

# Regulacija aktivnosti urokinaznog sustava u ljudskim stanicama glioblastoma

---

Požgaj, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2011

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:217:236261>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Lidija Požgaj

**Regulacija aktivnosti urokinaznog sustava u ljudskim stanicama  
glioblastoma**

Diplomski rad

Zagreb, 2011. godina

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Matulić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Matulić na ukazanom povjerenju, podršci, prenesenom znanju i vještinama tijekom izrade diplomskog rada. Hvala Vam za svaki izdvojeni trenutak, zaista mi je bila velika čast raditi s Vama.

Posebno hvala doc. dr. sc. Petri Cvjetko na pomoći u savladavanju komet-testa. Hvala za male ugodne razgovore.

Najljepše hvala Josipu koji mi je olakšao svaki provedeni trenutak u laboratoriju i što me uveo u zagonetni svijet znanosti i svih njezinih zamki.

Hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, svemu što su mi u životu pružili i svemu što su me naučili!

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Regulacija aktivnosti urokinaznog sustava u ljudskim stanicama glioblastoma**

Lidija Požgaj

Rooseveltov trg 6, Zagreb

Sustav aktivacije plazminogena proteolitički je sustav koji ima veliku ulogu u fiziološkim i patološkim procesima u kojima dolazi do pregradnje izvanstaničnog matriksa. Sustav aktivacije plazminogena reguliran je na razini ekspresije urokinaznog i tkivnog tipa plazminogenog aktivatora (uPA i tPA), inhibitora plazminogenog aktivatora (PAI-1 i PAI-2) i receptora za uPA (uPAR). Osnovni je princip djelovanja sustava aktivacija plazminogena i nastanak plazmina, proteaze širokog spektra djelovanja. Cilj ovog istraživanja bio je istraživanje mehanizma regulacije sustava plazminogene aktivacije kod stanica glioblastoma A1235, nakon alkilacijskog oštećenja, te je li u te procese uključena aktivacija MAP-kinaze JNK. Stanična linija glioblastoma A1235, kojoj nedostaje ekspresija enzima popravka O<sup>6</sup>metilguanin-metiltransferaze, nakon alkilirajućeg oštećenja inducira porast urokinazne aktivnosti. Inhibitor JNK nije pokazao znatnu inhibiciju indukcije aktivnosti uPA u stanicama A1235, nakon alkilirajućeg oštećenja. Sva ova istraživanja ukazuju na to da je regulacija urokinazne aktivnosti složen sustav, a signalni putevi indukcije ovisni o tipu stanica.

(39 stranica, 9 slika, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: uPA, stanična linija A1235, alkilacijsko oštećenje, JNK

Voditelj: Doc. dr. sc. Maja Matulić

Pomoćni voditelj: Josip Madunić, dip. ing. biol.

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Maja Matulić

Doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zamjena: Doc. dr. sc. Inga Marijanović

Rad prihvaćen: 6.10.2011.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

### **Regulation of urokinase activation system in human glioblastoma cells**

Lidija Požgaj

Rooseveltovo trg 6, Zagreb

Plasminogen activation system is a proteolytic system that plays an important role in physiological and pathological processes in which extracellular matrix remodelling occurs. Plasminogen activation system is regulated on the level of transcription of urokinase-type and tissue-type plasminogen activator (uPA and tPA), plasminogen activator inhibitors (PAI-1 i PAI-2) and uPA receptor (uPAR). The aim of this study was to investigate the regulation of urokinase activation system in A1235 human glioblastoma cells after alkylation treatment and to determine whether this induction of urokinase activity was associated with activation of JNK MAP-kinase. A1235 cells, lacking the expression of the O<sup>6</sup>metilguanin methyltransferase, after alkylation damage induced increase in urokinase activity. Inhibitor JNK didn't show significant inhibition of uPA activity in A1235 cells after alkylation damage. The experiments indicate the existence of complex pathways regulating urokinase activity, showing the cell type specificity.

(39 pages, 9 figures, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: uPA, cell line A1235, alkylation damage, JNK

Supervisor: Doc. dr. sc. Maja Matulić

Co-supervisor: Josip Madunić, dip. ing. biol.

Reviewers: Doc. dr. sc. Maja Matulić

Doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Substitute: Doc. dr. sc. Inga Marijanović

Thesis accepted: 6.10.2011.

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. PLAZMINOGENSKI AKTIVATOR .....	3
1.1.1. Urokinazni tip plazminogenog aktivatora .....	4
1.1.2. Tkivni tip plazminogenog aktivatora .....	5
1.1.3. Plazmin .....	6
1.2. UROKINAZNI INHIBITORI .....	7
1.2.1. Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-1 .....	7
1.2.1.1. Vitronektin .....	8
1.2.2. Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-2 .....	9
1.2.3. Proteaza neksin-1 .....	9
1.3. UROKINAZNI RECEPTOR .....	10
1.3.1. Internalizacija PAI-1-uPA-uPAR kompleksa .....	13
1.4. POLI-ADP-RIBOZILACIJSKA POLIMERAZA .....	14
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. MATERIJALI .....	16
3.1.1. Kultura stanica .....	16
3.1.2. Otopine i reagensi .....	16
3.1.3. Uređaji.....	18
3.1.4. Ostali materijali.....	18
3.2. METODE .....	19
3.2.1. Uzgoj stanica.....	19
3.2.2. Nasađivanje stanica.....	19
3.2.3. Kazeinoliza .....	19
3.2.3.1. Obrada i sakupljanje stanica.....	20
3.2.3.2. Određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda .....	20
3.2.3.3. Kazeinoliza.....	20
3.2.4. Komet-test.....	21
3.2.4.1. Obrada i sakupljanje stanica.....	21
3.2.4.2. Komet-test .....	22
3.2.5. Statistička obrada podataka.....	23

<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
4.1. UTJECAJ ALKILIRAJUĆEG AGENSA I INHIBITORA AKTIVNOSTI PARP-1 NA AKTIVNOST UROKINAZE U STANICAMA A1235 .....	24
4.2. VREMENSKA KRIVULJA INDUKCIJE UROKINAZE NAKON TRETIRANJA ALKILIRAJUĆIM AGENSOM U STANICAMA A1235.....	25
4.3. ODREĐIVANJE STUPNJA OŠTEĆENJA U STANICAMA A1235 .....	26
4.4. UTJECAJ ALKILIRAJUĆEG AGENSA NA AKTIVNOST UROKINAZE U STANICAMA PAŠ.....	28
4.5. UTJECAJ MAP-KINAZE JNK NA INDUKCIJU UROKINAZNE AKTIVNOSTI U STANICAMA A1235 .....	29
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>30</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>35</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>36</b>



**Mami i tati**

## 1. UVOD

Stanice su u višestaničnom organizmu okružene drugim stanicama, s kojima mogu biti bilo u direktnom kontaktu ili posredstvom međustaničnog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*), koji ispunjava prostor između njih. ECM čini složena mreža izlučenih ekstracelularnih makromolekula koje imaju mnoge uloge. Jedna od najvažnijih uloga je formiranje potporne strukture koja omogućava održanje stanica i tkiva zajedno, pokretanje i zaštitu. ECM čine specifični proteoglikani i proteini koje izlučuju okolne stanice. Ovisno o tipu tkiva u kojem se nalazi, ECM je građen od različitih tipova makromolekula organiziranih u različite oblike. Dva su glavna tipa makromolekula. Prvi su proteoglikani koji čine amorfnu tvar, velike molekule sastavljene od glikozaminoglikanskog polisaharidnog i proteinskog dijela. Drugi su fibrozni proteini poput kolagena, elastina, fibronektina i laminina koji doprinose strukturnim i adhezijskim funkcijama stanica. ECM nije inertan nosač stanica nego ima aktivnu i kompleksnu ulogu u ponašanju, preživljenju, razvoju, migraciji, proliferaciji, obliku i funkciji stanica (Alberts i sur. 2008).

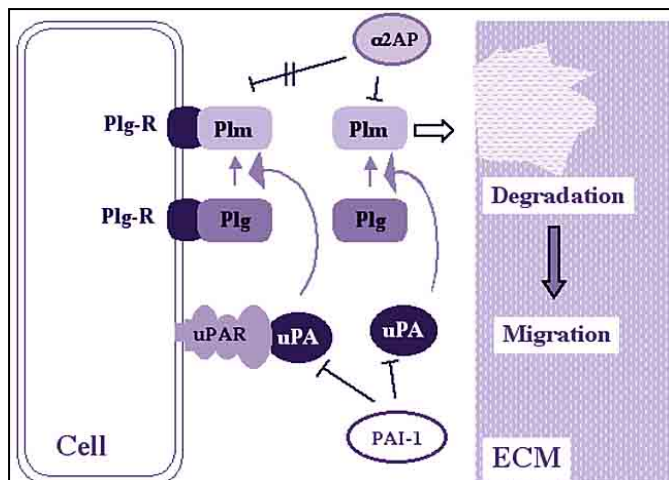
Pregradnja ECM je strogo regulirana, a susrećemo je u mnogim biološkim procesima, poput zaraščivanja rana, embriogeneze, obnavljanja stijenke uterusa nakon poroda, ovulacije, angiogeneze i metastaziranja, upalnih procesa i mnogih drugih. U pregradnji ECM sudjeluju ekstracelularni proteolitički enzimi, proteaze, koje kataliziraju hidrolitičko cijepanje peptidnih veza, a lokalno ih luče okolne stanice. Proteaze dijelimo u dvije velike skupine; matriksne metaloproteinaze koje za svoju aktivnost trebaju ione kalcija i cinka te serinske proteaze koje u svojem aktivnom mjestu imaju serin. Obje skupine proteaza degradiraju proteine matriksa kao što su kolagen, laminin i fibronektin (Alberts i sur. 2008).

Ekstracelularne proteaze imaju ulogu u normalnom tkivu u procesima remodeliranja tkiva, u raznim fiziološkim procesima i tijekom embriogeneze, a kod tumorskih stanica imaju ulogu u patološkim događanjima poput invazije i metastaziranja (Ghisso i sur. 1999). Glavna razlika između normalnih i patoloških događaja je kontrola i razina ekspresije proteaza. Proteaze povezane s invazivnošću tumorskih stanica su cisteinske i aspartatske proteaze poput katepsina L, B i D, metaloproteinaza i serinskih proteaza (plazminogeni aktivator, plazmin) (Ghisso i sur. 1999). U tumorima pluća, bubrega, želuca, ovarija, mozga, melanoma i raka dojke dokazana je

prekomjerna ekspresija urokinaznog plazminogenog aktivatora (uPA) koji je serinska proteaza (Ghisso i sur. 1999). Spomenute proteaze sudjeluju u pregradnji ECM za vrijeme različitih koraka metastatske kaskade. Sposobnost tumorskih stanica da ispolje invazivni fenotip ovisi o ravnoteži između proteaza i njihovih inhibitora. U nekoliko je eksperimenata dokazano da je kod humanih tumora ravnoteža između proteaza i njihovih inhibitora pomaknuta prema konstitutivnoj izvanstaničnoj proteolizi (velika količina proteaza/niska količina inhibitora) (Mueller i sur. 1995).

Jedan od proteolitičkih sustava koji ima veliku ulogu u fiziološkim i patološkim procesima u kojima dolazi do pregradnje ECM je sustav aktivacije plazminogena (sustav PA, engl. *plasminogen activation system*) (Slika 1). Taj sustav regulira pretvorbu plazminogena u plazmin, vrlo jaku ekstracelularnu proteazu koja cijepa proteine matriksa (npr. fibrin, trombin) i aktivira latentne matriksne metaloproteinaze. Sustav aktivacije plazminogena reguliran je na razini ekspresije urokinaznog i tkivnog tipa plazminogenog aktivatora (uPA i tPA), inhibitora plazminogenog aktivatora (PAI-1 i PAI-2) te receptora za uPA (uPAR) na površini stanice.

Svi ovi proteini imaju vrlo strogu regulaciju na razini ekspresije mRNA koja ovisi o raznim signalnim putevima u stanici. Osim toga, urokinaza se izlučuje iz stanice u obliku proenzima te se aktivira ekstracelularno, a dodatno se regulira vezanjem za svoj receptor i inhibitore. Sustav PA ima važnu ulogu u remodeliranju tkiva, ali i u procesima invazivnog rasta i metastaziranja tumora.



