

Uloga ekspresije p16 u karcinomima glave i vrata

Šimatović, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:237604>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Domagoj Šimatović

**Uloga ekspresije p16 u karcinomima glave i
vrata**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Vesne Musani. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode.

Zahvala

Hvala mentorici, doc. dr. sc. Vesni Musani na povjerenju i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada, te ukazanom povjerenju.

Hvala prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na suvoditeljstvu.

Zahvaljujem se voditelju laboratorija, docentu Petru Ozretiću na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.

Veliko hvala ostalim članovima Laboratorija za nasljedni rak. Nikolini, Matei, Maji i Petru koji su u svakom trenutku bili spremni pomoć.

Hvala ti Andrea za sve savjete i podršku tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji bez čije podrške ovo ne bih mogao ostvariti

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Uloga ekspresije p16 u karcinomima glave i vrata

Domagoj Šimatović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Protein p16, kodiran genom *INK4A*, pripada obitelji gena *INK4* koja ima ulogu tumor supresora i negativno regulira signalni put pRb-E2F. Genetskim promjenama gena *INK4A* dolazi do potpune inaktivacije ili do smanjene funkcije proteina p16. Karcinomi glave i vrata su tumori koji nastaju na području usne šupljine, ždrijela, grkljana i žlijezda slinovnica. U 50-70% karcinoma glave i vrata nađena je inaktivacija gena *INK4A*. U ovom diplomskom radu istraživao sam utjecaj ekspresije proteina p16 u stanicama tumora glave i vrata A253, FaDU i Detroit 562, na ekspresiju ciljnih gena te modulaciju tretmana s kemoterapeutcima. Ustanovio sam da kemoterapeutici induciraju ekspresiju gena *INK4A* u nekim staničnim linijama te da dodatni tretman s p16 pojačava taj efekt. Prateći ekspresiju ciljnih gena p16 utvrdio sam da se genska i proteinska ekspresija gena *BIRC5* (proteina survivin) smanjuje pod utjecajem p16. Genska ekspresija gena *BIRC5* se smanjivala nakon tretmanima kemoterapeutcima. Tretman doksorubicinom povećao je gensku ekspresiju *E2F1* nekim linijama, dok ju je tretman etopozidom i p16 smanjio. Tretmani kemoterapeutcima i p16 utjecali su na stanični ciklus, uzrokovali oštećenje DNA, te apoptozu i smrt stanica. Kombinirani tretmani s p16 i kemoterapeutcima nisu pokazivali jednoznačne rezultate u staničnim linijama, pa se nije moglo zaključiti ima li p16 ikakav dodatni utjecaj.

(77 stranica, 27 slika, 4 tablice, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *INK4A*, tretmani, doksorubicin, etopozid

Voditelj: doc. dr. sc. Vesna Musani

Suvoditelj: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Prof. dr. sc. Sven Jelaska

Rad prihvaćen: 17.02.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Role of p16 expression in head and neck carcinoma

Domagoj Šimatović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

P16 is a protein coded by the *INK4A* gene that belongs to *INK4* gene family. They have a tumor suppressor role and negatively regulate the pRb-E2F signal pathway. When a genetic mutation appears in *INK4A*, it leads to inactivation of the protein p16 or its improper function. Head and neck carcinomas can occur in the oral cavity, pharynx, larynx or in the salivary glands. In 50-70% of head and neck cancers the inactivation of *INK4A* was found. In this graduation thesis I studied the influence of p16 protein expression in head and neck cell lines A253, FaDU and Detroit 562 on the expression of target genes and its effect of the treatment with chemotherapeutic drugs. I found that chemotherapeutics induce expression of *INK4A* gene in some cell lines and that additional treatment with p16 amplifies that effect. Following the expression of the p16 target genes I found that the protein and gene expression of *BIRC5* gene (survivin protein) is lowered under the influence of p16. Gene expression of the *BIRC5* gene was lowered with chemotherapeutics treatment. Treatment with doxorubicin increased the *E2F1* gene expression in some cell lines, but the treatment with etoposide and p16 lowered *E2F1* expression. Treatment with chemotherapeutics and p16 influenced the cell cycle, DNA damage, apoptosis, and cell death. Combined treatment of p16 and chemotherapeutics did not show consistent results in cell lines, so I could not make a conclusion if p16 has any additional influence.

(77 pages, 27 figures, 4 tables, 87 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: *INK4A*, treatments, doxorubicin, etoposide

Supervisor: doc. dr. sc. Vesna Musani

Co-supervisor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić

Prof. Sven Jelaska

Asst. Prof. Tomislav Ivanković

Thesis accepted: 17.02.2021.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Obitelj gena <i>INK4</i>	1
1.2.	Gen <i>INK4A</i>	2
1.3.	Struktura proteina p16.....	2
1.4.	Funkcija p16.....	3
1.5.	Genetske promjene	3
1.6.	Regulacija na razini transkripcije.....	4
1.6.1.	Regulacija putem ETS	4
1.6.2.	Regulacija putem E-kutija.....	4
1.6.3.	Regulacija putem SP1	5
1.7.	Posttranslacijska regulacija	5
1.7.1.	Fosforilacija.....	5
1.7.2.	Regulacija p16 u stanicama karcinoma	5
1.8.	Survivin	7
1.9.	Kemoterapeutici	7
1.9.1.	Doksorubicin.....	7
1.9.2.	Etopozid.....	8
1.10.	Karcinomi glave i vrata	8
1.10.1.	Patofiziologija nastanka.....	8
1.10.2.	Karcinomi glave i vrata pozitivni na prisutnost papiloma virusa.....	9
1.10.3.	Karcinomi glave i vrata neovisni o papiloma virusu	10
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	11
3.	MATERIJALI I METODE.....	12
3.1.	Materijali	12
3.2.	Metode.....	13
3.2.1.	Umnažanje plazmida u bakterijama.....	13
3.2.2.	Provjera bakterijskih kolonija PCR metodom.....	14
3.2.3.	Sekvenciranje plazmidne DNA.....	15
3.2.4.	Izolacija plazmidne DNA iz bakterija	16
3.2.5.	Rad sa staničnim kulturama	18
3.2.5.1.	Odmrzavanje stanica	18
3.2.5.2.	Presadivanje i održavanje stanica u kulturi	18
3.2.5.3.	Priprema stanica za transfekciju.....	19
3.2.5.4.	Transfekcija stanica	20
3.2.5.5.	Tretiranje stanica.....	20

3.2.5.6.	Određivanje doze LD ₅₀ kemoterapeutika	21
3.2.5.7.	Zamrzavanje stanica	22
3.2.6.	Izolacija proteina iz stanica.....	22
3.2.7.	Izolacija RNA iz stanica	23
3.2.8.	Metoda „westernskog otiska“	24
3.2.9.	Reverzna transkripcija	26
3.2.10.	Kvantitativni „real-time PCR“ (qRT-PCR)	26
3.2.11.	Protočna citometrija.....	27
3.2.11.1.	Analiza staničnog ciklusa	28
3.2.11.2.	Analiza oštećenja DNA.....	29
3.2.11.3.	Analiza apoptoze (kaspaza-3/7)	30
3.2.12.	Statistika	32
4.	REZULTATI.....	33
4.1.	Određivanje letalne doze LD ₅₀ kemoterapeutika kod staničnih linija karcinoma glave i vrata 33	
4.1.1.	LD ₅₀ doksorubicina.....	33
4.1.2.	LD ₅₀ etopozida	34
4.2.	Proteinska ekspresija metodom „Westernskog otiska“	35
4.2.1.	Stanične linije tretirane transfekcijom p16	35
4.3.	Genska ekspresija <i>INK4A</i> i njegovih ciljnih gena	37
4.3.1.	Utjecaj tretmana na ekspresiju gena <i>INK4A</i>	37
4.3.2.	Utjecaj tretmana na ekspresiju gena <i>BIRC5</i>	39
4.3.3.	Utjecaj tretmana na ekspresiju gena <i>E2F1</i>	40
4.4.	Analiza staničnog ciklusa	41
4.4.1.	Utjecaj transfekcijskog reagensa na stanični ciklus.....	42
4.4.2.	Utjecaj tretmana na stanični ciklus	43
4.5.	Analiza oštećenja DNA.....	47
4.5.1.	Utjecaj transfekcijskog reagensa na oštećenje DNA	47
4.5.2.	Utjecaj tretmana na oštećenje DNA.....	49
4.6.	Analiza apoptoze	53
4.6.1.	Utjecaj transfekcijskog reagensa na apoptozu.....	53
4.6.2.	Utjecaj tretmana na apoptozu	55
5.	RASPRAVA.....	60
5.1.	Ekspresija gena <i>INK4A</i>	60
5.2.	Ekspresija gena <i>BIRC5</i>	60
5.3.	Ekspresija gena <i>E2F1</i>	61
5.4.	Utjecaj tretmana na stanični ciklus	62

5.5.	Utjecaj tretmana na oštećenje DNA.....	62
5.6.	Utjecaj tretmana na apoptozu	63
6.	ZAKLJUČAK.....	64
7.	LITERATURA.....	65
8.	ŽIVOTOPIS.....	77

KRATICE:

ARF – eng. Alternative reading frame, gen Alternativni okvir čitanja

APS – eng. Ammonium persulfate, amonijev persulfat

BCA - eng. bicinchoninic acid, bicinhoninska kiselina

BIRC5 – eng. Baculoviral IAP Repeat-Containing 5, gen Bakulovirusno IAP ponavljanje 5

BSA - eng. Bovine serum albumin, goveđi albumin iz seruma

CCND1 – eng. cyclin D1, ciklin D1

CDC 6 – eng. cell division cycle 6, ciklus diobe stanica 6

CDK – eng. cyclin-dependent kinase, kinaza ovisna o ciklinu

CDK4 – eng. cyclin-dependent kinase, kinaza ovisna o ciklinu 4

CDK6 – eng. cyclin-dependent kinase, kinaza ovisna o ciklinu 6

CDKN2A – eng. cyclin dependent kinase inhibitor 2A, inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A

DMSO – eng. Dimethyl Sulfoxide, dimetil sulfoksid

E2F – eng. E2F transcription factor, E2F transkripcijski faktor

E2F1 – eng. E2F transcription factor 1, E2F transkripcijski faktor 1

EDTA – eng. Ethylenediaminetetraacetic acid, etilendiamintetraoctena kiselina

ETS1 – eng. ETS Proto-oncogene 1 transcription factor, ETS proto-onkogen 1 transkripcijski faktor

ETS2 - eng. ETS Proto-oncogene 2 transcription factor, ETS proto-onkogen 2 transkripcijski faktor

FBS – eng. Fetal bovine serum, fetalni goveđi serum

GRIM-19 – eng. Cell Death Regulatory Protein GRIM-19, Protein regulacije stanične smrti GRIM-19

HLH – eng. helix-loop-helix, petlja-zavojnica-petlja

HPV – eng. Human papillomavirus, humani papiloma virus

ID1 – eng. Inhibitor of DNA Binding 1, inhibitor vezanja DNA 1

JNK – eng. Mitogen-activated protein kinase, proteinska kinaza aktivirana mitogenom

LD50 – eng. Lethal dose 50%, letalna doza 50%

mRNA – eng. messenger RNA, glasnička RNA

MTT – eng. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid

PCR - eng. polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

RB – eng. retinoblastoma gene, retinoblastoma gen

SAP - eng. Shrimp Alkanine Phosphatase, alkalna fosfazata iz škampa

Ser/Thr – eng. serine/threonine protein kinase, serin/treonin protein kinaza

SEI-1 - eng. SERTA domain-containing protein 1, protein koji sadrži domenu SERTA 1

SP1 – eng. SP1 transcription factor, SP1 transkripcijski faktor

P300/CBP – eng. P300/CBP coactivator family, P300/CBP koaktivatorska obitelj

PTEN – eng. Phosphatase and tensin homolog. Homolog fosfataze i tenzina

TEMED – eng. Tetramethylethylenediamine, tetrametiletilendiamin

TFIIH – eng. transcription factor II H, transkripcijski faktor II H

TP53 – eng. tumor protein P53, tumor supresorski protein p53

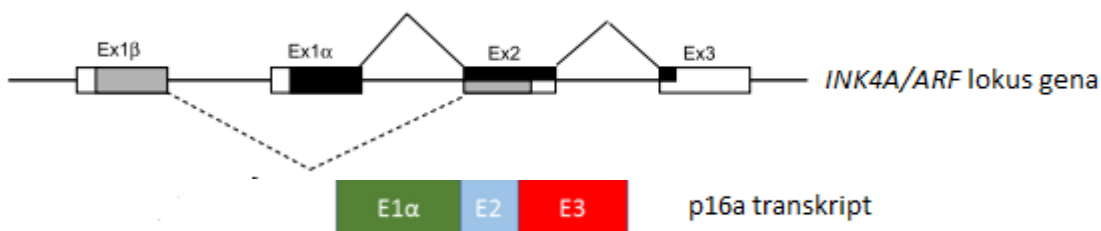
1. UVOD

1.1. Obitelj gena *INK4*

Stanični ciklus se sastoji od četiri osnovne faze. Tijekom dvije od četiri faze, stanica stvara jednu kopiju potpuno identičnog genetskog materijala (tijekom S faze) i prolazi proces razdvajanje staničnog sadržaja na dvije identične stanice (M faza). Ostale dvije faze su G1 i G2 unutar kojih se stanica priprema za obavljanje funkcija u S i M fazi. Da bi se osigurao normalan tijek staničnog ciklusa, stanice su razvile kontrolne točke. Kontrolne točke su mjesto prevencije napredovanja kroz stanični ciklus ako se prethodni korak staničnog ciklusa nije proveo do kraja (Roussel 1999).

Napredovanje kroz svaku fazu osiguravaju CDK (eng. Cyclin-dependent kinase, hrv. Kinaze ovisne o ciklinu). CDK su protein kinaze Ser/Thr (serin/treonin). Aktiviraju se fosforilacijom ili defosforilacijom nakon čega se vežu na regulatorne podjedinice ili cikline kako bi stvorili heterodimere (Massague 2004).

Mali peptidi negativno reguliraju tj. inhibiraju cikline. U sisavaca, inhibitori CDK su podijeljeni u dvije obitelji: INK4 i Cip/KiP. INK4 (eng. family of cyclin-dependent kinase inhibitors, hrv. obitelj inhibitora kinaze ovisne o ciklinu) specifično veže i inhibira proteine CDK4 i CDK6. U obitelji INK4 pripadaju p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) i p19 (INK4D) (Li i sur. 2011, Pei i Xiong 2005). Navedena četiri proteina iz obitelji INK4 dijele sličnu strukturu kojom dominira nekoliko ankirinskih ponavljanja (motiv dug 33 aminokiseline unutar proteina koji se sastoji od dvije alfa zavojnice razdvojene petljama). Proteini INK4 su često inaktivirani ili izgubljeni zbog mutacija, koje doprinose razvoju raznih oblika tumora (Ortega i sur. 2002, Pei i sur. 2005).



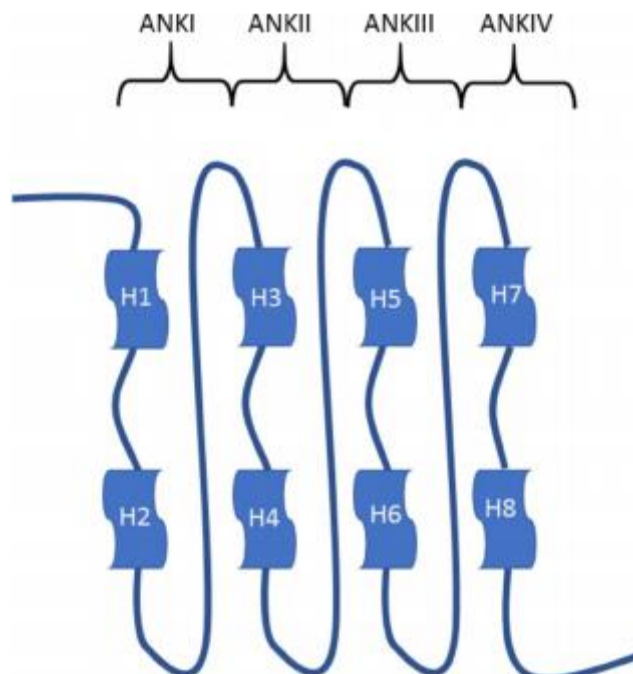
Slika 1 – Shematski prikaz gena *INK4A* (preuzeto iz Serra i Chetty 2018)

1.2. Gen *INK4A*

Gen *INK4A* (još poznat i pod imenom *CDKN2A* (eng. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, hrv. Inhibitor kinaze ovisne o ciklinu 2A) koji kodira protein p16 nalazi se na kromosomu 9p21 unutar lokusa *INK4B/ARF/INK4A* koji sadrži gene *INK4B*, *ARF* i *INK4A* (Krishnamurthy i sur. 2004). Geni *INK4A* i *ARF* (eng. Alternative reading frame, hrv. alternativni okvir čitanja) se prepisuju s istog mjesta, ali postoje dva okvira za čitanje. Gen *INK4A* uključuje eksone E1 α , E2 i E3, dok gen *ARF* uključuje E1 β , koji se nalazi 20 kb uzvodno od E1 α , E2 i E3 (Slika 1). Dakle, spajanjem eksona E1 α na E2 i E3 nastaje tumor supresor p16 (Li i sur. 2011, Lin i sur. 2007). Unutar istog lokusa nalazi se gen *INK4B* koji se nalazi uzvodno od gena *ARF* i *INK4A*.

1.3. Struktura proteina p16

Protein p16 sastoji se od 4 ankirinska ponavljanja (Slika 2). Ankirinska ponavljanja se sastoje od motiva koji imaju između 31-34 ostataka koji su složeni na način da nakon svake zavojnice dolazi do naglog zakretanja za 90° te ponovnog ponavljanja zavojnica. Susjedna ankirinska ponavljanja povezana su petljama različitih dužina koja su okomito orijentirana prema zavojnici.



Slika 2 – Shematski prikaz proteina p16 (preuzeto iz Serra i Chetty 2018)

1.4. Funkcija p16

Funkcija proteina p16 je da negativno regulira signalni put pRb-E2F tijekom staničnog ciklusa. Tijekom G₀ i na samom početkom G₁ faze, pRb je hipofosforiliran te veže i sprječava transkripcijske faktore E2F u aktiviranju promotora gena koji su odgovorni za proliferaciju stanice. Tijekom proliferacije, CDK4 i CDK6 fosforiliraju pRb na kraju G₁ faze. Time stanični ciklus ulazi u S fazu ciklusa. Kako bi se to spriječilo, p16 se veže na CDK4 i CDK6, te dolazi do hipofosforilacije pRb-a.

Također, p16 može destabilizirati komplekse CDK4 i CDK6, povećavajući na taj način otpuštanje drugih inhibitora.

Prema nekim istraživanjima, povećana koncentracija proteina p16 pojavljuje se ne samo kod premalignih stanica, već i kod starenja stanica (Li i sur. 2011).

Ukratko, konačna funkcija proteina p16 je zaustavljanje staničnog ciklusa u G₁/S fazi.

1.5. Genetske promjene

Kompleksnost lokusa *INK4B/ARF/INK4A* stvara velike probleme kada se na njemu dogode genetske promjene, mutacije. Jedna, primjerice, homozigotna delecija može istovremeno dovesti do gubitka funkcije nekoliko tumor supresorskih gena (Kim i Sharpless 2006). S druge strane, jedna točkasta mutacija u eksonu 2 inaktivira i *INK4A* i *ARF* (Kresty i sur. 2008). *INK4A* je, uz *TP53*, najčešće mutirani gen u humanim karcinomima. Do inaktivacije gena *INK4A* dolazi kroz četiri tipa genetskih promjena: hipermetilacije promotora, homozigotnih delecija, gubitka heterozigotnosti te točkastih mutacija (Forbes i sur 2006, Li i sur. 2000, Ortega i sur 2002). Najčešće genetske promjene gena *INK4A* su homozigotne delecije i hipermetilacija promotora. Kod karcinoma glave i vrata inaktivacija gena *INK4A* pronađena je u 50-70% slučajeva, a prednjače točkaste mutacije, u 30% slučajeva.

Svaka od navedenih mutacija ima različito djelovanje na funkciju proteina p16. Homozigotne delecije dovode do kompletnog gubitka funkcije p16, jer se protein ne može sintetizirati. Za razliku od toga, točkaste mutacije, među kojima su „missense“ (hrv. krivosmislene) mutacije najčešće, dolazi do djelomične promjene u strukturi, te naposljetku u funkciji p16 (Byeon i sur. 1998, Guo i sur. 2009). „Missense“ mutacije pronađene su u 76 ostataka p16 (Sharpless 2005). „Missense“ mutacije povezane s nastankom karcinoma mogu se podijeliti u 4 grupe, prema svojem efektu na protein CDK4. Prva grupa se sastoji od aminokiselina koje su direktno

uključene u povezivanju s CDK4/6, to su: E26, D74, D84 i D92. Oni se nalaze s konkavne strane proteina p16 koja se veže na CDK4. Promjene ne mijenjaju strukturu i stabilnost p16, ali dovode do slabije inhibicije CDK4. Druga grupa se sastoji od promjena u aminokiselinama W15, E69, N71, F90, W110 i L121. Ovi ostatci su direktno odgovorni za stabilnost strukture proteina p16. Mutacije tih aminokiselina dovode do slabije inhibicije CDK4 i smanjuju stabilnost p16. Treća grupa je odgovorna za strukturu proteina p16. To su ostatci L63, L78, P81, A100, G101 i P114. Mutacije ovih ostataka dovode do značajnih promjena u strukturi p16 i potpune eliminacije sposobnosti p16 da inhibira CDK4. Četvrta grupa ne uzrokuje promjene u inhibiciji, strukturi ili stabilnosti proteina p16. Mutacije četvrte grupe ostataka ne mijenjaju vezanje na CDK4, nego do promijenjenog vezanja na proteine TFIIH, JNK i GRIM-19 (Becker i sur. 2001, Choi i sur. 2005, Sun i sur. 2010).

1.6. Regulacija na razini transkripcije

1.6.1. Regulacija putem ETS

Transkripcijski faktori ETS1 i ETS2 (eng. E-26 transformation-specific, hrv. E-26 specifični transformatori) su nizvodni ciljevi signalnog puta Ras-Raf-MEK, te su aktivirani fosforilacijom MAPK. U području promotora gena *INK4* nalazi se kratko mjesto, na pozicijama -124 do -85 pozicije na koje se veže ETS. Prilikom vezanja ETS1 i ETS2 uzrokuju povećanu ekspresiju p16 u ljudskim fibroblastima. ETS2 je dominantni protein ETS u transaktivaciji p16. Da bi se održavala normalna razina ETS2, protein ID1 (od eng. Inhibitor Of DNA Binding 1, hrv. inhibitor vezanja DNA 1) funkcionira kao protuteža njegovom djelovanju. No, onkogen Ras može potpuno poremetiti takvo normalno stanje. Ras uzrokuje prekomjernu fosforilaciju ETS2 koje za posljedicu ima aktivaciju promotora p16 i transkripciju.

Odnos razina ETS1, ETS2 i ID1 djeluje kao senzor za detekciju prekomjerne količine signala rasta, odnosno signal onkogenog stresa (Ohtani i sur. 2001, Schmid i sur. 2007).

1.6.2. Regulacija putem E-kutija

Protein ID1, osim šta kontrolira aktivnost ETS, također ima utjecaj na transaktivaciju transkripcijskog faktora E47. E47 sadrži domenu HLH (eng. helix-loop-helix, hrv. petlja-zavojnica-petlja) koja ima mogućnost povezivanja s drugim proteinima HLH te na taj način regulira gensku ekspresiju *INK4A*. Gen *INK4A* ima dva elementa e-kutije. Prvi se nalazi na

poziciji -349 (CAGGTG), a drugi na poziciji -615 (CAGGTG). (Zheng i sur. 2004) Homodimerizacijom i heterodimerizacijom s drugim proteinima E, E47 se veže na dva navedena mjesta te aktivira transkripciju p16. Spomenuti ID1 sadrži domenu HLH, no nema domene potrebne za vezanje na molekulu DNA. Radi toga ID1 može stvarati samo heterodimerske veze s E47 tako inhibirajući E47 u aktivaciji promotora p16 (Hansson i sur. 2003).

1.6.3. Regulacija putem SP1

U promotoru gena *INK4A* postoji najmanje 5 regija GC, i to na pozicijama od -474 do -447, od -462 do -435, od -380 do -355, od -76 do -49, od -26 do -1. Ta područja predstavljaju vezna mjesta za transkripcijske faktore SP (Hansson i sur. 2003, Wu i sur. 2007). SP1 uz transkripcijske koaktivatore P300/CBP stimulira promotor *INK4A* i time mRNA ekspresiju p16. Ektopična ekspresija P300 može uzrokovati zastoj u staničnom ciklusu regulirajući ekspresiju p16. No, uloga P300 ne može biti samostalna već samo sa SP1 (Xue i sur. 2004).

