

# Ekspresija proteina p53 i p73 u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog vodikovim peroksidom u stanicama SH-SY5Y

---

Dunder, Snježana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:607315>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Snježana Dunder

**EKSPRESIJA PROTEINA p53 I p73 U  
UVJETIMA OKSIDACIJSKOG STRESA  
IZAZVANOG VODIKOVIM PEROKSIDOM  
U STANICAMA SH-SY5Y**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Jazvinščak Jembrek i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Nikoline Hanžić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je dr. sc. Morana Dulić.

## Zahvale

*Od srca se zahvaljujem...*

*... mojoj mentorici dr. sc. Maji Jazvinščak Jembrek na ukazanom povjerenju, pomoći, savjetima, strpljenju, svemu što ste me naučili, znanju koje ste mi prenijeli i vremenu koje ste posvetili meni i izradi ovog diplomskog rada.*

*... dr. sc. Nikolini Hanžić na svim savjetima, pomoći, ugodnom druženju, prenesenom znanju, veseloj radnoj atmosferi i pomoći pri interpretaciji rezultata. Uz tvoju organizaciju, zarazni smijeh i veseli pristup sati u labosu su brže prolazili.*

*... dr. sc. Nedi Slade što ste mi omogućili da svoj diplomski rad izradim u Laboratoriju za proteinsku dinamiku u ugodnom i poticajnom okruženju.*

*... svim djelatnicima Laboratorija za proteinsku dinamiku i Zavoda za molekularnu medicinu na pristupačnosti, strpljenju, pomoći, savjetima, ugodnoj i prijateljskoj atmosferi i razgovorima.*

*... doc. dr. sc. Morani Dulić na pomoći i savjetima pri pisanju ovog diplomskog rada.*

*... mojoj Barbari za sve, a svega je bilo puno! Hvala ti što si nesebično bila uz mene i što si uvijek bila, i jesi, najbolja prijateljica koju sam mogla poželjati!*

*... svim mojim mnogobrojnim i srcu posebno dragim prijateljima koje sam stekla na fakultetu i izvan njega i koji su me pratili na mom putu do diplome. Vi ste najvrjednije što nosim sa sobom iz studentskih dana. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene! Hvala na druženju, smijehu, pomoći i savjetima. Sve vas puno volim i na posebnom ste mjestu u mom srcu!*

*... Viktoru, na svemu! Hvala ti na nesebičnoj ljubavi i podršci i što si uvijek bio bezuvjetno uz mene stavljajući me ispred sebe. Uz tebe je svaka tuga duplo manja, a svaka sreća duplo veća!*

*... mojoj obitelji; seki, mami i tati! Vi ste moja stijena i moj najveći oslonac! Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, podršci i požrtvovnosti! Hvala što sam odrastala u sretnoj obitelji punoj ljubavi, podrške i međusobnog uvažavanja. Vi ste zaslužni za sve što sam postigla i za sve što jesam! Volim vas najviše!*

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Neuroblastom .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Reaktivne kisikove vrste i oksidacijski stres.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3. Programirana stanična smrt .....</b>	<b>3</b>
2.3.1. Apoptoza.....	4
<b>2.4. Protein p53.....</b>	<b>4</b>
2.4.1. Struktura proteina p53 .....	5
2.4.2. Nastajanje p53 tetramera.....	5
2.4.3. Izoforme proteina p53 .....	6
2.4.4. Obitelj p53.....	7
<b>2.5. Metoda Western blot.....</b>	<b>9</b>
2.5.1. Priprema uzoraka .....	10
2.5.2. Gel-elektroforeza .....	10
2.5.3. Prijenos proteina na membranu.....	11
2.5.4. Blokiranje nespecifičnih interakcija i inkubiranje sa specifičnim protutijelima .....	11
2.5.5. Detekcija proteina na membrani.....	11
2.5.6. Problemi i nedostaci metode i moguća rješenja .....	12
<b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>14</b>
3.1.1. Osnovne kemikalije .....	14
3.1.2. Puferi, otopine, hranjiva podloga, kultura stanica .....	15
3.1.3. Primarna i sekundarna protutijela.....	15
3.1.4. Komercijalni kompleti, markeri i ostali materijal.....	16
<b>3.2. Metode.....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Rad sa staničnom kulturom.....	18
3.2.2. Priprema i uzgoj stanica.....	18
3.2.3. Brojanje stanica.....	19
3.2.4. Tretiranje stanica SH-SY5Y vodikovim peroksidom .....	19
3.2.5. Određivanje preživljenja stanica SH-SY5Y testom MTT.....	19
3.2.6. Nastajanje ROS-a.....	20
3.2.7. Određivanje koncentracije staničnog ATP-a.....	20
3.2.8. Određivanje koncentracije reduciranog glutationa.....	20

---

3.2.9. Priprema stanica za analizu western blot.....	21
3.2.10. Izolacija proteina iz stanica .....	21
3.2.11. Određivanje koncentracije proteina.....	21
3.2.12. Poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak SDS-a.....	22
3.2.13. Prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu .....	24
3.2.14. Blokiranje i inkubacija s protutijelima.....	24
3.2.15. Detekcija ciljnih proteina.....	25
3.2.16. Obrada rezultata .....	25
<b>§ 4. REZULTATI.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y i nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta nakon tretmana vodikovim peroksidom .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Utjecaj $H_2O_2$ na preživljenje stanica SH-SY5Y.....	26
4.1.2. Utjecaj $H_2O_2$ na koncentraciju staničnog ATP-a.....	28
4.1.3. Utjecaj $H_2O_2$ na nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama SH-SY5Y .....	29
4.1.4. Utjecaj $H_2O_2$ na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u stanicama SH-SY5Y .....	30
<b>4.2. Utjecaj <math>H_2O_2</math> na ekspresiju proapoptotskih proteina p53 i p73.....</b>	<b>31</b>
4.2.1. Ekspresija izoformi proteina p53 .....	31
4.2.2. Ekspresija izoformi proteina p73 .....	39
<b>§ 5. RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
<b>§ 6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>48</b>
<b>§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>49</b>
<b>§ 8. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XIX</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### EKSPRESIJA PROTEINA p53 I p73 U UVJETIMA OKSIDACIJSKOG STRESA IZAZVANOG VODIKOVIM PEROSKSIDOM U STANICAMA SH-SY5Y

Snježana Dunder

Mnogi pristupi u liječenju tumora temelje se na izazivanju oksidacijskog stresa i posljedično apoptoze primjenom ionizirajućeg zračenja ili kemoterapeutika. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati utjecaj oksidacijskog stresa, izazvanog primjenom vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), na ekspresiju tumor supresorskih proteina p53 i p73, koji su uključeni u pokretanje apoptoze. Istraživanje je provedeno u stanicama neuroblastoma, stanična linija SH-SY5Y. Utvrdili smo da u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji,  $H_2O_2$  smanjuje preživljenje stanica, unutarstaničnu koncentraciju glutationa i ATP-a, te da povećava nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Metodom *western blot* utvrdili smo porast u ekspresiji ukupnog proteina p53 te njegove izoforme p53 $\alpha$ , dok je ekspresija izoformi p53 $\beta$  i  $\Delta 40p53\beta$  specifično smanjena. Također, nakon izlaganja  $H_2O_2$  došlo je do jake indukcije ekspresije proteina p73, posebice izoforme TAp73 $\alpha$ . Dobiveni rezultati upućuju na značajan doprinos pojačane ekspresije proteina p53 i p73 u smanjenju preživljenje stanica SH-SY5Y u uvjetima oksidacijskog stresa. (61 stranica, 21 slika, 5 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi:  $H_2O_2$ , izoforme p53 i p73, oksidacijski stres, stanice SH-SY5Y

Mentor: dr. sc. Maja Jazvinšćak Jembrek, zn. sur.

Neposredni voditelj: dr. sc. Nikolina Hanžić, asist.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Datum diplomskog ispita: 22. listopada 2018.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### EXPRESSION OF p53 AND p73 PROTEINS IN HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN SH-SY5Y CELLS

Snježana Dunder

Many approaches in tumor therapy are based on oxidative stress induction and triggering apoptosis by using ionizing radiation or chemotherapeutics. The aim of the study was to examine the effect of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced oxidative stress on the expression of tumor suppressor proteins p53 and p73 that are involved in the initiation of apoptosis. The study was performed in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. In a concentration-dependent manner H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased cell survival, intracellular glutathione and ATP levels, and increased accumulation of reactive oxygen species (ROS). Western blot method revealed increased expression of the total p53 protein and its isoform p53 $\alpha$ , while the expression of isoforms p53 $\beta$  and  $\Delta$ 40p53 $\beta$  was specifically reduced. Furthermore, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure, strong induction of p73 expression, particularly the TAp73 $\alpha$  isoform, was found. The obtained results suggest that increased expression of p53 and p73 proteins greatly contribute to reduced survival of SH-SY5Y cells under oxidative stress conditions.

(61 pages, 21 figures, 5 tables, 60 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxidative stress, p53 and p73 isoforms, SH-SY5Y cells

Mentor: Dr. Maja Jazvinščak Jembrek, Research Associate

Assistant mentor: Dr. Nikolina Hanžić, Research Associate - Assistant

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

2. Dr. Željka Soldin, Associate Professor

3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Substitute: Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Date of exam: 22nd October 2018



## § 1. UVOD

U eukariotskim stanicama nusprodukti metabolizma su jako reaktivne vrste nazvane slobodnim radikalima. U niskim koncentracijama u stanici su korisni jer služe kao male signalne molekule omogućujući komunikaciju unutar stanice. Tumorske stanice imaju puno brži metabolizam od normalnih stanica pa u njima nastaje i puno više slobodnih radikala koji u svojoj strukturi sadrže kisikove atome. Nakupljanjem tih vrsta u stanici oštećuju se stanični proteini, lipidi te DNA. Stanice se mogu s time nositi na tri načina: mogu pokrenuti proces programirane stanične smrti (apoptoze) čime stanica odumire te na taj način štiti organizam od svog štetnog utjecaja, mogu aktivirati alternativne metaboličke puteve čime se smanjuje nastajanje slobodnih radikala u stanici ili se mogu prilagoditi na visoke koncentracije tih slobodnih radikala uspostavljajući redoks ravnotežu. Uspostavljanje nove redoks ravnoteže kao odgovor na povećanje koncentracije slobodnih radikala u stanici omogućuje tumorskim stanicama brži metabolizam i proliferaciju što rezultira brzim rastom tumorskog tkiva.<sup>1</sup>

Budući da tumorske stanice same pokreću staničnu smrt nađu li se u nepovoljnim uvjetima (kao što je npr. visoka koncentracija slobodnih radikala u stanici), izazivanje oksidacijskog stresa čest je princip liječenja tumora. Oksidacijski stres u tumorskim stanicama izaziva se kemijskim agensima (kemoterapija) ili ionizirajućim zračenjem (radioterapija).

Neuroblastom je jedan od najčešćih tumora koji se javljaju u dječjoj dobi.<sup>1,2</sup> Cilj ovoga rada je izazvati oksidacijski stres u stanicama neuroblastoma, stanična linija SH-SY5Y, upotrebom vodikovog peroksida, ispitati preživljenje stanica u tim uvjetima i pratiti ekspresiju proapoptotskih proteina p53 i p73 iz obitelji p53, kao i njihovih specifičnih izoformi.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Neuroblastom

Neuroblastom je tumor koji pripada obitelji neuroblastičnih tumora, koju, osim njega, čine i ganglioneurom i ganglioneuroblastom. Po pojavnosti u ukupnoj ljudskoj populaciji je rijedak, iako je to najčešći tumor koji se dijagnosticira kod djece mlađe od 5 godina<sup>2</sup> te četvrti pedijatrijski tumor po učestalosti pojavljivanja, nakon leukemije, tumora središnjeg živčanog sustava i limfoma.<sup>3,4</sup>

Neuroblastom je ekstrakranijalni maligni tumor koji nastaje od pluripotentnih stanica simpatičkog živčanog sustava, a najčešće se dijagnosticira kod djece sa srednjom dobi od 18 mjeseci<sup>5</sup> te predstavlja 8% - 10% svih tumora kod djece s učestalošću od 10,2 slučaja na milijun djece u dobi do 15 godina. Rijetko se pojavljuje kod adolescenata i odraslih osoba.<sup>5,6</sup> Iako je odgovoran za veliki udio smrtnosti uzrokovanih malignim oboljenjima u dječjoj dobi, ovaj tumor pokazuje najveću stopu spontane i potpune regresije od svih maligniteta u ljudi.<sup>3,7</sup>

Može se pojaviti bilo gdje duž lanca simpatičkog živčanog sustava, a najčešće se javlja u abdomenu u nadbubrežnoj žlijezdi. Primarni tumor u vratu ili gornjem dijelu prsnog koša može za posljedicu uzrokovati Hornerov sindrom (disfunkcija vratnih simpatičkih izlaznih živaca obilježena spuštenom vjeđom, suženom zjenicom i nemogućnošću znojenja), dok pojava tumora duž kralježnice može dovesti do kompresije leđne moždine što može rezultirati paralizom. Neuroblastom najčešće metastazira na regionalne limfne čvorove i koštanu srž, a metastaze se mogu pojaviti i na jetri, koži, potkožnom tkivu te rijetko na plućima i središnjem živčanom sustavu.<sup>6,7</sup>

### 2.2. Reaktivne kisikove vrste i oksidacijski stres

Jedan od produkata metaboličkih i drugih fizioloških procesa u stanicama aerobnih organizama su reaktivne kisikove vrste (ROS; engl. *reactive oxygen species*). ROS nastaju u oksidacijsko-redukcijskim procesima u stanici redukcijom molekularnog kisika. Pod pojmom ROS se najčešće podrazumijevaju superoksidni anion ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) te hidroksilni radikal ( $OH^\bullet$ ) koji je od navedenih najreaktivniji.<sup>8</sup>

U fiziološkim uvjetima ROS djeluju kao male signalne molekule izazivajući oksidacijsku modifikaciju specifičnih ciljnih molekula, iako točan mehanizam djelovanja još uvijek nije

sasvim razjašnjen. Od prethodno navedenih, najlošija signalna molekula je hidroksilni radikal budući da je izrazito jako oksidacijsko sredstvo što dovodi do visoko nespecifične oksidacije. Oksidacija superoksidnim anionom je ograničena samo na ciljne vrste koji mu se nalaze u neposrednoj blizini, dok je vodikov peroksid najbolja signalna molekula jer lako difundira, električki je neutralan te je stabilan što znači da će lakše reagirati sa ciljnim vrstama koje se ne nalaze u neposrednoj blizini.<sup>9</sup>

ROS djeluju kao signalne molekule i imaju mnoge uloge u stanici, kao što su regulacija programirane stanične smrti, diferencijacija i dioba stanica, starenje, regulacija mnogih transkripcijskih faktora i njihovih površinskih receptora.<sup>10</sup>

Održavanje optimalne količine ROS-a u stanici je proces koji se održava pomoću mnogobrojnih molekula koje se mogu podijeliti u dvije temeljne kategorije: antioksidacijski enzimi i neenzimske antioksidacijske molekule. Najvažniji antioksidacijski enzimi su superoksid dismutaza (SOD; engl. *superoxyde dismutase*), katalaza i glutation-peroksidaza (GPx; engl. *glutathione peroxidase*), dok su neenzimski antioksidansi molekule niske molekularne mase što uključuje vitamine (vitamini C i E), β-karoten i glutation (GSH), tripeptid koji sadrži tiolnu skupinu. U prvom stupnju antioksidacijske zaštite enzimi neutraliziraju superoksid (SOD katalizira prevođenje superoksida u manje reaktivan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>), odnosno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GPx katalizira redukciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O pri čemu se troši glutation). U drugom stupnju antioksidacijske molekule uklanjaju potencijalno toksične metabolite nastale interakcijom ROS-a i produkata prvog stupnja ili iz izvanstaničnih izvora.<sup>10,11</sup>

Ukoliko tijekom staničnih procesa nastane više ROS-a nego što se antioksidativnom aktivnošću staničnih enzima uklanja, dolazi do stanja nazvanog oksidacijski stres. Budući da se u stanici tada nalazi više ROS-a nego je to potrebno za normalnu funkciju same stanice, te budući da su ROS-e izrazito jaka oksidacijska sredstva, dolazi do oštećenja staničnih proteina, lipida i deoksiribonukleinske kiseline (DNA; engl. *deoxyribonucleic acid*) što neizbježno utječe na staničnu funkciju. Rezultat toga je često preuranjeno starenje, razvoj bolesti ili stanična smrt.<sup>11,12</sup>

### 2.3. Programirana stanična smrt

Programirana stanična smrt (PCD; engl. *programmed cell death*) je strogo reguliran proces kojemu stanica podliježe s ciljem održavanja stanične homeostaze,<sup>13</sup> optimalnog broja stanica, uklanjanja oštećenih stanica, kod kojih oštećenje nije bilo moguće popraviti drugim staničnim

mehanizmima, te kao odgovor na zastoj u staničnom ciklusu. Na taj način uklanjaju se stanice koje više nisu korisne ili predstavljaju opasnost organizmu.<sup>14</sup>

Tri su najvažnija načina programirane stanične smrti. To su: autofagija, programirana nekroza i, nazastupljeniji, apoptoza.<sup>15,16</sup>

### 2.3.1. Apoptoza

Stanice koje ulaze u apoptozu odvajaju se od susjednih stanica, poprimaju okrugli ili ovalni oblik, smanjuju svoj volumen te dolazi do njihove fragmentacije i nastanka apoptotičnih tjelešca. Unutrašnjost stranice se također mijenja; dolazi do kondenzacije i razaranja jezgre te fragmentacije DNA, Golgijevog tijela i endoplazmatskog retikuluma.<sup>17,18</sup>

Dva su moguća puta pokretanja apoptoze: vanjski i unutarnji. Oba puta odvijaju se uz pomoć kaspaza, skupine proteolitičkih enzima koji u svojim aktivnim mjestima imaju cisteinske ostatke, a proteinske supstrate cijepaju iza asparaginske kiseline (Asp).<sup>12,20</sup> Kaspaze koje sudjeluju u apoptozi se dijele u dvije skupine: inicijacijske kaspaze (kojoj pripadaju kaspaze 8, 9 i 10) i izvršne kaspaze (kojoj pripadaju kaspaze 3, 6 i 7).

Vanjski put pokretanja apoptoze odvija se vezanjem liganada na tzv. receptore smrti koji se nalaze na vanjskoj strani membrane stanice. Njihovom interakcijom dolazi do aktivacije inicijacijske kaspaze 8 i/ili 10, a potom i izvršnih kaspaza 3, 6 i 7.

