

Određivanje promjene u ekspresiji gena CAIX u tumorskim stanicama izloženim derivatima kumarina

Kuzmić, Matija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:413015>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Matija Kuzmić

**ODREĐIVANJE PROMJENE U
EKSPRESIJI GENA CAIX U
TUMORSKIM STANICAMA
IZLOŽENIM DERIVATIMA KUMARINA**

Završni rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Matija Kuzmić

**ODREĐIVANJE PROMJENE U
EKSPRESIJI GENA CAIX U
TUMORSKIM STANICAMA
IZLOŽENIM DERIVATIMA KUMARINA**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za kulturu tkiva Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Teuta Opačak-Bernardi

Rad sadržava: 24 lista, 4 jednadžbe i 4 slike.

Zahvala

Ovom prilikom želim zahvaliti svojoj obitelji što me godinama podupirala u školovanju. Također, svim profesorima od osnovne škole pa do danas. Posebno zahvaljujem doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi koja mi je omogućila izradu završnog rada u području znanosti koje me izrazito zanima i što mi je proširila interese za biokemiju.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Tumori	1
1.1.1. Karcinom debelog crijeva	1
1.1.2 Adenokarcinom grlića maternice.....	1
1.2 Karboanhidraza IX.....	1
1.2.1 Hipoksija tumora	1
1.2.2 Karboanhidraza.....	2
1.2.3 Regulacija pH uz pomoć CAIX.....	3
1.2.4 Regulacija CAIX pomoću HIF-1 regulacijskog puta	4
1.3 Kumarinski spojevi	5
1.3.1 Kumarin	5
2. Hipoteza	6
3. Ciljevi.....	7
4. Materijali i metode.....	8
4.1 Materijali	8
4.1.1. Stanične linije	8
4.1.2. Ispitivani spojevi.....	8
4.1.3. Kemikalije	8
4.2 Metode.....	9
4.2.1. Kultivacija	9
4.2.2. Izolacija RNA.....	9
4.2.3 qRT-PCR.....	10
4.2.4. Analiza podataka	10
5. Rezultati	13
5.1 Određivanje promjene u ekspresiji gena ugljične anhidraze (CAIX) u stanicama tumora debelog crijeva (Caco-2).	13
5.2 Određivanje promjene u ekspresiji gena ugljične anhidraze (CAIX) u stanicama adenokarcinoma grlića maternice (HeLa).	14
6. Rasprava.....	16
7. Zaključci	18
8. Sažetak	19
9. Summary	20
10. Reference	21
11. Životopis	24

Popis kratica:

CAIX (engl. *carbonic anhydrase IX*) karboandihraza IX

CA (eng. *catalytic domain*) katalitička podjedinica

CARP (engl. *carbonic anhydrase related proteines*) proteini srodni karboanhidrazama

CDK1 (engl. *cyclin-dependent kinase 1*) ciklin ovisna kinaza 1

DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) Dulbeccov modificirani Eagleov medij

DMSO (engl. *dimethyl-sulfoxide*) dimetil-sulfoksid

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) etilendiamintetraoctena kiselina

ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*)

HCCA (engl. *coumarin-3-carboxylic acid*) kumarin-3-karboksilna kiselina

HIF (engl. *hypoxia-inducible factors*) faktori transkripcije koji induciraju hipoksiju

HRE (engl. *hypoxia responsive element*) element odgovora na hipoksiju

IC (engl. *intracellular tail*) intracelularni podjedinica

MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) mitogenom aktivirane proteinske kinaze

NFκB (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) nuklearni faktor –
κB

PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) fosfatom puferirana otopina soli

PG (engl. *proteoglycan-like domain*) proteoglikanska podjedinica

PHD (engl. *prolyl-4-hydroxylase domain*) prolil hidroksilaza

TM (engl. *transmembrane domain*) transmembranska podjedinica

VPA (engl. *valproic acid*) valproična kiselina

qRT-PCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*) kvantitativna lančana reakcija
polimerazom

1. Uvod

1.1 Tumori

U današnje vrijeme tumori predstavljaju jedan od najvećih izazova za medicinu. Zbog svoje izrazite agresivnosti i težine liječenja, uzrok su visokoj stopi smrtnosti u svijetu. Prema podacima Zavoda za javno zdravstvo, 2016. godine u Hrvatskoj je zabilježeno 13969 smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomima. Ukupan broj novodijagnosticiranih slučajeva iznosio je 23 650 (1).

1.1.1. Karcinom debelog crijeva

Karcinom debelog crijeva smatra se jednim od najčešćih uzročnika smrti u svijetu s incidencijom od 9,7 % ukupne incidencije karcinoma. Čimbenici poput genetske predispozicije, tjelesne mase, pušenja i alkoholizma, smatraju se rizičnima za razvoj bolesti. Genetska predispozicija za karcinom debelog crijeva povećava rizik od nastanka bolesti za 10 % do 20 % (2).

1.1.2 Adenokarcinom grlića maternice

Rak grlića maternice drugi je najčešći karcinom žena s izrazito visokom incidencijom (< 80 %) u svijetu. 10 – 25 % svih cervikalnih karcinoma su adenokarcinomi (3). Primarno se liječe kirurškim zahvatom ili kombinacijom kemoterapije i radioterapije u ranoj fazi karcinoma. Kasnije faze razvoja karcinoma liječe se simptomatski (4).

