

Učinak izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta, lipopolisaharida i lipoteikoične kiseline na aktivnosti kaspaza-3/-7, -8 i -9 u 16HBE bronhijalnim epitelnim stanicama

Jarni, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:976505>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



VERONIKA JARNI

**Učinak izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima
cigareta, lipopolisaharida i lipoteikoične kiseline
na aktivnosti kaspaza-3/-7, -8 i -9 u 16HBE
bronhijalnim epitelnim stanicama**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.



Ovaj diplomski rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-12.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći, razumijevanju i strpljenju. Posebno se zahvaljujem mojoj mentorici, Aniti Somborac Bačura na uloženom trudu, savjetima i pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujem se i svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tokom svih ovih godina. Veliko hvala i svim mojim prijateljima koji su uvijek bili tu i nezaboravnim uspomnama mi uljepšali godine studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB).....	1
1.1.1. Patogeneza KOPB-a.....	2
1.1.2. Molekularni mehanizmi u pozadini-urođena i stečena imunost.....	2
1.1.3. Molekularni mehanizmi u pozadini-proupalni medijatori i njihova uloga.....	4
1.1.4. Molekularni mehanizmi u pozadini-uloga oksidacijskog stresa.....	4
1.2. Tipovi stanične smrti.....	5
1.2.1. Apoptoza.....	5
1.2.2. Nekroza.....	8
1.2.3. Nekroptoza.....	9
1.3. Proteini toplinskog šoka (Hsp).....	11
1.3.1. Utjecaj Hsp-a na unutarnji put apoptoze.....	11
1.3.2. Utjecaj Hsp-a na vanjski put apoptoze.....	12
1.4. Receptori slični Tollu.....	12
1.4.1. Kako TLR receptori prepoznaju PAMPs.....	13
1.4.2. Signalni putevi aktivirani preko TLR receptora.....	14
1.4.3. Utjecaj LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Uzgoj stanica.....	18
3.2. Priprema ekstrakta dima cigareta.....	18
3.3. Tretiranje stanica.....	19
3.4. Određivanje aktivnosti kaspaza.....	19
3.4.1. Određivanje aktivnosti kaspaza -3/-7.....	19
3.4.2. Određivanje aktivnosti kaspaze-8.....	20
3.4.3. Određivanje aktivnosti kaspaze-9.....	21
3.5. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. Aktivnosti kaspaza -3/-7,-8 i -9 nakon tretmana od 2 sata.....	23
4.2. Aktivnosti kaspaza -3/-7,-8 i -9 nakon tretmana od 8 sati.....	25

5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČCI.....	31
7. LITERATURA.....	32
8. SAŽETAK.....	39
8.1. Sažetak.....	39
8.2. Summary.....	41
9. PRILOZI.....	43
9.1. Popis kratica.....	43
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

1. UVOD

1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

Kronična opstruktivska plućna bolest je kronična upalna bolest koja uzrokuje opstrukciju protoka zraka u plućima. Najčešće je uzrokovana dugotrajnim izlaganjem iritirajućim česticama ili dimu cigarete. Popraćena je povećanim rizikom od razvoja mnogih bolesti poput karcinoma pluća i bolesti srca. Simptomi su varijabilni, ali najčešće obuhvaćaju poteškoće u disanju, stvaranje sekreta i kašljanje (www.mayoclinic.org). Najčešće zahvaća populaciju pušača, no doprinose joj i mnogi drugi čimbenici. Godišnje u prosjeku od komplikacija usred akutnih egzacerbacija umire oko 3 milijuna ljudi. Čak dvije trećine umrlih umire u azijskim zemljama. Najopasnije su akutne egzacerbacije bolesti koje obuhvaćaju kašalj i dispneju. Iako se akutne egzacerbacije liječe lijekovima (bronhodilatatorima, kortikosteroidima i po potrebi antibioticima), u nekim slučajevima potrebna je hitna medicinska pomoć. Čak deset posto hospitalizacija uzrokovanih kroničnim egzacerbacijama je smrtonosno uslijed popratnih komplikacija koje uzrokuju. Najčešći problemi vezani su uz kardiovaskularne komplikacije koje obuhvaćaju ponajprije infarkt miokarda (Don D.Sin, 2019.). Smjernice za liječenje KOPB-a nazivaju se GOLD smjernice i izdaju se svake godine (www.goldcopd.org). Prema GOLD smjernicama KOPB se klasificira u 4 stupnja, ovisno o FEV₁ (forisirani izdisajni volumen u prvoj sekundi) (Tablica 1.).

Tablica 1. Klasifikacija KOPB-a u odnosu na FEV₁

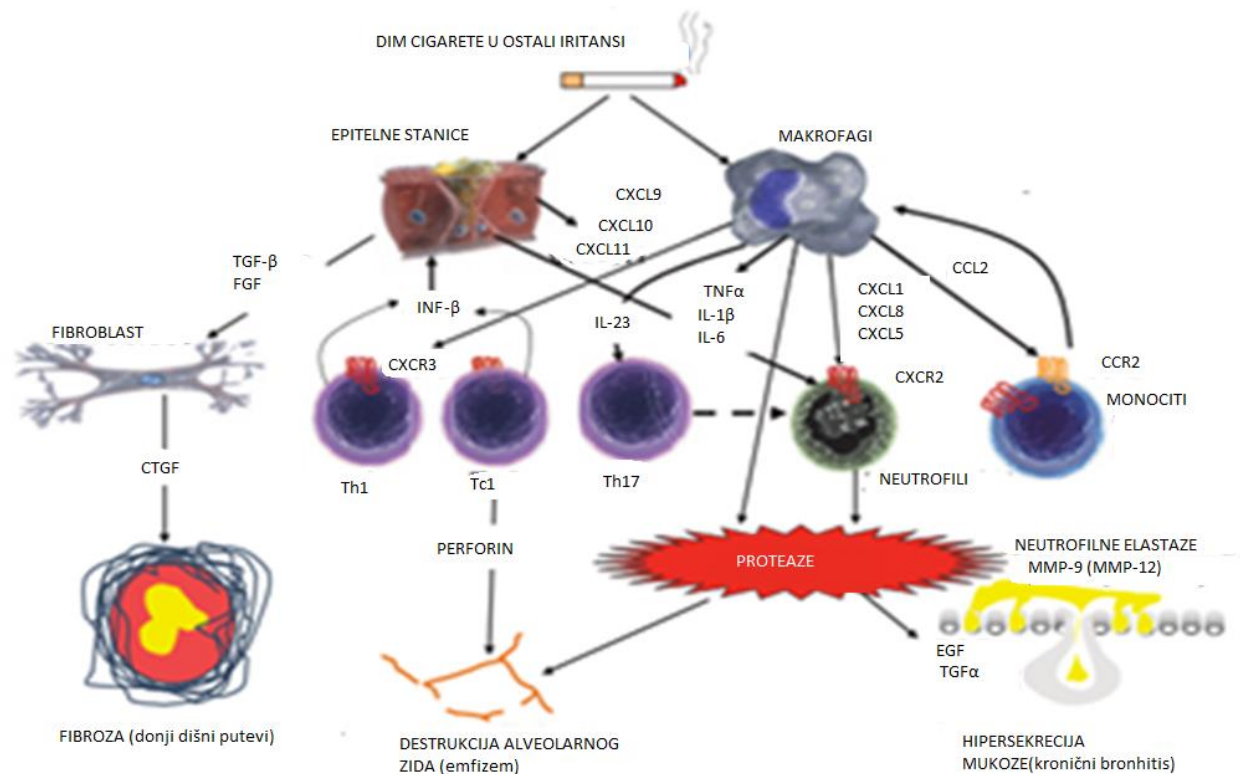
Stupanj KOPB-a	FEV ₁ (% u odnosu na predviđeni)
GOLD 1	≥ 80
GOLD 2	50 – 79
GOLD 3	30 – 49
GOLD 4	< 30

1.1.1. Patogeneza KOPB-a

U patofiziološkoj pozadini KOPB-a stoji kombinacija kroničnog bronhitisa, emfizema i pojačane sekrecije sluzi. Nema jednostavnog mehanizma koji bi obuhvatio čitavu kompleksnu patologiju KOPB-a, već je to bolest koja je interakcija mnogih kompleksnih mehanizama. U te mehanizme ubrajaju se oksidacijski stres, apoptoza i narušena ravnoteža između proteaza i anti-proteaza. Dolazi do kronične upale i destrukcije alveolarnog zida. Ta pojava naziva se emfizem. Na samom mjestu upale, značajno je povećanje broja alveolarnih makrofaga, neutrofila i citotoksičnih limfocita T, uz otpuštanje medijatora upale (kemokini, citokini, čimbenici rasta). Takav upalni odgovor može se amplificirati oksidacijskim stresom, stoga i on ima vrlo važnu ulogu u patogenezi. Osim navedenih procesa, dolazi i do elastolize djelovanjem elastolitičkih proteina (serinske proteaze, katepsini, matriksne metaloproteinaze). Cjelokupni mehanizam nastanka ustvari je amplifikacija normalnog upalnog odgovora na dim cigarete (ili neke druge iritirajuće čestice uslijed, primjerice, zagađenja zraka). Rezultat je sporo progresivno ireverzibilno ograničavanje protoka zraka (MacNee, 2005.).

1.1.2. Molekularni mehanizmi u pozadini - urođena i stečena imunost

Budući da je bolest uzrokovana upalnim odgovorom na štetnu noksu, potrebno je i razmotriti mehanizam istog. Takav upalni odgovor kombinacija je urođene i stečene imunosti. Dok je urođena imunost prva linija, stečena nastupa nešto kasnije. Odgovor započinje primarno aktiviranjem makrofaga. Oni su ključni u aktivaciji i regulaciji. Nastaju i diferencijacijom iz monocita koji se povećano vrbuju iz krvi pod utjecajem kemokina (CXCL1 i CCL2). Jednom aktivirani makrofagi luče razne proupalne medijatore i kemokine (koji privlače citotoksične T-limfocite i pomoćničke T-limfocite) te potiču i oksidacijski stres. Također luče i elastolitične enzime povezane s emfizemom. Uz to, aktiviraju i transkripcijski čimbenik NF-kB koji dodatno potiče upalni odgovor preko MAPK (protein-kinaze aktivirane mitogenom). Često je reducirana fagocitoza nekih bakterija poput *Haemophilus influenzae* ili *Streptococcus pneumoniae* povezana s učestalošću akutnih egzacerbacija kod bolesnika. Iduće stanice koje imaju bitnu ulogu u procesu razvoja ove bolesti su dendritičke stanice. One su specijalizirane antigen prezentirajuće stanice i kao takve su bitna poveznica između urođene i stečene imunosti.



Slika 1. Molekularni mehanizmi nastanka KOPB-a. Pokretači cijele reakcije su ili epitelne stanice ili makrofagi. Nakon susreta s iritansom, otpuštaju niz kemokina i citokina koji posreduju daljnu lančanu reakciju aktivacije koja rezultira fibrozom, emfizemom i kroničnim bronhitisom. Preuzeto: Barnes, 2017.

Bitni posrednici, čiji se broj povezuje s intenzitetom KOPB-a, su i neutrofili. Samo pušenje promovira produkciju granulocita uslijed povećanog lučenja čimbenika rasta GM-CSF (faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija) i G-CSF (faktor stimulacije granulocitnih kolonija). Adhezija neutrofila događa se preko E-selektina, a potom na traženo mjesto dolaze privučeni kemokinima (leukotrienB₄, CXCL1, CXCL5 i CXCL8) koje luče aktivirani makrofagi i T-stanice. Jednom kad dođu na mjesto upale i budu aktivirani, i oni sami luče mnoge posrednike upale kao i kemokine. Luče MPO (eng. myeloperoxidase) i mnoge serinske proteaze (neutrofilna elastaza, katepsin G, proteinaza 3, MMP-8 i MMP-9) povezane s napredovanjem emfizema. Neke od navedenih supstanci koje se luče su potentni stimulansi sekrecije mukoze i preko direktne stimulacije submukoznih žlijezda, ali i preko stimulacije vrčastih stanica na lučenje mukoze. Bitno je za napomenuti da je broj neutrofila posebno povećan kod akutnih egzacerbacija.

Potom na red dolazi stečena imunost. Budući da su te stanice druga linija obrane, njihov broj korelira s povećanom destrukcijom tkiva. Više je CD8⁺ limfocita. Od T-limfocita primarno su bitni Th1 i Th17, pri čemu Th17 biva privučen uz IL-6 i IL-23 kojeg luče makrofagi. Povećanje broja CD8⁺ limfocita u alveolama povezano je i sa kroničnom bakterijskom upalom. To rezultira apoptozom stanica i progresijom emfizema (uz pomoć izlučenih perforina, granzima i TNF- α) (Barnes, 2017. i Barnes, 2003.). Uz to često dolazi i do defekta autoimunih mehanizama i poremećaja rada regulatornih T-stanica (uslijed promjena na proteinima koje uzrokuje dim cigarete, kao što su posttranslacijske modifikacije proteina pri čemu nastaju citrulinirani proteini) (Kirkham i sur., 2011.). Nastaju novi antigeni i nepotrebno se aktivira imunološki sustav. Sukladno tome pronađena su brojna endotelna protutijela (Karayama i sur., 2010.). Same strukturne stanice također posreduju pospješivanju upale i to na način da luče brojne proupalne medijatore poput citokina i lipidnih medijatora (Slika 1.).