Unutarnji put apoptoze započinje promjenama vanjske membrane mitohondrija, izlaskom citokroma c u citoplazmu i formiranjem apoptosoma – kompleksa citokroma c, kaspaze 9 i adaptorske molekule apoptotički aktivirajući faktor proteaza (Apaf-1; engl. *Apoptotic protease activating factor 1*). Zatim se aktivira inicijacijska kaspaza 9, a potom izvršne kaspaze 3, 6 i 7.<sup>21,22</sup>

## 2.4. Protein p53

Gen *TP53* je prvi identificirani tumor-supresor gen.<sup>23</sup> Produkt tog gena, protein p53, je transkripcijski faktor koji ima proapoptotsku funkciju budući da aktivira transkripciju brojnih ciljnih gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa i pokretanje apoptoze. U fiziološkim uvjetima u stanici se nalazi u maloj koncentraciji koju održava enzim E3-ubikvitin-ligaza MDM2. Uslijed oštećenja DNA, p53 se nakuplja u stanici zbog posttranslacijskih modifikacija (npr. fosforilacija ili acetilacija) što rezultira disocijacijom MDM2, a p53 se tada aktivira i potiče zaustavljanje staničnog ciklusa i/ili apoptozu. Zaustavljanjem staničnog ciklusa osigurava se dovoljno vremena staničnim mehanizmima za popravak DNA da poprave nastalo

oštećenje, a ukoliko je oštećenje veće i nepopravljivo, p53 protein vrši svoju proapoptotsku funkciju aktivirajući gene koji su odgovorni za pokretanje apoptoze.<sup>24</sup>

Mutirani *TP53* pronađen je u 50% svih ljudskih tumora. Poznato je da gubitak funkcije proteina p53 putem mutacije gena, delecije, razgradnje proteina ili vezanjem viralnog onkogeno ima glavnu ulogu u nastanku tumora.<sup>25</sup>

U stanicama neuroblastoma rijetko se javljaju mutacije u proteinu p53. Kod 220 slučajeva neuroblastoma, mutacije u proteinu p53 detektirane su u samo 5 slučajeva. 4 od tih 5 slučajeva su bili pacijenti s uznapredovalom bolešću.<sup>26</sup>

#### 2.4.1. Struktura proteina p53

Humani protein p53 sastoji se od 393 aminokiseline. Čini ga 6 glavnih domena: N-terminalne transaktivacijske domene 1 i 2, prolinom bogata domena, centralna DNA-vezujuća domena, tetramerizacijska domena i C-terminalna bazna domena. Između DNA-vezujuće i tetramerizacijske domene nalazi se kratka sekvenca koja se naziva jezgrin lokalizacijski signal i služi za usmjeravanje proteina u jezgru nakon njegove sinteze.

Transaktivacijske domene su važne za transaktivacijsku aktivnost, i interakciju s mnogim proteinima. Također posreduju u interakciji s MDM2. Prolinom bogata domena je važna za stabilnost p53, transkripcijsku aktivnost i pokretanje apoptoze neovisne o transkripciji. DNA-vezujuća domena se veže na p53 konsenzus mjesto koje uključuje četiri pentanukleotidna ponavljanja. Tetramerizacijska domena sudjeluje u reverzibilnom nastajanju p53 tetramera i regulira oligomerno stanje p53. Za C-terminalnu baznu domenu je dokazano *in vitro* da interagira s nespecifičnim sekvencama DNA kako bi regulirala specifično vezanje centralne DNA-vezujuće domene.<sup>27,28</sup>

#### 2.4.2. Nastajanje p53 tetramera

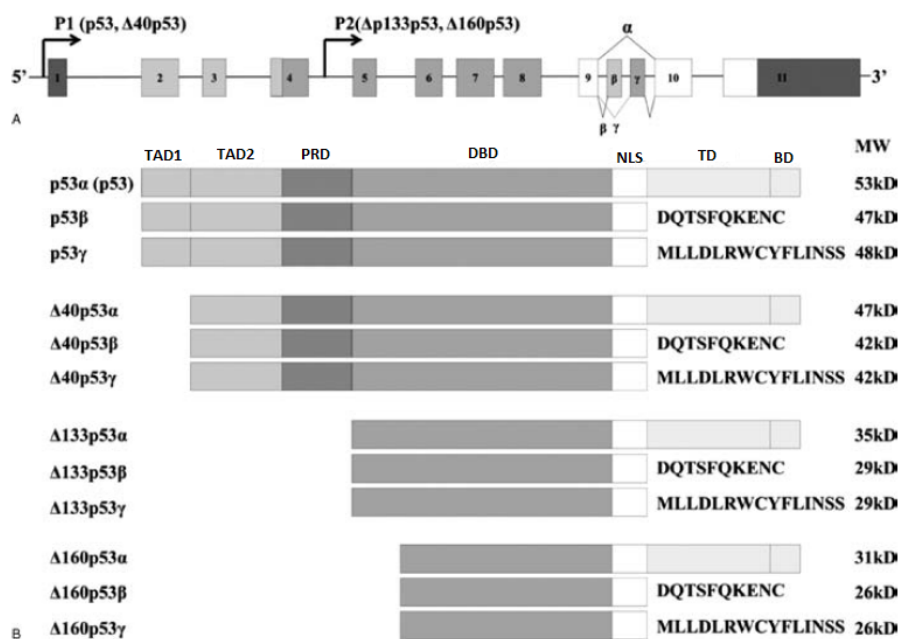
Da bi se protein p53 putem svoje DNA-vezujuće domene vezao na DNA, nužno je da se nalazi u obliku tetramera. Aktivna forma p53 je tetramer od četiri uobičajeno identične podjedinice koje se sastoje od dimera dimerâ. Dva dimera drže se zajedno djelovanjem hidrofobnih interakcija.<sup>29</sup>

Nastajanje tetramera p53 je potrebno za specifično vezanje DNA, posttranslacijske modifikacije i protein-protein interakcije. Tetramerizacija je posredovana tetramerizacijskom domenom, koja alosterički regulira DNA-vezujuću aktivnost p53. Posttranslacijske

modifikacije obično se događaju na N-terminalnom i C-terminalnom kraju te reguliraju aktivnost p53 i njegovu tetramerizaciju.<sup>27</sup>

### 2.4.3. Izoforme proteina p53

Zahvaljujući tome što gen *TP53* ima dva promotora s kojih može započeti transkripcija (P1 smješten uzvodno od eksona 1 i P2 smješten unutar eksona 4) i mogućnosti da transkripti podliježu alternativnom prekrajanju, do sada je otkriveno 12 izoformi proteina p53 kod ljudi.<sup>31</sup> Sve poznate izoforme prikazane su na slici 1. Najzastupljenija izoforma ima potpunu transaktivacijsku domenu na N-terminusu i najdulju C-terminalnu baznu domenu. Ta izoforma naziva se kanonski p53 ili p53 $\alpha$ . Ovisno o mjestu početka translacije, mogu biti eksprimirane 3 skraćene ili  $\Delta N$  varijante ( $\Delta 40p53$ ,  $\Delta 133p53$  i  $\Delta 160p53$ ) kojima nedostaje prva (u slučaju  $\Delta 40p53$ ), ili obje transaktivacijske domene (u slučaju  $\Delta 133p53$  i  $\Delta 160p53$ ). Ove 4 N-terminalne varijante (3  $\Delta N$  i kanonski p53) mogu biti kombinirane s 3 različite C-terminalne domene koje su rezultat alternativnog prekrajanja ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )<sup>31-32</sup> Izoforme  $\beta$  i  $\gamma$  imaju smanjenu transkripcijsku aktivnosti budući da im nedostaje tetramerizacijska domena.<sup>31,33</sup>

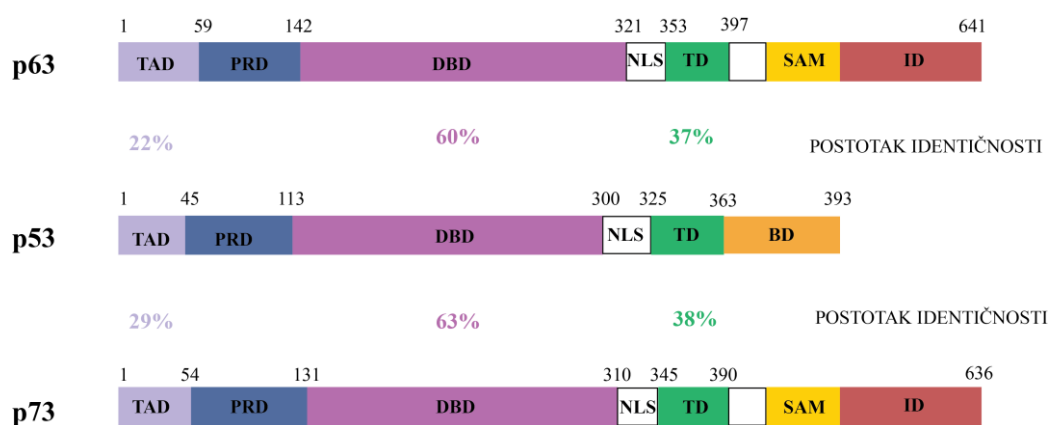


Slika 1. Gen *TP53* može biti eksprimiran u 12 različitih izoformi proteina.

A) Shema strukture humanog *TP53*. Prikazani su promotori (P1 i P2) te mjesta alternativnog prekrivanja ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ). B) Shema izoformi humanog p53 proteina s označenim domenama (TAD – transaktivacijska domena, PRD – prolinom bogata domena, DBD – DNA vezujuća domena, NLS – jezgrin lokalizacijski signal, TD – tetramerizacijska domena, BD – C-terminalna bazna domena). (Preuzeto iz i prilagođeno prema <sup>31</sup>)

#### 2.4.4. Obitelj p53

Postoje dva gena po strukturi slična genu *TP53*, a to su *TP63* i *TP73*, te zajedno čine obitelj gena *TP53*. Sheme navedenih gena i njihova strukturalna homologija prikazani su na slici 2. Produkti tih gena su proteini p63 i p73. Nakon otkrića *TP53*, prvi je otkriven njegov homolog *TP73*, a zatim *TP63*.<sup>30</sup>



Slika 2. Usporedna struktura gena *TP53*, *TP63* i *TP73*.

(TAD – transaktivacijska domena, PRD – prolinom bogata domena, DBD – DNA vezujuća domena, NLS – jezgrin lokalizacijski signal, TD – tetramerizacijska domena, SAM – područje sa sterilnim  $\alpha$ -motivom, ID – inhibitorna domena, BD – C-terminalna bazna domena)  
(Prilagođeno prema <sup>30</sup>)

Pored proteina p53, oba njegova homologa, p63 i p73 imaju važnu, iako iznenađujuće različitu s obzirom na njihovu homologiju, ulogu u razvoju miša i čovjeka.

Ekspresija proteina p63 i p73 je neophodna za ispravan razvoj i diferencijaciju. Istraživanja provedena na *knock out* miševima su pokazala da p53 *knock out* miš spontano razvija tumore, dok p63 i p73 *knock out* miševi ne razvijaju tumore, ali se kod njih javljaju mnogi regulacijski poremećaji u diferencijaciji ektoderma i neurogeneze, kronične infekcije i upale, promijenjena dinamika cerebrospinalnog likvora i respiratorne sluzi. Budući da se kod p53 *knock out* miša ne javljaju problemi u razvoju, vjerojatno je da proteini p63 i p73 nadomještaju ulogu proteina p53. Iako proteini p53, p63 i p73 mogu biti uključeni u iste regulatorne puteve, činjenica da p53, p63 i p73 transgenični *knock out* miševi pokazuju različit fenotip dovodi do zaključka da svaki od tih proteina ima jedinstvenu biološku ulogu unatoč velikoj homologiji u strukturi njihovih gena.<sup>30,33</sup>

Geni *TP63* i *TP73*, kao i *TP53*, imaju dva promotora s kojih može započeti transkripcija te alternativno prekrajanje na C-kraju. Izoforme proteina p73 mogu se podijeliti u dvije skupine: one koje imaju cjelovito transaktivacijsko područje (TAp73) i one u kojima ono nedostaje u cjelosti ili djelomično ( $\Delta N$  izoforme). p63 i p73 izoforme s cjelovitom transaktivacijskom domenom pokazuju funkciju sličnu onoj p53 te potiču transkripciju p53 ciljnih gena, dok  $\Delta N$  izoforme smanjuju aktivnost p53 djelujući suprotno djelovanju proteina p53.<sup>33,34</sup>



Najveća homologija između članova obitelji p53 postoji u DNA-vezujućoj domeni što ukazuje na činjenicu da se članovi te obitelji vežu na jednake sljedove DNA i aktiviraju jednake promotore. Pored velike homologije, prisutne su i određene različitosti koje dovode do različite učinkovitosti vezanja na promotorski regiju pa tako transkripcija istih ciljnih gena neće biti jednako učinkovita ovisno o tome je li transkripcijski faktor p53, p63 ili p73. Budući da je za transkripcijsku aktivnost odgovoran C-kraj na kojem se događa alternativno prekrajanje, zaključuje se da C-kraj ima važnu ulogu u transkripcijskoj aktivnosti pojedinih izoformi proteina iz obitelji p53.

Dvije su skupine gena odgovornih za pokretanje apoptoze koje aktivira protein p53. Jedna skupina je neovisna o prisutstvu TAp63 i TAp73, a drugu skupinu je moguće aktivirati samo u prisutstvu TAp63 i TAp73. Time se može objasniti činjenica da su za pokretanje apoptoze ovisne o p53 potrebni funkcionalni TAp63 i TAp73 u visokim razinama čak i kada nisu prisutne mutacije u njihovim genima.

Proteini obitelji p53 interagiraju međusobno na dva načina. Prvi način je kooperacija i kompeticija regija u promotorima onih gena koje aktiviraju geni obitelji p53 i samih gena obitelji 53. Kod proteina p53 ključno područje za interakcije je DNA-vezujuća domena. Kod proteina p63 i p73 je to oligomerizacijsko područje. Ukoliko se na položaju 72 u proteinu p53 javlja polimorfizam, to će utjecati na vezanje TAp73. Polimorfizam 72Arg rezultirat će jačom interakcijom s drugim proteinima nego 72Pro. Ove dvije varijante aktiviraju iste ciljne gene, no 72Arg učinkovitije aktivira transkripciju nego 72Pro. Drugi način su direktne fizičke interakcije proteina obitelji p53. Time dolazi do promjene u funkciji heterotetramera koji se veže na DNA i njegove transkripcijske aktivnosti.<sup>30</sup>

## 2.5. Metoda *Western blot*

*Western blot* je često korištena i široko primjenjiva analitička i preparativna metoda u staničnoj i molekularnoj biologiji i biokemiji. Još se naziva i imunoblot, odnosno protein *blot*. Temelji se na interakciji ciljnog proteina sa specifičnim protutijelom čime se omogućuje detekcija tog proteina u uzorku. Koristi se za identifikaciju, kvantifikaciju i određivanje veličine ciljnih proteina te kvantifikaciju proteinske ekspresije. Razvila se iz metode *Southern blot*, koja se koristi za određivanje specifičnih sekvenci DNA u fragmentima razdvojenim gel-elektroforezom, te iz *northern blot* metode, koja se koristi za detekciju i kvantifikaciju RNA, te

određivanje njene veličine. *Northern blot* također uključuje razdvajanje fragmenata RNA gel-elektroforezom.

Metoda *western blot* provodi se kroz nekoliko koraka: priprema uzoraka, gel-elektroforeza, prijenos proteina na membranu, blokiranje nespecifičnih interakcija, inkubacija sa specifičnim protutijelima te detekcija proteina na membrani.

### 2.5.1. Priprema uzoraka

Najčešći tip uzorka za *western blot* je lizat stanica za čiju pripremu su potrebni puferi za lizu.

U puferu su sadržani i inhibitori proteaza te često i inhibitori fosfataza kako bi se spriječila razgradnja proteina i/ili njihova modifikacija. Za ekstrakciju proteina iz staničnog lizata pristupa se homogenizaciji ili sonikaciji. Nakon ekstrakcije proteina, određuje im se koncentracija kako bi rezultati bili usporedivi. Za kvantifikaciju koncentracije proteina u lizatu najčešće se koriste metoda BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*) te Bradfordov test, prilikom kojih se dobivena standardna krivulja koristi za određivanje koncentracije nepoznatog uzorka.

### 2.5.2. Gel-elektroforeza

Za razdvajanje proteina upotrebljava se gel-elektroforeza. Proteine je moguće odijeliti s obzirom na izoeletričnu točku, molekulsku masu, električni naboj ili kombinaciju navedenih svojstava.

Najčešće korišten tip elektroforeze je poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecil-sulfata (SDS-PAGE; engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) koji denaturira proteine te se veže na njih. Zbog toga svi proteini, koji su prije dodatka SDS-a imali različite naboje, postaju negativno nabijeni. Kao rezultat toga moguće je odjeljivanje proteina na temelju molekulske mase u električnom polju. Tretiranje proteina reducirajućim agensom i podvrgavanje temperaturi od ~95 °C također rezultira denaturacijom.

Priprema gela odvija se u dva koraka. Između dva stakla prvo se izljava tzv. gel za razdvajanje, koji je bazičan (pH = 8,8) i čije su pore manje. Na gel za razdvajanje zatim se izljava gel za sabijanje, koji je kiseo (pH = 6,8) i čije su pore veće. Veće pore gela za sabijanje ne omogućuju razdvajanje proteina, već samo formiranje tanje, oštrije vrpce na granici dva gela koje onda ulaze u gel za razdvajanje gdje se proteini razdvajaju na temelju molekulske mase djelovanjem električne struje.

### 2.5.3. Prijenos proteina na membranu

Nakon razdvajanja proteina u poliakrilamidnom gelu potrebno je proteine prenijeti na membranu. Obično se koriste nitrocelulozne membrane, ali također je moguće upotrijebiti membranu načinjenu od poliviniliden-difluorida (PVDF; engl. *polyvinylidene difluoride*) ili aktiviranog papira ili najlona.

Prijenos se odvija primjenom električnog polja okomito na površinu gela uzrokujući kretanje proteina iz gela prema membrani. Najčešće se koristi tzv. „mokri“ transfer pri čemu se sve komponente sustava za transfer namoče u pufer za prijenos.

### 2.5.4. Blokiranje nespecifičnih interakcija i inkubiranje sa specifičnim protutijelima

Za detekciju ciljnih proteina bitno je spriječiti nespecifično vezanje membrane i protutijela kojim se detektira ciljni protein. Za blokiranje se najčešće koristi otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA; engl. *bovine serum albumin*) ( $\varphi = 5\%$ ) ili nemasnog mlijeka u prahu u prikladnom puferu. Potrebno je paziti da je odabrana otopina za blokiranje prikladna za korišteni tip membrane.

