

# Utjecaj stresa endoplazmatskog retikuluma na sustav plazminogenog aktivatora

---

Janjić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:913454>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Doris Janjić

**Utjecaj stresa endoplazmatskog  
retikuluma na sustav plazminogenog  
aktivatora**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doris Janjić

**The effect of endoplasmic reticulum stress  
on the plasminogen activator system**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Matulić. Diplomski rad izrađen je uz potporu projekta "Obnova timusa za preciznu medicinu u liječenju tumora i leukemija" (voditelj prof. dr. sc. Mariastefania Antica IP-2020-02-2431) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišni magistar eksperimentalne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj stresa endoplazmatskog retikuluma na sustav plazminogenog aktivatora

Doris Janjić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav plazminogenog aktivatora izvanstanični je proteolitički enzimski sustav koji se sastoji od urokinaznog plazminogenog aktivatora ili urokinaze (uPA), urokinaznog receptora uPAR i urokinaznog inhibitora PAI-1. Urokinaza aktivira plazminogen, pretvarajući ga u plazmin koji igra ključnu ulogu u remodeliranju izvanstaničnog matriksa, otapanju krvnih ugrušaka, migraciji i invaziji stanica, te sudjeluje u brojnim važnim fiziološkim procesima. Cilj ovog rada bio je utvrditi utječe li stres endoplazmatskog retikuluma (ER-a) na urokinaznu aktivnost stanica. Tijekom stresa ER-a, nastalog nakupljanjem nepravilno smotanih proteina, dolazi do aktivacije tri tipa transmembranskih senzora koji iniciraju i reguliraju odgovor na nesmotane proteine (UPR). Ovaj odgovor uključuje inhibiciju translacije proteina, povećanje ekspresije proteina šaperona te može dovesti do autofagije ili apoptoze. U istraživanju su korištene tumorske linije humanog glioblastoma A1235 i tumora dojke MDA-MB-231, pri čemu je stres ER-a bio induciran primjenom agensa za koje se zna da izazivaju takav stanični odgovor, ispitani su i u kombinaciji sa inhibitorima šaperona i senzornih molekula. U stanicama glioblastoma uočeno je povećanje aktivnosti uPA, dok je u stanicama tumora dojke zabilježen pad te aktivnosti. Analizirana je ekspresija uPA, PAI-1 i BiP proteina u staničnim lizatima kontrolnih i tretiranih stanica. Rezultati su pokazali da je induktor stresa ER-a značajno utjecao na urokinazni sustav u obje stanične linije, uz smanjenje migracije, invazije i proliferacije stanica. Također, inhibitori koji su smanjili učinke stresa ER-a utjecali su na aktivnost urokinaze, dok je inhibitor šaperona smanjio ekspresiju BiP-a. Zaključeno je da stres ER-a može sudjelovati u regulaciji sustava plazminogenog aktivatora, na stanično specifičan način.

(49 stranica, 18 slika, 98 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: urokinazni plazminogeni aktivator, PAI-1, uPAR, stres ER-a, glioblastom, tumor dojke, aktivnost, ekspresija

Mentor: prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Maja Matulić  
prof. dr. sc. Nada Oršolić  
prof. dr. sc. Petra Korac

Rad prihvaćen: 5. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### The effect of endoplasmic reticulum stress on the plasminogen activator system

Doris Janjić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The plasminogen activator system is an extracellular proteolytic enzyme system composed of urokinase plasminogen activator or urokinase (uPA), the urokinase receptor uPAR, and the urokinase inhibitor PAI-1. Urokinase activates plasminogen, converting it into plasmin, which plays a crucial role in extracellular matrix remodeling, blood clot degradation, cell migration and invasion, and numerous other physiological processes. The aim of this study was to determine whether endoplasmic reticulum (ER) stress influences urokinase activity. During ER stress, triggered by the accumulation of misfolded proteins, three types of transmembrane sensors are activated, initiating and regulating the unfolded protein response (UPR). This response includes inhibition of protein translation and increased expression of chaperone proteins, which can lead to autophagy or apoptosis. In this study human glioblastoma cell line A1235 and breast cancer cell line MDA-MB-231 were used, ER stress was induced by agents known to cause such cellular responses and agents were further examined in combination with chaperone inhibitor and inhibitor of the sensor molecule. In glioblastoma cells, an increase in uPA activity was observed, while a decrease was observed in breast cancer cells. The expression of uPA, PAI-1, and BiP proteins was analyzed in cell lysates from both control and treated cells. The results demonstrated that ER stress inductor significantly affected the urokinase system in both cell lines, leading to reduced cell migration, invasion, and proliferation. Additionally, inhibitors reduced the effects of ER stress on urokinase activity, while the chaperone inhibitor decreased BiP expression. The results suggest that ER stress may regulate the plasminogen activator system in a cell-specific manner.

(49 pages, 18 figures, 98 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in the Central Biological Library.

Keywords: urokinase plasminogen activator, PAI-1, uPAR, ER stress, glioblastoma, breast cancer, activity, expression

Mentor: Prof. Maja Matulić, PhD

Reviewers: Prof. Maja Matulić, PhD  
Prof. Nada Oršolić, PhD  
Prof. Petra Korać, PhD

Thesis accepted: September 5<sup>th</sup> 2024.

## *Zahvale*

*Ovom prilikom želim iskazati svoju iskrenu zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Maji Matulić na podršci, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Od srca hvala za svo znanje, savjete i motivaciju koja mi je pružena.*

*Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima, Tatjani i Slavku, na neizmjerne podršci, ljubavi i ohrabrenju tijekom cijelog mog obrazovanja. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i pružili mi sve što je bilo potrebno za ostvarenje ovog cilja. Bez vaše podrške, ovaj uspjeh ne bi bio moguć.*

*Neizmjerno sam zahvalna na divnim kolegama i prijateljima koje sam stekla tijekom studija. Posebno bih se željela zahvaliti Anđeli F., Lovri K., Nikoli B., Ivani D., Ani Josipi J., Ivoni K. i Bruni Ž. Vaša podrška, prijateljstvo i prisutnost kroz sve uspone i padove učinili su ovaj put nezaboravnim. Hvala vam što ste bili uz mene i što ste zajedno sa mnom ispisali ovo poglavlje mog života.*

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Sustav plazminogenog aktivatora</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Urokinazni tip plazminogenog aktivatora.....	1
1.1.2. Urokinazni receptor .....	3
1.1.3. Urokinazni inhibitori: PAI-1 i PAI-2 .....	3
1.1.4. Fiziološka uloga sustava uPA-uPAR .....	5
1.1.5. Funkcija sustava uPA-uPAR u progresiji tumora.....	7
1.1.6. Regulacija ekspresije urokinaze .....	8
<b>1.2. Stres endoplazmatskog retikuluma</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Odgovor na nesmotane proteine u tumorima .....	13
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. Stanična kultura</b> .....	<b>15</b>
3.1.1. Stanične linije.....	15
3.1.2. Uzgoj stanica u kulturi.....	15
3.1.3. Obrada stanica .....	16
<b>3.2. Radijalna kazeinoliza</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4. Analiza proteina metodom Western blot</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5. Testovi migracije stanica</b> .....	<b>19</b>
3.5.1. Test "zarastanja" .....	19
3.5.2. Test invazije u komoricama .....	20
<b>3.6. Test proliferacije stanica</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7. Statistička obrada podataka</b> .....	<b>21</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. Analiza urokinazne aktivnosti u staničnim linijama A1235 i MDA-MB-231 nakon tretmana različitim agensima</b> .....	<b>22</b>
4.1.1. Analiza urokinazne aktivnosti stanica A1235 nakon tretmana kemoterapeuticima	23
4.1.2. Analiza urokinazne aktivnosti stanica MDA-MB-231 nakon tretmana kemoterapeuticima .....	26
<b>4.2. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava i stresa ER-a</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3. Analiza sposobnosti invazije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4. Analiza sposobnosti migracije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom</b> .....	<b>32</b>



<b>4.5. Analiza proliferacije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade taspigarginom .....</b>	<b>33</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>41</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Sustav plazminogenog aktivatora

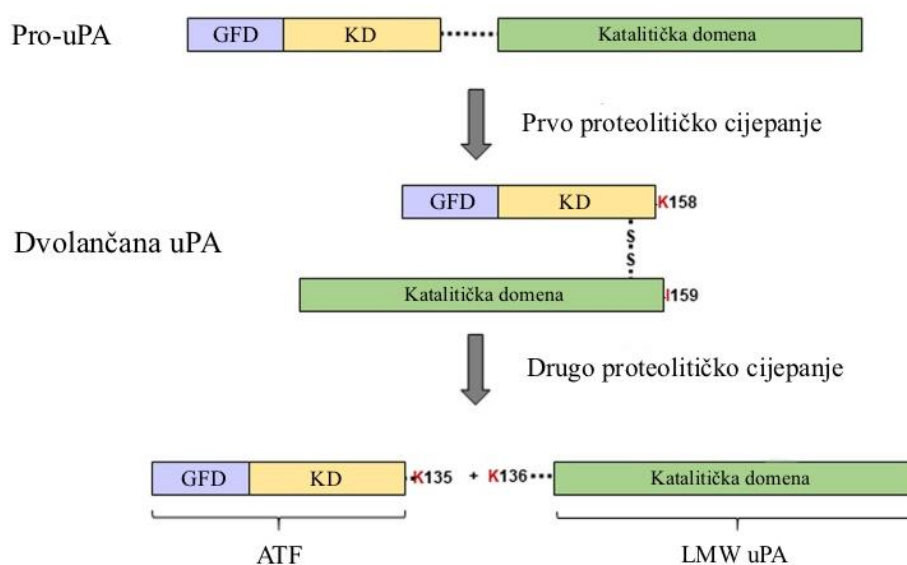
Sustav plazminogenog aktivatora (PA) je izvanstanični proteolitički enzimatski sustav koji se sastoji od izvanstanične serinske proteaze urokinaze ili urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA), urokinaznog receptora (uPAR) i inhibitora (PAI-1 i PAI-2) (Mahmood i sur., 2018). Plazminogeni aktivatori uključeni su u brojne fiziološke procese. Sudjeluju u procesima zarastanja rana, embriogenezi, ovulaciji, pregradnji tkiva, otapanju krvnih ugrušaka te mogu utjecati na staničnu migraciju i invaziju pa tako i procese metastaziranja tumora (Mahmood i sur., 2018). Glavna fiziološka funkcija sustava PA je pretvoriti neaktivan plazminogen u plazmin, izvanstaničnu proteazu širokog raspona supstrata. Ovom procesu mogu posredovati dva tipa plazminogenog aktivatora: tkivni tip plazminogenog aktivatora (tPA) i urokinazni tip plazminogenog aktivatora (uPA). Aktivacija plazminogena putem tPA i uPA primarno je regulirana razinom njihove ekspresije te njihovom interakcijom s inhibicijskim proteinom PAI-1 (Flick i Bugge, 2017).

### 1.1.1. Urokinazni tip plazminogenog aktivatora

Urokinazni tip plazminogenog aktivatora ili urokinaza ključna je serinska proteaza molekularne težine od približno 50 000 Da, a uključena je u pretvorbu neaktivnog plazminogena u aktivni plazmin (Choong i Nadesapillai, 2003). Urokinaza prvi je puta identificirana u urinu 1947. godine, međutim danas je poznato da se urokinazu može naći i u plazmi, sjemenoj tekućini i izvanstaničnom matriksu (ECM) mnogih tkiva (Mahmood i sur., 2018; Kjeldgaard i Ploug, 1957).

uPA se oslobađa iz stanica kao jednolančani zimogen prourokinaza (pro-uPA), neaktivni glikoprotein od 411 aminokiselina. Nakon izlučivanja pro-uPA dolazi do cijepanja peptidne veze između Lys158 i Ile159 prilikom čega nastaje dvolančana visokomolekularna uPA (Günzler i sur., 1982). Ovu konverziju mogu katalizirati plazmin, faktor zgrušavanja krvi XIIa, katepsin B i L, kalikrein i drugi (Ichinose i sur., 1986; Goretzki i sur., 1992). Jednolančani uPA 150 puta je manje potentan za generiranje aktivnog plazmina od dvolančanog uPA (Petersen i sur., 1988). Visokomolekularni uPA prolazi još jedno proteolitičko cijepanje i pretvara se u molekulu s tri funkcionalno neovisna područja: amino-terminalnog fragmenta koji sadrži domenu faktora rasta (GFD) i ima visok afinitet za vezanje s uPAR-om, domenu kringle (KD) uključenu u unutarstaničnu signalizaciju i migraciju stanica te karboksil-terminalnu proteolitički aktivnu serinsku proteaznu domenu koja zadržava funkciju aktivatora

plazminogena (slika 1) (Petersen i sur., 1988; Jaiswal i sur., 2018). Koncentracija uPA u krvnoj plazmi je oko 20 pM od čega većina stvara kompleks s PAI-1, dok je ostatak prisutan u obliku pro-uPA (Jaiswal i sur., 2018). Vežanjem uPA za uPAR povećava se njegova sposobnost pretvorbe plazminogena u plazmin, međutim, čak i vežanje pro-uPA na uPAR dovodi do aktivacije plazminogena bez aktivacije pro-uPA. Vjeruje se da vežanjem pro-uPA uPAR prolazi određene konformacijske promjene koje daju proteazne sposobnosti jednolančanoj uPA (Higazi i sur., 1995). Poznato je da tumorska tkiva imaju povećanu ekspresiju uPA u odnosu na normalna tkiva pri čemu uPA značajno doprinosi invaziji i migraciji stanica u primarnim i metastatskim tumorima (Kwaan i sur., 1991).



**Slika 1.** Struktura pro-uPA i uPA. Pro-uPA, sačinjen od domene faktora rasta (GFD), domene kringle (KD) i katalitičke domene serinske proteaze, izlučuje se kao jednolančani prekursor koji prolazi proteolitičko cijepanje između peptidne veze K158-I159 kako bi se generirala dvolančana forma uPA. Djelovanjem drugog proteolitičkog cijepanja, dvolančana forma uPA može se dodatno pocijepati između K135-K136, što rezultira formiranjem neaktivnog amino-terminalnog fragmenta (ATF) kao i katalitički aktivnog nisko-molekularnog oblika uPA (LMW uPA). pro-uPA: prourokinaza; uPA: urokinaza; K: lizin; I: izoleucin. (Preuzeto i prilagođeno prema Mahmood i sur., 2018).

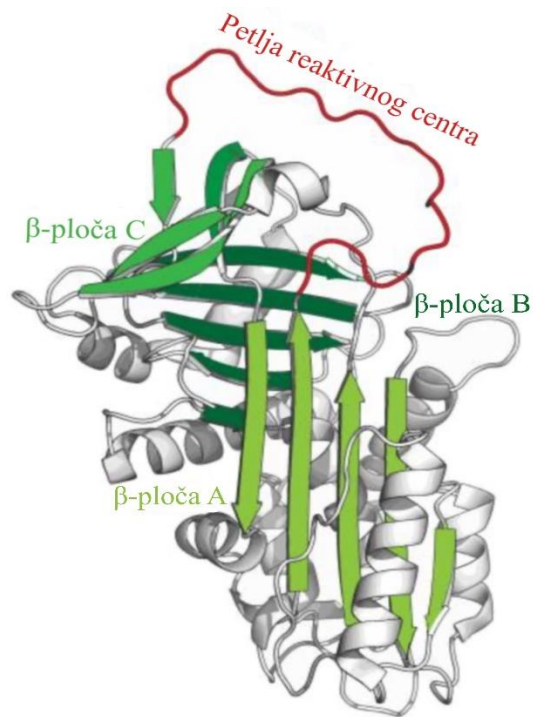
### 1.1.2. Urokinazni receptor

uPAR (CD87) je membranski receptor vrlo visokog afiniteta prema urokinazi. Sekvenca uPAR-a sadrži tri ponavljajuća slijeda od otprilike 90 aminokiselina, kodirajući tako tri homologne domene, pri čemu je svaka domena neovisno savijena u odnosu na drugu (Mahmood i sur., 2018). Receptor je sačinjen od jednog polipeptidnog lanca bogatog cisteinom (313 aminokiselina) s tri različite domene (D1, D2 i D3) koje su međusobno povezane (Fowler i sur., 1998). Ovaj protein ne sadržava transmembransku niti intracelularnu domenu, a njegov C-terminalni kraj je kovalentno povezan sa staničnom membranom pomoću glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra (Ploug i sur., 1991). Otkriveno je da se uPA prilikom vezanja na receptor veže u središnju šupljinu uPAR-a te tako ostavlja vanjsku površinu receptora dostupnu za vezanje drugim proteinima (Llinas i sur., 2005). Prisutnost dodatnog veznog mjesta pomaže uPAR-u u interakciji s različitim tipovima molekula i transmembranskih receptora kako bi olakšao nizvodno intracelularno signaliziranje. Sve tri domene uPAR-a mogu vezati uPA, međutim samo domene D2 i D3 mogu vezati i druge proteine poput integrina, vitronektina i sl. Fiziološki normalno tkivo rijetko eksprimira uPAR, ali tijekom nekih patoloških procesa, kao što su upalni odgovor i zacjeljivanje rana, razina uPAR-a se povećava (Xia i sur., 2003). Osim toga, cijepanjem GPI sidra nastaje topivi oblik uPAR-a (suPAR) koji je normalno prisutan u vrlo niskim razinama u krvi. Međutim, primijećena je povišena koncentracija suPAR-a kod tumora (Mahmood i sur., 2018). uPAR može jednakim afinitetom vezati pro-uPA kao i dvolančanu aktivnu uPA. uPAR ima razne uloge u stanici, počevši od usmjeravanja uPA na površinu stanice za proteolitičku aktivaciju, sudjelovanja u progresiji tumora, staničnoj adheziji, staničnoj signalizaciji i proliferaciji, regulaciji ekspresije gena i migraciji (Jaiswal i sur., 2018; Mazar i sur., 2011). Postoje dvije kategorije tumora koji ekspimiraju uPAR; prva se sastoji od stanica u kojima je uPAR ekspimiran samo u stanicama pridruženim tumoru, dok u drugoj kategoriji i tumorske stanice kao i stanice pridružene tumoru ekspimiraju uPAR. uPAR je obično ekspimiran na rubovima migrirajućih i invazivnih nakupina stanica kako bi se ograničilo područje proteolitičke aktivnosti i osigurala usmjerenost (Jaiswal i sur., 2018).

### 1.1.3. Urokinazni inhibitori: PAI-1 i PAI-2

Inhibitori serinskih proteaza pripadaju superporodici serpina. Serpini općenito imaju dobro očuvanu sekundarnu strukturu koja se sastoji od tri  $\beta$ -ploče (A, B i C) i devet  $\alpha$ -spirala. Osim toga, serpini sadrže izloženu petlju reaktivnog centra (RCL) koja je fleksibilna i služi kao mamac za ciljne proteaze (Slika 2.) (Maas i de Maat, 2021).