1.7. Posttranslacijska regulacija

1.7.1. Fosforilacija

Fosforilirani p16 ima povećani afinitet prema CDK4 i CDK6. Postoje četiri specifična serinska mjesta gdje se p16 fosforilira. To su Ser7, Ser8, Ser140 i Ser152 u ljudskim fibroblastima. Ove serinske aminokiseline, nemaju direktni kontakt s proteinima CDK4 i CDK6. No, u stanicama melanoma su pronađene mutacije koje uključuje navedene serinske aminokiseline pokazujući važnost fosforilacije p16 u stanicama karcinoma (Gump i sur. 2003).

1.7.2. Regulacija p16 u stanicama karcinoma

Karcinogeneza je proces u kojem normalna stanica postane maligna putem višestrukih aktivacija protoonkogeni i inaktivacijom tumor supresorskih gena. Uz inaktivaciju p16 kao jednog od ključnih koraka pri nastanku karcinoma, postoje druge promjene na molekularnoj razini koje direktno utječu na regulaciju i funkciju p16. Aktivacija ciklina D1, gankirina, SEI-1 (eng. SERTA domain-containing protein 1, hrv. protein koji sadrži domenu SERTA 1), CDC6

(eng. cell division cycle 6, hrv. Ciklus diobe stanica 6) su samo neki od takvih različitih mehanizama.

U slučaju genetske inaktivacije p16 putem delecije ili utišavanja, njegovu funkciju mogu zamijeniti proteini p15 ili p18 (Krimpenfort i sur. 2007, Wiedemeyer i sur. 2008). Dok s druge strane u pojedinim slučajevima p16, iako ima normalnu ekspresiju i funkciju, mogu funkcionalno inaktivirati prekomjerne ekspresije CDC6, ciklina D1 ili SEI-1. Prekomjerna ekspresija navedenih proteina može dovesti do ubrzane kancerogeneze.

Koordinacija između genetski uzrokovane inaktivacije ekspresije p16 i onkogeno uvjetovane deregulacije p16 se može razlikovati s obzirom na stadij karcinoma (Li i sur. 2010). Deregulacija p16 kroz aktivaciju onkogenog događa se tijekom početnih stadija razvoja karcinoma (Park i sur. 2001, Umemura i sur. 2008). Primjerice, u kemijski induciranoj karcinogenezi jetre na modelu glodavaca, hipermetilacija p16 događa se u kasnijem stadiju razvoja bolesti uz prekomjernu ekspresiju gankirina (Park i sur. 2001). Također, prekomjerna ekspresija gankirina otkrivena je u otprilike 50% premalignih lezija usne šupljine (Li i sur. 2011). Navedeno dovodi do zaključka kako prekomjerna ekspresija gankirina, bez obzira na genetske promjene *INK4A*, može biti vrijedan biomarker za rano otkrivanje karcinoma.

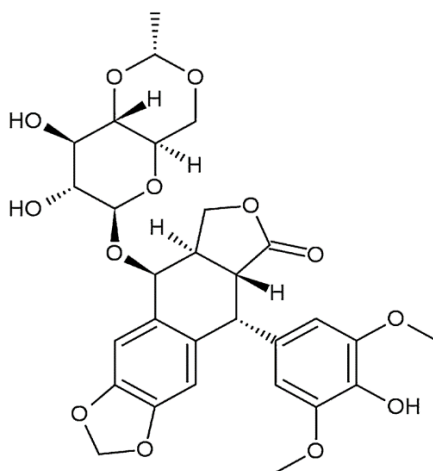
Onkogeno uvjetovana deregulacija funkcije p16 ima veći utjecaj na funkciju p16 u usporedbi s genetski inaktiviranim p16 (Li i sur. 2004, Li i sur. 2010). Primjerice, prekomjerna ekspresija gankirina dovodi do poremećaja u staničnom ciklusu zbog njegovog utjecaja na CDK4, pRb te p53 (Li i sur. 2010). Smetnje pri interakciji RD-CDC6, npr. genetske promjene *RD* i povećana ekspresija CDC6 može imati efekt na sva tri tumor supresorska gena koju kodira lokus *INK4B/ARF/INK4A*. To govori da ovakve smetnje mogu imati puno veći utjecaj na kancerogenezu od genetske inaktivacije gena *INK4A* ili *ARF* (Gonzalez i sur. 2006).

Većina humanih karcinoma u kojima se događa genetska promjena na genu *INK4A*, ima potpuno netaknut gen *INK4B* (Ortega i sur. 2002).

Negativna regulacija p16 dovodi do progresije karcinoma dopuštajući nenormalnu proliferaciju. Prekomjerna ekspresija p16 nekada se smatrala karakteristikom stanične smrti inducirane stresom i starenja stanice (Collado i sur. 2007, Yang i sur. 2008). No, prekomjerna ekspresija p16, bilo divljeg tipa ili mutanta, povezana je s lošom prognozom kod neuroblastoma, karcinoma jajnika, vrata maternice, prostate i usne šupljine (Lang i sur. 2002).

1.9.2. Etopozid

1932. godine je u biljci *Podophyllum peltatum* pronađen spoj pod nazivom podophyllotoxin. 1983. godine spoj etopozid, kao derivat navedenog podophyllotoksina, odobren je u svrhu terapije karcinoma (Slika 4). Etopozid djeluje na drugi korak tijekom djelovanja topoizomeraze II, odnosno, inhibira drugi korak u reakciji gdje se događa ponovna ligacija DNA (Hande 1998).



Slika 4 – Struktura etopozida (Klassen i sur. 2014)

1.10. Karcinomi glave i vrata

Karcinomi glave i vrata razvijaju se iz mukoznog epitela koji se nalazi unutar usne šupljine, grkljana i ždrijela. Uzrok karcinoma glave i vrata je usko vezan uz dugogodišnju konzumaciju alkohola ili prekomjernog uživanja duhanskih proizvoda. Osim konzumacije alkohola i duhanskih proizvoda, infekcija s onkogenim sojem humanog papiloma virusa (HPV), točnije HPV-16, također je povezana s razvitkom karcinoma (Isayeva i sur. 2012, Michaud i sur. 2014, Stein i sur. 2015). Karcinomi oralne šupljine i grkljana, koji su usko povezani s konzumacijom duhanskih proizvoda, klasificirani su kao HPV-negativni karcinomi glave i vrata.

1.10.1. Patofiziologija nastanka

Kao što je već navedeno, ovaj tip karcinoma povezan je s mukoznim epitelom koji oblaže usnu šupljinu, grkljan i ždrijelo. Progresija od normalnog mukoznog tkiva do invazivnog karcinoma se ne događa odjednom, već je potreban niz od četiri koraka koji dovode do invazivnog oblika. U prvom koraku dolazi do gubitka heterozigotnosti na lokusu 9p21, mjestu gdje se nalazi gen *INK4A*, te dolazi do njegove inaktivacije. Inaktivacijom *INK4A* dolazi do hiperplazije, odnosno

povećanog broja stanica. Drugi korak dovodi do gubitka heterozigotnosti na lokusima 3p21 i 17p13 što dovodi do inaktivacije gena *TP53*. Gen *TP53* kodira protein p53 koji je tumor supresorski protein koji regulira brzinu kojom stanica proliferira. Hiperplazija prelazi u displaziju. Displazija je termin koji uglavnom govori o određenoj abnormalnosti u razvoju, uglavnom o povećanom broju nezrelih stanica. Gubitak heterozigotnosti na lokusima 11q13, 13q21 i 14q32 dovodi do amplifikacije gena *CCND1* (eng. Cyclin D1, hrv. ciklin D1), koji kodira protein ciklin D1. Displazija prelazi u *in situ* karcinom. *In situ* je naziv za nakupinu abnormalnih stanica na jednom mjestu, bez dokaza o daljnjem širenju abnormalnih stanica. Ovim je završen treći korak u progresiji bolesti. Završni, četvrti korak je invazivni karcinom. Invazivni karcinom je naziv za stupanj progresije u kojoj su stanice karcinoma infiltrirale u okolno tkivo. U ovom slučaju dolazi do gubitka heterozigotnosti na lokusima 6p, 8, 4q27 i 10q23 te inaktivacija gena *PTEN* (od eng. Phosphatase and tensin homolog, hrv. Homolog fosfataze i tenzina) (Shah i sur. 2011).

1.10.2. Karcinomi glave i vrata pozitivni na prisutnost papiloma virusa
Povećani rizik za nastanak karcinoma glave i vrata je infekcija humanim papiloma virusima (HPV). Preko 70% karcinoma srednjeg dijela ždrijela povezano je s infekcijom HPV (Isayeva i sur. 2012, Stein i sur. 2015). HPV-16 je glavni uzročnik, ali HPV-18, HPV-31, HPV-33 i HPV-52 su također pronađeni kao uzročnici, no u vrlo malom postotku (Michaud i sur. 2014). Virusni genom je većinom pronađen na samo jednom mjestu u genomu domaćina (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Genom se sastoji od 7 ranih gena (*E1-E7*) te dva kasna gena (*L1* i *L2*). *L1* i *L2* kodiraju kapsidne proteine, dok *E1* i *E5* kodiraju proteine odgovorne za replikaciju i transkripciju virusnog genoma. Geni odgovorni za onkogeni transformaciju stanice su *E6* i *E7*. Protein E6 formira kompleks s E6-AP i p53 što dovodi do degradacije proteina p53 (Scheffner i sur. 1993). Protein E7 se snažno veže na regulator staničnog ciklusa, protein retinoblastoma (RB1), uzrokujući time proteosomsko uništenje proteina RB1 i oslobađanje transkripcijskih faktora E2F (Eckhardt i sur. 2018, Tomaic 2016, White i sur. 2012). Oslobodeni proteini E2F osiguravaju nesmetan „prolaz“ staničnog ciklusa u S fazu. Onemogućavanje normalne funkcije proteina RB1 putem E7 dovodi do povećanja ekspresije p16 (Estevao i sur. 2019, Venuti i sur. 2011).

1.10.3. Karcinomi glave i vrata neovisni o papiloma virusu

Primarni faktor za razvoj karcinoma glave i vrata negativnog na prisustvo HPV je konzumacija duhanskih proizvoda. Duhanski dim sadrži preko 5000 različitih kemijskih spojeva, među kojima su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH, eng. Polycyclic aromatic hydrocarbon) najodgovorniji za razvitak karcinoma (Hecht 1999). Uživanje duhanskih proizvoda je povezano s upalnim procesima u tkivima koja imaju direktan doticaj s duhanskim dimom. Upalni procesi uzrokuju povećanje produkcije citokina, kemokina i faktora rasta, što kao posljedicu može imati proliferaciju stanica, a na kraju karcinogenezu (Talamini i sur. 2002). Alkohol, kao još jedan faktor u nastajanju karcinomu glave i vrata funkcionira sinergistički s duhanskim proizvodima. Alkohol može služiti kao otopina za kancerogene spojeve te samim tim uzrokovati veću izloženost epitelnih stanica kancerogenim spojevima (Pai i i Westra 2009). Također, alkohol se metabolizira u acetaldehid koji je poznat da može uzrokovati mutacije svojim vezanjem na DNA (Brooks i Theruvathu 2005).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Protein p16, kodiran genom *INK4A*, pripada obitelji gena *INK4* koja ima tumor supresorsku ulogu i reguliraju puteve p53 i RB1 u staničnom ciklusu. Protein p16 negativno regulira signalni put pRb-E2F put tijekom staničnog ciklusa. Genetskim promjenama gena *INK4A* dolazi do potpune inaktivacije ili do smanjene funkcije proteina p16.

Hipoteza: Transfekcijom funkcionalne sekvence gena *INK4A* stanicama koje imaju mutirani gen *INK4A* trebao bi se modulirati odgovor na oštećenje DNA.

Cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj ekspresije egzogenog p16 na stanične linije karcinoma glave i vrata A253, FaDU, Detroit 562. Ovim ispitivanjem ustanovit će se kako transfekcija funkcionalnog p16 djeluje na stanični ciklus, apoptozu i razinu oštećenja DNA u normalnim uvjetima i uz tretman kemoterapeuticima doksorubicinom i etopozidom koji izazivaju oštećenje DNA.

Specifični ciljevi:

1. Ustanoviti utjecaj tretmana kemoterapeuticima na ekspresiju gena *INK4A* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 koje imaju različite mutacije gena *INK4A* sa i bez tretmana plazmidom koji eksprimira nemutirani protein p16
2. Ustanoviti utjecaj tretmana kemoterapeuticima na ekspresiju gena *BIRC5* i *E2F1* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 sa i bez tretmana plazmidom sa sekvencom za p16
3. Ustanoviti utjecaj tretmana kemoterapeuticima na stanični ciklus u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 sa i bez tretmana plazmidom sa sekvencom za p16
4. Ustanoviti utjecaj tretmana kemoterapeuticima na oštećenje DNA u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 sa i bez tretmana plazmidom sa sekvencom za p16
5. Ustanoviti utjecaj tretmana kemoterapeuticima na apoptozu u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 sa i bez tretmana plazmidom sa sekvencom za p16

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Istraživanje je provedeno na staničnim linijama karcinoma glave i vrata A253 (ATCC® HTB-41™), FaDU (ATCC® HTB-43™) i Detroit 562 (ATCC® CCL-138™). U tablici 1 prikazane su neke karakteristike tih staničnih linija. To su komercijalno dostupne stanične linije koje se uzgajaju kao adherentne kulture. Stanične linije FaDU i Detroit 562 uzgajaju se u mediju DMEM s 10% FBS (eng. Fetal bovine serum, hrv. Fetalni goveđi serum) dok se stanična linija A253 uzgaja u mediju McCoy's s 10% FBS. Stanične linije su uzgajane i održavane u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂, pri temperaturi od 37°C, u odgovarajućim petrijevkama za kultivaciju humanih stanica. Navedene stanice sam održavao u ekspanzionalnoj fazi rasta te koristio u pokusima transfekcije plazmidnim vektorom, tretmanima kemoterapeutcima, praćenje promjena ekspresije na razini RNA i proteina te za analizu staničnog ciklusa, oštećenja DNA i apoptoze.

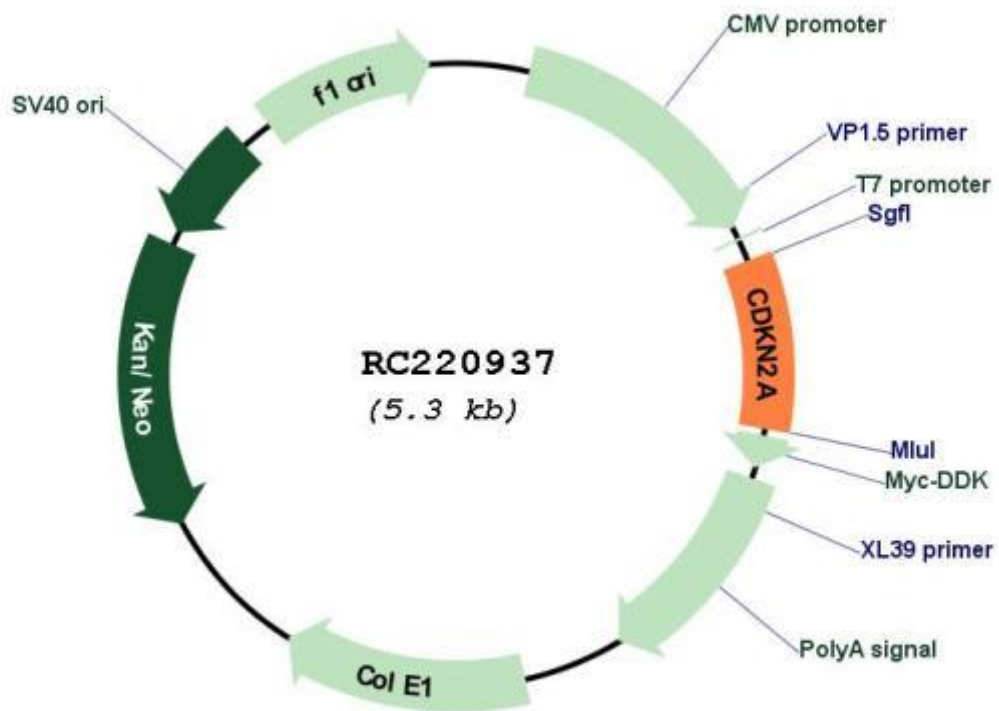
Tablica 1. – Karakteristika staničnih linija

Stanična linija	A253	FaDU	Detroit 562
lokacija	Žlijezda slinovnica	Hipofarinks	Ždrijelo
spol	Muški	Muški	Ženski
dob	54	56	-
mutacija <i>INK4A</i>	c.49_61del13	c.151-1G>T	c.1_457del457
druge mutacije	<i>KDM5C, TP53</i>	<i>SMAD4, TP53</i>	<i>PIK3CA, TP53</i>

3.2. Metode

3.2.1. Umnažanje plazmida u bakterijama

Komercijalni plazmidni vektor koji eksprimira p16 nabavljen je od tvrtke OriGene (RC220937, OriGene, SAD) (Slika 5). Za potrebe ovog rada bilo je potrebno umnožiti plazmid, te sekvenciranjem provjeriti da nije došlo do mutacija u sekvenci gena *INK4A*.



Slika 5 - Shematski prikaz plazmidnog vektora RC220937 s ukloniranim genom *INK4A* (pod imenom *CDKN2A*) (www.origene.com 05.01.2021.)

Plazmidom su transformirane u kompetentne bakterije (*Escherichia coli*, soj One Shot OmniMAX, Thermofisher, SAD). Bakterije se drže pohranjene na -80°C alikvotirane u volumen od 50 ml. Jednu ampulu bakterija otopio sam na ledu i u nju sam dodao 2 μl plazmida. Smjesu sam inkubirao 10 minuta na ledu, a potom zagrijao 30 sekundi na 42°C na termobloku. Smjesu sam zatim hladio 1 minutu na ledu, te nakon toga sam u nju dodao 250 μl medija LB (Sigma,

SAD) bez antibiotika, te inkubirao 80 minuta u termobloku na 37°C. Nakon inkubacije 100 µl bakterijske kulture sam razmazao na selektivnu ploču u kojoj se nalazi medij LB, agar i antibiotik kanamicin (50 µg/ml) i inkubirao preko noći na 37°C.

3.2.2. Provjera bakterijskih kolonija PCR metodom

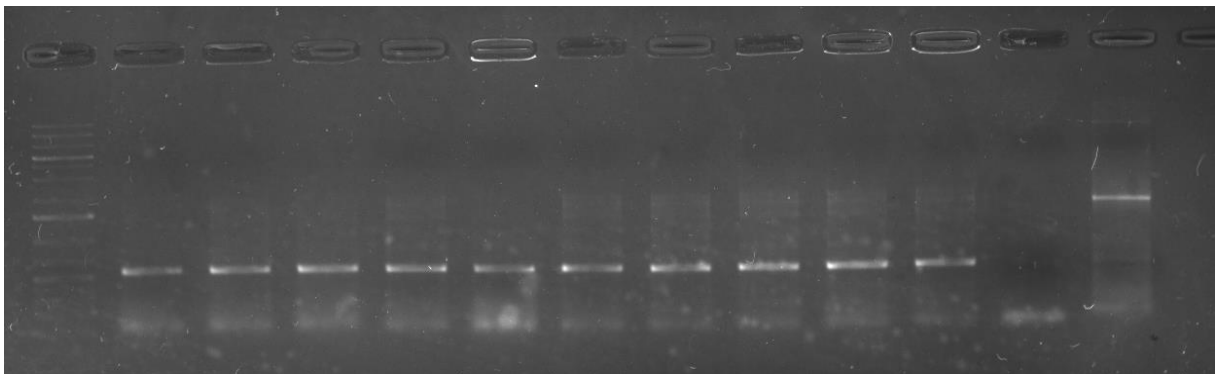
Bakterije koje su primile plazmid, stekle su rezistenciju na antibiotik kojeg sadržava tvrda hranjiva podloga (kanamicin). „Colony PCR“ metoda je koja omogućava provjeru bakterijskih kolonija koje su ugradile plazmid. Ovom metodom umnažao sam odsječak DNA plazmida duljine 764 pb u kojem se nalazi insertirani gen *INK4A* koristeći početnice T7 i XL39.

Na početku pripreme za PCR označio sam epruvete od 0,2 ml, te epruvete od 2ml. U epruvete od 2 ml dodao sam 1 ml LB medija s kanamicinom. Taj set epruveta, kasnije će služiti za pripremu starter bakterijske kulture koje analizom PCR i sekvenciranja pokazuju da sadrže točnu sekvencu. Epruvete od 0,2 ml služe za pripremu PCR uzorka. U njih sam dodao po 10 µl reakcijske smjese. S unutarnje strane poklopca, dodao am jednu kap parafinskog ulja kako bi se spriječilo hlapljenje reakcijske smjese tijekom PCR postupka. Sterilnim nastavkom pipete dotaknuo sam željene kolonije na krutoj podlozi i taj sadržaj resuspendirao unutar odgovarajuće epruvete od 0,2 ml. Nakon resuspendiranja u epruveti od 0,2 ml, tim istim nastavkom sam resuspendirao sadržaj unutar epruvete od 2 ml. Ovim načinom odmah sam priredio bakterijske kolonije koje nakon PCR postupka pokazuju da sadrže željeni fragment. Za svaku naraslu koloniju na tvrdoj hranjivoj podlozi postupak sam ponovio. Na kraju postupka, epruvete sam promiješao na mješalici i centrifugirao te ih postavio u PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) na sljedeći program:

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
94°C	4:00	
94°C	0:30	45x
51°C	1:00	
72°C	1:30	
72°C	7:00	
4°C	∞	

Epruvete od 2 ml, tzv. „starter kolonije“ stavio sam na termoblok, kojega sam postavio na 37°C tijekom nekoliko sati, a zatim na 4°C (do provjere sekvenciranjem), dok sam krute bakterijske podloge zaštitio parafilmom i pohranio na 4°C.

Da bi se identificirao željeni insert u bakterijskim kolonijama, iste sam ispitivao postupkom gel elektroforeze na agaroznom gelu (1%) koristeći boju Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Njemačka). Jedan gram agaroze rastopio sam u mikrovalnoj pećnici u 100 ml pufera TAE (40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1mM EDTA), te sam u agarozni gel dodao 4 µl boje Midori Green Advance. Pripremljenu smjesu izlio sam u kadicu za elektroforezu te postavio odgovarajući češljic. Agarozna je ostavljena 30 minuta da se ohladi, zatim sam uklonio češljic i kadicu postavio u sustav za horizontalnu elektroforezu u kojoj se nalazio pufer TE. 3 µl svakog uzorka, na parafilmu, sam pomiješao sa kapljicom plavog pufera za nanošenje na gel, te nanosio u jažice. U prvu jažicu stavio sam 3 µl standarda GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific, SAD). Kroz 30 minuta pri stalnom naponu od 100 V uzorci su bili podvrgnuti elektroforezi. Zatim sam gel slikao na instrumentu UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK) (Slika 6).



Slika 6 – Jažica 1 – GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific, SAD), jažice 2 do 11 - potvrda insertiranog gena *INK4A*, jažica 12 – negativna kontrola, jažica 13 – plazmid u kojem se nalazi insertirani gen *INK4A*.

3.2.3. Sekvenciranje plazmidne DNA

Sangerovom metodom sekvencirani su produkti colony PCR-a da bi se provjerilo da li je umnažanjem plazmidne DNA u sekvenci gena *INK4A* došlo do neželjenih promjena. Uzorke je sekvencirala dr.sc. Vesna Musani.

Postupak je sljedeći. Prvo se produkti PCR moraju enzimski pročistiti od viška početnica, plazmidne DNA i nukleotida. To se radi tako da se u PCR produkt doda 0,5 µl reagensa ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, SAD), koji se sastoji od modificirane egzonukleaze I i alkalne fosfataze iz škampa (SAP, eng. Shrimp Alkanine Phosphatase) te se smjesa inkubira 30 minuta na 37°C, te zatim zagrije 15 minuta na 85°C.

Zatim slijedi reakcija sekvenciranja. Rade se dvije reakcijske smjese, po jedna za svaku početnicu (T7 i BGH). Pomiješa se 3 µl kita za sekvenciranje Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, SAD), 1 µl jedne od početnice i 3 µl vode. Na to se doda 3 µl pročišćenog produkta PCR. Reakcijske smjese su kratko promiješane na miješalici i centrifugirane, te stavljene u uređaj za PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) na program:

Temperatura	Vrijeme	Broj Ciklusa
96°C	1:00	
96°C	0:10	25x
50°C	0:05	
60°C	4:00	
4°C	∞	

Prije stavljanja u instrument ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD), uzorke je bilo potrebno istaložiti centrifugiranjem i otopiti u formamidu. To se radi tako da se u svaki uzorak stavi 25 µl apsolutnog etanola, 1 µl 0,125 M EDTA i 1 µl 3M Na-acetata. Smjesa se precipitira 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon toga uzorci se centrifugiraju 20 minuta na 13.200 rpm (5415 D, Eppendorf, Njemačka). Supernatant se izlije i uzorci se isperu 125 µl 70% etanola i centrifugiraju 15 minuta na 13.200 rpm i zatim osuše. Slijedi otapanje u 20 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD), denaturacija 2-5 minuta na 95°C i hlađenje u ledenom staku. Nakon toga slijedi očitavanje na instrumentu i analiza sekvenci. Sekvence sam analizirao u programu BioEdit 7.2.5. uspoređivanjem sekvence i kromatograma svakog uzorka sekvenciranog iz oba smjera s referentnom sekvencom gena *INK4A*.