Nakon blokiranja, najčešći pristup je inkubiranje membrane s primarnim protutijelom koje se veže na specifični antigen na membrani, ispiranje, zatim inkubiranje membrane sa sekundarnim protutijelom koje prepoznaje primarno protutijelo i veže se na njega te ponovno ispiranje. Dobra praksa je inkubacija primarnog protutijela u BSA budući da je primarno protutijelo obično potrebno dodati u višim koncentracijama nego sekundarno. Pripremom primarnog protutijela u BSA omogućuje se ponovna upotreba tog protutijela ako se prvim *blotom* ne dobiju dobri rezultati. Važan korak je i ispiranje membrane puferom za ispiranje između inkubacije s protutijelima. Ovaj korak smanjuje pozadinsko vezanje i uklanja nevezano protutijelo.

### 2.5.5. Detekcija proteina na membrani

Za detekciju proteina na membrani koriste se različite metode (npr. kolorimetrijske, radioaktivne i fluorescentne).

Najčešća metoda je kemiluminiscencija pa su stoga dostupni mnogi komercijalni kompleti za vizualizaciju koji se temelje na luminiscenciji i omogućuju relativnu kvantifikaciju proteina od interesa. Sekundarna protutijela često su u kompleksu s nekim enzimom koji omogućuje reakciju razgradnje kemiluminiscentnog reagensa dajući luminiscentni produkt koji je povezan

s količinom proteina. Taj enzim je najčešće peroksidaza iz hrena (HRP; engl. *horseradish peroxidase*).

Za detekciju metodom kemiluminiscencije se upotrebljava svjetlosni detektor, a svjetlost se detektira fotografskim filmom ili kamerom sa detektorom koji ima nabojem spregnuti sklop (CCD; engl. *charge-coupled device*). Kamera je bolji izbor jer je osjetljivija, ima veće razlučivanje i veći raspon ekspozicija nego fotografski film.

#### 2.5.6. Problemi i nedostaci metode i moguća rješenja

Iako je *western blot* relativno jednostavna metoda, mogući su razni problemi koji mogu dovesti do neočekivanih rezultata koji se mogu svrstati u pet kategorija: 1) neobične ili neočekivane vrpce, 2) izostanak vrpce, 3) blijede vrpce ili slab signal, 4) jak pozadinski šum, 5) mrlje ili nejednake točkice.

Neobične ili neočekivane vrpce mogu biti posljedica proteazne razgradnje. Da bi se to spriječilo preporučuje se priprema uzorka neposredno prije same analize kojeg je potrebno čuvati na ledu ili upotrijebiti drugo protutijelo. Ukoliko se položaj proteina čini previsoko na membrani, moguće je da nije razorena kvaterna struktura proteina pa je potrebno uzorak ponovno zagrijati čime se protein denaturira. Mutne ili nejasne vrpce često su posljedica prejake električne struje ili mjehurića zraka koji su zaostali u „sendviču“ prilikom prijenosa na membranu. To se može izbjeći primjenom nižeg napona i posebnom pažnjom prilikom pripreme samog „sendviča“. Neravne vrpce često su posljedica prebrzog gibanja proteina kroz gel zbog niskog otpora. Da bi se to izbjeglo, potrebno je prirediti prikladan sastav gela s obzirom na svojstva uzorka.

Izostanak vrpce često je posljedica neprikladnog protutijela (primarnog ili sekundarnog), a potrebno je pripaziti i na samu koncentraciju protutijela. Ako je koncentracija preniska, signal neće biti vidljiv. Kako treba pripaziti na koncentraciju i prisutnost prikladnog protutijela, tako treba obratiti pažnju i na koncentraciju i prisutnost antigena. U ovakvom slučaju moguće je upotrijebiti antigen iz drugog izvora kako bi se potvrdilo leži li problem u samom uzorku ili u korištenom protutijelu. Problem može biti i u puferima pa tako svi korišteni puferi i supstrati trebaju biti svježe pripremljeni i nekontaminirani. Ukoliko je, primjerice, pufer kontaminiran natrijevim-azidom, doći će do inaktivacije HRP. Samo ispiranje također ne smije trajati predugo.

Slab signal također može biti uzrokovan niskom koncentracijom protutijela i/ili antigena. Produljeno vrijeme ekspozicije može pomoći u boljem očitavanju signala. Uzrok slabom signalu može biti i prekrivanje signala otopinom nemasnog mlijeka u prahu. U tom slučaju je potrebno smanjiti korištenu količinu mlijeka ili koristiti otopinu BSA.

Jak pozadinski šum je često uzrokovan previsokom koncentracijom protutijela koje se veže za samu membranu. Također, problem može ležati u prestarim puferima ili prekratkim ispiranjima. Potrebno je pripaziti i na vrijeme ekspozicije.

Mrlje ili nejednake točkice uglavnom su posljedica lošeg prijenosa. Zaostali mjehurić zraka između gela i membrane će se prikazati kao tamna točka. Važno je koristiti zibalicu tijekom svih inkubacija. Ovaj problem može biti i rezultat nespecifičnog vezanja protutijela na reagens za blokiranje. U ovom slučaju potrebno je upotrijebiti drugi reagens. Na kraju, ovaj problem može biti uzrokovan i agregacijama sekundarnog protutijela. Ukoliko je to slučaj, centrifugiranje i filtriranje se koristi za uklanjanje agregata.<sup>35,36</sup>

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Osnovne kemikalije

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Proizvođač
2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat (H2DCF-dA)	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, SAD
bisakrilamid	Sigma-Aldrich, SAD
bromfenol plavo	Sigma-Aldrich, SAD
destilirana voda (deH <sub>2</sub> O)	
dimetil-sulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska
ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, SAD
etanol	Kemika, Hrvatska
etilendiamintetraoctenakiselina (EDTA)	Kemika, Hrvatska
glicerol	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
kalijev klorid	Kemika, Hrvatska
L-glutamin	Sigma-Aldrich, SAD
medij za uzgoj stanica (DMEM; engl. <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> )	Sigma-Aldrich, SAD
metanol	Kemika, Hrvatska
naftol modriilo	Kemika, Hrvatska
natrijev dodecil-sulfat (SDS; engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev hidrogenfosfat	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	Kemika, Hrvatska
<i>N,N,N,N</i> -tetrametildiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, SAD
obrano mlijeko u prahu	Dukat, Hrvatska
octena kiselina	Kemika, Hrvatska
penicilin	Gibco <sup>TM</sup> , SAD
redestilirana voda (reH <sub>2</sub> O)	
serum fetusa goveda (FBS; engl. <i>fetal bovine serum</i> )	Gibco <sup>TM</sup> , SAD
streptomicin	Gibco <sup>TM</sup> , SAD
tripsin	Sigma-Aldrich, SAD
Tris-baza	Sigma-Aldrich, SAD
Tween 20	Sigma-Aldrich, SAD
vodikov peroksid	Sigma-Aldrich, SAD

## 3.1.2. Pufferi, otopine, hranjiva podloga, kultura stanica

- SDS ( $w = 10\%$ ,  $pH = 7,2$ ): 10 g SDS + reH<sub>2</sub>O do 100 mL
- Matična otopina akrilamida: akrilamid ( $\varphi = 30\%$ ) + bisakrilamid ( $\varphi = 0,8\%$ )
- APS: 10 g amonijev persulfat + reH<sub>2</sub>O do 100 mL
- Fosfatni puffer (PBS; engl. *Phosphate buffered saline*): 4 g NaCl + 0,1 g KCl + 0,72 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + reH<sub>2</sub>O do 1000 mL
- Otopina za blokiranje membrane: 5 g obrano mlijeko u prahu + TBST do 100 mL
- Otopina za bojanje membrane: 0,5 g naftol modriilo + 50 mL etanol + 10 mL octena kiselina + reH<sub>2</sub>O do 500 mL
- Otopina za odbojavanje membrane: metanol ( $\varphi = 40\%$ ) + octena kiselina ( $\varphi = 7\%$ ), reH<sub>2</sub>O
- Puffer RIPA (engl. *Radioimmunoprecipitation assay*): Tris ( $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $pH = 8,0$ ) + NaCl ( $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + SDS ( $\varphi = 0,1\%$ ) + Igepal CA-630 ( $\varphi = 1\%$ ) + 0,5 deoksikolat
- Puffer TBST (10 ×) (engl. *Tris buffer saline Tween*): NaCl ( $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + Tris ( $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + 50 mL Tween-20 + reH<sub>2</sub>O do 500 mL
- Puffer za elektroforezu (10 ×): Tris-baza ( $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + glicin ( $c = 190 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + SDS ( $\varphi = 0,1\%$ )
- Puffer za nanošenje uzoraka, 4 × LB (engl. *Laemmli buffer*): 2 mL Tris ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $pH = 6,8$ ) + 617,2 mg DTT ( $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + 800 mg SDS ( $w = 10\%$ ) + 4 mL glicerol + 40 mg bromfenol plavo
- Puffer za prijenos (10 ×): Tris-baza ( $c = 184 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + glicin ( $c = 140 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + etanol ( $\varphi = 20\%$ )
- Stanična kultura neuroblastoma, stanična linija SH-SY5Y, dobivena ljubaznošću dr.sc. Gorana Šimića
- Tekuća hranjiva podloga DMEM kompletirana dodatkom FBS ( $\varphi = 10\%$ ) + L-glutamin ( $c = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) + 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina + 0,1 mg mL<sup>-1</sup> streptomocina
- Tris ( $pH = 6,8$ ): 60,57 g Tris + reH<sub>2</sub>O do 100 mL ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ )
- Tris ( $pH = 8,8$ ): 90,885 g Tris + reH<sub>2</sub>O do 500 mL ( $c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ )

## 3.1.3. Primarna i sekundarna protutijela

Tablica 2. Korištena primarna protutijela

Naziv	Porijeklo	Radna koncentracija	Izvor	Proteini/izoforme koje prepoznaje
421	Miš	1:1000	Dobiveno ljubaznošću dr.sc. J. C. Bourdona, Dundee, UK	p53 $\alpha$ , $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , $\Delta$ 160p53 $\alpha$
KJC8	Kunić	1:1000		p53 $\beta$ , $\Delta$ 40p53 $\beta$ , $\Delta$ 133p53 $\beta$ , $\Delta$ 160p53 $\beta$
KJCA $\gamma$	Kunić	1:500		p53 $\gamma$ , $\Delta$ 40p53 $\gamma$ , $\Delta$ 133p53 $\gamma$ , $\Delta$ 160p53 $\gamma$
SAPU	Ovca	1:5000		Sve izoforme proteina p53
DO-11	Miš	1:1000		
DO-12	Miš	1:2000		
EP436Y	Kunić	1:2000	Abcam, V. Britanija	Sve izoforme proteina p73
$\beta$ -aktin	Miš	1:2000	Proteintech, SAD	$\beta$ -aktin
ApoTrack™ Cytochrome c Apoptosis WB Antibody Cocktail	Miš	1:2000	Abcam, V. Britanija	GAPDH

Tablica 3. Korištena sekundarna protutijela

Naziv	Radna koncentracija	Izvor	Supstrat
Kozje protumišje <i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific</i>	1:5000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Kuniće protumišje <i>Amersham ECL Antimouse IgG, HRP-linked whole antibody</i>	1:3000	GE HealthCare, UK	HRP
Kozje protukuniće <i>Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody</i>	1:3000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Magareće protuovčje <i>Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L)</i>	1:10000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Magareće protukožje <i>Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)</i>	1:3000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Kozje protukuniće <i>Unconjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (H+L)</i>	1:500	Jackson Immuno Research, SAD	-

#### 3.1.4. Komercijalni kompleti, markeri i ostali materijal

- Biljeg molekulskih masa *Precision Plus Protein Standards Dual Color*, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD)
- Inhibitor fosfataza *PhosSTOP™, Phosphatase Inhibitor Tablets*
- Inhibitor proteaza *Complete™, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablet*
- Komercijalni komplet za određivanje koncentracije reduciranog glutationa (GSH) *GSH-Glo™ Glutathione Assay* (Promega, SAD)
- Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD) i kao standardi otopine proteina albumina iz govedeg seruma, (BSA; engl. *bovine serum albumine*) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$
- Komercijalni komplet za određivanje koncentracije ATP-a *CellTiter-Glo® 2.0 Assay* (Promega, SAD)
- Kompleti za detekciju proteina kemiluminiscencijom:  
*SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* i *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (oba Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD)  
*Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate* (PerkinElmer, SAD)



- Nitrocelulozna membrana za transfer proteina *GE Healthcare Amersham™ Protran™ NC Nitrocellulose Membrane*, pora promjera 0,2 μm

Tablica 4. Popis korištenih uređaja

Naziv uređaja	Proizvođač
Centrifuga <i>Sorvall Lynx 4000</i>	Thermo Fisher Scientific, SAD
Centrifuga, <i>Harrier 18/80</i>	MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo
Centrifuga, tip <i>51445 R i 5403</i>	Eppendorf, Njemačka
Čitač pločica <i>ELISA</i>	Multiscan MS Labsystems, Finska
Fluorescencijski spektrofotometar <i>Fluoroscanner Ascent FL</i>	Thermo Scientific
Inkubator za uzgoj stanica	Kambič, Slovenija
Invertni mikroskop <i>Wilovert S</i>	Hund Wetzlar, Njemačka
Kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Iskra, Slovenija
Magnetska miješalica <i>MSH Basic</i>	Ika, Njemačka
Pločica Bürker-Türk za brojanje stanica	Brand, Njemačka
Sustav za elektroforezu <i>Mini-Protean II</i>	BioRad, SAD
Termoblok, <i>Thermomixer Comfort</i>	Eppendorf, Njemačka
Uređaj za napajanje <i>Power Pac Basic Power Supply i PowerPac 300</i>	Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo
Uređaj za oslikavanje <i>Alliance 4.7</i>	Asal, Italija
Vaga, tip <i>PM 4000</i>	BioRad, SAD
Vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip <i>1083</i>	UVItec Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo
Zibalica <i>PMR-30 Rocking Shaker</i>	Mettler Toledo, SAD
Zibalica za mikrotitarske pločice, tip <i>715</i>	GFL, Njemačka

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Rad sa staničnom kulturom

Istraživanje je provedeno u kulturi stanica SH-SY5Y. Ove stanice su porijeklom od neuroblastomske stanične linije SK-N-SH koja je dobivena nakon biopsije koštane srži četverogodišnje djevojčice koja je bolovala od neuroblastoma. Stanice se u kulturi mogu uzgajati adherirane na podlogu ili u suspenziji.<sup>37</sup>

Rad sa stanicama odvijao se u sterilnim uvjetima u kabinetu s laminarnim protokom zraka pri čemu su sav pribor i kemikalije bili sterilni. Stanice su rasle u inkubatoru pri temperaturi 37 °C, volumnom udjelu ugljikova dioksida od 5% i relativnoj vlažnosti od 95%. Sterilizacija radne površine provođena je UV-svjetlom minimalno 20 minuta prije početka rada te je radna površina dezinficirana etanolom.

### 3.2.2. Priprema i uzgoj stanica

Prije početka rada sa stanicama, stanice su bile zamrznute i čuvane na temperaturi -80 °C ili u tekućem dušiku u krioprotektivnom mediju. Stanice su odmrznute grijanjem u vodenoj kupelji, a nakon odmrzavanja preseljene u sterilnu staklenu epruvetu te im je dodano 5 mL svježe pripremljenog kompletiranog medija DMEM koji se priredio na način da su se DMEM mediju dodali FBS ( $\varphi = 10\%$ ) i 2 mmol dm<sup>-3</sup> L-glutamina te 100 U mL<sup>-1</sup> penicilina i 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomicina. Pripremljena stanična suspenzija centrifugirana je tijekom 5 min na 250 g, a nakon toga supernatant je odliven, a talogu je dodano 5 mL medija. Talog je resuspendiran te je sve zajedno preneseno u plastičnu Falcon posudu za stanični uzgoj površine 25 cm<sup>2</sup>.

Stanice su presađivane otprilike svaka tri dana, odnosno kada su dostigle 80-90% konfluentnosti u kompletiranom DMEM mediju. Presađivanje stanica vršeno je na sljedeći način: iz Falcon posude u kojoj su stanice rasle odsisan je medij. Nakon toga su stanice ispirane s 2 × 2 mL PBS-a, koji je također odsisan nakon ispiranja. Stanicama se, potom, dodao 1 mL otopine čiji je sastav tripsin ( $\varphi = 0,05\%$ ) i 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA u PBS-u. Otopina je, također, odmah odsisana, nakon čega se pričekalo 5 min kako bi se stanice pod djelovanjem tripsina odvojile jedne od drugih i od podloge. Nakon toga su stanice resuspendirane u 2 mL kompletiranog medija, a stanična suspenzija razrijeđena je u omjeru 1:10 u kompletiranom mediju.

### 3.2.3. Brojanje stanica

Da bi se mogao uzeti broj stanica potrebnih za daljnje eksperimente, potrebno je bilo prebrojati stanice. U tu svrhu se pomiješalo 20  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica, koje su prethodno tretirane tripsinom i resuspendirane u tekućem mediju, s 50  $\mu\text{L}$  otopine tripanskog modrila i 30  $\mu\text{L}$  DMEM medija. Mali volumen te pripremljene otopine prenio se na Bürker-Türk pločicu za brojanje stanica, pod pokrovno stakalce pazeći pritom da je cijela površina ispod stakalca prekrivena pripređenom otopinom. Brojanje stanica vršeno je pod svjetlosnim mikroskopom u četiri kvadrata komorice. Broj stanica u jednom mililitru stanične suspenzije dobiven je na sljedeći način: (ukupan broj stanica/broj polja)  $\times$  5 (razrjeđenje)  $\times$  250  $\times$  10<sup>3</sup>.

### 3.2.4. Tretiranje stanica SH-SY5Y vodikovim peroksidom

Praćen je učinak vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na stanice SH-SY5Y. U tu svrhu pripremljene su otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  različitih koncentracija. Razrijeđena je početna otopina  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentracije 10 mol  $\text{dm}^{-3}$  u DMEM mediju tako da se dobiju otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  sljedećih koncentracija: 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 i 1000  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Stanice SH-SY5Y nasadene su u mikrotitarske pločice s 96 bunarića (20  $\times$  10<sup>3</sup> po bunariću) 24 sata prije provođenja eksperimenta. Na dan tretmana stanice su tretirane sa 100  $\mu\text{L}$  otopine određene koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Za svaku koncentraciju istovremeno su izvođena 4 paralelna ponavljanja (kvadriplikati). Tako tretirane stanice ostavljene su u inkubatoru tijekom 24 sata. Kao kontrola su korištene netretirane stanice.

### 3.2.5. Određivanje preživljenja stanica SH-SY5Y testom MTT

Preživljenje stanica nakon tretmana vodikovim peroksidom praćeno je testom MTT. To je kolorimetrijska metoda koja se temelji na razgradnji supstrata metiltiazoliltetrazolij-bromida (MTT) djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza što se uočava kao promjena boje iz blijedožute (boja supstrata) do tamnoljubičaste (nastanak formazana) pri čemu je količina nastalog formazana u korelaciji s brojem vijabilnih stanica. Nastali produkt apsorbira u UV/Vis dijelu spektra pa je intenzitet obojenja moguće odrediti spektrofotometrijski.