Inhibitor plazminogenog aktivatora 1 (PAI-1) jednolančani je glikoprotein molekulske težine 50 kDa koji se sastoji od 379 aminokiselina te ima visok afinitet za uPA i tPA. PAI-1 se sintetizira uglavnom u jetri, adipocitima i endotelnim stanicama, izlučuje se u aktivnom obliku, ali se brzo pretvara u neaktivni latentni oblik koji se pak može reaktivirati izlaganjem kaotropnim agensima ili fosfolipidima. Ova latencija nije prisutna kod drugih serpina, a sam mehanizam i dalje je nerazjašnjen. U odnosu na druge serpine, pokazano je da PAI-1 ima kratak poluživot od 1-2 h pri 37°C i smatra se relativno nestabilnim. PAI-1 u plazmi i ECM-u često se može naći povezan s vitronektinom koji povećava njegovu stabilnost 2-3 puta, međutim kompleks se i dalje smatra nepovoljnim za terapijske svrhe. Ciljane mutacije na molekuli PAI-1 imaju mogućnost povećati stabilnost inhibitora, ali i produžiti poluživot sve do 700 h, ovisno o broju mutacija (Maas i de Maat, 2021; Vassalli i sur., 1991).



**Slika 2.** Struktura serpina. Tri  $\beta$ -ploče označene su zelenom bojom, a petlja reaktivnog centra (RCL) crvenom bojom (Preuzeto i prilagođeno prema Maas i de Maat, 2021)

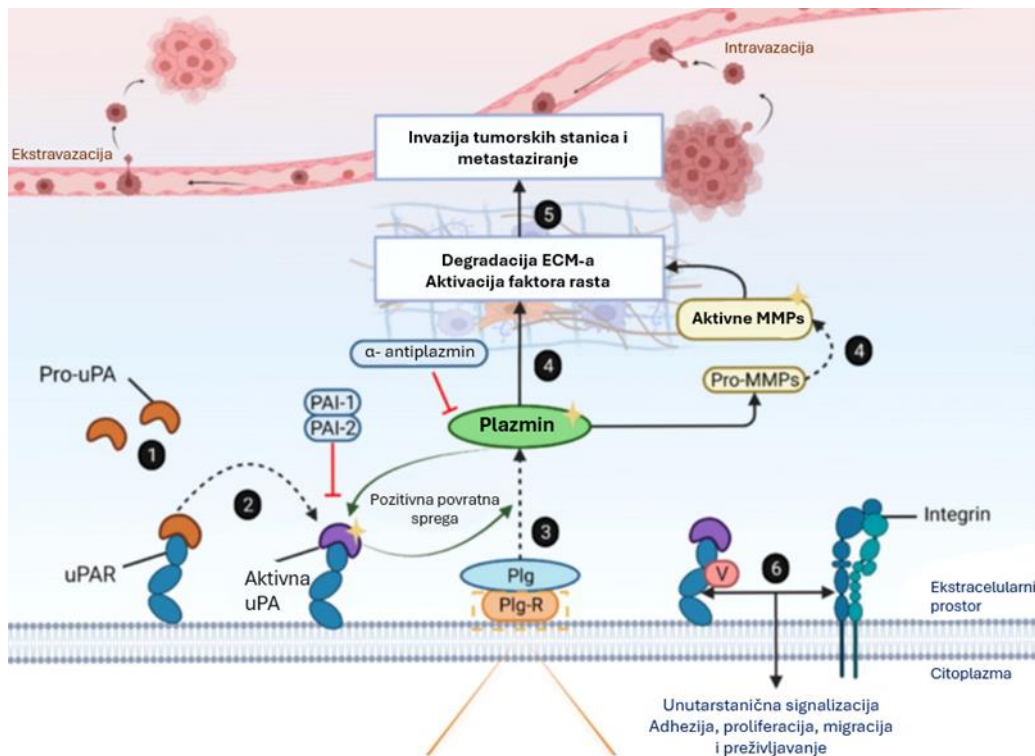
U svrhu inhibiranja tPA i uPA, PAI-1 na svojoj površini izlaže fleksibilnu petlju reaktivnog centra koja sadrži aktivno mjesto Arg346-Met347 za vezanje ciljne serinske proteaze. Aminokiseline aktivnog mjesta označavaju se kao dijelovi RCL-a P1-P1'. Prema tome, aminokiseline koje se nalaze N-terminalno od ovog mjesta nazivaju se ostaci P, P16-P1, dok su C-terminalni ostaci ostaci P', P1'-P13'. Snaga veze između ostataka P1 i ciljne proteaze određuje inhibicijsku aktivnost proteina. PAI-1 inhibira PA formiranjem kovalentnog kompleksa, čime

blokira daljnju interakciju PA s njegovim supstratom (Sillen i sur., 2021). Mehanizam inhibicije započinje uspostavljenjem reverzibilnog nekovalentnog Michaelisovog kompleksa koji nastaje prilikom početne interakcije sa supstratom. Kada je RCL vezan sa supstratom npr. urokinazom, veza P1-P1' RCL-a napada serinski ostatak u aktivnom mjestu urokinaze kako bi nastao kovalentni acilni međuprodukt. U idućem koraku inhibicijske reakcije dolazi do velike konformacijske promjene prilikom koje se N-terminalni dio RCL-a umeće u  $\beta$ -ploču A, a rezultat ove promjene ujedno je translokacija vezane urokinaze na suprotnu stranu PAI-1 molekule. U konačnoj fazi reakcije narušena je katalitička trijada urokinaze, a enzim ostaje ireverzibilno zarobljen u kompleksu s PAI-1 (Lee i Huang., 2005; Sillen i sur., 2021).

PAI-2 također ima sposobnost inhibirati uPA i tPA, iako manje učinkovito s obzirom da brzina inhibicije nije povoljna kao što je slučaj kod PAI-1. Zanimljivo je da se samo mali dio PAI-2 izlučuje, dok je PAI-1 isključivo sekretorni protein (Marín-García i sur., 2007). PAI-2 može se naći u citosolu stanica koje ga sintetiziraju te mu se razina u krvi značajno povisuje tijekom trudnoće, što upućuje kako bi PAI-2 mogao kontrolirati aktivnost drugih, još neidentificiranih enzima. Osim što sudjeluje u inhibiciji PA, PAI-2 uključen je u nekoliko intracelularnih funkcija: može utjecati na ekspresiju gena, modulirati stopu proliferacije i diferencijacije stanica te inhibirati apoptozu neovisno o inhibiciji urokinaze (Medcalf i Stasinopoulos, 2005; Vassalli i sur., 1991).

#### **1.1.4. Fiziološka uloga sustava uPA-uPAR**

Kao što je ranije spomenuto, sustav PA ima važnu ulogu u aktiviranju plazmina proteolitičkim cijepanjem neaktivne forme plazminogena. Nakon aktivacije, plazmin uzrokuje razgradnju fibrina, nekoliko faktora zgrušavanja krvi i izvanstaničnog matriksa (ECM) (Slika 3.). Time sustav PA djeluje kao homeostatski mehanizam u normalnom fiziološkom zacijeljivanju rana (Mahmood i sur., 2018). Osim toga, komponente sustava uPA-uPAR sudjeluju u proteolitičkoj aktivaciji brojnih čimbenika rasta (faktora rasta fibroblasta (FGF), transformirajućeg faktora rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ )) i citokina (npr. interleukina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ )) koji su uključeni u mijelopoezu (Mahmood i sur., 2018).



**Slika 3.** uPA receptor na površini stanice (uPAR) (1) aktivira pro-uPA u aktivni uPA (2). Plazminogen (Plg) se veže na svoj receptor (Plg-R) i biva pocijepan od strane uPA kako bi nastao aktivni plazmin (3). Plazmin zauzvrat aktivira pozitivnu povratnu spregu stvarajući više uPA i plazmina. Proteolitičke aktivnosti uPA i plazmina mogu inhibirati urokinazni inhibitori PAI-1, PAI-2 i  $\alpha$ -antiplazmin. Proteolitički učinak plazmina prenosi se izravno na komponente izvanstaničnog matriksa (ECM), te također potiče aktivaciju više nizvodnih proteina povezanih s ECM-om, uključujući latentne čimbenike rasta i metaloproteinaze matriksa (MMPs), kako bi razgradio ECM (4). Razgrađeni matriks stvara put za migraciju tumorskih stanica u okolno tkivo, te tako osim migracije olakšava i invaziju stanica, angiogenezu i metastaziranje (5). uPAR se može vezati s vitronektinom (V) i stupiti u interakciju s drugim koreceptorima, kao što su integrini, kako bi aktivirao unutarstaničnu signalizaciju koja potiče proliferaciju tumorskih stanica, adheziju, migraciju, invaziju, epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) i preživljavanje (6) (Preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., 2022).

Pokazano je da su komponente sustava uPA prisutne u raznim tipovima hematopoetskih stanica. Razine komponenti mijenjaju se tijekom infekcija, što sugerira na ulogu sustava uPA-uPAR u različitim tipovima imunološkog odgovora (Mahmood i sur., 2018). Kao odgovor na bakterijsku infekciju oslobađaju se proinflammatorni citokini poput faktora nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ), koji povećavaju ekspresiju i sekreciju uPA od strane različitih tipova stanica. Također, lokalno oslobađanje uPA može aktivirati neutrofile, pripremiti

ih na proizvodnju superoksida i potaknuti njihovu migraciju. uPAR također ima ulogu u prirodnom imunološkom odgovoru kroz regulaciju stanične adhezije i migracije (Abraham i sur., 2003; Mondino i Blasi, 2004).

Sustav PA također je uključen u adaptivni imunitet. Ekspresija uPA i njegovog receptora uPAR povećava se tijekom aktivacije T-limfocita u usporedbi s njihovim razinama u mirovanju ili naivnim T-limfocitima (Mahmood i sur., 2018). Osim toga, sustav uPA-uPAR uključen je u funkciju muškog reproduktivnog sustava gdje može povećati pokretljivost spermija, stimulirati akrosomsku reakciju i poticati oplodnju. Zbog ovih se učinaka vjeruje da bi ciljanje uPA mogla biti nova strategija za mušku kontracepciju (Qin i sur., 2015).

#### **1.1.5. Funkcija sustava uPA-uPAR u progresiji tumora**

Razine uPAR-a povišene su tijekom upalnih procesa i preoblikovanja tkiva, ali i kod brojnih vrsta humanih karcinoma, uključujući tumor prostate, mokraćnog mjehura, debelog crijeva, dojke, melanom, tumor mozga, pluća, jetre kao i tumor glave i vrata, te vrata maternice i gušterače. Sustav uPA-uPAR ima važnu ulogu u proliferaciji tumorskih stanica, staničnoj adheziji, metastaziranju, tumorskom mikrokruženju i angiogenezi (Lv i sur., 2021).

Budući da uPAR nema transmembransku niti unutarstaničnu domenu, povezuje se s transmembranskim receptorima i kompleksima kako bi pokrenuo nizvodno signaliziranje i potaknuo proliferaciju tumorskih stanica (Smith i Marshall, 2010). Nastanak kompleksa uPA-uPAR- $\alpha 5\beta 1$  integrin jedan je od načina koji može potaknuti proliferaciju tumorskih stanica, kroz poticanje nizvodnih signalnih putova (Eden i sur., 2018). Pokazalo se i da komponente sustava uPA mogu povećati proliferaciju stanica kroz proteolitičku aktivaciju različitih tipova faktora rasta kao što su vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), epidermalni faktor rasta (EGF), faktor rasta fibroblasta-2 (FGF-2) i transformirajući faktor rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Lv i sur., 2021). S druge strane, put Notch je visoko konzerviran stanični signalni put čijim utišavanjem može doći do inhibicije ekspresije uPA i njegovog receptora uPAR pa tako i do inhibicije proliferacije tumorskih stanica (Bazzoni i Bentiverga, 2019). Studije su također pokazale kako utišavanje uPAR-a inhibira ekspresiju pojedinih metaloproteinaza (MMP) (MMP2, MMP9) i signalni put MAPK/ERK te tako može smanjiti staničnu proliferaciju (Lv i sur., 2021).

Sustav uPA-uPAR također regulira staničnu adheziju poticanjem proteolize izvanstaničnog matriksa (ECM-a) i prijenosom unutarstaničnih signala. Sustav uPA-uPAR povezuje se direktno s vitronektinom i formira komplekse s integrinima kako bi regulirao adheziju pa je tako



pokazano da prekomjerna ekspresija uPAR-a može povećati ekspresiju MMP-a i pojačati staničnu adheziju kod stanica tumora dojke (Lv i sur., 2021).

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) biološki je proces u kojem polarizirane epitelne stanice postaju invazivne mezenhimske stanice. Ove stanice dobivaju veće migracijske sposobnosti te povećanu otpornost na apoptozu (Son i Moon, 2010). Povišena ekspresija uPAR-a u uvjetima hipoksije aktivira signalne puteve Akt i Rac1, što potiče EMT i invaziju stanica. Pokazano je kako inhibicija ekspresije uPAR-a može potisnuti EMT induciran hipoksijom, što ukazuje na ulogu uPAR-a u ovom procesu. Osim toga, uPAR je široko eksprimiran na površini endotelnih stanica, fibroblasta i raznih malignih stanica te na taj način dodatno doprinosi migraciji tumorskih stanica i metastaziranju (Lester i sur., 2007).

U tumorskom mikrokruženju, angiogeneza je vrlo značajan proces kojim je omogućena opskrba tumora kisikom i hranjivim tvarima, potičući tako rast, invaziju i metastaziranje (Li Santi i sur., 2021). Degradacija ECM-a posredovana s uPA ključna je za početak angiogeneze. uPA inducira oslobađanje proangiogenih čimbenika rasta kao što su VEGF i FGF-2, koji su važni za proliferaciju endotelnih stanica (Kaur i Roy, 2024). U endotelnim stanicama uPAR može smanjiti ekspresiju homologa fosfataze i tenzina (PTEN-a), važnog regulatora angiogeneze, kako bi aktivirao signalni put PI3K/Akt i time potaknuo angiogenezu. Također u endotelnim stanicama, uPAR može stupiti u interakciju s VEGFR2 te tako utjecati na signalizaciju putem VEGF i potaknuti angiogenezu. S druge strane, prekomjerna ekspresija matriks metaloproteinaze-12 (MMP-12) može inhibirati angiogenezu cijepanjem endotelnih uPAR-a (Lv i sur., 2021).

#### **1.1.6. Regulacija ekspresije urokinaze**

Sustav plazminogenog aktivatora pokazao se ključnim u regulaciji pokretljivosti, invazije i metastaze tumorskih stanica. Iako komponente sustava uPA-uPAR mogu proizvoditi i normalne i tumorske stanice, zabilježeno je povećanje ekspresije komponenti sustava kod pacijenata s invazivnim tumorima (Moreau i sur., 2011). Ekspresija gena humanog sustava uPA-uPAR pod kontrolom je brojnih izvanstaničnih i unutarstaničnih medijatora te je kontrolirana na nekoliko načina uključujući gensku ekspresiju, posttranskripcijsku regulaciju, proteolitičku aktivnost te endocitozu posredovanu receptorom (Montuori i sur., 2002).

Geni sustava uPA-uPAR mogu biti regulirani na transkripcijskoj razini djelovanjem faktora rasta (epidermalni faktor rasta: EGF; trombocitni faktor rasta: PDGF; faktor rasta hepatocita: HGF; vaskularni endotelni faktor rasta: VEGF), hormona (estrogeni i androgeni) i citokina

(transformirajući faktor rasta: TGF- $\beta$ ; faktor nekroze tumora: TNF- $\alpha$ ; interleukin-1: IL-1; interleukin-6: IL-6) (Santibanez, 2013). Faktori rasta obično djeluju putem receptorske tirozin-kinaze (RTK) koja može aktivirati nizvodne signalne puteve kao što su signalni put MAPK/ERK, PI3K/Akt, Wnt i NF- $\kappa$ B koji mogu pojačati ekspresiju gena za uPA i uPAR (Santibanez, 2013). TGF- $\beta$  također može regulirati sustav plazminogenog aktivatora kroz više mehanizama. Vezanjem TGF- $\beta$  za svoj receptor mogu se aktivirati unutarstanični regulatorni proteini SMAD (engl. *suppressor of mothers against decapentaplegic*) koji potom translociraju u jezgru i mogu se vezati za promotore uPA i uPAR gena te na taj način pojačati njihovu ekspresiju (Derynck i Zhang, 2003; Santibanez, 2013). TGF- $\beta$  također može regulirati aktivnost sustava uPA-uPAR pomoću PAI-1. Zanimljivo je što TGF- $\beta$  istovremeno potiče aktivnost uPA, što podržava degradaciju ECM i staničnu invaziju, dok s druge strane povećava ekspresiju PAI-1 kako bi ograničio i regulirao urokinaznu aktivnost (Santibanez, 2013). Utvrđeno je kako je sustav uPA-uPAR uključen u aktivaciju TGF- $\beta$  u staničnoj liniji tumora dojke MDA-MB-468 (Hu i sur., 2014). Naime, TGF- $\beta$  se izlučuje u neaktivnom multiproteinskom kompleksu, te mora biti aktiviran kako bi izvršavao svoje funkcije (Annes i sur., 2003). Jedan od ključnih enzima koji aktivira latentni TGF- $\beta$  je plazmin, nastao pod utjecajem uPA. Aktivirani TGF- $\beta$  zatim povećava ekspresiju uPA, koji zauzvrat potiče daljnju aktivaciju latentnog TGF- $\beta$  putem plazmina. Postojanje ovakvog pozitivnog povratnog mehanizma, pokazano je, doprinosi povećanju malignosti tumorskih stanica (Santibanez i sur., 2018).

Posttranskripcijska regulacija uPA uglavnom se odnosi na stabilizaciju ili destabilizaciju mRNA uPA. Na ovaj proces mogu utjecati različiti signali uključujući faktore rasta i upalne citokine, koji aktiviraju specifične signalne puteve kao što su MAPK/ERK i NF- $\kappa$ B. Ovi putevi mogu dovesti do promjena u vezanju regulatornih proteina na uPA mRNA, čime se stabilizira ili ubrzava razgradnja mRNA (Shetty i sur., 2012). Ključnu ulogu u ovom procesu ima specifičan protein ribonukleotid reduktaza M2 (RRM2), koji destabilizira mRNA uPA kada je previše eksprimiran, dok upotreba lipopolisaharida (LPS-a) translocira RRM2 iz citoplazme u jezgru, što rezultira stabilizacijom mRNA uPA i povećanjem ekspresije urokinaze. Također je uočeno da povećana sinteza uPA, kao rezultat posttranskripcijske stabilizacije mRNA uPA u tumorskim stanicama, doprinosi povećanom proliferativnom i invazivnom potencijalu tumorskih stanica (Shetty i sur., 2012).

