

Utjecaj citarabina na stanični ciklus leukemijskih stanica U937

Matić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:521857>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Matić

**Utjecaj citarabina na stanični ciklus leukemijskih
stanica U937**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Dora Matic

**The effect of cytarabine on the cell cycle of U937
leukemia cells**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dore Višnjić, te komentorstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlić. Istraživanje je financirano sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi, KK.01.1.1.01.0007“, Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Prvo bi htjela zahvaliti profesoricama Ingi Urlič i Dori Višnjić na mentorstvu i svim savjetima prilikom izrade rada.

Posebno hvala profesorici Višnjić kao i Barbari, Tomi i Marijani što se me primili u svoj laboratorij gdje sam se osjećala dobrodošlo od prvog dana. Bez njihove pomoći i strpljena ovaj rad ne bi bio moguć.

Hvala mojim kolegama i kolegicama s fakulteta čija pomoć i društvo su mi olakšali i uljepšali studij.

Naposljetku, želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na podršci i ljubavi koju ste mi pružali tijekom studiranja i nastavljate davati iz dana u dan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj citarabina na stanični ciklus leukemijskih stanica U937

Dora Matić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Citarabin je jedan od standardno korištenih lijekova u liječenju akutne mijeloične leukemije. Uočeno je da citarabin uzrokuje zastoj leukemijskih stanica u različitim fazama staničnog ciklusa. Poznato je da zastoj u fazama S i G₂/M aktivira kinazu Chk1 te da Chk1 inhibira CDK1, ali uloga kinaze CDK1 u učincima citarabina nije opisana. Cilj ovoga rada je ispitati učinke citarabina na stanični ciklus leukemijske linije U937 i kinazu CDK1, a hipoteza je da će citarabin zaustaviti progresiju stanica U937 kroz stanični ciklus i inhibirati kinazu CDK1. Stanice tretirane citarabinom obilježila sam propidij jodidom i odredila postotak stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa koristeći protočnu citometriju. Količinu kinaze CDK1 fosforilirane na tirozinu 15 (Tyr-15) u stanicama koje su tretirane citarabinom tijekom 48 sati odredila sam metodom *Western blot*. Rezultati su pokazali da citarabin smanjuje broj živih stanica u ovisnosti o koncentraciji te da u višim koncentracijama uzrokuje zastoj u fazama S i G₂/M. Zastoj staničnog ciklusa korelira s fosforilacijom kinaze CDK1 na Tyr-15 što upućuje na ulogu CDK1 kao ciljne molekule signalnoga puta ATR/Chk1 u učincima citarabina na leukemijske stanice U937.

Ključne riječi: CDK1, Chk1, AML
(36 stranica, 13 slika, 1 tablica, 41 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Dora Višnjić
Komentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić
 izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
 prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 10. 11. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The effect of cytarabine on the cell cycle of U937 leukemia cells

Dora Matic

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cytarabine is one of the standard drugs used in treating acute myeloid leukemia. It is noted that cytarabine causes cell cycle arrest in leukemia cells in different phases of the cell cycle. Arrest in the S and G₂/M phases activates Chk1 which in turn inhibits CDK1, but the role of CDK1 in the effects of cytarabine has not yet been described. The aim of this paper is to test the effect of cytarabine on the cell cycle of U937 cells and kinase CDK1, while the hypothesis is that cytarabine will halt progression of U937 cells through the cell cycle and inhibit CDK1. I marked the cells treated with cytarabine with propidium iodide and determined the percentage of cells in each phase of the cell cycle using flow cytometry. To determine the level of CDK1 phosphorylated on Tyr-15 in cells treated with cytarabine for 48 hours I used Western blot analysis. The results show that cytarabine lowers the number of living cells in a dose dependent manner and in higher concentrations causes cell cycle arrest in the S and G₂/M phase. Cell cycle arrest correlates with the phosphorylation of CDK1 on Tyr-15 which indicates the role of CDK1 as a key molecule in the ATR-Chk1 signaling pathway in the effects of cytarabine on U937 leukemia cells.

Keywords: CDK1, Chk1, AML

(36 pages, 13 figures, 1 table, 41 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Dora Višnjić

Co-mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Reviewers: Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted: 10. 11. 2022.

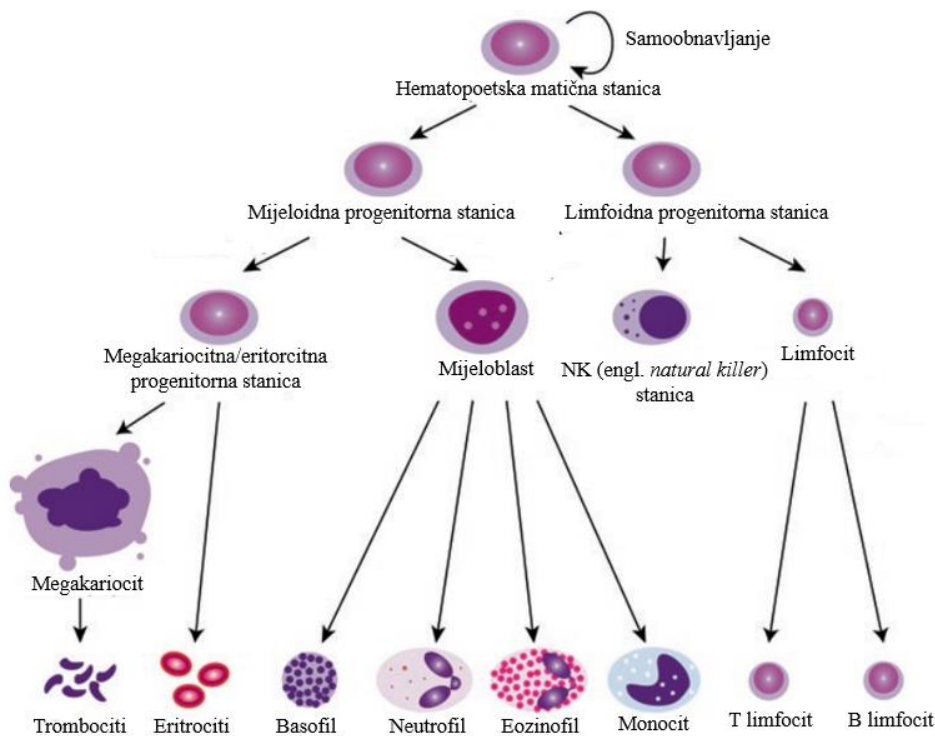
Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hematopoeza.....	1
1.2. Akutna mijeloična leukemija.....	2
1.3. Leukemijska stanična linija U937	4
1.4. Citarabin.....	4
1.5. Stanični ciklus	6
1.6. Odgovor stanice na oštećenje DNA.....	8
1.6.1. Signalni put ATM-p53-Chk2.....	9
1.6.2. Signalni put ATR-Chk1	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Materijali	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Uzgajanje stanica.....	14
3.2.2. Tretman propidijevim jodidom i analiza protočnim citometrom	14
3.2.3. Priprema ukupnih staničnih lizata	15
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	15
3.2.5. Razdvajanje proteina denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS-PAGE)...	16
3.2.6. Mokri prijenos na membranu i detekcija proteina metodom <i>Western blot</i>	17
4. REZULTATI	19
4.1. Citarabin smanjuje broj živih stanica u ovisnosti o koncentraciji	19
4.2. Citarabin zaustavlja prolazak stanica U937 kroz stanični ciklus	19
4.3. Citarabin potiče fosforilaciju kinaze CDK1 na Tyr-15	24
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA	32
8. ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

1.1. Hematopoeza

Kod zdrave odrasle osobe svakodnevno se procesom hematopoeze stvaraju nove krvne stanice kako bi se održala homeostaza tijela. Hematopoeza počinje od pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica (engl. *pluripotent hematopoietic stem cell*, PHSC) koje su sposobne za samoobnovu i diferencijaciju u različite specijalizirane stanice. Prilikom diobe PHSC se asimetrično dijeli na matičnu stanicu i stanicu koja će se diferencirati u mijeloidnu ili limfoidnu progenitorsku stanicu. Progenitorske stanice nemaju mogućnost samoobnavljanja i mogu se samo diferencirati u smjeru mijelopoeze ili limfopoeze. Stanice mijeloidne linije se dalje diferenciraju u bazofile, eozinofile, neutrofile, monocite, eritrocite i megakariocite, dok će se stanice limfoidne linije diferencirati u stanice NK (engl. *natural killer*), limfocite T i limfocite B (Slika 1) (Hoffman, R. 2009).



Slika 1. Shema diferencijacije stanica iz hematopoetske matične stanice u procesu hematopoeze (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i Li 2019).

Sudbina hematopoetskih matičnih stanica, kao i njihovih progenitornih stanica, uvjetovana je djelovanjem transkripcijskih faktora koji se mogu modificirati izvanstaničnim signalima kao što su citokini (Provan i Gribben 2005). Poremećaji u transkripcijskim faktorima, razini citokina i mutacije u genima zaslužnim za diferencijaciju stanica uzrokuju razne hematološke bolesti. Jedna od njih je akutna mijeloična leukemija.

1.2. Akutna mijeloična leukemija

Akutna mijeloična leukemija (AML) maligna je bolest krvotvornog sustava. Bolest karakterizira poremećaj hematopoetskih matičnih stanica te prekid u sazrijevanju i nakupljanje stanica mijeloične linije u koštanoj srži i krvi oboljelog (Newell i Cook 2021). Od stanica mijeloične linije inače sazrijevaju granulociti (neutrofili, eozinofili, bazofili), monociti, eritrociti i megakariociti, no u slučaju AML-a dolazi do nakupljanja nezrelih stanica (blasta) koje potiskuju normalnu hematopoezu. Rezultat je smanjena proizvodnja zrelih krvnih stanica i klinički znakovi bolesti (Hall i Hall 2022). Neki od simptoma su nespecifični umor, gubitak apetita, kratkoća daha prilikom napora zbog anemije, stalne infekcije zbog smanjenog broja zrelih neutrofila u krvi i sklonost dobivanju modrica i krvarenja zbog nedostatka zrelih trombocita u krvi (Khwaja i sur. 2016). AML se dijagnosticira kad je u uzorku krvi ili koštane srži pacijenta prisutno više od 20 % blasta. Također je moguće potvrditi dijagnozu pomoću biljega na površini stanice ili citoplazmatskih biljega koji se detektiraju protočnom citometrijom. Protočna citometrija je korisna i zbog određivanja imunofenotipa bolesti na temelju kojeg se može prilagoditi liječenje. Naime, akutne mijeloične leukemije se po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji mogu klasificirati prema citogenetici, molekularnoj genetici, morfologiji i imunofenotipu (Newell i Cook 2021). Uz navedene klasifikacije, još uvijek je često korištena stara klasifikacija francusko-američko-britanskih autora (FAB). Klasifikacija FAB dijeli AML na podtipove prema stupnju hematopoeze na kojemu je došlo do zastoja u sazrijevanju stanica i na temelju navedenog razlikuje osam podtipova AML-a (Tablica 1) (Lalić 2015).

