

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ASTRID STRGARŠEK

**VPLIV PROTITELES α -CK MAb NA AKTIVACIJO
PLAZMINOGENA NA TUMORSKIH CELICAH**

**INFLUENCE OF α -CK MONOCLONAL ANTIBODY ON
ACTIVATION OF PLASMINOGEN ON TUMOR CELLS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom Nataše Obermajer, mag. farm. Metodo SPR smo opravili v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco na Biotehniški fakulteti.

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Janku Kosu se zahvaljujem za pomoč pri načrtovanju raziskovalnega dela in pregledu diplomske naloge.

Najlepša hvala Nataši Obermajer, mag. farm. za posredovano strokovno pomoč in nasvete, vzpodbudo in pomoč pri eksperimentalnemu delu ter obilico potrpljenja in dobre volje.

Hvala tudi asist. dr. Bojanu Doljaku za pomoč pri izvedbi SPR metode.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom Nataše Obermajer, mag. farm.

Astrid Strgaršek

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ASTRID STRGARŠEK

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. RAK DOJKE	1
1.2. MONOKLONSKA PROTITELESA	2
1.2.1. ZGRADBA PROTITELES	2
1.2.2. PRIDOBIVANJE PROTITELES	3
1.2.3. ZDRAVLJENJE RAKA DOJKE Z MONOKLONSKIMI PROTITELESI	5
1.3. CITOKERATINI	6
1.3.1. STRUKTURA CITOKERATINOV	7
1.3.2 VLOGA CITOKERATINOV	8
1.4. PLAZMINOGENSKI SISTEM.....	11
1.4.1 PLAZMINOGEN	11
1.4.2. PLAZMIN	12
1.4.3. PLAZMINOGENSKI RECEPTOR	12
1.4.4. PLAZMINOGEN IN CITOKERATINI	14
2. NAMEN DELA	17
3.MATERIALI IN METODE	18
3.1.MATERIALI	18
3.1.1. Reagenti, raztopine, substrati:	18
3.1.2 Gojišča.....	19
3.1.3. Celične linije in hibridomi	20
3.1.4. Pufri	21
3.1.5. Laboratorijska oprema in aparature	22
3.2. METODE	23
3.2.1. PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES α -CK MAb.....	23
3.2.1.1. PRIRAŠČANJE HIBRIDOMOV	23
3.2.1.2. IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELES	24
3.2.2. VREDNOTENJE PROTITELES	26
3.2.2.1. ELISA ali imunoencimski test na trdi podlagi	26
3.2.2.2. AKTIVACIJA PLAZMINOGENA V PLAZMIN	28
3.2.2.3. SPR (površinska plazmonska resonanca).....	29

3.2.2.4. ADHEZIJA	31
3.2.2.5. INVAZIJA	32
3.2.2.6. MIGRACIJA	33
3.2.2.7. PRETOČNA CITOMETRIJA	34
3.2.2.8. MIKROSKOPIJA	35
4. REZULTATI	36
4.1. PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES	36
4.2. ČIŠČENJE IN IZOLACIJA	36
4.3. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTITELES	38
4.4. ELISA	38
4.5. AKTIVACIJA PLAZMINOGENA V PLAZMIN	39
4.6. SPR	40
4.7. ADHEZIJA	40
4.8. INVAZIJA	41
4.9. MIGRACIJA	42
4.10. PRETOČNA CITOMETRIJA	43
4.11. MIKROSKOPIJA	44
5. RAZPRAVA	46
6. SKLEP	49
7. LITERATURA	50

POVZETEK

Citokeratini, intermediarni filamenti epitelijskih celic, predstavljajo največjo družino citoskeletnih proteinov. Dolgo je veljalo, da imajo citokeratini predvsem strukturno vlogo, sedaj pa je vedno bolj uveljavljen njihov pomen pri modulaciji in kontroli bistvenih celičnih procesov. Znano je, da rakave celice izražajo citokeratine tudi na svoji površini, kjer lahko služijo kot receptorji, med drugim tudi za plazminogeni sistem. V diplomski nalogi smo proučevali monoklonsko protitelo α -CK Mab, ki prepozna citokeratinski profil v rakavih celicah dojke.

Namen našega dela je bil preučiti vpliv protitelesa na plazminogeni sistem. Protitelo smo pridobili z gojenjem hibridomske celične linije, dobljene z imunizacijo miši z membransko frakcijo celičnega lizata rakavih celic dojke. Po izolaciji in čiščenju z afinitetno kromatografijo smo določili njegovo aktivnost z imunoencimskim testom na trdi podlagi. Opazili smo, da protitelo odvisno od koncentracije inhibira nastanek plazmina, ki lahko sproži razgradnjo zunajceličnega matriksa. S površinsko plazmonsko resonanco smo dokazali, da se urokinazni plazminogeni aktivator, ki aktivira nastanek plazmina iz plazminogena, veže na dodekapeptid, ki ga specifično prepozna tudi protitelo. Poleg tega protitelo tudi poveča adhezijo celic na fibronektin in zmanjša proliferacijo in invazijo celic skozi matrigel.

Protitelo bistveno spremeni celično signalizacijo. Sklepamo lahko, da protitelo zasede vezavna mesta urokinaznemu plazminogenemu aktivatorju na rakavih celicah in prepreči nastanek plazmina, proteaze, ki cepi številne proteine zunajceličnega matriksa ter fibronektin. Inhibicija nastanka plazmina povzroči povečano adhezijo celic ter zmanjša njihovo invazijo. Oba procesa sta ključna pri razvoju raka. S tem se odpira možnost uporabe tovrstnih protiteles pri terapiji raka.

ABSTRACT

Cytokeratins, intermediate filament proteins of epithelial cells, constitute the largest family of cytoskeletal proteins. The function of these proteins has long been thought as structural, however, it has become evident that they also act as a framework for modulation and control of essential cell processes. It is known that cancer cells express cytokeratins on their surface, where they act as receptors among others also for plasminogen system. We have studied monoclonal antibody α -CK MAb, which recognizes cytokeratin profile in breast cancer cells.

Our purpose was to study the influence of the antibody on plasminogen system. We have produced the antibody by growing hybridoma cell line, that was attained from mouse immunized with membrane fraction of cell lysate of breast cancer cells. After isolation and purification by affinity chromatography, the activity of the antibody was determined with enzyme linked immunosorbent assay. We have noticed that the antibody inhibits plasmin formation in a concentration-dependent manner. With surface plasmon resonance we have shown that urokinase plasminogen activator, which activates formation of plasmin from plasminogen, binds to dodecapeptide, specifically recognized by α -CK MAb. The antibody increases cell adhesion on fibronectin, decreases proliferation and invasion through matrigel.

The antibody significantly alters cell signaling. We may conclude that the antibody occupies binding site for urokinase plasminogen activator on cancer cells and prevents formation of plasmin, protease, which cleaves many extracellular matrix proteins, including fibronectin. Inhibition of plasmin formation causes increased cell adhesion and decreases their invasion. Both processes are crucial in cancerogenesis. The antibody thus seems prospective in therapy of cancer.

SEZNAM OKRAJŠAV

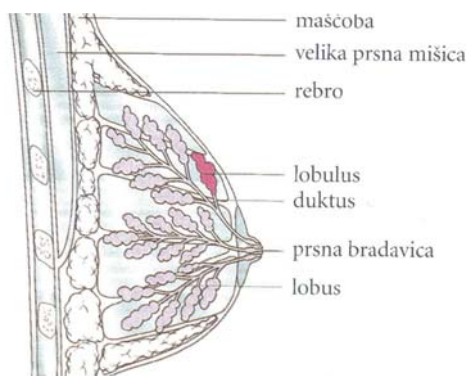
A	absorbanca
Ab	protitelo
Akt	aktin
BSA	goveji serumski albumin (»Bovine Serum Albumin«)
CK	citokeratin
DMEM	Eaglovo gojišče, modificirano po Dulbeccu
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ECM	zunajcelični matriks (»Extracellular matrix«)
EGF	epidermalni rastni faktor (»Epidermal Growth Factor«)
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor
ELISA	Imunoencimski test na trdem nosilcu (»Enzyme-Linked Immunosorbent Assay«)
Fab	monovalentni fragment imunoglobulina, ki nastane po cepljenju s papainom
FACS	fluorescenčno aktivirano celično sortiranje
FAK	(»Focal Adhesion Kinase«)
Fc	fragment imunoglobulina, ki nastane po cepljenju s papainom in nima vezišča za antigen
FCS	telečji fetalni serum
HAT	hipoksantin-aminopterin-timidin
HER	receptor za epidermalni rastni dejavnik
HGPRT	hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza
IF	Intermediarni filamenti
Ig	imunoglobulin
MAB	monoklonsko protitelo
MAPK	z mitogenom aktivirana protein-kinaza
MMP	matriks metaloproteinaze
mTOR	sesalska tarča za rapamicin (»mammalian target of rapamycin«)
PBS	fosfatni pufer z dodatkom NaCl za spiranje celičnih linij (»Phosphate Buffered Saline«)

PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PKC	protein-kinaza C
RACK	Receptor za aktivirano C kinazo (»Receptor for Activated C Kinase«)
RNaza	ribonukleaza
SPR	površinska plazmonska resonanca (»Surface Plasmon Resonance«)
t-PA	tkivni aktivator plazminogena
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik beta (»Transforming Growth Factor β «)
u-PA	urokinazni plazminogeni aktivator
u-PAR	receptor za urokinazni plazminogeni aktivator

1. UVOD

1.1. RAK DOJKE

Rak dojke je maligna tvorba (1), ki nastane z nenadzorovano delitvijo celic. Najpogosteje vznikne v duktusih in lobulih, torej v epitelnih strukturah, zato to vrsto raka imenujemo karcinom (2).



Slika 1.: Anatomska zgradba dojke (3).

Pri raku dojke so značilne nekatere specifične spremembe v celici. Ena najzgodnejših sprememb, ki jo lahko zaznamo, je izguba normalne regulacije števila celic, ki se odraža v epiteljski hiperplaziji. Genetska nestabilnost se kaže v spremembi majhne populacije celic in jo lahko detektiramo histološko. Ko rak napreduje v karcinom, se v celici sprožijo številni mehanizmi, kot so: povečana ekspresija onkogenov, zmanjšana ekspresija ali funkcija tumor-supresorskih genov, spremembe v strukturi celice (povečana ekspresija vimentina, citokeratinov), izguba celične adhezije (izguba integrinov), povečana ekspresija proteinov, ki so udeleženi pri celičnem ciklu, povečana ekspresija angiogenih dejavnikov (vaskularni endotelijski rastni dejavnik) in povečana ekspresija proteaz (katepsini, uPA,...) (4).

Glede na spremembe, ki se zgodijo, razdelimo rak dojke na štiri stopnje. V I. stopnji raka dojke najdemo rakave celice v sami dojki, medtem ko so v II. stopnji prisotne tudi v bezgavkah pod pazduho. V III. stopnji je tumor že nekoliko večji in se lahko vrašča tudi v mišico pod dojko, vendar je še vedno omejen le na dojko in bezgavke pod pazduho. V IV. stopnji se rak razširi na druge dele telesa, ta stadij imenujemo metastatski rak (1).

Vsaka tumorska sprememba v dojki (zatrđlina) še ni nujno rakava (maligna). Kar 80% sprememb v dojkah je benigne narave (fibromi, ciste). Odločitev o zdravljenju raka dojke je zelo zapletena in zahteva znanje in izkušnje zdravnika, ki natančno pozna biologijo posameznega tumorja (stopnjo malignosti, velikost, hormonsko odvisnost tumorja). Kirurgija, obsevanje, zdravljenje s citostatiki, hormonsko zdravljenje in zdravljenje z biološkimi zdravili so najpomembnejši načini zdravljenja raka dojke. V praksi se ti načini zdravljenja pogosto kombinirajo. Pri kirurškem zdravljenju pride do odstranitve dela ali celotne dojke ter pod pazdušnih bezgavk. Po operativni odstranitvi tumorja sledi uničenje morebitnih rakavih celic v dojki ali prsni steni z obsevanjem. Zdravljenje s citostatiki pomeni sistemsko zdravljenje z zdravili, ki uničujejo rakave celice kjerkoli v telesu. Hormonsko zdravljenje in zdravljenje z biološkimi zdravili se uporablja kot dopolnilno zdravljenje po operaciji ali za zdravljenje napredovanega raka (2).

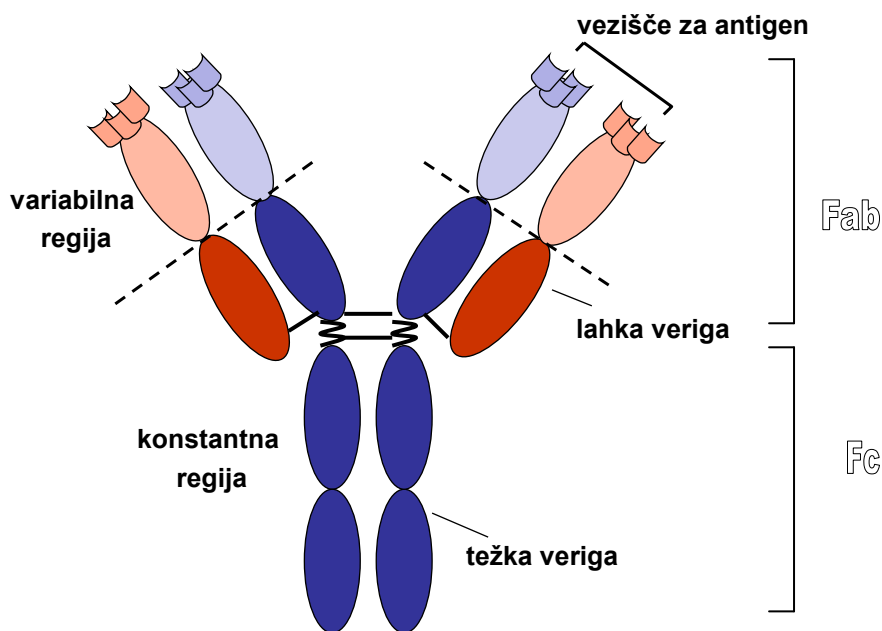
1.2. MONOKLONSKA PROTITELESA

1.2.1. ZGRADBA PROTITELES

Protitelesa IgG so monomerne molekule in so sestavljene iz dveh istovetnih lahkih in dveh istovetnih težkih verig, ki so povezane z disulfidnimi vezmi. Vsaka molekula ima dve vezišči (2 Fab), ki sta gibljivo pritrjeni na Fc, tako da lahko molekula zavzame obliko črke T ali črke Y. Aminoterminalnih 100 aminokislin v lahkih in težkih verigah sestavlja variabilno zaporedje. Drugi del lahke verige predstavlja en konstantni segment, drugi del težke verige pa predstavlja tri ali štiri konstantne segmente (5).

V vsaki molekuli humanih protiteles je ena od petih težkih verig (μ , γ , α , δ in ϵ) in ena od dveh lahkih verig (κ ali λ). Te verige imenujemo izotipi. Izotipi težkih verig določajo pet razredov protiteles (IgM, IgG, IgA, IgD in IgE) (5).

V aminoterminalnem variabilnem segmentu zaporedja vsake težke verige in lahke verige so tri hipervariabilne regije, ki sestavljajo vezišče za antigen ter določajo njegovo specifičnost (5).



Slika 2: Skica monoklonskega protitelesa (6).

