

# Kloniranje urokinaznog plazminogenog aktivatora, njegovog inhibitora i receptora te njihova ekspresija u ljudskim stanicama u kulturi

---

Balent, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:049696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Tihana Balent

**Kloniranje urokinaznog plazminogenog  
aktivatora, njegovog inhibitora i receptora  
te njihova ekspresija u ljudskim stanicama  
u kulturi**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Tihana Balent

**Cloning of urokinase plasminogen  
activator, its inhibitor and receptor and  
their expression in human cells in culture**

Master thesis

Zagreb, 2022.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 Homeostaza izgradnje i razgradnje tkiva .....	1
1.2 Plazminogeni aktivatori .....	1
1.3 Ekstracelularni matriks .....	3
1.4 Urokinazni sustav .....	3
1.5 Urokinazni plazminogeni aktivator.....	5
1.6 Receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora .....	7
1.7 Inhibitori urokinaznog plazminogenog aktivatora .....	8
1.8 Urokinazni sustav kao dio staničnih signalnih puteva .....	10
1.9 Uloga urokinaznog sustava u razvoju bolesti .....	11
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>14</b>
3.1 Umnažanje sekvenca za uPA, PAI-1 i uPAR .....	14
3.1.1 Agarozna gel elektroforeza .....	14
3.1.2 Izolacija DNA iz agaroznog gela .....	15
3.2 Ugradnja sekvenci u pGEM plazmid .....	16
3.3 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija rekombinantnim plazmidima .....	17
3.4 Izolacija plazmida iz bakterija .....	18
3.5 Cijepanje plazmida restrikcijskim enzimima .....	18
3.6 Ugradnja izrezanih sekvenci u plazmid pcDNA3 .....	19

3.7 Analiza orijentacije kloniranih fragmenata .....	20
3.8 Transfekcija stanica plazmidima pomoću Lipofectamina te njihov selektivni rast .....	21
3.9 Kazeinoliza .....	22
3.10 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	23
3.11 Obrada podataka .....	24
3.12 Western blot .....	24
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>27</b>
4.1 Konstrukcija rekombinantnih plazmida sa sekvencama uPA, PAI-1 i uPAR.....	27
4.2 Transfekcija stanica .....	31
4.3 Analiza urokinazne aktivnosti u stanicama transficiranim plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR .....	32
4.4 Analiza ekspresije proteina .....	36
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>40</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>45</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>46</b>
<b>8. PRILOZI .....</b>	<b>52</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>55</b>

Ovaj rad izrađen je 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 edukacije biologije i kemije.

*Ogromno hvala mentorici na stručnim savjetima, uloženom vremenu i trudu te pomoći tijekom izrade ovog rada. Posebno hvala na iskazanom strpljenju jer je izrada ovog rada trajala malo duže vrijeme.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci tijekom studija, a posebno sestri Lidiji zbog savjeta i pomoći na početku studiranja. Hvala kolegicama s faksa s kojima sam dijelila dobro i loše. Za kraj, hvala i ekipi s LA-a. Nedostajat će mi sastanci i kave na hodniku nakon ponoći.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Kloniranje urokinaznog plazminogenog aktivatora, njegovog inhibitora i receptora te njihova ekspresija u ljudskim stanicama u kulturi

Tihana Balent

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Urokinazni plazminogeni aktivator (uPA) ili urokinaza zaslužan je za aktivaciju plazminogena i njegovu pretvorbu u plazmin, proteolitički enzim koji razgrađuje ekstracelularni matriks. Urokinaza je dio sustava koji obuhvaća i receptor uPA (uPAR) koji je veže na staničnu membranu te njene inhibitore, PAI-1 i PAI-2. Cilj ovog rada bio je klonirati sekvence koje kodiraju za urokinazu, njen receptor i inhibitor PAI-1 te ih eksprimirati u različitim staničnim linijama. Analiza ekstracelularne enzimske aktivnosti i ekspresije pojedinih elemenata sustava u različitim tipovima stanica ukazala bi na mehanizme regulacije urokinazne aktivnosti. Konstruirani su plazmidi sa sekvencama gena za uPA, PAI-1 i uPAR te transficirane stanične linije A1235, HeLa i HEK293. Stanice HEK293 i A1235 transficirane plazmidom sa sekvencom za uPA imale su bazalnu aktivnost urokinaze. Sojevi stanica A1235 i HEK293 transficirani plazmidom sa sekvencom za PAI-1, pokazali su smanjenu aktivnost urokinaze. Stanice HeLa nisu pokazale urokinaznu aktivnost. Unos plazmida sa sekvencom uPAR nije utjecao na urokinaznu aktivnost stanica. Analiza ekspresije proteina pokazala je da plazmidi sa sekvencom urokinaze nisu promijenili razinu ekspresije ovog proteina u staničnim lizatima. Kod stanica A1235 i HEK293 detektirano je povećanje ekspresije uPAR i PAI-1 nakon transfekcije plazmidima s njihovim sekvencama. Uzgojene stanične linije s različitom urokinaznom aktivnosti mogu poslužiti kao model za istraživanje utjecaja urokinaznog sustava na staničnu proliferaciju, migraciju i preživljenje.

(55 stranica, 18 slika, 1 tablica, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: urokinaza, PAI-1, uPAR, tumorske stanice, ekspresija, aktivnost

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

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

prof. dr. sc. Željka Soldin

prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 10.2.2022.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

# Cloning of urokinase plasminogen activator, its inhibitor and receptor and their expression in human cells in culture

Tihana Balent

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Urokinase plasminogen activator (uPA) or urokinase is responsible for the activation of plasminogen and its conversion into plasmin, a proteolytic enzyme that degrades the extracellular matrix. Urokinase is a part of a system that includes the uPA receptor (uPAR) that binds urokinase to the cell membrane and its inhibitors, PAI-1 and PAI-2. The aim of this study was to clone sequences encoding urokinase, its receptor and PAI-1, and to express them in different cell lines. Analysis of extracellular enzyme activity and expression of individual urokinase system elements in different cell types, could indicate the regulatory mechanisms of urokinase activity. Plasmids with gene sequences for uPA, PAI-1 and uPAR were constructed and A1235, HeLa and HEK293 cell lines were transfected with plasmids. HEK293 and A1235 cells transfected with the uPA sequence plasmid had basal urokinase activity. A1235 and HEK293 cell strains transfected with plasmid containing PAI-1 sequence showed reduced urokinase activity. HeLa cells did not have urokinase activity. Expression of plasmids with the uPAR sequence did not affect urokinase activity in the transfected cell lines. Analysis of protein expression showed that plasmids with the urokinase sequence did not change the expression levels of this protein in the cell lysates. In A1235 and HEK293 cells, an increase in uPAR and PAI-1 expression was detected after transfection with plasmids with corresponding sequences. Cell strains with different urokinase activity can serve as a model for investigating the impact of the urokinase system on cell proliferation, migration and survival.

(55 pages, 18 images, 1 table, 61 references, original language: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: urokinase, PAI-1, uPAR, tumor cells, expression, activity

Supervisor: Assoc. Prof. Maja Matulić PhD

Reviewers: Assoc. Prof. Maja Matulić PhD

Prof. Željka Soldin, PhD

Prof. Ines Radanović, PhD

Thesis accepted: 10.2.2022.

## **Kratice:**

kDa - kilodalton

LBS - proteini s lizinskim ostacima tzv. "lysine-binding sites"

tPA - tkivni plazminogeni aktivator

uPA - urokinazni plazminogeni aktivator

ECM - ekstracelularni matriks

A2PI - inhibitor plazmina  $\alpha$ 2-antiplazmin

$\alpha$ 2M - opći inhibitor proteaza  $\alpha$ 2-makroglobulin

MMP - matriksne metaloproteinaze

uPAR - receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora

PAI-1 - inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora

VEGF - eng. vascular endothelial growth factor

sc-uPA = pro-uPA - inaktivirani jednolančani uPA

pro-HGF - faktor rasta hepatocita

GPI - glikozil-fosfatidil-inozitolno sidro

LU - eng. Ly6/uPAR/ $\alpha$ -neurotoxin-like podjedinice uPAR

FPR - eng. formyl peptide receptors

su-uPAR - eng. soluble uPAR

RCL - eng. reactive center loop

LRP1 proteinom - eng. LDL receptor-related protein 1

MAPK - eng. mitogen-activated protein kinase

TGF- $\beta$ 1 - eng. transforming growth factor- $\beta$

BMP protein - eng. bone morphogenetic proteins

EMT - epitelno mezenhimska tranzicija

Sp1 i Sp3 - specifični proteini 1 i 3

JNK kinaze - eng. c-Jun N-terminal kinase

NF- $\kappa$ B - eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

TCF - eng. T-cell factor

PCR - eng. polymerase chain reaction

dNTP - nukleozid trifosfati

rpm - eng. revolutions per minute, okretaja u minuti

kb - kilo baza

ATP - adenzin trifosfat

IPTG - izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid

X-gal - 5-bromo-4-kloro-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid

bp - eng. base pair, par baza

GFP - eng. green fluorescent protein, zeleni fluorescentni protein

BSA - eng. bovine serum albumine, albumin govedeg seruma

PMSF - eng. fenilmetilsulfonil fluorid

SDS - natrijev dodecilsulfat

APS - amonijev persulfat

TEMED - tetrametiletilediamin

PVDF - eng. polyvinylidene fluoride

fMLF - N-formilmetionil-leucil-fenilalanin, N-formilirani tripeptid

# 1. UVOD

## 1.1 Homeostaza izgradnje i razgradnje tkiva

Svaki organizam nastoji postići unutarnju ravnotežu i optimalno obavljanje svih životno važnih funkcija. U razvijenim organizmima veliku ulogu u procesu homeostaze ima krvožilni sustav jer krv dopire do svake stanice kako bi dovela hranjive tvari te uklonila štetne i nepotrebne tvari. Protok krvi može biti blokiran zbog različitih stanja, npr. velikih krvarenja ili krvnih ugrušaka. U svakodnevnom životu se često događaju male ozljede. Kapilare vrlo često pucaju ili se začepi malim ugrušcima, ali to ne predstavlja veliku opasnost jer organizam stalno popravlja nastala oštećenja (Velnar i sur. 2009). Ukoliko se detektira oštećenje endotela žile, pokreće se niz kompleksnih reakcija. Dolazi do spazma žile i aktivacije trombocita kako bi se spriječilo daljnje krvarenje. Nakon aktivacije enzima trombina, fibrinogen prelazi u niti fibrina u koje se zapletu krvne stanice i tako omogućuju nastanak krvnog ugrušaka dok se ne popravi endotel žile. No, krvni ugrušci ne mogu dugo opstati u žili jer blokiranje krvnog protoka je pogubno za tkivo tako da postoji mehanizam njihove razgradnje. Razgradnja krvnih ugrušaka je regulirana pretvorbom neaktivnog plazminogen u proteolitički enzim plazmin koji razgrađuje komponente krvnih ugrušaka i druge proteine (Chapin i Hajjar 2015).

## 1.2 Plazminogeni aktivatori

Plazminogen je zimogeni protein kojeg proizvodi i luči jetra. Njegova molekulska masa je 92-94 kDa jer ovisi o razini glikolizacije. Stalno cirkulira u krvi u malim količinama gdje je prisutan u svom neaktivnom obliku. Sastoji se od N-terminalne domene, pet domena „kringle“ i domene serinske proteaze u kojoj je klasična katalitička trijada sastavljena od histidina, aspartata i serina. Domene kringle su rigidni dijelovi proteina povezani mnogim disulfidnim vezama. Ime same strukture potječe od peciva koje je slične okruglaste strukture. Domene kringle imaju mnogo mjesta vezanja proteina s lizinskim ostacima tzv. „lysine-binding sites“ (LBS) koji sudjeluju u interakciji s fibrinom u ugrušcima, receptorima na površini stanice i drugim proteinima. Osim toga domene kringle sudjeluju i intramolekulskim interakcijama s N-terminalnom domenom, pa tako omogućuju da plazminogen ostaje u svojoj zatvorenoj, tj. neaktivnoj formi dok kola krvlju. Vezanjem plazminogena na stanični receptor događa se niz

konformacijskih promjena kako bi plazminogeni aktivator mogao potaknuti cijepanje peptidne veze Arg561-Val562.

Aktivacija plazmina, tj. pretvorba plazminogena u plazmin, može biti aktivirana pomoću dva aktivatora. Prvi je tkivni plazminogeni aktivator ili tPA, a drugi je urokinazni plazminogeni aktivator ili uPA (Bharadwaj i sur. 2021). Cijepanjem peptidne veze jednolančani plazminogen postaje dvolančani plazmin čiji su lanci povezani dvjema disulfidnim vezama (Cys548–Cys666, Cys558–Cys566), a otpušta se N-terminalni dio od 77 preostalih aminokiselina. Glavna i najpoznatija zadaća plazmina je cijepanje stabilne mreže vlaknastog proteina fibrina na manje i topive dijelove. Osim ove funkcije, plazmin sudjeluje u razgradnji proteina izvanstaničnog matriksa (ECM, eng. extracellular matrix) (Schaller i Gerber 2010).

Aktivnost plazminogenih aktivatora i nastanak plazmina iz plazminogena strogo je regulirana jer je plazminogen ubikvitiran proteina, a nastali plazmin jaka serinska proteaza koja može razgrađivati različite proteine. Plazmin je uključena u procese razgradnje krvnih ugrušaka, izvanstaničnog matriksa, pregradnju tkiva u ovulaciji, procese upale itd. Razgradnjom matriksa i fibrina oslobađaju se faktori rasta ili aktiviraju metaloproteinaze (Okomura i sur. 2007). Aktivnost plazminogenih aktivatora može biti smanjena djelovanjem dvaju inhibitora plazminogenog aktivatora, PAI-1 i PAI-2. Također, u krvi postoje inhibitori plazmina:  $\alpha$ 2-antiplazmin (A2PI) i opći inhibitor proteaza  $\alpha$ 2-makroglobulin ( $\alpha$ 2M) (Schaller i Gerber 2010).

Tkivni plazminogeni aktivator ili tPA funkcijski ima istu ulogu kao i uPA, ali je njegova primarna zadaća razgradnja krvnih ugrušaka. tPA se izlučuje u krv kao zimogeni enzim, ali čak i u takvoj jednolančanoj formi pokazuje aktivnost, dok se puna aktivnost postiže u aktivnoj dvolančanoj formi enzima koja nastaje prilikom reakcije s primjerice fibrinom, koagulacijskim faktorima ili proteazama iz skupine kalikreina. tPA također sadrži domene kringle koje reagiraju s terminalnim lizinom i argininom iz fibrina. Veliki afinitet prema fibrinu čini tPA usko specijaliziranim za razgradnju krvnih ugrušaka, a izlučuje ga endotel žila. Dopire i do mozga jer u svojoj strukturi ima tzv. „domenu prsta“ koja omogućuje prijelaz krvno-moždane barijere. U literaturi su opisane male razlike u strukturi tPA pa se pretpostavlja da postoji više vrsta tPA koje treba dodatno istražiti (Chevilley i sur. 2015).

Molekule s aktivnošću tPA imaju veliku primjenu u medicini kod liječenja raznih bolesti i stanja koja su povezana s nastankom krvnih ugrušaka. Iako u krvi opstaje veoma kratko, oko 5 min, koriste se u slučaju ishemičnog moždanog ili srčanog udara, tromboze vena u nogama itd.

Veoma je bitno da se pravilno doziraju kako bi njihovo djelovanje bilo ograničeno samo na otapanje ugrušaka, a ne na oštećivanje zdravog tkiva (El-Sherbiny i sur. 2014).

### **1.3 Ekstracelularni matriks**

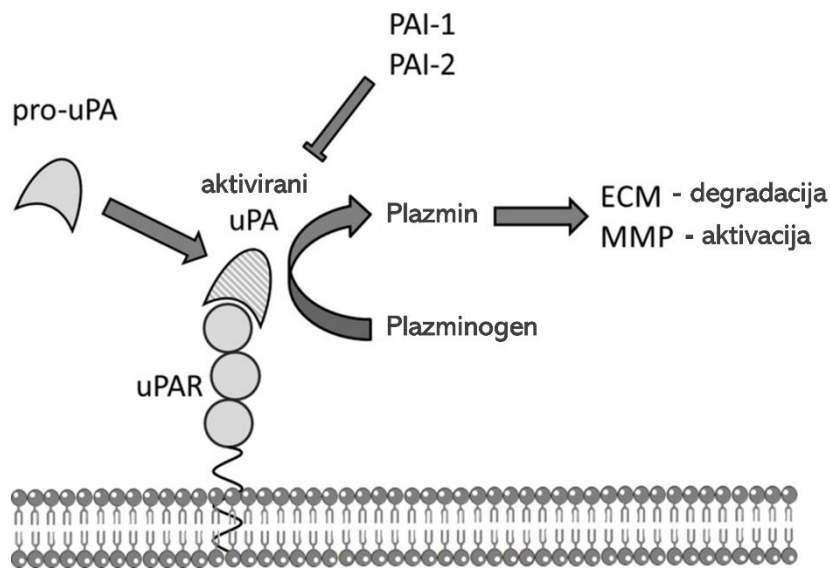
Ekstracelularni matriks ili ECM (eng. extracellular matrix) naziv je za strukturu koja ispunjava prostor između stanica. Matriks može biti intersticijski ili izgrađivati bazalnu membranu. Sastoji se od glikoproteina, proteoglikana, niza fibrilarnih proteina poput lamina, kolagena IV i fibronektina koji međusobnim povezivanjem čine mrežu, a vezani su za stanicu preko integrina. Intersticijski matriks uglavnom proizvode stanice vezivnog tkiva, a sadrži rahlu amorfnu tvar, sastavljenu od proteoglikana povezanih s vlaknastim proteinima poput kolagena. Može vezati i regulirati djelovanje faktora rasta koje luče stanice. Faktori rasta su endogene signalne molekule koje reguliraju odgovor stanica na različite podražaje te potiču proliferaciju, zarastanje rana i remodeliranje tkiva. Sudjeluju i u imunološkim odgovorima, ali mogu sudjelovati i u malignim procesima (Park i sur. 2017). ECM utječe na aktivnost i dostupnost tih faktora (Høye i Erler 2015, Hynes i Naba 2012). Uočeno je da se ECM oko tumora i oko zdravog tkiva razlikuje, što potvrđuje teoriju da tumori utječu na remodeliranje matriksa (Naba i sur. 2012).

### **1.4 Urokinazni sustav**

Urokinazni sustav se sastoji od urokinaze ili urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA) koji je serinska proteaza. On se veže na receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPAR) na staničnoj membrani. Glavni inhibitor tog sustava je tzv. inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora (PAI-1). Djelovanjem uPA vezanim na uPAR, dolazi do cijepanja plazminogena i nastaje plazmin koji ima proteolitičku ulogu te sudjeluje u remodeliranju ECM (Brungs i sur. 2017) (Slika 1.).

