TGF $\beta$ . Stanice smo uzgajali u mediju kondicioniranom stanicama TA za koje smo pretpostavili da povećavaju koncentraciju TGF $\beta$  u mediju i detektirali smo povećanu aktivnost urokinaze kod stanica MDA MB-231. Kod stanica A2182 nije bilo razlike u aktivnosti uPA kod stanica koje su rasle u mediju kondicioniranom stanicama TA, u odnosu na kontrolni kondicionirani medij stanica A1235. Da bi se isključio utjecaj povećane koncentracije aktivne urokinaze u mediju koja bi pozitivnom povratnom signalnom vezom preko receptora mogla utjecati na povećanje urokinaze (Konakova i sur. 1998), stanice smo inkubirali i uz dodatak komercijalne urokinaze, međutim nije pokazano da bi ona imala utjecaj. Obrada stanica MDA MB-231 inhibitorom puta TGF $\beta$ , međutim, nije izazvala smanjenje aktivnosti urokinaze, dok je kod A2182 došlo do porasta bazalne aktivnosti.

Moglo bi se zaključiti da signalni put TGF $\beta$  može regulirati bazalnu aktivnost urokinaze, ali su ti procesi stanično-specifični. Chen i suradnici (2001) su pokazali kako različite signalne mreže koje postoje u različitim tumorskim stanicama tj. unutarstanični okoliš može promijeniti set gena koji su mete puta TGF $\beta$ , a kako su to i uPA i njegovi inhibitori, moguće je da omjer njihove ekspresije bude specifičan za stanični tip. Ova pojava

može biti posljedica gubitka sposobnosti određenih gena da reagiraju na signale TGF $\beta$  zbog strukturnih promjena kromatina u procesu tumorigeneze (Chen i sur. 2001), postojanja različitih kofaktora transkripcije koji se kombiniraju s nizvodnim elementima signalnog puta TGF $\beta$  (Mullen i sur. 2011), te epigenetskog statusa promotora gena koji su nizvodne mete TGF $\beta$ . Zbog toga bi odgovor stanice bio ovisan o njenom unutarstaničnom miljeu (Postigo i sur. 2003; Caja i sur. 2015).

Sposobnost stanične migracije jedno je od obilježja epitelno-mezenhimske tranzicije. Signalni put TGF $\beta$  se smatra jednim od pokretača tih procesa. Sánchez-Tilló i suradnici (2013) su pokazali da je EMT proces kojim TGF $\beta$  potiče staničnu migraciju i može povećati metastaziranje. Usporedili smo stoga sposobnost migracije stanica TA s roditeljskim stanicama testom „zarastanja“ te uočili da stanice TA brže „zarastaju“ od roditeljskih iako im je stopa proliferacije bila jednaka. Također smo analizirali krovne transkripcijske faktore epitelno-mezenhimske tranzicije TWIST-1, ZEB-1, SNAIL-1 i SNAIL-2. Oni su regulirani preko TGF $\beta$ , a nedavna istraživanja su pokazala da neki od njih mogu regulirati i ekspresiju elemenata sustava uPA. Naime, otkriveno je da ZEB-1 ima sposobnost koordinirati ekspresiju uPA i PAI-1 na razini transkripcije i stabilnosti mRNA (Sánchez-Tilló i sur. 2013). Rezultati nisu pokazali velike promjene u ekspresiji u odnosu na roditeljski soj. Možemo pretpostaviti da TGF $\beta$  potiče migraciju stanica, ali ne preko regulacije gena epitelno-mezenhimske tranzicije.

## **5.2. Uloga TGF $\beta$ u mehanizmu djelovanja NaS na promjenu sustava uPA**

Budući da su dosadašnja istraživanja pokazala da obrada stanica tumora različitim kemoterapeuticima može povećati ili inhibirati aktivnost urokinaze (Matulić i Brdar 2001; Madunić i sur. 2017), drugi cilj ovog istraživanja bio je otkriti moguću ulogu signalnog puta TGF $\beta$  u tim procesima. NaS inače može utjecati na signalne puteve uključene u regulaciju gena sustava uPA, poput signalnih putova MAP kinaza i NF- $\kappa$ B (Schwenger i sur. 1997; Yin i sur. 1998; Schwenger i sur. 1999). Analize urokinazne aktivnosti nakon obrade s NaS kod nekoliko staničnih linija su pokazale da je utjecaj NaS stanično-specifičan. U staničnim linijama glioblastoma (Matulić i Brdar 2001) došlo je do povećanja aktivnosti uPA, u stanicama bubrega embrija HEK 293 nije bilo promjene dok je kod stanica tumora pluća A2182 i dojke MDA MB-231 došlo do smanjenja aktivnosti (Madunić i sur. 2017).