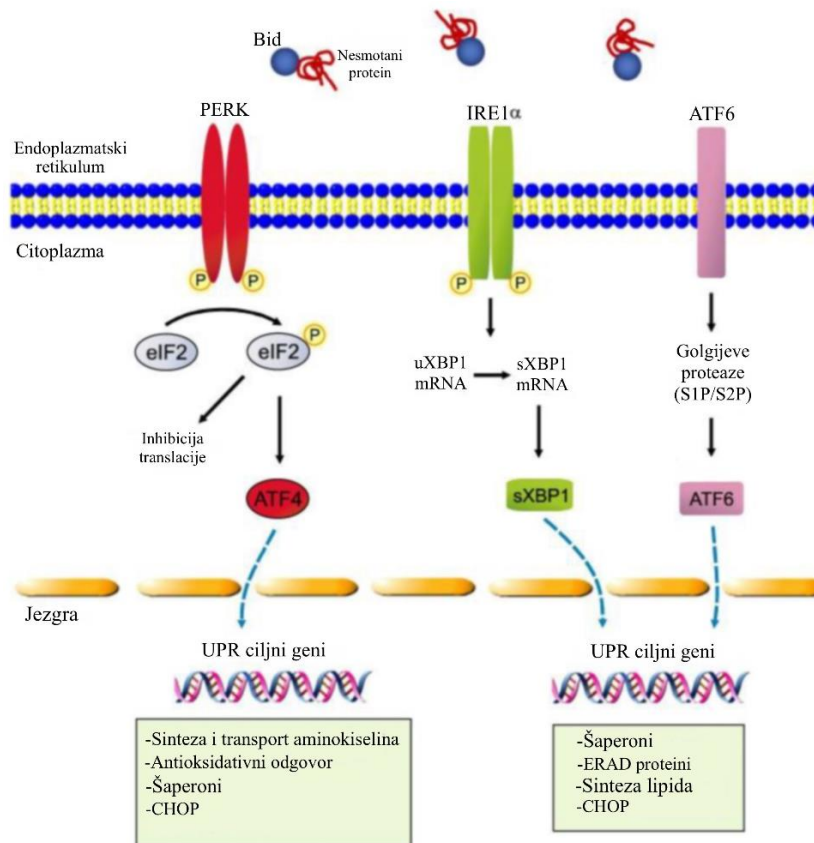
Još jedan od načina regulacije aktivnosti uPA na površini stanice je endocitoza. Endocitoza je stanični proces pomoću kojeg stanice, koristeći vezikularne odjeljke, mogu internalizirati

površinske proteine zajedno s izvanstaničnim materijalnom i staničnom membranom (Maxfield i McGraw, 2004). Kompleks uPA-PAI-uPAR internaliziran je endocitozom ovisnom o klatrinu. U ovome procesu važnu ulogu ima molekula LRP1 (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*) poznata i kao CD91, koja djeluje kao koreceptor i tako olakšava endocitozu. LRP se veže na uPA-PAI-uPAR kompleks te pojačava internalizaciju, što dovodi do razgradnje uPA i PAI (Czekay i sur., 2001). uPAR, osim što se može razgraditi može se i reciklirati natrag na površinu stanice, gdje ponovno može vezati novu uPA i sudjelovati u degradaciji ECM-a. Internalizacijom i razgradnjom kompleksa uPA-PAI-uPAR, stanice mogu ograničiti trajanje i stopu proteolitičke aktivnosti na površini stanice, te na taj način spriječiti prekomjernu razgradnju ECM-a i kontrolirati staničnu migraciju i invaziju (Santibanez, 2013).

## 1.2. Stres endoplazmatskog retikuluma

Endoplazmatski retikulum (ER) igra ključnu ulogu u održavanju kvalitete proteina i homeostaze ER-a. Homeostaza ER može biti narušena uslijed hipoksije, oksidativnog stresa, nedostatka energije, genetskih ili okolišnih oštećenja, upale te povećane sinteze proteina kao i neispravno smotanih proteina (Chen i sur., 2023). Svi ovi čimbenici dovode do stanja poznatijeg kao stres endoplazmatskog retikuluma. Sustav "kontrole kvalitete" proteina uključuje degradaciju povezanu s ER-om (engl. *ER-associated protein degradation*, ERAD), sintezu proteina šaperona i autofagiju pomoću kojih precizno koordinira stope sinteze, smatanja i transporta proteina kako bi se osiguralo optimalno funkcioniranje ER-a (Chen i sur., 2023; Smith i sur., 2011). Homeostaza ER je ključna za preživljavanje stanica, a neravnoteža može rezultirati bolestima poput metaboličkih, neurodegenerativnih, onkoloških i kardiovaskularnih poremećaja. U slučaju produljenog stresa ER-a, kada se počnu nakupljati nepravilno smotani proteini, dolazi do aktivacije odgovora na nesmotane proteine (engl. *unfolded protein response*, UPR). Djelovanje UPR-a uključuje inhibiciju sinteze proteina, povećanje transkripcije šaperona te indukciju apoptoze ukoliko homeostaza ne može biti ponovno uspostavljena (Kadowaki i Nishitoh, 2013; Wand i Kaufman, 2012).

U eukariotskim stanicama UPR mogu pokrenuti i regulirati tri tipa senzora ER-a (Slika 4.): IRE1 (engl. *inositol requiring enzyme 1*), PERK (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*) i ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Kadowaki i Nishitoh, 2013).



**Slika 4.** Tijekom stresa endoplazmatskog retikuluma može doći do aktivacije senzornih molekula IRE1 $\alpha$ , ATF6 i PERK. Aktivirani PERK fosforilira  $\alpha$  podjedinicu eukariotskog translacijskog inicijacijskog faktora 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). Fosforilirani eIF2 $\alpha$  inhibira sintezu proteina i aktivira transkripciju ATF4 (engl. *activating transcription factor-4*) inducirajući tako transkripciju nizvodnih gena. IRE1 svojom RNaznom aktivnošću modificira mRNA za skraćeni XBP1 protein (XBP1s) koji potiče transkripciju ciljnih gena ponajviše uključenih u pravilno smatanje i degradaciju proteina. ATF6 translocira se iz ER-a u Golgijev aparat, gdje se aktivira djelovanjem dvaju proteaza. Transkripcijski aktivni ATF6f potom se premješta u jezgru i djeluje kao transkripcijski faktor (Preuzeto i prilagođeno prema Yadav i sur., 2014).

IRE1 je tip I transmembranskog proteina ER-a sa serin/treonin kinaznom i endoribonukleaznom (RNaza) aktivnošću u svojoj citosolnoj domeni i konzerviran je od kvasaca do ljudi. Sisavci imaju dva homologa IRE1: IRE1 $\alpha$  i IRE1 $\beta$ . IRE1 $\alpha$  eksprimira se u svim stanicama i tkivima, dok se IRE1 $\beta$  specifično izražava u stanicama crijevnog epitela. Signalizacija UPR-a uglavnom je posredovana preko IRE1 $\alpha$ , dok je funkcija IRE1 $\beta$  u UPR-u još uvijek nerazjašnjena (Siwecka i sur., 2021). Aktivacija IRE1 pokreće se disocijacijom šaperona u ER, BiP-a (engl. *immunoglobulin-binding protein*) od luminalne domene IRE1. Nepravilno smotani proteini koji se akumuliraju u ER-u vežu se za oslobođenu luminalnu

domenu IRE1 $\alpha$ , što dovodi do oligomerizacije, autofosforilacije kinazne domene, te konačno, aktivacije endoribonukleazne domene IRE1 $\alpha$  kao odgovor na konformacijske promjene. Aktivirani IRE1 $\alpha$  izrezuje fragment od 26 baza iz mRNA koja kodira za XBP1 (engl. *X-box binding protein-1*). mRNA za XBPs (skraćeni XBP) prepisuje se u transkripcijski faktor koji potiče transkripciju gena za proteine uključene u biogenezu membrane ER-a, šaperone, ERAD i sekreciju proteina iz stanice (Kadowaki i Nishitoh, 2013; Ron i Walter, 2007; Wand i Kaufman, 2012).

PERK je također tip I transmembranskog proteina ER sa serin/treonin kinaznom aktivnošću na C-terminalnoj citosolnoj domeni, dok akumulirane nepravilno smotane proteine prepoznaje pomoću N-terminalne luminalne domene za dimerizaciju. Ovakva građa PERK čini srodnim IRE1 $\alpha$  (Wang i sur., 2018). Aktivacija PERK-a pokreće se disocijacijom BiP-a od luminalne domene PERK-a, nakon čega slijedi oligomerizacija i autofosforilacija PERK-a. Neposredni učinak aktivacije PERK-a je fosforilacija  $\alpha$  podjedinice eukariotskog translacijskog inicijacijskog faktora 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) na Ser51, što smanjuje globalnu sintezu proteina kako bi se smanjila količina proteina u lumenu ER-a (Bell i sur., 2016). S druge strane, fosforilacija eIF2 $\alpha$  inducira specifičnu translaciju ATF4 (engl. *activating transcription factor-4*) promjenom okvira čitanja unutar njegove mRNA (Wek, 2018). ATF4 tijekom dugotrajnog stresa ER, djeluje kao transkripcijski faktor za drugi transkripcijski faktor C/EBP-homologi proteina (CHOP), koji potiče apoptozu ovisnu o Bax/Bak. CHOP pojačava ekspresiju oksidoreduktina-1 $\alpha$  (ERO1 $\alpha$ ) u ER i GADD34 (engl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein*) koji aktiviraju signalne puteve što vode do apoptoze stanica, kao važnog mehanizma za održavanje homeostaze putem eliminacije nenormalnih stanica (Rozpędek i sur., 2017). ATF4 također inducira ekspresiju brojnih drugih gena uključenih u funkciju ER-a, kao i inhibicijski povratni mehanizam defosforilacije eIF2 $\alpha$  kako bi se spriječila pretjerana aktivacija UPR-a. Također je pokazano kako PERK može fosforilirati i NRF2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) kako bi inducirao gene za odgovor na oksidacijski stres, uključujući hem oksigenazu 1 i glutation-S-transferazu. Prema tome, PERK-eIF2 $\alpha$  uključen je u očuvanje redoks ravnoteže tijekom stresa ER putem aktivacije ATF4 i NRF2 (Harding i sur., 2003; Kadowaki i Nishitoh, 2013).

ATF6 je transmembranski protein tipa II koji je ujedno i transkripcijski faktor. Kod sisavaca postoje dva gena za ATF6, ATF6 $\alpha$  i ATF6 $\beta$ . ATF6 $\alpha$  i ATF6 $\beta$  proteini su koji su eksprimirani u svim tkivima. ATF6 sintetizira se kao neaktivni prekursor, vezan za membranu ER-a putem transmembranskog segmenta (Kadowaki i Nishitoh, 2013). U uvjetima stresa ER, ATF6 se transportira iz ER-a u Golgijev aparat, gdje ga cijepaju proteaze rezidentne u Golgiju, prvo

serinskom proteazom S1P, a zatim u intramembranskoj regiji i metaloproteinazom S2P, Takvo cijepanje dovodi do oslobađanja transkripcijski aktivnog oblika - ATF6f, koji se potom se premješta u jezgru i veže na DNA, te potiče ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na stres ER, poput šaperona ER i XBP1 (Ron i Walter, 2007; Yao i sur., 2024).

### **1.2.1. Odgovor na nesmotane proteine u tumorima**

U tumorskom mikrokruženju prisutna su stanja hipoksije i hipoglikemije koja dovode do induciranja stresa ER-a (Onozuka i sur., 2011). Dobro je poznato da su putovi UPR aktivirani tijekom rasta tumorskih stanica. UPR se u eukariotskim stanicama sastoji od tri različita mehanizma: (1) smanjenje translacije proteina, (2) transkripcijska aktivacija gena koji kodiraju faktore uključene u smatanje proteina i njihovu razgradnju u ER-u i (3) ERAD (razgradnja ovisna o ER-u), koji služi za obnavljanje kapaciteta za smatanje proteina tako što uklanja nakupljene nepravilno smotane proteine putem sustava ubikvitin-proteasom (Kadowaki i Nishitoh, 2013). BiP je induciran u brojnim tumorima te doprinosi proliferaciji i preživljavanju tumorskih stanica. Pokazano je kako inhibicija ekspresije BiP-a inhibira rast, progresiju i metastaziranje tumorskih stanica u modelima *in vitro* i *in vivo*, dok se pojačana ekspresija BiP-a pokazala povezanom s rezistencijom na kemoterapiju te je uočena u agresivnijim oblicima tumora (Jamora i sur., 1996; Mozos i sur., 2011). Osim toga, put PERK također igra važnu ulogu u preživljavanju tumorskih stanica. Inaktivacija puta PERK, bilo mutacijama u kinaznoj domeni PERK-a ili mutacijom Eif2- $\alpha$  na mjestu fosforilacije, narušava preživljavanje u hipoksičnim uvjetima (Kadowaki i Nishitoh, 2013). PERK putem molekule ATF4 može utjecati na smanjenje oksidativnih oštećenja u molekuli DNA i tako dodatno potaknuti rast tumorskih stanica. U modelu glioma kod glodavaca, inhibicija puta IRE1 sprječava rast tumorskih stanica i angiogenezu (Auf i sur., 2010). Isto tako, utišavanje transkripcije XBP1 povećalo je osjetljivost na staničnu smrt induciranu hipoksijom i smanjilo je rast tumora. Uzevši u obzir važnost puta UPR u progresiji tumora i njegove proapoptotske učinke, upravo bi UPR mogao poslužiti kao buduća potencijalna meta u liječenju tumora (Wang i Kaufman, 2012).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glioblastom jedan je od najagresivnijih tipova moždanih tumora s izrazito lošom prognozom (Holland, 2000), dok je tumor dojke jedan od najčešćih i smrtonosnijih oblika tumora žena (Wilkinson i Gathani, 2022). S obzirom na česte nedovoljno učinkovite terapijske opcije nužno je dalje istražiti molekularne mehanizme koji bi mogli poslužiti kao potencijalne mete za terapiju. Jedan od takvih mehanizama je stres endoplazmatskog retikuluma koji zajedno sa sustavom plazminogenog aktivatora može utjecati na različite stanične procese, uključujući sintezu proteina, staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju.

Prema tome, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- 1) Ispitati može li stres ER inducirati promjene u aktivnosti urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA) u staničnim linijama glioblastoma A1235 i tumora dojke MDA-MB-231.
- 2) U slučaju modulacije urokinaznog sustava pod utjecajem stresa ER-a, cilj je bio je ispitati osnovu promjene urokinazne aktivnosti analizom ekspresije na razini proteina pojedinih komponenti sustava PA- uPA i PAI1, te molekula odgovora na stres ER - BiP.
- 3) Ispitati utjecaj stresa ER-a na staničnu proliferaciju, invaziju i migraciju.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Stanična kultura

##### 3.1.1. Stanične linije

U ovom istraživanju koristila sam dvije stanične linije: humane glioblastoma stanice A1235 dobivene iz laboratorija dr. S. A. Aaronsona (Giard i sur., 1973) i stanice karcinoma dojke MDA-MB-231 komercijalno dostupne u zbirci ATCC (engl. *American Type Culture Collection*, SAD). Stanice su kultivirane u Dulbeccovom modificiranom Eaglovom mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM; Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich, SAD), na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2. Uzgoj stanica u kulturi

Stanične linije A1235 i MDA-MB-231 uzgajane su u različitim formatima Petrijevih zdjelica. Presađivanje stanica uključivalo je nekoliko koraka. Prije tripsinizacije, stanice sam isprala fiziološkom otopinom kako bih uklonila ostatke medija sa serumom koji sadržava inhibitorne komponente koje smanjuju učinkovitost tripsina. Nakon ispiranja, stanice sam inkubirala u 0,25 % otopini tripsina (Sigma-Aldrich, SAD) otprilike 2-5 minuta, ovisno o staničnoj liniji. Tripsin je kao proteolitički enzim razgrađivao proteine koji drže stanice pričvršćenima za podlogu Petrijeve zdjelice. Kada su se stanice potpuno odvojile od površine, tripsin sam neutralizirala dodatkom medija koji sadrži serum, a stanice sam zatim resuspendirala kako bi se osiguralo potpuno razdvajanje. Stanice sam brojala pomoću Bürkerovog hemocitometra u tekućoj suspenziji pod mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL) što je omogućilo precizno određivanje koncentracije stanica na temelju broja stanica u definiranim područjima.

Broj stanica u alikvotu od 1 mL računa se po formuli:

$$\text{Broj stanica/mL} = \frac{\text{Ukupan broj stanica u svim kvadratima}}{\text{Broj komorica koje se broje}} \times \text{Faktor razrjeđenja}$$

Stanice se nakon određivanja koncentracije razrijede medijem prema željenoj koncentraciji za nasađivanje.



### 3.1.3. Obrada stanica

Stanice smo tretirali N-Metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidinom (MNNG) (dar B. Brdara, dr. sc., Institut Ruđer Bošković), natrijevim salicilatom (NaS) (Kemika, Hrvatska), tapsigarginom (Medchemexpress, SAD) i gemcitabinom (Medchemexpress, SAD), te inhibitorom ECGC (epigalokatehin galat; engl. *epigallocatechin gallate*; Medchemexpress, SAD) i GSK2606414 (GSK) inhibitorom PERK-a (Medchemexpress, SAD).

Za pripremu matičnih koncentracija MNNG je otopljen u etanolu, dok je NaS otopljen u vodi. Tapsigargin i gemcitabin pripremljeni su u dimetil-sulfoksidu (DMSO), ECGC u vodi, dok je inhibitor PERK-a otopljen također u DMSO.

### 3.2. Radijalna kazeinoliza

Metoda kazeinolize koristi se za mjerenje proteolitičke aktivnosti enzima urokinaze. Urokinaza iz kondicioniranog staničnog medija aktivira plazminogen, koji zatim kao plazmin razgrađuje kazein u supstratu, stvarajući tako prozirne zone lize u agaroznom gelu. Veličina prozirnih zona lize proporcionalna je proteolitičkoj aktivnosti u ovom slučaju urokinaze u uzorku.

Stanice smo nasađivali u ploče s 12 jažica,  $1 \times 10^5$  stanica po jažici. Sljedeći smo dan stanice tretirali, a nakon 24 sata isprali fiziološkom otopinom te inkubirali u 260  $\mu$ L medija bez seruma 6 sati. Nakon inkubacije sakupila sam kondicionirani medij i pohranila na  $-80$  °C. Stanice sam potom sastrugala plastičnim strugačem u 100  $\mu$ L lizirajućeg pufera (1 % Triton X-100; 10 mM Tris, pH 7,5; 100 mM NaCl), a sakupljene stanične lizate pohranila na  $-80$  °C.

Kako bih odredila enzimatsku aktivnost urokinaze pripremila sam 1 % agarozni gel s dodatkom 2,5 mL fosfatnog pufera PBS-a (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10,14 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4), 2,5 mL 8 % nemasnog mlijeka otopljenog u vodi (Sigma-Aldrich, SAD), 5  $\mu$ L plazminogena (koncentracije 5-7 mg/mL; Sigma-Aldrich, SAD) i 100  $\mu$ L natrijeva azida (Kemika, Hrvatska). U gelu sam metalnom cjevčicom napravila jažice u koje sam dodala po 5  $\mu$ L uzorka u duplikatima. U preostale jažice dodala sam po 5  $\mu$ L serijski razrijeđene komercijalno dostupne uPA (Leo Pharmaceuticals, Danska) u rasponu od 0,1 do 100 mU (mU= jedinica aktivnosti urokinaze). Ploča se potom inkubira do 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, ploču smo skenirali. Ukoliko je u uzorcima medija bila prisutna urokinaza nastaju zone lize čiji sam promjer mjerila u programu *ImageJ*. Serijska razrjeđenja uPA i njihov promjer zone lize koristila sam za izradu baždarne krivulje pomoću koje sam određivala aktivnost urokinaze u svakom pojedinom uzorku (Madunić i sur., 2017).

### 3.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metoda po Bradfordu je kolorimetrijska metoda za mjerenje koncentracije proteina u otopini. Ova se metoda temelji na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (Roth, Njemačka) na proteine. Kada se boja veže za proteinske molekule, dolazi do pomaka u apsorpcijskom maksimumu boje s 465 nm na 595 nm, što rezultira promjenom boje iz smeđe u plavu.