Tablica 1. Podtipovi AML-a po klasifikaciji FAB (Bennet i sur. 1976 i 1991).

oznaka	naziv	stupanj sazrijevanja stanica
AML-M0	minimalno diferencirana AML	leukemijski blasti bez obilježja mijeloidne loze
AML-M1	mijeloblastična leukemija bez sazrijevanja	slabo diferencirani blasti (mali broj diferencira u granulocite)
AML-M2	mijeloblastična leukemija sa sazrijevanjem	diferencijacija do faze promijelocita
AML-M3	hiperglanularna promijelocitna leukemija	više stanica se diferencira u abnormalne promijelocite
AML-M4	mijelomonocitna leukemija	diferencijacija u monocite i granulocite
AML-M5	monocitna leukemija	diferencijacija u monoblaste ili promonocite i monocite
AML-M6	eritroidna leukemija	više od 30 % stanica koštane srži s jezgrom su eritroblasti
AML-M7	megakariocitna leukemija	stanice se morfološki ne razlikuju od mijeloblasta

AML je rijetka bolest, no predstavlja jednu trećinu svih dijagnosticiranih leukemija (Pelcovits i Niroula 2020). Različite genetske promjene doprinose heterogenosti bolesti zbog kojih se pacijenti međusobno razlikuju po prognozi i odgovoru na liječenje. Drugi čimbenici koji utječu na ishod liječenja su dob pacijenata i intenzitet terapije (Tallam i sur. 2005).

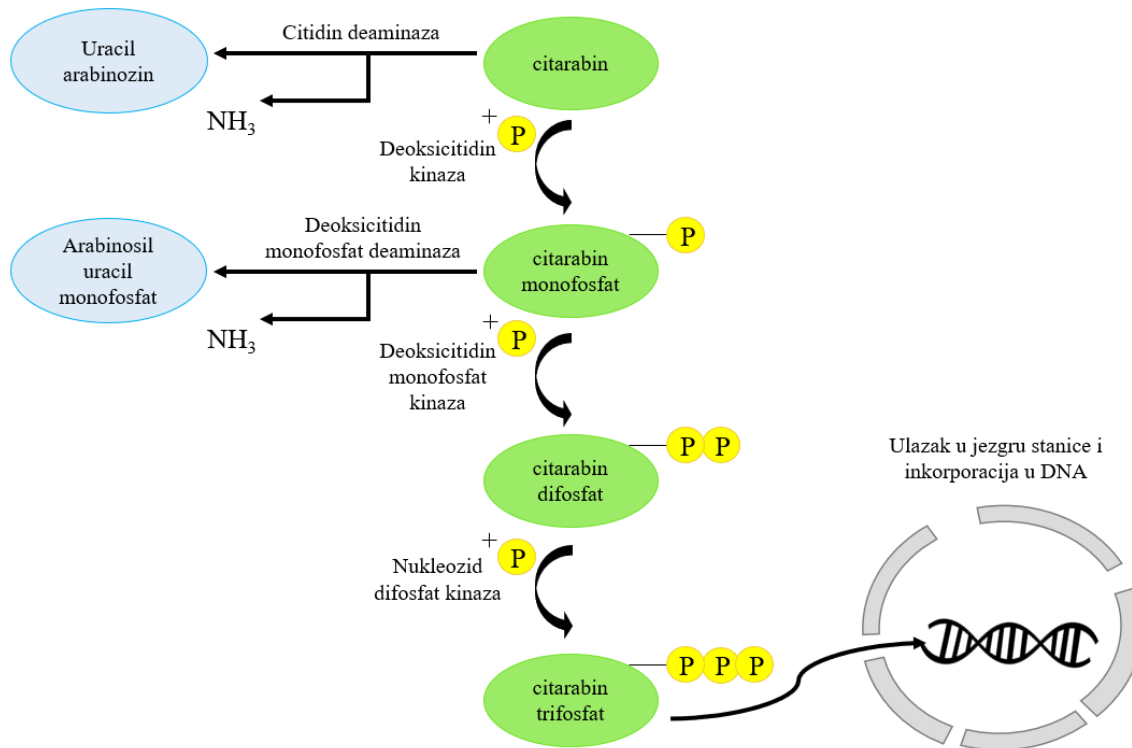
Sredinom dvadesetog stoljeća dolazi do značajnog napretka u liječenju AML koji se dogodio zbog razumijevanja genetskih varijacija bolesti. Usprkos napredcima, standardna terapija za AML se nije mijenjala zadnjih 50 godina. Za pacijente koji mogu podnijeti intenzivnu kemoterapiju koristi se indukcijska terapija poznata kao 7+3. Sastoji se od kontinuirane infuzije citarabina tijekom 7 dana u kombinaciji s antraciklinom prva 3 dana. Navedena terapija zasad pokazuje najveći uspjeh u liječenju blažih oblika AML-a (Pelcovits i Niroula 2020).

1.3. Leukemijska stanična linija U937

Leukemijsku staničnu liniju U937 koristila sam kao model za istraživanje utjecaja citarabina na AML. Riječ je o monocitnoj ljudskoj liniji AML-a izoliranoj iz pleuralnog izljeva bolesnika oboljelog od limfoma. Usprkos njenom limfocitnom podrijetlu, navedena stanična linija pokazuje mnoga obilježja monocita, stoga se svrstava u podtip AML-M5 (monocitna leukemija) i pogodna je kao model za proučavanje AML-a (Chanput i sur. 2015). Jedno obilježje ove stanične linije, kao i drugih leukemijskih staničnih linija, jest inaktivacija *P53*, gena koji se prepisuje u jednog od najvažnijih tumorskih supresora (Sugimoto i sur. 1992).

1.4. Citarabin

Citarabin ili citozin arabinozid (1- β -D-arabinofuranosilcitozin) analog je deoksiribonukleozida deoksicitidina. Kao nukleozidni analog citarabin ulazi u stanicu pomoću transportnih proteina. Nakon ulaska u stanicu treba se aktivirati da bi imao svoj citotoksični učinak. Prvi korak aktivacije je konverzija citarabina u citarabin monofosfat pomoću enzima deoksicitidin-kinaze. Drugi korak je fosforilacija u citarabin difosfat pomoću deoksicitidin monofosfat-kinaze. Naposljetku nukleozid difosfat-kinaza fosforilira citarabin difosfat u citarabin trifosfat. Citarabin trifosfat je analog deoksicitidin trifosfata i inkorporira se u DNA kao lažni prekursor (Slika 2). Prisutnost citarabin trifosfata zaustavlja progresiju DNA polimeraze i ometa sintezu i popravak DNA. Tako dolazi do zastoja u prolasku stanica kroz stanični ciklus u fazi S (Grant 1991). Za razgradnju citarabina ključna su dva enzima: citidin-deaminaza i deoksicitidin monofosfat-deaminaza. Navedeni enzimi razgrađuju citarabin i citarabin monofosfat u inaktivne metabolite uracil arabinozid i arabinoziluracil monofosfat. Ravnoteža između razgradnje i aktivacije citarabina je bitna za određivanje količine citarabina koji se konvertira u citarabin trifosfat. Citarabin trifosfat je aktivni oblik citarabina koji ima citotoksični učinak i antitumorsku aktivnost (Di Francia i sur. 2021).

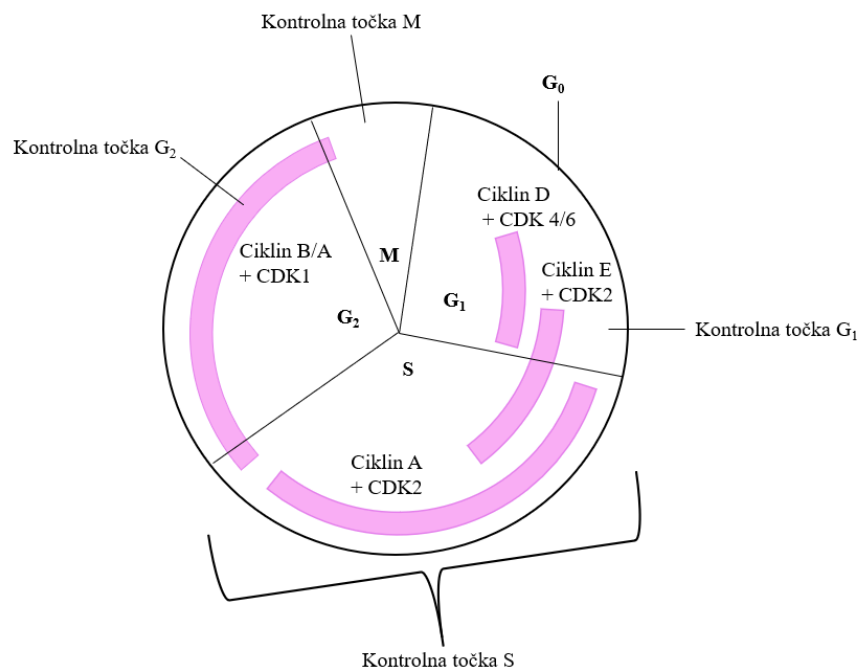


Slika 2. Shema aktivacije citarabina fosforilacijom i njegova razgradnja u stanici (Autor: Dora Matić).

Citarabin se smatra najučinkovitijom antineoplastičnom tvari u liječenju mijeloidne i limfoidne leukemije (Schenk i sur. 2012). Usprkos njegovoj dugogodišnjoj kliničkoj primjeni napredak u liječenju citarabinom stagnira. Otpornost na citarabin javlja se u velikom broju oboljelih od AML-a, dok je kod starijih pacijenata prisutan problem slabog odgovora na terapiju jer ne mogu podnijeti velike doze citarabina (Chen i sur. 2017; Döhner i sur. 2015). Stoga postoji značajni interes za identifikaciju mehanizma djelovanja niskih doza citarabina te određivanje mehanizama koji doprinose rezistenciji na citarabin.

1.5. Stanični ciklus

Za razumijevanje utjecaja citarabina na stanični ciklus potrebno je prvo razumjeti stanični ciklus. Stanični ciklus je osnova života stanice, a unutar njega možemo razlikovati četiri različita procesa: rast stanice, replikaciju DNA, raspodjelu udvostručenih kromosoma te diobu stanice. S obzirom na navedene procese stanični ciklus u eukariota se dijeli na četiri faze: G_1 (prema engl. *gap*), S (sinteza), G_2 i M (mitoza) (Slika 3). Faze G_1 , S i G_2 čine interfazu, dok faza M čini mitozu. G_1 i G_2 su svojevrsne međufaze između faza S i M u kojima se stanica priprema za sljedeću fazu (Ma i sur. 2011). Tijekom faze G_1 stanica raste i skuplja hranjive tvari koje su potrebne za prijelaz u fazu S. U fazi S dolazi do replikacije DNA, stoga u fazama S i G_2 stanica ima udvostručenu količinu DNA koja se mora raspodijeliti u dvije stanice tijekom mitoze. U mitozu dolazi do odvajanja sestrinskih kromatida nastalih u fazi S u dvije različite stanice kćeri koje se zatim odvajaju u zasebne stanice citokinezom (Cooper 2000).



Slika 3. Shema progresije stanice kroz faze staničnog ciklusa s označenim kontrolnim točkama (Autor: Dora Matić).

U normalnim uvjetima većina stanica nije u staničnom ciklusu te se nalaze u stanju mirovanja koje se naziva G_0 . Prelazak stanica iz faze G_0 u stanični ciklus je reguliran mitogenima, a jednom kada

je stanica krenula u proces staničnog ciklusa njezina progresija kroz faze ciklusa ovisi o ciklinima i kinazama koje ovise o ciklinima (engl. *cyclin dependent kinase*, CDK) (Alberts i sur. 2007).