Natrijev salicilat je derivat acetilsalicilne kiseline (aspirina) koji se stoljećima koristi kao nesteroidni protuupalni lijek (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID) zbog svojih analgetskih i protuupalnih učinaka. Aspirin djeluje putem inhibicije ciklooksigenaza (COX), enzima uključenih u sintezu prostaglandina. NaS nema acetilnu skupinu potrebnu za proteinsku interakciju s ciklooksigenazama, ali ipak ima protuupalno djelovanje (Amann i Peskar 2002). Unutarstanični putevi djelovanja NaS su još uvijek meta istraživanja. Neke studije pokazuju da NaS utječe na COX na stupnju transkripcije i djeluje na puteve uključene u upalu preko inhibicije različitih protein kinaza (Tegeder i sur. 2001). Štoviše, pokazano je da aspirin i njegovi derivati imaju sposobnost suprimirati rast tumora kolona i prema tome pokazuju kemoterapeutski potencijal za liječenje tumora (Stark i sur. 2007).

U ovom istraživanju analizirali smo utjecaj NaS na promjenu aktivnosti urokinaze u ovisnosti o induciranoj ili inhibiranoj ekspresiji TGF $\beta$ . Pokazano je da stanice A1235 povećavaju aktivnost urokinaze nakon obrade natrijevim salicilatom, te da je taj proces ovisan i o promjeni ekspresije uPA i PAI-1 (Matulić i Brdar 2001). Stanice smo zato tretirali natrijevim salicilatom u kombinaciji s inhibitorom receptora TGF $\beta$ . Inhibitor receptora TGF $\beta$  smanjio je indukciju aktivnosti urokinaze izazvanu salicilatom te ukazao na moguće sudjelovanje ovog puta u regulaciji plazminogenog aktivacijskog sustava. Također su i stanice TA pokazale slične promjene. Ovi su rezultati potvrđeni i u eksperimentu u kojem je urokinazna aktivnost inducirana alkilirajućim agensom. Naime, stanice A1235 pokazuju porast aktivnosti urokinaze i nakon indukcije alkilirajućeg oštećenja (Brdar 1986; Brdar i Matulić 1988; Madunić i sur. 2014) kojeg ne mogu popravljati enzimom O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferazom (engl. *O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase*; MGMT) koji im nedostaje (Day i sur. 1980; Scudiero i sur. 1984). Obradom stanica kombinacijom MNNG i inhibitora receptora TGF $\beta$  istražili smo utjecaj puta TGF $\beta$  i u tim procesima je inhibitor TGF $\beta$  smanjio razinu indukcije.

Analiza utjecaja natrijevog salicilata na ekspresiju proteina urokinaznog sustava kod lizata stanica A1235 i TA pokazala je da se ekspresija pojedinih oblika TGF $\beta$  kod tretiranih stanica smanjuje u odnosu na netretirane. Kvantitativna analiza ekspresije RNA kod stanica A1235 tretiranim s NaS pokazala je, međutim, da je natrijev salicilat povećao ekspresiju *SMAD-7*, proteina uključenog u negativnu povratnu vezu puta TGF $\beta$  i blago povećao *SMAD-4*, dok promjene ekspresije *TGF $\beta$*  nisu bile statistički značajne (neobjavljeni rezultati).



Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava nakon tretmana salicilatom nije pokazala povećanje ekspresije uPA kod tretiranih stanica. Međutim, ekspresija inhibitora PAI-1 je kod tih stanica smanjena u odnosu na netretirane, čime bi se moglo objasniti povećanje aktivnosti enzima. Ove podatke potvrđuju i rezultati analize ekspresije na razini RNA (neobjavljeni podaci). S druge strane, inhibitor receptora TGF $\beta$  je također inhibirao ekspresiju PAI-1, budući da je PAI-1 reguliran signalnim putem TGF $\beta$  (Datta i sur. 2000), ali nije došlo do povećanja enzimske aktivnosti. Stanice TA imale su slične promjene u ekspresiji urokinaze i njenog inhibitora kao odgovor na obradu salicilatom kao roditeljske stanice A1235.