Za izvođenje metode po Bradfordu, prvo sam pripremila seriju poznatih koncentracija proteina, govedeg serumskog albumina (BSA) u rasponu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  - 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , koji su služili za pripremu standardne krivulje. Nakon centrifugiranja uzoraka 15 minuta na 12 000 rpm pri 4 °C, po 1-10  $\mu\text{L}$  staničnog lizata razrijedila sam u vodi do volumena od 100  $\mu\text{L}$ . Razrijeđenim uzorcima sam zatim dodala 900  $\mu\text{L}$  reagensa Bradford (za 100 mL; 0,01 g Coomassie Brilliant Blue G-250; 5 mL 95 % etanol; 10 mL 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; de $\text{H}_2\text{O}$  do 100 mL). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi 5-10 minuta, pomoću spektrofotometra sam mjerila apsorbciju svakog uzorka na 595 nm. Iz dobivenih vrijednosti apsorbcija za BSA napravila sam baždarnu krivulju pomoću koje sam u programu *Microsoft Excel* određivala koncentraciju proteina u pojedinom uzorku (Sambrook i sur., 1989).

### 3.4. Analiza proteina metodom Western blot

Western blot je analitička metoda koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u uzorku tkiva ili stanica.

Za pripremu uzoraka, stanice koje rastu u Petrijevim zdjelicama u kulturi ostrugala sam pomoću plastičnog strugača u 1,5 mL PBS-a te centrifugirala pri 500 g 8 min. Na talog stanica sam zatim dodala 100  $\mu\text{L}$  lizirajućeg pufera (137 mM NaCl; 10 % glicerol; 1 % Triton X-100; 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM EDTA) uz dodatak 5  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  pufera 100 mg/mL PMSF (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) i 1  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  smjese inhibitora proteaza (Inhibitor Cocktail Plus, Carl Roth, SAD). Uzorci su potom inkubirani na ledu 20 min i pohranjeni na -80 °C. Kako bi se uzorci pripremili za elektroforezu prvo smo ih centrifugirali 15 min na 4 °C i 12 000 rpm, a zatim sam im dodala 1/6 volumena 6x pufera za nanošenje uzoraka (225 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) glicerol, 2 mM SDS; 0,02 % (w/v) bromfenol-plavo, 1 %  $\beta$ -merkaptoetanol) te ih inkubirala 5 minuta na 95 °C.

Slijedi razdvajanje proteina SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Natrij dodecil sulfat (SDS) je anionski detergent koji denaturira proteine, odnosno narušava njihovu sekundarnu i tercijarnu strukturu, daje im negativan naboj i time omogućava njihovo

razdvajanje isključivo na temelju njihove molekularne mase. Tijekom SDS-PAGE elektroforeze, proteini migriraju kroz gel od negativne prema pozitivnoj elektrodi s tim da manji proteini migriraju brže, dok veći prolaze sporije.

U poliakrilamidnoj gel elektroforezi koristila sam dva tipa gela: gornji, sabijajući gel i donji, razdvajajući gel. Donji gel ima viši sadržaj akrilamida i viši pH, što omogućava proteinima razdvajanje. Donji gel pripremila sam od 6,24 mL vode, 5,4 mL 30 % akrilamida (Acros, Organics, Belgija), 4 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 160  $\mu$ L 10 % SDS, 160  $\mu$ L 10 % amonijevog persulfata (APS, za polimerizaciju) (Acros Organics, Belgija), te 9,6  $\mu$ L tetrametiletilenediamina (TEMED, katalizator polimerizacije) (Acros Organics, Belgija). Donji gel sam potom izlila između dvije staklene ploče učvršćene držačem, a na vrh gela dodala sam vodu kako bi se izravnala površina gela. Nakon 15-20 min polimerizacije izlila sam vodu, a zatim sam nanijela gornji gel. Gornji gel koristi se za sabijanje proteina u tanke, oštre trake prije nego što uđu u razdvajajući gel. Ovo omogućuje bolju rezoluciju i razdvajanje proteina prema veličini. Gornji gel pripremila sam od 7,4 mL vode, 1,2 mL 30 % akril amida, 1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100  $\mu$ L 10 % SDS, 100  $\mu$ L 10 % APS i 10  $\mu$ L TEMED. Na vrh dolivenog gela stavila sam češljic za formiranje jažica. Nakon polimerizacije 15-20 min stakla sam zajedno s držačem prenijela u kadicu za Western Blot (Biometra, Njemačka) i uronila u pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl; 250 mM glicin; 0,1 % SDS, pH 8,3). U jažice gela dodala sam 10-15  $\mu$ L uzorka. U jednu od jažica nanijela sam 3  $\mu$ L markera PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619 (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji sadrži proteine poznatih molekularnih masa te po završetku elektroforeze pomaže u procjeni molekularnih masa ciljnih proteina. Elektroforeza se odvijala na 120 V dok uzorci nisu prešli u donji gel, a potom sam voltažu povisila na 140 V.

Nakon elektroforeze slijedi prijenos ili transfer proteina na membranu. Gelove sam stavila u pufer za transfer proteina (48 mM Tris-HCl; 39 mM glicin, 20 % metanol, pH 8,3). Membranu PVD (GVS Filter Technology, SAD) izrezala sam kako bi odgovarala veličini gela, a zatim sam ju kratko stavila u metanol kako bi se aktivirala da može učinkovito vezati proteine tijekom prijenosa. Po aktivaciji membrane u puferu za prijenos složila sam tzv. "sendvič" za transfer koji se sastoji od spužvice, 2 filter papira, gela na koji se stavi membrana, pa ponovno 2 filter papira i spužvica. "Sendvič" sam zatim zatvorila u kazetu i stavila u kutiju za transfer. Transfer se odvijao pri 380 mA 120 min.

Nakon transfera membrana se blokira 60 min u 3 % otopini nemasnog mlijeka u prahu u puferu TBST (20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20). Blokiranjem se sprječava nespecifično vezanje antitijela na membranu.

Nakon blokiranja membranu sam isprala u puferu TBST i inkubirala u odgovarajućem primarnom antitijelu preko noći. Korištena antitijela podrijetlom iz kunića su uPA i BiP (uPA, BiP: Cell Signaling Technology, SAD). Osim toga koristila sam i antitijela podrijetlom iz miša,  $\beta$ -aktin (Santa Cruz Biotechnology, SAD) za normalizaciju ukupnog sadržaja proteina, te antitijelo za PAI-1 (PAI-1: Becton Dickson, SAD). Nakon inkubacije u primarnom antitijelu, membranu sam isprala u puferu TBST 3 puta po 10 minuta, a zatim 60 min inkubirala u odgovarajućem sekundarnom antitijelu (Sigma-Aldrich, SAD) porijekla iz kunića i miša. Sekundarna antitijela konjugirana su s peroksidazom iz hrena koja omogućuje vizualizaciju proteina. Nakon inkubacije, membranu sam ponovno isprala u puferu TBST 3 puta po 10 min, a potom detektirala proteine (Sambrook i sur., 1989).

Detekciju specifičnih proteina provela sam metodom kemiluminiscencije koristeći otopine *Clarity Western ECL Blotting Substrate* (BioRad, SAD). Ovaj sustav uključuje dvije komponente: supstancu A koja sadrži luminol, te supstancu B koja sadrži vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Kada sam supstance A i B pomiješala u omjeru 1:1 i nanijela na membranu koja sadrži proteine, vodikov peroksid katalizirao je reakciju luminola u prisutnosti hrenove peroksidaze (HRP) konjugirane sa sekundarnim antitijelom, što je rezultiralo emisijom svjetlosti. Membranu sam inkubirala do 5 minuta, a potom pažljivo postavila u kontakt s fotografskim filmom 20-60 min. Nakon inkubacije, film sam razvila pomoću razvijача (Kodak, SAD) i fiksira (Fotokemika, Hrvatska), a rezultati su se pojavili kao tamne trake na svijetloj pozadini. Sve sam radila u tamnoj komori, kako bi se izbjeglo izlaganje svjetlu koje može utjecati na kvalitetu detekcije.

### **3.5. Testovi migracije stanica**

#### **3.5.1. Test "zarastanja"**

Test migracije, poznat i kao *wound healing assay* ili *scratch assay*, laboratorijska je tehnika koja se koristi za istraživanje migracije stanica *in vitro*. Ovaj test je koristan za razumijevanje različitih procesa poput zacjeljivanja rana, metastaziranja tumora i regeneracije tkiva.

Stanice smo nasadili u pločice s 12 jažica i uzgajali dok ne dostignu konfluentnost. Nakon postizanja konfluencije, u svakoj jažici sam napravila tri paralelne ogrebotine u staničnom sloju pomoću sterilnog nastavka za mikropipete volumena 10-100  $\mu$ l. Nakon što je napravljena

ogrebotina, stanicama sam promijenila medij te ih tretirala različitim agensima. Ogrebotine sam potom mikrofotografirala pomoću mikroskopa (Zeiss Axiovert 40 CFL) kako bi se zabilježilo početno stanje. Ploče sam zatim vratila u inkubator kroz 16-24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, ogrebotine sam ponovno mikrofotografirala na istim mjestima kako bi se procijenila sposobnost zarastanja stanica u kontrolnim i tretiranim uvjetima. Slike sam obradila u programu *ImageJ*, koji omogućava preciznu kvantifikaciju promjena u površini ogrebotine (Horvat i sur., 2019).

### 3.5.2. Test invazije u komoricama

Test invazije izvodi se korištenjem Boydenovih komorica s porama veličine 8  $\mu\text{m}$  (*Transwell chamber*; Brand, Njemačka). Na membrane komorica dodaje se tvar koja oponaša izvanstanični matriks (Maxgel, Sigma-Aldrich, SAD) razrijeđen do 100 puta u hladnom mediju bez seruma. Slijedi inkubacija 4 sata pri 37 °C prilikom koje dolazi do polimerizacije. Nakon polimerizacije ukloni se višak tekućine, a membrane se ostave sušiti. U komorice se zatim dodaju stanice razrijeđene u mediju bez seruma do koncentracije  $2 \times 10^5$  stanica po mL. U ploču s 24 jažice u kojima se nalaze komorice doda se 100  $\mu\text{l}$  medija bez seruma i 200  $\mu\text{l}$  stanične suspenzije. U bunariće se doda medij sa serumom tako da su komorice donjim dijelom uronjene u medij. Ovakvo postavljanje omogućava stanicama da migriraju prema mediju sa serumom. Kako bi pratili utjecaj različitih agenasa, oni se u istoj koncentraciji dodaju u medij sa stanicama i medij sa serumom u koji su uronjene komorice, dok netretirane stanice služe kao kontrola. Nakon inkubacije od 16-24 sata komorice se ispiru dva puta s PBS-om kako bi se uklonile stanice iz gornjeg odjeljka. Nakon ispiranja komorice se fiksiraju u 4 % formaldehidu (T.T.T., Hrvatska) 2 minute. Slijedi permeabilizacija hladnim metanolom kroz 20 minuta, nakon čega se ponovno ispiru u PBS-u. Stanice se zatim bojaju inkubiranjem kroz 15 minuta u 0,2 % otopini kristal ljubičaste boje (Fluka, Švicarska) otopljene u 2 % etanolu. Nakon bojanja gornja se površina membrane obriše vatenim štapićem. Obojene i osušene komorice mikrofotografirala sam pod lupom (Zeiss Stemi 2000c). Stanice sam brojala pomoću programa *ImageJ*, a podatke obradila u programu *Excel*.

Ovaj test omogućava analizu sposobnosti stanica da migriraju kroz izvanstanični matriks. Test time pruža uvid u razumijevanje interakcije stanica s okolišem i kako različiti tretmani mogu modulirati migracijske i invazivne sposobnosti (Justus i sur., 2023).

### **3.6. Test proliferacije stanica**

Test proliferacije stanica metoda je koja omogućava istraživanje utjecaja različitih tretmana na brzinu rasta stanica. Ova je metoda posebno korisna za proučavanje učinaka lijekova, kemijskih spojeva ili genetskih modifikacija na sposobnost stanica da se dijele i rastu.

Test proliferacije proveden je kako bi se istražili učinci taspigargina na rast stanica. Stanice smo nasadili na ploču s 48 jažica,  $1 \times 10^4$  stanica po jažici. Nakon 24 sata stanice sam tretirala taspigarginom u različitim koncentracijama. Nakon sljedećih 24 i 48 sati stanice sam brojala. Stanice sam prije brojanja ispirala fiziološkom otopinom kako bi se uklonile nepotrebne supstance i mrtve stanice. Nakon ispiranja, stanice sam tripsinizirala kako bi se odvojile od stanične podloge i stvorile homogenu suspenziju. Nakon tripsinizacije stanice sam resuspendirala u određenom volumenu medija i prebrojala pomoću Bürkerovog hemocitometra. Uzorke sam brojala u triplikatima. Rezultati ovog testa omogućili su usporedbu rasta stanica između kontrolnih i tretiranih stanica, što pruža uvid u utjecaj tretmana na proliferaciju stanica.

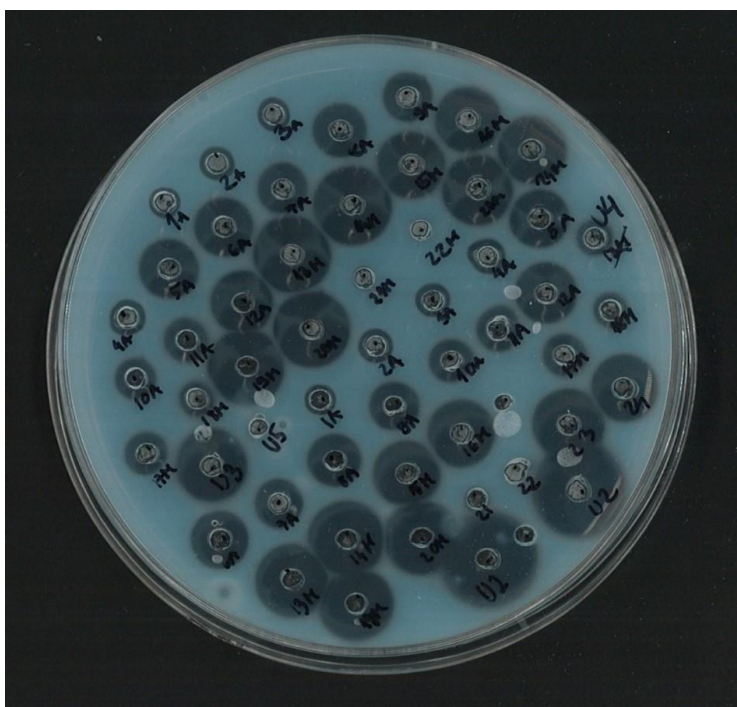
### **3.7. Statistička obrada podataka**

Podatke dobivene različitim eksperimentima obradila sam pomoću paketa *Microsoft Office* i programa *ImageJ*, kao aritmetičke sredine vrijednosti duplikata ili triplikata, a izraženi su kao postotak u odnosu na kontrolnu skupinu. Odstupanja od kontrole prikazana su kao standardna devijacija. Statističku značajnost razlike između kontrolnih i tretiranih uzoraka ispitala sam primjenom Studentovog T-testa.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza urokinazne aktivnosti u staničnim linijama A1235 i MDA-MB-231 nakon tretmana različitim agensima

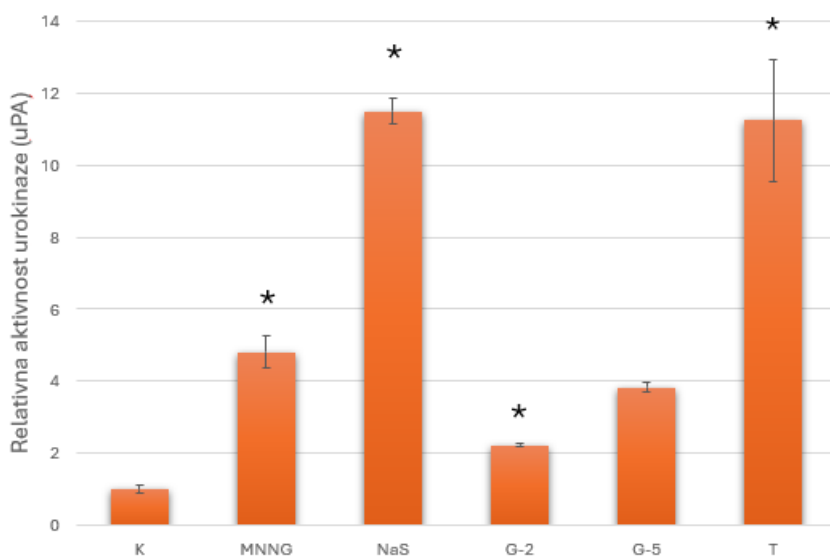
Metodom radijalne kazeinolize istražila sam utjecaj različitih kemoterapeutika, koji potencijalno izazivaju stres ER-a, na aktivnost urokinaze. Urokinaznu aktivnost ispitala sam kod uzgojenih sojeva staničnih linija A1235 i MDA-MB-231. S obzirom da je urokinaza izvanstanična proteaza, analiziran je kondicionirani medij stanica nasađenih u ploče s 12 jažica. Nakon 24 sata od tretmana stanice su inkubirane 6 sati u mediju bez seruma. Na osnovu izmjerenih zona lize i baždarne krivulje, te izmjerene količine proteina u lizatu, odredila sam relativnu urokinaznu aktivnost u uzorcima (Slika 5.).



**Slika 5. Radijalna kazeinoliza.** Stanice A1235 i MDA-MB-231 tretirane su različitim kemoterapeuticima, te je njihov kondicionirani medij stavljen u jažice na agaroznom gelu s dodatkom kazeina i plazminogena. Uzorci su označeni 1A-12A i 13M-24M te su nanešeni u duplikatima. Zone lize vidljive su kao prozirni krugovi. U1-U4 oznake predstavljaju serijska razrjeđenja uPA poznate koncentracije i služe izradi baždarne krivulje. Veličine zone lize uzoraka izmjerene su pomoću programa *Image J*.

#### 4.1.1. Analiza urokinazne aktivnosti stanica A1235 nakon tretmana kemoterapeuticima

Da bi se usporedio utjecaj različitih kemoterapeutika na aktivnost urokinaze, te mogući utjecaj stresa ER-a, stanice glioblastoma A1235 tretirane su 24 sata s 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom te 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom. Tapsigargin je tvar koja se eksperimentalno koristi za izazivanje stresa ER-a, a djeluje tako da inhibira pumpu SERCA ( $\text{Ca}^{2+}$  pumpa u sarko/endoplazmatskom retikulumu) (Yoshino i sur., 2017). MNNG je alkilirajući agens koji izaziva alkilaciju na guaninu i tako djeluje mutageno, a za koji je pokazano da utječe na aktivnost urokinaze kod stanica A1235 (Brdar, 1986). Za NaS je također pokazano da može utjecati na urokinaznu aktivnost u stanicama glioblastoma (Matulić i Brdar, 2001). Gemcitabin je nukleozidni analog deoksicitidina (Gesto i sur., 2012) koji potencijalno izaziva stres ER-a (Wang i sur., 2017). U kondicioniranom mediju, sakupljenom nakon tretmana, određena je urokinazna aktivnost radijalnom kazeinolizom. Urokinazna aktivnost bila je povećana 4 puta uslijed tretmana MNNG-om, 11 puta natrijevim salicilatom, 2 puta 2  $\mu\text{M}$  gemcitabinom i 11 puta tapsigarginom, dok tretman 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom nije doveo do bitnih promjena (Slika 6.).