CDK i ciklini su jedni od najvažnijih regulatora staničnog ciklusa. Kao što samo ime sugerira, ciklini se ciklički stvaraju i razgrađuju. CDK i ciklini stvaraju kompleks u kojem ciklini djeluju kao regulacijske jedinice, a CDK kao katalitička jedinica koja fosforilira ciljne proteine potrebne za daljnju progresiju kroz stanični ciklus (Pecorino 2021). Ciklini karakteristični za stanični ciklus ljudskih stanica su ciklin D, E, A, i B. Oni u svom pripadajućem kompleksu ciklin/CDK su prisutni u različitim fazama staničnog ciklusa (Slika 3). Ciklin D se sintetizira prvi i stvara kompleks s CDK4/6 koji potiče progresiju kroz fazu G_1 staničnog ciklusa. Ciklin D također regulira i sintezu ciklina E koji zajedno s CDK2 potiče prijelaz iz faze G_1 u fazu S staničnog ciklusa. Za daljnju progresiju kroz fazu S bitan je ciklin A koji stvara kompleks s CDK1. Kompleks ciklin A/CDK1 također zajedno s kompleksom ciklin B/CDK1 potiče prijelaz iz faze G_2 u fazu M (Patil i sur. 2013). CDK1 ili *cdc2* (engl. *cell division cycle*) prvi je otkrio Paul Nurse u kvasca *Saccharomyces pombe*. Nurse je zamijetio da od previše aktivnosti *cdc2* stanice ulaze u mitozu prerano dok stanice bez *cdc2* ne ulaze u mitozu. Ekvivalent *cdc2* u eukariota otkriven je kasnije te je nazvan CDK1 po svojoj ovisnosti o ciklinima kao i činjenici da je otkriven kao prvi homolog do tad poznatih CDC iz kvasaca (Uzbekov i Prigent 2022). CDK1 stvara kompleks s ciklinom B čija sinteza počinje već u fazi S staničnog ciklusa. Kompleks u početku nije aktivan zbog fosforilacije CDK1 na dva mjesta. Fosforilacija CDK1 je posljedica djelovanja dviju kinaza. Prva kinaza je kinaza koja aktivira CDK (engl. *cdc activating kinase*, CAK) i fosforilira CDK1 na treoninu 161. Druga kinaza je kinaza Wee1 koja fosforilira CDK1 na tirozinu 15 i treoninu 14 i time je inaktivira. Da bi se CDK1 mogla aktivirati i s njom kompleks ciklin B/CDK1 potrebna je CDC25 fosfataza koja defosforilira CDK1. Defosforilirana CDK1 je aktivna u kompleksu s ciklinom B i kao takva može fosforilirati mnoštvo ciljnih proteina koji potiču ulazak stanice u mitozu. Kompleks ciklin B/CDK1 također dodatno aktivira svog aktivatora CDC25, te inhibira svog inhibitora Wee1 tako stvarajući pozitivnu povratnu spregu. Važnost fosfataze CDC25 i kinaze Wee1 pokazana je činjenicom da mutanti u CDC25 imaju produženu fazu G_2 i ne ulaze u diobu dok mutanti s inaktivnim proteinom Wee1 imaju skraćenu fazu G_2 i ulaze u diobu iako stanica za nju nije spremna (Alberts i sur. 2007). U tumorskim stanicama navedeni mehanizmi kontrole staničnog ciklusa su najčešće poremećeni i takve stanice karakterizira prekomjerna proliferacija (Pecorino 2021).

Osim ciklinima, napredovanje kroz stanični ciklus regulirano je kontrolnim točkama u kojima se provjerava zadovoljava li stanica uvjete, kao što su dovoljna količina hranjivih tvari, pravilna replikacija DNA ili pravilna raspodjela kromosoma u stanici. Kontrolne točke nalazimo u sve četiri faze staničnog ciklusa. Prva kontrolna točka se nalazi u fazi G_1 u kojoj stanica provjerava ima li dovoljno hranjivih tvari za prolazak iz faze G_1 u fazu S nakon čega može krenuti u sintezu DNA. Nadzorna točka koja se nalazi na prijelazu između faze G_2 u fazu M provjerava točnost replikacije DNA u fazi S i spremnost stanice da napreduje u fazu M. Prisutnost ove kontrolne točke osigurava da stanica neće ući u mitozu bez da se DNA u potpunosti replicirala, kao i da stanica ne započne još jedan ciklus replikacije DNA (Cooper 2000). U fazi M se nalazi kontrolna točka staničnog ciklusa u kojoj se prije odvajanja stanice u stanice kćeri treba provjeriti pravilno učvršćenje kromosoma za diobeno vreteno i pravilnu raspodjelu kromosoma na stanice kćeri (Slika 3). Naposljetku, postoji i kontrolna točka unutar faze S koja sprječava napredak stanice u fazu G_2 u slučaju nepravilno replicirane DNA ili manjka nukleotida u stanici (Segurado i Tercero 2009). Aktivacija ove kontrolne točke potiče aktivaciju signalnih putova uključenih u popravka DNA i stabilizaciju replikacijske vilice kao i nastavljanje zaustavljene replikacijske vilice (Schnerch i sur. 2012).

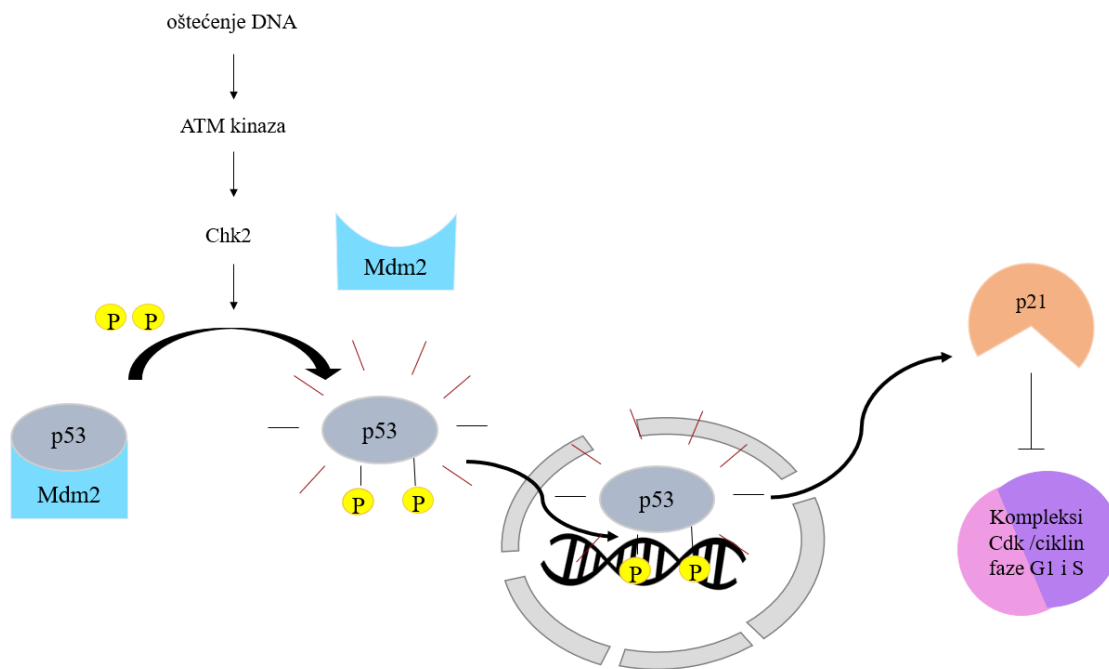
1.6. Odgovor stanice na oštećenje DNA

Mehanizam popravka oštećenja DNA (engl. *DNA damage repair*, DDR) put je prijenosa signala koji povezuje popravak DNA s njezinom replikacijom i progresijom kroz stanični ciklus. U odgovoru na oštećenje DNA, DDR može aktivirati signalne putove koji koče progresiju stanice kroz stanični ciklus te potaknuti specifične mehanizme popravka DNA kako bi uklonile oštećenje. U slučaju nemogućnosti popravka oštećenja, DDR može potaknuti apoptozu nepovratno oštećene stanice (Alhmod i sur. 2020). U tumorskim stanicama DDR je pojačano aktiviran jer pomaže tumorskim stanicama da se nose s velikom količinom genotoksičnog stresa. Dva glavna signalna puta koja se mogu aktivirati uslijed oštećenja DNA su ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*)-p53-Chk2 (engl. *checkpoint kinase 2*) i ATR (engl. *ataxia telangiectasia and Rad3 related*)-Chk1 (engl. *checkpoint kinase 1*) (Manic i sur. 2015).

1.6.1. Signalni put ATM-p53-Chk2

ATM je kinaza aktivirana prilikom nastanka dvostrukih lomova u lancu DNA. ATM kinaza potom aktivira Chk2 koja može fosforilirati p53. Kada nije fosforiliran, p53 se veže za Mdm2 (engl. *mouse double minute 2*) koji potiče ubikvitinaciju p53 i posljedično tome njegovu razgradnju u proteosomu. Fosforilacija p53 blokira vezanje Mdm2 te potiče nakupljanje p53 u stanici. Kada se nakupi u dovoljno visokoj količini u stanici, p53 djeluje kao transkripcijski čimbenik koji potiče transkripciju gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa, popravak DNA, te u nekim slučajevima apoptozu stanice. Jedan od gena čiju ekspresiju potiče je gen koji kodira za protein p21. p21 je protein koji inhibira CDK, a budući da se veže za komplekse ciklin/CDK karakteristične za faze G₁ i S staničnog ciklusa tako zaustavlja progresiju stanice kroz navedene faze (Slika 4) (Alberts i sur. 2007).

S obzirom na to da su mutacije p53 zabilježene u stanicama AML-a pa tako i u staničnoj liniji U937, stanica se ne može oslanjati na ovaj put popravka oštećenja DNA i napreduje kroz fazu G₁ usprkos oštećenju DNA. Posljedično tome, kontrolne točke u fazama S, G₂ i M staničnog ciklusa ostaju kao potencijale kontrolne točke i nude se kao pogodne mete za antitumorske terapije.



Slika 4. Shema signalnog puta ATM-p53-Chk2 (Autor: Dora Matić).