Kako je analiza na razini RNA pokazala da je kod stanica A1235 natrijev salicilat povećao ekspresiju *ZEB-1*, *SNAIL-1* i *SNAIL-2* kao krovih transkripcijskih faktora EMT (neobjavljeni rezultati), a stanice A1235 nakon obrade s NaS povećavaju aktivnost urokinaze, pretpostavili smo da bi NaS mogao povećati staničnu migraciju. Sposobnost migracije ispitali smo u posebnim komoricama samo na stanicama TA. Rezultati su pokazali smanjenje migracije stanica nakon obrade salicilatom. Slični su rezultati dobiveni testom „zarastanja“ stanica i kod stanica A1235 i TA. Kod testa "zarastanja" rezultat je posljedica utjecaja i na staničnu migraciju i staničnu proliferaciju, a prethodna su istraživanja pokazala da salicilat inhibira proliferaciju stanica A1235 (Matulić i Brdar 2001; Madunić i sur. 2017). Primijećeno je da NaS dovodi do inhibicije sinteze proteina i stanične proliferacije. S druge strane, istraživanje migracije stanica tumora dojke MDA MB-231 nakon obrade salicilatom pokazalo je smanjenje migracije stanica u testu „zarastanja“, no ne i u testu migracije u komoricama. Kod ovih je stanica salicilat inhibirao aktivnost urokinaze, zbog smanjene ekspresije urokinaze i povećanja ekspresije njezinih inhibitora. Analiza signalnih molekula pokazala je aktivaciju TGF $\beta$ , povećanje krovih transkripcijskih faktora EMT i promjene u ekspresiji integrina (Madunić i sur. 2017).

Dosadašnja su istraživanja pokazala da stanice tumora dojke MDA MB-231 i pluća A2182 nakon tretmana natrijevim salicilatom smanjuju aktivnost uPA (Madunić i sur. 2017). Eksperimenti s inhibicijom puta TGF $\beta$  pokazali su da kombinacija salicilata i inhibitora smanjuje inhibični utjecaj salicilata, ali ne u potpunosti. Ovi bi rezultati ukazivali da signalni put TGF $\beta$  sudjeluje u staničnom odgovoru na natrijev salicilat, ali da nije jedini faktor. Složene odnose puta TGF $\beta$  i regulacije urokinaze potvrđuju i rezultati analize ekspresije gena i proteina kod stanica MDA MB-231 tretiranih salicilatom (Madunić i sur. 2017). U ovim je stanicama salicilat smanjio aktivnost urokinaze, inhibicijom ekspresije uPA i blagim povećanjem ekspresije PAI-1. Inhibicija ekspresije uPA javila se i nakon obrade stanica

celecoxibom, specifičnog inhibitora ciklooksigenaza s aktivnostima sličnim aspirinu (Andrews i sur. 2005). Međutim, ovi su procesi bili praćeni povećanjem ekspresije *TGFβ*, *SMAD-4* i *SMAD-7*, kao i krovnog transkripcijskog faktora *ZEB-1*. S druge strane, ekspresija *ZEB-1* se povezuje s povećanjem aktivnosti urokinaze u drugim tipovima tumora (Sanchez-Tillo i sur. 2013).

Iako se sastoji od samo nekoliko stepenica, signalni put *TGFβ* vrlo je kompleksan i ovisan o unutarstaničnom okolišu, ekspresiji specifičnih kofaktora i dostupnosti signalnih molekula promotorima. To potvrđuje i njegova uloga i kao tumorskog supresora i kao promotora razvoja tumora. Naši su eksperimenti pokazali da *TGFβ* može sudjelovati u regulaciji sustava urokinaznog plazminogenog sustava na stanično-specifičan način. Također je pokazano da može modulirati stanični odgovor na obradu natrijevim salicilatom, na stanično-specifičan način. S druge strane, aktivnost urokinaznog plazminogenog sustava, iako bi mogla biti dio mezenhinskog fenotipa i sudjelovati u staničnoj migraciji, ne korelira kod svih staničnih tipova i u svim uvjetima rasta stanica s procesima epitelno-mezenhimske tranzicije. Potrebna su dodatna istraživanja da bi se upoznalo složene mehanizme regulacije ovih procesa u stanici.