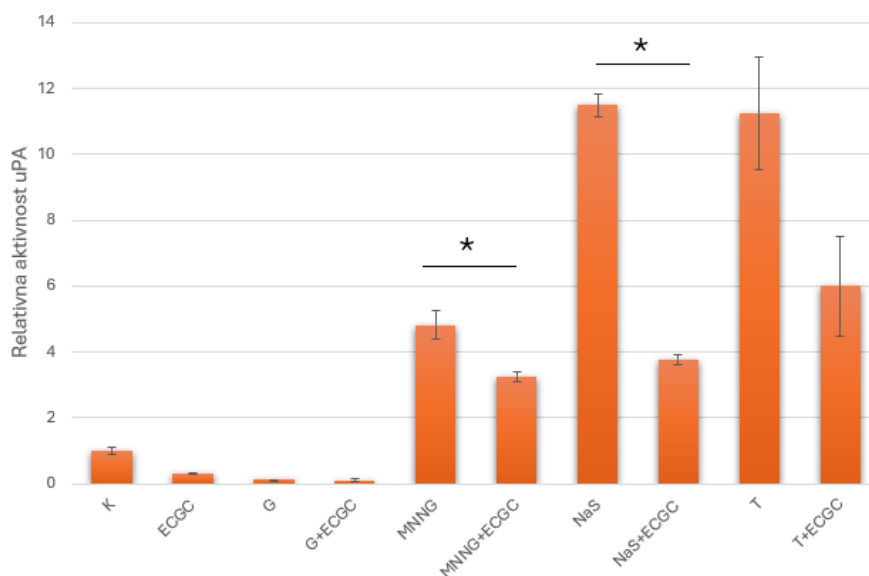
**Slika 6. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama A1235 nakon obrade različitim agensima.** Stanice A1235 tretirane su 24 sata s 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 2  $\mu\text{M}$  gemcitabinom, 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom te 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K**: netretirane stanice



A1235; kondicionirani medij stanica tretiranih: **MNNG**: N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom; **NaS**: natrijevim salicilatom; **G-2** i **G-5**: gemcitabinom u koncentraciji 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ; **T**: tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

Kako bih istražila utjecaj stresa ER-a na promjenu urokinazne aktivnosti, stanice A1235 tretirane su inhibitorom šaperona BiP-a epigalokatehin galatom (ECGC-om) (Roller i Maddalo, 2013). Stanice su također tretirane kombinacijom inhibitora i kemoterapeutika. Nakon inkubacije od 24 sata u mediju s različitim agensima, urokinazna je aktivnost određena u kondicioniranom mediju bez seruma u kojem su stanice inkubirane dodatnih 6 sati. Urokinaznu aktivnost odredila sam radijalnom kazeinolizom.

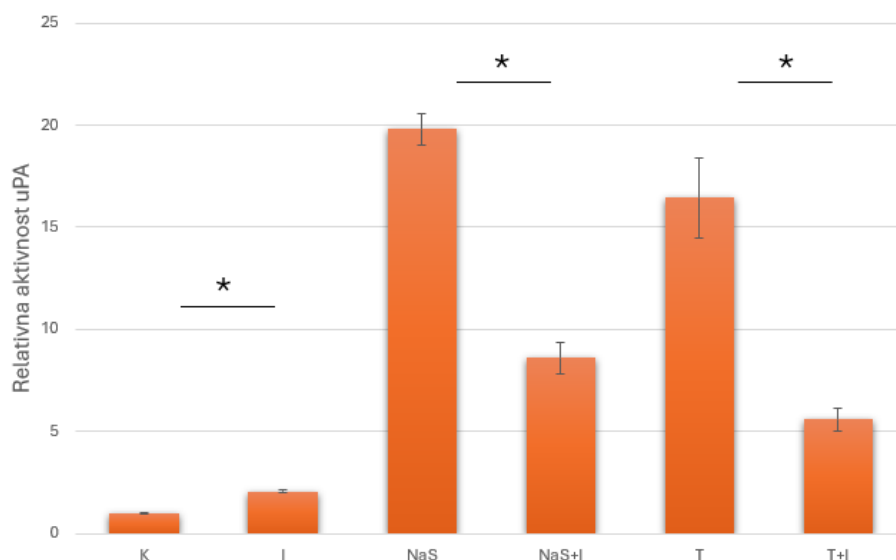
ECGC nije bitno smanjio bazalnu aktivnost urokinaze, međutim u kombinaciji inhibitora s MNNG-om došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 32 %, u odnosu na sam tretman. Inhibitor je također smanjio urokinaznu aktivnost izazvanu natrijevim salicilatom za 67 %, dok na aktivnost izazvanu gemcitabinom i tapsigarginom nije bitno utjecao (Slika 7.).



**Slika 7. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama A1235 nakon obrade različitim agensima u kombinaciji s ECGC.** Stanice A1235 tretirane su 24 sata sa 100  $\mu\text{M}$  inhibitorom šaperona ECGC, 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom, 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom te kombinacijom gemcitabina, MNNG, NaS i tapsigargina s inhibitorom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K**: netretirane stanice A1235; kondicionirani medij stanica tretiranih: **ECGC**: epigalokatehin galatom; **G**:

gemcitabinom; MNNG: N-metil-N'- nitro-N-nitrozoguanidinom; NaS: natrijevim salicilatom; T: tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

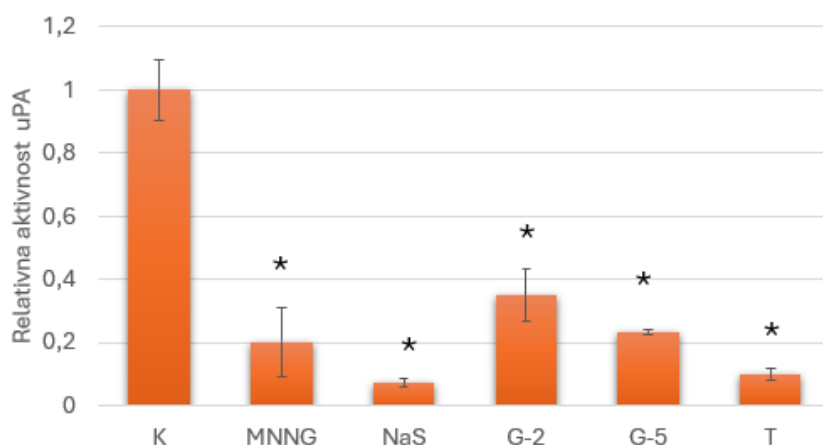
Da bi se istražio direktan utjecaj stresa ER-a na regulaciju urokinazne aktivnosti, stanice A1235 su tretirane različitim agensima u kombinaciji s inhibitorom PERK-a, senzorne molekule na membrani ER-a. Inhibitor PERK-a dovodi do smanjenja kinazne aktivnosti PERK-a kojom je reguliran odgovor na stres ER-a (Gundu i sur., 2022). Stanice su tretirane agensima i inhibitorom te njihovom kombinacijom kroz 24 sata. U kondicioniranom mediju bez seruma određena je aktivnost urokinaze metodom radijalne kazeinolize. Rezultati (Slika 8.) pokazuju utjecaj inhibitora PERK-a GSK2606414 (GSK) na aktivnost urokinaze, te njegov utjecaj u kombinaciji s natrijevim salicilatom i tapsigarginom. Inhibicija PERK-a povećala je bazalnu aktivnost urokinaze, međutim pokazalo se kako inhibitor smanjuje aktivnost induciranu natrijevim salicilatom za 56 %, te aktivnost induciranu tapsigarginom za 66 %.



**Slika 8. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama A1235 nakon obrade različitim agensima u kombinaciji s inhibitorom PERK-a.** Stanice A1235 tretirane su 24 sata s 10  $\mu\text{M}$  inhibitorom I (GSK), 15 mM NaS, 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom te kombinacijom NaS i T s inhibitorom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K**: netretirane stanice A1235; kondicionirani medij stanica tretiranih: **I**: inhibitorom PERK-a GSK2606414; **NaS**: natrijevim salicilatom; **T**: tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2. Analiza urokinazne aktivnosti stanica MDA-MB-231 nakon tretmana kemoterapeuticima

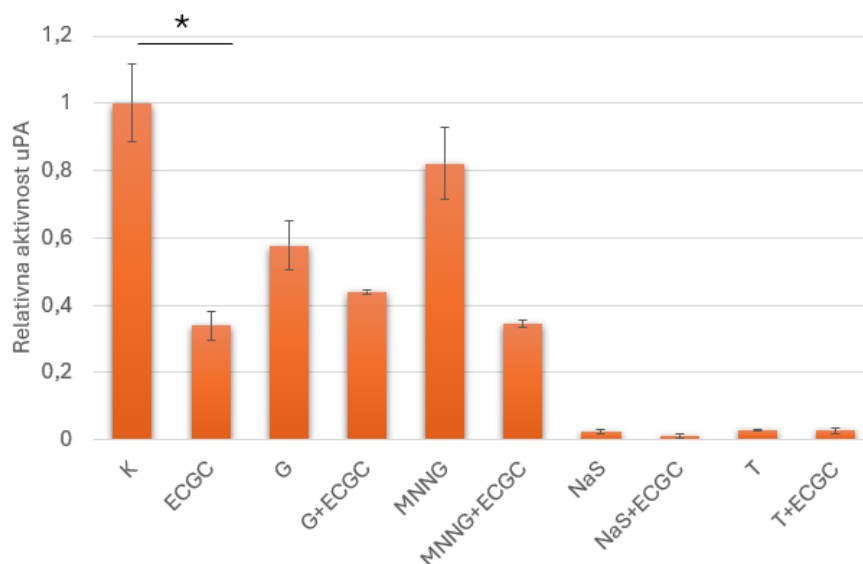
Istraživanja su pokazala da alkilirajući agens N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) može modulirati urokinaznu aktivnost u određenim tipovima stanica (Brdar i Matulić, 1988) kao i da NaS može inhibirati urokinaznu aktivnost u stanicama MDA-MB-231 (Madunić i sur., 2017), pa se htjelo ispitati jesu li ti procesi povezani sa stresom ER-a. Stanice su stoga tretirane s 5  $\mu\text{M}$  MNNG-om, 15 mM NaS, 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom. Stanice su također tretirane 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom, induktorom stresa ER-a, kako bi se istražio njegov utjecaj na urokinazu kroz 24 sata; prethodna istraživanja su pokazala da su više koncentracije tapsigargina izazvala veću citotoksičnost (neobjavljeni rezultati kolega iz laboratorija). U kondicioniranom mediju bez seruma, u kojem su stanice rasle dodatnih 6 sati određena je aktivnost urokinaze. Rezultati (Slika 9.) su pokazali kako je smanjenje aktivnosti uPA tretmanom MNNG bilo oko 80 %, a tapsigarginom 90 %. Osim toga, kod stanica tretiranih s NaS došlo je do smanjenja aktivnosti uPA od čak 92 %, sukladno prijašnjim istraživanjima na stanicama MDA-MB-231 (Madunić i sur., 2017). Ispitano je još i djelovanje citostatika gemcitabina u koncentracijama 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ , pri čemu su oba tretmana smanjila aktivnost uPA, s tim da se tretman pri koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$  pokazao nešto učinkovitijim sa smanjenjem od 76 % u usporedbi s 65 % smanjenjem pri koncentraciji 2  $\mu\text{M}$ .



**Slika 9. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama MDA-MB-231 nakon obrade različitim agensima.** Stanice MDA-MB-231 tretirane 24 sata su s 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom te 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu

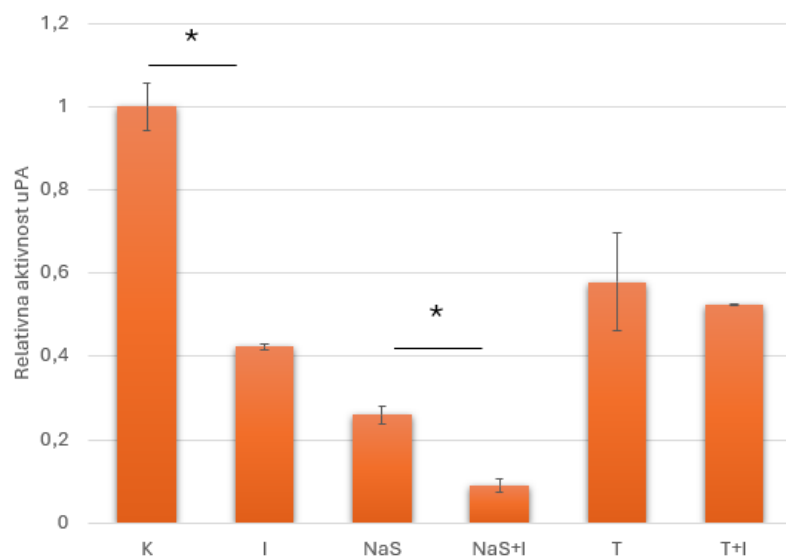
kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K**: netretirane stanice MDA-MB-231; kondicionirani medij stanica tretiranih: **MNNG**: N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom; **NaS**: natrijevim salicilatom; **G-2** i **G-5**: gemcitabinom u koncentraciji 2  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ; **T**: tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

Povezanost stresa ER-a i urokinaze istražila se primjenom inhibitora BiP-a, epigalokatehin galata (ECGC). Ispitala sam i koliko učinkovito ECGC djeluje u kombinaciji s različitim agensima. Rezultati (Slika 10.) pokazuju kako je ECGC smanjio bazalnu aktivnost urokinaze. Međutim, uočeno je da ECGC u kombinaciji s gemcitabinom, MNNG-om, natrijevim salicilatom i tapsigarginom nije značajno utjecao na urokinaznu aktivnost moduliranu kemoterapeuticima.



**Slika 10. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama MDA-MB-231 nakon obrade različitim agensima u kombinaciji s ECGC.** Stanice MDA-MB-231 tretirane su 24 sata s 100  $\mu\text{M}$  ECGC, 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom, 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom uključujući i svaki agens u kombinaciji s inhibitorom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K**: netretirane stanice MDA-MB-231; kondicionirani medij stanica tretiranih: **ECGC**: epigalokatehin galatom; **G**: gemcitabinom; **MNNG**: N-metil-N'- nitro-N-nitrozoguanidinom; **NaS**: natrijevim salicilatom; **T**: tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

Ispitan je utjecaj inhibitora PERK-a GSK na aktivnost urokinaze, te njegov utjecaj u kombinaciji s natrijevim salicilatom i tapsigarginom kod stanica MDA-MB-231 (Slika 11.). Stanice su tretirane agensima u kombinaciji s inhibitorom kroz 24 sata, a urokinazna je aktivnost određena u kondicioniranom mediju. Inhibitor GSK smanjio je bazalnu aktivnost urokinaze za 57 %. Zabilježeno je smanjenje aktivnosti uPA pri kombinaciji GSK s natrijevim salicilatom za 65 %, dok u kombinaciji s tapsigarginom nije došlo do bitnih promjena.



**Slika 11. Relativna aktivnost urokinaze u stanicama MDA-MB-231 nakon obrade različitim agensima u kombinaciji s inhibitorom PERK-a.** Stanice MDA-MB-231 su tretirane 24 sata s 10  $\mu\text{M}$  inhibitorom I (GSK), 15 mM NaS, 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom te kombinacijom natrijevog salicilata i tapsigargina s inhibitorom. Aktivnost urokinaze određena je u kondicioniranom mediju bez seruma i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na netretiranu kontrolu. Svaki uzorak pripremljen je u dvije biološke replike. **K:** netretirane stanice MDA-MB-231; kondicionirani medij stanica tretiranih: **I:** inhibitorom PERK-a GSK2606414; **NaS:** natrijevim salicilatom; **T:**tapsigargin; \*  $p < 0,05$ .

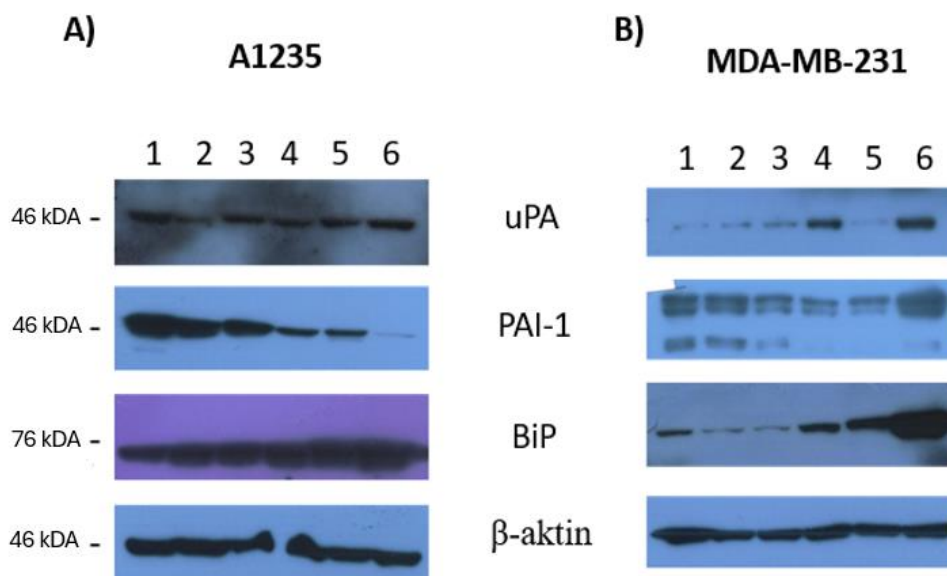
#### 4.2. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava i stresa ER-a

Da bi se istražio mehanizam promjene aktivnosti urokinaze nakon tretmana različitim agensima, izolirala sam stanične proteine iz stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  ECGC, 5  $\mu\text{M}$  gemcitabinom, 5  $\mu\text{M}$  MNNG, 15 mM NaS, 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom (A1235) i 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom (MDA-MB-231) kroz 24 sata. Stanične lizate sam potom analizirala metodom *Western blot*. Membrane s proteinima inkubirane su u primarnim

antitijelima za uPA, PAI-1, BiP i  $\beta$ -aktin. Proteine sam detektirala metodom kemiluminiscencije. Ekspresija  $\beta$ -aktina korištena je kao mjera količine proteina nanese na gel. Kako je aktivnost urokinaze ovisna o ekspresiji urokinaze i njenog inhibitora, analizirana je ekspresija tih proteina. Protein BiP je šaperon, čija ekspresija može ukazati na postojanje stresa ER-a.

Rezultati analize ekspresije urokinaze (uPA) u stanicama A1235 (Slika 12. A) pokazali su sličnu razinu ovog proteina u lizatima stanica tretiranih gemcitabinom, MNNG-om, natrijevim salicilatom i tapsigarginom u usporedbi s ekspresijom u netretiranim stanicama. U staničnim lizatima tretiranim ECGC-om detektirana je smanjena količina urokinaze. Količina PAI-1 bila je na bazalnoj razini kod stanica tretiranih ECGC-om i gemcitabinom, dok je smanjena količina PAI-1 primijećena kod stanica tretiranih MNNG-om, natrijevim salicilatom i tapsigarginom. Detektirano je i povećanje ekspresije BiP-a u stanicama tretiranim ECGC-om, gemcitabinom, MNNG-om, natrijevim salicilatom i ponajviše tapsigarginom u odnosu na ekspresiju u netretiranim kontrolnim uzorcima.