3.2.4. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Nakon provjere sekvenciranjem, jedna „starter kolonija“ se koristi za dobivanje plazmidne DNA potrebne za eksperimente.

Kompletan sadržaj starter epruvete od 2 ml izlio sam u staklenu tikvicu sa 100 ml LB medija s kanamicinom. Tikvicu sam postavio u inkubator na 37°C, preko noći, s upaljenom tresilicom. Prije početka izolacije, 500 µl bakterijske kulture sam izdvojio i pomiješao s 500 µl 50%-tnog glicerola u epruveti za zamrzavanje od 2 ml, koje sam pohranio na -80°C. Ostatak sadržaja sam podjednako raspodijelio u dvije Falcon epruvete od 50 ml. Plazmidnu DNA sam izolirao pomoću kita Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Njemačka). Falcon epruvete u kojima su se nalazile bakterije sam centrifugirao 20 minuta na 4°C pri 5000 rpm. Supernatant sam odlio, te u epruvete dodao 8 ml pufera za resuspenziju. Epruvete sam dobro promućkao dok se bakterijski talog nije potpuno resuspendirao u puferu. Nakon što sam postupak ponovio s drugom epruvetu, sadržaj objiju epruveta sam spojio u jednu zajedničku falcon epruvetu. Nakon toga sam dodao pufer za lizu stanica, promućkao na način da sam nekoliko puta izvrtio epruvetu i ostavio 5 minuta na sobnoj temperaturi. Istekom vremena od 5 minuta, dodao sam pufer za neutralizaciju nakon čega je otopina promijenila boju iz plave u bijelu. Uz promjenu boje došlo je do formiranja bijelih grudica koje predstavljaju koagulirane proteine, odnosno stanični otpad. Nakon što sam dodao pufer za neutralizaciju, otopinu sam pažljivo dodavao u kolonu za pročišćavanje DNA koju sam prethodno natopio s 5 ml pufera EQU. Nakon prolaska otopine kroz filter, dodao sam 12 ml pufera EQU. Tih 12 ml pufera EQU sam pažljivo dodavao na vanjske dijelove kolone, pritom pazeći da ne dodajem direktno u kolonu. Prolaskom naknadno dodanog pufera, filter sam uklonio iz kolone i zamijenio ga novom epruvetom. Na donju membranu kolone dodao sam pufer za eluciju ELU koji je isprao vezanu DNA s kolone u epruvetu. Sastav pufera je zaštićeni podatak proizvođača te nije bio dostupan. Nakon ovog koraka u epruvetu s ispranom DNA dodao sam izopropanol kako bi izazvao precipitaciju plazmidne DNA. Otopinu sam rasporedio u 6 tubica od 2ml te centrifugirao 30 minuta na 4°C pri 15.000 rpm. Dobivene taloge sam ispirao u 70% etanolu, osušio i otopio u 200 µL pufera TE.

Pomoću spektrofotometra NanoPhotometer (Implen, Njemačka) izmjerio sam koncentraciju i čistoću plazmidne DNA. Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Uređaj sam prvo kalibrirao nanošenjem 1 µl TE pufera. Nakon toga sam mjerio plazmidnu DNA, također tako da sam 1 µl uzorka nanosio na uređaj. Omjer A260/A280 govorio o čistoći plazmidne DNA. Što je taj omjer bliži vrijednosti 2 to je DNA čišća. Ukoliko je omjer niži, to može značiti da je uzorak kontaminiran proteinima koji apsorbiraju pri 280 nm.

3.2.5. Rad sa staničnim kulturama

Kompletan rad sa staničnim kulturama je obavljan u sterilnim uvjetima. Posuđe, otopine, puferi i mediji su bili sterilni. Aktivnosti vezane uz stanične kulture obavljao se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa laminarnim protokom zraka. Prije svakog početka rada, radna površina se čistila alkoholom. Pri završetku rada se također radna površina čistila alkoholom te sterilizirala UV svjetlom.

3.2.5.1. Odmrzavanje stanica

Stanice koje su se koristile za ovaj eksperiment su bile pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% DMEM medij, 10% DMSO) u ampulama za zamrzavanje koje se nalaze na -80°C . Odmrzavanje stanica sam odrađivao u što kraćem roku, kako bi se skratilo vrijeme djelovanja citotoksičnog DMSO-a. Vađenje ampula za zamrzavanje iz -80°C odradio sam u što kraćem roku i postavio ih u posudu sa ledom. U međuvremenu sam obilježio sterilne staklene epruvete s nazivom pojedine stanične linije te u njih dodao 5 ml odgovarajućeg medija za rast stanica. Medij DMEM za FaDU i Detroit 562, te medij McCoy's za A253. Mediji u sebi sadrže 10% FBS (fetalni goveđi serum, GE Healthcare, UK). Ampule za zamrzavanje koje sadržavaju staničnu liniju, kratko sam zagrijavao u rukama. Dovoljno da se zaleđena smjesa odvojila od stijenke ampule. Kada sam primijetio da se smjesa odvojila od stijenke ampule, prenio sam kompletan sadržaj ampule u sterilnu staklenu epruvetu sa odgovarajućim medijem. Staklene epruvete postavio sam u centrifugu te centrifugirao na 4°C , 1200 rpm 5 min. Nakon centrifugiranja jasno je bio vidljiv talog stanica na dnu staklene epruvete. Supernatant sam odlio a talog stanice resuspendirao u 10 ml odgovarajućeg medija. Kompletan sadržaj od 10 ml sam prenio u petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt, Njemačka). Petrijevke sam blago protresao kako bi se sadržaj ravnomjerno rasporedio po petrijevki. Završetkom nasađivanja sve petrijevke sam pohranio u inkubator na 37°C , 5% CO_2 .

3.2.5.2. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanicama koje se održavaju u kulturi medij sam mijenjao svaka dva do tri dana. Sve tri stanične linije su adherentne, pa sam sav stari medij staklenom pipetom sakupio iz petrijevke i bacio u otpad. Čistom pipetom sam dodao 10 ml svježeg medija. Stanice sam presađivao kada

sam provjerom na mikroskopu ustanovio da su narasle toliko da prekrivaju kompletnu površinu petrijevke.

Kako bi presadio stanice, prvo sam uklonio sav medij sa sterilnom staklenom pipetom. U petrijevku sam potom dodao 5 ml PBS-a (1,7 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 1 mM Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7,2), kratko prodrmao petrijevku kako bi se isprao sav preostali medij, pokupio sadržaj, te bacio u otpad. Korištenjem PBS-a ispirao sam preostali medij kako serum unutar medija nebi deaktivirao djelovanje tripsina. Zatim sam dodao 1 ml tripsina s dodatkom 1 mM EDTA, protresao sam petrijevku, te ostavio da djeluje 5-10 minuta. Proces sam provjeravao svakih par minuta, kako bi utvrdio odvajanje stanica od podloge (tripsinizacija). Nakon šta sam utvrdio da su stanice odvojene od podloge, u petrijevku sam dodao 5 ml odgovarajućeg medija, resuspendirao ih propuhivanjem kroz pipetu te po 1 ml nasadio u novu, sterilnu petrijevku. Uz 1 ml nasađenih stanica dodao sam još 10 ml svježeg odgovarajućeg medija.

3.2.5.3. Priprema stanica za transfekciju

Stanice koje su bile pohranjene u inkubatoru izvadio sam van, staklenom sterilnom pipetom uklonio medij, te ih isprao sa 5 ml PBS-a. Nakon toga sam dodao 1 ml tripsina s dodatkom 1 mM EDTA kako bi se stanice odvojile od površine petrijevke. Kada su stanice bile vidljivo odvojene od petrijevke, uzeo sam 5 ml odgovarajućeg medija, isprao petrijevku, te kompletan sadržaj prenio u sterilnu staklenu epruvetu. Kako bih pripremio stanice za transfekciju, izbrojao sam 300.000 stanica na način da sam uzeo 20 μl stanica iz staklene epruvete, resuspendirao u 80 μl metilenskog modrila, te 20 μl tog sadržaja prebacio u Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Izbrojao sam stanice, te pomoću formule $(\text{br.stanica}/0,4) \times 5 \times 10^3$ izračunao potreban broj stanica po mililitru medija. Stanice sam nasađivao na pločicu koja sadrži 6 bunarića, tako da u svakoj bude 300.000 stanica. Koristio sam svih 6 bunarića na način da su tri bunarića bila sa kontrolnim stanicama, dok su preostala tri bunarića bila s transficiranim stanicama (ne tretirane, tretirane s doksorubicinom, tretirane s etopozidom, ne tretirane transfecirane s p16, transfecirane s p16 + doksorubicin, transfecirane s p16 + etopozid).

3.2.5.4. Transfekcija stanica

Transfekcijom stanica će se uspostaviti kultura stanica u kojoj vektor nije stabilno ugrađen u stanični genom. Komplet Xfect transfection Reagent (Takara, SAD) koristio sam za transfekciju. Na početku sam dobro promiješao na mješalici Xfect polimer te u praznu epruvetu dodao 5 µg plazmidne DNA i 100 µl prethodno promiješanog Xfect pufera. Nakon toga sam epruvetu dobro promiješao na miješalici 5 sekundi. Potreban volumen plazmidne DNA sam izračunao pomoću formule $c=m/v$. U smjesu polimera i plazmidne DNA dodao sam 1,5 µl Xfect polimera. Ovim postupkom reagens u interakciji s DNA stvara biorazgradive nanočestice te omogućava efikasnu transfekciju s minimalnom citotoksičnim efektom. Nakon dodavanja Xfect polimera smjesu sam inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi. Istekom 10 minuta stanicama sam dodao sav sadržaj plazmidne DNA, Xfect pufera i Xfect polimera, te na to dodao 1 ml medija. Stanice sam inkubirao četiri sata na 37°C u inkubatoru s 5% CO₂. Završetkom inkubacije, stanicama sam uklonio medij i dodao 2 ml odgovarajućeg medija.

3.2.5.5. Tretiranje stanica

Tretiranje stanica uslijedilo je nakon šta je postupak transfekcije završio. Tretiranjem stanica s dva kemoterapeutika, doksorubicinom (koncentracija 10 mM) i etopozidom (koncentracija 17 mM), željelo se dobiti uvid u funkciju proteina p16 nakon ovih tretmana. U ploču sa 6 bunarića prethodno sam nasadio jednu staničnu liniju na način da sam u gornji red postavio ne transfecirane stanice, dok su u donjem redu bile transfecirane stanice.

Tablica 2 – LD₅₀ doze kemoterapeutika

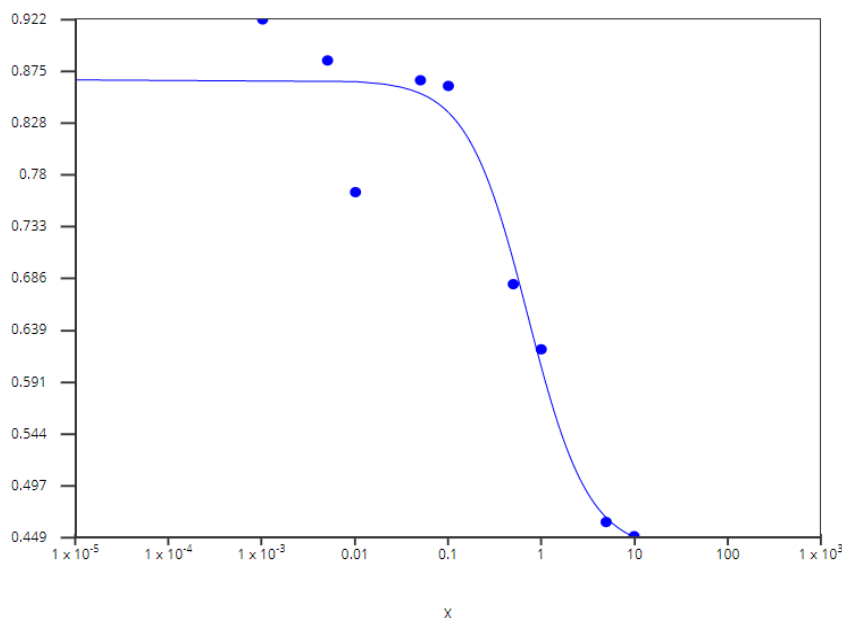
Stanična linija	Doksorubicin u µM	Etopozid u µM
FaDU	0,9	3,9
A-253	0,9	7,1
Detroit 562	2,9	18,5

Tretiranje sam radio na način da sam uzimao količinu kemoterapeutika (Tablica 2) potrebnu za LD₅₀ te nanosio u prethodno označene bunariće. Nakon nanošenja, ploču sam lagano protresao kako bi se tretman pravilno rasporedio po bunariću. Tretirane stanice stavio sam u inkubator na 37°C s 5% CO₂ tijekom 24 sata. Kompletan postupak sam provodio u sterilnim uvjetima unutar kabineta za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka.

3.2.5.6. Određivanje doze LD₅₀ kemoterapeutika

Puno je ime kratice LD₅₀ „Lethal dose 50%“. To jest, kolika će količina unesene toksične supstance, kroz određeno vrijeme, usmrtiti polovicu testirane populacije. Supstanca s nižom vrijednosti LD₅₀ je potentniji otrov od supstance koja ima višu vrijednost LD₅₀.

Da bih utvrdio kolika je doza LD₅₀ za stanične linije koje sam testirao, prvo je bilo potrebno učiniti MTT test. MTT test je kolorimetrijska metoda utvrđivanja aktivnosti staničnog metabolizma pomoću MTT (3-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid). MTT je spoj žute boje koje je u živim stanicama reduciran u formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltijazol-2-il)-1,3-difenilformazan) koji je ljubičaste boje. U pločici s 96 bunarića nasadio 20.000 stanica u svaki bunarić. Stanice sam inkubirao u inkubatoru na 37°C tijekom 24 sata. Nakon 24 sata, stanice sam tretirao s različitim koncentracijama kemoterapeutika (serijska razrjeđenja: doksorubicin – 0,001 do 10 µM, etopozid – 0,01 do 100 µM) te inkubirao u inkubator kroz 4 sata. Nakon 4 sata, pločicu sam dobro protresao kako ne bi bilo mjehurića u bunarićima, te izmjerio apsorbanciju na spektrofotometar NanoPhotometer (Implen, Njemačka). Dobivene rezultate izračunao sam u LD₅₀ kalkulator (<https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>) te dobio krivulju (Slika 7).



Slika 7 – Primjer izračuna LD₅₀ za staničnu liniju A23 tretiranu kemoterapeutikom doksorubicinom. Os X – koncentracija kemoterapeutika, os Y – postotak živih stanica

3.2.5.7. Zamrzavanje stanica

Stanice su zamrzavane da bi se sačuvale za kasnije eksperimente, a ostali dio koji je pripremljen za izolaciju proteina je kratkotrajno smrznut. Stanice je najbolje zamrzavati kada su optimalne gustoće.

Postupak sam započeo na način da sam uklonio medij, petrijevku isprao s 5 ml PBS-a te tripsinizirao s 1 ml tripsina. Kada su se stanice odvojile od podloge na njih sam dodao 5 ml odgovarajućeg medija te sam ih prenio u sterilnu staklenu epruvetu. Stanice sam centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm pri 4°C. Nakon centrifugiranja supernatant sam odvajao a talog stanica resuspendirao u 1 ml hladnog medija za zamrzavanje. Kompletnih 1 ml sam prebacio u ampule za zamrzavanje. Ampule sam pohranio u zamrzivač na -80°C.

Stanice koje sam zamrzavao za kasniji postupak izolacije proteina smrjavane su na drugačiji način. Petrijevke sa stanicama sam postavio na led kako ne bi došlo do temperaturnog šoka. Čistom pipetom sam ih uklonio medij te sam petrijevku isprao sa 1 ml PBS-a. Postupak sam ponovio dva puta. Nakon šta sam isprao u petrijevku sam dodao 1 ml PBS-a te sa sterilnom strugalicom strugao stanice s površine. Sadržaj sam pokupio pipetom i prebacio u epruvetu od 2 ml. Budući da sam stanice nasađivao u 6 bunarića, između svakog struganja strugalicu sam oprao etanolom i destiliranom vodom. Stanice sam centrifugirao 5 min pri 1200 rpm. Završetkom centrifugiranja, supernatant sam bacio, a taloge pohranio na -20°C.

3.2.6. Izolacija proteina iz stanica

Za izolaciju proteina iz stanica koristio sam pufer za lizu RIPA (25 mM Tris-HCL, 1% Na-deoksiholat, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1% SDS) i inhibitor proteaza uz korištenje sonikatora. Prethodno pohranjene taloge stanica resuspendirao sam u 50 µl pufera za lizu. Resuspendirani sadržaj prebacio sam u zasebne epruvete od 1,5 ml koje su prikladne za homogenizaciju sa sonikacijom. Tijekom cijelog postupka stanice sam držao na ledu. Soniciranje sam radio dva puta po 15 sekundi pomoću sonikatora Labsonic M (Sartorius, Njemačka). Nakon soniciranja, homogeniziranu smjesu sam centrifugirao 20 minuta na 13.200 rpm pri temperaturi od 4°C. Supernatant sam pažljivo sakupio te prebacio u mikroepruvetu. Mikroepruvete sam pohranio na -80°C do upotrebe.

Pomoću kolorimetrijske metode po Bradford-u odredio sam koncentraciju proteina. U tu svrhu koristio sam komercijalnu otopina Pierce BCA Protein Assay (Thermo scientific, USA).

Navedeno mjerenje se zasniva na svojstvu bicinkoninske kiseline (BCA, eng. bicinchoninic acid) da promjeni boju vezanja za bazične i aromatske aminokiseline u proteinima. Vežanjem na proteine dolazi do snažne apsorbcije na 562 nm koja se linearno povećava s koncentracijom proteina. Usporedom apsorbcija sa standardnom krivuljom poznatih koncentracija određuje se koncentracija proteina.

Na početku sam napravio niz serijskih razrjeđenja poznatog standardnog proteina, 1 µg/ml BSA (eng. Bovine serum albumin, hrv. goveđi albumin iz seruma) sam razrijedio ovim redoslijedom: 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml i 0 µg/ml prema uputama u kompletu. Nakon toga napravio sam radnu otopinu reagensa koja se sastoji od otopine A i B u omjeru 50:1. 25 µl uzorka i standarda pipetirao sam u pločicu s 96 bunarića u duplikatu. U svaki bunarić dodao sam 200 µl radne otopine, te sam pločicu prodrmao. Nakon toga pločicu sam inkubirao 30 minuta na 37°C. Apsorbancija sam mjerio na 562 nm na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MS, Finska). Dobivene vrijednosti sam unosio u računalo te crtao standardnu krivulju na temelju koje se odredila vrijednost koncentracije proteina.

3.2.7. Izolacija RNA iz stanica

Za izolaciju RNA iz stanica koristio sam NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Njemačka) prema protokolu. U prethodno pripremljene taloge stanica stavio sam 500 µl NucleoZOL-a te dobro pipetom promiješao na način da sam uvlačio i ispuštao sadržaj. Nakon toga sam dodao 200 µl vode bez RNAza te prodrmao 15 sekundi. Ostavio da se inkubira 5 minuta, te nakon isteka 5 minuta centrifugirao 15 minuta na 13.000 rpm. 500 µl supernatanta sam nakon centrifugiranja prebacio u nove, prethodno označene epruvete. U epruvete sa supernatantom dodao sam 500 µl izopropanola te ostavio 5 minuta da se inkubira. Nakon inkubacije ponovno sam centrifugirao, 10 minuta na 13.000 rpm. Nakon centrifugiranja supernatant sam uklonio, te dodao 500 µl 75% etanola. Ponovno sam inkubirao 5 minuta, te centrifugirao 5 minuta na 8000 rpm. Postupak s etanolom sam ponovio još jednom. Nakon zadnjeg centrifugiranja, supernatant sam bacio, a talog sam otopio u 50 µl TE pufera. Pomoću spektrofotometra NanoPhotometer (Implen, Njemačka) izmjerio sam koncentraciju i čistoću RNA.

3.2.8. Metoda „westernskog otiska“

Metodom westernskog otiska detektiraju se proteini u određenom uzorku pomoću specifičnih protutijela. Dobivamo informaciju o tome u kojoj je mjeri i je li uopće protein eksprimiran.

Prvi korak započinje razdvajanjem proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu. SDS djeluje denaturirajuće na proteine i prekriva ih negativnim nabojem. To omogućava putovanje proteina prema pozitivnom polu na temelju njihove molekularne mase.

Tablica 3 – Sastav i omjeri komponenti za izradu akrilamidnih gelova

komponenta	volumen
gel za razdvajanje	
ddH ₂ O	2,6 ml
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	3,2 ml
1.5 M TRIS-HCl pufer, pH 8,8	2 ml
10% SDS	0,08 ml
10% amonij persulfat	0,08 ml
TEMED	0,008 ml
gel za sabijanje	
ddH ₂ O	2,6 ml
30% akrilamid-bisakrilamid mješavina	1 ml
1 M TRIS-HCl pufer, pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
10% amonij persulfat	0,05 ml
TEMED	0,005 ml

Prvo sam napravio gel za razdvajanje (Tablica 3). TEMED (eng. Tetramethylethylenediamine, hrv. Tetrametiletilendiamin) i APS (amonij persulfat) sam dodao neposredno prije izlijevanja gela između stakala. Između stakala dodao sam približno $\frac{3}{4}$ njegove visine gela za razdvajanje. Na gel za razdvajanje dodao sam izopropanola kako bi gel bio ravnomjerno raspoređen unutar stakalaca. Takav gel sam ostavio da se polimerizira, te sam krenuo pripremiti gel za sabijanje. Isto kao i sa gelom za razdvajanje, APS i TEMED dodao sam neposredno prije izlijevanja. APS i TEMED kataliziraju polimerizaciju akrilamida i bisakrilamida. Prije izlijevanja gela za

sabijanje, uklonio sam izopropanol, te sam do vrha ulio gel za sabijanje i postavio češljic za formiranje jažica. Gel sam ostavio da se polimerizira.

Nakon pripreme gela pripremio sam proteinske uzorke. Uzorke sam denaturirao na način da sam u epruvetu dodao 50 µl proteina i ¼ konačnog volumena 4x pufera za nanošenje (pufer LB, sastav: 0,2 Tris-HCL pH 6,8, 0,4 M DTT, 8% SDS, 40% glicerol, 0,002% bromfenol blue). Uzorke sam zagrijavao 10 minuta na 95°C te centrifugirao jednu minutu na 13.200 rpm. Nakon što se gel polimerizirao, uklonio sam češljic te postavio u sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (Bio-Rad, SAD) s puferom za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS). U prvu jažicu nanio sam 4 µl proteinskog markera BioRad Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, SAD), a zatim uzorke. Elektroforeza odvijala se pri naponu od 110 V tijekom 20 minuta.

Kada je fronta boje pufera stigla donji rub gela, elektroforezu sam zaustavio. Iz sustava sam pažljivo izvadio gel i složio u „sendvič“ za prijenos na membranu. U plastični nosač sam redom postavio na prozirnu stranu: spužvica, dva komada filter papira, nitrocelulozna membrana, gel, dva komada filter papira i opet spužvica. Sustav sam zatvorio crnom stranom nosača i postavio u sistem za prijenos na membranu u pufer za prijenos (200 mM Tris, 1,5 M glicin, svježe se dodaje još 10-20% metanol). Prijenos se odvijao pri naponu od 100 V tijekom 90 minuta. Nakon završetka transfera membranu sam blokirao u 5% otopini mlijeka otopljenog u puferu TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) na tresilici 1 sat. Primarna antitijela razrijedio sam u istoj otopini 5% mlijeka. Nakon blokiranja, membrane sam postavio u kadice sa otopinom primarnih antitijela te inkubirao preko noći na 4°C, zatvorena i na tresilici.

Sljedeći dan sam membranu isprao 3x5 minuta u puferu TBST na njihalici. Nakon toga pripremio sam otopinu sekundarnih protutijela u 5% otopini mlijeka u TBST-u. Membrane sam inkubirao u otopini sekundarnih protutijela sat vremena pri sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon inkubacije, membrane sam ponovno isprao 3x5 minuta u puferu TBST. Za detekciju signala koristio sam kombinaciju kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (Thermo Scientific, SAD), koji sam međusobno miješao u omjeru 3:1. Membrane sam nakapao kemiluminiscentnim reagensom i inkubirao 5 minuta u mraku. Nakon inkubacije, višak kemiluminiscenta sam uklonio te sam membrane prenio na prozirnu foliju. Membrane u foliji slikao sam u aparatu za slikanje UVITEC Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge, UK).

3.2.9. Reverzna transkripcija

Prije analize lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, potrebno je RNA molekulu prevesti u cDNA (eng. complementary DNA, komplementarna DNA). Ovaj postupak se radi uz pomoć enzima reverzna transkriptaza. Reverzna transkriptaza transkribira RNA u komplementarnu cDNA.