24 sata nakon dodatka otopinâ  $\text{H}_2\text{O}_2$  u bunariće sa stanicama, odsisan je medij te je dodano 40  $\mu\text{L}$  1  $\times$  MTT supstrata po bunariću. Pločice su vraćene u inkubator na tri sata, a nakon toga je u svaki bunarić dodano po 160  $\mu\text{L}$  DMSO-a koji omogućava otapanje nastalog formazana. Pločica sa stanicama, MTT reagensom i DMSO kratko je protresena na zibalici te je očitana apsorbancija pri valnoj duljini 570 nm na automatskom čitaču mikrotitarskih pločica.

### 3.2.6. Nastajanje ROS-a

Mjerenje porasta ROS-a u stanicama nakon tretmana s  $\text{H}_2\text{O}_2$  provedeno je uz pomoć spoja 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (H2DCF-dA), koji se oksidira u prisutnosti ROS-a dajući fluorescentni produkt. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini ROS-a.

Nakon 24 sata inkubacije stanica s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , stanice su inkubirane s  $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$  reagensom H2DCF-dA u PBS-u jedan sat. Zatim su isprane i inkubirane još jedan put u PBS-u. Intenzitet fluorescencije mjeren je na fluorescencijskom spektrofotometru pri pobudnoj valnoj duljini od 485 nm i emisijijskoj od 538 nm. Kao kontrola su korištene netretirane stanice. Svaki eksperiment je proveden u kvadriplikatima.

### 3.2.7. Određivanje koncentracije staničnog ATP-a

Ovaj test korišten je za praćenje preživljenja stanica. Isto kao i za određivanje ROS, u bijele mikrotitarske pločice s 96 bunarića nasađeno je  $20 \times 10^3$  stanica SH-SY5Y. Stanice su tretirane otopinama  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentracija 300, 500 i  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$  u kvadriplikatima. Također su korištene i kontrolne stanice koje nisu bile tretirane peroksidom. Nakon 24 sata tretmana, pločica sa stanicama ostavljena je 30 min na sobnoj temperaturi. Na  $100 \mu\text{L}$  medija sa stanicama u bunarić je dodano  $100 \mu\text{L}$  *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> 2.0 reagensa (u reakciji kataliziranoj enzimom luciferaza dolazi do oksigenacije luciferina i stvaranja luminiscentnog signala u prisutnosti iona magnezija, molekularnog kisika i ATP-a koji je porijeklom iz stanica. Intenzitet luminiscencije je proporcionalan unutarstaničnoj koncentraciji ATP-a, odnosno broju stanica u kulturi). Pločica je nakon dodatka reagensa ostavljena 2 min na zibalici kako bi se osigurala potpuna liza stanica te je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se stabilizirao luminiscentni signal koji je potom očitao na luminometru (*Fluoroskan Ascent FL*, Thermo Scientific) uz vrijeme integracije signala od 0,8 s po bunariću.

### 3.2.8. Određivanje koncentracije reduciranog glutationa

Reducirani glutation je jedan od najvažnijih neenzimskih antioksidanasa u eukariotskim stanicama. Smanjenje koncentracija reduciranog glutationa u stanicama događa se zbog interakcije s ROS i njegova antioksidacijskog djelovanja.

Ovaj test temelji se na reakciji prevođenja derivata luciferina u luciferin koju katalizira glutation-S-transferaza. Nastali luciferin detektira se kao luminiscentni signal čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji reduciranog glutationa u stanicama.

Pokus je proveden na način da je stanicama nasađenima u bijele mikrotitarske pločice odsisan medij te je, nakon provedenog tretmana vodikovim peroksidom (24 h) u svaki bunarić dodano po 100  $\mu\text{L}$  *GSH-Glo*<sup>TM</sup> reagensa (u prvom koraku se derivat luciferina pretvara u luciferin u reakciji koju katalizira glutation-S-transferaza u prisutnosti glutationa. U drugoj reakciji se pomoću enzima luciferaze luciferin detektira u obliku luminiscentnog signala, a intenzitet luminiscencije proporcionalan je koncentraciji GSH u uzorku). Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je u svaki bunarić dodano po 100  $\mu\text{L}$  reagensa za detekciju luciferina. Pločica je kratko promiješana i nakon 15 min detektirana emitirana svjetlost na luminometru. Pokusi su provedeni u duplikatima.

### 3.2.9. Priprema stanica za analizu western blot

Za analizu *western blot* stanice su uzgajane u plastičnim posudama Falcon za stanični uzgoj površine 25  $\text{cm}^2$ . U svaku posudu je nasađeno  $2 \times 10^6$  stanica koje su nakon 24 sata tretirane otopinama  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentracija 300, 500 i 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Posude sa stanicama i  $\text{H}_2\text{O}_2$  vraćene su u inkubator gdje su ostale 24 sata.

### 3.2.10. Izolacija proteina iz stanica

Nakon 24 sata inkubacije stanica s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , stanice su odvojene od podloge uz pomoć strugalice. Cijeli postupak se odvijao na ledu da bi se sprječila razgradnja proteina. Zajedno s medijem, stanice su prenesene u plastične Falcon epruvete volumena 15 mL te su centrifugirane 5 min na 250 g. Supernatant je bačen, a talog zaostao nakon centrifugiranja je ispran PBS-om, te je ponovljeno centrifugiranje 5 min na 250 g. Supernatant je ponovno odsisan, a na talog dodan hladni pufer RIPA u kojeg su dodani inhibitori proteaza. Stanice su lizirane na ledu, a sadržaj centrifugiran 15 min pri 4 °C i na 14000 g. Supernatant je prenesen u Eppendorf epruveticu od 1,5 mL i čuvan na -80 °C do upotrebe.

### 3.2.11. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u staničnom lizatu određena je metodom bicinkonične kiseline (BCA). Tom metodom se određuje ukupna koncentracija svih proteina u uzorku, a sama metoda temelji

se na interakciji proteina i bakrovih(II) iona u bazičnim uvjetima pri čemu nastaje njihov kompleks, a bakrovi(II) ioni reduciraju se do bakrovih(I) iona. Ova reakcija naziva se biuretska reakcija. Dalje reducirani bakar reagira s bicinkoničnom kiselinom dajući intenzivno ljubičasto obojen produkt koji se otapa u vodi i čiji je apsorpcijski maksimum na 562 nm. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski, a intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji. Koncentracija proteina određena je iz standardne krivulje uz pomoć jednadžbe pravca koja je dobivena mjerenjem apsorbancija standardnih otopina BSA.

Postupak određivanja koncentracije proveden je na način da je u bunariće prozirne mikrotitarske pločice dodano po 20  $\mu\text{L}$  pripremljenih standardnih otopina BSA čije su koncentracije 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . U jedan od bunarića dodano je 20  $\mu\text{L}$  reH<sub>2</sub>O što je služilo kao negativna kontrola, dok je u ostale bunariće dodano po 20  $\mu\text{L}$  uzoraka kojima se željela odrediti koncentracija. Uzorci su nanoseni u duplikatima. U svaki od ovih bunarića dodano je po 200  $\mu\text{L}$  BCA reagensa svježe pripremljenog miješanjem vodenih otopina A (koja sadrži natrijev karbonat, natrijev hidrogenkarbonat, bicinkoničnu kiselinu i natrijev tartarat u 0,1 mol dm<sup>-3</sup> natrijevom hidroksidu) i B (koja sadrži bakrov(II) sulfat ( $w = 4\%$ )) u omjeru 50:1. Pločica s uzorcima, standardima i reagesom je promiješana na zibalici te zatim inkubirana u vodenoj kupelji tijekom 30 min na temperaturi 37 °C. Nakon 30 min pločica je ostavljena na sobnoj temperaturi dok nije poprimila istu te je spektrofotometrijski očitana apsorbancija pri 570 nm. Iz apsorbancija standardnih otopina BSA dobiven je baždarni pravac iz kojega su onda interpolacijom određene nepoznate koncentracije proteina u uzorku.

### 3.2.12. Poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak SDS-a

Nakon što je određena koncentracija proteina, korištena je poliakrilamidna gel-elektroforeza u denaturirajućim uvjetima za razdvajanje proteina. Proteini se na ovaj način odjeljuju na temelju molekulske mase. U tu svrhu pripremani su gelovi za razdvajanje s različitim udjelima akrilamida ( $\varphi = 8\%$ ,  $\varphi = 10\%$ ,  $\varphi = 11\%$ ) i gel za sabijanje ( $\varphi(\text{akrilamid}) = 5\%$ ). Sastav tih gelova prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Sastav gela za sabijanje i gelova za razdvajanje

Komponenta	Gel za razdvajanje ( $\varphi$ (akrilamid) = 8%)	Gel za razdvajanje ( $\varphi$ (akrilamid) = 10%)	Gel za razdvajanje ( $\varphi$ (akrilamid) = 11%)	Gel za sabijanje ( $\varphi$ (akrilamid) = 5%)
	Volumen / mL	Volumen / mL	Volumen / mL	Volumen / mL
reH <sub>2</sub> O	4,6	4	3,65	2,7
matična otopina akrilamida ( $\varphi$ (akrilamid) = 30%)	2,7	3,3	3,65	0,67
1,5 mol dm <sup>-3</sup> Tris (pH = 8,8)	2,5	2,5	2,5	-
1 mol dm <sup>-3</sup> Tris (pH = 6,8)	-	-	-	0,5
SDS ( $w$ = 10%)	0,1	0,1	0,1	0,04
APS ( $w$ = 10%)	0,1	0,1	0,1	0,04
TEMED	0,006	0,004	0,007	0,004

Prije izljevanja pripremljenih gelova stakla su oprana detergentom te isprana reH<sub>2</sub>O i etanolom. Sklopljena su tako da dobro prijanjaju jedno uz drugo te da nema curenja gela iz sustava. Prvo je izliven gel za razdvajanje pazeći pritom da nema zaostalih mjehurića zraka. Na gel za razdvajanje nanijelo se otprilike 1 mL reH<sub>2</sub>O da bi se izbjegao kontakt sa zrakom. Nakon što se gel polimerizirao, voda je odlivena, a svježe pripremljen gel za razdvajanje je izliven na polimerizirani gel za razdvajanje. Odmah po izljevanju gela umetnut je češljic za formiranje jažica s posebnom pažnjom da ne bi zaostali mjehurići zraka. Nakon što je gel polimerizirao, uklonjen je češljic, nastale jažice isprane pod blagim mlazom reH<sub>2</sub>O, i stakla s gelovima složena u sustav za elektroforezu. Uliven je pufer za elektroforezu između stakala tako da prekrije stakla u potpunosti.

Za svaki uzorak izračunat je volumen koji sadrži 20-40  $\mu$ g proteina (ovisno o vrsti proteina kojeg smo detektirali) te volumen pufera za nanošenje uzoraka na gel (4  $\times$  LB) te fosfatnog pufera (PBS). Pripremljeni uzorci su grijani na 95 °C tijekom 5 min kako bi se denaturirali, nakon čega su kratko centrifugirani. Pripremljeni uzorci su nanoseni u jažice gela, a u jednu jažicu je nanešen i marker molekulskih masa. Aparatura za elektroforezu priključena je na izvor električne struje te je pokrenuta elektroforeza uz napon od 90 V tijekom 30 min dok uzorci nisu došli do granice gela za sabijanje i gela za razdvajanje, nakon čega je napon pojačan na 120 V do kraja elektroforeze što je trajalo još 90 min. Elektroforeza je bila završena kada je plava boja bromfenol plavo, koja je sadržana u puferu za nanošenje uzoraka, stigla do donjeg ruba gela za razdvajanje.

### 3.2.13. Prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu

Kad je završila elektroforeza, potrebno je bilo pripremiti aparaturu za prijenos. Gel je izvađen iz sustava za elektroforezu te je uklonjen gel za sabijanje. Korišten je princip mokrog prijenosa pri čemu su sve komponente namočene u puferu za prijenos. Prva se u sustav slaže spužvica koja ide na tamni dio kazete. Na spužvicu su stavljena dva filter papira, zatim gel pa nitrocelulozna membrana izrezana na veličinu gela te potom ponovno dva filter papira pa spužvica. Sve komponente su pažljivo složene u „sendvič“ pazeći da nema zaostalih mjehurića zraka. Kazeta je zatvorena i složena u sustav za prijenos. U sustav je stavljena i posudica s ledom koja sprječava pregrijavanje. U kadicu je također stavljen i magnetički te je potom sustav za prijenos stavljen na magnetsku mješalicu i spojen na izvor električne energije uz napon od 12 V ako je transfer provođen preko noći ili jakost struje od 200 mA ako je provođen tijekom dva sata.

### 3.2.14. Blokiranje i inkubacija s protutijelima

Nakon prijenosa, nitrocelulozna membrana je inkubirana u otopini za bojanje (naftolno modrilo) da bi se vizualizirali proteini na membrani i provjerila učinkovitost prijenosa proteina s gela na membranu. Nakon toga je membrana odbojavana u otopini za odbojavanje. Nakon odbojavanja membrana je blokirana u otopini nemasnog mlijeka u prahu ( $w = 5\%$ ) u  $1 \times$  TBST-u (ako se radilo o membrani na kojoj će se detektirati ukupni p53, p53 $\alpha$  izoforme, ukupni p73, TAp73 izoforme ili  $\Delta$ Np73 izoforme), odnosno u  $1 \times$  PBST-u (ako se radilo o membrani na kojoj će se detektirati p53 $\beta$  i p53 $\gamma$  izoforme).

Nakon blokiranja membrane su ispirane 3 puta po 10 min u TBST puferu ili PBST puferu, opet ovisno o tome koji proteini i koje izoforme će biti detektirane na membrani. Nakon ispiranja, membrana je inkubirana s primarnim protutijelom preko noći na zibalici na temperaturi od 4 °C ili na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata. Korištena primarna protutijela prikazana su u Tablici 2. Nakon inkubacije nevezano primarno protutijelo uklonjeno je ispiranjem membrane 3 puta po 10 min u TBST ili PBST puferu.

Za detekciju svih proteina osim izoformi p53 $\beta$  i p53 $\gamma$ , provođen je *western blot* u dva stupnja. Membrana je nakon ispiranja inkubirana s prikladnim sekundarnim protutijelom koje je u kompleksu s HRP. Inkubacija je trajala jedan sat na sobnoj temperaturi na zibalici. Popis korištenih sekundarnih protutijela nalazi se u Tablici 3. Nevezano sekundarno protutijelo uklonjeno je ispiranjem membrane u TBST puferu.



Ukoliko su se na membrani detektirale p53 $\beta$ , odnosno p53 $\gamma$  izoforme proveden je *western blot* u tri stupnja. Membrana je nakon ispiranja inkubirana s prikladnim sekundarnim protutijelom koje nije u kompleksu s HRP tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon toga je membrana ispirana s PBST-om te inkubirana s drugim sekundarnim protutijelom koje je u kompleksu s HRP i veže se specifično na prethodno sekundarno protutijelo. Inkubacija je trajala sat vremena na sobnoj temperaturi nakon čega je membrana ispirana u PBST puferu.

Osim protutijela specifičnih za ciljni protein, korištena su i protutijela za GAPDH i  $\beta$ -aktin. Signali dobiveni za ta dva proteina korišteni su za normalizaciju, budući da je ekspresija GAPDH i  $\beta$ -aktina u stanicama neovisna o tretmanu. Radi uštede materijala, membrane su rezane između 40 i 50 kDa jer je signal za GAPDH na oko 39 kDa, pa je bilo moguće u isto vrijeme oba dijela membrane inkubirati s različitim protutijelima.

#### 3.2.15. Detekcija ciljnih proteina

Zahvaljujući kompleksu sekundarnih protutijela s HRP, omogućena je vizualizacija djelovanjem na kemiluminiscentni supstrat. Proteini su vizualizirani otopinama za detekciju kemiluminiscencije koje su navedene u poglavlju 3.1.4. Otopine za vizualizaciju su pripravljene miješanjem u omjeru 1:1, ukoliko se radilo o kompletu *Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate*. Oko 1 mL pripremljenog supstrata je nanoseno na membranu, s kojom je inkubiran jednu minutu u tami. Nakon toga je višak reagensa uklonjen papirnom maramicom. Ukoliko se radi o kompletima *SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate* i *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate*, tada je otopina za vizualizaciju pripravljena u omjeru 3:3:1:1, oko 1 mL je nanosen na membranu te inkubiran 5 min s membranom nakon čega je višak supstrata uklonjen papirnom maramicom. Membrana je prenesena u uređaj koji detektira kemiluminiscentni signal.

#### 3.2.16. Obrada rezultata

Program *GraphPad Prism 5* je korišten za statističku obradu i grafički prikaz podataka. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje srednje vrijednosti. Također je provedena jednostruka analiza varijance (ANOVA), kako bi se odredile značajne razlike između analiziranih grupa. Tukeyev test je proveden za međusobnu usporedbu svih skupina, a Dunnettov test za usporedbu tretiranih uzoraka s kontrolnim uzorkom. Razlike između skupina se smatraju značajnim kada je vjerojatnost pogreške, P, manja od 0,05.