Urokinazni sustav uključen je u mnoge fiziološke procese. Važan je u funkcioniranju imunološkog sustava, npr. u proliferaciji limfocita kako bi se tijelo borilo protiv upale, sudjeluje u procesu zarastanja rana, ugradnji trofoblasta u zid maternice, embriogenezi, ovulaciji, zarastanju rana, pregradnji tkiva itd. U tom procesu važnu ulogu ima VEGF (eng. vascular endothelial growth factor) čija je aktivacija povezana s procesom razgradnje ECM i proliferacijom endotelnih stanica (Breuss i Uhrin 2012). Također, urokinaza je bitna tijekom

razgradnje ugrušaka nakon embolije pluća, akutnog infarkta miokarda, mikrougrušaka u oku, oporavaka nakon krvarenja itd. (Crippa 2007). Urokinazni sustav bitan je i u procesu regeneracije mišića nakon ozljeda jer je potrebno razgraditi oštećena te izgraditi nova vlakna. Vjeruje se da bi jednog dana mogli koristiti ovaj sustav u procesu regeneracije mišića kod mišićnih degenerativnih bolesti (Suelves i sur. 2005).



**Slika 1. Shematski prikaz urokinaznog sustava**

Urokinazni receptor je vezan za staničnu membranu i veže na sebe inaktivni prourokinazni plazminogeni aktivator (pro-uPA). To uzrokuje nastanak urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA) koji pretvara inaktivni plazminogen u aktivnu proteazu plazmin. Plazmin razgrađuje proteine ECM i posredno aktivira MMP koje još dodatno razgrađuju ECM i aktiviraju druge stanične puteve. Aktivaciju urokinaznog sustava mogu spriječiti inhibitori PAI-1 i 2. uPAR: receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora, uPA: urokinazni plazminogeni aktivator, pro-uPA: prourokinazni plazminogeni aktivator, ECM: ekstraselularni matriks, MMP: matriksne metaloproteinaze, PAI-1 i 2: inhibitori urokinaznog plazminogenog aktivatora (preuzeto i prerađeno prema Brungs i sur. 2017)

## 1.5 Urokinazni plazminogeni aktivator

Urokinazni plazminogeni aktivator ili uPA, ima sličnu ulogu kao i tPA, ali ima puno manji afinitet prema trombinu. Ponajviše sudjeluje u remodeliranju ECM tijekom normalnog rasta i razvoja tkiva, ali i tijekom malignih promjena u procesu metastaziranja tumora. tPA se naziva tkivnim aktivatorom jer je prvotno izoliran iz tkiva, a urokinazni je izoliran iz uzorka urina. Slično kao i kod tPA, uPA proizvode endotelne stanice, ali i stanice pluća, bubrega, keratinociti itd. (Schaller i Gerber 2010). uPA se proizvodi kao pro-uPA koji je zimogeni jednolančani protein od 411 aminokiselina, mase 55 kDa. Na konačnu masu, koja može biti i preko 70 kDa, utječe stupanj glikolizacije. Pro-uPA (ili jednolančani uPA, sc-uPA) aktivira se i pretvara u dvolančani uPA povezan disulfidnom vezom posredstvom raznih faktora, npr. mnogih proteaza poput kalikreina, katepsina, hepsina, samog plazmina ili pak faktora koagulacije.

uPA ima više domena u svojoj strukturi: aminokiseline 1-49 čine domenu koja je slična faktorima rasta, dok domenu kringle čine aminokiseline 50-131. Te dvije domene su povezane preko tzv. vezne domene (aminokiseline 132-158) s domenom serinske proteaze (aminokiseline 159-411). Iako točan način rada svake pojedine domene nije do kraja razjašnjen, pretpostavlja se da domena faktora rasta sudjeluje u interakciji s urokinaznim plazminogenim receptorom (uPAR), a domene kringle dodatno stabiliziraju nastali kompleks uPA/uPAR. To je bitno jer nastali kompleks ima važnu ulogu u migraciji stanica, proliferaciji i adheziji. Domena kringle može samostalno vezati transmembranski protein integrin, pa uPA sudjeluje u staničnoj migraciji. Domena serinske proteaze građena je od histidina, aspartata i serina te je reakcijsko mjesto koje služi za cijepanje veze arginin 560-valin 561 plazminogena i nastanak plazmina. uPA preko katalitičke domene može posredno potaknuti proliferaciju stanica, apoptozu i razgradnju ECM jer može reagirati s faktorom rasta hepatocita (pro-HGF) i proteinom koji stimulira makrofage (Carriero i sur. 2009).

Gen za pro-uPA, *PLAU*, veličine je 6.4 kb i nalazi se duljem kraku desetog kromosoma. Regulacija ekspresije urokinaze bazira se na aktivaciji gena *PLAU* te ekspresija tog gena ovisi o tipu stanica. Uglavnom je niska u zdravih stanicama, dok je u malignim često višestruko povećana. Na ekspresiju gena *PLAU* utječu razni faktori rasta, hormoni, citokini, kao i razne morfološke promjene u stanicama. Bazalnu i inducibilnu ekspresiju kontroliraju proksimalni promotor i pojačivač (eng. enhancer) koji se nalaze ispred početka transkripcijskog mjesta za *PLAU*. Promotorska regija sadrži mjesta vezanja raznih transkripcijskih faktora poput NF- $\kappa$ B (eng. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), aktivatorski protein 1



(AP-1) i dr. te je pod utjecajem različitih signalnih puteva. Neki transkripcijski faktori su pod utjecajem signalnog puta Ras/MAPK kojeg aktiviraju faktori rasta, citokini, UV svjetlost itd. Ovaj put je često pojačano aktivirani u tumorima (Carriero i sur. 2009, Chou i sur. 2018, Galvagni i sur. 2013). Proksimalni minimalni promotor sastoji se od regije bogate sekvencama GC/GA. Tu regiju mogu prepoznati transkripcijski faktori poznati kao specifični proteini, Sp1 i Sp3 te su oni uključeni u bazalnu ekspresiju. S druge strane, proteini Ets1 i Ets2 koji se veži na regiju pojačivača, oko 2 kb ispred regije GC/GA, uključeni su u dodatnu aktivaciju gena *PLAU*.

Transkripcijski faktor Ets reguliran je signalnim putem MAPK (mitogen-aktivirana protein kinaza), kinazom ERK, dok je transkripcijski faktor AP1, sastavljen od proteina Jun u obliku homo ili Jun/Fos heterodimera, reguliran kinazom JNK (eng. c-Jun N-terminal kinase). Ekspresija urokinaze može biti ovisna i o drugim signalnim putovima, npr. NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -kateninom i TCF (eng. T-cell factor) reguliranim putem Wnt. Signalni putovi koji reguliraju ekspresiju urokinaze mogu biti aktivirani raznim faktorima rasta i citokinima (Mahmood 2018, Nagamine i sur. 2005).

Povišena razina transkripcije gena *PLAU* detektirana je u mnogim tumorima. Naime, aktivacija gena *PLAU* moguće je jedan od faktora u aktivaciji epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) gdje čvrsto povezane epitelne stanice gube svoj oblik i prelaze u lako gibljive mezenhimske stanice. Jedan od osnovnih pokretača EMT je signalni put TGF- $\beta$  (Chen i sur. 2021).

TGF- $\beta$ 1 (eng. transforming growth factor- $\beta$ ) je faktor rasta i član istoimene porodice dimernih proteina koja sadrži oko 40 strukturno sličnih faktora rasta, aktivina, inhibina, proteina BMP (eng. bone morphogenetic proteins) itd. TGF- $\beta$  može regulirati ekspresiju uPA preko signalnog puta Ha-Ras/ERK1,2 i Rac1/ROS/NF $\kappa$ B (Santibanez i sur. 2018, Morikawa i sur. 2016).

## 1.6 Receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora

Receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora ili uPAR, još zvani i CD 87, protein je od 283 aminokiseline koji u glikoliziranom stanju ima masu od oko 46 kDa. C-terminalni kraj proteina vezan je pomoću glikozil-fosfatidil-inozitolnog sidra (GPI) za staničnu membranu, iako postoje i slobodne forme uPAR (Barnathan i sur. 1990). uPAR je eksprimiran uglavnom na površini monocita, makrofaga, endotelnih stanica, stanica glatkih mišića itd. (Breuss i Uhrin 2021).

uPAR se sastoji od 3 domene LU (eng. Ly6/uPAR/ $\alpha$ -neurotoxin-like) od kojih svaka ima oko 90 aminokiselina te su evolucijski visoko očuvane. Ovaj relativno mali receptor može reagirati s mnoštvom proteina. Pretpostavlja se da receptor prolazi kroz konformacijske promjene kako bi reagirao s različitim ligandima. Kod interakcije s uPA, poznato je da se sve tri domene LU saviju prema unutra te se pomiču aminokiseline 130–140, formirajući strukturu nalik džepu koja reagira s domenom faktora rasta u uPA. uPAR ne veže nužno samo uPA, već i druge proteine i to usporedno s vezanjem uPA, jer se uPA smjesti u nastali džep, a drugi proteinski ostaci mogu reagirati s ostalim proteinima. uPAR tako veže glikoprotein vitronektin prisutan u ECM, koji je bitan u adheziji stanica te transmembranske receptore integrine. Surađuje s receptorima za epidermalni faktor rasta, receptorima spregnutim s G-proteinom, receptorima za lipoproteine male gustoće i faktore zgrušavanja itd. (Xu i sur. 2012). Također veže i kininogene visoke molekularne mase, direktne prekursore za kinin koji sudjeluje u zgrušavanju krvi, vazodilataciji, kontrakciji glatkih mišića i upalnim reakcijama (Ponczek 2021).

Budući da je uPAR vezan za staničnu membranu, vezanjem urokinaze može lokalizirati razgradnju ECM. Primjerice, maligne stanice razgrađuju bazalnu membranu da bi prodrle u krvotok ili limfne žile u procesu metastaziranja. Moguće je da u tom procesu sudjeluje uPAR vezan za uPA (Llinas i sur. 2005).

uPAR sudjeluje u fiziološkim procesima kao što je ciljana razgradnja proteina ili oporavak nakon ishemičnog moždanog udara. Povišena razina uPAR je povezana i s patološkim procesima jer je ekspresija u zdravom tkivu niska, dok je u malignom ili bolesnom tkivu povećana. Vjeruje se da povećanje ekspresije uPAR ima ulogu u malignim bolestima, reumatoidnom artritisu, aterosklerozi, ulceroznom kolitisu, Crohnovoj bolesti, degenerativnim promjenama na mozgu, bolestima bubrega, teškim imunskim reakcijama itd. Zbog činjenice da je povećana ekspresija povezana s razvojem bolesti, danas se ulažu napor da uPAR postane

jedan od dijagnostičkih markera za kardiovaskularne, bubrežne, reumatoidne i jetrene bolesti (Liu i sur. 2019, Baart 2020).

Zanimljivo je da se uPAR može povezati s pandemijom COVID-19 virusa. Naime, uPAR reagira s receptorima FPR (eng. formyl peptide receptors) koji su uključeni u obranu od patogena i ostalih malignih bolesti. Pronađeno je da određeni pacijenti, koji pate od komorbiditeta, imaju povišene razine slobodne forma uPAR (suPAR, eng. soluble). Upala, dugotrajan stres na tijelo i teška klinička slika kod zaraze mogu izazvati povišenje razine suPAR u serumu koja remeti normalan rad uPA/uPAR sistema (D'Alonzo i sur. 2020).

## **1.7 Inhibitori urokinaznog plazminogenog aktivatora: PAI-1 i PAI-2**

PAI-1 je inhibitor koji je prisutan u plazmi te ima veliki afinitet za tPA i uPA. PAI-1 se luči u svom aktivnom obliku, ali brzo prelazi u inaktivni oblik i u tom obliku cirkulira sve dok se ne reaktivira u kontaktu s fosfolipidima ili kaotropnim molekulama. Takvo ponašanje je neobično za protein iz skupine serpina te sam mehanizam takvog reagiranja nije do kraja objašnjen. Protein je često povezan s vitronektinom koji vjerojatno stabilizira aktivnu formu. Također reagira i s antikoagulansom heparinom, kako bi se smanjila aktivnost trombina u plazmi (Vasalli i sur. 1991).

PAI-1 luče mnoge stanice poput endotelinih, glatkih mišićnih te jetrenih stanica. U slučaju velikih vaskularnih ozljeda trombociti djeluju na smanjenje sekrecije inhibitora. PAI-1 se izlučuje kao jednolančani glikoprotein mase oko 50 kDa, ovisno o stupnju glikolizacije. Struktura mu je slična kao i u ostalih proteina iz skupine serpina, a informacija za njegovu sintezu je kodirana na sedmom kromosmu genom *SERPINE1* od 12.2 kb (Schaller i Gerber 2011).

Molekula PAI-1 se sastoji od dvije domene, prva je domena RCL (eng. reactive center loop) koja je primarno mjesto za vezanje uPA i njegovu inhibiciju. Druga domena se sastoji od 3 fleksibilne proteinske zavojnice koje se nazivaju D, E i F. Vezanjem uPA za reakcijsko mjesto RCL, odsijeca se mali dio molekule PAI-1 i stvara se novi kompleks koji uzrokuje inaktivaciju uPA ili tPA te pomicanje domene RCL tvoreći novu, treću podvrstu inhibitora. Moguća je i inaktivacija uPA i tPA bez formacije kompleksa i u tom slučaju je PAI-1 sposoban i dalje reagirati s drugim proteinima pomoću ostatka molekule, ali više ne može ponovo reagirati s uPA ili tPA zbog pomaka domene RCL.

PAI-1 ima ulogu u adheziji i migraciji stanica. Kada nema PAI-1, kompleks uPA/uPAR ima veći afinitet za vitronektin i integrine. Kada se PAI-1 veže na kompleks, uzrokuje prekid interakcija kompleksa i vitronektina ili integrina, smanjujući mogućnost migracije ili adhezije stanica. PAI-1 može vezati vitronektin s većim afinitetom nego uPAR i time se sprječava adhezija i migracija stanica. PAI-1 vezan s kompleksom uPA/uPAR može reagirati s proteinom LRP1 (eng. LDL receptor-related protein 1) koji se nalazi na membrani stanica i potaknuti endocitozu kompleksa uPA/uPAR. Endocitoza kompleksa uPA/uPAR vezanog s PAI-1 može aktivirati neke signalne puteve. Ulaskom u stanicu počinje razgradnja urokinaznog kompleksa, a moguće je recikliranje receptora koji se tada vraća na membranu (Rahman i Krause 2020).

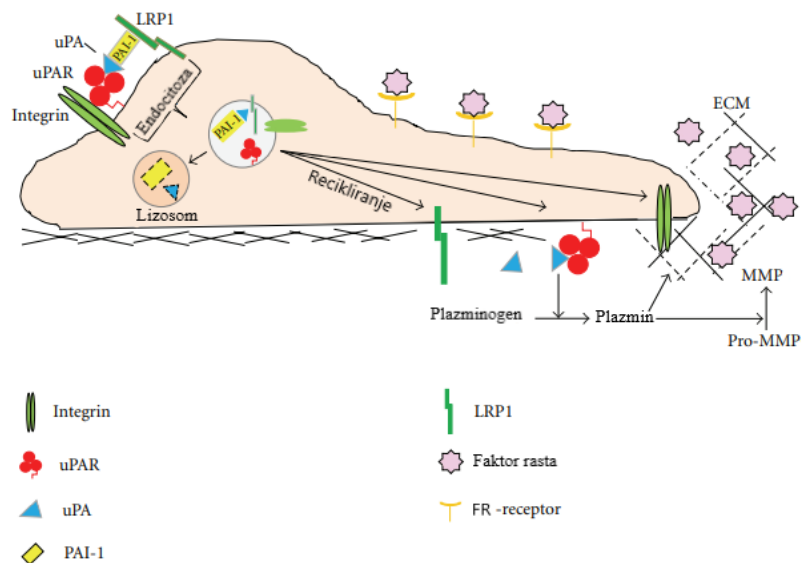
Studije *in vitro* pokazuju da PAI-1 može biti induciran signalnim putem TGF- $\beta$  i da njegov promotor sadrži elemente koji su potrebni za vezanje SMAD proteina koji su signalni transduktori nizvodno od receptora za TGF- $\beta$ . Aktivirani receptori za TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI II) induciraju fosforilaciju SMAD 2 i 3 koji tvore kompleks sa SMAD 4. Nastali kompleks translocira se u jezgru gdje regulira ekspresiju mnogih gena, a ujedno i PAI-1 (Kawaradai sur. 2016). Put TGF- $\beta$ , osim što djeluje na ekspresiju uPA i PAI-1, također inducira ekspresiju uPAR u nekim linijama stanicama, posredno utječe na aktivaciju MMP i sudjeluje u odvijanju epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) stanica u procesu metastaziranja. Ekspresija i aktivnost SMAD proteina utječe na EMT tako da se induciraju krovni transkripcijski faktori SNAIL, ZEB i TWIST te utiša ekspresija E-kadherina (Hao i sur. 2019, Santibanez i sur. 2018, Morikawa i sur. 2016).

PAI-2 je protein koji se u plazmi nalazi u vrlo malim količinama i detektiran je prvi put u krvi trudnica jer se tada povećava njegova koncentracija. Aktivnost ovog inhibitora je manja od aktivnosti inhibitora PAI-1. Moguće je da PAI-2 inhibira neke druge još neidentificirane enzime, pogotovo u stanju trudnoće. Povezuje se s reguliranjem proliferacije, diferencijacije te apoptozom stanica. PAI-2 se može i izlučivati i sintetizirati u citosolu, dok je PAI-1 isključivo sekretorni proteina (Medcalf i Stasinopoulos 2005, Rahman i Krause 2020).

## 1.8 Urokinazni sustav kao dio staničnih signalnih puteva

Iako uPAR nema transmembransku i intracelularnu domenu, može, surađujući s drugim molekulama, utjecati na unutarstanično signaliziranje. Tako vezanje uPA i PAI-1 utječe na stanično signaliziranje, a jedna od molekula koje u tome posreduju je LRP1. LRP1 može reagirati s integrinima, proteoglikanima i receptorima faktora rasta. Kao jedna od posljedica tih reakcija je aktivacija signalnog puta MAPK (eng. mitogen-activated protein kinase) i kinaze Src. Aktivacija signalnih puteva i proteina potiče proliferaciju stanica i njihovu migraciju mijenjajući aktivnost GTP-aza iz porodice Rho koje utječu na aktinski citoskelet (Hall 2012, Czekay i sur. 2011). PAI-1 može reagirati s LRP1 i potaknuti aktivaciju puta Jak/Stat1 koji ima za posljedicu migraciju stanica, apoptozu itd. (Simone i Higgins 2012).

Metaloproteinaze (MMP) su ekstracelularni enzimi te je za njihovu katalitičku aktivnost potreban metal. Mogu biti slobodne ili vezane uz staničnu membranu (Barillari 2020). MMP remodeliraju stanični matriks, a za njihovu aktivaciju i rad jednim dijelom je zaslužan i urokinazni sustav budući da se njihovi proenzimi aktiviraju djelovanjem plazmina, nastalog djelovanjem urokinaze (Slika 2). Urokinazni sustav, povezan s LRP1, pokreće cijeli niz signalnih putova i reakcija koje vode prema proliferaciji, migraciji, stvaranju novog tkiva te angiogenezi, tj. procesu stvaranja novih krvnih žila. Mnogi od ovih procesa povezani su s tumorigenozom. Primjerice proces angiogeneze iznimno je bitan u metastazi tumora jer veći i agresivniji tumori iznimno potiču angiogenezu kako bi se mogli neometano širiti (Rahman i Krause, 2020).