## 6. ZAKLJUČAK

- (1) stanična linija TA transficirana plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$  ima povećanu ekspresiju deletiranog oblika molekule TGF $\beta$  koja ne uzrokuje promjene u morfologiji i rastu u odnosu na roditeljske stanice A1235
- (2) signalni put TGF $\beta$  utječe na promjenu aktivnosti urokinaze kod stanica humanog glioblastoma budući da inhibicija signalnog puta TGF $\beta$  smanjuje bazalnu aktivnost urokinaze i aktivnost induciranu natrijevim salicilatom, a stanice TA imaju povećanu aktivnost
- (3) inhibicija receptora TGF $\beta$  povećava aktivnost uPA kod stanica A2182, ali ne i kod stanica MDA MB-231. Natrijev salicilat znatno inhibira aktivnost uPA kod obje stanične linije, a u kombinaciji s inhibitorom dolazi do smanjenja te inhibicije
- (4) natrijev salicilat povećava urokinaznu aktivnost i smanjuje migraciju stanica TA transficiranih plazmidom pcDNA3-hTGF $\beta$
- (5) sustavi regulacije urokinaznog plazminogenog aktivatora i signalnog puta TGF $\beta$  stanično su specifični.

## 7. LITERATURA

Aguirre Ghiso JA, Alonso DF, Farias EF, Gomez DE, Bal de Kier Joffe E (1999). Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *European Journal of Biochemistry* **263**: 295–304.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Rafi M, Roberts K, Walter P (2008). Molecular biology of the cell. *Garland Science*, New York.

Amann R, Peskar BA (2002). Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *European Journal of Pharmacology* **447**: 1–9.

Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 25–40.

Andrews HN, Habibi G, Kucab JE, Dunn SE (2005). Celecoxib inhibits urokinase-type plasminogen activator (uPA) production in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **94**: 47-52.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003). Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science* **116**: 217–224.

Benasciutti E, Pagès G, Kenzior O, Folk W, Blasi F, Crippa MP (2004). MAPK and JNK transduction pathways can phosphorylate Sp1 to activate the uPA minimal promoter element and endogenous gene transcription. *Blood* **104**: 256–262.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine* **342**: 1350-1358.

Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**: 786-801.

Boon RA, Fledderus JO, Volger OL, van Wanrooij EJ, Pardali E, Weesie F, Kuiper J, Pannekoek H, ten Dijke P, Horrevoets AJ (2007). KLF2 suppresses TGF-beta signaling in endothelium through induction of Smad7 and inhibition of AP-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**: 532–553.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005). Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer* **5**: 744–749.

Brdar B (1986). Induction of Plasminogen Activator by Alkylating Agents in a Repair Defective Human Glioblastoma Cell Strain. *Cancer Research* **46**: 2282–2284.

Brdar B, Matulić M (1988). Induction of plasminogen activator by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mer+ and mer- human tumour cell strains. *Carcinogenesis* **9**: 2191–2195.

Caja L, Bellomo C, Moustakas A (2015). Transforming growth factor  $\beta$  and bone morphogenetic protein actions in brain tumors. *FEBS Letters* **589**: 1588-1597.

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  $\beta$  growth arrest program. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 992–999.

Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990). NPXY, a Sequence Often Found in Cytoplasmic Tails, Is Required for Coated Pit-mediated Internalization of the Low Density Lipoprotein Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 3116-3123.

Conese M, Blasi F (1995). Urokinase/urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**: 143–155.

Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A (2017). Stromal Modulators of TGF-  $\beta$  in Cancer. *Journal of Clinical Medicine* **6**: 1–25.

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta$ 1 in vivo. *Cell* **93**: 1159-1170.

Crippa MP (2007). Urokinase-type plasminogen activator. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**: 690–694.

Cubellis MV, Wun TC, Blasi F (1990). Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *The EMBO Journal* **9**: 1079–1085.

- D’Orazio D, Besser D, Marksitzer R, Kunz C, Hume DA, Kiefer B, Nagamine Y (1997). Cooperation of two PEA3/AP1 sites in uPA gene induction by TPA and FGF-2. *Gene* **201**: 179–187.
- Danø K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985). Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Advances in Cancer Research* **44**: 139–266.
- Day RS, Ziolkowski CH, Scudiero DA, Meyer SA, Lubiniecki AS, Girardi AJ, Galloway SM, Bynum GD (1980). Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature* **288**: 724–727.
- Datta PK, Blake MC, Moses HL (2000). Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta-induced physical and functional interactions between Smads and Sp1. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 40014–40019.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577–584.
- Didiasova M, Wujak L, Wygrecka M, Zakrzewicz D (2014). From plasminogen to plasmin: role of plasminogen receptors in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **15**: 21229-21252
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* **123**: 4195–4200.
- Fuchs H, Simon MM, Wallich R, Bechtel M, and Kramer MD (1996). *Borrelia burgdorferi* induces secretion of pro-urokinase-type plasminogen activator by human monocytes. *Infection and Immunity* **64**: 4307–4312.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: 1417–1423.
- Guerrini L, Casalino L, Corti A, Blasi F (1996). NF-kappa B-mediated regulation of urokinase gene expression by PMA and TNF-alpha in human A549 cells. *FEBS Letters* **393**: 69–73.
- Hynes R (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**: 1216–1219.

- Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M (2000). Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas. *Oncogene* **19**: 4134-4145.
- Ikushima H, Miyazono K (2010). TGF $\beta$  signalling: A complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* **10**: 415–424.
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 104–132.
- Kang JS, Liu C, Derynck R (2009). New regulatory mechanisms of TGF- $\beta$  receptor function. *Trends in Cell Biology* **19**: 385–394.
- Konakova M, Hucho F, Schleuning WD (1998). Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction. *European Journal of Biochemistry* **253**: 421-429.
- Kretzschmar M, Massague J (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 103–111.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**: 178–196.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE A (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645–648.
- Lengyel E, Stepp E, Gum R, Boyd D (1995). Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 23007–23012.
- Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, Simmet T (2007). Plasmin triggers cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**: 1383–1389.
- Lijnen HR (2005). Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**: 35–45.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology* **3**: 1-24.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta1 by plasmin. *The Journal of Cell Biology* **110**: 1361–1367.
- 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.
- Madunić J, Horvat L, Majstorović I, Jodłowska I, Antica M, Matulić M (2017). Sodium Salicylate Inhibits Urokinase Activity in MDA MB-231 Breast Cancer Cells. *Clinical Breast Cancer* **17**: 629–637.
- Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S, Sugimachi K (1999). Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **17**: 607–614.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704–715.
- Massague J (1990). The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **6**: 597-641.
- Massague J (1998). TGF- $\beta$  signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 753-91.
- Massague J (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**: 616–630.
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000). TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295–309.



- Matulić M, Brdar B (2001). Induction of Urokinase-type Plasminogen Activator by Sodium Salicylate in a Glioblastoma Cell Strain. *Food Technology and Biotechnology* **39**: 5–11.
- Matulić M, Brdar B (2002). Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor induction by etoposide in a glioblastoma cell strain. *Food Technology and Biotechnology* **40**: 1–7.
- Morisson CD, Parvani JG, Schiemann WP (2013). The Relevance of the TGF- $\beta$  Paradox to EMT-MET Programs. *Cancer Letters* **341**: 1–22.
- Moustakas A, Heldin CH (2016). Mechanisms of TGF $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine* **5**: 63.
- Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, Reddy J, Guenther MG, DeKoter RP, Young RA (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- $\beta$  signaling. *Cell* **147**: 565-576.
- Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P (2005). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **93**: 661–675.
- Nagamine Y (2008). Transcriptional regulation of the plasminogen activator inhibitor type 1 – With an emphasis on negative regulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **100**: 1007–1013.
- Pecorino L (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *The FASEB Journal* **13**: 2105-2124.
- Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO Journal* **22**: 2453-2462.
- Ravitz MJ, Wenner CE (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF- $\beta$ . *Advances in Cancer Research* **71**: 165-207.

- Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I, Sung J (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **107**: 80–85.
- Robbins KC, Summaria L, Hsieh B, Shah RJ (1967). The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *Journal of Biological Chemistry* **242**: 2333–2342.
- Santibanez JF, Iglesias M, Frontelo P, Martínez J, Quintanilla M (2002a). Involvement of the Ras/MAPK signaling pathway in the modulation of urokinase production and cellular invasiveness by transforming growth factor-beta (1) in transformed keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **273**: 521–527.
- Santibanez JF, Guerrero J, Quintanilla M, Fabra A, Martinez J (2002b). Transforming growth factor-beta1 modulates matrixmetalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**: 267–273.
- Sánchez-Tilló E, Barrios O De, Siles L, Amendola PG, Darling DS, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A (2013). ZEB1 promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1. *Clinical Cancer Research* **19**: 1071–1082.
- Schmitt M, Janicke F, Moniwa N, Chucholowski N, Pache L, Graeff H (1992). Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **373**: 611–622.
- Schwenger P, Bellosta P, Vietor I, Basilico C, Skolnik EY, Vilcek J (1997). Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 2869–2873.
- Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J (1999). Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates. *Journal of Cellular Physiology* **179**: 109–114.
- Scudiero DA, Meyer SA, Clatterbuck BE, Mattern MR, Ziolkowski CH, Day RS (1984). Relationship of DNA Repair Phenotypes of Human Fibroblast and Tumor Strains to Killing by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Research* **44**: 961–969.

Seiffert D, Smith JW (1997). The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 13705–13710.

Shi Y, Massagué J (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685–700.

Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, Kielty CM (1998). Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor- $\beta$  binding proteins. *Matrix Biology* **17**: 529-545.

Sporn MB (1996). The war on cancer. *The Lancet* **347**: 1377–1381.

Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, Jodrell DI, Clarke AR, Dunlop MG (2007). Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **28**: 968-76.

Syrovets T, Lunov O, Simmet T (2012). Plasmin as a proinflammatory cell activator. *Journal of Leukocyte Biology* **92**: 509–519.

Syrovets, T, Simmet T (2004). Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 873–885.

Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J (1998). Extracellular matrix-associated transforming growth factor- $\beta$ : role in cancer cell growth and invasion. *Advances in Cancer Research* **75**: 87-134.

Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, Wakefield LM (2003). TGF- $\beta$  switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation* **112**: 1116–1124.

Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2001). Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *The FASEB Journal* **15**: 2057-72.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871–890.

Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* **9**: 32-71.

Verde P, Boast S, Franzè A, Robbiati F, Blasi F (1988). An upstream enhancer and a negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen activator gene. *Nucleic Acids Research* **16**: 10699–10716.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I (kappa) B kinase-beta. *Nature* **396**: 77-80.

Web izvori :

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (pristupljeno 23. kolovoza 2018.)

<http://www.ensembl.org/index.html> (pristupljeno 23. kolovoza 2018.)

[https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) (pristupljeno 23. kolovoza 2018.)

## **8. PRILOZI**

Prilog I. Sekvenca dobivena sekvenciranjem ekspresijskog plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$

Prilog II. Polipeptidna sekvenca dobivena *in silico* iz rezultata sekvenciranja plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$