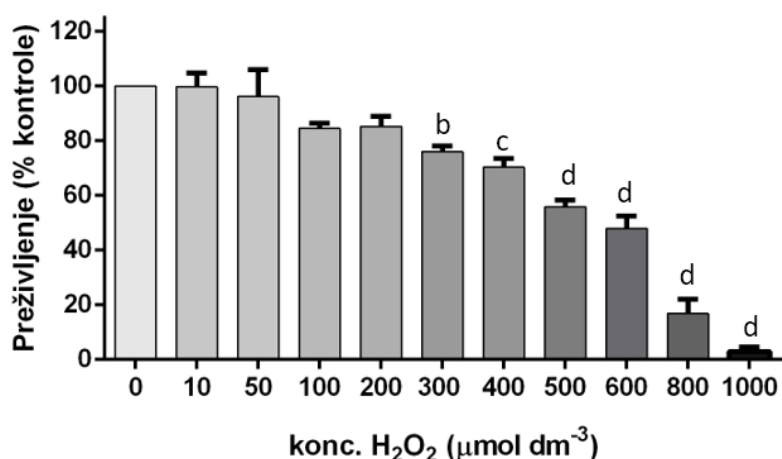
## § 4. REZULTATI

### 4.1. Preživljenje stanica SH-SY5Y i nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta nakon tretmana vodikovim peroksidom

#### 4.1.1. Utjecaj $H_2O_2$ na preživljenje stanica SH-SY5Y

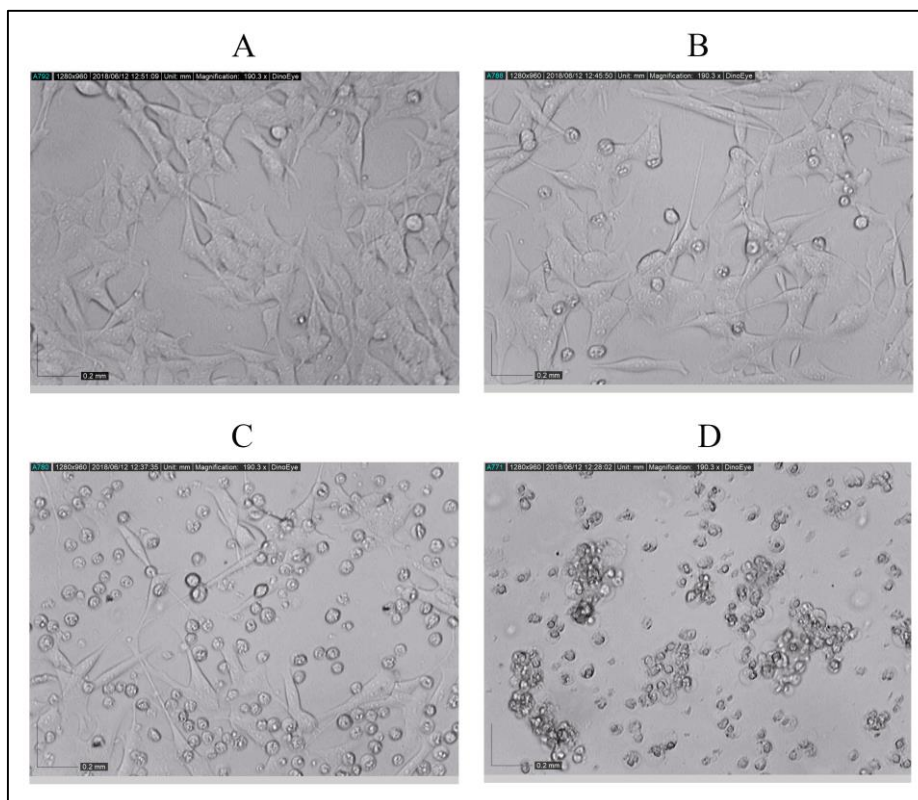
Stanice SH-SY5Y su tretirane različitim koncentracijama  $H_2O_2$ , a tretman je trajao 24 sata. Nakon 24 sata testom MTT mjerena je njihova metabolička aktivnost koja je proporcionalna broju vijabilnih stanica u uzorku. Koncentracije  $H_2O_2$  su bile sljedeće: 0, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 i 1000  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Rezultati su izraženi kao postotak apsorbancije stanica tretiranih  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolni netretirani uzorak. Rezultati su prikazani na slici 3.

$H_2O_2$  u koncentraciji 10  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  nije imao utjecaja na preživljenje stanica. Pri koncentracijama 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i 200  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  uočen je trend pada u vijabilnosti, iako taj pad nije dostigao razinu statističke značajnosti. Značajno smanjenje preživljenja dobiveno je pri koncentraciji od 300  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Pri toj koncentraciji preživljenje je iznosilo  $76,0 \pm 2,1\%$  u odnosu na kontrolni uzorak. Koncentracija od 400  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  je smanjila preživljenje na  $70,4 \pm 3,2\%$ . Tretman  $H_2O_2$  koncentracije 500  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  je doveo do odumiranja skoro 50% stanica u odnosu na netretirani uzorak. Preživljenje je iznosilo  $55,9 \pm 2,4\%$ , dok je koncentracija od 600  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  smanjila preživljenje za 52% i ono je iznosilo  $48,0 \pm 4,6\%$ . Koncentracija od 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  smanjila je preživljenje na  $16,8 \pm 5,2\%$ , dok je kod 1000  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  koncentracije preživjelo samo  $2,9 \pm 1,7\%$  tretiranih stanica. Za daljnje eksperimente odabrane su koncentracije 300, 500 i 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  kao koncentracije pri kojima se uočava dovoljno različit učinak  $H_2O_2$  na preživljenje stanica SH-SY5Y.



Slika 3. Učinak različitih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na preživljenje stanica SH-SY5Y. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. (Oznaka b: P < 0,01; oznaka c: P < 0,001, oznaka d: P < 0,0001 u usporedbi s netretiranim stanicama prema Dunnettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

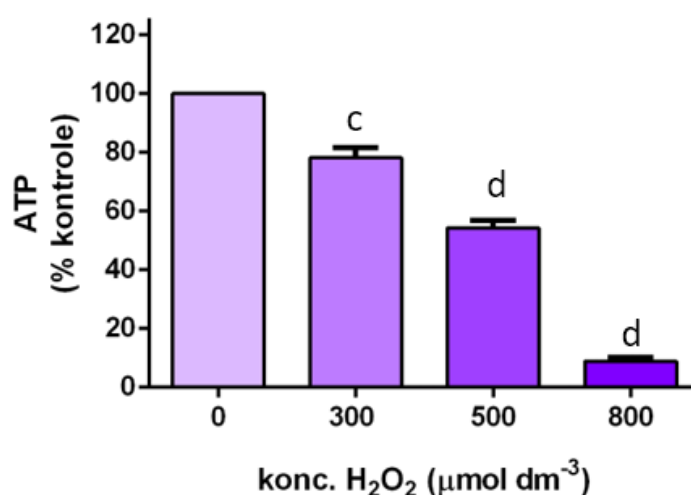
Na slici 4 prikazan je izgled stanica SH-SY5Y nakon tretiranja odabranim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kontrolne stanice SH-SY5Y imaju karakterističan izgled epitelnih stanica, rastu u nakupinama u jednom sloju i pričvršćene su za podlogu na kojoj rastu. Veće okrugle stanice koje su vidljive na slici 4A su stanice u diobi. Pri 300 µmol dm<sup>-3</sup> koncentraciji ne uočavaju se značajnije morfološke promjene, ali vidljivo je smanjenje gustoće stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, te se u mediju mogu vidjeti manje okrugle stanice koje nisu preživjele tretman (slika 4B). Pri 500 µmol dm<sup>-3</sup> koncentraciji uočljiv je velik broj mrtvih okruglih stanica koje plutaju u mediju, a preživjele stanice su i dalje pričvršćene uz podlogu posude za staničnu kulturu. Imaju više izduženi fenotip i slabiju međustaničnu povezanost u usporedbi s kontrolnim stanicama (slika 4C). Pri najvišoj koncentraciji velik je broj manjih okruglih tj. mrtvih stanica u staničnom mediju. Preživjele stanice su također zaokružene, ali nešto većeg volumena i vrlo slabo pričvršćene za podlogu posude (slika 4D).



Slika 4. Morfološke promjene stanica SH-SY5Y tretiranih različitim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A) kontrolne netretirane stanice, B) stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , C) stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , D) stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ . Slikano svjetlosnim mikroskopom s faznim kontrastom (povećanje  $390 \times$ )

#### 4.1.2. Utjecaj $\text{H}_2\text{O}_2$ na koncentraciju staničnog ATP-a

Pored testa MTT proveden je još jedan test vijabilnosti stanica. Istraženo je kako tretman stanica SH-SY5Y odabranim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 24 sata utječe na koncentraciju staničnog ATP-a. Njegova je unutarstanična koncentracija proporcionalna broju živih, metabolički aktivnih stanica. Rezultati su izraženi kao postotak luminiscencije tretiranih stanica u odnosu na kontrolnu grupu stanica. Rezultati su prikazani na slici 5. Tretman stanica  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$  koncentracijom  $\text{H}_2\text{O}_2$  smanjio je koncentraciju staničnog ATP-a na  $78,2 \pm 3,4\%$  kontrolne grupe. Kod koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$  taj je pad iznosio  $45,7\%$ , dakle koncentracija staničnog ATP-a smanjena je na  $54,3 \pm 2,6\%$ . Najviša koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$  smanjila je koncentraciju staničnog ATP-a na  $8,9 \pm 1,2\%$  u odnosu na netretirane stanice.

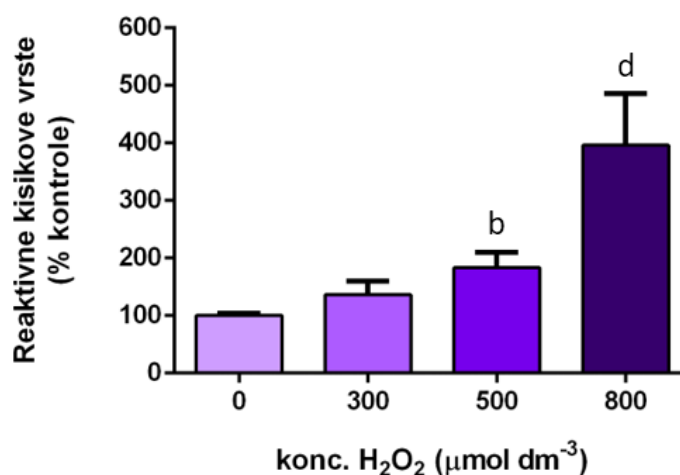


Slika 5. Učinak odabranih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na koncentraciju staničnog ATP-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. (Oznaka c: P < 0,001, oznaka d: P < 0,0001 u usporedbi s netretiranim stanicama prema Dunnettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

#### 4.1.3. Utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta u stanicama SH-SY5Y

Kao mjera razine oksidacijskog stresa praćeno je nakupljanje ROS-a u stanicama SH-SY5Y nakon izlaganja odabranim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rezultati su izraženi kao promjena u intenzitetu fluorescencije u usporedbi s kontrolnom grupom budući da količina ROS-a u stanicama korelira s intenzitetom fluorescencije produkta koji nastaje hidrolizom spoja H<sub>2</sub>DCF-dA. Rezultati su prikazani na slici 6.

U stanicama tretiranim 300 µmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uočava se porast ROS od 36,1 ± 8,0%. Koncentracija od 500 µmol dm<sup>-3</sup> izazvala je povećanje nakupljanja ROS-a od 83,5 ± 8,8%, dok je u stanicama tretiranim 800 µmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentracija unutarstaničnih ROS iznosila 396,2 ± 31,8% u odnosu na kontrolnu skupinu.

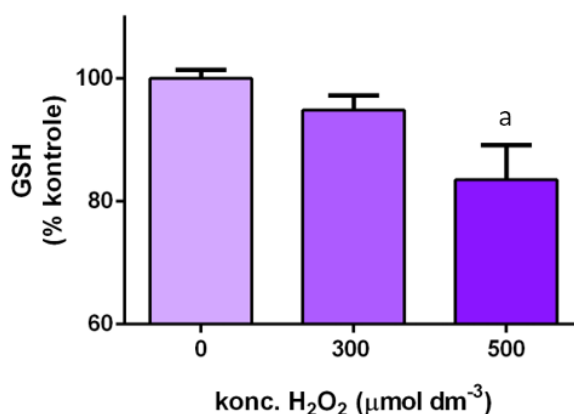


Slika 6. Učinak odabranih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na nastajanje ROS-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. (Oznaka b: P < 0,01; oznaka d: P < 0,0001 u usporedbi s netretiranim stanicama prema Dunnettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

#### 4.1.4. Utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u stanicama SH-SY5Y

Koncentracija reduciranog glutationa u stanicama SH-SY5Y dodatno je praćena kao potvrda oksidacijskog stresa. U stanicama kod kojih je došlo do nakupljanja ROS-a troši se GSH koji nastale ROS-ove uklanja antioksidacijskom aktivnošću. U našem istraživanju praćena je promjena u koncentraciji GSH u stanicama tretiranim dvjema koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 300 i 500 µmol dm<sup>-3</sup>. Rezultati su izraženi kao promjena u intenzitetu luminiscencije u odnosu na kontrolnu skupinu stanica i prikazani su na slici 7.

Tretman stanica SH-SY5Y 300 µmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nije izazvao značajan pad koncentracije GSH. Izmjerena je njegova koncentracija od 94,9 ± 2,4% u usporedbi s kontrolnom skupinom. Međutim, pri koncentraciji primjenjenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od 500 µmol dm<sup>-3</sup> došlo je do značajnog smanjenja koncentracije GSH i ona je iznosila 83,5 ± 5,7% u odnosu na koncentraciju izmjerenu u netretiranim stanicama SH-SY5Y.



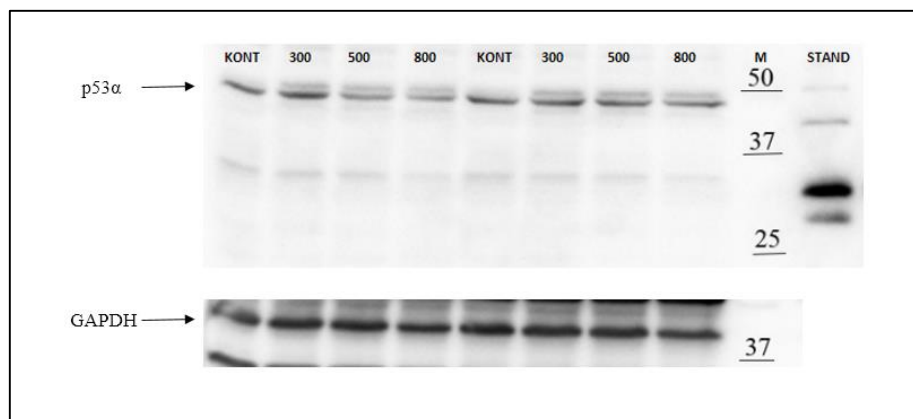
Slika 7. Učinak odabranih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na unutarstaničnu koncentraciju GSH. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. (Oznaka a: P < 0,05 u usporedbi s netretiranim stanicama prema Dunnettovom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

## 4.2. Utjecaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ekspresiju proapoptotskih proteina p53 i p73

Za razjašnjavanje molekularnog i staničnog odgovora na oksidacijski stres, praćene su promjene u ekspresiji izoformi proteina p53 i p73 u stanicama tretiranim trima odabranim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300, 500 i 800 µmol dm<sup>-3</sup>). Rezultati analize *western blot* su denzitometrirani i normalizirani u odnosu na ekspresiju jednog od kontrolnih (*housekeeping*) gena, β-aktina ili gliceralhid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH), čija se ekspresija smatra konstantnom u različitim eksperimentalnim uvjetima.

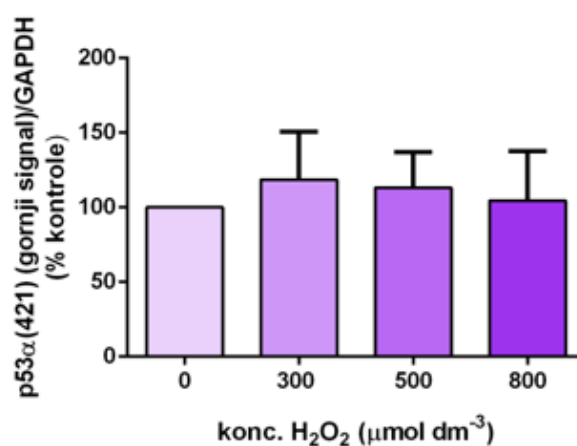
### 4.2.1. Ekspresija izoformi proteina p53

*Western blot* metodom praćena je ekspresija izoformi p53α, p53β i p53γ proteina p53. Ekspresija α izoformi praćena je pomoću protutijela 421 čiji se epitop nalazi u C-terminalnoj baznoj domeni. Nakon svih provedenih postupaka detektirana su dva signala. Korištenjem proteinskog markera molekularskih masa vidljivo je da se gornja vrpca nalazi na nešto manje od 50 kDa, dok je druga na približno 35 kDa. Dobivene vrpce prikazane su na slici 8. Korištenjem standardâ za 4 izoforme humanog proteina p53α i spomenutog proteinskog markera, pretpostavljamo da gornja vrpca odgovara kanonskom p53 proteinu, ili proteinu p53α veličine 53 kDa, a donja vrpca izoformi Δ133p53α.



Slika 8. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju  $\alpha$  izoformi proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je 421. (KONT - netretirani uzorak, 300 – uzorak tretiran  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – uzorak tretiran  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – uzorak tretiran  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , M – marker molekulskih masa, STAND – standard za 4  $\alpha$  izoforme humanog proteina p53)

Denzitometrijskom analizom bilo je moguće odrediti ekspresiju samo gornje vrpce, dok donji signal zbog slabe ekspresije nije bilo moguće kvantificirati. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji proteina GAPDH čija je vrpca detektirana na približno 39 kDa. Rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina p53 $\alpha$  prikazani su na slici 9. Iako statistička obrada (jednostruka ANOVA) pokazuje razlike u ekspresiji ( $P = 0.0481$ ), daljnja analiza pomoću Dunnett testa upućuje na nepromijenjenu ekspresiju gornje vrpce u stanicama SH-SY5Y tretiranim svim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

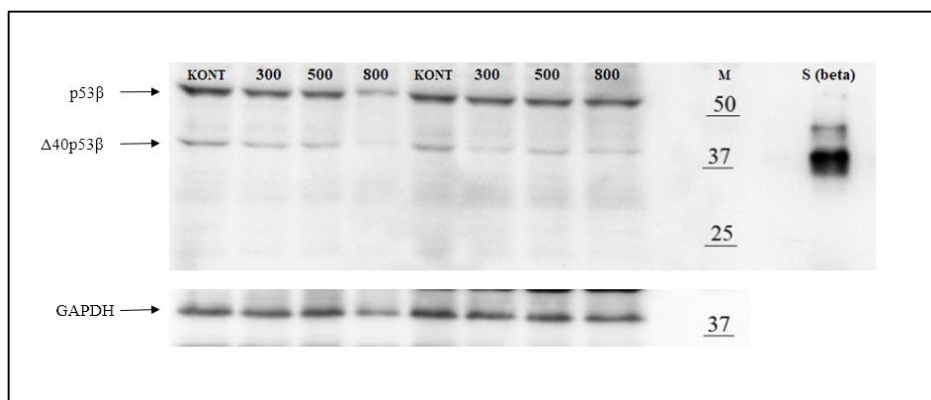


Slika 9. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju  $\alpha$  izoformi proteina p53. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje.

Za određivanje promjena u ekspresiji  $\beta$  izoformi proteina p53 koristili smo protutijelo KJC8 koje je specifično za slijed DQTSFQKENC i prepoznaje sve  $\beta$  izoforme proteina p53.<sup>38</sup>



Metodom *western blot* detektirana su dva signala, gornji iznad 50 kDa, i donji pri 40 kDa. Dobiveni signali prikazani su na slici 10.