1.2.2. PRIDOBIVANJE PROTITELES

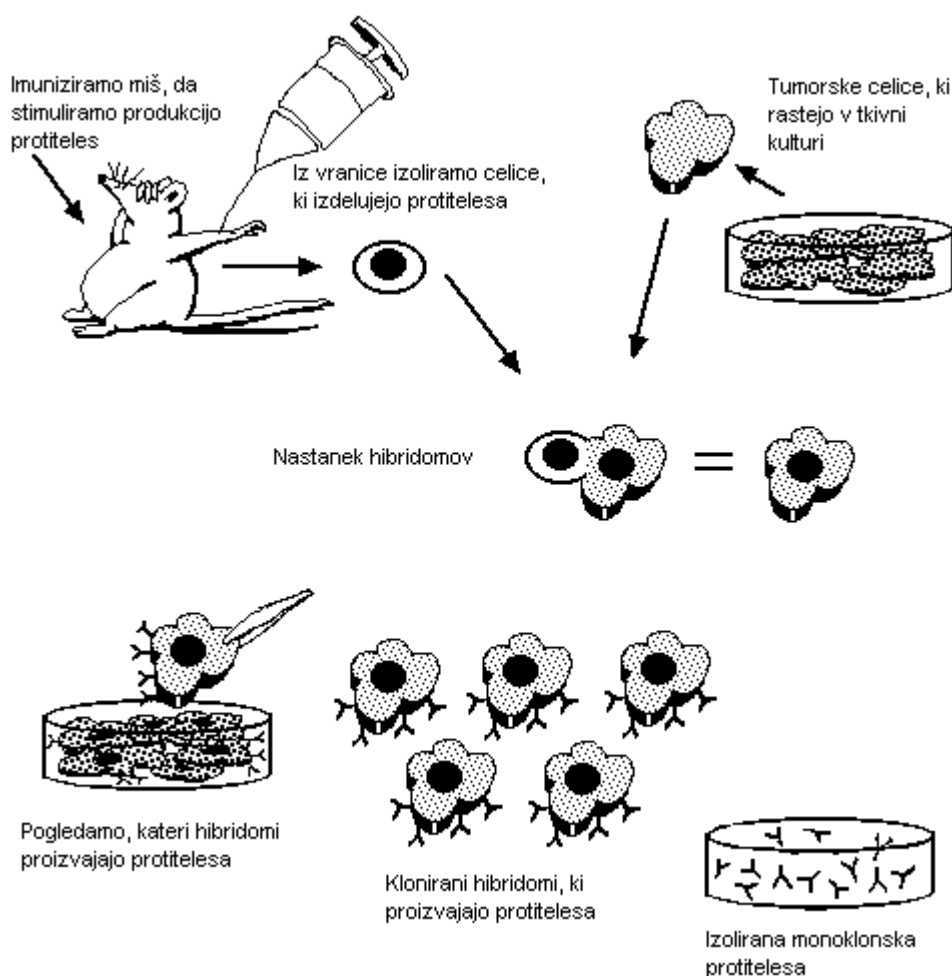
Čeprav so protitelesa zelo heterogena, lahko posamezna celica (diferenciran limfocit B) izdeluje samo eno protitelo (5).

Tumorsko celico in limfocit B, ki izloča protitelo, združimo s fuzijo s pomočjo virusa Sendai ali polietilenglikola. To omogoči zlitje plazemskih membran, kar omogoči nastanek hibridne celice z dvema ločenima jedroma - heterokariont. Po več delitvah se jedri združita v eno veliko jedro, ki ima kromosome obeh starševskih celic (5).

Hibridne celice je potrebno ločiti od homologno zlitih celic in nezlitih celic. Najbolj uporabljena metoda za osamitev hibridov je, da kot starševske celice izberemo take, ki zaradi mutacije ne morejo sintetizirati nukleotidov po eni od dveh poti. Zlite celice gojimo v gojišču HAT (hipoksantin, aminopterin in timidin), v katerem preživijo samo hibridne celice (5).

Podlaga za selekcijo v gojišču HAT je ugotovitev, da sesalčje celice lahko sintetizirajo nukleotide po dveh različnih poteh. Po poglavitni poti, imenovani pot »de novo« in po

pomožni poti. Pri poglavitni poti se blokira prenos formilne ali metilne skupine iz aktivirane oblike tetrahidrofolata. Blokado povzroči aminopterin, ki je analog dihidrofolijske kisline. Z močno afiniteto se veže na dihidrofolat reduktazo ter s tem prepreči sintezo purina. Če je poglavitna pot blokirana, uporabi celica pomožno pot, da lahko sintetizira DNA. Gojišče HAT vsebuje aminopterin, ki blokira poglavitno pot, ter hipoksantin in timidin, ki omogočata razmnoževanje prek pomožne poti. Pomožno pot katalizirajo encimi, ki vključujejo hipoksantin-gvanin fosforibozil transferazo (HGPRT) in timidin kinazo (5).

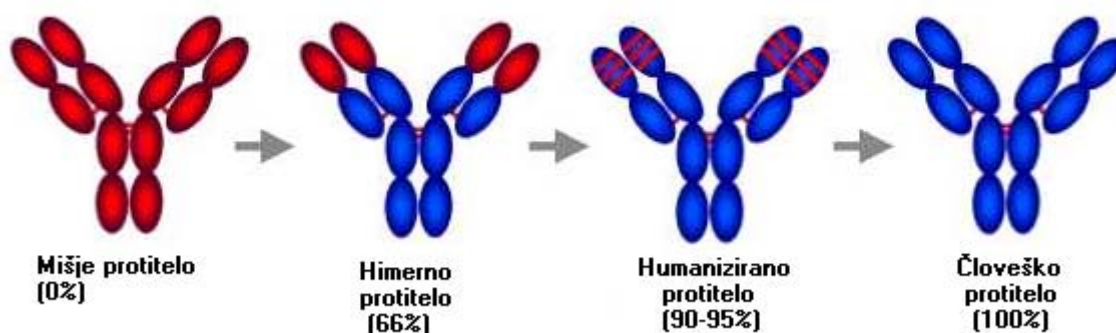


Slika 3.: Pridobivanje monoklonskih protiteles (7).

Za pripravo heterokarionta vzamemo mielomske celice, ki ne izdelujejo protiteles in so tudi HGPRT⁻. Te celice podelijo zlitim celicam nesmrtnost, same pa ne preživijo v gojišču HAT. Drugi fuzijski partner so vranične celice, ki vsebujejo aktivirane celice B, ki lahko izdelujejo protitelesa in so HGPRT⁺. Nezlite vranične celice B so končno diferencirane celice, ki živijo le kratek čas in kmalu odmrejo (5).

Z dodatnim preizkušanjem in kloniranjem iz večjega števila hibridomov izberemo posamezne celice, ki proizvajajo specifična monoklonska protitelesa proti izbranemu antigenu, ter iz njih vzpostavimo proizvodne klone hibridomske celične linije (9).

Če vbrizgamo mišja protitelesa ljudem, jih ti spoznajo za tuje in razvijejo proti njim protitelesni odziv. Nastala humana protitelesa proti mišjim protitelesom hitro zmanjšajo učinkovitost mišjih protiteles in jih odstranijo iz telesa. Himerna protitelesa imajo manjše razlike v aminokislinski sestavi v primerjavi s človeškimi protitelesi. 60-70% primarne zgradbe je enako človeškemu protitelesu, pri humaniziranem protitelesu se ta delež poveča na 90-95%. Imunogenost pada z naraščanjem deleža aminokislin človeškega proteina (9).



Slika 4: Primerjava mišjih, himernih, humaniziranih in človeških protiteles (8).

1.2.3. ZDRAVLJENJE RAKA DOJKE Z MONOKLONSKIMI PROTITELESI

Z odkritjem monoklonskih protiteles (MAb), so postali znani številni s tumorjem povezani antigeni, ki lahko služijo kot tarča terapije. Celice raka dojke izražajo antigene, ki v netumorskih celicah niso izraženi ali pa v manjši meri. Terapija z MAb je privlačna zaradi selektivnosti protiteles, specifičnosti antigenov *in vitro* in v živalskih modelih raka dojke (10).

Mehanizmi delovanja MAb so različni. Prvi od njih je sproženje imunskega odgovora, kar se lahko zgodi pasivno ali aktivno. Pri pasivni imunoterapiji administriramo intravensko MAb, ki je specifično za tumorski antigen, medtem ko z aktivno imunoterapijo aktiviramo lastne limfocite. Na MAb lahko kovalentno vežemo citotoksične snovi in jih dostavimo na

želeno mesto, zaradi specifičnosti MAb. Kot citotoksično snov lahko uporabimo radioaktivne izotope, bakterijske ali rastlinske toksine, citokine ali kemoterapevtike. Sama MAb lahko vplivajo na biološki odgovor, ki vodi v inhibicijo celične rasti, apoptozo ali pa spremenijo diferenciacijo celic. MAb lahko tudi regulirajo celične mehanizme rezistence drugih zdravil (10).

Protitelo z vezavo na receptorje za rastne dejavnike blokira celično rast in diferenciacijo tumorskih celic in s tem zaustavi rast tumorja. Primer takega protitelesa je trastuzumab, ki je bilo odobreno leta 1998. Trastuzumab je himerno MAb razreda IgG1, ki prepozna človeški epidermalni rastni dejavnik 2 (HER2). Trastuzumab pod lastniškim imenom Herceptin uporabljamo za zdravljenje bolnic z metastatsko obliko raka dojk, katerih tumorji imajo čazmerno izražen HER2. HER2 je prisoten na površini nekaterih rakavih celic, kjer vzpodbuja njihovo rast. Pri preobrazbi normalne v rakasto celico so zaradi spremembe gena HER2 ugotovili večje število teh proteinov na površini celic, kar pripisujejo slabi prognozi in večji agresivnosti tumorja (9). Poleg tega so v kliničnih študijah protitelesa proti različnim proteinom, ki se v tumorskih celicah prekomerno izražajo. Ta protitelesa so večinoma konjugirana z radioaktivnim izotopom, ki uniči rakave celice (10).

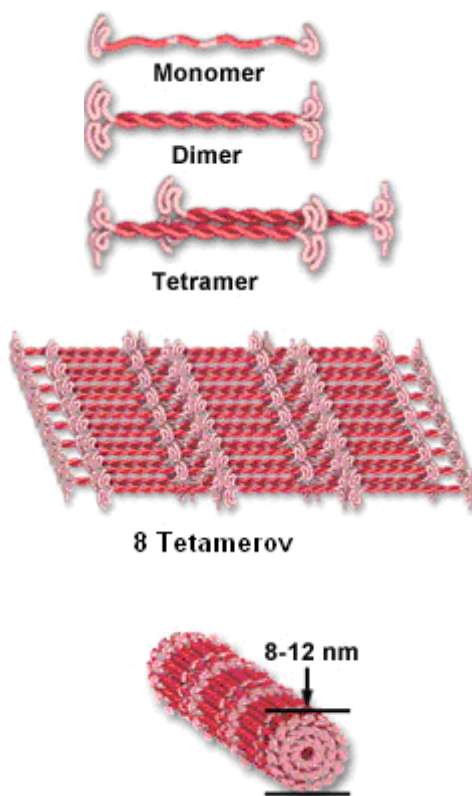
1.3. CITOKERATINI

Citokeratini ali keratini so najbolj raznolika družina epitelijskih intermediarnih filamentov. Približno dvajset so jih našli v različnih tipih človeških epitelijskih celic in okoli deset, ki so specifični za lase in nohte (11). Citokeratine so poleg epitelijskih celic prisotni še v karcinomih (12). Citokeratini (CK) so razdeljeni na Tip I (CK9-22) in Tip II (CK1-8). V prvo skupino spadajo majhni in kisli citokeratini, v drugi so večji in nevtralni ali bazični citokeratini (13). Ena epitelijska celica ima lahko izraženih več tipov citokeratinov, ki kopolimerizirajo v komponento citoskeleta.

Regulacija citokeratinov poteka preko postranslacijskih modifikacij: farnezilacijo, fosforilacijo, glikozilacijo, transglutaminacijo in z interakcijo s proteini, ki se vežejo na citokeratine (14).

1.3.1. STRUKTURA CITOKERATINOV

Citokeratini so 10-12 nm široka, zelo fleksibilna in nepolarna citoskeletna vlakna (15). Citokeratini so sestavljeni iz N in C terminalne globularne strukture, ki ju povezuje α -heliks. α -heliks je dolg 310-352 aminokislin in je prekinjen z vmesnimi regijami (8-17 aminokislin), v katerih ga cepijo kaspaze med apoptozo. Ti deli so zelo konzervativni in predstavljajo aspartatne ostanke. N in C terminalne strukture vsebujejo 8-12 aminokislin in so prav tako zelo konzervativni in najverjetneje določajo posamezne specifične funkcije. Na terminalnih strukturah citokeratini interagirajo z različnimi proteini, kinazami, fosfatazami in šaperoni. Mutacije na teh mestih povzročijo spremembo fenotipa. Najpreprostejša topna enota citokeratinov je tetramer, sestavljen iz dveh antiparalelnih dimerov. Dimer je sestavljen iz ene molekule Tipa I in ene molekule Tipa II (14).



Slika 5: Shematski prikaz zgradbe citokeratinov. Osnovna enota je monomer, ki se povezuje v dimere, tetramere. Osem tetramerov tvori strukturo, ki je podobna vrvi (spodaj) (16).

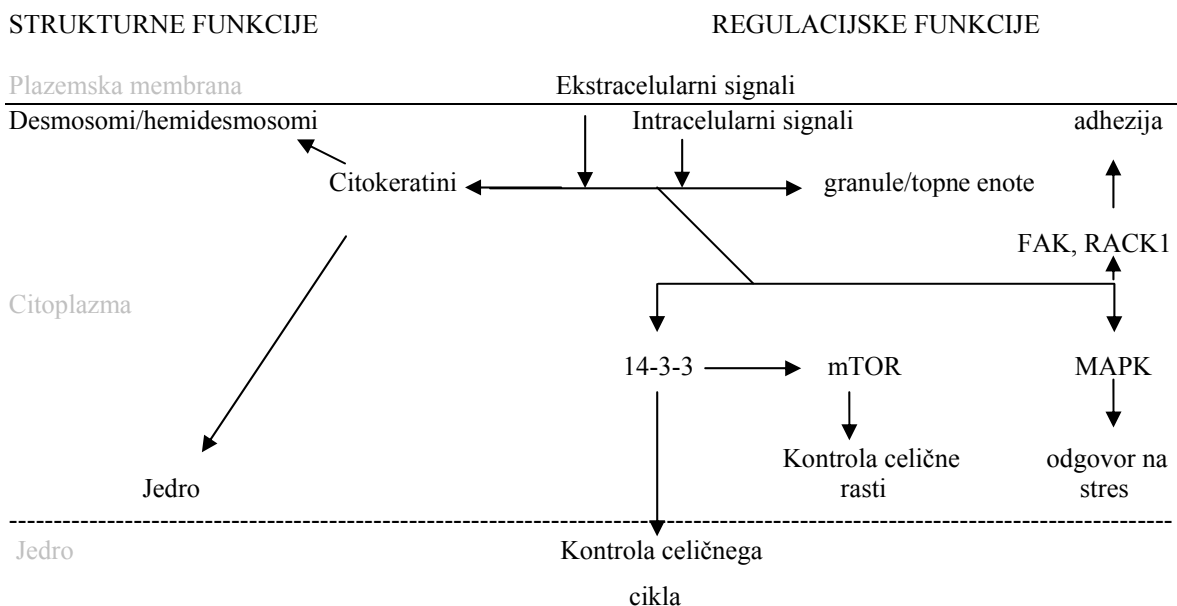
Različne tipe epitelijskih celic lahko okarakteriziramo s specifičnimi pari CK, ki jih izražajo. Citokeratini so izraženi v različnih epitelijih. Ekspresija je odvisna od diferenciacije in regulirana z nastankom epitelija. Vsak tip epitelija izraža 4-8 citokeratinov. Preprost monoslojen epitelij izraža CK8 in CK18 skupaj z CK7, CK17 in CK19. Večslojni epitelij izraža CK4 in CK5 v bazalni plasti, glede na stanje diferenciacije in keratinizacije epitelija so v zgornjem sloju izraženi CK8/CK10 ali pa CK4/CK13 (17).

Večina CK8 je povezana s CK18 v zelo netopne filamente, ki se raztezajo od jedrne ovojnice do notranjega roba plazemske membrane. CK8 ne vsebuje signalnega peptida ali zadosti velike serije hidrofobnih aminokislin, da bi lahko tvoril transmembransko domeno. Ne vemo, kakšen je mehanizem translokacije CK8, vendar je dokazano, da je prisoten na celični površini. Gires in sod. so pokazali prisotnost CK8 epitopa na zunanji površini plazemske membrane. Prav tako so pokazali, da je plazemska membrana neprepustna za protitelesa in da CK8 ni prisoten na celični površini večine tkiv. Zato je možna uporaba CK8 *in vivo* za zdravljenje tumorskih celic s protitelesi, ki so označena z radioaktivnimi delci (18).

1.3.2 VLOGA CITOKERATINOV

Citokeratini predstavljajo skelet epitelijskih celic in zagotavljajo oporo pred mehaničnim stresom ter služijo posredovanju celičnega signala. Torej imajo strukturno in regulacijsko vlogo, ki sta med seboj povezani (19).

Dinamično naravo citokeratinov določa njihova interakcija s številnimi proteini. Številni izmed njih predstavljajo signalizacijske intermediete (kinaze, fosfataze, 14-3-3 družino proteinov). Reorganizacija citokeratinov pri odgovoru na zunajcelične in znotrajcelične signale vključuje fosforilacijo serinov. Ta fosforilacija lahko ustvari vezavna mesta za 14-3-3 družino adaptorskih proteinov, kar lahko vpliva na biosintezo proteinov preko mTOR signalne poti (19).

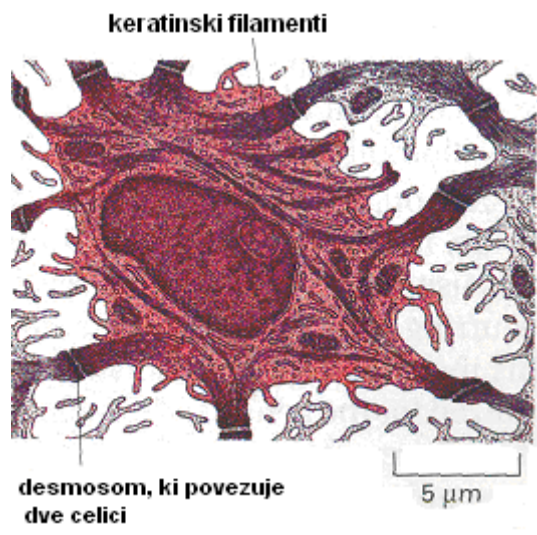


Slika 6: Regulacijska in strukturna vloga citokeratinov (19).

Celična rast je zelo reguliran celični proces. Akt/mTOR signalna pot ima glavno vlogo pri kontroliranju sinteze proteinov in vpliva na rast celic, tkiv in organov. Rast celic je potrebna pri poškodbi tkiva, kot odgovor na rano. Colulombe in sod. so pokazali, da CK17 regulira celično rast preko 14-3-3 σ proteina. Dve aminokislini, ki se nahajata na N-terminalnem delu CK17, sta potrebni, da se 14-3-3 σ protein translocira iz jedra v citoplazmo, stimulira mTOR aktivnost in celično rast (19).

14-3-3 proteini so membranski, adaptorski proteini, ki regulirajo distribucijo in aktivacijo stotih proteinov. Pri miših, ki nimajo izraženih CK8 in CK18, pride do translokacije 14-3-3 proteina v jedro, kar prepreči mTOR aktivacijo. V jedru pride do akumulacije 14-3-3 ξ , kar povzroči večjederne celice velikanke z dvojno količino DNA. Tako odsotnost CK8 in CK18 zmoti celični cikel in citokinezo in vodi celice v zastoj v G2-S fazi (19).

V G2/M fosfataza Cdc25 aktivira Cdc2/CiklinB kompleks z defosforilacijo. Regulacija Cdc25 poteka s fosforilacijo in vezavo na 14-3-3 protein, hkrati pa je potrebna še dodatna fosforilacija CK8 in CK18. Ni še znano, katere aminokisliline na citokeratinih se lahko fosforilirajo in služijo za vezavo 14-3-3 proteina (19).



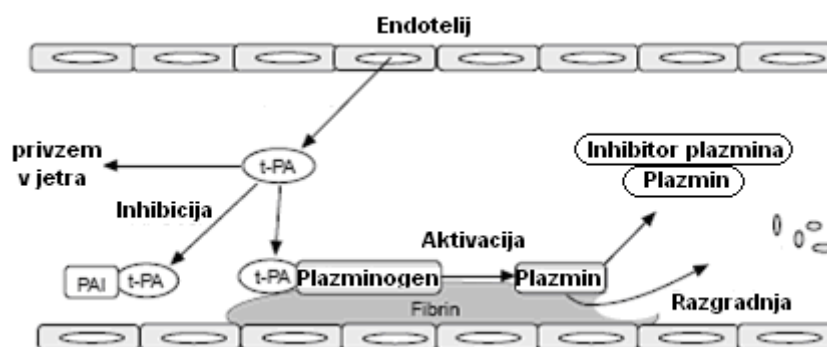
Slika 7: Prikaz citokeratina v celici (11).

Marceau in sod. so delali poizkuse na jetrnih celicah, ki nimajo izraženega CK8, in ugotovili, da se take celice počasneje razraščajo na fibronektinu, ter vplivajo na integrin β 1, RACK1, plektin in vinkulin, spremenijo Akt signaliziranje in avtofosforilacijo FAK med razraščanjem celic. Poleg tega izguba CK8/CK18 vodi v zmanjšanje velikosti celic, kar je povezano z manjšo sintezo proteinov in večjo G1/S tranzicijo. Iz teh rezultatov lahko zaključimo, da citokeratini vplivajo na signalizacijo v celici, tako da spremenijo adhezijo in rastno pogojeno signalno transdukcijo. CK8/CK18 imajo mnogo funkcij, katere s pomočjo plektina in RACK1 prenašajo iz membran na druga citoplazemska mesta. Plektin interagira z intermediarnimi filamenti, tudi citokeratini in RACK1 interagira s plektinom med celično adhezijo. Tako CK8 in CK18 spremenita porazdelitev plektina v celici in prek spremenjenega signala RACK1 se spremeni od PKC odvisna interakcija z β 1 integrinom. RACK1 je adaptorski protein, ki poveže PKC z β 1 integrinom in inzulinskim receptorjem, kar vpliva na PI3K/Akt signalizacijo. RACK1, naj bi kot partner integrina β 1 in modulator c-Src reguliral G1/S tranzicijo neodvisno od ciklina D1 preko cMyc/ciklin A/Cdk2 odvisne poti. Povečana G1/S tranzicija je povezana z večjo koncentracijo ciklina A. Ciklin A in cMyC se inducirata z β 1 integrinom preko EGFR odvisne poti, v odsotnosti EGF. To se zgodi preko FAK (13). Fibronektin in integrin sprožita prenos signala iz zunanosti celice v celico, ki favorizira citoskeletne spremembe, potrebne za razraščanje celic. Ta signal vključuje povezavo nekaterih proteinov, med njimi tudi FAK proteina, ki je ključen za začetek signala in citoskeletnega proteina kot je vinkulin, ki pomaga pri spremembi v organizaciji aktina (13).

Citokeratini delujejo kot receptorji različnih proteinov, kot so trombin-antitrombin III kompleks, lipokortin-1, kininogen in plazminogen (20).

1.4. PLAZMINOGENSKI SISTEM

Invazija in metastaziranje rakavih celic sta odvisna od procesov, ki sestojijo iz več dejavnikov. Potrebna je aktivacija proteolitičnih encimov, kot so kolagenaze, katepsini, plazmin in aktivatorji plazminogena (21). Plazminogeni sistem ima pomembno vlogo pri razgradnji fibrina in pospešitvi migracije celic skozi zunajcelični matriks in bazalno membrano (22). Encimska kaskada, ki jo povzroči aktivacija plazminogena, se zgodi v mnogih fizioloških procesih, kot so fibrinoliza, celjenje ran, embriogeneza, invazija in migracija tumorskih celic (23).

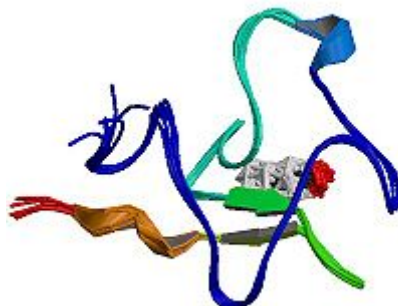


Slika 8: Shematski prikaz poteka fibrinolize (24).

1.4.1 PLAZMINOGEN

Plazminogen je glikoprotein sestavljen iz 791 aminokislin. Je proencim z N terminalno glutaminsko kislino, ima pet kringle domen, ki vsebujejo vezavna mesta za lizin in C terminalno proteazno domeno (25). Plazminogen se veže na celice z majhno afiniteto in visoko kapaciteto prek lizinskih vezavnih mest, saj prepozna lizine na C-terminalnem delu proteinov, ki so na celični površini (22).

t-PA je glavni aktivator plazminogena v krvi, u-PA pa je aktivator plazminogena v zunajceličnem matriksu.



Slika 9: Struktura plazminogena (26).

1.4.2. PLAZMIN

Plazmin je proteaza, ki cepi fibrin, veliko proteinov zunajceličnega matriksa (ECM), kot so fibronektin, von Willebrandov faktor, laminin, trombospodin, in aktivira metaloproteaze matriksa (MMP). Plazmin lahko vpliva na aktivacijo citokinov, rastnih dejavnikov in TGF - β . Tako plazmin direktno in indirektno olajša razgradnjo ECM in pospeši migracijo skozi ECM. Regulacija plazminogenih receptorjev predstavlja tarčo primarnega regulatornega mehanizma za kontrolo celičnega odgovora (25).

Encimska aktivnost topnega plazmina je kratka, zaradi hitre inaktivacije z α 2-antiplazminom. Vezava na celično površino varuje plazmin pred inaktivacijo (22). Poleg α -2 antiplazmina in alfa-2 makroglobulina, uravnava aktivnost plazmina še t-PA, u-PA, PAI-1 in PAI-2 (27).

1.4.3. PLAZMINOGENSKI RECEPTOR

Mnoge molekule imajo sposobnost vezave plazminogena. Receptor plazminogena mora vsebovati C- terminalen lizin, ki se lahko izpostavi tudi po cepitvi substrata ali pa se plazminogen veže neodvisno od lizina. Lys-plazminogen se aktivira hitreje kot Glu-plazminogen in hkrati pripomore k aktivaciji plazminogena v plazmin (28).

Burtin in sod. so že konec 80.let ugotovili, da imajo tumorske celice, ki izvirajo iz karcinoma debelega črevesja visoko vezavno kapaciteto za plazmin in prišli so do zaključka, da plazmin lahko pospeši svojo vezavo na tumorske celice (25). Stillfried in sod. so ugotovili, da je velika večina plazminogena, ki se veže na rakave celice dojke, regulirana z aktivnostjo plazmina. Tako so potrdili, da obstaja pozitivna zanka pri aktivaciji plazminogena, ki pripomore k invazivnosti rakavih celic (29).

Ranson in sod. so pokazali, da imajo metastatske celične linije raka dojke višjo vezavno kapaciteto kot nemetastatske rakave celice in, da metastatske celice uspešnejše pretvorijo plazminogen v plazmin. Torej je povečana ekspresija plazminogenih receptorjev na rakavih celicah dojke povezana s povečanim metastaziranjem. Niso uspeli dokazati, da blokada teh receptorjev zmanjša metastaziranje celic.

Pri raku jajčnikov in rakavih celic pljuč so s človeškim proteaznim inhibitorjem inaktivirali na receptor vezan plazmin in s tem povzročili inhibicijo invazije celic *in vitro* ter zmanjšanje števila metastaz v pljučih *in vivo*. Te raziskave kažejo, da s spremenjenim delovanjem plazminogenega receptorja lahko dosežemo klinične učinke.

Plazminogeni receptorji so uravnavani na dva načina. Prvi je proteazno odvisna pot, pri kateri proteaze cepijo substrate na površini celic in s tem povečajo vezavna mesta in vezavo plazminogena ter njegovo aktivacijo, kar se odraža v invaziji, metastaziranju in angiogenezi. Druga je proteazno neodvisna pot, ki se odraža v spremembi organizacije plazemske membrane ali citoskeleta in s tem povečanju vezavnih mest za plazminogen na površini celic (25). Ko celice migrirajo oziroma so neadherentne, se njihova vezavna kapaciteta poveča (22).

Če imamo povečano gostoto plazminogenih receptorjev, lahko ti receptorji koncentrirajo plazmin na površini celic in s tem povečajo razgradnjo specifičnih substratov plazmina (30).

In vitro in *ex vivo* študije so pokazale, da ima razgradnja proteinov zunajceličnega matriksa (fibronektin, laminin) s plazminom ključno vlogo pri adheziji. Ta proces potrebuje lizinska

vezavna mesta na fibrinu in celičnih površinah, na katera se veže plazminogen. Funkcionalna vezavna mesta na plazminogenu se nahajata na K1 in K4 domenah. Ho-Tin-Noe in sod. so s specifičnimi protitelesi proti vezavnim mestom za lizin na K1 (MAb 34D3) in proti vezavnim mestom za lizin na K4 (MAb A10.2) pokazali, da ima K1 domena primarno vlogo pri vezavi plazminogena na fibrin in na celice. Z MAb 34D3 so preprečili vezavo plazminogena na celice in fibrin. Protitelesa 34D3 koncentracijsko odvisno inhibirajo nastanek plazmina. Zaradi odsotnosti plazmina, se je povečala tudi adhezija celic (31).

Plazminogeni sistem ima dvojno vlogo, regulira pericelularno proteolizo in receptorje adhezije na površini celic. Primarno aktivira nastanek plazmina iz plazminogena. Plazmin pospeši razgradnjo fibrina, k tej razgradnji prispevajo tudi matriks metaloproteaze. Plazmin tako lahko razgradi fibrin in uniči anatomske bariere in tako omogoči migracijo celic. Poleg tega plazminogeni sistem interagira z vitronektinom in integrini ter na ta način regulira celično adhezijo in razgradnjo ECM. Ti dve funkciji sta povezani in vplivata na interakcije med samimi celicami in interakcijami med celicami in ECM. Tako plazmin poruši adhezijo, pritrjenost celic v matiksu (32).

1.4.4. PLAZMINOGEN IN CITOKERATINI

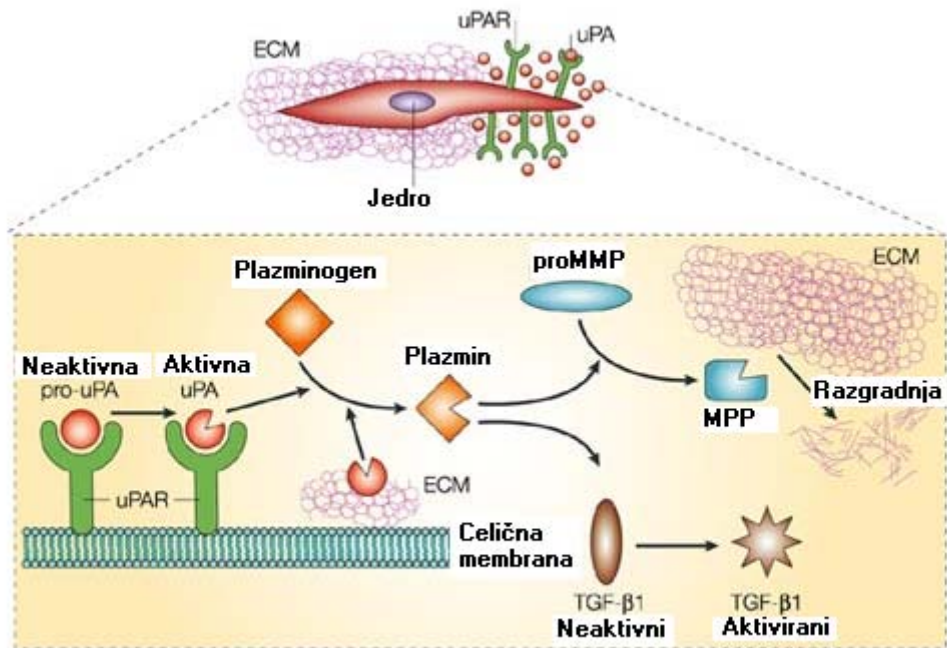
Študije kažejo, da deluje CK8 kot plazminogeni receptor. Ta funkcija je značilna le za CK8 med intermediatnimi filamentami. CK8 vsebuje C-terminalen lizin, ki je navadno potreben za sposobnost vezave plazminogena. Poleg tega vezavnega mesta pa se plazminogen veže tudi na druga vezavna mesta na citokeratinu, čeprav v manjši meri. Na CK8 in njegov vezavni partner CK18 se veže tudi tkivni plazminogeni aktivator (t-PA). t-PA in plazminogen tekujeta za vezavo na CK8. Tako so Kralovich in sod. pokazali, da je funkcionalna enota CK8, ki pospeši aktivacijo plazminogena s t-PA homodimer ali pa CK8/CK18 heterodimer. Plazminogen, vezan na površino celice, se hitreje aktivira s tkivnim plazminogenim aktivatorjem (t-PA) ali urokinaznim plazminogenim aktivatorjem (u-PA), in sicer CK8 pospeši aktivacijo plazminogena s t-PA tako da zmanjša K_M 2000 krat. To kaže, da CK8 tvori kompleks, ki vključuje t-PA in plazminogen (20). Tudi u-PAR tvori kompleks s CK8 in CK18 ter serinskimi kinazami (33).

CK8 se izraža na zunanji površini hepatocitov, pri karcinomu dojke in pri hepatocelularnem karcinomu. Zlasti pri celičnih linijah raka dojke (MCF 7) predstavlja CK8 večino vezavnih mest za plazminogen na celični površini. Citokeratini se v velikih količinah sproščajo iz rakavih celicah *in vitro* in karcinomov *in vivo*. Tudi topen CK8, ki se sprošča iz rakavih celic *in vivo*, pospeši aktivacijo plazminogena pri malignosti (27).

Aktivacija plazminogena na površini celic je lahko pomembna pri procesih, ki vključujejo migracijo celic, tumorsko invazijo in metastaziranje. Plazmin razgrajuje komponente zunajceličnega matriksa, hkrati vpliva na fenotip celice z vplivanjem na rastne dejavnike, receptorje rastnih dejavnikov ali pa na receptorje adhezije (25). Z u-PA posredovana aktivacija plazminogena je eden ključnih procesov pri invaziji in metastaziranju rakavih celic. Ne glede na količino vezanega plazminogena na celično površino, mora biti prisotna aktivna u-PA v zadostnih količinah, da se poveča aktivacija plazminogena. Večja kot je ekspresija u-PA, večja je aktivnost plazmina, ki pripomore k razgradnji zunajceličnega matriksa in pospešuje migracijo (30).

Hkrati vezava eksogene u-PA na njen receptor u-PAR koncentracijsko pogojeno trikratno poveča migracijo, brez zunajcelične proteolize, pri čemer u-PAR posreduje znotrajcelični signal, neodvisno od nastanka plazmina (30).

Nekatere bolj agresivne celične linije raka dojke imajo močno povišano aktivnost endogene u-PA in u-PAR, vendar nimajo povišane vrednosti CK8 na površini celic. Busso in sod. so identificirali u-PAR kot del makromolekulskega kompleksa, ki vključuje CK8, CK18 in protein kinazo C. Mehanizem povezave u-PAR s CK8 v tem kompleksu ni znan, vendar predvidevajo, da je ta povezava prisotna na površini celice. MDA-MB-231, ki velja za metastatsko celično linijo, ima na celico izraženih približno 70,000 u-PAR na celični površini, medtem ko MCF7 le 4,000 u-PAR. Velja, da metastatske linije aktivirajo plazminogen s pomočjo u-PA in imajo malo CK8 na površini celic (30).



Slika 10: Shematski prikaz vloge u-PA. Na invazivni fronti celic, ki migrirajo, u-PAR veže neaktivno pro-u-PA in jo spremeni v aktivno u-PA. Komponente ECM lahko nadomestijo u-PAR in vežejo u-PA, zaradi tega je u-PAR nepotreben v nekaterih procesih. Aktivna u-PA proteolitično spremeni zimogen plazminogen v aktivno obliko plazmin, ki razgrajuje komponente ECM ali aktivira rastne dejavnike, kot je TGF- β 1. Plazmin lahko razgradi ECM indirektno z aktivacijo matriks metaloproteinaz (34).

2. NAMEN DELA

Študije so pokazale, da je citokeratin 8 plazminogeni receptor in preko njega poteka celična signalizacija. Povezava citokeratinov s plazminogenim sistemom je pomembna, saj vemo, da ima plazminogeni sistem pomembno vlogo pri razgradnji zunajceličnega matriksa. Citokeratini bi lahko imeli pomembno vlogo pri invaziji ter migraciji raka dojke in so lahko možna tarča za zdravljenje raka dojke.

Monoklonska protitelesa smo pridobili iz hibridomske celične linije, ki je bila izselekcionirana kot α -CK MAb. Za določanje specifičnosti protiteles smo uporabili lizat celic raka dojke ali že sintetizirani dodekapeptid, za katerega je bilo dokazano, da se veže na protitelesa α -CK MAb. Dodekapeptid je bil sintetiziran na podlagi aminokislinskega zaporedja CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18, ki ga protitelesa prepoznavajo (35).

Naša delovna hipoteza: Protitelesa proti citokeratinom α -CK MAb vplivajo na nastanek plazmina in posredno na adhezijo, migracijo in invazijo, ki so ključni procesi pri razvoju raka.

Naš načrt dela je sledeč:

1. Pripravili bomo monoklonska protitelesa α -CK MAb, jih izolirali in očistili.
2. Preučili bomo ali α -CK MAb vplivajo na aktivacijo plazminogena.
3. Ugotavljanje posledic inhibicije nastanka plazmina na celične procese.

3.MATERIALI IN METODE

3.1.MATERIALI

3.1.1. Reagenti, raztopine, substrati:

- barvilo za celice Cell TraceTM CFSE Cell proliferation Kit (Invitrogen)
- BSA
- $C_4H_{11}NO_3$ (Promega, Madison, WI)
- $C_6H_8Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (Riedel-deHaën)
- $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (Riedel-deHaën)
- DMEM (ICN Bioedicals Inc., Irvine, ZDA)
- DMSO (Gibco BRL)
- EGF (Sigma, St. Lois, MO)
- etanol (Riedel-deHaën)
- FCS (Hyclone, Logan, ZDA)
- fibronektin (BD Bioscience, Bradford, MA)
- hidrokortizon (Sigma, St. Lois, MO)
- insulin (Sigma, St. Lois, MO)
- KH_2PO_4 (Riedel-deHaën)
- Goat Anti-Mouse IgG, HRP conjugate, Upstate, ZDA)
- L-glutamin (ICN Bioedicals Inc., Irvine, ZDA)
- Matrigel (BD Matrigel matrix)
- MTS (Promega, Madison, WI)
- Na_2CO_3 (Kemika)
- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Riedel-deHaën)
- NaCl (Kemika)
- $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Riedel-deHaën)
- $NaHCO_3$ (Riedel-deHaën)
- penicilin (Sigma, St. Lois, MO)
- plazminogen (Sigma)
- ProLong Antifade kit (Molecular Probes, Carelsbad, CA)

- propidijev jodid (BD Pharmingen, BD Bioscience)
- RNAza (Qiagen)
- streptomycin (Sigma, St. Lois, MO)
- substrat za uPA je D-Ala-Leu-Lys 7- amido-4-methylcoumarin, hidroklorid sol (Sigma, St. Lois, MO)
- TMB (Sigma, St. Lois, MO)
- Triton X 100 (Sigma, St Lois, MO)
- Tween (Serva)
- u-PA (Sigma)
- 0,05% P20 (Biacore AB, Uppsala, Švedska)

3.1.2 Gojišča

Kompletno gojišče za hibridome:

Za pripravo kompletnega gojišča sterilno odmerimo:

100 mL DMEM

15 mL FCS

1,2 mL L-glutamina

1,2 mL antibiotika

Premešamo in do uporabe hranimo v hladilniku.

Gojišča za MCF celice:

- Gojišče za MCF celice brez seruma:

98 mL advanced DMEM

1 mL glutamina

1mL antibiotika (penicilin/streptomycin)

100 μ L insulina

50 μ L hidrokortizona

40 μ L EGF

- Gojišče za MCF celice:

93 mL advanced DMEM

5 mL FCS

1 mL glutamina

1 mL antibiotika (penicilin/streptomycin)

100 μ L insulina

50 μ L hidrokortizona

40 μ L EGF

Zamrzovalno gojišče za hibridome:

Za pripravo zamrzovalnega gojišča sterilno odmerimo:

0,75 mL nekompletnega gojišča DMEM

0,6 mL FCS

150 μ L DMSO

Premešamo in do uporabe hranimo na ledu, da se primerno ohladi.

3.1.3. Celične linije in hibridomi

MCF 7 in MCF 10A neo T izvirata iz človeških epitelijskih celic dojke. Celična linija MCF 7 je bila pridobljena pri American Tissue Culture Collection (ATCC, Rokville, Maryland, ZDA). Celična linija MCF 10 A neo T je bila pridobljena pri prof. B.F.Sloane (Wayne State University, MI).

- MCF 7 so človeške celice raka dojke, ki se razraščajo kot epitelijske celice v monosloju. Izolirane so bile pri bolnici kavkazijskega porekla z metastatsko obliko raka dojke leta 1970.

- MCF 10A neo T je transformirana človeška epitelijska celična linija dojke. MCF 10 celična linija je bila izolirana pri bolnici s fibrocistično boleznijo dojke. Ta celična linija je v celični kulturi spontano postala nesmrtna. V prisotnosti normalnih koncentracij kalcija raste priraščena kot MCF 10A celična linija. Celično linijo MCF 10A neo T so pridobili s kotransfekcijo celic MCF 10A s plazmidom, ki je vseboval gen za odpornost na neomicin in onkogen c-Ha-ras z mutacijo humane oblike T24.

- hibridomska celična linija α -CK MAb: Hibridomi so bili že pripravljene s fuzijo limfocitov iz vranice miši, imunizirane z membransko frakcijo MCF 7 celic, in celic

mielomske celične linije. Selekcija je potekala v gojišču HAT, kjer preživijo samo stabilni kloni. Osamitev klona, ki izdeluje specifična MAb, je potekala z metodo omejenega redčenja. Določevanje specifičnosti MAb je potekalo z ELISA testom.

3.1.4. Pufri

Vežalni pufer: 0,14M fosfatni pufer s pH 8,2

Raztopina A: 24,9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 1000 mL

Raztopina B: 1,9g KH_2PO_4 / 100 mL

Raztopini A dodajaš raztopino B do vrednosti pH 8,2.

Pufer za eluiranje protiteles: 0,1M citratni pufer s pH 3,5

Raztopina A: 7,4g $\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 250 mL

Raztopina B: 24g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 1000 mL

Raztopini B dodajaš raztopino A do vrednosti pH 3,5.

Pufer za eluiranje protiteles: 0,1M citratni pufer s pH 2,5

Raztopina A: 7,4g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 250 mL

Raztopina B: 21g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ / 1000 mL

Raztopini B dodajaš raztopino A do vrednosti pH 2,5.

Raztopina za nevtraliziranje eluiranih frakcij protiteles: 1M Tris

6,1g Trisa ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) / 50 mL H_2O

PBS za protitelesa:

8,5g NaCl

1,34g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,43g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Pufer A:

1,6g Na_2CO_3

2,94g NaHCO_3

0,2g NaN_3 dopolnimo z destilirano vodo do 1000 mL in uravnamo pH na 9.

Pufer B:

8,5g NaCl

1,34g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2,94g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,5g Tween 20

Do 1 litra dvakrat destilirana voda in uravnamo pH na 7,2.

Pufer C, potreben za blokado prostih mest in redčenje primarnih in sekundarnih protiteles:

2g BSA v 100 mL pufra B.

3.1.5. Laboratorijska oprema in aparature

- komora z laminarnim pretokom (PIO SMBC 183 AV)
- magnetno mešalo (ROAMIX 550MM, Tehnica)
- mikroskop Nikon in Olympus
- okrogla stekla za mikroskop
- acetatno celulozni filter (0,8 μm , Sartorius)
- analizna tehtnica (EXACTA 610 EB)
- avtomatski spiralec za mikrotiterske plošče (TECAN M8/2R)
- celični inkubator (CB 210 BINDER)
- centrifuga (Sortvall RT7)
- pretočni citometer (BD FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickins Inc, USA)
- čitalec absorbance (SLT RAinbow)
- čitalec fluorescence Safire (Tecan/Genios)
- gojiščne plastenke (25 cm², 150 cm², TPP Tissue Culture Flasks)
- konično mešalo-vorteks (VIBROMIX 104EV)
- membranski filter za ultrafiltracijo (AMICON, YM3 62 mm)
- pH meter (HANNA HI9321 microprocessor pH meter)
- polavtomatske pipete (Eppendorf)
- posoda za sterilno filtracijo (Sartorius)

- posoda za ultrafiltracijo (AMICON)
- senzorski čip CM5 (Biacore)
- spektrofotometer (Perkin Elmer)
- SPR aparat Biocore X (Biacore)
- suhi inkubator (WTB Binder)
- Transwell (Coring Inc, NY)

3.2. METODE

3.2.1. PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES α -CK MAb

3.2.1.1. PRIRAŠČANJE HIBRIDOMOV

ODMRZOVANJE HIBRIDOMOV

Hibridomske celice, ki so bile pridobljene z imunizacijo miši z lizatoma membranske frakcije celične linije raka dojke, smo vzeli iz tekočega dušika in jih segreli na vodni kopeli pri temperaturi 37°C. Hibridome smo prenesli v centrifugirko in jim dodali kompletno gojišče za hibridome ter jih centrifugirali pri 1300 obratih na minuto 5 minut. Supernatant smo odstranili in celicam dodali 5 mL gojišča.

GOJENJE HIBRIDOMOV

Hibridome smo prenesli v malo gojiščno plastenko (25cm²) in jih gojili pri sterilnih pogojih v celičnem inkubatorju v vlažni atmosferi s 5% CO₂ pri 37°C. Z mikroskopom smo vsak dan opazovali rast celic. Postopoma smo dodajali gojišče in jih prenašali v dodatne platenke, da so bile celice ves čas v eksponentni fazi rasti. Ko se je namnožila zadostna količina celic, smo en del celic zamrznili, ostalim pa prenehali dodajati gojišče, tako da je prišlo do odmiranja celic. Suspenzijo celic šestih gojiščnih plastenok smo filtrirali in filtrat shranili pri -20°C.

ZAMRZOVANJE HIBRIDOMOV

Najprej smo določili št. celic na mL suspenzije s pomočjo citometra na mikroskopu. 100 μ L gojišča s celicami smo dodali 100 μ L nigrozina, ki obarva mrtve celice in prešteli vse žive celice pod mikroskopom. Iz enačbe smo izračunali število celic.

$$N=N_{\text{povo}} * V * X * 10^4$$

N_{povo} povprečno število prešteti celic

V-volumen gojišča

X-faktor redčenja

10^4 - faktor mrežice v mikroskopu

Gojišče s celicami smo centrifugirali pri 1300 obratih na minuto 5 minut. Celice smo resuspendirali v 0,15 mL nekompletnega gojišča DMEM, dodali še 0,6 mL FCS in 150 μ L DMSO in jih prenesli v 1,5 mL vialo za zmrzovanje. Vialo smo čez noč zamrznili pri -70 °C, naslednji dan smo jo shranili v tekočem dušiku pri -197°C.

3.2.1.2. IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTITELES

FILTRACIJA SUSPENZIJE CELIC

Celice smo centrifugirali in supernatant prefiltrirali skozi celulozni filter, da smo odstranili morebitno sluz in trde delce. S pomočjo vodne črpalke smo filtrirali na nuči skozi celulozno-acetatni filter s premerom 0,8 μ m, da smo odstranili odmrle celice.

KONCENTRIRANJE IN DIALIZA PROTI VEZAVNEM PUFRU

Filtrat smo koncentrirali na ultrafiltru. Ultrafiltracija do čim manjšega volumna se izvaja z nadtlakom dušika 3 atm in s stalnim mešanjem, ki preprečuje mašenje membrane zaradi usedanja netopnih delcev. Voda in manjše molekule iz vzorca gredo skozi pore, skoncentrirane makromolekule pa ostanejo na površini membrane. Nato smo dializirali proti vezavnemu pufri s pH 8,2 1:1, saj smo s tem razsolili in uravnali pH raztopine.

AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

V organizmu procesi temeljijo na specifičnih interakcijah bioloških makromolekul z drugimi molekulami, pravimo, da med njimi obstaja biološka afiniteta. Interakcije so nekovalentne, in zato reverzibilne. O afinitetni kromatografiji govorimo, ko eno od komponent para kovalentno vežemo na matriks. Na tako pripravljen gel nanesimo vzorec, kjer pride do adsorbcije druge komponente para (36). Imobilizirana komponenta je bila v našem primeru Protein G-Sefaroz, to 30-35 kDa velik protein, izoliran iz β -hemolitičnih streptokokov in se veže na Fc regijo IgG.

Postopek izvajana afinitetne kromatografije:

- a) Kolono s Protein G-Sefarozo speremo z vezalnim pufrom (trikratni volumen kolone) in pustimo, da vezalni pufer popolnoma odteče.
- b) Nanesimo vzorec na gel in ko se vzorec posede, kolono zapremo.
- c) Inkubiramo 60 minut pri sobni temperaturi, da pride do vezave protiteles na ligand.
- d) Kolono spiramo z vezalnim pufrom, dokler ne pade absorbanca pri 280 nm pod vrednost 0,010. S tem speremo nevezane snovi.
- e) Kolono spiramo z elucijskim pufrom s pH 3,5. Frakcije po 6 mL zbiramo v epruvete in posamezni frakciji izmerimo absorbanco. Frakcije z visoko absorbanco združimo, uravnamo pH s Tris pufrom na pH 7 in shranimo pri -20°C .
- f) Kolono spiramo z elucijskim pufrom s pH 2,5. Frakcije po 6 mL zbiramo v epruvete in jim izmerimo absorbanco. Frakcije z visoko absorbanco združimo in jim uravnamo pH s Tris pufrom na 7.
- g) Ob koncu dela smo kolono sprali z vezalnim pufrom, ki smo ji dodali etanol v razmerju 80:20.

Afinitetno kromatografijo smo zaradi velike količin protiteles izvedli petkrat.

DIALIZA PROTI PBS PUFRU

Vse frakcije, ki smo jih shranili, smo združili in jih z ultrafiltracijo skoncentrirali do volumna 10 mL. Potem smo jim trikrat dodali PBS v razmerju 1:2 in tako dializirali proti PBS pufri s pH 7,2.

STERILNA FILTRACIJA

Protitelesa smo s pomočjo injekcijske brizge prefiltrirali skozi filter s porami 0,22 nm. Prefiltriranemu vzorcu smo izmerili absorbanco pri 280 nm. Nato smo razdelili vzorce v vialo, v katere smo dali po 500 μ L vzorca.

DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTITELES

Koncentracijo smo določali spektrofotometrično. Osnova spektroskopskim analiznim metodam je interakcija svetlobne energije s preiskovanim vzorcem. Del molekule, ki je odgovoren za absorbcijo svetlobe, imenujemo kromofor ali kromoforni sistem. Aromatske aminokisliline v proteinih (triptofan, tirozin in v manjši meri tudi fenilalanin) močno absorbirajo pri 280nm (36).

Odnos med absorbanco, debelino sloja, ki ga obsevamo in koncentracijo raztopine opisuje Beer-Lambertov zakon:

$$A = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot b$$

A- absorbanca

E- molarni absorptivni koeficient (L/mol*cm)

c- molarna koncentracija (mol/L)

b- debelina vzorca (cm)

3.2.2. VREDNOTENJE PROTITELES

3.2.2.1. ELISA ali imunoencimski test na trdi podlagi

Metoda je uporabna za večje molekule, ki imajo vsaj dva ločena epitopa, ki se ne prekrivata. Odlikuje se po hitrosti in visoki občutljivosti, zato je najbolj uporabljena imunska metoda. Poznamo dve izvedbi ELISA testa: direktno in indirektno metodo. Uporabili smo indirektno metodo, pri kateri najprej na podlago naneseemo antigen, nato vežemo nanj primarno protitelo. Primarno protitelo prepoznamo s sekundarnim, ki je označeno.



Slika 11: Princip indirektne ELISA (37).

Postopek izvajanja indirektnega ELISA testa:

- a) En dan prej pripravimo lizate in jih damo čez noč v zamrzovalnik.
- b) Peptid s koncentracijo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nanese po 100 μL v stolpec A. V stolpec B nanese lizat MCF 10A neoT, v stolpec C lizat MCF 7. Oba lizata pripravimo z enako koncentracijo (1,685 mg/mL) in ju damo po 100 μL v ustrezno vdolbinico. Inkubiramo 24 ur pri temperaturi 4°C.
- c) Ploščo trikrat spiramo z avtomatskim spiralcem in osušimo.
- č) Dodamo blokado, po 100 μL 0,5 % Tweena v PBS v vdolbinico. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi.
- e) Dodamo po 100 μL raztopine protiteles, ki smo jih redčili po tabeli št.1 v pufri. Puffer za stolpec A je 0,5% Tween, za stolpca B in C pa puffer A.
- f) Inkubiramo 2 uri pri 37°C.
- g) Spiramo in osušimo ploščo.
- h) Dodamo v vsako vdolbinico 100 μL mešanice 0,5% Tweena in kozji mišji IgG.
- i) Inkubiramo 2 uri pri 37°C.
- j) Spiramo in osušimo ploščo.
- k) Pripravimo raztopino, ki vsebuje 5 mL TMB in 5 mL substratnega pufra in jo dodamo v vsako vdolbinico po 200 μL in počakamo 15 minut na modro obarvanje.
- l) Dodamo še 2M H_2SO_4 , ki prekine reakcijo in izmerimo absorbanco pri 450 nm.

Preglednica I: Redčitvena vrsta α -CK MAb:

	peptid	MCF 10A neoT	MCF 7	slepi vzorec
A	1/100	1/100	1/100	peptid
B	1/200	1/200	1/200	MCF 10A neo T
C	1/400	1/400	1/400	MCF 7
D	1/800	1/800	1/800	/
E	1/1600	1/1600	1/1600	/
F	1/3600	1/3600	1/3600	/
G	1/6400	1/6400	1/6400	/
H	1/16800	1/12800	1/12800	/

3.2.2.2. AKTIVACIJA PLAZMINOGENA V PLAZMIN

Fluorescenca je optični pojav, pri katerem fotoni, ki se absorbirajo v snovi, povzročajo oddajanje fotonov z daljšo valovno dolžino. Svetloba, ki pri fluorescenci prihaja v vzorec, se imenuje ekscitacijska svetloba, tista, ki jo snov oddaja, je emitirana svetloba. Količina emitirane svetlobe je sorazmerna s koncentracijo vzorca (9).

Postopek izvajanja testa:

Na ploščo s 96 vdolbnicami dodamo po 100 μ L celic s koncentracijo $2,5 \cdot 10^5$ MCF 10A neoT celic/mL. Inkubiramo 24 ur v atmosferi z 37°C in 5% CO_2 . Naslednji dan vzorce odstranimo in na ploščo dodamo 80 μ L gojišča. Potem dodamo še naša protitelesa s koncentracijami $2\mu\text{M}$, $0,5\mu\text{M}$, $0,25\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{M}$ in $0\mu\text{M}$ tako, da je posamezna koncentracija nanešena v eno vrstico. Inkubiramo 24 ur pri 37°C s 5% CO_2 . Potem spiramo s PBS in dodamo 50 μ L PBS s protitelesi. Pustimo 20 minut in dodamo u-PA, plazminogen in substrat. Vsakega po 2 μ L, tako, da je končna koncentracija plazminogena $0,25 \cdot 10^{-6}\text{M}$, u-PA $5 \cdot 10^{-11}\text{M}$ in substrata $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. Merimo fluorescenco z instrumentom Safire.

Pogoji meritev:

Ekscitacija: 370 nm

Emisija: 470 nm

Število kinetičnih ciklov: 40

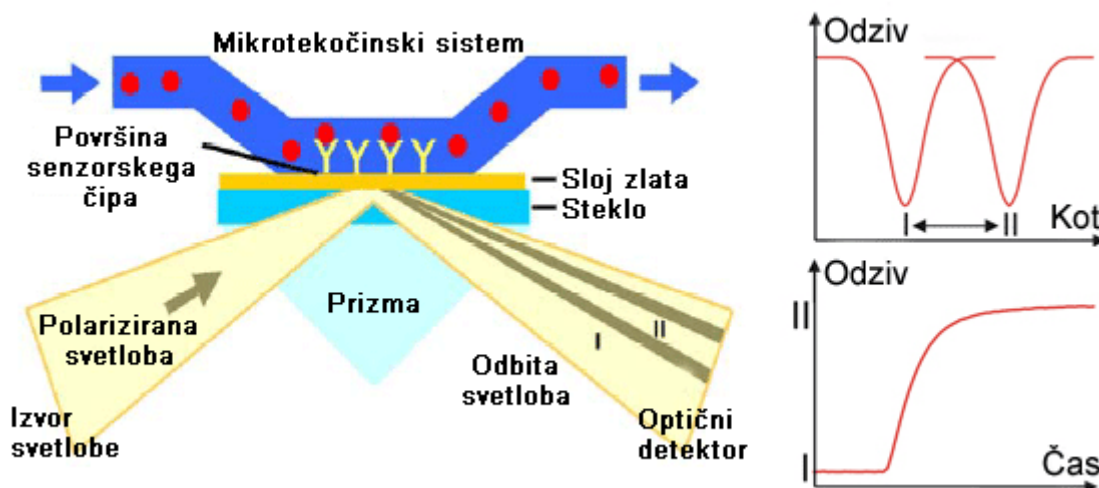
Interval kinetike: 120 sekund

Temperatura: 25-38°C

3.2.2.3. SPR (površinska plazmonska resonanca)

Na osnovi površinske plazmonske resonance merimo z refraktometrom hitrost asociacije in disociacije ter tako afiniteto interakcij med molekulami (38).

Tehnologijo Biacore sestavljajo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem. Mikrotekočinski sistem je sestavljen iz drobnih cevk, ki pripelje do površine senzorskega čipa raztopino molekule, ki jo želimo analizirati. Laser usmeri svetlobo skozi prizmo, prvi medij, na senzorski čip, ki predstavlja drugi medij z nižjim lomnim količnikom. Laserski snop je usmerjen pod takšnim kotom, da pride do popolnega odboja svetlobe. Na meji med obema medijema je tanek sloj zlata, ki lahko pod določenimi pogoji privzame del energije vpadne svetlobe. To zaznamo kot spremembo kota popolnega odboja. Ta pojav imenujemo površinska plazmonska resonanca (38).

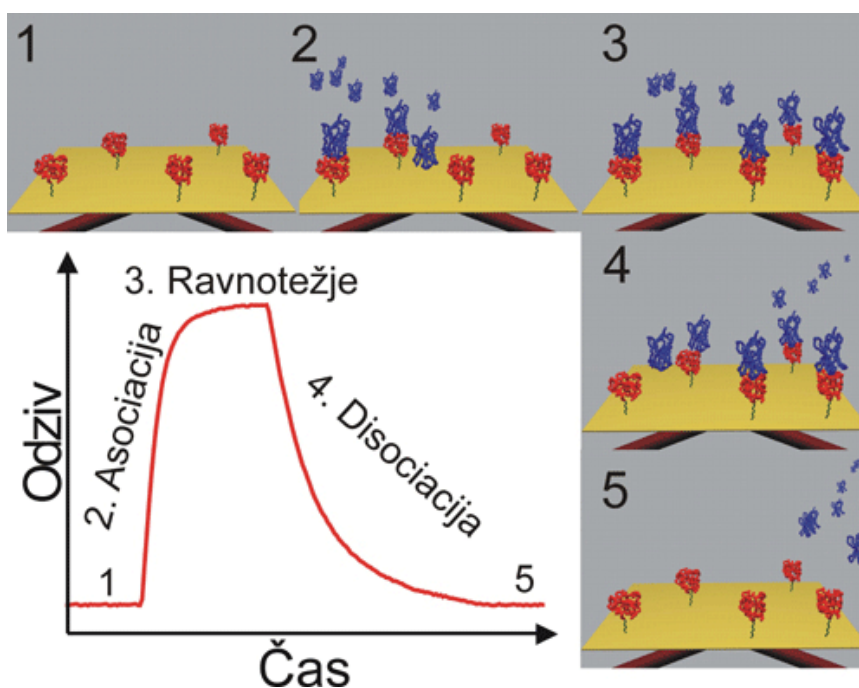


Slika 12: Shematski prikaz delovanja Biacore sistema (38).

Senzogram je krivulja, ki prikazuje spremembo intenzitete svetlobe v času in iz njih lahko določimo:

- ali se molekuli sploh vežeta,
- koliko analita je vezanega,
- kako hitro poteka vezava in disociacija in
- kakšna je afiniteta vezave med obema partnerjema.

V fazi asociacije se analit veže na ligand, kar se kaže kot porast signala na senzogramu. Ligand je vezan na senzorski čip. Ko so zasedena vsa vezavna mesta, pride do zasičenja in odziv se ustali pri neki vrednosti. Ko prenehamo vbrizavati vzorec preko senzorskega čipa, pride do disociacije, ko se analit počasi izplavlja iz liganda. Na koncu imamo na senzorskemu čipu vezan le ligand in zato je odziv enak kot na začetku (38).



Slika 13: Prikaz senzograma (38).

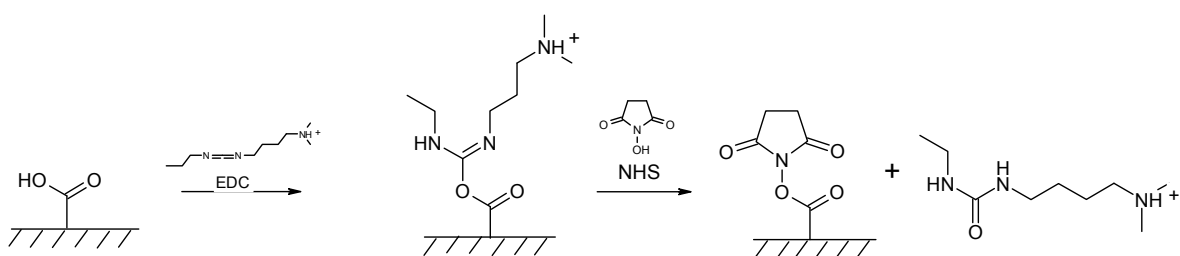
Prednosti SPR:

- molekul ni potrebno kemijsko spreminjati
- vezavo med molekulami spremljamo v realnem času
- potrebujemo zelo majhno količino ligandov in analitov
- interakcije lahko zasledujemo tudi v kompleksnih zmesih

Uporabili smo CM5 senzorski čip. Njegovo površino sestavlja karboksimetiliran dekstran, ki je vezan na zlato. Na površino CM5 čipa lahko vežemo molekule preko $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{OH}$ ali $-\text{COOH}$ skupin. CM5 čip ima visoko vezavno kapaciteto, kar omogoča visok odgovor.

Postopek izvajanja SPR metode:

1. Priprava celic za vezavo liganda: Celici spiramo dvakrat z imobilizacijskim pufrom.
2. Aktivacija karboksilnih skupin z 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidom (EDC) in N-hidroksisukcinimidom (NHS). EDC in NHS dodamo v razmerju 1:1. Dodamo ga 70 μL , 7 minut 5 μL na minuto.



Slika 14: Aktivacija karboksilnih skupin z EDC in NHS.

3. Vezava peptida: Injiciramo 45 μL peptida, ki je raztopljen v imobilizacijskem pufri. 5 minut, s pretokom 5 μL na minuto, vežemo le na drugo celico. Vežemo peptid še enkrat, injiciramo ga 35 μL s pretokom 3 μL na minuto.
4. Blokada: Blokiram proste aktivirane karboksilne skupine in spiramo nekovalentno vezan peptid z etanolaminom. Injiciramo ga 70 μL s pretokom 5 μL na minuto.
5. Spiramo z glicinom.
6. Vežemo u-PA v različnih koncentracijah.

3.2.2.4. ADHEZIJA

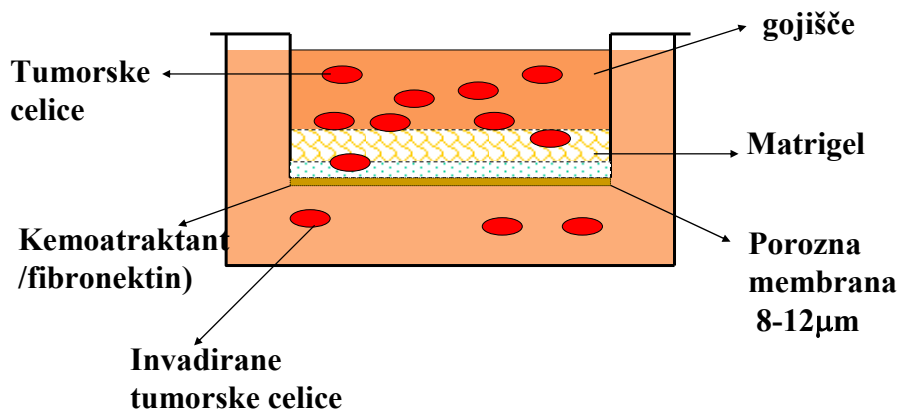
Postopek izvajanja testa:

- a) Predpriprava plošče: v vsako vdolbinico dodamo 50 μL fibronektina s koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in inkubiramo 24 ur pri 4°C .
- b) Ploščo spiramo s PBS.

- c) Blokiramo z 1% BSA v PBS. Dodamo 100 μ L v vdolbinice in pustimo 20 minut na sobni temperaturi.
- d) Ploščo spiramo s PBS.
- e) Dodamo naša protitelesa s koncentracijo 1 μ M v vdolbinico.
- f) Dodamo po 100 μ L naših celic s koncentracijo $3 \cdot 10^5$ MCF 7 celic/mL v vsako vdolbinico.
- g) Čez 30 minut dvakrat spiramo z 100 μ L PBS, nato dodamo 100 μ L gojišča brez seruma. To ponovimo vsako merjenje.
- h) Po 3 urah dodamo 20 μ L MTS v vdolbinico in inkubiramo 2 uri na 37°C.
- i) Izmerimo absorbanco pri 492 nm.

Adhezijo smo še enkrat ponovili. Držali smo se zgoraj napisanih navodil. Spremenili smo točko f, ker smo dodali naše celice s koncentracijo $2,56 \cdot 10^5$ MCF 10A neo T celic/mL. Dodali smo 15 μ L MTS v točki h.

3.2.2.5. INVAZIJA



Slika 15: Mehanizem testa invazije (6).

Postopek izvajanja testa:

- 1.DAN: Prestavimo celice v gojišče za MCF celice brez seruma.
- 2.DAN: Spodnjo stran polikarbonatne membrane z 12 μ m porami prekrijemo s 15 μ L fibronektina s koncentracijo 100 μ g/mL. Redčimo matrigel na 1 mg/mL v DMEM in ga dodamo 150 μ L v zgornjo komuri. Dodamo 17,5 μ L protiteles, netretiranim celicam pa

17,5 μ L PBS. Delamo v dveh paralelkah. Pustimo, da matrigel gelira eno uro. V spodnjo komuro damo 81,7 μ L protiteles, da bo končna koncentracija 1 μ M (imamo v spodnji komuri volumen 700 μ L), ker dodamo še 700 μ L DMEM. V zgornjo komuro dodamo 46,7 μ L protiteles in 46,7 μ L PBS netretiranim celicam. Nato dodamo DMEM in $2,5 \cdot 10^5$ MCF 10A neo T celic v zgornjo komuro. V drugo prazno komuro damo celice in 700 μ L DMEM (za 100% izračun). Inkubiramo 24 ur pri 37°C in z 5% CO₂.

3.DAN: Prestavimo raztopino v spodnji komuri v centrifugirke. Spiramo s 500 μ L PBS. Dodamo 1000 μ L 0,02% EDTA v PBS in 25 μ L tripsina. Prestavimo v iste centrifugirke in centrifugiramo pri 2000 obratih 5 minut. Resuspendiramo v 100 μ L gojišča za MCF celice in prestavimo v plošče za ELISA. Dodamo tudi gojišče za MCF celice v dve vdolbinici. Dodamo po 15 μ L MTS in inkubiramo 2 uri pri 37°C in 5% CO₂. Po dveh urah izmerimo absorbanco pri 492 nm.

$$\% = (\text{povprečje absorbanca} * 100) / \text{total}$$

3.2.2.6. MIGRACIJA

Postopek izvajanja testa:

1.dan: Prestavimo celice v gojišče za MCF celice brez seruma.

2.dan: Prekrijemo spodnjo plast por z 10 μ L fibronektina s koncentracijo 1 μ g/mL in počakamo, da se posuši. Dodamo protitelesa s koncentracijo 1 μ M. Dodamo še celice, da je njihova koncentracija $1,5 \cdot 10^5$ celic v zgornji komuri. Inkubiramo 24 ur pri 37°C in pri atmosferi s 5% CO₂, da poteče migracija.

3.dan: Iz spodnje komure damo celice v vialo. Speremo s 200 μ L PBS in dodamo v vialo. Nato dodamo 500 μ L PBS+0,02%EDTA in tripsin. Pustimo 5 minut pri 37°C z 5% CO₂. Speremo in dodamo v iste vialo kot prej. Centrifugiramo in celice resuspendiramo v 100 μ L PBS in prestavimo v ploščo z 96 vdolbinicami. Dodamo 15 μ L MTS in inkubiramo 2 uri, nato izmerimo absorbanco pri 492 nm.

3.2.2.7. PRETOČNA CITOMETRIJA

Laserski žarek osvetljuje posamezno celico, ki potuje v ozkem toku tekočine. Če celica vsebuje fluorokrom, se stimulira in emitira svetlobo specifične valovne dolžine, kar zazna detektor (9). S pretočno citometrijo lahko hitro in kvantitativno določimo nekatere karakteristike celice, kot na primer vsebnost DNA v tumorski celici.

PROLIFERACIJA

Postopek izvajanja testa:

- a) Predpriprava plošče z 12 vdolbinicami: ploščo prekrijemo s 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronektinom, 200 μL na vdolbinico in inkubiramo 24 ur pri 4°C.
- b) Spiramo z 1 mL PBS in blokiramo s 1% BSA v PBS, dodamo ga 500 μL .
- c) Resuspendiramo celice v PBS in dodamo barvilo za celice (redčeno 1/1000) v razmerju 1:1. Pustimo 10 minut v inkubatorju pri 37°C s 5% CO₂, nato pa damo petkratno količino mrzlega gojišča in pustimo 10 minut na 4°C. Centrifugiramo 4 minute pri 2000 obratih na minuto, jih razbijemo s PBS, dodamo še 10 mL PBS in centrifugiramo še 5 minut. Dodamo $2,5 \cdot 10^5$ celic v vdolbinico. Celice analiziramo z FACS, da določimo nastavitve meritev.
- d) Dodamo še naša protitelesa 1 μM in inkubiramo 48 ur pri 37°C z 5%CO₂.
- e) Celice tripsiniziramo, speremo s PBS in centrifugiramo 5 minut pri 2000 obratih na minuto. Celice resuspendiramo v 300 μL PBS in jih analiziramo z FACS, pri zgoraj določenih nastavitvah.

CELIČNI CIKEL

Postopek izvajanja testa:

- a) Predpriprava plošče z 12 vdolbinicami: ploščo prekrijemo s 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronektinom, 200 μL na vdolbinico in inkubiramo 24 ur na 4°C.
- b) Spiramo z 1 mL PBS in blokiramo s 1% BSA v PBS, dodamo ga 500 μL .
- c) Dodamo $2,5 \cdot 10^5$ celic na vdolbinico.
- d) Dodamo naša protitelesa s koncentracijo 1 μM in inkubiramo 48 ur pri 37°C.
- e) Vdolbinico speremo s PBS in vse prestavimo v centrifugirke.

- f) Dodamo 1 mL EDTA v PBS in 25 μ L tripsina, inkubiramo 5 minut pri 37°C.
- g) Spiramo z 1 mL PBS in vse zbiramo v iste centrifugirke kot prej.
- h) Centrifugiramo 5 minut pri 2000 obratih na minuto.
- i) Resuspendiramo v 200 μ L PBS in dodamo 4 mL mrzlega 70% etanola.
- j) Damo na led za 45 minut.
- k) Centrifugiramo 1500 obratih na minuto 15 minut, nato odpipetiramo etanol in resuspendiramo v 0,5 mL PBS.
- l) Dodamo 0,1% RNazo in 20 μ L 40 μ g/mL propidijevega jodida ter inkubiramo 30 minut pri 37°C.
- m) Izvedemo pretočno citometrijo.

3.2.2.8. MIKROSKOPIJA

- Postopek izvajanja fluorescenčne mikroskopije:

- a) Stekelca prekriljemo z 100 μ L 1 μ g/mL fibronektinom in inkubiramo 24 ur pri 4°C.
- b) Spiramo z PBS.
- c) Dodamo 0,5 mL BSA v PBS in pustimo 30 minut.
- d) Dodam celice in protitelesa, tako da je njihova koncentracija 1 μ M in inkubiramo 24 ur.
- e) Ploščo centrifugiramo, da fiksiramo celice, 2,5 minut na 1000 obratov na minuto.
- f) Speremo s PBS.
- g) Dodamo 850 μ L 4% paraformaldehida, da fiksiramo celice in inkubiramo 45 minut.
- h) Dodamo 1mL 0,1% TritonX100 v PBS in inkubiramo 10 minut.
- i) Speremo s PBS in dodamo 1mL 3% BSA v PBS in inkubiramo 10 minut.
- j) Na 2 steklci dodamo 100 μ L aktina in pustimo inkubirati na sobni temperaturi 30 minut. Potem steklce spiramo in ga posušimo, potem pa dodamo sekundarna protitelesa. Steklca fiksiramo z antifade reagentom.
- k) Inkubiramo na 4°C za 24 ur, nato jih zalepimo z lakom.
- l) Izvedemo fluorescenčno mikroskopijo.

- Svetlobna mikroskopija:

Ploščo smo prekrili z 200 μ L fibronektina s koncentracijo 1 μ g/mL in inkubirali 24 ur pri 4°C. Ploščo smo spirali s PBS in dodali $2,5 \cdot 10^5$ celic na vdolbinico. V eno vdolbinico smo dodali protitelesa s koncentracijo 1 μ M. Ploščo smo inkubirali 72 ur pri 37°C in 5 % CO₂. S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo opazovali, kako se celice pritrdijo na fibronektin.

4. REZULTATI

4.1. PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES

Po odmrzitvi smo hibridome prenesli v gojiščno plastenko velikosti 25 cm². Dva tedna smo dodajali sveže gojišče. Hibridomske celice so se hitro namnožile in jih je bilo potrebno prestaviti v 150 cm² velike gojiščne platenke. Ko je bilo v platenkah po 150 mL gojišča, jim pet dni nismo dodajali svežega gojišča. Tako so se celice namnožile do maksimalne gostote, potem pa začele lizirati in sproščati protitelesa v gojišče.

4.2. ČIŠČENJE IN IZOLACIJA

Ko smo namnožili protitelesa, jih je bilo potrebno najprej izolirati in očistiti. S filtracijo skozi filtrirni papir smo odstranili sluz, trdne delce, ostanke umrlih in liziranih celic. Po ultrafiltraciji in dializi smo jih očistili z afinitetno kromatografijo. Zaradi velike količine protiteles in omejene kapacitete kolone za izolacijo smo izolirali v petih serijah.

Preglednica II: Izpiranje α -CK MAb iz kolone (1. nanos).

št. epruvete	absorbanca	m _{MAb}	V _{frakcije}	uravnava pH
1.	-0,005	/	6 mL	Ne
2.	0,459	2,040mg	6 mL	1M Tris
3.	0,006	/	6 mL	Ne
4.	0,035	/	6 mL	Ne
5.	0,016	/	6 mL	Ne

$$m_{\text{MAb}} = A_{280} * V_{\text{frakcije}} * f_{\text{MAb}}$$

Preglednica III: Izpiranje α -CK MAb iz kolone (2. nanos).

št. epruvete	absorbanca	m _{MAb}	V _{frakcije}	uravnava pH
1.	0,048	0,213mg	6 mL	1M Tris
2.	0,454	2,018mg	6 mL	1M Tris
3.	0,016	0,071mg	6 mL	1M Tris
4.	0,019	/	6 mL	Ne
5.	0,014	/	6 mL	Ne

Preglednica IV: Izpiranje α -CK MAb iz kolone (3. nanos).

št. epruvete	absorbanca	m _{MAb}	V _{frakcije}	uravnana pH
1.	0,047	0,209mg	6 mL	1M Tris
2.	0,428	1,902mg	6 mL	1M Tris
3.	0,018	0,080mg	6 mL	1M Tris
4.	-0,048	/	6 mL	Ne
5.	0,019	/	6 mL	Ne

Preglednica V: Izpiranje α -CK MAb iz kolone (4. nanos).

št. epruvetke	absorbanca	m _{MAb}	V _{frakcije}	uravnava pH
1.	0,045	0,200mg	6 mL	1M Tris
2.	0,505	2,244mg	6 mL	1M Tris
3.	0,024	0,107mg	6 mL	1M Tris
4.	0,011	/	6 mL	Ne
5.	0,045	0,200mg	6 mL	1M Tris
6.	0,004	/	6 mL	Ne

Preglednica VI: Izpiranje α -CK MAb iz kolone (5. nanos).

št. epruvete	absorbanca	m _{MAb}	V _{frakcije}	uravnava pH
1.	0,019	0,084mg	6 mL	1M Tris
2.	0,577	2,564mg	6 mL	1M Tris
3.	0,043	0,191mg	6 mL	1M Tris
4.	0,012	0,053mg	6 mL	1M Tris
5.	-0,012	/	6 mL	Ne

4.3. DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTITELES

Združili smo vse frakcije, sprane z afinitetne kolone s pufrom pH 2,5 in jih ultrafiltrirali. Potem smo sterilno prefiltrirali protitelesa in jih razdelili v viale. Dobili smo 9 vial po 0,5 mL protiteles in jih shranili na -20°C do testiranja. Pred tem smo jim izmerili koncentracijo.

Spektrofotometrično lahko koncentracijo protiteles določimo po naslednji zvezi:

$$c_{\text{MAb}} = A_{280} * f_{\text{MAb}}$$

c_{MAb} = koncentracija protiteles v mg/mL

A_{280} = absorbanca pri valovni dolžini 280 nm

f_{MAb} = faktor protiteles: $1/\epsilon=0,7407$

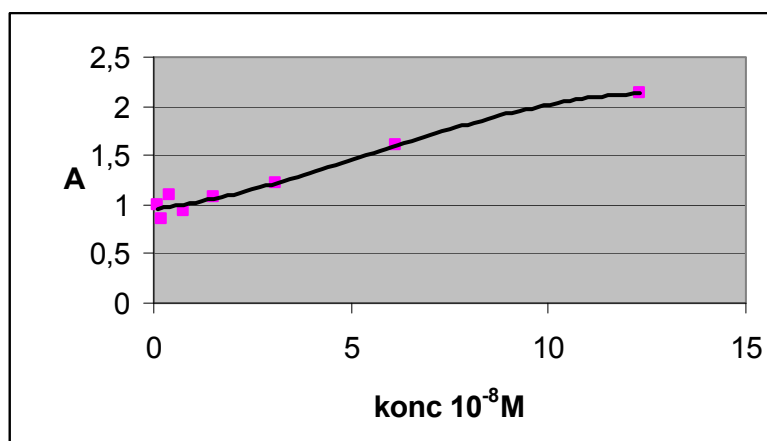
Koncentracija izoliranih protiteles je znašala **1,72 mg/mL**.

4.4. ELISA

Preglednica VII.: Rezultati vezave protiteles na peptid in MCF celice z indirektno ELISA.

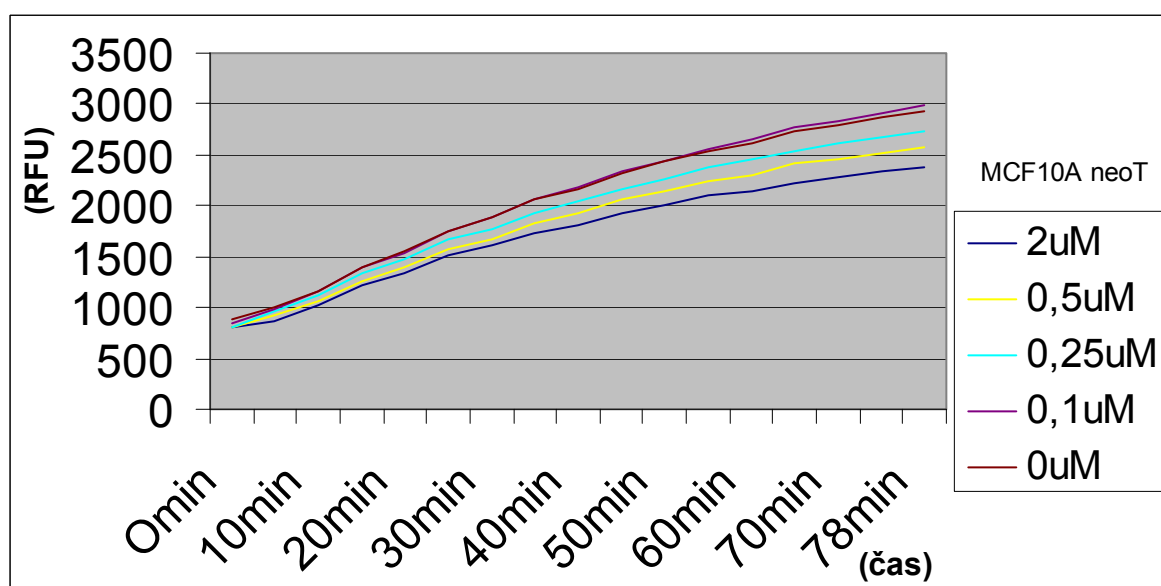
	Redčitve MAb	peptid	MCF 10A neoT	MCF 7
A	1/100	2,178	2,127	2,180
B	1/200	2,150	1,598	1,436
C	1/400	2,073	1,215	1,334
D	1/800	0,752	1,082	0,958
E	1/1600	0,389	0,929	0,921
F	1/3200	0,372	1,103	0,790
G	1/6400	0,253	0,844	0,795
H	1/12800	0,175	1,003	0,792

Z indirektnim ELISA testom smo želeli določiti afiniteto α -CK MAb do sinteznega dodekapeptida in antigenov na MCF 7 in MCF 10A neo T celicah. Iz grafa, ki prikazuje vrednosti absorbanc v odvisnosti od koncentracije protiteles, je razvidno, da absorbance naraščajo sorazmerno z naraščanjem koncentracije protiteles.



Slika 16: Prikaz ELISA testa na MCF 10 A neo T lizatu.

4.5. AKTIVACIJA PLAZMINOGENA V PLAZMIN

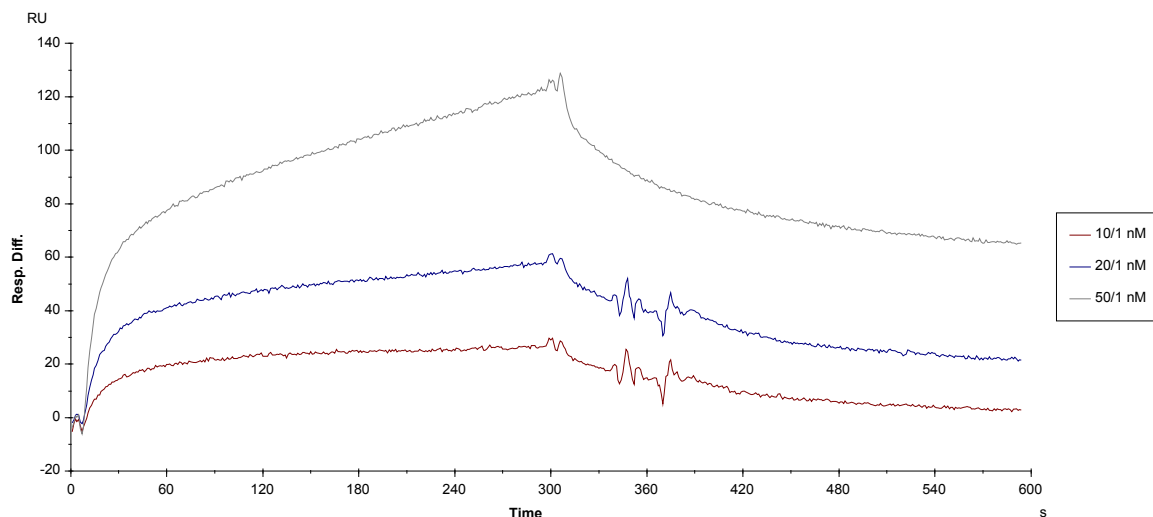


Slika 17: Aktivacija plazminogena v plazmin pri različni koncentraciji protiteles.

Pri tem testu smo merili fluorescenco nastalega produkta, ki nastane po cepitvi substrata, specifičnega za plazmin, pri nastanku plazmina iz plazminogena. Vidimo, da je ob prisotnosti 2 μM koncentracije protiteles fluorescentni produkt nastaja v manjši meri kot pri netretiranih celicah. Torej pri 2 μM koncentraciji protiteles nastane najmanj plazmina. Protitelesa inhibirajo aktivacijo plazminogena v plazmin, odvisno od koncentracije protiteles.

4.6. SPR

Z SPR metodo smo želeli dokazati, da se u-PA veže na dodekapeptid, ki ga specifično prepoznava tudi α -CK MAb. Iz senzograma je razvidno, da se u-PA veže na dodekapeptid koncentracijsko odvisno.

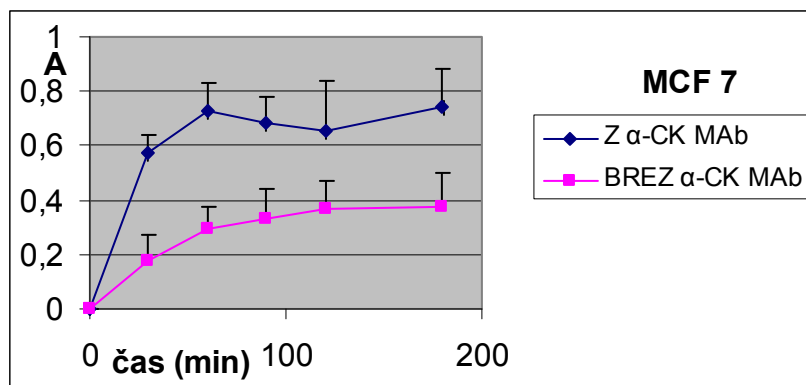


Slika 18: Senzogram, ki prikazuje vezavo u-PA na dodekapeptid.

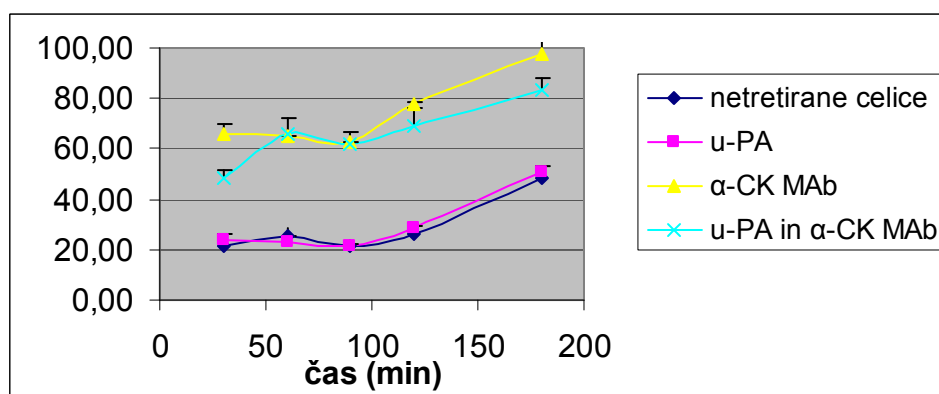
4.7. ADHEZIJA

Preglednica VIII: Rezultati absorbanca adheriranih celic.

MCF 7		Z α -CK MAb				BREZ α -CK MAb			
	čas	1	2	3	4	5	6	7	8
A	30 min	0,550	0,591	0,539	0,622	0,195	0,172	0,154	0,179
B	60 min	0,623	0,719	0,782	0,786	0,283	0,239	0,326	0,270
C	90min	0,722	0,678	0,590	0,736	0,296	0,384	0,318	0,330
D	120 min	0,556	0,550	0,700	0,800	0,357	0,328	0,362	0,418
E	180 min	0,593	0,801	0,809	0,771	0,406	0,328	0,337	0,420



Slika 19: Adhezija MCF 7 celic.

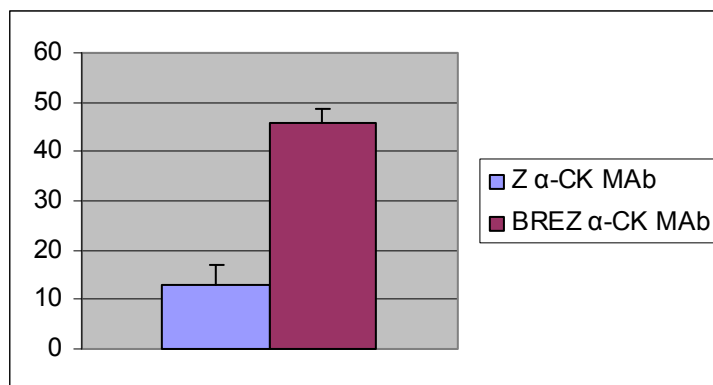


Slika 20: Adhezija MCF 10A neo T celic, ko je prisotna u-PA, protitelesa, u-PA in protitelesa in netretirane celice.

Gledali smo kakšna je adhezija celic na fibronektin v prisotnosti protiteles. Hoteli smo izvedeti, kako bi dodatek u-PA vplival na adhezijo celic, ki jo protitelesa značilno povečajo.

4.8. INVAZIJA

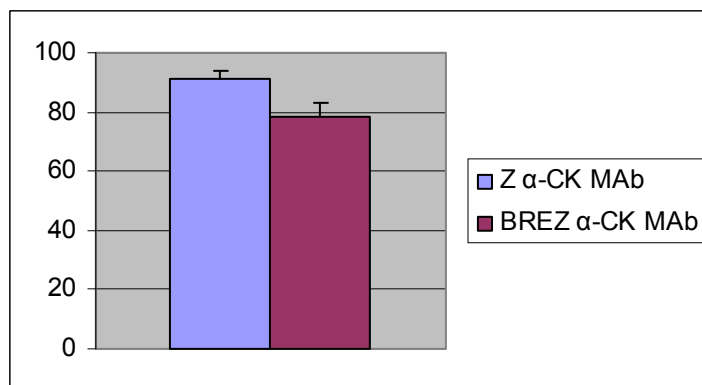
Pri tem testu smo gledali kakšen delež celic preide skozi matrigel in 12 μ m pore v filtru. 100% invazija pomeni, da bi skozi matrigel prešle vse celice, dodane v zgornjo komuro. Test invazije skozi matrigel je pokazal, je bila invazija za več kot 30% večja brez dodanih protiteles kot s protitelesi. Ta razlika je tudi statistično značilna saj je $p < 0,05$. Test ponazarja invazijo celic skozi zunajcelični matriks. Pri prehodu je potrebna razgradnja matrigela.



Slika 21: Test invazije skozi matrigel, ko so prisotna protitelesa in brez njih.

4.9. MIGRACIJA

Pri testu migracije smo opazovali, koliko celic preide iz zgornje v spodnjo komuro, pri čemer je bila spodnja stran 8 μ m porozne membrane prekrita s fibronektinom. Po dodatku protiteles je prešlo 91% vseh celic, brez protiteles pa 78%. Razlika je statistično značilna $p < 0,05$. Podobno kot pri adheziji celic na fibronektin, je tudi migracija ob prisotnosti protiteles večja kot brez protiteles.



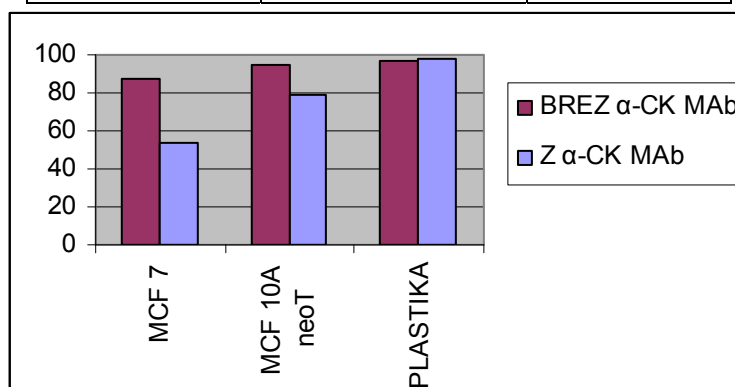
Slika 22: Migracija MCF 10A neo T celic s protitelesi in brez njih.

4.10. PRETOČNA CITOMETRIJA

PROLIFERACIJA

Preglednica IX: Rezultati proliferacije celic.

	BREZ α -CK MAb	Z α -CK MAb
MCF 7	87,88	54
MCF 10A neoT	94,98	79,03
PLASTIKA	96,33	97,51



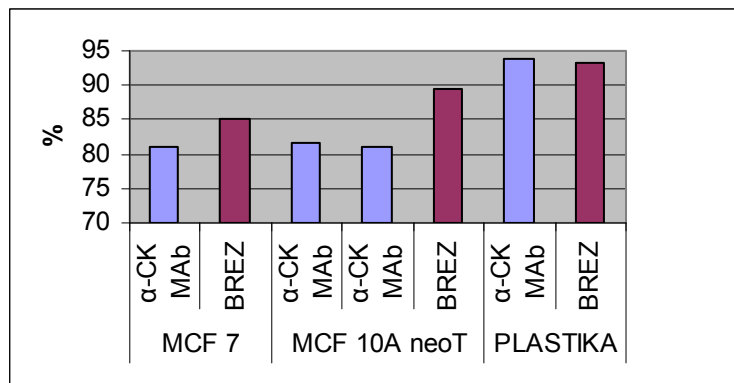
Slika 23: Prikaz proliferacije celic.

CELIČNI CIKEL

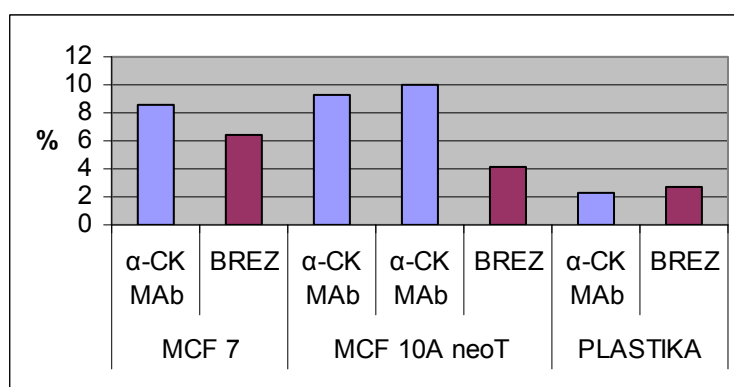
Številke prikazujejo v kateri fazi je celica v celičnem ciklu. Prikazuje deleže celic v G₀/ G₁, S, G₂/M fazi in celice v apoptozi.

Preglednica 10: Porazdelitev celic glede na to, v kateri fazi celičnega cikla so.

faza	MCF 7		MCF 10A neoT			PLASTIKA	
	Z α -CK MAb	BREZ α -CK MAb	Z α -CK MAb	Z α -CK MAb	BREZ α -CK MAb	Z α -CK MAb	BREZ α -CK MAb
G ₀ /G ₁	81	85	81,51	80,93	89,61	93,91	93,22
S	8,55	6,5	9,28	10,00	4,14	2,35	2,70
G ₂ /M	5,57	4,9	5,32	5,18	4,04	2,78	2,89
apoptoza	5,9	4,15	5,08	5,27	2,63	1,02	1,23



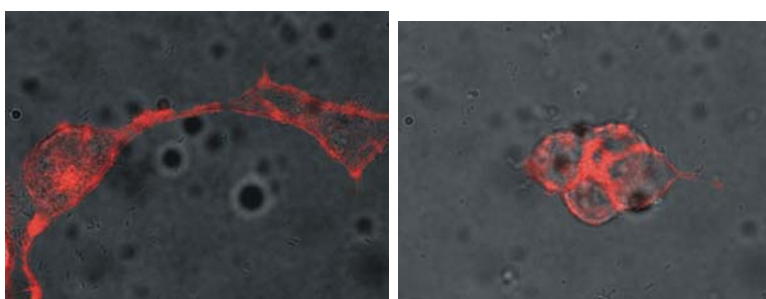
Slika 24: Delež celic v G1 fazi.



Slika 25: Delež celic v S fazi.

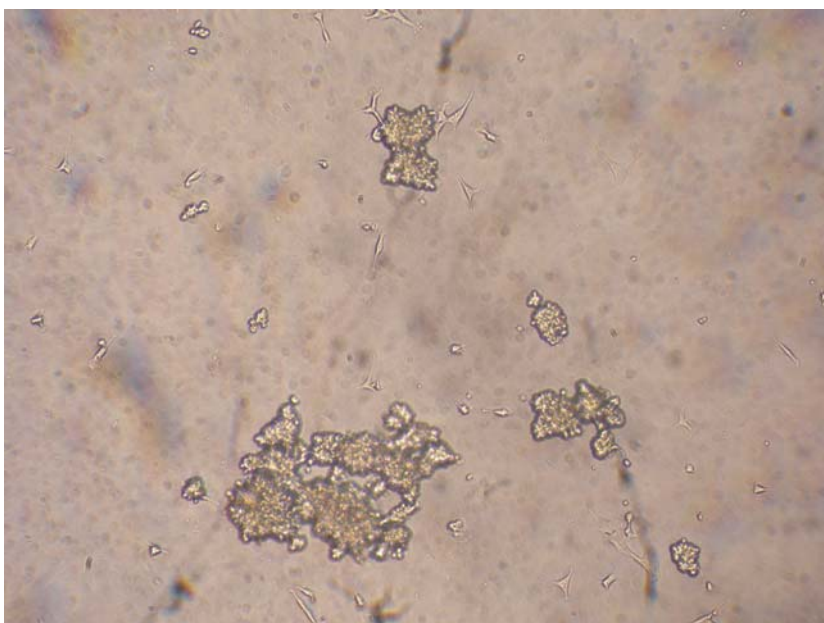
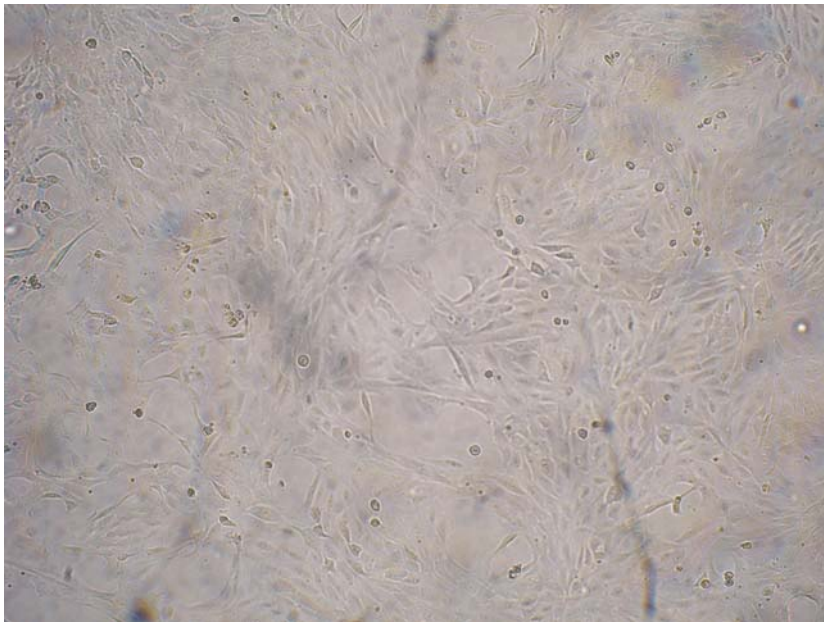
4.11. MIKROSKOPIJA

- FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA



Slika 26: Prikaz porazdelitve aktina, pri inkubaciji celic s protitelesi (levo) in brez njih (desno). Vidimo, da je aktin v prisotnost protiteles porazdeljen perinuklearno kot tudi ob membrani, medtem ko je brez prisotnosti protiteles večinoma porazdeljen ob celični membrani.

- SVETLOBNA MIKROSKOPIJA



Slika 27: Adhezija celic na fibronektinu s protitelesi (zgoraj) in brez njih (spodaj). Vidimo, da so celice ob prisotnosti protiteles pritrjene, medtem ko so netretirane celice povezane v celične skupke in prosto plavajo v gojišču.

5. RAZPRAVA

Pripravili smo monoklonska protitelesa α -CK MAb. Hibridomske celice so bile predhodno pripravljene s fuzijo mielomskih celic in mišjih limfocitov B, imuniziranih z MCF 7 membransko frakcijo. Hibridomske celice smo namnožili in jih gojili do največje gostote. Protitelesa, ki so jih sprostili v gojišče, smo izolirali z afinitetno kromatografijo z uporabo elucijskega pufru s pH 2,5. Izkoristek izolacije je bil 7,88 mg na liter gojišča. Koncentracijo izoliranih protiteles smo določili spektrofotometrično in je znašala 1,72 mg/mL.

Bilo je že ugotovljeno, da se na dodekapeptid, ki je bil sintetiziran na podlagi aminokislinskega zaporedja CK1, CK2, CK8, CK10 in CK18, veže α -CK MAb. Z metodo SPR smo želeli pokazati, da se na dodekapeptid veže tudi u-PA. To je razvidno iz dobljenega senzograma, vezava pa je odvisna od koncentracije. Ker se u-PA veže na isti dodekapeptid kot α -CK MAb in ker je bil dodekapeptid sintetiziran na podlagi aminokislinskega zaporedja citokeratinov, lahko sklepamo, da se α -CK MAb veže na tumorskih celicah na mesto, kjer bi se u-PA in prepreči njegovo delovanje.

Znano je, da plazminogeni sistem vpliva na adhezijo celic. V poizkusu z MCF 7 celicami smo primerjali adhezijo celic ob prisotnosti α -CK MAb in z u-PA netretiranih celic. V grafu, ki prikazuje časovni potek adhezije, vidimo, da se netretirane celice tudi po treh urah ne adherirajo v tolikšni meri kot se pritrdijo celice ob prisotnosti protitelesa že po tridesetih minutah. Poizkus smo ponovili tudi z MCF 10A neo T celicami in videli, da je po treh urah s protitelesi pritrjenih 97% celic, brez protiteles pa 48%. Torej polovica manj. Pri drugem poskusu smo dodali še u-PA. Iz grafa (slika 20) je razvidno, da je časovni potek adhezije netretiranih celic in u-PA tretiranih celic primerljiv. Dodatek u-PA k protitelesom statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjša adhezijo. Statistično značilna razlika je bila opažena tako po 30 minutah kot po 180 minutah. Večja adhezija celic s protitelesi kot pri netretiranih celicah je razvidna tudi iz rezultatov svetlobne mikroskopije. To je zelo pomembno, saj večja adhezija celic pomeni manjšo migracijo in invazijo celic.

Celice se adherirajo na ECM. Za to vezavo poskrbijo integrini, njihovi ligandi, znotrajcelični proteini, ki se povežejo z integrini, in FAK. Večjo adhezijo celic po dodatku protiteles lahko razložimo z inhibicijo nastanka plazmina. Ko smo pobarvali celice z aktinom, smo videli, da se v prisotnosti protiteles spremeni tudi porazdelitev aktina. Lahko sklepamo, da pride do sprememb v organizaciji citoskeleta, kar dodatno pripomore k večji adheziji celic. Tan in sod. so pri raku trebušne slinavke proučeval vlogo plazmina na disociacijo in nadaljno invazijo celic. Ugotovili so, da je ekspresija plazmin(ogen)a v nemalignih tkivih šibka, ekspresije u-PA in u-PAR pa niso zaznali. Plazmin(ogen), u-PA in u-PAR so bili prekomerno izraženi v malignih tkivih. Pokazali so tudi, da je bila ekspresija plazmin(ogen)a in u-PAR večja na invazivni fronti, kot v centru rakavega tkiva. Ko so tretirali manj invazivne celice z u-PA, so opazili povečano izražanje plasmin(ogena) ter disociacijo celic, kar je prva pomembna stopnja pri invaziji (39). Pri tej študiji so dokazali, da nastanek, izločanje ter aktivacija plazminogena omogoča razgradnjo zunajceličnega matriksa in da plazminogen vpliva na adhezijo celic in posledično na invazijo tumorja. Ta študija je obravnavala raka trebušne slinavke (39), vendar lahko sklepamo, da se podobno zgodi pri rakavih celicah dojke. Reinartz in sod. so tudi dokazali, da plazmin, ki nastane z u-PA posredovano aktivacijo na celični površini, prepreči adhezijo človeških keratinocitov HaCaT na vitronektin zaradi proteolitične razgradnje vitronektina (40).

Da povečana adhezija celic zmanjša invazijo, smo dokazali s testom invazije matrigela. Z dodatkom protiteles se je invazija značilno zmanjšala. Da je plazmin ključen pri procesu adhezije, je proučeval tudi M.H.Chun na celičnih linijah raka dojke, ki rastejo pritrjene v monosloju. Z dodatkom plazmina je dosegel, da so se celice odlepile od podlage in da so rastle kot plavajoči večcelični sferoidi. Sferoidi so nastali tudi, ko jim je dodal gojišče brez inhibitorjev plazminogenskih aktivatorjev. Celice v sferoidu tvorijo večje količine ECM, ki za razliko ECM, ki ga tvorijo celice v monosloju, vsebuje fibronektin. Ko je celicam dodal novo gojišče z inhibitorji, so se sferoidi v 24 urah pritrdili v monosloj. Nastanek večceličnih sferoidov ni vplival na hitrost proliferacije. Ko celice postanejo maligne, se na njihovi membrani aktivira plazmin in njihova morfologija se spremeni iz enoslojne epiteljske v multicelične skupke. Tvorba večceličnih skupkov je značilna za mikrometastazne celice raka dojke (41).

Vidimo, da citokeratini znatno spremenijo signaliziranje v celici, kar se vidi kot povečana adhezija celic. Sprememba celičnega signaliziranja je vidna tudi pri prestrukturiranju aktina. Spremembe so se odražale tudi pri celičnem ciklu. Pri tem je bila povečana G1/S tranzicija pri celicah, tretiranih s protitelesom in gojenih na fibronektinu, medtem ko na plastiki ni bilo videti razlik v celičnem ciklu. Pri tretiranju celic s protitelesom so celice manj proliferirale kot pri netretiranih celicah.

Glede na dejstvo, da pri maligni pretvorbi pride do dediferenciacije celic, ki se nenadzorovano delijo, je torej regulacija njihove proliferacije bistvenega pomena. Zanimivo bi bilo preučiti, kakšen vpliv ima tretiranje celic s protitelesi proti citokeratinom na diferenciacijo celic, saj je znano, da je prisotnost plazminogena v epidermalnih celicah kazalec nediferenciranosti celic (42). Plazminogen se tekom epidermalne maturacije porablja in plazmin, ki nastane po delovanju PA v keratinocitih, naj bi igral vlogo pri diferenciaciji epidermisa (42). Citokeratini imajo poleg strukturne tudi regulacijsko vlogo. Možno je, da citokeratini delujejo kot receptorji za u-PA na površini celice. To potrjujejo zadnje študije regulacijske vloge citokeratinov, ki vključujejo kot ligande molekule kot so FAK, MAPK, TGF- β 1, PKC, EGF, PI3K, src in integrin, za katere je znano, da interagirajo tudi z u-PAR.

6. SKLEP

Rak dojke je pri ženskah v razvitih državah najpogostejša oblika raka in tudi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka. Vse hitrejši razvoj molekularne biologije vodi ne le k boljšemu poznavanju bioloških lastnosti tumorjev, ampak tudi k hitrejšemu razvoju novih tarčnih zdravil, ki delujejo usmerjeno na posamezne biološke značilnosti tumorja.

V diplomski nalogi smo obravnavali protitelesa proti CK in s funkcijskimi testi pokazali, da protitelesa povečajo adhezijo celic na fibronektin, zmanjšajo proliferacijo in invazijo celic skozi matrigel. Protitelesa spremenijo celično signaliziranje ter vplivajo na ključne procese v celici - invazijo in migracijo celic.

Pri zdravljenju raka dojke je povečana membranska ekspresija citokeratinov, povečana dediferenciacija in proliferacija rakavih celic, proteoliza ter razgradnja zunajceličnega matriksa in s tem povečana invazija ter metastaziranje. Protitelesa proti CK *in vitro* zavirajo te pomembne procese in so potencialno uporabna tako v terapiji kot diagnostiki rakavih obolenj.

7. LITERATURA

1. M. Vergelj Pirc: Hormonsko zdravljenje raka dojke, Društvo onkoloških bolnikov slovenije, Ljubljana, 2004: 9-14, 31
2. Granada U., Makovac S., Kastelic S., Stažičar M., Jakovac M., Rugel B.: Hormoni in rak, Seminarska naloga pri predmetu Biokemija nastanka in napredovanja raka, Ljubljana, 2007: 8-12
3. Kaučič M.: Kirurško zdravljenje raka dojke in rekonstrukcija dojke, Društvo onkoloških bolnikov Slovenije, Ljubljana, 2006: 9
4. Cotran R.S., Kumar V., Collins T.: Pathologic basis of disease, 6. izdaja, Saunders company, New York, 1999: 321-325, 1104-1117
5. Vozelj M.: Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000: 47-74
6. J. Kos: Biokemija napredovanja in nastanka raka, skripta predavanj, Ljubljana, 2006
7. <http://www.aecom.yu.edu/cancer/new/cores/hybridoma/>
8. http://www.4-antibody.com/images/therapeutic_abs.jpg
9. Štrikelj B., Kos J.: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 164, 177, 178, 532-578
10. Grossbard M.L.: Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer, Marcel Dekker Inc, New York, 1998: 309-338
11. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Molecular biology of the cell, 4. izdaja, Taylor and Francis group, New York, 2002: 923-925, 1261
12. Karlovich K.R., Li Li, Hemburg T.A., Webb D.J., Karns L.R., Gonias S.L.: Characterization of the Binding Sites for Plasminogen and Tissue-Type Plasminogen Activator in Cytokeratin 8 and Cytokeratin 18, Journal of Protein Chemistry, 1998; 17: 845-853
13. Galarneau L., Lornger A., Gilbert S., Marceau N.: Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition, Eksperimental Cell Research, 2007; 313: 179-194
14. Omary M.B., Coulombe P.A., McLean W.H.I.: Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases, N ENGL J MED, 2004; 351: 2087-2098
15. Seyun K., Wong P., Coulombe P.A.: A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth, Nature, 2006; 44: 362-365
16. <http://www.molecularexpressions.com/cells/intermediatefilaments/images/intermediatefilamentsfigure1.jpg>

17. Upsani O.J., Vaidya M.M., Bhisey A.N.: Database on monoclonal antibodies to Cytokeratin, *Oral Oncology*, 2004; 40: 236-256
18. Gires O., Andratschke M., Schmitt B., Mack B., Schaffrik M.: Cytokeratin 8 associates with the external leaflet of plasma membranes in tumor cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 238: 1154-1132
19. Magin T.M., Vijaraj P., Leube R.E.: Structural and regulatory functions of keratins, *Experimental Cell Research*, 2007; 313: 2021-2032
20. Kralovich K.R., Li Li, Hembrough T.A., Webb D.J., Karns L.R., Gonias S.L.: Characterization of the Binding Sites for Plasminogen and Tissue-Type Plasminogen Activator in Cytokeratin 8 and Cytokeratin 18, *Journal of Protein Chemistry*, 1998; 17: 845-854
21. Esteva F.J., Hortibagyi G.N.: Prognostic molekular markers in early breast cancer; *Breast Cancer Res*, 2004; 6: 109-118
22. Plow E.F., Herren T., Redlitz A., Miles L.A., Hoover-Plow J.L.: The cell biology of plasminogen system *FASEB J.*, 1995; 9: 939-945
23. Hyoung-Min Kang, Kyu-Sil Choi, Kassam G., Fitzpatrick S.L., Mijung Kwon, Waisman D.M.: Role of annexin II Tetramer in plasminogen aktivation, *TCM*, 1999; 9: 92-102
24. Axelsson F.: Plasminogen Monograph 1995, Chromagenix AB, 1995: 4
25. Herren T., Swisgood C., Plow E.F.: Regulation of plasminogen receptors, *Frontiers in Bioscience*, 2003; 8: 1-8
26. <http://en.wikipedia.org/wiki/Plasmin>
27. Hembrough T.A., Kralovich K.R., Li Li in Gonias S.L.: Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells *in vitro* binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation, *Biochem. J.*, 1996; 317: 763-769
28. Miles L.A., Castellino F.J., Yun Gong: Critical role of Glu-Plasminogen to Lys-Plasminogen for Optimal Stimulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces, *TCM*, 2003; 13: 21-30
29. Stillfried G.E., Saunders D.N., Ranson M.: Plasminogen binding and activation at the breast cancer cell surface: the integral role of urokinase activity, *Breast Cancer Research*, 2007; 9: 1-11

30. Gonias S.L., Hembrough T.A., Sankovic M.: Cytokeratin 8 functions as a major plasminogen receptor in select epithelial and carcinoma cells, *Frontiers in Bioscience*, 2001; 6: 1403-1411
31. Benoit Ho-Tin-Noe, Rojas G., Vranckx R., Lijnen H.R., Angles-Cano E.: Functional hierarchy of plasminogen kringle 1 and 4 in fibrinolysis and plasmin-induced cell detachment and apoptosis, *The FEBS Journal*, 2005; 272: 3387-3400
32. Del Rosso M., Fibbi G., Pucci M., D'Alessio S., Del Rosso A., Magnelli L., Chiarugi V.: Multiple pathways of cell invasion regulated by multiple families of serine proteases, *Clinical and Experimental Metastasis*, 2002; 19: 193-2002
33. Busso N., Masur S.K., Lezega D., Waxman S., Ossowski L.: Induction of Cell Migration by Pro-urokinase Binding to Its Receptor: Possible Mechanism for Signal Transduction in Human Epithelial Cells, *The Journal of Cell Biology*, 1994; 126: 259-270
34. Blasi F., Carmeliet P.: uPAR: A versatile signalling orchestrator, *Nature*, 2002; 3: 936
35. Zaloker U.: Vrednotenje monoklonskih protiteles proti človeškim citokeratinom, *Diplomska naloga*, Ljubljana, 2007
36. Kuhelj R.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, FKKT, 3. izdaja, Ljubljana, 2003: 28-32,50
37. www.sahandafshanteb.com/asset/Images/pic1.gif
38. <http://web.bf.uni-lj.si/sprcenter/Tehnologija.html>
39. Tan X., Egami H., Nozawa F., Abe M., Baba H.: Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: Involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells, *International Journal of Oncology*, 2006; 28: 369-374
40. Reinartz J., Schafer B., Batrla R., Klein C.E., Kramer M.D.: Plasmin abrogates α V β 5-mediated adhesion of a human keratinocyte cell line (HaCaT) to vitronectin, *Experimental Cell Research*, 1995; 220: 274-282
41. Chung M.H.: Plasmin induces the formation of multicellular spheroids of breast cancer cells, *Cancer Letters*, 1997; 117: 51-56
42. Isseroff R.R., Rifkin D.B.: Plasminogen is present in the basal layer of the epidermis, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1983; 80: 297-299