1.1.3. Molekularni mehanizmi u pozadini - proupalni medijatori i njihova uloga

Bitnu ulogu imaju lipidni medijatori (arahidonska kiselina, prostaglandini, cistein-leukotrien prostaglandin E2, prostaglandin F2 α i leukotrien B4), pri čemu je posebno bitan leukotrien B4 jer je pronađena njegova povišena koncentracija kod akutnih egzacerbacija (mjereno u izdahu bolesnika). Ta činjenica ne čudi jer je on potentni kemoatraktant neutrofila (Biernacki i sur., 2003. i Beeh i sur., 2003.) i to preko leukotrijenskih BLT-1 receptora (Beeh i sur., 2003.). Osim lipidnih medijatora, sudjeluju i citokini. TNF- α je povezan s kaheksijom i razaranjem mišića. Djeluje aktivacijom NF- κ B i samim time aktivira i upalu. Osim njega, bitni su i IL-6, IL-17 te IL-22. Kemokini također imaju svoju ulogu. Posebice je primijećena povišena koncentracija CXCL8 koji je bitan za neutrofile i T-limfocite. Za privlačenje monocita najbitniji je CXCL1 (Traves i sur., 2004.). Ekspresiju citokina reguliraju i inflammasomi. Inflammasomi su multiproteinski kompleksi prisutni kod težih oblika bolesti. Najbitniji su NLRP3 inflammasomi koji djeluju preko aktivacije pro-kaspaza (Barnes, 2017.).

1.1.4. Molekularni mehanizmi u pozadini - uloga oksidacijskog stresa

Oksidacijski stres je u pozadini mnogih kroničnih i malignih bolesti, pa tako i KOPB-a. Čak i nakon prestanka pušenja, povećana količina reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. reactive oxygen species), nastalih uslijed djelovanja oksidacijskog stresa, može uzrokovati ozbiljna oštećenja. Uslijed velike količine takvih spojeva dolazi do gomilanja upalnih stanica (Montuschi i sur., 2000.). Uz to je uočena i smanjena količina antioksidansa kod bolesnika (Nrf-

2 nije prikladno aktiviran) (Malhorta i sur., 2008.). ROS imaju i ulogu u amplifikaciji upalnog odgovora preko aktivacije NF- κ B. Oksidacijski stres umanjuje i aktivnost nekih anti-proteaza, poput α 1-antitripsina, čime se ubrzava razgradnja elastina i pospješuje napredovanje emfizema. Dolazi i do smanjene aktivnosti HDAC-2 (histonskadeacetilaza 2) te samim time povećane acetilacije, preko PI3K (fosfoinozimid 3-kinaza) (Barnes, 2009.). Smanjenje sitruina-1, odnosno ubrzano starenje pluća, također je povezano s oksidacijskim stresom (Nakamaru i sur., 2009. i Mercado i sur., 2015.).

1.2. Tipovi stanične smrti

Stanična smrt može biti regulirana, pri čemu dolazi do svrsishodnog umiranja stanice bez popratnog oštećenja tkiva i takav se tip smrti naziva apoptoza, ili neregulirana, pri čemu u okolnom tkivu nastaje kolateralna šteta i takav se tip smrti naziva nekroza. Ima još nekoliko vrsta stanične smrti, ali neće sve biti opisane u ovom radu.

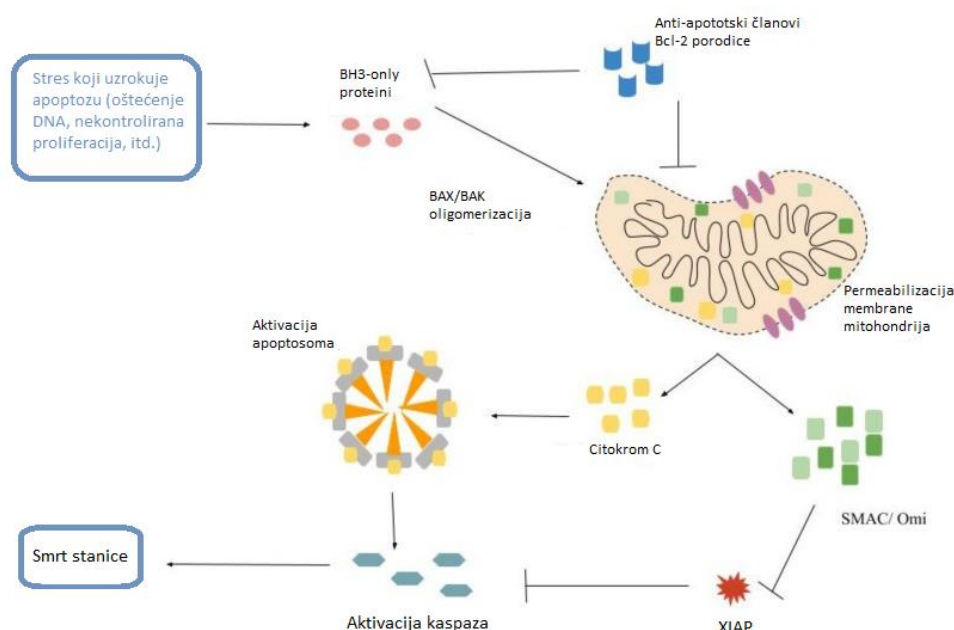
1.2.1. Apoptoza

Apoptoza se često naziva i programiranom staničnom smrti. To je proces u kojem stanica prestaje rasti i dijeliti se te umjesto toga ulazi u proces koji završava kontroliranom smrti stanice bez izlivanja staničnog sadržaja u okolinu. Apoptozu inicira aktivacija enzima, cistein-aspartatnih proteaza poznatih pod nazivom kaspaze. Kaspaze se dijele na inicijacijske i na izvršne (Elmore, 2007.). Inicijacijske kaspaze se aktiviraju iz pro-kaspaza čim se uoči oštećenje stanice. U inicijacijske kaspaze ubrajaju se kaspaza-8 i kaspaza-9. Aktivne inicijacijske kaspaze aktiviraju izvršne kaspaze. U izvršne kaspaze ubrajamo kaspaze-3, -6 i -7. Aktivacija izvršnih kaspaza potom dalje pokreće niz događaja koji rezultiraju aktivacijom endonukleaza te posljedično fragmentacijom DNA, razgradnjom citoskeleta i nuklearnih proteina te naposljetku formiranjem apoptoznih tjelešaca (Marinvalet i sur., 2005.; Poon i sur., 2014.). Okolne stanice fagocitiraju tako nastala tjelešca što rezultira izbjegavanjem oštećenja okolnog tkiva i minimaliziranjem štete. Bitno je za napomenuti da je apoptoza genetski programiran proces (Lokshin i Zakeri, 2004.). Može biti aktivirana unutarnjim putem, ako sama stanica preko raznovrsnih unutarstaničnih senzora osjeti da je oštećena, ili vanjskim putem, ako je posredovana komunikacijskom interakcijom između oštećene stanice i neke stanice imunskog sustava (Sica i sur., 1990.; Oppenheim i sur., 2001.). Apoptoza je mehanizam koji omogućava normalno funkcioniranje svih organa i organskih sustava. Bilo da je posredovana unutarnjim ili vanjskim putem, apoptoza je proces ključan za održavanje homeostaze organizma i greška u

njezinoj regulaciji može imati vrlo opasne posljedice. Kad dođe do pogreške u regulaciji apoptoze, to može dovesti do početka mnogih patofizioloških procesa. Primjer takve pogreške je Alzheimerova bolest (Dickson, 2004.).

Unutarnji put aktivacije apoptoze

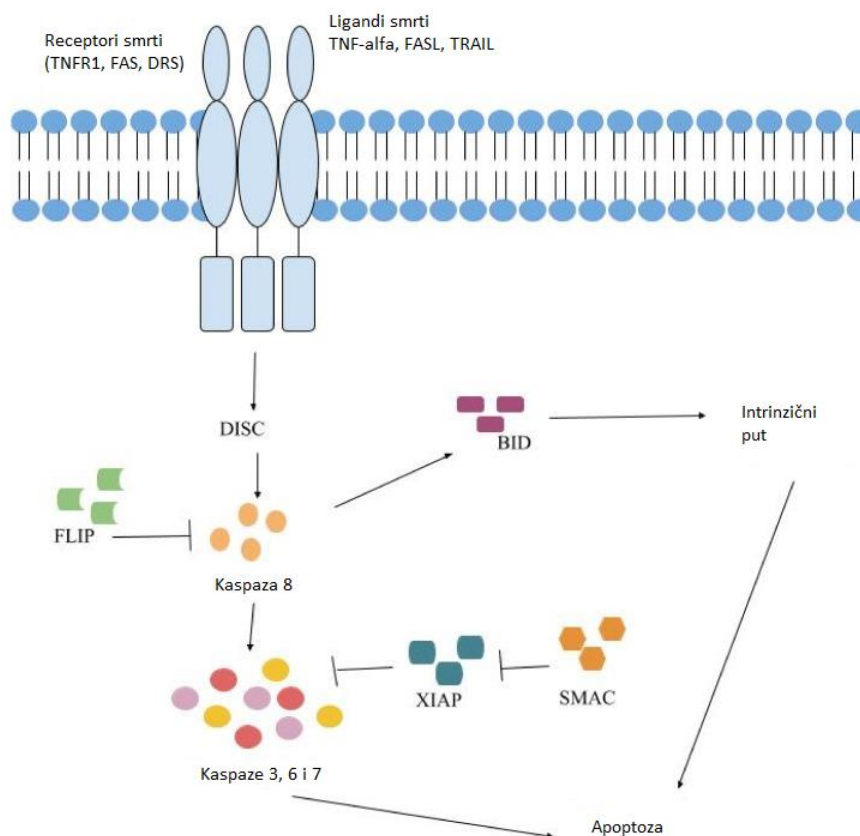
Unutarnji put aktivacije apoptoze još se naziva i mitohondrijski put (Slika 2.). Aktiviraju ga brojni čimbenici, a može biti rezultat pozitivnih ili negativnih signala. U negativne signale ubrajamo nedostatak normalno prisutnih hormona, citokina ili čimbenika rasta. U takvim se uvjetima aktiviraju pro-apoptotske molekule u stanici te stanica ulazi u apoptozu. U pozitivne signale ubrajamo izloženost stanice nekom štetnom vanjskom djelovanju poput primjerice radijacije, stanja hipoksije, štetnih toksina i sličnih tvari. Inicijatorska kaspaza ovog puta apoptoze je kaspaza-9 (D'Arcy, 2019.). Cijeli put reguliran je proteinima iz Bcl-2 porodice (Pfeffer i Singh, 2018.). Put započinje tako što apoptotski čimbenici aktiviraju proteine iz obitelji Bcl-2 koji sadrže samo jednu BH3 domenu, a koji potom aktiviraju BAX i BAK. Oni se potom oligomeriziraju te to uzrokuje promjenu permeabilnosti mitohondrijske membrane, a samim time i otpuštanje intermembranskih proteina. Tako otpušteni proteini potiču aktivaciju apoptosoma u kojem iz pro-kaspaze-9 nastaje aktivna kaspaza-9. Kaspaza-9 potom aktivira efektorske kaspaze-3 i -7 koje brzo uzrokuju razgradnju proteina što naposljetku rezultira smrću stanice.



Slika 2. Unutarnji put aktivacije apoptoze. BH3-only proteini se dovode kao odgovor na stres. Oni aktiviraju BAX/BAK oligomerizaciju što rezultira promjenom permeabilnosti membrane mitohondrija. Promjena permeabilnosti uzrokuje otpuštanje citokroma C, SMAC i Omi i stvara se apoptosom (čine ga prokaspaza-9, dATP, citokrom C i APAF-1). Potom dolazi do aktivacije kaspaza i daljnje lančane reakcije koja dovodi do smrti stanice. Preuzeto: Pfeffer i Singh, 2018.

Vanjski put aktivacije apoptoze

Vanjski put aktivacije apoptoze još se naziva i putem receptora smrti (Slika 3.). Pokreću ga lokalni makrofagi ili NK (eng. natural killer) stanice oslobađanjem tzv. liganda smrti. Oni se potom vežu na receptore smrti te se aktivira pro-kaspaza-8 pri čemu nastaje kaspaza-8. Receptori smrti članovi su TNF porodice proteina. Oni su povezani s adapterskim proteinima poput FADD (domena smrti povezana s Fas-om) i TRADD (domena smrti povezana s TNF receptorom). Vezanjem monomera inicijatorske kaspaze (preko efektorske domene smrti DED) na adapterski protein nastaje DISC (signalni kompleks koji inducira smrt) pri čemu dolazi i do dimerizacije monomera kaspaza. Taj događaj aktivira pro-kaspaze i nastaju kaspaze. Aktivirane inicijacijske kaspaze potom aktiviraju efektorske kaspaze te započinje razgradanja proteina stanice što naposljetku dovodi do njezine smrti. Važno je spomenuti i c-FLIP koji je inhibitor DISC-a te je ključan u regulaciji vanjskog puta apoptoze (Green i Liambi, 2017.).



Slika 3. Vanjski put apoptoze Vanjski put apoptoze započinje vezanjem liganda smrti na svoj receptor. Protein-adaptor se veže na receptor i zajedno sa prokaspazom-8 i -10 formira DISC. Kaspaza 8 se aktivira i onda ona sama aktivira izvršne kaspaze 3, 6 i 7 i BID (jedan od agonista smrti). BID potom aktivira BAX/BAK kompleks koji potom potiče intrinzični put apoptoze. Preuzeto: Pfeffer i Singh, 2018.

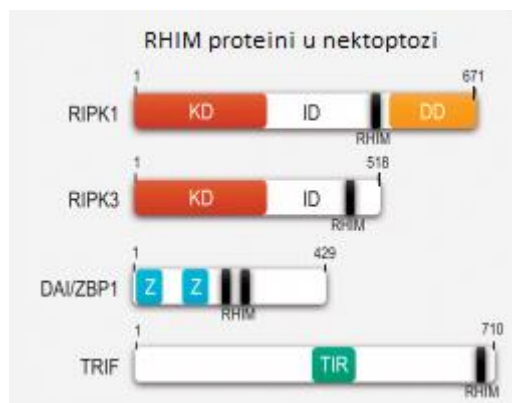
1.2.2. Nekroza

Nekroza je, za razliku od apoptoze, puno manje reguliran tip stanične smrti. Često za sobom povlači i oštećenja okolnog tkiva. Okolna tkiva su kolateralna šteta ovakvog načina smrti stanice. Karakteristike nekroze su oticanje stanice, ruptura stanične membrane bez prethodne kondenzacije kromatina te izlivanje staničnog sadržaja u međustanični prostor. Do nekroze može doći uslijed izlaganja stanice uvjetima poput ekstremno visoke temperature, smrzavanja, mehaničkog stresa ili hipoksije (Elmore, 2007.). Takvi uvjeti narušavaju integritet stanice i ona umire jer ne može više funkcionirati i to bez prethodne aktivacije određenog puta stanične smrti.

Važno je za napomenuti da se nekroza morfološki ne razlikuje puno od krajnjeg stadija apoptoze ukoliko ne dođe do pravovremene fagocitoze apoptoznih tjelešaca (D`Arcy, 2019.).

1.2.3. Nekroptoza

Nekad se smatralo da je samo apoptoza regulirani način stanične smrti. Međutim, daljnja ispitivanja ukazala su na to da nekroza nije nužno neregulirana. Jedna od vrsta regulirane nekroze je nekroptoza (Degterev i sur., 2005.). Aktivirana je najčešće putem receptora smrti, ponajviše preko TNFR1 (eng. tumor-necrosis factor receptor 1). Vezanje TNF-a na TNFR1 u određenim uvjetima inducira nekroptozu putem nekroptosoma. Medijatori su RIPK1 (eng. receptor interacting protein 1), RIPK3 (eng. receptor interacting protein 3) i MLKL (eng. mixed lineage kinase domain-like). RIPK1 integrira signale staničnog stresa i sastoji se od nekoliko domena: N-terminalna kinazna domena, intermedijarna domena (ID), C-terminalna RHIM (eng. RIPK-homotypic interaction motif) domena i domena smrti. N-terminalni dio nužan je za nekroptozu, ali u određenim uvjetima i za RIPK1 uvjetovanu apoptozu. C-terminalni dio posreduje apoptozu preko aktivacije FADD i posljedično kaspaze-8. Intermedijarna domena služi kao skela za stvaranje kompleksa koji posljedično dovode do aktivacije NF- κ B. RHIM domena zaslužna je za regrutaciju RIPK3 i drugih srodnih proteina koji sadržavaju RHIM domenu poput TRIF (Slika 4.) i ZBP1 (eng. Z-DNA binding protein 1). RIPK3 je srodna i strukturno slična RIPK1. Razlikuju se po tome što RIPK3 nema domenu smrti na C-terminalnom kraju. Aktivnost RIPK3 nužna je za nekroptozu (Zhang i sur., 2009.). Izvršna molekula u putu nekroptoze je MLKL. MLKL je pseudo-kinaza. Sastoji se od N-terminalnog dijela građenog od 4 uzvojnice koji je bitan za stvaranje membranskih pora. C-terminalni dio drži N-terminalni dio inaktivnim. MLKL ulazi u interakciju s RIPK3 i to tek nakon fosforilacije RIPK3 na mjestu Ser227. I dok je kinazna aktivnost RIPK1 i RIPK3 nužna za nekroptozu, kinazna aktivnost MLKL je zanemariva i u ovom kontekstu ne igra bitniju ulogu. Nakon fosforilacije MLKL, odlazi do konformacijske promjene koja uzrokuje otkrivanje N-terminalnog dijela i samim time aktivaciju MLKL.



Slika 4. Prikaz proteina koji sadrže RHIM domenu, a sudjeluju u nekroptozu. Preuzeto: Grootjans i sur., 2017.

Nekroptoz započinje formiranjem nekroptosoma, odnosno TNF stimulacijom i neovisnom regrutacijom RIPK1 i TRADD preko njihovih domena smrti. U kompleksu sa TNF receptorom, RIPK-1 se ubikvitinira na ID mjestu, što omogućuje vezanje I κ B kinaznog kompleksa (sastavljenog od NEMO, IKK α i IKK β). IKK α i IKK β ovisna fosforilacija RIPK-1 sprječava disocijaciju RIPK-1 s TNF receptora i time sprječava formiranje citosolnog kompleksa smrti (kompleks II) (Grootjans i sur., 2017.). Postoje dvije vrste kompleksa II, ovisno o proteinima koji čine kompleks i njihovoj aktivnosti. Kompleks IIa se formira nakon disocijacije TRADD s TNFR1 što rezultira vezanjem FADD i aktivacijom kaspaze-8. To je put koji vodi do apoptoze. S druge strane, kompleks IIb promovira RIPK1 ovisnu apoptozu. Kad kaspaza-8 nije prisutna ili nije aktivirana, kinazna aktivnost RIPK1 u kompleksu II privlači, veže i aktivira RIPK3 što dovodi do formiranja nekrosoma. Nekrosom se sastoji od TRADD, RIPK1, RIPK3 i FADD (Zhang i sur., 2009., Cho i sur., 2009.). MLKL se naknadno inkorporira u nekrosom preko RIPK3. Potom dolazi do već spomenute fosforilacije i aktivacije RIPK3 na mjestu Ser199 (He i sur., 2009.). Dakle, ako RIPK1 aktivira kaspazu-8, stanica ulazi u apoptozu, a dok kaspaza-8 nije dostupna, RIPK1 fosforilacijom aktivira RIPK3 što uvodi stanicu u nekroptozu. Nakon aktivacije RIPK3, za nastavak nekroptoze potrebna je oligomerizacija RIPK3 u amoliodne vlaknaste strukture (Orozco i sur., 2014.). Potom dolazi do aktivacije MLKL koja je ključan korak. Aktivacija se događa preko fosforilacija MLKL na mjestima Thr357 i Ser358 u aktivacijskoj petlji koja je dio MLKL (Xie i sur., 2013.). Takva fosforilacija dovodi do konformacijske promjene MLKL i ekspozicije dijela koji se sastoji od 4 uzvojnice (Murphy i sur., 2013.; Hildebrand i sur., 2014.). Taj dio promovira nastanak pora i smrt stanice. Pretpostavlja se da se MLKL veže na PIP (fosfatidil-inozitol fosfat) koji je sastavni dio membrane i na taj način ostvaruje svoj učinak (Quarato i sur., 2016.).

1.3. Proteini toplinskog šoka (HSP)

Povišena koncentracija proteina toplinskog šoka (eng. heat shock proteins, Hsp) uočena je kod mnogo kroničnih bolesti pa tako i kod KOPB-a (Qu i sur., 2015.). Proteine toplinskog šoka nalazimo u svim stanicama, kako eukariotskim tako i prokariotskim. Izrazito su konzervirani i termostabilni. Imaju zaštitnu ulogu i njihova se produkcija značajno povećava uslijed izlaganja stanice različitim stresorima, iako ima i nekih koji su konstitutivno prisutni (Kiang i Tsokos, 1998.). Riječ je o velikoj obitelji molekularnih šaperona koja ima značajnu ulogu u sazrijevanju proteina, njihovom ponovnom smatanju i razgradnji. Stresori poput hipoksije i hipertermije značajno povećavaju njihovu koncentraciju. Dije se na temelju molekularne mase. Mali, ATP-neovisni Hsp imaju molekularnu masu između 8 i 28 kDa. U tu skupinu spadaju primjerice ubikvitin, α -kristalini, HspB1 i mnogi drugi. Drugu skupinu čine veliki Hsp molekularnih masa između 45 i 105 kDa. U toj skupini je daleko najzanimljiviji Hsp70 kojeg inducira stres. Uz to, postoji i konstitutivni Hsc70. Značajni protein iz ove skupine je i Hsp90 koji također može biti i inducibilan i konstitutivan. Valja još spomenuti i Hsp40c jer ima regulatornu ulogu (Miller i Fort, 2018.).

Kao što je navedeno, Hsp imaju (između ostalog) ulogu šaperona. Šaperoni su proteini koji stabiliziraju native proteine, pomažu u njihovoj translokaciji, ponovnom namatanju i razgradnji. Sve ove radnje često izvode uz ko-šaperone. Na taj način kontroliraju kvalitetu proteina i sprječavaju njihovu nepotrebnu razgradnju. Locirani su na različitim mjestima u organizmu, a njihova ekspresija značajno varira pod raznim utjecajima (Miller i Fort, 2018.). Hsp imaju značajnu ulogu u apoptozi. Oni mogu održati stanicu na životu na način da inhibiraju aktivnost kaspaza ili miču skupine koje kaspaze prepoznaju i na taj način zaustavljaju apoptozu, čak i kada su neki ekstremni uvjeti u pitanju. Različitim mehanizmima djeluju i na unutarnji i na vanjski put apoptoze.

1.3.1. Utjecaj Hsp na unutarnji put apoptoze

Hsp mogu inhibirati aktivnost pro-apoptotskih proteina Bcl-2 i time spriječiti promjenu permeabilnosti membrane koja bi uzrokovala ispuštanje čimbenika koji promoviraju apoptozu (Bree, 2004.). Hsp27 djeluje na regulaciju apoptoze tako da suprimira translokaciju Bid-a i sprječava oslobađanje citokroma c (Paul i sur., 2002.). Hsp70 djeluje na sličan način. On smanjuje aktivaciju Bid-a nastalu kao odgovor na TNF, ali i suprimira aktivaciju drugih pro-

apoptotskih signalnih puteva (primjerice preko MAPK) koji bi rezultirali otpuštanjem citokroma c ili Smac (Bree, 2004.). Također, Hsp70 i njegovi ko-šaperoni (Hsp40 i HSDJ, eng. Heatshock protein 70 DNA-J) djeluju i na inhibiciju translokacije Bax u mitohondrij kod apoptoze inducirane dušikovim oksidom (Gotoh i sur., 2004.). Takav način interakcije s ko-šaperonima ukazuje na to da se anti-apoptotska aktivnost Hsp70 uvelike povećava kod interakcije sa ko-šaperonima.

Apoptosom je ključan za aktivaciju pro-kaspaze-9 u kaspazu-9. Hsp70 djeluje na dva načina u ometanju funkcije apoptosoma. On djeluje tako da ili sprječava oligomerizaciju Apaf-1 (gradivni element apoptosoma, Saleh i sur., 2002.) ili tako da pospješuje održavanje konformacijeoligomera u kojoj je CARD domena Apaf-1 skrivena, pa samim time ne dolazi do aktivacije kaspaze-9 (Beere i sur., 2000.).

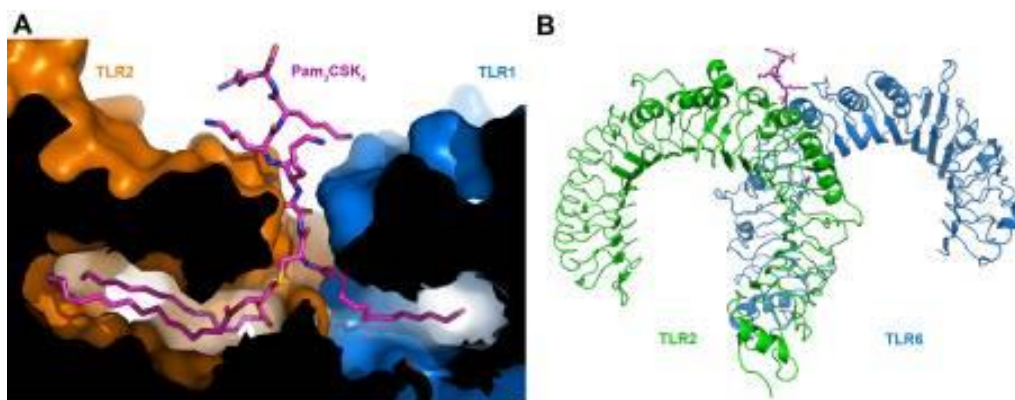
1.3.2. Utjecaj Hsp na vanjski put apoptoze

Hsp moduliraju signalizaciju putem Fas, TNF i TRAIL. Na inhibiciju TNF posredovane aktivacije apoptoze djeluju tako da suprimiraju aktivaciju fosfolipaze A2 (Jaatela, 1993.), inhibiraju ROS i povišuju koncentraciju glutationa (Mehlen i sur., 1996.) te reguliraju koncentraciju kalcija i aktivnost fosfataze (Liopsis i sur., 1997.). Hsp70 djeluje na inhibiciju TNF-inducirane upale tako da suprimira aktivaciju NF- κ B (Guzhova i sur., 1997.).

1.4. Receptori slični Tollu (TLR)

Receptori slični Tollu (TLR, eng. Toll-like receptor) su dio veće skupine receptora koji prepoznaju molekularne obrasce (PRR, eng. pattern-recognition receptor). PRR su receptori koji služe za inicijalno prepoznavanje mikroba. Prepoznaju određene molekularne obrasce, specifične za patogene. Takvi se obrasci nazivaju PAMPs (eng. pathogen-associated molecular patterns). Uz to, prepoznaju i neke molekularne obrasce specifične za oštećene stanice koji se nazivaju DAMPs (eng. damage-associated molecular paterns). PRR aktiviraju signalne puteve koji vode do aktivacije imunološkog sustava jer rezultiraju otpuštanjem brojnih medijatora upale poput proupalnih citokina ili interferona. PRR se dijele u nekoliko skupina. To su TLR, RLR (eng. RIG-1-like receptors) , NLR (eng. NOD-like receptors), ALR (eng. AIM-2-like

receptors), CLR (eng. C-type-lectin receptors) i neki unutarstanični DNA senzori (Kawasaki i Kawai, 2014.).



Slika 5. Heterodimer sastavljen od TLR2 i TLR1 u interakciji sa PAMPs (slika A) Heterodimer sastavljen od TLR2 i TLR6 u interakciji s PAMPs (slika B). Preuzeto: Botos i sur., 2011.

1.4.1. Kako TLR receptori prepoznaju PAMPs

TLR receptori dijele se u dvije velike skupine. Jednu skupinu čine receptori na površini stanice, a drugu unutarstanični receptori. U skupinu receptora na površini ubrajamo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10. Oni prepoznaju većinom membranske komponente mikroba (poput lipida, lipoproteina i proteina). Pojedini TLR specifični su za prepoznavanje određenih komponenti. Primjerice, TLR4 prepoznaje bakterijski lipopolisaharid (LPS), TLR5 prepoznaje flagelin itd. S druge strane, unutarstanični TLR smješteni su u endosomu i u njih ubrajamo TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9. Oni prepoznaju nukleinske kiseline virusa i bakterija. No, taj sustav u nekim autoimunim bolestima zakaže, pa ponekad mogu prepoznati i naše vlastite nukleinske kiseline. U ovoj skupini je svaki TLR specifičan za prepoznavanje određene vrste nukleinske kiseline. Tako je npr. TLR3 zaslužan za prepoznavanje RNA s dvostrukom uzvojnicom (Kawasaki i Kawai, 2014.).

1.4.2. Signalni putevi aktivirani preko TLR receptora

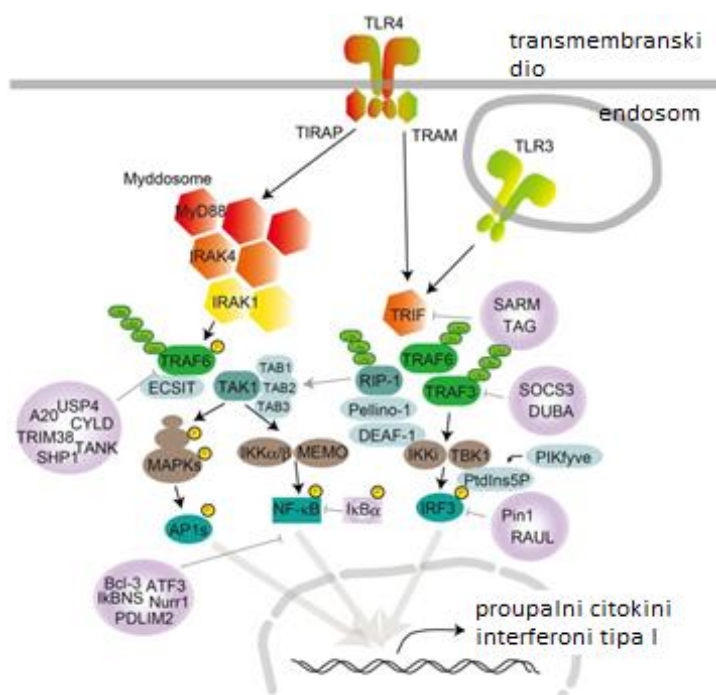
Svaki TLR ima svoju TIR domenu s drugačijim adaptorima. Ovisno o vrsti adaptoru, postiže se drugačiji odgovor na vezanje PAMPs na receptor. Četiri su različita adaptoru koja mogu biti vezana uz TIR domenu: MyD88, TRIF (eng. TIR domain adaptor inducing interferon- β), TIRAP/Mal (eng. TIR adaptor protein / MyD88 adaptor-like) i TRAM (eng. TRIF related adaptor molecule). MyD88 je adaptor koji pospješuje aktivaciju NF- κ B i MAPK te sintezu proupalnih citokina. TIRAP je sortirajuća adaptacijska molekula koja dovodi MyD88 do površinskih TLR (najčešće TLR2 i TLR4). Međutim, TIRAP može sudjelovati i u signalizaciji preko unutarstaničnih TLR, pa je njegova uloga dvostruka. TRIF aktivira alternativne puteve koji također preko NF- κ B i MAPK dovode do sinteze interferona i proupalnih citokina. Najčešće je TIR u domeni TLR3 i TLR4. Interakcija TLR3 i TRIF zahtjeva fosforilaciju dva tirozinska ostatka u citoplazmatskoj domeni TLR3. Tu fosforilaciju obavljaju epidermalni čimbenici rasta Btk (Lee i sur., 2012.) i ErbB1. TRAM je selektivan za TLR4. Cjelokupni putevi signalizacije putem TLR receptora ugrubo se dijele na MyD88-ovisne i TRIF-ovisne puteve (Slika 6.).

MyD88 ovisni putevi počinju (nakon regrutacije TLR) sa formiranjem kompleksa između MyD88 IRAK kinaznom obitelji. Takav se kompleks naziva eng. Myddosome. U sklopu formacije tog kompleksa, IRAK 4 aktivira IRAK 1 koji se potom autofosforilira na nekoliko mjesta i odvaja od MyD88. Potom se IRAK 1 veže na TRAF6. TRAF 6 u suradnji s

ubikvitinirajućim enzimima potiče poliubikvitinaciju samog sebe i TAK1 protein kinaznog kompleksa. TAK1 je član obitelji MAPKKK i on nakon ubikvitinacije stvara kompleks sa svojim pomoćnim molekulama i aktivira se. Nakon aktivacije, on dalje aktivira dva različita puta, jedan preko MAPK, a drugi preko IKK-NEMO kompleksa koji vodi do aktivacije NF- κ B (jer IKK kompleks fosforilacijom inaktivira I κ B α koji je inhibitor NF- κ B). I na taj način preko dva različita puta dolazi do sinteze proupalnih citokina posredovane MyD88 (Kawasaki i Kawai, 2014.).

TRIF-ovisni putevi su malo drugačiji. TRIF dolazi u interakcije s TRAF3 i TRAF6. TRAF6 regrutira kinazu RIP-1 koja aktivira TAK-1 i dalje ide istim putem kao i kod MyD88 ovisnog puta. S druge strane, TRAF3 regrutira IKK vezane kinaze IKKi i TBK1 i NEMO koji fosforilira IRF3. IRF3 nakon fosforilacije dimerizira i odlazi u jezgru te tamo potiče indukciju gena za INF I (Kawai i Akira, 2010.).

Važan je balans između TRIF-ovisnih i MyD88 ovisnih puteva. Kontrolirana produkcija proupalnih citokina bitna je za sprječavanje tumorskih i autoimunih bolesti.

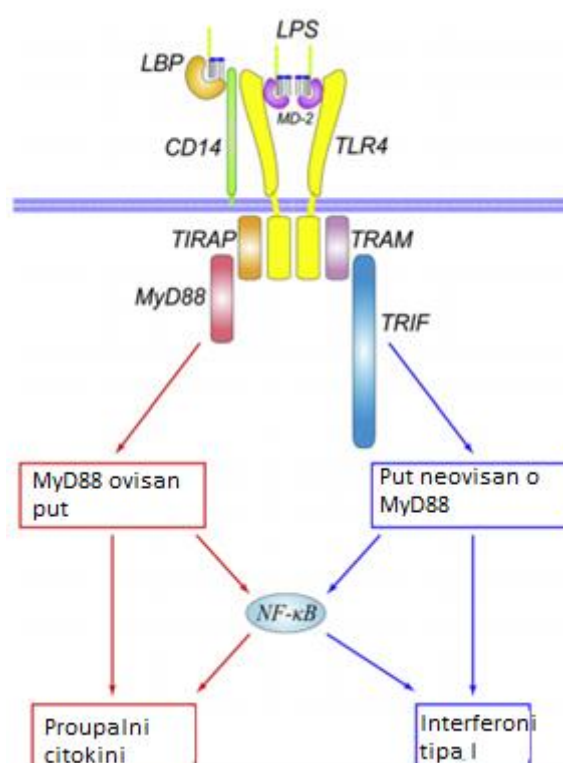


Slika 6. Sažeti prikaz signalnih kaskada koje preko TLR receptora uzrokuju indukciju sinteze gena za proupalne čimbenike. Preuzeto: Kawasaki i Kawai, 2014.

1.4.3. Utjecaj LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore

Lipopolisaharidi (LPS) su strukturne komponente vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Sastoje se od lipida A, sržnog oligosaharida i postraničnog O polisaharidnog lanca. Glavni PAMPs je lipid A. Nakon vezanja LPS-a na TLR4, aktiviraju se oba signalizacijska puta, i onaj ovisan o MyD88 i onaj ovisan o TRIF-u te se potiče sinteza proupalnih citokina i interferona (Slika 7.).

Lipoteikoična kiselina (LTA) je strukturna komponenta Gram-pozitivnih bakterija. I dok je LPS agonist TLR4, LTA stimulira aktivaciju TLR2/TLR6 heterodimera i preko tog dimera potiče upalni odgovor (Lu i sur, 2008.).



Slika 7. Aktivacija signalnih puteva uzrokovana vezanjem LPS na TLR4. Preuzeto: Lu i sur., 2008.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dim cigarete jedan je od glavnih uzročnika kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB-a). Djeluje tako da uzrokuje upalni odgovor koji se kasnije amplificira i rezultira kronicitetom. Bakterijske infekcije su često prisutne kod bolesnika s KOPB-om. LPS i LTA su građevne komponente Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te također uzrokuju upalni odgovor preko kaskadne reakcije, primarno aktivacijom TLR receptora. Hsp70 je protein toplinskog šoka koji unutar stanice djeluje protektivno i potuupalno, dok izvanstanični Hsp70 posreduje u aktivaciji kaskade koja dovodi do sinteze proupalnih čimbenika te razvoja prvo akutne, a zatim i kronične upale.

Cilj ovog ispitivanja je korištenjem izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta, LPS-a i LTA te njihovih kombinacija na bronhijalnim epitelnim stanicama 16HBE utvrditi dovode li do smrti stanica apoptozom mjerenjem aktivnosti pojedinih kaspaza. Ispitivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 provodilo se pomoću komercijalnih kitova koji sadrže specifične luminogene supstrate za navedene kaspaze. Nastala luminescencija proporcionalna je aktivnosti kaspaza prisutnih u uzorku.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj stanica

16HBE stanice su humana bronhijalna epitelna stanična linija izolirana iz pluća jednogodišnjeg muškog pacijenta. Stanice su imortalizirane SV40 plazmidom (pSVori-), a pri tome su zadržale karakteristične značajke normalnih diferenciranih bronhijalnih epitelnih stanica.

16HBE stanice se uzgajaju u EMEM mediju (Lonza Group, Švicarska) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. fetalbovine serum; inaktiviran toplinom; Capricorn Scientific, Njemačka) te 1 % antibiotika i antimikotika (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka). Stanice rastu u bočicama za uzgoj staničnih kultura od 25 cm² prethodno obloženima s EMEM medijem u koji je dodano 1 % kolagena (3,2 mg/mL PureCol, Advanced BioMatrix, SAD) i 0,1 % goveđeg serumskog albumina (BSA, eng. bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, SAD). Za određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 stanice se nasađuju na pločice s 96 jažica koje su obložene na isti način kao i bočice za uzgoj staničnih kultura.

Nakon što postignu oko 90 % konfluentnosti 16HBE stanice se isperu s 5 mL HBSS otopine (Lonza Group, Švicarska), zatim se dodaje novih 5 mL HBSS otopine i stanice se inkubiraju 5 - 10 minuta na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂. Nakon toga se HBSS ukloni vakuum sisaljkom i stanice se isperu s 1,5 mL 0,25 % otopine tripsin - EDTA (Sigma-Aldrich, SAD), zatim im se ponovno dodaje 1,5 mL 0,25 % otopine tripsin - EDTA na 60 sekundi te se nakon toga ista ukloni vakuum sisaljkom. Zatim se stanice inkubiraju 5 - 10 minuta na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂ kako bi se odvojile od podloge te im se doda 5 mL EMEM medija koji sadrži FBS te antibiotik i antimikotik. Stanice se dobro resuspendiraju i nasade na bijele pločice s 96 jažica u koncentraciji od 20 000 stanica po jažici u 100 µL EMEM medija s 10 % FBS-a i 1 % antibiotika i antimikotika. Nakon što stanice postignu oko 95 % konfluentnosti promijeni se medij u EMEM bez FBS-au kojemu se inkubiraju preko noći prije izvođenja pokusa. Sva tretiranja na 16HBE stanicama vrše se u EMEM mediju bez FBS-a.

3.2. Priprema ekstrakta dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (CSE, eng. cigarette smoke extract) se svježe priprema neposredno prije izvođenja pokusa. Koriste se referentne cigarete 3R4F (Kentucky Tobacco Research & Development Center, University of Kentucky, SAD). Cigaretama se odrežu filteri te se dim dviju cigareta propuše kroz 25 mL staničnog medija bez seruma uz upotrebu peristaltičke pumpe (MINIPULS Evolution, Gilson, SAD). Tako nastali 100 % CSE standardizira se mjerenjem apsorbancije na 320 nm uz pomoć UV/VIS spektrofotometra (Cecil Aquarius CE 7200, Cecil Instruments, UK). Apsorbancija svježe pripremljenog CSE-a odgovarala je vrijednostima dobivenima mjerenjem apsorbancija šest ekstrakata dima cigareta pripremljenih u tri uzastopna dana (Somborac-Baćura i sur., 2018a.).

3.3. Tretiranje stanica

16HBE stanice su tretirane s 0,3 i 1 µg/mL rekombinantnog humanog Hsp70 proteina sintetiziranog u bakteriji *E. coli*, s niskim sadržajem endotoksina (Enzo Life Sciences, SAD). Nadalje, 16HBE stanice su tretirane s CSE-om (unutar 60 minuta od njegove pripreme) razrijeđenim sa staničnim medijem bez seruma na 2,5 % i 15 % CSE-a te kombinacijama CSE-a s 0,3 i 1 µg/mL Hsp70.

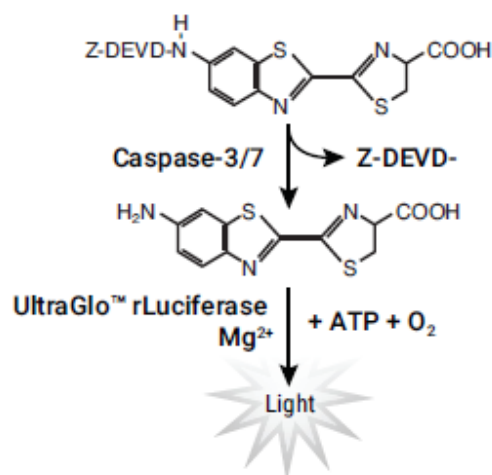
16HBE stanice su također tretirane s 0,1 µg/mL LPS-a i 1 µg/mL LTA te njihovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/mL Hsp70. LPS je izoliran iz *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, SAD), a LTA iz *Staphylococcus aureus* (Invivogen, Francuska).

Svi tretmani su rađeni u triplicatu tijekom 2 ili 8 sati uz inkubaciju stanica na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂.

3.4. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9

3.4.1. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7

Korišten je The Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) komercijalni kit kojim se mjere aktivnosti kaspaze-3 i kaspaze-7. Ovaj kit sadrži luminogeni supstrat kaspaza-3/7. Supstrat sadrži tetrapeptidnu sekvencu DEVD u reagensu optimiziranom za aktivnost kaspaza, aktivnost luciferaze i lizu stanica. Pomiješaju se Caspase-Glo 3/7 supstrat i Caspase-Glo 3/7 pufer, da se dobije Caspase-Glo 3/7 reagens. Dodatkom Caspase-Glo 3/7 reagensa dolazi do lize stanica, slijedi cijepanje supstrata putem kaspaza, oslobađa se supstrat za luciferazu i stvara se luminiscentni signal (Slika 8.). Luminescencija je proporcionalna aktivnosti prisutnih kaspaza.

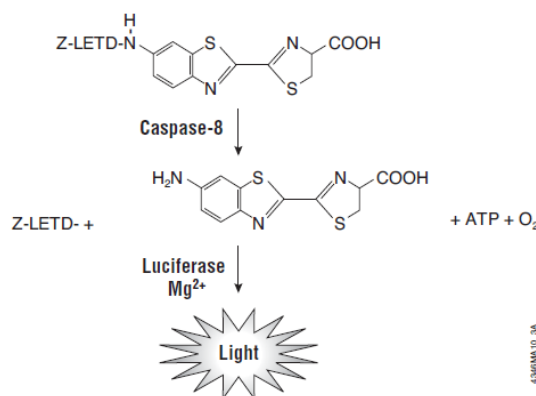


Slika 8. Shematski prikaz principa rada komercijalnog kita za određivanje aktivnosti kaspaze-3/7 (Promega).

Ovaj test se izvodi u bijelim pločicama za uzgoj stanica s 96 jažica. Pločice s tretiranim stanicama se izvade iz inkubatora i temperiraju na sobnu temperaturu. Na 100 μ L staničnog medija doda se 100 μ L Caspase-Glo 3/7 reagensa, promiješa se tijekom 30 sekundi na tresilici pri 400 rpm. Potom se inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta do 3 sata i mjeri se luminescencija na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

3.4.2. Određivanje aktivnosti kaspaze-8

Korišten je The Caspase-Glo8 Assay (Promega) komercijalni kit koji sadrži luminogeni supstrat kaspaze-8. Supstrat sadrži tetrapeptidnu sekvencu LETD u reagensu optimiziranom za aktivnost kaspaze, aktivnost luciferaze i lizu stanica. Pomiješaju se Caspase-Glo 8 supstrat i Caspase-Glo 8 pufer, da se dobije Caspase-Glo 8 reagens. Dodatkom Caspase-Glo 8 reagensa dolazi do lize stanica, slijedi cijepanje supstrata putem kaspaze, oslobađa se supstrat za luciferazu i stvara se luminescentni signal (Slika 9.). Luminescencija je proporcionalna aktivnosti prisutne kaspaze-8.

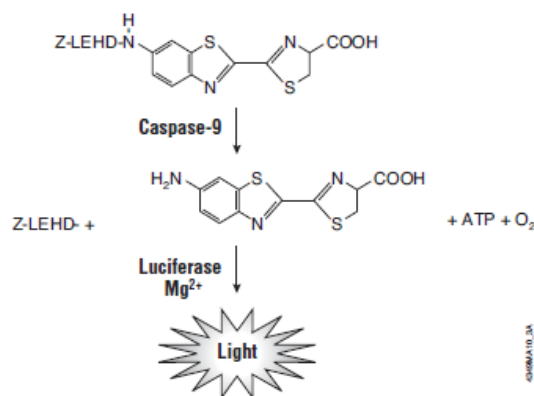


Slika 9. Shematski prikaz principa rada komercijalnog kita za određivanje aktivnosti kaspaze-8 (Promega).

Ovaj test se izvodi u bijelim pločicama za uzgoj stanica s 96 jažica. Pločice s tretiranim stanicama se izvade iz inkubatora i temperiraju na sobnu temperaturu. Na 100 μ L staničnog medija doda se 100 μ L Caspase-Glo 8 reagensa, promiješa se tijekom 30 sekundi na tresilici pri 400 rpm. Potom se inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta do 3 sata i mjeri se luminescencija na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

3.4.3. Određivanje aktivnosti kaspaze-9

Korišten je The Caspase-Glo 8 Assay (Promega) komercijalni kit koji sadrži luminogeni supstrat kaspaze-9. Supstrat sadrži tetrapeptidnu sekvencu LEHD u reagensu optimiziranom za aktivnost kaspaza, aktivnost luciferaze i lizu stanica. Pomiješaju se Caspase-Glo 9 supstrat i Caspase-Glo 9 pufer, da se dobije Caspase-Glo 9 reagens. Dodatkom Caspase-Glo 9 reagensa dolazi do lize stanica, slijedi cijepanje supstrata putem kaspaza, oslobađa se supstrat za luciferazu i stvara se luminiscentni signal (Slika 10.). Luminescencija je proporcionalna aktivnosti prisutne kaspaze-9.



Slika 10. Shematski prikaz principa rada komercijalnog kita za određivanje aktivnosti kaspaze-8 (Promega).

Ovaj test se izvodi u bijelim pločicama za uzgoj stanica s 96 jažica. Pločice s tretiranim stanicama se izvade iz inkubatora i temperiraju na sobnu temperaturu. Na 100 μL staničnog medija doda se 100 μL Caspase-Glo 9 reagensa, promiješa se tijekom 30 sekundi na tresilici pri 400 rpm. Potom se inkubira na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta do 3 sata i mjeri se luminescencija na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD).

3.5. Statistička obrada podataka

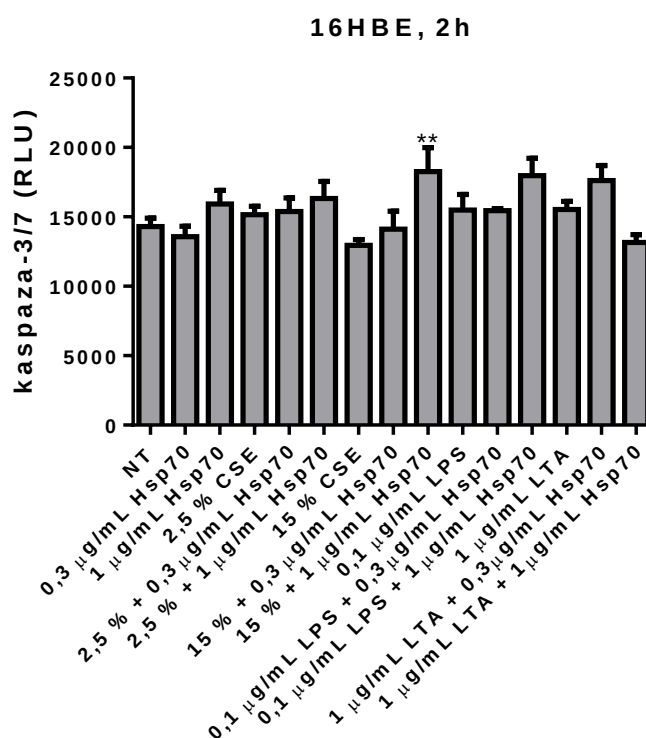
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SEM). Statistička analiza korištena za testiranje razlika između skupina podataka je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, eng. One-way analysis of variance). *Post-hoc* analize provedene su Tukey-evom metodom. $P < 0,05$ smatra se statistički značajnom vrijednošću. Podaci su analizirani upotrebom programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD).

4. REZULTATI

U ovom istraživanju ispitan je način umiranja bronhijalnih epitelih stanica 16HBE izazvan izlaganjem stanica Hsp70, CSE-u, LPS-u i LTA-u, što je određeno mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9.

4.1. Aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 nakon tretmana od 2 sata

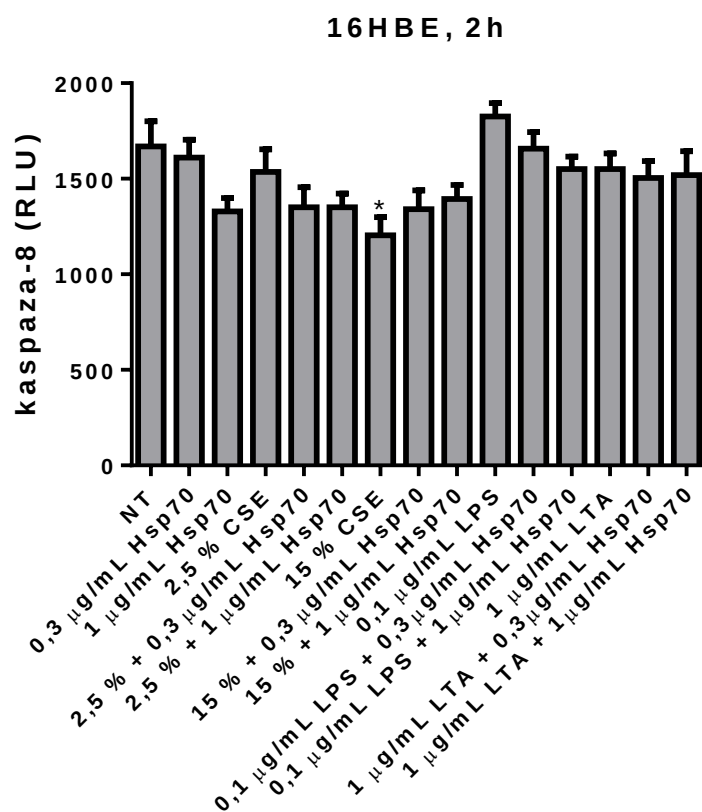
Mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7 nakon tretmana bronhijalnih epitelih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata (Slika 11.) većinom nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu. Jedino je uočen statistički značajan porast aktivnosti kaspaza-3/7 kod stanica tretiranih s kombinacijom 15% CSE-a i 1 $\mu\text{g/mL}$ Hsp70 ($P = 0,008$), što nam ukazuje na prisustvo više stanica u apoptozu. Izlaganjem bronhijalnih epitelih stanica 16HBE LPS-u, LTA ili njihovim kombinacijama s Hsp70 tijekom 2 sata nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



Slika 11. Aktivnost kaspaza-3/7 nakon tretmana bronhijalnih epitelih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

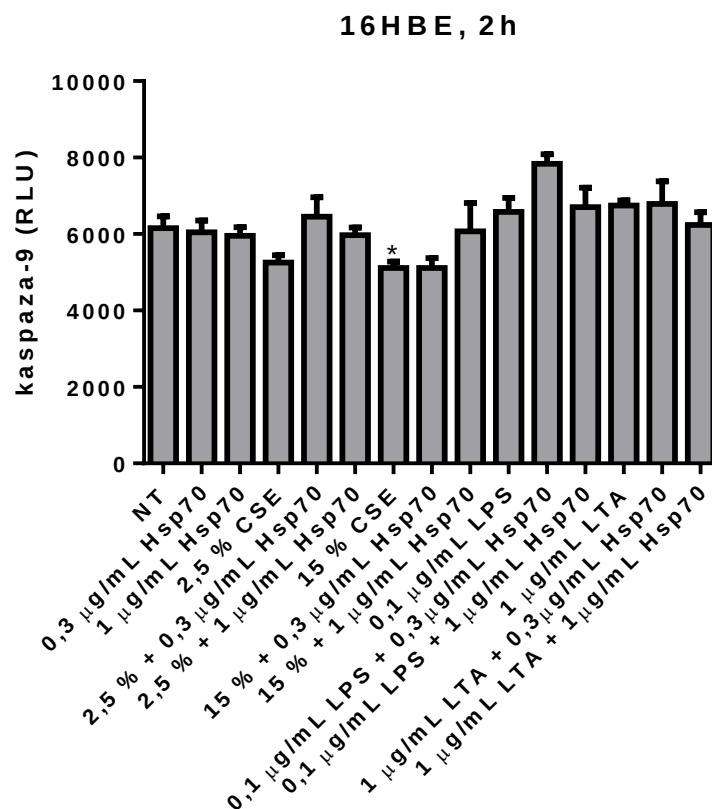
Mjerenjem aktivnosti kaspaze-8 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata (Slika 12.) većinom nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu. Jedino je uočena statistički značajan pad aktivnosti kaspaze-8 kod stanica tretiranih s 15% CSE-a ($P = 0,005$), što može ukazivati na inhibiciju vanjskog puta apoptoze. Izlaganjem bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE LPS-u, LTA ili njihovim kombinacijama s Hsp70 tijekom 2 sata nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



Slika 12. Aktivnost kaspaze-8 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

Mjerenjem aktivnosti kaspaze-9 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata (Slika 13.) većinom nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu. Jedino je uočen statistički značajan pad aktivnosti kaspaze-9 kod stanica tretiranih s 15% CSE-a ($P = 0,002$), što može ukazivati na inhibiciju unutarnjeg puta apoptoze. Izlaganjem bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE LPS-u, LTA ili njihovim kombinacijama s Hsp70 tijekom 2 sata nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



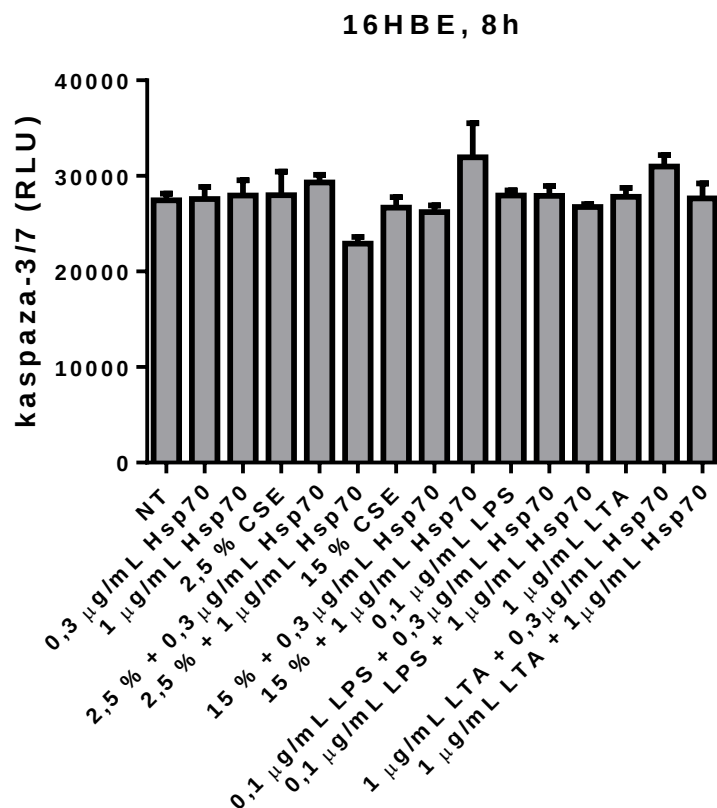
Slika 13. Aktivnost kaspaze-9 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 sata.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

4.2. Aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 nakon tretmana od 8 sati

Mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-u, LTA ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sata (Slika 14.) nisu

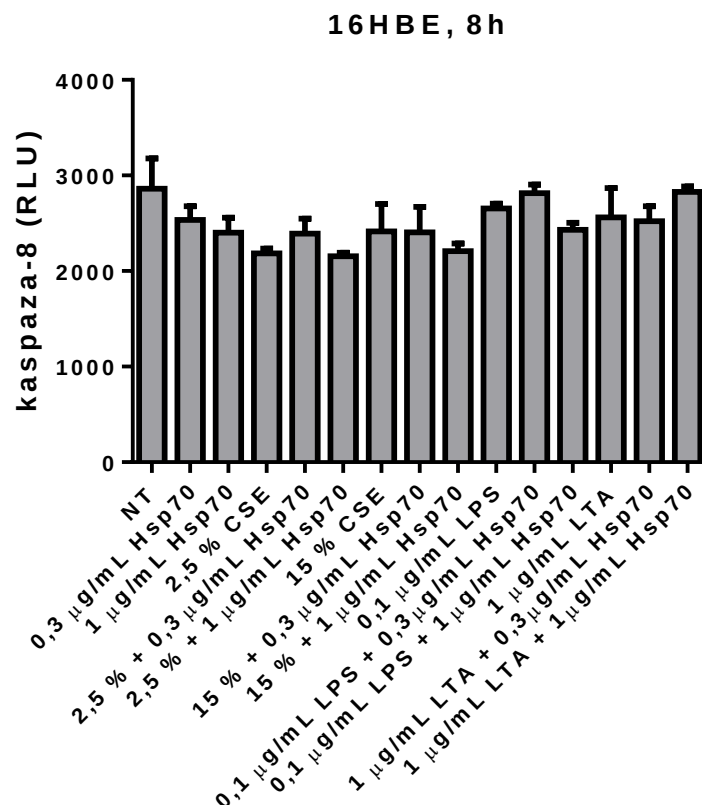
uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



Slika 14. Aktivnost kaspaze-3/7 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sati.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

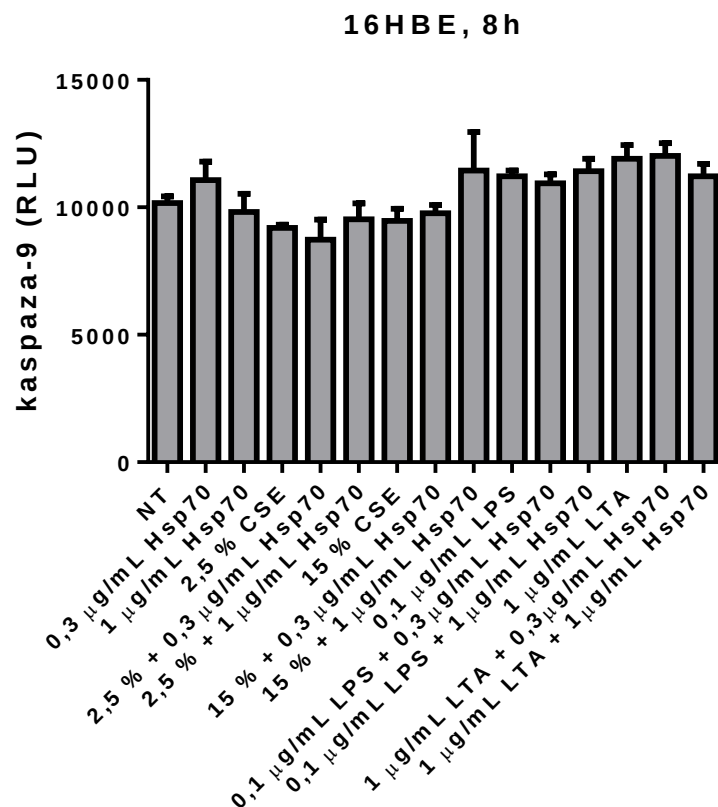
Mjerenjem aktivnosti kaspaze-8 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sati (Slika 15.) nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



Slika 15. Aktivnost kaspaze-8 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sati.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

Mjerenjem aktivnosti kaspaze-9 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sati (Slika 16.) nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, što ukazuje na to da upotrijebljene koncentracije ovih agenasa ne vode stanice u apoptozu.



Slika 16. Aktivnost kaspaze-9 nakon tretmana bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE s Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 8 sati.

NT = netretirane stanice (negativna kontrola); RLU = relativne jedinice luminiscencije.

5. RASPRAVA

Jedan od glavnih uzročnika nastanka KOPB-a je dim cigareta. Uslijed kronične upale izazvane konstantnim udisanjem dima cigareta i amplifikacije upalnog odgovora posredovane drugim čimbenicima, dolazi do razvoja ove bolesti. Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije također igraju bitnu ulogu u razvoju kroniciteta i pospješuju egzacerbacije. LPS, gradivna komponenta Gram-negativnih bakterija, je izravni agonist TLR4 te samim time potiče upalni odgovor. S druge strane, LTA je gradivna komponenta Gram-pozitivnih bakterija i agonist TLR2 koja djeluje na sličan način. Izvanstanični Hsp70 također djeluje kao DAMPs i potiče signalne kaskade posredovane MAPK i NF- κ B što rezultira sintezom proupalnih čimbenika (putem TLR4 i TLR2). U ovom istraživanju promatran je učinak izvanstaničnog Hsp70, CSE-a, LPS-a i LTA na aktivaciju apoptoze mjerenjem aktivnosti kaspaza-3/7 (izvršne kaspaze u apoptozi), kaspaze-8 (pokazatelj aktivacije vanjskog puta apoptoze) i kaspaze-9 (pokazatelj aktivacije unutarnjeg puta apoptoze) u bronhijalnim epitelnim stanicama 16HBE.

U ovom ispitivanju utvrđeno je da nakon tretmana 16HBE stanica s izvanstaničnim Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 ili 8 sati većinom ne dolazi do značajnijeg porasta broja stanica u apoptozi u odnosu na netretirane stanice. Pronađeno je jedino da nakon 2 sata inkubacije kombinacija 15%-tnog ekstrakta dima cigareta i 1 μ g/mL Hsp70 značajno više potiče smrt 16HBE stanica apoptozom u odnosu na sami 15%-tni ekstrakt dima cigareta. Nasuprot tome, u uzorcima 16HBE stanica tretiranih samo s 15 %-tnim ekstraktom dima cigareta tijekom 2 sata uočena je značajno smanjena aktivnosti kaspaza -8 i -9 u odnosu na netretirane stanice.

Aktivnost kaspaze-8 povezana je s intencijom usmjeravanja stanice na vanjski put aktivacije apoptoze, dok je aktivnost kaspaze-9 povezana s unutarnjim putem aktivacije apoptoze. Snižena aktivnost kaspaze-8 koja je pokazana u ovom radu može upućivati na to da stanice izložene visokoj koncentraciji dima cigareta umiru nekim alternativnim putem (primjerice, inaktivacijom kaspaze-8 može doći do razvoja nekroptoze). To je u skladu s istraživanjem koje je pokazalo da tretiranje stanica dimom cigareta potiče smrt stanice nekroptozom (Pouwels i sur., 2016). Slični rezultati dobiveni su i u radu koji je pokazao da izlaganje alveolarnih epitelnih stanica dimu cigareta tokom duljeg vremena dovodi do umiranja stanica uslijed znatnih oštećenja koja se javljaju (Somborac-Baćura i sur., 2018b.). Somborac-Baćura i suradnici (2018b) su pokazali da ukoliko su alveolarne epitelne stanice izložene većim

koncentracijama dima cigareta kraće vrijeme, one imaju tendenciju umiranja apoptozom, dok je duže vrijeme izlaganja povezano s nekrozom. Nasuprot tome, Kaushik i suradnici (2008) su zaključili da veće koncentracije kondenzata dima cigareta i duža izloženost smanjuju vijabilnost stanica uzrokujući apoptozu. Međutim, Wickenden i suradnici (2003) su dokazali da dim cigareta sprječava aktivaciju apoptoze putem inhibicije aktivacije kaspaza i vodi A549 alveolarne epitelne stanice u nekrozu. Također je pokazano da dulje izlaganje Beas-2B bronhijalnih epitelnih stanica i pri većim koncentracijama ekstrakta dima cigareta dovodi do nekroze stanica (Slebos i sur., 2007.).

U krvi oboljelih od KOPB-a pronađena je povišena koncentracija izvanstaničnog Hsp70 (Hacker i sur., 2009.), dok je u različitim radovima opisano kako izvanstanični Hsp70 utječe na upalni učinak uzrokovan djelovanjem dima cigareta na različitim stanicama. Sami izvanstanični Hsp70 ponaša se kao DAMPs putem TLR2 i TLR4 receptorate uzrokuje proupalni odgovor (Hulina i sur., 2018a.). Izlaganje bronhijalnih epitelnih stanica NCI-H292 15 %-tnom CSE-u i njegovim kombinacijama s Hsp70 dovodi do smanjenja vijabilnosti stanica (mjereno MTS testom) i povećane aktivnosti kaspaza-3/7, ali ne i do povećane aktivnosti laktat-dehidrogenaze u staničnom mediju (Hulina-Tomašković i sur., 2018b.). Istraživanje na normalnim ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama NHBE izloženima CSE-u i njegovim kombinacijama s Hsp70 je pokazalo da ne dolazi do promjena u vijabilnosti stanica (Hulina-Tomašković i sur., 2019.).

Budući da su bolesnici s KOPB-om podložni egzacerbacijama često puta uzrokovanim bakterijama, ispitani su i kombinirani učinci izvanstaničnog Hsp70 s LPS-om ili LTA-om. Utvrđeno je da LPS i LTA pojedinačno i u kombinaciji s Hsp70 ne utječu na razvoj apoptoze, što je u skladu s radom Sangiorgia i suradnika gdje je MTT testom pokazano da LPS ne utječe na preživljavanje 16HBE stanica (Sangiorgi i sur., 2017.).

Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da izlaganje bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE izvanstaničnom Hsp70, CSE-u, LPS-u, LTA-u ili njihovim kombinacijama uglavnom ne dovodi do aktivacije kaspaza-3/7, kaspaze-8 i kaspaze-9 te razvoja apoptoze. Rezultate našeg rada bilo dobro nadopuniti određivanjem biljega drugih načina umiranja stanica (primjerice, nekroze ili nekroptoze), što bi omogućilo bolju usporedbu s rezultatima već objavljenih radova te primjerenije zaključke vezano uz moguće uzroke gubitka plućnih struktura kod oboljelih od KOPB-a, a možda čak i potencijalne nove mete lijekova.

6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije od 0,3 i 1 $\mu\text{g/mL}$ izvanstaničnog Hsp70 ne utječu na aktivnosti kaspaza -3/7, -8 i -9 u 16HBE bronhijalnim epitelnim stanicama tijekom inkubacija od 2 i 8 sati.
2. Tretmani 16HBE stanica s 2,5 % CSE-om i njegovim kombinacijama s 0,3 i 1 $\mu\text{g/mL}$ Hsp70 također nemaju utjecaja na aktivnosti kaspaza -3/7, -8 i -9 tijekom 2 i 8 sati.
3. U 16HBE stanicama tretiranim s 15 % CSE tijekom 2 sata došlo je do smanjenja aktivnosti kaspaza -8 i -9 u odnosu na netretirane stanice, dok nije bilo razlika u aktivnosti nakon 8 sati, kao niti razlika u aktivnosti kaspaza -3/7 u oba vremenska perioda.
4. Nakon 2 sata inkubacije kombinacija 15 % CSE-a i 1 $\mu\text{g/mL}$ Hsp70 značajno povećava aktivnost kaspaza -3/7 u 16HBE stanicama u odnosu na sami 15 % CSE, dok drugih razlika kod tretmana s kombinacijama 15 % CSE-a i Hsp70 nije bilo.
5. 0,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS i 1 $\mu\text{g/mL}$ LTA te njihove kombinacije s 0,3 i 1 $\mu\text{g/mL}$ Hsp70 ne utječu na aktivnosti kaspaza -3/7, -8 i -9 u 16HBE stanicama tijekom inkubacija od 2 i 8 sati.
6. Primijenjeni tretmani (izvanstanični Hsp70, CSE, LPS, LTA ili njihove kombinacije) na bronhijalnim epitelnim stanicama 16HBE uglavnom ne dolavode do aktivacije kaspaza-3/7, kaspaze-8 i kaspaze-9 te razvoja apoptoze.
7. Moguće je da 15 %-tni CSE potiče smrt 16HBE stanica nekim drugim putem stanične smrti (primjerice, nekrotozom jer dovodi do inaktivacije kaspaze-8, ali to bi trebalo potvrditi dodatnim istraživanjima).

7. LITERATURA

Barnes PJ, Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD, *Clin.Sci (London)*, 2017, 131 (13), 1541-1558.

Barnes PJ. Role of HDAC in Pathophysiology of COPD.*Annual Review of Physiology*, 2009,71(1), 451-464.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: molecular and cellular mechanisms.*EurRespir J* ,2003, 22(4), 672-688.

Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil Chemotactic Activity of Sputum From Patients With COPD.*CHEST Journal*, 2003,123(4),1240-1247.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to Apaf-1 apoptosome, *Nat Cell Bio*,2000, 2(8),469-475.

Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breathe condensate of patients with exacerbations of COPD.*Thorax*,58, 2003, 294-298.

Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011,19(4),447-459.

Cho YS, Challa S, Moquin Det al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*,2009, 137(6), 1112-1123.

D'Arcy M. CellDeath. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biology International*, 2019, 43 (6), 582-592.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of non apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat ChemBiol*, 2005,1(2), 112–19.

Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest*, 2004, 114(1), 23–27.

Diseases and conditions: COPD, <https://www.mayoclinic.org>, pristupljeno 16.3.2020.

Don D. Sin. Contemporary Concise Review 2019.: Chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 2019, 25, 449-454.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 34(5), 495-516.

GOLD guidelines, <https://goldcopd.org>, pristupljeno 16.3.2020.

Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4), 390-402.

Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(12), a006080.

Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ*, 2017, 24(7), 1184-1195.

Guzhova IV, Darieva ZA, Melo AR, Margulis BA. Major stress protein Hsp70 interacts with NF- κ B regulatory complex in human T-lymphoma cells. *Cell Stress Chaperones*, 1997, 2(2), 132-139.

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K et al. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 α in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab*, 2009, 55, 31–40.

He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*, 2009, 137(6), 1100-1111.

Hildebrand JM, Tanzer MC, Lucet IS, et al. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(42),15072-15077.

Hulina A, Grdić Rajković M, Jakšić Despot D, et al. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress Chaperones*, 2018a,23(3),373-384.

Hulina-Tomašković, Grdić Rajković, Somborac Bačura, Čeri, Dabelić, Rumora. Extracellular Hsp70 modulates the inflammatory response of cigarette smoke extract in NCI-H292 cells. *Experimental physiology*, 2018b, 103, 1704-1716.

Hulina-Tomašković, Heijink, Jonker, Somborac Bačura, Grdić Rajković, Rumora. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients, *Biochemie*, 2019,156, 47-58.

Jaatela M. Overexpression of major heatshock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *The Journal of Immunology*, 1993,151 (8), 4286-4294.

Karayama M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, Nakamura H, Chida K. Antiendothelial Cell Antibodies In Patients With COPD. *CHEST Journal*, 2010, 138 (6), 1303-1308.

Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett*, 2008,270, 120–131.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. 2010. *Nature Immunology*, 2010,11(5), 373-84.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014,5,461.

Kiang JG, Tsokos GC. Heat Shock Protein 70kDa: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology. *Elsevier*, 1998, 80 (2), 183-201.

KirkhamPA, CaramoriG, CasolariP, PapiAA, EdwardsM, ShamjiB, TriantaphyllopoulosK, HussainF, PinartM, KhanY, HeinemannL, StevensL, YeadonM, BarnesPJ, ChungKF, AdcockI M. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *America Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011,184(7), 796-802.

Lee KG, Xu S, Kang ZH, et al. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *ProcNatlAcadSci U S A*, 2012,109(15),5791-5796.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 2008,42(4), 145-151.

MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2(4), 258-291.

Malhorta D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sanford A, Elliott M, Singh A, Chen L, ZhuangX, Hogg J, Pare P, Tuder RM, Biswal S. Decline in NRF2-regulated antioxidants in COPD lungs due to loss of its positive regulator DJ-1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008,179 (7), 624.

Mehlen P, Kretz-Remy C, Prévile X, Arrigo AP. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alpha B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF alpha-induced cell death. *EMBO J*, 1996,15(11), 2695-2706.

Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax*, 2015, 70, 482-489.

Miller DJ, Fort Pe. Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Frontiers in Neuroscience*, 2018,12, 821.

Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an In Vivo Biomarker of Lung Oxidative Stress in Patients with

COPD and Healthy Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, 162(3), 1175-1177.

Murphy JM, Czubotar PE, Hildebrand JM, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*. 2013, 39(3), 443-453.

Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Eliot M, Hogg J, Kharitonov S, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ, Ito K. A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9, *The FASEB Journal*, 2009, 23(9), 2810-2819.

Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevett D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci*, 2001, 21(13), 4752-60.

Orozco S, Yatim N, Werner MR, et al. RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ*. 2014, 21(10), 1511-1521.

Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP. Hsp27 as a Negative Regulator of Cytochrome c Release. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(3), 816-834.

Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis. A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2), 448.

Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential, *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3), 166-180.

Pouwels SD, Zijlstra GJ, van der Toorn M, Hesse L, Gras R, Ten Hacken NHT, Krysko DV, Vandenabeele P, de Vries M, van Oosterhout AJM, Heijink IH, Nawijn MC. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2016, 310(4), 377-386.

Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein70 in various non disease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell stress chaperones*,2015,885–892.

Quarato G, Guy CS, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Rodriguez DA et al. Sequential engagement of distinct MLKL phosphatidyl inositol-binding sites executes necroptosis. *Mol Cell*,2016, 61, 589–601.

Saleh A, Sirinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*, 2000,2(8), 476-483.

Sangiorgi C, Vallese D, Gnemmi I, Bucchieri F, Balbi B, Brun P, Leone A, Giordano A, Macario EC De, Macario AJL, Cappello F, Stefano A Di. HSP60 activity on human bronchial epithelial cells.*Int J Immunopathol Pharmacol*, 2017, 30(4), 333-340.

Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology*,1990, 144(8), 3034–3038.

Slebos DJ, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AM. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4), 409-17.

Somborac Bačura, Popović-Grle, Zovko, Žanić- Grubišić. Cigarette Smoke Induces Activation of Polymorphonuclear Leukocytes, *Lung*, 2018a,196 (1), 27-31.

Somborac Bačura, Rumora, Novak, Rašić, Dumić, Čepelak, Žanić-Grubišić. Differential expression of heat shock proteins and activation of mitogen-activated protein kinases in A549 alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Experimental physiology*, 2018b, 103,1666-1678.

Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, Donnelly LE. Specific CXC but not CC chemokines caused elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol*, 2004, 76 (2), 441-50.

Wickenden J A, Clarke MCH, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2003, 29(5), 562–570.

Xie T, Peng W, Yan C, Wu J, Gong X, Shi Y. Structural insights into RIP3-mediated necroptotic signaling. *Cell Rep*, 2013, 5(1), 70-78.

Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 2009, 325(5938), 332-336.

8. SAŽETAK

8.1. Sažetak

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je kronična upalna bolest koja uzrokuje opstrukciju protoka zraka u plućima. Jedan od glavnih uzročnika KOPB-a je dim cigarete. Molekularni mehanizmi u pozadini klasična su kombinacija urođene i stečene imunosti, a važnu ulogu imaju i proupalni medijatori i oksidacijski stres. Takav upalni odgovor dovodi do smrti stanice. Razlikujemo mnogo načina smrti stanice, ali u ovom kontekstu su najrelevantnije apoptoza, nekroza i nekroptaza. Važnu ulogu u usmjeravanju stanice u određeni oblik stanične smrti imaju proteini toplinskog šoka. LPS (lipopolisaharid) i LTA (lipoteikoična kiselina) kao građivne komponente bakterija utječu kao molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMPs) te također usmjeravaju stanicu u staničnu smrt preko djelovanja na TLR receptore. Cilj ovog ispitivanja bio je korištenjem izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta (CSE), LPS-a i LTA te njihovih kombinacija na bronhijalnim epitelnim stanicama 16HBE utvrditi dovode li do smrti stanica mjerenjem aktivnosti pojedinih kaspaza. Ispitivanje aktivnosti kaspaza-3/7, -8 i -9 provodilo se pomoću komercijalnih kitova koji sadrže specifične luminogene supstrate za navedene kaspaze. Nastala luminescencija proporcionalna je aktivnosti kaspaza prisutnih u uzorku. Praćena je aktivnost kaspaza nakon dvosatnog i osmerosatnog tretmana. Dobiveni rezultati ukazuju na to da nakon tretmana 16HBE stanica s izvanstaničnim Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 ili 8 sati većinom ne dolazi do značajnijeg porasta broja stanica u apoptozi u odnosu na netretirane stanice. Pronađeno je jedino da nakon 2 sata inkubacije kombinacija 15 % CSE-a i 1 µg/mL Hsp70 značajno više aktivira kaspaze-3/7 u 16HBE stanicama u odnosu na sami 15 % CSE. Nasuprot tome, u uzorcima 16HBE stanica tretiranih samo s 15 % CSE-om tijekom 2 sata uočena je značajno smanjena aktivnosti kaspaza -8 i -9 u odnosu na netretirane stanice. Snižena aktivnost kaspaze-8 može upućivati na to da stanice izložene visokoj koncentraciji dima cigareta umiru nekim alternativnim putem (primjerice, inaktivacijom kaspaze-8 može doći do razvoja nekroptoze). Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da izlaganje bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE izvanstaničnom Hsp70, CSE-u, LPS-u, LTA-u ili njihovim kombinacijama uglavnom ne dovodi do aktivacije kaspaza-3/7, -8 i -9 te razvoja apoptoze. Rezultate rada bilo dobro nadopuniti određivanjem biljega drugih načina umiranja stanica (primjerice, nekroze ili

nekroptoze), što bi omogućilo bolju usporedbu s rezultatima već objavljenih radova te primjerenije zaključke vezano uz moguće uzroke gubitka plućnih struktura kod oboljelih od KOPB-a, a možda čak i potencijalne nove mete lijekova.

8.2. Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease that causes obstruction of air flow in the lungs. One of the main causes of COPD is cigarette smoke. Molecular mechanisms in the background are a classic combination of innate immunity and adaptive immunity. Pro-inflammatory cytokines and oxidative stress also play an important role. Such response can lead to cell death. Different types of cell death can be differentiated, but in this case the most relevant ones are apoptosis, necrosis and necroptosis. Heat shock proteins play an important role in modifying cell death. LPS (lipopolysaccharides) and LTA (lipoteichoic acid), as structural components of bacteria, behave as PAMPs (pathogen associated molecular patterns) and may modulate cell death via TLRs (Toll-like receptors). The aim of this study was to establish if the treatment of 16HBE cells with extracellular Hsp70, CSE (cigarette smoke extract), LPS, LTA or their combinations leads to cell death, that was quantified by the measurement of caspases activities. The measurement of the activities of caspases -3/-7, -8 and -9 was done with the use of commercial kits that contain specific luminogenic substrates for these caspases. The measured luminescence is proportional to the activity of caspases. The activity was measured after a two hour treatment and after an eight hour treatment. The results imply that after the treatment of 16HBE cells with eHsp70, CSE, LPS, LTA and their combinations after 2 hours or 8 hours there were no significant increases of cells in apoptosis when compared to untreated cells. The only result that was statistically significantly different was that after a two hour treatment, a combination of 15% CSE and 1 $\mu\text{g/mL}$ Hsp70 significantly increased an activity of caspases-3/7 in 16HBE cells when compared to the treatment with 15% CSE only. However, in the samples of 16HBE cells treated with 15% CSE during 2 hours, there was a significant drop in the activity of caspase-8 and caspase-9 when compared to untreated cells. The drop in the activity of caspase-8 can implicate that exposure to high concentrations of CSE lead to an alternative type of cell death (inactivation of caspase-8 may lead to necroptosis). From the results of this study, we can conclude that exposure of bronchial epithelial cells 16HBE to extracellular Hsp70, CSE, LPS, LTA or their combinations mostly does not lead to activation of caspases-3/7, -8 or -9 and apoptosis in general. The results of this work could be completed by measuring the markers of other types of cell death (such as necrosis or necroptosis). That would make even better comparison to results of the already conducted experiments. Better comparisons are crucial for

making new, more appropriate conclusions about what might be the cause of lung structure loss in COPD patients, and possibly even a discovery of new drug targets.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

16HBE	humana bronhijalna epitelna stanična linija
ALR	receptor sličan AIM-2 (eng. AIM-2 like-receptor)
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance (eng. One-Way Analysis of Variance)
APAF-1	faktor-1 za aktiviranje apoptotskih proteaza (eng. factor-1 for activating apoptotic proteases)
ATP	adenozin-trifosfat
CLR	receptori slični C-tipu lektina (eng. C-type-lectin receptors)
CSE	ekstrakt dima cigareta (eng. cigarette smoke extract)
DAMPs	molekularni obrasci povezani s oštećenjem (eng. damage-associated molecular patterns)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (eng. death inducing signaling complex)
FADD	protein koji ima domenu smrti povezan s Fas-om (eng. Fas-associated death domain)
FBS	fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum)
FEV ₁	forsirani izdisajni volumen u 1 s (eng. forced expired volume in 1 s)
G-CSF	faktor stimulacije granulocitnih kolonija
GM-CSF	faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija
GOLD	Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (eng. Global initiative for chronic obstructive lung disease)
HDAC	histonska deacetilaza
HSDJ	eng. Heatshock protein 70 DNA-J
HSP	protein toplinskog šoka (eng. heat shock protein)
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LPS	lipopolisaharid (eng. lipopolysaccharide)
LRR	leucinom bogata ponavljanja (eng. leucin-rich repeats)
LTA	lipoteikoična kiselina (eng. lipoteicoic acid)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (eng. mitogen-activated protein kinase)

MLKL	eng. mixed lineage kinase domain-like
MPO	mijeloperoksidaza
MyD88	čimbenik mijeloidne diferencijacije 88 (eng. myeloid differentiation factor 88)
NF- κ B	jezgrin čimbenik κ B
NK cells	prirodne stanice ubojice (eng. natural killer cells)
NLR	eng. NOD-like receptors
NLRP	protein koji sadrži NOD, LRR i pirin domenu (eng. NOD-, LRR-, and pyrin domain containing protein 3)
Nrf-2	nuklearni faktor eritroid-2
PAMPs	molekularni obrasci povezani s patogenima (eng. pathogen associated molecular pattern)
PI3K	fosfoinozimid 3-kinaza
PIP	fosfatidil-inozitol fosfat
PRR	receptor koji prepoznaje molekularne obrasce (eng. pattern recognition receptor)
RHIM	homotipni RIPK interakcijski motiv (eng. RIPK-homotypic interaction motif)
RIPK	protein koji ulazi u interakcije s receptorom (eng. receptor interacting protein)
RLR	eng. RIG-1-like receptors
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (eng. reactive oxygen species)
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	receptor sličan Tollu (eng. Toll-like receptor)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze- α (eng. tumor necrosis factor- α)
TRADD	domena smrti povezana s TNF receptorom
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon- β (eng. TIR domain-containing adaptor inducin interferon β)
ZBP1	protein koji veže Z-DNA (eng. Z-DNA binding protein 1)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Biokemija
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Učinak izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta, lipopolisaharida i lipoteikoične kiseline na aktivnosti kaspaza-3/-7, -8 i -9 u 16HBE bronhijalnim epitelnim stanicama

Veronika Jarni

SAŽETAK

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je kronična upalna bolest koja uzrokuje opstrukciju protoka zraka u plućima. Jedan od glavnih uzročnika KOPB-a je dim cigarete. Molekularni mehanizmi u pozadini klasična su kombinacija urođene i stečene imunosti, a važnu ulogu imaju i proupalni medijatori i oksidacijski stres. Takav upalni odgovor dovodi do smrti stanice. Razlikujemo mnogo načina smrti stanice, ali u ovom kontekstu su najrelevantnije apoptoza, nekroza i nekroptoza. Važnu ulogu u usmjeravanju stanice u određeni oblik stanične smrti imaju proteini toplinskog šoka. LPS (lipopolisaharid) i LTA (lipoteikoična kiselina) kao građivne komponente bakterija utječu kao molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMPs) te također usmjeravaju stanicu u staničnu smrt preko djelovanja na TLR receptore. Cilj ovog ispitivanja bio je korištenjem izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta (CSE), LPS-a i LTA te njihovih kombinacija na bronhijalnim epitelnim stanicama 16HBE utvrditi dovode li do smrti stanica mjerenjem aktivnosti pojedinih kaspaza. Ispitivanje aktivnosti kaspaza-3/-7, -8 i -9 provodilo se pomoću komercijalnih kitova koji sadrže specifične luminogene supstrate za navedene kaspaze. Nastala luminescencija proporcionalna je aktivnosti kaspaza prisutnih u uzorku. Praćena je aktivnost kaspaza nakon dvosatnog i osmerosatnog tretmana. Dobiveni rezultati ukazuju na to da nakon tretmana 16HBE stanica s izvanstaničnim Hsp70, CSE-om, LPS-om, LTA-om ili njihovim kombinacijama tijekom 2 ili 8 sati većinom ne dolazi do značajnijeg porasta broja stanica u apoptozi u odnosu na netretirane stanice. Pronađeno je jedino da nakon 2 sata inkubacije kombinacija 15 % CSE-a i 1 µg/mL Hsp70 značajno više aktivira kaspaze-3/-7 u 16HBE stanicama u odnosu na sami 15 % CSE. Nasuprot tome, u uzorcima 16HBE stanica tretiranih samo s 15 % CSE-om tijekom 2 sata uočena je značajno smanjena aktivnost kaspaza -8 i -9 u odnosu na netretirane stanice. Snižena aktivnost kaspaze-8 može upućivati na to da stanice izložene visokoj koncentraciji dima cigareta umiru nekim alternativnim putem (primjerice, inaktivacijom kaspaze-8 može doći do razvoja nekroptoze). Iz rezultata ovog rada može se zaključiti da izlaganje bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE izvanstaničnom Hsp70, CSE-u, LPS-u, LTA-u ili njihovim kombinacijama uglavnom ne dovodi do aktivacije kaspaza-3/-7, -8 i -9 te razvoja apoptoze. Rezultate rada bilo dobro nadopuniti određivanjem biljega drugih načina umiranja stanica (primjerice, nekroze ili nekroptoze), što bi omogućilo bolju usporedbu s rezultatima već objavljenih radova te primjerenije zaključke vezano uz moguće uzroke gubitka plućnih struktura kod oboljelih od KOPB-a, a možda čak i potencijalne nove mete lijekova.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 44 stranice, 6 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 58 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: KOPB, stanična smrt, kaspaze, dim cigareta, Hsp70, LPS, LTA

Mentor: Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Roberta Petlevski, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Effects of extracellular Hsp70, cigarette smoke extract, lipopolysaccharide and lipoteicoic acid on activity of caspases-3/-7,-8 and -9 in 16HBE bronchial epithelial cells

Veronika Jarni

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease that causes obstruction of air flow in the lungs. One of the main causes of COPD is cigarette smoke. Molecular mechanisms in the background are a classic combination of innate immunity and adaptive immunity. Pro-inflammatory cytokines and oxidative stress also play an important role. Such response can lead to cell death. Different types of cell death can be differentiated, but in this case the most relevant ones are apoptosis, necrosis and necroptosis. Heat shock proteins play an important role in modifying cell death. LPS (lipopolysaccharides) and LTA (lipoteicoic acid), as structural components of bacteria, behave as PAMPs (pathogen associated molecular patterns) and may modulate cell death via TLRs (Toll-like receptors). The aim of this study was to establish if the treatment of 16HBE cells with extracellular Hsp70, CSE (cigarette smoke extract), LPS, LTA or their combinations leads to cell death, that was quantified by the measurement of caspases activities. The measurement of the activities of caspases -3/-7, -8 and -9 was done with the use of commercial kits that contain specific luminogenic substrates for these caspases. The measured luminescence is proportional to the activity of caspases. The activity was measured after a two hour treatment and after an eight hour treatment. The results imply that after the treatment of 16HBE cells with eHsp70, CSE, LPS, LTA and their combinations after 2 hours or 8 hours there were no significant increases of cells in apoptosis when compared to untreated cells. The only result that was statistically significantly different was that after a two hour treatment, a combination of 15% CSE and 1 µg/mL Hsp70 significantly increased an activity of caspases-3/7 in 16HBE cells when compared to the treatment with 15% CSE only. However, in the samples of 16HBE cells treated with 15% CSE during 2 hours, there was a significant drop in the activity of caspase-8 and caspase-9 when compared to untreated cells. The drop in the activity of caspase-8 can implicate that exposure to high concentrations of CSE lead to an alternative type of cell death (inactivation of caspase-8 may lead to necroptosis). From the results of this study, we can conclude that exposure of bronchial epithelial cells 16HBE to extracellular Hsp70, CSE, LPS, LTA or their combinations mostly does not lead to activation of caspases-3/7, -8 or -9 and apoptosis in general. The results of this work could be completed by measuring the markers of other types of cell death (such as necrosis or necroptosis). That would make even better comparison to results of the already conducted experiments. Better comparisons are crucial for making new, more appropriate conclusions about what might be the cause of lung structure loss in COPD patients, and possibly even a discovery of new drug targets.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 6 figures, 1 table and 58 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COPD, cell death, caspases, cigarette smoke extract, Hsp70, LPS, LTA

Mentor: **Anita Somborac-Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac-Bačura, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Roberta Petlevski, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.