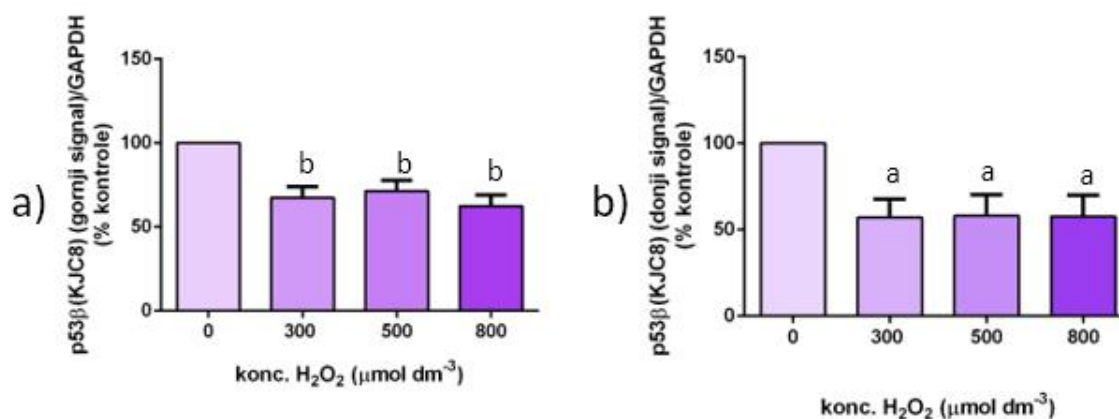


Slika 10. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju  $\beta$  izoformi proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je KJC8. (KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , M – marker molekulskih masa, S (beta) – standard za 3  $\beta$  izoforme humanog proteina p53)

Denzitometrijskom analizom obrađena su oba signala. Korištenjem standardâ za tri izoforme humanog proteina p53  $\beta$  i markera molekulskih masa pretpostavljamo da gornji signal odgovara izoformi p53 $\beta$ , a donji izoformi  $\Delta 40\text{p}53\beta$ . Kao i za  $\alpha$  izoforme, rezultati denzitometrijske analize  $\beta$  izoformi proteina p53 su normalizirani prema ekspresiji proteina GAPDH te prikazani na slici 11.

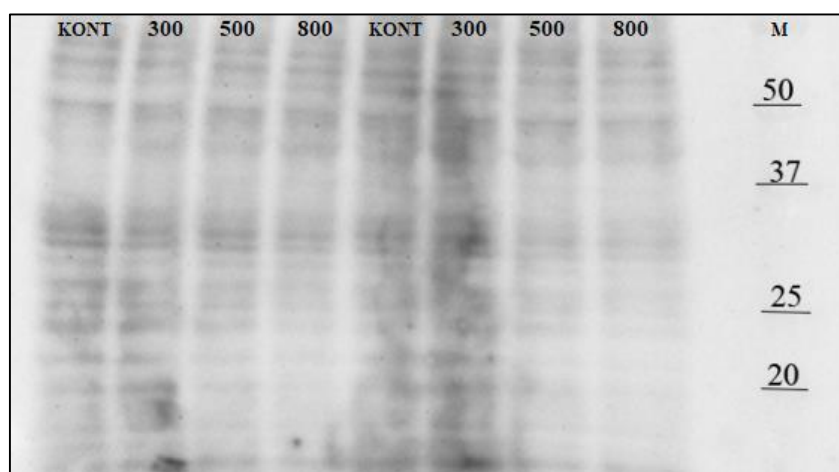
Prema rezultatima denzitometrijske i statističke obrade, u stanicama tretiranim  $\text{H}_2\text{O}_2$  dolazi do smanjenja ekspresije izoforme p53 $\beta$ . Smanjenje ekspresije bilo je nevisno o primijenjenoj koncentraciji i iznosilo je  $67,4 \pm 6,6\%$  ( $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ ),  $71,4 \pm 6,3\%$  ( $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ ) te  $62,5 \pm 6,6\%$  ( $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ ) ekspresije kontrolne skupine.

Rezultati denzitometrijske analize ekspresije izoforme  $\Delta 40\text{p}53\beta$  uz korišteno protutijelo KJC8 prikazani su na slici 11 b). Kao i za izoformu p53 $\beta$ , u sve tri skupine tretirane  $\text{H}_2\text{O}_2$  uočeno je smanjenje ekspresije koje je bilo nevisno o koncentraciji.



Slika 11. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju  $\beta$  izoforni. Analizirane su promjene u ekspresiji a) izoforme p53 $\beta$  i b) izoforme  $\Delta 40\text{p}53\beta$ . Korišteno primarno protutijelo je KJC8. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje. (Oznaka a:  $P < 0,05$ ; oznaka b:  $P < 0,01$  u usporedbi s netretiranim stanicama prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

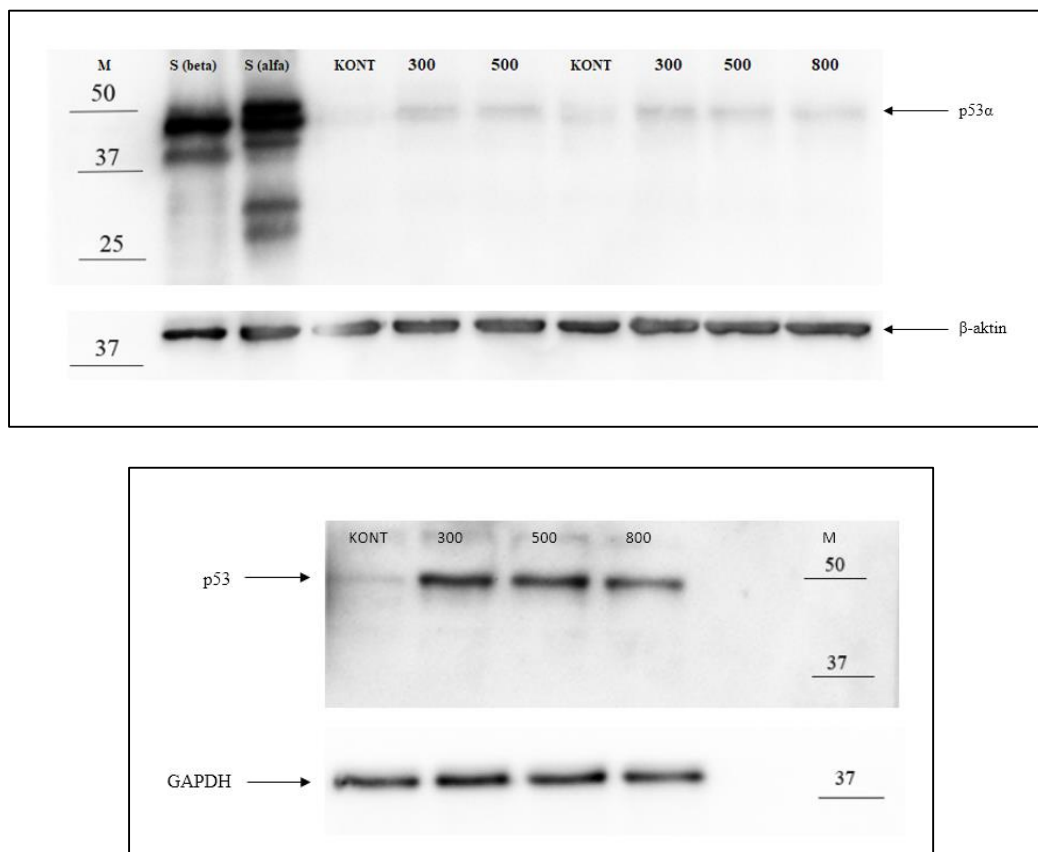
Također su rađeni pokusi praćenja ekspresije izoforme p53 $\gamma$  korištenjem primarnog protutijela KJCA $\gamma$ , no dobiveni signali su bili nejasni, slabi i nije ih bilo moguće kvantificirati. Ti signali prikazani su na slici 12.



Slika 12. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju  $\gamma$  izoforni proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je KJCA $\gamma$  (KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , M – marker molekulskih masa)

Osim protutijela za specifične izoforme proteina p53, za analizu promjena u ekspresiji proteina p53 koristili smo i protutijela SAPU, DO-11 i DO-12 kojima bi trebalo biti moguće istovremeno detektirati sve  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  izoforme budući da detektiraju epitope u eksonima koji su

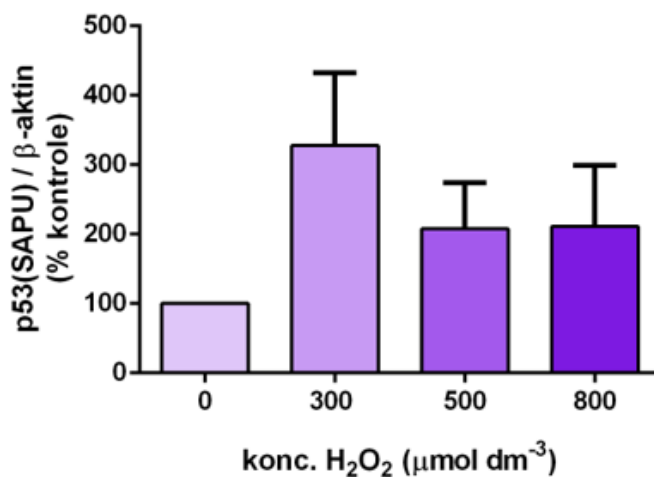
zajednički svim izoformama. Međutim, korištenjem primarnog protutijela SAPU, *western blot* analiza je pokazala prisutnost samo jednog signala na približno 50 kDa koji vjerojatno odgovara izoformi p53 $\alpha$ . Dobivene vrpce prikazane su na slici 13.



Slika 13. Učinak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ekspresiju proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je SAPU. Na slici su prikazane dvije različite membrane. Na gornjoj membrani vidljiv je položaj detektiranih vrpca u usporedbi sa standardima (vrijeme ekspozicije: 15 s). Na donjoj mebrani vidljive su promjene ekspresije proteina p53 nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vrijeme ekspozicije: 2 min). (M – marker molekulskih masa, S (beta) – standard za 3  $\beta$  izoforme humanog proteina p53, S (alfa) – standard za 4  $\alpha$  izoforme humanog proteina p53, KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane 300  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500 – stanice tretirane 500  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 800 – stanice tretirane 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

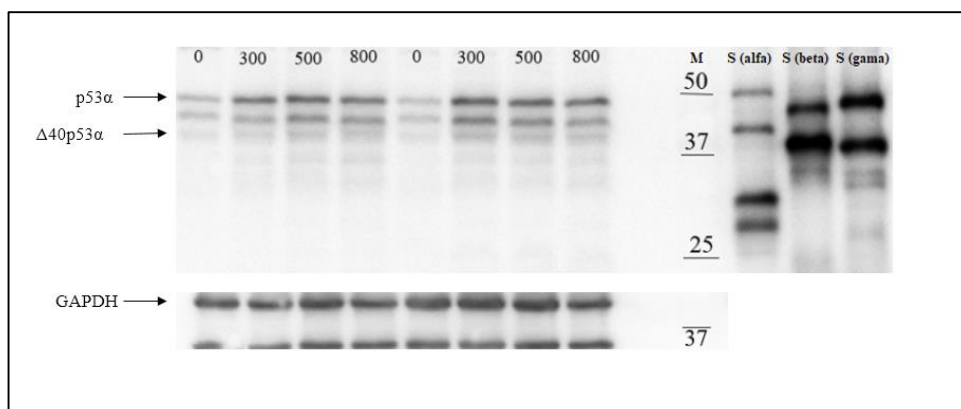
Rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina p53 uz korišteno protutijelo SAPU prikazani su na slici 14. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji  $\beta$ -aktina ili GAPDH. Iako srednja vrijednost ekspresije proteina p53 iz svih eksperimenata ( $n = 4$ ) upućuje na značajan porast u uvjetima oksidacijskog stresa, zbog neujednačenih rezultata između pojedinih pokusa koji su, pretpostavljamo, uzrokovani vrlo slabom detekcijom signala i posljedično otežanom denzitometrijom na pojedinim membranama, taj porast nije dosegao razinu statističke

značajnosti primjenom jednostruke ANOVA-e. Rezultati su dodatno obrađeni i pomoću t-testa, no nisu utvrđene statistički značajne razlike između analiziranih grupa.



Slika 14. Učinak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ekspresiju proteina p53. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje.

Rezultati dobiveni s protutijelom DO-11 prikazani su na slici 15. Detekcija proteina p53 ovim protutijelom dala je nekoliko različitih vrpca veličine 30-50 kDa, od čega su tri bile jače ekspimirane i bilo ih je moguće denzitometrirati. Korištenjem standardâ za izoforme humanog proteina i markera molekulskih masa, pretpostavljamo da od tri jače ekspimirane vrpce gornja odgovara kanonskom p53 (p53 $\alpha$ ), a donja  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ . Između signala za p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  vidljiv je signal koji bi prema veličini mogao odgovarati izoformi p53 $\beta$ . Također, na otprilike 35 kDa vidljiv je slab signal koji vjerojatno odgovara izoformi  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , no zbog slabog intenziteta nije ga bilo moguće reproducibilno kvantificirati. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji proteina GAPDH.



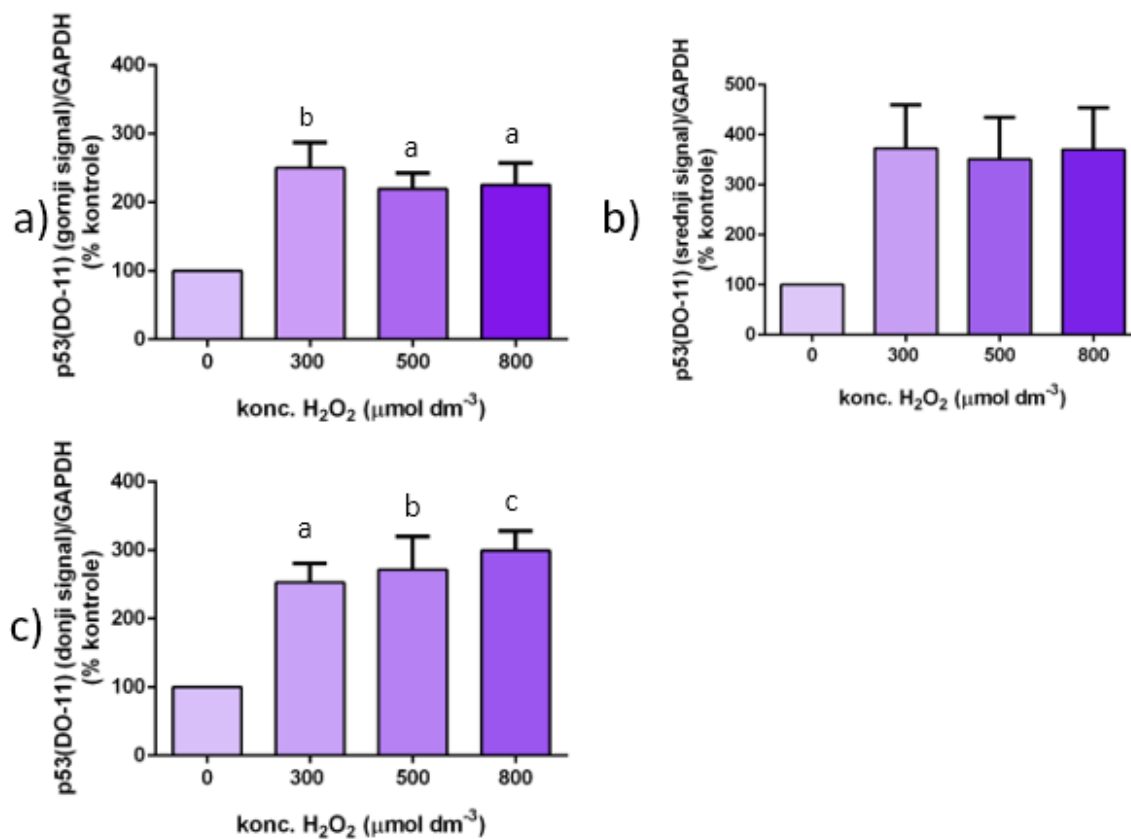
Slika 15. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je DO-11. (0 – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , M – marker molekulskih masa, S (alfa) – standard za 4  $\alpha$  izoforme humanog proteina p53, S (beta) – standard za 3  $\beta$  izoforme humanog proteina p53, S (gama) – standard za 3  $\gamma$  izoforme humanog proteina p53)

Rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina p53 $\alpha$  uz korišteno protutijelo DO-11 prikazani su na slici 16 a). Tretman stanica  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentracije  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$  pokazao je porast u ekspresiji izoforme p53 $\alpha$ . Njena ekspresija iznosila je  $250,3 \pm 36,9\%$  u usporedbi s netretiranim stanicama SH-SY5Y. Koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$  također je izazvala povećanje ekspresije. Razina ekspresije izoforme p53 $\alpha$  bila je  $219,9 \pm 20,0\%$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanjem koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $800 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , razina ekspresije povećana je na  $225,4 \pm 31,9\%$ . Prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e, razlike u ekspresiji izoforme p53 $\alpha$  između stanica tretiranih različitim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$  nisu značajne.

Za srednju vrpču, vjerojatno izoformu p53 $\beta$ , rezultat denzitometrijske analize prikazan je na slici 16 b). Detektiran je jak porast u ekspresiji, iako učinak nije bio ovisan o koncentraciji. Za sve 3 primijenjene koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  količina detektiranog proteina p53 bila je 350-375% količine prisutne u kontrolnim stanicama SH-SY5Y.

Rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina  $\Delta 40\text{p}53\alpha$  uz korišteno protutijelo DO-11 prikazani su na slici 16 c). Prilikom tretmana  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$  došlo je do povećanja u ekspresiji proteina  $\Delta 40\text{p}53\alpha$ . Ekspresija ove izoforme iznosila je  $252,8 \pm 27,6\%$  u odnosu na netretirane stanice SH-SY5Y. Koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$  uzrokovala je porast ekspresije proteina  $\Delta 40\text{p}53\alpha$  na  $271,7 \pm 48,6\%$  kontrolne skupine. Povećanje u ekspresiji je

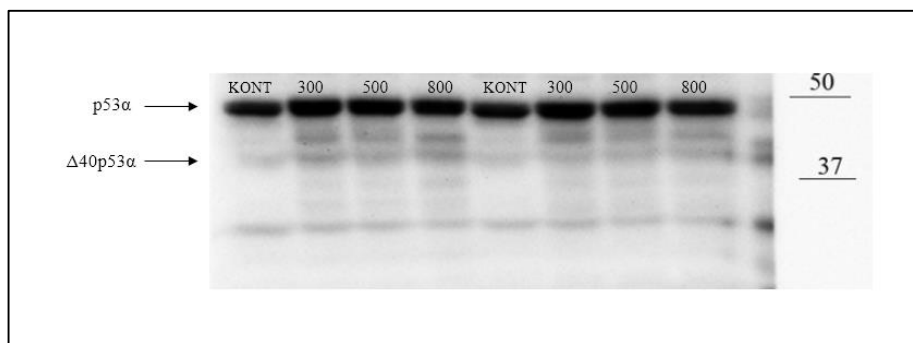
također uočeno i pri tretmanu stanica  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ . Ekspresija je porasla na  $299,5 \pm 28,6\%$  netretirane skupine.



Slika 16. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je DO-11.