S druge strane, stanice MDA-MB-231 (Slika 12. B) pokazuju porast ekspresije urokinaze (uPA) u uzorcima tretiranim MNNG-om i tapsigarginom, dok se u uzorcima lizata stanica tretiranih ECGC-om, gemcitabinom i natrijevim salicilatom ne primjećuje bitna razlika u odnosu na kontrolu. Povećana ekspresija PAI-1 zabilježena je pri tretmanu tapsigarginom. Količina PAI-1 bila je na bazalnoj razini kod stanica tretiranih ECGC-om, gemcitabinom, MNNG-om i natrijevim salicilatom. Ekspresija BiP-a bila je smanjena u lizatu stanica tretiranih ECGC-om i gemcitabinom, dok je povećana ekspresija BiP-a detektirana u lizatima stanica tretiranih MNNG-om, natrijevim salicilatom i tapsigarginom u usporedbi s ekspresijom u netretiranim stanicama.

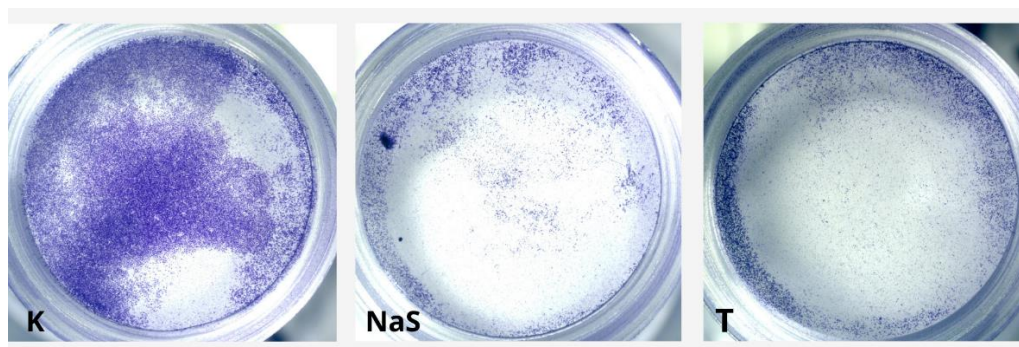


**Slika 12. Analiza ekspresije proteina metodom *Western Blot*.** Stanice A1235 (**A**) tretirane su sa 100  $\mu$ M ECGC, 5  $\mu$ M gemcitabinom, 5  $\mu$ M MNNG, 15 mM NaS, 0,5  $\mu$ M tapsigarginom kroz 24 sata. Stanice MDA-MB-231 (**B**) tretirane su sa 100  $\mu$ M ECGC, 5  $\mu$ M gemcitabinom, 5  $\mu$ M MNNG, 15 mM NaS, 0,25  $\mu$ M tapsigarginom kroz 24 sata. Stanice su lizirane, a proteini lizata analizirani metodom *Western blot* pomoću antitijela za uPA, PAI-1, BiP i  $\beta$ -aktin. Ekspresija  $\beta$ -aktina služila je kao kontrola nanošenja. Korišten je marker PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619 za detekciju proteina u rasponu 10-250 kDa. **1:** kontrola, netretirane stanice; stanični lizati s tretmanima: **2:** epigalokatehin galat (ECGC); **3:** gemcitabin; **4:** N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG); **5:** natrijev salicilat (NaS); **6:** tapsigargin.

#### 4.3. Analiza sposobnosti invazije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom

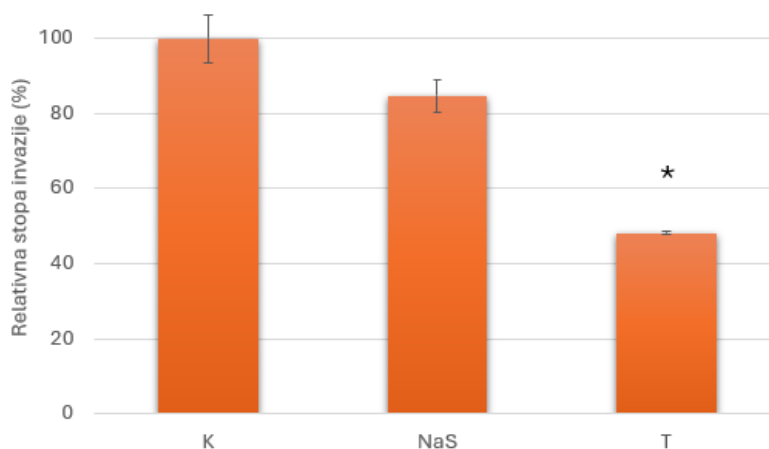
Budući da je urokinazni sustav povezan sa sposobnošću migracije i invazije te s adhezijom i degradacijom izvanstaničnog matriksa (Alfano i sur., 2022) istražila sam sposobnost migracije i invazije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom. Kako bi se istražila invazija, stanice su nasađene u komorice s membranom presvučenom slojem izvanstaničnog matriksa. Stanice smo nasadili u mediju bez seruma s 15 mM natrijevim salicilatom (NaS) i 0,5  $\mu$ M za A1234 te 0,25  $\mu$ M tapsigarginom (T) za stanice MDA-MB-231 ili su nasađene kao kontrola bez tretmana. Komorice su potom uronjene u medij sa serumom koji je sadržavao jednaku koncentraciju agenasa kao i stanični medij u komoricama. Nakon

inkubacije od 16 do 24 h prilikom koje su stanice migrirale kroz pore membrane komorice prema mediju sa serumom, stanice smo fiksirali i obojali u 0,2 % otopini kristal ljubičaste boje (Slika 13.).



**Slika 13. Primjer invazije stanica u komoricama.** Stanice su nasade u komorice s membranom presvučenom ECM-om i tretirane natrijevim salicilatom i taspigarginom u mediju bez seruma. Komorice su uronjene u medij sa serumom s jednakim koncentracijama agensa. Nakon 16-24 h inkubacije i bojanja bojom kristal ljubičasto, stanice su slikane pod lupom te prebrojane pomoću programa *ImageJ*. **K:** netretirane stanice; **NaS:** stanice tretirane natrijevim salicilatom; **T:** stanice tretirane taspigarginom.

Rezultati su prikazani kao relativna stopa invazije usporedbom broja stanica kontrole i tretiranih stanica. Kod stanica A1235, nakon obrade natrijevim salicilatom, nije došlo do značajne promjene u sposobnosti invazije. Nakon tretmana taspigarginom, stanice su pokazale značajno smanjenje sposobnosti invazije (oko 50 %) usprkos povećanju urokinazne aktivnosti (Slika 14.)

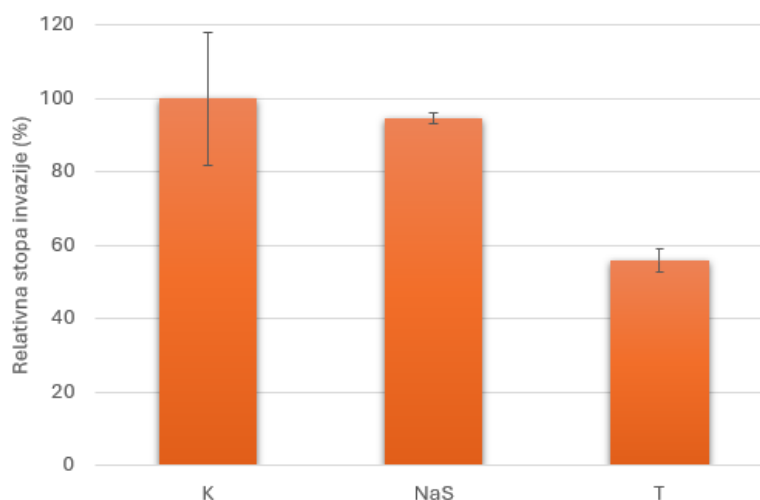


**Slika 14. Relativna stopa invazije u stanicama A1235 nakon obrade natrijevim salicilatom i taspigarginom.** Stanice su nasade u komorice s membranom presvučenom



izvanstaničnim matriksom i tretirane 15 mM natrijevim salicilatom i 0,5  $\mu\text{M}$  tapsigarginom. Nakon inkubacije od 16 do 24 sata, stanice su fiksirane, obojene i prebrojane. Svaki je uzorak napravljen u duplikatu. **K**: netretirane stanice A1235; **NaS**: stanice tretirane natrijevim salicilatom; **T**: stanice tretirane tapsigarginom.

Rezultati testa invazije stanica MDA-MB-231 (Slika 15.) pokazali su da obrada stanica natrijevim salicilatom i tapsigarginom nije značajno inhibirala sposobnost invazije stanica MDA-MB-231.

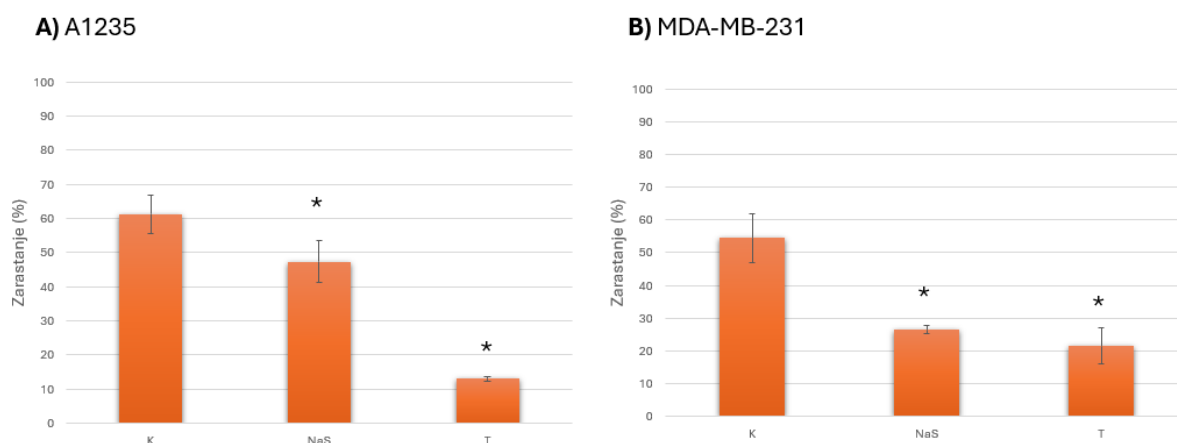


**Slika 15. Relativna stopa invazije u stanicama MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom.** Stanice su nasadene u komorice s membranom presvučenom izvanstaničnim matriksom i tretirane 15 mM natrijevim salicilatom i 0,25  $\mu\text{M}$  tapsigarginom. Nakon inkubacije od 16 do 24 sata, stanice su fiksirane, obojene i prebrojane. Svaki je uzorak napravljen u duplikatu. **K**: netretirane stanice MDA-MB-231; **NaS**: stanice tretirane natrijevim salicilatom; **T**: stanice tretirane tapsigarginom.

#### 4.4. Analiza sposobnosti migracije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom

Kako bismo istražili sposobnost migracije stanica u uvjetima stresa ER-a napravila sam test "zarastanja ogrebotine". Konfluentne kulture stanica A1235 i MDA-MB-231 tretirali smo 15  $\mu\text{M}$  natrijevim salicilatom i 0,5 (A1235)  $\mu\text{M}$  te 0,25  $\mu\text{M}$  (MDA-MB-231) tapsigarginom, a zatim sam napravila tri paralelne ogrebotine u staničnom sloju. Stanice s ogrebotinama mikrofotografirala sam u početnom stanju, a onda ponovno nakon 24 sata kako bi se mogao usporediti postotak "zarastanja ogrebotine" stanica. Također smo pratili ovisnost migracije o

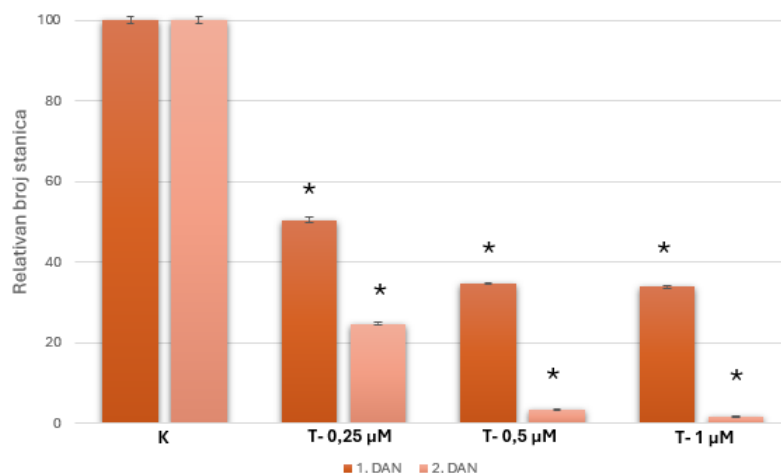
natrijevom salicilatu i tapsigarginu. Rezultati (Slika 16.) su prikazani kao relativna vrijednost smanjenja širine ogrebotine u odnosu na početnu širinu. Kod obje stanične linije pokazano je kako i natrijev salicilat i tapsigargin inhibiraju staničnu migraciju, odnosno tretirane stanice sporije su migrirale u ogrebotinu u odnosu na kontrolu, bez obzira na urokinaznu aktivnost.



**Slika 16. Postotak "zarastanja" stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade natrijevim salicilatom i tapsigarginom.** Konfluentnu kulturu stanica tretirali smo natrijevim salicilatom i tapsigarginom te napravili tri paralelne ogrebotine. Stanice sam mikrofotografirala na početku i nakon 24 sata kako bih usporedila sposobnost migracije stanica pod utjecajem tretmana. Uspoređen je postotak smanjenja širine ogrebotine u odnosu na početno stanje. **A)** Stanice A1235 tretirane su s 15 mM natrijevim salicilatom (NaS) i 0,5  $\mu$ M tapsigarginom. **B)** Stanice MDA-MB-231 tretirane su s 15 mM natrijevim salicilatom (NaS) i 0,25  $\mu$ M tapsigarginom. Svaki je uzorak napravljen u duplikatu, a po uzorku je analizirano 9 točaka. **K:** netretirane stanice; **NaS:** stanice tretirane natrijevim salicilatom; **T:** stanice tretirane tapsigarginom; \*  $p < 0,05$ .

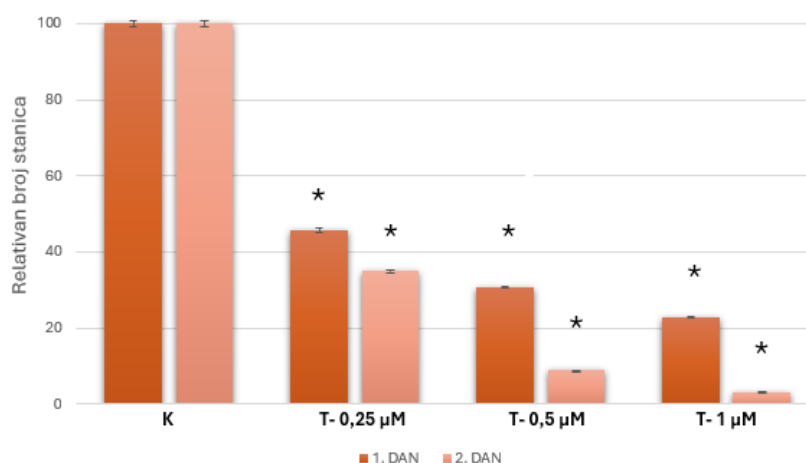
#### 4.5. Analiza proliferacije stanica A1235 i MDA-MB-231 nakon obrade tapsigarginom

Kako bi se istražio utjecaj stresa ER-a na staničnu proliferaciju, pratila sam rast stanica nakon tretmana različitim koncentracijama tapsigargina. Stanice sam prebrojala nakon 24 i 48 sati inkubacije s tapsigarginom pomoću hemocitometra. Uzroci su tretirani i stanice brojane u triplikatima. Kod stanica A1235 (Slika 17.) proliferacija je značajno inhibirana već prvi dan tretmana, s tim da je 0,25  $\mu$ M tapsigargin inhibirao rast za 49 %, 0,5  $\mu$ M za 65 %, te 1  $\mu$ M za 66 %. Jači toksični učinak tapsigargina zabilježen je nakon 48 sati inkubacije s tapsigarginom pa je tako 0,25  $\mu$ M tapsigargin inhibirao rast za 75 %, 0,5  $\mu$ M za 96 %, a 1  $\mu$ M za 99 %.



**Slika 17. Učinak taspigargina na proliferaciju stanica A1235 nakon obrade taspigarginom.** Stanice A1235 tretirane su s 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  te 1  $\mu\text{M}$  taspigarginom. Uzorci su tretirani u triplicatu te prebrojani nakon 24 i 48 sati. **K:** netretirane stanice A1235; **T-0,25  $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 0,25  $\mu\text{M}$  taspigarginom; **T-0,5  $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 0,5  $\mu\text{M}$  taspigarginom; **T-1 $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 1  $\mu\text{M}$  taspigarginom.

Kod stanica MDA-MB-231 (Slika 18.) također je primijećena značajna inhibicija proliferacije pri svim koncentracijama taspigargina. Prvi je dan 0,25  $\mu\text{M}$  taspigargin inhibirao rast za 54 %, 0,5  $\mu\text{M}$  za 69 % i 1  $\mu\text{M}$  za 76 %, dok je drugi dan 0,25  $\mu\text{M}$  taspigargin inhibirao rast za 65 %, 0,5  $\mu\text{M}$  za 91 %, a 1  $\mu\text{M}$  taspigargin za 96 %.



**Slika 18. Učinak taspigargina na proliferaciju stanica MDA-MB-231 nakon obrade taspigarginom.** Stanice MDA-MB-231 tretirane su s 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  te 1  $\mu\text{M}$  taspigarginom. Uzorci su tretirani u triplicatu te prebrojani nakon 24 i 28 sati. **K:** netretirane stanice MDA-MB-231; **T-0,25  $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 0,25  $\mu\text{M}$  taspigarginom; **T-0,5  $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 0,5  $\mu\text{M}$  taspigarginom; **T-1 $\mu\text{M}$ :** stanice tretirane 1  $\mu\text{M}$  taspigarginom.

## 5. RASPRAVA

Stres endoplazmatskog retikuluma (ER) i sustav plazminogenog aktivatora (PA) ključni su elementi unutar stanice koji igraju značajne uloge u održavanju homeostaze i regulaciji različitih procesa. Kada se naruši homeostaza ER-a zbog nepravilno smotanih proteina, javlja se stres ER-a koji dovodi do aktivacije odgovora na nesmotane proteine (UPR). UPR nastoji obnoviti normalnu funkciju stanice ili potaknuti apoptozu u slučaju kada homeostaza ne može biti ponovno uspostavljena.

Ranija su istraživanja pokazala kako različiti kemoterapeutici mogu modulirati urokinaznu aktivnost (Madunić i sur., 2017; Matulić i Brdar, 2001; Rozpędek i sur., 2017). Jedan od tih agenasa, natrijev salicilat, može utjecati i na ER-stres (Silva i sur., 2007). Također se pokazalo da niz citotoksičnih tvari može izazvati odgovor koji povezuje oksidativni i stres ER-a (Bhattarai i sur., 2021; Ong i Logue, 2023). Prema tome, cilj rada bio je utvrditi djeluju li agensi koji moduliraju urokinaznu aktivnost stanica posredovanjem puteva stresa ER-a. Usporedno, stanice su tretirane i standardnim induktorom stresa ER-a, tapsigarginom, kako bi se ispitalo može li stres ER utjecati na urokinaznu aktivnost.

Alkilirajući agens N-metil-N'-nitro-N-nitrozogvanidin (MNNG) je kancerogen koji izaziva alkilaciju na kisiku i dušiku guanina, tako da djeluje mutageno, što može dovesti do stanične smrti (Mishina i sur., 2006). Međutim, MNNG također može pokrenuti zaštitni odgovor induciranjem ekspresije gena povezanih s popravkom DNA (Parra i sur., 2000). Prethodna istraživanja (Brdar, 1986) su utvrdila da stanice koje ne izražavaju enzim (O6-metilguanin-DNA metiltransferazu - MGMT) odgovoran za popravak oštećenja DNA uzrokovanih MNNG-om pokazuju povećanu aktivnost urokinaze nakon alkilacije. Zna se i kako je transkripcija urokinaze povećana pod utjecajem MNNG-a, a taj je efekt postignut aktivacijom signalnog puta JNK (engl. *c-JUN N-terminal kinase*) u mišjim stanicama (Parra i sur., 2000). U ovom istraživanju tretman stanica A1235 s MNNG-om povećao je urokinaznu aktivnost. S druge strane, uočeno je smanjenje urokinazne aktivnosti u stanicama MDA-MB-231 nakon tretmana MNNG-om. Stanice MDA-MB-231 bile su osjetljive na ovaj alkilirajući agens te je moguće da je stanični stres mogao dovesti do ovakvih promjena. Eksperimenti u kojima je tretman s MNNG kombiniran s tretmanom inhibitora stresa ER-a, pokazali su da je kod stanica A1235 ECGC smanjio urokinaznu indukciju. Međutim, kod stanica MDA-MB-231, ECGC nije bitno utjecao na urokinaznu aktivnost induciranu MNNG-om. Na razini proteina, MNNG je povećao ekspresiju BiP-a kod stanica A1235, smanjio ekspresiju PAI-1, dok nije uočena razlika u razini

uPA u lizatu stanica tretiranih s MNNG. Kod stanica MDA-MB-231, uočeno je povećanje ekspresije uPA i BiP u lizatima stanica tretiranih s MNNG, dok je ekspresija PAI bila slična bazalnoj ekspresiji u lizatima netretiranih kontrolnih stanica. Moglo bi se zaključiti da je uloga stresa ER-a u modulaciji urokinazne aktivnosti izazvane alkilirajućim agensom MNNG ovisna o staničnoj liniji.

Natrijev salicilat (NaS) je aktivna komponenta aspirina (acetilsalicilne kiseline) koja je poznata po svom protuupalnom djelovanju, a osim smanjenja upale učinkovita je i za smanjenje temperature, boli, inzulinske rezistencije te se sve više koristi u zaštiti od tumora (Bao i sur., 2018). Djelovanje aspirina očituje se u inhibiranju ciklooksigenaza (enzima koji pretvaraju arahidonsku kiselinu u prostaglandine). Natrijev salicilat također može inhibirati biosintezu prostaglandina, ali takav učinak nije prisutan u svim uvjetima (Amann i Peskar, 2002). Natrijev salicilat može utjecati na različite signalne puteve u stanici uključujući energetski senzor u stanici AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase*), te signalne puteve NFkB i MAPK/ERK (Bao i sur., 2018). Utvrđeno je i da natrijev salicilat može izazvati stres ER-a (Silva i sur., 2007). Pokazano je da natrijev salicilat povećava aktivnost urokinaze kod stanica humanog glioblastoma A1235 (Matulić i Brdar, 2001), što je potvrđeno ovim istraživanjem. Cilj ovog rada bio je utvrditi izaziva li natrijev salicilat stres ER-a u modelnim stanicama i kako su ti procesi povezani s regulacijom urokinazne aktivnosti. Istraživanje je pokazalo da je NaS povećao ekspresiju šaperona BiP kod stanica A1235, a uočeno je i povećanje ekspresije ATF4 te niza mRNA gena uključenih u stres ER-a (neobjavljeni rezultati dobiveni od kolega u laboratoriju). Istovremeno je pokazano da na razini proteina staničnih lizata dolazi do smanjenja ekspresije PAI-1, dok nije nađena razlika u razini urokinaze kod lizata stanica tretiranih s NaS. Na ulogu stresa ER-a u regulaciji urokinaze ukazuju i eksperimenti s inhibitorima ECGC i kinaze PERK, koji su smanjili povećanje aktivnosti urokinaze u kombinaciji sa salicilatom. S druge strane utvrđeno je da obrada stanica MDA-MB-231 natrijevim salicilatom smanjuje aktivnost urokinaze, sukladno prijašnjim studijama (Madunić i sur., 2017). Na razini proteina, NaS je povećao ekspresiju BiP-a, a pokazano je i kako povećava ekspresiju ATF4 (neobjavljeni rezultati), što upućuje na staničnu reakciju odgovora na stres ER-a. Eksperimenti s inhibitorima UPR pokazali su da, iako kod stanica MDA-MB-231 NaS može izazvati stres ER-a, on nije ključan u regulaciji urokinaze natrijevim salicilatom - ECGC nije bitno utjecao na inhibiciju aktivnosti izazvane natrijevim salicilatom, dok je inhibitor PERK-a dodatno povećao inhibiciju aktivnosti izazvane natrijevim salicilatom.

Kako bi se direktno pokazao utjecaj stresa ER-a na sustav plazminogenog aktivatora stanice su tretirane tapsigarginom, tvari koja se eksperimentalno koristi za izazivanje stresa ER-a. Tapsigargin djeluje tako što ireverzibilno inhibira pumpu SERCA (engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) (Yoshino i sur., 2017). Kalcij je značajna stanična signalna molekula koja se u ER-u nalazi u znatno većoj koncentraciji nego u citosolu, te se otvaranjem kanala nakon signala ispušta u citosol i regulira procese. Poremećaj funkcije SERCA dovodi do povećanja unutarstaničnih razina Ca<sup>2+</sup> i iscrpljivanja Ca<sup>2+</sup> u spremištima ER-a. S obzirom da brojni endoplazmatski šaperoni ovise u kalciju, tapsigargin može izazvati stres u ER-u i apoptozu izazvanu stresom (Jaskulska i sur., 2020). U ovom je istraživanju pokazano da tapsigargin može modulirati aktivnost urokinaze. Promjene su bile stanično specifične i usporedive s djelovanjem natrijevog salicilata. Kod stanica A1235 dolazi do povećanja aktivnosti urokinaze, dok kod MDA-MB-231 dolazi do smanjenja aktivnosti. Kod stanica A1235 tapsigargin je izazvao izrazito povećanje ekspresije šaperona BiP i transkripcijskog šaperona ATF4 (neobjavljeni rezultati), što ukazuje na indukciju stresa ER-a. Iako je zabilježeno povećanje urokinazne aktivnosti, u staničnim lizatima nije detektirano znatno povećanje količine uPA, ali je količina PAI-1 bila smanjena. Kod stanica MDA-MB-231 tapsigargin je smanjio aktivnost urokinaze. Ipak, analiza proteina lizata pokazala je povećanje količine uPA, ali i PAI-1 u lizatu. Povećanje ekspresije proteina BiP i ATF4 ukazuju na indukciju stresa ER-a i aktivaciju signalnog puta PERK. ECGC i inhibitor PERK-a nisu bitno utjecali na inhibiciju urokinazne aktivnosti izazvane tapsigarginom. Podaci ukazuju da, iako tapsigargin inducira stres ER-a kod stanica MDA-MB-231 i utječe na urokinaznu aktivnost, nije jedini faktor regulacije i moguće je uključeno više signalnih puteva.

Gemcitabin je pirimidinski nukleozidni antimetabolit koji zaustavlja rast stanice putem inhibicije sinteze DNA i ribonukleotidne reduktaze uključene u sintezu deoksiribonukleotida (Plunkett i sur., 1995; Toschi i sur., 2005). Dugotrajna primjena lijeka često dovodi do razvoja rezistencije, a jedan od mehanizama koji se istražuje u tom kontekstu je stres ER-a potaknut gemcitabinom (Wang i sur., 2017). Budući da djeluje kao kemoterapeutik i potencijalno izaziva stres ER, htjelo se istražiti utječe li i na sustav uPA. Gemcitabin je povećao bazalnu aktivnost urokinaze u staničnoj liniji A1235, a smanjio bazalnu aktivnost urokinaze kod stanica MDA-MB-231. Kod stanica A1235 i MDA-MB-231, kombinacija tretmana gemcitabina i inhibitora šaperona ECGC nije dovela do bitnih promjena. Na proteinskoj razini u obje stanične linije nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji uPA i PAI-1, međutim ekspresija BiP-a je bila povećana kod stanica A1235, a smanjena kod MDA-MB-231 u usporedbi s ekspresijom u

netretiranim kontrolnim uzorcima. Može se zaključiti da u obje stanične linije gemcitabin modulira aktivnost urokinaze, ali da je taj mehanizam različit od putova stresa ER-a.

Epigalokatehin galat (EGCG) je katehin, vrsta flavonoida koji se nalazi u visokim koncentracijama u zelenom čaju. Utvrđeno je da EGCG pokazuje antiproliferativne, antiangiogene i proapoptotske učinke u brojnim tumorskim staničnim linijama (Talib i sur., 2024). Prijašnja istraživanja na staničnim linijama tumora prostate pokazala su kako EGCG inhibira urokinazu (uPA) i smanjuje urokinaznu aktivnost tako što se veže na uPA te tako narušava katalitičku trijadu (Sah i sur., 2022). Međutim, pokazano je i da se veže na šaperon BiP, te bi tako mogao utjecati na stres ER-a (Roller i Maddalo, 2013). U našem istraživanju, kod stanica tretiranih s EGCG došlo je do značajnog smanjenja urokinazne aktivnosti u odnosu na bazalnu kod stanica MDA-MB-231, dok kod A1235 nisu uočene bitne razlike. Osim toga, EGCG je ispitan i u kombinaciji s drugim agensima, uključujući gemcitabin, MNNG, NaS i tapsigargin. Kod stanica MDA-MB-231 EGCG nije modulirao aktivnost izazvanu tretmanima. Pretpostavlja se da su dobiveni rezultati posljedica inhibicije BiP-a ili nekog drugog procesa, a ne direktne inhibicije urokinazne enzimatske reakcije – urokinazna aktivnost ispitana je u kondicioniranom mediju u kojem ne bi trebao biti prisutan EGCG. Ekspresija BiP-a nije bila bitno smanjena u lizatima kod stanica A1235, ali jest kod stanica MDA-MB-231 tretiranih EGCG-om. Međutim, ekspresija uPA je bila smanjena u staničnim lizatima A1235, što bi moglo ukazivati na utjecaj na inhibiciju sinteze urokinaze, ali i na stres koji bi EGCG mogao izazvati kod tih stanica.

GSK2606414 (GSK) je prvi oralni inhibitor PERK-a koji su razvili GlaxoSmithKline 2012. godine (Axten et al., 2012). PERK je monomer lokaliziran na membrani ER-a te igra ključnu ulogu u translacijskoj kontroli stresa ER-a tako što detektira nakupljanje nepravilno smotanih proteina u lumenu ER-a (Gundu i sur., 2022). GSK djeluje putem moduliranja signalnog puta PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP. Inhibicija PERK-a u tumorskim stanicama može potisnuti njihovu sposobnost prilagodbe u uvjetima stresa, što može dovesti do apoptoze i/ili inhibicije rasta tumora (Bagratuni i sur., 2020). Kod stanica A1235, inhibitor PERK-a smanjio je povećanje urokinazne aktivnosti u odnosu na bazalnu aktivnost u netretiranim uzorcima, ali i u kombinaciji s natrijevim salicilatom i tapsigarginom. Ovakva inhibicija bi ukazivala da ER stres može utjecati na regulaciju urokinaze kod stanica A1235. U stanicama MDA-MB-231 inhibitor PERK-a smanjio je bazalnu aktivnost i aktivnost izazvanu s natrijevim salicilatom, dok na aktivnost izazvanu tapsigarginom nije bitno utjecao, što bi ukazivalo na različite mehanizme regulacije.

Migracija i invazija stanica bitni su procesi kod metastaziranja tumora. Migracija se odnosi na sposobnost stanice da promijeni svoj položaj unutar tkiva, dok se proces invazije odnosi na migraciju pojedinačnih stanica kroz izvanstanični matriks, što omogućava tumorskim stanicama da urastaju u okolno tkivo, uđu u krvotok ili limfne žile te izlaskom iz njih u udaljenim organima stvaraju metastaze (Friedl i Wolf, 2003). Proces migracije povezani su sa sposobnostima adhezije za podlogu, dok je invazija povezana i sa sposobnostima razgradnje izvanstaničnog matriksa, putem izvanstaničnih proteaza, poput plazmina i metaloproteinaza. U njihovoj aktivaciji, direktno ili indirektno može sudjelovati urokinaza. U ovom istraživanju migraciju sam ispitala testom "zacjeljivanja" ogrebotine, a invaziju testom u komoricama, na dvije stanične linije, A1235 i MDA-MB-231. Istovremeno sam promatrala utjecaj natrijevog salicilata i tapsigargina na migraciju i invaziju. Rezultati pokazuju da je migracija bila smanjena u odnosu na kontrolu, u stanicama A1235 i MDA-MB-231 koje su bile tretirane s NaS i tapsigarginom, unatoč tome što je aktivnost urokinaze bila povećana u stanicama A1235, a smanjena u MDA-MB-231. S druge strane, NaS i tapsigargin nisu bitno utjecali na invazivni potencijal stanica MDA-MB-231, dok je tapsigargin kod stanica A1235 ipak inhibirao invaziju. Ovi podaci ukazuju da sama urokinazna aktivnost nije jedini faktor koji određuje migracijski i invazivni potencijal stanica. U stanicama A1235, iako NaS i tapsigargin povećavaju urokinaznu aktivnost, što bi inače moglo potaknuti razgradnju izvanstaničnog matriksa i povećati migraciju i invaziju, drugi mehanizmi, poput reorganizacije aktinskog citoskeleta, promjene adhezijskih molekula te promjena pokretljivosti uslijed tretmana natrijevim salicilatom, mogu biti odgovorni za smanjenje migracije i invazije (Karalis i sur., 2020). Suprotno našim rezultatima, istraživanja Jiang i sur., (2020) pokazala su da tapsigargin može potaknuti staničnu migraciju u određenim staničnim linijama kolorektalnog karcinoma, poput HT29 i HCT116. Tapsigargin je potaknuo staničnu migraciju kroz aktivaciju dugolančane nekodirajuće RNA MALAT1 koja je povezana i s invazivnosti stanica. Ovaj proces posredovan je stresom ER-a, kroz aktivaciju signalnih puteva IRE1/XBP1 i PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4, koji potiču ekspresiju MALAT1 i time pridonose migraciji stanica (Jiang i sur., 2020). Vjerojatno je razlog za te različite rezultate u različitim eksperimentalnim uvjetima, a posebno u koncentracijama tapsigargina. U spomenutom istraživanju korišten je tapsigargin koncentracije 1 nM, dok smo mi koristili značajno više koncentracije, 0,5  $\mu$ M za stanice A1235 i 0,25  $\mu$ M za MDA-MB-231. Visoke koncentracije tapsigargina mogu izazvati jači stres ER-a, što može dovesti do aktivacije apoptoze i drugih stresnih odgovora koji inhibiraju migraciju stanica. Rezultati također upućuju da tapsigargin može imati različite učinke ovisno o tipu stanica i koncentraciji koja se koristi.



U sklopu istraživanja ispitala sam i utjecaj stresa ER-a na staničnu proliferaciju u stanicama A1235 i MDA-MB-231. Stanice su tretirane različitim koncentracijama tapsigargina, induktora stresa ER-a, a proliferacija je praćena kroz dva dana. Rezultati su pokazali zanimljive razlike u odgovoru između dvije stanične linije. Prvog dana, A1235 stanice su pokazale veću otpornost na tretman tapsigarginom, međutim, drugi dan, osobito pri višim koncentracijama tapsigargina, došlo je do naglog pada vijabilnosti. S druge strane, stanice MDA-MB-231 su prvog dana od tretmana pokazale veću osjetljivost na tapsigargin, međutim, zanimljivo je da su drugi dan, unatoč početnoj osjetljivosti, stanice ostale vijabilne (neobjavljeni podaci kolega u laboratoriju). Chang i sur. (2023) istražili su utjecaj tapsigargina na citoskelet i formiranje mikrotentakula (McTN) u stanicama MDA-MB-231. Utvrdili su da tapsigargin povećava razinu kalcija u citoplazmi što smanjuje formiranje McTN-a i otežava ponovno pričvršćivanje stanica, ali ne kao posljedica citotoksičnosti (Chang i sur., 2023). Mikrotentakuli su specifične izbočine koje nastaju zbog neravnoteže između sila koje djeluju na staničnu membranu. Naime, u mikrokruženjima, kao što su krvožilni ili limfni sustav (Thompson i sur., 2022) sila koju vrše mikrotubuli prema van nadmašuje unutarnju napetost aktina, što dovodi do stvaranja izbočina građenih od mikrotubula – mikrotentakula (McTNs) (Chang i sur., 2023). Prisutnost McTNs-a na površini cirkulirajućih tumorskih stanica potiče ponovno prijanjanje na endotelne stanice što ukazuje na njihovu ulogu u metastaziranju (Killilea i sur., 2017). Istraživanja su također pokazala značajno povećanje migracije i invazije stanica MDA-MB-231 uslijed povećane količine izvanstaničnog kalcija (Saidak i sur., 2009). Dugotrajno signaliziranje putem izvanstaničnog kalcija pokazalo se učinkovitim u poticanju preživljavanja stanica, migracije, invazije te poticanju epitelno-mezenhimalne tranzicije. S druge strane oslobađanje kalcija iz zaliha ER-a u citosol pokreće signalne puteve koji mogu rezultirati apoptozom i autofagijom tijekom duljih vremenskih razdoblja (Chang i sur., 2023). Iako bi se smanjenje migracije i proliferacije kod stanica MDA-MB-231 moglo povezati s promjenom unutarstaničnog kalcija nastalom djelovanjem tapsigargina, Chang i sur. (2023) proučavali su stanice u neadherentnom okolišu, dok su stanice u našim eksperimentima bile adherirane.

## 6. ZAKLJUČAK

- (1) Analiza aktivnosti urokinaze u staničnoj liniji glioblastoma A1235 pokazala je da obrada stanica MNNG-om, NaS-om, gemcitabinom i tapsigarginom dovodi po povećanja bazalne aktivnosti urokinaze. Kada su stanice A1235 tretirane kombinacijom kemoterapeutika i inhibitora šaperona BiP-a – ECGC-om, ECGC nije bitno utjecao na bazalnu aktivnost uPA, niti na smanjenje aktivnosti koja je inducirana gemcitabinom i tapsigarginom, ali jest na aktivnost izazvanu s MNNG i NaS. Iako su stanice tretirane inhibitorom PERK-a povećale bazalnu aktivnost urokinaze, inhibitor je značajno smanjio aktivnost izazvanu s NaS i tapsigarginom.
- (2) Obrada stanica MDA-MB-231 gemcitabinom, MNNG-om, NaS-om i tapsigarginom smanjila je bazalnu aktivnost urokinaze. Tretman inhibitorom ECGC kod stanica MDA-MB-231 smanjio je bazalnu aktivnost uPA, dok u kombinaciji s kemoterapeuticima nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti uPA. Inhibitor PERK-a smanjio je bazalnu aktivnost urokinaze i aktivnost urokinaze izazvanu NaS-om, dok u kombinaciji s tapsigarginom nije došlo do značajnih promjena.
- (3) Kod stanica A1235, nakon tretmana s gemcitabinom, MNNG-om, NaS-om i tapsigarginom, ekspresija urokinaze bila je na bazalnoj razini, dok je tretman s ECGC inhibirao ekspresiju urokinaze. Ekspresija PAI-1 bila je na bazalnoj razini nakon tretmana s ECGC-om i gemcitabinom, dok je smanjena kod tretmana s MNNG-om, NaS-om i tapsigarginom. Ekspresija BiP-a bila je povećana kod svih tretmana kemoterapeuticima. S druge strane, kod stanica MDA-MB-231, ekspresija uPA bila je povećana u uzorcima tretiranim s MNNG-om i tapsigarginom, dok ECGC, gemcitabin i NaS nisu izazvali značajne promjene. Ekspresija PAI-1 povećana je u stanicama tretiranim tapsigarginom, dok je kod tretmana ostalim kemoterapeuticima bila na bazalnoj razini. Ekspresija BiP-a bila je smanjena u stanicama tretiranim ECGC-om i gemcitabinom, a povećana kod tretmana MNNG-om, NaS-om i tapsigarginom.
- (4) Natrijev salicilat i tapsigargin smanjili su sposobnost migracije stanica A1235 i MDA-MB-231. Tapsigargin je smanjio sposobnost invazije stanica A1235, dok NaS nije bitno utjecao. Kod stanica MDA-MB-231 NaS i tapsigargin nisu značajno utjecali na sposobnost invazije.
- (5) U stanicama A1235 i MDA-MB-231, tapsigargin je značajno inhibirao proliferaciju stanica tijekom 24 sata i 48 sati inkubacije pri koncentracijama od 0,25  $\mu$ M do 1  $\mu$ M.

## 7. LITERATURA

1. Abraham E., Gyetko MR., Kuhn K., Arcaroli J., Strassheim D., Park JS., Shetty S., Idell, S. (2003): Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 170(11), 5644–5651.
2. Alfano D., Franco P., Stoppelli MP. (2022): Modulation of Cellular Function by the Urokinase Receptor Signalling: A Mechanistic View. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8(10), 818616.
3. Amann R., Peskar BA. (2002): Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *European Journal of Pharmacology*. 447(1), 1-9.
4. Annes JP., Munger JS., Rifkin DB.(2003): Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *Journal of Cell Science*. 116(2), 217–224.
5. Auf G., Jabouille A., Guérit S., Pineau R., Delugin M., Bouchecareilh M., Magnin N., Favereaux A., Maitre M., Gaiser T., von Deimling A., Czabanka M., Vajkoczy P., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. (2010): Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(35), 15553–15558.
6. Axten J.M., Medina J.s.R., Feng Y., Shu A., Romeril S.P., Grant S.W., Li W.H.H., Heerding D.A., Minthorn E., Mencken T. (2012): Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl) phenyl] acetyl)-2, 3-dihydro-1 H-indol-5-yl)-7 H-pyrrolo [2, 3-d] pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *Journal of Medicinal Chemistry*. 55, 7193–7207.
7. Bagratuni T., Patseas D., Mavrianou-Koutsoukou N., Liacos CI., Sklirou AD., Rousakis P., Gavriatopoulou M., Terpos E., Tsitsilonis OE., Trougakos IP., Kastiris E., Dimopoulos MA. (2020): Characterization of a PERK Kinase Inhibitor with Anti-Myeloma Activity. *Cancers* (Basel). 12(10), 2864.
8. Bao W., Luo Y., Wang D., Li J., Wu X., Mei W. (2018): Sodium salicylate modulates inflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in LPS-stimulated THP-1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 119(1), 850-860.
9. Bazzoni R., Bentivegna A. (2019): Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. *Cancers*. 11(3), 292.
10. Bell M. C., Meier S. E., Ingram A. L., Abisambra, J. F. (2016): PERK-opathies: An Endoplasmic Reticulum Stress Mechanism Underlying Neurodegeneration. *Current Alzheimer research*. 13(2), 150–163.

11. Bhattarai K. R., Riaz T. A., Kim H. R., Chae H. J. (2021): The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. *Experimental & molecular medicine*. 53(2), 151–167.
12. Brdar B. (1986): Induction of plasminogen activator by alkylating agents in a repairdefective human glioblastoma cell strain. *Cancer Research*. 46, 2282-2284.
13. Brdar B., Matulić M. (1988): Induction of plasminogen activator by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mer<sup>+</sup> and mer<sup>-</sup> human tumor cell strains. *Carcinogenesis*. 9, 2191-2195.
14. Chang KT., Thompson KN., Pratt SJP., Ju JA., Lee RM., Mathias TJ., Mull ML., Annis DA., Ory EC., Stemberger MB., Vitolo MI., Martin SS. (2023): Elevation of Cytoplasmic Calcium Suppresses Microtentacle Formation and Function in Breast Tumor Cells. *Cancers (Basel)*. 15(3), 884.
15. Chen X., Shi C., He M., Xiong S., Xia X. (2023): Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. 8(1), 352.
16. Choong PF., Nadesapillai AP. (2003): Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 415, 46-58.
17. Czekay R. P., Kuemmel T. A., Orlando R. A., Farquhar M. G. (2001): Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Molecular biology of the cell*. 12(5), 1467–1479.
18. Derynck R., Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*. 425(6958):577–584
19. Eden G., Archinti M., Arnaudova R., Andreotti G., Motta A., Furlan F. (2018): D2A sequence of the urokinase receptor induces cell growth through  $\alpha\beta 3$  integrin and EGFR. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 75, 1889-907.
20. Flick M. J., Bugge T. H. (2017): Plasminogen-receptor  $\text{KT}$  : plasminogen activation and beyond. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 15(1), 150–154.
21. Fowler B., Mackman N., Parmer RJ., Miles LA. (1998): Binding of human single chain urokinase to Chinese hamster ovary cells and cloning of hamster u-PAR. *Thrombosis and Haemostasis*. 80(1): 148–154.
22. Friedl P., Wolf K. (2003): Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 3, 362–374.
23. Gesto D.S., Cerqueira N.M., Fernandes P.A., Ramos M.J. (2012): Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. *Current medicinal chemistry*. 19(7), 1076–1087.

24. Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 51(5), 1417–1423.
25. Goretzki L., Schmitt M., Mann K., Calvete J., Chucholowski N., Kramer M., Günzler W. A., Jänicke F., Graeff H. (1992): Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Letters*. 297(1-2), 112-118.
26. Gundu C., Arruri V. K., Sherkhane B., Khatri D. K., Singh S. B. (2022): GSK2606414 attenuates PERK/p-eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP axis and augments mitochondrial function to mitigate high glucose induced neurotoxicity in N2A cells. *Current research in pharmacology and drug discovery*. 3, 100087.
27. Günzler WA., Steffens GJ., Otting F., Kim SM., Frankus E., Flohé L. (1982): The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 363(10), 1155-1165.
28. Harding H. P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P. D., Calfon M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D. F., Bell J. C., Hettmann T., Leiden J. M., Ron D. (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*. 11(3), 619–633.
29. Higazi A., Cohen R. L., Henkin J., Kniss D., Schwartz B. S., Cines D. B. (1995): Enhancement of the enzymatic activity of single-chain urokinase plasminogen activator by soluble urokinase receptor. *The Journal of biological chemistry*. 270(29), 17375–17380.
30. Holland E. C. (2000): Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(12), 6242–6244.
31. Horvat L., Madunić J., Grubar M., Antica M., Matulić, M. (2019): Induction of Urokinase Activity by Retinoic Acid in Two Cell Lines of Neuronal Origin. *Biomedicines*. 7(3), 70.
32. Hu J., Jo M., Eastman BM., Gilder AS., Bui JD., Gonias SL. (2014): uPAR induces expression of transforming growth factor  $\beta$  and interleukin-4 in cancer cells to promote tumor-permissive conditioning of macrophages. *The American Journal of Pathology*. 184, 3384–3393.
33. Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T. (1986): The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *Journal of Biological Chemistry*. 261(8), 3486-3489.
34. Jaiswal R. K., Varshney A. K., Yadava, P. K. (2018): Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 98, 886–898.

35. Jamora C., Dennert G., Lee, A. S. (1996): Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(15), 7690–7694.
36. Jaskulska A., Janecka AE., Gach-Janczak K. (2020): Thapsigargin-From Traditional Medicine to Anticancer Drug. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(1), 4.
37. Jiang X., Li D., Wang G., Liu J., Su X., Yu W., Wang Y., Zhai C., Liu Y., Zhao Z. (2020): Thapsigargin promotes colorectal cancer cell migration through upregulation of lncRNA MALAT1. 43(4), 1245-1255.
38. Justus C.R., Marie M.A., Sanderlin E.J., Yang L.V. (2023): Transwell In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2644, 349–359.
39. Kadowaki H., Nishitoh H. (2013): Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes*. 4(3), 306–333.
40. Karalis TT., Chatzopoulos A., Kondyli A., Aletras AJ., Karamanos NK., Heldin P., Skandalis SS. (2020): Salicylate suppresses the oncogenic hyaluronan network in metastatic breast cancer cells. *Matrix Biology Plus*. 6(7), 100031.
41. Kaur G., Roy B. (2024): Decoding Tumor Angiogenesis for Therapeutic Advancements: Mechanistic Insights. *Biomedicines*. 12(4), 827.
42. Killilea AN., Csencsits R., Le EBNT., Patel AM., Kenny SJ., Xu K., Downing KH. (2017): Cytoskeletal organization in microtentacles. *Experimental Cell Research*. 357(2), 291-298.
43. Kjeldgaard NO., Ploug J. (1957): Urokinase an activator of plasminogen from human urine. II. Mechanism of plasminogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 24(2), 283-289.
44. Kumar A.A., Buckley B.J., Ranson M. (2022): The Urokinase Plasminogen Activation System in Pancreatic Cancer: Prospective Diagnostic and Therapeutic Targets. *Biomolecules*. 12(2), 152.
45. Kwaan H. C., Keer H. N., Radosevich J. A., Cajot J. F., Ernst R. (1991): Components of the plasminogen-plasmin system in human tumor cell lines. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 17(3), 175–182.
46. Lee C.C., Huang T.S. (2005): Plasminogen activator inhibitor-1: the expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration. *Journal of Molecular Cancer*. 1(1), 25–36.
47. Lester RD., Jo M., Montel V., Takimoto S., Gonias SL. (2007): uPAR induces epithelial–mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *Journal of Cell Biology*. 178(3), 425–36.

48. Li Santi A., Napolitano F., Montuori N., Ragno P. (2021): The Urokinase Receptor: A Multifunctional Receptor in Cancer Cell Biology. Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*. 22(8), 4111.
49. 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.
50. 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.
51. Maas C., de Maat S. (2021): Therapeutic SERPINS: Improving on Nature. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 8, 648349.
52. Madunić J., Horvat L., Majstorović I., Jodłowska I., Antica M., Matulić M. (2017): Sodium Salicylate Inhibits Urokinase Activity in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Clinical Breast Cancer*. 17(8), 629-637.
53. Mahmood N., Mihalcioiu C., Rabbani SA. (2018): Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Frontiers in oncology*. 8, 24.
54. Marín-García J., Goldenthal MJ., Moe GW. (2007): Molecular basis of lipoprotein disorders, atherogenesis, and thrombosis. *Post-Genomic Cardiol*. 1, 211–260.
55. Matulić M., Brdar B. (2001): Induction of Urokinase-type Plasminogen Activator by Sodium Salicylate in a Glioblastoma Cell Strain. *Food Technology and Biotechnology*. 39(1), 5–11.
56. Maxfield FR., McGraw TE. (2004): Endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5(2), 121–132.
57. Mazar A. P., Ahn R. W., O'Halloran T. V. (2011): Development of novel therapeutics targeting the urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and their translation toward the clinic. *Current pharmaceutical design*. 17(19), 1970–1978.
58. 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.
59. Mishina Y., Duguid E. M., He C. (2006): Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chemical reviews*. 106(2), 215–232.
60. Mondino A., Blasi F. (2004): uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends in Immunology*. 25(8), 450–5.
61. Montuori N., Rossi G., Ragno P. (2002): Post-transcriptional regulation of gene expression in the plasminogen activation system. *Biological Chemistry*. 383(1), 47–53.

62. Moreau M., Mourah S., Dosquet C. (2011):  $\beta$ -Catenin and NF- $\kappa$ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells. *International journal of cancer*. 128(6), 1280–1292.
63. Mozos A., Roué G., López-Guillermo A., Jares P., Campo E., Colomer D., Martinez A. (2011): The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large b-cell lymphoma. *The American journal of pathology*. 179(5), 2601–2610.
64. Ong G., Logue S. E. (2023): Unfolding the Interactions between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 12(5), 981.
65. Onozuka H., Tsuchihara K., Esumi H. (2011): Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer science*. 102(5), 975–982.
66. Parra M., Lluís F., Miralles F., Caelles C., Muñoz-Cánoves P. (2000): The cJun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway mediates induction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) by the alkylating agent MNNG. *Blood*. 96(4), 1415-24.
67. Petersen L., Lund L., Nielsen L., Danø K., Skriver L. (1988): One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 263(23), 11189–11195.
68. Ploug M., Rønne E., Behrendt N., Jensen AL., Blasi F., Danø K. (1991): Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*. 266(3), 1926–33.
69. Plunkett W., Huang P., Gandhi V. (1995): Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*. 6, 7-13.
70. Qin Y., Han Y., Xiong CL., Li HG., Hu L., Zhang L. (2015): Urokinase-type plasminogen activator: a new target for male contraception? *Asian Journal of Andrology*. 17(2), 269.
71. Roller C., Maddalo D. (2013): The Molecular Chaperone GRP78/BiP in the Development of Chemoresistance: Mechanism and Possible Treatment. *Frontiers in pharmacology*. 4, 10.
72. Ron D., Walter P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8(7), 519–529.
73. Rozpędek W., Pytel D., Dziki Ł., Nowak A., Dziki A., Diehl J. A., Majsterek I. (2017): Inhibition of PERK-dependent pro-adaptive signaling pathway as a promising approach for cancer treatment. *Polski przeglad chirurgiczny*. 89(3), 7–10.
74. Sah DK., Khoi PN., Li S., Arjunan A., Jeong J-U., Jung YD. (2022): (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Prevents IL-1 $\beta$ -Induced uPAR Expression and Invasiveness via the Suppression of NF-



- $\kappa$ B and AP-1 in Human Bladder Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(22), 14008.
75. Saidak Z., Boudot C., Abdoune R., Petit L., Brazier M., Mentaverri R., Kamel S. (2009): Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Experimental Cell Research*. 315, 2072–2080.
76. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 iz. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
77. Santibanez J. F. (2013): Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. *ISRN dermatology*. 2013, 597927.
78. Santibanez JF., Obradović H., Kukulj 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.
79. Shetty SK., Marudamuthu AS., Abernathy D., Shetty RS., Shetty P., Fu J., Idell S., Bhandary YP., Ji H., Liu MC., Shetty S. (2012): Regulation of urokinase expression at the posttranscription level by lung epithelial cells. *Biochemistry*. 51(1), 205–213.
80. Sillen M., Miyata T., Vaughan DE., Strelkov SV., Declerck PJ. (2021): Structural Insight into the Two-Step Mechanism of PAI-1 Inhibition by Small Molecule TM5484. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(3), 1482.
81. Silva AM., Wang D., Komar AA., Castilho BA., Williams BR. (2007): Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 282(14), 10164-71.
82. Siwecka N., Rozpędek-Kamińska W., Wawrzynkiewicz A., Pytel D., Diehl J. A., Majsterek I. (2021): The Structure, Activation and Signaling of IRE1 and Its Role in Determining Cell Fate. *Biomedicines*. 9(2), 156.
83. Smith HW., Marshall CJ. (2010): Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11, 23–36.
84. Smith M. H., Ploegh H. L., Weissman J. S. (2011): Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 334, 1086–1090.
85. Son H., Moon A. (2010): Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicological research*. 26(4), 245–252.

86. Talib WH., Awajan D., Alqudah A., Alsawwaf R., Althunibat R., Abu AlRoos M., Al Safadi A., Abu Asab S., Hadi RW., Al Kury LT. (2024): Targeting Cancer Hallmarks with Epigallocatechin Gallate (EGCG): Mechanistic Basis and Therapeutic Targets. *Molecules*. 29(6), 1373.
87. Thompson KN., Ju JA., Ory EC., Pratt SJP., Lee RM., Mathias TJ., Chang KT., Lee CJ., Goloubeva OG., Bailey PC., Chakrabarti KR., Jewell CM., Vitolo MI., Martin SS. (2022): Microtubule disruption reduces metastasis more effectively than primary tumor growth. *Breast Cancer Research*. 24(1), 13.
88. Toschi L., Finocchiaro G., Bartolini S., Gioia V., Cappuzzo F. (2005): Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncology*. 1(1), 7-17.
89. Vassalli JD., Sappino AP., Belin D. (1991): The plasminogen activator/plasmin system. *Journal of Clinical Investigation*. 88(4), 1067-1072.
90. Wang L., Zhang Y., Wang W., Zhu Y., Chen Y., Tian B. (2017): Gemcitabine treatment induces endoplasmic reticular (ER) stress and subsequently upregulates urokinase plasminogen activator (uPA) to block mitochondrial-dependent apoptosis in Panc-1 cancer stem-like cells (CSCs). *PLoS ONE*. 12(8), e0184110.
91. Wang P., Li J., Tao J., Sha, B. (2018): The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*. 293(11), 4110–4121.
92. Wang S., Kaufman R. J. (2012): The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of Cell Biology*. 197(7), 857–867.
93. Wek R. C. (2018): Role of eIF2 $\alpha$  Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 10(7), a032870.
94. Wilkinson L., Gathani, T. (2022): Understanding breast cancer as a global health concern. *The British journal of radiology*. 95(1130), 20211033.
95. Xia W., Bock C., Murrell G. A., Wang Y. (2003): Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is up-regulated during tendon healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 21(5), 819–825.
96. Yadav RK., Chae SW., Kim HR., Chae HJ. (2014): Endoplasmic reticulum stress and cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 19(2), 75-88.
97. Yao D., Chen E., Li Y., Wang K., Liao Z., Li M., Huang L. (2024): The role of endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and their crosstalk in intervertebral disc degeneration. *Cellular signalling*. 114, 110986.
98. Yoshino H., Kumai Y., Kashiwakura I. (2017): Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *Molecular Medicine Reports*. 15, 2867-72.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12. 10. 1998. godine u Osijeku gdje sam završila srednju školu II. Gimnaziju. Preddiplomski studij Biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku upisala sam 2017. god. i završila 2021. god. te stekla titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.). Iste godine upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije (Modul: Fiziologija i imunobiologija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad započela sam 2023. godine na Zavodu za molekularnu biologiju, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu pod mentorstvom prof. dr. sc. Maje Matulić.

### Laboratorijska stručna praksa:

02/2022 – 05/2022

"Korištenje in vivo modela u imunohistokemijskim analizama". Jedinica za molekularnu toksikologiju, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI), Zagreb, Hrvatska.

Mentor: dr. sc. Dean Karaica

02/2023

Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, LabAnim A.

03/2023 – 09/2023

Izrada diplomskog rada, Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Mentor: prof. dr. sc. Maja Matulić

10/2023 – 01/2024

Kontrola integriranog odgovora na stres nad cap-neovisnom translacijom. BIOCEV-1LF, 1. Medicinski fakultet, Karlovo sveučilište, Prag, Češka.

Mentor: dr. sc. Radoslav Janoštiak

### Publikacije:

Žuna Pfeiffer T., Špoljarić Maronić D., Stević F., Galir Balkić A., Bek N., Martinović A., Mandir T., Nikolašević R., Janjić D. (2022): Plastisphere development in relation to the surrounding biotic communities. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987). 306, 119380. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119380>