1.2 Karboanhidraza IX

1.2.1 Hipoksija tumora

Preživljenje tumorskih stanica ovisi o njihovoj uspješnoj prilagodbi na nepovoljne uvjete. Zbog ubrzane proliferacije tumorskih stanica dolazi do neravnoteže između brzine tumorskog rasta i kapaciteta lokalnog kapilarnog sustava, što u konačnici rezultira smanjenom opskrbom kisika,

odnosno hipoksijom. Tumorske su stanice, kao odgovor na promjenu mikrookoliša u kojem se nalaze, razvile sposobnost anaerobne glikolize radi stvaranja dovoljne količine energije potrebne za proliferaciju stanica. Konačni su produkti anaerobne glikolize maslačna kiselina i ugljikov dioksid koji povisuje vrijednosti okolišnog pH i time pospješuje razvoj i posljedice hipoksije (5).

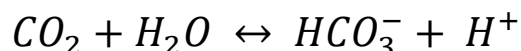
Hipoksija aktivira niz regulatornih puteva kako bi se osigurao optimalan odgovor stanice na hipoksične okolišne uvjete i povratak u stanje ravnoteže. Hipoksija inducirajući faktor (HIF) ključni je transkripcijski čimbenik u regulaciji staničnog odgovora u uvjetima smanjene koncentracije kisika. Osim HIF-a, identificirani su i drugi signalni putevi i pridruženi ključni regulatorni čimbenici poput ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*) i NFkB (engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*). Ti transkripcijski čimbenici reguliraju kaskadnu aktivaciju velikog broja staničnih proteina koji sudjeluju u nizu reakcija povezanih s proliferacijom, apoptozom, metabolizmom stanice i sl. Oni nisu izravno povezani s regulacijom acido-bazne ravnoteže, ali u određenim uvjetima aktivacija signalne kaskade uvjetuje aktivaciju HIF-a (6).

1.2.2 Karboanhidraza

Karboanhidraze su metaloenzimi koji sudjeluju u nizu procesa u organizmu poput respiracije, regulacije acido-bazne ravnoteže, stvaranju likvora, želučane kiseline te razvoju tumorskih stanica (7). Široko su rasprostranjeni u prirodi te ih je moguće naći u bakterijama, biljkama i životinjama. Za sada je otkriveno 16 izoenzima karboanhidraze (CA) koje možemo podijeliti u nekoliko skupina. Karboanhidraza CA1-3, CA7 i CA13 pripadaju skupini citosolnih enzima. Osim u citosolu, razlikujemo nekoliko membranskih oblika CA kao što su CA4, CA9, CA12, CA14 i CA15. Enzimi CAVA i CAVB pripadaju skupini mitohondrijskih karboanhidraza, dok se izoenzim CA6 izlučuje u mlijeko i slinu. Posljednjoj skupini karboanhidraza pripadaju CA8, CA10 i CA11, koji su nekatalitički enzimi, također poznati pod nazivom CARP (engl. *carbonic anhydrase related proteins*) (8).

Karboanhidraza IX je transmembranski protein koji katalizira reverzibilnu reakciju hidratacije ugljikovog dioksida u ugljičnu kiselinu (Jednadžba 1.). Visoko je aktivan enzim prilikom proliferacije tumorskih stanica. Svojim djelovanjem omogućuje regulaciju acido-bazne ravnoteže koja se mijenja prilikom povećane proliferacije stanica. U tim uvjetima glavni metabolički put je anaerobna glikoliza. Najnovija istraživanja pokazuju da je karboanhidraza IX dobra ciljna molekula za terapijsku primjenu zbog visoke aktivnosti u nepovoljnim uvjetima

poput hipoksije (5, 7). Za razliku od drugih izoenzima CA, CAIX se smatra najaktivnijim oblikom. Sastoji se od nekoliko podjedinica. Većina karboanhidraza je građena od katalitičke podjedinice (CA), transmembranske podjedinice (TM) i intracelularne podjedinice (IC). Enzim CAIX također sadrži PG podjedinicu (engl. *N-terminal proteoglycan-like domain*). Smatra se da PG podjedinica pospješuje djelovanje CAIX pri visokom pH (8).



Jednadžba 1. Reakcija hidratacije ugljikovog dioksida u ugljičnu kiselinu

1.2.3 Regulacija pH uz pomoć CAIX

pH gradijent normalnih stanica uvjetuje normalne metaboličke, transportne i regulatorne procese. Taj je gradijent diferencijal između više bazičnog okoliša ekstracelularnog matriksa ($pH_e \geq 7,3$) i neznatno kiselijeg citosola ($pH_i = 7,2$). Ulaskom stanica u stanje hipoksije dolazi do pomicanja tog gradijenta. Naime, pH ekstracelularnog matriksa snižava se na 6,5 – 7,2, dok pH celularnog matriksa iznosi $pH_i \geq 7,2$. Takva promjena gradijenta omogućuje remodeliranje ekstracelularnog matriksa te ograničava učinak puferiranja ovisnog o HCO_3^- , što u konačnici dovodi do diseminacije stanica, izbjegavanja apoptoze, odnosno do intenzivne proliferacije, metastaziranja i metaboličke prilagodbe stanica. Promjena staničnog pH potiče glikolizu i inhibira glukoneogenezu. Također stimulira aktivaciju nekolicine glikolitičkih enzima te laktat dehidrogenaze (LDH) koja je potrebna za pojačanu glikolitičku aktivnost stanica. Osim pojačane glikolitičke aktivnosti, povišen će pH_i dovesti do aktivacije aktin vezujućih proteina, te u samoj konačnici do pojačane proliferacije (9).

Takav karakterističan pH u tumorima omogućuje pojačanje aktivnosti ciklin ovisne kinaze 1 (CDK1), što pospješuje učinkovitost puta mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) koji omogućuje brži prolazak stanice kroz G2/M do S faze staničnog ciklusa. Tumorske stanice u S fazi manje su osjetljive na kemoterapeutike i radijacijske terapije i time im je omogućeno preživljenje (9).