Analizirane su promjene u ekspresiji a) izoforme p53 $\alpha$ , b) vjerojatno izoforme p53 $\beta$  i c) izoforme  $\Delta 40\text{p}53\alpha$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje. (Oznaka a:  $P < 0,05$ ; oznaka b:  $P < 0,01$ ; oznaka c:  $P < 0,001$  u usporedbi s netretiranim stanicama SH-SY5Y prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e)

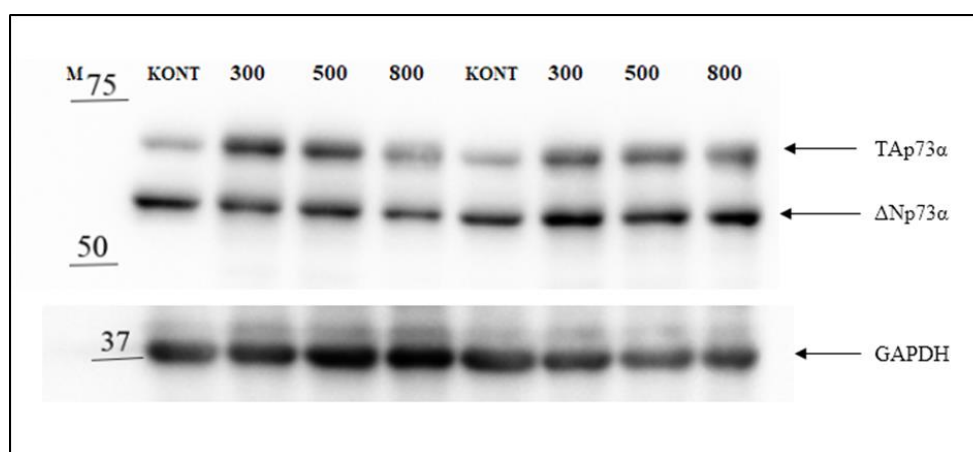
Na slici 17 pokazani su rezultati dobiveni upotrebom protutijela DO-12 koje kao i DO-11 detektira sve izoforme p53. Rezultati su slični onima s korištenim DO-11. Vidljive su tri jače ekspimirane vrpce, te nekoliko signala slabijeg intenziteta koje nije bilo moguće analizirati.



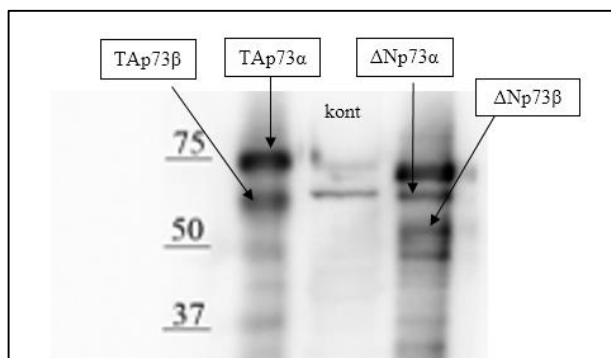
Slika 17. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju proteina p53. Korišteno primarno protutijelo je DO-12. (KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ )

#### 4.2.2. Ekspresija izoformi proteina p73

Osim ekspresije izoformi proteina p53, praćena je i ekspresija izoformi proteina p73. Metodom *western blot* detektirane su dvije vrpce pomoću primarnog protutijela EP436Y. Gornji signal se nalazi na približno 73 kDa, a donji oko 65 kDa. Detektirane vrpce prikazane su na slici 18. U svrhu njihove identifikacije, na posebnom gelu nanoseni su standardi za 4 izoforme humanog p73 proteina (TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ ,  $\Delta\text{Np}73\alpha$  i  $\Delta\text{Np}73\beta$ ) zajedno s proteinskim izolatom iz kontrolnih stanica SH-SY5Y. Usporedbom dobivenih vrpca i literaturnih izvora<sup>27</sup> pretpostavljamo da su u stanicama SH-SY5Y detektirane izoforme TAp73 $\alpha$  (gornja vrpca) i  $\Delta\text{Np}73\alpha$  (donja vrpca). Rezultati su prikazani na slici 19.



Slika 18. Učinak  $\text{H}_2\text{O}_2$  na ekspresiju proteina p73. Korišteno primarno protutijelo je EP436Y. (M – marker molekularnih masa, KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane  $300 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 500 – stanice tretirane  $500 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ , 800 – stanice tretirane  $800 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{H}_2\text{O}_2$ )

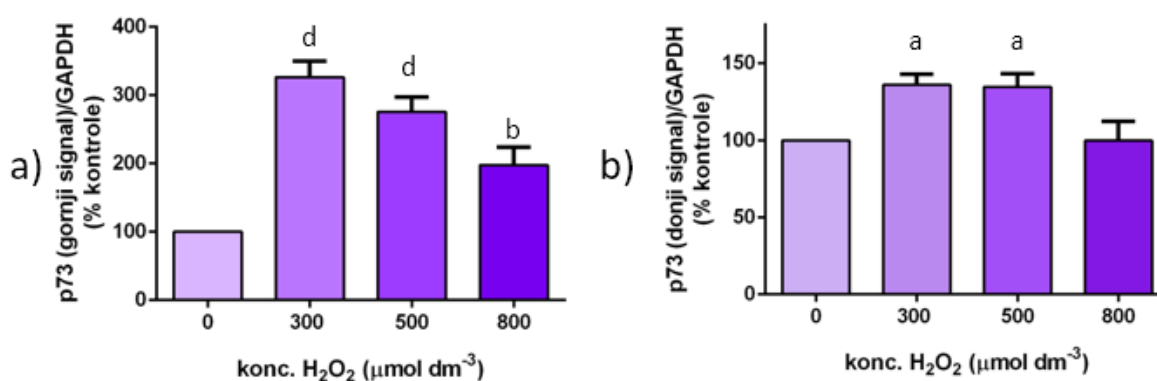


Slika 19. Identifikacija izoformi proteina p73. Označeni su signali pojedinih izoformi iz nanesenog standarda. Korišteno primarno protutijelo je EP436Y. (kont - kontrolni uzorak)

Rezultati denzitometrijske analize ekspresije izoforme TAp73 $\alpha$  prikazani su na slici 20 a). Tretman stanica SH-SY5Y 300  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izazvao je najjači porast njene ekspresije: ekspresija je iznosila 326,6  $\pm$  23,1% u usporedbi s kontrolnim stanicama. Nakon tretmana 500  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> razina ekspresije bila je 275,9  $\pm$  21,8% u odnosu na netretiranu kontrolu skupinu, dok je nakon primjene 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O njena ekspresija povećana približno dvostruko.

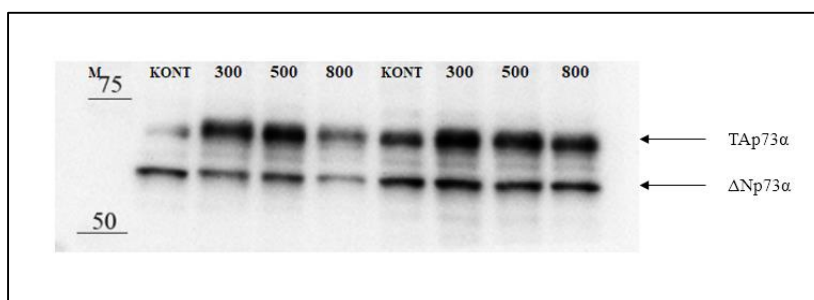
Rezultati denzitometrijske analize ekspresije proteina  $\Delta\text{Np73}\alpha$  uz korišteno protutijelo EP436Y prikazani su na slici 20 b). Rezultati su normalizirani prema ekspresiji proteina GAPDH. Tretman stanica SH-SY5Y s 300  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> povećao je ekspresiju izoforme  $\Delta\text{Np73}\alpha$  proteina p73 za 36%. Sličan rezultat dobiven je i nakon tretmana stanica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon tretmana 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nisu dobivene promjene u ekspresiji izoforme  $\Delta\text{Np73}\alpha$ .





Slika 20. Učinak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ekspresiju izoformi proteina p73. Analizirane su promjene u ekspresiji a) izoforme ΔNp73α i b) izoforme TAp73α. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. (Oznaka a: P < 0,05; oznaka b: P < 0,01; oznaka d: P < 0,0001 u usporedbi s netretiranim stanicama prema Tukeyevom testu nakon jednostruke ANOVA-e)

Na gelovima manje gustoće osim izoformi TAp73α i ΔNp73α bio je vidljiv i dodatni signal, vjerojatno TAp73β. Rezultat je prikazan na slici 21.



Slika 21. Učinak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ekspresiju proteina p73. Korišteno primarno protutijelo je EP436Y. (M – marker molekulskih masa, KONT – netretirane stanice, 300 – stanice tretirane 300 μmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500 – stanice tretirane 500 μmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 800 – stanice tretirane 800 μmol dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

## § 5. RASPRAVA

U znanstvenim istraživanjima,  $\text{H}_2\text{O}_2$  je čest induktor oksidacijskog stresa, a izazivanje oksidacijskog stresa česta je polazna točka mnogim istraživanjima na različitim vrstama tumorskih stanica. Nakupljanje ROS u stanici oštećuje DNA što aktivira stanične mehanizme za popravak DNA ili mehanizme stanične apoptoze.

Izazivanjem oksidacijskog stresa kao induktora apoptoze omogućuje se istraživanje tog složenog staničnog procesa, uključujući i ulogu brojnih proapoptotskih proteina.<sup>39,40</sup>

U našem istraživanju pratilo se preživljenje stanica neuroblastoma, stanična linija SH-SY5Y, nakon tretmana otopinama  $\text{H}_2\text{O}_2$  širokog raspona koncentracija. Primjenom testa MTT utvrdili smo značajno smanjenje preživljenja stanica SH-SY5Y kod tretmana  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 24 sata. U sličnom istraživanju provedenom na istoj staničnoj liniji opažen je značajan pad pri koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$  nakon 24 sata, što upućuje na podjednaku osjetljivost stanica SH-SY5Y u oba istraživanja.<sup>41</sup> Slično tome, u drugom provedenom istraživanju  $400 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  smanjio je preživljenje za približno 35%, dok je u našim eksperimentalnim uvjetima smanjenje iznosilo 30%.<sup>42</sup>

Istraživanje provedeno također na stanicama neuroblastoma, ali na staničnoj liniji SK-N-SH, pokazalo je značajno smanjenje preživljenja već pri koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  od  $150 \mu\text{mol dm}^{-3}$  kojom su stanice tretirane tijekom 18 sati<sup>43</sup>, pokazujući tako da posljedice izazivanja oksidacijskog stresa ovise o staničnoj liniji i trajanju tretmana.

Rezultati dobiveni mjerenjem koncentracije staničnog ATP-a su u skladu s očekivanjima i pokazuju smanjenje ukupnog staničnog ATP-a u tretiranim stanicama. U vijabilnim stanicama metaboličkim procesima nastaje ATP pa je smanjenje koncentracije ATP-a u stanicama znak gubitka vijabilnosti. Također, s povećanjem koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentracija staničnog ATP-a sve se više smanjuje i u korelaciji je s rezultatima testa MTT. Npr. za  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  dobiveno je smanjenje preživljenja na 78,2% kontrolne vrijednosti, dok je koncentracija ATP-a iznosila 76,0% kontrolne vrijednosti. Kod stanica SH-SY5Y tretiranih  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  preživljenje je smanjeno za 45,7%, a koncentracija ATP-a za 44,1%. U ranije provedenom istraživanju također je pokazano gotovo jednako smanjenje preživljenja s obje metode nakon tretmana s  $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  tijekom 24 sata.<sup>44</sup>

Kako je i očekivano, tretman stanica rastućim koncentracijama  $H_2O_2$  povećava nakupljanje ROS-a u stanicama budući da dolazi do sve većeg zasićenja unutarstaničnih antioksidacijskih sustava. Usporede li se ti rezultati s rezultatima testa MTT i koncentracije staničnog ATP-a, možemo pretpostaviti da je povećanje ROS-a u stanici izravno povezano sa smanjenjem preživljenja tretiranih stanica. Posebno velika promjena opažena je između 500 i 800  $\mu\text{mol dm}^{-3}$   $H_2O_2$  i upućuje na značajno iscrpljenje unutarstaničnih antioksidacijskih sustava. I drugi su autori utvrdili da je porast ROS nakon tretmana s  $H_2O_2$  povezan s promjenama u vijabilnosti stanica SH-SY5Y.<sup>42,44</sup>

Glutation u stanici egzistira u oksidiranom i reduciranom stanju. Kada se nalazi u reduciranom obliku (GSH) reagira s različitim ROS i neutralizira njihov štetan učinak po stanicu. U toj reakciji sam se oksidira (GSSG). Rezultat toga je smanjenje koncentracije GSH u stanici, a povećanje GSSG.<sup>45</sup> Osim toga glavni enzim koji katalizira redukciju  $H_2O_2$  do vode je glutation-peroksidaza. U toj reakciji troše se 2 molekule GSH i nastaje GSSG.<sup>10</sup> Prema tome, rezultati koji pokazuju smanjenje GSH nakon tretmana s  $H_2O_2$  u skladu su s očekivanima i literaturnim izvorima.<sup>44</sup> Koncentracije GSH se smanjuju s povećanjem koncentracije  $H_2O_2$  kojim su stanice tretirane što znači da GSH reagira s nastalim ROS ili sudjeluje u reakciji glutation peroksidaze.

p53 je tumor-supresor protein koji je u fiziološkim uvjetima u stanici prisutan u vrlo niskim koncentracijama. Između ostaloga, p53 je uključen u regulaciju staničnog ciklusa, djeluje kao transkripcijski faktor proteina odgovornih za pokretanje apoptoze, te je i sam proapoptotski protein. U stanicama većine tumora dokazana je njegova povećana ekspresija.<sup>46-48</sup> Unatoč tomu, i dalje u kliničkim ispitivanjima nije uspješno povezana njegova povećana ekspresija s liječenjem ili progresijom tumora. Za potpuno razumijevanje mehanizma njegova djelovanja i za potencijalno ciljanje tog proteina u liječenju tumora, pa tako i neuroblastoma, potrebno je istražiti ekspresiju, kao i potencijalnu ulogu svih, do sad otkrivenih 12, njegovih izoformi u razvoju patoloških procesa.<sup>49</sup> Istraživanja u ovom području su malobrojna. Prema rezultatima dosadašnjih eksperimenata, u stanicama SH-SY5Y eksprimirane su dvije izoforme p53. Opisana je prisutnost p53 $\alpha$  i p53 $\beta$  pomoću protutijela DO-7 koje se veže na epitop unutar transaktivacijske domene TA1, dok je jedna vrpca malo iznad, a druga malo ispod 53 kDa detektirana pomoću protutijela DO-1 koje se također veže na TA1.<sup>50</sup> Osim toga, treba istaknuti

da su dostupna različita protutijela za p53 epitope, od kojih bi neka trebala prepoznati sve izoforme, a druga samo specifične.<sup>51</sup> Međutim, i ona protutijela čiji se epitop nalazi na svim izoformama ne detektiraju uvijek sve izoforme. Jasno razlikovanje izoformi otežava i to što su mnoge od njih slične ili jednake veličine. Npr. veličina izoformi  $\Delta 40p53$ ,  $p53\beta$ , i  $p53\gamma$  iznosi oko 45 kDa.<sup>38</sup>

Prema dostupnoj literaturi, nema podataka o promjenama ekspresije pojedinih izoformi u uvjetima oksidacijskog stresa. Međutim, u nekoliko je radova pokazano da kod stanica SH-SY5Y izloženih  $H_2O_2$  dolazi do porasta ukupnog p53 i akumulacije u jezgri.<sup>52,53</sup>

Pomoću protutijela 421 koje je specifično za  $\alpha$  izoforme, i koje nije nabavljeno iz komercijalnih izvora, u našim smo stanicama SH-SY5Y detektirali 2 signala različite veličine, jedan nešto manji od 50 kDa, a drugi oko 35 kDa. Na gelovima veće gustoće ( $\phi(\text{akrilamid}) = 11\%$ ), gornja se vrpca razdvajala u dva signala koja vjerojatno predstavljaju istu izoformu s različitim posttranslacijskim modifikacijama koje malo mijenjaju molekulsku masu proteina (slika 8), dok je na gelovima manje gustoće ( $\phi(\text{akrilamid}) = 8\%$ ) detektirana samo jedna vrpca. Uzevši u obzir da je pokazano da stanice SH-SY5Y ekspimiraju izoformu  $p53\alpha$  veličine oko 53 kDa, te činjenicu da nisu pokazane promjene u ekspresiji naše vrpce veličine približno 48 kDa, pretpostavljamo da se radi o nespecifičnom signalu što bi trebalo potvrditi primjenom drugih  $p53\alpha$  specifičnih protutijela (npr. BP53.10 i ICA-9) ili pokusima utišavanja p53 mRNA. Poznato je da protutijelo 421 ima niski afinitet za p53 budući je njegov epitop jako podložan modifikacijama poput fosforilacije, ubikvitinacije, acetilacije itd.<sup>49</sup> Također, isti autor navodi da u svojim istraživanjima nije mogao detektirati izoforme  $\Delta 40p53$  i  $\Delta 133p53$  pomoću ovog protutijela. Osim spomenutih metoda, u identifikaciji pojedinih izoformi mogu se koristiti specifične početnice i lančana reakcija polimerazom (PCR).<sup>38</sup>

Signal koji smo pomoću protutijela 421 detektirali na 35 kDa mogao bi odgovarati izoformi  $\Delta 133p53\alpha$  usporedi li se njegov položaj na membrani s markerom molekulskih masa i nanesenim standardom, no promjene u njegovoj ekspresiji nije bilo moguće kvantificirati.

Detekcija  $\beta$  izoformi provedena je koristeći također nekomercijalno protutijelo KJC8 kojim su detektirane dvije specifične vrpce, te nekoliko vrlo slabo vidljivih, vjerojatno nespecifičnih signala. Kvantificirane su vrpce koje odgovaraju izoformama  $p53\beta$ , čija je masa 47 kDa, i  $\Delta 40p53\beta$ , čija je masa 42 kDa. Položaj detektiranih vrpce u stanicama SH-SY5Y upućuje na molekulsku masu veću od očekivane. No, slično neslaganje postoji i za marker molekulskih

masa pa pretpostavljamo da se ipak radi o navedenim izoformama. Denzitometrijska analiza pokazala je da u uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do smanjenja ekspresije obje vrpce koje se detektiraju protutijelom KJC8. Budući da pojedine p53 izoforme mogu ili inhibirati ili pojačati tumor-supresorsku aktivnost p53, naši bi rezultati upućivali na to da je smanjenje ekspresije  $\beta$  izoformi povezano s proapoptotskim djelovanjem p53. Pretraživanjem literature nisu pronađena slična provedena istraživanja, te dobivene rezultate u našem istraživanju nije moguće usporediti s nekim drugim sličnim rezultatima. Međutim, u stanicama MCF7 (tumor dojke) pokazano je da endogeni protein p53 $\beta$  tvori kompleks s p53 $\alpha$  te da specifično povećava njegovu transkripcijsku aktivnost s Bax promotora.<sup>38</sup> Bax je protein s proapoptotskim djelovanjem, tako da bi opaženo smanjenje ekspresije na našim stanicama bilo u suprotnosti s ovim rezultatom te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnio doprinos  $\beta$  izoformi na smanjenje preživljenja u uvjetima oksidacijskog stresa nakon tretmana s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> te utvrdilo je li taj odgovor tkivno specifičan.