1.6.2. Signalni put ATR-Chk1

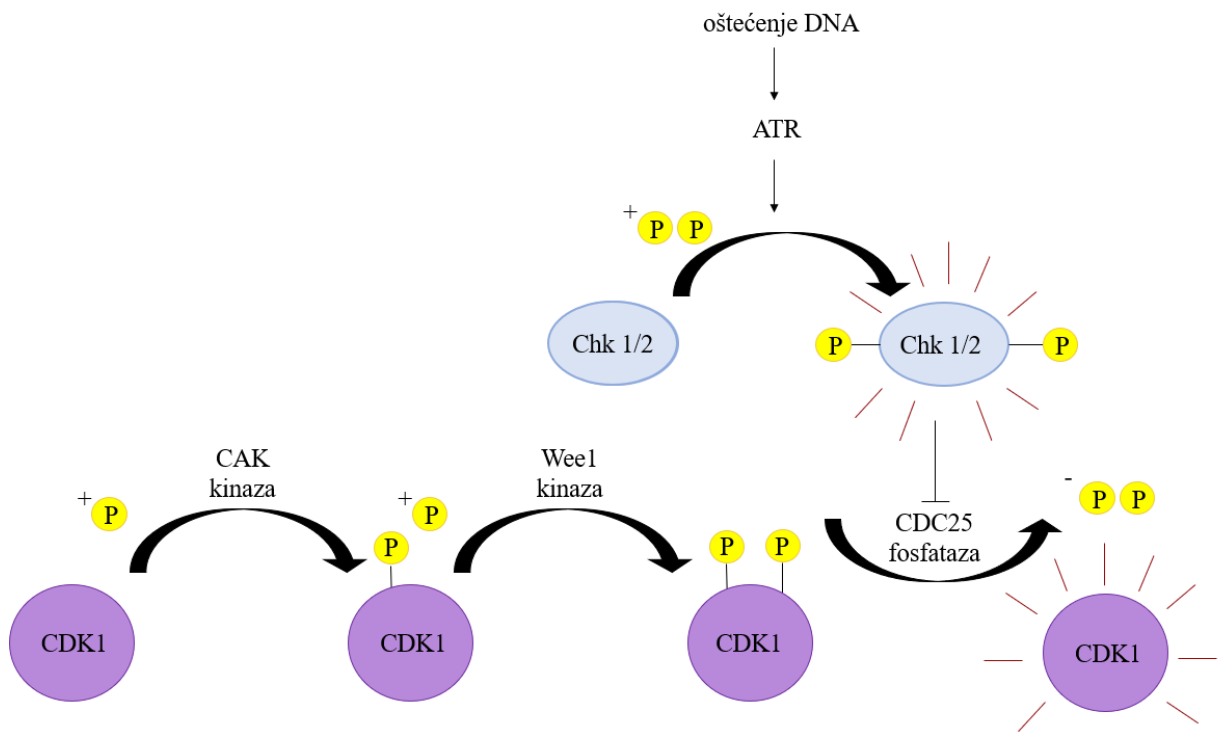
Dok se kod tumora često događaju mutacije signalnog puta ATM-Chk2-p53, mutacije gena ključnih za signalni put ATR-Chk1 su rijetke te nisu primijećene u oboljelih od AML-a (Boudny i Trbusek 2020). Naprotiv, kod stanica AML-a primijećena je povećana ekspresija gena *CHEK1* koji kodira Chk1, kinazu koja sudjeluje u signalnom putu ATR (David i sur. 2016). Navedeno upućuje da je ovaj signalni put ključan za preživljenje tumorskih stanica i kao takav pogodna meta za antitumorske terapije. Manjak ATR uzrokuje prekid u kromosomima i zastoj u staničnom ciklusu, manjak Chk1 smanjuje količinu procesa popravka dvolančanih lomova DNA. Važnost ovih signalnih putova potvrđuje i podatak da njihov nedostatak uzrokuje smrt embrija (Seguardo i Tercero 2009).

ATR se aktivira zbog poremećaja replikacijskih vilica. Poremećaji mogu biti uzrokovani oštećenjem DNA molekule, nastankom baznih adukata ili poprečnih veza te nedostatkom nukleotida (Nam i Cortez 2011). Aktivacija signalnog puta ATR-Chk1 može rezultirati zastojem staničnog ciklusa i usporavanjem replikacije DNA. Navedeni mehanizmi daju vremena da se DNA oporavi i zadrži genomski integritet. Uočeno je i da Chk1 ima izravan utjecaj na mehanizam popravka oštećenja inducirajući posttranslacijske modifikacije čimbenika bitnih u popravku DNA (Patil i sur. 2013).

Sukladno raznim djelovanjima signalnog puta ATR-Chk1 postoji više strategija za antitumorske terapije koje ga ciljaju. Određene terapije se temelje na direktnoj inhibiciji enzima koji sudjeluju u signalnom putu ATR-Chk1. Pri inhibiciji kinaza ATR ili Chk1, stanica nastavlja prolaziti kroz stanični ciklus usprkos oštećenju DNA, oštećenja se nakupljaju do razine koju stanica više ne može podnijeti te stanica umire (David i sur. 2017). Druga strategija se temelji na pojačavanju replikacijskog stresa dodavanjem citotoksičnog agensa kao što je citarabin. Pokazano je da u određenim dozama citarabin pojačava aktivaciju signalnog puta ATR i potiče stanice na diferencijaciju kao i apoptozu (Chen i sur. 2017).

Citarabin djeluje ugrađujući se u DNA umjesto deoksicitidina što uzrokuje zastoj u djelovanju DNA polimeraze, ali ne utječe i na DNA helikazu koja nastavlja odmotavati DNA i stvara regije jednolančane DNA (Schenk i sur. 2012). Dolazi do nakupljanja jednolančane DNA na koju se veže replikacijski protein A i zajedno s nosivom novosintetiziranom DNA služi kao signal za aktivaciju kinaze

ATR (Zeman i Cimprich 2014). ATR je ključna za progresiju kroz kontrolnu točku u fazi G₂ staničnog ciklusa. ATR djeluje na stanični ciklus fosforilacijom Chk1. Fosforilirana Chk1 zatim inhibira fosfatazu CDC25 tako što je fosforilira i šalje na degradaciju (Boudny i Trbusek 2020). Kada je aktivna, fosfataza CDC25 defosforilira kinazu CDK1 i time je aktivira, stoga inhibicija CDC25 uzrokuje inhibiciju CDK1. Sve dok je CDK1 fosforilirana ne može doći do stvaranja kompleksa ciklin B/A i CDK1 i stanica ne može napredovati kroz fazu G₂ staničnog ciklusa (Slika 5) (Goto i sur. 2019). Kod stanica AML-a tretiranih citarabinom opisano je da dolazi do fosforilacije kinaze Chk1, no nije opisano dolazi li do fosforilacije kinaze CDK1 (Schenk i sur. 2012).



Slika 5. Shema aktivacije CDK1 i signalnog puta ATR-Chk1 (Autor: Dora Matić).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je ispitati korelira li zastoj staničnog ciklusa pod utjecajem citarabina s inhibicijom kinaze CDK1. S obzirom na to da je poznato da citarabin aktivira Chk1, hipoteza je da će citarabin zaustaviti progresiju stanica U937 kroz stanični ciklus te fosforilirati kinazu CDK1 na tirozinu 15 (Tyr-15) i time je inhibirati. Specifični cilj će mi biti uzgojiti stanice leukemijske stanične linije U937 i inkubirati ih s citarabinom u periodu od 48 i 72 sata. Obilježavanjem tripanskim modrilom i brojanjem stanica hemocitometrom odredit ću broj preživjelih stanica i usporediti ih s kontrolom. Da bih provjerila utjecaj citarabina na stanični ciklus, stanice tretirane u periodu od 72 sata analizirat ću protočnom citometrijom i usporediti udio stanica u određenim fazama staničnog ciklusa s netretiranom kontrolom. Za detaljniju analizu utjecaja citarabina na stanični ciklus provjerit ću razinu fosforilacije kinaze CDK1 (Tyr-15) metodom *Western blot*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Kemikalije: medij RPMI-1640 uz dodatak 10 % fetusnog telećeg seruma inaktiviranog toplotom, L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml) i streptomicina (50 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific-Gibco, Waltham, MA, SAD), fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), tripansko modriilo, otopina propidij-jodida (50 µg/ml propidij-jodida, 10 mM Tris (pH 8,0), 10 mM NaCl, 10 µg/ml RNaza A, 0,1 %-Igepal), pufer za lizu stanica (engl. *cell lysis buffer*, CLB; 20 mM Tris-HCL (pH 7,5), 1 mM natrijeva etilen diamin tetraoctena kiselina (EDTA), 1 mM etilen glikol tetraoctena kiselina (EGTA), 150 mM NaCl 1 % Triton X-100, 2,5 mM natrijev pirofosfat, 1 mM natrijev ortovanadat (Na₃VO₄), 1 mM beta-glicerol fosfat, 1 µg/ml leupeptin, 1 µM mikrocin i 1 mM PMSF), goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), Bradford reagens (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD), komercijalni komplet TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD), otopina SDS-a (0,5 M Tris, 0,4 % SDS-a, 20 % SDS, 0,15 mM bromfenolplava, 2 % beta-merkaptioetanol, 40% glicerol), pufer za elektroforezu (engl. *running buffer*) koji sadrži SDS (25 mM Tris, 192 mM glicin, 1% SDS-a), biljeg (engl. *color marker*) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD), pufer za elektroforezu bez SDS-a (25 mM Tris, 192 mM glicin), TBS-Tween (25 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20), kuniće poliklonsko protutijelo CDC2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), kuniće poliklonsko protutijelo pCDC2 (Tyr-15) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), β-aktin mišje monoklonsko protutijelo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), protumišje IgG HRP-konjugirano protutijelo (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), protukuniće IgG HRP-konjugirano protutijelo protutijelo (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, SAD), komercijalni komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD)

Uređaji: protočni citometar Attune sistem (Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD), spektrofotometar Eppendorf BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), uređaj za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD), ChemiDoc™ XRS+ system (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Uzgajanje stanica

Za provedbu pokusa koristila sam leukemijsku staničnu liniju U937 (European Collection of Animal Cell Cultures, PHLS, Porton, Salisbury, UK). Staničnom kulturom prilikom uzgoja rukovala sam u zaštitnom kabinetu za rad u sterilnim uvjetima. Stanice sam uzgajala u suspenziji u mediju RPMI-1640 uz dodatak 10% fetusnog telećeg seruma inaktiviranog toplinom (engl. *fetal bovine serum*, FBS), L-glutamina (2 mM), penicilina (50 U/ml) i streptomicina (50 µg/ml) na temperaturi od 37 °C uz 5 % CO₂. Svaka dva do tri dana stanice su prikupljene, centrifugirane i raspršene u svježem mediju u gustoći od 0,3 do 0,5 x 10⁶ st/ml. U pokusima su korištene stanice koje su prethodni dan nasađene u mediju u gustoći od 0,5 x 10⁶ st/ml. Stanice sam centrifugirala i resuspendirala u svježem mediju uz dodatak FBS-a, L-glutamina, penicilina i streptomicina te odredila broj živih stanica pomoću tripanskog modrila i hemocitometra. Stanice koje sam uzgajala za analizu staničnog ciklusa zasadila sam u gustoći od 0,2 x 10⁶ st/ml, dok sam stanice namijenjene za dobivanje ukupnih staničnih lizata zasadila u gustoći od 0,3 x 10⁶ st/ml. Stanice sam zatim tretirala različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM, 1000 nM). Stanice namijenjene za analizu staničnog ciklusa inkubirala sam 72 sata, a stanice namijenjene za dobivanje ukupnih staničnih lizata inkubirala sam 48 sati.

3.2.2. Tretman propidijevim jodidom i analiza protočnim citometrom

Kontrolne stanice i stanice inkubirane 72 sata s citarabinom isprala sam PBS-om, te sam odredila broj živih stanica koristeći tripansko modriilo i hemocitometar. Uzela sam volumen stanične suspenzije tako da ukupni broj živih stanica u svim uzorcima bude 150 000 te sam uzorke potom

centrifugirala 3 min na 1970 okreta po minuti pri 4 °C. Nakon centrifugiranja dekantirala sam supernatant i dodala 1 ml PBS-a. Uzorke sam vorteksirala te centrifugirala 3 minute na 1970 rpm pri 4 °C. Nakon centrifugiranja odlila sam supernatant i dodala 250 µl otopine propidij-jodida. Uzorke sam vorteksirala i prekrila aluminijskom folijom kako bi bili zaštićeni od svjetlosti tijekom inkubacije. Nakon 20 minuta inkubacije u mraku na 4 °C analizirala sam stanični ciklus koristeći protočni citometar Attune sistem. Analizu sam napravila pomoću programa FlowJo platform (TreeStar, Ashland, OR, SAD).

3.2.3. Priprema ukupnih staničnih lizata

Nakon 48 sati inkubacije stanica s različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM, 1000 nM) pripremila sam ukupne stanične lizate. Za pripremu ukupnih staničnih lizata, suspenziju stanica sam prelila iz bočica za uzgoj stanica u plastične epruvete volumena 50 ml te centrifugirala 3 minute na 1970 rpm pri 4 °C. Potom sam ih jednom isprala u PBS-u i raspršila u puferu za lizu stanica i inkubirala tijekom 10 minuta na ledu. Potom sam stanice homogenizirala protiskivanjem kroz iglu promjera 23 G sedam puta i ponovno inkubirala na ledu 10 minuta. Tako dobiven homogenat sam centrifugirala na 14000 x g tijekom 10 minuta na temperaturi od 4 °C. Dobiveni nadtalog je ukupni stanični lizat u kojem sam zatim odredila koncentraciju proteina.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentraciju proteina u staničnim lizatima izmjerila sam spektrometrijski metodom po Bradfordu. Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije otopine po Bradfordu čiji je glavni sastojak Coomassie Brilliant Blue, boja koja se veže za proteine iz ekstrakta. Mjereći apsorbanciju uzorka može se odrediti koncentracija proteina pomoću baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija otopina poznatih koncentracija tzv. standarda. Kao standard koristila sam otopine BSA koncentracije u rasponu od 0,1 do 1 mg/ml. Da bih odredila koncentraciju proteina u ukupnim staničnim lizatima, na 2 µl uzorka i 48 µl vode dodala sam 1,5 ml Bradford reagensa. Nakon 3 min inkubacije potrebne da se boja razvije i stabilizira, uzorke sam prenijela u plastične kivete te intenzitet obojenja izmjerila pomoću spektrofotometra Eppendorf BioPhotometer plus pri valnoj

duljini od 595 nm. Nepoznate koncentracije proteina u našim uzorcima izračunala sam prema baždarnoj krivulji ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji BSA.

3.2.5. Razdvajanje proteina denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (SDS-PAGE)

Koristila sam gelove za denaturirajuću poliakrilamidnu gel-elektroforezu (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis*, SDS-PAGE) dobivene pomoću komercijalnog kompleta TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions. Prilikom izlijevanja gelova prvo sam otpipetirala gel za razdvajanje i neposredno poslije njega gel za sabijanje i ostavila ih 45 minuta da se polimeriziraju. Za vrijeme polimerizacije gelova pripremila sam uzorke. U skladu s vrijednostima koncentracije proteina dobivenih metodom po Bradfordu uzorke sam otpipetirala u epruvete tako da koncentracija proteina u svim uzorcima bude otprilike jednaka, a ukupni volumen uzorka i CLB bude 25 μ L. Potom sam dodala još 25 μ L otopine SDS-a. Epruvete s uzorcima sam stavila na plutajući stalak u čaši s vodom koja ključa da se kuhaju 4 minute. Nakon kuhanja slijedilo je kratko centrifugiranje na 14000 x g nakon čega su uzorci bili spremni za nanijeti na gel. Polimerizirane gelove sam stavila u kazetu za gelove u kadicu u kojoj će se provoditi elektroforeza. U sredinu kazete za gelove, između dva gela, ulila sam pufer za elektroforezu koji sadrži SDS. Uzorke sam nanijela u jažice gela u volumenu od 23 μ l dok sam u prvu, srednju i zadnju jažicu nanijela biljeg u boji PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 –250 kDa u volumenu od 5 μ L. Nakon nanošenja uzoraka na gel, u kadicu za elektroforezu sam dodala pufer za elektroforezu koji sadrži SDS i zatvorila sustav. Uređaj za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System sam uključila na 90 V oko 20 minuta dok proteini nisu počeli prelaziti iz gela za sabijanje u gel za razdvajanje. Zatim sam voltažu povećala na 115 V. Elektroforezu sam nastavila sve dok uzorci nisu došli oko 0,5 cm od donjeg ruba gela. Nakon elektroforeze odvojila sam gelove od stakla i stavila ih u pufer za elektroforezu bez SDS-a. Kako bih vizualizirala proteine, aktivirala sam gelove koristeći sustav ChemiDoc™ XRS+ system. Naime, gelovi dobiveni komercijalnim kompletom TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions sadrže trihalo komponentu koja se kovalentno veže za triptofan proteina u gelu. Izlagajući spoj trihalne komponente i triptofana UV svijetlu stvara se uočljivi signal kojim se može detektirati prisutnost proteina u gelu.

3.2.6. Mokri prijenos na membranu i detekcija proteina metodom *Western blot*

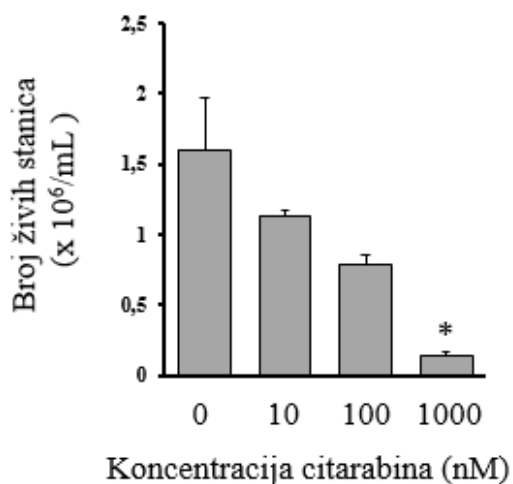
Za mokri prijenos elektroforetskih proteina na nitroceluloznu membranu koristila sam spužvice, nitrocelulozne membrane i papire prethodno namočene u pufer za elektroforezu bez SDS-a. Pri slaganju kazete za prijenos na crni dio kazete složila sam spužvicu i papir pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka među slojevima. To sam činila tako što sam pritiskala kazetu plastičnom epruvetom dok mjehurići nisu nestali. Zatim sam kazeti pridružila gel na kojeg sam naslagala membranu, papir i spužvicu opet pazeći da istisnem mjehuriće zraka među slojevima. Pripremljenu kazetu sam stavila u kadicu za prijenos u koju sam ulila pufer za elektroforezu bez SDS-a. Prijenos proteina se odvijao pri 60 V 55 minuta. Po završetku prijenosa proteina izvadila sam membrane i blokirala ih kako bih spriječila nespecifično vezanje za membranu. Membrane sam inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi u 5 %-tnom mlijeku bez mliječne masti otopljenom u TBS-Tween-u. Nakon blokiranja oprala sam membrane 3 puta po 5 minuta u TBS-Tween-u. Slijedila je inkubacija membrana u primarnom protutijelu. Za detekciju CDK1 koristila sam protutijelo za CDK1 dobiveno iz miša, a za detekciju CDK1 fosforiliranog na Tyr-15, protutijelo dobiveno iz kunića. Primarno protutijelo sam priredila u 5 %-tnom BSA otopljenom u TBS-Tween-u. Protutijelo sam razrijedila u omjeru 1:1000. Membrane sam stavila u plastične vrećice u kojima sam dodala 10 ml priređenog primarnog protutijela. Zatim sam vakumirala vrećice i ostavila ih na inkubaciju preko noću na miješalici na 4 °C. Sljedećeg jutra membrane sam uklonila iz primarnog protutijela i isprala 3 puta po 5 minuta u 20 ml TBS-Tween-a. Nakon ispiranja membranama sam dodala sekundarno protutijelo. Za detekciju pCDK1 (Tyr-15) koristila sam protukuniće, a za detekciju CDK1 koristila sam protumišje sekundarno protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena. Oba protutijela napravila sam u omjeru 1:2000. Kao i kod dodavanja primarnog protutijela, membrane sam stavila u vrećice u koje je sam dodala sekundarno protutijelo, te ih vakumirala. Nakon 2 sata inkubacije u sekundarnom protutijelu membrane sam isprala 3 puta po 5 minuta u 20 ml TBS-Tween-a nakon čega sam ih prebacila u 20 ml destilirane vode prije vizualizacije. Za vizualizaciju sam koristila komercijalni komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate. Na membrane sam nanijela 750 µl prethodno pripremljenog kemiluminiscencijskog reagensa i signal je detektiran sustavom ChemiDoc™ XRS+ system. Nakon vizualizacije, membrane sam spremila u TBS-u na 4 °C. Kao kontrolu nanošenja (engl. *loading control*) koristila sam β-aktin. Membrane sam inkubirala u

odgovarajućem primarnom i sekundarnom protutijelu za β -aktin po već prije navedenom protokolu. Protutijela koja sam koristila su primarno protutijelo za aktin dobiveno iz miša otopljeno u BSA-Tween-u u omjeru 1:20000 i sekundarno protumišje protutijelo otopljeno u 5 %-tnom mlijeku u omjeru 1:2500.

4. REZULTATI

4.1. Citarabin smanjuje broj živih stanica u ovisnosti o koncentraciji

Učinke različitih koncentracija citarabina na broj živih stanica ispitala sam na stanicama U937 koje sam zasadila u koncentraciji $0,2 \times 10^6/\text{mL}$ i tretirala različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM i 1000 nM) tijekom 72 sata. Nakon inkubacije, broj živih stanica odredila sam pomoću tripanskog modrila i hemocitometra (Slika 6). Može se uočiti da kontrola ima najviše preživjelih stanica, dok broj živih stanica opada s povećanjem koncentracije citarabina.

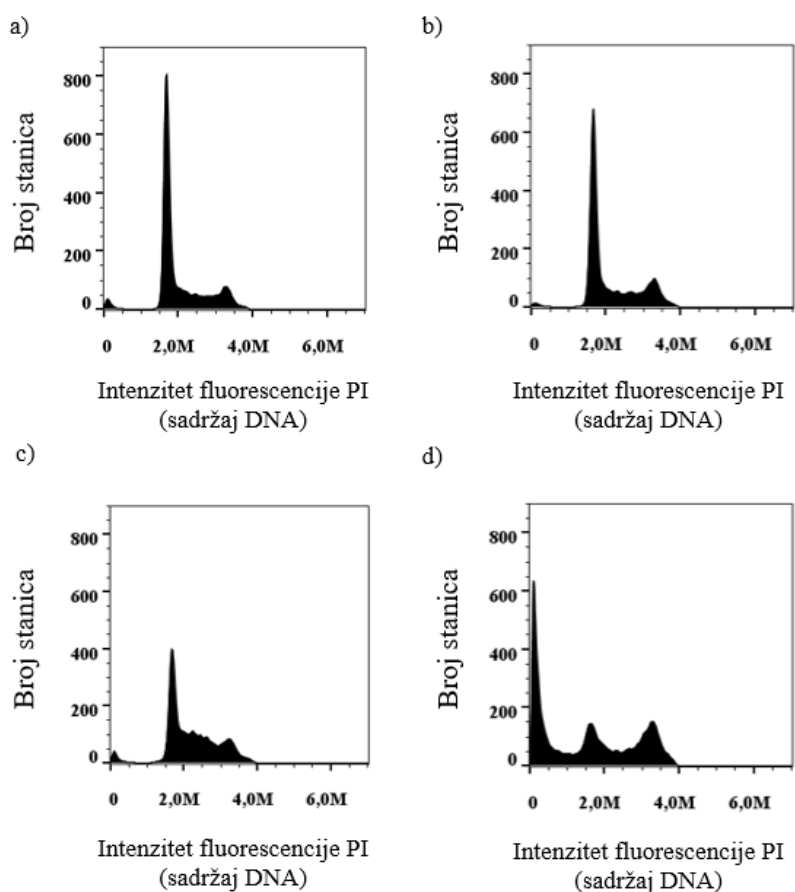


Slika 6. Utjecaj citarabina nakon 72 sata na broj živih stanica ovisno o koncentraciji citarabina kojom su stanice tretirane. Broj živih stanica određen je pomoću hemocitometra i tripanskog modrila. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (Studentov t-test).

4.2. Citarabin zaustavlja prolazak stanica U937 kroz stanični ciklus

Koristeći protočnu citometriju mogla sam istražiti utjecaj citarabina na stanični ciklus stanica U937. Stanice su obilježene otopinom propidij jodida koji se veže za DNA i fluorescira nakon pobuđivanja laserskom svjetlošću. Na temelju intenziteta fluorescencije vezanog propidij jodida može se zaključiti u kojoj se fazi staničnog ciklusa stanica nalazi. Naime, stanice u fazi G_1 su

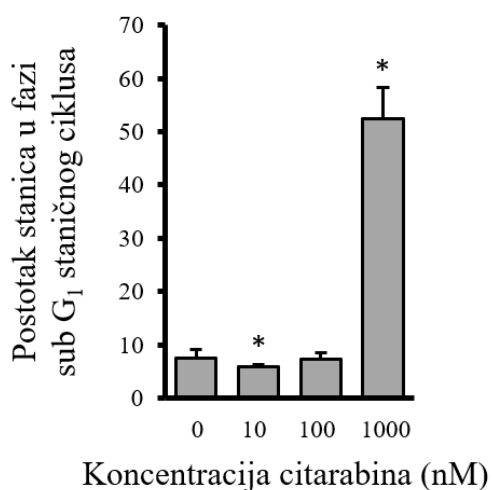
diploidne ($2n$), dok se tijekom replikacije sadržaj DNA postupno udvostručuje pa stanice u fazi S sadrže DNA od $2n$ do $4n$. Na temelju sadržaja DNA nemoguće je razlikovati faze G_2 i M jer sadržaj DNA u obje faze iznosi $4n$. Ostatci mrtvih stanica mogu se zamijetiti protočnom citometrijom kao čestice (engl. *event*) čiji sadržaj DNA iznosi manje od $2n$ pa se takvi zajedno označavaju kao sub G_1 . Koristeći protočni citometar moguće je detektirati razliku u intenzitetu fluorescencije te potom analizirati faze staničnog ciklusa u kojoj su stanice zaustavljene koristeći program FlowJo platform. Na slici 7 prikazan je primjerni histogram dobiven kao rezultat protočne citometrije stanica U937 nakon tretmana različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM, 1000 nM) tijekom 72 sata. Na apscisi je količina DNA tj. intenzitet fluorescencije, a na ordinati broj događaja tj. broj stanica.



Slika 7. Histogrami analize staničnog ciklusa: a) netretirane stanice, b) tretirane citarabinom u koncentraciji 10 nM, c) tretirane citarabinom u koncentraciji 100 nM, d) citarabinom u koncentraciji 1000 nM.

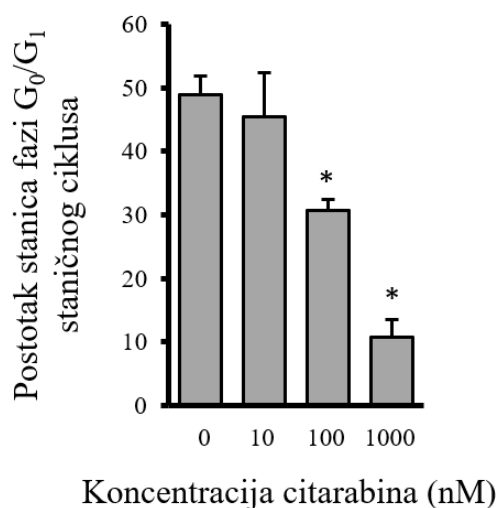
Kada gledamo kontrolu (Slika 7 a) možemo vidjeti normalni stanični ciklus u kojem se većina stanica nalazi u fazi G₁ ciklusa, najmanji postotak stanica fazi u G₂/M, a ostatak u fazi S. Sličan trend prate stanice tretirane citarabinom u koncentraciji od 10 nM (Slika 7 b). U stanicama koje su tretirane sa 100 nM citarabinom (Slika 7 c), uočava se manji vršak histograma koji odgovara stanicama u fazi G₁ uz povećanje udjela stanica u fazi S staničnog ciklusa. Najveću razliku možemo vidjeti kod stanica tretiranih s 1000 nM citarabinom (Slika 7 d). Kod ovog tretmana većina stanica nalazi se u fazi sub G₁, a broj stanica koje prolaze stanični ciklus je jako nizak.

Da bih mogla pobliže odrediti utjecaj citarabina na udio stanica u određenoj fazi staničnog ciklusa, usporedila sam udio stanica u određenoj fazi ciklusa kod svakog tretmana (Slike 8-11).



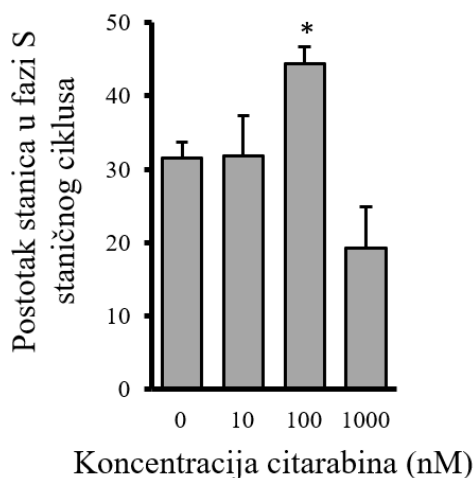
Slika 8. Učinak citarabina u različitim koncentracijama na udio stanica u fazi sub G₁ staničnog ciklusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (Studentov t-test).

Na slici 8 može se vidjeti da citarabin u koncentraciji od 1000 nM statistički značajno povećava udio stanica u fazi sub G₁ staničnog ciklusa. Pritom netretirane stanice i stanice tretirane manjim koncentracijama citarabina (10 nM i 100 nM) imaju sličan postotak umrlih stanica koji se kreće ispod 10 %.



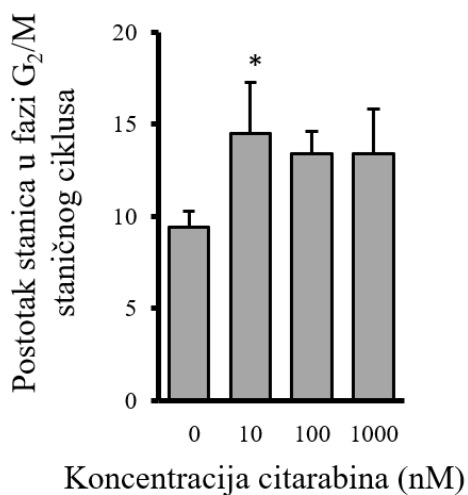
Slika 9. Učinak citarabina u različitim koncentracijama na udio stanica u fazi G₀/G₁ staničnog ciklusa. * p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Studentov t-test).

Na slici 9 može se uočiti smanjenje udjela stanica u fazi G₀/G₁ staničnog ciklusa u ovisnosti o povećanju koncentracije citarabina kojom su stanice tretirane. Netretirane stanice imaju najveći udio stanica u ovoj fazi staničnog ciklusa te se oko polovine stanica nalazi u fazi u kojoj se stanice pripremaju za replikaciju. Prate ih stanice tretirane 10 nM citarabinom koje imaju sličan udio stanica u fazi G₀/G₁. U stanicama koje su tretirane citarabinom u koncentraciji od 100 nM zamjećuje se statistički značajno smanjenje udjela u fazi G₀/G₁. Naposljetku, stanice tretirane najvišom koncentracijom citarabina (1000 nM) imaju najmanji udio stanica u fazi G₀/G₁ staničnog ciklusa, samo 10 %.



Slika 10. Učinak citarabina u različitim koncentracijama na udio stanica u fazi S staničnog ciklusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (Studentov t-test).

Analiza udjela stanica u fazi S staničnog ciklusa pokazala je da je citarabin u koncentraciji od 100 nM statistički značajno povećao udio stanica u fazi S staničnog ciklusa (Slika 10). Udio stanica u fazi S koje su tretirane citarabinom u koncentraciji od 10 nM nije se razlikovao od udjela kontrolnih stanica u istoj fazi. Tretman stanica citarabinom u koncentraciji od 1000 nM rezultira najmanjim postotkom stanica u fazi S.

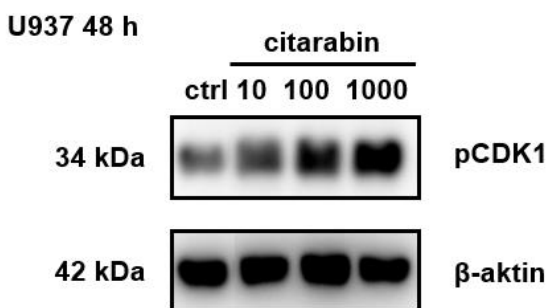


Slika 11. Učinak citarabina u različitim koncentracijama na udio stanica u fazi G₂/M staničnog ciklusa. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu (Studentov t-test).

Na slici 11 može se uočiti povećanje udjela stanica u fazi G₂/M nakon tretmana citarabinom. U stanicama koje su tretirane najmanjom koncentracijom citarabina (10 nM) zamjećuje se statistički značajno povećanje udjela stanica u fazi G₂/M u odnosu na kontrolne stanice (Slika 11).

4.3. Citarabin potiče fosforilaciju kinaze CDK1 na Tyr-15

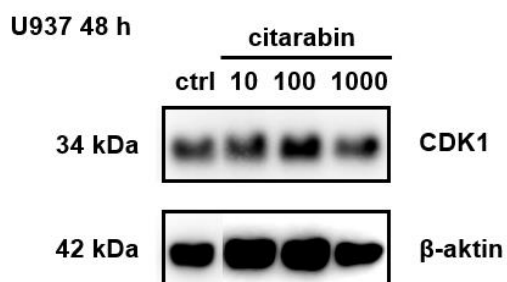
Koristeći metodu *Western blot* mogla sam odrediti je li zastoj staničnog ciklusa pod utjecajem citarabina praćen inhibicijom CDK1 (*cdc2*). To sam učinila tako što sam odredila razinu kinaze CDK1 fosforilirane na Tyr-15 (*pcdc2*) u ukupnim proteinima stanica tretiranih citarabinom tijekom 48 sati. Detekcija CDK1 fosforiliranog na Tyr-15 pokazala je njegovu povećanu količinu u stanicama tretiranim citarabinom u usporedbi s kontrolom. Pritom je moguće primijetiti porast u njegovoj ekspresiji u ovisnosti o koncentraciji citarabina kojom su stanice tretirane (Slika 12). β -aktin kao kontrola nanošenja pokazao je da je u sve jažice nanescena otprilike jednaka količina uzorka.



Slika 12. Količina fosforiliranog CDK1 proteina (Tyr-15) iz ukupnih staničnih lizata izolirani h nakon 48 sati inkubacije različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM, 1000 nM). Slika jažice koja pripada kontroli (ctrl, β -aktin) izrezana je pomoću programa Microsoft PowerPoint i dodana na sliku jažica s uzorcima tretiranim citarabinom. Kontrola i uzorci analizirani su na istom PAGE gelu, ali nisu bili u susjednim jažicama.

Dodatno sam provjerila učinke različitih koncentracija citarabina na ukupnu količinu CDK1. Prilikom detekcije CDK1 od 34 kDa u stanicama koje su tretirane citarabinom u koncentraciji od

100 nM može se primijetiti blago povećana ekspresija ukupnog CDK1 u usporedbi s njegovom ekspresijom u stanica tretiranih s citarabinom u koncentraciji od 10 nM i 1000 nM (Slika 13). Kao kontrolu nanošenja koristila sam β -aktin koji je jednako eksprimiran u stanicama. Kontrola nanošenja pokazuje da prva jažica (kontrola) i zadnja jažica (tretman 1000 nM citarabinom) imaju manju količinu β -aktina nego ostale jažice.



Slika 13. Količina proteina CDK1 iz ukupnih staničnih lizata izoliranih nakon 48 sati inkubacije različitim koncentracijama citarabina (10 nM, 100 nM, 1000 nM). Slika jažice koja pripada kontroli (ctrl, β -aktin) izrezana je pomoću programa Microsoft PowerPoint i dodana na sliku jažica s uzorcima tretiranim citarabinom. Kontrola i uzorci analizirani su na istom PAGE gelu, ali nisu bili u susjednim jažicama.

5. RASPRAVA

Citarabin je poznati lijek koji se već godinama koristi u kombinaciji s antraciklinima kao indukcijska terapija za liječenje AML-a (Pelcovits i Niroula 2020). Ugradnjom u DNA remeti replikaciju DNA i uzrokuje replikacijski stres koji aktivira odgovor na oštećenje DNA. Nakon odgovora, stanica može ili popraviti oštećenje ili krenuti u apoptozu (Zeman i Cimprich 2014). Put koji će stanica odabrati ovisi o stupnju oštećenja DNA kojem je stanica izložena. Što je veća koncentracija citarabina, točnije veća razina oštećenja DNA, to je vjerojatnije da će stanica krenuti u apoptozu, što je i potvrđeno rezultatima. Moguće je uočiti trend u broju umrlih stanica u ovisnosti o povećanju koncentracije citarabina, pritom je najveći broj umrlih stanica detektiran nakon tretmana citarabinom u koncentraciji od 1000 nM. Uočeni trend je u skladu s prijašnjim saznanjima o djelovanju citarabina na leukemijske stanice (Grant 1997), kao i na samu staničnu liniju U937 (Cheong i sur. 2016; Chen i sur. 2017).

Posljedično poremećaju u replikaciji DNA, stanice se zaustavljaju u fazi S kao i u fazi G₂/M staničnog ciklusa. Kao što citarabin utječe na preživljenje stanice, tako utječe i na stanični ciklus ovisno o koncentraciji citarabina kojim je stanica tretirana. Stanice tretirane manjom koncentracijom citarabina (10 nM) ne pokazuju poremećaj u staničnom ciklusu te imaju sličnu progresiju kroz stanični ciklus kao i netretirane stanice, no iznenađujuće je da se najveća razlika u udjelu stanica između kontrole i stanica tretiranim niskom dozom citarabina zamjećuje u fazi G₂/M ciklusa. Navedeno je vjerojatno posljedica niske razine oštećenja DNA nastalog djelovanjem citarabina, stoga stanice imaju priliku popraviti oštećenje i proći kroz S kontrolnu točku staničnog ciklusa. Dio stanica nastavlja replikaciju DNA i kao posljedica toga prolazi kroz fazu S u fazu G₂. Primijećeni zastoj staničnog ciklusa u fazi G₂ se može pripisati aktivaciji signalnog puta ATR koji zaustavlja daljnju progresiju stanica kroz stanični ciklus. Poznato je da se signalni put ATR aktivira jednolančanim lomovima DNA uslijed oštećenja (Zeman i Cimprich 2014). Navedeno oštećenje se može povezati s djelovanjem citarabina koji svojim ugradnjom u DNA blokira replikaciju DNA dok je helikaza nastavlja odmotavati i stvarati jednolančane regije DNA koje zajedno s replikacijskim proteinom A služe kao signal ATR kinazi.

Do primjetne razlike u progresiji stanica kroz stanični ciklus između kontrolnih i tretiranih stanica dolazi prilikom tretmana stanica 100 nM citarabinom. Pri ovoj koncentraciji citarabina udio stanica

koje se nalaze u fazi S staničnog ciklusa je veći u usporedbi s ostalim tretmanima. U ovoj fazi stanicama je dio DNA udvostručen dok dio još čeka udvostručenje. Zastoj u ovoj fazi je posljedica umetanja citarabina u DNA i sprječavanja napredovanja replikacijske vilice kod većine stanica. Dobiveni rezultati se poklapaju s rezultatima Qi i sur. (2020.) koji su po inkubaciji s jednakom koncentracijom citarabina u U937 stanicama primijetili povećano nakupljane stanica u fazi S staničnog ciklusa u usporedbi s kontrolom. Navedeni rezultati u skladu su i s već poznatim saznanjima o utjecaju oštećenja DNA na stanični ciklus. Poznato je da oštećenje DNA zaustavlja stanični ciklus u fazi G₂, no također aktivira kontrolnu točku u fazi G₁ koja zaustavlja stanični ciklus preko djelovanja aktiviranog proteina p53. S obzirom na to da mnoge tumorske stanice, pa tako i U937 stanična linija, imaju mutirani protein p53, zastoj staničnog ciklusa u fazi G₁ zbog aktivacije p53 nije moguć i sljedeća linija obrane stanice od oštećenja DNA nalazi se u fazi S (Cooper 2000). Aktivacija kontrolne točke faze S potiče mehanizme popravka DNA koji u nekim slučajevima uspiju popraviti DNA i potaknuti stanicu da nastavi u fazu G₂ staničnog ciklusa. Međutim, u slučaju prevelikog oštećenja stanica ne može popraviti oštećenje i umire. Prisutnost najvećeg broja stanica u fazi S kod tretmana stanica citarabinom u koncentraciji od 100 nM u usporedbi s drugim tretmanima upućuje da navedena koncentracija citarabina uzrokuje dovoljno visoku razinu oštećenja DNA koju stanica ne može popraviti da bi se DNA mogla nastaviti replicirati, a stanica nastaviti dalje kroz ciklus.

Kod stanica tretiranih najvišom koncentracijom citarabina (1000 nM) dolazi do masovnog umiranja stanica i većina stanica se nalazi u fazi sub G₁. Kod ove koncentracije citarabina dolazi do prevelikog oštećenja DNA koje ne može popraviti DDR i stanice masivno ulaze u apoptozu prije nego uopće dobiju priliku napredovati kroz stanični ciklus. Navedene stanice su vjerojatno prošle jedan stanični ciklus u kojem je dio stanica ostao u fazi G₂ ili M gdje su zaustavljene kada su došle do kontrolne točke navedenih faza staničnog ciklusa. One stanice koje su uspjele proći mitozu su to učinile s ogromnom razinom oštećenja DNA te umiru. Takve stanice točnije apoptotska tjelešca ne mogu opet ući u stanični ciklus, stoga se mogu detektirati u fazi sub G₁ van staničnog ciklusa. To bi objasnilo i značajni pad u udjelu stanica u fazi G₀/G₁ i fazi S staničnog ciklusa u usporedbi sa stanicama tretiranim citarabinom u koncentraciji od 100 nM.

Može se primijetiti da je određeni zastoj stanica u fazi G₂/M staničnog ciklusa zamijećen u stanicama koje su tretirane svim koncentracijama citarabina. Navedeno nije uvijek statistički

značajno, no vjerojatno je pokazatelj važnosti G₂ kontrolne točke u obrani stanice od oštećenja DNA, poglavito kod stanica s mutiranim p53.

Za dublju analizu utjecaja citarabina na stanični ciklus U937 stanica bilo bi zanimljivo usporediti rezultate protočne citometrije tretiranih stanica nakon 24, 48 i 72 sata, što nažalost nije bilo moguće pokriti u okviru ovog diplomskog rada.

Da bi utvrdila je li zastoj stanica tretiranih citarabinom u S fazi staničnog ciklusa povezan s aktivacijom ATR-Chk1 signalnog puta, analizirala sam fosforilaciju CDK1, kinaze koja se inhibira aktivacijom navedenog signalnog puta. Usporedila sam količinu nefosforilirane i fosforilirane CDK1 kod tretmana stanica različitim koncentracijama citarabina.

Pri detekciji nefosforiliranog oblika može se primijetiti povećanje ekspresije CDK1 kod stanica tretiranih 10 nM i 100 nM citarabinom u usporedbi s kontrolom, no pri tretmanom 1000 nM citarabinom dolazi do opadanja količine CDK1. Opadanje ekspresije CDK1 kod tretmana 1000 nM citarabinom je najvjerojatnije posljedica nejednakog nanošenja proteina u jažice s obzirom na to da i kontrola nanošenja pokazuje manju količinu β-aktina kod stanica tretiranih 1000 nM citarabinom. Da bi se mogla vidjeti značajnost navedenih razlika potrebno je napraviti denzitometriju.

Uspoređujući količinu nefosforiliranog i fosforiliranog CDK1, kod kontrole i stanica tretiranih 10 nM citarabinom može se uočiti manja količina fosforilirane CDK1 od njezinog nefosforiliranog oblika. Navedeno sugerira da tretman 10 nM citarabinom nije dovoljan za aktivaciju signalnog puta ATR-Chk1 u stanicama U937. S obzirom na potencijalnu grešku u nanošenju uzorka stanica tretiranih 1000 nM citarabinom, količinu nefosforiliranog CDK1 ne mogu usporediti s količinom fosforiliranog oblika CDK1. Blago povećanje količine pCDK1 u usporedbi s količinom CDK1 može se zamijetiti u stanicama koje su tretirane 100 nM citarabinom. Primijećeno povećanje količine fosforiliranog oblika CDK1 se može pripisati aktivaciji signalnog uputa ATR-Chk1 uslijed oštećenja DNA nastalog djelovanjem citarabina. Navedeni rezultati se poklapaju s rezultatima protočne citometrije koja je pokazala da najveći udio stanica tretiranih 100 nM citarabinom zastaje u fazi S. Stoga se zastoj u fazi S kao i fazi G₂/M staničnog ciklusa može pripisati fosforilaciji CDK1 koja se nakuplja u fazi S staničnog ciklusa umjesto da se njegov nefosforilirani oblik spaja u kompleks s ciklinom B i potiče prijelaz iz faze G₂ u fazu M staničnog ciklusa.

Pri detekciji fosforiliranog oblika CDK1, rezultati su pokazali povećane razine fosforilacije CDK1 na tirozinu 15 koja ovisi o koncentraciji citarabina kojim su stanice tretirane. Poznat je utjecaj citarabina na aktivaciju signalnog puta ATR-Chk1, točnije aktivaciju Chk1 (Schenk i sur. 2012). Nadalje, poznato je i da je razina fosforilacije Chk1 u direktnoj svezi sa zaustavljanjem replikacije uzrokovano djelovanjem citotoksičnog agensa kao što je citarabin (Iyer i Rhind 2017). Stoga se fosforilacija CDK1 na tirozinu 15, točnije njegova inhibicija, može pripisati aktivnosti Chk1. Poznato je da Chk1 djeluje na CDK1 indirektno, preko CDC25 i Wee1. Chk1 fosforilira i na taj način inaktivira CDC25 koja potom ne može defosforilirati CDK1 na tirozinu 15 i treoninu 14. Chk1 također fosforilira kinazu Wee1 koja fosforilira CDK1 na tirozinu 15 i treoninu 14 (Patil i sur. 2013). Stoga se može pretpostaviti da fosforilaciji CDK1, a posljedično i zastoju staničnog ciklusa u fazama S i G₂/M, doprinosi aktivnost kinaze Wee1. Potrebno je provjeriti fosforilaciju Wee1 kinaze u leukemijskim stanicama U937 tretiranim citarabinom da bi se mogao potvrditi njezin utjecaj na CDK1 u učincima citarabina.

Daljnja istraživanja su potrebna da bi se mogao detaljnije razumjeti mehanizam djelovanja citarabina na leukemijske stanice, ali i da bi se premostili problemi otpornosti na citarabin. Naime kod mnogih pacijenata dolazi do remisije bolesti kao i nemogućnosti liječenja zbog otpornosti leukemijskih stanica na citarabin. Trenutno obećavajući smjer istraživanja je korištenje citarabina u kombinaciji s inhibitorima signalnog puta ATR da bi se povećavala njegova učinkovitost. Pritom su najviše istraženi inhibitori koji ciljaju Chk1 da bi se omogućio popravak DNA i tako pojačala učinkovitost genotoksičnog agensa kao što je citarabin (Di Tullio i sur. 2017). Inhibitori selektivni za Chk1 kao što su SCH 900776 (Schenk i sur. 2012) i GDC-0575 (Di Tullio i sur. 2017) dokazano povećavaju učinkovitost citarabina i uzrokuju povećanje razine apoptoze tumorskih stanica zbog nekontrolirane stanične progresije kroz stanični ciklus koja ultimativno vodi mitotskoj katastrofi (Boudny i Trbusek 2020). Inhibitori Chk1 također pomažu u borbi s rezistencijom stanica AML-a na citarabin pa je tako dokazano da SCH 900776 vraća osjetljivost na citarabin stanicama koje su otporne zbog prekomjerne ekspresije Chk1 (David i sur. 2017).

S obzirom na to da većina tumorskih stanica, pa tako i stanice AML-a imaju inaktivirani p53, te stanice zaobilaze G₁ kontrolnu točku. Posljedično tome, S, G₂ i M ostaju kao kontrolne točke ključne za preživljenje stanica nakon oštećenja DNA, stoga se inhibicija same ATR javlja kao pogodan način za pojačavanje antileukemijske aktivnosti citotoksičnih tvari kao što je citarabin.

Pokazano je da selektivni inhibitor ATR AZ20 pojačava učinak citarabina i uzrokuje pojačanu apoptozu leukemijskih stanica (Ma i sur. 2017). Iako inhibitori signalnog puta ATR pokazuju obećavajuće rezultate u pretkliničkim testiranjima kod akutne leukemije, klinička istraživanja ne daju željene rezultate, te se smatra da navedeni inhibitori nisu spremni za primjenu na pacijentima. Potrebno je još istraživanja da bi se inhibitori signalnog puta ATR mogli koristiti u kliničkoj primjeni (Boudny i Trbusek 2020).

6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje potvrdilo je učinak citarabina na smanjenje broja živih stanica ljudske leukemijske linije U937 u ovisnosti o koncentraciji. Istraživanje je pokazalo da citarabin u koncentraciji od 100 nM statistički značajno smanjuje udio stanica u fazi G_0/G_1 , a povećava udio stanica u fazi S staničnog ciklusa. Citarabin u koncentraciji od 1000 nM potiče masovno umiranje stanica jer statistički značajno povećava udio u fazi sub G_1 staničnog ciklusa. Zastoj staničnog ciklusa korelira s fosforilacijom kinaze CDK1 na tirozinu 15 što upućuje na ulogu CDK1 kao ciljne molekule signalnoga puta ATR/Chk1 u učincima citarabina na leukemijske stanice U937.

7. LITERATURA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Alhmoud, J. F., Mustafa, A. G., Malki, M. I. (2020): Targeting DNA repair pathways in hematological malignancies. **International Journal of Molecular Sciences** 21:19.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., Sultan, C. (1976): Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. **British journal of haematology** 33: 451-458.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., Sultan, C. (1991): Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **British journal of haematology** 78: 325-329.
- Boudny, M., & Trbusek, M. (2020): ATR-CHK1 pathway as a therapeutic target for acute and chronic leukemias. **Cancer Treatment Reviews** 88: 102026.
- Chanput, W., Peters, V., Wichers, H. (2015): *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer, New York.
- Chen, L., Guo, P., Zhang, Y., Li, X., Jia, P., Tong, J., Li, J. (2017): Autophagy is an important event for low-dose cytarabine treatment in acute myeloid leukemia cells. **Leukemia research** 60: 44-55.

- Cheong, J. W., Kim, Y., Eom, J. I., Jeung, H. K., Min, Y. H. (2016): Enhanced autophagy in cytarabine arabinoside-resistant U937 leukemia cells and its potential as a target for overcoming resistance. **Molecular medicine reports** 13: 3433-3440.
- Cooper G. (2000): *The Cell: A Molecular Approach* Sunderland. ASM Press ; Sinauer Associates, Washington, D.C.
- David, L., Fernandez-Vidal, A., Bertoli, S., Grgurevic, S., Lepage, B., Deshaies, D., Hoffmann, J. S. (2016): CHK1 as a therapeutic target to bypass chemoresistance in AML. **Science signaling** 9: 445.
- David, L., Manenti, S., Récher, C., Hoffmann, J. S., Didier, C. (2017): Targeting ATR/CHK1 pathway in acute myeloid leukemia to overcome chemoresistance. **Molecular & Cellular Oncology** 4: 1289293.
- Dembitz, V., Tomic, B., Kodvanj, I., Simon, J. A., Bedalov, A., Visnjic, D. (2019): The ribonucleoside AICAr induces differentiation of myeloid leukemia by activating the ATR/Chk1 via pyrimidine depletion. **Journal of Biological Chemistry** 294: 15257-15270.
- Di Francia, R., Crisci, S., De Monaco, A., Cafiero, C., Re, A., Iaccarino, G., Pinto, A. (2021): Response and toxicity to cytarabine therapy in leukemia and lymphoma: From dose puzzle to pharmacogenomic biomarkers. **Cancers** 13: 966.
- Di Tullio, A., Rouault-Pierre, K., Abarrategi, A., Mian, S., Grey, W., Gribben, J., Bonnet, D. (2017): The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. **Nature communications** 8:1-12.

- Döhner, H., Weisdorf, D. J., Bloomfield, C. D. (2015): Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine** 373: 1136-1152.
- Grant, S. (1997): Ara-C: cellular and molecular pharmacology. **Advances in cancer research** 72: 197-233.
- Goto, H., Natsume, T., Kanemaki, M. T., Kaito, A., Wang, S., Gabazza, E. C., Mizoguchi, A. (2019): Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression. **Journal of Cell Science** 132: 2
- Hall, J. E., & Hall, M. E. (2022): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb.
- Hoffman, R. (2009): Hematology: basic principles and practice. Churchill Livingstone/Elsevier, Philadelphia, PA
- Iyer, D. R., & Rhind, N. (2017): The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. **Genes** 8: 74.
- Jayat, C., & Ratinaud, M. H. (1993): Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. **Biology of the Cell** 78: 15-25.
- Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. E., Levine, R. L., Jordan, C. T., Ehninger, G., Linch, D. C. (2016): Acute myeloid leukaemia. **Nature reviews Disease primers** 2: 1-22.
- Lalić, H. (2015): Uloga signalnoga puta AMPK/mTOR u diferencijaciji leukemijskih stanica. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb.

- Nam, E. A., & Cortez, D. (2011): ATR signalling: more than meeting at the fork. **Biochemical Journal** 436: 527-536.
- Newell, L. F., & Cook, R. J. (2021): Advances in acute myeloid leukemia. **BMJ (Clinical research ed.)** 375: 2026.
- Ma, C. X., Janetka, J. W., Piwnica-Worms, H. (2011): Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. **Trends in molecular medicine** 17:88-96.
- Ma, J., Li, X., Su, Y., Zhao, J., Luedtke, D. A., Epshteyn, V., Ge, Y. (2017): Mechanisms responsible for the synergistic antileukemic interactions between ATR inhibition and cytarabine in acute myeloid leukemia cells. **Scientific reports** 7:1-14.
- Manic, G., Obrist, F., Sistigu, A., Vitale, I. (2015): Trial watch: targeting ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways for anticancer therapy. **Molecular & cellular oncology** 2: 4.
- Patil, M., Pabla, N., Dong, Z. (2013): Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. **Cellular and molecular life sciences** 70: 4009-4021.
- Pecorino, L. (2021): Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford university press, Oxford.
- Pelcovits, A., Niroula, R. (2020): Acute myeloid leukemia: A review. **Rhode Island Medical Journal** 103: 38-40.
- Provan, D. & Gribben, J. (2005): Molecular hematology. Blackwell Pub., Malden.

- Qi, W., Yan, X., Xu, X., Song, B., Sun, L., Zhao, D., Sun, L. (2020): The effects of cytarabine combined with ginsenoside compound K synergistically induce DNA damage in acute myeloid leukemia cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 132: 110812.
- Schenk, E. L., Koh, B. D., Flatten, K. S., Peterson, K. L., Parry, D., Hess, A. D., Kaufmann, S. H. (2012): Effects of selective checkpoint kinase 1 inhibition on cytarabine cytotoxicity in acute myelogenous leukemia cells in vitro. **Clinical Cancer Research** 18: 5364-5373.
- Schnerch, D., Yalcintepe, J., Schmidts, A., Becker, H., Follo, M., Engelhardt, M., Wäsch, R. (2012): Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **American journal of cancer research** 2: 508.
- Segurado, M., & Tercero, J. A. (2009): The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. **Biology of the Cell** 101: 617-627.
- Sugimoto, K., Toyoshima, H., Sakai, R., Miyagawa, K., Hagiwara, K., Ishikawa, F., Hirai, H. (1992): Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. **Blood** 79: 2378-2383.
- Tallman, M. S., Gilliland, D. G., Rowe, J. M. (2005): Drug therapy for acute myeloid leukemia. **Blood** 106: 1154-1163.
- Uzbekov, R., & Prigent, C. (2022): A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. **Cells** 11: 704.
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014): Causes and consequences of replication stress. **Nature cell biology** 16: 2-9.
- Zhang, H. & Li, S., (2019): Leukemia stem cells in hematologic malignancies. Springer, Singapore.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu 19.03.1999. Pohađala sam osnovnu školu Lučac u Splitu, a potom Prvu jezičnu gimnaziju Split. Upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu 2017. godine. Preddiplomski studij sam završila 2020. nakon čega sam upisala diplomski studij Molekularne biologije na istom fakultetu. Tijekom studija sudjelovala sam u znanstveno-popularnoj manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ i odradila nekoliko laboratorijskih praksi. Prvu laboratorijsku praksu sam odradila u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u laboratoriju profesorice Mirte Boban (3.-6. mjesec 2020.), zatim sam odradila laboratorijsku praksu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Laboratoriju za mikrobiologiju pod vodstvom profesorice Martine Šeruge Musić (2.-6. mjesec 2021.) i naposljetku sam odradila praksu na Institutu za oceanografiju i ribarstvo Split u Laboratoriju za mikrobiologiju pod vodstvom profesorice Danijele Šantić (8.-9. mjesec 2021). Na trećem semestru diplomskog studija otišla sam na studentsku razmjenu ERASMUS+ u Gironu u Španjolskoj gdje sam također odradila laboratorijsku praksu u laboratoriju Technosperm koji se bavi istraživanjem animalne i humane reprodukcije.