1 µg RNA je potrebno za reakciju reverzne transkripcije. Za ovu reakciju koristio sam komplet za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, SAD). On sadrži sve potrebne komponente za izvođenje reakcije. U reakciju se ulazi s ukupnim volumenom od 25 µl od čega je 8,5 µl reakcijska smjesa (10x pufer (10% v/v), 5 mM dNTP, 10x početnice (nasumične početnice, 10% v/v), 1 U/µl inhibitora RNaza i 2,5 U/µl reverzne transkriptaze), 1 µg RNA i ostatak sam nadopunio sa H₂O (oslobođena od nukleaza) do konačnog volumena. Reakcija se odvija u PCR uređaju (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) prema navedenom programu:

Temperatura	Vrijeme
25°C	10:00
37°C	120:00
85°C	5:00
4°C	∞

Završetkom reakcije, cDNA sam pohranio na -20°C do korištenja.

3.2.10. Kvantitativni „real-time PCR“ (qRT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Real-time PCR) je postupak osmišljen na temelju standardne LRP. Osnovna razlika je u uvođenju istovremene detekcije produkta PCR-a, odnosno mogućnost praćenja umnažanja novonastalih molekula DNA tijekom svakog ciklusa reakcije. Tijekom PCR-a količina DNA se udvostručuje sa svakim ciklusom, te se na taj način eksponencijalno povećava količina DNA u uzorku. Da bi se pratilo udvostručavanje koristi se fluorescentna SYBR Green boja koja se interkalira u novonastale lance DNA. Svakim ciklusom razina fluorescencije se povećava. Ciklus u kojem se detektira dovoljno DNA, odnosno da fluorescencija poraste iznad praga detekcije naziva se Ct vrijednost. qRT-PCR pretpostavlja da je količina nosintetizirane DNA tijekom eksponencijalne faze reakcije PCR proporcionalna početnoj količini DNA. Tako određuje proizvoljnu vrijednost granične fluorescencije u eksponencijalnoj fazi (eng. treshold). Prelaskom te granice definira se ciklus prijelaza granične vrijednosti fluorescencije (eng. Treshold cycle, Ct.). Što je Ct-vrijednost manja, veća je početna količina kalupa DNA, jer je prije postignuta granična vrijednost

fluorescencije. Dakle, što ima više DNA u uzorku, ranije će se umnožiti dovoljan broj kako bi se dostigao prag detekcije. Ako postoje razlike u početnoj koncentraciji uzorka, one se ispravljaju pomoću referentnog gena koji služi kao kontrola jer je njegova ekspresija stabilna u svim tkivima i pod svim uvjetima. Ct-vrijednosti koji se analiziraju, normaliziraju se prema vrijednosti referentnog gena. Usporedba razina ekspresije gena između dvije kategorije uzoraka, relativna ekspresija gena je izražena kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen, izračunata kao $2^{-\Delta C_t}$, gdje je $e \Delta C_t$ razlika u ekspresiji (Ct [ispitivani gen] – Ct [referentni gen]). Za računanje razlike u ekspresiji gena između netretiranih i tretiranih stanica korištena je formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdje je $\Delta\Delta C_t$ razlika između ΔC_t netretiranih i ΔC_t tretiranih stanica. qRT-PCR se radi u pojedinačnim mikroeprijetama ili u pločicama s 96 bunarića koji se stavljaju u uređaj za kvantitativni real-time PCR Bio-Rad 96 CFX (Bio-Rad Laboratories, SAD).

Detekciju ekspresije radio sam na četiri gena: *INK4A*, *BIRC5*, *E2F1* i *RPLP0* (Tablica 2). *RPLP0* je služio kao referentni gen. Reakcijsku smjesu sam radio zasebno za svaki gen. U smjesu sam dodao otopinu SsoFast Evagreen (Bio-Rad Laboratories, SAD) 2x (50%v/v), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) i voda do ukupnog volumena od 9 μ l. Svaki uzorak sam analizirao minimalno u duplikatu, a za svaku reakcijsku smjesu sam radio dodatnu negativnu kontrolu u koju nisam stavljao cDNA.

Uvjeti koje sam koristio za qRT-PCR: početna denaturacija na 95°C tijekom 3 minute, 30 ciklusa na 95°C tijekom 15 sekundi, 61°C tijekom 1 minute i konačno krivulja mekšanja sa 75°C na 95°C.

Tablica 4 – Sekvence početnica za određivanje ekspresije gena:

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	Referenca
<i>INK4A</i>	F - CAACGCACCGAATAGTTACG R - AGCACCACCAGCGTGTC	Leović i sur. (2010)
<i>BIRC5</i> (WT)	F - TGACGACCCCATAGAGGAAC R - TCCTTTGCATTTTGTCTTGG	Trnski i sur. (2019)
<i>E2F1</i>	F – CGGCGCATCTATGACATCAC R – GTCAACCCCTCAAGCCGTC	Shats i sur. (2017)
<i>RPLP0</i>	F - GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG R- TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC	Leović i sur. (2010)

3.2.11. Protočna citometrija

Protočna citometrija je tehnologija koja omogućuje proučavanje stanične populacije. Pomoću protočne citometrije, moguće je analizirati individualne stanice i njezine parametre unutar

heterogene populacije. Način na koji funkcionira je da stanica po stanica prolaze kroz zraku lasera te aparat analizira raspršenu svjetlost koju je stanica uzrokovala svojim prolaskom kroz zraku lasera (Picot i sur. 2012).

Uređaj koji se koristio u ovom istraživanju je "Guava Muse Cell Analyzer" od tvrtke Luminex.

3.2.11.1. Analiza staničnog ciklusa

Pomoću seta za praćenje staničnog ciklusa „Muse® Cell Cycle Kit“ (MCH100106, Luminex, SAD) napravio sam kvantitativnu analizu postotka stanica u fazama G0/G1, S i G2/M staničnog ciklusa. Koristeći reagense iz kompleta koji uključuju DNA boju propidij jodid (PI, eng. propidium jodid) i RNAazu A. Propidij jodid se interkalira u DNA te je razmjerna količini DNA u stanicama u različitim fazama ciklusa, dok RNAza pomaže povećati specifičnost bojanja DNA. Za pripremu ove analize prethodno sam nasadio 300.000 stanica po bunariću na pločicu sa 6 bunarića. Svaki bunarić je sadržavao određeni tretman koji sam provodio, te određeni tretman transfekcije. Tretirane stanice sam inkubirao 24 sata te sam nakon 24 sata pripremio prema protokolu za očitavanje.

Prethodno sam pripremio 70% etanol te ga spremio na -20°C i držao sve do upotrebe. Nakon 24 sata stanice sam izvadilo iz inkubatora. Svaki bunarić sam isprao u 1 ml PBS-a. Budući da sam trebao svaku stanicu iz bunarića, a ne samo žive, isprani sadržaj nisam bacao, već sam prebacio u označene falkon epruvete od 15 ml. Nakon ispiranja, u bunarić sam dodao 500 µl tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon 5 do 10 minuta sadržaj iz bunarića sam sakupio i prebacio u epruvetu s već prethodno prebačenim PBS-om. Slijedi centrifugiranje 5 minuta na 1200 rpm. Završetkom centrifugiranja supernatant sam uklonio, a talog stanica ponovno isprao s PBS-om te centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Tijekom centrifugiranja sam pripremio novi set epruveta u koji sam ulio po 1 ml ledenog hladnog 70% etanola. Novo pripremljene epruvete sam također držao na ledu. Nakon centrifugiranja supernatant sam uklonio te na talog stanica dodao 50 µl PBS-a kako bi se stanice resuspendirale. Resuspendirane stanice sam dodavao „kap po kap“ u epruvete s 1 ml ledeno hladnog etanola, uz napomenu da sam epruvetu konstantno morao držati na mješalici pri dodavanju stanica. Stalno držanje epruvete na mješalici pri dodavanju stanica je potrebno kako bi spriječio nastanak velikih nakupina stanica koje bi kasnije dovele do krivog očitavanja na protočnom

citometru. Nakon šta sam sav sadržaj prenio, epruvete (u kojima se nalaze stanice i etanol) sam dobro zatvorio i pohranio na -20°C , preko noći.

Sljedeći dan sam pripremio epruvete od 1,5 ml, označene s odgovarajućim tretmanom i staničnom linijom koja se analizira. Kompletan sadržaj iz epruveta sam prebacio u te epruvete i centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant sam bacio a talog stanica resuspendirao u 500 μl PBS-a. Ponovno sam centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Stanice sam resuspendirao u 200 μl reagensa „Muse cell cycle“. Nakon dodavanja reagensa, stanice sam inkubirao 30 minuta na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetla. Nakon 30 minuta stanice su spremne za očitavanje na instrumentu.

Očitavanje na instrumentu započeo sam odabirom opcije „system clean“ kako bi se uređaj očistio. Nakon završetka čišćenja, u opciji softwarea sam odabrao program „cell cycle“. Odabirom programa započinje kalibriranje sustava. Kalibriranje sustava sam radio na način da sam postavio prvi uzorak u instrument te se prema njegovom očitavanju postavio parametri. Kada su se parametri postavili, započeo sam s testiranjem. Svaki uzorak sam analizirao 3 puta te je između svakog analiziranja bilo potrebno protresti epruvetu sa sadržajem kako bi se stanice raspršile po epruveti. Završetkom analize, dobivene rezultate sam prebacio na USB memoriju a instrument ponovno očistio pomoću „system clean“ opcije.

3.2.11.2. Analiza oštećenja DNA

Za analizu oštećenja DNA koristio sam komplet Muse Multi-Color DNA Damage (MCH200107, Luminex, SAD) koji omogućuje prikaz količine jednolančanih i dvolančanih DNA lomovi. Oštećenje se detektira pomoću dva antitijela koja se nalaze u kompletu: ATM (Ser1981)-PE i Histon H2A.X-PECy5. Aktivirana antitijela na ATM ili H2A.X nam ukazuju na količinu jednostrukih lomova DNA, dok njihova zajednička aktivacija pokazuje količinu dvolančanih lomova DNA.

Za pripremu ove analize prethodno sam nasadio 300.000 stanica po bunariću na pločicu sa 6 bunarića. Svaki bunarić je sadržavao određeni tretman koji se provodio. Tretirane stanice sam inkubirao 24 sata te sam ih zatim obradio.

Nakon 24 sata stanice sam izvadio iz inkubatora. Budući da mi je trebala svaka stanica iz bunarića, a ne samo žive, isprani sadržaj nisam bacao, već sam prebacio u označene epruvete od 15 ml. Nakon ispiranja, u bunarić sam dodao 500 μl tripsina kako bi se stanice odvojile od stijenke. Nakon 5 do 10 minuta sadržaj iz bunarića sam sakupio i prebacio u epruvetu s već

prethodno prebačenim PBS-om. Potom sam centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Završetkom centrifugiranja supernatant sam uklonio, a talog stanica ponovno isprao s PBS-om te centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Nakon drugog centrifugiranja, talog sam resuspendirao u 50 µl pufera za ispitivanje. U to sam dodao isti volumen fiksacijskog pufera te promiješao pipetiranjem. Uzorke sam nakon miješanja stavio na led i inkubirao 10 minuta. Nakon inkubacije uzorke sam centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Supernatant sam bacio, te dodao stanicama 100 µl permeabilizacijskog pufera. Ponovno se sve inkubirao 10 minuta na ledu te centrifugirao u pelet 5 minuta na 1200 rpm. Supernatant sam ponovno bacio, pri čemu sam supernatant pažljivo odpipetirao, budući da dodatkom permeabilizacijskog pufera stanice nakon centrifugiranja ne ostanu na dnu epruvete. U epruvetu sam zatim dodao 90 µl pufera. Tijekom prethodnog centrifugiranja, pripremio sam antitijela na način da sam uzeo po 5 µl svakog antitijela (ATM i H2A.X) te zajedno pomiješao u zasebnu epruvetu (to je količina za jedan uzorak). 10 µl mješavine antitijela dodao sam u svaki uzorak te sam uzorke inkubirao 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta dodao sam još 100 µl pufera za ispitivanje te centrifugirao u talog 5 minuta na 1200 rpm. Supernatant sam bacio, a stanice sam resuspendirao u 200 µl pufera za ispitivanje.

Očitanje na instrumentu započeo sam odabirom opcije „system clean“ kako bi se uređaj očistio. Nakon završetka čišćenja, u opciji softwarea sam odabrao program „DNA damage“. Odabirom programa započinje kalibriranje sustava. Kalibriranje sustava sam radio na način da sam postavio prvi uzorak u instrument te se prema njegovom očitavanju postavio parametri. Kada su se parametri postavili, započeo sam s testiranjem. Svaki uzorak sam analizirao 3 puta te sam između svakog analiziranja protresao epruvetu sa sadržajem kako bi stanice raspršio po epruveti. Završetkom analize, dobivene rezultate sam prebacio na USB memoriju a instrument ponovno očistio „system clean“ opcijom.

3.2.11.3. Analiza apoptoze (kaspaza-3/7)

Komplet Kaspaza-3/7 (Part Number: MCH100108) omogućuje kvantitativno mjerenje dva parametra, apoptozu uzrokovanu aktivacijom kaspaza-3/7 i permeabilizaciju plazmatske membrane. Analiza pokazuje relativni postotak stanica koje su ostale žive nakon tretmana, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica. Reagens „Muse caspase-3/7“ prolazi kroz staničnu membranu i nije toksičan za stanicu. Sadrži boju koja se veže na DNA koja je

povezana s peptidnim supstratom DEVD. Kada je boja vezana za DEVD, ona nije u mogućnosti da se spoji s DNA. Kaspaza-3/7 lomi vezu između boje i DEVD te boja ima mogućnost vezanja za DNA. Samim tim boja fluorescira, te je instrument može očitati. Uz kaspaza-3/7 reagens u kompletu dolazi i marker 7-AAD koji označi mrtve stanice.

Za pripremu ove analize prethodno sam nasadio 300.000 stanica po bunariću na pločicu sa 6 bunarića. Svaki bunarić je sadržavao određeni tretman koji se provodio. Tretirane stanice sam inkubirao 24 sata te sam nakon 24 sata pripremio prema protokolu za očitavanje.

Nakon 24 sata stanice sam izvadilo iz inkubatora. Budući da mi je trebala svaka stanica iz bunarića, a ne samo žive, isprani sadržaj nisam bacao, već sam prebacio u označene epruvete od 15 ml. Nakon ispiranja, u bunarić sam dodao 500 μ l tripsina kako bi se stanice odvojile od stijenke. Nakon 5 do 10 minuta sadržaj iz bunarića sam sakupio i prebacio u epruvetu s već prethodno prebačenim PBS-om. Potom sam centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Završetkom centrifugiranja supernatant sam uklonio, a talog stanica ponovno isprao s PBS-om te centrifugirao 5 minuta na 1200 rpm. Nakon centrifugiranja pripremio sam otopine. Radna otopina „Caspase 7-AAD“ pripremio sam tako da sam pomiješao 2 μ l „Muse Caspase 7-AAD“ i 148 μ l pufera BA. Radnu otopinu sam zamotao u foliju te držao na ledu do upotrebe. Reagens „Muse caspase-3/7“ sam razrijedio u omjeru 1:8 s PBS-om. Centrifugirane stanice resuspendirao sam u 50 μ l pufera BA. Nakon resuspendiranja dodao sam po 5 μ l razrijeđenog reagensa „Muse caspase-3/7“ u svaki uzorak, promiješao pipetom i miješalicom. Labavo zatvorene epruvete ostavio sam 30 minuta na 37°C u inkubatoru s 5% CO₂. Nakon 30 minuta u epruvete sam dodao po 150 μ l radne otopine „Caspase 7-AAD“, promiješao na miješalici. Potom se uzorci inkubiraju 5 minuta zaštićeni od svjetla.

Očitavanje na instrumentu započeo sam odabirom opcije „system clean“ kako bi se uređaj očistio. Nakon završetka čišćenja, u opciji softwarea sam odabrao program „Caspase-3/7“. Odabirom programa započinje kalibriranje sustava. Kalibriranje sustava se radi na način da sam postavio prvi uzorak u instrument te se prema njegovom očitavanju postavio parametri. Kada su se parametri postavili, započeo sam s testiranjem. Svaki uzorak sam analizirao 3 puta te između svakog analiziranja potrebno je bilo protresti epruvetu sa sadržajem kako bi se stanice raspršile po epruveti. Završetkom analize, dobivene rezultate sam prebacio na USB memoriju a instrument ponovno očistio „system clean“ opcijom.

3.2.12. Statistika

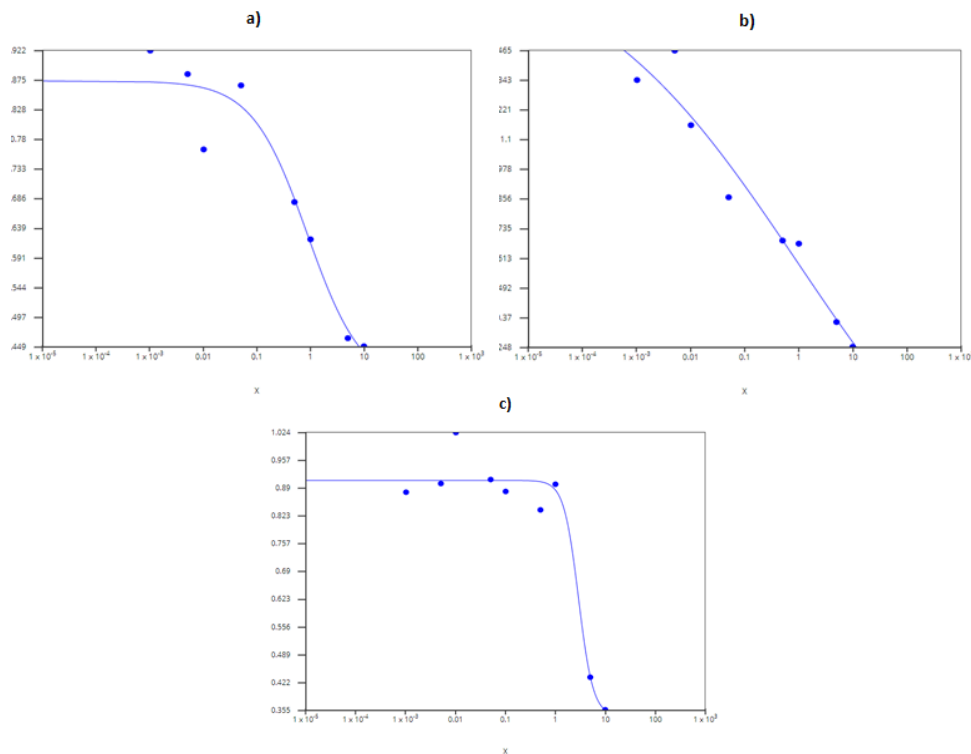
Statistički se obrađuju rezultati dobiveni analizom genske ekspresije i primjenom protočne citometrije. Za ispitivanje normalnosti distribucije numeričkih rezultata koristi se D'Agostino-Pearsonov test. Varijable koje nisu pokazale normalnu distribuciju su logaritamski transformirane. Za ispitivanje utjecaja tretmana na ekspresiju gena, stanični ciklus, oštećenje DNA i apoptozu koristi se nezavisni t-test za dvije grupe, te jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i Tukey-Kramer post-hoc test za tri i više grupa. Dvosmjerne P-vrijednosti manje od 0,05 smatraju se statistički značajne. Statistička analiza provodi se pomoću programa Microsoft Excel 2010, Microsoft Office 365 ProPlus (Microsoft, Redmond, WA, SAD) i MedCalc verzija 19.6 (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje letalne doze LD₅₀ kemoterapeutika kod staničnih linija karcinoma glave i vrata

Kako bi se mogla utvrditi količina kemoterapeutika za daljnje eksperimente bilo je potrebno utvrditi letalnu dozu LD₅₀ za spojeve doksorubicin i etopozid kod stanica A253, FaDU i Detroit 562. Stanice su tretirane različitim koncentracijama (Tablica 3) i nakon 4 h je mjereno preživljenje stanica testom MTT.

4.1.1. LD₅₀ doksorubicina

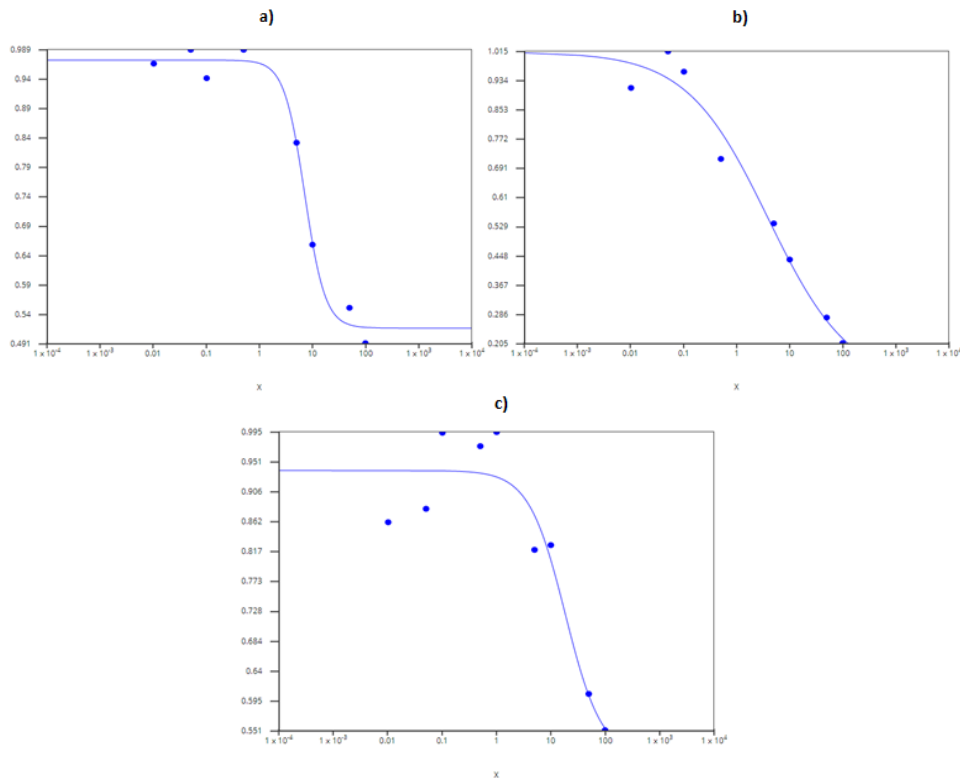


Slika 8 - a), b), c) - Djelovanje doksorubicina na stanične linije a) A253 b) FaDU c) Detroit 562.

Os X – koncentracija kemoterapeutika, os Y – postotak živih stanica

Nakon provedenog ispitivanja djelovanja doksorubicina na ispitivane stanične linije dobiveni su rezultati (Slika 8.) za svaku od staničnih linija. Za staničnu liniju A253 potrebno je 0,9 μM doksorubicina, kod FaDU također 0,9 μM i 2,9 μM kod Detroit 562 kako bi se izazvala smrt stanica u 50% populacije. Prema ovim rezultatima vidimo da je stanična linija Detroit 562 otpornija na tretman doksorubicinom u odnosu na preostale dvije stanične linije.

4.1.2. LD₅₀ etopozida



Slika 9 - a), b), c) – Grafički prikaz djelovanja etopozida na stanične linije a) A253 b) FaDU c) Detroit 562. Os X – koncentracija kemoterapeutika, os Y – postotak živih stanica

Nakon provedenog ispitivanja djelovanja etopozida na ispitivane stanične linije dobiveni su rezultati (Slika 9.) za svaku od staničnih linija. Za staničnu liniju A253 potrebna količina od 3,9 μM etopozida, kod FaDU 7,1 μM i 18,5 μM kod Detroit 562 da bi se izazvala smrt stanica u 50% populacije. Prema ovim rezultatima vidimo da je stanična linija Detroit 562 najotpornija na djelovanje etopozida od tri testirane linije.

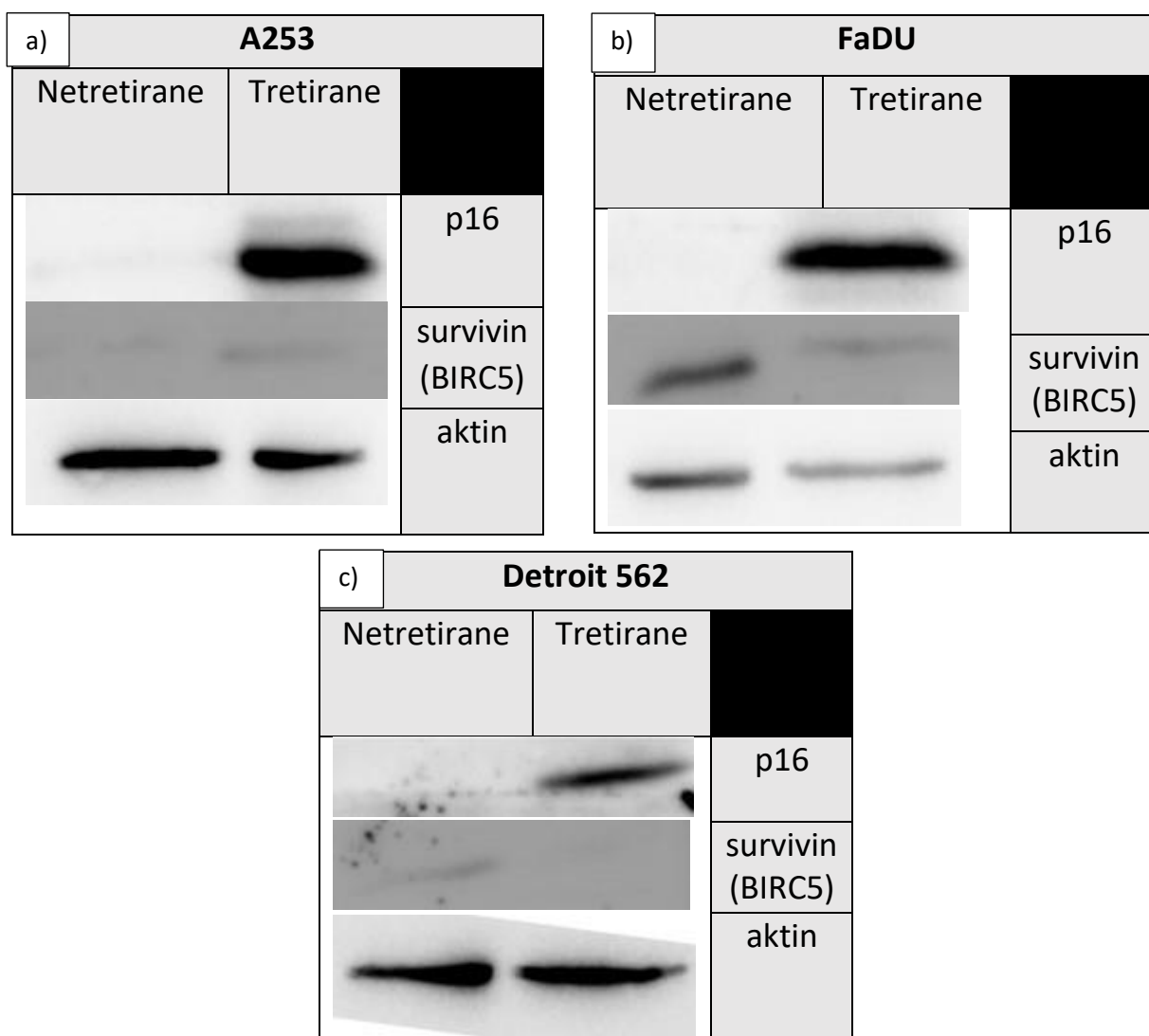
Usporedbom djelovanja doksorubicina i etopozida, možemo zaključiti da je doksorubicin potentniji u izazivanju smrti stanica u usporedbi s etopozidom. Dok od testiranih staničnih linija, Detroit 562 se pokazala kao najotpornija na djelovanje doksorubicina i etopozida.

4.2. Proteinska ekspresija metodom „Westernskog otiska“

Westernskom metodom otiska detektirala se proteinska ekspresija proteina p16 i survivin.

4.2.1. Stanične linije tretirane transfekcijom p16

Nakon tretmana transfekcije, plazmidom koji sadrži sekvencu p16 stanica A253, FaDU i Detroit 562, tražila se potvrda proteinske ekspresije ciljanog proteina p16 i survivina. Rezultat transfekcije se jasno može vidjeti prema slikama (slika 10) gdje je vidljiv jaki signal proteina p16 nakon transfekcije su svim staničnim linijama. Uz p16 gledala se ekspresija survivina, kao ciljnog gena čija ekspresija indukcijom p16 treba opasti. U linijama FaDU i Detroit 562 vidljiv je pad ekspresije, odnosno jačine signala. Dok u staničnoj liniji A253 je vidljiv blago pojačani signal survivina. Ekspresija aktina je poslužila kao mjera količine proteina.



Slika 10 – a), b), c) – Prikaz rezultata metode „Westernskog otiska“ – a) A253, b) FaDU, c) Detroit 562

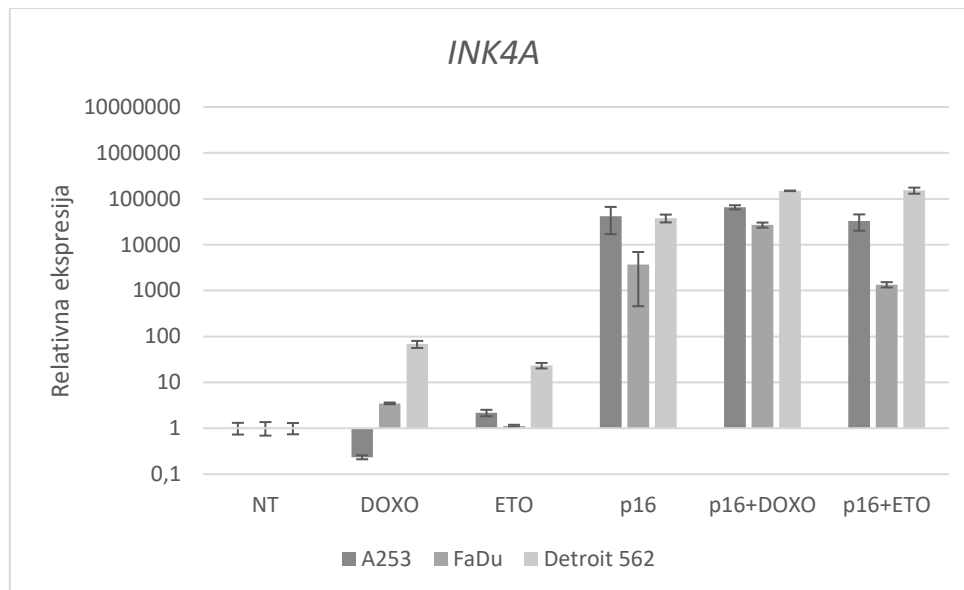
Tretmani s doksorubicinom i etopozidom imali su prevelik utjecaj na smrtnost stanica pa nije bilo moguće dobiti dovoljno visoku količinu proteina za analizu.

4.3. Genska ekspresija *INK4A* i njegovih ciljnih gena

Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena *INK4A*, te njegovih ciljnih gena *BIRC5* i *E2F1* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit562, koje su bile tretirane s plazmidom koji eksprimira protein p16, te kemoterapeutičima doksorubicin i etopozid u različitim kombinacijama. Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti ΔCt , što znači da su se Ct-vrijednosti za svaki gen normalizirale prema Ct-vrijednosti referentnog gena (*RPLP0*). Razine ekspresije prikazane su kao $2^{-\Delta Ct}$ gdje su ekspresije tretiranih stanica normalizirane prema ekspresiji netretiranih stanica.

4.3.1. Utjecaj tretmana na ekspresiju gena *INK4A*

Relativna razina ekspresije gena *INK4A* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 koje su bile tretirane kemoterapeutičima doksorubicinom i etopozidom određena je metodom qRT-PCR. Provjerena je i uspješnost transfekcije s plazmidom koji eksprimira protein 16 (Slika 11).



Slika 11 - Utjecaj doksorubicina, etopozida i p16 na relativnu ekspresiju gena *INK4A* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562. Zbog vrlo visokih vrijednosti ekspresije gena *INK4A* u stanicama tretiranim s plazmidom prikazane su vrijednosti u logaritamskoj skali. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom

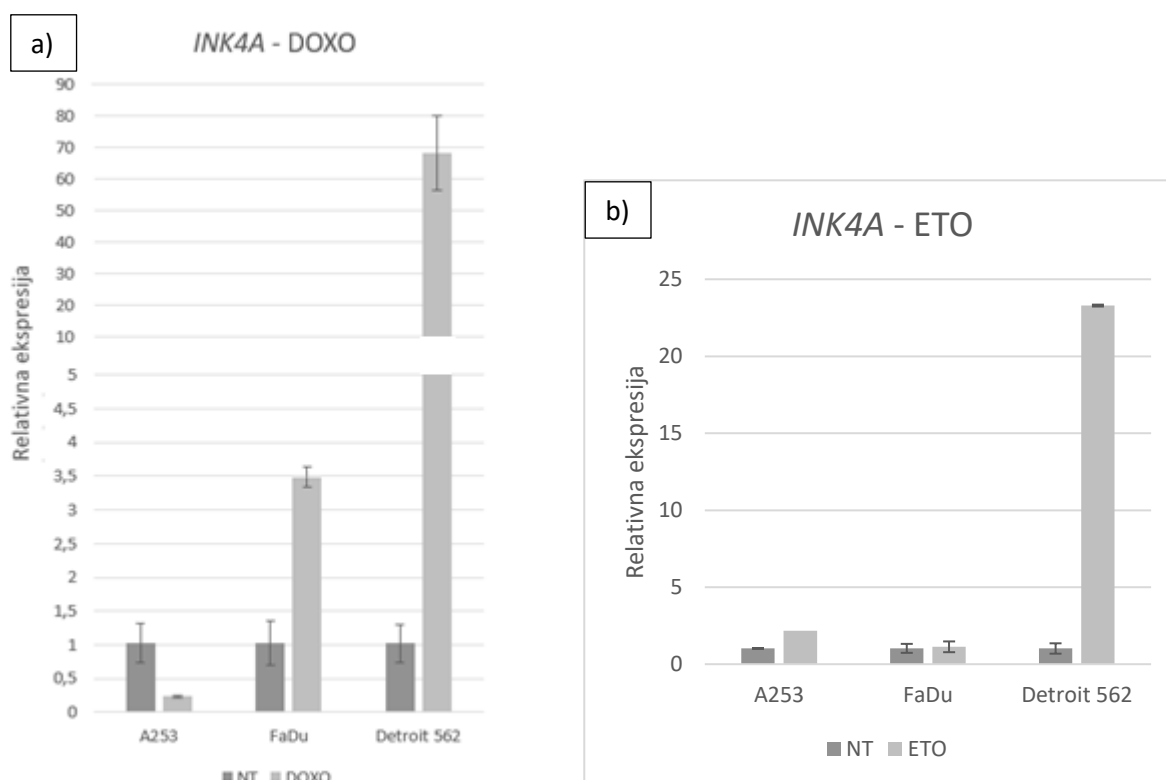
Tretman s ekspresijskim plazmidom je pokazao relativnu ekspresiju gena *INK4A* od 1347, do 37871 puta veću nego o istim stanicama koje nisu bile tretirane ili su bile tretirane samo doksorubicinom ili etopozidom (Slika 11).

Kombinirani tretman s unesenim plazmidom i doksorubicinom zajedno je značajno dodatno povećao ekspresiju gena *INK4A* u odnosu na tretman samo s plazmidom u staničnim linijama FaDU ($p < 0,001$) i Detroit 652 ($p < 0,001$).

Kombinirani tretman s unesenim plazmidom i etopozidom zajedno je značajno dodatno povećao ekspresiju gena *INK4A* u odnosu na tretman samo s plazmidom u staničnoj liniji Detroit 652 ($p < 0,001$).

Tretman doksorubicinom pokazao je statističku razliku u povećanoj genskoj ekspresiji gena *INK4A* u staničnim linijama FaDU ($p = 0,0344$) i Detroit 562 ($p = 0,0031$), dok u staničnoj liniji A253 nije uzrokovao statistički važnu promjenu. (Slika 12 a).

Linije A253 i FaDU su se statistički razlikovale od linije Detroit 562 ($p = 0,0102$) u ekspresiji gena *INK4A* u odgovoru na tretman doksorubicinom, dok se međusobno nisu razlikovale.



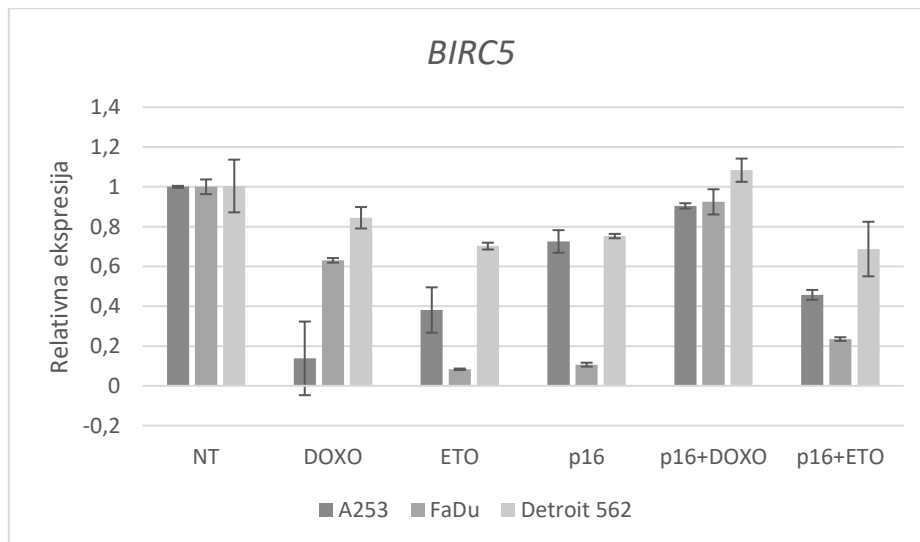
Slika 12 – a), b) - Utjecaj doksorubicina (a) i etopozida (b) na ekspresiju gena *INK4A* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom

Tretman etopozidom pokazao je statističku razliku u povećanoj genskoj ekspresiji gena *INK4A* u staničnoj liniji Detroit 562 ($p=0,0102$), dok u staničnim linijama A253 i FaDU nije uzrokovao statistički važnu promjenu (Slika 12 b).

Linije A253 i FaDU su se statistički razlikovale od linije Detroit 562 ($p=0,002$) u ekspresiji gena *INK4A* u odgovoru na tretman etopozidom, dok se međusobno nisu razlikovale.

4.3.2. Utjecaj tretmana na ekspresiju gena *BIRC5*

Metodom qRT-PCR određena je relativna razina ekspresije gena *BIRC5* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 koje su bile tretirane kemoterapeutičima doksorubicinom i etopozidom i plazmidom koji eksprimira protein 16 (Slika 13).



Slika 13 – Relativna ekspresija gena *BIRC5* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 koje su tretirane doksorubicinom, etopozidom i plazmidom p16. Metodom qRT PCR određena razina ekspresije u cDNA dobivenom reverznom transkripcijom. Eksperiment je napravljen jednom. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom

Stanice tretirane doksorubicinom, u usporedbi s netretiranim stanicama imale su smanjenu ekspresiju *BIRC5* u staničnim linijama A253 ($p=0,001$) i FaDU ($p=0,0054$).

Stanice tretirane etopozidom, u usporedbi s netretiranim stanicama imale su smanjenu ekspresiju *BIRC5* u staničnim linijama A253 ($p=0,0166$) i FaDU ($p=0,0054$).

Unos plazmida koji kodira protein p16 u usporedbi sa netretiranim stanicama pokazao je smanjenu ekspresiju *BIRC5* u staničnim linijama A253 ($p=0,0209$) i FaDU ($p=0,0009$).

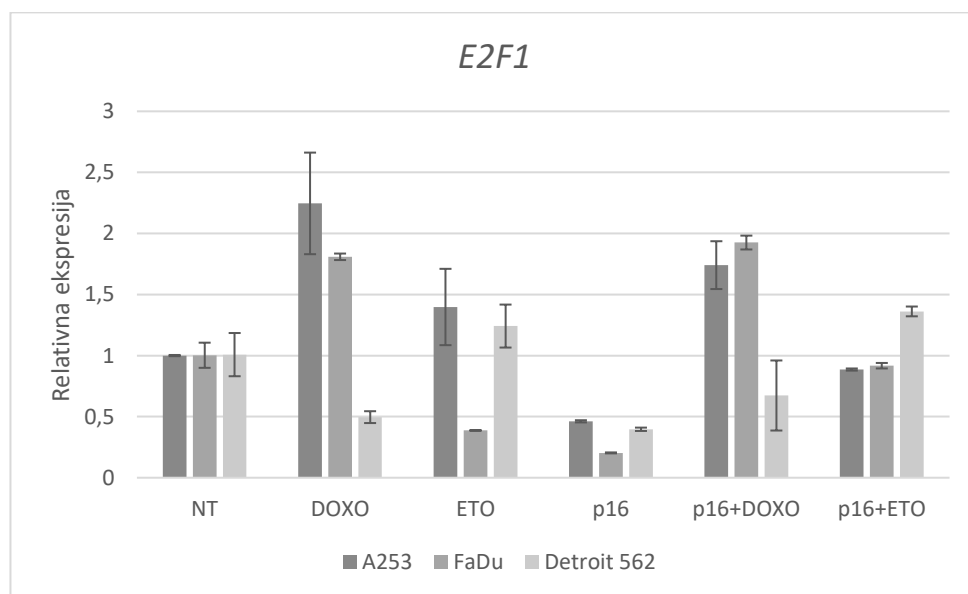
Kombinacija tretmana doksorubicinom s transfekcijom p16 pokazala je povećanu ekspresiju *BIRC5* u staničnoj liniji FaDU ($p=0,008$), dok je kombinacija tretmana etopozidom sa transfekcijom pokazala smanjenu ekspresiju *BIRC5* u staničnoj liniji A253 ($p=0,001$).

Usporedba stanica tretiranih kombinacijom doksorubicina i tretmana transfekcijom p16 sa stanicama tretiranih doksorubicinom pokazala je u staničnoj liniji A253 ($p=0,001$) povećanje ekspresije *BIRC5* u stanicama tretiranim kombinacijom tretmana.

Stanice tretirane kombinacijom etopozida i transfekcije u usporedbi sa stanicama tretiranih etopozidom nisu pokazale statistički značajne razlike u ekspresiji *BIRC5*.

4.3.3. Utjecaj tretmana na ekspresiju gena *E2F1*

Relativna razina ekspresije gena *E2F1* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 koje su bile tretirane kemoterapeutcima doksorubicinom i etopozidom te plazmidom koji ekspimiraju protein 16 određena je metodom qRT-PCR (Slika 14.).



Slika 14 - Utjecaj doksorubicina, etopozida i transfekcije p16 na ekspresiju *E2F1* u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562. Iz stanica je izolirana RNA, prevedena je u cDNA, te je

analizirana metodom qRT-PCR. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom

Stanice tretirane doksorubicinom, u usporedbi s netretiranim stanicama imale su značajno povećanu ekspresiju *E2F1* u staničnim linijama A253 ($p=0,002$) i FaDU ($p=0,0086$).

Stanice tretirane etopozidom, u usporedbi s netretiranim stanicama imale su smanjenu ekspresiju *E2F1* u staničnoj liniji FaDU ($p=0,0024$).

Unos plazmida koji kodira protein p16 u usporedbi s netretiranim stanicama doveo je do značajnog pada ekspresije *E2F1* u sve tri stanične linije, A253 ($p=0,0002$), FaDU ($p=0,0022$) i Detroit 562 ($p=0,0396$).

Stanice tretirane doksorubicinom i plazmidom koji kodira protein p16 u usporedbi s netretiranim stanicama pokazale su značajno povećanu ekspresiju *E2F1* u staničnoj liniji FaDU ($p<0,001$), dok je u staničnoj liniji Detroit 562 ($p=0,001$) došlo do značajnog pada ekspresije *E2F1*.

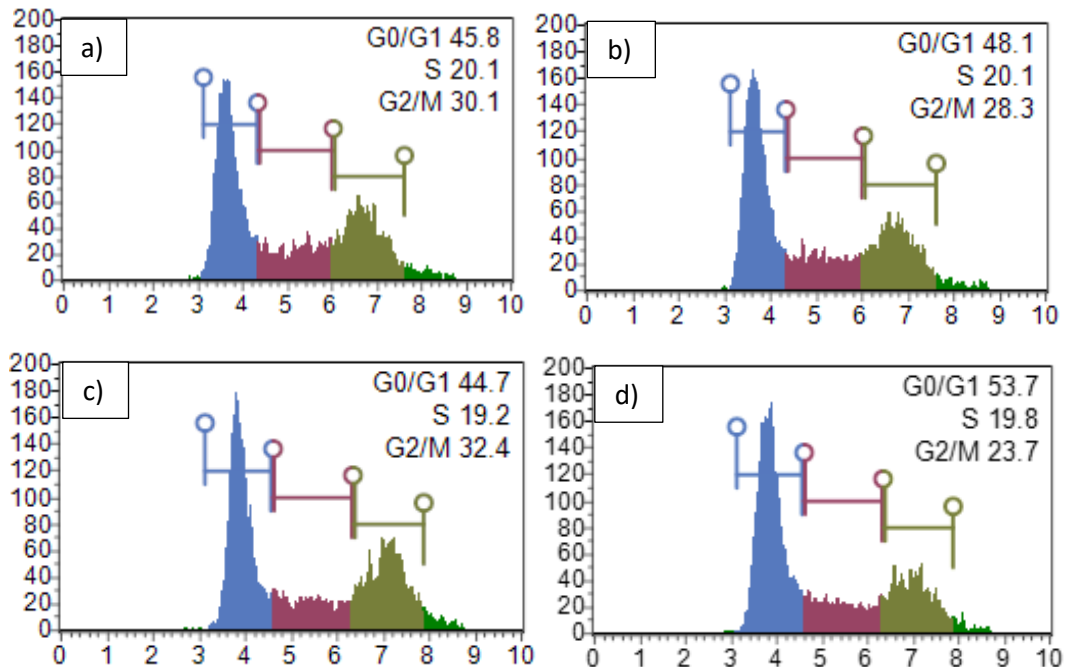
Usporedba ekspresije *E2F1* stanica tretiranih kombinacijom etopozida i transfekcijom p16 sa ekspresijom u stanicama tretiranih etopozidom pokazala je statističku razliku u povećanoj genskoj ekspresiji *E2F1* u staničnoj liniji FaDU ($p<0,001$).

4.4. Analiza staničnog ciklusa

Kvantitativna analiza postotka stanica u fazama G0/G1, S i G2/M staničnog ciklusa napravljena je pomoću komercijalnog seta za praćenje staničnog ciklusa „Muse® Cell Cycle Kit“. Upotrebom reagensa koji sadrži DNA boju PI (propidij jodid) i RNAazu A, može se mjeriti postotak stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA, dok RNAaza povećava specifičnost obilježavanja DNA. U G0/G1 fazi stanice sadrže po dvije kopije svakog kromosoma. Kako stanični ciklus napreduje, stanice sintetiziraju DNA (S faza), te fluorescencija raste dok se sva DNA ne udvostruči (G2/M faza). Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava udio stanica u svakoj fazi te prikazuje populacijski profil u obliku histograma (Slika 15 a).

4.4.1. Utjecaj transfekcijskog reagensa na stanični ciklus

Ovim ispitivanjem utvrđeno je djelovanje transfekcijskog reagensa na stanični ciklus u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slika 16).



Slika 15 – Analiza staničnog ciklusa. Interkalirajuća boja propidij jodid koja se veže na DNA omogućuje razlikovanje i mjerenje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA. Prikaz količine stanica (histogram) u G1 (plava), S (crvena) i G2/M (maslinasto zelena) fazi staničnog ciklusa. Netransfecirane stanice A253 (a), transfecirane stanice A253 (b) netransfecirane stanice Detroit 562 (c) i transfecirane stanice Detroit 562 (d)

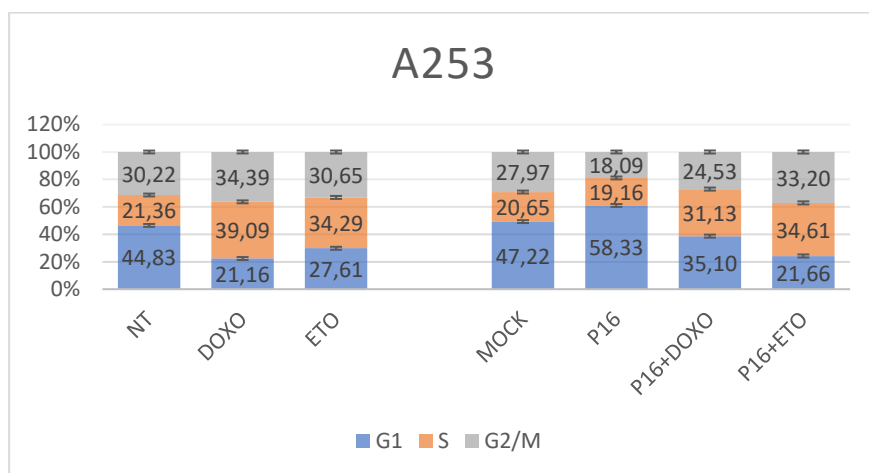
Kod staničnih linija A253 (Slika 15 a i b) i FaDU transfekcijski reagens nema utjecaja na stanični ciklus, ali kod linije Detroit 562 tretman samim transfekcijskim reagensom Xfect dovodi do statistički značajnog povećanja broja pozitivnih stanica u G0/G1 fazama staničnog ciklusa ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu (NT). Sukladno tome, broj stanica u G2/M fazi se statistički smanjila, dok se broj stanica u S fazi nije mijenjao (Slika 15 c i d).

Zbog ovakve statistički značajne razlike u rezultatima kod linije Detroit 562, njezina kontrolna skupina (NT) nije korištena u svrhu usporedbe, već kontrola MOCK, Dok kod staničnih linija A253 i FaDU transfekcija nema utjecaj na stanični ciklus, te samim tim nema utjecaja na

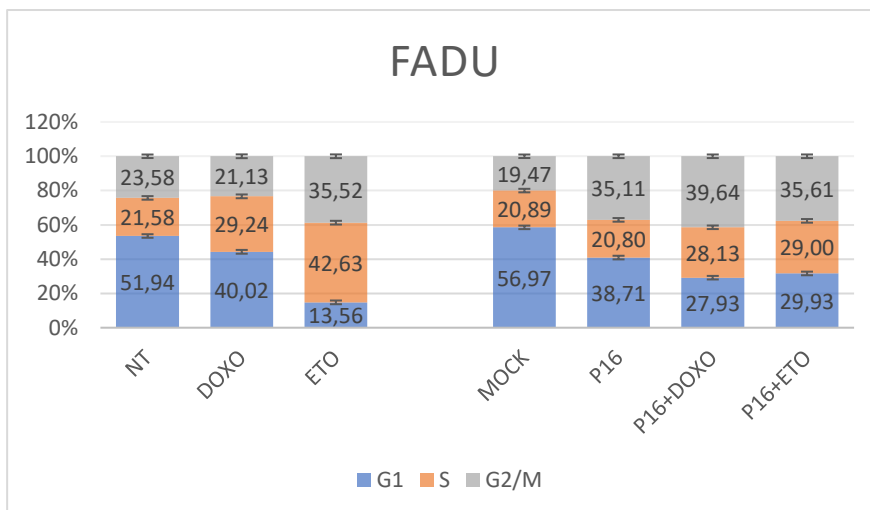
rezultate. Svaka promjena u rezultatima kod ovih staničnih linija je isključivo odgovor na uspješnu transfekciju p16.

4.4.2. Utjecaj tretmana na stanični ciklus

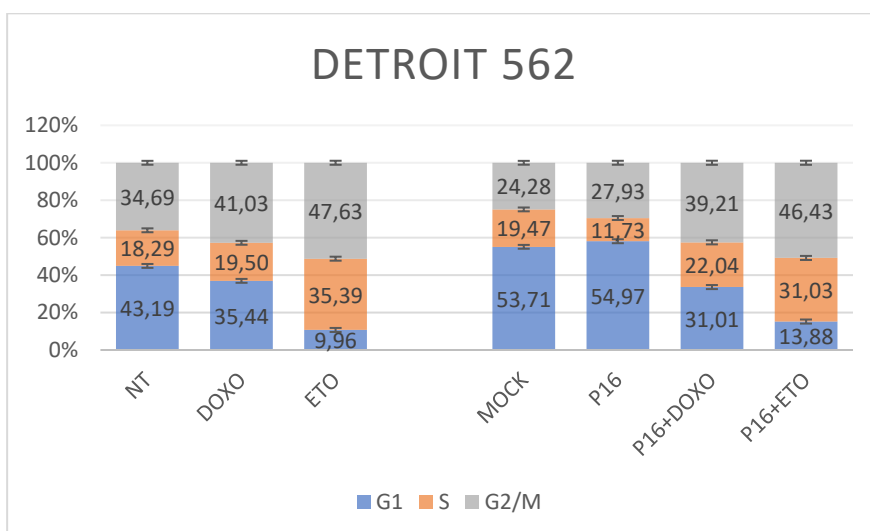
Analizirano je djelovanje proteina p16, te kemoterapeutika doksorubicin i etopozid u različitim kombinacijama na stanični ciklus u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slike 16, 17, 18).



Slika 16 – Utjecaj različitih tretmana na količine stanica zaustavljenih u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u staničnoj liniji A253. Interkalirajuća boja propidij jodid koja se veže na DNA omogućuje razlikovanje i mjerenje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava udio stanica u svakoj fazi. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom.



Slika 17 – Utjecaj različitih tretmana na količine stanica zaustavljenih u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u staničnoj liniji FaDU. Interkalirajuća boja propidij jodid koja se veže na DNA omogućuje razlikovanje i mjerenje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava udio stanica u svakoj fazi. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom



Slika 18 – Utjecaj različitih tretmana na količine stanica zaustavljenih u pojedinoj fazi staničnog ciklusa u stanične linije Detroit 562. Interkalirajuća boja propidij jodid koja se veže na DNA omogućuje razlikovanje i mjerenje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa na temelju diferencijalnog sadržaja DNA. Programski modul protočnog citometra Guava Muse

automatski izračunava udio stanica u svakoj fazi. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom

Tretman doksorubicinom u sve tri stanične linije dovodi do statistički značajnog smanjenja udjela stanica u G1 fazi ($p < 0,001$). U staničnim linijama A253 i FaDU dolazi do značajnog povećanja udjela stanica u S fazi, dok je u staničnoj liniji Detroit 562 statistički značajno raste udio stanica u G2/M fazi (Slika 16, 17, 18).

Tretman etopozidom u sve tri stanične linije dovodi do statistički značajnog smanjenja udjela stanica u G1 fazi ($p < 0,001$) i povećanja količine stanica u S fazi ($p < 0,001$). U staničnim linijama FaDU i Detroit 562 dolazi i do statistički značajnog povećanja količine stanica u G2/M fazi (Slika 16, 17, 18).

Tretman s plazmidom koji eksprimira p16 ima različiti učinak u staničnim linijama. U staničnoj liniji A253 statistički značajno raste količina stanica u G1 fazi ($p < 0,001$) (Slika 16, 17, 18). U staničnoj liniji FaDU količina stanica u fazi G1 značajno pada ($p < 0,001$), a značajno raste u G2/M fazi ($p < 0,001$). U staničnoj liniji Detroit 562, kod koje sama transfekcija ima učinka na stanični ciklus, u usporedbi s kontrolom „MOCK“ statistički raste samo udio stanica u S fazi.

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i doksorubicinom u sve tri linije dovodi do statistički značajnog pada u G1 fazi ($p < 0,001$) i rasta količine stanica u S fazi ($p < 0,001$) u odnosu na netretirane stanice, odnosno kontrolu „MOCK“ ($p < 0,001$). Usporedbom sa stanicama tretiranim samo s doksorubicinom u staničnoj liniji A253 statistički raste udio stanica u G1 fazi, a u druge dvije faze pada, ali ne značajno. U staničnoj liniji FaDU statistički značajno pada količina stanica u G1 ($p < 0,001$), a značajno raste u G2 ($p < 0,001$). U staničnoj liniji Detroit 562 značajno raste količina stanica u S fazi ($p < 0,001$). Usporedbom sa stanicama tretiranim samo s plazmidom koji eksprimira p16 u staničnim linijama A253 i Detroit 562 dolazi do statistički značajnog pada količine stanica u G1 fazi ($p < 0,001$), te rasta u S fazi ($p < 0,001$), dok linija FaDU pokazuje samo značajni rast količine stanica u S fazi ($p < 0,001$).

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom u sve tri linije dovodi do statistički značajnog pada u G1 fazi ($p < 0,001$) i rasta udjela stanica u S fazi ($p < 0,001$) u odnosu na netretirane stanice, odnosno kontrolu „MOCK“ ($p < 0,001$). U staničnim linijama FaDU i

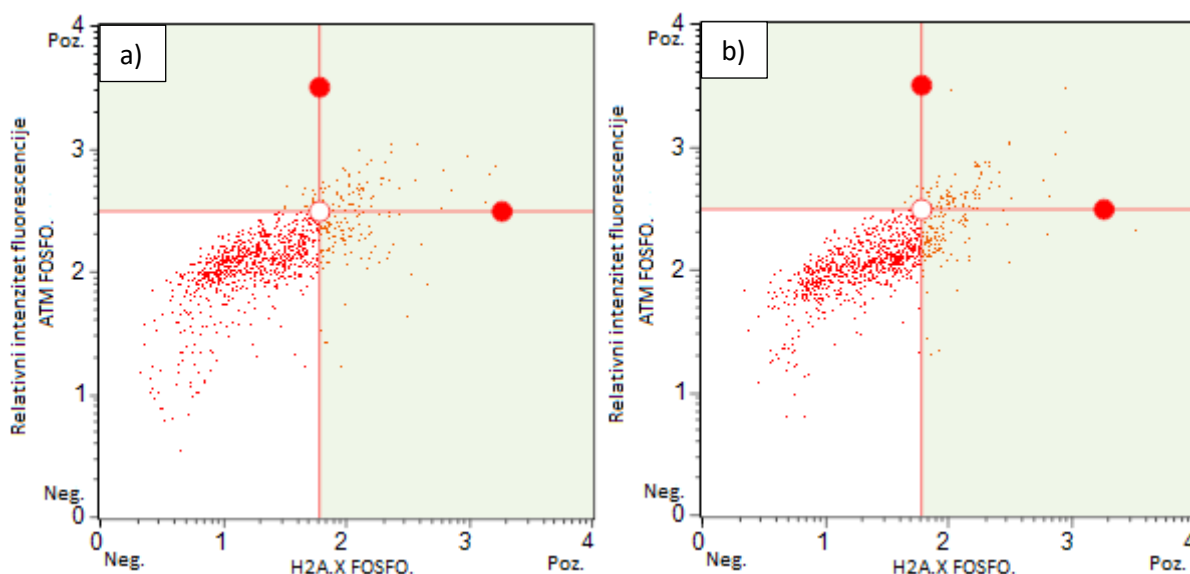
Detroit 562 dolazi i do statistički značajnog rasta udjela stanica u G2 fazi. Usporedbom sa stanicama tretiranim samo s etopozidom u staničnoj liniji FaDU statistički značajno raste količina stanica u G1 fazi ($p < 0,001$), a pada u S fazi ($p < 0,001$). Usporedbom sa stanicama tretiranim samo s plazmidom koji eksprimira p16 u linijama A253 i Detroit 562 dolazi do statistički značajnog pada količine stanica u G1 fazi ($p < 0,001$), te rasta u S fazi ($p < 0,001$), dok linija FaDU pokazuje samo značajni rast količine stanica u S fazi ($p < 0,001$).

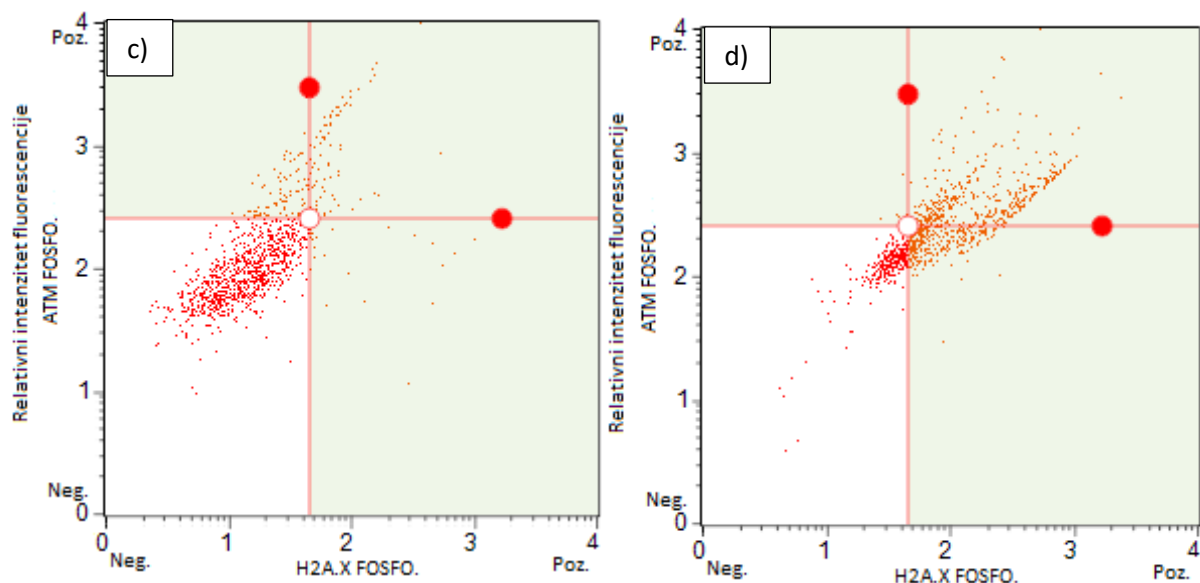
4.5. Analiza oštećenja DNA

Kvantitativno mjerenje oštećenja DNA napravljeno je pomoću komercijalnog seta za određivanje oštećenja DNA „Muse® Multi-Color DNA Damage kit“. Upotrebom kombinacije antitijela specifičnih na fosforilirani ATM i fosforilirani Histon H2A.X obilježena različitim bojama moguće je pouzdano pratiti stupanj oštećenja DNA u stanicama. Aktivirana antitijela na ATM ili H2A.X nam pokazuju količinu jednostrukih lomova unutar DNA, dok njihova zajednička aktivacija pokazuje količinu dvolančanih lomova unutar DNA. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava postotak stanica koje nemaju oštećenje DNA, stanica koje imaju aktivirani ATM, stanica koje imaju aktivirani H2A.X i stanica koje imaju dvolančani lom DNA.

4.5.1. Utjecaj transfekcijskog reagensa na oštećenje DNA

Analizirano je djelovanje transfekcijskog reagensa na oštećenje DNA u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slika 19).





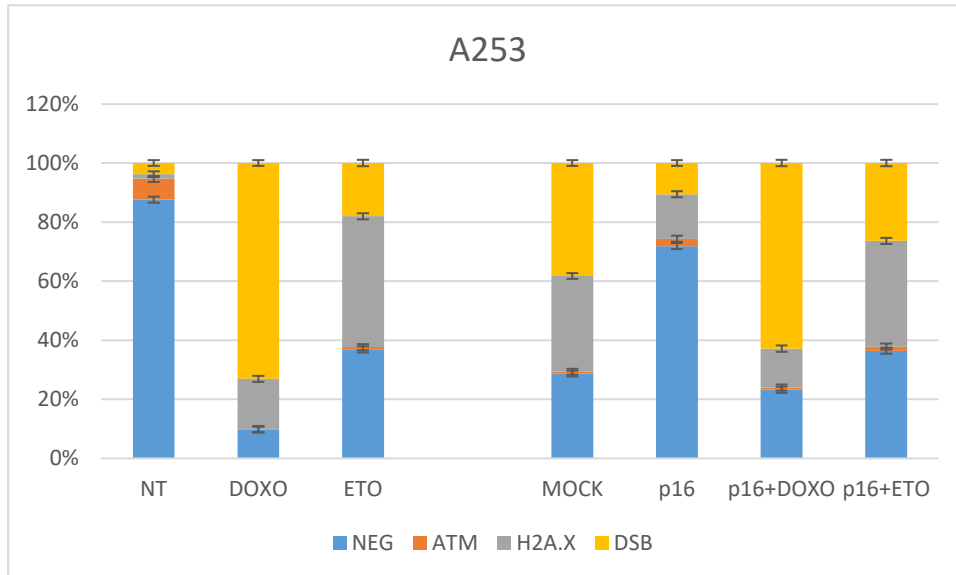
Slika 19 – Analiza pojave jednolančanih i dvolančanih lomova u stanicama. Stanice su inkubirane s antitijelima na fosforilirani ATM i fosforilirani H2A.X, te analizirane pomoću protočne citometrije. Rezultati su prikazani dijagramski: negativne stanice (bez oštećenja DNA – dolje lijevo), stanice pozitivne samo na fosforilirani ATM (gore lijevo), stanice pozitivne samo na fosforilirani H2A.X (dolje desno) i dvostruko aktivirane stanice (dvolančani lom DNA – gore desno). Netransfecirane stanice Detroit 562 (a), transfecirane Detroit 562 (b), Netransfecirane stanice A253 (c), transfecirane stanice A253 (d)

Kod staničnih linija A253 i FaDU tretman transfekcijskim reagensom Xfect (MOCK) dovodi do statistički značajnih razlika u odnosu na netransfecirane stanice ($p < 0,001$), dok kod linije Detroit 562 transfekcijski reagens nema utjecaja na oštećenje stanica.

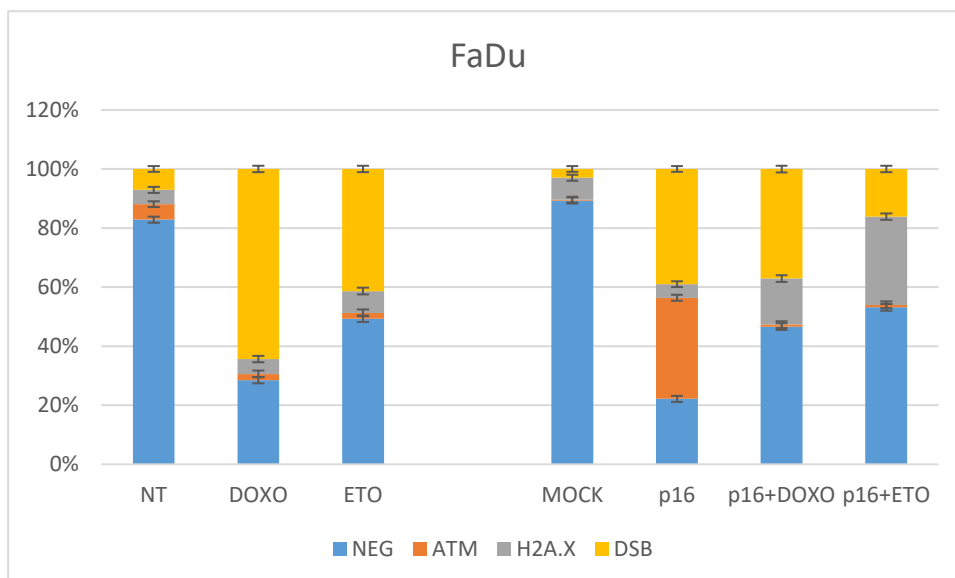
Zbog ovakve statistički značajne razlike u rezultatima kod linija A253 i FaDU, njihova kontrolna skupina (NT) nije korištena u svrhu usporedbe, već kontrola MOCK. Dok kod stanične linije Detroit 562 transfekcija nema utjecaj na stanični ciklus, te samim tim nema utjecaja na rezultate. Svaka promjena u rezultatima kod ove stanične linije je isključivo odgovor na uspješnu transfekciju p16.

4.5.2. Utjecaj tretmana na oštećenje DNA

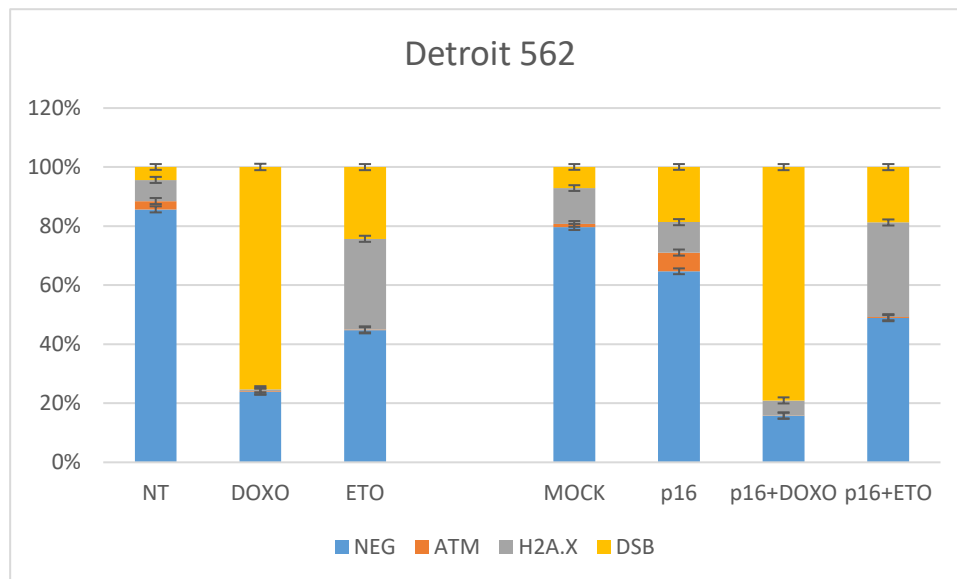
Ovim ispitivanjem utvrđeno je djelovanje proteina p16, te kemoterapeutika doksorubicin i etopozid u različitim kombinacijama na oštećenje DNA u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slike 20, 21, 22).



Slika 20 – Utjecaj različitih tretmana na oštećenje DNA. Stanice su inkubirane s antitijelima na fosforilirani ATM i fosforilirani H2A.X, te analizirane pomoću protočne citometrije. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava postotak stanica koje nemaju oštećenje DNA, stanica koje imaju aktivirani ATM, stanica koje imaju aktivirani H2A.X i stanica koje imaju dvolančani lom DNA. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom. NEG – stanice negativne na oštećenje, ATM – ATM pozitivne stanice, H2A.X – H2A.X pozitivne stanice, DSB – stanice pozitivne na dvolančani lom



Slika 21 – Utjecaj različitih tretmana na oštećenje DNA. Stanice su inkubirane s antitijelima na fosforilirani ATM i fosforilirani H2A.X, te analizirane pomoću protočne citometrije. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava postotak stanica koje nemaju oštećenje DNA, stanica koje imaju aktivirani ATM, stanica koje imaju aktivirani H2A.X i stanica koje imaju dvolančani lom DNA. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom. NEG – stanice negativne na oštećenje, ATM – ATM pozitivne stanice, H2A.X – H2A.X pozitivne stanice, DSB – stanice pozitivne na dvolančani lom



Slika 22 – Utjecaj različitih tretmana na oštećenje DNA. Stanice su inkubirane s antitijelima na fosforilirani ATM i fosforilirani H2A.X, te analizirane pomoću protočne citometrije. Programski modul protočnog citometra Guava Muse automatski izračunava postotak stanica koje nemaju oštećenje DNA, stanica koje imaju aktivirani ATM, stanica koje imaju aktivirani H2A.X i stanica koje imaju dvolančani lom DNA. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom. NEG – stanice negativne na oštećenje, ATM – ATM pozitivne stanice, H2A.X – H2A.X pozitivne stanice, DSB – stanice pozitivne na dvolančani lom

Tretman doksorubicinom u sve tri stanične linije dovodi do statistički značajnog smanjenja neoštećenih stanica i značajnog povećanja stanica s oštećenjem DNA ($p < 0,001$) i to najviše dvolančanih lomovima DNA. U staničnoj liniji A253 dolazi i do statistički značajnog povećanja stanica s aktiviranim H2A.X ($p < 0,001$), što znači da je povećan i broj stanica s jednostrukim lomovima DNA.

Tretman etopozidom u sve tri stanične linije dovodi do značajnog povećanja stanica s oštećenjem DNA ($p < 0,001$). U sve tri stanične linije dolazi do značajnog povećanja stanica s dvolančanim lomovima DNA, dok u staničnim linijama A253 i Detroit 562 i do statistički

značajnog povećanja stanica s aktiviranim H2A.X ($p < 0,001$). S druge strane, u sve tri stanične linije dolazi do smanjenja aktiviranog ATM ($p < 0,001$).

Tretman s plazmidom koji eksprimira p16 u sve tri stanične linije dovodi do statistički značajnog povećanja stanica s oštećenjem DNA ($p < 0,001$) u odnosu na netretirane stanice, ali u staničnoj liniji A253 je oštećenje DNA manje nego u kontroli „MOCK“. U staničnoj liniji FaDU statistički značajno raste udio stanica s aktiviranim ATM.

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i doksorubicinom u sve tri stanične linije pokazuje statistički značajno povećanje stanica s oštećenjem DNA u odnosu na netretirane stanice, a kod staničnih linija FaDU i Detroit 562 i u odnosu na kontrolu MOCK ($p < 0,001$). U odnosu na stanice tretirane samo s doksorubicinom stanična linija FaDU pokazuje manje ukupno oštećenje stanica ($p < 0,001$), ali veći udio stanica s jednostrukim lomom DNA (aktivirani H2A.X). Usporedbom sa stanicama tretiranim samo s plazmidom koji eksprimira p16 u staničnim linijama A253 i Detroit se značajno povećava udio stanica s oštećenjem DNA i to većim dijelom u obliku dvolančanih lomova, dok u staničnoj liniji FaDU on pada ($p < 0,001$).

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom u sve tri stanične linije pokazuje statistički značajno povećanje stanica s oštećenjem DNA u odnosu na netretirane stanice, a stanične linije FaDU i Detroit 562 i u odnosu na kontrolu MOCK ($p < 0,001$).

Usporedbom kombiniranog tretmana s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom sa stanicama tretiranim samo s etopozidom u staničnoj liniji FaDU dolazi do značajno manje dvolančanih lomova, a više jednolančanih lomova.

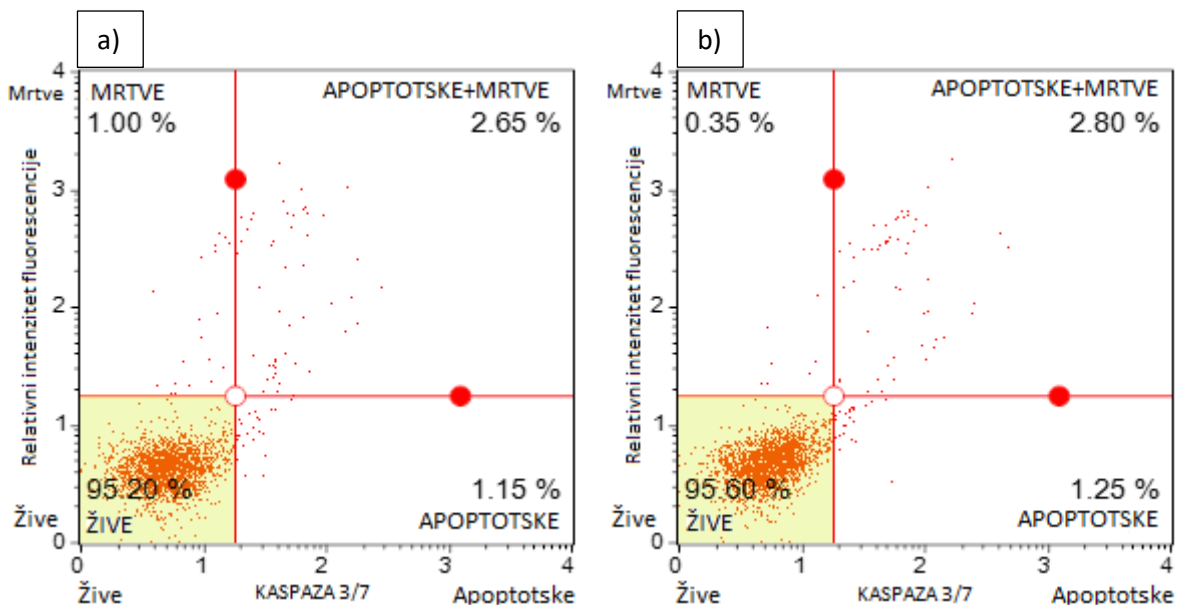
Usporedbom kombiniranog tretmana s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom sa stanicama tretiranim samo s plazmidom koji eksprimira p16, stanična linija A253 ima značajno više oštećenja, dok stanična linija FaDU značajno manje oštećenja. Stanična linija FaDU i Detroit 562 imaju manje jednolančanih lomova pozitivnih na fosforilirani ATM, dok stanična linija FaDU ima manje dvolančanih lomova.

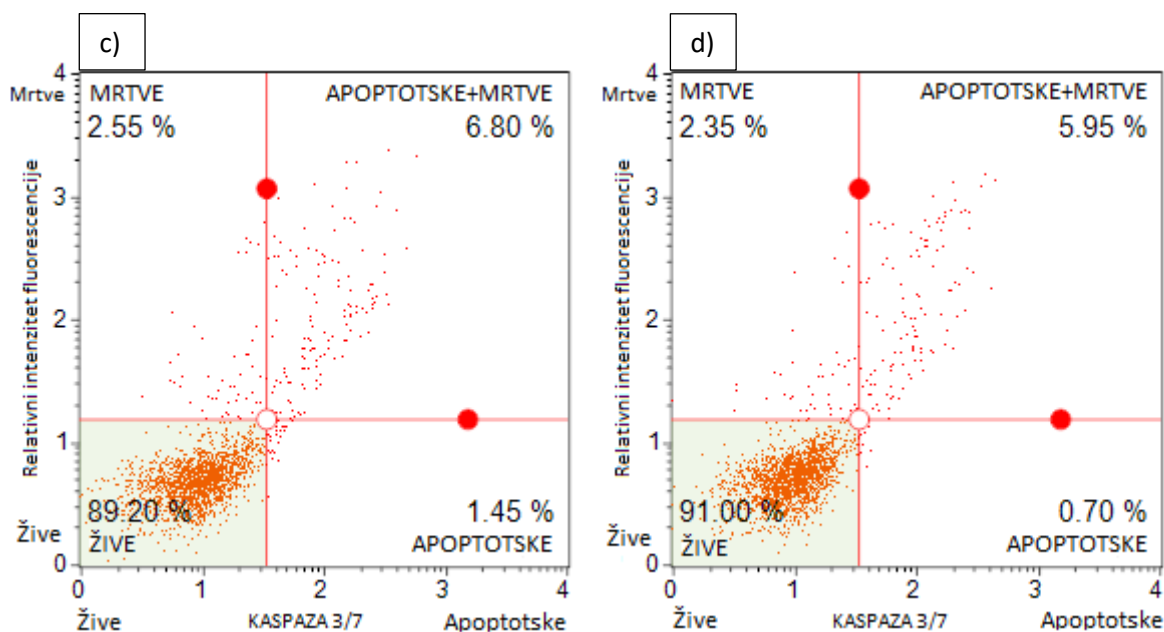
4.6. Analiza apoptoze

Kvantitativno mjerenje udjela stanica u apoptozi uzrokovanoj aktivacijom kaspaza 3/7 i mrtvih stanica (praćenjem permeabilizacije stanične membrane) napravljeno je pomoću komercijalnog seta za mjerenje apoptoze „Muse® Caspase-3/7 Kit“. Test istovremeno mjeri broj i postotak stanica u različitim stadijima apoptoze bazirano na aktivnosti kaspaza 3/7 u kombinaciji s bojom koja obilježava mrtve stanice (7-AAD). Programski modul protočnog citometra Guava Muse pokazuje relativni postotak živih stanica, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica.

4.6.1. Utjecaj transfekcijskog reagensa na apoptozu

Analizirano je djelovanje transfekcijskog reagensa na apoptozu u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slika 23). U niti jednoj od testiranih staničnih linija, A253, FaDU i Detroit 562, nema promjene vijabilnosti nakon transfekcije. Ovaj rezultat dovodi do zaključka da je svaka promjena nakon transfekcije rezultat djelovanja p16.

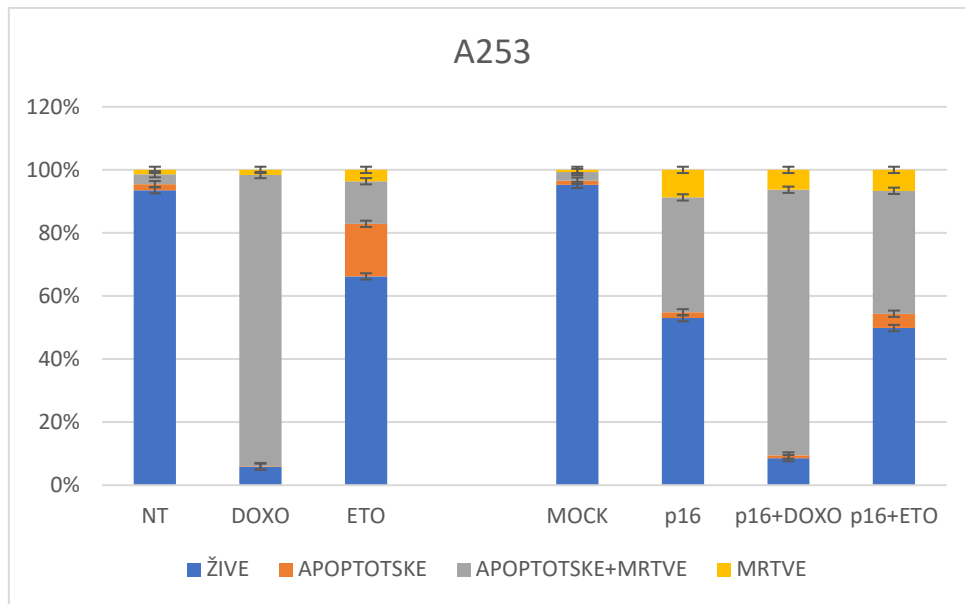




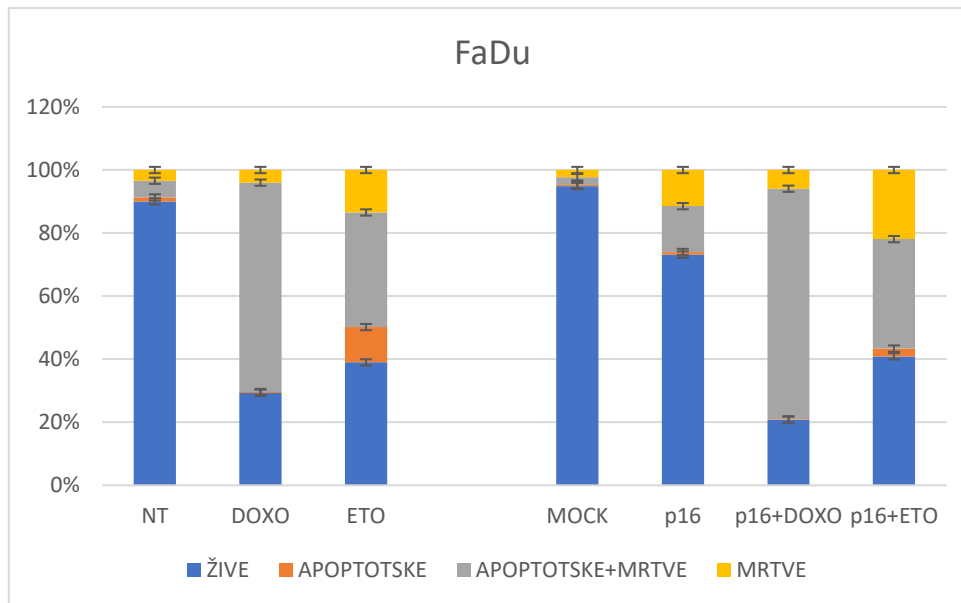
Slika 23 – Analiza vijabilnosti stanica nakon transfekcije reagensom Xfect. Aktivnost kaspaze 3/7 se mjeri intenzitetom boje koja se veže na DNA nakon što kaspaze 3/7 slome vezu boje i peptidnog supstrata DEVD. Marker 7-AAD označava mrtve stanice. Prikaz dijagrama s točkama koji pokazuje žive stanice (negativne na kaspaze 3/7 i boju 7-AAD – dolje lijevo), apoptotske stanice (pozitivne na kaspaze 3/7, negativne na boju 7-AAD – dolje desno), stanice u kasnoj apoptozi i mrtve stanice (pozitivne na kaspaze 3/7 i boju 7-AAD – gore desno) i nekrotične (mrtve) stanice (negativne na kaspaze 3/7, pozitivne na boju 7-AAD). Netransfecirane stanice A253 (a), transfecirane stanice A253 (b), netransfecirane stanice Detroit 562 (c), transfecirane stanice Detroit 562 (d)

Analizirano je djelovanje proteina p16, te kemoterapeutika doksorubicin i etopozid u različitim kombinacijama na apoptozu u staničnim linijama A253, FaDU i Detroit 562 (Slike 24, 25, 26).

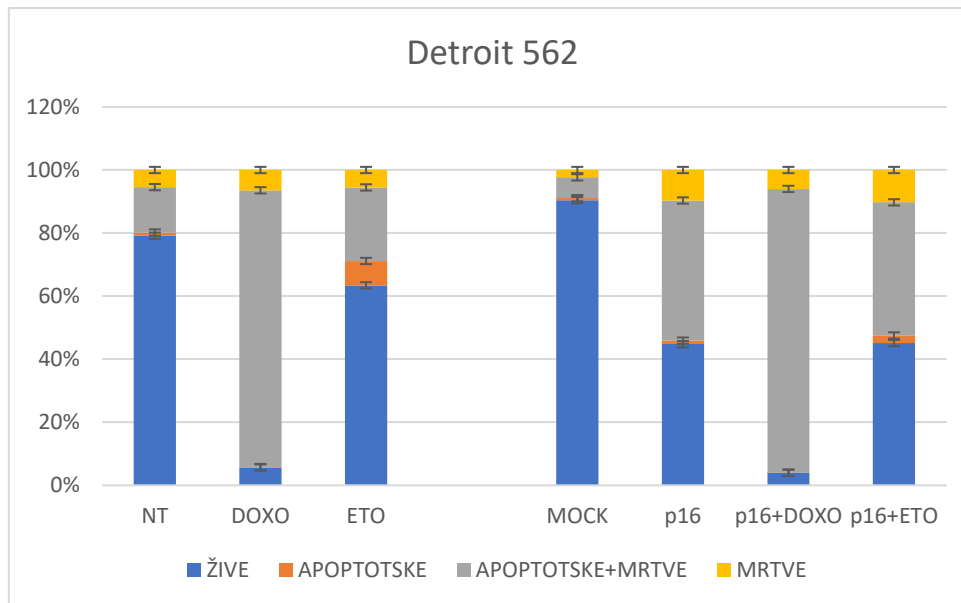
4.6.2. Utjecaj tretmana na apoptozu



Slika 24 – Grafički prikaz utjecaja različitih tretmana na apoptozu. Aktivnost kaspaza-3/7 se mjeri intenzitetom boje koja se veže na DNA nakon što kaspaze3/7 slome vezu boje i peptidnog supstrata DEVD. Marker 7-AAD označava mrtve stanice. Programski modul protočnog citometra Guava Muse pokazuje relativni postotak živih stanica, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom.



Slika 25 – Grafički prikaz utjecaja različitih tretmana na apoptozu. Aktivnost kaspaza-3/7 se mjeri intenzitetom boje koja se veže na DNA nakon što kaspaze3/7 slome vezu boje i peptidnog supstrata DEVD. Marker 7-AAD označava mrtve stanice. Programski modul protočnog citometra Guava Muse pokazuje relativni postotak živih stanica, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom.



Slika 26 – Grafički prikaz utjecaja različitih tretmana na apoptozu. Aktivnost kaspaza-3/7 se mjeri intenzitetom boje koja se veže na DNA nakon što kaspaze3/7 slome vezu boje i peptidnog supstrata DEVD. Marker 7-AAD označava mrtve stanice. Programski modul protočnog citometra Guava Muse pokazuje relativni postotak živih stanica, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom.

Tretman doksorubicinom u sve tri linije povećava udio stanica u kasnoj apoptozi i mrtvih stanica ($p < 0,001$) (Slika 24, 25, 26).

Tretman etopozidom u sve tri linije povećava udio stanica u apoptozi i mrtvih stanica ($p < 0,001$) (Slika 24, 25, 26).

Tretman s plazmidom koji eksprimira p16 u sve tri linije statistički povećava količinu stanica u kasnoj apoptozi i mrtvih stanica ($p < 0,001$) (Slika 24, 25, 26, 27).

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i doksorubicinom u odnosu na NT u sve tri linije statistički povećava količinu stanica u kasnoj apoptozi i mrtvih stanica ($p < 0,001$) (Slika 24, 25, 26).

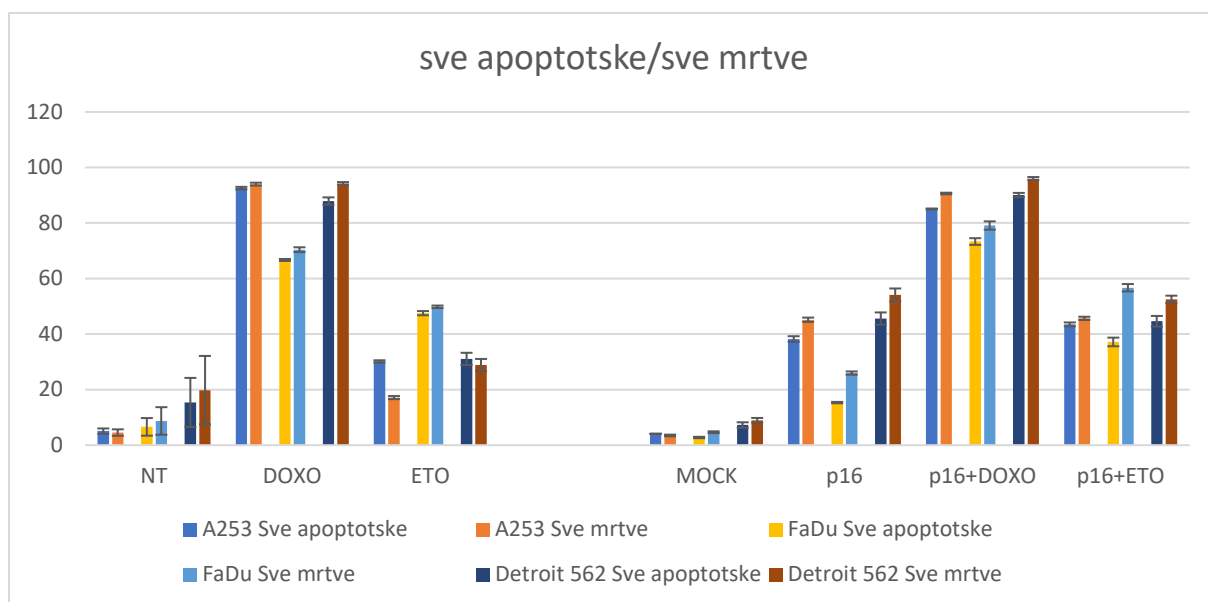
Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i doksorubicinom u odnosu na stanice tretirane samo s doksorubicinom u u staninoj liniji A253 dovodi do pada udjela stanica u apoptozi, a rasta udjela mrtvih stanica. U staničnoj liniji FaDU raste udio stanica u apoptozi i mrtvih ($p < 0,001$), dok u Detroit 562 nema razlike.

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i doksorubicinom u odnosu na stanice tretirane samo s plazmidom koji eksprimira p16 u svim linijama se smanjuje udio i živih i mrtvih stanica, a raste udio stanica u kasnoj apoptozi i mrtvih ($p < 0,001$).

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom u odnosu na netretirane stanice u sve tri linije povećava količinu stanica u apoptozi i broj mrtvih stanica ($p < 0,001$) (Slika 24, 25, 26).

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom u odnosu na stanice tretirane samo s etopozidom u staničnim linijama A253 i Detroit 562 smanjuje broj živih stanica, smanjuje broj stanica u ranoj apoptozi, a diže u kasnoj apoptozi i broj mrtvih stanica. U staničnoj liniji FaDU smanjuje broj stanica u apoptozi.

Kombinirani tretman s plazmidom koji eksprimira p16 i etopozidom u odnosu na stanice tretirane samo s plazmidom koji eksprimira p16 u staničnoj liniji A253 podiže količinu stanica u apoptozi, u staničnoj liniji FaDU smanjuje broj živih stanica, dok podiže broj stanica u apoptozi, te podiže broj mrtvih stanica. U staničnoj liniji Detroit 562 nema razlike.



Slika 27 – Grafički prikaz svih apoptotskih i svih mrtvih stanica ispitivanih staničnih linija A253, FaDu i Detroit 562. Aktivnost kaspaza-3/7 se mjeri intenzitetom boje koja se veže na DNA nakon što kaspaze3/7 slome vezu boje i peptidnog supstrata DEVD. Marker 7-AAD označava mrtve stanice. Programski modul protočnog citometra Guava Muse pokazuje relativni postotak živih stanica, stanica u ranoj ili kasnoj fazi apoptoze, te mrtvih stanica. NT – netretirane stanice, DOXO – stanice tretirane doksorubicinom, ETO - stanice tretirane etopozidom, p16 – stanice transfecirane plazmidom koji eksprimira protein p16, p16+DOXO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i doksorubicinom, p16+ETO – stanice tretirane plazmidom koji eksprimira protein p16 i etopozidom.

Usporedni prikaz svih apoptotskih i svih mrtvih stanica u svim tretmanima kod sve tri stanične linije (Slika 27) pokazuje da svi tretmani pokazuju isti trend u svim linijama. Ovdje se može vidjeti i da kod kombiniranih tretmana s plazmidom koji eksprimira protein p16 postoji rast u broju stanica u apoptozi i mrtvih stanica u odnosu na tretmane bez plazmida.

5. RASPRAVA

U ovom radu istražena je ekspresija *INK4A* (p16) i njegovih ciljnih gena nakon tretmana staničnih linija karcinoma glave i vrata kemoterapeutima te nakon unosa plazmida koji eksprimira p16. Cilj istraživanja je bio ustanoviti djelovanje kemoterapeutika doksorubicina i etopozida na ekspresiju *INK4A*. Uz samostalno djelovanje kemoterapeutika, istražena je reakcija tumorskih stanica na povećanje ekspresije proteina p16 nakon transfekcije plazmida s njegovom sekvencom, te nakon tretmana kemoterapeutima.

5.1. Ekspresija gena *INK4A*

U ovom istraživanju nakon tretmana doksorubicinom zabilježen je značajan porast ekspresije gena *INK4A* u staničnim linijama Detroit 562 i FaDU, dok je u staničnoj liniji A253 ekspresija *INK4A* ostala jednaka. Porast ekspresije nakon tretmana se poklapa s prijašnjim rezultatima Spallarosa i suradnika (2010) utvrdili su da male doze doksorubicina povećavaju ekspresiju *INK4A* u stanicama krvi uzete iz pupčane vrpce, a Adewoye i sur. (2020) su isto ustanovili na stanicama glioblastoma, kao i Piegari i sur. (2020) u laboratorijskim štakorima.

Tretman etopozidom je jedino u staničnoj liniji Detroit 562 doveo do značajnog povećanja ekspresije gena *INK4A*. Povećanje ekspresije *INK4A* su 2005. vidjeli Chiu i sur. na modelu raka nemalih stanica pluća, dok Tamamori-Adachi i sur. (2018) na modelu karcinoma kore nadbubrežne žlijezde nisu našli promjene ekspresije.

5.2. Ekspresija gena *BIRC5*

Utjecaj unosa plazmida koji eksprimira p16 na ekspresiju gena *BIRC5* praćena je i na genskoj i na proteinskoj razini. Na proteinskoj razini, u staničnoj liniji A253 proteinski produkt gena *BIRC5*, survivin je lagano povišen u odnosu na netretirane stanice, pada u liniji FaDU i potpuno nestaje u staničnoj liniji Detroit 562. Na genskoj razini rezultati su se dijelom pokazali drugačijima. U linijama A253 i FaDU ekspresija gena *BIRC5* statistički značajno pada, dok u staničnoj liniji Detroit ostao je nepromijenjen. Kod linije FaDU i genska i proteinska ekspresija pokazuju pad, i tako su međusobno sukladne, dok se u liniji A253 koja u genskoj ekspresiji pokazuje pad, proteinska raste. U liniji Detroit 562 genska ekspresija se ne mijenja, ali nije bilo

proteinske ekspresije. U literaturi su Hu i sur. (2011) na modelu karcinoma jetre ustanovili da p16 smanjuje ekspresiju survivina smanjujući fosforilaciju proteina Akt. S druge strane Xu i sur. (2012), su našli da se u karcinomu dojke genska i proteinska ekspresija ne poklapaju.

Tretman doksorubicinom je u staničnim linijama A253 i FaDU statistički značajno smanjio ekspresiju gena *BIRC5*. U liniji A253 su standardne devijacije bile relativno velike, jer je pokus rađen samo jednom i zbog vremenskog ograničenja ga nije bilo moguće ponoviti. S druge strane ti rezultati se poklapaju s rezultatima Estève i sur. (2007) koji su isto pokazali na stanicama karcinoma debelog crijeva i Nestal de Moraes i sur. (2013) u stanicama raka dojke.

Tretman etopozidom je u stanicama A253 i FaDU statistički značajno smanjio ekspresiju gena *BIRC5*. Ti rezultati nisu u skladu s rezultatima Ceballos-Cancino i sur. (2007) koji su pokazali da etopozid diže ekspresiju survivina, dok su Ong i sur. (2016) našli da etopozid nije smanjivao ekspresiju gena *BIRC5* u osteosarkomu pasa.

Kombinirani tretman s p16 i doksorubicinom povećava ekspresiju gena *BIRC5* u odnosu na samo jedan od tretmana. To ukazuje da kombinacija tretmana dokida efekt pojedinog tretmana i da djeluju antagonistički.

5.3. Ekspresija gena *E2F1*

Rezultati su pokazali da doksorubicin povećava ekspresiju gena *E2F1* u staničnim linijama A253 i FaDU. Ti rezultati se slažu s rezultatima Sorianija i sur. (2014) koji su našli da tretman doksorubicinom povećava ekspresiju *E2F1* u stanicama multiplog mijeloma. S druge strane, Shafiei-Roudbari i sur. su 2017. godine ustanovili da doksorubicin smanjuje ekspresiju *E2F1* u štakorima.

Tretman plazmidom koji eksprimira p16 je u sve tri stanične linije doveo do smanjene ekspresije *E2F1*. To se slaže s rezultatima Al-Khalaf i sur. (2011) na humanim i mišjim stanicama, te Li i sur. (2016) u karcinomu mokraćnog mjehura. S druge strane Jeong i sur. (2003) su ustanovili da u stanicama karcinoma želuca egzogeno dodani p16 povećava ekspresiju *E2F1* i na taj način vodi stanice u apoptozu.

5.4. Utjecaj tretmana na stanični ciklus

Tretman doksorubicinom smanjuje postotak stanica u G1 fazi u sve tri stanične linije, a u liniji Detroit 562 povećava postotak stanica u G2/M fazi. Zaustavljanje staničnog ciklusa u G2/M je poznati efekt doksorubicina (Kim i sur, 2009).

Tretman etopozidom u sve tri linije smanjuje postotak stanica u G1 fazi i povećanja postotka stanica u S fazi staničnog ciklusa. U staničnim linijama FaDU i Detroit 562 uzrokuje i povećanje postotka stanica u G2/M fazi. To je u skladu s literaturnim podacima, jer etopozid usporava stanični ciklus i uzrokuje nakupljanje u G2 fazi (Clifford i sur, 2003, Smith i sur. 1994, Tamamori-Adachi i sur. 2018).

Tretman plazmidom koji eksprimira p16 je u staničnoj liniji A253 povećao postotak stanica u G1 fazi, dok je u staničnoj liniji FaDU smanjio postotak stanica u G1 fazi, a povećao u G2/M. U staničnoj liniji Detroit 562 je pak porastao postotak stanica u S fazi. Normalna funkcija p16 je da zaustavlja stanični ciklus na prijelazu između G0 i G1 faze (Li i sur. 2011), što je ovdje slučaj u staničnoj liniji A253. U malignim stanicama je pak moguće i nakupljanje u S fazi (Chien i sur. 2010), kao što se dogodilo u liniji Detroit 562.

5.5. Utjecaj tretmana na oštećenje DNA

Tretman doksorubicinom je u sve tri linije doveo do značajnog povećanja oštećenja DNA i to najvećim dijelom dvolančanog loma DNA. To je sukladno s poznatim rezultatima (Halim i sur, 2018.). U staničnoj liniji A253 došlo je i do značajnih jednolančanih lomova, što je također poznato iz literature (Capolongo i sur. 1990).

Tretman etopozidom u sve tri stanične linije značajno povećava broj stanica s dvolančanim lomovima DNA, u staničnim linijama A253 i Detroit 562 dolazi i do povećanja jednolančanih lomova. To je u skladu s literaturnim podacima (Muslimović i sur. 2009, Schnake i Gutiérrez 2019).

Tretman plazmidom koji eksprimira p16 je u sve tri stanične linije povećao broj stanica s oštećenjem DNA. To je neočekivani rezultat jer se p16 aktivira kao odgovor na oštećenje DNA (Spallarosa i sur. 2010).

U kombiniranim tretmanima p16 i doksorubicinom nema velike promjene u odnosu na stanične linije tretirane samo sa doksorubicinom, osim u staničnoj liniji FaDU u kojoj se povećava količina neoštećena DNA.

U kombiniranom tretmanu s p16 i etopozidom se u stančnim linijama A253 i Detroit 56 ne događa značajna razlika. Dok u staničnoj liniji FaDU se smanjuje količina dvolančanih lomova povećava količina jednolančanih lomov, što znači da dodatni tretman p16 nema značajnog utjecaja.

5.6. Utjecaj tretmana na apoptozu

Tretman doksorubicinom i etopozidom su u sve tri stanične linije povećale količinu stanica u apoptozi i mrtvih stanica, što je očekivano.

Tretman plazmidom koji eksprimira p16 je doveo do povećanja stanica u apoptoza i mrtvih stanica u sve tri linije. To je sukladno sa literaturnim podacima (Calbó i sur. 2004, Kim i sur. 2000).

Kombinirani tretmani doksorubicinom i plazmidom koji eksprimira p16 su u linijama A253 i FaDU, a etopozidom i plazmidom koji eksprimira p16 su u linijama A253 i Detroit 562 povećali broj stanica u apoptozi i mrtvih stanica, što ukazuje da tretman s p16 pojačava učinak kemoterapeutika.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- doksorubicin inducira ekspresiju gena *INK4A* u staničnim linijama FaDU i Detroit 562; doksorubicin inducira ekspresiju gena *INK4A* u tim linijama tretiranim p16 plazmidom
- etopozid inducira ekspresiju *INK4A* u staničnoj liniji Detroit 562; etopozid također inducira ekspresiju gena *INK4A* u toj liniji nakon dodatnog tretmana s p16 plazmidom
- ekspresija gena *BIRC5* u staničnim linijama A253 i FaDU pada tretmanima doksorubicinom, etopozidom i p16. p16 također smanjuje proteinsku ekspresiju proteina survivin. Kombinacija tretmana p16 i kemoterapeutika djeluje antagonistički na ekspresiju *BIRC5*
- ekspresija gena *E2F1* nakon tretmana doksorubicinom raste u staničnim linijama A253 i FaDU, a pada s tretmanom etopozidom u staničnoj liniji FaDU. Tretman s plazmidom koji eksplicira p16 snizuje ekspresiju *E2F1* u sve tri stanične linije. Kombinirani tretmani p16 i kemoterapeutika ne pokazuju konzistentne rezultate
- tretmani doksorubicinom i etopozidom smanjuju postotak stanica u G1 fazi
- tretman doksorubicinom uzrokuje oštećenje DNA, najviše dvolančane lomove
- tretman etopozidom dovodi do povećanja oštećenja stanica dvolančanim lomom DNA u sve tri stanične linije, a jednolančanih lomova u linijama A253 i Detroit 562
- tretman plazmidom p16 uzrokuje povećanje oštećenja DNA u sve tri stanične linije
- kombinirani tretman s p16 i doksorubicinom ili etopozidom nema značajnog utjecaja na oštećenje stanica u odnosu na tretmane bez p16
- tretmani doksorubicinom i etopozidom uzrokuje apoptozu i smrt stanica uz značajno jači efekt doksorubicina u odnosu na etopozid
- tretman s p16 povećava količinu stanica u apoptozu
- kombinirani tretmani p16 i doksorubicin ili etopozid imaju pojačani utjecaj kemoterapeutika na apoptozu i smrt stanica

Hipoteza da bi se uvođenjem funkcionalnog p16 u stanice koje imaju mutirani gen *INK4A* trebao modulirati odgovor na oštećenje DNA se nije pokazala ispravnom, jer p16 nije promijenio odgovor stanica na kemoterapeutike s obzirom na stanični ciklus i oštećenje DNA, ali je imao učinak na povećanje apoptoze.

7. LITERATURA

Adewoye, A.B., Tampakis, D., Follenzi, A. i suradnici 2020: Multiparameter flow cytometric detection and quantification of senescent cells in vitro. *Biogerontology* 21: 773–786.

Al-Khalaf, H. H., Colak, D., Al-Saif, M., Al-Bakheet, A., Hendrayani, S. F., Al-Yousef, N., Kaya, N., Khabar, K. S., Aboussekhra, A. (2011): p16(INK4a) positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1. *PLoS One* 6(7): e21111.

Becker, T. M., Rizos, H., Kefford, R. F., Mann, G. (2001): Functional impairment of melanoma-associated p16INK4a mutants in melanoma cells despite retention of cyclin-dependent kinase 4 binding. *Clin. Cancer Res.* 7: 3282–3288.

Brooks, P. J. i Theruvathu, J. A. (2005): DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 35: 187–193.

Byeon, I. J., Li, J., Ericson, K., Selby, T. L., Tevelev, A., Kim, H. J., O’Maille, P., and Tsai, M.D. (1998): Tumor suppressor p16INK4A: Determination of solution structure and analyses of its interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Cell* 1: 421–431.

Calbó, J., Serna, C., Garriga, J., Graña, X., Mazo, A. (2004): The fate of pancreatic tumor cell lines following p16 overexpression depends on the modulation of CDK2 activity. *Cell death and differentiation* 11(10): 1055–1065.

Cancer Genome Atlas Network (2015): Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517: 576–582.

Capolongo, L., Belvedere, G., D’Incalci, M. (1990): DNA damage and cytotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin in doxorubicin-sensitive and -resistant human colon carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 25(6): 430–434.

Ceballos-Cancino, G., Espinosa, M., Maldonado, V., Melendez-Zajgla, J. (2007): Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene* 26(54): 7569-75.

Chien, W. W., Domenech, C., Catallo, R., Salles, G., Ffrench, M. (2010): S-phase lengthening induced by p16(INK4a) overexpression in malignant cells with wild-type pRb and p53. *Cell Cycle* 9(16): 3286-96.

Chiu, C. C., Li, C. H., Ung, M. W., Fuh, T. S., Chen, W. L., Fang, K. (2005): Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G2-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer letters* 223(2): 249–258.

Choi, B. Y., Choi, H. S., Ko, K., Cho, Y. Y., Zhu, F., Kang, B. S., Ermakova, S. P., Ma, W. Y., Bode, A. M., Dong, Z. (2005): The tumor suppressor p16INK4a prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 699–707.

Clifford, B., Beljin, M., Stark, G. R., Taylor, W. R. (2003): G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.* 63(14): 4074-81.

Collado, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2007): Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223–233.

Damiani, R.M., Moura, D.J., Viau, C.M., Caceres, R.A., Henriques, J.A., Saffi, J. (2016): Pathways of cardiac toxicity: Comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch. Toxicol.* 90: 2063–2076.

Eckhardt, M., Zhang, W., Gross, A. M., Von Dollen, J., Johnson, J. R., Franks-Skiba, K. E., Swaney, D. L., Johnson, T. L., Jang, G. M., Shah, P. S., Brand, T. M., Archambault, J., Kreisberg, J. F., Grandis, J. R., Ideker, T., Krogan, N. J. (2018): Multiple Routes to Oncogenesis Are

Promoted by the Human Papillomavirus-Host Protein Network. *Cancer discovery* 8(11): 1474–1489.

Estevao, D., Costa, N. R., Gil da Costa, R. M., Medeiros, R. (2019): Hallmarks of HPV carcinogenesis: the role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1862: 153–162.

Estève, P. O., Chin, H. G., Pradhan, S. (2007): Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 282(4): 2615–2625.

Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Wooster, R., Futreal, P. A., Stratton, M. R. (2006): Cosmic 2005. *Br. J. Cancer* 94: 318–322.

Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes, M., Mendez, J., Antequera, F., Serrano, M. (2006): Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ ARF locus. *Nature* 440: 702–706.

Gump, J., Stokoe, D., McCormick, F. (2003): Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association. *J. Biol. Chem.* 278: 6619–6622.

Guo, Y., Mahajan, A., Yuan, C., Joo, S. H., Weghorst, W. M., Tsai, M.D., Li, J. (2009): Comparisons of the conformational stability of cyclin-dependent kinase (CDK) 4-interacting ankyrin repeat (AR) proteins. *Biochemistry* 48: 4050–4062.

Halim, V. A., García-Santisteban, I., Warmerdam, D. O., van den Broek, B., Heck, A., Mohammed, S., Medema, R. H. (2018): Doxorubicin-induced DNA Damage Causes Extensive Ubiquitination of Ribosomal Proteins Associated with a Decrease in Protein Translation. *Molecular & cellular proteomics* 17(12): 2297–2308.

Hande, K. R. (1998): Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 34:1514–21.

Hansson, A., Manetopoulos, C., Jonsson, J., Axelson, H. (2003): The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTR genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 1073–1081.

Hecht, S. S. (1999): Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1194–1210.

Hu, H., Li, Z., Chen, J., Wang, D., Ma, J., Wang, W., Li, J., Wu, H., Li, L., Wu, M., Qian, Q., Chen, J., Su, C. (2011): P16 reactivation induces anoikis and exhibits antitumour potency by downregulating Akt/survivin signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Gut* 60: 710-721.

Isayeva, T., Li, Y., Maswahu, D., Brandwein-Gensler, M. (2012): Human papillomavirus in non-oro-pharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol.* 6: 104–120.

Johnson-Arbor, K., Dubey, R. (2018): Doxorubicin. StatPearls Publisher, Treasure Island, FL, USA.

Jeong, Y. W., Kim, K. S., Oh, J. Y., Park, J. C., Baek, W. K., Suh, S. I., Suh, M. H., Lee, J. C., Cho, J. W. (2003): Exogenous wild-type p16INK4A gene induces delayed cell proliferation and promotes chemosensitivity through decreased pRB and increased E2F-1 expressions. *International journal of molecular medicine* 12(1): 61–65.

Kim, M., Katayose, Y., Rojanala, L., Shah, S., Sgagias, M., Jang, L., Jung, Y. J., Lee, S. H., Hwang, S. G., Cowan, K. H. (2000): Induction of apoptosis in p16INK4A mutant cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16INK4A protein. *Cell death and differentiation* 7(8): 706–711.

Kim, H. S., Lee, Y. S., Kim, D. K. (2009): Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and Fas-mediated cell death. *Pharmacology* 84(5): 300-9.

Kim, W. Y., Sharpless, N. E. (2006): The regulation of INK4/ ARF in cancer and aging. *Cell* 127: 265–275.

Klasen, A., Kessari, R., Mercier, L., Valade, C., Grill, J., Desmaris, R., & Paci, A. (2014): Stability of etoposide solutions in disposable infusion devices for day hospital cancer practices. *Drugs in R&D* 14(1): 13–23.

Kresty, L. A., Mallery, S. R., Knobloch, T. J., Li, J., Lloyd, M., Casto, B. C., Weghorst, C. M. (2008): Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 17: 3179–3187.

Krimpenfort, P., Upenberg, A., Song, J.-Y., van der Valk, M., Nawijin, M., Zevenhoven, J., Berns, A. (2007): p15Ink4b is a critical tumor suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* 448: 943–946.

Krishnamurthy, J., Torricem C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., Sharpless, N. E. (2004): Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clinical Invest.* 114: 1299–07.

Lang, J. C., Borchers, J., Danahey, D., Smith, S., Stover, D. G., Agrawal, A., Malone, J. P., Schuller, D. E., Weghorst, C. M., Holinga, A. J., Lingam, K., Patel, C. R., Esham, B. (2002): Mutational status of overexpressed p16 in head and neck cancer: Evidence for germline mutation of p16/p14ARF. *Int. J. Oncol.* 21: 401–408.

Leovic, D., Sabol, M., Ozretic, P., Musani, V., Car, D., Marjanovic, K., Zubcic, V., Sabol, I., Sikora, M., Grce, M., Glavas-Obrovac, L., Levanat, S. (2012): Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck* 34(1): 104–112.

Li, J., Byeon, I. J., Poi, M. J., Ericson, K., Selby, T., O'Maille, P., Qin, D., Tsai, M. D. (2000): Structure-function relationship of the INK4 family of tumor suppressors. In *DNA Alterations in Cancer: Genetic and Epigenetic Changes*. Eaton Publishing, Westborough, USA.

Li, J., Guo, Y. (2010): Gankyrin oncoprotein: Structure, function, and involvement in cancer. *Curr. Chem. Biol.* 4: 13–19.

Li, J., Knobloch, T. J., Kresty, L. A., Zhang, X., Lang, J. C., Schuller, D. E., Weghorst, C. M. (2011): Gankyrin, a biomarker for epithelial carcinogenesis, is overexpressed in human oral cancers. *Anticancer Res.* 31(9): 2683 – 2693.

Li, J., Melvein, W. S., Tsai, M.D., Weghorst, C. M., and Muscarella, P. (2004): The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. *Biochemistry* 43: 4394–4399.

Li, J., Muscarella, P., Joo, S. H., Knobloch, T. J., Melvin, W. S., Weghorst, C. M., and Tsai, M.D. (2005): Dissection of CDK4-binding and transactivation activities of p34SEI-1 and comparisons between functions of p34SEI-1 and p16INK4A. *Biochemistry* 44: 13246–13256.

Li, J., Poi, M. J., Tsai, M. D. (2011): Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry* 50: 5566–82.

Li, S., Zhu, Y., Liang, Z., Wang, X., Meng, S., Xu, X., Xu, X., Wu, J., Ji, A., Hu, Z., Lin, Y., Chen, H., Mao, Y., Wang, W., Zheng, X., Liu, B., Xie, L. (2019): Correction: Up-regulation of p16 by miR-877-3p inhibits proliferation of bladder cancer. *Oncotarget* 10(6): 684.

Lin, Y. C., Diccianni, M. B., Kim, Y., i suradnici (2007): Human p16gamma, a novel transcriptional variant of p16(INK4A), coexpresses with p16(INK4A) in cancer cells and inhibits cell-cycle progression. *Oncogene* 26: 7017–27.

Massague, J. (2004): G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432: 298-306.

McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., Yellon, D. M. (2017): Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 31: 63–75.

Meng, R. D., Phillips, P., El-Deiry, W. S. (1999): p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int. J. Oncol.* 14(1): 5-14.

Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., Kelsey, K. T. (2014): High-risk HPV types and head and neck cancer. *International journal of cancer* 135(7): 1653–1661.

Mirzayans, R., Andrais, B., Hansen, G., Murray, D. (2012): Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry research international* 2012: 951574.

Muslimović, A., Nyström, S., Gao, Y., Hammarsten, O. (2009): Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PloS one* 4(6): e5859.

Nestal de Moraes, G., Vasconcelos, F. C., Delbue, D., Mognol, G. P., Sternberg, C., Viola, J. P., Maia, R. C. (2013): Doxorubicin induces cell death in breast cancer cells regardless of Survivin and XIAP expression levels. *Eur. J. Cell Biol.* 92(8-9): 247-56

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J. G., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., Hara, E. (2001): Opposing effects of Ets and Id proteins on p16Ink4a expression during cellular senescence. *Nature* 409: 1067–1070.

Ong, S. M., Saeki, K., Tanaka, Y., Nishimura, R., Nakagawa, T. (2016): Effects of etoposide alone and in combination with piroxicam on canine osteosarcoma cell lines. *Vet. J.* 218: 51-59.

Ortega, S., Malumbres, M., Barbacis, M. (2002): cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 73-87.

Park, T. J., Kim, H. S., Byun, K. H., Jang, J. J., Lee, Y. S., Lim, I. K. (2001): Sequential changes in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine plus thioacetamide in Fisher 344 rats: Induction of gankyrin expression in liver fibrosis, pRB degradation in cirrhosis, and methylation of p16INK4a exon 1 in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.* 30: 138–150.

Pai, S. I., Westra, W. H. (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu. Rev. Pathol.* 4: 49–70.

Pei, X. H., Xiong, Y. (2005): Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues, *Oncogene* 24: 2787-2795

Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., Boulanger, C. M. (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64(2): 109–130.

Piegari, E., Cozzolino, A., Ciuffreda, L.P., Cappetta, D., De Angelis, A., Urbanek, K., Rossi, F., Berrion, L. (2020). Cardioprotective effects of miR-34a silencing in a rat model of doxorubicin toxicity. *Sci. Rep.* 10: 12250.

Renu, K., Abilash, V.G., Pirupathi Pichiah, P. B., Arunachalam, S. (2018): Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy. An update. *Eur. J. Pharmacol.* 818: 241–253.

Roussel, M.F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer, *Oncogene* 18: 5311-5317.

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., Howley, P. M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495–505.

Schmid, G., Kramer, M. P., Maurer, M., Wandl, S., Wesierska-Gadek, J. (2007): Cellular and organismal ageing: Role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence. *J. Cell. Biochem.* 101: 1355–1369.

Serra, S., Chetty, R. (2018): p16. *J. Clin. Pathol.* 71(10):853-858

Shafiei-Roudbari, S. K., Malekinejad, H., Janbaz-Aciabar, H., Razi, M. (2017): Crosstalk between E2F1 and P53 transcription factors in doxorubicin-induced DNA damage: evidence for preventive/protective effects of silymarin. *J. Pharm. Pharmacol.* 69(9): 1116-1124.

Shafei, A., El-Bakly, W., Sobhy, A., Wagdy, O., Reda, A., Aboelenin, O., Marzouk, A., El Habak, K., Mostafa, R., Ali, M.A., Ellithy, M. (2017): A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 95: 1209–1218.

Shah, F. D., Begum, R., Vajaria, B. N., Patel, K. R., Patel, J. B., Shukla, S. N., Patel, P. S. (2011): A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian journal of clinical biochemistry.* 26(4): 326–334.

Sharpless, N. E. (2005): INK4a/ARF: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat. Res.* 576: 22–38.

Shats, I., Deng, M., Davidovich, A., Zhang, C., Kwon, J. S., Manandhar, D., Gordân, R., Yao, G., You, L. (2017): Expression level is a key determinant of E2F1-mediated cell fate. *Cell death and differentiation* 24(4): 626–637.

Smith, P. J., Souès, S., Gottlieb, T., Falk, S. J., Watson, J. V., Osborne, R. J., Bleehe, N. M. (1994): Etoposide-induced cell cycle delay and arrest-dependent modulation of DNA topoisomerase II in small-cell lung cancer cells. *Br. J. Cancer* 70(5): 914-21.

Soriani, A., Iannitto, M. L., Ricci, B., Fionda, C., Malgarini, G., Morrone, S., Peruzzi, G., Ricciardi, M. R., Petrucci, M. T., Cippitelli, M., Santoni, A. (2014): Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *J. Immunol.* 193(2): 950-60.

Spallarossa, P., Altieri, P., Barisione, C., Passalacqua, M., Aloï, Concetta., Fugazza, G., Frassoni, F., Podestà, M., Canepa, M., Ghigliotti, G., Brunelli, C., Gaetano, C. (2010): p38 MAPK and JNK Antagonistically Control Senescence and Cytoplasmic p16INK4A Expression in Doxorubicin-Treated Endothelial Progenitor Cells. *PLoS ONE*. 5(12): e15583.

Stein, A. P., Saha, S., Kraninger, J. L., Swick, A. D., Yu, M., Lambert, P. F., Kimple, R. J. (2015): Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer journal*. 21(3): 138–146.

Sun, P., Nallar, S. C., Raha, A., Kalakonda, S., Velalar, C. N., Reddy, S. P., Kalvakolanu, D. V. (2010): GRIM-19 and p16INK4a synergistically regulate cell cycle progression and E2F1-responsive gene expression. *J. Biol. Chem.* 285: 27545–27552.

Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., Franceschi, S. (2002): Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control* 13(10): 957–964.

Tamamori-Adachi, M., Koga, A., Susa, T., Fujii, H., Tsuchiya, M., Okinaga, H., Hisaki, H., Iizuka, M., Kitajima, S., Okazaki, T. (2018): DNA damage response induced by Etoposide promotes steroidogenesis via GADD45A in cultured adrenal cells. *Scientific reports* 8(1): 9636.

Tomaic, V. (2016): Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites. *Cancers* 8: 95.

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., Altman, R. B. (2011): Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genom* 21: 440–446.

Trnski, D., Gregorić, M., Levanat, S., Ozretić, P., Rinčić, N., Vidaković, T. M., Kalafatić, D., Maurac, I., Orešković, S., Sabol, M., Musani, V. (2019): Regulation of Survivin Isoform Expression by GLI Proteins in Ovarian Cancer. *Cells* 8(2): 128.

Umemura, A., Itoh, Y., Itoh, K., Nakajima, T., Higashitsuji, H., Onoue, H., Fukumoto, M., Okanoue, T., Fujita, J. (2008): Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulinlike growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 493–502.

Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., Borzacchiello, G. (2011): Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer*. 10: 140.

White, E. A., Kramer, R. E., Tan, M. J., Hayes, S. D., Harper, J. W., Howley, P. M. (2012): Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *Journal of virology* 86(24): 13174–13186.

Wiedemeyer, R., Brennan, C., Heffernan, T. P., Xiao, Y., Mahoney, J., Protopopov, A., Zheng, H., Bignell, G., Furnari, F., Cavenee, W. K., Hahn, W. C., Ichimura, K., Collins, V. P.,

Chu, G. C., Stratton, M. R., Ligon, K., Futreal, P. A., Chin, L. (2008): Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell* 13: 355–364.

Wu, J., Xue, L., Weng, M., Sun, Y., Zhang, Z., Wang, W., and Tong, T. (2007): Sp1 is essential for p16INK4a expression in human diploid fibroblasts during senescence. *PLoS One* 2: 164.

Xu, C., Yamamoto-Ibusuki, M., Yamamoto, Y., Yamamoto, S., Fujiwara, S., Murakami, K., Okumura, Y., Yamaguchi, L., Fujiki, Y., Iwase, H. (2014): High survivin mRNA expression is a predictor of poor prognosis in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Breast cancer* 21(4): 482–490.

Xue, L., Wu, J., Zheng, W., Wang, P., Li, J., Zhang, Z., Tong, T. (2004): Sp1 is involved in the transcriptional activation of p16INK4 by p21Waf1 in HeLa cells. *FEBS Lett.* 564: 199–204.

Yang, D. G., Liu, L., Zheng, X.Y. (2008): Cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a and telomerase may co-modulate endothelial progenitor cells senescence. *Ageing Res. Rev.* 7: 137–146.

Zheng, W., Wang, H., Xue, L., Zhang, Z., Tong, X. (2004): Regulation of cellular senescence and p16INK4a expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. *J. Biol. Chem.* 279: 31524–31532.

8. ŽIVOTOPIS

Domagoj Šimatović je rođen 20.11.1993. godine u Koprivnici. Osnovnu školu završio je u Križevcima, a srednju školu u Koprivnici, smjer Medicinski tehničar.

2018. godine završio je preddiplomski studij biologije na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Završni rad izradio je pod vodstvom doc. dr. sc. Ivne Štolfe Čamagajevac. Završnim radom "Epigenetski lijekovi" završava studij i stječe titulu prvostupnika biologije. Obrazovanje nastavlja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu na diplomskom studiju ekologija i zaštita prirode. Tijekom školovanja sudjelovao je u brojnim manifestacijama s ciljem popularizacije znanosti kao što su "Tjedan mozga", "Biolog-I-Ja" i "Primatijada".

Diplomski rad izradio je na Institut Ruđer Bošković u Laboratoriju za nasljedni rak pod vodstvom doc. dr. sc. Vesne Musani i suvoditeljem prof. dr. sc. Domagojem Đikićem.