Uzrok takve nespecifične promjene u pH gradijentu je aktivnost karbonanhidraze. Zbog velike količine CO_2 prisutnog u ekstracelularnom prostoru, CA hidratacijom CO_2 stvara HCO_3^- i protone. Bikarbonatni ioni putuju u stanični matriks preko transportera te u matriksu reagiraju

s protonima nastalim u procesu glikolize. Produkt dobiven reakcijom bikarbonatnog iona i slobodnih protona citosola je CO_2 koji se preko membrane iznosi nazad u ekstracelularni matriks. Takav proces regulacije dovodi do sniženja pH ekstracelularnog matriksa zbog razine protona dobivenih reakcijom hidratacije CA te povišenjem pH citosola obrnutom reakcijom (9).

1.2.4 Regulacija CAIX pomoću HIF-1 regulacijskog puta

Regulacija ekspresije karboanhidraze IX (CAIX) provodi se na razini transkripcije. Transkripcijski faktor koji inducira hipoksiju (HIF-1) vezanjem na element odgovora na hipoksiju (HRE) djeluje kao aktivator transkripcije CAIX. Transkripcijski čimbenik HIF-1 je heterodimerni protein koji se sastoji od dvije podjedinice; HIF-1 α , čija je aktivnost regulirana razinom kisika, i podjedinica HIF-1 β , koja je kontinuirano aktivna (10).

U normalnim uvjetima dolazi do normalne proizvodnje HIF-1 α , ali se protein brzo razgrađuje u proteosomu. Pri tome, važnu ulogu u održavanju stanične homeostaze HIF-1 α imaju enzimi prolil hidroksilaza (PHD) i faktor inhibicije HIF-1 α (FIH-1). Hidroksiliranjem prolinskih ostataka P402 i P564 HIF-1 α podjedinice, PHD pospješuje ubikvitilaciju i posljedičnu razgradnju HIF-1 u uvjetima normoksije. Istovremeno, FIH-1 hidroksilira asparaginsku jedinicu N803 HIF-1 α podjedinice te time onemogućuje vezanje HIF-1 na koaktivatorski transkripcijski kompleks CBP/p300 i inhibira transkripcijsku aktivnost HIF-1 (6, 11).

U stanju hipoksije zbog nedostatka kisika onemogućena je aktivnost PHD-a i FIH-1, što pospješuje stabilizaciju HIF-1 α . U okviru MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) signalnog puta dolazi do fosforilacije HIF-1 α , što pospješuje translokaciju i lokalizaciju HIF-1 α u jezgru te posljedičnu heterodimerizaciju s transkripcijski trajno aktivnom HIF-1 β podjedinicom (također poznata pod nazivom ARNT, od engl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Na nehidroksilirani N803 ostatak HIF-1 α podjedinice vezat će se CBP/p300, a nastali transkripcijski kompleks CBP/p300/HIF-1 α /ARNT osigurat će inicijaciju genske ekspresije vezanjem za HRE elemente ciljnih gena (6, 12).

1.3 Kumarinski spojevi

1.3.1 Kumarin

Kumarin, također poznat kao 2H-4-benzopyran-2-on, heterociklični je aromatski spoj široko rasprostranjen u prirodi. Prvi puta izoliran je 1822. godine, a sintetiziran 1868. godine. Pripada skupini benzopirona, a sastoji se od benzenskog i α -pironskog prsena (13).

Primjena je kumarina široko rasprostranjena u raznim industrijama. Zbog svoga karakterističnog mirisa, koristi se u industriji parfema kao zaslađivač i fiksativ parfema, pojačivač prirodnih ulja i kao dodatak prehrani u kombinaciji s vanilijom. Neki od njegovih derivata, poput 3,4-dihidroksikumarina i 6-metilkumarina, koriste se u industriji parfema, dok se 7-hidroksikumarin koristi kao florigeni enzimski supstrat. Najbitnijim derivatom smatra se 4-hidroksikumarin koji je prekursor dikumarola i varfarina zbog uloge u metabolizmu vitamina K. Nadalje, aminometil kumarin octena kiselina služi kao fluorescentni obilježivač antitijela (13).

2. Hipoteza

Ekspresija gena za ugljičnu anhidrazu (CAIX) bit će promijenjena u tumorskim stanicama koje su izložene djelovanju kumarina.

3. Ciljevi

Cilj je istraživanja ispitati promjene u ekspresiji gena ugljične anhidraze (CAIX) u stanicama tumora debelog crijeva i stanicama adenokarcinoma grlića maternice *in vitro*.

4. Materijali i metode

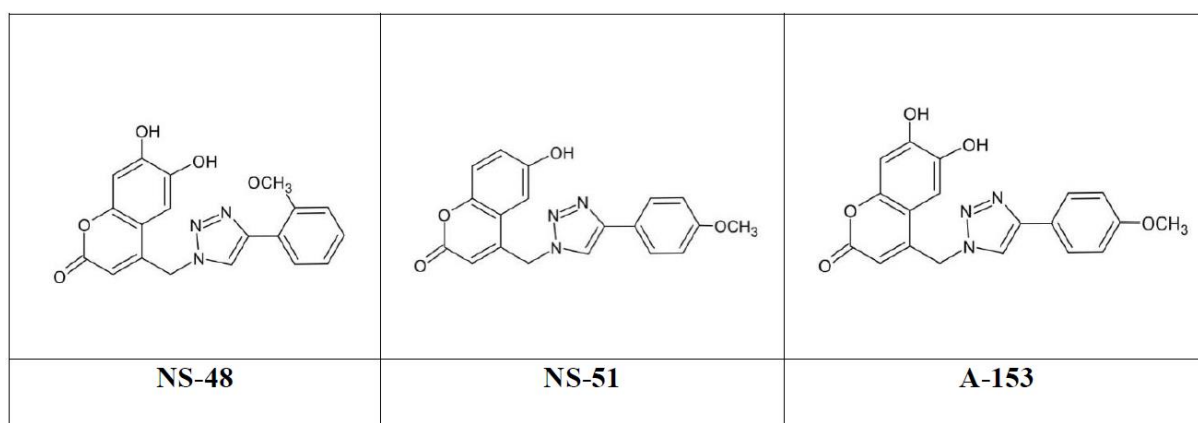
4.1 Materijali

4.1.1. Stanične linije

Stanice korištene u istraživanju su humane stanice adenokarcinoma grlića maternice (HeLa stanična linija) i humane stanice karcinoma debelog crijeva (Caco-2 stanična linija).

4.1.2. Ispitivani spojevi

Spojevi korišteni u istraživanju kumarinski su derivati. Sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu (Slika 1.). U svrhu istraživanja, navedeni spojevi otopljeni su kao *stock* otopine u koncentraciji 1×10^{-2} M. Iz navedenih *stock* otopina pripremljene su radne otopine za primjenu u istraživanju.



Slika 1. Derivati kumarina korišteni u istraživanju.

4.1.3. Kemikalije

- *EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit*, Bio Basic INC. (Ontario, Canada)
- Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) uz dodatak glukoze (4,5 g/L), Capricorn Scientific GmbH (Njemačka), 10 % inaktivirani goveđi serum (FBS), Gibco Invitrogen (Velika Britanija), 2mM L-glutamin, Gibco Invitrogen (Velika Britanija), 1 % Antibiotic/Antimycotic Solution (100 x), Capricorn Scientific GmbH (Njemačka)
- Tripansko plavilo 0,4 %, Lonza, SAD

- 0,25 % tripsin EDTA, Pan Biotech, Njemačka
- Fosfatom puferirana otopina soli (PBS)
- Dimetilsulfoksid (DMSO), Acros Organics, SAD
- *PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit* (Takara Bio Inc)
- *GoTaq® Flexi DNA Polymerase Protocol* (Promega)

4.2 Metode

4.2.1. Kultivacija

Stanice su uzgajane u laboratoriju sa sterilnim kabinetom i laminarnim protokom zraka. Sav pribor i svi reagensi korišteni prilikom kultivacije bili su sterilni kako ne bi došlo do kontaminacije stanica.

HeLa stanice, kao i Caco-2 stanice, uzgajane su na DMEM mediju s dodatkom glukoze (4,5 g/L) L-glutamina, 10 % temperaturno inaktiviranim goveđim serumom i antibiotikom (1 %).

4.2.2. Izolacija RNA

Stanice su nasadene u jažice u koncentraciji od 5×10^6 stanica po jažici. Tretirane su odabranim derivatima u koncentraciji od 10^{-5} M u trajanju 24 sata. Za kontrolu su korištene netretirane stanice. Uzgojene stanice tripsinizirali smo i isprali u PBS-u te premjestili u RNase *free* kivete kako bi ih pripremili za izolaciju. Izolacija je vršena u sterilnom laboratoriju u kojemu su sav pribor, namještaj na kojemu se izvodio pokus i reagensi bili sterilni i prebrisani RNase *free* maramicama kako ne bi došlo do uništenja RNA prilikom izolacije. Izolacija RNA odrađena je pomoću *EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-preps Super Kit* prema protokolu dobivenom od proizvođača.

4.2.3 qRT-PCR

Dobiveni izolat RNA kvantificirali smo pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR). Ukupna RNA prepisana je pomoću *PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit* kita nasumičnim početnicama. Nadalje, qRT-PCR učinjen je na *QuantStudio5* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) uređaju upotrebom kemikalija iz kita *GoTaq® Flexi DNA Polymerase Protocol* na bazi fluorescentne boje i specifičnih početnica za gen *CAIX*. Genska ekspresija *CAIX* normalizirana je u odnosu na ekspresiju gena za β -aktin.

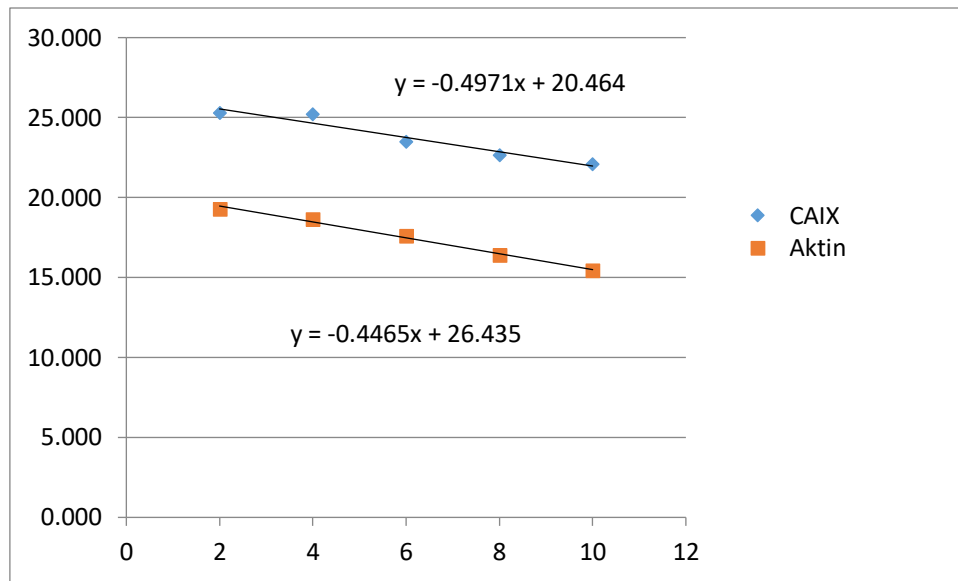
Umnažanje specifičnih genskih odsječaka provedeno u 20 μ l qPCR reakcijske smjese koja je sadržavala 0,2 mM dNTP mješavinu, 3 mM $MgCl_2$, 1,25 U Taq polimeraze, 1 x *Syber Green* boju, 0,5 μ M specifičnih početnica i 1 μ l cDNA kalupa.

Sve qPCR reakcije učinjene su tijekom 40 ponavljajućih ciklusa u sljedećim temperaturnim uvjetima: nakon početne inkubacije u trajanju 2,5 min na 95 °C, slijedila je denaturacija tijekom 30 s na 95 °C, zatim vezanje početnica tijekom 1,5 minute na 57 °C i konačna elongacija tijekom 1 min na 72 °C.

Na temelju zabilježenih vrijednosti fluorescencije navedenih uzoraka, dobivene su C_T (engl. *threshold cycle*) vrijednosti koje opisuju količinu RNA dobivenih qRT-PCR reakcijom na temelju linearnog odnosa između brzine rasta fluorescencije i količine ciljnih cDNA fragmenata u ispitivanim uzorcima.

4.2.4. Analiza podataka

Jedan od ključnih parametara s kojim osiguravamo ispravnost podataka dobivenih qRT-PCR metodom je učinkovitost PCR reakcije. Učinkovitost smo odredili izradom standardne krivulje između dobivenih C_T vrijednosti i logaritamske vrijednosti količine standarda i izračunavanjem pomoću formule (Slika 2. i Jednadžba 2.) (14).



Slika 2. Grafički prikaz jednadžbi pravaca odnosa koncentracije i C_T vrijednosti u uzorcima

$$E = 10^{\left(\frac{1}{nagib}\right)} - 1$$

Jednadžba 2. Učinkovitost PCR reakcije

Dobivene učinkovitosti PCR reakcije CAIX ($E = -0,99027$) i aktina ($E = -0,99424$) su podjednake te smo razinu genske ekspresije nastavili računati $\Delta\Delta C_T$ metodom.

Metoda kojom smo obradili rezultate dobivene PCR reakcijom je $\Delta\Delta C_T$ metoda. Navedenu metodu moguće je koristiti jer su učinkovitosti PCR reakcije za ciljani i referentni gen podjednake. Dobivene C_T vrijednosti ciljnog gena za nepoznate uzorke kao i za kalibratore (netretirani uzorci) smo normalizirali (Jednadžba 3.) (14).

$$\Delta CT(\text{uzorak}) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ referentni gen}$$

$$\Delta CT(\text{kalibrator}) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ referentni gen}$$

Jednadžba 3. Jednadžbe normalizacije kalibratora i nepoznatih uzoraka

Normalizirane smo vrijednosti kalibratora nadalje oduzeli od vrijednosti nepoznatih uzoraka (Jednadžba 4.) (14).

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{uzorak}) - \Delta CT (\text{kalibrator})$$

Jednadžba 4. Izračunavanje $\Delta\Delta CT$

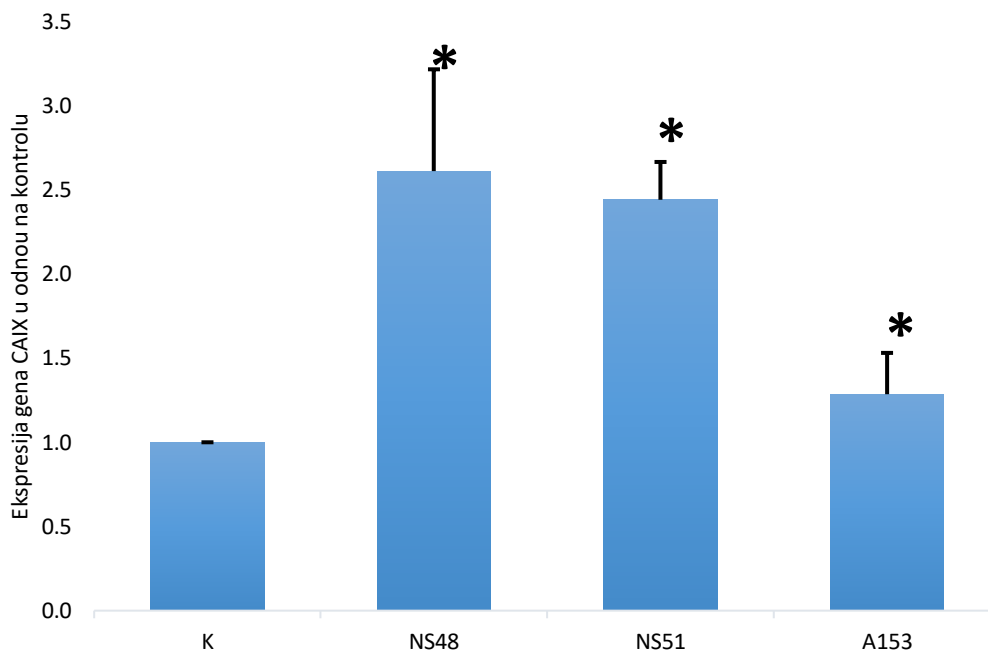
Pomoću dobivenih $\Delta\Delta C_T$ vrijednosti možemo nadalje izračunati vrijednosti genske ekspresije ciljnih gena formulom $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 3.) (14).

5. Rezultati

Promjene ekspresije gena za ugljičnu anhidrazu (CAIX) ispitivane su na stanicama tumora debelog crijeva (Caco-2 stanična linija) i stanicama adenokarcinoma grlića maternice (HeLa stanična linija). Obje su stanične linije tretirane spojevima NS48, NS51 i A153. Promijene u ekspresiji navedenog gena određene su pomoću $\Delta\Delta C_T$ metode nakon odrađenog qRT-PCR-a. S obzirom na veličinu uzorka i distribuciju podataka, za statističku analizu odabran je neparametrijski test razlika za nezavisne uzorke (Mann-Whitneyjev U test). Statistička analiza obavljena je u programu SPSS for Windows (inačica 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) software-a. Rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

5.1 Određivanje promjene u ekspresiji gena ugljične anhidraze (CAIX) u stanicama tumora debelog crijeva (Caco-2).

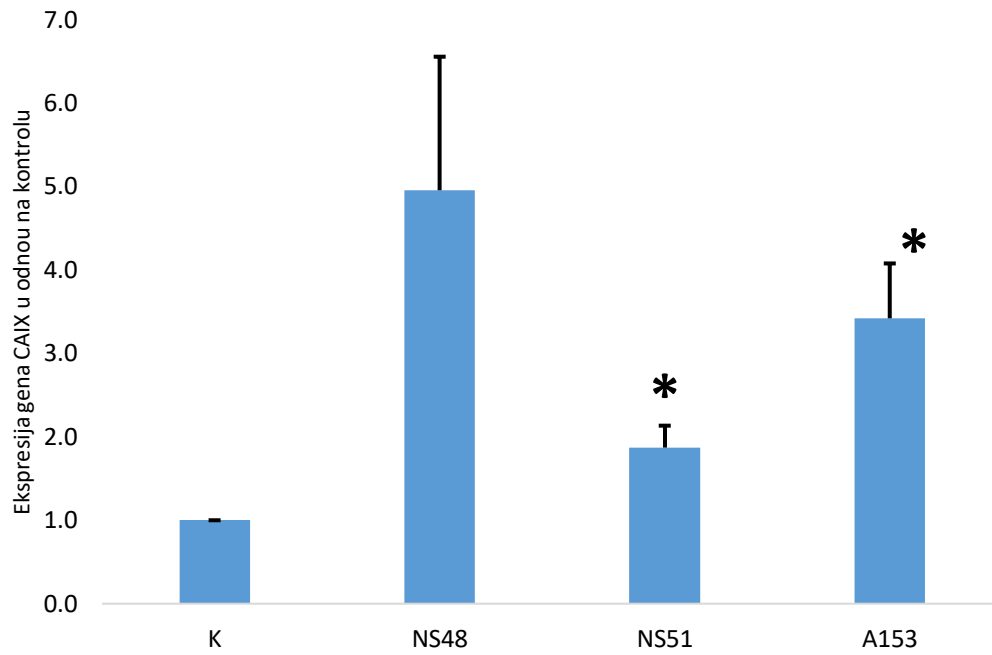
Dobiveni rezultati qRT-PCR analize genske ekspresije ugljične anhidraze IX pokazuju značajno veću ekspresiju CAIX u stanicama koje su tretirane kumarinskim derivatima u odnosu na kontrolni uzorak. Stanice tretirane derivatom NS48 pokazuju 2,6 puta veću razinu ekspresije CAIX ($2,611 \pm 0,605$, $Z = -2,34$, $p = 0,02$) u odnosu na kontrolne stanice. Značajno povećanje ekspresije CAIX zabilježeno je i u stanicama tretiranim NS51 (veličina razlike = 2,4 x; $2,440 \pm 0,225$, $Z = -2,25$, $p = 0,02$), odnosno A153 derivatom (veličina razlike = 1,2 x; $1,286 \pm 0,245$, $Z = -2,60$, $p = 0,01$) (Slika 3.).



Slika 3. Grafički prikaz genske ekspresije gena CAIX u Caco-2 staničnoj liniji. Rezultati su normalizirani prema genu za aktin. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*).

5.2 Određivanje promjene u ekspresiji gena ugljične anhidraze (CAIX) u stanicama adenokarcinoma grlića maternice (HeLa).

U HeLa staničnoj liniji tretiranoj kumarinskim derivatima uočene su značajne promjene u ekspresiji gena za CAIX. Peterostruko povećanje CAIX genske aktivnosti zabilježeno je u NS48 tretiranih ($4,955 \pm 1,601$, $Z = -1,63$, $p = 0,10$) u odnosu na netretirane HeLa kulture. HeLa stanice tretirane s NS51 ($1,871 \pm 0,263$, $Z = -2,16$, $p = 0,03$). odnosno s A153 ($3,420 \pm 0,658$, $Z = -2,25$, $p = 0,02$) derivatima, također pokazuju 1,8 odnosno 3,5 puta veću ekspresiju CAIX mRNA u odnosu na netretirane HeLa linije (Slika 4.).



Slika 4. Grafički prikaz genske ekspresije gena CAIX u HeLa staničnoj liniji. Rezultati su normalizirani prema genu za aktin. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*).

6. Rasprava

Hipoksija je pojava karakteristična za proces tumorogeneze. Ključna uloga hipoksije u održavanju tumorskog razvoja i rasta očituje se u metaboličkim i fiziološkim promjenama koje induciraju uvjeti smanjene opskrbe kisikom i acidoze kao posljedice hipoksije, a koje u tumorskim stanicama izazivaju povećanje mobilnosti, neovaskularizaciju, epitelno-mezenhimalnu tranziciju i metastaziranje (15). Takvi učinci uvelike su rezultat djelovanja hipoksije na različite signalne puteve u kontroli stanične diferencijacije, proliferacije i apoptoze, poput HIF, PI3K i NF κ B signalnih puteva. Promjena regulatornih mehanizama u hipoksiji osigurava pogodan mikrookoliš za daljnji razvoj i metastaziranje tumorskih stanica. Stoga hipoksiju možemo smatrati jednom od ključnih točaka u tumorogenezi kao i privlačnom metom za razvoj ciljanih, tumor-specifičnih terapijskih pripravaka (6).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti učinak kumarinskih derivata NS48, NS51 i A153 na promjene u ekspresiji gena CAIX u staničnoj kulturi humanih solidnih tumora grlića maternice i debelog crijeva. Ugljična anhidraza radi svoje značajne uloge u regulaciji stanične acido-bazne ravnoteže čini potencijalno važnu metu u razvoju novih antitumorskih lijekova. Naime, dosadašnji rezultati znanstvenih istraživanja ukazuju na značajno povišene razine ekspresije CAIX u solidnim tumorima u odnosu na normalne stanice, a smanjenje aktivnosti CAIX uzrokuje promjenu pH vrijednosti tumorskog mikrookoliša, smanjenu proliferaciju i smanjeno preživljenje tumorskih stanica (16, 17). Iz tog razloga CAIX je odabran kao ciljni indikator potencijalne antitumorske aktivnosti odabranih derivata kumarina (8). Stanice na kojima smo istraživali promjene u ekspresiji su HeLa stanice adenokarcinoma grlića maternice i Caco-2 stanice karcinoma debelog crijeva. Uzgojem stanica u prisutnosti kumarinskih spojeva uočeno je da dolazi do povećanja genske ekspresije CAIX u obje stanične linije. Pokazano je da je HeLa stanična linija osjetljivija na kumarinske derivate u odnosu na staničnu liniju Caco-2. Kumarini su relativno novootkriveni spojevi za koje se smatra da djeluju kao dobri inhibitori karboanhidraze. Svojim vezanjem u aktivno mjesto enzima otvaraju niz mogućnosti za istraživanje niza derivata koji će svojim vezanjem potencijalno inhibitorno djelovati na navedeni enzim (18). Međutim u okviru ove studije, potencijalni inhibitorni učinci kumarinskih derivata NS48, NS51 i A153 na ekspresiju CAIX nisu zabilježeni, barem ne na razini genske ekspresije.

U istraživanju Liua i suradnika, istraživao je utjecaj kombinacije VPA (valproična kiselina) i kumarinskih derivata (HCCA) na inhibiciju proliferacije i migracije metastaza karcinoma pluća

pokretanjem apoptoze i regulacije proteinske ekspresije. Istraživanje je pokazalo da kumarinski derivat HCCA u kombinaciji s VPA-om suzbija proliferaciju i metastaziranje preko staničnih signalnih puteva (19). U tom kontekstu, opseg trenutne studije trebalo bi proširiti testiranjem sinergističkog djelovanja VPA i testiranih kumarinskih derivata te analizom ekspresije signalnih molekula u uzvodnom i nizvodnom dijelu CAIX signalne kaskade kao što su HIF-1, PI3K, Akt, NF- κ B te bikarbonatnih transportera poput NBCe1 i AE2 (15). Zaključno, testirani kumarinski derivati ne pokazuju inhibitorne učinke na razinu genske ekspresije CAIX u HeLa i Caco-2 staničnim linijama. Daljnja istraživanja drugih kumarinskih derivata ili njihovih združenih učinaka s drugim vrstama antitumorskih lijekova mogla bi imati pozitivan utjecaj na razvoj protutumorskih lijekova. Dodatna istraživanja karboanhidraza, njihovih aktivatora i inhibitora zasigurno će igrati ključnu ulogu u kontroli hipoksije tumorskih stanica, odnosno suzbijanju njihove agresivne prirode.

7. Zaključci

Dobivenim rezultatima možemo zaključiti da kumarinski derivati NS48, NS51 i A153 uzrokuju povećanje razine genske ekspresije CAIX u stanicama karcinoma debelog crijeva i adenokarcinoma grlića maternice.

8. Sažetak

Uvod: Karboanhidraza IX, kao jedan od ključnih enzima u procesu održavanja acido-bazne ravnoteže tumora, predstavlja ciljano središte protutumorske terapije. Inhibicijom njezinog aktivnog mjesta omogućena je kontrola regulacije stvaranja potrebnog mikrookoliša za daljnju proliferaciju tumorskih stanica. U ovom su istraživanju za inhibiciju CAIX korišteni derivati kumarina NS48, NS51 i A153. Kumarin je zbog svoje karakteristične aktivnosti dobar inhibitor aktivnog mjesta CAIX.

Cilj: Cilj je istraživanja odrediti utjecaj kumarinskih derivata na gensku ekspresiju CAIX u stanicama adenokarcinoma grlića maternice i stanicama karcinoma debelog crijeva.

Materijali i metode: Stanične linije korištene u istraživanju su HeLa stanice adenokarcinoma grlića maternice i Caco-2 stanice karcinoma debelog crijeva. Stanice su tretirane kumarinskim derivatima NS48, NS51 i A153. Nakon kultivacije, RNA je izolirana i ekspresija određena qRT-PCR-om. Vrijednosti dobivene qRT-PCR reakcijom obrađene su $\Delta\Delta C_T$ metodom kako bi se kvantificirala razina genske ekspresije.

Rezultati: Tretman stanica adenokarcinoma grlića maternice, kao i stanica karcinoma debelog crijeva, kumarinskim derivatima pokazuju povećanje genske ekspresije za CAIX. Uzrok povećanja genske ekspresije pretpostavka je da je došlo do blokiranja aktivnog mjesta enzima navedenim derivatima.

Zaključak: Kumarinski derivati NS48, NS51 i A153 uzrokuju povećanje ekspresije gena za CAIX u svim ispitivanim uzorcima.

Ključne riječi: kumarin, kumarinski derivati, tumorske stanice, CAIX, HeLa, Caco-2, hipoksija

9. Summary

Introduction: Carbonic anhydrase IX, as one of the key enzymes in the process of maintenance of acid-base balance of tumors, is the center target for anti-cancer therapy. Inhibition of its' active site enables the regulation of the micro environment which prevents further proliferation of tumor cells. In this study the compounds used to inhibit CAIX are derivatives of coumarin, NS48, NS51 and A153. Coumarin is a potent inhibitor of CAIX active site and thus affect the change in the level of gene expression for CAIX.

Goals: The goal is to determine the effect of coumarin derivatives on gene expression for CAIX in cervical adenocarcinoma and colon cancer cell lines

Materials and methods: The cell lines used in the study are HeLa cells of cervical adenocarcinoma and Caco-2 cells of colon cancer. The cells were treated with coumarin derivates NS48, NS51 and A153. After cultivation, RNA was isolated from each culture as well as from the controls, and further tested by qRT-PCR. The values obtained by qRT-PCR reaction were analysed with the $\Delta\Delta C_T$ method to calculate the level of gene expression.

Results: Cervical adenocarcinoma cells, as well as colon cancer cells treated with coumarin derivates, have shown increased gene expression of CAIX.

Conclusion: The NS48, NS51 and A153 coumarin derivates increase the expression of CAIX in the cells.

Key words: coumarin, coumarin derivates, tumor cells, CAIX, HeLa, Caco-2, hypoxia

10. Reference

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019.
2. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065. Published 2015 Nov 5. doi:10.1038/nrdp.2015.65
3. Gomes DL, Telles CBS, Costa MSSP, Almeida-Lima J, Costa LS, Keesen TSL, Rocha HAO. Methanolic Extracts from Brown Seaweeds *Dictyota cilliolata* and *Dictyota menstrualis* Induce Apoptosis in Human Cervical Adenocarcinoma HeLa Cells. *Molecules*. 2015; 20(4):6573-6591.
4. Silva Costa, L., Silva Telles, C. B., Medeiros Oliveira, R., Duarte Barreto Nobre, L. T., Dantas-Santos, N., Barros Gomes Camara, R., ... & Leite, E. L. (2011). Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. *Marine drugs*, 9(4), 603-614.
5. Benej M., Pastorekova S., Pastorek J. (2014) Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. In: Frost S., McKenna R. (eds) *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. *Subcellular Biochemistry*, vol 75. Springer, Dordrecht
6. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83–92. Published 2015 Dec 11. doi:10.2147/HP.S93413
7. Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – . Accession No. NM_001216, Homo sapiens carbonic anhydrase 9 (CA9), mRNA; [cited 2018 May 08]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/768#gene-expression>
8. Tafreshi NK, Lloyd MC, Bui MM, Gillies RJ, Morse DL. Carbonic anhydrase IX as an imaging and therapeutic target for tumors and metastases. *Subcell Biochem*. 2014;75:221–254. doi:10.1007/978-94-007-7359-2_12
9. Mboge, M., Mahon, B., McKenna, R., & Frost, S. (2018). Carbonic anhydrases: role in pH control and cancer. *Metabolites*, 8(1), 19.
10. Kaluz, S., Kaluzová, M., Liao, S. Y., Lerman, M., & Stanbridge, E. J. (2009). Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: A one

transcription factor (HIF-1) show?. *Biochimica et biophysica acta*, 1795(2), 162–172. doi:10.1016/j.bbcan.2009.01.001

11. Dayan F, Monticelli M, Pouyssegur J, Pecou E. Gene regulation in response to graded hypoxia: the non-redundant roles of the oxygen sensors PHD and FIH in the HIF pathway. *J Theor Biol.* 2009;259:304–316

12. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., ... & Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33095-33106.

13. Egan, D., O'kenney, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., & Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 22(5), 503-529.

14. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.

15. Svastova, E., Witariski, W., Csaderova, L., Kosik, I., Skvarkova, L., Hulikova, A., ... & Pastorekova, S. (2012). Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3392-3402.

16. Mahon, B., Pinard, M., & McKenna, R. (2015). Targeting carbonic anhydrase IX activity and expression. *Molecules*, 20(2), 2323-2348.

17. Li, Y., Tu, C., Wang, H., Silverman, D. N., & Frost, S. C. (2011). Catalysis and pH control by membrane-associated carbonic anhydrase IX in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 15789-15796.

18. Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2009). The coumarin-binding site in carbonic anhydrase accommodates structurally diverse inhibitors: the antiepileptic lacosamide as an example and lead molecule for novel classes of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 53(2), 850-854.

19. Liu, X., Chen, L., Sun, F., & Zhang, G. (2013). Enhanced suppression of proliferation and migration in highly-metastatic lung cancer cells by combination of valproic acid and coumarin-

3-carboxylic acid and its molecular mechanisms of action. *Cytotechnology*, 65(4), 597–608.
doi:10.1007/s10616-012-9513-7

20. A. Bistrović, N. Stipaničev, T. Opačak-Bernardi, M. Jukić, S. Martinez, L. Glavaš-Obrovac and S. Raić-Malić, *New J. Chem.* Synthesis of 4-aryl-1,2,3-triazolyl appended natural coumarin related compounds with antiproliferative, radical scavenging activities and intracellular ROS production modification

21. Vats L., Sharma V., Angeli A., Kumar R., Supuran C.T., Sharma P.K. Synthesis of novel 4-functionalized 1,5-diaryl-1,2,3-triazoles containing benzenesulfonamide moiety as carbonic anhydrase I, II, IV and IX inhibitors *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 150, 2018

11. Životopis

Ime i prezime: Matija Kuzmić

Datum i mjesto rođenja: 31. prosinca 1996., Slavonski Brod.

Adresa stanovanja: Andrije Štampara 16, 35000 Slavonski Brod

Kontakt: 099 315 62 34

Obrazovanje:

2015. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2011. – 2015. Gimnazija Matija Mesić, Slavonski Brod, opći smjer

2011. – 2015. Glazbena škola Slavonski Brod, Slavonski Brod, Klavirski smjer

2003. – 2011. Osnovna škola Hugo Badalić, Slavonski Brod

2003. – 2011. Glazbena škola Slavonski Brod, Slavonski Brod, osnovno školovanje