**Slika 1.** Shematski prikaz sustava aktivacije plazminogena. Aktivni plazmin (Plm, engl. *plasmin*) nastaje cijepanjem proenzima plazminogena (Plg, engl. *plasminogen*). Reakcija je katalizirana urokinaznim tipom plazminogenetskog aktivatora (uPA, engl. *urokinase-type plasminogen activator*). uPA može biti inhibiran inhibitorom plazminogenetskog aktivatora (PAI-1, engl. *plasminogen activator inhibitor*). Receptor plazminogena (Plg-R, engl. *plasminogen receptor*) veže plazminogen i plazmin istim afinitetom. Lokalizacija plazminogena na površini stanice olakšava njegovu aktivaciju pomoću uPA ili uPA vezanog na uPAR. Receptori plazminogena koncentriraju plazmin na površini stanice i olakšavaju degradaciju specifičnih supstrata plazmina. Plazmin vezan na receptor zaštićen je od svojih inhibitora,  $\alpha_2$ -antiplazmina i  $\alpha_2$ -makroglobulina (preuzeto iz Lopez-Alemaný i sur. 2005).

### 1.1. PLAZMINOGENSKI AKTIVATOR

Postoje dva tipa plazminogenetskog aktivatora: tkivni tip plazminogenetskog aktivatora (tPA) i urokinazni tip plazminogenetskog aktivatora (uPA). tPA je glavni plazminogenetski aktivator u plazmi, a ima važnu ulogu u intravaskularnoj fibrinolizi, ovulaciji i trombolizi (Conese i sur. 1995). uPA je uključen u proteolizu koja se događa za vrijeme invazije makrofaga, zacjeljivanja rana, embriogeneze, metastaziranja i invazivnosti tumorskih stanica. Općenito, uPA ima veću važnost u biologiji tumora, dok je glavna uloga tPA stvaranje plazmina za fibrinolizu krvnog ugruška (Conese i sur. 1995).

### 1.1.1. Urokinazni tip plazminogenog aktivatora

Urokinazni tip plazminogenog aktivatora (uPA) ekstracelularna je serinska proteaza veličine 55 kDa koja se izlučuje iz stanica kao jednolančani proenzim pro-uPA. Neaktivni pro-uPA prelazi u aktivni uPA cijepanjem jedne peptidne veze (Lys158-Ile159 kod humanog uPA). To cijepanje katalizira plazmin, ali i druge proteaze poput tripsina, faktora XIIa, katepsina G, katepsina B, katepsina L. pro-uPA ima 250 puta manju aktivnost od dvolančanog aktivnog uPA (Andreasen i sur. 2000).

Aktivni heterodimer uPA građen je od lanca A veličine 20 kDa na N-terminalnom kraju i lanca B veličine 34 kDa na C-terminalnom kraju, povezanih jednom disulfidnom vezom. U aktivnom uPA postoje četiri glavne domene: domena nalik faktoru rasta (GFD, engl. *growth factor domain*), domena „kringl“ i vezna regija u lancu A, te serin-proteazna domena (SPD, engl. *serine protease domain*) u lancu B. Funkcija domene GFD je vezanje uPA na uPAR na površini stanice. Domena „kringl“ stabilizira vezanje uPA na uPAR (Andreasen i sur. 2000). SPD je katalitički aktivno mjesto sa serin-proteaznom aktivnošću, a homologno je aktivnim mjestima drugih serinskih proteaza poput tripsina, plazmina, trombina. Aktivno mjesto uPA sadrži oksianionski prostor u kojem su najvažniji His<sup>99</sup> i Ser<sup>19</sup> koji sudjeluju u direktnom cijepanju peptidne veze supstrata (Alberts i sur. 2008).

Nakon što se pro-uPA izluči iz stanice, može se vezati na uPAR, a može ostati i slobodan. Aktivacija pro-uPA vezanog na uPAR na staničnoj površini puno je brža od aktivacije slobodnog pro-uPA (Andreasen i sur. 2000). Pro-uPA se može aktivirati i proteolitičkim cijepanjem neovisno o plazminu. Aktivacija plazminogena u plazmin je puno brža kada je aktivni uPA vezan na uPAR. Sposobnost uPAR da lokalizira proteolitičku aktivnost uPA na površini stanice izrazito je važna za invazivnost tumorskih stanica. Vezanjem uPA na uPAR stvara se signal koji utječe na transkripciju gena važnih za migraciju, proliferaciju i adheziju stanica. uPA tako može, pored regulacije proteolitičkog mehanizma na površini stanice utjecati i na prijenos signala i transkripciju gena (Andreasen i sur. 2000).

Enzimska aktivnost uPA regulirana je inhibitorima (PAI-1, PAI-2) koji se vežu na katalitički aktivan dio lanca B. Vezanje kompleksa PAI-1-uPA na uPAR potiče internalizaciju i degradaciju tog kompleksa (Näykjer 1997).

Gen *uPA* nalazi se na kromosomu 10, velik je 4,6 kb i sadrži 10 eksona. Transkripcija *uPA* gena nalazi se pod kontrolom slijeda TATA, unutar kojeg je minimalni promotor s veznim mjestima za Sp1, i pojačivača koji se nalazi -2 kb uzvodno (Benasciutti i sur. 2004). Za transkripciju je potrebna kooperacija između uzvodnog mjesta Ets/AP-1<sub>A</sub> i nizvodnog mjesta AP-1<sub>B</sub>, odvojenih regijom COM (engl. *cooperation mediator*) (Benasciutti i sur. 2004). Regija COM sadrži, uzvodnu regiju uCOM (engl. *upstream cooperation mediator*) i nizvodnu regiju dCOM (engl. *downstream cooperation mediator*), koje su važne za kooperaciju transkripcijskih faktora AP-1. Nizvodno od mjesta AP-1<sub>B</sub> nalazi se nekoliko veznih mjesta za NF-κB. Na oko -5,5 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije nalazi se drugo mjesto AP-1/Ets koje ima sinergistički učinak s mjestom Ets/AP-1<sub>A</sub> na -2 kb, čime se postiže potpuna transkripcija *uPA* gena (Nagamine i sur. 2005).

Mjesta AP1 na promotoru prepoznaju transkripcijski faktori porodice Jun koji mogu biti u obliku homodimera proteina Jun ili heterodimera Jun/Fos. Transkripcijski faktori koji se vežu na mjesta Ets/AP1 mogu biti aktivirani članovima MAP-kinazne obitelji. Sve se te kinaze aktiviraju različitim uzvodnim putevima (faktorima rasta, citokinima, osmotskim stresom, agensima koji oštećuju DNA).

Mjesta Ets/AP1 na promotoru *uPA* mete su signalnih kaskada potaknute npr. okadaičnom kiselinom, promjenom citoskeleta, faktorima rasta (npr. fibroblastnim faktorom rasta, FGF-2, engl. *fibroblast growth factor*), onkogenima (Her2/neu, v-Src, v-Ras), genotoksičnim agensima (ultraljubičasto zračenje, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidin), citokinima (TNF $\alpha$ , engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) (Nagamine i sur. 2005). FGF-2 putem signalnog puta Grb2/Sos1/Ha-Ras/c-Raf/MEK/ERK2 aktivira promotor *uPA*. Promjene citoskeleta djeluju na promotor *uPA* kroz signalni put FAK/Src/Ras/Erk. Sve ukazuje na to da je signalni put ERK važan u indukciji transkripcije *uPA* i da djeluje kroz vezanje na mjesta Ets/AP1, a induciran je različitim izvanstaničnim signalima. Za razliku od FGF-2 i TNF $\alpha$ , genotoksični stres uzrokovan UV i MNNG potiče transkripciju *uPA* putem signalnog puta JNK (Parra i sur. 2000).

### **1.1.2. Tkivni tip plazminogenog aktivatora**

Tkivni tip plazminogenog aktivatora (tPA, engl. *tissue plasminogen activator*) je serinska proteaza veličine 70 kDa koja katalizira pretvorbu jednolančanog proenzima plazminogena u

dvolančani aktivni plazmin. Baš kao i uPA, tPA se iz stanica izlučuje u jednolančanom obliku koji se može proteolitičkim cijepanjem jedne peptidne veze (Arg275-Ile276 u humanom tPA) pretvoriti u dvolančani oblik. Posljedica tog cijepanja je nastanak lanca A i lanca B povezanih jednom disulfidnom vezom. U dvolančanom tPA postoji nekoliko domena: fibronektinska domena tipa II, domena nalik faktoru rasta, dvije domene „kringle“ i serin-proteinazna domena (Andreasen i sur. 2000).

tPA je kodiran genom *PLAT* koji se nalazi na kromosomu 8, a naziva se i fibrinolitičkim enzimom. Aktivnost jednolančanog i dvolančanog tPA potaknuta je formiranjem fibrina. tPA se koristi u liječenju bolesti koje su nastale kao posljedica stvaranja krvnih ugrušaka, poput plućne embolije i srčanog udara (Conese i sur.1995).

### **1.1.3. Plazmin**

Plazminogen je jednolančani proenzim plazmina. Aktivni plazmin nastaje proteolitičkim cijepanjem jedne peptidne veze (Arg561-Val562 u humanom plazminogenu). Ovu reakciju specifično kataliziraju ili uPA ili tPA. Plazmin se sastoji od dva lanca (lanac A i lanac B) povezana s dva disulfidna mosta. U lancu A nalazi se pet domena „kringle“, a u lancu B serin-proteinazna domena (SPD) koja je odgovorna za katalitičku aktivnost plazmina (Andreasen i sur. 2000).

Plazmin katalizira hidrolizu peptidne veze na C-kraju Lys i Arg. Posljedica stvaranja aktivnog plazmina je degradacija različitih komponenti ECM kao što su fibronektin, lamini, kolagen (Andreasen i sur. 2000), a proteolitička kaskada uključuje i aktivaciju matriksnih metaloproteinaza (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13) odgovornih za degradaciju kolagena. Plazmin katalizira i aktivaciju latentnog transformirajućeg faktora rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ , engl. *transforming growth factor- $\beta$* ) i otpuštanje fibroblastnog faktora rasta (bFGF engl. *basic fibroblast growth factor*) s veznih mjesta na ECM. Osim što katalizira pretvaranje plazminogena u plazmin, uPA katalizira pretvorbu i neaktivnih jednolančanih oblika HGF/SF (engl. *hepatocyte growth factor/scatter factor*) i MSP (engl. *macrophage stimulating protein*) u njihove aktivne dvolančane oblike (Andreasen i sur. 2000).

Na stanicama se nalaze receptori plazminogena koji koncentriraju plazmin na površini stanice i olakšavaju proteolizu potaknutu plazminom.  $\alpha_2$ -antiplazmin i  $\alpha_2$ -makroglobulin su serumski inhibitori plazmina. Plazmin vezan na receptor zaštićen je od tih inhibitora.

## 1.2. UROKINAZNI INHIBITORI

Postoje tri specifična urokinazna inhibitora: inhibitor plazminogenog aktivatora tip-1 (PAI-1, engl. *plasminogen activator inhibitor-1*), inhibitor plazminogenog aktivatora tip-2 (PAI-2, engl. *plasminogen activator inhibitor-2*) i proteaza neksin-1 (PN-1, engl. *protease nexin-1*). Inhibitori pripadaju porodici serpina (engl. *serine proteinase inhibitor*). Za inhibitornu aktivnost serpina najbitnija je omča RCL (engl. *reactive center loop*) koja se nalazi na njihovoj površini. RCL stvara kovalentnu vezu s aktivnim mjestom proteaze pri čemu nastane stabilni kompleks između inhibitora i proteaze. Jedna molekula inhibitora inhibira jednu molekulu proteaze (Andreasen i sur. 2000).

### 1.2.1. Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-1

Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-1 (PAI-1) je jednolančani glikoprotein veličine 50 kDa. Najučestaliji je urokinazni inhibitor u plazmi. Primarno ga proizvode endotelne stanice, ali i drugi tipovi stanica. Reaktivni centar (Arg346/Met347) nalazi se unutar omče RCL (Andreasen i sur. 2000). PAI-1 se naziva još „inhibitorom samoubojicom“ jer djeluje ireverzibilno. PAI-1 inhibira tPA, uPA, ali ne pro-uPA, a razlikuje se od drugih članova iz porodice serpina ( $\alpha$ -antitripsina,  $\alpha$ -antiplazmina, antitrombina III) jer može postojati u aktivnom i inaktivnom (latentnom) stanju. Po završetku sinteze, PAI-1 se ne skladišti nego se brzo luči iz stanice. Iz stanica se luči u aktivnom obliku, ali je izrazito nestabilan i brzo prelazi u latentni oblik osim ako se aktivni oblik ne stabilizira vezanjem na vitronektin. Iz inaktivnog oblika može se pretvoriti u aktivni oblik pomoću denaturanata i drugih molekula koje izazivaju konformacijske promjene u proteinima (natrij dodecil sulfat, guanidin, klorovodik, urea) (Lambers i sur. 1987). Dokazano je da u aktivaciji PAI-1 sudjeluju negativno nabijeni fosfolipidi (fosfatidilserin i fosfatidilinozitol), dok fosfolipidi bez naboja, nemaju utjecaja na aktivaciju PAI-1 (Lambers i sur. 1987). Većina PAI-1 u krvi je u aktivnom obliku i cirkulira u kompleksu s vitronektinom koji djeluje kao njegov kofaktor.



Gen za PAI-1, *SERPINE1* nalazi se na dugom kraku kromosoma 7 (7q21.3- q22), velik je 12,2 kb i sadrži 9 egzona. Sinteza PAI-1 može biti inducirana brojnim faktorima rasta, citokinima, hormonima, hipoksijom. TGF- $\beta$ , EGF (engl. *epidermal growth factor*), bFGF, TNF- $\alpha$ , kortikosteroidi, inzulin, estradioli, interleukin-1 samo su neke od različitih molekula koje reguliraju sintezu PAI-1 (Nagamine i sur. 2005). U kontrolu ekspresije gena PAI-1 uključeno je nekoliko signalnih puteva, put protein kinaze C (PKC), put MAP-kinaza, put fosfatidilinozitol-3-kinaza/protein kinaza B (PI3-K/PKB) (Nagamine i sur. 2005).

PAI-1 vezan na vitronektin je aktivan i može inhibirati aktivaciju plazminogena kroz inhibiciju uPA. PAI-1 inhibira migraciju stanica koja je potaknuta stvaranjem plazmina (Andreasen i sur. 2000). PAI-1 u nekim staničnim linijama inhibira, a u nekim stimulira migraciju stanica ovisnu o integrinima. Ta dva suprotna efekta možda su povezana s mogućnošću PAI-1 da inhibira vezanje integrina na vitronektin. Moguće je da uPA regulira migraciju stanica tako da stvara kompleks s PAI-1 koji tada nije više u mogućnosti inhibirati vezanje integrina na vitronektin.

PAI-1 pokazuje drugačiji utjecaj na invazivnost stanica u različitim staničnim linijama, npr. inhibira ovaj proces kod stanica karcinoma pluća, dok kod stanica karcinoma prostate nema utjecaj (Andreasen i sur. 2000). Visoke razine PAI-1 štite ECM od proteolize posredovane plazminom, pa se na taj način inhibira invazivnost. Utjecaj PAI-1 na invazivnost ovisi i o drugim komponentama sustava PA, o receptorima za endocitozu, integrinima te strukturi ECM.

Danas se razina PAI-1 može koristiti kao prognostički marker u humanim malignim tumorima. Povišena koncentracija PAI-1 povezana je sa slabom prognozom preživljenja pacijenata (Andreasen i sur. 2000). Sve ukazuje na to da PAI-1 ima i drugu ulogu osim inhibiranja uPA. Trenutno nije poznata točna uloga PAI-1 u biologiji tumora: neki znanstvenici predlažu da PAI-1 sudjeluje u migraciji i invaziji inhibirajući uPA, dok neki smatraju da je PAI-1 potreban za optimalno funkcioniranje uPA sustava u tim procesima, regulirajući adheziju stanica te vremenski i prostorno ograničavajući proteolizu.

#### ***1.2.1.1. Vitronektin***

Vitronektin (VTN) je glikoprotein prisutan u plazmi i ECM. Kodiran je genom *VTN*, veličine 5,3 kb. Pripada proteinima iz obitelji peksina. Nakon sinteze se luči iz stanice. Postoji u

jednolančanom i dvolančanom obliku. Jednolančani oblik vitronektina prelazi u dvolančani cijepanjem na mjestu Arg379 (Andreasen i sur. 2000). Lanci su povezani disulfidnom vezom. Oba oblika vitronektina jednako su zastupljena.

Na vitronektinu se nalazi domena SomB (engl. *Somatomedin B*) kojom se veže na PAI-1 i uPAR, koji se natječu za mjesto vezanja. Vitronektin stabilizira PAI-1 i tako sudjeluje u regulaciji proteolize inducirane aktivacijom plazminogena. Zbog mogućnosti vezanja na uPAR, vitronektin ima ulogu u migraciji stanica i prijenosu signala unutar stanice (Habermann i sur. 1993). Vitronektin se veže na integrine ( $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  i  $\alpha 8\beta 1$ ) pomoću sekvence RGD (Arg-Gly-Asp). PAI-1 i integrini natječu se za vezanje na vitronektin (Habermann i sur. 1993).

### **1.2.2. Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-2**

Inhibitor plazminogenog aktivatora tip-2 (PAI-2) veličine 50 kDa poznat je kao placentalni inhibitor plazminogenog aktivatora. Kodiran je genom *PLANH2*, a budući da pripada porodici serpina, naziva se i Serpin B2. Za razliku od PAI-1, PAI-2 se može akumulirati unutar stanice. Pohranjeni PAI-2 je u neglikoziliranom obliku (47 kDa), dok je sekretirani oblik glikozilirani (60 kDa) (Andreasen i sur. 2000).

PAI-2 je jedan od primarnih regulatora aktivacije plazminogena. Može inhibirati oba plazminogena aktivatora, uPA i tPA. Reagira s njima puno sporije, ali efikasnije nego PAI-1. Unutar stanice PAI-2 ima različite uloge, može utjecati na ekspresiju gena, na proliferaciju i diferencijaciju stanica te inhibirati apoptozu. PAI-2 je faktor preživljenja koji regulira unutarstanične razine tumor supresorskog proteina Rb (Darnell i sur. 2003), inhibira invazivnost i metastaziranje tumorskih stanica (Mueller i sur. 1995).

### **1.2.3. Proteaza neksin-1**

Proteaza neksin-1 (PN-1, engl. *protease nexin-1*) je glikoprotein veličine 44 kDa poznat kao Serpin E2. Luče ga glija stanice i fibroblasti. PN-1 može inhibirati široki spektar serinskih proteaza, ali preferira vezanje na trombin, urokinazu, tripsin i plazmin. PN-1 stvara kovalentne komplekse s ciljnim proteazama, a za stanice se veže pomoću specifičnih receptora. Poznata su dva oblika proteaze neksin-1: PN-1 $\alpha$  i PN-1 $\beta$ . PN-1 ima ulogu u strukturnim promjenama

centralnog živčanog sustava, a vjerojatno ima i zaštitnu ulogu od serinskih proteaza. PN-1 sintetiziraju mišići, a lokaliziran je na području neuromuskularne sinapse. Zbog mogućnosti inhibicije aktivacije plazminogena, moguće je da sudjeluje i u regulaciji razvoja mišića (Conese i sur. 1995).

### 1.3. UROKINAZNI RECEPTOR

Urokinazni receptor (uPAR) je izrazito glikozilirani protein veličine 55-60 kDa. Pripada obitelji glikoproteina Ly-6, a sadrži 5 potencijalnih glikozilacijskih mjesta. Glikozilacija je potrebna za unutarstanični transport i sazrijevanje receptora, a može utjecati i na afinitet uPAR za uPA (Conese i Blassi, 1995).

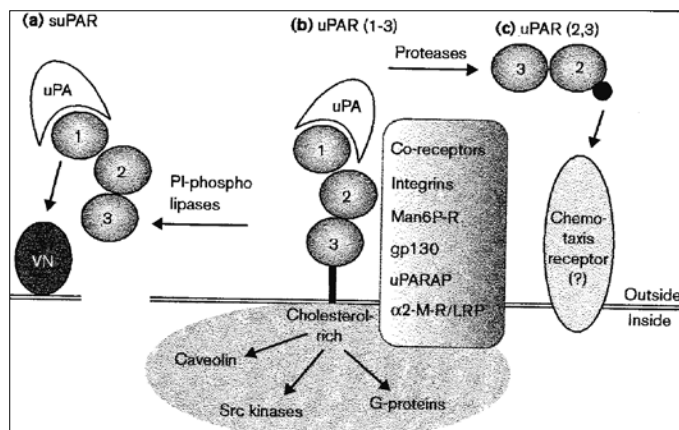
uPAR je građen od tri homologne domene (domena 1, domena 2 i domena 3), a u vanjski sloj plazma membrane usidren je pomoću glikozil-fosfatidil inozitola (GPI), koji se može pocijepati s GPI specifičnom fosfolipazom (Andreasen i sur. 2000). Zbog vezanja putem GPI, uPAR ima veliku lateralnu mobilnost u plazma membrani i agregira s drugim proteinima na mjestima lipidnih splavi (dijelovima membrane bogatim glikosfingolipidima, kolesterolom i signalnim molekulama). U nekim stanicama uPAR se nalazi u invaginacijama plazma membrane koje sadrže kaveolin, tzv. kaveolama.

uPAR je eksprimiran na površini brojnih stanica (leukociti, endotelne glatke mišićne stanice, fibroblasti). Ekspresija gena *uPAR* potaknuta je tumorskim promotorima, faktorima rasta, citokinima, hormonima, hipoksijom (Preissner i sur. 2000). Razina ekspresije uPAR u korelaciji je sa sposobnošću migracije i invazivnošću stanica.

uPA, vitronektin i kininogen su izvanstanični proteini koji se mogu vezati na uPAR. pro-uPA i uPA se vežu visokim afinitetom na uPAR. Ovim vezanjem uPAR usmjeruje uPA aktivnost na površinu stanice, dozvoljavajući reguliranu proteolizu ovisnu o staničnom površinskom plazminu. uPA se veže na uPAR pomoću omega omče koja se nalazi unutar domene GFD (engl. *growth factor domain*) (Andreasen i sur. 2000). Domena 1 najvećim udjelom sudjeluje u stvaranju veznog mjesta za uPA. Domena 3 i domena 2 povećavaju afinitet domene 1 za uPA (Andreasen i sur. 2000).

uPA povećava afinitet uPAR za vezanje slobodnog multimernog vitronektina. Budući da su vezna mjesta za uPAR i PAI-1 u neposrednoj blizini na vitonektinu, PAI-1 može spriječiti vezanje vitronektina na uPAR (Preissner i sur. 2000).

uPAR može imati tri oblika (Slika 2). Prvi oblik je intaktni oblik sa sve tri domene, usidren u plazma membranu pomoću GPI (Slika 2b). Drugi oblik uPAR nastane kada se GPI pocijepa fosfatidilinozitol-fosfolipazom (PI-fosfolipaza) (Slika 2a). Treći oblik se stvara proteolizom unutar uPAR u prisustvu uPA ili drugih proteaza (Slika 2c).

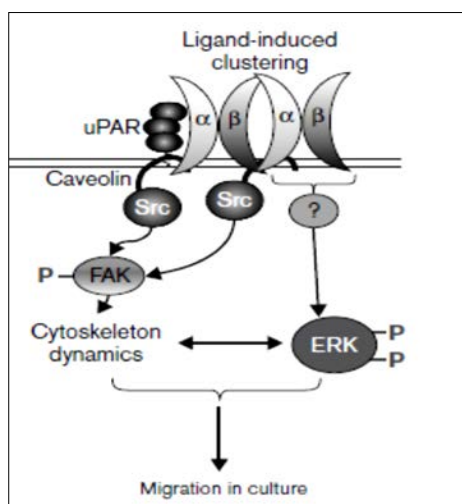


**Slika 2.** Shematski prikaz povezivanja uPAR s drugim proteinima na površini stanice. (b) Intaktni oblik uPAR ima ulogu receptora za uPA, vitronektin i kininogen. Ovisno o tipu stanice, uPAR može biti u interakciji s transmembranskim molekulama poput integrina,  $\alpha 2$ -makroglobulin-receptor/LRP ( $\alpha 2$ -MR/LRP), receptora manoz-6-fosfata (Man6P-R), glikoproteina 130 (gp 130) i uPAR-asociranih proteina (uPRAP). Takav oblik uPAR nalazi se u lipidnim splavima ili kaveolama. (a) PI-fosfolipaza može pocijepati GPI pa se uPAR otpušta s površine stanice i u kompleksu s uPA može se vezati na stanicu ili vitronektin. (c) Treći oblik uPAR je konformacijski promijenjen i nedostaje mu domena 1. Takav oblik uPAR se može vezati na kininogen, ali se ne veže na vitronektin i uPA. Tako promijenjeni receptor možda prepoznaje neki, za sada nepoznati, ligand ili kemotaksični receptor (preuzeto iz Preissner i sur. 2000).

Postoje brojni dokazi koji podupiru činjenicu da uPAR ima i druge funkcije osim one da olakšava aktivaciju plazminogena na površini stanice. Prvi nagovještaj tome su bili pokusi na humanim

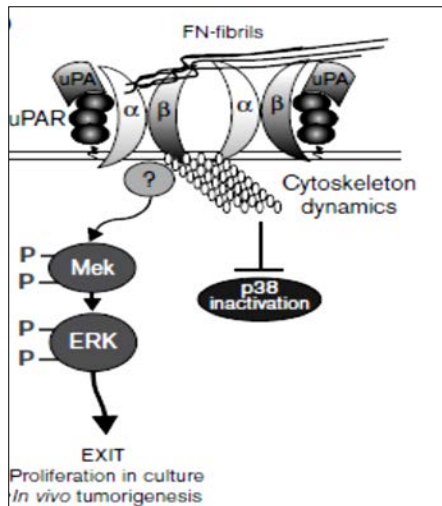
mijeloidnim stanicama HL60 u kojima je dokazano da uPAR ima ulogu u adheziji stanica (Ossowski i sur. 2000).

Stahl i suradnici (1994) dokazali su da uPAR kroz transmembransko signaliziranje stimulira migraciju stanica. Za pokretanje signaliziranja potrebna je konformacijska promjena na uPAR. Posljedica konformacijske promjene vjerojatno je izlaganje neke regije koja je potrebna za kontakt s adaptorskim proteinima koji dalje prenose signale. Poznato je da se obitelji integrina  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 3$  vežu na uPAR dok su vezani za specifične ligande ECM. Predložena su dva modela koja objašnjavaju vezanje između uPAR i integrina (Slika 3). U oba modela integrini vezanjem liganda ECM stvaraju nakupine i nakon toga se vežu na uPAR. Nakupine integrina sadrže samo nekoliko molekula uPAR jer bi velike količine uPAR inhibirale funkciju integrina. Ovi modeli predloženi su za stanice u kojima je eksprimiran kaveolin.



**Slika 3.** Hipotetski model za uPA-uPAR potaknutu signalnu kaskadu u stanicama koje imaju kaveolin. Prvi model predlaže mehanizam ovisan o kaveolinu. Nakupine integrina, stvorene vezanjem liganda, potiču oligomerizaciju kaveolina koja uzrokuje otpuštanje i aktivaciju kinaze Src. U isto vrijeme uPAR se pomiče prema kompleksu integrin-kaveolin-Src kinaza i „obogaćuje“ taj kompleks signalnim molekulama te stimulira funkciju integrina. Dolazi do aktivacije FAK i ERK koje je zajedno sa promjenama citoskeleta utječu na migraciju stanica ovisnu o matriksu. Drugi model predlaže mehanizam neovisan o kaveolinu. U ovome modelu još uvijek nije poznata molekula koja bi umjesto kaveolina potaknula aktivaciju nizvodnih signalnih puteva (preuzeto iz Ossowski i sur. 2000).

Novija istraživanja na tumorskim stanicama Hep3 pokazala su da te stanice imaju visoku razinu ekspresije uPAR, da su snažno adherirane na fibronektin i ne ekspimiraju kaveolin. Stoga je predložen i drugi model za uPAR signaliziranje u stanicama koje nemaju ekspimiran kaveolin. U ovome modelu prekomjerno ekspimiran uPAR putem integrina stvara mitogeni signal koji regulira dva suprotna signalna puta: aktivira put ERK i inhibira put p38<sup>MAPK</sup>. U takvim uvjetima ravnoteža je pomaknuta prema putu ERK i kad se postigne određena aktivnost tog puta, tumorske stanice počinju proliferirati *in vivo* (Slika 4) (Ossowski i sur. 2000).



**Slika 4.** Hipotetski model za uPA-uPAR potaknutu signalnu kaskadu u stanicama koje nemaju kaveolin. Kompleks uPA-uPAR- $\alpha\beta$ 1 veže fibronektin nakon čega nastanu fibrile fibronektina i potakne se unutarstanična signalizacija. Kompleks uPA-uPAR- $\alpha\beta$ 1-FN-fibril, neovisno o kaveolinu, aktivira put Mek/ERK. Nepoznatim putem inhibira se put p38<sup>MAPK</sup> (preuzeto iz Ossowski i sur. 2000).

Dokazano je da interakcije između uPA, uPAR i integrina aktiviraju signalne puteve, migraciju, adheziju, diferencijaciju te ekspresiju gena (Ossowski i sur. 2000).

### 1.3.1. Internalizacija PAI-1-uPA-uPAR kompleksa

Aktivni uPA ili pro-uPA vezan na uPAR se ne internalizira nego ostaje vezan na površini stanice. Kada je uPA u kompleksu s PAI-1 ili PN-1 vezan na uPAR, tada dolazi do internalizacije i njihove degradacije u lizosomima. Za internalizaciju su potrebni transmembranski LDL-receptori lipoproteina:  $\alpha$ 2MR-LRP (engl.  *$\alpha$ 2-makroglobulin receptor/low density lipoprotein*

*receptor-related protein*), glikoprotein 130 ili receptor VLDL (Andreasen i sur. 2000). Kompleks uPA-PAI-1-uPAR mora biti u interakciji s receptorima jer je uPAR usidren u vanjski sloj plazma membrane i nema transmembransku domenu kojom bi bio u doticaju s citoplazmom. uPAR se internalizira zajedno s kompleksom uPA-serpin. Kompleks uPA-serpin se razgrađuje u lizosomima. Internalizirani uPAR se ne degradira nego se reciklira i vraća natrag na površinu stanice (Näykjer 1997).

#### 1.4. POLI-ADP-RIBOZILACIJSKA POLIMERAZA

Poli-ADP-ribozilacijska polimeraza (PARP, engl. *poly(ADP-ribose)polymerase*) je posttranslacijski enzim koji sudjeluje u poli(ADP-ribozil)aciji proteina. PARP katalizira sintezu poli-ADP-riboze na aminokiselinskim ostacima. U ovoj se reakciji ADP-riboza prenosi s nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) na ciljni protein ili DNA. Sintetizirani poli-ADP-ribozni lanci imaju negativan naboj i mogu promijeniti funkciju proteina (Diefenbach i Bürkle 2005).

PARP-1 je najistraživaniji član obitelji PARP, a sudjeluje u apoptozi, nekrozi, transkripciji gena i popravku oštećenja molekule DNA. Ova se polimeraza aktivira kod oštećenja DNA prilikom nastanka jednolančanih i dvolančanih lomova (Diefenbach i Bürkle 2005). PARP-1 čini strukturu kromatina rahlijom i regrutira enzime popravka molekule DNA. Na aktivnost PARP-1 utječu i drugi signali osim oštećenja DNA, poput faktora rasta, citokina i hormona. Dokazano je da PARP-1 ne utječe na transkripciju gena samo putem poli(ADP-ribozil)acije proteina nego i direktnim vezanjem na regulatorne dijelove gena (Krishnakumar i sur 2010). Proces poli(ADP-ribozil)acije je uključen i u regulaciju sinteze uPA (Chevanne i sur. 2005).

PARP-1 katalizira oslobađanje faktora indukcije apoptoze (AIF, engl. *apoptosis-inducing factor*) iz mitohondrija. Na taj način sudjeluje u apoptozi neovisnoj o kaspazama. PARP-1 se za vrijeme apoptoze pocijepa kaspazama 3 i 7 jer bi u suprotnom iscrpio energiju (ATP i  $\text{NAD}^+$ ) u stanici i pokrenuo proces nekroze (Diefenbach i Bürkle 2005).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Stanice glioblastoma A1235 su tumorske stanice koje su osjetljive na oštećenje alkilirajućim agensima, poput N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). U tim je stanicama inhibirana aktivnost enzima popravka, O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaze (Brdar 1986). Kao posljedica oštećenja DNA, kod ovih stanica dolazi do povećanja urokinazne aktivnosti. S druge strane, alkilirajuće oštećenje može aktivirati usporedan sustav enzima PARP-1 koji omogućuje popravak lomova DNA.

Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje mehanizma regulacije sustava plazminogenske aktivacije kod stanica glioblastoma A1235, nakon alkilacijskog oštećenja. Željela sam ispitati je li poli(ADP-ribozil)acija uključena u proces indukcije urokinazne aktivnosti nakon staničnog oštećenja i postoji li korelacija indukcije aktivnosti uPA sa stupnjem oštećenja DNA. Drugi mi je cilj bio utvrditi je li proces indukcije urokinazne aktivnosti nakon alkilacijskog oštećenja povezan s aktivacijom MAP-kinaze JNK.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kultura stanica

U istraživanju sam koristila stanice humanog glioblastoma A1235 i njihov soj PAŠ.

Stanice A1235 su tumorske stanice koje su osjetljive na oštećenje alkilirajućim agensima, budući da im je inhibirana aktivnosti enzima popravka, O<sup>6</sup>-metilguanin-DNA metiltransferaze.

Stanice PAŠ su soj stanica A1235 koje su stabilno transficirane plazmidom pEGFP-hPARP-1 (donacija prof. Valérie Schreiber, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 67412 Illkirch Cedex, France).

##### 3.1.2. Otopine i reagensi

- fetalni teleći serum (FBS, engl. *fetal bovine serum*) (Sigma, SAD)
- Dulbeccov modificirani Eaglov medij za uzgoj stanica (DMEM engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Sigma, SAD)  
za 500 mL kompletnog medija:
  - 500 mL DMEM
  - 50 mL FBS
- 0,25 % tripsin (Sigma, SAD)
- fosfatni pufer (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) bez Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (pH 7,3):
  - 137 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>
  - 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>
- fiziološka otopina (0,9 % NaCl otopljen u destiliranoj vodi)
- 3-aminobenzamid (3-ABA, engl. *3-aminobenzamide*) (Sigma, SAD) (0,3 M matična otopina u 96 % etanolu)
- N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidin (MNNG, engl. *N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine*) (10 mM matična otopina u 96 % etanolu)

- 30 % vodikov peroksid ( $H_2O_2$ , Kemika, Zagreb)
- Bradford reagens
  - za 100 mL:
    - 10 mg Coomasie brilliant blue G- 250
    - 5 mL 95 % EtOH
    - 10 mL 88 %  $H_3PO_4$
    - nadopuniti do 100 mL  $dH_2O$
- agaroz (Sigma, SAD)
- Tris (1M, pH 7,5)
- lizin (Sigma, SAD) (matična otopina 100 mM u 0,1 M Tris pH 7,5)
- humani plazminogen (Sigma, SAD) (20 mg/mL u 20 mM otopini lizina)
- kazein (8 % otopina u destiliranoj vodi)
- Na-azid (1 % otopina u vodi)
- dimetil sulfoksid (DMSO, engl. *dimethyl sulfoxide*) (Sigma, SAD)
- SP600125; antrapirozolon (engl. *anthrapyrazolon*) (Sigma, SAD) (matična otopina 100 mM u DMSO)
- pufer za lizu stanica (za kazeinolizu):
  - 20 mM Tris (pH 7,5) (Kemika, Zagreb)
  - 137 mM NaCl (Kemika, Zagreb)
  - 2 mM EDTA (pH 7,4) (Kemika, Zagreb)
  - 1 % TRITON X-100 (Kemika, Zagreb)
  - 10 % glicerol (Kemika, Zagreb)
- pufer za lizu stanica (za komet-test), pH 10:
  - 2,5 M NaCl (Kemika, Zagreb)
  - 100 mM EDTA (Kemika, Zagreb)
  - 10 mM Tris-HCl (Kemika, Zagreb)
  - 1 % TRITON X-100 (Kemika, Zagreb)
  - 10 % DMSO (Sigma, SAD)
- pufer za elektroforezu (za komet-test), pH > 13
  - 10 mM NaOH (Kemika, Zagreb)
  - 200 mM EDTA (Kemika, Zagreb)

- etidij bromid (10 µg/mL) (Sigma, SAD)

### **3.1.3. Uređaji**

- kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Heraeus, Njemačka)
- inkubator za uzgoj stanica pri 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> (Heraeus, Njemačka)
- vakuumska sisaljka
- invertni svjetlosni mikroskop (Zeiss, Njemačka)
- centrifuga (Hettich, Njemačka)
- brojač stanica (Coulter Counter, Beckman, SAD)
- spektrofotometar (Unicam, Engleska)
- tresilica (IKA, Njemačka)
- vodena kupelj (Julabo, Engleska)
- mikrovalna pećnica
- termoblok (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za elektroforezu (Amersham, Engleska)
- fluorescencijski mikroskop (Opton, Japan)

### **3.1.4. Ostali materijali**

- petrijevke za uzgoj kulture stanice (TTP, Švicarska)
- ploča za stanične kulture s 24 bunarića (TTP, Švicarska)
- staklene pipete
- mikropipete (Gilson, SAD)
- nastavci za mikropipete
- mikroeprevete
- plastične epruvete volumena 15 mL (TTP, Švicarska)
- pinceta
- strugalica
- predmetna i pokrovna stakalca
- filter papir (3mm, Millipore)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice A1235 uzgajala sam u petrijevkama srednje veličine ( $\emptyset$  5 cm) u mediju DMEM koji sadržava FBS u konačnoj koncentraciji 10 %. Stanice su rasle u inkubatoru, u atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  pri 37°C. Prije presađivanja, konfluentnost stanica sam provjerila pod invertnim mikroskopom. Stanice sam presađivala kad bi postigle 80-90 % konfluentnosti. Iz petrijevke bih prvo odsisala stari medij, a potom stanice isprala s 2 mL PBS da uklonim ostatke seruma koji može inhibirati aktivnost tripsina. Nakon toga, stanicama sam dodala 0,5 mL 0,25 % tripsina i vratila ih nazad u inkubator na 5 do 10 minuta. Odvajanje stanica od podloge pratila sam pod invertnim mikroskopom. Nakon odvajanja stanica od podloge, djelovanje tripsina neutralizirala sam dodavanjem 3,5 mL medija FBS. U srednju petrijevku sam nasadila 0,5 mL stanične suspenzije u 1,5 mL svježeg medija. Stanice sam pustila da rastu u inkubatoru, u atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  pri 37°C. Na ovaj sam način održavala staničnu kulturu.

### 3.2.2. Nasađivanje stanica

Da bih nasadila odgovarajući broj stanica za pojedini pokus, stanice sam prije nasađivanja izbrojala na brojaču stanica. Tripsinizirane stanice sam resuspendirala u 3,5 mL medija s 10 % FBS. 0,5 mL stanične suspenzije sam pomiješala s 9,5 mL fiziološke otopine i stavila u brojač stanica. Volumen stanične suspenzije koji sam nasađivala, izračunala sam prema formuli:

$$V_1 \times c_1 = V_2 \times c_2;$$

gdje je  $V_1$  = volumen stanične suspenzije koji nasađujemo,  $c_1$  = početna koncentracija,  $V_2$  = konačni volumen,  $c_2$  = konačna koncentracija.

Stanice sam nasadila u broju ovisnom o eksperimentu. Stanice sam ostavila da rastu 24 sata u inkubatoru u atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  pri 37°C.

### 3.2.3. Kazeinoliza

Kazeinoliza je metoda pomoću koje sam određivala izvanstaničnu aktivnost uPA u stanicama A1235. Izvedba same metode je relativno brza i jednostavna. Kazeinoliza se izvodi na kazeinskoj ploči koja sadrži supstrat za uPA (plazminogen) i plazmin (kazein). uPA cijepa plazminogen u plazmin, a on razgrađuje kazein što se vidi u obliku koncentričnih plakova na kazeinskoj ploči.

### ***3.2.3.1. Obrada i sakupljanje stanica***

U svakom sam eksperimentu nasadila odgovarajući broj petrijevki s određenim brojem stanica. Stanice sam tretirala s različitim koncentracijama (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) alkilirajućeg agensa (MNNG) i u kombinaciji s 3 mM 3-ABA (inhibitor PARP-1) i 10  $\mu$ M SP600125 (inhibitor JNK). Kombinacije MNNG, 3-ABA i SP600125 ovisile su o eksperimentu. Svi su tretmani napravljeni u duplikatu. Nakon određenog vremena inkubacije, stanice sam isprala i medij im zamijenila s 500  $\mu$ L medija bez seruma, uz dodatak specifičnih inhibitora. Stanice su zatim ostavljene rasti još 6 sati u mediju bez seruma. Nakon tog razdoblja sakupljen je stanični kondicionirani medij, a stanice lizirane. Medij sam centrifugirala 7 minuta na 3500 rpm u centrifugi prethodno ohlađenoj pri 4°C. Supernatant sam pohranila pri -80°C. Supernatant sam koristila za ispitivanje proteolitičkih sposobnosti kazeinolizom, budući da sadrži uPA i PAI koje stanice izlučuju.

Stanice sam lizirala sa 100  $\mu$ L pufera za lizu, a potom ih sastrugala sa površine petrijevke. Radi se na ledu kako ne bi došlo do razgradnje proteina. Uzorke sam pohranila pri -80°C. Lizati se koriste za određivanje koncentracije proteina.

### ***3.2.3.2. Određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda***

Stanične lizate koristila sam kao proteinski ekstrakt za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda. Ova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini 595 nm. U 5  $\mu$ L uzorka proteinskog ekstrakta prvo sam dodala 95  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, a zatim 1 mL otopine Bradford. Uzorke sam vorteksirala prije mjerenja. Koncentraciju proteina u svakom uzorku odredila sam pomoću baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina poznatih koncentracija u rasponu od 1  $\mu$ g/mL do 10  $\mu$ g/mL. Koncentraciju proteina sam koristila za normalizaciju vrijednosti urokinaze.

### ***3.2.3.3. Kazeinoliza***

Za test kazeinolize, bilo je potrebno napraviti kazeinsku ploču koja je sadržavala supstrat za uPA iz kondicioniranog medija. Ploča je napravljena od: 5 mL 2 % agaroze, 2 mL PBS, 3 mL 8 % kazeina, 10  $\mu$ L 10 % Na-azida i 10  $\mu$ L humanog plazminogena (~8 mg/ml). Sastojke sam

pomiješala u vodenoj kupelji prethodno zagrijanoj pri 45°C. Smjesu sam izlila u veliku petrijevku. Ploču sam ostavila otprilike 40 minuta da se ohladi i stvrdne. Na kazeinskoj ploči sam zatim izbušila rupice i u svaku rupicu dodala po 5 µL uzorka. Svaki uzorak na ploču je dodan u duplikatu što znači da je pojedini tretman ispitan u kvadripletu. Na ploču sam dodala četiri uzorka urokinaze poznatih koncentracija, u rasponu od 100 mU do 0,1 mU. Uzorci urokinaze poznatih koncentracija služili su mi za izradu baždarne krivulje aktivnosti urokinaze. Ploču s nanesenim uzorcima omotala sam aluminijskom folijom i stavila u inkubator pri 37°C.

Uzorci difundiraju iz svojih jažica u okolnu ploču. Ovisno o koncentraciji uPA i PAI, plazminogen se cijepa u plazmin, a on razgrađuje kazein što je vidljivo u obliku koncentričnih krugova oko svake jažice. Ti su krugovi svjetliji od ostatka urokinazne ploče.

Nakon 24 sata oko svake jažice se vide koncentrični krugovi gdje je razgrađen kazein. Mjeri im se promjer i uspoređuje s vrijednostima urokinaze na baždarnoj krivulji.

#### **3.2.4. Komet-test**

Komet test ili mikroelektroforeza pojedinačnih stanica u agaroznom gelu djelotvorna je tehnika za brzo otkrivanje oštećenja u molekuli DNA. U ovome testu stanice se uklapaju u mikrogel agaroze. U stanici se liziraju citoplazma i membranske strukture te se oslobađa ukupna DNA. Ona se zatim denaturira u alkalnom ili neutralnom puferu i podvrgava elektroforezi tijekom koje fragmenti DNA nastali jednonlančanim ili dvolančanim lomovima putuju kroz pore gela prema pozitivno nabijenoj anodi. Jezgre pri tome gube svoj cjelovit oblik i prelaze u strukturu nalik kometu. Sposobnost migriranja DNA fragmenata iz središta jezgre u rep kometa ovisi o veličini DNA fragmenata te o broju lomova. Povećanjem broja lomova, fragmenti DNA sve slobodnije migriraju u rep kometa pa se on povećava razmjerno s oštećenjem molekule DNA. Jačina oštećenja molekule DNA direktno je proporcionalna veličini repa.

##### **3.2.4.1. Obrada i sakupljanje stanica**

Stanice sam uzgajala na ploči za staničnu kulturu s 24 bunarića. Stanice sam tretirala alkilirajućim agensom (MNNG) i inhibitorom PARP-1 (3-ABA). Nakon 24 sata inkubacije, stanice sam sakupila tripsinizacijom i isprala ih sa PBS puferom. Stanice sam centrifugirala 10

minuta na 1200 rpm u prethodno ohlađenoj centrifugi pri 4°C. Talog stanica sam resuspendirala u 60 µL PBS pufera.

#### **3.2.4.2. Komet-test**

Postoji nekoliko izvedbi komet-testa ovisno o pH uvjetima. Koristila sam alkalnu izvedbu komet-testa,  $\text{pH} \geq 13$ , koja detektira (ali ne razlikuje) jednolančane i dvolančane lomove, alkalno-labilna mjesta, mjesta zakašnjelog popravka DNA te unakrsne veze između DNA i DNA te DNA i proteina. Postoji još jedna izvedba komet-testa, neutralni komet-test kojim se mogu detektirati samo dvolančani lomovi (Tuteja i sur. 2009).

Pomiješala sam 50 µL stanične suspenzije s 50 µL 1 % agaroze otopljene u vodi pri 41°C. Smjesu sam pomoću mikropipete stavila na predmetno stakalce i sve poklopila pokrovnim stakalcem. Tako pripremljene uzorke prebacila sam u kadicu s ledom, prekrila aluminijskom folijom i ostavila kroz 15 minuta da se agarozna što prije ispolimerizira, a stanice fiksiraju. Uzorci se inkubiraju sat vremena u puferu za lizu pri 4°C. Nakon lize stanica, stanice isperemo puferom Tris-HCl (pH 7,5).

Neposredno prije elektroforeze u puferu za elektroforezu provedena je alkalna denaturacija kroz 15 minuta pri 4 °C. Elektroforeza je trajala 15 minuta pri jakosti struje od 300 mA i 24 V. Po završetku elektroforeze preparati su neutralizirani u Tris-HCl (pH 7,5), isprani destiliranom vodom i osušeni na sobnoj temperaturi. Tako fiksirani preparati mogu biti pohranjeni i do nekoliko mjeseci u tami na sobnoj temperaturi.

Neposredno prije analize, stakalca sam isprala destiliranom vodom te ih obojala nakapavanjem otopine etidij bromida (10 µg/mL). Preparate sam analizirala na fluorescencijskom mikroskopu (Opton: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm). Jezgre sam snimala digitalnom kamerom kod povećanja objektiva 40x. Ukupno je analizirano 150 jezgara po tretmanu. Oštećenja u molekuli DNA analizirala sam računalnim programom Komet (Comet version 5, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Oštećenje DNA procjenjuje se mjerenjem „repa“ i „glave“ kometa.

### **3.2.5. Statistička obrada podataka**

Analiza podataka kod kazeinolize provedena je pomoću računalnog programa Microsoft Excel. Radi točnije usporedbe rezultata pojedinih eksperimenata aktivnost urokinaze izrazila sam kao faktor indukcije aktivnosti urokinaze u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice.

Kod komet testa rezultati su prikazani kao aritmetička sredina određenog broja replika dobivenih iz tri pokusa. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je u obliku standardne devijacije. Statističku analizu podataka provela sam pomoću računalnog programa STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedba kontrole i tretmana (međusobno i pojedinačno) provedena pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) i post-hoc testom višestrukih usporedbi. Statistički značajne vrijednosti su one koje su se razlikovale na razini  $p \leq 0,05$ , a označene su različitim slovima (Duncan, 1955).



## 4. REZULTATI

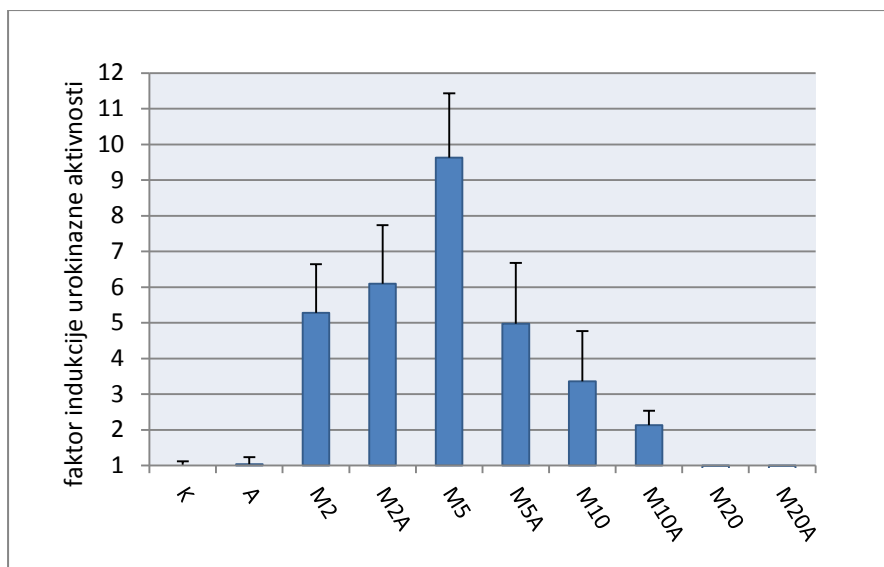
MNNG je monofunkcionalan alkilirajući agens, izrazito mutagen i karcinogen. Citotoksična i mutagena svojstva MNNG posljedica su metilacije na O<sup>6</sup> guaninu. Direktni popravak O<sup>6</sup>MeG popravljaju enzim metilguanin-DNA metiltransferaza, koji nedostaje stanicama A1235. Kako su stanice A1235 osjetljive na alkilirajuće agense, željela sam ispitati djelovanje takvog oštećenja na sposobnost stanica da izazovu plazminogenску aktivaciju. Utjecaj PARP-1 koji se također aktivira kod alkilirajućeg oštećenja ispitala sam dodavanjem inhibitora aktivnosti PARP-1 u stanični medij.

### 4.1. UTJECAJ ALKILIRAJUĆEG AGENSA I INHIBITORA AKTIVNOSTI PARP-1 NA AKTIVNOST UROKINAZE U STANICAMA A1235

Stanice A1235 nasadila sam u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/mL i tretirala samo s MNNG (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) i u kombinacijama s 3 mM 3-ABA. Negativne kontrole bile su netretirane stanice.

24 sata nakon dodavanja alkilirajućeg agensa, medij sam zamijenila sa medijem bez seruma, uz dodatak 3-ABA. Nakon idućih 6 sati sakupila sam stanični kondicionirani medij te ispitala aktivnost urokinaze kazeinolizom. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na Slici 5.

Inhibicija PARP-1 u uvjetima bez oštećenja pokazuje kontrolne vrijednosti. Urokinazna aktivnost u mediju počinje rasti već kod 2  $\mu$ M MNNG i postiže maksimum kod 5  $\mu$ M, nakon čega dolazi do njenog pada. Kod koncentracija MNNG većih od 5  $\mu$ M, aktivnost urokinaze pada, isto kao i kod tih istih koncentracija u kombinaciji s 3-ABA. Najmanja aktivnost urokinaze postignuta je kod najveće koncentracije MNNG od 20  $\mu$ M. Sve kombinacije MNNG s inhibitorom PARP-1, pokazuju smanjenje urokinazne aktivnosti osim kod kombinacije s 2  $\mu$ M MNNG gdje je aktivnost urokinaze povećana.



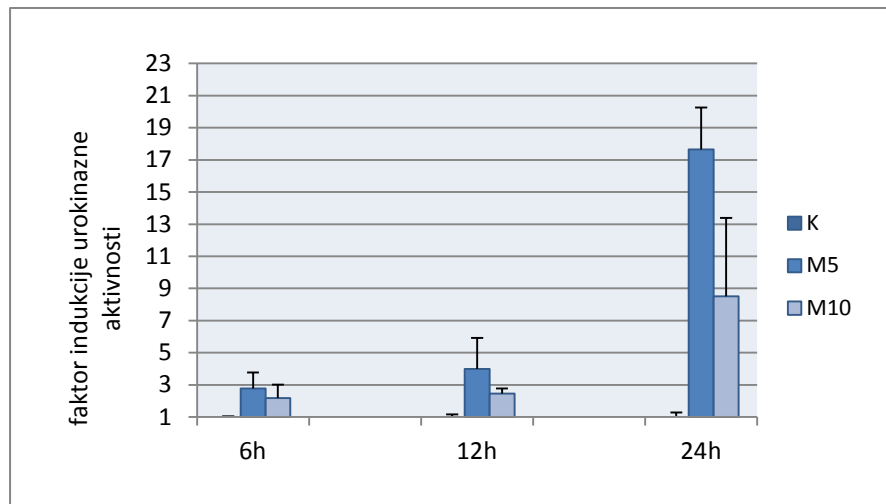
**Slika 5.** Aktivnost urokinaze u stanicama A1235. Stanice su tretirane različitim koncentracijama MNNG i u kombinaciji s 3-ABA. Kondicionirani medij tretiranih stanica koji je ispitan kazeinolizom. Dobivene su vrijednosti uspoređene s baždarnom krivuljom urokinaznih koncentracija. Urokinazne vrijednosti su izražene kao faktor indukcije urokinazne aktivnosti u odnosu na kontrolne stanice. (**K**: kontrola; **A**: 3 mM 3-ABA; **M2**: 2  $\mu$ M MNNG; **M2A**: 2  $\mu$ M MNNG + 3-ABA; **M5**: 5  $\mu$ M MNNG; **M5A**: 5  $\mu$ M MNNG + 3-ABA ; **M10**: 10  $\mu$ M MNNG; **M10A**: 10  $\mu$ M MNNG + 3-ABA; **M20**: 20  $\mu$ M MNNG; **M20A**: 20  $\mu$ M MNNG + 3-ABA).

#### 4.2. VREMENSKA KRIVULJA INDUKCIJE UROKINAZE NAKON TRETIRANJA ALKILIRAJUĆIM AGENSOM U STANICAMA A1235

U ovom sam koraku ispitala u kojem vremenskom razdoblju nakon alkilacijskog oštećenja dolazi do indukcije urokinazne aktivnosti.

Stanice A1235 sam nasadila u koncentraciji  $1 \times 10^5$  st/mL i tretirala s 5  $\mu$ M i 10  $\mu$ M MNNG. Negativne kontrole su bile netretirane stanice. Nakon 6, 12 i 24 sati stanicama je zamijenjen kompletni medij s medijem bez seruma. Takav kondicionirani medij, sakupljen nakon idućih 6 sati, ispitan je na aktivnost urokinaze kazeinolizom. Slika 6 prikazuje rezultate ovog eksperimenta.

Rezultati ukazuju na to da aktivnost urokinaze u stanicama A1235 ovisi o vremenu proteklom od tretiranja alkilirajućim agensom. Urokinazna aktivnost u mediju počinje rasti već nakon 6 sati, a maksimalnu vrijednost pokazuje nakon 24-30 sati.



**Slika 6.** Aktivnost urokinaze u stanicama A1235. Stanice su tretirane različitim koncentracijama MNNG. Nakon 6, 12 i 24 sati inkubacije u kompletnom i 6 sati u mediju bez seruma, kondicionirani medij tretiranih stanica je sakupljen i ispitan kazeinolizom. Dobivene su vrijednosti uspoređene s baždarnom krivuljom urokinaznih koncentracija. Urokinazne vrijednosti su izražene kao faktor indukcije urokinazne aktivnosti u odnosu na kontrolne stanice. (**K**: kontrola; **M5**: 5 μM MNNG; **M10**: 10 μM MNNG; **6h**: 6 sati nakon tretmana, **12h**: 12 sati nakon tretmana, **24h**: 24 sata nakon tretmana).

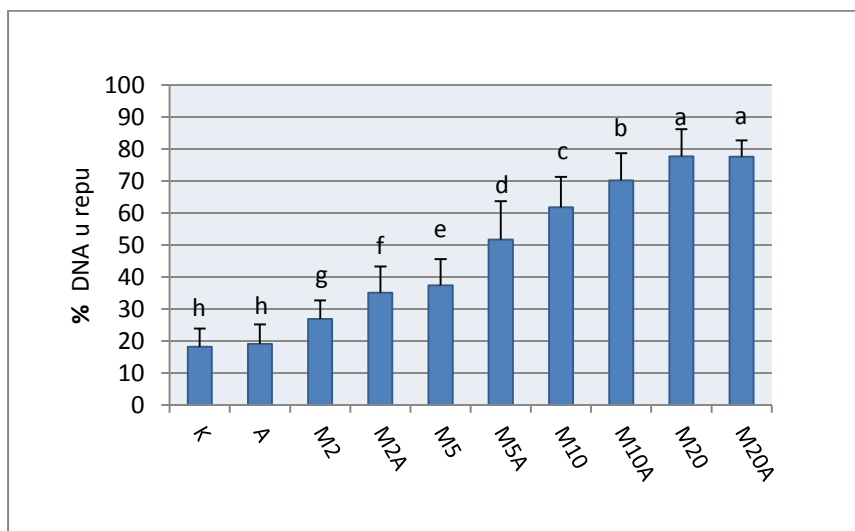
#### 4.3. ODREĐIVANJE STUPNJA OŠTEĆENJA U STANICAMA A1235

Kako su nam prethodni rezultati ukazivali na korelaciju koncentracije MNNG i indukcije urokinazne aktivnosti kod manjih koncentracija, kao i utjecaj inhibitora PARP-1, željela sam vidjeti kakvo je oštećenje DNA nakon takvog tretiranja.

Stanice A1235 tretirala sam različitim koncentracijama MNNG, samim, i u kombinaciji s 3-ABA, kao u prethodnim eksperimentima. Stanice su sakupljene nakon 24 sata inkubacije. Napravila sam alkalnu izvedbu komet-testa. Svaki uzorak je napravljen u triplikatu, a po svakoj replici analizirano je 50 jezgara. Uzorke sam analizirala na fluorescencijskom mikroskopu.

Oštećenje DNA procijenila sam pomoću računalnog programa Komet. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na Slici 7.

Rezultati pokazuju porast duljine repa, tj. povećanje količine jednolančanih i dvolančanih lomova s povećanjem koncentracije alkilirajućeg agensa, u odnosu na kontrolu. Inhibitor PARP-1 je imao istu razinu oštećenja kao kontrola u odsustvu oštećenja. Inhibicija PARP-1 je kod tretmana s 2-10  $\mu\text{M}$  MNNG povećala razinu oštećenja. Kod 20  $\mu\text{M}$  oštećenje je jednako onom s inhibicijom PARP-1, ali u oba uzorka doseže maksimum od 80 % DNA u repu.



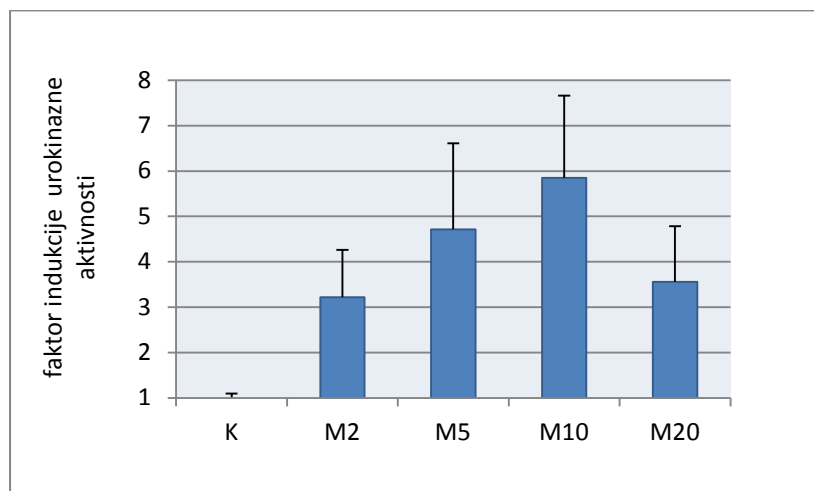
**Slika 7.** Oštećenje DNA u stanicama A1235. Stanice su tretirane različitim koncentracijama MNNG i u kombinaciji s 3-ABA. Nakon 24 sata inkubacije izolirane su jezgre i na njima napravljen komet-test u alkalnim uvjetima. Uzorci su analizirani na fluorescencijskom mikroskopu. Rezultati prikazuju srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju ( $p \leq 0,005$ , DN MRT). (**K**: negativna kontrola **A**: 3 mM 3-ABA; **M2**: 2  $\mu\text{M}$  MNNG; **M2A**: 2  $\mu\text{M}$  MNNG + 3-ABA; **M5**: 5  $\mu\text{M}$  MNNG; **M5A**: 5  $\mu\text{M}$  MNNG + 3-ABA; **M10**: 10  $\mu\text{M}$  MNNG; **M10A**: 10  $\mu\text{M}$  MNNG + 3-ABA; **M20**: 20  $\mu\text{M}$  MNNG; **M20A**: 20  $\mu\text{M}$  MNNG + 3-ABA ).

#### 4.4. UTJECAJ ALKILIRAJUĆEG AGENSA NA AKTIVNOST UROKINAZE U STANICAMA PAŠ

Stanice PAŠ su soj stanica A1235 koje imaju ugrađenu dodatnu kopiju gena za PARP-1. Zbog dodatnog gena za PARP-1 ove stanice bi trebale biti otpornije na alkilirajuće agense. Kod ovih sam stanica željela vidjeti ima li unos dodatnog gen za PARP-1 utjecaj na aktivnost urokinaze nakon tretiranja alkilirajućim agensom.

Stanice PAŠ sam tretirala s MNNG različitih koncentracija i nakon 24 sata inkubacije, u potpunom, i 6 sati u mediju bez seruma, sakupila sam kondicionirani medij i ispitala aktivnost urokinaze kazeinolizom. Rezultate ovog eksperimenta prikazuje Slika 8.

Rezultati ukazuju da već kod 2  $\mu\text{M}$  MNNG dolazi do porasta aktivnosti uPA u odnosu na kontrolu. Kod stanica PAŠ maksimum urokinazne aktivnosti je pri 10  $\mu\text{M}$  MNNG nakon čega aktivnost urokinaze pada.



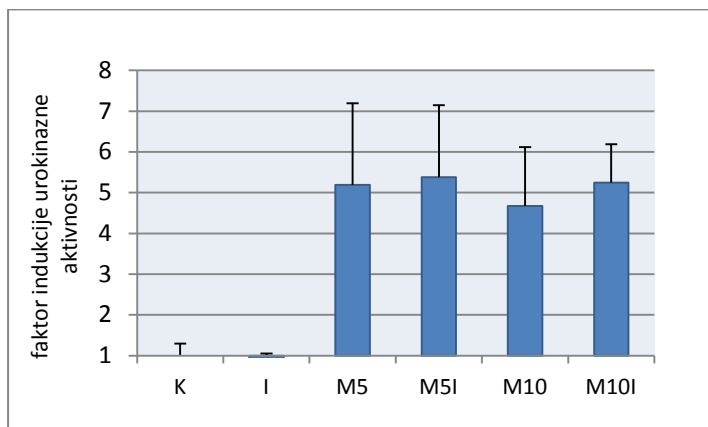
**Slika 8.** Aktivnost urokinaze u stanicama PAŠ. Stanice su tretirane različitim koncentracijama MNNG, a kondicionirani medij tretiranih stanica ispitan kazeinolizom. Dobivene su vrijednosti uspoređene s baždarnom krivuljom urokinaznih koncentracija. Urokinazne vrijednosti su izražene kao faktor indukcije urokinazne aktivnosti u odnosu na kontrolne stanice. (**K**: kontrola; **M2**: 2  $\mu\text{M}$  MNNG; **M5**: 5  $\mu\text{M}$  MNNG; **M10**: 10  $\mu\text{M}$  MNNG; **M20**: 20  $\mu\text{M}$  MNNG).

#### 4.5. UTJECAJ MAP-KINAZE JNK NA INDUKCIJU UROKINAZNE AKTIVNOSTI U STANICAMA A1235

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi je li indukcija urokinazne aktivnosti nakon alkilacijskog oštećenja povezana s aktivacijom MAP-kinaze JNK.

Stanice sam nasadila u koncentraciji  $1 \times 10^5$ /mL i tretirala samo s MNNG (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) i u kombinaciji s inhibitorom JNK (SP600125) konačne koncentracije 10  $\mu$ M. Negativne kontrole su bile netretirane stanice. Nakon 24 sata inkubacije, medij sam zamijenila za medij bez seruma, uz dodatak inhibitora JNK. Nakon 6 sati inkubacije u mediju bez seruma sakupila sam stanični kondicionirani medij i ispitala kazeinolizom. Slika 9 pokazuje rezultate ovog eksperimenta.

MNNG je inducirao aktivnost uPA 5-6 puta pri obje koncentracije. Stanice tretirane samo s inhibitorom pokazale su kontrolne vrijednosti. U uvjetima eksperimenta inhibitor nije pokazao značajno smanjenje indukcije uPA u kombinaciji s MNNG (Slika 9).



**Slika 9.** Utjecaj MAP-kinaze JNK na aktivnost urokinaze u stanicama A1235. Stanice su tretirane različitim koncentracijama MNNG i u kombinaciji s inhibitorom JNK, a kondicionirani medij tretiranih stanica ispitan kazeinolizom. Dobivene su vrijednosti uspoređene s baždarnom krivuljom urokinaznih koncentracija. Urokinazne vrijednosti su izražene kao faktor indukcije u odnosu na kontrolne stanice. (**K**: kontrola; **I**: inhibitor; **M5**: 5  $\mu$ M MNNG; **M5I**: 5  $\mu$ M MNNG + I; **M10**: 10  $\mu$ M MNNG; **M10I**: 10  $\mu$ M MNNG + I).

## 5. RASPRAVA

Sustav plazminogenog aktivatora je proteolitički sustav koji je uključen u brojne fiziološke i patološke procese. Taj sustav ovisi o dva specifična plazminogena aktivatora (uPA i tPA), receptoru plazminogenog aktivatora (uPAR) i specifičnim inhibitorima plazminogenog aktivatora (PAI-1, PAI-2). uPA se iz stanice izlučuje kao jednolančani proenzim, a aktivira se proteolitičkim cijepanjem. Aktivni uPA pretvara proenzim plazminogen u plazmin koji degradira različite proteine ECM i aktivira latentne metaloproteinaze (Andreasen i sur. 2000).

Sustav PA povezan je s invazivnošću i metastaziranjem tumorskih stanica. U brojnim tumorskim staničnim linijama pronađena je prekomjerna ekspresija uPA i PAI-1 (Ghisso i sur. 1999).

Stanice A1235 nemaju enzim metilguanin-DNA metiltransferazu (MGMT) koji sudjeluje u popravku O<sup>6</sup>-MeG i osjetljive su na tretman alkilirajućim agensom (MNNG). Budući da su prethodna istraživanja pokazala da ove stanice induciraju urokinaznu aktivnost nakon alkilirajućeg oštećenja, htjela sam ispitati ovisnost indukcije urokinazne aktivnosti o veličini oštećenja DNA te vidjeti kakav je utjecaj inhibicije alternativnog sustava popravka DNA u kojem sudjeluje PARP-1.

Rezultati su pokazali da je aktivnost uPA već kod malih koncentracija MNNG od 2  $\mu$ M porasla 4-5 puta u odnosu na kontrolne stanice. Maksimalna aktivnost uPA postignuta je kod koncentracije od 5  $\mu$ M, gdje je indukcija aktivnosti uPA veća 7-8 puta u odnosu na kontrolne stanice. Daljnim porastom MNNG aktivnost uPA se smanjuje i pri koncentraciji od 20  $\mu$ M postiže vrijednost kontrolnih stanica. Vremenska je krivulja pokazala da do porasta aktivnosti uPA (oko 30 %) dolazi već 6-12 sati nakon tretiranja stanica. Indukcija aktivnosti uPA postiže maksimum tek 24-30 sati nakon tretiranja stanica.

Inhibicija PARP-1 u uvjetima u kojima DNA nije oštećena pokazuje kontrolne vrijednosti. Inhibicija PARP-1 uz istovremeno tretiranje stanica s 2  $\mu$ M MNNG pokazuje povećanje aktivnosti uPA u odnosu na sam alkilirajući agens. Međutim, kod većih koncentracija MNNG istovremena inhibicija PARP-1 smanjuje indukciju aktivnosti uPA.

Brdar (1986) je dokazao da je u staničnim linijama fenotipa Mer<sup>-</sup> (engl. *MNNG damage repair minus*) indukcija uPA povezana s oštećenjem DNA nakon tretiranja MNNG. U stanicama Xeroderma pigmentosum koje su isto deficitarne u mehanizmu popravka DNA, nakon tretmana s UV dolazi do indukcije aktivnosti uPA (Miskin i sur. 1981). U ovim je eksperimentima pokazano da aktivnost uPA slijedi krivulju u kojoj njezina aktivnost raste porastom oštećenja sve do točke u kojoj postiže maksimum, a nakon toga pada. Kod stanica A1235, aktivnost uPA je najveća kod 5 μM MNNG i ovdje postiže svoju optimalnu razinu aktivnosti. Daljnjim povećanjem oštećenja aktivnost uPA se smanjuje. Poznato je da aktivnost uPA ovisi i o aktivnosti PAI-1. Brdar i Matulić su 1998. pokazali da se aktivnost uPA može inducirati etopozidom kod ove stanične linije, te da se tada povećava i koncentracija uPA i njegovog inhibitora PAI-1, s kojim se nalazi u kompleksu. U eksperimentima nisam promatrala izvanstaničnu razinu PAI-1, ali je moguće da se uPA nalazi s njim u kompleksu. Moguće je da se njihova ekspresija, ali i relativni odnosi uPA i njegovog inhibitora mijenjaju kao posljedica signalnih puteva aktiviranih oštećenjem DNA i tako dovode do porasta urokinazne aktivnosti kod 5-10 μM i zatim njenog opadanja.

U stanicama A1235, inhibicija PARP-1 u uvjetima u kojima DNA nije oštećena nema utjecaj na aktivnost uPA. Ti rezultati potvrđuju dosadašnja saznanja da oštećenja DNA potiču aktivaciju PARP-1 (D'Amours i sur. 1999). Aktivirani PARP-1 regrutira molekule uključene u popravak jednolančanih i dvolančanih lomova molekule DNA (D'Amours i sur. 1999). Osim toga, njegova uloga u modificiranju transkripcijskih faktora još se uvijek istražuje; PARP-1 modificira transkripcijske faktore SP1, AP-1, p53 (Chevanne i sur. 2005). Pretpostavlja se da PARP-1 na aktivnost uPA djeluje indirektno tako što inhibicija PARP-1 povećava razinu greške ukidanjem alternativnog puta aktivacije popravka u stanicama. Kod manjih koncentracija MNNG, povećana razina greške povećava aktivnost uPA, dok kod većih koncentracija MNNG utječe na smanjenje aktivnosti uPA. Inhibicija PARP-1 prati krivulju aktivnosti uPA tako da kod koncentracija MNNG od 5-10 μM dolazi do smanjenja indukcije od 40-50 %, dok kod niskih koncentracija podiže razinu aktivnosti. Ovakav bi se utjecaj inhibitora PARP-1 na indukciju enzimske aktivnosti mogao objasniti indirektnim utjecajem preko efekta na veličinu oštećenja DNA, a ne direktnim utjecajem na pojedine transkripcijske faktore.



Metodom komet-test željela sam potvrditi pretpostavku da inhibicija PARP-1 povećava razinu oštećenja u stanicama. U eksperimentu sam koristila alkalnu izvedbu komet-testa koji detektira jednolančane i dvolančane lomove (Tuteja i sur. 2009). Posljedica tretiranja s MNNG su jednolančani lomovi, stoga naši rezultati nisu prikaz specifičnih oštećenja nastalih kao posljedica tretiranja alkilirajućim agensom, već prikazuju sve jednolančane i dvolančane lomove u molekuli DNA. Rezultati nam pokazuju porast razine oštećenja s povećanjem koncentracije MNNG u odnosu na kontrolne stanice. Sama inhibicija PARP-1 u uvjetima u kojima DNA nije oštećena imala je razinu oštećenja kao kontrolne stanice. Kombinacije 2-10  $\mu\text{M}$  MNNG s inhibitorom PARP-1 povećavaju razinu oštećenja čime se potvrđuje prethodna pretpostavka da se inhibicijom PARP-1 povećava razina greške u stanicama. Kod 20  $\mu\text{M}$  oštećenje je jednako onom sa inhibicijom PARP-1, međutim iznosi gotovo 80 % DNA u repu.

Lončarek i sur. su (1998) dokazali da stanice A1235 koje su transficirane genom za MGMT, pokazuju otpornost na tretman s MNNG i manju indukciju izvanstanične aktivnosti uPA. Na sličan sam način htjela vidjeti da li su stanice PAŠ otpornije na tretman s MNNG od stanica A1235, budući da imaju dodatnu kopiju gena za PARP-1. Rezultati eksperimenta pokazuju da već kod 2  $\mu\text{M}$  dolazi do porasta aktivnosti uPA u odnosu na kontrolu, ali je maksimum aktivnosti pri 10  $\mu\text{M}$ . Za usporedbu, kod divljeg tipa stanica A1235 maksimum urokinazne aktivnosti je pri 5  $\mu\text{M}$ . Mogli bismo zaključiti da pri istim koncentracijama MNNG, stanice PAŠ imaju manje oštećenje DNA te slabije induciraju urokinaznu aktivnost od stanica A1235.

Dokazano je da u stanicama NIH3T3 signalni put JNK posreduje u indukciji aktivnosti uPA nakon tretiranja MNNG (Parra i sur. 2009). Htjela sam vidjeti da li i u stanicama A1235 put JNK ima ključnu ulogu u aktivaciji uPA nakon tretmana MNNG.

Rezultati su pokazali da MNNG inducira aktivnost uPA 5-6 puta pri obje koncentracije (5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  MNNG). Ti su rezultati u skladu s prethodnim eksperimentima. Sama inhibicija JNK u odsustvu oštećenja pokazuje kontrolne vrijednosti. U uvjetima eksperimenta inhibitor JNK nije pokazao znatno smanjenje indukcije uPA u kombinaciji s MNNG u stanicama A1235. Rezultati bi ukazivali da put JNK u stanicama A1235 nema glavnu ulogu u aktivaciji uPA nakon tretiranja s MNNG.

Promotor uPA je kompleksan i sadrži vezna mjesta za transkripcijske faktore Sp1, Ets, homodimere proteina Jun i heterodimere Jun/Fos (Nagamine i sur. 2005). Transkripcijski faktori koji se vežu na mjesta Ets/AP1 aktivirani su članovima MAP-kinazne obitelji koji su potaknuti npr. forbol esterima (TPA, engl. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), promjenom citoskeleta, faktorima rasta, genotoksičnim agensima (UV, MNNG) (Nagamine i sur. 2005). Različiti izvanstanični signali na promotor uPA mogu djelovati kroz različite signalne puteve, tako npr. FGF-2 aktivira promotor uPA aktivirajući signalni put Grb2/Sos1/Ha-Ras/c-Raf/MEK/ERK2 (Besser i sur. 1995). Promjena citoskeleta utječe na aktivaciju promotora uPA pomoću signalnog puta FAK/Src/Ras/Erk (Irigoyen i sur. 1999) i vezanjem aktiviranog c-Jun na mjesto AP-1 (Lee i sur. 1993). TPA djeluje na promotor uPA kroz iste elemente kao i promjena citoskeleta uz dodatnu aktivaciju c-Fos (Lee i sur. 1993). Genotoksični stres uzrokovan UV i MNNG potiče transkripciju uPA putem signalnog puta JNK i mjesta AP-1 (Miralles i sur. 1998, Parra i sur. 2000). Signalni put ERK djeluje na promotor uPA kroz vezanje na mjesta Ets, a signalni put JNK kroz vezanje na mjesta AP-1 (Parra i sur. 2000). Kod tumorskih stanica jajnika dominantan je signalni put PI3K koji regulira ravnotežu između PAI-1 i uPA (Whitley i sur. 2006). U stanicama A1235 nismo vidjeli inhibiciju c-Jun, ali je moguće da je c-Jun aktiviran nekim drugim signalnim putem. Dokazano je da u živčanim stanicama postoji aktivacija c-Jun koja je neovisna o signalnom putu JNK, a ovisi o ciklin-ovisnim kinazama (Besirli i sur. 2003). Sva ova istraživanja ukazuju na to da je regulacija ekspresije uPA kompleksan sustav. Signalni put JNK samo je jedan od mogućih aktivatora uPA i moguće ovisan o tipu stanica.

Oštećenja DNA potiču brzu i snažnu aktivaciju PARP-1 i poli(ADP-ribozil)aciju raznih proteina jezgre. PARP-1 uključen je u nekoliko mehanizama popravka DNA i u interakciji je s proteinima uključenim u popravak DNA (XRCC-1, DNA ligaza III) te je vjerojatno bitan za njihovo vezanje na mjesta oštećenja DNA (Diefenbach i Bürkle 2005). Pokazano je da PARP-1 može modificirati različite transkripcijske faktore, i tako utjecati na njihovo vezanje na mjesto promotora ili zadržavanje u jezgri (npr. SP-1, AP-1, NF- $\kappa$ B, Oct-1 i p53) (Krishnakumar i sur. 2010). Mnogi od ovih transkripcijskih faktora imaju svoja mjesta vezanja na promotorima gena uPA i PAI-1, odnosno mogli bi interferirati s njihovom ekspresijom (npr. SP-1, AP-1, NF- $\kappa$ B, p53). Osim toga, PARP-1 može reprimirati ekspresiju pojedinih gena i direktnim vezanjem za promotorsku sekvencu (Krishnakumar i sur. 2010). Chevanne i sur. (2005) postavili su hipotezu o povezanosti

regulacije sinteze uPA i PARP-1. Naši rezultati su ukazali na povezanost ovih dvaju sustava, ali indirektnim putem, posredstvom molekula koje reagiraju na veličinu oštećenja DNA.

Članovi sustava plazminogenog aktivatora imaju složene regulacije koje se međusobno isprepliću i čine sustav još kompleksnijim. Različiti izvanstanični i unutarstanični signali i signalni putevi, vrsta stanica te mehanizmi popravka oštećenja DNA su samo neki od čimbenika koji mogu utjecati na ekspresiju pojedinih komponenata sustava PA. Taj složeni sustav je uključen u mnoge fiziološke i patološke procese te nalazi primjenu u medicini, s jedne strane u liječenju bolesti poput infarkta miokarda, a s druge strane u dijagnostici progresije tumora.

## 6. ZAKLJUČAK

- Stanična linija glioblastoma A1235, kojoj nedostaje ekspresija metilguanin-DNA metiltransferaze, nakon alkilirajućeg oštećenja s MNNG inducira porast urokinazne aktivnosti.
- Indukcija urokinazne aktivnosti kod stanica A1235 ovisi o koncentraciji alkilirajućeg agensa, tj. količini oštećenja DNA, s maksimalnom indukcijom kod 5-10  $\mu\text{M}$  MNNG i opadanjem razine indukcije s daljnjim porastom oštećenja. Vremenska je krivulja pokazala porast indukcije s vremenom proteklim od obrade stanica, s maksimumom kod 24-30 sati nakon tretiranja.
- Inhibicija PARP-1 interferirala je s indukcijom urokinazne aktivnosti. Kod suboptimalnih koncentracija MNNG inhibicija PARP-1 je povećala razinu aktivnosti urokinaze, dok je kod optimalnih koncentracija smanjivala ukupnu razinu aktivnosti.
- Komet-testom je pokazano da MNNG izaziva oštećenje DNA, razmjerno koncentraciji. Istodobna inhibicija PARP-1 povećavala je oštećenje DNA.
- Soj stanica PAŠ u koje je unesen dodatni gen za PARP-1 nakon alkilirajućeg oštećenja s MNNG inducirao je urokinaznu aktivnost, s maksimalnom indukcijom kod viših koncentracija MNNG.
- Inhibitor JNK nije pokazao znatnu inhibiciju indukcije aktivnosti uPA u stanicama A1235, nakon alkilirajućeg oštećenja, ukazujući na stanično-specifičan odgovor.

## 7. LITERATURA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) *Molecular Biology of The Cell*. Peto izdanje. New York: Garland Science.

Andreasen P. A., Egelund R., Petersen H. H. (2000) The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.*, **57**, 25-40.

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

Besirli G. C., Johnson M. E. (2003) JNK-independent activation of c-Jun during neuronal apoptosis induced by multiple DNA-damaging agents, *Biol. Chem*, **278**, 22357–22366.

Besser D., Presta M., Nagamine Y. (1995) Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Growth Differ.*, **6**, 1009-1017.

Brdar B. (1986) Induction of plasminogen activator by alkylating agents in a repair defective human glioblastoma cell strain. *Cancer Res.*, **46**, 2282-2284.

Chevanne M., Rosso M., Caldini R. (2005) Poly(ADP-ribosyl)ation, a molecular switch of transcription, shows an attractive relationship with urokinase expression, *Thromb Haemost.*, **93**, 220-227.

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

D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.*, **342**, 249–268.

Darnell A. G., Antalis M. T., Johnstone W. R., Stringer W.B., Ogbourne M. S., Harrich D., Suhrbier A. (2003) Inhibition of Retinoblastoma Protein degradation by interaction with the serpin plasminogen activator inhibitor 2 via a novel consensus motif. *Mol Cell Biol*, **23**, 6520-6532.

Diefenbach J., Bürkle A. (2005) Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci.*, **62**, 721-730.

Duncan D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, **11**, 1-42.

Felding-Habermann B., Cheresch A., D. (1993) Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 864-868.

Ghiso Aguirre A. J., Alonso D., Farias E. , Gomez D., Bal de Kier Joffe E. (1999) Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. *Eur. J. Biochem*, **263**, 295-304.

Irigoyen J. P., Besser D., Nagamine Y. (1997) Cytoskeleton reorganization induces the urokinase-type plasminogen activator gene via the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Biol Chem*, **272**, 1904-1909.

Krishnakumar R., Kraus W. L. (2010) The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol. Cell. Biol*, **39**, 8-24.

Lambers W. J. J., Cammenga M., Konig W. B., Mertens K., Pannekoek H., Mourik J. (1987) Activation of Human Endothelial Cell-type Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1) by Negatively Charged Phospholipids. *J Biol Chem*, **262**, 17492-17499.

Lee J.S., von der Ahe D., Kiefer B., Nagamine Y. (1993) Cytoskeletal reorganization and TPA differently modify AP-1 to induce the urokinase-type plasminogen activator gene in LLC-PK1 cells. *Nucleic Acid Res.*, **21**, 3365-3372.

Lončarek J., Sorić J. (1998) Bacterial O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase reduces *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine induction of plasminogen activator in Mer<sup>-</sup> human glioblastoma A1235 cell line. *Mut Res/DNA Repair*, **408**, 47-54.

Lopez-Alemanly R., Suelves M., Diaz-Ramos A., Vidal B., Munoz-Canoves P. (2005) Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis. *Front. Biosci.*, **10**, 30-36.

Matulić M., Brdar B. (2002) Urokinase-type plasminogen aktivator and plasminogen aktivator inhibitor induction by etoposide in a glioblastom cell strain. Food Technol. Biotechnol., **40**, 1-7.

Miralles F., Parra M., Cellles C. (1998) UV irradiation induces the murine urokinase-type plasminogen activator gene via the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway: requirement of an AP1 enhancer element. Mol Cell Biol., **18**, 4537-4547.

Miskin R., Ben-Ishai R. (1981) Induction of plasminogen activator by UV light in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. **10**,6236-6240.

Mueller B. M., Yu Y. B., Laug W. E. (1995) Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **92**, 205-209.

Nagamine Y, Medcalf RL, Muñoz-Cánoves P. (2005) Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. Thromb Haemost, **93**, 661-675.

Nykjer A., Conese M., Christensen I. E., Olson D., Cremona O., Gliemann J., Blasi F. (1997) Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. EMBO J., **16**, 2610–2620.

Ossowski L., Aguirre-Ghiso A. J. (2000) Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. Curr Opin Cell Biol, **12**, 613-620.

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**, 1415-1424.

Preissner T. K., Kanse M. S., May E. A. (2000) Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. Curr Opin Cell Biol, **12**, 621-628.

Stahl A., Mueller B. M. (1994) Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells *in vitro*. Cancer Res., **54**, 3066-3071.

Tuteja N., Ahmad P., Panda B. B., Tuteja R. (2009) Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res.*, **681**, 134-149.

Whitley R. B., Beaulieu M, L., Carter C.J., Church C. F. (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt regulates the balance between plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase to promote migration of SKOV-3 ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.*, **104**, 470-479.