**Slika 2. uPA i PAI-1 reguliraju migraciju stanica putem remodeliranja ECM**

Razgradnja proteina uz rub stanične membrane regulirana je djelovanjem urokinaznog sustava te aktivacijom plazminogena na površini stanice. PAI-1 može inhibirati rad urokinaznog sustava i onemogućiti stvaranje plazmina. Pericelularna proteoliza potiče razgradnju ECM, prekida vezu staničnog matriksa s receptorima poput integrina, dovodi do otpuštanja bioaktivnih molekula poput faktora rasta, što ima za posljedicu proliferaciju i migraciju stanica. PAI-1: inhibitor plazminogenog aktivatora-1, uPA: urokinazni plazminogeni aktivator, uPAR: receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora, MMP: matriksne metaloproteinaze, ECM: ekstracelularni matriks, FR: receptor za faktor rasta, LRP1: eng. *low-density lipoprotein receptor-related protein-1*. (Preuzeto i prilagođeno prema Czekay i sur. 2011)

## 1.9 Uloga urokinaznog sustava u razvoju bolesti

Razgradnja ECM jedan je od najbitnijih koraka pri invazivnom rastu tumora. Najčešći tumori u ljudi su tumori epitelnog tkiva koji pri invazivnom rastu probijaju bazalnu membranu. Također, u procesu metastaziranja, tumorske stanice ulaze u krvne i limfne žile, šire se u udaljene dijelove organizma, te izlaze iz krvožilnog sustava i stvaraju novu malignu tvorevinu. Sve ove stepenice zahtijevaju pregradnju ECM, u čemu ulogu može imati i urokinazni sustav (Barillari 2020). U radu Mahmood i sur. (2018) prikazana je korelacije između pojave mnogih

vrsta malignih bolesti i njihova poveznica s poremećenim razinama uPA, PAI-1 i 2 ili uPAR. Poremećena funkcija određenih dijelova urokinaznog sustava utvrđena je kod tumora dojke, prostate, jajnika, maternice, kostiju i mekog tkiva, želuca, prostate, melanoma, leukemije itd. Vidljivo je da poremećena funkcija urokinaznog sustava igra ulogu u razvoju i napretku mnogih bolesti te su stoga potrebna daljnja istraživanja, kako bi se pronašao način reguliranja rada tog sustava.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je klonirati sekvence koje kodiraju za urokinazu, njen receptor i inhibitor PAI-1 i eksprimirati ih u različitim staničnim linijama. Analiza ekstracelularne enzimske aktivnosti i ekspresije pojedinih elemenata sustava u različitim tipovima stanica ukazala bi na mehanizme regulacije urokinazne aktivnosti.

Prvi dio rada obuhvatio bi konstrukciju plazmida za ekspresiju uPA, PAI-1 i uPAR u eukariotskim stanicama. Transfekcijom staničnih linija A1235, HeLa i HEK293 uzgojili bi se stabilni klonovi transficiranih stanica. Analizirat će se urokinazna aktivnost kondicioniranog medija u kojem su rasle stanice da bi se utvrdila aktivnost proteina kodiranih plazmidima te ekspresija proteina urokinaznog sustava.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Umnažanje sekvenci za uPA, PAI-1 i uPAR

cDNA stanica A1235 sintetizirana je reverznom transkripcijom iz ukupne stanične RNA u prethodnim eksperimentima. Sekvence gena uPA, PAI-1 i uPAR umnožene su iz cDNA reakcijom PCR (eng. polymerase chain reaction) pomoću specifičnih početnica.

Za sintezu koristi se ALLin™ RPH Polymerase (HighQu, Njemačka) koja ima sposobnost provjere točnosti polimerizacije. Naprave se reakcijske smjese od 2 µL početnica (5 µM) koje su navedene u Tablici 1., cDNA u količini od 100 ng, 10 µL 5X pufera ALLin (0,25mM dNTP; 3mM MgCl<sub>2</sub> uz dodane pojačivače i stabilizatore), 0,25 µL polimeraze ALLin, te se doda voda do volumena od 50 µL. Na uređaju za PCR prvo se uzorak inkubira 1 min na 95 °C, zatim slijedi 35 ciklusa koji se sastoje od inkubacije 15 sekundi na 95°C, 15 sekundi na 58°C i 30 sekundi na 72°C. Na kraju se uzorak inkubira 7 min na 72 °C za završno produženje.

**Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje fragmenta DNA u lančanoj reakciji polimeraze.**

Ime	Početnice
uPA	F: 5' CCCGACCTCGCCACCATGAGAGCCCTG 3' R: 5' GACCCTCAGAGGGCCAGGCCATTC 3'
uPAR	F: 5' GGAGCTGCCCTCGCGACATGGGT 3' R: 5' TCAGGTTTAGGTCCAGAGGAGAGA 3'
PAI-1	F: 5' CAGGATGCAGATGTCTCCAG 3' R: 5' GGTCAGGGTTCCATCACTTG 3'

##### 3.1.1 Agarozna gel elektroforeza

Detekcija DNA radi se pomoću agarozne gel elektroforeze. Potrebno je pripremiti 0,8 postotni gel za elektroforezu u puferu TAE (40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0). Nastala otopina se zagrijava u mikrovalnoj pećnici oko 90 sekundi dok se sva agarozna ne otopi. U nastalu otopinu dodaje se 10 µg/mL etidijeva bromida (Sigma-Aldrich, SAD). Smjesa se izlije u plastični kalup u koji se stavi plastični „češalj“. Gel se potopi u kadnicu za elektroforezu u 1%

pufer TAE. U nastale jažice nanese se uzorci DNA pomiješani s 1  $\mu\text{L}$  6x pufera za nanošenje uzoraka (0,25 % bromfenol-plavo u vodi i 30 % glicerol). U jednu jažicu nanese se i 1  $\mu\text{L}$  standarda veličine (NEB, PCR Marker #N3234) koji ima vrpce točno određene veličine, tj. broja kilobaza, te se prema njemu može kasnije određivati veličina fragmenata u ostalim uzorcima. Elektroforeza se provodi djelovanjem električnog polja jakosti 80 V 20 minuta. Na kraju elektroforeze gel slika se posebnim fotoaparatom pod UV lampom (KODAK EDAS 290, Kodak, SAD).

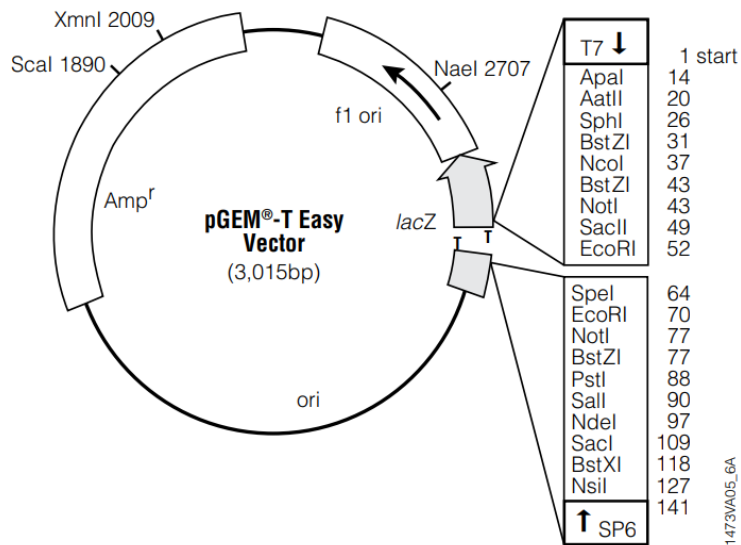
### 3.1.2 Izolacija DNA iz agaroznog gela

Postupak izolacije fragmenata iz gela odvija se prema uputama kompleta *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, SAD). Nakon što se željeni fragment gela izreže i izvaže na vagi, za svakih 10 mg gela doda se 10  $\mu\text{L}$  otopine za prihvaćanje na membranu (4,5 M gvanidin izotiocijanat; 0,5 M kalijev acetat, pH 5,0). Epruveta se zatvori, promiješa preokretanjem i stavi grijati na 60 °C dok se gel ne otopi. Sadržaj epruvete se preseli u malu kolonu umetnutu u epruvetu za sakupljanje. Nakon jedne minute inkubacije na sobnoj temperaturi, epruveta s kolonom se centrifugira (Sigma-Aldrich, SAD) jednu minutu na 14 000 rpm i 4 °C. U kolonu se zatim doda 700  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje membrane (10mM kalijev acetat, pH 5,0; 80% etanol; 16,7 $\mu\text{M}$  EDTA, pH 8,0) te se ponovno centrifugira jednu minutu na 14 000 rpm i 4 °C. Ponovo se doda 500  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje membrane i centrifugira pet minuta u istim uvjetima. Za kraj se jednu minutu na istim uvjetima centrifugiran prazna epruveta s kolonom. Kolona se izvadi iz epruvete i umetne u čistu epruvetu. U kolonu se doda 50  $\mu\text{L}$  vode bez nukleaza i sve se inkubirano jednu minutu na sobnoj temperaturi. Zatim se sadržaj centrifugiran jednu minutu pri istim uvjetima. Izolirani fragmenti se čuvaju na – 20 °C.

Koncentracija DNA mjeri se pomoću spektrofotometra (NanoVue Plus™, Biochrom - Harvard Bioscience, SAD). Uređaj određuje koncentraciju DNA na temelju apsorbancije svjetlosti u 2  $\mu\text{L}$  uzorka.

### 3.2 Ugradnja sekvenci u plazmid pGEM-T

Izolirane sekvence DNA umnožene reakcijom PCR ugrađene su u plazmid „pGEM-T easy vector“ (Promega, SAD) (Slika 3.). To je plazmid koji se eksprimira u bakterijskim stanicama. Ima 3015 parova baza, gen za bakterijsku rezistenciju na ampicilin i mjesto kloniranja s jednolančanim nukleotidima T.



**Slika 3. Mapa pGEM®-T Easy Vector plazmida s naznačenim mjestom kloniranja**

(Slika preuzeta iz: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>)

Neke polimeraze (npr. ALLin) stavljaju adenin na kraj sekvenci umnoženih lančanom reakcijom polimeraze. Linearizirani plazmid „pGEM-T easy vector“ ima timin na svojim krajevima, a to omogućuje da se spoje komplementarne baze timin i adenin. Da bismo mogli pravilno odrediti prikladan omjere plazmida i fragmenta koje želimo ugraditi potrebno je veličinu te koncentraciju fragmenata i plazmida unijeti u online program: NEBio ligation calculator (<https://nebiocalculator.neb.com>). Program izračunava masu fragmenta potrebnog za ligaciju sa 60 ng vektora, u omjeru 3:1.

Reakcija ligacije sadržava 5  $\mu\text{L}$  2X ligacijskog pufera (Promega, SAD), 1  $\mu\text{L}$  plazmida pGEM-T (60ng), 0,5  $\mu\text{L}$  ATP-a, po 1  $\mu\text{L}$  fragmenata uPA, PAI-1 ili uPAR izoliranih iz gela, 1  $\mu\text{L}$  enzima ligaze (Promega, SAD) i vode do 10 $\mu\text{L}$ . Reakcijske smjese se inkubiraju na 15 °C preko noći.

### **3.3 Transformacija kemijski kompetentnih bakterija rekombinantnim plazmidima**

Kemokompetentne bakterije *E. coli*. (soj XL-10 Gold) transformiraju se plazmidima sa ugrađenim željenim sekvencama. U epruvete se doda po 50  $\mu\text{L}$  bakterija i 1  $\mu\text{L}$  pojedinog rekombinantnog plazmida. Bakterije se inkubiraju na ledu 30 min. Zatim se epruvete urone u vodenu kupelj temperature 42 °C na 30 sekundi. Nakon toga se ponovo stave na led 2 minute. Sadržaj svake epruveta se pomiješan sa po 900  $\mu\text{L}$  medija LB (tripton 10 g/l; ekstrakt kvasca 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH7,0  $\pm$ 0,2; Carl Roth, SAD) te inkubira 60 min na temperaturi od 37°C.

Pripreme se agarne ploča na koje će se nasaditi bakterije bakterije *E. coli* transformirane pGEM-T vektorom sa sekvencama za uPA, PAI-1 ili uPAR. Ploče sadrže LB medij i 15 g/L agara te ampicilin kao selekcijski antibiotik (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Na ploče se nanese 80  $\mu\text{L}$  0,1 M IPTG (izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid, Sigma-Aldrich) i 50  $\mu\text{L}$  X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol- $\beta$ -D-galaktopiranozid, Sigma-Aldrich, otopljen u dimetil sulfoksidu u koncentraciji 20 mg/mL) koji se razmažu sterilnim štapićem. IPTG i X-gal omogućuju tzv. plavo-bijelu selekciju bakterija, čija je svrha odrediti u kojim je bakterijama plazmid s ugrađenim fragmentom. Plavo-bijela selekcija se bazira na aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze koji cijepa X-gal čime nastaje spoj koji dimerizacijom i oksidacijom postaje plave boje.  $\beta$ -galaktozidaza se sastoji od dvije podjedinice  $\alpha$  i  $\omega$  te radi samo kada su prisutne obje komponente. Ako korištene bakterije imaju samo  $\omega$  podjedinicu onda se moraju transformirati plazmidom koji ima gen za  $\alpha$  podjedinicu da bi enzim  $\beta$ -galaktozidaza bio funkcionalan. Ukoliko pak koristimo plazmid, kakav je primjerice korišten u ovome radu, tada je mjesto gena za  $\alpha$  podjedinicu ujedno mjesto ugradnje sekvence. Kolonije koje su bijele su se uspješno transformirale rekombinantnim plazmidom, a plave kolonije sadrže recirkulirani plazmid koji vjerojatno nije ugradio DNA sekvencu.

Nakon što prođe sat vremena inkubacije, transformirane bakterije se nasaduju u pripremljene petrijeve zdjelice. Bakterije se ostave rasti na 37°C preko noći.

Nakon inkubacije odaberu se bijele kolonije. Pripremi se još jedna agarna ploča s ampicilinom te se na staklo od petrijeve zdjelice ucrtta mreža pravokutnika od otprilike 1 x 1 cm. Pomoću pincete su sterilnim čačkalicama, pojedine odabrane kolonije bakterija iz prve agarozne ploče, prenesene na ploču s ucrtanom mrežom. Nakon što je svaka pojedina kolonija prenesena na drugu ploču ta ista čačkalica se stavi u sterilnu epruvetu u kojoj se nalazi 3 mL tekućeg medija LB s ampicilinom. Bakterije se uzgajaju na 37 °C preko noći.

### **3.4 Izolacija plazmida iz bakterija**

Plazmid se izoliraju pomoću kompleta *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) te su praćeni koraci navedeni u uputama. Bakterije koje su narasle preko noći centrifugiraju se 3 min na 12 000 rpm. Na talog bakterija doda se 250 µL otopine za resuspenziju taloga (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaza A). Zatim se dodaje 250 µL otopine za razgradnju stanica (0,2 M NaOH; 1 % SDS) te se epruveta preokrene četiri puta kako bi se sadržaj dobro promiješao. Doda se još 10 µL otopine alkalnih proteaza, sadržaj se ponovno izmiješa preokretanjem epruvete te inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, doda se 350 µL otopine za neutralizaciju (4,09 M gvanidin hidroklorid; 0,759 M kalij acetat; 2,12 M ledena octena kiselina; pH 4,2), te se sadržaj centrifugiran na 10 min pri 12 000 rpm. Nakon centrifugiranja sadržaj iz epruvete se prebaci u malu kolonu u epruveti i centrifugira 1 minutu na 12 000 rpm. U kolone se ponovno doda 750 µL otopine za ispiranje (60 % etanol; 60 mM kalij acetat; 8,3 mM Tris-HCl; 0,04 mM EDTA). Epruveta s kolonom ponovno se centrifugira jednu minutu pri istim uvjetima te se ponovi ispiranje, ali ovaj put s 250 µL otopine. Kolona i epruveta za sakupljanje ponovno se centrifugiraju 2 min na 12 000 rpm. Na kraju se DNA eluira sa 100 µL vode bez nukleaza te centrifugirana 1 min na 12000 rpm. Izolirani plazmidi pohrane se na -20 °C.

### **3.5 Cijepanje plazmida restrikcijским enzimima**

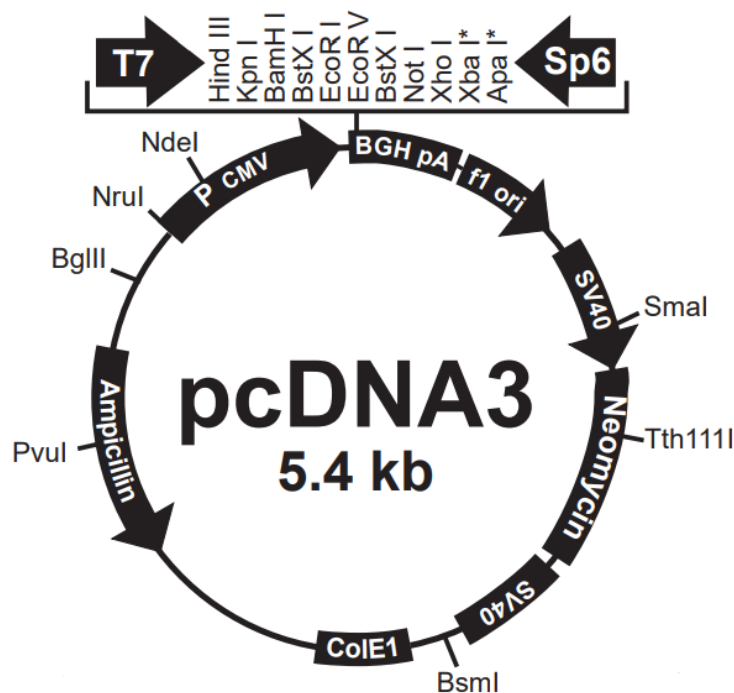
Nakon što su izolirani rekombinantni plazmidi pGEM-T s ugrađenim sekvencama za uPA, PAI-1 i uPAR, potrebno je te iste sekvence izrezati iz umnoženih plazmida kako bi se mogle ugraditi u drugi plazmid koji ima mogućnost ekspresije u eukariotskim stanicama. DNA sekvence se izrezuju iz plazmida pomoću restrikcijских enzima.

Restriksijski enzimi su enzimi koji cijepaju DNA na mjestu sekvence koju prepoznaju. Kada restriksijski enzimi pocijepaju plazmid, na to mjesto cijepanja se može ugraditi neki željeni fragment DNA. Potrebno je paziti na to kakvi su krajevi pocijepanog plazmida i fragmenata koje želimo ugraditi. Postoje tzv. tupi i ljepljivi krajevi koje ostavljaju restriksijski enzimi. Na „ljepljive“ krajeve je moguće ugraditi željenu sekvencu jer enzim cijepa DNA zavojnicu tako da jedan kraj ostaje duži i strši van te je zato potrebno da željena sekvenca ima baze koje su komplementarne tom dijelu koji je „ljepljiv“. Komplementarnost sekvence dobivene PCR-om i 3' kraja lineariziranog plazmida je postignuta tzv. TA kloniranjem.

NotI je restriksijski enzim koji je korišten kako bi se iz pGEM-T plazmida izrezali fragmenti DNA koji nose uputu za uPA, a enzimom EcoRI cijepani su plazmidi koji sadrže fragmente za PAI-1 i uPAR. Za oba enzima pripremi se ista reakcijska smjesa, samo se doda drugi enzim. U epruvetu se doda 16  $\mu\text{L}$  vode, 2  $\mu\text{L}$  pufera NEBuffer™ 3 (NEB, SAD) za NotI i pufer NEBuffer™ 4 za EcoRI, 2  $\mu\text{L}$  izoliranih rekombinantnih plazmida pGEM-T i 0,2  $\mu\text{L}$  enzima NotI ili EcoRI (NEB, SAD). Reakcije se inkubiraju sat vremena na 37°C. Provodi se gel elektroforeza kako bi se odredila ispravnost restriksijskih produkata. Uspoređivanjem položaja vrpce na gelu sa standardom veličine, detektira se prisutnost sekvenci za dijelove urokinaznog sustava.

### **3.6 Ugradnja izrezanih sekvenci u pcDNA3 plazmid**

Sekvence izrezane iz plazmida pGEM-T ugrađene su u plazmid pcDNA3 (5446 bp, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) koji ima mogućnost ekspresije u eukariotskim stanicama (Slika 4). Plazmid je već ranije bio pocijepan restriksijskim enzimima EcoRI i NotI, a da bi se spriječilo spontano zatvaranje plazmida jedan 5' kraj je defosforiliran enzimom CIP (eng. Calf-intestinal alkaline phosphatase, TaKaRa Bio, Japan). Ligacija DNA fragmenata u plazmid pcDNA3 provodi se po istom principu kao i kod ligacije fragmenata u plazmid pGEM-T.



**Slika 4. Mapa pcDNA3 vektora s naznačenim mjestima djelovanja pojedinih restrikcijskih enzima**

(Preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V79020> )

### 3.7 Analiza orijentacije kloniranih fragmenata

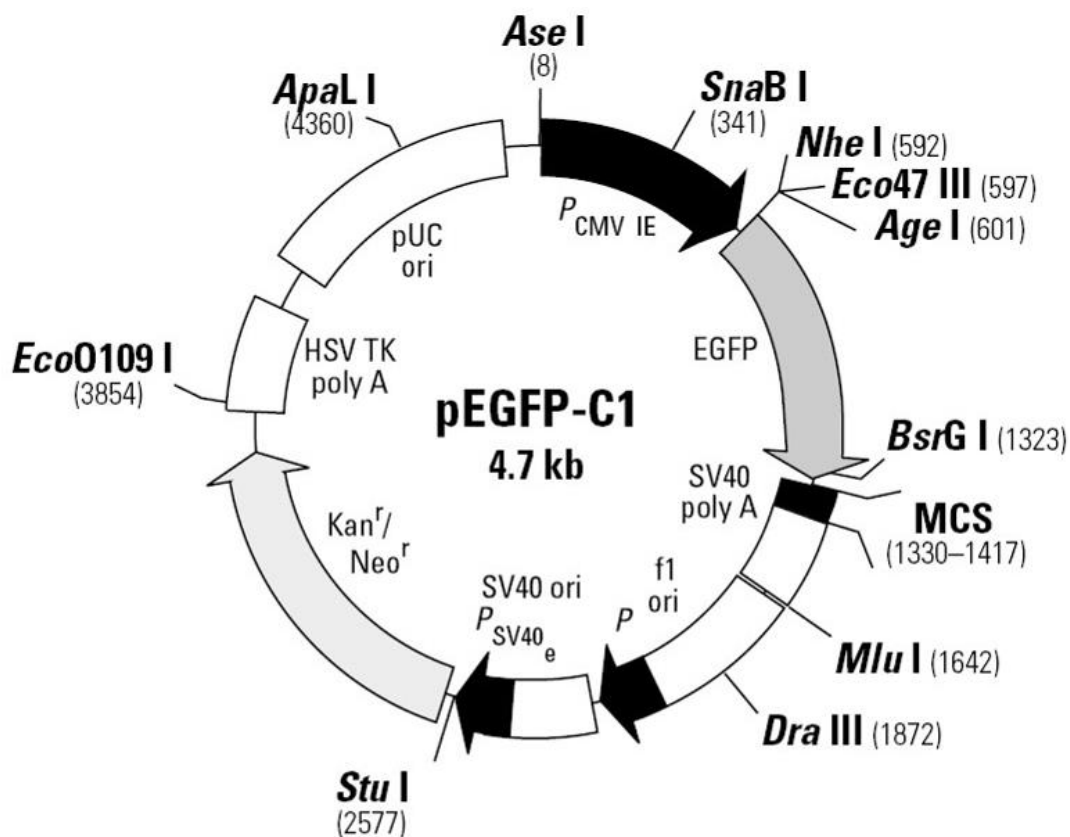
Prilikom ugradnje u plazmid pcDNA3 DNA fragmenti se mogu ugraditi u dvije orijentacije. Da bi se odredila orijentacija fragmenata moguće je plazmide cijepati restrikcijskim enzimima koji proizvode fragmente različite veličine ovisno o orijentaciji. Iz tog razloga su sekvence za uPA, PAI-1 i uPAR (navedene u prilogu 1., preuzete s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) uključujući i početnice korištene u amplifikaciji, ispitane u programu NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) da se pronađu restrikcijski enzimi koji ih cijepaju. Enzimom BamHI (NEB, SAD) cijepaju se plazmidi sa sekvencama uPA i uPAR te je za njega potreban NEBuffer™ 4 (NEB, SAD). Plazmidi sa sekvencom uPAR cijepaju se restrikcijskim enzimom PstI te je za njega potreban NEBuffer™ 3. Za SalI kojim se cijepa plazmid sa PAI-1 sekvencom koristi se tzv. „cut smart pufer“ (NEB, SAD). Usporedbom teoretskih veličina fragmenata i fragmenata detektiranih elektroforezom odredi se orijentacija fragmenata u plazmidima.

### **3.8 Transfekcija stanica plazmidima pomoću Lipofectamina te njihov selektivni rast**

Stanice A1235, HeLa i HEK293 uzgajaju se u mediju DMEM (Sigma-Aldrich Corporation, SAD) u koji se doda goveđi serum (Sigma-Aldrich Corporation, SAD) u inkubatoru (Heraeus, Njemačka) na 37° C, uz vlagu i 5% CO<sub>2</sub>. Stanice se pripreme za transfekciju tako da se dan ranije nasade u ploče s 24 jažice, 6-8 x 10<sup>4</sup> stanica po jažici. Transfekcija stanica napravi se pomoću kompleta *Lipofectamine 3000 Reagent* (Thermo Fischer Scientific, SAD). Za svaku jažicu prvo se pripremi otopina Lipofectamine reagensa, 1 µL u 25 µL medija Opti-MEM te otopina plazmida, 0,5 µg plazmida u 25 µL Opti-MEM uz dodatak 1 µL reagensa p3000. Zatim se pomiješa po 25 µL pripremljenog reagensa Lipofectamine s rekombinantnim plazmidom te se nastala smjesa inkubira 15 min na sobnoj temperaturi. Nastala smjesa doda se u bunarić sa stanicama. Nakon 24 sata rasta u bunarićima, stanice se presađuju u plastične bočice površine 25 cm<sup>2</sup>. Nakon još 24 sata transficiranim stanicama doda se antibiotik geneticin (G418, Calbiochem, 400 µg/mL) radi selekcije stanica. Stanicama se medij mijenja svaka 2-3 dana, kroz 2 tjedna, do pojave kolonija.

Osim što su korišteni rekombinantni plazmidi u transfekciji stanica korišten je i plazmid s ugrađenim zelenim fluorescentnim proteinom - GFP (pEGFP-C1, Clontech - TaKaRa Bio, Japan), koji je služio kao kontrola (Slika 5.).





Slika 5. Mapa pEGFP-C1 vektora

(Preuzeto iz <https://www.takarabio.com/> )

### 3.9 Kazeinoliza

Da bi se odredila aktivnost urokinaze, stanice se nasađuju u male petrijeve zdjelice (promjer 3 cm), 1 x 10<sup>5</sup> stanica po zdjelici. Nakon inkubacije od 24 sata, stanicama se medij sa serumom zamijeni za 600 µL medija DMEM bez seruma. Nakon 6 sati inkubacije na 37 °C, sakupi se medij, a stanični proteini liziraju u lizirajućem puferu (137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2 mM EDTA, pH 8.0; 10% glicerol; 1% triton X-100) i ostružu s petrijevke. Dobiveni uzorci smrznu se u tekućem dušiku i sprema na -70 °C.

Aktivnost urokinaze može se odrediti kazeinolizom. Napravi se agarozni gel s dodatkom mlijeka i plazminogena, a u jažice se dodaju uzorci medija u kojem su rasle stanice. Ukoliko je u uzorcima medija prisutna aktivna urokinaza, ona će aktivirati plazminogen te će se stvoriti plazmin koji će pocijepati kazein u mlijeku pa nastaju prozirne zone lize. Usporedbom veličine

dobivenih zona s veličinom zona koje nastaju dodatkom urokinaze poznate koncentracije, može se odrediti kakva je aktivnost urokinaze u uzorcima.

U Erlenmeyerovoj tikvici pripremi se 5 mL 2% agaroznog gela te se doda 2 mL PBS-a, 3mL 8% nemasnog mlijeka (Delikat-Gramm, Italija), 6  $\mu$ L plazminogena (Sigma-Aldrich, SAD) i 50  $\mu$ L 10 % natrijeva azida (Kemika, Hrvatska) koji ima antibakterijsko djelovanje. Pripremljena smjesa se izlije u petrijevu zdjelicu i ostavi da se gel stisne. Metalnom cjevčicom se načine jažice u gelu te se u svaku jažicu doda po 5  $\mu$ L uzorka u duplikatima. U jažice se doda i 5  $\mu$ L uPA (Leo Pharmaceutical Products, Danska) koji se serijski razrijedi tako da se dobi razrjeđenje od 0,1 do 100 mU (mU = jedinica aktivnosti urokinaze). Nakon pola sata inkubacije na sobnoj temperaturi, petrijeva zdjelica s gelom stavlja se u inkubator na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije petrijeva zdjelica se skenira, a dobivena snimka se analizira programom *Image J*. Pomoću programa izmjeri se promjer zone kazeinolize svakog pojedinog uzorka i razrijeđenog uPA. Serijska razrjeđenja uPA i promjer zone lize koriste se za izradu baždarnog dijagrama iz kojeg se odredi urokinazna aktivnost svakog pojedinog uzorka.

### **3.10 Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu**

Za određivanje količine proteina koristi se tzv. Bradfordova metoda što je kolorimetrijska i kvantitativna metoda određivanja količine proteina u uzorku. Temelj ove metode je vezanje proteina za bojilo Coomassie Brilliant Blue G-250 (Roth, Njemačka). Vezanjem proteina, inače smeđi reagens, mijenja svoju strukturu i boju, a apsorbancija spoja pomiče s 465 na 595nm.

Apsorbancija albumina goveđeg seruma (BSA, eng. bovine serum albumine) koristi se za izradu baždarnog grafa za procjenu količine proteina. Potrebno je napraviti serijska razrjeđenja u rasponu od 1  $\mu$ g/ $\mu$ L do 10  $\mu$ g/ $\mu$ L i dodati po 1  $\mu$ L u bunarić. Kao slijepa proba koristi se voda. Nakon centrifugiranja doda se po 1  $\mu$ l staničnog lizata iz svakog uzorka, s time da se svi uzorci stave u duplikatu. Na sve dodane uzorke i probe doda se po 100  $\mu$ L reagensa Bradford (za 200 mL: 0,02 g Coomassie Brilliant Blue G-250; 10 mL 95 % etanol; 20 ml 85 % fosforna kiselina; destilirana voda do 200mL). Pomoću spektrofotometra izmjeri se apsorbancija na 600 nm. Iz dobivenih apsorbancija za BSA, u programu *Microsoft Excel* napravi se baždarni graf i odredi količina proteina svakog uzorka.

### 3.11 Obrada podataka

Vrijednosti dobivene za aktivnost urokinaze podijele se s količinom proteina kako bi se dobila aktivnost urokinaze po  $\mu\text{g}$  proteina, a vrijednosti za aktivnost urokinaze kasnije su uspoređivane s vrijednostima kontrolnih uzoraka. Tako se dobije relativna vrijednost aktivnosti urokinaze uzoraka u odnosu na kontrolu. U programu *Microsoft Excel* provede se Studentov T-test kojim se utvrđuje postoje li značajne razlike u vrijednostima varijanci aktivnosti urokinaza između uzoraka i kontrole. Izračuna se standardna devijacije te se odredi da su statistički značajne vrijednosti onih uzoraka gdje je  $p < 0,05$ .

### 3.12 Western blot

Western blot je tehnika kojom se identificira i određuje veličina te razina ekspresije nekog proteina iz proteinske smjese. Tehnika se temelji na vezanju specifičnih obilježenih antitijela za određeni protein da bi se detektirali proteini.

Stanice se liziraju u 85  $\mu\text{L}$  pufera za lizu stanica (137 mM NaCl; 10% glicerol; 1% Triton X-100; 20 mM Tris; 2 mM EDTA) uz dodatak 5  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  pufera 100 mg/ml PMSF (eng. kratica od fenilmetilsulfonila fluorid) i 1  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  smjese inhibitora proteaza (Inhibitor Cocktail Plus, Carl Roth, SAD). Uzorci staničnih lizata inkubiraju se u ledu 20 min te se zatim smrznu u tekućem dušiku i spremne na  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Proteini se razdvoje vertikalnom SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. U elektroforezi negativno nabijene čestice putuju prema pozitivnoj elektrodi. Deterdžent SDS (natrijev dodecilsulfat) denaturira proteine i daje im negativan naboj kako bi se u elektroforezi mogli razdvojiti po svojoj masi ili veličini. Uzorci proteina se odmrznu te centrifugiraju 15 min na  $4^\circ\text{C}$  i 12 000 rpm. Na 100  $\mu\text{L}$  uzorka doda se 20  $\mu\text{L}$  6x pufera za nanošenje uzorka (225 mM Tris-HCl; 20 % glicerol; 2 mM SDS; 0,02 % bromfenol-plavo; 1 %  $\beta$ -merkaptetoetanol). Zatim se uzorci denaturiraju pri temperaturi od  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min.

Poliakrilamidni gel sastoji se od dvije vrste gela, donji dio naziva se gel za razdvajanje, a gornji gel za sabijanje. Gel za razdvajanje pripravlja se od 6,24 mL vode, 5,4 mL 30 % akril amida (Acros Organics, Belgija), 4 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 160  $\mu\text{L}$  10 % SDS, 160  $\mu\text{L}$  10% amonijevog persulfata (APS, služi za polimerizaciju) (Acros Organics, Belgija), te 9,6  $\mu\text{L}$  tetrametiletilenediamina (TEMED, služi kao okidač polimerizacije) (Acros Organics, Belgija).

Gel se izlije između dvije staklene ploče učvršćene u stalku te se na gel doda voda kako bi se izravnala površina gela. Nakon otprilike 20 min gel se polimerizira pa se voda može odliti. Na taj gel izlije se gel za sabijanje. Gel za sabijanje pripravlja se od 7,4 mL vode, 1,2 mL 30 % akril amida, 1,25 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 100  $\mu$ L 10% SDS, 100  $\mu$ L 10% APS i 10  $\mu$ L TEMED. Na vrh gela, između dva stakla stavi se češljic za stvaranje jažica. U jažice gela nanese se po 15  $\mu$ L uzoraka, a u jednu jažicu stavi se proteinski standard (PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619, Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza se odvija u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl; 250 mM glicin; 0,1 % SDS; pH 8,3), 2 sata pri 150 V.

Nakon elektroforeze slijedi prijenos proteina na membranu. Gel se stavi u pufer za transfer (48 mM Tris-HCl; 39 mM glicin; 0,037 % SDS; 20 % metanol; pH 8,3). Membrana PVDF (eng. polyvinylidene fluoride, Roche Holding AG, Švicarska) se izreže i kratko namoči u metanolu. Izrežu se i 4 komada filter papira iste veličine i izradi „sendvič“, za transfer unutar tzv. kazete za transfer. Prvo se stavi spužvica iz koje je istisnut zrak, zatim 2 sloja filter papira pa gel i membrana. Na membranu se stave dva sloja filter papira i spužvica. Na kraju se kazeta zatvori i stavi u kutiju za transfer. Transfer se odvija pri 380 W, 120 min pri 4 °C u puferu za transfer.

Nakon transfera provodi se „blokiranje membrane, što je postupak kojim se želi spriječiti nespecifično vezanje antitijela na membranu. Membrana se inkubira jedan sat u otopini 3% mlijeka u TBST puferu (150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0.1% neionski detergent Tween 20).

Nakon blokiranja membrana se ispiru u puferu TBST i inkubira u primarnom antitijelu, razrijeđenom prema uputama proizvođača, preko noći. Za uPA i uPAR korišteno je antitijelo podrijetlom iz kunića (uPA: Cusabio, SAD, uPAR: Cell Signaling Technology, SAD). Za PAI-1 je korišteno antitijelo podrijetlom iz miša (Becton Dickson, SAD). Korišteno je i antitijelo za  $\beta$ -aktin (Santa Cruz Biotechnology, SAD) da bi se procijenila količina proteina u uzorku.

Nakon inkubacije u primarnom antitijelu, membrana se sat vremena, u nekoliko sljedova, ispiru u puferu TBST, a zatim se sat vremena inkubira u otopini sekundarnog antitijela. Sekundarno antitijelo na kuniće i mišje proteine (Sigma-Aldrich, SAD) konjugirano je s enzimom peroksidaza iz hrena te služi za detekciju proteina. Membrana se zatim ispere u puferu TBST i proteini se detektiraju pomoću kemiluminiscencije.

Kemiluminiscencija nastaje zbog reakcije peroksidaze na sekundarnom antitijelu s luminolom i vodikovim peroksidom. U tamnoj komori i uz crveno svjetlo, pomiješa se po 100  $\mu$ L otopine A (kumarin) i B (luminol s peroksidom) (Bio-Rad Laboratories, SAD) nastala otopina se stavi

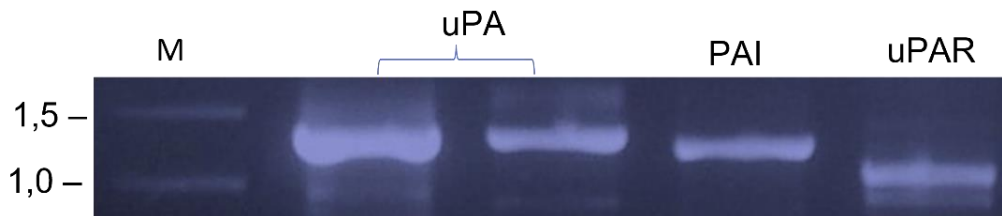
na membranu i inkubira 3 min. Membrana se zatim 15 min izloži rendgenskom filmu u kazeti. Film se kratko uroni u razvijач (Kodak, SAD) i fiksir (Fotokemika, RH) te na kraju ispere destiliranom vodom.

## 4. REZULTATI

Da bi se istražila regulacija sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora, konstruirani su rekombinantni plazmidi sa sekvencama koje kodiraju uPA, PAI-1 i uPAR. Tim plazmidima su transficirane stanice različitih tumorskih linija te nakon uzgoja staničnih sojeva ispitana aktivnost urokinaze i ekspresija pojedinih proteina urokinaznog sustava.

### 4.1 Konstrukcija rekombinantnih plazmida sa sekvencama uPA, PAI-1 i uPAR

Sekvence gena uPA, PAI-1 i uPAR umnožene su reakcijom PCR iz cDNA dobivene reverznom transkripcijom ukupne RNA izolirane iz stanica glioblastoma A1235. Duljina amplificiranih sekvenci provjerena je elektroforetski (Slika 6). Fragment uPA imao je veličinu od 1315 bp, PAI-1 1215 bp i uPAR 1022 bp.



**Slika 6. Sekvence gena uPA, PAI-1 i uPAR umnožene metodom PCR**

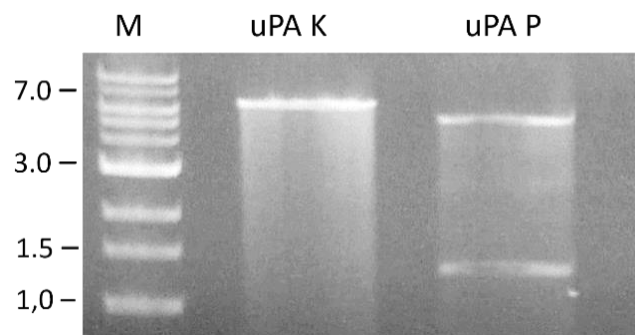
Sekvence gena su umnožene pomoću specifičnih početnica i polimeraze ALLin iz cDNA dobivene reverznom transkripcijom stanične RNA. Detekcija je provedena gel elektroforezom. M: standard veličine s naznačenim fragmentima veličine 1 i 1,5 kb, uPA: urokinazni plazminogeni aktivator, PAI: Inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1, uPAR: receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora

Umnožene sekvence gena izolirane su iz gela pomoću kompleta *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*. Nakon mjerenja koncentracije napravljena je ligacija s linearnim vektorom pGEM-T i transformirane su kompetentne bakterije. Plazmid pGEM-T omogućava plavo-bijelu

selekciju kolonija, tako da su izabrane bijele kolonije narasle na selektivnoj podlozi nakon transformacije. Uzgojeno je po deset kolonija za svaku transformaciju bakterija te su iz njih izolirani plazmidi. Ugradnja fragmenata u plazmid provjerena je gel elektroforezom, budući da su takvi plazmidi imali veću molekulsku masu. Izabrani plazmidi pocijepani su restrikcijskim enzimima koji imaju mjesto cijepanja s obje strane mjesta ugradnje. Kod plazmida pGEM-T to su NotI i EcoRI. Prethodno su pomoću računalnog programa NEBcutter ispitana potencijalna mjesta cijepanja amplificiranih fragmenata restrikcijskim enzimima NotI i EcoRI, kako da bi se izbjeglo korištenje enzima koji bi mogli pocijepati klonirane sekvence. Za izrezivanje sekvence uPA korišten je NotI, a za izrezivanje PAI-1 i uPAR EcoRI. Fragmenti uPA, PAI-1 i uPAR izrezani su iz gela nakon elektroforeze, pročišćeni kompletom te su ligirani u već prethodno pripremljen plazmid pcDNA3 pocijepan s EcoRI ili NotI. Ovaj plazmid je prethodno bio obrađen alkalnom fosfatazom CIAP da se spriječi njegova religacija bez fragmenta.

Fragmentima uPA, PAI-1 i uPAR, ligiranim u plazmid pcDNA3 ponovo su transformirane bakterije. Kad su kolonije narasle na pločama s ampicilinom, izabrano ih je desetak svake vrste za uzgoj u tekućem mediju. Izolirani plazmidi su analizirani gel elektroforezom, da bi se izdvojilo one koji su imali ugrađene sekvence. Nakon detekcije takvih plazmida bilo je potrebno odrediti orijentaciju ugrađenih fragmenata, budući da su s obje strane fragmenta bila mjesta cijepanja istog restrikcijskog enzima, a samo ispravna orijentacija jamči pravilnu ekspresiju u stanicama. Orijentacija je određena tako da su rekombinantni plazmidi pcDNA3 cijepani pomoću restrikcijskih enzima za koje je utvrđeno da imaju mjesta cijepanja i u plazmidu i u fragmentu te da bi fragmenti dobiveni cijepanjem imali različite molekulske mase u slučaju različite orijentacije. Analiza mjesta cijepanja fragmenata je napravljena pomoću programa NEBcutter.

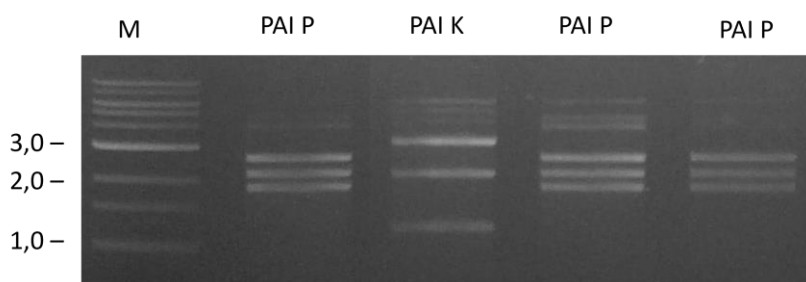
Plazmidi pcDNA3-uPA s ukloniranom sekvencom uPA cijepani su enzimom BamHI. Obrnuta orijentacija ugrađenog fragmenta trebala je dati vrpce veličine 6714 bp koja je i detektirana u uzorku označenom s uPA K, dok cijepanje plazmida s pravilno ugrađenim fragmentom daje vrpce veličine 1268 bp i 5493 bp koje su vidljive kod uzorka označenog s uPA P (Slika 7.).



**Slika 7. Plazmidi pcDNA3 sa sekvencom uPA pocijepani restrikcijom Bam HI**

M: standard veličine DNA s naznačenom veličinom fragmenata, uPA K: plazmid s pogrešnom orijentacijom sekvenca za urokinazni plazminogeni aktivator uPA P: plazmid s ispravnom orijentacijom sekvenca za urokinazni plazminogeni aktivator

Plazmidi pcDNA3-PAI-1 s ukloniranom sekvencom PAI-1 cijepani su enzimom SalI (Slika 8.). Ako je fragment pravilno okrenut, dobiju se fragmenti veličine 2610 bp, 2222 bp i 1892 bp, dok obrnuta orijentacije daje fragmente od 3241 bp, 2222 bp i 1198 bp.

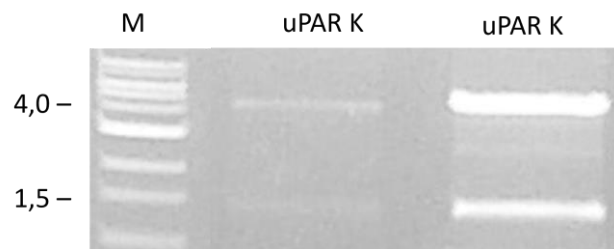


**Slika 8. Plazmidi pcDNA3 sa sekvencom PAI-1 pocijepani restrikcijom SalI**

M: standard veličine DNA s naznačenom veličinom fragmenata, PAI K: plazmid s pogrešnom orijentacijom sekvenca za inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1, PAI P: plazmid s ispravnom orijentacijom sekvenca za inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1

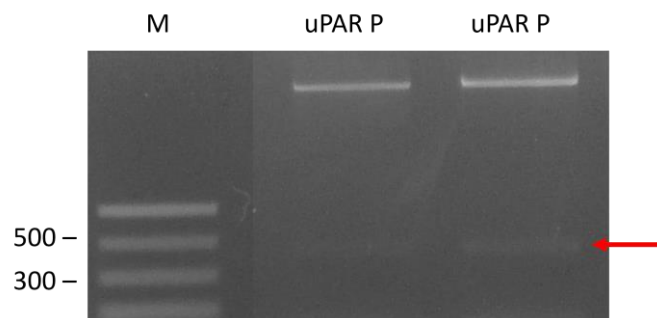


Plazmidi pcDNA3-uPAR s ukloniranom sekvencom uPAR cijepani su enzimom PstI (Slika 9.). U slučaju obrnuto ugrađene sekvence nastaju fragmenti veličine 607, 268, 1532 i 4061 bp. Dodatno je orijentacija provjerena i restrikcijskim enzimom BamHI (Slika 10.), koji bi u slučaju pravilne orijentacije trebao dati fragmente od 460 i 6008 bp.



**Slika 9. Plazmidi pcDNA3 sa sekvencom uPAR pocijepani restrikcijskim enzimom PstI**

M: standard veličine DNA s naznačenom veličinom fragmenata, uPAR K: plazmid s pogrešnom orijentacijom sekvence za receptor urokinaznog plazminogenkog aktivatora



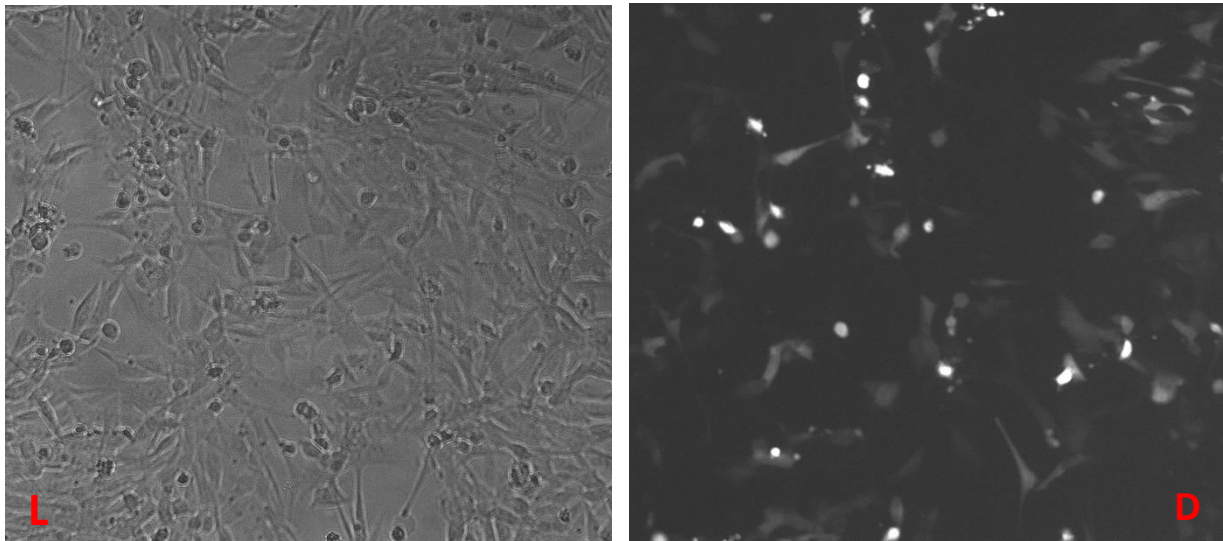
**Slika 10. Plazmidi pcDNA3 sa sekvencom uPAR cijepani restrikcijskim enzimom BamHI**

M: standard veličine DNA s naznačenom veličinom fragmenata, uPAR P: plazmid s ispravnom orijentacijom sekvence za receptor urokinaznog plazminogenkog aktivatora

Na slici je crvenom strelicom označena malo slabije vidljivija vrpca koja odgovara veličini od 460 bp.

## 4.2 Transfekcija stanica

Plazmidi pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR s pravilnom orijentacijom fragmenata korišteni su za transfekciju stanica, kao i plazmid pEGFP-C1 koji je služio kao kontrola uspješnosti transfekcije.  $6-8 \times 10^4$  stanica linija HeLa (stanice raka maternice), A1235 (glioblastomske stanice) i HEK293 (imortalna linija ljudskih embrionalnih stanica bubrega) nasadene su na ploču s 24 jažice. Stanice su transficirane plazmidima pomoću Lipofectamina. Sljedeći dan je uspješnost transfekcije provjerena promatranjem zelene fluorescencije stanica transficiranih kontrolnim plazmidom pEGFP-C1 (Slika 11.). Stanice su presađene u bočice od  $25 \text{ cm}^2$ , a dva dana nakon transfekcije u kulture se počeo dodavati antibiotik geneticin ( $400 \mu\text{g/mL}$ ). Nakon dva tjedna selekcije u bočicama su se počele formirati kolonije koje su presađene i umnožene.

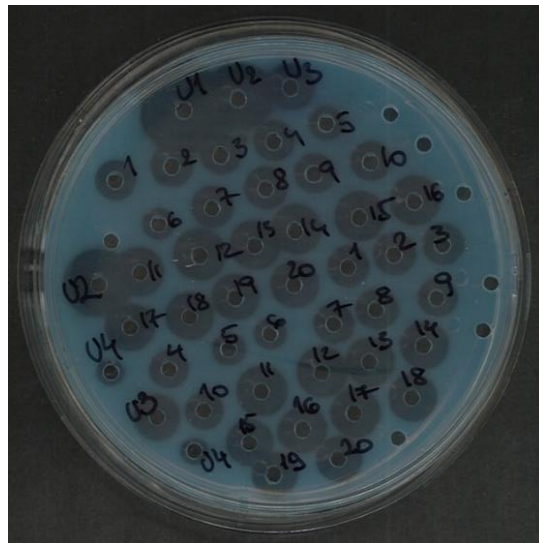


**Slika 11. Stanice A1235 transficirane plazmidom pEGFP-C1**

Stanice A1234 snimljene crno bijelom kamerom pri normalnom (L) i UV svjetlu (D). Pri UV svjetlu transficirane stanice imaju zelenu fluorescenciju zelenog fluorescentnog proteina.

### 4.3 Analiza urokinazne aktivnosti u stanicama transficiranim plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR

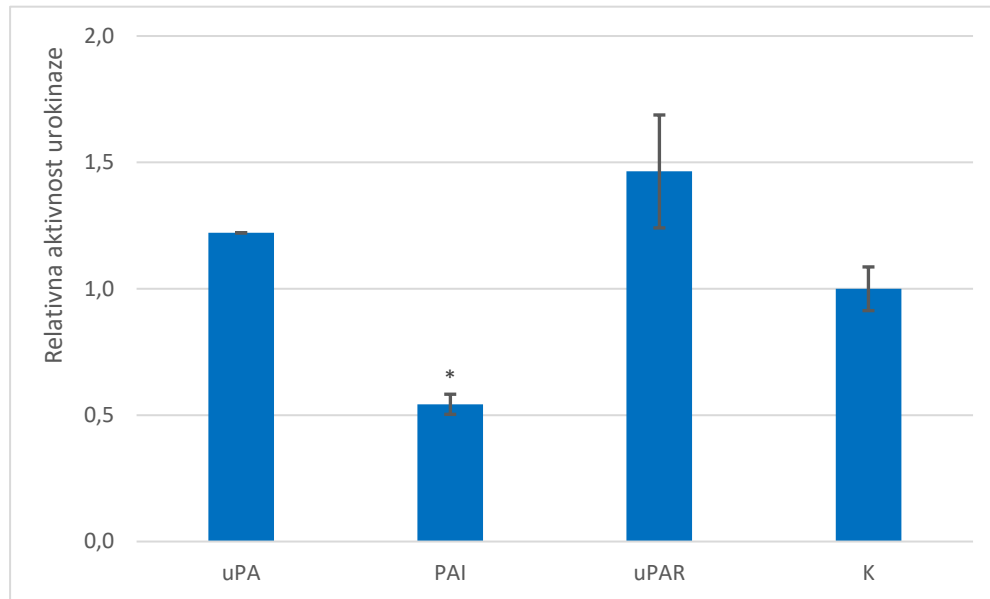
Kod uzgojenih sojeva staničnih linija HeLa, HEK293 i A1235 transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR te onih transficiranim kontrolnim plazmidom pEGFP-C1 ispitana je urokinazna aktivnost. Kako je urokinaza ekstracelularna proteaza, analiziran je kondicionirani medij stanica nasadenih u male petrijevke, nakon inkubacije od 6 sati. Nakon inkubacije, supernatanti i stanični lizati su sakupljeni i spremljeni na  $-70^{\circ}\text{C}$ . U staničnim lizatima određena je koncentracija proteina Bradfordovom metodom. Kondicionirani medij stavljen je na agarozne ploče koje su sadržavale plazminogen i kazein kao supstrate (Slika 12.). Metodom radijalne kazeinolize je utvrđeno je li došlo do promjene aktivnosti urokinaze u pojedinim uzorcima. Zone lize na pločama su izmjerene, određena je baždarna krivulja aktivnosti same urokinaze i na temelju tih podataka izračunata je relativna aktivnost uzoraka.



**Slika 12. Radijalna kazeinoliza kondicioniranog medija u petrijevoj zdjelici**

Brojevima 1 - 20 označeni su uzorci kondicioniranog medija koji su nanijeti u jažice u duplikatima. Oznakama U1-4 označeni su uzorci urokinaze poznate koncentracije. Zone lize su prozirni krugovi na gelu čija je veličina mjerena pomoću *Image J* programa.

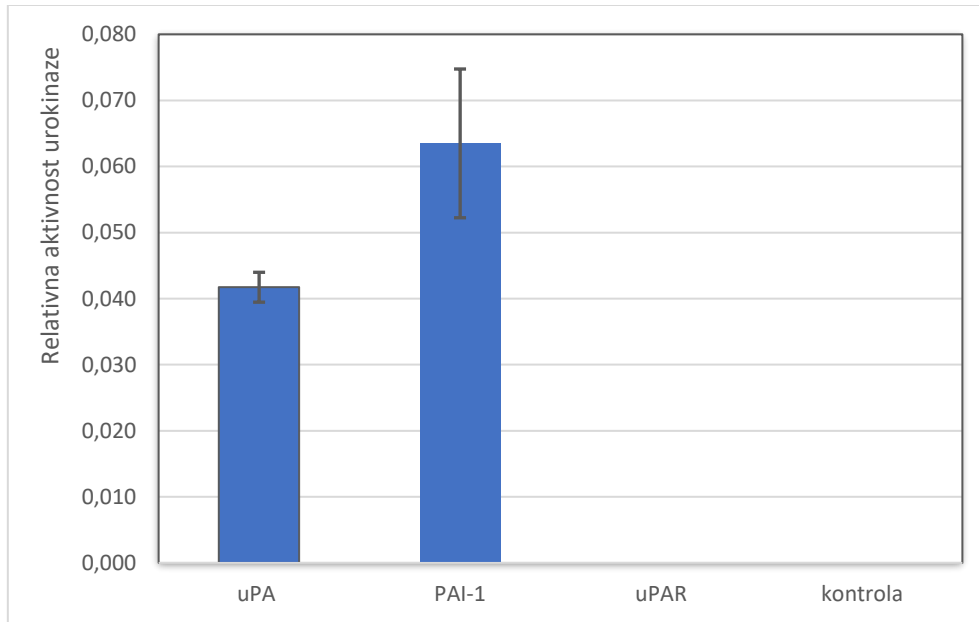
Kazeinoliza uzoraka stanica A1235 pokazala je da su stanice transficirane plazmidima pcDNA3-uPA i pcDNA3-uPAR imale u kondicioniranom mediju sličnu aktivnost urokinaze kao i stanice kontrolnog soja transficiranog plazmidom pEGFP-C1. Stanice s unesenim plazmidom pcDNA3-PAI-1 pokazale su smanjenu aktivnost urokinaze.



**Slika 13. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama A1235**

Stanice A1235 transformirane su rekombinantnim plazmidima koji sadrže sekvence za uPA, PAI-1, uPAR i GFP. Analiziran je kondicionirani medij metodom kazeinolize. Aktivnost urokinaze izračunata je na osnovi baždarne krivulje aktivnosti referentne urokinaze i izražena je kao relativna aktivnost u odnosu na aktivnost medija stanica transficiranih kontrolnim plazmidom pEGFP-C1. Svi uzorci napravljeni su u dvije biološke replike. uPA: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za urokinazni plazminogeni aktivator, PAI: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1, uPAR: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora, K: stanice transficirane kontrolnim plazmidom pEGFP-C1, \*  $p < 0,05$

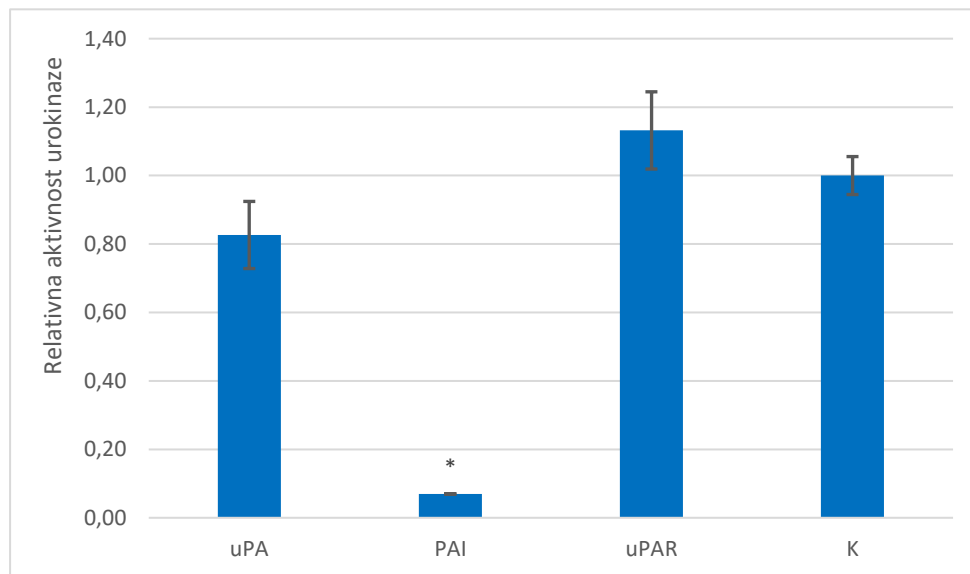
Stanice HeLa ne pokazuju urokinaznu aktivnost. Sojevi uzgojeni nakon transfekcije plazmidima pcDNA3-uPAR i pEGFP-C1 nisu pokazali nikakvu aktivnost, dok je niska aktivnost detektirana kod sojeva transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA i pcDNA3-PAI-1. Vrijednosti su stoga predstavljene kao relativna aktivnost u odnosu na kontrolu koja je jednaka nuli.



**Slika 14. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama HeLa**

Aktivnost urokinaze u HeLa stanicama prikazana je kao relativna aktivnost urokinaze po uzorku. Analiziran je kondicionirani medij metodom kazeinolize. Aktivnost urokinaze izračunata je na osnovi baždarne krivulje aktivnosti referentne urokinaze. Svi uzorci napravljeni su u dvije biološke replike. uPA: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za urokinazni plazminogeni aktivator, PAI-1: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1, uPAR: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora, kontrola: stanice transficirane kontrolnim plazmidom pEGFP-C1

Kazeinoliza uzoraka sojeva stanica HEK293 pokazala je da su stanice transficirane plazmidima pcDNA3-uPA i pcDNA3-uPAR imale u kondicioniranom mediju sličnu aktivnost urokinaze kao i kontrolne stanice transficirane plazmidom pEGFP-C1. Stanice s unesenim plazmidom pcDNA3-PAI-1 imaju smanjenu aktivnost urokinaze.



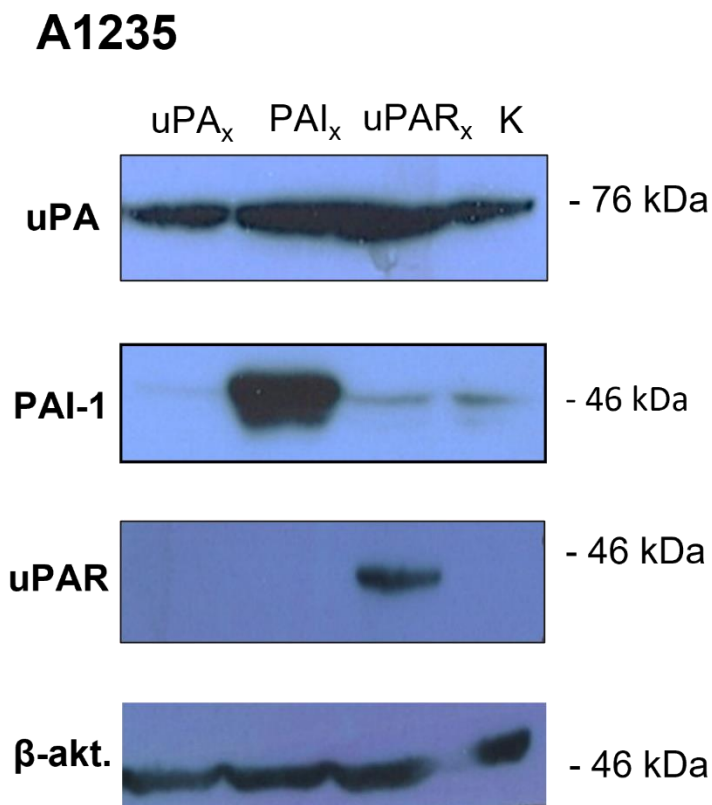
**Slika 15. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama HEK293**

Stanice HEK293 transformirane su rekombinantnim plazmidima koji sadrže sekvence za uPA, PAI-1, uPAR i GFP kao kontrola. Analiziran je kondicionirani medij metodom kazeinolize. Aktivnost urokinaze izračunata je na osnovi baždarne krivulje aktivnosti referentne urokinaze i izražena je kao relativna aktivnost u odnosu na aktivnost medija stanica transficiranih kontrolnim plazmidom pEGFP-C1. Svi uzorci su napravljeni u dvije biološke replike. uPA: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za urokinazni plazminogeni aktivator, PAI: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za inhibitor urokinaznog plazminogenog aktivatora 1, uPAR: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora, K: stanice transficirane kontrolnim plazmidom pEGFP-C1, \*  $p < 0,05$

#### **4.4 Analiza ekspresije proteina**

Iz stanica sojeva A1235, HEK293 i HeLa transficiranih plazmidima sa sekvencama za uPA, PAI-1 i uPAR, izolirani su proteini i analizirani metodom Western blot. Membrane s proteinima inkubirane su u prisustvu antitijela za uPA, PAI-1, uPAR i  $\beta$ -aktin, a nakon inkubacije odgovarajućim sekundarnim antitijelom, proteini su detektirani pomoću kemiluminiscencije. Ekspresija proteina  $\beta$ -aktina služila je kao mjera za normalizaciju količine proteina nanosene na gel.

Analiza proteina sojeva stanica A1235 transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1, pcDNA3-uPAR i pEGFP-C1 pokazala je sličnu razinu proteina uPA kod svih sojeva. Povećana ekspresija proteina PAI-1 je zabilježena kod stanica transficiranih s istovrsnim plazmidom, a u ostalim stanicama je slabo eksprimiran. Slična situacija vidljiva je i kod proteina uPAR koji je detektiran samo kod stanica u koje je unesen plazmid sa sekvencom za uPAR.

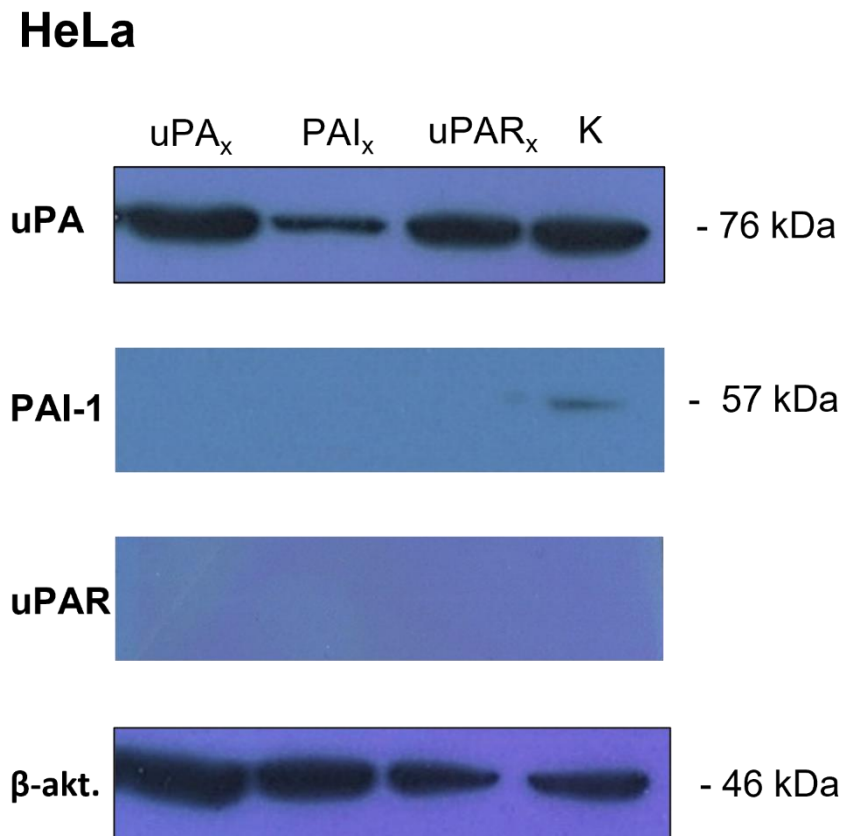


**Slika 16. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot u A1235 stanicama glioblastoma**

Metodom imunodetekcije sa specifičnim antitijelima analizirani su proteini u A1235 stanicama koje su transficirane plazmidima sa sekvencama za uPA, PAI-1, uPAR, dok je protein β-aktin služio kao endogena kontrola. **uPA:** detekcija proteina uPA specifičnim antitijelom, **PAI-1:** detekcija proteina PAI-1 specifičnim antitijelom, **uPAR:** detekcija proteina uPAR specifičnim antitijelom, **β-akt.:** detekcija beta aktina specifičnim antitijelom, uPA<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPA, PAI<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za PAI-1, uPAR<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPAR, K: stanice transficirane plazmidom pEGFP-C1



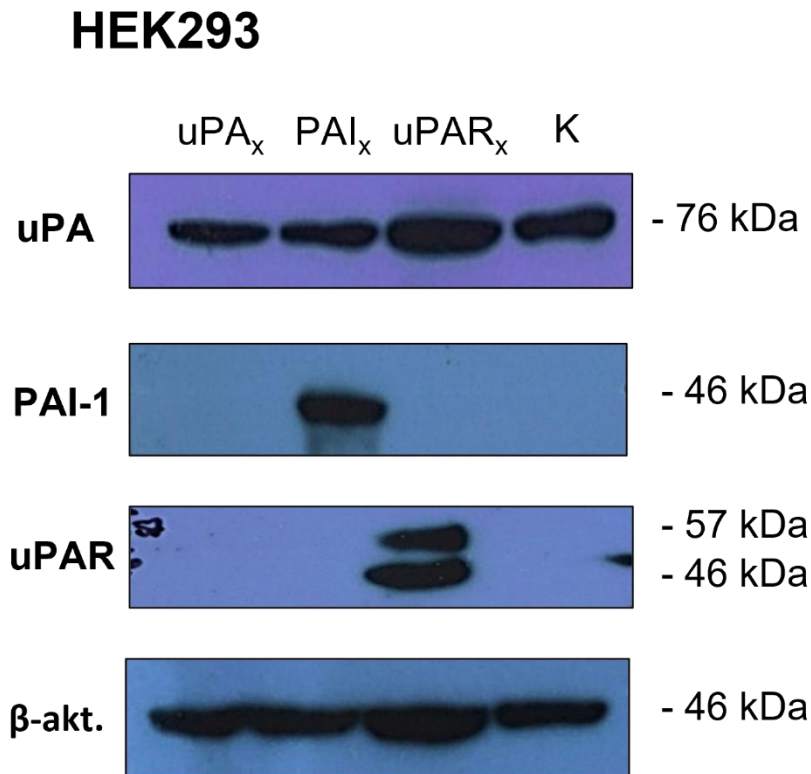
Analiza proteina sojeva stanica HeLa transficiranim plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1, pcDNA3-uPAR i pEGFP-C1 pokazala je sličnu razinu proteina uPA kod stanica u koje je unesen plazmid sa sekvencom za uPA, uPAR i kontrolni plazmid. Stanice s unesenim plazmidom PAI-1 imale su smanjenu ekspresiju uPA. Proteini uPAR i PAI-1 međutim, nisu detektirani u lizatima stanica HeLa.



**Slika 17. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot u stanicama HeLa**

Metodom imunodetekcije sa specifičnim antitijelima analizirani su proteini u stanicama HeLa koje su transficirane plazmidima sa sekvencama za uPA, PAI-1, uPAR, dok je protein β-aktin služio kao endogena kontrola. **uPA:** detekcija proteina uPA specifičnim antitijelom, **PAI-1:** detekcija proteina PAI-1 specifičnim antitijelom, **uPAR:** detekcija proteina uPAR specifičnim antitijelom, **β-akt.:** detekcija beta aktina specifičnim antitijelom, uPA<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPA, PAI<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za PAI-1, uPAR<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPAR, K: stanice transficirane plazmidom pEGFP-C1

Kod sojeva stanica HEK293 transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1, pcDNA3-uPAR i pEGFP-C1 ekspresija uPA bila je kod svih lizata slična onoj kontrolnih stanica. PAI-1 je bio eksprimiran samo kod stanica transficiranih plazmidom pcDNA3-PAI-1, dok je uPAR detektiran samo kod soja transficiranog plazmidom pcDNA3-uPAR.



**Slika 18. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot u stanicama HEK293**

Metodom imunodetekcije sa specifičnim antitijelima analizirani su proteini u stanicama HEK293 koje su transficirane plazmidima sa sekvencama za uPA, PAI-1, uPAR, dok je protein β-aktin služio kao endogena kontrola. **uPA:** detekcija proteina uPA specifičnim antitijelom, **PAI-1:** detekcija proteina PAI-1 specifičnim antitijelom, **uPAR:** detekcija proteina uPAR specifičnim antitijelom, **β-akt.:** detekcija beta aktina specifičnim antitijelom, uPA<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPA, PAI<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za PAI-1, uPAR<sub>x</sub>: stanice transficirane plazmidom sa sekvencom za uPAR, K: stanice transficirane plazmidom pEGFP-C1

## 5. RASPRAVA

Plazmin je proteolitički enzim koji nastaje aktivacijom plazminogena te mu je glavna uloga razgradnja krvnih ugrušaka i proteina ekstracelularnog matriksa. Pretvorba plazminogena u plazmin regulirana je kaskadnim sustavom u kojem glavnu ulogu imaju tkivni i urokinazni plazminogeni aktivatori.

Tema ovog rada je urokinazni plazminogeni aktivator, čija je sekrecija prva stepenica u aktivaciji plazminogena. Procesi razgradnje ekstracelularnog matriksa predstavljaju dio fizioloških procesa prilikom zarastanja rana, migracije stanica, razvoja embrija i nastanka tkivnih promjena pri ovulaciji, prestanku dojenja, otapanju ugrušaka, ali i invazivnog rasta i metastaziranja tumora. Urokinaza je dio sustava kojeg čine funkcionalno povezani proteini uPA, PAI-1 i uPAR. uPA se luči iz stanica i njegova se aktivnost može lokalizirati vezanjem za uPAR, receptor na površini stanične membrane. Aktivnost može biti inhibirana djelovanjem PAI-1. Vezanjem PAI-1 za već povezani uPA i uPAR dolazi do internalizacije cijelog kompleksa, da bi se prekinulo daljnje djelovanje urokinaze. Receptor se reciklira na površinu, a kompleks uPA/PAI-1 se razgrađuje (Yepes 2019).

U ovom je radu opisano kloniranje i ekspresija elemenata sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora u različitim staničnim linijama. Ovi eksperimenti su napravljeni kao dio istraživanja biologije urokinaze i mehanizama regulacije urokinaznog sustava, a konstruirani plazmidi mogli bi poslužiti u istraživanju regulacije sekrecije urokinaze.

U prvom dijelu rada konstruirani su plazmidi pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR. Iako su imali odgovarajuću molekulsku masu te su provjereni specifičnim restrikcijom cijepanjem, prava provjera sekvenci se mogla postići tek sekvenciranjem i provjerom aktivnosti *in vivo*. Usporedbom aktivnosti urokinaze uzoraka kondicioniranog medija stanica transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR te kontrolnih stanica transficiranih plazmidom pEGFP-C1 i usporedbom tih podataka sa ekspresijom proteina, analizirana je uspješnost kloniranja i transfekcije stanice.

Kod A1235 stanica uočena je smanjena aktivnost urokinaze kod stanica transficiranih s plazmidom pcDNA3-PAI-1, a stanice transficirane plazmidima pcDNA3-uPA i pcDNA3-uPAR imale su sličnu aktivnost kao i stanice kontrole. Ekspresija proteina uPA je kod svih

transficiranih sojeva slična, dok su uPAR i PAI-1 imali povećanu ekspresiju kod stanica transficiranih odgovarajućim plazmidom pcDNA3-uPAR ili pcDNA3-PAI-1.

Stanice HeLa transficirane plazmidom koji sadrži sekvencu za uPAR i kontrolnim plazmidom nisu pokazale urokinaznu aktivnost, dok je niska aktivnost postojala kod stanica transficiranih plazmidima koji sadrže sekvence za uPA ili PAI-1. Međutim, u svim staničnim sojevima je detektirana ekspresija urokinaze metodom Western blot. To bi ukazivalo na mogućnost ekspresije inaktivne urokinaze, njene inaktivacije ili nemogućnost sekrecije. Ekspresija proteina uPA bila je slična kod stanica s unesenim plazmidom pcDNA3-uPA i kontrole pa bi se moglo zaključiti da nije bilo uspješne transkripcije sekvence uPA s plazmida. Transficirani sojevi stanica HeLa nisu pokazali ekspresiju ni PAI-1 niti uPAR. Stanice transficirane plazmidom pcDNA3-PAI-1 pokazale su smanjenje ekspresije uPA, iako nije detektirana ekspresija proteina PAI-1. Postoji mogućnost da stanica ima mehanizme kojima inhibira translaciju proteina, međutim, to bi trebalo istražiti na razini RNA.

Stanice HEK293 transficirane plazmidima sa sekvencama za uPA i uPAR imale su bazalnu aktivnost urokinaze, koja je bila smanjena samo kod klonova transficiranih plazmidom pcDNA3-PAI-1.

Rezultati analize ekspresije i aktivnosti uPA, koja je bila podjednaka kod kontrole te stanica transficiranih s pcDNA3-uPA i kod stanica HEK293 i stanica A1235, ukazivali su da plazmid pcDNA3-uPA nije funkcionalan. S druge strane, pcDNA3-PAI-1 je uzrokovao znatno povećanje razine ekspresije PAI-1, kao i smanjenje urokinazne aktivnosti, potvrđujući funkcionalnost konstrukta. Ekspresija pcDNA3-uPAR je također potvrđena na razini proteina, međutim, nije utjecala na ukupnu staničnu urokinaznu aktivnost.

Da bi se provjerile sekvence plazmida pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR, plazmidi su sekvencirani (rezultati u prilogu 2.). Analizom sekvence plazmida pcDNA3-uPA utvrđeno je da postoji mogućnost mutacija. Stoga je u laboratoriju u kojem je napravljen ovaj rad ponovljeno kloniranje urokinazne sekvence, kao i transfekcija stanica HeLa, HEK293 i A1235. Dobiveno je znatno povećanje aktivnosti urokinaze kod stanica HEK293 i A1235, što bi potvrdilo da je plazmid pcDNA3-uPA bio nefunkcionalan. Stanice HeLa ponovo nisu pokazale značajno povećanje aktivnosti urokinaze, ni u kondicioniranom mediju, ni u staničnim lizatima.

Urokinazni sustav sudjeluje u raznim fiziološkim procesima koji uključuju pregradnju ECM. Često se sustav povezuje s epitelno-mezenhimskom tranzicijom. EMT je proces kojim stanice

mijenjaju svoj fenotip i ekspresijski program. Epitelne stanice su međusobno čvrsto povezane čvrstim i adhezijskim vezama i ekspresiraju specifične citoskeletne proteine, a promjenom u mezenhimski fenotip postaju tipične stanice vezivnog tkiva: proizvode pojedine molekule ekstracelularnog matriksa, kao i ekstracelularne proteaze, gube ekspresiju proteina čvrstih i adhezijskih veza epitelnih stanica, te povećavaju sposobnost invazije i migracije. Ovi su procesi sastavni dio procesa tijekom embriogeneze, ali sudjeluju i u fiziološkim procesima kod odraslih jedinki, npr. kod zarastanja rana. Danas se smatra da slični procesi omogućuju tumorskim stanicama invazivni rast i migraciju. Tumorske stanice bi imale sposobnost plastičnosti, mogućnost prijelaza iz jednog u drugi fenotip i nazad, ovisno o uvjetima okoliša (Nieto i sur. 2016, Babaei i sur. 2021).

Kako je jedno od obilježja mezenhimskih stanica oslobađanje proteaza potrebnih za migraciju kroz ekstracelularni matriks, mnogi znanstvenici povezuju procese EMT s povećanjem aktivnosti urokinaze.

Jo i sur. (2009) proučavali su plastičnost EMT kod stanica karcinoma dojke izlaganih različitim koncentracijama kisika. Utvrđeno je da ekspresija uPAR i EMT ovise o dostupnosti kisika. U hipoksičnim uvjetima povećava se ekspresija uPAR i potiče se EMT. Ovakvo istraživanje bi bilo zanimljivo provesti na našim stanicama i vidjeti povećava li ekspresija uPAR staničnu otpornost na hipoksiju. S druge strane, Semina i sur. (2020) pokazali su da utišavanje gena za uPAR glioblastomskih stanica, povećava njihovu migraciju. Bez svog receptora, uPA bi, nakon endocitoze, bio translociran u jezgru i utjecao na ekspresiju gena uključenih u EMT. U stanicama u kojima se uPAR ipak ekspresira, uPA se veže na uPAR i stvori se kompleks koji se internalizira i razgrade ga lizosomi, čime se sprječava utjecaj uPA na transkripcijske faktore.

Radovi o funkciji uPAR i njegovoj ulozi u metastaziranju su često bazirani na stanicama tumora dojke gdje se ne može izreći univerzalan zaključak o ulozi uPAR. Vjeruje se da dinamika interakcija uPA i uPAR s vitronektinom utječe na aktivaciju puta Rac koji ima za posljedicu proliferaciju i migraciju stanica. Budući da je uPAR vezan na membranu GPI sidrom, on nema svoju intracelularnu domenu pa njegova uloga u EMT i unutarstaničnom signaliziranju mora biti vezana uz njegovu interakciju s drugim koreceptorima poput integrina, receptora vezanih za G protein, raznim faktorima rasta itd. Iz tog je razloga bitno proučavati interakcije uPAR s drugim molekulama kako bi se razjasnila uloga uPAR u EMC i metastaziranju. Danas se u kliničkim studijama nastoji stvoriti inhibitorne peptide koji bi spriječili komunikaciju i interakciju između uPAR i njegovih liganda kao što je uPA ili vitronektin (Noh i sur. 2013).

Uzgojeni sojevi stanica A1235 i HEK293 mogli bi poslužiti kao model u istraživanju uloge urokinaznog sustava u staničnoj migraciji da bi se istražilo imaju li stanice s povećanom ekspresijom urokinaze i povećanu migraciju, te je li povećanje PAI-1 povezano s njenom inhibicijom. Gorrasi i sur. (2014) istraživali su migraciju stanica HEK293 transficiranih plazmidom pcDNA3-uPAR. Roditeljske stanice nisu ekspimirale receptor. Utvrđeno je da u stanicama gdje je uPAR povećano ekspimiran postoji poveznica između razine uPAR te smjera migracije stanica. uPAR koji je vezan uz membranu usmjeravao je migraciju surađujući s integrinima i receptorima za N-formilirani tripeptid (fMLF: N-formilmetionil-leucil-fenilalanin). Zaključeno je da uPAR utječe na funkciju faktora rasta i signalne putove u stanici. Međutim, iako je mijenjao tip stanične migracije, ukupna stopa migracije stanica ostala je jednaka.

Uloga PAI-1 u migraciji stanica i EMT je dosta kontradiktorna, iako su napravljena mnoga istraživanja, posebice na stanicama tumora dojke. S jedne strane ekspresija PAI-1 je smanjila migraciju i metastaziranje stanica tumora dojke i jajnika, a s druge strane je utvrđeno da je povećana ekspresija povezana s agresivnijim tipovima karcinoma. Pri tome veliku ulogu ima i TGF- $\beta$ , osnovni pokretač te regulator i EMT i ekspresije PAI-1 (Das i sur. 2019).

Duffy i sur. (2014) analizirali su uloge uPA i PAI-1 u metastaziranju tumora. Kod određenih tipova tumora dojke povećana ekspresija uPA, a posebice PAI-1 povezana je s težim oblikom bolesti i može se koristiti kao biomarker u medicini. Dok je ekspresija uPAR korelirala s lošijim prognozama kod karcinoma, ekspresija PAI-1 je ovisila o raznim drugim faktorima poput vrste i stadija u kojem se karcinom nalazi. U nekim radovima ipak je pronađena potpuno suprotna situacija, gdje je povećana ekspresija PAI-1 povezana sa smanjenom migracijom stanica HeLa jer je onemogućen normalan rad uPAR i njegovo vezanje s ligandima. Uočeno je da smanjenje ekspresije receptora za prostaglandin utječe na razinu fosforilacije ERK kinaza i translokaciju p53 u jezgru gdje je regulirao transkripciju PAI-1 (Ye i sur. 2020).

Na stanicama HeLa napravljena su istraživanja s umjetnim inhibitorima uPA zvanim Amiloride. Stanice tretirane tim inhibitorom imale su smanjenu ekspresiju uPA te je smanjena migracija stanica. Sve to ukazuje da i uPA utječe na migraciju stanica, najvjerojatnije djelujući na put aktivacije MMP (Wang i sur. 2018).

Povišene razine ekspresije uPAR povezane su s proliferacijom i angiogenezom u karcinomu prostate, mjehura, dojke, mozga, jetre, maternice itd. Razina ekspresije uPAR direktno je povezana s invazivnošću tumora. Interakcija uPA/uPAR može potaknuti signalne putove

vezane za proliferaciju, ponajviše djelujući na aktivnost VEGF. Utišavanjem gena za uPAR pomoću mehanizma CRISPR/Cas9, znatno je smanjena proliferacija stanica glioblastoma i HeLa. Pokazano je da utišavanje uPAR onemogućava stvaranje kompleksa uPA-uPAR-integrin  $\alpha 5\beta 1$  te njegov utjecaj na aktivaciju receptora povezanih s G proteinima i nizvodnih putova povezanih s proliferacijom (Lv i sur. 2021).

Jing i sur. (2012) napravili su kliničku studiju povezanosti ekspresije uPAR s proliferacijom karcinoma vrata maternice, te je u 66 % tumora bila povišena ekspresija receptora. Praćena je i ekspresija suPAR, tzv. topive vrste uPAR koji nije vezan GPI sidrom. Ekspresija suPAR se čak smanjila nakon što su žene podvrgnute operaciji uklanjanja karcinoma. Iako se uPAR u samim stanicama ne može baš direktno koristiti kao biomarker zbog iznimaka i kompleksnosti dobivanja uzorka, suPAR u serumu mogao bi dati jednostavne i točnije korelacije te predviđanja za tijek bolesti.

Sva ova istraživanja ukazuju da bi se stanice HEK293 i A1235, kod kojih je pokazano povećanje ekspresije elemenata urokinaznog sustava nakon transfekcije plazmidima, mogle koristiti u istraživanjima proliferacije i migracije stanica.

Glioblastomska stanična linija A1235 model je u istraživanju urokinaznog sustava u laboratoriju u kojem je napravljen rad. Ove stanice imaju sposobnost povećanja aktivnosti urokinaze nakon obrade pojedinim kemoterapeutcima: alkilirajućim agensima na koje su osjetljive (Madunić i sur. 2016), natrijevim salicilatom (Matulić i Brdar 2001) i etopozidom koji izaziva dvolančane lomove (Matulić i Brdar 2002).

Eksperimenti ukazuju da je povećanje urokinazne aktivnosti dio staničnog programa koji se pokreće kao odgovor na određene tipove stresa (Madunić i sur. 2016). Stanični sojevi s povećanom ili smanjenom urokinaznom aktivnošću, uzgojeni transfekcijom plazmidima, mogli bi poslužiti kao model u istraživanju ovisnosti otpornosti na određene tipove stresa i urokinazne aktivnosti.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Konstruirani su rekombinantni plazmidi pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR.
2. Uzgojeni su sojevi tumorskih staničnih linija A1235, HeLa i HEK293 transficirani plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR.
3. Analizirana je aktivnost urokinaze u kondicioniranom mediju sojeva stanica A1235, HeLa i HEK293 transficiranih plazmidima pcDNA3-uPA, pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR te uspoređena s onom kontrolnog soja transficiranim plazmidom pEGFP-C1. Sojevi A1235 i HEK293 transficirani plazmidom pcDNA3-PAI-1 imali su smanjenu aktivnost urokinaze, dok su stanice transficirane plazmidima pcDNA3-uPA i pcDNA3-uPAR imale bazalnu aktivnost urokinaze. Stanice HeLa nisu pokazale značajnu urokinaznu aktivnost.
4. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava pokazala je povećanje ekspresije PAI-1 i uPAR kod stanica A1235 i HEK293 nakon transfekcije plazmidima pcDNA3-PAI-1 i pcDNA3-uPAR. Stanice A1235 i HEK293 nisu imale povećanje ekspresije urokinaze nakon transfekcije plazmidom pcDNA3-uPA. Stanice HeLa nisu imale značajno povećanje ekspresije proteina urokinaznog sustava.



## 7. LITERATURA

- Baart, V. M., Houvast, R. D., de Geus-Oei, L. F., Quax, P., Kuppen, P., Vahrmeijer, A. L., Sier, C. (2020). Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. *EJNMMI research*, 10(1), 87.
- Babaei, G., Aziz, S. G., Jaghi, N. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 133, 110909.
- Barillari G. (2020). The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4526.
- Barnathan, E. S., Kuo, A., Karikó, K., Rosenfeld, L., Murray, S. C., Behrendt, N., Rønne, E., Weiner, D., Henkin, J., Cines, D. B. (1990). Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood*, 76(9), 1795–1806.
- Bharadwaj, A. G., Holloway, R. W., Miller, V. A., Waisman, D. M. (2021). Plasmin and Plasminogen System in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Cancers*, 13(8), 1838.
- Breuss, J. M., Uhrin, P. (2012). VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell adhesion & migration*, 6(6), 535–615.
- Brungs, D., Chen, J., Aghmesheh, M., Vine, K. L., Becker, T. M., Carolan, M. G., Ranson, M. (2017). The urokinase plasminogen activation system in gastroesophageal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(14), 23099–23109.
- Chapin, J. C., Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood reviews*, 29(1), 17–24.
- Chen, G., Sun, J., Xie, M., Yu, S., Tang, Q., Chen, L. (2021). PLAU Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in genetics*, 12, 651882.

- Chevilley, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D. (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 415
- Chou, R. H., Hsieh, S. C., Yu, Y. L., Huang, M. H., Huang, Y. C., Hsieh, Y. H. (2013). Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PloS one*, 8(8), e71983.
- Crippa M. P. (2007). Urokinase-type plasminogen activator. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 690–694.
- Czekay, R. P., Wilkins-Port, C. E., Higgins, S. P., Freytag, J., Overstreet, J. M., Klein, R. M., Higgins, C. E., Samarakoon, R., Higgins, P. J. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *International journal of cell biology*, 2011, 562481.
- D'Alonzo, D., De Fenza, M., Pavone, V. (2020). COVID-19 and pneumonia: a role for the uPA/uPAR system. *Drug discovery today*, 25(8), 1528–1534.
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., Pal, M. (2019). The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *Journal of cellular physiology*, 10.1002/jcp.28160.
- Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomssen, C., Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast cancer research : BCR*, 16(4), 428.
- El-Sherbiny, I. M., Elkholi, I. E., Yacoub, M. H. (2014). Tissue plasminogen activator-based clot busting: Controlled delivery approaches. *Global cardiology science & practice*, 2014(3), 336–349.
- Galvagni, F., Orlandini, M., Oliviero, S. (2013). Role of the AP-1 transcription factor FOSL1 in endothelial cells adhesion and migration. *Cell adhesion & migration*, 7(5), 408–411.
- Gorrasi, A., Li Santi, A., Amodio, G., Alfano, D., Remondelli, P., Montuori, N., Ragno, P. (2014). The urokinase receptor takes control of cell migration by recruiting integrins and FPR1 on the cell surface. *PloS one*, 9(1), e86352.

- Grøndahl-Hansen, J., Christensen, I. J., Rosenquist, C., Brünner, N., Mouridsen, H. T., Danø, K., Blichert-Toft, M. (1993). High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer research*, 53(11), 2513–2521.
- Hall A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions*, 40(6), 1378–1382.
- Hao, Y., Baker, D., Ten Dijke, P. (2019). TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2767.
- Høye, A. M., Erler, J. T. (2016). Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. *American journal of physiology. Cell physiology*, 310(11), C955–C967.
- Hynes, R. O., Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(1), a004903
- Jing, J., Zheng, S., Han, C., Du, L., Guo, Y., Wang, P. (2012). Evaluating the value of uPAR of serum and tissue on patients with cervical cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*, 26(1), 16–21.
- Jo, M., Lester, R. D., Montel, V., Eastman, B., Takimoto, S., Gonias, S. L. (2009). Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. *The Journal of biological chemistry*, 284(34), 22825–22833.
- Kawarada, Y., Inoue, Y., Kawasaki, F., Fukuura, K., Sato, K., Tanaka, T., Itoh, Y., Hayashi, H. (2016). TGF- $\beta$  induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Scientific reports*, 6, 35483.
- Liu, M., Lin, L., Høyer-Hansen, G., Ploug, M., Li, H., Jiang, L., Yuan, C., Li, J., Huang, M. (2019). Crystal structure of the unoccupied murine urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) reveals a tightly packed DII-DIII unit. *FEBS letters*, 593(11), 1236–1247.
- Llinas, P., Le Du, M. H., Gårdsvoll, H., Danø, K., Ploug, M., Gilquin, B., Stura, E. A., Ménez, A. (2005). Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *The EMBO journal*, 24(9), 1655–1663.
- Lv, T., Zhao, Y., Jiang, X., Yuan, H., Wang, H., Cui, X., Xu, J., Zhao, J., Wang, J. (2021). uPAR: An Essential Factor for Tumor Development. *Journal of Cancer*, 12(23), 7026–7040.

- Madunić, J., Antica, M., Cvjetko, P., Požgaj, L., Matulić, M. (2016). Modulation of urokinase plasminogen activator system by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition. *Cytotechnology*, 68(4), 783–794.
- Mahmood, N., Mihalcioiu, C., Rabbani, S. A. (2018). Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Frontiers in oncology*, 8, 24.
- Matulic, M., Brdar, B. (2001). Induction of Urokinase-type Plasminogen Activator by Sodium Salicylate in a Glioblastoma Cell Strains. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 39(1), 5-12.
- 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), 1-7.
- Medcalf, R. L., Stasinopoulos, S. J. (2005). The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *The FEBS journal*, 272(19), 4858–4867.
- Morikawa, M., Derynck, R., Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5), a021873.
- Naba, A., Clauser, K. R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S. A., Hynes, R. O. (2012). The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 11(4)
- Nagamine, Y., Medcalf, R. L., Muñoz-Cánoves, P. (2005). Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thrombosis and haemostasis*, 93(4), 661–675.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- Noh, H., Hong, S., Huang, S. (2013). Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics*, 3(7), 487–495.
- Okumura, N., Seki, T., Ariga, T. (2007). Cell surface-bound plasminogen regulates hepatocyte proliferation through a uPA-dependent mechanism. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(6), 1542–1549.

- Park, J. W., Hwang, S. R., Yoon, I. S. (2017). Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1259.
- Ponczek M. B. (2021). High Molecular Weight Kininogen: A Review of the Structural Literature. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13370.
- Rahman, F. A., Krause, M. P. (2020). PAI-1, the Plasminogen System, and Skeletal Muscle. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7066.
- Santibanez, J. F., Obradović, H., Kukolj, T., Krstić, J. (2018). Transforming growth factor- $\beta$ , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 382–395.
- Schaller, J., Gerber, S. S. (2011). The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(5), 785–801.
- Semina, E. V., Rubina, K. A., Shmakova, A. A., Rysenkova, K. D., Klimovich, P. S., Aleksanrushkina, N. A., Sysoeva, V. Y., Karagyaur, M. N., Tkachuk, V. A. (2020). Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma. *Journal of cellular physiology*, 235(9), 6268–6286.
- Simone, T. M., Higgins, P. J. (2012). Low Molecular Weight Antagonists of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Therapeutic Potential in Cardiovascular Disease. *Molecular Medicine & Therapeutics*, 1(1), 101.
- Suelves, M., Vidal, B., Ruiz, V., Baeza-Raja, B., Diaz-Ramos, A., Cuartas, I., Lluís, F., Parra, M., Jardi, M., Lopez-Aleman, R., Serrano, A. L., Muñoz-Canoves, P. (2005). The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 10, 2978–2985.
- Vassalli, J. D., Sappino, A. P., Belin, D. (1991). The plasminogen activator/plasmin system. *The Journal of clinical investigation*, 88(4), 1067-1072.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*, 37(5), 1528–1542.

- Vincenza Carriero, M., Franco, P., Vocca, I., Alfano, D., Longanesi-Cattani, I., Bifulco, K., Mancini, A., Caputi, M., Stoppelli, M. P. (2009). Structure, function and antagonists of urokinase-type plasminogen activator. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *14*, 3782–3794.
- Wang, X., Jiang, Z., An, J., Mao, X., Lin, F., Sun, P. (2018). Effect of a synthetic inhibitor of urokinase plasminogen activator on the migration and invasion of human cervical cancer cells in vitro. *Molecular medicine reports*, *17*(3), 4273–4280.
- Xu, X., Gårdsvoll, H., Yuan, C., Lin, L., Ploug, M., Huang, M. (2012). Crystal structure of the urokinase receptor in a ligand-free form. *Journal of molecular biology*, *416*(5), 629–641.
- Ye, Y., Peng, L., Vattai, A., Deuster, E., Kuhn, C., Dannecker, C., Mahner, S., Jeschke, U., von Schönfeldt, V., Heidegger, H. H. (2020). Prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) signaling promotes migration of cervical cancer via urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR). *Journal of cancer research and clinical oncology*, *146*(9), 2189–2203.
- Yepes M. (2019). The Plasminogen Activation System Promotes Neurorepair in the Ischemic Brain. *Current drug targets*, *20*(9), 953–959.

**Internetske reference:**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno: 1.2.2021.)

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (pristupljeno: 24.2.2021.)

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf> (pristupljeno 18.12.2021.)

<https://www.takarabio.com/> ( pristupljeno 10.1.2022.)

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V79020> (pristupljeno 17.12.2021.)

## 8. PRILOZI

### 1. Sekvence za uPA, PAI-1 i uPAR preuzete s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### a) uPA

CCCGACCTCGCCACCATGAGAGCCCTGCTGGCGCGCCTGCTTCTCTGCGTCCTGGTCTGAGCGACTCCAAAAGGC  
AGCAATGAACTTCATCAAGTTCCATCGAACTGTGACTGTCTAAATGGAGGAACATGTGTGTCCAACAAGTACTTC  
TCCAACATTCCTGCTGCAACTGCCCAAAGAAATTCGGAGGGCAGCACTGTGAAATAGATAAGTCAAAAACCTGC  
TATGAGGGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGCACACCATGGGCCGGCCCTGCCTGCCCTGGAAC  
TCTGCCACTGTCTTCAGCAAACGTACCATGCCACAGATCTGATGCTCTTCAGCTGGGCCTGGGGAAACATAAT  
TACTGCAGGAACCCAGACAACCCGGAGGGCAGCCCTGGTGCTATGTGCAGGTGGGCCTAAAGCCGCTTGTCCAAGAG  
TGCATGGTGCATGACTGGGCAGATGGAAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAATTAAAAATTCAGTGTGGCCAA  
AAGACTCTGAGGCCCCGCTTTAAGATTATTGGGGGAGAATTCACCACCATCGAGAACCAGCCCTGGTTTGCGGCC  
ATCTACAGGAGGCACCGGGGGGGCTCTGTACCTACGTGTGTGGAGGCAGCCTCATCAGCCCTTGTGGGTGATC  
AGCGCCACACACTGCTTCATTGATTACCCAAAGAAGGAGGACTACATCGTCTACCTGGGTCTCAAGGCTTAAC  
TCCAACACGCAAGGGGAGATGAAGTTTGAGGTGGAAAACCTCATCTACACAAGGACTACAGCGCTGACACGCTT  
GCTCACCACAACGACATTGCCTTGCTGAAGATCCGTTCCAAGGAGGGCAGGTGTGCGCAGCCATCCCGGACTATA  
CAGACCATCTGCCTGCCCTCGATGTATAACGATCCCCAGTTTGGCACAAGCTGTGAGATCACTGGCTTTGGAAAA  
GAGAATTTACCAGACTATCTCTATCCGGAGCAGCTGAAAATGACTGTTGTGAAGCTGATTTCCACCGGGAGTGT  
CAGCAGCCCCACTACTACGGCTCTGAAGTCACCACCAAAATGCTGTGTGCTGCTGACCCACAGTGGAAAAACAGAT  
TCCTGCCAGGGAGACTCAGGGGGACCCCTCGTCTGTTCCCTCCAATGCCGCATGACTTTGACTGGAATTGTGAGC  
TGGGGCCGTGGATGTGCCCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTACCCTGGATCCGC  
AGTCACACCAAGGAAGAGAATGGCCTGGTCTCTGAGGGT

#### b) PAI-1

CAGGATGCAGATGTCTCCAGCCCTCACCTGCCTAGTCTGGCCCTGGCCCTTGTCTTTGGTGAAGGGTCTGCTGT  
GCACCATCCCCATCCTACGTGGCCACCTGGCCTCAGACTTCGGGGTGAGGGTGTTCAGCAGGTGGCGCAGGC  
CTCCAAGGACCGCAACGTGGTTTTCTCACCCATATGGGGTGGCCTCGGTGTTGGCCATGCTCCAGCTGACAACAGG  
AGGAGAAACCCAGCAGCAGATTCAAGCAGCTATGGGATTCAAGATTGATGACAAGGGCATGGCCCCGCCCTCCG  
GCATCTGTACAAGGAGCTCATGGGGCCATGGAACAAGGATGAGATCAGCACCACAGACGCGATCTTCGTCCAGCG  
GGATCTGAAGCTGGTCCAGGGCTTCATGCCCCACTTCTTCAGGCTGTTCCGGAGCACGGTCAAGCAAGTGGACTT  
TTCAGAGGTGGAGAGAGCCAGATTATCATCAATGACTGGGTGAAGACACACAAAAAGGTATGATCAGCAACTT  
GCTTGGGAAAGGAGCCGTGGACCAGCTGACACGGCTGGTGCTGGTGAATGCCCTCTACTTCAACGGCCAGTGGAA  
GACTCCCTTCCCCGACTCCAGCACCCACCGCCGCTCTCCACAAATCAGACGGCAGCACTGTCTCTGTGCCAT  
GATGGCTCAGACCAACAAGTTCAACTATACTGAGTTACCACGCCCCGATGGCCATTACTACGACATCCTGGAAC  
GCCCTACCACGGGGACACCCTCAGCATGTTTATTGCTGCCCTTATGAAAAAGAGGTGCCTCTCTCTGCCCTCAC  
CAACATTTCTGAGTGGCCAGCTCATCAGCCACTGGAAAGGCAACATGACCAGGCTGCCCCGCTCCTGGTTCTGCC  
CAAGTTCTCCCTGGAGACTGAAGTCGACCTCAGGAAGCCCCTAGAGAACCTGGGAATGACCGACATGTTTACAGACA  
GTTTCAGGCTGACTTACAGAGTCTTTTACAGCAAGAGCCTCTCCACGTGCGCAGGGCCTGCAGAAAAGTGAAGAT  
CGAGGTGAACGAGAGTGGCACGGTGGCCCTCCTCATCCACAGCTGTATAGTCTCAGCCCGCATGGCCCCGAGGA  
GATCATCATGGACAGACCCCTTCTCTTTGTGGTCCGGCACAACCCACAGGAACAGTCTTTTTCATGGGCCAAGT  
GATGGAACCCTGACC

### c) uPAR

CTCGCGACATGGGTACCCGCGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCTCCACACCTGCGTCCCAGCCTCTTGGGGCC  
TGCGGTGCATGCAGTGTAAGACCAACGGGGATTGCCGTGTGGAAGAGTGCGCCCTGGGACAGGACCTCTGCAGGA  
CCACGATCGTGCCTTGTGGGAAGAAGGAGAAGAGCTGGAGCTGGTGGAGAAAAGCTGTACCCACTCAGAGAAGA  
CCAACAGGACCCTGAGCTATCGGACTGGCTTGAAGATCACCAGCCTTACCGAGGTTGTGTGTGGGTAGACTTGT  
GCAACCAGGGCAACTCTGGCCGGGCTGTCACCTATTCCCGAAGCCGTTACCTCGAATGCATTTCCCTGTGGCTCAT  
CAGACATGAGCTGTGAGAGGGGCCCGCACCAGAGCCTGCAGTGCCGCAGCCCTGAAGAACAGTGCTGGATGTGG  
TGACCCACTGGATCCAGGAAGGTGAAGAAGGGCGTCCAAAGGATGACCGCCACCTCCGTGGCTGTGGCTACCTTC  
CCGGCTGCCCGGGCTCCAATGGTTTTCCACAACAACGACACCTTCCACTTCCCTGAAAATGCTGCAACACCACCAAA  
GCAACGAGGGCCCAATCCTGGAGCTTGAATACTGCCGAGAATGGCCGCCAGTGTTACAGCTGCAAGGGGAACA  
GCACCCATGGATGCTCCTCTGAAGAGACTTTCCCTCATTGACTGCCGAGGCCCATGAATCAATGTCTGGTAGCCA  
CCGGCACTCACGAACCGAAAAACCAAAGCTATATGGTAAGAGGCTGTGCAACCGCCTCAATGTGCCAACATGCC  
ACCTGGGTGACGCCTTCAGCATGAACCACATTGATGTCTCCTGCTGTACTAAAAGTGGCTGTAACCACCCAGACC  
TGGATGTCCAGTACCGCAGTGGGGCTGCTCCTCAGCCTGGCCCTGCCCATCTCAGCCTCACCATCACCCTGTAA  
TGACTGCCAGACTGTGGGGAGGCACCTCTCCTTGGACCTAAACCTGA

## 2. Sekvence za uPA, PAI-1 i uPAR dobivene sekvenciranjem

### a) uPA

CCGGGCGCGCTGCTTCTCTGCGTCCTGGTTCGTGAGCGACTCCAAACGAACTGTGACTGTCTAAAATGGAGAACAT  
GTGTGTCCAACAAGTACTTCTCCAACATTCACTGGTGCAACTGCCCAAAGAAATTCGGAGGGCAGCACTGTGAAA  
TAGATAAGTCAAAAACCTGCTATGAGGGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAAGGCCAGCACTGACACCATGGGCC  
GGCCCTGCCTGCCCTGGAACCTCTGCCACTGTCTTTCAGCAAACGTACCATGCCACAGATCTGATGCTCTTCAGC  
TGGGCCTGGGGAAACATAATTACTGCAGGAACCCAGACAACCGGAGGCGACCCTGGTGTATGTGCAGGTGGGCC  
TAAAGCCGCTTGTCCAAGAGTGCATGGTGCATGACTGCGCAGATGGAAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAAT  
TAAAATTTTCAGTGTGGCCAAAAGACTCTGAGGCCCGCTTTAAGATTATTGGGGGAGAATTCACCACCATCGAGA  
ACCAGCCCTGGTTTTGCGGCCATCTACAGGAGGCACCGGGGGGCTCTGTACCTACGTGTGTGGAGGCAGCCTCA  
TCAGCCCTTGCTGGGTGATCAGCGCCACACACTGCTTTCATTGATTACCCAAAGAAGGAGGACTACATCGTCTACC  
TGGGTGCTCAAGGCTTAACTCCAACACGCAAGGGGAGATGAAGTTTGAGGTGGAAAACCTCATCTACACAAGG  
ACTACAGCGCTGACACGCTTGCTCACCACAACGACATTGCCTTGCTGAAGATCCGTTCCAAGGAGGGCAGGTGTG  
CGCAGCCATCCCGGACTATACAGACCATCTGCCTGCCCTCGATATATAACGATCCCCAGTTTTGGCACAAGCTGTG  
AGATCACTGGCTTTGGAAAAGAGAATTCTACCGACTATCTCTATCCGGAGCAGCTGAAAATGACTGTTGTGAAGC  
TGATTTCCACCGGGAGTGTGAGCAGCCCCACTACTACGGCTCTGAAGTCACCACCAAAAATGCTGTGTGCTGCTG  
ACCCACAGTGGAAAACAGATTCCTGCCAGGGAGACTCAGGGGGACCCCTCGTCTGTTCCCTCCAAGGCCGATGA  
CTTTGACTGGAATTGTGAGCTGGGGCCGTGGATGTCACCTGAAGGACAACCCAGGCGTTAACCGAGAGTTCCAAC  
TTCTTTCCCGGATCCGCCGCCACCATGAAAAAAGGGCCTGGCCCTCTAGGGGCAACCAAGTAATTCCTGGCC  
CCCCACGGGCATATAAGGGCCCATTTAAAGTTCCCAAAAATATGAGCCCTTTTCCCCAATGTCATTATATTT  
TAACCACTTTGGTTTTCCCCCCCCCGTCTCTCTTGACACGTAAAAGTCCCTCCCCCTCTTTCTTCAAAGAGAA  
GGAAATATATTCTCTGCTTGGCGAGTTTTCTCTCTTTTCGGGGGGGTAATAGCGTACATTAACGCTGCTGCACC  
CTATATTATAATATACGTTATATTCTTAGGTGTCATACTATTGTAGACCGACAAAAATATATACTAATATAGCGT  
CGCCGTGAAGCACATTCTCTAATGCTATAACC



## b) PAI-1

CCCGGTCATTCTGGGCTGGATTGTCTTTGGTGAGGGTCTGCTGTGCACCATCCCCATCCTACGTGGCCACCTG  
GCCTCAGACTTCGGGGTGAGGGTGTTCAGCAGGTGGCGCAGGCCTCCAAGGACCGCAACGTGGTTTTCTCACCT  
ATGGGGTGGCCTCGGTGTTGGCCATGCTCCAGCTGACAACAGGAGGAGAAAACCCAGCAGCAGATTCAAGCAGCTA  
TGGGATTCAAGATTGATGACAAGGGCATGGCCCCCGCCTCCGGCATCTGTACAAGGAGCTCATGGGGCCATGGA  
ACAAGGATGAGATCAGCACCACAGACGCGATCTTCGTCCAGCGGGATCTGAAGCTGGTCCAGGGCTTCATGCCCC  
ACTTCTTCAGGCTGTTCCGGAGCACGGTCAAGCAAGTGGACTTTTCAGAGGTGGAGAGAGCCAGATTTCATCATCA  
ATGACTGGGTGAAGACACACACAAAAGGTATGATCAGCAACTTGCTTGGGAAAGGAGCCGTGGACCAGCTGACAC  
GGCTGGTGCTGGTGAATGCCCTCTACTTCAACGGCCAGTGAAGACTCCCTTCCCCGACTCCAGCACCACCGCC  
GCCTCTTCCACAAATCAGACGGCAGCACTGTCTCTGTGCCATGATGGCTCAGACCAACAAGTTCAACTATACTG  
AGTTCACCACGCCCGATGGCCATTACTACGACATCCTGGAAGTGCCTACCACGGGGACACCCTCAGCATGTTCA  
TTGCTGCCCCTTATGAAAAAGAGGTGCCTCTCTGTGCCCTACCAACATTCTGAGTGGCCAGCTCATCAGCCACT  
GGAAAGGCAACATGACCAGGCTGCCCCGCTCCTGGTTCTGCCCAAGTTCTCCCTGGAGACTGAAGTCGACCTCA  
GGAAGCCCCTAGAGAACCTGGGAATGACCGACATGTTTCAGACAGTTTCAGGCTGACTTCACGAGTCTTTCAGACC  
AAGAGCCTCTCCACGTCGCGCAGGGCGCTGCAGAAAGTGAAGATCGAGGTGAACGAGAGTGGCACGGTGGCCTCCT  
CATCCACAGCTGTCATAGTCTCAGCCCCGATGGCCCCCGAGGAGATCATCATGGACAGACCCTTCTCTTTGTGG  
TCCGGCACACCCACAGGAACAGTCTTTTTCTGGGCCAAGTGAAGTGAACCCTGACCAATCACTATTGAATTTCTGC  
AGATTCCTCAACTGGCGGGCCGTTCAACATGCATTTAAGGGCCCATTCCTAAGGTCCCCAAAGGTAGAATCCTG  
ATAACCCTCAAGGGGCCTTTAATTGCCAACAATTTTTGTTGTCCCCCCCCCGCCCTTTTTCCCCGAAAGGGC  
CCCCCCCCGGTCTTTTTCTAAAAAAGAAAATTTCCCTATTTTAAAGGTTTTTTTTCTTGGGGGGGGGGGGCAGA  
CCCAGGGGGAAATGTTTAATACAATTTCTGTCCGGGTTGGTATTTT

## c) uPAR

ACCGAGCCCCGGCTGCGCTGCTGCTGCTGCTCCACACCTGCGTCCCAGCCTCTTGGGGCCTGCGGTGCATGCAGT  
GTAAGACCAACGGGGATTGCCGTGTGGAAGAGTGCGCCCTGGGACAGGACCTCTGCAGGACCACGATCGTGCCT  
TGTGGGAAGAAGGAGAAGAGCTGGAGCTGGTGGAGAAAAGCCGTACCCACTCAGAGAAGACCAACAGGACCCTGA  
GCTATCGGACTGGCTTGAAGATCACCAGCCTTACCGAGGTTGTGTGTGGGTTAGACTTGTGCAACCAGGGCAACT  
CTGGCCGGGCTGTCACCTATTCCCAGAGCCGTTACCTCGAATGCATTTCTGTGGCTCATCAGACATGAGCTGTG  
AGAGGGGCCGGCACCAGAGCCTGCAGTGCCTGAGCCCTGAAGAACAGTGCCTGGATGTGGTGACCCACTGGATCC  
AGGAAGGTGAAGAAGGGCGTCCAAAGGATGACCGCCACCTCCGTGGCTGTGGCTACCTTCCCGGCTGCCCGGGC  
CAATGGTTTTCCACAACAACGACACCTTCCACTTCCCTGAAATGCTGCAACACCACCAATGCAACGAGGGCCCAAT  
CCTGGAGCTTGAATCTGCCGAGAAATGGCCGCCAGTGTACAGCTGCAAGGGGAACAGCACCATGGATGCTC  
CTCTGAAGAGACTTTCTCATTGACTGCCGAGGCCCCATGAATCAATGTCTGGTAGCCACCGGCACTCACGAACC  
GAAAAACCAAGCTATATGGTAAGAGGCTGTGCAACCGCCTCAATGTGCCAACATGCCACCTGGGTGACGCCTT  
CAGCATGAACCACATTGATGTCTCCTGCTGTACTAAAAGTGGCTGTAACCACCAGAACCTGGATGTCCAGTACC  
GCAGTGGGGCTGCTCCTCAGCCTGGCCCTGCCATCTCAGCCTCACCATCACCCTGCTAATGACTGCCAGAACTG  
GTGGGGAGGCTCTCTCCTCTGGACCTAAACCTGAAATCACTAGTGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTTACTAG  
TGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGGTCTCCCTATAGTGAAGTTCGATTAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTG  
GGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGCTTAAATAGACCTCCACCGTACACGCCTACCGCCATTTGCGTCAAG  
GGGGGCGGAATTGTTACAAATTTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGGTGCCAAAACAACTCCATTGACGCCCAA  
GGGGGGGGAAACTTGAATCCCCGGGAATAAACCGCTTTCCCCCCCCCTTTGTGTTTGCAAACCCCTCCCCGG  
GGTATAACGGATAAAAAAACAATAATTTTCGGCCAAAAAACCACCAAGGGTTTTTGGGGTAAAGGGGGGG  
GGGCCTTTTCCCTTTTTATTCAAAGGGGCTTTTTATTAAATCTTTTAGGGGTCCCGGGGGGTTTCTAAAACC  
CCCTTTGTGTAGAGAACCTTTGGTTTTGGAAAATTTTTTAGTAGGGGGGGTGGG

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15.1.1998. u Čakovcu, a odrasla sam u Prelogu. Osnovnu i srednju školu sam pohađala u Prelogu gdje sam od početka pokazivala interes za učenje i znanost. Tijekom osnovne i srednje škole odlazila sam na razna natjecanja iz biologije, kemije i geografije, a najbolje rezultate sam postigla na natjecanjima iz povijesti te sam umalo studirala povijest. Ipak je ljubav prema biologiji prevagnula te sam upisala biologiju i kemiju na PMF-u u Zagrebu. Tijekom studija radila sam kod svojih roditelja na OPG-u te sam obavljala razne studentske poslove poput instrukcija, rada u trgovini i promocija.