## Prilog I. Sekvenca dobivena sekvenciranjem ekspresijskog plazmida pcDNA3-hTGFβ

CCGAGTGGGAGCATATAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTAC  
TGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAG  
CTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGATTATGCCGCCCT  
CCGGGCTGCGGCTGCTGCTGCTGCTGCTACCGCTGCTGTGGCTACTGGTGC  
TGACGCCTGGCCGGCCGGCCGGGACTATCCACCTGCAAGACTATCGACA  
TGGAGCTGGTGAAGCGGAAGCGCATCGAGGCCATCCGCGGCCAGATCCTGT  
CCAAGCTGCGGCTCGCCAGCCCCCGAGCCAGGGGGAGGTGCCGCCCGGCC  
CGCTGCCCGAGGCCGTGCTCGCCCTGTACAACAGCACCCGCGACCGGGTGG  
CCGGGGAGAGTGCAGAACCGGAGCCCGAGCCTGAGGCCGACTACTACGCCA  
AGGAGGTCACCCGCGTGCTAATGGTGGAAACCCACAACGAAATCTATGACA  
AGTTCAAGCAGAGTACACACAGCATATATATGTTCTTCAACACATCAGAGCT  
CCGAGAAGCGGTACCTGAACCCGTGTTGCTCTCCCGGGCAGAGCTGCGTCT  
GCTGAGGCTCAAGTTAAAAGTGGAGCAGCACGTGGAGCTGTACCAGAAATA  
CAGCAACAATTCCTGGCGATACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCACCCAGCGA  
CTCGCCAGAGTGGTTATCTTTTGATGTCACCGGAGTTGTGCGGCAGTGGTTG  
AGCCGTGGAGGGGAAATTGAGGGCTTTCGCCTTAGCGCCCACTGCTCCTGT  
GACAGCAGGGATAACACACTGCAAGTGGACATCAACGGGTTCACTACCGGC  
CGCCGAGGTGACCTGGCCACCATTCATGGCATGAACCGGCCTTTCCTGCTTC  
TCATGGCCACCCCGCTGGAGAGGGCCAGCATCTGCAAAGCTCCCGGCAC  
CGCCGAGCCCTGGACACCAACTATTGCTTCAGCTCCACGGAGAAGAAGTCTGCT  
GCGTGCGGCAGCTGTACATTGACTTCCGCAAGGACTTCGGCTGGAAGTGGATC  
CACGAGCCCAAGGGCTACCATGCCAACTTCTGCCTCGGGCCCTGCCCTACATTT  
GGAACCTGGACACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGCCCTGTACAACCAGCATTAAAC  
CCGGGGGCTTTCGGCGGGCCCTGGCTTCTTTGTCCCAAGGGCTTGGAAACCCTGC  
CCCTCCGTGTAACACCTGGGGCCCCAAGCCCAAGGTGGGAACACCTGTCCACACT  
GATCTGGGCGCCTCTGCAAATGCGGCTGAAATACCTTTGGGAATTTTGGAAATAA  
CCTTCACACTGGGGGGGCGCTCGGAATTGGTCTTAAAGGGGCCTTATTCTAATTG  
TGCCCAAATGTGAAACCTCCTATAAACCCCCAGGTGGCTCTTAATTTGCGCCC  
ACCTTGTTTGTGCCCTCCCCGGCCGTCTTTTCAACGGGGAAGGGGGCTTCCCCCG  
CTCTCTCTAAAAAAGAAGATAATCCCCCTTTTTCGAGGGAGGCTTTAATTTCTC  
TTGGGGGGGGGGTGGGGGGACCCACCACAAAAGAGAATAGATATACACAACC  
TCCCCTTCGGGTCGGTGTGTTGGCTCTTTTGTAAACAGAAAACCAATTTGGTTGTGGA

CCCCGCCCCCAGAGCCCAACAGGGTTGGGTGTGACCACAGAACCACAACGCTTTC  
CCCTTCCTT

**Legenda:** Plavom bojom označena je kodirajuća sekvenca TGF $\beta$ ; crvenom bojom je označena insercija koja uvodi pomak okvira čitanja zbog kojeg se pojavljuje preuranjeni STOP kodon TGA (označen zelenom bojom).

(Dobiveno pomoću programa <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> i <http://www.ensembl.org/index.html>)

## **Prilog II. Polipeptidna sekvenca dobivena *in silico* iz rezultata sekvenciranja plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$**

Met P P S G L R L L L L L P L L W L L V L T P G R P A A G L S T C K T I D Met E L V  
K R K R I E A I R G Q I L S K L R L A S P P S Q G E V P P G P L P E A V L A L Y N S T  
R D R V A G E S A E P E P E P E A D Y Y A K E V T R V L Met V E T H N E I Y D K F  
K Q S T H S I Y Met F F N T S E L R E A V P E P V L L S R A E L R L L R L K L K V E  
Q H V E L Y Q K Y S N N S W R Y L S N R L L A P S D S P E W L S F D V T G V V R Q  
W L S R G G E I E G F R L S A H C S C D S R D N T L Q V D I N G F T T G R R G D L A  
T I H G Met N R P F L L L Met A T P **A G E G P A S A K L P A P P S P G H Q L L L Q L H**  
**G E E L L R A A A V H Stop**

**Legenda:** Pomoću programa [https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) sekvenca dobivena sekvenciranjem plazmida pcDNA3-hTGF $\beta$  je prepisana u aminokiseline. Crveno označeno je aminokiselina alanin koja je zbog insercije zamijenila leucin, a zeleno slijed promijenjenih aminokiselina zbog pomaka okvira čitanja.

# ŽIVOTOPIS

---

## OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: **Dominik Puljić**  
Datum i mjesto rođenja: 18. rujna 1991., Mostar, BiH

---

## OBRAZOVANJE:

**2015. – 2018.** **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

**2012. – 2015.** **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**  
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

---

## RADNO ISKUSTVO:

**ožujak 2017. – lipanj 2018.** **Izrada diplomskog rada**  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za molekularnu biologiju  
Mentori: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić,  
mag. biol.mol. Luka Horvat

**rujan 2017. - veljača 2018.** **Demonstrature** iz kolegija:  
„Medicinska genetika“ i „Molekularna dijagnostika“  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za molekularnu biologiju  
Mentor: izv.prof.dr.sc. Petra Korać

**rujan 2017. - listopad 2017.** **Laboratorijska stručna praksa**  
Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“  
Mentor: prof.dr.sc. Jasna Bošnjir

**ožujak 2016. - srpanj 2016.** **Laboratorijska stručna praksa**  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za molekularnu biologiju  
Mentori: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, dr. sc. Josip Madunić

**rujan 2015. - veljača 2016.** **Demonstrature** iz kolegija:  
„Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima“  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za animalnu fiziologiju  
Mentori: doc.dr.sc. Duje Lisičić, doc.dr.sc. Sofia Ana Blažević

**ožujak 2015. - srpanj 2015.** **Laboratorijska stručna praksa**  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za animalnu fiziologiju  
Mentor: izv.prof.dr.sc. Vesna Benković

**rujan 2013. - veljača 2014.** **Demonstrature** iz kolegija: „Zoologija“  
Sveučilište u Zagrebu, PMF, Zavod za zoologiju  
Mentori: prof.dr.sc. Mladen Kučinić, dr.sc. Lucija Šerić Jelaska

**srpanj 2014.** **Terenska nastava** iz botanike i zoologije u Petrinji, Hrvatska

---



## VJEŠTINE I INTERESI:

<b>Osobne vještine:</b>	organiziranost, pouzdanost, preciznost, strpljivost, motiviranost
<b>Jezici:</b>	Engleski – napredno znanje, Njemački – osnovno znanje
<b>Tehničke vještine:</b>	<i>MS Office, ImageJ, SnapGene, PhotoScape</i>
<b>Volonterski rad:</b>	Projekt „Kumstva“ udruge Kolajna ljubavi, 72 sata bez kompromisa, Pučka kuhinja Misionarki ljubavi, 40 dana za život
<b>Hobiji:</b>	slikarstvo, fotografija, hortikultura, planinarenje, psihologija

---

## NAGRADE I AKTIVNOSTI:

<b>rujan 2018</b>	<b>2. Hrvatski simpozij biologa u zdravstvu</b> u Poreču- poster na temu: „ <i>Crosstalk between urokinase system and TGFβ pathway in human glioblastoma cell line</i> “ (Horvat L, Puljić D, Matulić M)
<b>2015.-2018.</b>	stipendija za izvrsnost <b>JP „Elektroprivreda HZHB“</b> (Mostar, BiH)
<b>2012.-2015.</b>	stipendija za izvrsnost <b>Croatian Scholarship Fund</b> (California, SAD)
<b>2018.- sada</b>	polaznik tečaja „ <b>Tečaj komunikacije i odnosa</b> “
<b>ožujak 2018.</b>	Sudionik „ <b>Radionice o osobnim financijama</b> “ tvrtke bonaFIN
<b>2016. i 2017.</b>	voditelj radionice i sudionik na „ <b>Noć biologije</b> “ (PMF, Zagreb)
<b>2015. i 2016.</b>	promotor Biološkog odsjekana „ <b>Smotri sveučilišta u Zagrebu</b> “
<b>svibanj 2015.</b>	sudionik na projektu „ <b>Radićevi dani</b> “ u SD Stjepan Radić
<b>2012.-2017.</b>	aktivnosti kao člana „ <b>Zavičajnog kluba hercegovačkih studenata</b> “