Kao što je već istaknuto, ekspresija p53 izoformi slabo je istraženo područje. To je tako prvenstveno zbog toga što se još uvijek pronalaze nove izoforme proteina p53 te zbog toga što ne postoje dobra, komercijalno dostupna, protutijela za detekciju  $\beta$  i  $\gamma$  izoformi, već samo protutijela pripremljena u laboratoriju za vlastita istraživanja. I za  $\alpha$  izoforme dostupan je mali broj protutijela. Također, i sami standardi ne odgovaraju u potpunosti očekivanim molekulskim masama proteinskih izoformi što sve zajedno znatno otežava identifikaciju pojedinih izoformi i istraživanja u ovom području.

Eksperiment kojim su praćene promjene u ekspresiji  $\gamma$  izoforme nije dao željene rezultate. Iako je detekcija rađena u tri koraka, s dva sekundarna protutijela sa svrhom pojačavanja signala, detektirano je mnoštvo slabo ekspimiranih vrpca uz korištenje primarnog protutijela KJCA $\gamma$ . Niti jedan od tih signala nije bilo moguće kvantificirati ili identificirati. No,  $\gamma$  izoforme su u stanicama tumora općenito slabo ekspimirane i njihov je udio u sveukupnom p53 mali, pa možemo očekivati da nemaju značajan učinak na stanični odgovor u oksidacijskom stresu.

*Western blot* analiza provedena je i u svrhu detekcije ukupnog proteina p53, odnosno s protutijelima koja bi trebala detektirati sve izoforme. U tu svrhu korištena su tri različita primarna protutijela, SAPU, DO-11 i DO-12. Uz SAPU protutijelo detektiran je samo divlji tip proteina p53, iako smo protutijelima specifičnim za pojedine izoforme dokazali prisutnost i pojedinačnih izoformi u ispitivanim stanicama. Razlog tomu može biti samo protutijelo (starost,

razrijeđenje), ali i razlike u *western* metodi (dva ili tri koraka). Također je moguće da su proteini imali neku posttranslacijsku modifikaciju na epitopu koja je onemogućila prepoznavanje epitopa od strane protutijela. Uz DO-11 protutijelo broj detektiranih izoformi je nešto veći, kao što je to slučaj i s protutijelom DO-12, iako je opisano da protutijelo SAPU daje jači signal u usporedbi s drugim protutijelima.<sup>51</sup> Rezultati dobiveni s protutijelom DO-11 upućuju na ekspresiju nekoliko izoformi koje tek trebaju biti sa sigurnošću identificirane u daljnjim istraživanjima, no sigurna je prisutnost izoformi p53 $\alpha$  (53 kDa) i  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  (47 kDa). Između ta dva signala jasno se uočava još jedan signal za kojeg nije moguće sa sigurnošću potvrditi kojoj izoformi pripada. Ista vrpca dobivena je i pomoću protutijela DO-12. Iako bi taj signal prema veličini mogao odgovarati izoformi  $\Delta$ 40p53 $\beta$ , evidentan je porast njegove ekspresije, dok je s protutijelom KJC8 detektirano smanjenje ekspresije  $\beta$  izoformi. Stoga je vjerojatnije da ova vrpca predstavlja razgradni produkt ili posttranslacijski modificiranu neku od  $\alpha$  izoformi. Nije neobično da različita protutijela za isti protein daju različite rezultate pokazujući nespecifičnost. Kao što je prethodno spomenuto, moguće je da za isti protein jedno protutijelo daje jak signal, dok koristeći drugo protutijelo signal koji se dobije bude slab ili potpuno izostane.<sup>54,55</sup> Međutim, treba istaknuti da protutijela SAPU, DO-11 i DO-12 upućuju na porast ekspresije proteina p53 što je u skladu s literaturnim navodima, ali i smanjenjem preživljenja stanica SH-SY5Y. Stoga se čini da protutijela na sve izoforme daju bolji uvid u sveukupni trend promjena, i da bi se uz upotrebu ovih protutijela u kombinaciji s drugim metodama (utišavanje p53 mRNA, q-PCR) mogao bolje razjasniti doprinos pojedinih izoformi. Osim toga, treba istaknuti da su izoforme  $\beta$  i  $\gamma$  u stanicama SH-SY5Y slabo eksprimirane i jako malo doprinose ukupnoj količini proteina p53. Naime, iako je za detekciju  $\beta$  i  $\gamma$  izoformi na gel nanošeno 40  $\mu$ g proteina, umjesto 20  $\mu$ g, koliko je korišteno za detekciju  $\alpha$  izoformi i ukupnog p53, te je proveden *western blot* u tri stupnja, dobiveni signali su slabiji od detektiranih signala za  $\alpha$  izoforme i ukupni p53.

Osim promjena u ekspresiji izoformi proteina p53, cilj diplomskog rada bio je istražiti i promjene u ekspresiji proteina p73. Korištenjem protutijela EP436Y detektirana su dva signala za koje je upotrebom standarda utvrđeno da odgovaraju izoformama TAp73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ . No, ukoliko smo izoforme razdvajali koristeći gel s manjim udjelom akrilamida ( $\phi$ (akrilamid) = 8%) umjesto  $\phi$ (akrilamid) = 11%), između signala za te dvije izoforme uočava se još jedan slab signal kojeg nismo mogli kvantificirati i identificirati. Moguće je da pripada jednoj od izoformi

čiji standard nismo imali, ili da pripada izoformi  $\Delta Np73\beta$  ako signal usporedimo sa standardima koje smo nanijeli na gel. Prema istraživanju provedenom na istoj staničnoj liniji SH-SY5Y, nanošenjem 1  $\mu\text{g}$  uzorka na gel nije detektirana niti jedna izoforma proteina p73, no nanošenjem 50  $\mu\text{g}$  istog uzorka, detektirane su tri njegove izoforme. Dvije su identificirane kao TAp73 $\alpha$  i  $\Delta Np73\alpha$ , dok treća nije jasno okarakterizirana.<sup>25</sup>

U našem je istraživanju pokazana snažna stimulacija ekspresije izoforme TAp73 $\alpha$  u uvjetima oksidacijskog stresa koja vjerojatno značajno utječe na smanjenje preživljenja kroz pokretanje apoptoze. Protein p73 je također tumor-supresor protein i očekivan je porast njegove ekspresije s padom vijabilnosti.<sup>56</sup> Štoviše, TAp73 je neophodan u staničnom odgovoru na oksidacijski stres te je pokazano da p53 potiče transkripciju s TAp73 promotora u uvjetima stresa. Također, pokazano je da porast ekspresije TAp73 $\alpha$  i  $\Delta NP73\alpha$  povećava razinu proteina p53 u stanicama SH-SY5Y. Osim toga, TAp73 regulira sintezu mitohondrijalnih proteina čime se potiče aktivnost mitohondrija i prilagodba na oksidacijski stres.<sup>57</sup> Istraživanja na p73 *knock out* miševima pokazala su veće nakupljanje ROS u stanicama nakon tretmana  $\text{H}_2\text{O}_2$  u odnosu na divlji tip što potvrđuje početnu hipotezu da TAp73 ima važnu ulogu u odgovoru na oksidacijski stres.<sup>58</sup> Također, pokazano je da TAp73 izoforme sudjeluju u pokretanju apoptoze neovisne o proteinu p53 što znači da ekspresija TAp73 izoformi proteina p73 ne mora nužno biti u korelaciji s ekspresijom p53 izoformi u stanicama.<sup>59,60</sup>

## § 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju, doneseni su sljedeći zaključci:

U ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji, otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smanjuje preživljenje stanica SH-SY5Y.

Zbog povećanja nakupljanja ROS i smanjivanja koncentracije unutarstaničnog glutaciona, primjena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovodi do poremećaja redoks ravnoteže i stanice SH-SY5Y dovodi u stanje oksidacijskog stresa.

*Western blot* metodom pomoću protutijela 421 utvrdili smo da izazivanje oksidacijskog stresa primjenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne povećava ekspresiju izoforme p53 $\alpha$  u stanicama SH-SY5Y.

*Western blot* metodom pomoću protutijela KJC8 utvrdili smo da izazivanje oksidacijskog stresa primjenom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> smanjuje ekspresiju izoformi p53 $\beta$  i  $\Delta$ Np53 $\beta$  u stanicama SH-SY5Y.

*Western blot* analiza pomoću protutijela SAPU, DO-11 i DO-12 pokazala je povećanje ekspresije ukupnog proteina p53 u stanicama SH-SY5Y nakon tretmana H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To upućuje da je stanična smrti ovisna o proteinu p53 u uvjetima oksidacijskog stresa.

Primjena H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u stanicama SH-SY5Y povećava ekspresiju izoformi TAp73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  što ukazuje na proapoptotsku ulogu proteina p73 u staničnom odgovoru na oksidacijski stres.



## § 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APS	– amonijev persulfat
ATP	– adenzin-3-fosfat
BCA	– test bicinkoničnom kiselinom
BD	– C-terminalna bazna domena
BSA	– albumin iz govedeg seruma
DBD	– DNA-vezujuća domena
DMEM	– medij za uzgoj stanica ( <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> )
DMSO	– dimetil sulfoksid
DNA	– deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	– etilendiamintetraoctena kiselina
FBS	– serum fetusa goveda
GAPDH	– gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GPx	– glutation peroksidaza
GSH	– glutation
H2DCF-dA	– 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat
HRP	– peroksidaza iz hrena
MTT	– metiltiazoliltetrazolij-bromid
NLS	– jezgrin lokalizacijski signal
PBS	– fosfatni pufer
PBST	– fosfatni pufer uz dodatak <i>Tween 20</i>
PCD	– programirana stanična smrt
PRD	– prolinom bogata domena
ROS	– reaktivne kisikove vrste
SDS	– natrijev dodecil-sulfat
SOD	– superoksid dismutaza
TAD	– transaktivacijska domena
TBST	– <i>Tris</i> pufer uz dodatak <i>Tween 20</i>
TD	– tetramerizacijska domena

## § 8. LITERATURNI IZVORI

1. V. Sosa, T. Moliné, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh, *Ageing. Res. Rev.* **12** (2013) 376–390.
2. R. Luksch, M. R. Castellani, P. Collini, B. De Bernardi, M. Conte, C. Gambini, L. Gandola, A. Garaventa, D. Biondi, M. Podda, A. R. Sementa, G. Gatta, G. P. Tonini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **107** (2016) 163–181.
3. L. Hranilović, *Neuroblastom u djece*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 1.
4. A. F. Olshan u N. V. Chong, S. L. Cohn (ur.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2005, str. 1–4.
5. J. R. Park, A. Eggert, H. Caron, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* **24** (2010) 65–86.
6. K. K. Matthay, J. M. Maris, G. Schleiermacher, A. Nakagawara, C. L. Mackall, L. Diller, A. Weiss, *Nat. Rev. Dis. Primers* **2** (2016) 1–21.
7. J. M. Maris, *N. Engl. J. Med.* **362** (2010) 2202–2211.
8. F. McMurray, D. A. Patten, M. E. Harper, *Obesity* **24** (2016) 2301–2310.
9. E. G. Russell, T. G. Cotter, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **319** (2015) 221–254.
10. E. Birber, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayaci, *World Allergy Organ. J.* **5** (2012) 9–19.
11. M. Schieber, N. S. Chandel, *Curr. Biol.* **24** (2014) 453–462.
12. A. Spector, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **16** (2000) 193–201.
13. S. Banerjee, T. Uppal, R. Strahan, P. Dabral, S. C. Verma, *Front. Microbiol.* **7** (2016) 1–22.
14. R. P. Rastogi, R. Sinha, R. P. Sinha, *EXCLI J.* **8** (2009) 155–181.
15. L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F.-T. Wang, T.-T. Zhou, B. Liu, J.-K. Bao, *Cell Prolif.* **45** (2012) 487–489.
16. Y. Li, A. Nakagawara, *Cells* **2** (2013) 432–459.
17. R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9** (2008) 231–241.
18. S. Elmore, *Toxicol. Pathol.* **35** (2007) 495–516.
19. D. Živković, *Učinak DMAG-a i utišavanja Hsp90 na vijabilnost THP-1 stanica*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 3.

20. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013) 1–29.
21. M. Janković, A. Markotić, *Infektološki glasnik* **27** (2007) 63–70.
22. V. Žlander, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **54** (2004) 267–274.
23. L. Pecorino, *Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets and therapeutics*, Oxford University Press, Oxford, 2008. str. 132.
24. T. Ozaki, A. Nakagawara, *Cancers* **3** (2011) 994–1013.
25. D. Goldschneider, E. Blanck, G. Raguénez, M. Barrois, A. Legrand, G. Le Roux, H. Haddada, J. Bénard, S. Douc-Rasy, *J. Cell. Sci.* **117** (2004) 293–301.
26. D. A. Tweddle, A. J. Malcolm, N. Bown, A. D. Pearson, J. Lunec, *Cancer Res.* **61** (2001) 8–13.
27. R. Kamada, Y. Toguchi, T. Nomura, T. Imagawa, K. Sakaguchi, *Biopolymers* **106** (2016) 598–612.
28. O. Laptenko, I. Schiff, W. Freed-Pastor, A. Zupnick, M. Mattia, E. Freulich, I. Shamir, N. Kadouri, T. Kahan, J. Manfredi, I. Simon, C. Prives, *Mol. Cell.* **57** (2015) 1034–1046.
29. W. M. Chan, W. Y. Siu, A. Lau, R. Y. C. Poon, *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004) 3536–3551.
30. A. Zorić, A. Horvat, N. Slade, *Medicina Fluminensis* **46** (2010) 135–142.
31. S. Kim, S. S. An, *Medicine* **95** (2016) 1–6.
32. S. M. Jorruiz, J. C. Bourdon, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **6** (2016) 1–22.
33. M. Jazvinščak Jembrek, N. Slade, P.R. Hof, G. Šimić, *Prog. Neurobiol.* **168** (2018) 104–127.
34. U. M. Moll, N. Slade, *Mol. Cancer Res.* **2** (2004) 371–386.
35. E. C. Jensen, *Anat. Rec.* **295** (2012) 369–371.
36. T. Mahmood, P. C. Yang, *N. Am. J. Med. Sci.* **4** (2012) 429–434.
37. J. Kovalevich, D. Langford, *Methods Mol. Biol.* **1078** (2013) 9–21.
38. J. C. Bourdon, K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D. P. Xirodimas, M. K. Saville, D. P. Lane, *Genes Dev.* **19** (2005) 2122–2137.
39. A. Gracimartín, M. E. López-Oliva, M. P. González, F. J. Sánchez-Muniz, J. Benedí, *Redox. Biol.* **12** (2017) 719–726.
40. A. Romero, E. Ramos, I. Ares, V. Castellano, M. Martínez, M. R. Martínez-Larrañaga, M. A. Martínez, *Arch. Toxicol.* **91** (2017) 2151–2164.

41. C. Feng, T. Luo, S. Zhang, Y. Zhang, Y. Luo, P. Ge, *Mol. Med. Rep.* **13** (2016) 4205–4214.
42. A. Gracimartín, J. J. Merino, M. P. González, M. I. Sánchez-Reus, F. J. Sánchez-Muniz, S. Bastida, J. Benedí, *BMC Complement. Altern. Med.* **14** (2014) 1–9.
43. X. Wang, E. Perez, R. Liu, L. J. Yan, R. T. Mallet, S. H. Yang, *Brain Res.* **1132** (2007) 1–9.
44. M.R. de Oliveira, B. F. de Bittencourt, C. R. Fürstenau, *Mol. Neurobiol.* **55** (2018) 4777–4787.
45. G. S. Heverly-Coulson, R. J. Boyd, *J. Phys. Chem. A.* **114** (2010) 1996–2000.
46. K. Huang, L. Chen, J. Zhang, Z. Wu, L. Lan, L. Wang, B. Lu, Y. Liu, *Oncol. Lett.* **8** (2014) 1441–1446.
47. Z. Feng, W. Hu, G. Rajagopal, A. J. Levine, *Cell Cycle* **7** (2008) 842–847.
48. D. Reisman, P. Takahashi, A. Polson, K. Boggs, *Biochem. Res. Int.* **2012** (2012) 1-6.
49. J. C. Bourdon, *Br. J. Cancer* **97** (2007) 277–282.
50. A. Carpentieri, E. Cozzoli, M. Scimeca, E. Bonanno, A. M. Sardinelli, A. Gambacurta, *Cell. Death. Dis.* **6** (2015) 1–9.
51. M. P. Khoury, J. C. Bourdon, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* **2** (2010) 1–11.
52. J. H. Lee, M. W. Jeong, W. Kim, Y. H. Choi, K. T. Kim, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 19826–19835.
53. J. Wang, H. Liu, X. Zhang, X. Li, L. Geng, H. Zhang, Q. Zhang, *Mar. Drugs.* **15** (2017) 110.
54. J. C. Bourdon, M. P. Khoury, A. Diot, L. Baker. K. Fernandes, M. Aoubala, P. Quinlan, C. A. Purdie, L. B. Jordan, A. C. Prats, D. P. Lane, A. M. Thompson, *Breast Cancer Res.* **13** (2011) 1–10.
55. M. K. Danks, D. O. Whipple, C. R. McPake, D. Lu, L. C. Harris, *Cell Death Differ.* **5** (1998) 678-696.
56. J. Wang, Y. X. Liu, A. C. Wong, Y. J. Jin, Y. Yin, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 29152–29162.
57. A. Marini, B. Rotblat, T. Sbarrato, M. V. Niklison-Chirou, J. R. P. Knight, K. Dudek, C. Jones, M. Bushell, R. A. Knight, I. Amelio, A. E. Willis, G. Melino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115** (2018) 6219–6224.

- 
58. M. Agostini, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Melino, A. Rufini, *Oncotarget*. **7** (2016) 29881–29900.
  59. P. Klanrit, M. B. Flinterman, E. W. Odell, G. Melino, R. Killick, J. S. Norris, M. Tavassoli, *Cell Cycle* **7** (2008) 205–215.
  60. M. Rada, N. Barlev, S. Macip, *Cell Death Discov.* **5** (2018) 30.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Snježana Dunder

Datum rođenja: 27.01.1991.

Mjesto rođenja: Doboj

### Obrazovanje

1997.–2005. Osnovna škola „Fra Grga Martić“ Globarica

2005.–2009. Srednja škola Opća gimnazija, „KŠC Don Bosco“ Žepče

2009.–2016. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013.–2015. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka