



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Diana Culej Bošnjak

**ULOGA STRESA ENDOPLAZMATSKOG
RETIKULUMA U MODULACIJI SUSTAVA
UROKINAZNOGA PLAZIMOGENSKOGA
AKTIVATORA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Diana Culej Bošnjak

**THE ROLE OF ENDOPLASMATIC
RETICULUM STRESS IN MODULATION OF
THE UROKINASE PLASMINOGEN
ACTIVATOR SYSTEM**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Matulić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj rad je izrađen uz potporu projekta "Obnova timusa za preciznu medicinu u liječenju tumora i leukemija" (voditeljica: prof. dr. sc. Mariastefania Antica, IP-2020-02-2431), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Informacije o mentoru

Maja Matulić je 1987. godine završila studij eksperimentalne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te postala diplomirani inženjer biologije. 1990. godine obranila je magistarski rad na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 1993. godine, na istom fakultetu, doktorsku disertaciju. Od 1988. godine do 1994. godine zaposlena je kao znanstveni novak na Klinici za tumore u Zagrebu, a od 1994. godine do 2003. godine kao asistent i stručni suradnik u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. 2003. godine postaje znanstveni suradnik na Institutu Ruđer Bošković. Od 2007. do 2012. godine zaposlena je kao docent na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2012. godine postaje izvanredna profesorica na istom fakultetu, a 2023. godine redovita profesorica. Kao nastavnik na Biološkom odsjeku održava nastavu iz područja molekularne biologije na Preddiplomskom i Diplomskom studiju molekularne biologije, te na Doktorskom studiju Biologije.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Maji Matulić, na pruženoj prilici, nesebičnoj pomoći, podršci i usmjeravanju koje mi je pružila tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem kolegicama sa Zavoda za molekularnu biologiju na njihovoj pomoći u radu i konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem kolegici Doris Janjić na suradnji zajedničkih istraživačkih interesa.

Na kraju, zahvaljujem obitelji i prijateljima na beskrajnom razumijevanju i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

ULOGA STRESA ENDOPLAZMATSKOG RETIKULUMA U MODULACIJI SUSTAVA UROKINAZNOGA PLAZIMOGENSKOGA AKTIVATORA

DIANA CULEJ BOŠNJAK

Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Urokinazni plazminogeni aktivator izvanstanična je proteaza koja aktivacijom plazminogena sudjeluje u razgradnji ekstracelularnog matriksa, staničnoj migraciji i invaziji. Njezina aktivnost ovisi o ekspresiji urokinaze i njenog inhibitora, koji zajedno s urokinaznim receptorom čine sustav urokinaznog plazminogenog aktivatora. U ovom radu se istražila povezanost sustava sa stresom endoplazmatskog retikuluma. Povećanjem količine nepravilno smotanih proteina izaziva odgovor nesmotanih proteina te aktivaciju signalnih puteva koji inhibiraju translaciju proteina, dovode do povećanja ekspresije šaperona, autofagije ili apoptoze. Utjecaj stresa endoplazmatskog retikuluma istražen je kod tumorskih staničnih linija. Natrijev salicilat i thapsigargin, koji su povećali ekspresiju gena i proteina staničnog odgovora na stres endoplazmatskog retikuluma, mijenjaju aktivnost urokinaze. U stanicama glioblastoma zabilježena je povišena urokinazna aktivnost. Nasuprot tome, u stanicama karcinoma dojke, došlo je do smanjenja urokinazne aktivnosti. Induktori stresa endoplazmatskog retikuluma inhibirali su staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju, u ovisnosti o staničnoj liniji. Povezanost ovih sustava potvrdila se analizom aktivnosti urokinaze u uvjetima inhibicije odgovora nesmotanih proteina.

(91 stranica, 37 slika, 2 tablice, 109 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: urokinaza; stres endoplazmatskog retikuluma; A1235; MDA-MB-23; thapsigargin; natrijev salicilat

Mentor: prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Inga Urlić, prof. dr. sc. Biljana Balen, dr. sc. Helena Četković

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

THE ROLE OF ENDOPLASMATIC RETICULUM STRESS IN MODULATION OF THE UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM

DIANA CULEJ BOŠNJAK

Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

Urokinase plasminogen activator is an extracellular protease that activates plasminogen and participates in extracellular matrix degradation, cell migration and invasion. Its activity depends on the expression of urokinase and its inhibitor, which, together with the urokinase receptor, form the urokinase plasminogen activator system. In this work association of the urokinase plasminogen activator system with the endoplasmatic reticulum stress was investigated. Endoplasmatic reticulum stress, caused by the accumulation of unfolded proteins, triggers the unfolded protein response, which activates signaling pathways that inhibit protein translation, upregulate chaperon expression and induce autophagy or apoptosis. The impact of endoplasmatic reticulum stress was investigated in tumor cell lines. Sodium salicylate and thapsigargin, which increased the expression of genes and proteins involved in the endoplasmic reticulum stress response, altered urokinase activity: glioblastoma cells showed elevated urokinase activity, whereas breast cancer cells exhibited a reduction. Endoplasmic reticulum stress inducers inhibited cell proliferation, migration, and invasion in a cell line-dependent manner. The connection of systems was confirmed by analyzing urokinase plasminogen activation under conditions of unfolded protein response inhibition.

(91 pages, 37 figures, 2 tables, 109 references, original in Croatian)

Keywords: urokinase; endoplasmatic reticulum stress; A1235; MDA-MB-231; thapsigargin; sodium salicylate

Supervisor: prof. Maja Matulić, PhD

Reviewers: prof. dr. sc. Inga Urlić, prof. dr. sc. Biljana Balen, dr. sc. Helena Četković

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Sustav urokinaznoga plazminogenetskoga aktivatora.....	3
2.2. Urokinazni plazminogenetski aktivator.....	3
2.3. Inhibitor plazminogenetskoga aktivatora -1.....	7
2.4. Receptor urokinaznog plazminogenetskoga aktivatora.....	7
2.5. Plazminogen i plazmin	9
2.6. Fiziološka uloga sustava urokinaznog plazminogenetskoga aktivatora.....	11
2.7. Uloga sustava urokinaznog plazminogenetskoga aktivatora u progresiji tumora.....	12
2.8. Stres endoplazmatskog retikuluma	14
2.9. Odgovor nesmotanih proteina	15
2.10. Odgovor nesmotanih proteina u tumorskim stanicama	22
3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
4. MATERIJALI I METODE	24
4.1. Uzgoj stanica	24
4.2. Brojanje stanica s pomoću hemocitometra	24
4.3. Obrada stanica kemoterapeuticima.....	24
4.4. Praćenje stanične proliferacije.....	25
4.5. Određivanje aktivnosti urokinaze metodom radijalne kazeinolize.....	25
4.6. Test migracije stanica - test „zarastanja“	25
4.7. Test invazije stanica u komoricama s membranom	26
4.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	26
4.9. Izolacija staničnih proteina	27
4.10. SDS-elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu	27
4.11. Analiza proteina metodom Western blot	28

4.12. Izolacija RNA	29
4.13. Provjera kvalitete i koncentracije RNA	29
4.14. Reverzna transkripcija	30
4.15. Lančana reakcija polimerazom	30
4.16. Elektroforeza DNA u gelu agaroze	31
4.18. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	31
4.19. Dizajn početnica	32
4.20. Statistička obrada podataka	34
5. REZULTATI	35
5.1. Analiza urokinazne aktivnosti nakon djelovanja kemoterapeutika ili izazivanja stresa endoplazmatskog retikluma	35
5.1.1. Utjecaj induktora stresa endoplazmatskog retikluma thapsigargina na aktivnost urokinaze kod različitih staničnih linija	35
5.1.2. Utjecaj kemoterapeutika i induktora stresa endoplazmatskog retikluma thapsigargina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235	37
5.1.3. Utjecaj kemoterapeutika i induktora ERS thapsigargina na aktivnost urokinaze kod stanične linije MDA-MB-231	39
5.1.4. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma ECGC na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235	40
5.1.5. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma ECGC na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231	42
5.1.6. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma icerguastata na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235	43
5.1.7. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma icerguastata na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231	45
5.1.8. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikuluma GSK2656157 na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235	46
5.1.9. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikuluma GSK2656157 na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231	47

5.1.10. Utjecaj ionomycina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231	48
5.1.11. Utjecaj tiplaxtinina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235	50
5.2 Analiza ekspresije gena urokinaznog sustava i gena uključenih u odgovor na stres endoplazmatskog retikuluma	51
5.2.1. Analiza ekspresije gena urokinaznog sustava u staničnim linijama glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih natrijevim salicilatom i thapsigarginom	51
5.2.2. Analiza ekspresije gena uključenih u puteve odgovora na stres endoplazmatskog retikuluma u staničnim linijama glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 ..	53
5.3. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava i stresa endoplazmatskog retikuluma	58
5.3.1. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava u staničnoj liniji glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon tretmana natrijevim salicilatom i thapsigarginom.....	58
5.3.2. Analiza ekspresije proteina stresa endoplazmatskog retikuluma u staničnoj liniji glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon tretmana natrijevim salicilatom i thapsigarginom	60
5.4. Analiza migracije stanica tretiranih kemoterapeutikom natrijevim salicilatom i thapsigarginom	62
5.4.1. Analiza migracije stanica testom „zarastanja“ u staničnoj kulturi glioblastoma A1235 tretiranih NaS i thapsigarginom	62
5.4.2. Analiza migracije stanica testom „zarastanja“ u staničnoj kulturi karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih NaS i thapsigarginom	64
5.5. Analiza invazije stanica tretiranih natrijevim salicilatom i thapsigarginom	65
5.5.1. Analiza invazije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane NaS i thapsigarginom	65
5.5.2. Analiza invazije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane NaS i thapsigarginom.....	66

5.6. Analiza proliferacije stanica tretiranih induktorom stresa endoplazmatskog retikuluma thapsigarginom	67
5.6.1. Analiza proliferacije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane thapsigarginom	67
5.5.2. Analiza proliferacije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane thapsigarginom.....	68
6. RASPRAVA.....	69
7. ZAKLJUČAK	79
8. POPIS LITERATURE	81
9. ŽIVOTOPIS	91

1. UVOD

Homeostazom eukariotska stanica održava stabilno unutarnje okruženje. Pod uvjetima staničnog stresa, kao što je nedostatak kisika, dolazi do nakupljanja krivo smotanih ili nesmotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu. On sudjeluje u sintezi sekretornih i membranskih proteina, regulira njihovo pravilno smatanje, održava homeostazu kalcija te regulira sintezu lipida (Corazzari i sur., 2017.; Schröder i Kaufman, 2005.). Pravilno smatanje proteina omogućuju šaperoni endoplazmatskog retikuluma. Poremećaj regulacije razine kalcija ili glikozilacije proteina može omesti njihovu funkciju te dovesti do nakupljanja nepravilno smotanih proteina. Stanica odgovara na stres endoplazmatskog retikuluma (engl. *endoplasmatic reticulum stress*, ERS) degradacijom oštećenih proteina, smanjenjem sinteze proteina, autofagijom te odgovorom nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*, UPR) (Chen i Cubillos-Ruiz, 2021.). Akumulacija nepravilno smotanih proteina i poremećen stanični odgovor na njihov nastanak obilježje je mnogih tumorskih stanica, koje pritom mogu razviti adaptivne mehanizme povećane otpornosti. Također, ti procesi mogu mijenjati tumorski mikrookoliš te doprinijeti njihovom preživljavanju, proliferaciji, neoangiogenezi, invaziji i metastaziranju (Liang i sur., 2021.; Senft i Ronai, 2015.; Zhang i sur., 2024b.).

Urokinazni plazminogeni aktivator (uPA) ili urokinaza serinska je proteaza koja aktivira plazminogen te nastaje plazmin, enzim za razgradnju ekstracelularnog matriksa (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.). Sustav uPA sudjeluje u embriogenezi, ovulaciji, pregradnji tkiva, zacjeljivanju rana te imunološkom odgovoru (Bydoun i sur., 2018.; Mahmood i sur., 2018.). Povećana aktivnost sustava potiče invaziju, migraciju i metastaziranje tumorskih stanica. U tumorima, interakcija uPA s receptorom i integrinima doprinosi neoangiogenezi, epitelno-mezenhimskoj tranziciji i proliferaciji stanica, dok poremećaj ovog sustava može biti povezan s lošom prognozom pacijenata s tumorom (Alfano i sur., 2022.; Ulisse i sur., 2009.). Kako se otkrilo da neki kemoterapeutici koji moduliraju uPA izazivaju ERS, postavlja se pitanje mogu li poznati stresori endoplazmatskog retikuluma utjecati na sustav uPA.

Hipoteza ovog istraživanja jest da su ERS i UPR povezani s modulacijom aktivnosti sustava uPA te da priroda tog odgovora ovisi o specifičnoj signalizaciji unutar pojedine stanične linije.

Za konkretnije ostvarenje ovog cilja, istraživanje se usredotočilo na nekoliko specifičnih zadataka. Prvi zadatak bio je ispitati utjecaj tvari koje su poznati induktori ERS na promjene u sustavu uPA. Zatim se analiziralo kako induktori staničnog stresa, za koje je već utvrđeno da

mijenjaju uPA sustav, utječu na ekspresiju molekula uključenih u UPR. Također, inhibirane su pojedine molekule signalnog puta kako bi se istražila njihova uloga u regulaciji transkripcije i aktivacije uPA sustava. Na kraju, ispitan je utjecaj ERS na staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju.

Razumijevanje mehanizama regulacije sustava uPA, posebice njegova uloga u ERS, pruža važne informacije o tome kako modifikacija aktivnosti sustava utječe na stanične funkcije poput migracije, invazije i proliferacije tumorskih stanica. Razumijevanje regulacije povezanosti sustava uPA i ERS stvara nove mogućnosti za razvoj ciljanih terapija koje bi poboljšale učinkovitost kemoterapije, potencijalno smanjujući metastaziranje i invaziju tumora te poboljšavajući prognozu u liječenju karcinoma.

2. LITERATURNI PREGLED

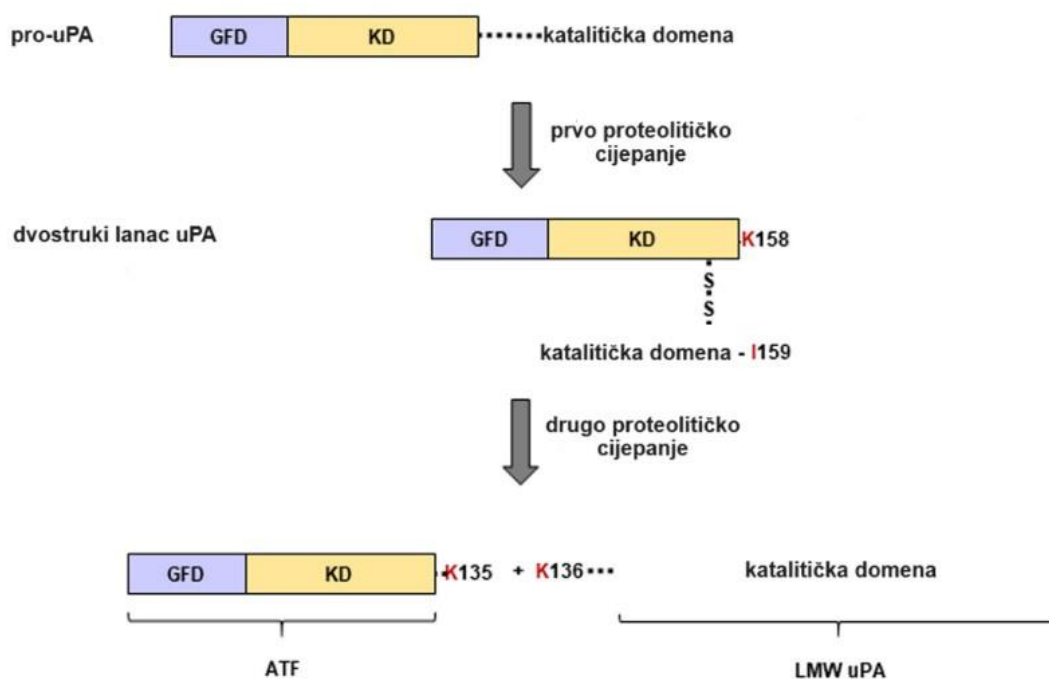
2.1. Sustav urokinaznoga plazminogenetskoga aktivatora

Sustav urokinaznoga plazminogenetskoga aktivatora izvanstanični je proteolitički sustav koji obuhvaća urokinazni plazminogenetski aktivator iz porodice serinskih proteaza (engl. *serine protease inhibitor*; serpin), inhibitor plazminogenetskog aktivatora -1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*; PAI-1) i receptor urokinaznog plazminogenetskog aktivatora (engl. *urokinase plasminogen activator receptor*; uPAR ili engl. *cluster of differentiation 87*; CD87) (Blasi i Sidenius, 2010.;). Sudjeluje u embriogenezi, ovulaciji, pregradnji tkiva i zaraštavanju rana te može utjecati na staničnu migraciju i invaziju (Mahmood i sur., 2018.).

2.2. Urokinazni plazminogenetski aktivator

Urokinaza je visokospecifična serinska proteaza veličine 53 kDa koja se sintetizira kao latentni proenzim (pro-uPA) te se aktivira izvanstanično (Duffy, 2005.; Mahmood i sur., 2018.). Osnovna je funkcija urokinaze aktivacija plazminogena pri čemu nastaje plazmin. Iz urina su je 1947. godine izolirali MacFarlan i Pilling, a Sobel nazvao današnjim imenom. Nalazi se u plazmi, ekstracelularnom matriksu i sjemenoj tekućini (Mahmood i sur., 2018.). Stvara se i otpušta kao jedan polipeptidni lanac i glikozilirani zimogen sastavljen od 411 aminokiselina i tri domene: domene faktora rasta (engl. *growth factor domain*; GFD) koja nalikuje na domenu epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*; EGF), „kringle“ domene (engl. *kringle domain*; KD) te domene serinske proteaze (engl. *serine protease domain*) (Blasi i Carmeliet, 2002.; Mahmood i sur., 2018.). Na N-terminalnom kraju, od 1-49 aminokiselinskog slijeda nalazi se domena GFD koja se nastavlja na domenu KD od 50-131 aminokiselinskog slijeda. Na C-terminalnom kraju nalazi se katalitička domena serinske proteaze koja se proteže od 159 do 411 aminokiseline (Mahmood i sur., 2018.). Između N- i C-terminalnog kraja nalazi se domena koja ih povezuje (engl. *linker region*) (Blasi i Carmeliet, 2002.; Mahmood i sur., 2018.). Jednom secernirana pro-uPA prolazi prvo proteolitičko cijepanje između 158. aminokiseline (lizina) i 159. aminokiseline (izoleucina) čime se stvara dvostruki lanac uPA povezan disulfidnom vezom (Mahmood i sur., 2018.). Jednostruki uPA lanac 250 puta je manje potentan od dvostrukog u cijepanju plazminogena. Kao što je uPA najučinkovitija u konverziji plazminogena u plazmin, tako je i plazmin najučinkovitiji pri konverziji pro-uPA u aktivnu uPA. Drugim proteolitičkim cijepanjem na peptidnoj vezi između 135. i 136. aminokiseline (lizina) dvostruki lanac se razdvaja na katalitički aktivnu domenu uPA niske molekularne težine, od oko 30 kDa koja u sebi ima domenu serinske proteaze (engl. *low-molecular weight*

form of urokinase; LMWH uPA) i inaktivni, aminoterminalni kraj (engl. *amino-terminal fragment*; ATF). Struktura pro-uPA i njegovog aktivnog oblika, uPA, prikazana je na Slici 1. Kako se za uPAR veže regija GFD, jednostruki i dvostruki lanac uPA vežu se za njega gotovo jednakim afinitetom (Mahmood i sur., 2018.).



Slika 1. Struktura pro-uPA i uPA. uPA je serinska proteaza koja se sintetizira kao neaktivni proenzim i aktivira izvanstanično. Sastoji se od tri glavne domene: domene faktora rasta, domene „kringle“ i katalitičke domene serinske proteaze. Prvim proteolitičkim cijepanjem nastaje pro-uPA, čime se stvara aktivan oblik urokinaze s dvostrukim lancem, 250 puta potentniji u stvaranju plazmina od jednostrukog lanca. Drugim proteolitičkim cijepanjem nastaje inaktivni aminoterminalni kraj u kojem domena faktora rasta omogućuje vezanje za uPAR, dok katalitička domena niske molekularne težine ostaje funkcionalna. **pro-uPA**: neaktivni proenzim urokinaze; **uPA**: urokinaza; **GFD**: domena faktora rasta; **KD**: domena „kringle“; **ATF**: aminoterminalni kraj; **LMWH uPA**: domena urokinaze niske molekularne težine. *Preuzeto i modificirano prema Mahmood i sur. (2018.).*

Vezanjem za receptor, dolazi do konformacijske promjene kojom čak i pro-uPA može aktivirati plazminogen (Mahmood i sur., 2018.). Njena aktivnost regulirana je putem inhibitora PAI-1, kao i vezanjem za receptor (Mahmood i sur., 2018.). Ako se uPAR veže za receptor, dolazi do lokalizacije aktivnosti, no ako se veže kompleks uPA/PAI-1, dolazi do internalizacije i njegove razgradnje (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.). Specifična aktivacija plazminogena pomoću uPA događa se izvan stanice, ali u neposrednoj blizini stanica koje izlučuju uPA (Mahmood i sur., 2018.). Aktivnost sustava uPA ovisi u prvom redu o regulaciji

transkripcije uPA i PAI-1, njihovoj posttranskripcijskoj regulaciji, proteolitičkoj aktivnosti i endocitozi posredovanoj receptorom. Transkripcijska regulacija sustava uPA može ovisiti o signalnim putevima potaknutim faktorima rasta (epidermalnim faktorom rasta (engl. *epidermal growth factor*; EGF), trombocitnim faktorom rasta (engl. *platelet-derived growth factor*; PDGF), vaskularnim endotelnim faktorom rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF)), citokinima (transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor β* ; TGF- β), faktorom nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor - α* ; TNF- α)), interleukinom-1 (IL-1), interleukinom-16 (IL-16), peptidnim i steroidnim hormonima (estrogeni, androgeni) i dr. (Nagamine i sur., 2005.).

Gen koji kodira za uPA (*PLAU*) nalazi se na 10. kromosomu i sastoji se od 11 eksona (Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). Promotorska regija sadrži sekvencu TATA iza koje uzvodno slijedi sekvenca dugačka oko 200 parova baza bogata s GC, zatim sekvenca CAAT i brojna mjesta vezanja transkripcijskih faktora Sp1 i CTF, odgovornih za konstitutivnu ekspresiju (Nagamine i sur., 2005.). Aktivacija transkripcije posredovana je putevima kinaza MAP (engl. *mitogen-activated protein*; MAP), Erk i JNK, vezanjem fosforiliranog Sp1 i regijama u promotoru aktiviranim forbol esterom (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*; PMA) putem protein kinaze C (engl. *protein kinase C*; PKC) ili fibroblastnim faktorom rasta -2 (engl. *fibroblast growth factor -2*; FGF-2). Transkripcijski pojačivač sastoji se od složenog mjesta Ets/AP1a (PEA3/AP1) koje se nalazi uzvodno od početka transkripcije na -1980 bp i nizvodno od AP1b mjesta koje se nalazi na -1875 bp (D'Orazio i sur., 1997.; Nagamine i sur., 2005.). AP1a i AP1b međusobno su povezani sekvencom COM (engl. *cooperation mediator*; COM) koja sadrži vezna mjesta za transkripcijske faktore - induktore ekspresije uPA (engl. *urokinase enhancer factors*; UEF) (D'Orazio i sur., 1997.; Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). Drugi transkripcijski pojačivač složenog mjesta Ets/AP1 nalazi se uzvodno od početka transkripcije na -5,36 kbp (D'Orazio i sur., 1997.). Mjesto AP1 prepoznaje istoimeni kompleks transkripcijskih faktora te se sastoji od homodimera Jun ili heterodimera Jun/Fos. Članovi obitelji Jun heterodimeriziraju s ATF2 i ATF3, koji pripadaju obitelji CREB/ATF (engl. *CRE-binding protein/activating transcription factor*). Vezna mjesta u promotoru uPA za Ets su transkripcijski faktori Ets-1 i Ets-2 (D'Orazio i sur., 1997.; Nagamine i sur., 2005.). Utišavanjem Ets-1 došlo je do smanjene ekspresije uPA (Nagamine i sur., 2005.). Vezanje transkripcijskih faktora za mjesto Ets/AP1 u promotoru uPA je posljedica aktivacije MAP kinaza (D'Orazio i sur., 1997.; Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). Genotoksični agensi aktiviraju mjesto AP1 na promotoru pomoću kinaze JNK (Nagamine i sur., 2005.).

Promotorska regija uPA sadrži i vezno mjesto za transkripcijski faktor NF- κ B uzvodno na -1583 bp (Nagamine i sur., 2005.). Dva mjesta vezanja Rel (engl. *Rel-like binding sites*) pronađena su uzvodno na -1865 bp i -1835 bp (Nagamine i sur., 2005.). Heterodimer NF- κ B sastoji se od dviju podjedinica: Rel/p65 i p65/p50, od čega je Rel/p65 zaslužna za ekspresiju uPA u staničnim linijama karcinoma vrata maternice (Nagamine i sur., 2005.). Osim što se aktivira MAP kinazama, promotor uPA ovisan je i o cikličkom adenozin monofosfatu (cAMP) i koncentraciji kalcija. Ako je promotor uPA hipometiliran u staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231, stanice jače invadiraju (Nagamine i sur., 2005.).

Posttranskripcijska regulacija uPA odnosi se na (de)stabilizaciju mRNA. Faktori rasta i upalni citokini aktiviraju signalne puteve MAPK/ERK i NF- κ B koji vode promjeni vezanja regulatornih proteina na mRNA uPA stabilizirajući ili ubrzavajući razgradnju mRNA. Ribonukleotid reduktaza (RNR) je enzim uključen u sintezu DNA i odgovoran za redukciju ribonukleotida u njihove odgovarajuće deoksiribonukleotide. Sastoji se od tri podjedinice: RRM1 (ribonukleotid reduktaza M1), RRM2 (ribonukleotid reduktaza M2) i p53R2 koje osiguravaju uravnoteženu opskrbu nukleotidnim prekursorima. RRM2 je protein koji, kada je previše eksprimiran, destabilizira mRNA uPA. Tumor supresor protein p53 također inhibira ekspresiju uPA destabilizacijom uPA mRNA. Lipopolisaharid LPS translocira RRM2 iz citoplazme u jezgru te vodi u stabilizaciju mRNA uPA te povećanje ekspresije urokinaze. Regije vezanja p53 i RRM2 na 3' UTR sekvenci uPA mRNA su susjedne i one mogu koordinirano regulirati aktivnost RNR tijekom oštećenja DNA. Posttranskripcijska stabilizacija mRNA uPA u tumorskim stanicama karcinoma pluća povećava sintezu uPA, što posljedično potiče veću sposobnost tumorskih stanica za proliferaciju i invaziju (Level i sur., 2013.).

Endocitoza je proces pomoću kojeg stanice internaliziraju površinske proteine, izvanstanični materijal i staničnu membranu pomoću formiranja membranskih vezikula (Blasi i Sidenius, 2010.). Kompleks uPA-PAI-uPAR internaliziran je endocitozom ovisnom o klatrinu gdje LRP1 (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*, CD 91) djeluje kao koreceptor (Baart i sur., 2020.; Blasi i Carmeliet, 2002.; Blasi i Sidenius, 2010.). Tako dolazi do razgradnje uPA i PAI, dok se uPAR vraća na površinu stanice gdje može ponovno vezati novu uPA (Baart i sur., 2020.; Vallabhaneni i sur., 2011.). Internalizacijom i razgradnjom kompleksa uPA-PAI-uPAR ograničava se trajanje i sprječava prekomjerna razgradnja ECM, čime se kontrolira stanična migracija i invazija (Baart i sur., 2020.; Vallabhaneni i sur., 2011.).

2.3. Inhibitor plazminogenog aktivatora -1

PAI-1 je inhibitor serinske proteaze, član porodice serpina koji može ireverzibilno inhibirati urokinazu (Duffy, 2005.; Mahmood i sur., 2018.). Serpin se sastoji od 3 β -ploče (A, B i C) i 9 α -uzvojnica s izloženom fleksibilnom petljom reaktivnog centra (RCL) koja služi kao mamac za ciljane proteaze (Alfano i sur., 2022.; Mahmood i sur., 2018.; Ulisse i sur., 2009.). Glikoprotein je molekularne mase 43 kDa, jednolančani, sastavljen od reaktivnog centra, kojeg čini peptidna veza između aminokiselina arginin (346.) i metionin (347.), smještenog na površini petlje na C-terminalnom kraju PAI-1 za koje se veže proteaza. Nakon proizvodnje, luči se izvan stanice (Mahmood i sur., 2018.; Ulisse i sur., 2009.). Kako bi inhibirao uPA, izlaže fleksibilnu petlju reaktivnog centra te formira kovalentni kompleks koji blokira daljnju interakciju uPA i njenog supstrata (Higgins i sur., 2011.).

PAI-1 se može nalaziti u inaktivnom obliku gdje se reaktivni centar spontano smata unutar molekule ili u aktivnom obliku vežući se za uPA ili pak mnogo sporije za pro-uPA (Ulisse i sur., 2009.) PAI-1 je relativno nestabilan ($t_{1/2} = 1-2$ h; 37 °C), stoga se u plazmi i ekstracelularnom matriksu nalazi povezan s vitronektinom koji mu povećava stabilnost (Higgins i sur., 2011.).

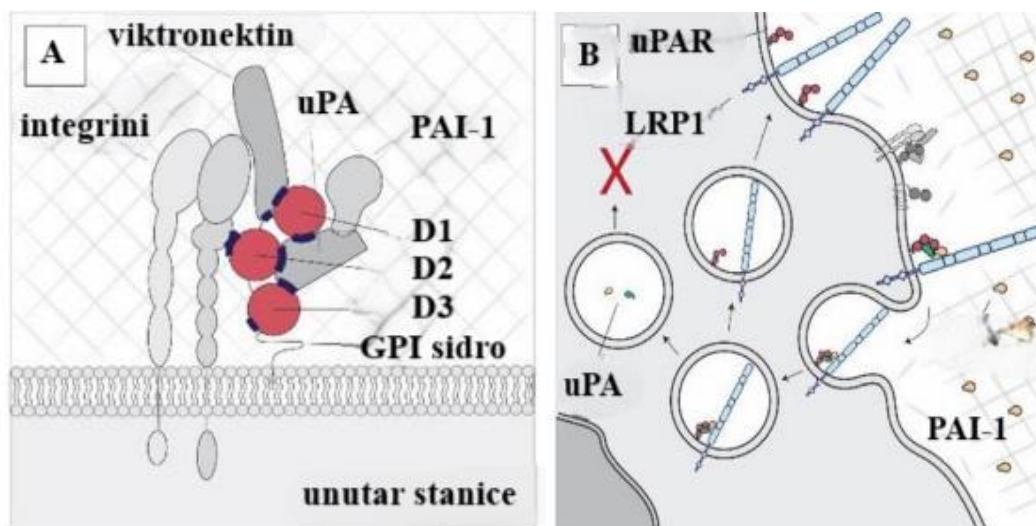
Gen koji kodira za PAI-1 (*SERPINE1*) nalazi se na 7. kromosomu i sastoji se od 9 eksona (Nagamine i sur., 2005.; Ulisse i sur., 2009.). Promotorska regija sadrži sekvencu TATA i vezna mjesta za transkripcijske faktore PEA3/Ets, AP-1 i Sp1. Aktivacija transkripcije na veznim mjestima AP-1 posredovana je regijama u promotoru aktiviranim forbol esterom PMA preferencijalno putem homodimera c-Jun/c-Jun, ali i heterodimera c-Fos/c-Jun. Promjenom omjera c-Jun/c-Jun i c-Fos/c-Jun u korist c-Fos/c-Jun dolazi do inhibicije ekspresije PAI-1. Također, signalni putevi MAPK/ERK i PI3K povećavaju ekspresiju PAI-1 u uvjetima hiperglikemije, a njihova inhibicija smanjuje aktivaciju promotora PAI-1 u uvjetima hipoksije. Posttranskripcijska regulacija utječe na stabilnost mRNA PAI-1 preko sekvenci ARE na 3'-kraju (Nagamine i sur., 2005.). Promotor PAI-1 ima mjesta vezanja Sp1 te SMAD-3, nizvodnog elementa puta TGF β (Datta i sur., 2000.).

2.4. Receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora

uPAR je jednostruki polipeptidni glikoproteinski lanac bogat cisteinom, sastavljen od 313 aminokiselina i veličine 55-60 kDa (Blasi i Sidenius, 2010.; Duffy, 2005.; Mahmood i sur., 2018.). Pripadnik je porodice membranskih proteina Ly-6, nalazi se na staničnoj membrani te

ima visok afinitet prema uPA. Sastoji se od transmembranske i unutarstanične domene, usidren u vanjski sloj lipidnog dvosloja C-terminalnim krajem s pomoću glikozil-fosfatidil-inozitolnog sidra (engl. *glycosyl phosphatidyl inositol anchor*, GPI) na kojeg se nastavljaju tri domene: D1, D2 i D3 povezane s dvije vezne regije. Domene formiraju šupljinu koja omogućuje da se uPA veže za središnji dio, ostavljajući vanjsku površinu slobodnom za vezanje drugih proteina (npr. integrina, vitronektina) (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.; Ulisse i sur., 2009.; Vallabhaneni i sur., 2011.). Sve regije uPAR (D1, D2, D3) mogu vezati uPA, a samo regije D2 i D3 mogu vezati druge proteine (Blasi i Sidenius, 2010.). Odvajanjem GPI sidra, uPAR se oslobađa s membrane i nastaje topiva forma uPA – suPAR (engl. *soluble urokinase plasminogen activator receptor*) koji cirkulira unutar tkiva i tjelesnih tekućina. Nakon endocitoze kompleksa uPA/PAI-1, internalizirani uPAR se ne degradira već se reciklira i vraća na površinu stanice. Kad je na uPAR vezana uPA, proteoliza posredovana uPA je lokalizirana. (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.; Vallabhaneni i sur., 2011.). Smatra se da receptor surađuje s integrinima ($\alpha\beta3$) i drugim transmembranskim molekulama te tako aktivira različite signalne puteve u stanici, a također sudjeluje u procesima stanične migracije i adhezije (Blasi i Sidenius, 2010.; Vallabhaneni i sur., 2011.).

Gen koji kodira za uPAR (*PLAUR*) nalazi se na 19. kromosomu i sastoji se od 7 eksona. Promotorska regija ne sadrži tipične sekvence TATA i CAAT, no sadrži sekvencu bogatu sekvencom CG, kao i vezna mjesta za AP-1, AP-2, PEA-3, NF- κ B i Sp-1 (Nagamine i sur., 2005.; Ulisse i sur., 2009.). Aktivacija transkripcije na dva vezna mjesta za AP-1 i jednom vezom mjestu za Sp-1 zaslužna je za konstitutivnu ekspresiju (Blasi i Sidenius, 2010.; Nagamine i sur., 2005.; Ulisse i sur., 2009.). Također, forbol esteri PMA potiču vezanje c-Jun i c-Fos na sekvence promotora AP-1 i Ets-1 te indukciju transkripcije gena uPAR. Posttranskripcijska regulacija također utječe na stabilnost mRNA uPAR (Nagamine i sur., 2005.). uPAR nije samo proteinski receptor, već utječe na migraciju, adheziju, diferencijaciju i proliferaciju unutarstaničnim signaliziranjem (Baart i sur., 2020.; Blasi i Carmeliet, 2002.). Struktura uPAR, kao i njegova interakcija s uPA i PAI-1, prikazana je na slici 2.



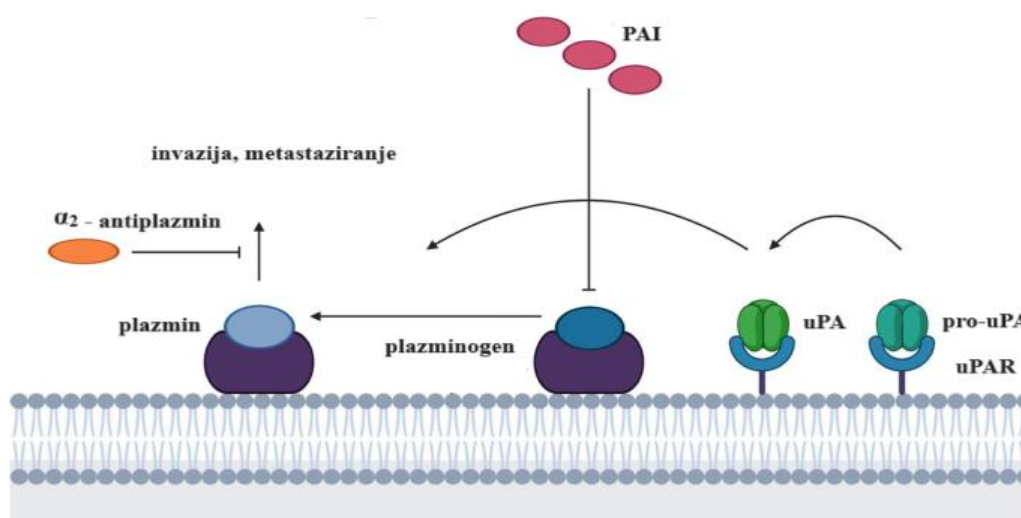
Slika 2. Receptor urokinaznoga plazminogenkoga aktivatora.

- A) uPAR se sastoji se od transmembranske i unutarstanične domene, usidren i kovalentno vezan C-terminalnim krajem pomoću glikozil-fosfatidil-inozitolnog sidra na kojeg se nastavlja tri domene: D1, D2 i D3 povezane s dva fleksibilna linkera. Djeluje kao receptor za urokinazu koja aktivira plazminogen, pri čemu nastaje plazmin, enzim odgovoran za razgradnju ekstracelularnog matriksa.
- B) Kompleks uPA-PAI-uPAR internaliziran je endocitozom ovisnom o klatrinu gdje LRP1 djeluje kao koreceptor. Tako dolazi do razgradnje uPA i PAI, dok se uPAR vraća na površinu stanice gdje može ponovno vezati novu uPA te sudjelovati u degradaciji ECM. Internalizacijom i razgradnjom kompleksa uPA-PAI-uPAR ograničava se trajanje i sprječava prekomjerna razgradnja ECM, čime se kontrolira stanična migracija i invazija. **uPAR**: receptor urokinaznog plazminogenkog aktivatora; **GPI**: glikozil-fosfatidil-inozitolno sidro; **ECM**: ekstracelularni matriks; **LRP1**: engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*, CD 91. *Preuzeto i modificirano prema Baart i sur. (2020.).*

2.5. Plazminogen i plazmin

Plazminogen je ubikvitarni serumski proenzim i kao aktivirana serinska proteaza plazmin ima širok spektar supstrata. Cijepanjem peptidne veze između 561. aminokiseline (arginina) i 562. aminokiseline (valina) nastaju dva polipeptidna lanca međusobno povezana disulfidnim mostovima. Na N- terminalnom kraju nalazi se α lanac koji sadrži 5 domena „kringle“ s mjestima vezanja lizina i β lanac koji sadrži domenu serinske proteaze s aktivnim mjestom sastavljenim od tri katalitičke aminokiseline - histidin 603, asparagin 646 i serin 741 (Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). Plazminogen se pretežno proizvodi u jetri te se nalazi u visokoj koncentraciji u plazmi, od oko 2 μ M (Mahmood i sur., 2018.). Među supstratima su mu

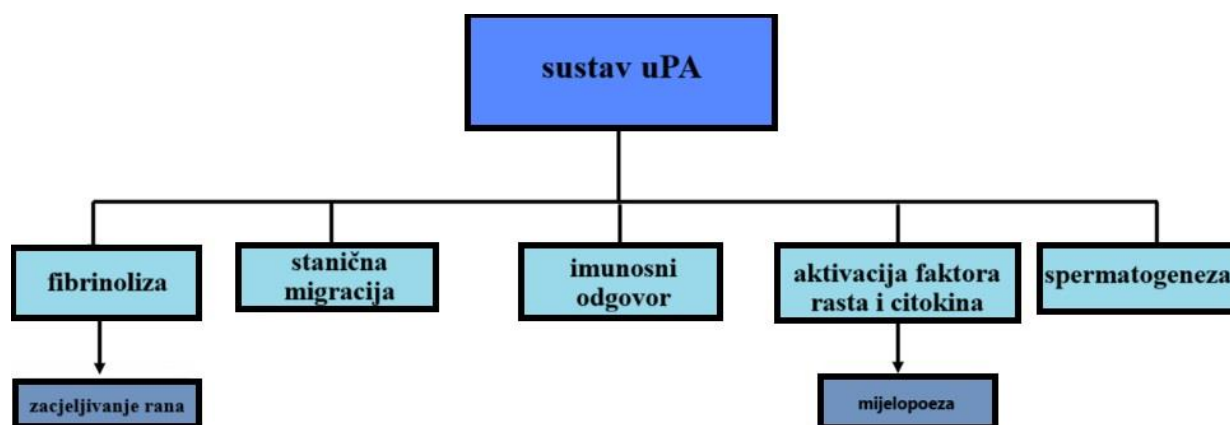
proteini ekstracelularnog matriksa poput vitronektina, laminina, fibronektina i fibrina (Blasi i Sidenius, 2010.; Nagamine i sur., 2005.). Više od polovine stanica na svojoj površini ekspirira receptore za plazminogen te se smatra da njegovo vezanje potiče staničnu migraciju lokalnom pregradnjom ekstracelularnog matriksa uz pomoć matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*; MMP) (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.). Aktivirani plazmin može specifičnim mehanizmom povratne veze aktivirati latentni pro-uPA što dodatno pojačava proizvodnju samog plazmina na površini stanica koje ekspiriraju uPAR. Glavni inhibitor ove kaskade je $\alpha 2$ -antiplazmin koji blokira samo aktivnost slobodnog plazmina, dok ostavlja netaknutim plazmin vezan za površinu stanice (Mahmood i sur., 2018.). Njegova je aktivnost regulirana sintezom i sekrecijom uPA, ali i koncentracijom njenog inhibitora PAI-1 (Blasi i Sidenius, 2010.). Regulacija aktivacije plazminogena, uključujući ključne komponente, inhibitore i povratne mehanizme, prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Regulacija plazminogenske aktivacije. Aktivirani plazmin može aktivirati latentni pro-uPA što dodatno pojačava proizvodnju samog plazmina na površini stanica koje ekspiriraju uPAR. Glavni inhibitor ove kaskade je $\alpha 2$ -antiplazmin koji blokira samo aktivnost slobodnog plazmina, dok ostavlja netaknutim plazmin vezan za površinu. Njegova je aktivnost regulirana sintezom i sekrecijom uPA i PAI-1. **pro-uPA:** neaktivni proenzim urokinaze; **uPA:** urokinaza; **uPAR:** receptor urokinaznoga plazminogenskoga aktivatora; **PAI-1:** inhibitor urokinaznoga plazminogenskoga aktivatora -1. *Preuzeto i modificirano prema Salamouni i sur. (2022.).*

2.6. Fiziološka uloga sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora

uPA specifično aktivira plazminogen i omogućuje nastanak plazmina, izvanstanične proteaze (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.). Visoka razina uPA i uPAR primjećena je kod procesa remodeliranja tkiva u embriogenezi, kod invazije trofoblasta, zacjeljivanja rana i postlaktacijske involucije dojke. Komponente sustava uPA prisutne su raznim hematopoetskim stanicama - sudjeluju u procesima mijelopoeze, ali i imunološkom odgovoru. Prilikom imunosnog odgovora otpuštaju se proinflammatorni citokini (npr. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) koji povećavaju ekspresiju i sekreciju uPA. Također, sustav uPA je uključen u spermatogenezu, može povećati pokretljivost spermija, poticati akrosomsku reakciju, a time i povećati mogućnost oplodnje (Mahmood i sur., 2018.). U humanoj reprodukciji, smanjena količina suPAR u sjemennoj tekućini ukazuje na veću mobilnost i vitalnost spermija, dok njegova povišena količina u plazmi ukazuje na veću mogućnost nastanka sindroma hiperstimulacije jajnika (Martinez-Soto i sur., 2018.). U opstetriciji, povišene vrijednosti suPAR u plazmi ukazuje na veću mogućnost prijevremenog porođaja (Koelbl i sur., 1989.). Poremećena ekspresija komponenti sustava uPA otkrivena je u raznim vrstama tumora, pri čemu ekspresija uPA nije prisutna u svim tumorskim stanicama, već je stanično specifična (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). uPA značajno pridonosi invaziji i migraciji stanica u primarnim i metastatskim tumorima (Blasi i Sidenius, 2010.; Mahmood i sur., 2018.). Fiziološka uloga uPA sustava prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Fiziološka uloga sustava uPA. uPA: urokinaza. Preuzeto i modificirano prema Mahmood i sur. (2018.).

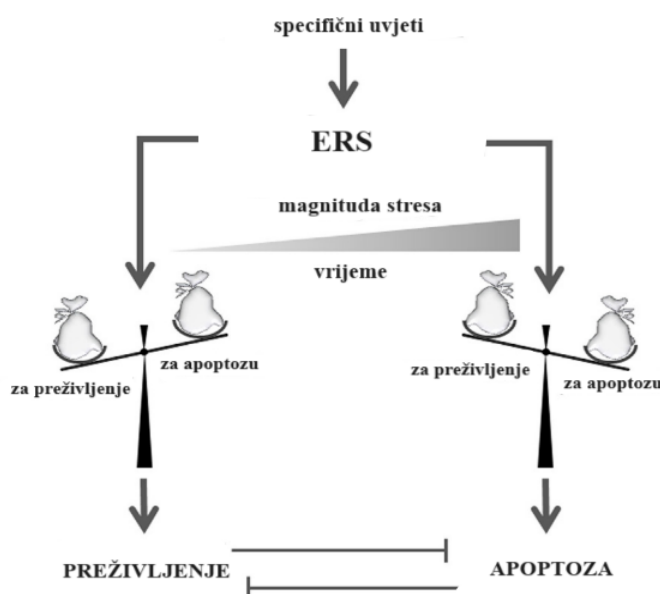
2.7. Uloga sustava urokinaznog plazminogenog aktivatora u progresiji tumora

Sustav uPA preko interakcije uPA-uPAR s integrinima i vitronektinom sudjeluje u migraciji, proliferaciji i adheziji stanica, neoangiogenezi i metastaziranju sudjelovanjem u procesu epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT). To je biološki proces u kojem se polarizirane epitelne stanice transformiraju u mezenhimske stanice sa sposobnošću mobilizacije, smanjene apoptoze i povećane proizvodnje proteina ECM (Blasi i Carmeliet, 2002.; Duffy, 2005.; Yepes, 2020.). Inhibicija ekspresije uPAR može potisnuti EMT induciran hipoksijom (Duffy, 2005.). Neoangiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila kojom se omogućuje opskrba tumora kisikom i hranjivim tvarima te se tako potiče rast, invazija i metastaziranje (Blasi i Carmeliet, 2002.; Duffy, 2005.; Yepes, 2020.). Proliferacija tumorskih stanica povezana je s nastankom kompleksa uPA-uPAR- $\alpha 5\beta 1$ integrin, dok je za pokretanje proliferacije endotelnih stanica neophodna stimulacija proangiogenim faktorima rasta (npr. VEGF, FGF-2) čije oslobađanje potiče uPA (Duffy, 2005.). U endotelu, uPAR može utjecati na inhibiciju ekspresije PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*), tumor supresor gena, te utjecati na povećanje signalizacije putem signalnog puta PI3K/AKT (Blasi i Carmeliet, 2002.; Dass i sur., 2008.). Povišena razina uPAR primijećena je kod karcinoma želuca, debelog crijeva, gušterače, pluća, dojke, sluznice i vrata maternice, jajnika, prostate, bubrega, štitnjače, melanoma, leukemije i glioblastoma (Dass i sur., 2008.). Aktivnost uPA kod tumora dojke korelira s veličinom tumora i brojem metastaza (Ulisse i sur., 2009.). Uz estrogenske receptore i receptor HER-2 (engl. *human epidermal growth factor receptor -2*), uPA i PAI-1 su glavni neovisni prognostički markeri koji nam govore u prilog kratkom vremenu bez relapsa i lošem preživljenju (Dass i sur., 2008.; Duffy, 2005.; McMahon i Kwaan, 2015.; Ulisse i sur., 2009.). Ako znamo da je PAI-1 inhibitor uPA, trebao bi imati antitumorski učinak, no PAI-1 ne sprječava protumorski učinak cijelog sustava, već ga naprotiv pojačava - pacijenti s povećanom ekspresijom PAI-1 imaju lošiju prognozu (Duffy, 2005.). Paradoksalno, lučenje PAI-1 kod tumorskih stanica inducira angiogenezu, osigurava rast i razvoj tumora, dok PAI-1 preko interakcija s vitronektinom i kompleksom uPA/uPAR ima velik utjecaj na vezanje i migraciju stanica te njegova inhibicija uPA održava mitogeni signal i potpomaže angiogenezu tumora (Duffy, 2005.; Mahmood i sur., 2018.). Istraživanja su pokazala poveznicu između barem jednog od elemenata sustava uPA i agresivnog razvoja malignih tumora. Povećana ekspresija uPA i PAI-1 korelira s preživljenjem u naprednom stadiju karcinoma jajnika. Ekspresija uPAR korelira sa slabim preživljenjem i govori nam o uspješnosti kemoterapije (Dass i sur., 2008.; McMahon i Kwaan, 2015.). U karcinomu vrata maternice, uPA i PAI-1 su povišeni u invazivnom karcinomu i predviđaju rizik limfogenog širenja. U karcinomu endometrija (sluznice

maternice), uPA i suPAR su povišeni u plazmi, uPAR korelira s naprednim stadijem bolesti, a PAI-1 korelira s vremenom relapsa i sveukupnim preživljenjem (Dass i sur., 2008.; Duffy, 2005.; Mahmood i sur., 2018.; McMahon i Kwaan, 2015.). Uz PAI-1 postoji i PAI-2 koji je prvi puta izoliran iz ljudske posteljice te može inhibirati i uPA i tPA (engl. *tissue plasminogen activator*) (Mahmood i sur., 2018.). PAI-2 pripada skupini serpina B, dok je PAI-1 serpin E1 (Blasi i Carmeliet, 2002.; Mahmood i sur., 2018.). PAI-2 je protein molekulske mase 47 kDa koji sadrži u svojoj strukturi tri mjesta glikozilacije (Mahmood i sur., 2018.). Njegov reaktivni centar sastoji se od dvije aminokiseline, arginina 380 i treonina 381 te poput reaktivnog centra PAI-1 služi kaoamac za ciljane serinske proteaze s kojima stvara ireverzibilne kovalentne komplekse (Mahmood i sur., 2018.). Nalazi se i unutar i izvan stanice, ali se izvan stanice luči malena količina glikoziliranog PAI-2 molekulske mase 60 kDa (Mahmood i sur., 2018.). Za razliku od protumorskog PAI-1, inhibitor PAI-2 ima antitumorski učinak. Zbog svoje strukture ne može ostvarivati iste interakcije kao PAI-1, stoga je njegova primarna uloga u tumorima fiziološka inhibicija uPA i kompeticija s protumorskim PAI-1 (Mahmood i sur., 2018.; McMahon i Kwaan, 2015.). Također, koncentracija PAI-2 u plazmi raste pri kraju trudnoće, a proizvodi ga trofoblast posteljice - tako štiti posteljicu od proteolitičke razgradnje na kraju trudnoće i sprječava njeno prerano odvajanje tj. abrupciju (Koelbl i sur., 1989.). Tumorski mikrookoliš prolazi kroz brojne dinamične promjene koje podržavaju rast, invaziju i otpornost tumora na terapiju. Ključne karakteristike uključuju hipoksiju, metaboličke promjene, remodeliranje ECM i imunološku supresiju. U brzorastućim tumorima često dolazi do hipoksije zbog neadekvatne vaskularizacije, što potiče aktivaciju faktora inducibilnog hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor*; HIF-1 α), koji regulira ekspresiju gena uključenih u angiogenezu, metaboličku prilagodbu i otpornost na stres (Semenza, 2012.). Istovremeno, tumorske stanice preusmjeravaju metabolizam prema aerobnoj glikolizi umjesto oksidativne fosforilacije, čak i u prisutnosti kisika. Ovaj fenomen zvan Warburgov efekt omogućava brzu proizvodnju ATP-a i doprinosi održavanju redoks ravnoteže, čime potiče proliferaciju i preživljavanje stanica. Osim toga, povećavajući unos glukoze i proizvodnju laktata, stvara kiseli mikrookoliš što potiče invazivnost i metastaziranje tumora (De Berardinis i Chandel, 2016.; Semenza, 2012.). Paralelno dolazi do remodeliranja ECM, pri čemu proteaze poput MMP razgrađuju matriksne proteine te također omogućuju tumorskim stanicama migraciju i metastaziranje (Egeblad i sur., 2010.). Sve ove promjene zajedno oblikuju kompleksan i dinamičan ekosustav koji omogućuje tumorskim stanicama preživljavanje, prilagodbu i progresiju bolesti.

2.8. Stres endoplazmatskog retikuluma

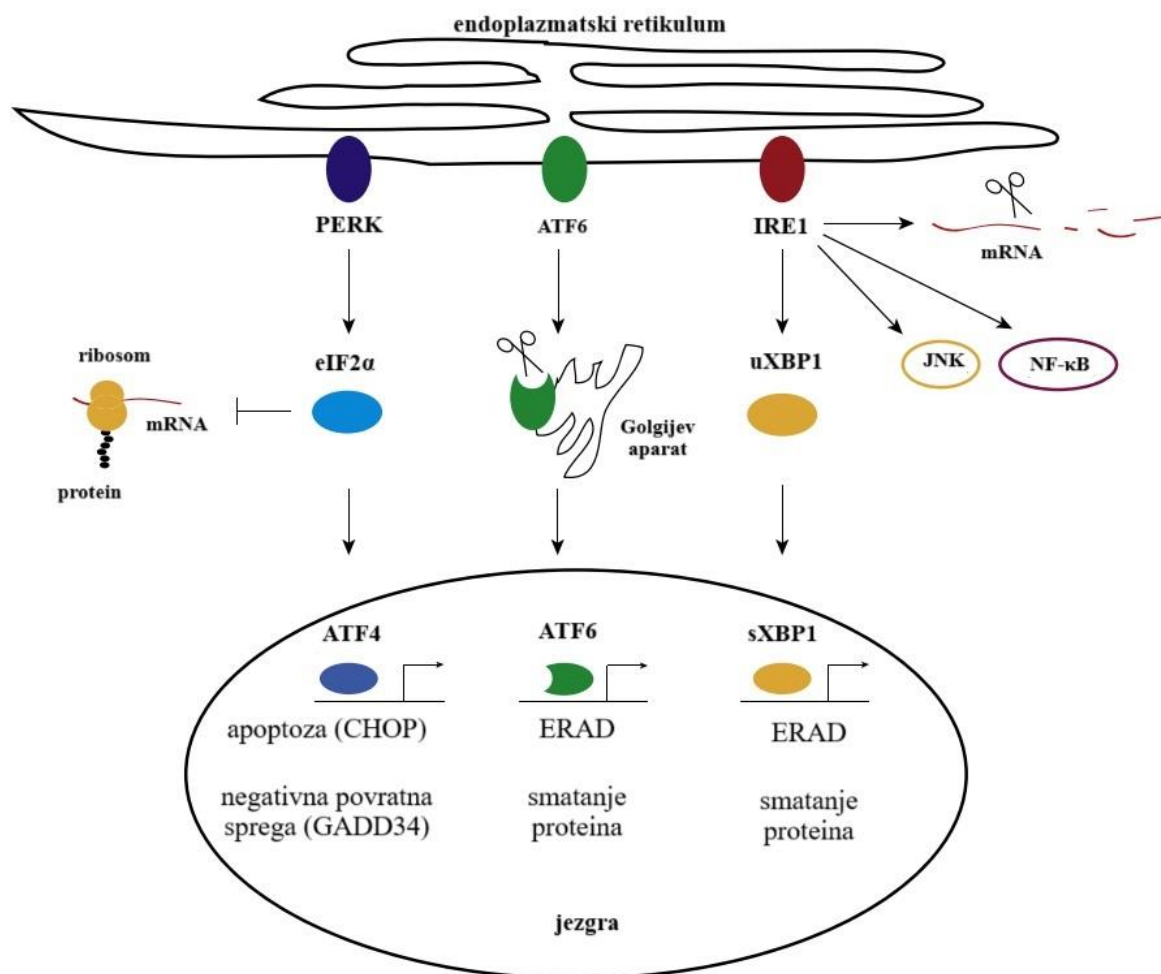
Endoplazmatski retikulum sustav je unutarstaničnih membrana koji sudjeluje u sintezi sekretornih i membranskih proteina, regulira njihovo pravilno smatanje, održava homeostazu kalcija te regulira sintezu lipida (Corazzari i sur., 2017.). Sastoji se od hrapavog i glatkog endoplazmatskog retikuluma. Jedna od zadaća hrapavog endoplazmatskog retikuluma je kontrola pravilnog smatanja novosinteziranih proteina, što omogućuju šaperoni (Schröder i Kaufman, 2005.). Međutim, može se dogoditi da se u specifičnim uvjetima (manjak kalcija, poremećaj glikozilacije), u endoplazmatskom retikulumu nagomilaju nepravilno smotani ili nesmotani proteini te dovedu do ERS. U slučaju produljenog ERS dolazi do nakupljanja nepravilno smotanih proteina, odnosno do aktivacije UPR (Corazzari i sur., 2017.; Liang i sur., 2021.; Lin i sur., 2003.). Kako bi održala homeostazu, stanica pokreće sintezu šaperona, degradaciju povezanu s endoplazmatskim retikulumom tzv. ERAD (engl. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) i autofagiju (Corazzari i sur., 2017.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.). ERAD je proces kojem se proteini retranslociraju u citosol, ubikvitiniraju te degradiraju u proteasomu. Autofagija je proces u kojem se dijelovi endoplazmatskog retikuluma obuhvate dvostrukom membranom i te u daljnjem procesu, donosom lizosomskih hidrolaza razgrađuju u novostvorenom autofagosomu (Corazzari i sur., 2017.). Hoće li doći do preživljenja ili apoptoze stanice ovisi o duljini trajanja i jačini stimulusa. Ova dinamika signalizacije prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Stanični odgovor na ERS. ERS: stres endoplazmatskog retikuluma. Preuzeto i modificirano prema Corazzari i sur. (2017.).

2.9. Odgovor nesmotanih proteina

Signalne puteve odgovora UPR pokreće aktivacija receptora na membrani endoplazmatskog retikuluma prilikom nagomilavanja nepravilno smotanih proteina i nedostatka slobodnih šaperona. Prvi poznati regulator UPR je BiP (HspA5, GRP78) (engl. *binding immunoglobulin protein*, *heat shock protein*, *glucose regulated protein* 78). Cilj UPR je obnova homeostaze endoplazmatskog retikuluma smanjenjem sinteze proteina, povećanjem sinteze šaperona i degradacijom nepravilno smotanih proteina, a može potaknuti i procese autofagije i apoptoze. Reguliran je pomoću tri signalna puta koje pokreće aktivacija receptora na membrani endoplazmatskog retikuluma što je prikazano na Slici 6. To su: PERK (engl. *protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*), ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*) i IRE1 α (engl. *inositol-requiring enzyme type 1 α*) (Corazzari i sur., 2017.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.). Trenutačno razumijevanje ovog sustava pokazuje da su, u uvjetima bez stresa, PERK, ATF6 i IRE1 α , prvenstveno vezani za BiP, što ih održava neaktivnima i sprječava signalizaciju UPR (Corazzari i sur., 2017.; Ramirez i sur., 2020.; Senft i Ronai, 2015.). Kada se nepravilno smotani proteini akumuliraju, odnosno kada se aktivira ERS, BiP se odvaja od PERK, ATF6 i IRE1 α , kako bi se vezao za nesmotane polipeptidne lance. Oslobođanjem od BiP pokreće se signalna kaskada odgovora UPR u citosolu (Adams i sur., 2019.; Corazzari i sur., 2017.; Pyrko i sur., 2007.; Roller i Maddalo, 2013.).



Slika 6. Odgovor nesmotanih proteina. Tri senzora ERS - PERK, ATF6 i IRE1 aktiviraju složenu transkripcijsku kaskadu s različitim funkcijama u citosolu. PERK fosforilira eIF2 α , čime se općenito smanjuje sinteza proteina, ali istodobno omogućuje selektivnu translaciju određenih gena, uključujući ATF4. Tijekom ERS, ATF6 se translocira u Golgijev aparat, gdje prolazi proteolitičku obradu i postaje visoko aktivan transkripcijski faktor. IRE1, osim što smanjuje dotok proteina u ER poticanjem degradacije mRNA, aktivira dodatne stanične signalne puteve, poput JNK i NF- κ B, s ciljem ublažavanja ERS. Također, katalizira cijepanje nemodificirane mRNA XBP1, čime nastaje sXBP1 koja se prevodi u funkcionalni transkripcijski faktor. Sva tri transkripcijska faktora pridonose pojačanoj ekspresiji molekula šaperona, uz regulaciju svojih specifičnih ciljnih gena, čime se nastoji ponovno uspostaviti homeostaza endoplazmatskog retikuluma. U slučaju perzistentnog stresa i neuspješne adaptacije, aktiviraju se putevi stanične smrti. **PERK**: protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; **ATF6**: activating transcription factor 6; **IRE1**: inositol-requiring enzyme type 1; **eIF2 α** : eukaryotic initiation factor 2 α ; **JNK**: c-Jun N-terminalna kinaza; **NF- κ B**: nuklearni faktor kappa B; **XBP1**: X-box binding protein-1; **sXBP1**: spliced X-box binding protein-1; **ERAD**: degradacija povezana s endoplazmatskim retikulumom. *Preuzeto i modificirano prema Senft i sur. (2015.).*

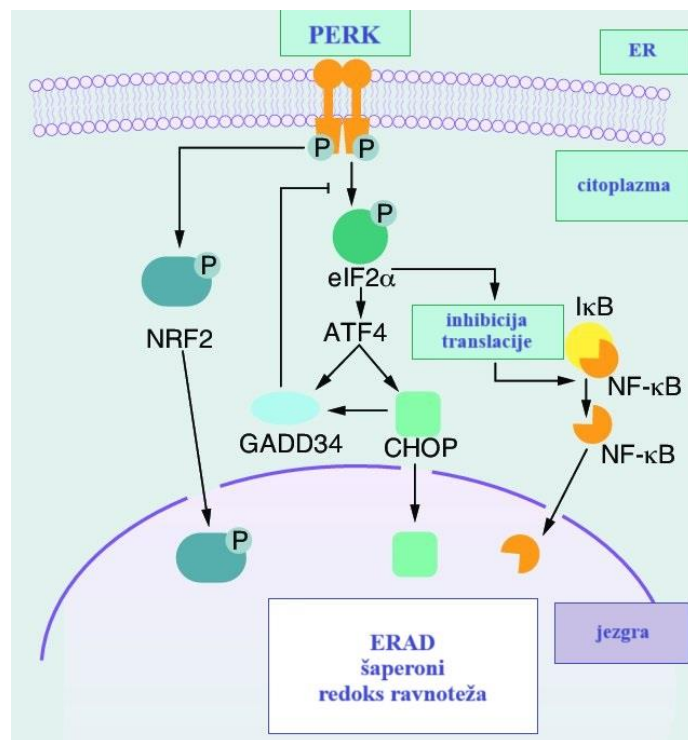
PERK je tip I transmembranskog proteina endoplazmatskog retikluma koji se sastoji od serin/treonin kinazne citosolne domene na C-terminalnom kraju i N-terminalne luminalne domene kojom prepoznaje nepravilno smotane proteine (Dadey i sur., 2018.; Nagamine i Dolan, 2021.). Aktivacija PERK-a započinje disocijacijom BiP od luminalne domene (Dufey i sur., 2020.; Nagamine i Dolan, 2021.; Senft i Ronai, 2015.). Nakon aktivacije dolazi do dimerizacije i autofosforilacije kinaze PERK, što rezultira fosforilacijom podjedinice α eukariotskog inicijacijskog faktora, eIF2 α (engl. *eukaryotic initiation factor 2 α*) kako bi se privremeno zaustavila globalna translacija proteina, dok se istodobno omogućuje selektivna translacija određenih mRNA, uključujući onu za transkripcijski faktor ATF4 (engl. *activating transcription factor 4*). ATF4 potom regulira ekspresiju niza gena uključenih u adaptivne mehanizme unutar UPR, kao i puteve koji vode prema staničnom preživljenju ili apoptozi (Chen i Cubillos-Ruiz, 2021.; Corazzari i sur., 2017.; Dicks i sur., 2015a.; Dufey i sur., 2020.; Hwang i Qi, 2018.; Pyrko i sur., 2007.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.).

ATF4 pogoduje preživljenju stanica, inducira ekspresiju proteina TRIBB3 (engl. *Tribbles protein 3*), inhibira defosforilaciju eIF2 α (pomoću enzima PP1A (engl. *protein phosphatase 1A*) te time sprječava pretjeranu aktivaciju UPR (Corazzari i sur., 2017.; Pecoraro i sur., 2020.). mTOR (engl. *mechanistic Target of Rapamycin*) je serin/treonin kinaza koja djeluje u okviru dvaju funkcionalno različitih kompleksa: mTORC1 i mTORC2. mTORC1 regulira ključne stanične procese, uključujući rast, proliferaciju, sintezu proteina i inhibiciju autofagije. Njegova aktivacija ovisi o signalnom putu PI3K/AKT te je osjetljiva na dostupnost nutrijenata, energije i rastnih faktora. mTORC2 sudjeluje u regulaciji metabolizma i preživljenja stanica, uglavnom putem aktivacije AKT-a, no njegova uloga u regulaciji autofagije i apoptoze manje je izražena u usporedbi s mTORC1. TRIBB3, kao negativni regulator signalizacije putem AKT, može potaknuti autofagiju inhibicijom signalizacije kompleksa mTORC1. Inhibicija mTORC1 uklanja njegov supresivni učinak na autofagiju, čime TRIBB3 indirektno potiče aktivaciju autofagijskih procesa. Osim toga, TRIBB3 može doprinijeti apoptozi, osobito u uvjetima staničnog stresa ili disfunkcije endoplazmatskog retikuluma. Iako je ekspresija TRIBB3 primarno inducirana putem osi PERK–ATF4 tijekom ER-stresa, sve je više dokaza da TRIBB3 može, putem modulacije signalnih putova kao što su AKT/mTOR i NF- κ B, neizravno utjecati i na druge grane UPR-a, uključujući IRE1 α i ATF6. Takva interakcija može dodatno oblikovati stanični odgovor na stres i odrediti smjer prema preživljenju ili apoptozi (Pecoraro i sur., 2020.). Tijekom dugotrajnog ERS, ATF4 djeluje kao transkripcijski faktor za proteine CHOP (engl. *C/EBP homologous protein*) ili DDIT3 (engl. *DNA damage-inducible transcript 3*) (Corazzari

i sur., 2017.). CHOP potiče ekspresiju oksidoreduktina-1 α (engl. *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 α* ; ERO1 α) i GADD34 (engl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) te pogoduje apoptozi (Corazzari i sur., 2017.; Lin i sur., 2003.; Lorenz i sur., 2021.; Senft i Ronai, 2015.). Na kraju, aktivacija i fosforilacija NRF2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor*) pomoću PERK regulira stanični antioksidativni odgovor koji je ključan za očuvanje redoks ravnoteže održavajući homeostazu reaktivnih kisikovih spojeva, ROS (engl. *reactive oxygen species*) (Senft i Ronai, 2015.). Detaljan prikaz ovog signalnog puta predstavljen je na Slici 7.

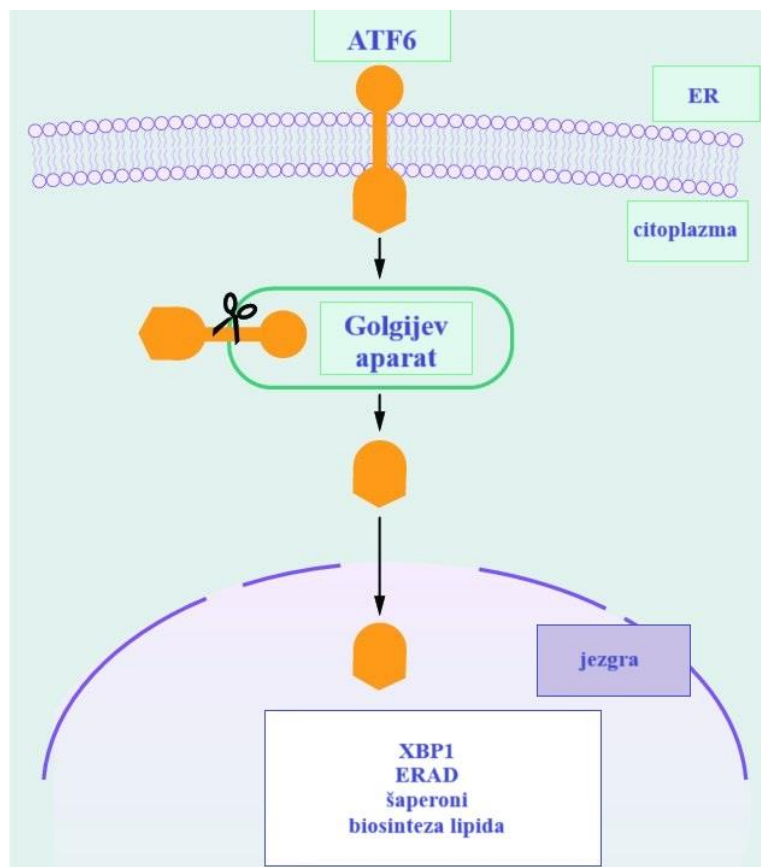
Još jedan od ključnih gena koji se inducira kao odgovor na ATF4 tijekom ERS je proapoptotski protein NOXA, proapoptotski protein koji igra ključnu ulogu u mitohondrijskoj disfunkciji, oslobađa citokrom C iz mitohondrija te aktivira kaspaze (Senft i Ronai, 2015.). Često je reguliran pomoću faktora CHOP čime se može zaključiti kako oba proteina zajedno djeluju u smjeru induciranja apoptoze (Senft i Ronai, 2015.).

Sekvestosom SQSTM1 (p62) (engl. *Sequestosome 1*) također je jedan od proteina odgovora na ERS. Pomaže usmjeravanju oštećenih proteina prema autofagiji, pomažući smanjenje ERS. Ako je stres dugotrajan, može utjecati na pro-apoptotske puteve, uključujući aktivaciju kaspaza. Služi kao modulator signalizacije staničnog stresa, no ta interakcija nije toliko dobro karakterizirana poput izravnih putova ATF4 ili CHOP (Park i sur., 2016.).



Slika 7. Signalni put PERK u odgovoru nesmotanih proteina. PERK je transmembranska kinaza aktivirana oligomerizacijom (dimerizacijom) i autofosforilacijom. PERK fosforilira eIF2 α , što dovodi do opće inhibicije translacije proteina. ATF4 inducira ekspresiju CHOP i GADD34, fosfataze koja djeluje kao regulator fosforilacije eIF2 α . PERK također može fosforilirati i aktivirati faktor transkripcije NRF-2, koji inducira ekspresiju gena uključenih u antioksidativni odgovor. Fosforilacija eIF2 α posredovana PERK-om i posljedično slabljenje translacije može pospješiti aktivaciju NF- κ B, budući da je poluživot njegovog inhibitora (I κ B) puno kraći. **PERK**: protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; **ATF4**: activating transcription factor 4; **eIF2 α** : eukaryotic initiation factor 2 α ; **NF- κ B**: nuklearni faktor kappa B; **CHOP**: C/EBP homologous protein ili **DDIT3** DNA damage-inducible transcript 3; **NRF2**: nuclear factor erythroid 2-related factor; **GADD34**: growth arrest and DNA damage-inducible protein 34; **ERAD**: degradacija povezana s endoplazmatskim retikulumom; **ER**: endoplazmatski retikulum; **IKK**: kinaza I κ B. *Preuzeto i modificirano prema Galluzzi sur. (2017.).*

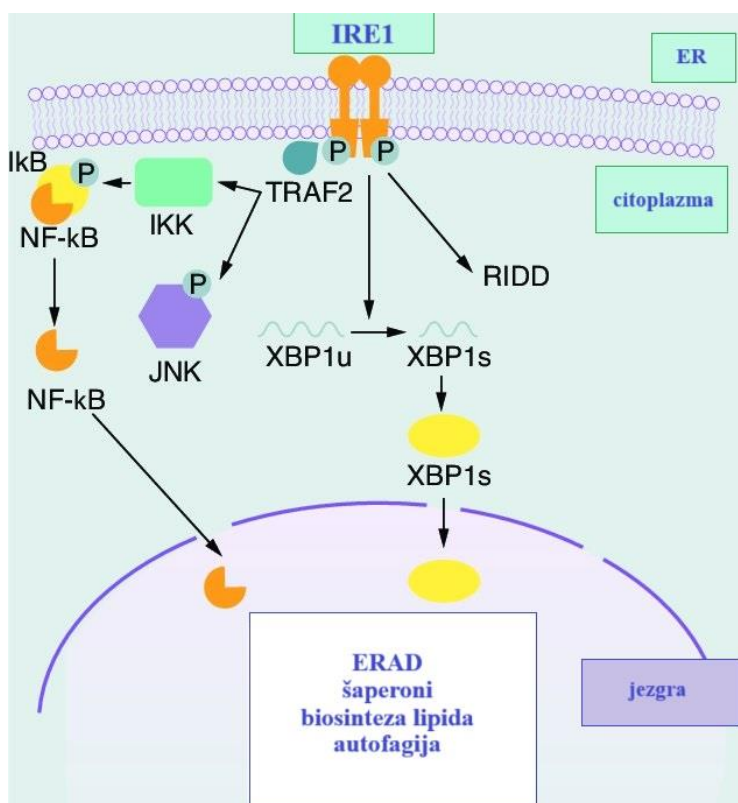
ATF6 je tip II transmembranskog proteina (Corazzari i sur., 2017.). Translokacija ATF6 iz endoplazmatskog retikluma u Golgijev aparat vodi u njegovu aktivaciju, pomoću serinske proteaze S1P i metaloproteinaze S2P, te tako modificiran ATF6 djeluje kao transkripcijski faktor (Corazzari i sur., 2017.; Dufey i sur., 2020.). Vežući se za DNA u jezgri potiče ekspresiju gena koji sudjeluju u odgovoru na ERS (npr. XBP1 (engl. *X-box binding protein-1*)) (Lin i sur., 2003.). Detaljan prikaz ovog signalnog puta predstavljen je na Slici 8.



Slika 8. Signalni put ATF6 u odgovoru nesmotanih proteina. ATF6 je lokaliziran na endoplazmatskom retikulumu stanice. Nakon ERS, ATF6 se prenosi u Golgijev aparat, gdje se podvrgava proteolizi (grafički prikaz škara). Fragment citosolne domene se oslobađa i migrira u jezgru, gdje potiče ekspresiju XBP1, šaperona ERAD i sintezu lipida. **ATF6:** activating transcription factor 6; **XBP1:** X-box binding protein-1; **ER:** endoplazmatski retikulum; **ERAD:** degradacija povezana s endoplazmatskim retikulumom. *Preuzeto i modificirano prema Galluzzi sur. (2017.).*

IRE1 je tip I transmembranskog proteina endoplazmatskog retikluma koji se sastoji od serin/treonin kinazne domene koja je senzor ERS i endoribonukleazne domene unutar citosola uključene u indukciju ekspresije gena (Lin i sur., 2003.). Čine ga dva homologa, IRE1 α i IRE1 β , pri čemu je IRE1 α taj koji potiče signalni put unutar odgovora nesmotanih proteina. Nakon što se oslobodi veze s BiP, na njega se vežu nepravilno smotani proteini te dolazi do dimerizacije i autofosforilacije kinazne domene (Corazzari i sur., 2017.; Lin i sur., 2003.). Fosforilacija i dimerizacija IRE1 α potiče endoribonukleaznu domenu koja iz mRNA XBP-1 izrezuje intron veličine 26 pb, čime nastaje sXBP1 (engl. *spliced X-box binding protein-1*). sXBP1 potiče transkripciju gena uključenih u ekspresiju šaperona ERAD, biogenezu i metabolizam lipida te modulira autofagiju i apoptozu (Dufey i sur., 2020.; Gentz i sur., 2013.; Senft i Ronai, 2015.).

Osim učinaka posredovanih sXBP-1, endoribonukleazna domena IRE razgrađuje mRNA povezanu s ribosomima kroz razgradnju ovisnu o IRE1 (engl. *IRE1-dependent decay*, RIDD) kako ne bi došlo do daljnjeg nakupljanja nesmotanih proteina (Ramirez i sur., 2020.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.). Također, kinazna domena IRE1 posredno dovodi do fosforilacije c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) te pridonosi apoptozi tijekom produljene signalizacije UPR (Adams i sur., 2019.; Ramirez i sur., 2020.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.). Detaljan prikaz ovog signalnog puta predstavljen je na Slici 9.



Slika 9. Signalni put IRE1 u odgovoru nesmotanih proteina. Oligomerizacija (dimerizacija) i autofosforilacija IRE1 aktiviraju njegovu domenu endoribonukleaze, koja cijepa mRNA XBP1, generirajući mRNA sXBP1 koja omogućuje translaciju transkripcijskog faktora XBP1s. IRE1 također može pridonijeti razgradnji mRNA povezanih s ribosomima u ER-u kroz proces poznat kao RIDD. Fosforilirani IRE1 α stupa u interakciju s IKK (engl. *the inhibitor of NF- κ B kinase*; I κ B kinase) i JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) regrutiranjem TRAF2 (engl. *TNF receptor associated factor 2*) stoga kontrolira aktivaciju dvaju glavnih upalnih transkripcijskih faktora NF- κ B i AP-1. **ER**: endoplazmatski retikulum; **IKK**: kinaza I κ B; **JNK**: c-Jun N-terminalna kinaza; **RIDD**: razgradnja ovisna o IRE1 **IRE1**: inositol-requiring enzyme type 1; **NF- κ B**: nuklearni faktor kappa B; **XBP1**: X-box binding protein-1; **sXBP1**: spliced X-box binding protein-1; **ERAD**: degradacija povezana s endoplazmatskim retikulumom. *Preuzeto i modificirano prema Galluzzi sur. (2017.).*

2.10. Odgovor nesmotanih proteina u tumorskim stanicama

Zajedničkim djelovanjem signalnih puteva UPR dolazi do smanjene translacije, a time i sinteze proteina, transkripcijske aktivacije gena koji kodiraju faktore uključene u pravilno smatanje proteina i njihovu razgradnju u endoplazmatskom retikulumu i ERAD – retranslokacije ubikvitiranih proteina u citosol te usmjeravanja u proteasom na degradaciju (Chen i Cubillos-Ruiz, 2021.; Corazzari i sur., 2017.; Dicks i sur., 2015a.; Hwang i Qi, 2018.; Pyrko i sur., 2007.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.).

Neke tumorske stanice imaju promijenjenu ekspresiju proteina UPR, npr. povećanu količinu šaperona, što im povećava otpornost na induktore staničnog stresa (Dadey i sur., 2018.; Gao i sur., 2012.; Watkins i Sontheimer, 2012.). Do sada je pokazano kako inhibicija ekspresije BiP inhibira rast, progresiju i metastaziranje tumorskih stanica (Pyrko i sur., 2007.). U stanicama glioblastoma, visoka ekspresija ATF4 povezana je s lošim ukupnim preživljenjem, PERK je ključan za opstanak stanica pod stresom, dok IRE1 potiče daljnju diferencijaciju stanica (Atkins i sur., 2013.; Axten i sur., 2013.).

Aktivacija PERK ima važnu ulogu u glioblastomu i karcinomu dojke. U glioblastomu, on je ključan za održavanje svojstava glioblastomskih matičnih stanica. Aktivacija potiče preživljavanje i omogućava da ostanu u nespecijaliziranom, matičnom obliku, zadrže sposobnost samoobnavljanja i nezreli fenotip čime mogu biti odgovorne za recidiv tumora. Stoga signalizacija PERK može biti odgovorna za agresivnost glioblastoma (Axten i sur., 2013.; Dicks i sur., 2015b.; Pyrko i sur., 2007.; Ramirez i sur., 2020.). S druge strane, put IRE1 održava diferencirani fenotip stanica (Liang i sur., 2021.; Ramirez i sur., 2020.). Zaključno, čini se da PERK i IRE1 imaju suprotne uloge u glioblastomu.

U karcinomu dojke IRE1 igra ključnu ulogu u preživljavanju stanica pod stresom, omogućavajući im da prežive i rastu u nepovoljnim uvjetima. Potiče invaziju i metastaziranje, čineći tumor agresivnijim. Osim toga, istraživanja sugeriraju da PERK može regulirati signalizaciju u vezi s estrogenskim receptorima u karcinomu dojke, čime doprinosi rastu tumora (Axten i sur., 2013.; Dicks i sur., 2015b.; Liang i sur., 2021.; Pyrko i sur., 2007.; Ramirez i sur., 2020.).

3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza rada je da su ERS i UPR povezani s modulacijom aktivnosti sustava uPA te da odgovor ovisi o specifičnoj signalizaciji stanične linije.

Cilj rada je istražiti ulogu ERS u modulaciji aktivnosti sustava uPA kod odabranih staničnih linija.

Specifični ciljevi su:

1. istražiti utjecaj tvari koja je poznati induktor ERS na promjene u sustavu uPA
2. istražiti utjecaj induktora staničnog stresa za koje znamo da izazivaju promjene u sustavu uPA, na ekspresiju molekula sustava UPR
3. inhibirati pojedine molekule signalnog puta PERK i tako istražiti njihovu ulogu u regulaciji transkripcije i aktivacije sustava uPA
4. istražiti utjecaj ERS na staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzgoj stanica

U radu su korištene stanične linije karcinoma dojke MDA-MD-231, ljudskog embrionalnog bubrega HEK-293, glioblastoma A1235, neuroglioma H4, osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa. Stanična linija glioblastoma A1235 dobivena je iz laboratorija S. A. Aaronsona (*National Cancer Institute*, Bethesda, MD, SAD, Giard i sur. 1973.), dok su druge stanične linije komercijalno dostupne (engl. *American Type Culture Collection* (ATCC), SAD). Stanične linije uzgajaju se u Dulbeccovom modificiranom Eaglovom mediju (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Sigma-Aldrich, SAD) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich, SAD) pri temperaturi 37 °C i vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂ u inkubatoru (Heraeus, Njemačka). Kako bi se adherentna stanična linija odvojila od podloge, koristi se 0,25 % otopina tripsina (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon odvajanja od podloge, tripsin se inaktivira dodatkom medija sa serumom.

4.2. Brojanje stanica s pomoću hemocitometra

Koncentracija stanica određuje se brojanjem pomoću hemocitometra (Bürker-Turk komorice, Kefo, Hrvatska), predmetnog stakalca s ucrtanom kvadrantnom mrežicom, u tekućoj suspenziji pod mikroskopom (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka).

4.3. Obrada stanica kemoterapeutcima

Stanične linije su tretirane alkilirajućim agensima N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom (MNNG) (dar B. Brdara, Institut Ruđer Bošković), natrijevim salicilatom (NaS) (Kemika, Hrvatska) te gemcitabinom (MedChemExpress, SAD), induktorom ERS thapsigarginom (MedChemExpress, SAD) i inhibitorima ERS, icerguastatom, epigalokatehin 3-galatom (ECGC) (MedChemExpress, SAD) i GSK2656157 (MedChemExpress, SAD). 1 M natrijev salicilat priprema se otapanjem u destiliranoj vodi (deH₂O), 10 mM N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) u apsolutnom etanolu, thapsigargin, icerguastat i GSK2656157 u dimetilsulfoksidu, a ECGC i gemcitabin u vodi.

4.4. Praćenje stanične proliferacije

Kako bi se usporedila sposobnost proliferacije stanica, 1×10^4 stanica je nasađeno po jažici ploče s 48 jažica. Nakon 24 sata stanice su tretirane različitim koncentracijama ispitivane tvari u triplikatima, dok su netretirane stanice služile kao kontrola. Stanice su brojane svaka 24 sata tijekom četiri dana tako da bi se tripsinizirale i odredio njihov ukupni broj brojanjem na hemocitometru.

4.5. Određivanje aktivnosti urokinaze metodom radijalne kazeinolize

Metoda radijalne kazeinolize koristila se za analizu urokinazne aktivnosti u kondicioniranom mediju u kojem stanice rastu. Stanice su nasađene u Petrijeve zdjelice, 1×10^5 stanica po zdjelici i inkubirane 24 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon inkubacije, dio stanica se tretirao kemoterapeuticima. Nakon idućih 24 sata, isprane su u fiziološkoj otopini i inkubirane u mediju DMEM bez seruma tijekom 6 sati, budući da serum sadrži plazminogen. Kondicionirani medij je sakupljen i centrifugiran na 2200 rpm, 4 °C da se uklone stanice, a supernatant pohranjen na -80 °C. Kako bi se izolirali proteini, stanicama se dodalo 100 µL lizirajućeg pufera (1 % Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl) te su sastrugane plastičnim strugačem. Tako pripremljeni stanični lizati pohranjeni su na -80 °C. U Erlenmeyerovoj tikvici pripremljen je agarozni gel koncentracije 2 % u vodi. Na 5 mL 2 % agaroze dodano je 2,5 mL fosfatnog pufera PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,76 mM KH_2PO_4 ; 10,14 mM Na_2HPO_4 , pH 7), 2,5 mL 8 % nemasnog mlijeka, 5 µL plazminogena (oko 7 mg/mL Sigma-Aldrich, SAD) i 100 µL 10 % natrijevog azida (Kemika, Hrvatska). U bunariće napravljene u gelu stavljeno je 5 µL kondicioniranog medija u duplikatima. Usporedno s uzorcima, u jažice su dodana serijska razrjeđenja komercijalne uPA (Leo Pharmaceutical Products, Danska) u rasponu koncentracija 0,1 mU do 100 mU (mU = jedinica aktivnosti urokinaze). Nakon prekonoćne inkubacije na 37 °C aktivnost urokinaze u uzorku određena je mjerenjem veličine lizirane zone. Iz podataka o veličini zona lize komercijalnog uPA poznate koncentracije, napravljena je baždarna krivulja i interpolacijom se odredila aktivnost uPA. Izmjerena aktivnost urokinaze normalizirana je s vrijednostima koncentracije proteina i izražena kao faktor povećanja u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (Madunić i sur., 2017.).

4.6. Test migracije stanica - test „zarastanja“

Test „zarastanja“ (engl. *scratch test*, *wound healing assay*) koristila se kako bi se izmjerila migracija stanica *in vitro* (Martinotti i Ranzato, 2020.). Konfluentnoj staničnoj kulturi napravilo

se nekoliko paralelnih ogrebotina pomoću sterilnog nastavka za mikropipete volumena 10 – 100 μ L. Zatim je stanicama odsisan medij i dodan svježi medij DMEM sa serumom. Ogrebotine su fotografirane na invertnom svjetlosnom mikroskopu (Zeiss Axiovert 40 CFL, Njemačka) kako bi se zabilježilo početno stanje. Stanice su obrađene kemoterapeuticima i inkubirane još 16-24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, ogrebotine su se ponovno fotografirale na istim mjestima. Stopa migracije određena je usporedbom širine ili površine „ogrebotine“ prvi i drugi dan. Za preciznije kvantificiranje stope migracije korišten je računalni program Image J (Horvat i sur., 2019a.; Suarez-Arnedo i sur., 2020.).

4.7. Test invazije stanica u komoricama s membranom

Za ispitivanje invazije stanica, stanice su nasadene u mediju bez seruma u komorice s membranom s porama veličine 8 μ m (engl. *Boyden transwell chamber*; Brand, Njemačka). Membrane su prethodno obložene ekstracelularnim matriksom (Maxgel Sigma-Aldrich, SAD) razrijeđenim do 100 puta u hladnom mediju bez seruma, koji je dodan u komorice te inkubiran 4 sata na 37 °C kako bi se polimerizirao. Višak tekućine je uklonjen, a membrane komorica ostavile sušiti 30 minuta. U komorice je dodano 100 μ L medija bez seruma i 200 μ L stanične suspenzije. Kako se u bunarić dodao medij sa serumom tako da su komorice donjim dijelom bile uronjene u medij, stanice su invadirale prema mediju sa serumom kroz ekstracelularni matriks. Kako bi se pratio utjecaj različitih agensa, dodani su u istoj koncentraciji u medij sa stanicama i medij sa serumom u koji su uronjene komorice, dok su netretirane stanice služile kao kontrola. Nakon inkubacije od 16-24 sata komorice su se odvojile i isprale dva puta u PBS-u kako bi se uklonile stanice iz gornjeg odjeljka. Zatim su fiksirane 2 minute u 4 % formaldehidu i 20 minuta u hladnom metanolu. Komorice su isprane dva puta u PBS-u i inkubirane 15 minuta u 0,2 % otopini kristal ljubičastog (Fluka, Švicarska) otopljenog u 2 % etanolu. Nakon sljedeća dva ispiranja u PBS-u, pamučnim štapićem su uklonjene stanice s gornje strane membrane. Obojene i osušene komorice fotografirane su pod lupom (Zeiss Stemi 2000c, Njemačka), a stanice prebrojane u programu Image J (Justus i sur., 2014.; O'brien i sur., 2016.).

4.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Vezanjem proteina za boju *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Roth, Njemačka), reagens Bradford mijenja boju iz smeđe u plavu pomicanjem apsorbancije s 465 na 595 nm. 1-10 μ L

staničnog lizata razrijeđeno je u vodi do volumena 100 μ L te je tako razrijeđenim uzorcima dodano 900 μ L reagensa Bradford (za 100 mL; 0,01 g *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 5 mL 95% etanol; 10 mL 85% H_3PO_4 ; deH_2O do 100 mL). Usporedno je napravljena serija razrjeđenja komercijalnog albumina goveđeg seruma. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi 5-10 minuta, apsorbancija je izmjerena spektrofotometrijski na valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina određena je pomoću baždarne krivulje za poznate koncentracije albumina (Sambrook i sur., 1989).

4.9. Izolacija staničnih proteina

Kako bi se iz stanica izolirali proteini, stanice su sakupljene u hladnom PBS-u i nakon centrifugiranja (500 g, 8 minuta na 4 °C), lizirane u 100 μ L lizirajućeg pufera (137 mM NaCl; 10 % glicerol; 1 % Triton X-100; 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM EDTA, pH 8,1) uz dodatak 1 μ L/100 μ L inhibitora proteaza (100 μ g/mL) (*Inhibitor Cocktail Plus*, Carl Roth, Njemačka) i 5 μ L/100 μ L pufera PMSF (100 mg/mL) (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma Aldrich, SAD). Stanični lizat je inkubiran na ledu 20 minuta, a zatim smrznut u tekućem dušiku. Nakon odmrzavanja, proteini su centrifugirani na 12000 rpm, 15 minuta na 4 °C kako bi se uklonio netopivi talog.

4.10. SDS-elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu

Uzorci proteinsu pripremljeni za elektroforezu tako da je na uzorak proteinskog lizata, dodana 1/5 volumena 6x pufera za nanošenje uzoraka (225 mM Tris-HCl; 20 % (v/v) glicerol; 2 mM SDS; 0,02 % (w/v) bromfenol-plavo; 1 % β -merkaptoetanol) te sudenaturirani 5 minuta pri 95 °C. Poliakrilamidni gel sastojao se od donjeg (gel za razdvajanje) i gornjeg dijela (gel za sabijanje). 10 %-tni gel za razdvajanje pripremljen je miješanjem 6,24 mL deH_2O , 5,4 mL 30 % akrilamida (AA; Acros Organics, Belgija), 4 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 160 μ L 10 % natrijev dodecil-sulfata (SDS), 160 μ L 10% amonijevog persulfata (APS; Acros Organics, Belgija) i 9,6 μ L tetrametiletilendiamina (TEMED; Acros Organics, Belgija). Gel za sabijanje pripremljen je miješanjem 7,4 mL deH_2O , 1,2 mL 30 % AA (Acros Organics, Belgija), 1,25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 100 μ L 10 % SDS-a, 100 μ L 10% amonijevog persulfata (APS) i 10 μ L TEMED. Na vrh gornjeg gela stavljen je češljic za formiranje jažica. Nakon polimerizacije, cijela kazeta je uronjena u pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl; 250 mM glicin; 0,1 % SDS, pH 8,3). Zatim je u jažice gela nanesen biljeg molekulskih masa *PageRuler Plus Prestained*

Protein Marker 26619 (New England Biolabs, SAD) i proteinski uzorci. Elektroforeza je tekla pri naponu od 120 V (Sambrook i sur., 1989).

4.11. Analiza proteina metodom Western blot

Nakon elektroforeze, gel je stavljen u pufer za prijenos (48 mM Tris-HCl; 39 mM glicin; 20 % metanol, pH 8,3). Membrana PVDF (engl. *polyvinylidene difluoride*; Roche, Švicarska) je kratko namočena u metanol kako bi se aktivirala, a zatim je u kazeti za prijenos složen „sendvič“ sastavljen od spužvice, dva filter papira, gela, membrane PVDF, dva filter papira i spužvice. Prijenos proteina s gela na membranu se odvijao 120 minuta, na 4 °C uz stalnu jakost struje od 380 mA. Nakon prijenosa, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na površinu membrane, membrana je inkubirana 60 minuta u 3 % otopini nemasnog mlijeka u puferu TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20). Nakon „blokiranja“, membrana je kratko isprana u puferu TBST i inkubirana preko noći u otopini primarnog antitijela razrijeđenog prema uputama proizvođača u 0,5 % mlijeku (ili 1 % BSA) u puferu TBST. Za detekciju proteina upotrijebljena su primarna antitijela, a njihov popis nalazi se u Tablici 1. Nakon inkubacije u primarnom antitijelu, membrana je isprana tri puta u puferu TBST 5-10 minuta, a zatim inkubirana u odgovarajućem sekundarnom antitijelu konjugiranom s enzimom peroksidaza iz hrena. Koristila su se sekundarna antitijela porijeklom iz kunića ili miša (oba Sigma-Aldrich, SAD), razrijeđena prema uputama proizvođača (1: 30 000) u 0,5 % nemasnog mlijeka u puferu TBST. Nakon 60 minuta inkubacije, membrana je isprana 3 puta po 5-10 minuta u puferu TBST. Za vizualizaciju proteina kemiluminiscencijom korištena je otopina Clarity Western ECL Substrate (BioRad, SAD). Potom je membrana izložena rendgenskom filmu Super HR-U30 (Kodak, Japan), 30-60 min, film je razvijen razvijaču (Kodak, SAD) i fiksiru (Efke Fotokemika, Hrvatska). Membrana PVDF se može ispirati kako bi se uklonila vezana antitijela i ponovno inkubirati u novom primarnom antitijelu ili obojiti bojom *amido black* (Sigma-Aldrich, SAD). Postupak uklanjanja vezanih antitijela se sastoji od dva ispiranja po 10 minuta u puferu za uklanjanje antitijela (7,5 g glicina; 0,5 g SDS; 5 mL Tween 20; dopuniti deH₂O do ukupnog volumena od 500 mL, pH 2,2), zatim dva ispiranja po 10 minuta u PBS-u i na kraju dva ispiranja po 10 minuta u puferu TBST (Sambrook i sur., 1989).

Tablica 1.: Popis korištenih primarnih antitijela:

Antigen	Molekularna masa	Razrjeđenje	Uzgojeno	Proizvođač
uPA	50 kDa	1:1000	kunić	Cell Signaling Technology, SAD
PAI-1	46 kDa	1:1000	miš	Becton, Dickinson and Company, SAD
uPAR	65 kDa	1:1000	kunić	Cell Signaling Technology, SAD
BiP	78 kDa	1:1000	kunić	Cell Signaling Technology, SAD
ATF4	49 kDa	1:1000	kunić	Cell Signaling Technology, SAD
CHOP	32 kDa	1:1000	kunić	Cell Signaling Technology, SAD
β-aktin	46 kDa	1:1000	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD

uPA: urokinazni plazminogeni aktivator; **PAI-1:** inhibitor aktivatora plazminogena-1; **uPAR:** receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora; **BiP** (HspA5, GRP78): *engl. binding immunoglobulin protein*; **ATF4:** *engl. activating transcription factor 4*; **DDIT3:** *engl. DNA-damage inducible transcript 3* ili **CHOP (GADD153):** *engl. C/EBP homologous protein*; **β-aktin:** beta aktin, biljeg količine proteina.

4.12. Izolacija RNA

Za izolaciju ukupne RNA korišten je komplet *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen, Njemačka). Stanice su lizirane u lizirajućem puferu (Buffer RLT) te su uzorci 5 puta provučeni kroz iglu kako bi se homogenizirali. Dodan im je 1 volumen 70 % etanola te su uzorci stavljeni u kolonice. Nakon centrifugiranja na 10000 rpm 15 sekundi, na kolonu je dodano 700 µL pufera RW1 i ponovljeno je ispiranje. Kolona je zatim postavljena u novu epruvetu i RNA eluirana s 30 µL vode bez RNAze. Uzorci RNA su pohranjeni na -80°C.

4.13. Provjera kvalitete i koncentracije RNA

Nakon izolacije potrebno je odrediti koncentraciju, čistoću i cjelovitost RNA. Koncentracija i čistoća izmjerena je spektrofotometrijski (Nanovue, Thermoscientific, SAD), mjerenjem apsorbanije na 230 nm, 260 nm i 280 nm. Osim masene koncentracije, određen je omjer apsorbanija na 280 i 260 nm koji je mjera onečišćenosti uzorka proteinima. Kvaliteta RNA provjerena je elektroforezom u 1 % agaroznom gelu u puferu TAE (40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0). U jažice gela nanešeno je po 1 µL uzorka pomiješanog s puferom za nanošenje

uzoraka (0,25 % bromfenol-plavo u vodi; 30 % glicerol). Gel je inkubiran u vodenoj otopini etidijevog bromida (10 mg/mL), 15 minuta. Samo RNA odgovarajuće kvalitete, čistoće i koncentracije koristila se za reverznu transkripciju (Sambrook i sur., 1989).

4.14. Reverzna transkripcija

Procesom obrnutog prepisivanja RNA je prevedena u cDNA koja je služila kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Za provedbu reverzne transkripcije napravljene su dvije reakcijske otopine. Prva reakcijska otopina sastojala se od 1 µL deoksiribonukleotida (dNTP; 10 mM; Sigma-Aldrich, SAD), 1 µL početnica oligo d(T) (50 pM; Roche, Švicarska), 2 µg RNA i vode bez RNAza do ukupnog volumena od 10 µL. Reakcijska otopina je inkubirana na 65 °C 5 minuta kako bi se denaturirala RNA. Zatim je pripremljena druga reakcijska otopina sastavljena od 4 µL 5x pufera za PCR (250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl₂; 15 mM MgCl₂, pH 8,3; TaKaRa, SAD), 0,5 µL 200 U/µL reverzne transkriptaze (*Prime Script Rtase*; TaKaRa, SAD), 0,5 µL 40 U/µL inhibitora RNAza (Applied Biosystems, SAD) i 5 µL vode bez RNAza do ukupnog volumena 10 µL. Inkubirana je 60 minuta na 42 °C, a zatim 15 minuta na 70 °C. Nakon obrnutog prepisivanja u otopinu je dodano 20 µL vode bez RNAza. Uspješnost reverzne transkripcije provjerena je reakcijom PCR pomoću početnica za gen hipoksantin-guanin fosforibozil transferazu (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, HPRT). cDNA pohranjena na -80 °C (Sambrook i sur., 1989).

4.15. Lančana reakcija polimerazom

Sekvence DNA od interesa umnožene su reakcijom PCRu reakcijskoj smjesi koja se sastojala od 1,5 µL 10x pufera za PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl₂, pH 8,3, 20 °C; Sigma-Aldrich, SAD), 0,3 µL MgCl₂ (25 mM; Sigma-Aldrich, SAD), 0,3 µL dNTP (10 mM; Sigma-Aldrich, SAD), 0,3 µL uzvodne početnice (10 µM), 0,3 µL nizvodne početnice (10 µM), 0,1 µL Taq polimeraze (5 U/< µL; Sigma-Aldrich, SAD), 1,2 µL cDNA te vode do ukupnog volumena 15 µL. U programu reakcije PCR uređaja ProFlex (Applied Biosystems), poslije početne denaturacije cDNA 5 minuta na 94 °C, provedeno je 35-40 ciklusa denaturacije (30 sekundi na 94 °C, vezanja početnica 30 sekundi na 56 °C te produljivanja lanaca 30 sekundi na 72 °C). Reakcija je završila produljivanjem lanaca 7 minuta na 72 °C.

4.16. Elektroforeza DNA u gelu agaroze

Za gel elektroforezu priređen je 0,8% agarozni gel u puferu TAE (40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) u koji je dodan etidij bromid (5 µg/mL). U uzorke DNA dodanaje 1/6 volumena 6x pufera za nanošenje, a elektroforeza je tekla pri naponu od 80 V. Gel je vizualiziran pomoću UV lampe.

4.17. Elektroforeza DNA u poliakrilamidnom gelu

Gel elektroforeza DNA u poliakrilamidnom gelu omogućuje razdvajanje malih fragmenata DNA. Gel je pripremljen kao 12 % poliakrilamidni gel (od matične otopine 30 % smjese AA i bisakrilamida 1:30) u 1 x puferu TBE (tris-boratni pufer, matična otopina 5x: 54 g Tris, 27,5 g borne kiseline, 20 mL 0,5 M EDTA pH 8) u 1 L deH₂O). Polimerizacija je potaknuta pomoću APS (140 µL/10 mL smjese) i TEMED-a (10 µL/10 mL smjese). Elektroforeza je provedena tijekom 2 sata pri 100 V, u 1x puferu TBE. Nakon završetka elektroforeze, gel je inkubiran 20 minuta u otopini etidij bromida radi interkalacije boje s nukleinskim kiselinama, čime je omogućena njihova vizualizacija pomoću UV lampe (Green i Sambrook, 2020.).

4.18. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Ekspresija RNA ispitana je pomoću PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Reakcijska smjesa sastojala se od 7,5 µL smjese 2x SYBR Green (engl. *SYBR Green PCR MASTER MIX*; Promega, SAD), 0,25 µL uzvodne početnice (10 µM), 0,25 µL nizvodne početnice (10 µM), 6 µL vode i 1 µL cDNA. Negativna kontrola imala je sve sastojke reakcijske smjese osim cDNA čiji se volumen nadomjestio vodom. Za svaki uzorak napravljene su dvije tehničke replike, a kao endogena kontrola korištene su sekvence gena *HPRT* (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Reakcija se odvijala na pločici s 96 bunarića (Applied Biosystems, SAD) u uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System Quant Studio (Applied Biosystems, SAD). Poslije denaturacije cDNA od 2 minute na 95 °C uslijedilo je 40 ciklusa denaturacije 15 sekundi na 95 °C te vezanja početnica i produljivanja lanaca na 56 °C. Vrijednost Ct korištena je za kvantifikaciju ekspresije ispitivanih gena. Za relativnu kvantizaciju ekspresije korištena je tzv. delta delta Ct metoda ($\Delta\Delta Ct$). Uređaj je detektirao broj ciklusa potrebnih kako bi reakcija dostigla eksponencijalnu fazu, tzv. Ct. Vrijednosti ΔCt označavaju razliku u broju ciklusa. Srednja vrijednost Ct gena od interesa normalizirana je prema srednjoj vrijednosti Ct gena *HPRT* (endogene kontrole) kako bi se odredila vrijednost ΔCt za svaki gen u svakom uzorku.

Srednje vrijednosti ΔC_t za uzorak uspoređene su sa srednjom vrijednošću ΔC_t kontrolnih stanica čime je dobivena vrijednost $\Delta\Delta C_t$. Pomoću nje određen je faktor promjene ekspresije gena koji nam govori koliko je puta promijenjena ekspresija određenog gena u uzorku u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (Namba i sur., 2015.).

4.19. Dizajn početnica

Početnice su dizajnirane pomoću softvera Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) tako da se nalaze na dva različita egzona kako bi se izbjeglo umnažanje genomske DNA. Jedinstvenost vezanja na ljudski genom provjerena je u programu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvence za početnice urokinaznog sustava i za *HPRT* korištene su u radu Horvat i sur. (2017.), a prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2.: Početnice za RT-qPCR.

Korištene početnice	
Ime	Sekvenca
HPRT	F: 5'-CTTTGCTGACCTGCTGGATT-3' R: 5'-TCCCCTCTTGACTTGGTCATT-3'
uPA	F: 5'-GGAGATGAAGTTTGAGGTGGAA-3' R: 5'-CTCCTTGGAACGGATCTTCAG-3'
PAI-1	F: 5'-CTGGTGAATGCCCTCTACTTC-3' R: 5'-TGCTGCCGTCTGATTTGT-3'
uPAR	F: 5'-GGAGATGAAGTTTGAGGTGGAA-3' R: 5'-CTCCTTGGAACGGATCTTCAG-3'
ATF3	F: 5'-CTGCAGAAAGAGTCGGAGAAG-3' R: 5'-CCGATGAAGGTTGAGCATGTA-3'
ATF4	F: 5'-AATGGCTGGCTGTGGATG-3' R: 5'-TCCAATCTGTCCCGGAGAA-3'
BiP (HSA5)	F: 5'-GGTGCCTACCAAGAAGTCTCA-3' R: 5'-TGATTGTCTTTTGTGAGGGGTCT-3'
SQSTM1	F: 5'-ACAGGTGAACTCCAGTCCCTA-3' R: 5'-CTGGGAGAGGGACTCAATCAG-3'
DDIT3 (CHOP)	F: 5'- GCAAGAGGTCTGTCTTCAGAT-3' R: 5'-GCTTGTGACCTCTGCTGGTT-3'
TRIBB3	F: 5'- TCAAGCTGTGTCGCTTTGTC-3' R: 5'- AGCTGAGTATCTCAGGTCCCA-3'
GDF15	F: 5'- GGATACTCACGCCAGAAGTG-3' R: 5'- GAACAGAGCCCGGTGAAG-3'
IRE1α	F: 5'- GATCTCTCCGAGCCATGAG-3' R: 5'-GGGCTGGAAGAGTCTCTCGT-3'
XBP1	F: 5'-GGAGTTAAGACAGCGCTTGGGGA-3' R: 5'- TGTCTGGAGGGGTGACAACTGGG-3'

uPA: urokinazni plazminogeni aktivator; **PAI-1:** inhibitor aktivatora plazminogena-1; **uPAR:** receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora; **ATF3:** engl. *activating transcription factor 3*; **ATF4:** engl. *activating transcription factor 4*; **BiP** (HspA5, GRP78): engl. *binding immunoglobulin protein*; **SQSTM1:** sekvestosom 1; **DDIT3:** engl. *DNA-damage inducible transcript 3* ili **CHOP** (**GADD153**): engl. *C/EBP homologous protein*; **TRIBB3:** engl. *Tribbles protein*; **GDF15:** GDF15 engl. *growth differentiation factor*; **IRE1α:** engl. *iron regulatory element 1α*; **XBP1:** engl. *X-box binding protein 1*.

4.20. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je primjenom programa Microsoft Excel (MS Office 2019, Microsoft, SAD). Usporedba kontrole i tretmana napravljena je pomoću Studentovog t-testa (dvokraka distribucija, jednake varijance dvaju uzoraka), a kao statistički značajne razlike uzete su vrijednosti koje su se razlikovale na razini p - vrijednosti $< 0,05$.

5. REZULTATI

Dosadašnja su istraživanja pokazala da je regulacija sustava uPA stanično specifična i da pojedini agensi povezani s oštećenjem DNA ili drugim oblicima stresa, izazivaju kod pojedinih staničnih linija povećanje, a kod pojedinih smanjenje aktivnosti uPA, dok neke stanične linije nisu pokazivale promjene (Brdar i Matulić, 1988.; Horvat i sur., 2019b.; Madunić i sur., 2017.; Matulić i Brdar, 2002.).

Kako NaS, koji je modulirao sustav uPA na različite načine, u ovisnosti o tipu stanica, može biti induktor ERS, istražilo se može li ERS biti uzrok promjene aktivnosti uPA kod različitih staničnih linija. Stoga su stanične linije usporedno tretirane tvarima koje su poznati induktori ERS i tvarima za koje potencijalno moduliraju sustav uPA. Stanične linije su tretirane induktorima staničnog stresa, kemoterapeutima koji kod nekih linija moduliraju sustav uPA (gemcitabin (Wang i sur., 2017.), alkilirajućim agensom N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidinom i NaS) te induktorom ERS thapsigarginom, kako bi se istraživo utjecaj tvari koja je poznati induktor ERS na promjene u sustavu uPA.

5.1. Analiza urokinazne aktivnosti nakon djelovanja kemoterapeutika ili izazivanja stresa endoplazmatskog retikuluma

5.1.1. Utjecaj induktora stresa endoplazmatskog retikuluma thapsigargina na aktivnost urokinaze kod različitih staničnih linija

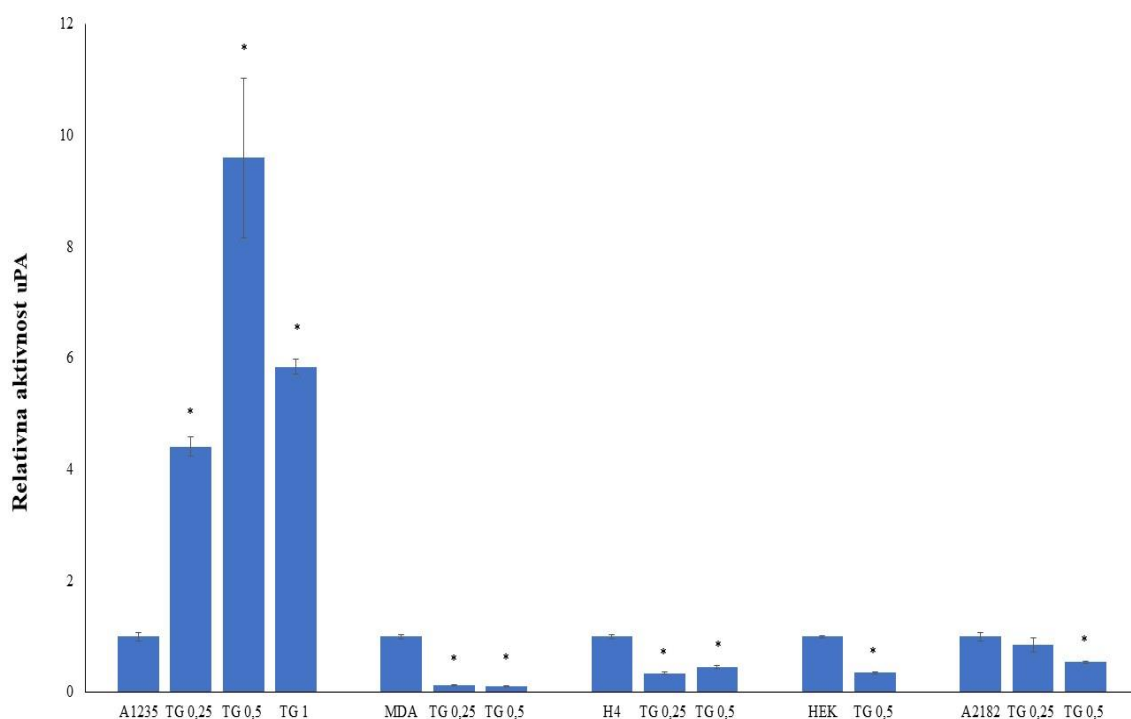
Ispitana je uPA aktivnost, bazalna i nakon izazivanja ERS pomoću thapsigargina kod adherentnih staničnih linija glioblastoma A1235, karcinoma dojke MDA-MB-231, neuroglioma H4, ljudskog embrionalnog bubrega HEK-293, karcinoma pluća A2182, osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa. Stanice su tretirane različitim koncentracijama thapsigargina (0,25-1 μ M) kako bi se utvrdila subletalna koncentracija za tip stanica. Nakon 24 sata od početka tretmana, stanice su inkubirane u mediju DMEM bez seruma tijekom 6 sati te se u kondicioniranom mediju odredila relativna aktivnost uPA radijalnom kazeinolizom.

Thapsigargin se eksperimentalno koristi za izazivanje ERS. On djeluje kao ireverzibilni, nekompetitivni inhibitor Ca^{2+} -ATPaze sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA). Budući da funkcija brojnih endoplazmatskih šaperona ovisi o prisutnosti kalcija, thapsigargin može

izazvati ERS te dovesti do apoptoze uzrokovane stresnim uvjetima (Jaskulska i sur., 2021.; Yoshino i sur., 2017.).

Rezultati (Slika 10.) su pokazali da je induktor ERS thapsigargin uzrokovao povećanje aktivnosti uPA u odnosu na bazalnu aktivnost u staničnoj liniji glioblastoma A1235, dok je uzrokovao smanjenje aktivnosti uPA u staničnim linijama MDA-MB-231, H4, HEK-293 i A2182. Stanice osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa nisu pokazale aktivnost uPA.

Za daljnje istraživanje odabrane su stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 koje su pokazale najveću promjenu u aktivnosti uPA nakon izazivanja ERS thapsigarginom.



Slika 10. Relativna aktivnost uPA kod staničnih linija glioblastoma A1235, karcinoma dojke MDA-MD-231, neuroglioma H4, ljudskog embrionalnog bubrega HEK-293, karcinoma pluća A2182, osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa nakon tretmana različitim koncentracijama thapsigargina. Stanice su tretirane različitim koncentracijama thapsigargina tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena je u kondicioniranom mediju i izražena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **A1235:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **MDA:** bazalna aktivnost uPA kod stanica netretiranih MDA-MB-231; **H4:** bazalna

aktivnost uPA kod netretiranih stanica neuroglioma H4; **HEK**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica HEK-293; **A2182**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A2182; **TG 0,25**: thapsigargin 0,25 μM ; **TG 0,5**: thapsigargin 0,5 μM ; **TG 1**: thapsigargin 1 μM . *statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolu prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.2. Utjecaj kemoterapeutika i induktora stresa endoplazmatskog retikluma thapsigargina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235

Stanice A1235 tretirane su tvarima kojima je ranije dokazana modulacija sustava uPA poput MNNG i NaS kako bi se istražilo uzrokuju li one i ERS (Madunić i sur., 2017.; Matulić i Brdar, 2002.). Osim toga, ispitan je i učinak gemcitabina, koji dosad nije bio istražen. Aktivnost uPA nakon tretmana tim tvarima uspoređena je s aktivnošću nakon izazivanja ERS.

Gemcitabin je prolijek koji se metabolizira u stanici djelovanjem deoksicitidin-kinaze (Dck) u gemcitabin monofosfat koji se prevodi u aktivne metabolite gemcitabin difosfat (dFdCDP) i gemcitabin trifosfat (dFdCTP). Gemcitabin trifosfat natječe se s deoksicitidin trifosfatom (dCTP) pri ugradnji u DNA i izaziva zaustavljanje sinteze DNA (Bastiancich i sur., 2018.). (Wang i sur., 2017.).

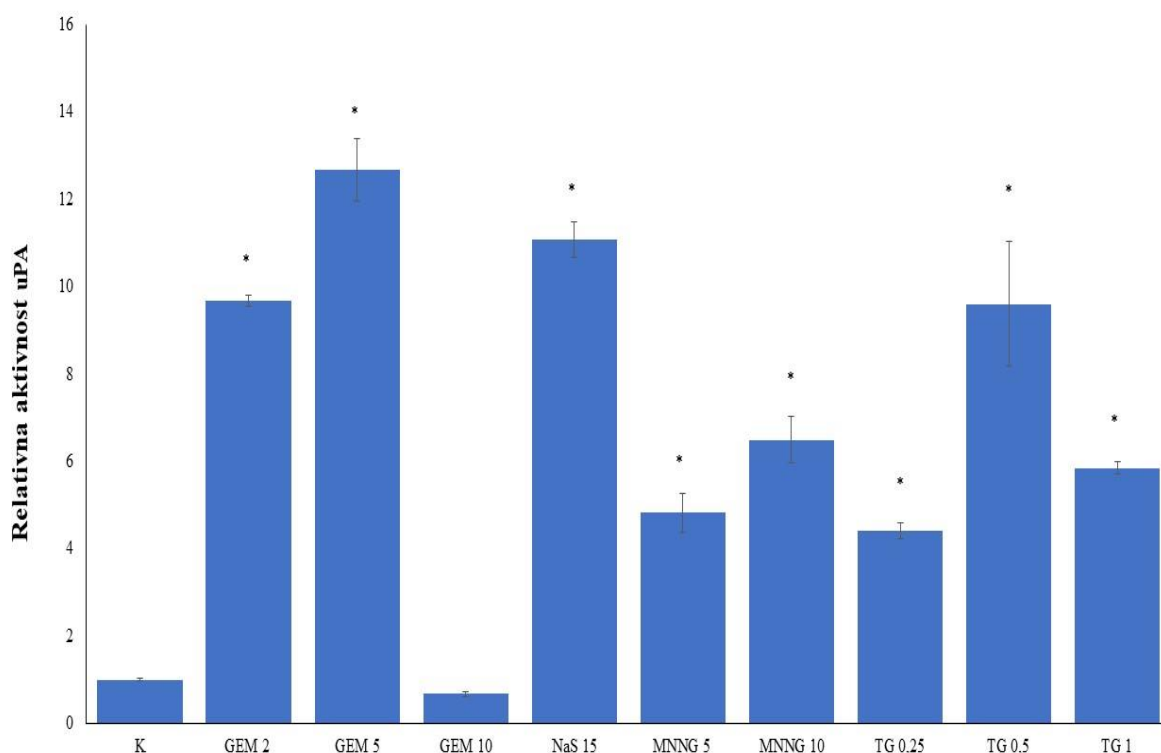
NaS, aktivna komponenta aspirina (acetilsalicilne kiseline) djeluje na upalne signalne putove inhibicijom različitih proteinskih kinaza (Silva i sur., 2007.). Obrada stanica NaS je povećavala aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma, dok je kod stanica karcinoma dojke smanjila aktivnost (Horvat i sur., 2019b.; Madunić i sur., 2017.; Matulić i Brdar, 2002.).

Alkilirajući agens MNNG izaziva alkilaciju guanina. Dosadašnja istraživanja su pokazala da kod stanica kojima je nedostajala aktivnost enzima popravka, O⁶metilguanin-DNA metiltransferaze (MGMT) dolazi doporasta aktivnosti uPA. (Bastiancich i sur., 2018.; Brdar i Matulić, 1988.).

Stanice A1235 tretirane su s 2, 5 i 10 μM gemcitabina, 15 mM NaS, 5 i 10 μM MNNG te 0,25, 0,5 i 1 μM thapsigargina tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena u kondicioniranom mediju metodom radijalne kazeinolize.

Rezultati (Slika 11.) su pokazali da stanice A1235 nakon tretmana kemoterapeuticima (gemcitabinom, NaS i MNNG), kao i induktorom ERS thapsigarginom povećavaju aktivnost uPA.

Relativna aktivnost uPA bila je povećana 10 puta uslijed tretmana 2 μ M gemcitabinom, 13 puta 5 μ M gemcitabinom, 11 puta 15 mM NaS, 5 puta 5 μ M MNNG-om, 6 puta 10 μ M MNNG-om, 4 puta 0,25 μ M thapsigarginom, 10 puta 0,5 μ M thapsigarginom i 6 puta 1 μ M thapsigarginom. Iznimka je djelovanje 10 μ M gemcitabina koji je letalno djelovao na stanice A1235.



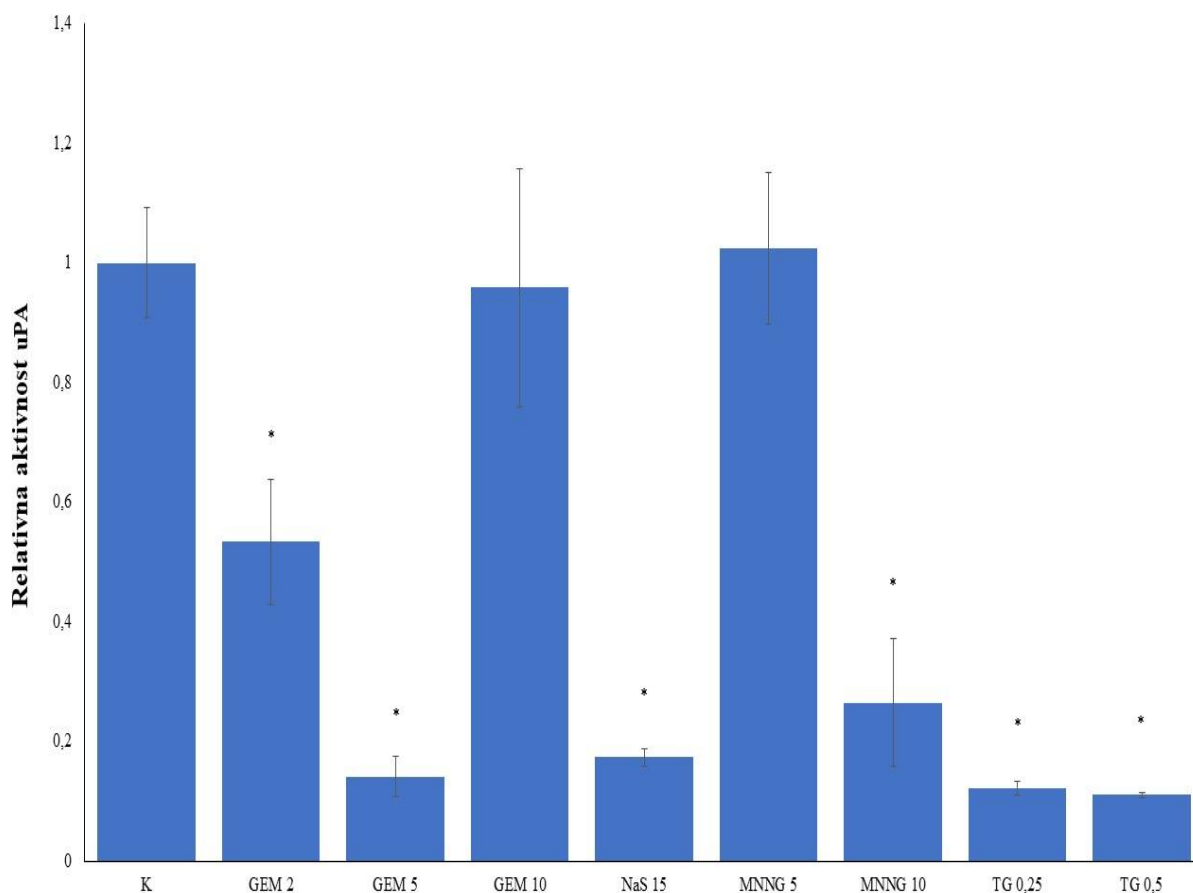
Slika 11. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma A1235 tretiranih kemoterapeuticima i thapsigarginom. Stanice A1235 su tretirane kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) i thapsigarginom tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena u kondicioniranom mediju te je predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **GEM 2**: gemcitabin 2 μ M; **GEM 5**: gemcitabin 5 μ M; **GEM 10**: gemcitabin 10 μ M; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM; **MNNG 5**: MNNG 5 μ M; **MNNG 10**: MNNG 10 μ M; **TG 0,25**: thapsigargin 0,25 μ M; **TG 0,5**: thapsigargin 0,5 μ M; **TG 1**: thapsigargin 1 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na K prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.3. Utjecaj kemoterapeutika i induktora ERS thapsigargina na aktivnost urokinaze kod stanične linije MDA-MB-231

Kako su dosadašnja istraživanja pokazala da a NaS može modulirati aktivnost uPA u stanicama MDA-MB-231, a potencijalni je induktor ERS (Madunić i sur., 2017.), djelovanje različitih kemoterapeutika uspoređeno je s učincima thapsigargina, induktora ERS.

Stanice MDA-MB-231 tretirane su s 2, 5 i 10 μM gemcitabinom, 15 mM NaS, 5 i 10 μM MNNG te 0,25 i 0,5 μM thapsigarginom tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena je u kondicioniranom mediju metodom radijalne kazeinolize. Rezultati (Slika 12.) su pokazali da su stanice MDA-MB-231 nakon tretmana gemcitabinom, NaS i thapsigarginom imale smanjenu aktivnost uPA. Pri koncentraciji od 5 μM , gemcitabin je izazvao smanjenje aktivnosti za 86%, dok je pri koncentraciji od 2 μM smanjenje iznosilo 56%. Pri koncentraciji od 10 μM , gemcitabin je letalno djelovao na stanice MDA-MB-231. Kod stanica tretiranih NaS, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA od 82%.

Pri koncentraciji od 5 μM , MNNG nije doveo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti uPA, dok je pri koncentraciji od 10 μM doveo do smanjenja aktivnosti od oko 75%, ali uz znatnu citotoksičnost. Tretman stanica s 0,25 i 0,5 μM thapsigargina izazvao je sličnu razinu smanjenja aktivnosti uPA (88% kod 0,25 μM u odnosu na 89% 0,5 μM thapsigargina). Thapsigargin u koncentraciji od 1 μM bio je citotoksičan za stanice MDA-MB-231.



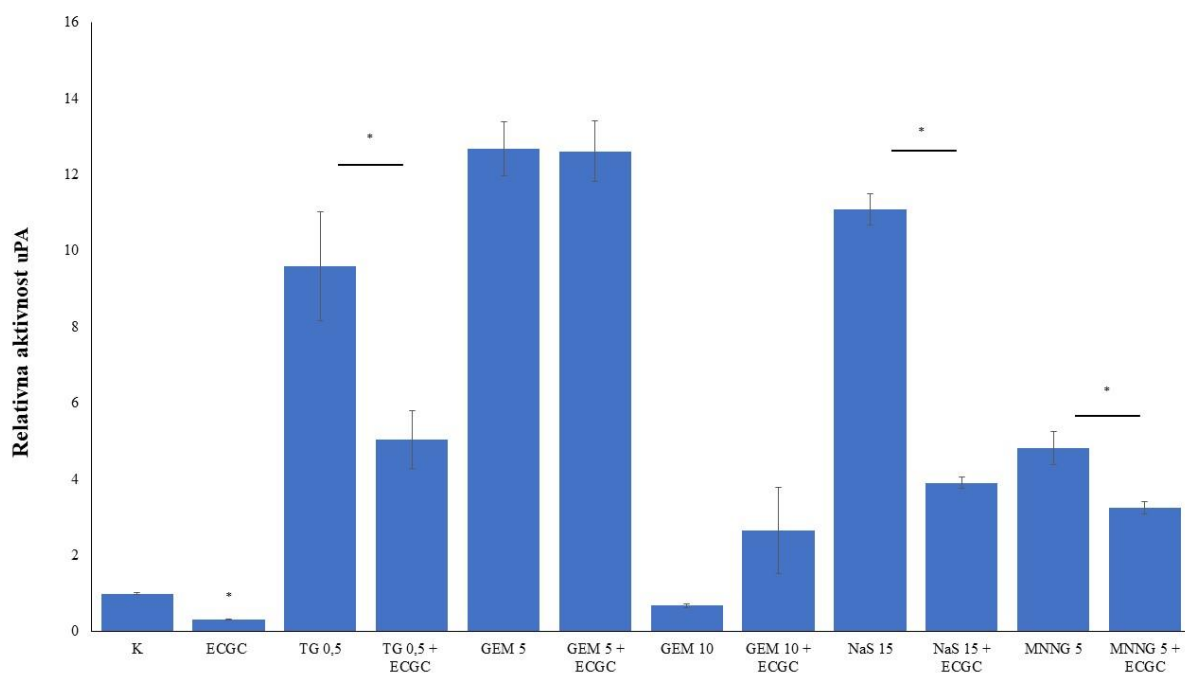
Slika 12. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih kemoterapeuticima i thapsigarginom. Stanice MDA-MB-231 tretirane su kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) i thapsigarginom tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena u kondicioniranom mediju te je predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MD-231; **GEM 2**: gemcitabin 2 μ M; **GEM 5**: gemcitabin 5 μ M; **GEM 10**: gemcitabin 10 μ M; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM; **MNNG 5**: MNNG 5 μ M; **MNNG 10**: MNNG 10 μ M; **TG 0,25**: thapsigargin 0,25 μ M; **TG 0,5**: thapsigargin 0,5 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.4. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma ECGC na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235

Kako se istražilo je li ERS uzrok promjena aktivnosti uPA, stanice su tretirane kombinacijom kemoterapeutika koji su modulirali aktivnost uPA i inhibitora pojedinih stepenica odgovora na ERS.

Stanice A1235 tretirane su kombinacijom thapsigargina i inhibitora šaperona BiP, ECGC (Roller i Maddalo, 2013.).

Također su tretirane kemoterapeuticima, 5 i 10 μM gemcitabinom, 15 mM NaS te 5 μM MNNG tijekom 24 sata u prisustvu 100 μM ECGC. Aktivnost uPA određena je radijalnom kazeinolizom u kondicioniranom mediju. Rezultati (Slika 13.) su pokazali da su uzorci tretirani inhibitorom ERS ECGC imali smanjenu aktivnost uPA u odnosu na bazalnu aktivnost. Kod tretmana stanica kombinacijom thapsigargina i ECGC došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti uPA za 47% u odnosu na sam tretman. Kod stanica tretiranih kombinacijom NaS i ECGC došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti uPA za 67 % u odnosu na aktivnost uPA kod stanica tretiranih samo s NaS. Kod tretmana stanica kombinacijom MNNG i ECGC, došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti uPA za 32 % u odnosu na sam tretman. ECGC nije bitno utjecao na promjenu aktivnosti uPA u kombinaciji s gemcitabinom.



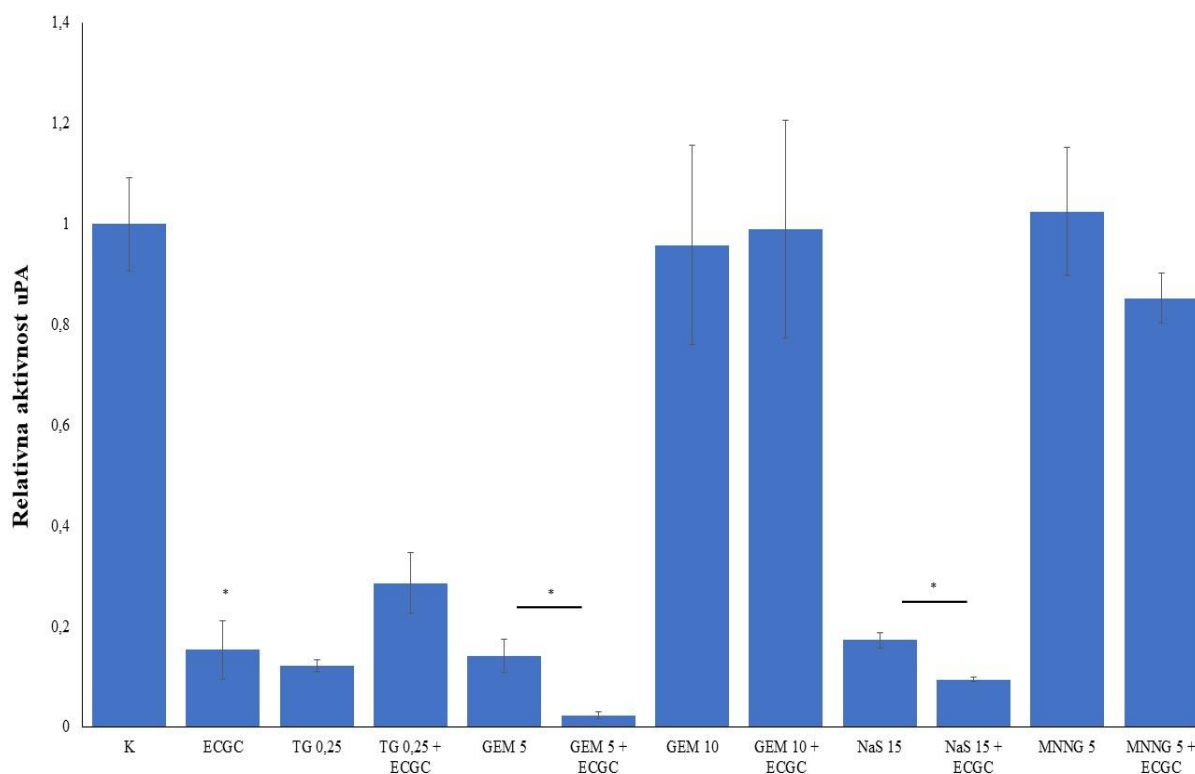
Slika 13. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma A1235 tretirane ECGC, u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima. Stanice A1235 su tretirane ECGC, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) tijekom 24 sata. Aktivnost uPA je određena u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **ECGC**: ECGC 100 μM ; **TG 0,5**: thapsigargin 0,5 μM ; **TG 0,5 + ECGC**: thapsigargin 0,5 μM + ECGC 100 μM ; **GEM 5**: gemcitabin 5

μM ; **GEM 5 + ECGC**: gemcitabin $5 \mu\text{M}$ + ECGC $100 \mu\text{M}$; **GEM 10**: gemcitabin $10 \mu\text{M}$; **GEM 10 + ECGC**: gemcitabin $10 \mu\text{M}$ + ECGC $100 \mu\text{M}$; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM ; **NaS 15 + ECGC**: natrijev salicilat 15 mM + ECGC $100 \mu\text{M}$; **MNNG 5**: MNNG $5 \mu\text{M}$; **MNNG 5 + ECGC**: MNNG $5 \mu\text{M}$ + ECGC $100 \mu\text{M}$. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.5. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma ECGC na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231

Stanice MDA-MB-231 tretirane su kemoterapeuticima 5 i $10 \mu\text{M}$ gemcitabinom, 15 mM NaS te $5 \mu\text{M}$ MNNG tijekom 24 sata u prisustvu $100 \mu\text{M}$ ECGC. Aktivnost uPA određena je radijalnom kazeinolizom u kondicioniranom mediju.

Rezultati (Slika 14.) su pokazali da inhibitor BiP-a ECGC smanjuje aktivnost uPA u odnosu na bazalnu aktivnost u staničnoj liniji MDA-MB-231. ECGC je statistički značajno smanjio bazalnu aktivnost uPA za 85%. Nakon tretmana kombinacijom kemoterapeutika gemcitabina i NaS s ECGC došlo je do daljnjeg smanjenja aktivnosti uPA. U kombinaciji inhibitora s $5 \mu\text{M}$ gemcitabinom, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 86 % u odnosu na tretman s ECGC. U kombinaciji inhibitora s NaS došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 47 % u odnosu na sam tretman. Kombinacija inhibitora s thapsigarginom rezultirala je povećanjem ukupne aktivnosti uPA za 56% u odnosu na tretman samo s ECGC-om, međutim, ta razlika nije bila statistički značajna. Sam inhibitor nije imao značajan utjecaj na aktivnost uPA izazvanu MNNG-om.



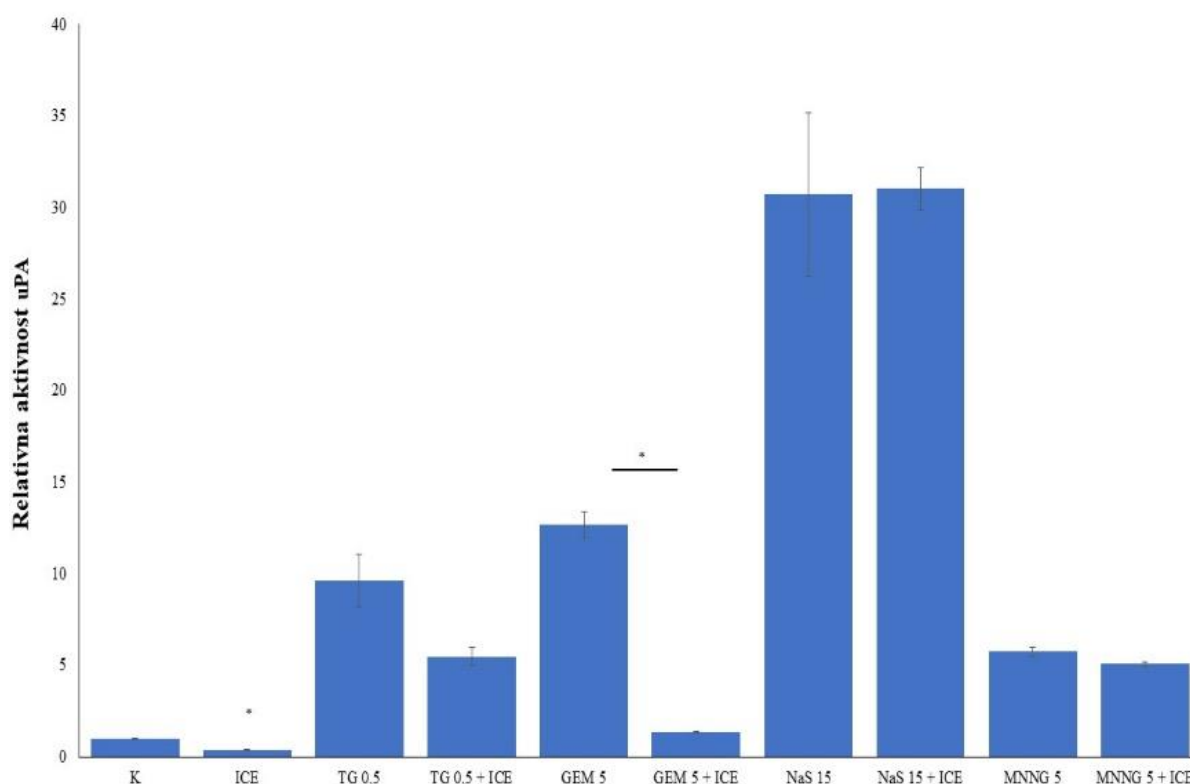
Slika 14. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane ECGC, u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima. Stanice MDA-MB-231 su tretirane ECGC, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) tijekom 24 sata. Aktivnost uPA je određena u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MB-231; **ECGC**: ECGC 100 μ M; **TG 0,25**: thapsigargin 0,5 μ M; **TG 0,25 + ECGC**: thapsigargin 0,5 μ M + ECGC 100 μ M; **GEM 5**: gemcitabin 5 μ M; **GEM 5 + ECGC**: gemcitabin 5 μ M + ECGC 100 μ M; **GEM 10**: gemcitabin 10 μ M; **GEM 10 + ECGC**: gemcitabin 10 μ M + ECGC 100 μ M; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + ECGC**: natrijev salicilat 15 mM + ECGC 100 μ M; **MNNG 5**: MNNG 5 μ M; **MNNG 5 + ECGC**: MNNG 5 μ M + ECGC 100 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.6. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma icerguastata na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235

Stanice A1235 tretirane su kombinacijom thapsigargina i icerguastata. Icerguastat djeluje kao selektivni inhibitor regulatorne podjedinice PPP1R15A (R15A) (GADD34) čime smanjuje fosforilaciju EIF2A i drugih proteina koji djeluju na stopu translacije (Nagamine i Dolan, 2021.;

Senft i Ronai, 2015.). Stanice su tretirane kemoterapeuticima 5 μ M gemcitabinom, 15 mM NaS te 5 μ M MNNG tijekom 24 sata u prisustvu 5 μ M icerguastata. Aktivnost uPA određena je radijalnom kazeinolizom u kondicioniranom mediju.

Rezultati (Slika 15.) su pokazali da je inhibitor ERS icerguastat statistički značajno smanjio aktivnost urokinaze u odnosu na bazalnu aktivnost kod stanica A1235, za 60 %. Kod tretmana stanica kombinacijom gemcitabina i icerguastata, došlo je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti uPA za 89 % u odnosu na tretman gemcitabinom.



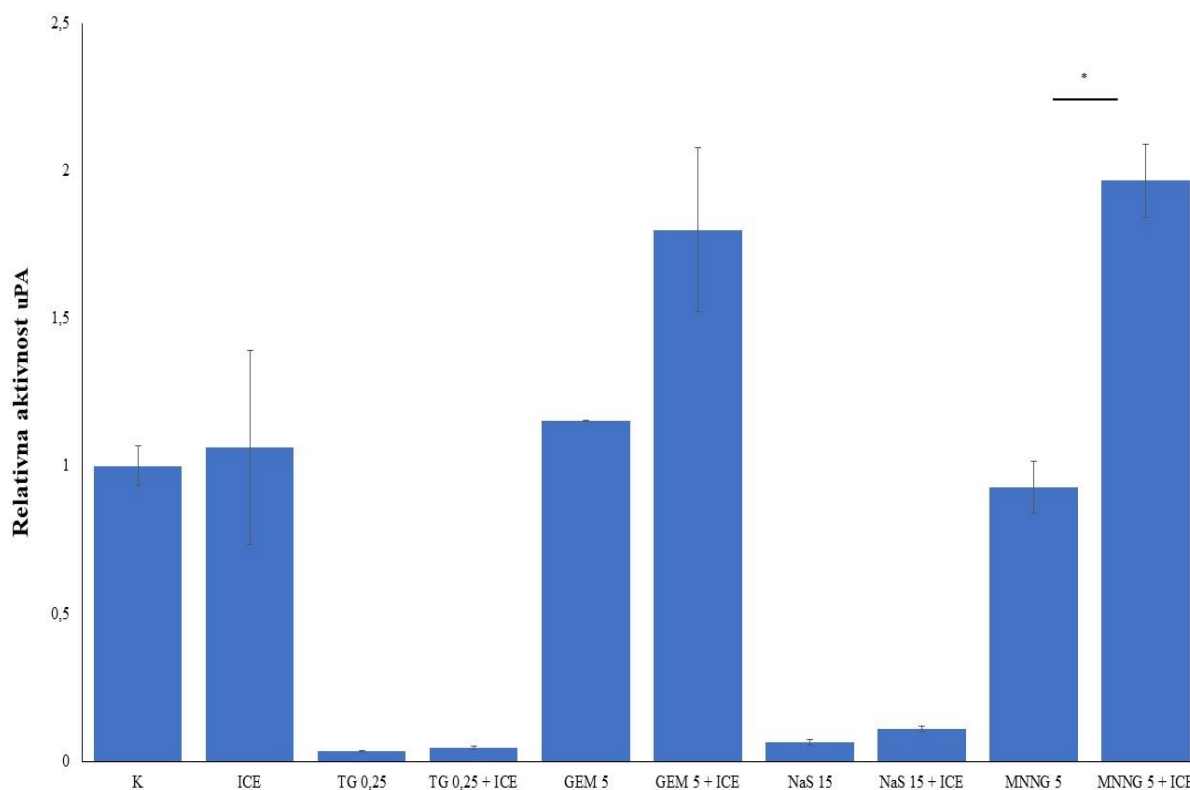
Slika 15. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma A1235 tretirane icerguastatom, u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima. Stanice A1235 su

tretirane icerguastatom, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) tijekom 24 sata. Aktivnost uPA je određena u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **ICE:** icerguastat 5 μ M; **TG 0,5:** thapsigargin 0,5 μ M; **TG 0,5 + ICE:** thapsigargin 0,5 μ M + icerguastat 5 μ M; **GEM 5:** gemcitabin 5 μ M; **GEM 5 + ICE:** gemcitabin 5 μ M + icerguastat 5 μ M; **NaS 15:** natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + ICE:** natrijev salicilat 15 mM + icerguastat 5 μ M; **MNNG 5:** MNNG 5 μ M; **MNNG 5 + ICE:** MNNG 5 μ M + icerguastat 5 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.7. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikluma icerguastata na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231

Stanice MDA-MB-231 tretirane su kombinacijom thapsigargina i icerguastata, te kombinacijom kemoterapeutika 5 μ M gemcitabina, 15 mM NaS te 5 μ M MNNG i 5 μ M icerguastata tijekom 24 sata.

Rezultati (Slika 16.) su pokazali da icerguastat nije povećao bazalnu aktivnost uPA. Kod tretmana icerguastatom i MNNG-om došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti uPA od oko 2 puta u odnosu na sam tretman s MNNG-om. Icerguastat nije bitno utjecao na aktivnost uPA kod stanica tretiranih thapsigarginom, gemcitabinom i NaS.



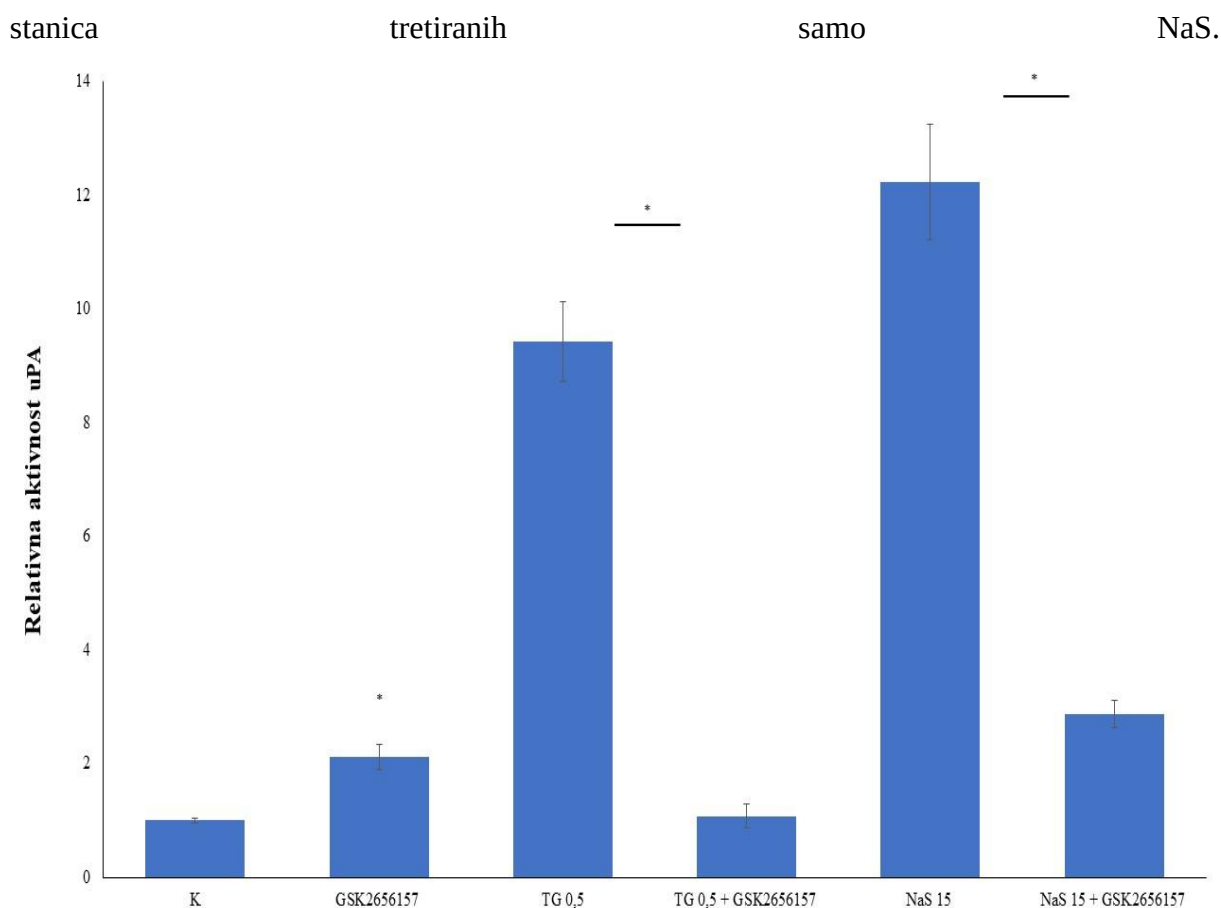
Slika 16. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane icerguastatom, u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima. Stanice MDA-MB-231 su tretirane icerguastatom, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i kemoterapeuticima (gemcitabin, NaS i MNNG) tijekom 24 sata. Aktivnost uPA je određena u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MB-231; **ICE:** icerguastat 5 μ M; **TG 0,25:** thapsigargin 0,25 μ M; **TG 0,25 + ICE:** thapsigargin

0,25 μ M + icerguastat 5 μ M; **GEM 5**: gemcitabin 5 μ M; **GEM 5 + ICE**: gemcitabin 5 μ M + icerguastat 5 μ M; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + ICE**: natrijev salicilat 15 mM + icerguastat 5 μ M; **MNNG 5**: MNNG 5 μ M; **MNNG 5 + ICE**: MNNG 5 μ M + icerguastat 5 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.8. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikuluma GSK2656157 na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235

Stanice A1235 tretirane su kombinacijom thapsigargina i GSK2656157. Također, tretirane su i kemoterapeutikom 15 mM NaS tijekom 24 sata u prisustvu 10 μ M GSK2656157. GSK2656157 je visokoselektivan inhibitor kinaze PERK (Atkins i sur., 2013.; Axten i sur., 2013.).

Rezultati (Slika 17.) su pokazali da je inhibitor GSK2656157 povećao aktivnost uPA u odnosu na bazalnu aktivnost u staničnoj liniji A1235. GSK2656157 je povećao bazalnu aktivnost uPA za oko 2 puta, no nakon tretmana thapsigarginom ili NaS uzrokovao je smanjenje aktivnosti uPA. U kombinaciji inhibitora s thapsigarginom došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za oko 90 % u odnosu na aktivnost uPA kod stanica tretiranih samo thapsigarginom. U kombinaciji inhibitora s NaS, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 76% u odnosu na aktivnost uPA kod

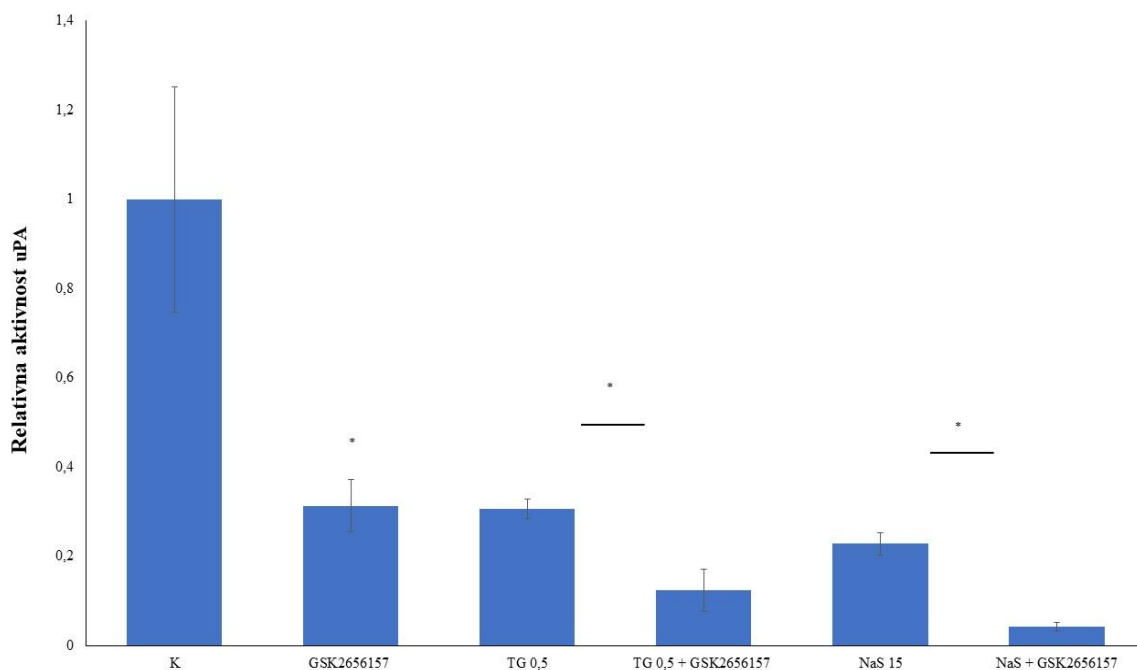


Slika 17. Relativna aktivnost uPA stanične linije glioblastoma A1235 tretirane GSK2656157, thapsigarginom i NaS. Stanice A1235 su tretirane GSK2656157, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i NaS tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **GSK2656157:** GSK2656157 10 μ M; **TG 0,5:** thapsigargin 0,5 μ M; **TG 0,5 + GSK2656157:** thapsigargin 0,5 μ M + GSK2656157 10 μ M; **NaS 15:** natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + GSK2656157:** natrijev salicilat 15 mM + GSK2656157 10 μ M.*statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.9. Utjecaj inhibitora stresa endoplazmatskog retikuluma GSK2656157 na aktivnost urokinaze kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231

Stanice MDA-MB-231 tretirane su kombinacijom thapsigargina i GSK2656157. Također, tretirane su i kemoterapeutikom 15 mM NaS tijekom 24 sata u prisustvu 10 μ M GSK2656157.

Rezultati (Slika 18.) su pokazali da je inhibitor GSK2656157 statistički značajno smanjio bazalnu aktivnost uPA u staničnoj liniji MDA-MB-231, za oko 70 %. U kombinaciji inhibitora s 0,5 μ M thapsigarginom, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 60 % u odnosu na aktivnost kod stanica tretiranih samim thapsigarginom. U kombinaciji inhibitora s NaS, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 82% u odnosu na tretman samim NaS.



Slika 18. Relativna aktivnost uPA stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane GSK2656157, thapsigarginom i NaS. Stanice MDA-MB-231 su tretirane GSK2656157, a zatim u kombinaciji s thapsigarginom i NaS tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MB-231; **GSK2656157:** GSK2656157 10 μ M; **TG 0,5:** thapsigargin 0,5 μ M; **TG 0,5 + GSK2656157:** thapsigargin 0,5 μ M + GSK2656157 10 μ M; **NaS 15:** natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + GSK2656157:** natrijev salicilat 15 mM + GSK2656157 10 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

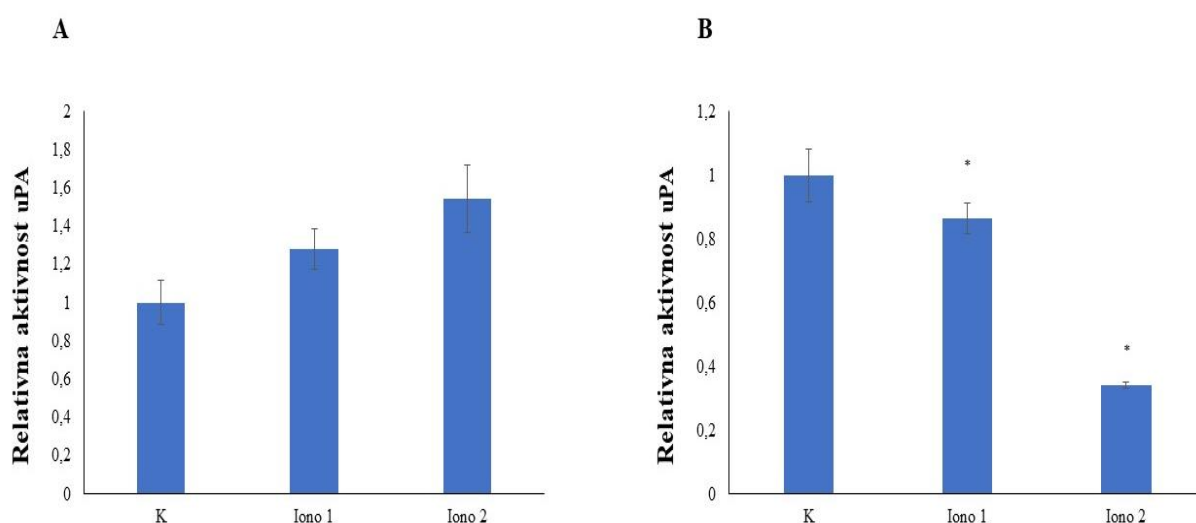
5.1.10. Utjecaj ionomycina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231

Ionomycin je ionofor kalcija, potiče unos kalcija u stanicu povećavajući njegovu intracelularnu koncentraciju, pri čemu djeluje i na endoplazmatskom retikulumu i na plazma membrani

(Morgan i Jacob, 1994.; Pecoraro i sur., 2020.). Budući da ERS izazvan thapsigarginom smanjuje koncentraciju kalcija u ER, dok je istovremeno povećava u citosolu, primjenom ionomycina - koji povećava razinu kalcija u citosolu - željelo se ispitati jesu li učinci thapsigargina povezani s porastom citosolnog kalcija ili smanjenjem kalcija u endoplazmatskom retikulumu koji bi mogao inhibirati šaperone ER.

Ispitana je aktivnost uPA, bazalna i nakon tretmana ionomycinom kod stanica A1235 i MDA-MB-231. Stanice su tretirane s 1 i 2 μM ionomycina tijekom 24 sata, a aktivnost uPA određena u kondicioniranom mediju u kojem su stanice bile inkubirane.

Rezultati (Slika 20.) nisu pokazali značajno povećanje aktivnosti uPA nakon tretmana ionomycinom u stanicama A1235, dok je došlo do smanjenja aktivnosti uPA u stanicama MDA-MB-231. Kada su tretirane 1 μM ionomycinom, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 14%, a kada su tretirane 2 μM ionomycinom, došlo je do smanjenja aktivnosti uPA za 66%.



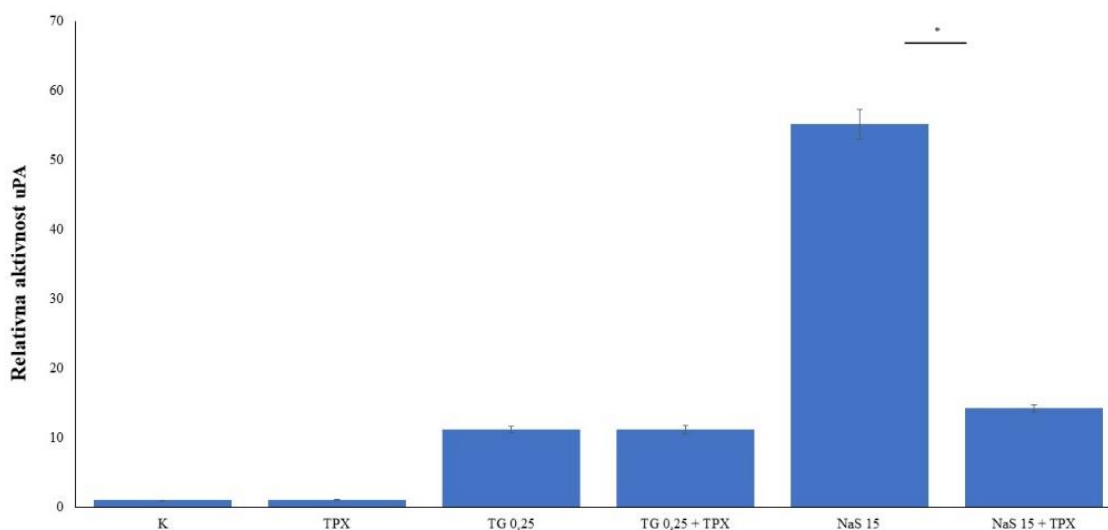
Slika 19. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma A1235 (A) i karcinoma dojke MDA-MB-231 (B) tretiranih ionomycinom. Stanice A1235 i MDA-MB-231 su tretirane ionomycinom tijekom 24 sata, a aktivnost uPA je određena u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235 ili MDA-MB-231; **Iono 1**: ionomycin 1 μM ; **Iono 2**: ionomycin 2 μM . *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.1.11. Utjecaj tiplaxtinina na aktivnost urokinaze kod stanične linije glioblastoma A1235

Tiplaxtinin (PAI-039) specifičan je i potentan inhibitor PAI-1, serpinskog inhibitora koji regulira uPA aktivnost (Elokdaš i sur., 2004.). Stabilizira PAI-1 u neaktivnom konformacijom obliku, veže se za aktivno mjesto, sprječavajući ga da inhibira uPA (Elokdaš i sur., 2004.).

Stanice A1235 su tretirane tijekom 24 sata tiplaxtininom te kombinacijom s thapsigarginom i NaS. Aktivnost uPA određena u kondicioniranom mediju u prisustvu tiplaxtinina.

Rezultati (Slika 21.) su pokazali kako nije bilo značajnog smanjenja bazalne uPA aktivnosti nakon tretmana tiplaxtininom, kao ni u kombinaciji s thapsigarginom. Došlo je do značajnog smanjenja aktivnosti uPA nakon tretmana NaS.



Slika 20. Relativna aktivnost uPA kod stanične linije glioblastoma A1235 tretirane tiplaxtininom, u kombinaciji NaS i thapsigarginom. Stanice A1235 su tretirane tiplaxtininom te kombinacijom NaS i thapsigargina tijekom 24 sata. Aktivnost uPA određena je u kondicioniranom mediju i predstavljena kao relativna vrijednost u odnosu na vrijednosti netretirane kontrole. Stupci predstavljaju srednju vrijednost rezultata dviju bioloških replika. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MB-231; **TPX**: tiplaxtinin 10 μ M; **TG 0,25**: thapsigargin 0,25 μ M; **TG 0,25 + TPX**: thapsigargin 0,25 μ M + tiplaxtinin 10 μ M; **NaS 15**: natrijev salicilat 15 mM; **NaS 15 + TPX**: natrijev salicilat 15 mM + tiplaxtinin 10 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** ili induktor staničnog stresa tj. ERS prema Student T-testu ($p < 0.05$).

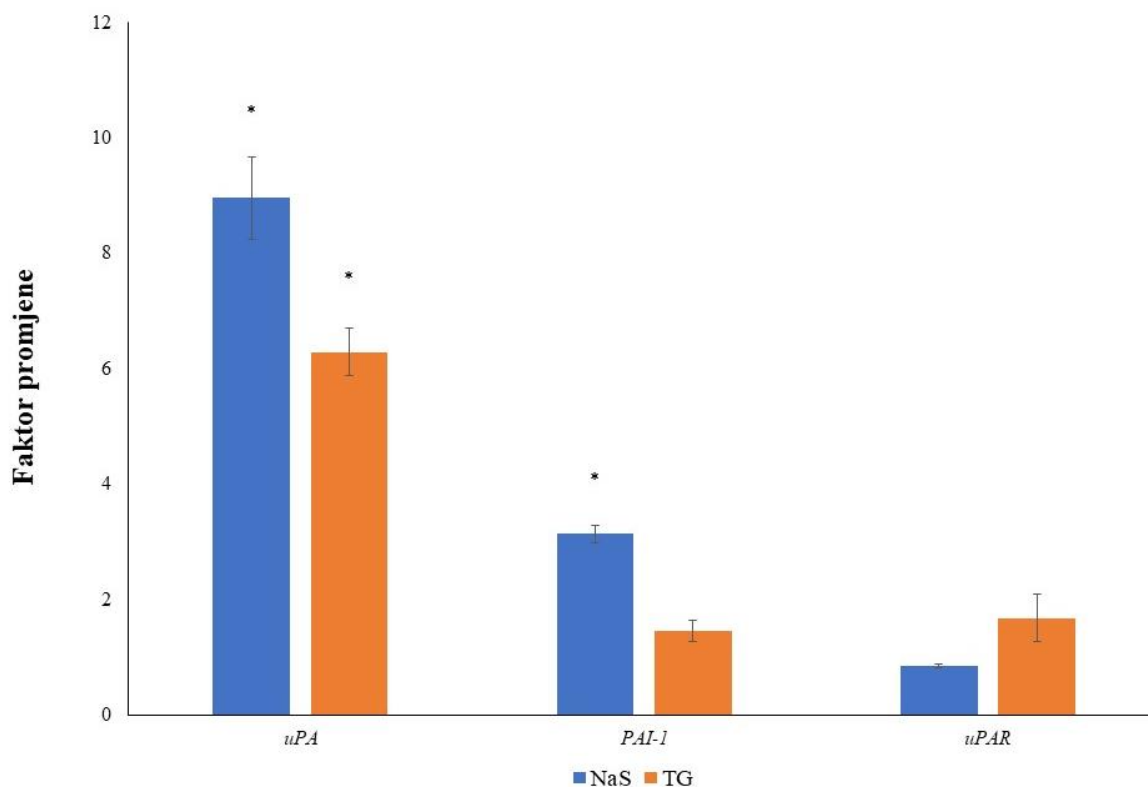
5.2 Analiza ekspresije gena urokinaznog sustava i gena uključenih u odgovor na stres endoplazmatskog retikuluma

5.2.1. Analiza ekspresije gena urokinaznog sustava u staničnim linijama glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih natrijevim salicilatom i thapsigarginom

Ekspresija gena sustava uPA i signalnog puta PERK (odgovora nesmotanih proteina) analizirana je metodom qRT-PCR kod stanica glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231, u bazalnim uvjetima, te nakon tretmana NaS i thapsigarginom.

Stanice A1235 i MDA-MB-231 tretirane su s 15 mM NaS i thapsigarginom (0,5 μ M kod A1235 i 0,25 μ M za MDA) tijekom 24 sata, a zatim je izolirana RNA. RNA je prevedena u cDNA te je genska ekspresija analizirana metodom qPCR pomoću specifičnih početnica.

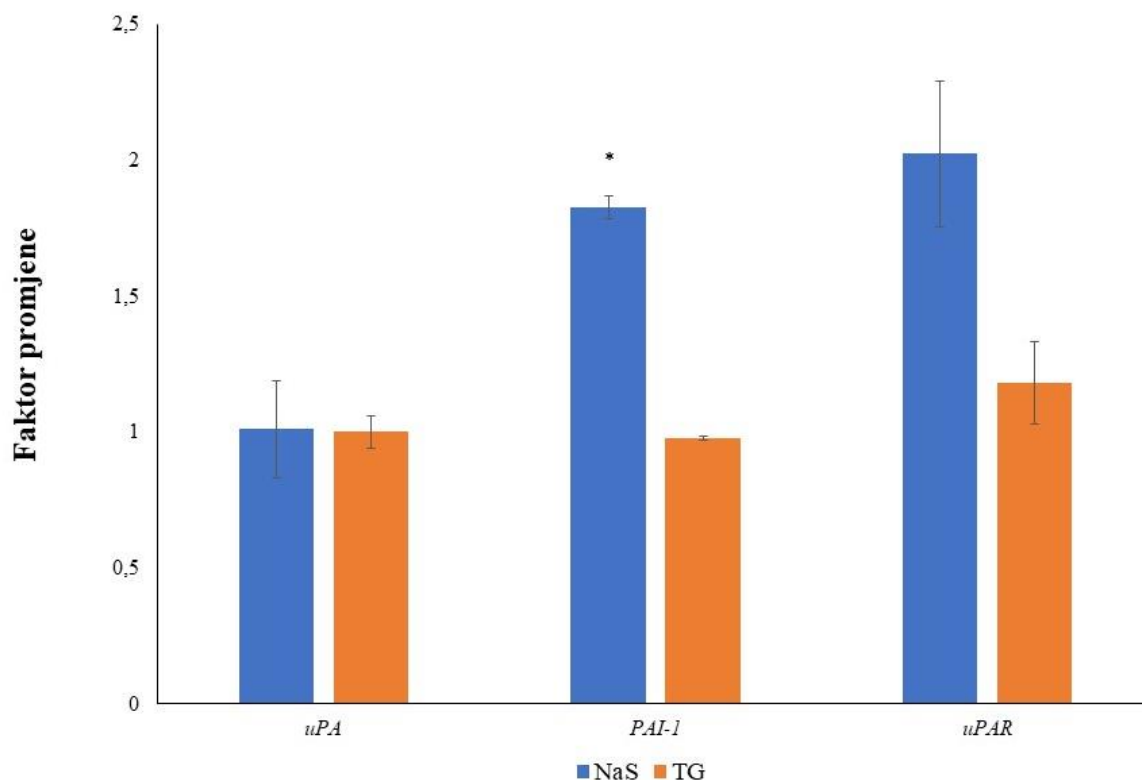
Rezultati (Slika 21.) su pokazali da je ekspresija gena za uPA u stanicama A1235 značajno povećana nakon tretmana NaS i thapsigarginom. Konkretno, nakon tretmana NaS porasla je oko 9 puta, dok je nakon thapsigargina porasla oko 6 puta. Također, ekspresija gena za PAI-1 (*PAI-1*) povećana je nakon tretmana NaS i thapsigarginom. Nakon tretmana NaS porasla je oko 3 puta, što je statistički značajno povećanje, dok je nakon tretmana thapsigarginom porasla oko 1,5 puta. Kod tretmana NaS i thapsigarginom nije bilo značajne promjene u ekspresiji gena za uPAR (*uPAR*).



Slika 21. Ekspresija gena sustava uPA u staničnoj liniji glioblastoma A1235 tretirane NaS i thapsigarginom. Stanice A1235 tretirane su NaS i thapsigarginom. Izolirana RNA obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena napravljena je metodom RT-qPCR. Gen *HPRT* je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolne stanice A1235. **K**: stanice A1235; **uPA**: gen za urokinazni plazminogeni aktivator; **uPAR**: gen za receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora; **PAI-1**: gen za inhibitor aktivatora plazminogena -1; **NaS**: 15 mM natrijev salicilat; **TG**: 0,5 μ M thapsigargin. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

Analizirana je i ekspresija gena sustava uPA kod stanica MDA MB-231.

Rezultati (Slika 22.) su pokazali da tretman NaS i thapsigarginom nije rezultirao povećanjem ekspresije gena *uPA* u odnosu na kontrolne stanice. Ekspresija gena *PAI-1* u stanicama MDA-MB-231 značajno se povećala nakon tretmana NaS. Konkretno, nakon tretmana NaS, ekspresija gena *PAI-1* porasla je oko 2 puta. Nakon tretmana thapsigarginom nije bilo promjene. Također, ekspresija gena *uPAR* se povećala nakon tretmana NaS i oko 2 puta, dok nakon tretmana thapsigarginom nije bilo promjene.



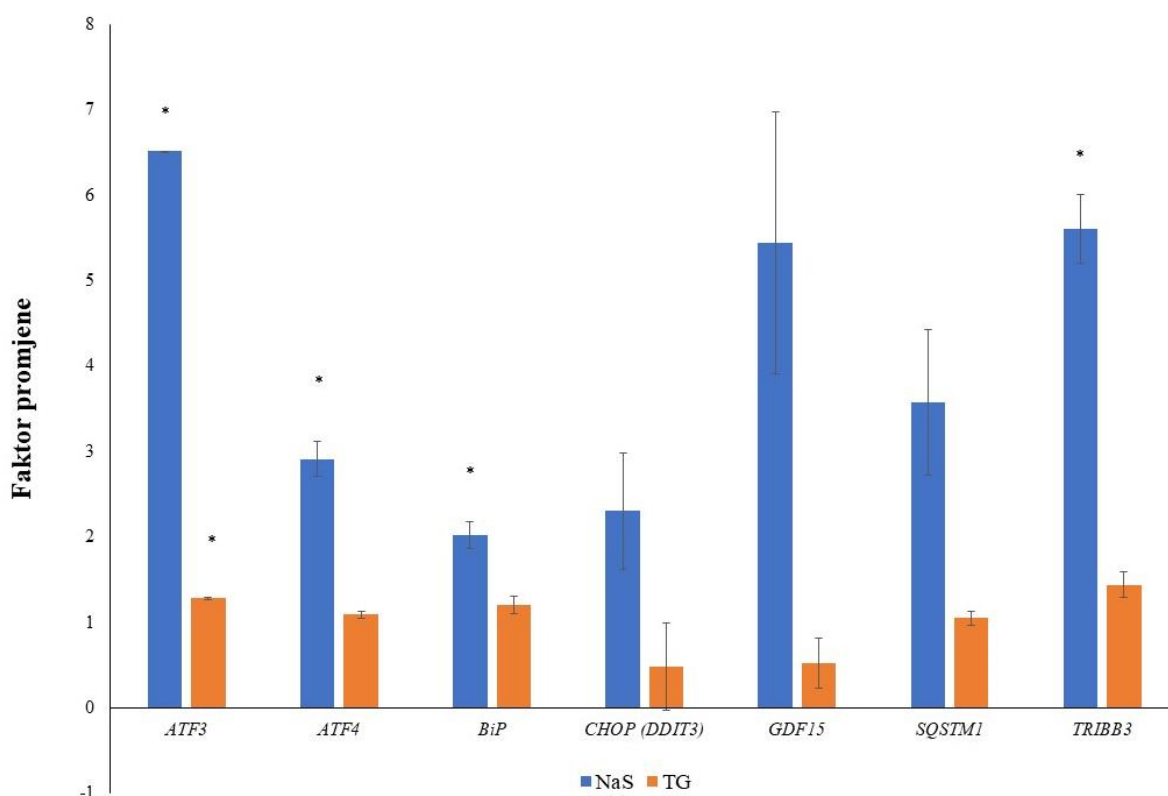
Slika 22. Ekspresija gena sustava uPA u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih NaS i thapsigarginom. Stanice MDA-MB-231 tretirane su NaS i thapsigarginom. Izolirana RNA obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena napravljena je metodom RT-qPCR. Gen *HPRT* je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolne stanice MDA-MB-231. **K**: stanice MDA-MB-231; **uPA**: gen za urokinazni plazminogeni aktivator; **uPAR**: gen za receptor urokinaznog plazminogenog aktivatora; **PAI-1**: gen za inhibitor aktivatora plazminogena -1; **NaS**: 15 mM natrijev salicilat; **TG**: 0,25 μ M thapsigargin. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.2.2. Analiza ekspresije gena uključenih u puteve odgovora na stres endoplazmatskog retikluma u staničnim linijama glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231

Da bi se istražila aktivacija odgovora na ERS, analizirana je ekspresija gena uključenih u puteve odgovora na ERS, nakon tretmana stanica thapsigarginom i NaS. Analizirana je ekspresija gena *ATF3*, *ATF4*, *BiP* (*HspA5*, *GRP789*), *CHOP* (*DDIT3*, *GADD153*), *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*.

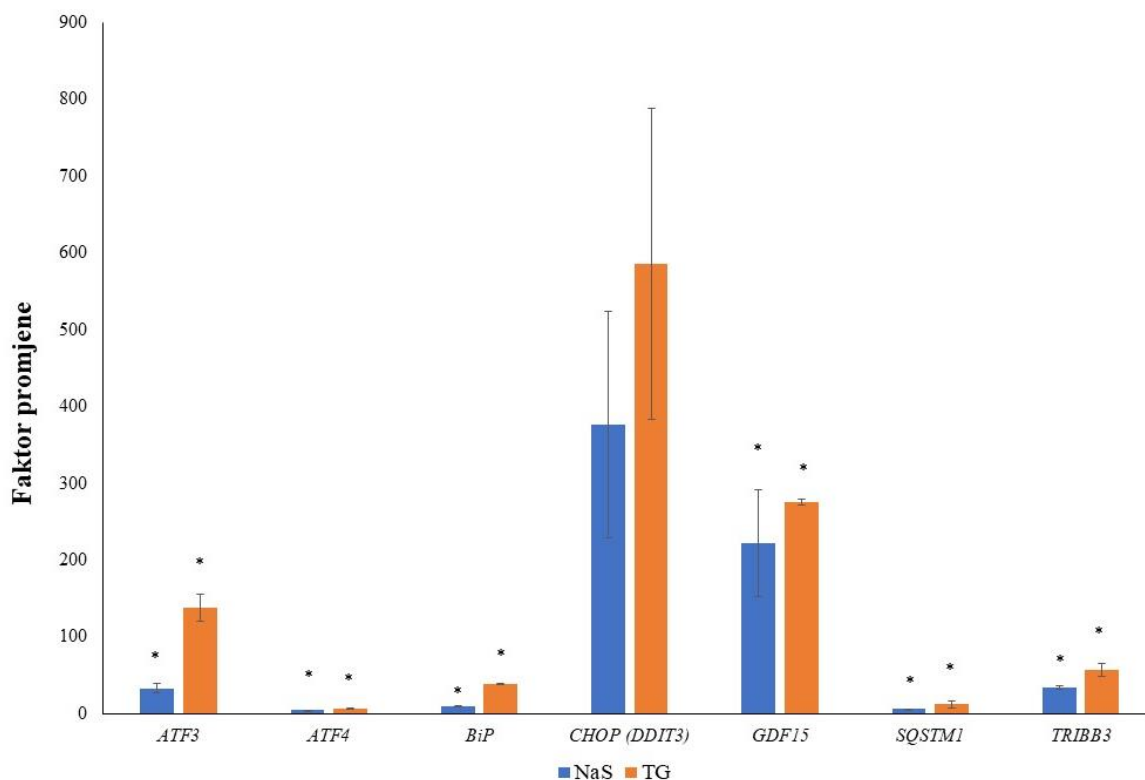
Rezultati (Slika 23.) su pokazali povećanu ekspresiju gena *ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *CHOP* (*DDIT3*), *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3* nakon tretmana NaS i thapsigarginom u stanicama A1235.

Ekspresija gena *CHOP* (*DDIT3*) i *GDF15* bila je povećana nekoliko stotina puta nakon tretmana NaS i thapsigarginom, kao i gena *ATF3* nakon tretmana thapsigarginom. Statistički značajno povećanje ekspresije primjećena je nakon tretmana NaS i thapsigarginom kod gena *ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*.



Slika 23. Ekspresija gena uključenih u puteve odgovora na ERS u staničnoj liniji glioblastoma A1235 tretiranih NaS i thapsigarginom. Stanice A1235 su tretirane NaS ili thapsigarginom. Izolirana RNA iz staničnih linija obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena napravljena je metodom RT-qPCR. Gen *HPRT* je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolne stanice A1235. **K**: stanice A1235; ***ATF3***: gen za engl. *activating transcription factor 3*; ***ATF4***: gen za engl. *activating transcription factor 4*; ***BiP*** (*HspA5*, *GRP78*): gen za engl. *binding immunoglobulin protein*; ***CHOP*** (*GADD153*, *DDIT3*): gen za engl. *C/EBP homologous protein*; ***GDF15***: gen za engl. *Growth Differentiation Factor 15*; ***SQSTM1***: gen za sekvestosom 1; ***TRIBB3***: gen za engl. *Tribbles pseudokinase*. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

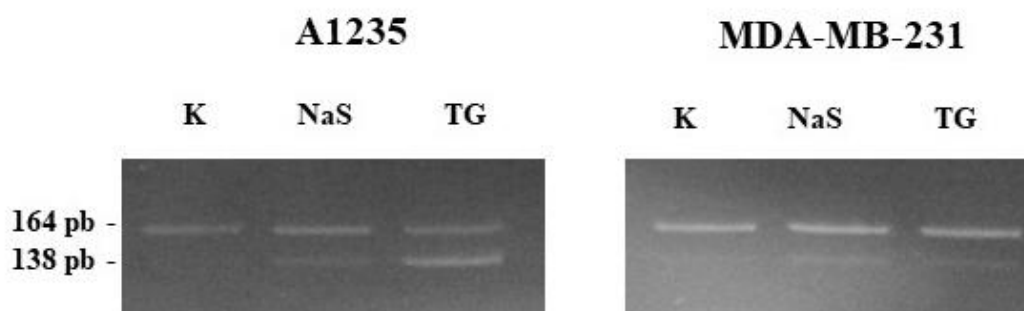
Rezultati (Slika 24.) analize ekspresije RNA u stanicama MDA-MB-231 su pokazali povećanu ekspresiju gena *ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *SQSTM1* i *TRIBB3* nakon tretmana NaS i thapsigarginom. Povećanje ekspresije gena *CHOP (DDIT3)* i *GDF15* primjećeno je nakon tretmana NaS, ali su rezultati imali veliko raspršenje. Statistički značajna razlika primjećena je nakon tretmana NaS kod gena *ATF3*, *ATF4*, *BiP* i *TRIBB3*, kao i nakon tretmana thapsigarginom kod gena *ATF3*.



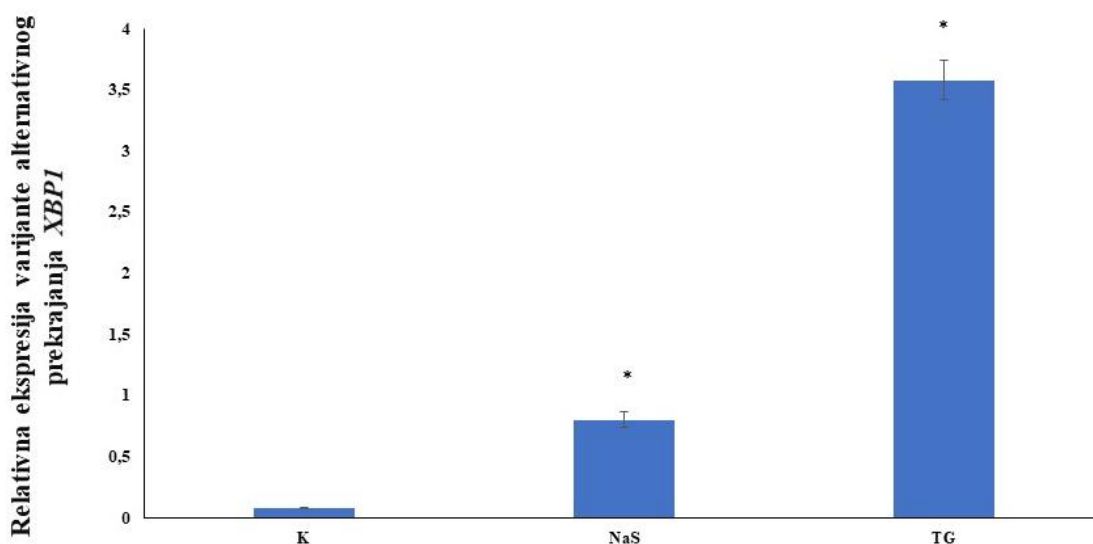
Slika 24. Ekspresija gena uključenih u puteve odgovora na ERS u staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih NaS i thapsigarginom. Stanice MDA-MB-231 su tretirane NaS ili thapsigarginom. Izolirana RNA iz staničnih linija obrnuto je prepisana u cDNA. Relativna kvantifikacija ekspresije gena napravljena je metodom RT-qPCR. Gen HPRT je korišten kao endogena kontrola za normalizaciju ekspresije gena, a faktori promjene ekspresije gena izraženi su u odnosu na kontrolne stanice. **K**: stanice MDA-MB-231; **ATF3**: gen za engl. activating transcription factor 3; **ATF4**: gen za engl. activating transcription factor 6; **BiP** (HspA5, GRP78): gen za engl. binding immunoglobulin protein; **CHOP** (*GADD153*, *DDIT3*): gen za engl. C/EBP homologous protein; **GDF15**: gen za engl. Growth Differentiation Factor 15; **SQSTM1**: gen za sekvestosom 1; **TRIBB3**: gen za engl. Tribbles pseudokinase. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

XBP1 je ključan transkripcijski faktor uključen u UPR koji se aktivira izrezivanjem dijela mRNA pomoću aktivne endonukleaze IRE1. Time nastaje mRNA koja se prevodi u protein,

transkripcijski faktor. Promjena veličine produkata PCR, izrezivanje fragmenta od 26 pb, ukazuje na aktivaciju IRE1.

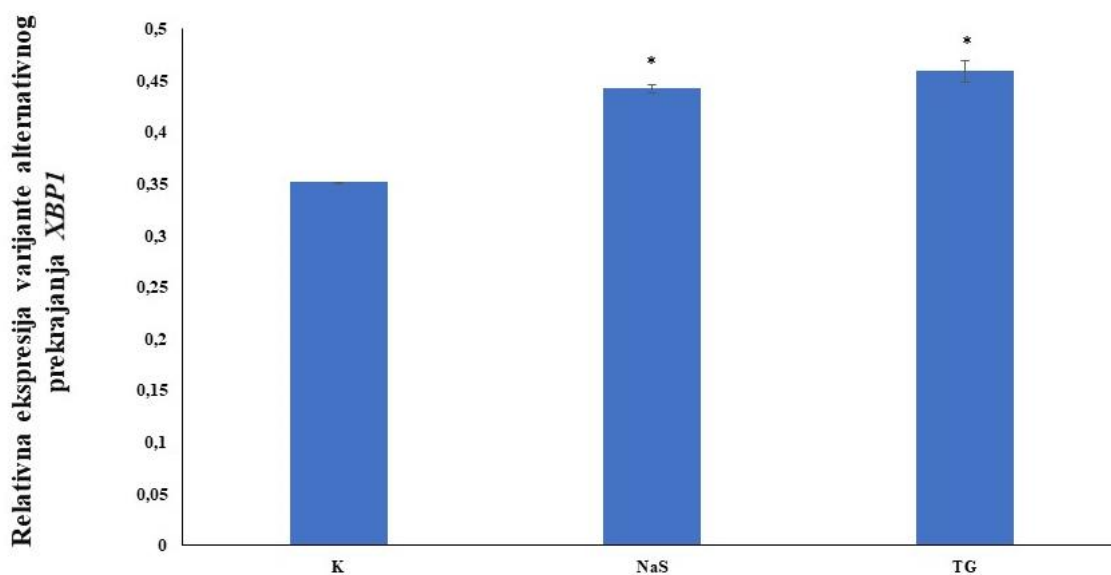


Slika 25. Prekrajanje mRNA gena *XBP1* nakon ERS u staničnoj liniji glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 izazvanog NaS i thapsigarginom. Na slici poliakrilamidne gel elektroforeze prikazani su amplifikati PCR nakon obrade uzoraka. Stanice A1235 i MDA-MB-231 tretirane su NaS i thapsigarginom tijekom 24 sata. Nakon tretmana, izolirana je ukupna RNA, koja je reverznom transkripcijom prevedena u cDNA. Umnažanje ciljanog transkripta provedeno je metodom PCR korištenjem početnica specifičnih za *XBP1*. Dobiveni PCR produkti razdvojeni su elektroforezom u poliakrilamidnom gelu i vizualizirani bojanjem etidijevim bromidom. Molekularni marker korišten je kao referenca za određivanje veličine fragmenata. **K:** bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235 i MDA-MB-231; **NaS:** nakon tretmana 15 mM NaS; **TG:** nakon tretmana thapsigarginom 0,5 μ M kod stanica A1235 i 0,25 μ M kod stanica MDA MB-231.



Slika 26. Prekrajanje mRNA gena *XBP1* nakon ERS u staničnoj liniji glioblastoma A1235 izazvanog NaS i thapsigarginom. Iz kontrolnih stanica A1235 i stanica tretiranih NaS i

thapsigarginom izolirana je RNA, prevedena u cDNA te amplificirana početnicama za XBP1. Nakon gel elektroforeze, dobivene vrpce su denzitometrirane i prikazan je omjer cjelovitog i prekrojenog transkripta XBP1. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica A1235; **NaS**: nakon tretmana 15 mM NaS; **TG**: nakon tretmana thapsigarginom 0,5 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).



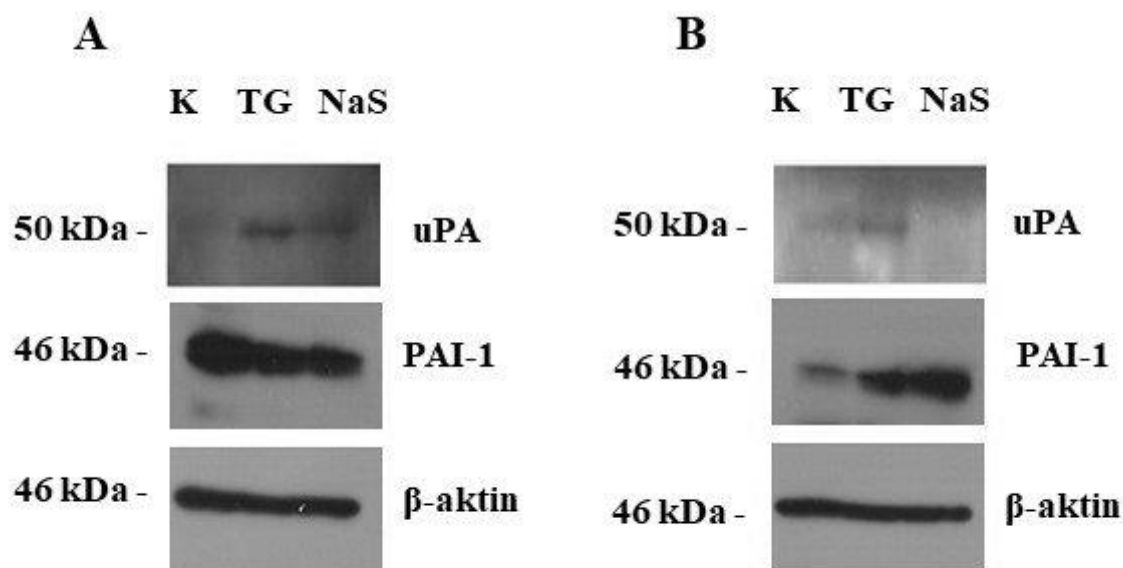
Slika 27. Prekrajanje mRNA gena *XBP1* nakon ERS u staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 izazvanog NaS i thapsigarginom. Iz kontrolnih stanica MDA-MB-231 i stanica tretiranih NaS i thapsigarginom izolirana je RNA, prevedena u cDNA te amplificirana početnicama za XBP1. Nakon gel elektroforeze, dobivene vrpce su denzitometrirane i prikazan je omjer cjelovitog i prekrojenog transkripta XBP1. **K**: bazalna aktivnost uPA kod netretiranih stanica MDA-MB-231; **NaS**: nakon tretmana 15 mM NaS; **TG**: nakon tretmana thapsigarginom 0,25 μ M. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.3. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava i stresa endoplazmatskog retikuluma

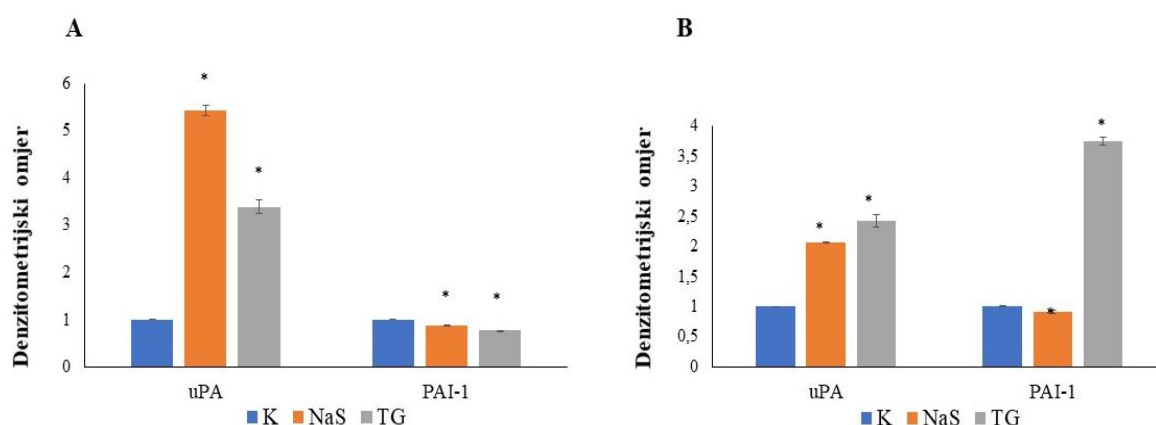
5.3.1. Analiza ekspresije proteina urokinaznog sustava u staničnoj liniji glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon tretmana natrijevim salicilatom i thapsigarginom

Kako bi se istražila modulacija aktivnosti uPA nakon tretmana različitim agensima, izolirani su proteini iz staničnih linija glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon tretmana. Tretman je proveden 15 mM NaS-om i 0,5 μ M thapsigarginom za staničnu liniju glioblastoma A1235 tj. 0,25 μ M thapsigarginom za staničnu liniju karcinoma dojke MDA-MB-231. Stanični lizati analizirani su metodom Western blot. Membrane s proteinima inkubirane su u primarnom antitijelu za uPA, uPAR, PAI-1 i β -aktin. Proteini su detektirani metodom kemoluminiscencije. Kao mjera za normalizaciju količine proteina nanosene na gel korištena je ekspresija β -aktina. Aktivnost uPA ovisi o ekspresiji uPA, njenog inhibitora te mogućnosti vezanja za receptor, stoga je analizirana njihova ekspresija. Rezultati (Slika 28.) su pokazali da je ekspresija uPA u lizatima stanica A1235 bila povećana nakon tretmana stanica NaS i thapsigarginom. Ekspresija PAI-1 je bila smanjena, u staničnim lizatima stanica tretiranih NaS i thapsigarginom, u odnosu na kontrolne uzorke. Detekcija ekspresije uPAR nije bila uspješna.

Kod stanica karcinoma dojke MDA-MB-231 ekspresija je uPA u staničnim lizatima bila promijenjena, u odnosu na netretirane stanice. Dok je kod stanica tretiranih thapsigarginom bila povećana, kod stanica tretiranih NaS bila je smanjena. Ekspresija PAI-1 je u lizatima stanica tretiranih thapsigarginom i NaS bila povećana u odnosu na kontrolne stanice. Detekcija ekspresije uPAR nije bila uspješna.



Slika 28. Analiza ekspresije proteina sustava uPA u staničnoj liniji glioblastoma A1235 (A) i staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231 (B) nakon tretmana thapsigarginom i NaS. Stanice A1235 i MDA-MB-231 su tretirane thapsigarginom i NaS kroz 24 sata, zatim su lizirane, a proteini lizata analizirani metodom Western blot pomoću antitijela za uPA, PAI-1 i β-aktin. Kao mjera za normalizaciju količine proteina nanosene na gel korištena je ekspresija β-aktina. Korišten je marker PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619 kojime se detektiraju proteini molekularne mase 10-250 kDa. **K:** kontrolne, netretirane stanice A1235 tj. MDA-MB-231; **TG:** stanice tretirane s 0,5 μM tj. 0,25 μM thapsigargina; **NaS:** stanice tretirane 15 mM NaS.



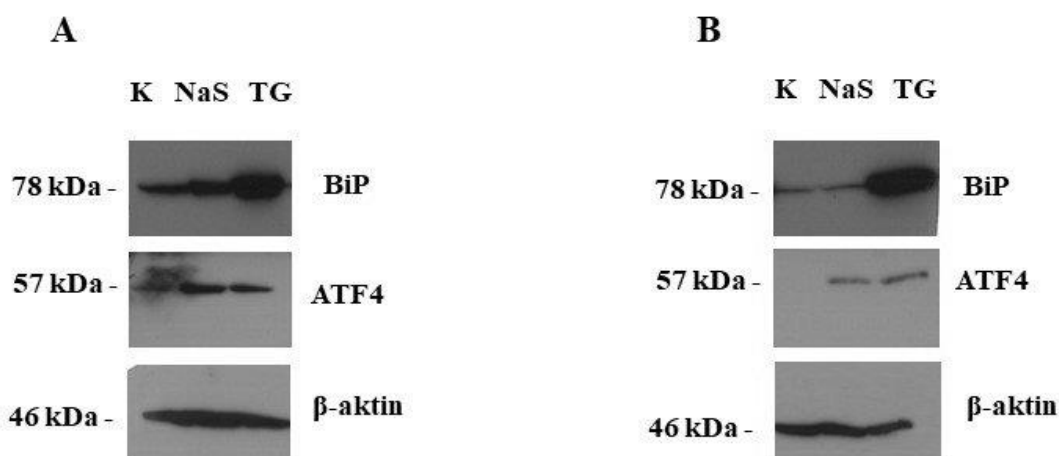
Slika 29. Grafički prikaz analize ekspresije proteina sustava uPA u staničnoj liniji glioblastoma A1235 (A) i karcinoma dojke MDA-MB-231 (B) nakon tretmana thapsigarginom i NaS pomoću denzitometrijskih omjera. Stanice A1235 i MDA-MB-231 su

tretirane thapsigarginom i NaS tijekom 24 sata, zatim su lizirane, a proteini lizata analizirani metodom Western blot pomoću antitijela za uPA, PAI-1 i β -aktin. Denzitometrija je učinjena pomoću Image J. Grafički prikaz je predstavljen kao omjer razine ekspresije uPA i PAI u odnosu na β -aktin, a dodatno normalizirana na kontrolni uzorak uPA tj. PAI-1. **uPA**: omjer razine ekspresije uPA u odnosu na β -aktin, normaliziran na kontrolni uzorak; **PAI-1**: omjer razine ekspresije PAI-1 u odnosu na β -aktin, normaliziran na kontrolni uzorak; **K**: kontrolne, netretirane stanice A1235 tj. MDA-MB-231; **TG**: stanice tretirane 0,5 μ M tj. 0,25 μ M thapsigargina; **NaS**: stanice tretirane 15 mM NaS. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

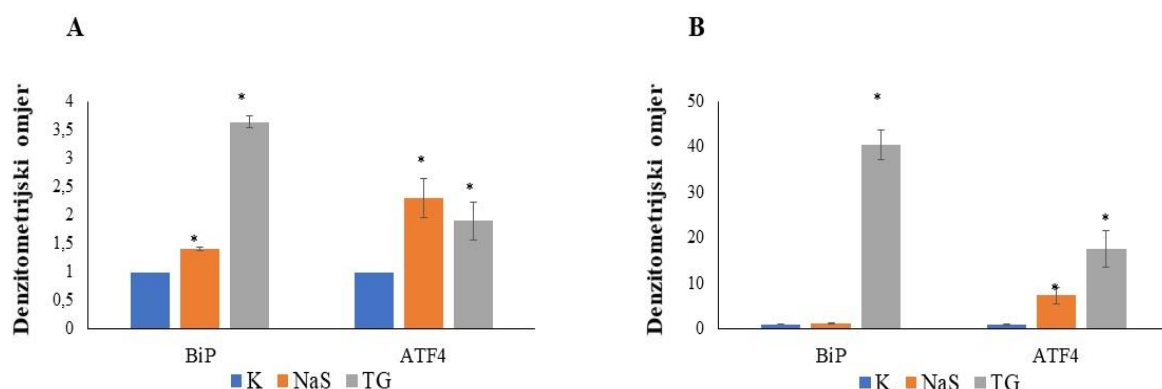
5.3.2. Analiza ekspresije proteina stresa endoplazmatskog retikuluma u staničnoj liniji glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon tretmana natrijevim salicilatom i thapsigarginom

Stanice A1235 i MDA-MB-231 tretirane su s 15 mM NaS i 0,5 μ M thapsigargina za stanice A1235 tj. 0,25 μ M thapsigargina za stanice MDA te su izolirani proteini koji su analizirani metodom Western blot. Membrane s proteinima inkubirane su u primarnom antitijelu za BiP, ATF4, CHOP i β -aktin.

Rezultati su pokazali povećanje ekspresije BiP u staničnim lizatima stanica A1235 i MDA-MB-231 tretiranim NaS, a posebice thapsigarginom, obzirom na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama (Slika 30.). Primjećeno je povećanje ekspresije ATF4 u staničnom lizatu stanica A1235 tretiranih thapsigarginom, obzirom na ekspresiju u kontrolnim, netretiranim stanicama. Također, primjećeno je povećanje ekspresije ATF4 u staničnom lizatu stanica MDA-MB-231 tretiranih NaS, posebice thapsigarginom, obzirom na ekspresiju u kontrolnim, stanicama.



Slika 30. Analiza ekspresije proteina ERS u staničnoj liniji glioblastoma A1235 (A) i karcinoma dojke MDA-MB-231 (B) nakon tretmana NaS i thapsigarginom. Stanice A1235 i MDA-MB-231 su tretirane NaS i thapsigarginom tijekom 24 sata, zatim su lizirane, a proteini lizata analizirani metodom Western blot pomoću antitijela za BiP, ATF4 i β-aktin. Kao mjera za normalizaciju količine proteina nanese na gel korištena je ekspresija β-aktina. Korišten je marker PageRuler Plus Prestained Protein Marker 26619 kojime se detektiraju proteini molekularne mase 10-250 kDa. **K:** kontrolne, netretirane stanice A1235 tj. MDA-MB-231; **NaS:** stanični lizat tretiran s 15 mM NaS; **TG:** stanični lizat tretiran s 0,5 μM tj. 0,25 μM thapsigargina.



Slika 31. Analiza ekspresije proteina ERS (ATF4 i BiP) u staničnoj liniji glioblastoma A1235 (A) i karcinoma dojke MDA-MB-231 (B) nakon tretmana NaS i thapsigarginom pomoću denzitometrijskih omjera. Stanice A1235 i MDA-B-231 su tretirane NaS i thapsigarginom tijekom 24 sata, zatim su lizirane, a proteini lizata analizirani metodom Western blot pomoću antitijela za ATF4, BiP i β-aktin. Denzitometrija je učinjena pomoću programa Image J. Grafički prikaz je predstavljen kao omjer razine ekspresije ATF4 i BiP u odnosu na β-aktin, a dodatno normalizirana na

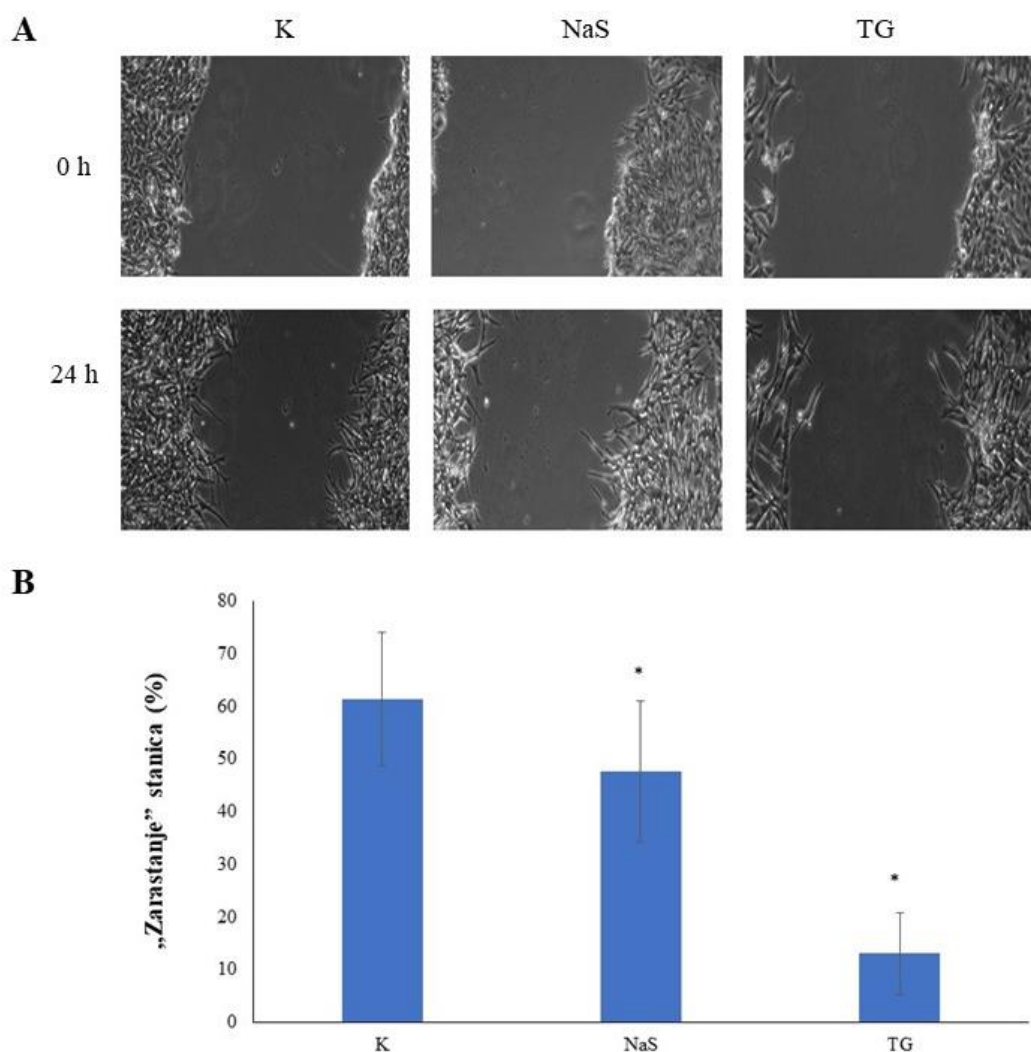
kontrolni uzorak BiP tj. ATF4. **ATF4**: ekspresija ATF4; **BiP**: ekspresija BiP; **K**: kontrolne, netretirane stanice A1235 tj. MDA-MB-231; **NaS**: stanični lizat tretiran s 15 mM NaS; **TG**: stanični lizat tretiran s 0,5 μ M tj. 0,25 μ M thapsigargina. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.4. Analiza migracije stanica tretiranih kemoterapeutikom natrijevim salicilatom i thapsigarginom

5.4.1. Analiza migracije stanica testom „zarastanja“ u staničnoj kulturi glioblastoma A1235 tretiranih NaS i thapsigarginom

Migracija je sposobnost aktivnog kretanja tumorskih stanica. Budući da sustav uPA može utjecati na staničnu adheziju, migraciju i invaziju, analizirana je migracija stanica A1235, nakon tretmana 15 mM NaS i 0,5 μ M thapsigarginom tijekom 24 sata. Migracija stanica analizirana je pomoću testa zarastanja ogrebotine na konfluentnom sloju stanica. Rezultati su prikazani kao relativna vrijednosti smanjenja širine „ogrebotine“ u odnosu na početnu.

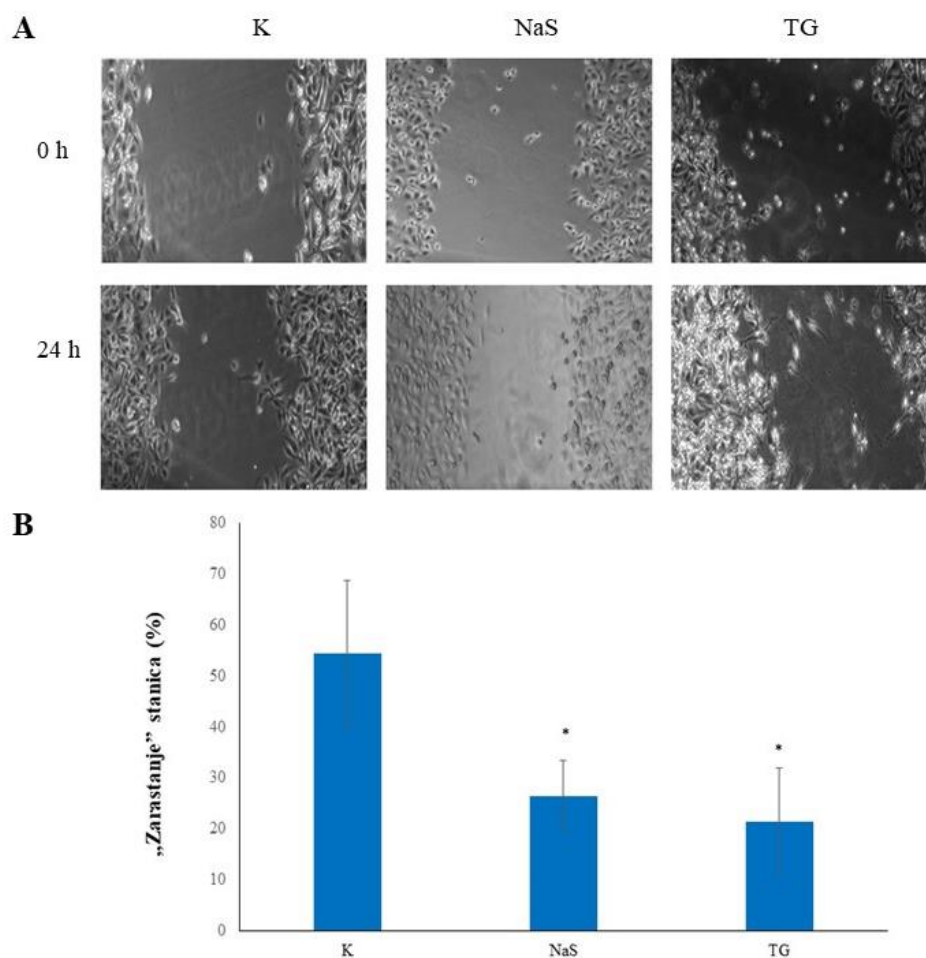
Rezultati (Slika 32.) su pokazali značajno smanjenje migracije kod stanica tretiranih NaS i thapsigarginom.



Slika 32. Migracija stanica A1235 tretiranih NaS i thapsigarginom metodom „zarastanja“. Na konfluentnom sloju stanica A1235 napravljena je „ogrebotina“ te uspoređen postotak „zarastanja ogrebotine“ nakon 24 sata. Stanice su tretirane NaS i thapsigarginom. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke (A), a u drugom dijelu (B) rezultati prikazani kao relativna vrijednosti smanjenja širine „ogrebotine“ u odnosu na početnu. Svaki je uzorak načinjen u duplikatu, a po uzorku analizirano 9 točaka. **K:** netretirane stanice A1235; **NaS:** 15 mM NaS; **TG:** 0,5 μ M thapsigargin. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.4.2. Analiza migracije stanica testom „zarastanja“ u staničnoj kulturi karcinoma dojke MDA-MB-231 tretiranih NaS i thapsigarginom

Rezultati (Slika 33.) su pokazali značajno smanjenje migracije tj. stanice tretirane NaS i thapsigarginom (koncentracije 0,25 μ M) sporije „zarastaju“.



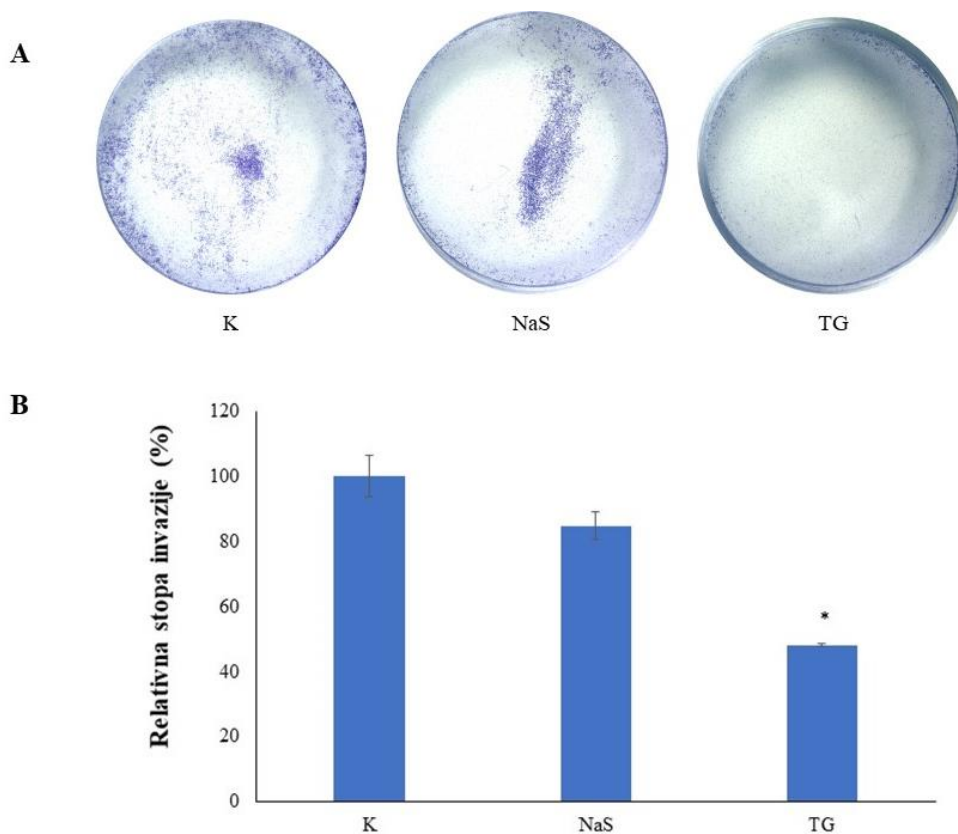
Slika 33. Migracija stanica MDA-MB-231 tretiranih NaS i thapsigarginom metodom „zarastanja“. Na konfluentnom sloju stanica MDA-MB-231 napravljena je „ogrebotina“ te uspoređen postotak „zarastanja ogrebotine“ nakon 24 sata. Stanice su tretirane NaS i thapsigarginom. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke (A), a u drugom dijelu (B) rezultati prikazani kao relativna vrijednosti smanjenja širine „ogrebotine“ u odnosu na početnu. Svaki je uzorak načinjen u duplikatu, a po uzorku analizirano 9 točaka. **K:** netretirane stanice MDA-MB-231; **NaS:** 15 mM NaS; **TG:** 0,25 μ M thapsigargin. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.5. Analiza invazije stanica tretiranih natrijevim salicilatom i thapsigarginom

5.5.1. Analiza invazije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane NaS i thapsigarginom

Invazija je migracija stanica razgradnjom izvanstaničnog matriksa pomoću proteaza kojom im je omogućen prelazak u okolno tkivo, krvne i limfne žile te stvaranje udaljenih metastaza (Blasi i sur., 1997.). Analizirana je sposobnost invazije stanične linije glioblastoma A1235 kroz ekstracelularni matriks nakon obrade NaS i thapsigarginom.

Rezultati su prikazani kao relativna stopa invazije stanica usporedbom broja kontrolnih i tretiranih stanica. Rezultati (Slika 34.) su pokazali kako nakon obrade stanica A1235 thapsigarginom dolazi do značajnog smanjenja sposobnosti invazije (za oko 50 %).



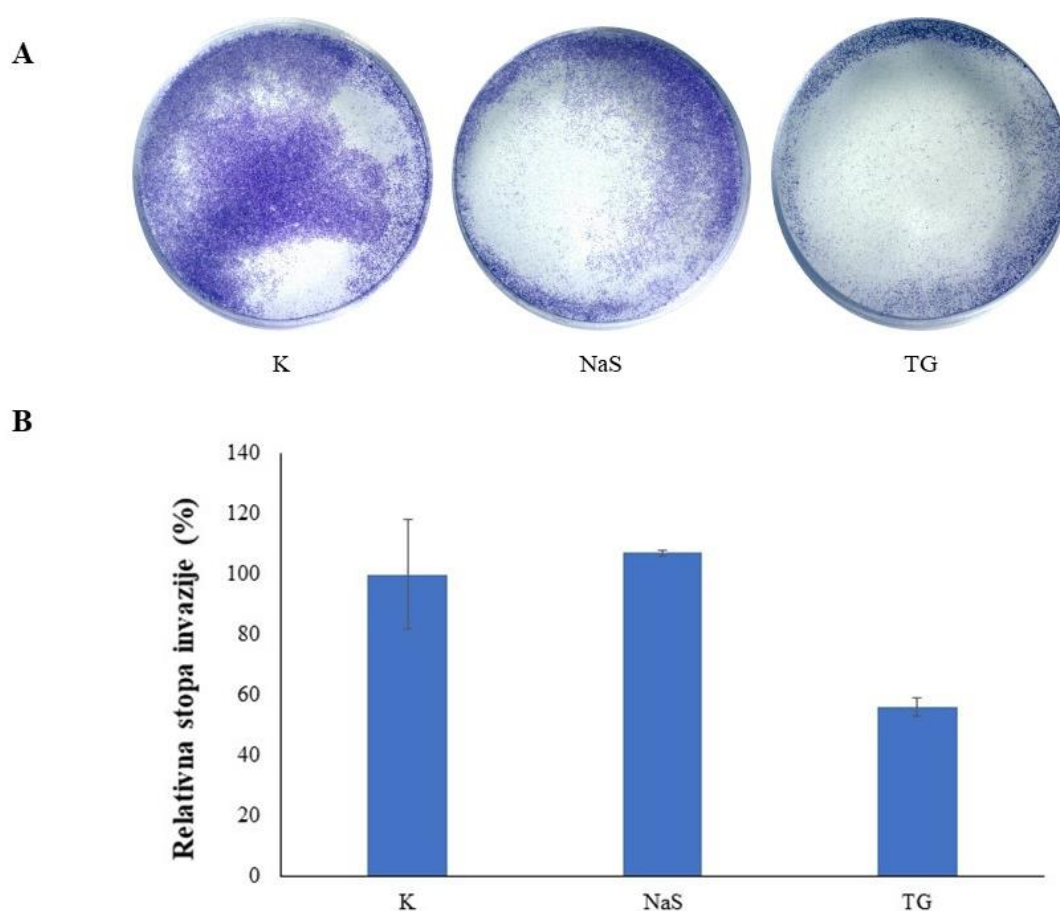
Slika 34. Relativna stopa invazije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane NaS i thapsigarginom. Stanice A1235 su nasadene u komorice s membranom koja sadrži izvanstanični matriks te su tretirane NaS i thapsigarginom. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sata, stanice su fiksirane, obojane i prebrojane. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke (A), a u drugom dijelu (B) podaci su izraženi kao postotak u odnosu na kontrolni uzorak. **K:** netretirane stanice A1235; **NaS:** stanice tretirane 15 mM NaS; **TG:** stanice tretirane 0,5 μ M thapsigarginom. *statistički značajna razlika u odnosu na K prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.5.2. Analiza invazije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane NaS i thapsigarginom

Analizirana je sposobnost invazije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 nakon obrade NaS i thapsigarginom.

Rezultati su prikazani kao relativna stopa invazije stanica usporedbom broja stanica kontrole i tretmana.

Rezultati (Slika 35.) su pokazali kako nakon obrade stanica MDA-MB-231 NaS i thapsigarginom nije došlo do značajnog smanjenja sposobnosti invazije.



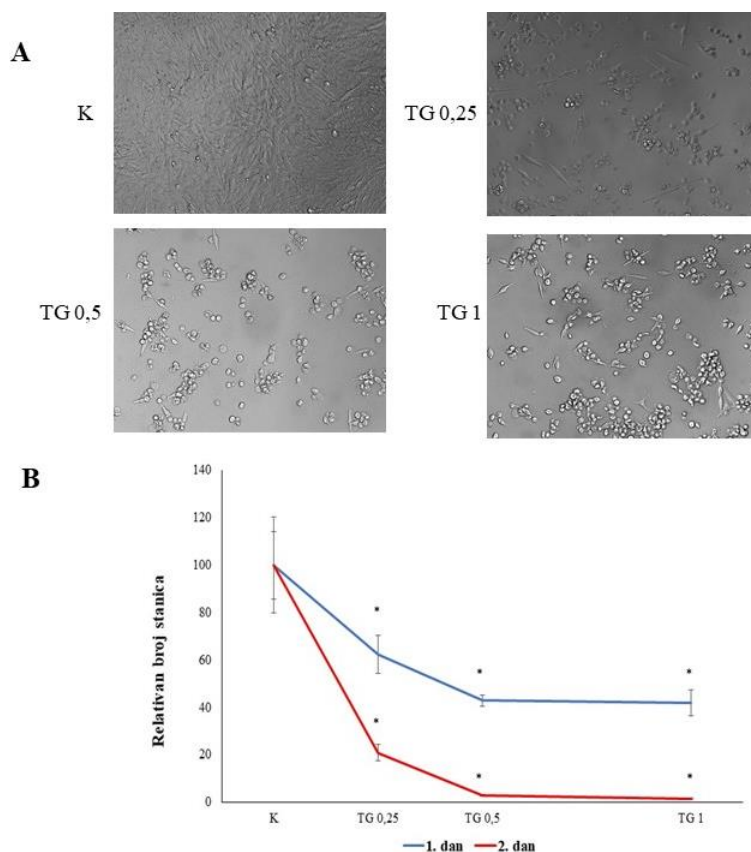
Slika 35. Relativna stopa invazije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane NaS i thapsigarginom. Stanice MDA-MB-231 su nasađene u komorice s membranom koja sadrži izvanstanični matriks te su tretirane NaS i thapsigarginom. Nakon perioda inkubacije od 16 do 24 sata, stanice su fiksirane, obojane i prebrojane. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke (A), a u drugom dijelu (B) podaci su izraženi kao postotak u odnosu na kontrolni uzorak. **K:** netretirane stanice A1235; **NaS:** stanice tretirane 15 mM NaS; **TG:** stanice tretirane 0,25 μ M thapsigarginom.*statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.6. Analiza proliferacije stanica tretiranih induktorom stresa endoplazmatskog retikuluma thapsigarginom

5.6.1. Analiza proliferacije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane thapsigarginom

Kako bi se istražilo utjecaj ERS na staničnu proliferaciju, pratio se stanični rast brojanjem stanica nakon tretmana različitim koncentracijama thapsigargina.

Rezultati (Slika 36.) pokazuju značajnu inhibiciju proliferacije stanica A1235 pri svim koncentracijama thapsigargina. Nakon 24 sata, thapsigargin u koncentraciji 0,25 μM inhibirao je rast za 38%, u koncentraciji 0,5 μM za 57%, a u koncentraciji 1 μM za 59%. Nakon 48 sati, thapsigargin u koncentraciji 0,25 μM inhibirao je rast za 79%, u koncentraciji 0,5 μM za 97%, a u koncentraciji 1 μM za 98%.

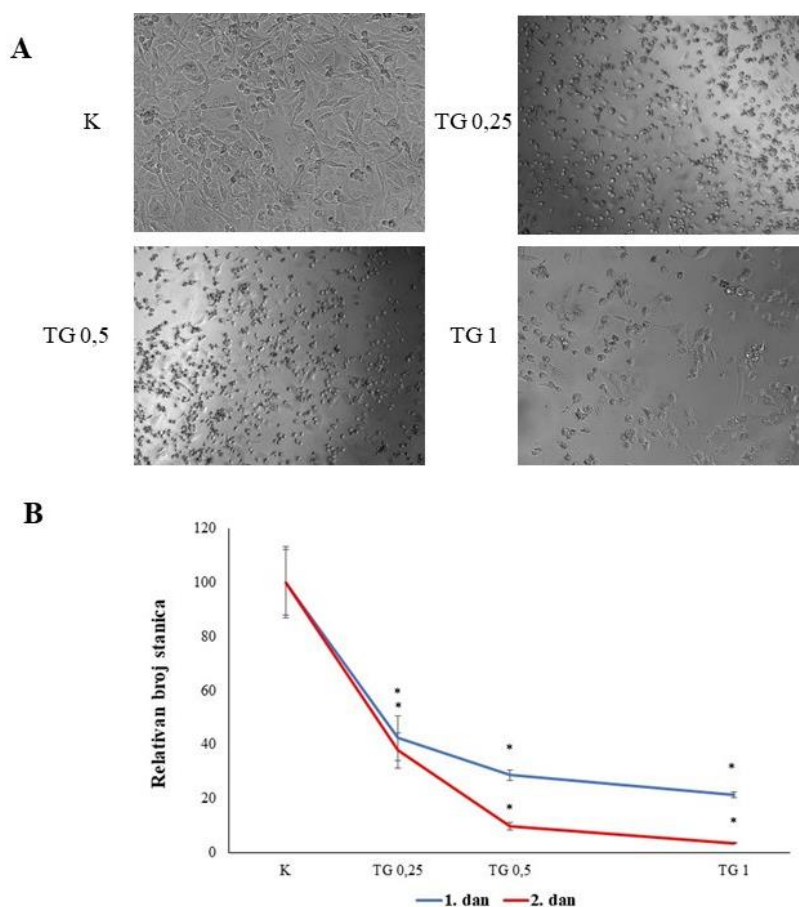


Slika 36. Prikaz proliferacije stanične linije glioblastoma A1235 tretirane thapsigarginom.

Stanice A1235 tretirane su različitim koncentracijama thapsigargina. Tretman, kao i brojanje stanica rađeno je u triplikatu. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke stanica drugog dana tretmana (A), a u drugom dijelu (B) grafički prikaz. **K**: netretirane stanice A1235; **TG 0,25**: stanice tretirane 0,25 μM thapsigarginom; **TG 0,5**: stanice tretirane 0,5 μM thapsigarginom; **TG 1**: stanice tretirane 1 μM thapsigarginom. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

5.5.2. Analiza proliferacije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane thapsigarginom

Rezultati (Slika 37.) pokazuju značajnu inhibiciju proliferacije stanica MDA-MB-231 pri svim koncentracijama thapsigargina. Nakon 24 sata, thapsigargin u koncentraciji 0,25 μM inhibirao je rast za 58%, u koncentraciji 0,5 μM za 72%, a u koncentraciji 1 μM za 78%. Nakon 48 sati, thapsigargin u koncentraciji 0,25 μM inhibirao je rast za 62%, u koncentraciji 0,5 μM za 90%, a u koncentraciji 1 μM za 96%.



Slika 37. Prikaz proliferacije stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 tretirane thapsigarginom. Stanice MDA-MB-231 tretirane su različitim koncentracijama thapsigargina. Tretman, kao i brojanje stanica rađeno je u triplicatu. U prvom dijelu prikazane su mikroskopske snimke stanica drugog dana tretmana (A), a u drugom dijelu (B) grafički prikaz. **K:** netretirane stanice MDA-MB-231; **TG 0,25:** stanice tretirane 0,25 μM thapsigarginom; **TG 0,5:** stanice tretirane 0,5 μM thapsigarginom; **TG 1:** stanice tretirane 1 μM thapsigarginom. *statistički značajna razlika u odnosu na **K** prema Student T-testu ($p < 0.05$).

6. RASPRAVA

Sustav uPA sustav je koji ima važnu ulogu u nizu fizioloških i patoloških procesa poput zarastanja rana, otapanja krvnih ugrušaka, degradacije izvanstaničnog matriksa, metastaziranja i remodeliranja tkiva što je rezultat interakcija molekula koje u njemu sudjeluju (Blasi i sur., 1997.; Duffy, 2005.; Yepes, 2020.). Na molekularnoj razini, interakcije uPA, PAI-1 i uPAR, reguliraju aktivaciju plazmina i kroz nju procese degradacije ekstracelularnog matriksa, ali i složene procese adhezije, migracije i invazije stanica (Baart i sur., 2020.). Regulacija sustava uPA je na razini transkripcije uPA, PAI-1 i uPAR, njihove sekrecije te međusobnih interakcija proteaze uPA s uPAR ili inhibicije aktivnosti djelovanjem PAI-1 (Higgins i sur., 2011.; Mahmood i sur., 2018.; Nagamine i sur., 2005.). Djelovanje sustava ovisi o stanično-specifičnoj ekspresiji molekula sustava, ali i molekula s kojima one stupaju u interakciju, poput integrina, LRP1 (CD 91), i dr. kao i o regulaciji unutarstaničnim signalnim putevima (Baart i sur., 2020.; Cannio i sur., 1991.; Mahmood i sur., 2018.; Ulisse i sur., 2009.; Vallabhaneni i sur., 2011.).

Cilj ovog rada bilo je istraživanje regulacije sustava uPA pod utjecajem ERS. Hipoteza rada da ERS može utjecati na aktivnost uPA potvrdila se istraživanjem djelovanja poznatih induktora ERS na sustav uPA. Ispitivanjem mehanizma djelovanja poznatih modulatora aktivnosti uPA istražilo se je li ERS mehanizam kojim se regulira uPA u stresnim uvjetima.

ERS ima ključnu ulogu u biologiji tumora, doprinoseći preživljavanju, proliferaciji i otpornosti stanica. U tumorskom mikrookolišu, gdje su kisik i hranjive tvari često ograničeni, mnoge tumorske stanice imaju izmijenjen odgovor na stres te dolazi do nakupljanja nepravilno smotanih ili nesmotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu, što dovodi do ERS. U slučaju produljenog ERS dolazi do nakupljanja nepravilno smotanih proteina, odnosno do aktivacije UPR (Corazzari i sur., 2017.; Liang i sur., 2021.; Lin i sur., 2003.). Cilj UPR je obnova homeostaze endoplazmatskog retikuluma smanjenjem sinteze proteina, povećanjem sinteze šaperona i degradacijom nepravilno smotanih proteina, a ovisno o intenzitetu i trajanju stresa, omogućuje tumorskim stanicama prilagodbu i preživljenje ili vodi u programiranu staničnu smrt (apoptozu) (Corazzari i sur., 2017.; Schröder i Kaufman, 2005.; Senft i Ronai, 2015.; Wu i Kaufman, 2006.). Integrirani odgovor na stres (engl. *integrated stress response*, ISR) složen je mehanizam odgovora na različite tipove staničnog stresa čiji su nizvodni putevi povezani s odgovorom na ERS. (Pakos-Zebrucka i sur., 2016.). ATF4 je središnji transkripcijski faktor, koji nije aktivan samo u kontekstu ERS, već i kod drugih oblika staničnog stresa, poput nedostatka aminokiselina, nutrijenata, željeza, prisustva dvolančane RNA i hipoksije i koji se

sintetizira i regulira transkripciju nizvodnih meta u suradnji s drugim specifičnim transkripcijskim faktorima i usprkos općoj inhibiciji translacije (Lorenz i sur., 2021.; Neill i Masson, 2023.). Inhibicija UPR povećava osjetljivost tumora na kemoterapiju i imunoterapiju, čime se otvaraju nove mogućnosti za terapijske intervencije usmjerene na ERS (Hetz i Saxena, 2017.; Wang i sur., 2017.).

Kako bi se istražilo može li ERS utjecati na sustav uPA, stanične linije glioblastoma A1235, karcinoma dojke MDA-MB-231, neuroglioma H4, ljudskog embrionalnog bubrega HEK-293, karcinoma pluća A2182, osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa tretirane su thapsigarginom, koji se eksperimentalno koristi za izazivanje ERS, ireverzibilnim i nekompetitivnim inhibitorom Ca^{2+} -ATPaze sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA) koja se nalazi na membrani endoplazmatskog retikuluma. Inhibicijom SERCA spriječen je povratak kalcija u endoplazmatski retikulum, čime dolazi do smanjenja koncentracije kalcija u endoplazmatskom retiklumu i povećanja u citoplazmi (Jaskulska i sur., 2021.; Yoshino i sur., 2017.). Budući da funkcija brojnih endoplazmatskih šaperona ovisi o prisutnosti kalcija, može doći do nagomilavanja nepravilno smotanih proteina tj. ERS (Corazzari i sur., 2017.). U ovom istraživanju je pokazano da thapsigargin u koncentracijama 0,25-1 μM može modulirati ekstracelularnu aktivnost uPA te da su promjene stanično specifične. Kod stanične linije A1235 došlo je do povećanja, dok kod staničnih linija MDA-MB-231, H4, HEK-293 i A2182 do smanjenja aktivnosti uPA. Pojedine stanične linije, poput stanica osteosarkoma U-2OS i karcinoma vrata maternice HeLa, nisu imale bazalnu aktivnost uPA. Kod stanica A1235 krivulja povećanja aktivnosti imala je zvonolik oblik, slično kao i kod tretmana NaS i nekim drugim agensima, što je protumačeno odgovorom kod optimalnih koncentracija, u subletalnim uvjetima (Matulić i Brdar 2001, Madunić i sur. 2016). S druge strane, odgovor u obliku promjene aktivnosti uPA opada kod viših koncentracija thapsigargina, zbog povećanja citotoksičnosti. Stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231, pokazale su najveću promjenu u aktivnosti uPA nakon izazivanja ERS thapsigarginom, a sličan stanično specifičan način promjene aktivnosti uPA prisutan je i nakon tretmana NaS što je pokazano ovim, ali i prethodnim istraživanjima (Madunić i sur., 2017. Matulić i Brdar 2001). NaS može inducirati ERS (Mügge i Silva, 2017.), ali djeluje i kao modulator MAP kinaza i puteva NF- κB te inhibitor AMPK, ovisno o tipu stanica (Amann i Peskar, 2002.; Razandi i sur., 2002.; Tegeder i sur., 2001.). Neki od ovih signalnih puteva mogu utjecati na aktivnost promotora uPA i PAI-1 (Madunić i sur. 2016, Madunić i sur. 2017). Stanična linija glioblastoma A1235 povećavala je aktivnost uPA i nakon tretmana kemoterapeutcima koji mogu djelovati mutageno, poput

alkilirajućeg agensa MNNG (Brdar i Matulić, 1988.), etopozida koji izaziva dvolančane lomove DNA (Matulić i Brdar, 2002.), ali i djelovanja retinoične kiseline (Horvat i sur., 2019b.). Stanice A1235 pokazale su relativnu otpornost na MNNG (neobjavljeni podaci), što je moguće posljedica upravo povećane aktivnosti molekula odgovora na ERS. Aktivnost uPA povećana je i nakon tretmana gemcitabinom, citidinskim analogom koji zaustavlja sintezu DNA i inhibira enzime uključene u njihovu sintezu (Bastiancich i sur., 2018.), uz iznimku 10 μ M gemcitabina koji je letalno djelovao. Povećanje aktivnosti uPA pokazano je kod tumorskih staničnih linija i nakon tretmana različitim agensima poput inhibitora citoskeleta, forbol esterima, inhibitorima fosfataza, aktivatorima MAP kinaza itd. (Nagamine i sur., 2005.; Razandi i sur., 2002.; Tegeder i sur., 2001.).

S druge strane, stanična linija karcinoma dojke MDA-MB-231 smanjila je aktivnost uPA nakon tretmana NaS, ali i kod nižih koncentracija gemcitabina. Usprkos hipotezi da je povećanje aktivnosti uPA povezano sa sposobnosti stanica da eksprimiraju O6-metilguanin metiltransferazu i popravljaju alkilirajuća oštećenja, stanice MDA-MB-231 nemaju detektabilnu aktivnost MGMT (Chen i sur., 2015.), ali su smanjivale aktivnost uPA nakon alkilirajućeg oštećenja. Ove su stanice bile vrlo osjetljive na alkilirajući MNNG (podaci kolega iz laboratorija).

Da bi se istražila povezanost promjena aktivnosti uPA sa ERS, analizirana je ekspresija gena i proteina odgovora UPR nakon tretmana različitim agensima. Kod stanične linije glioblastoma A1235 analiza ekspresije gena pokazala je da su i thapsigargin i NaS uzrokovali ERS. Došlo je do povećanja ekspresije gena za *BiP*, koji kodira za šaperon koji pravilno smata proteine u ER i povećava ekspresiju kao odgovor na ERS (Corazzari i sur., 2017.; Heinrich i sur., 2024.; Hwang i Qi, 2018.; Zhang i sur., 2024b.). Zabilježeno je i povećanje ekspresije gena za *ATF4* koji kodira za ključni transkripcijski faktor koji regulira stanični odgovor na stres. Nakon aktivacije receptora PERK, dolazi do fosforilacije eIF2 α i posljedične inhibicije opće stanične translacije. Ipak, zahvaljujući posebnoj strukturi 5' UTR regije mRNA, *ATF4* se može selektivno i dalje može sintetizirati i u tim uvjetima. Uloga *ATF4* u staničnom odgovoru ovisi o njegovom dimerizacijskom partneru, koji se razlikuje ovisno o potrebama stanice (Pakos-Zebrucka i sur., 2016.). Aktivirani *ATF4* inducira sintezu šaperona, formira heterodimere s CHOP te regulira apoptozu, autofagiju i druge procese povezane s odgovorom na stres (Neill i Masson, 2023.; Pakos-Zebrucka i sur., 2016.). *ATF4* se na ciljnim promotorima veže za elemente C/EBP-ATF (CARE) (Gentz i sur., 2013.; Pakos-Zebrucka i sur., 2016.; Senft i Ronai, 2015.) te povećava ekspresiju niza gena, uključujući gene za *ATF3*, šaperon *BiP*,

CHOP/DDIT3/GADD156, *DDIT3*, *GADD34* i *TRIBB3* (Cunard, 2013.; Vihervaara i sur., 2018.). Neki od ovih proteina sudjeluju u ublažavanju stresa i regulaciji aktivnosti ATF4, dok drugi, poput *GADD34*, djeluju povratno inhibirajući kinazu odgovornu za fosforilaciju eIF2 α , čime se ponovno uspostavlja opća translacija (Magg i sur., 2024.). *TRIBB3*, s druge strane, povezan je s regulacijom signalnog puta mTOR i inhibicijom staničnog rasta, a i ATF4 također može sudjelovati u negativnoj regulaciji signalizacije putem Akt/mTOR (Zhang i sur., 2024a.). Uz *CHOP*, ATF4 regulira i ekspresiju p62/SQSTM1, ključnog adaptora u procesu autofagije. U tumorskim stanicama, povišena ekspresija ATF4 u uvjetima stresa može imati različite učinke - u nekim slučajevima doprinosi preživljenju stanica, dok u drugima moguće vodi povećanju apoptoze i autofagije (Liu i sur., 2016.; Park i sur., 2016.).

Kod stanične linije glioblastoma A1235 thapsigargin je povećao ekspresiju gena za *ATF4* te svih navedenih nizvodnih meta (gena za *ATF3*, *BiP*, *SQSTM1*, *TRIBB3*, *CHOP*). Povećana je bila i ekspresija gena za *GDF15*, koji kodira protein porodice TGF β povezan sa stresom i karakteristično je induciran NaS (Emmerson i sur., 2018.). Bazalna je razina ekspresije nekih gena ERS kod stanica A1235 bila visoka, poput one kod gena za *ATF4* (neobjavljeni podaci RNA sekvenciranja, podaci RT-qPCR). S druge strane, povećanje ekspresije je bilo vrlo veliko, do nekoliko desetaka puta (npr. *ATF3* i *GDF15*). Povećanje ekspresije gena za *CHOP* nije pokazalo statističku značajnost zbog velikog rasapa rezultata, moguće zbog nestabilnosti sekvence, iako je povećanje bilo izrazito, te se moglo detektirati i običnom reakcijom PCR. Povećanje ekspresije je potvrđeno za neke molekule UPR i na razini proteina, poput gena za *ATF4* i *BiP*. NaS, iako ima višestruko djelovanje u stanici može izazvati ERS (Mügge i Silva, 2017.; Razandi i sur., 2002.). Kod stanične linije glioblastoma A1235 također je povećao ekspresiju RNA gena za *ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *CHOP* (*DDIT3*), *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*. Pilot projekt sekvenciranja RNA stanične linije glioblastoma A1235 tretirane NaS potvrdio je višestruko povećanje ekspresije niza gena povezanih s odgovorom na ERS (*ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *CHOP*, *GADD34*, *TRIBB3*). Slično kao i kod thapsigargina, povećanje je ekspresije bilo kod nekih gena do nekoliko desetaka pa i stotinu puta (npr. *GDF15*). Osim aktivacije puta PERK, kod stanične linije glioblastoma A1235 bila je povećana aktivacija puta IRE α , budući da je detektiran kratki oblik transkripta gena *XBP1*. Aktivacijom IRE α dolazi do izrezivanja sekvence mRNA od 26 pb, čime nastaje transkript po kojem se sintetizira transkripcijski faktor uključen u odgovor na ERS. Ciljni geni ovog faktora uključuju one koji sudjeluju u metabolizmu lipida, ekspresiji šaperona i drugim aspektima prilagodbe stanice na stres (Oslowski i Urano, 2011.; Senft i Ronai, 2015.).

Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 također je pokazano da thapsigargin i NaS izazivaju odgovor na ERS. Za eksperimentalne uvjete korištena je koncentracija 0,25 μ M thapsigargina, budući da je pokazala optimalan odgovor u odnosu na staničnu vijabilnost. Na razini RNA, thapsigargin je inducirao ekspresiju gena za *ATF3*, dok je ekspresija većine drugih nizvodnih gena, *BiP*, *CHOP*, *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*, uključujući *ATF4* bila slična kontroli. Međutim, na razini proteina povećana je bila ekspresija *BiP* i *ATF4*. NaS je kod ovih stanica izazvao povećanje ekspresije gena za *ATF4*, *ATF3*, *BiP*, *CHOP* i *TRIBB3*. Faktor povećanja ekspresije je bio 2-6 puta. Na razini proteina *ATF4* je također pokazao povećanje ekspresije, dok je povećanje ekspresije *BiP* bilo znatno manje. NaS i thapsigargin također su aktivirali signalni put IRE α i uzrokovali cijepanje XBP1, međutim u znatno manjoj mjeri nego kod stanične linije glioblastoma A1235.

Iako su NaS i thapsigargin izazvali promjene ekspresije gena i proteina ERS, odgovor stanica na NaS je bio veći na razini ekspresije RNA, dok je šaperon *BiP* bio izrazito induciran thapsigarginom. Različita jačina odgovora na razini proteina i RNA kod tretmana thapsigarginom može se objasniti vremenskim tijekom događanja. Oboje su analizirani nakon 24 sata, te je moguće da stanice brzo reagiraju promjenama u ekspresiji RNA, koja se nakon 24 sata vraća na bazalne vrijednosti, dok je u međuvremenu došlo do sinteze proteina. Količina mRNA tijekom UPR može biti regulirana stimulacijom ili inhibicijom transkripcije i povećanjem ili smanjenjem stabilnosti mRNA (Arendsorf i sur., 2013.). Odgovor i ishod ERS mogu biti regulirani npr. s pomoću GADD34, fosfataze koja sudjeluje u povratnoj spregi, defosforilira eIF2 α i tako smanjuje inhibiciju proteinske translacije, i mijenja relativnu količinu transkripcijskih faktora. S druge strane, primjer RNA i proteina kratkog poluživota je *CHOP*, koji se smatra sekundarnim transkripcijskim faktorom UPR, budući da je direktno reguliran s pomoću *ATF4* i *ATF6*. Funkcija mu je povezana sa staničnom smrću. Stoga se njegova količina smatra mjerom stresa ER u realnom vremenu i strogo je kontrolirana (Rutkowski i sur. 2006). *CHOP* regulira ekspresiju i anti i proapoptotskih gena porodice *Bcl2*, ali i negativnu povratnu vezu kroz GADD34 (Arendsorf i sur., 2013.).

Da bi se detaljnije istražio odgovor stanica na ERS, putevi odgovora su inhibirani različitim inhibitorima i pratila se promjena aktivnosti uPA. Ispitan je stanični odgovor nakon tretmana s ECGC, inhibitorom šaperona *BiP* zatim s icerguastatom, inhibitorom fosfataze PPP1R15A/GADD34, koja je uključena u ponovnu aktivaciju eIF2 α , te GSK2656157, inhibitorom signalnog puta PERK.

Kod stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231, ECGC je smanjio bazalnu razinu aktivnosti uPA. Kod stanične linije glioblastoma A1235, vezanjem za BiP teoretski bi mogao i aktivirati i smanjiti reakciju na ERS blokadom šaperona (Capasso i sur., 2025.; Pyrko i sur., 2007.; Talib i sur., 2024.). Također, ECGC je potencijalni inhibitor aktivnosti uPA na enzimatskoj razini (Shin i sur., 2018.), a, kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 je pokazano da može inhibirati rast stanične linije inaktivacijom β -kateninskog signalnog puta (Hong i sur., 2017.). Naši su rezultati pokazali smanjenje ekspresije uPA na razini proteina kod stanica A1235, dok kod stanica MDA MB-231 nije bilo bitnih promjena ekspresije uPA (rezultati kolega iz laboratorija). Kod stanica A1235, u kombinaciji s thapsigarginom, NaS i alkilirajućim agensom MNNG, ECGC je doveo do smanjenja povećane aktivnosti uPA.

Kod stanica MDA MB-231 kombinacija tretmana s ECGC i gemcitabina ili NaS dovela je do dodatnog smanjenja aktivnosti uPA, dok kombinacija s thapsigarginom nije bitno utjecala na aktivnost uPA.

Inhibicija PERK visokoselektivnim inhibitorom GSK2656157 (Axten i sur., 2013.), kod stanične linije glioblastoma A1235 povećala je bazalnu aktivnost uPA. Međutim, u kombinaciji s thapsigarginom, NaS, MNNG-om i gemcitabinom došlo je do smanjenja povećane aktivnosti izazvane kemoterapeuticima. Takvi bi rezultati ukazivali na povezanost ERS i aktivnosti uPA kod ovih stanica.

Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 inhibicija PERK nije utjecala na bazalnu aktivnost uPA niti je bitno utjecala na smanjenje aktivnosti nakon tretmana s thapsigarginom, NaS i gemcitabinom. Jedino je bilo povećanje aktivnosti u kombinaciji s MNNG. Ovi bi rezultati ukazivali da put regulacije aktivnosti uPA kod ERS kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 ne ovisi o aktivnosti kinaze PERK.

Inhibitor GADD34, icerguastat – selektivni inhibitor regulatorne podjedinice PPP1R15A, fosfataze uključene u povratnu spregu i utišavanje odgovora na stres, također je različito djelovao kod stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231. Kod stanične linije glioblastoma A1235 povećao je bazalnu aktivnost uPA, ali je smanjio aktivnost nakon tretmana thapsigarginom, NaS, MNNG-om i gemcitabinom. Rezultati sekvenciranja RNA stanica A1235 tretiranih NaS pokazali su relativno visoku ekspresiju gena za *GADD34* i povećanje od 5 puta nakon tretmana. Smanjenje aktivnosti uPA kod kombinacije tretmana s kemoterapeuticima i inhibitorom također ukazuje na uključenost ERS u regulaciju urokinazne

aktivnosti kod tretmana kemoterapeuticima. Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, inhibicija GADD34 je smanjila bazalnu aktivnost uPA. Uz tretman s thapsigarginom i NaS došlo je do dodatnog smanjenja aktivnosti. Inhibicija GADD34 mogla je smanjiti negativnu povratnu spregu i potencijalno pojačati stresni odgovor te potaknuti dodatnu inhibiciju. Podaci iz baze podataka *Human Protein Atlas* ukazuju na prisutnost aktivacije povratnog odgovora posredovanog GADD34 u staničnoj liniji karcinoma dojke MDA-MB-231, što može doprinijeti njihovoj prilagodbi na ERS. Ovi bi podaci ukazivali na složene putove regulacije aktivnosti uPA kod ove stanične linije.

Pored specifičnih inhibitora puteva ERS, stanice su tretirane i ionomycinom, antibiotikom i kalcijevim ionoforom koji omogućuje transport kalcijevih iona kroz membrane, uključujući plazma membranu i membranu ER, povećavajući propusnost za kalcijeve ione i njegovu koncentraciju u citosolu (Morgan i Jacob, 1994.; Pecoraro i sur., 2020.). Cilj je bio istražiti može li promjena aktivnosti uPA biti uzrokovana porastom intracelularnog kalcija koji je posljedica djelovanja thapsigargina, a ne samim odgovorom na ERS. Kako nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti uPA, zaključeno je da je promjena njene aktivnosti posljedica ERS.

Aktivnost uPA u eksperimentima služila kao mjera odgovora na ERS, no ona je posljedica interakcija između uPA i PAI-1, te mehanizama regulacije njihove ekspresije na razini transkripcije RNA i sinteze proteina. Stoga je analiziran sustav uPA kod indukcije ERS na razini RNA i proteina. Kod stanične linije glioblastoma A1235, i thapsigargin i NaS izazvali su povećanje ekspresije mRNA gena za uPA 6-9 puta. Istovremeno, NaS je inducirao ekspresiju gena za PAI-1 oko 3 puta, dok kod tretmana thapsigarginom nije bilo promjene. Ekspresija uPAR nije bila bitno promijenjena. Neobjavljeni podaci RNA sekvenciranja stanične linije glioblastoma A1235 tretiranih NaS također su potvrdili porast ekspresije uPA i PAI-1. Na razini unutarstaničnih proteina thapsigargin i NaS su inducirali povećanu ekspresiju uPA. S druge strane, ekspresija PAI-1 je bila smanjena, kod oba tretmana. Kako je ukupna aktivnost uPA rezultat odnosa urokinaze i PAI-1, povećanje aktivnosti moglo bi se objasniti povećanjem omjera enzima i njenog inhibitora. Stanice A1235 su pokazale povećanu aktivnost u nizu eksperimenata s različitim agensima, te različitu regulaciju u odnosu na druge stanične linije (Madunić i sur. 2017). Stoga je moguće kod ovih stanica uPA regulirana specifičnom kombinacijom signalnih puteva, a postoji i mogućnost poremećaja u interakciji uPA i PAI-1. Takav bi poremećaj mogao dovesti do nemogućnosti inhibitora da inhibira aktivnost uPA. Stoga je napravljen dodatni eksperiment s tiplaxtininom, inhibitorom PAI-1. On nije smanjio

bazalnu aktivnost uPA niti imao utjecaja na povećanje aktivnosti uzrokovane thapsigarginom, ali je smanjio aktivnost uPA inducirane NaS. Ovi bi rezultati mogli ukazati na poremećenu interakciju uPA i PAI-1. Od ostalih tvari koje su modulirale aktivnost uPA, ECGC je smanjio ekspresiju uPA te bi se tako moglo objasniti smanjenje aktivnosti uPA. S druge strane, povećanje aktivnosti uPA kod tretmana gemcitabinom i MNNG je moguće posljedica smanjenja ekspresije PAI-1 (rezultati kolega iz laboratorija). Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, na razini RNA, nije bilo promjena ekspresije uPA, dok je samo NaS inducirao povećanje ekspresije PAI-1. Kod ekspresije uPAR nije bilo promjene. Na razini proteina, dok je kod tretmana NaS ekspresija uPA bila vrlo niska, thapsigargin je povećao njenu ekspresiju. Međutim, i kod stanica tretiranih NaS i onih thapsigarginom došlo je do povećanja razine PAI-1, u odnosu na kontrolu, te bi se smanjenje aktivnosti uPA moglo protumačiti kao posljedica povećanja inhibicije. Zaključno, tretman NaS i thapsigarginom izazvao je stres ER kod stanica A1235 i MDA MB-231 i izazvao promjene u aktivnosti uPA. Rezultati ukazuju da je mehanizam regulacije sustava uPA stanično specifičan. Kod glioblastomskih stanica pokazana je ovisnost sustava o pojedinim stepenicama odgovora na ERS. Kod stanica MDA MB-231 regulacija je posljedica složenih odnosa signalnih puteva, moguće inhibicije translacije koja mijenja sastav sekretoma, te direktna regulacija aktivnosti uPA ERS nije utvrđena.

Pored uloge uPA u aktivaciji plazminogena i degradaciji ECM, procesima koji su direktno povezani s procesima invazije, sustav uPA može biti uključen u procese proliferacije, migracije i adhezije, putem složenih interakcija između uPA, PAI-1, uPAR, vitronektina, te plazmina i plazminogena (De Lorenzi i sur., 2016.). Stoga su procesi migracije, invazije i proliferacije istraženi i kod stanica izloženih ERS.

Procesi invazije mogu biti direktno povezani s djelovanjem plazmina i razgradnjom ECM, te aktivnošću uPA, koja može i, posredstvom plazmina, aktivirati metaloproteinaze. Eksperimenti su pokazali da je u uvjetima stresa izazvanog thapsigarginom došlo do inhibicije invazije kod stanica A1235 i MDA MB-231 (kod kojih nije dosegla značajnost), dok tretman NaS nije bitno utjecao na taj proces. Može se zaključiti da povećanje aktivnosti uPA nije povećalo invaziju kod stanica A1235. Proces invazije može biti i neovisan o uPA i biti povezan sa sekrecijom metaloproteinaza te nizom drugih molekula, te biti ovisan o specifičnostima staničnog tipa. Odgovor na ERS utječe na sintezu i sekreciju niza molekula, te moguće inhibira procese invazije. Također, istraživanje povećane ekspresije uPA kod glioblastomskih stanica A1235 u bazalnim uvjetima uzgoja nije povećao staničnu invaziju, iako je taj proces bio povećan kod stanica HEK293 koje inače imaju slabu ekspresiju sustava uPA (Culej Bošnjak i sur., 2025.).

S druge strane, mnogobrojna su istraživanja pokazala da je sustav uPA uključen u procese metastaziranja i invazivnog rasta tumora. Pokazano je da uPA vezan za uPAR regulira ekspresiju pojedinih molekula vezanih za invaziju, poput molekula EMPPRIN (engl. *extracellular matrix metalloproteinases inducer*) i enolaze (Ferraris i sur., 2014.). Kod nekih je tumorskih stanica povećanje ekspresije PAI-1 smanjilo pokretljivost i invaziju kroz ECM koji je sadržavao laminin i kolagen, ali nije invaziju kroz trodimenzionalni model živčanog tkiva, ukazujući i na ulogu sastava ECM (Ghosh i Vaughan, 2012.). Inače, ekspresija uPA, ali i PAI-1 pokazala je povezanost s metastaziranjem i agresivnošću tumora, kao što su tumori dojke, pluća, jajnika, u eksperimentima *in vitro* i *in vivo* (Duffy i sur., 1998.; Gandhari i sur., 2006.; Holst-Hansen i sur., 1996.; Jänicke i sur., 2001.; Minaei i sur., 2022.; Nagamine i sur., 2005.; Ossowski i sur., 1991.). Dok procesi invazije uključuju razgradnju ECM, migracija obuhvaća stanično pokretanje, koje može biti ameboidno i neameboidno, a povezana je s procesima adhezije i odljepljivanja s površine, te također uključuje velik broj interakcija između različitih molekula. Kod staničnih linija izloženih ERS migracija je bila inhibirana, i kod stanica A1235 s povećanom aktivnosti uPA, i kod stanica MDA MB-231 sa smanjenom aktivnošću. Ovi bi se rezultati mogli protumačiti u kontekstu staničnog odgovora na ERS kojim se smanjuje ekspresija niza gena, moguće i membranskih molekula uključenih u migraciju. Slična su istraživanja kod stanica A1235 u bazalnim i uvjetima tretiranja koji su povećavali ekspresiju urokinaze također pokazali da stanice nisu povećale migraciju (Culej Bošnjak i sur., 2025.; Horvat i sur., 2019.). S druge strane, povećanje ekspresije PAI-1 i uPAR kod stanica HEK293 je smanjilo migraciju (Culej Bošnjak i sur., 2025.). Kako su stanice MDA MB-231 pod stresom ER imale povećanu ekspresiju PAI-1, moguće da su ti procesi inhibirali migraciju.

Analiza migracije stanica u kulturi u kontekstu uPA pokazala je važnost ekspresije uPAR te njegovih interakcija s uPA, PAI-1 i vitronektinom. PAI-1 je djelovao antagonistički na staničnu adheziju, ali u prisustvu uPA je povećao adheziju za vitronektin (De Lorenzi i sur., 2016.). Vezanje uPA te kompleksa uPA-PAI-1 za uPAR omogućuje aktivaciju različitih signalnih puteva, ovisno o kontekstu. Tako je npr. ekspresija uPAR kod stanica HEK293 utjecala na tip migracije, iako nije došlo do promjene stope migracije (Margheri i sur., 2014.). Aktivacija uPAR vezanjem liganada bila je povezana, u nekim stanicama, s aktivacijom puteva MAP, kao i pojedinih Rho kinaza, uključenih u regulaciju aktinskog citoskeleta (Kjøller, 2002.). Kod stanica karcinoma dojke otkrivena je promjena tzv. mikrotentakula kao posljedica promjene koncentracije kalcija u stanicama. Mikrotentakuli su specifične izbočine koje nastaju u mikrookruženjima poput krvožilnog ili limfnog sustava kada sile koju mikrotubuli vrše prema

van nadmašuju unutarnju napetost aktina. Njihova prisutnost na površini cirkulirajućih tumorskih stanica potiče ponovno prijanjanje na endotelne stanice, što ukazuje na njihovu ulogu u metastaziranju. Thapsigargin povećava razinu kalcija u citoplazmi, što vodi u smanjenje formiranja mikrotentakula u stanicama, a time moguće i smanjenja migracije (Chang i sur., 2023.).

Analiza proliferacije stanica izloženih ERS pokazala je da dolazi do značajne inhibicije, koja se povećava s duljinom izlaganja stresu. Ovi su rezultati logična posljedica inhibicije sinteze proteina i nehomeostatskih uvjeta koji inhibiraju proliferaciju. Dugotrajno izlaganje ERS dovodi do apoptoze (Zhang i sur., 2024.). Signalni putevi koji se aktiviraju ERS uključuju nizvodne puteva MAP kinaza (kinazu ASK I JNK), a kod nekih je stanica nađen porast proapoptotske molekule NOXA (Neill i Masson, 2023.; Yoshino i sur., 2017.; Zhang i sur., 2024.). Promatranjem se moglo zaključiti da je nakon dvodnevnog izlaganja stanica A1235 vrlo malen broj ostao vijabilan, te da su te stanice, usprkos snažnom odgovoru na ERS i kapacitetu podnošenja stresa zbog količine molekula odgovora koje su eksprimirale u bazalnom stanju, bile neotporne na dugotrajan stres. Sposobnost proliferacije je također opadala srazmjerno koncentraciji thapsigargina, tj. veličini ERS. Sličan je bio odgovor stanica A1235 i MDA MB-231 na tretman NaS (Madunić i sur., 2017.; Matulić i Brdar, 2002.). Sustav uPA također može utjecati na procese proliferacije. Kod stanica A1235 koje su povećano eksprimirale PAI-1, u bazalnim uvjetima, primijećena je veća stopa proliferacije, dok je kod stanica s povećanom ekspresijom uPA i uPAR bila smanjena (Culej Bošnjak i sur., 2025.). Slična je pojava prisutna i kod nekih tumora *in vivo* koji su kod povećane ekspresije PAI-1 bili agresivniji i pojačano progredirali. Takve su pojave opažene npr. kod tumora mokraćnog mjehura i želuca (Furuya i sur., 2022.; Gomes-Giacoaia i sur., 2013.). Utjecaj cijelog sustava na proliferaciju ovisi o staničnom tipu i ekspresiji pojedinih elemenata sustava, u prvom redu prisustvu uPAR koji može vezati uPA ili nakon vezanja uPA i PAI-1 bude internaliziran i recikliran. Većina je eksperimenata pokazala da utišavanje uPA ili uPAR smanjuje proliferaciju, a u nekim je slučajevima ishod ovisio o usporednoj aktivaciji puta EGF-EGFR (Gilder i sur., 2018.; Kozlova i sur., 2016.). Međutim, utjecaj sustava uPA na proliferaciju ovisio je i o tipu stanica te različitim modelnim sustavima *in vivo* i *in vitro* (Holst-Hansen i sur., 1996.; Jo i sur., 2005.; Margheri i sur., 2014.). Zaključno, odgovor na ERS je modulirao ekspresiju i aktivnost sustava uPA na način ovisan o tipu stanica, ali je inhibirao staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju, bez obzira na promjene aktivnosti uPA.

7. ZAKLJUČAK

ERS, induciran thapsigarginom, može modulirati ekstracelularnu aktivnost uPA u tumorskim staničnim linijama, pri čemu je učinak specifičan za pojedinu staničnu liniju. Stanična linija glioblastoma A1235 pokazuje porast aktivnosti, dok stanična linija karcinoma dojke MDA-MB-231 i neuroglioma H4, smanjuje aktivnost uPA.

Stanična linija glioblastoma A1235 pokazala je povećanje aktivnosti uPA nakon tretmana NaS, MNNG-om i gemcitabinom. Stanična linija karcinoma dojke MDA-MB-231 smanjila je aktivnost uPA nakon tretmana NaS i kod nižih koncentracija gemcitabina.

Kod stanične linije glioblastoma A1235 analiza ekspresije gena uključenih u odgovor stanica na ERS pokazala je da su thapsigargin i NaS uzrokovali ERS. Tretman stanica A1235 0,5 μ M thapsigarginom je povećao ekspresiju gena za *ATF4*, *ATF3*, *BiP*, *CHOP*, *GDF 15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*. Povećanje ekspresije je potvrđeno na razini proteina za ATF4 i BiP. NaS povećao je ekspresiju gena za *ATF3*, *ATF4*, *BiP*, *CHOP*, *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*. Postojanje ERS potvrđeno je i na razini proteina gdje su detektirane povećane količine proteina ATF4 i BiP.

Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231 pokazano je da thapsigargin i NaS izazivaju odgovor na ERS. Na razini RNA, 0,25 μ M thapsigargin je inducirao ekspresiju gena za *ATF3*, dok je ekspresija većine drugih nizvodnih gena, *BiP*, *CHOP*, *GDF15*, *SQSTM1* i *TRIBB3*, uključujući *ATF4* bila na kontrolnoj razini. NaS je kod ovih stanica izazvao povećanje ekspresije gena za *ATF4*, *ATF3*, *BiP*, *CHOP* i *TRIBB3*. Na razini proteina dektirano je povećanje ATF4 i BiP.

Kod stanične linije glioblastoma A1235 i karcinoma dojke MDA-MB-231, ECGC, inhibitor BiP, smanjio je bazalnu razinu aktivnosti uPA. Kod stanične linije A1235 ECGC je smanjio povećanje aktivnosti uPA izazvano tretmanom NaS i MNNG-om. Kod stanične linije MDA-MB-231 ECGC je dodatno smanjio aktivnost uPA u kombinaciji s NaS i gemcitabinom.

Inhibicija PERK, inhibitorom GSK2656157 kod stanične linije glioblastoma A1235 povećala je bazalnu aktivnost uPA. U kombinaciji s thapsigarginom i NaS, inhibitor PERK je smanjio povećanu aktivnost uPA. Kod stanične linije MDA-MB-231 inhibicija PERK nije utjecala na bazalnu aktivnost uPA; ali je dodatno smanjenjila aktivnost nakon tretmana thapsigarginom i NaS.

Inhibitor GADD34 icerguastat kod stanične linije glioblastoma A1235 smanjio je bazalnu aktivnost uPA, te aktivnost nakon tretmana gemcitabinom. Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, inhibicija GADD34 je smanjila bazalnu aktivnost uPA te povećala aktivnost nakon tretmana s MNNG.

Kod stanične linije glioblastoma A1235, thapsigargin i NaS izazvali su povećanje ekspresije mRNA za gen za *uPA*. Istovremeno, NaS je inducirao ekspresiju gena za *PAI-1*, dok kod tretmana thapsigarginom nije bilo promjene. Također, ekspresija gena za *uPAR* nije bila bitno promijenjena. Na razini proteina povećana je ekspresija uPA u staničnim lizatima, te smanjena ekspresija PAI-1 nakon tretmana thapsigarginom i NaS. Kod stanične linije karcinoma dojke MDA-MB-231, na razini RNA, nije bilo promjena ekspresije gena za *uPA*, dok je NaS inducirao povećanje ekspresije gena za *PAI-1*. Kod ekspresije gena za *uPAR* nije bilo promjene. Na razini proteina, thapsigargin je povećao ekspresiju uPA, a oba agensa povećala ekspresiju PAI-1.

Istraživanje je pokazalo da agensi koji izazivaju ERS moduliraju urokinaznu aktivnost stanica. Promjena aktivnosti bila je stanično specifična i ovisna o unutarstaničnoj signalnoj mreži. Međutim, bez obzira na promjene aktivnosti urokinaze ERS je inhibirao staničnu proliferaciju, migraciju i invaziju.

Odgovor na ERS proces je kojim stanica, nakon stresa, ponovno uspostavlja homeostazu ili, ako to nije moguće, ide u apoptozu. Ti procesi omogućuju normalno funkcioniranje cijelog organizma. S druge strane, tumorske su stanice, već promjenama svog metabolizma, neprestano izložene stresu. Povećanje ERS djelovanjem različitih kemoterapeutika s jedne bi strane moglo omogućiti apoptozu tumorskih stanica, kao dio mehanizma odgovora. S druge strane, neke tumorske stanice mogu povećati otpornost na stres promjenom ekspresije gena i proteina UPR. Ovo je istraživanje pokazalo da glioblastomska stanična linija ima povećanu bazalnu i ekspresiju gena odgovora nakon ERS, što bi potencijalno moglo utjecati na staničnu rezistenciju na kemoterapeutike. Također je ukazalo na moguću aktivaciju promotora gena urokinaznog sustava transkripcijskim faktorima reguliranim odgovorom na ERS.

8. POPIS LITERATURE

Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR, i Ali MMU (2019) Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* 6: 1–12.

Alfano D, Franco P, i Stoppelli MP (2022) Modulation of Cellular Function by the Urokinase Receptor Signalling: A Mechanistic View. *Front. Cell Dev. Biol.* 10: 1–20.

Amann R i Peskar BA (2002) Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 1–9.

Arendsdorf AM, Diedrichs D, i Rutkowski DT (2013) Regulation of the transcriptome by ER stress: Non-canonical mechanisms and physiological consequences. *Front. Genet.* 4: 1–16.

Atkins C, Liu Q, Minthorn E, Zhang SY, Figueroa DJ, Moss K, i sur. (2013) Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 73: 1993–2002.

Axten JM, Romeril SP, Shu A, Ralph J, Medina JR, Feng Y, i sur. (2013) Discovery of GSK2656157: An optimized PERK inhibitor selected for preclinical development. *ACS Med. Chem. Lett.* 4: 964–968.

Baart VM, Houvast RD, de Geus-Oei LF, Quax PHA, Kuppen PJK, Vahrmeijer AL, i sur. (2020) Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. *EJNMMI Res.* 10.

Bastiancich C, Bastiat G, i Lagarce F (2018) Gemcitabine and glioblastoma: challenges and current perspectives. *Drug Discov. Today* 23: 416–423.

De Berardinis RJ i Chandel NS (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2.

Blasi F i Carmeliet P (2002) uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 932–943.

Blasi F i Sidenius N (2010) The urokinase receptor: Focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett.* 584: 1923–1930.

Blasi F, Fazioli F, Resnati M, Sidenius N, Rabbani S, i Degryse B (1997) The urokinase-sensitive region of the urokinase receptor is responsible for its potent chemotactic activity.

Fibrinolysis and Proteolysis 11: 10.

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

Bydoun M, Sterea A, Weaver ICG, Bharadwaj AD, i Waisman DM (2018) A novel mechanism of plasminogen activation in epithelial and mesenchymal cells. *Sci. Rep.* 8: 1–17.

Cannio R, Rennie PS, i Blasi F (1991) A cell-type specific and enhancer-dependent silencer in the regulation of the expression of the human urokinase plasminogen activator gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 2303–2308.

Capasso L, De Masi L, Sirignano C, Maresca V, Basile A, Nebbioso A, i sur. (2025) Epigallocatechin Gallate (EGCG): Pharmacological Properties, Biological Activities and Therapeutic Potential. *Molecules* 30: 1–34.

Chang KT, Thompson KN, Pratt SJP, Ju JA, Lee RM, Mathias TJ, i sur. (2023) Elevation of Cytoplasmic Calcium Suppresses Microtentacle Formation and Function in Breast Tumor Cells. *Cancers (Basel).* 15.

Chen X i Cubillos-Ruiz JR (2021) Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 21: 71–88.

Chen S, Zhang Y, i Zhang D (2015) Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) confers radioresistance through the DNA repair gene, O6-methylguanine DNA-methyltransferase, in breast cancer cells. *Sci. Rep.* 5: 1–12.

Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM, i Piacentini M (2017) Endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, and cancer cell fate. *Front. Oncol.* 7: 1–11.

Culej Bošnjak D, Balent T, Korać P, Antica M, i Matulić M (2025) Urokinase Plasminogen Activation System Modulation in Transformed Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 26: 1–14.

Cunard R (2013) Mammalian Tribbles Homologs at the Crossroads of Endoplasmic Reticulum Stress and Mammalian Target of Rapamycin Pathways. *Scientifica (Cairo).* 2013: 1–17.

D'Orazio D, Besser D, Marksitzer R, Kunz C, Hume DA, Kiefer B, i sur. (1997) Cooperation of two PEA3/AP1 sites in uPA gene induction by TPA and FGF-2. *Gene* 201: 179–187.

Dadey DYA, Kapoor V, Khudanyan A, Thotala D, i Hallahan DE (2018) PERK regulates

glioblastoma sensitivity to ER stress although promoting radiation resistance. *Mol. Cancer Res.* 16: 1447–1453.

Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, i Sarkar FH (2008) Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat. Rev.* 34: 122–136.

Datta PK, Blake MC, i Moses HL (2000) Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor- β -induced physical and functional interactions between Smads and Sp1. *J. Biol. Chem.* 275: 40014–40019.

Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, i Agellon LB (2015a) Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front. Oncol.* 5: 1–9.

Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, i Agellon LB (2015b) Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front. Oncol.* 5: 1–8.

Dufey E, Bravo-San Pedro JM, Eggers C, González-Quiroz M, Urrea H, Sagredo AI, i sur. (2020) Genotoxic stress triggers the activation of IRE1 α -dependent RNA decay to modulate the DNA damage response. *Nat. Commun.* 11: 1–13.

Duffy M (2005) The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Curr. Pharm. Des.* 10: 39–49.

Duffy MJ, Duggan C, Mulcahy HE, McDermott EW, i O'Higgins NJ (1998) Urokinase plasminogen activator: A prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease. *Clin. Chem.* 44: 1177–1183.

Egeblad M, Nakasone ES, i Werb Z (2010) Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 18: 884–901.

Elokda H, Abou-Gharbia M, Hennen JK, McFarlane G, Mugford CP, Krishnamurthy G, i sur. (2004) Tiplaxtinin, a novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: Design, synthesis, and preclinical characterization. *J. Med. Chem.* 47: 3491–3494.

Emmerson PJ, Duffin KL, Chintharlapalli S, i Wu X (2018) GDF15 and Growth Control. *Front. Physiol.* 9: 1–7.

Ferraris GMS, Schulte C, Buttiglione V, De Lorenzi V, Piontini A, Galluzzi M, i sur. (2014) The interaction between uPAR and vitronectin triggers ligand-independent adhesion signalling by integrins . *EMBO J.* 33: 2458–2472.

Furuya H, Sasaki Y, Chen R, Peres R, Hokutan K, Murakami K, i sur. (2022) PAI-1 is a potential transcriptional silencer that supports bladder cancer cell activity. *Sci. Rep.* 12: 1–12.

Gandhari M, Arens N, Majety M, Dorn-Beineke A, i Hildenbrand R (2006) Urokinase-type plasminogen activator induces proliferation in breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 28: 1463–1470.

Gao D, Bambang IF, Putti TC, Lee YK, Richardson DR, i Zhang D (2012) ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58 IPK. *Lab. Investig.* 92: 200–213.

Gentz SHL, Bertollo CM, Souza-Fagundes EM, i Da Silva AM (2013) Implication of eIF2 α kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate. *J. Pharm. Pharmacol.* 65: 430–440.

Ghosh AK i Vaughan DE (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 227: 493–507.

Gilder AS, Natali L, Van Dyk DM, Zalfa C, Banki MA, Pizzo DP, i sur. (2018) The Urokinase Receptor Induces a Mesenchymal Gene Expression Signature in Glioblastoma Cells and Promotes Tumor Cell Survival in Neurospheres. *Sci. Rep.* 8: 1–16.

Gomes-Giacoaia E, Miyake M, Goodison S, i Rosser CJ (2013) Targeting plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenesis and tumor growth in a human cancer xenograft model. *Mol. Cancer Ther.* 12: 2697–2708.

Green MR i Sambrook J (2020) Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2020: 525–532.

Heinrich R, Aronheim A, Cheng YC, i Perlman I (2024) Editorial: ATF3: a crucial stress-responsive gene of glia and neurons in CNS. *Front. Mol. Neurosci.* 17: 3–5.

Hetz C i Saxena S (2017) ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurol.* 13: 477–491.

Higgins PJ, Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, i sur. (2011) PAI-1: An integrator of cell signaling and migration. *Int. J. Cell Biol.* 2011.

Holst-Hansen C, Johannessen B, Høyer-Hansen G, Rømer J, Ellis V, i Brünner N (1996) Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clin. Exp. Metastasis* 14: 297–307.

- Hong OY, Noh EM, Jang HY, Lee YR, Lee BK, Jung SH, i sur. (2017) Epigallocatechin gallate inhibits the growth of MDA-MB-231 breast cancer cells via inactivation of the β -Catenin signaling pathway. *Oncol. Lett.* 14: 441–446.
- Horvat L, Grubar M, Madunic J, Antica M, i Matulic M (2019a) Inhibition of PARP activity does not affect the differentiation processes caused by retinoic acid in SH-SY5Y cells. *Mol. Exp. Biol. Med.* 2: 38–43.
- Horvat L, Madunić J, Grubar M, Antica M, i Matulić M (2019b) Induction of urokinase activity by retinoic acid in two cell lines of neuronal origin. *Biomedicines* 7.
- Hwang J i Qi L (2018) Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem. Sci.* 43: 593–605.
- Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, i sur. (2001) Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 913–920.
- Jaskulska A, Janecka AE, i Gach-Janczak K (2021) Thapsigargin—from traditional medicine to anticancer drug. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 1–12.
- Jo M, Thomas KS, Marozkina N, Amin TJ, Silva CM, Parsons SJ, i sur. (2005) Dynamic assembly of the urokinase-type plasminogen activator signaling receptor complex determines the mitogenic activity of urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 280: 17449–17457.
- Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, i Yang L V. (2014) In vitro cell migration and invasion assays. *J. Vis. Exp.* 1–8.
- Kastrati I, Joosten SEP, Semina SE, Alejo LH, Brovkovich SD, Stender JD, i sur. (2020) The NF- κ B pathway promotes tamoxifen tolerance and disease recurrence in estrogen receptor-positive breast cancers. *Mol. Cancer Res.* 18: 1018–1027.
- Kjøller L (2002) The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol. Chem.* 383: 5–19.
- Koelbl H, Tatra G, i Kirchheimer J (1989) Influence of delivery on plasminogen activator inhibitor activity. *J. Perinat. Med.* 17: 107–111.

- Kozlova N, Samoylenko A, Drobot L, i Kietzmann T (2016) Urokinase is a negative modulator of Egf-dependent proliferation and motility in the two breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol. Carcinog.* 55: 170–181.
- Level P, Lung BY, i Cells E (2013) Regulation of Urokinase Expression At the. 51: 205–213.
- Liang D, Khoonkari M, Avril T, Chevet E, i Krut FAE (2021) The unfolded protein response as regulator of cancer stemness and differentiation: Mechanisms and implications for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* 192: 114737.
- Lin L, Tang CS, i Yuan WJ (2003) Endoplasmic reticulum stress. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 34: 333–335.
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, i sur. (2016) P62 Links the Autophagy Pathway and the Ubiquitin-Proteasome System Upon Ubiquitinated Protein Degradation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 21: 1–14.
- Lorenz NI, Sittig ACM, Urban H, Luger AL, Engel AL, Münch C, i sur. (2021) Activating transcription factor 4 mediates adaptation of human glioblastoma cells to hypoxia and temozolomide. *Sci. Rep.* 11: 1–11.
- De Lorenzi V, Sarra Ferraris GM, Madsen JB, Lupia M, Andreasen PA, i Sidenius N (2016) Urokinase links plasminogen activation and cell adhesion by cleavage of the RGD motif in vitronectin . *EMBO Rep.* 17: 982–998.
- Madunić J, Horvat L, Majstorović I, Jodłowska I, Antica M, i Matulić M (2017) Sodium Salicylate Inhibits Urokinase Activity in MDA MB-231 Breast Cancer Cells. *Clin. Breast Cancer* 17: 629–637.
- Madunic Josip (2018) The Urokinase Plasminogen Activator System in Human Cancers : An Overview of Its Prognostic and Predictive Role. *Thromb. Haemostasis.* 118: 2020–2036.
- Magg V, Manetto A, Kopp K, Wu CC, Naghizadeh M, Lindner D, i sur. (2024) Turnover of PPP1R15A mRNA encoding GADD34 controls responsiveness and adaptation to cellular stress. *Cell Rep.* 43: 114069.
- Mahmood N, Mihalcioiu C, i Rabbani SA (2018) Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): Diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front. Oncol.* 8.

Margheri F, Luciani C, Taddei ML, Giannoni E, Laurenzana A, Biagioni A, i sur. (2014) The receptor for urokinase-plasminogen activator (uPAR) controls plasticity of cancer cell movement in mesenchymal and amoeboid migration style. *Oncotarget* 5: 1538–1553.

Martinez-Soto JC, Landeras J, Mollá M, Mondejar I, Nicolás M, Fernández-Olmedilla L, i sur. (2018) Total urokinase-type plasminogen activator (uPA) levels in seminal plasma are associated with positive assisted reproductive technology outcomes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 35: 1091–1101.

Martinotti S i Ranzato E (2020) Scratch wound healing assay. *Methods Mol. Biol.* 2109: 225–229.

Matulić M i Brdar B (2002) Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor induction by etoposide in a glioblastoma cell strain. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 1–7.

Mcmahon BJ i Kwaan HC (2015) Markers for Cancer. 145–156.

Minaei E, Mueller SA, Ashford B, Thind AS, Mitchell J, Perry JR, i sur. (2022) Cancer Progression Gene Expression Profiling Identifies the Urokinase Plasminogen Activator Receptor as a Biomarker of Metastasis in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* 12: 1–16.

Morgan AJ i Jacob R (1994) Ionomycin enhances Ca^{2+} influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* 300: 665–672.

Mügge FLB i Silva AM (2017) Aspirin metabolite sodium salicylate selectively inhibits transcriptional activity of ATF6 α and downstream target genes. *Sci. Rep.* 7: 1–12.

Nagamine BS i Dolan BP (2021) The Unfolded Protein Response reveals eIF2 α phosphorylation as a critical factor for direct MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* 206: 93.05-93.05.

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

Namba T, Chu K, Kodama R, Byun S, Yoon KW, Hiraki M, i sur. (2015) Loss of p53 enhances the function of the endoplasmic reticulum through activation of the IRE1 α /XBP1 pathway. *Oncotarget* 6: 19990–20001.

Neill G i Masson GR (2023) A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response. *Front. Mol. Neurosci.* 16: 1–14.

O'brien J, Hayder H, i Peng C (2016) Automated quantification and analysis of cell counting procedures using imagej plugins. *J. Vis. Exp.* 2016: 1–10.

Osowski CM i Urano F (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 490: 71–92.

Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, i Blasi F (1991) In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: Effect on tumor cell invasion. *J. Cell Biol.* 115: 1107–1112.

Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Lujic M, Samali A, i Gorman AM (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.* 17: 1374–1395.

Park JS, Oh SY, Lee DH, Lee YS, Sung SH, Ji HW, i sur. (2016) p62/SQSTM1 is required for the protection against endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death. *Free Radic. Res.* 50: 1408–1421.

Pecoraro A, Pagano M, Russo G, i Russo A (2020) Role of autophagy in cancer cell response to nucleolar and endoplasmic reticulum stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1–21.

Pyrko P, Schöntha AH, Hofman FM, Chen TC, i Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* 67: 9809–9816.

Ramirez MU, Hernandez SR, Soto-Pantoja DR, i Cook KL (2020) Endoplasmic reticulum stress pathway, the unfolded protein response, modulates immune function in the tumor microenvironment to impact tumor progression and therapeutic response. *Int. J. Mol. Sci.* 21.

Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, i Levin ER (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: Implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.* 16: 100–115.

Roller C i Maddalo D (2013) The molecular chaperone GRP78/BiP in the development of chemoresistance: Mechanism and possible treatment. *Front. Pharmacol.* 4 FEB: 1–5.

Schröder M i Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 569: 29–63.

Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399–

408.

Senft D i Ronai ZA (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem. Sci.* 40: 141–148.

Shin S, Kim MK, Jung W, i Chong Y (2018) (–)-Epigallocatechin gallate derivatives reduce the expression of both urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 to inhibit migration, adhesion, and invasion of MDA-MB-231 cells. *Phyther. Res.* 32: 2086–2096.

Silva AM, Wang D, Komar AA, Castilho BA, i Williams BRG (2007) Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 282: 10164–10171.

Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, i Muñoz-Camargo C (2020) An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One* 15: 1–14.

Talib WH, Awajan D, Alqudah A, Alsawwaf R, Althunibat R, Abu AlRoos M, i sur. (2024) Targeting Cancer Hallmarks with Epigallocatechin Gallate (EGCG): Mechanistic Basis and Therapeutic Targets. *Molecules* 29: 1–25.

Tegeder I, Pfeilschifter J, i Geisslinger G (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* 15: 2057–2072.

Ulisce S, Baldini E, Sorrenti S, i D’Armiento M (2009) The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 9: 32–71.

Vallabhaneni KC, Tkachuk S, Kiyani Y, Shushakova N, Haller H, Dumler I, i sur. (2011) Urokinase receptor mediates mobilization, migration, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Cardiovasc. Res.* 90: 113–121.

Vihervaara A, Duarte FM, i Lis JT (2018) Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat. Rev. Genet.* 19: 385–397.

Wang L, Zhang Y, Wang W, Zhu Y, Chen Y, i 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: 1–18.

Watkins S i Sontheimer H (2012) Unique biology of gliomas: Challenges and opportunities. *Trends Neurosci.* 35: 546–556.

Wu J i Kaufman RJ (2006) From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ.* 13: 374–384.

Yepes M (2020) Urokinase-type plasminogen activator is a modulator of synaptic plasticity in the central nervous system: Implications for neurorepair in the ischemic brain. *Neural Regen. Res.* 15: 620–624.

Yoshino H, Kumai Y, i Kashiwakura I (2017) Effects of endoplasmic reticulum stress on apoptosis induction in radioresistant macrophages. *Mol. Med. Rep.* 15: 2867–2872.

Zhang HP, Jiang RY, Zhu JY, Sun KN, Huang Y, Zhou HH, i sur. (2024a) PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: an important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer* 31: 539–551.

Zhang W, Shi Y, Oyang L, Cui S, Li S, Li J, i sur. (2024b) Endoplasmic reticulum stress—a key guardian in cancer. *Cell Death Discov.* 10: 1–16.

9. ŽIVOTOPIS

Diana Culej Bošnjak diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine. Od 2018. do 2019. godine zaposlena je kao liječnica u Zavodu za hitnu medicinu Grada Zagreba. Specijalizaciju iz ginekologije i opstetricije započela je 2019. godine u Kliničkoj bolnici Merkur. U sklopu specijalizacije usavršavala se u klinikama u Hrvatskoj, Sloveniji i Austriji, a specijalistički ispit iz ginekologije i opstetricije položila je 2024. godine. Njeno glavno područje interesa usmjereno je na cjelovitu zdravstvenu skrb žena, s naglaskom na minimalno invazivnu ginekologiju i ultrazvučnu dijagnostiku, dok je područje njezinog znanstvenog zanimanja mehanizam nastanka, razvoja i progresije tumora. Pohađala je više međunarodnih i domaćih tečajeva i kongresa. Koautor je jednog originalnog znanstvenog rada i 10 preglednih radova.