

Utjecaj sirtuina 3 u tretmanu hiperoksijom na tumorske karakteristike trostruko negativnih stanica raka dojke (MDA-MB-231)

Marčinko, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:742016>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dora Marčinko

**Utjecaj sirtuina 3 u tretmanu hiperoksijom na tumorske
karakteristike trostruko negativnih stanica raka dojke
(MDA-MB-231)**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, pod mentorstvom doc.dr.sc. Sandre Sobočanec i neposrednim voditeljstvom dr.sc. Ive Škrinjar.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc. Morana Dulić.

Zahvale

Zahvaljujem dragoj mentorici Sandri Sobočanec na ukazanoj prilici, strpljenju, podršci, svim savjetima i šalama koje su upotpunile izradu mog rada.

Zahvaljujem doc.dr.sc.Morani Dulić na svim savjetima, pomoći te uloženom vremenu i trudu.

Veliko hvala Ivi i Mariji na uloženom trudu i pomoći prilikom izrade i pisanja diplomskog rada. Hvala Vam na svakom istraživačkom, ali i prijateljskom savjetu.

Zahvaljujem prof.dr.sc.Tihomiru Balogu što je omogućio moj dolazak u Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, te hvala ostatku labosa što ste mi dozvolili da učim od Vas!

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi bili podrška tijekom studiranja. Hvala što smo kroz smijeh i zabavu prošli lijepe, ali i one manje lijepe studentske dane!

I na kraju, najviše želim zahvaliti svojim roditeljima i bratu koji su uz mene cijeli život i koji su mi bili potpora u svim velikim, ali i malim koracima. Oduvijek ste moji životni učitelji i sve svoje dosadašnje, ali i buduće uspjehe dugujem vama!

HVALA svima!

„Ne možeš uvijek biti sretan, ali zato možeš biti hrabar. To je početak svega.“

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Ciljevi i svrha rada.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Sirtuini	3
2.2. Utjecaj aktivnosti sirtuina 3 i hiperoksije na nastanak oksidacijskog stresa	4
2.2.1. Nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS).....	4
2.2.2. Sirtuin 3 kao posrednik u produljenju životnog vijeka.....	6
2.2.3. Sirtuin 3: tumor-supresor ili tumor-promotor?	7
2.3. Trostruko negativne stanice raka dojke (MDA-MB-231)	8
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Standardne kemikalije.....	9
3.2. Stanična kultura <i>in vitro</i>	9
3.3. Uvjeti normoksije i hiperoksije.....	10
3.4. Metode za određivanje ekspresije gena.....	10
3.4.1. Izolacija RNA (Trizol reagent).....	10
3.4.2. Reverzna transkripcija	11
3.4.3. Kvantitativni PCR (qPCR).....	11
3.5. Metode za određivanje ekspresije proteina	12
3.5.1. Izolacija proteina	12
3.5.2. BCA analiza	12
3.5.3. SDS-PAGE ili denaturirajuća elektroforeza.....	13
3.5.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu	14
3.5.5. Imunodetekcija proteina na membrani	15
3.6. MTT test- metoda za određivanje metaboličke aktivnosti stanica	16
3.7. CFU – metoda za određivanje preživljenja stanica	16
3.8. Protočna citometrija	17
3.8.1. Mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutastaničnih ROS-ova	17
3.8.2. Stanični ciklus	18
3.9. Mjerenje antioksidacijskog enzima GPx	19

3.10. Imunofluorescencija.....	20
3.11. Konfokalna mikroskopija.....	21
§ 4. REZULTATI.....	22
4.1. Određivanje ekspresije proteina γ H2AX u svrhu određivanja trajanja tretmana.....	22
4.2. Karakterizacija klonova sa stabilnom ekspresijom sirtuina 3 u normoksiji i hiperoksiji...23	
4.3. Utjecaj sirtuina 3 na ekspresiju antioksidacijskih proteina u uvjetima hiperoksije.....	24
4.4. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na metaboličku aktivnost i stvaranje kolonija...25	
4.5. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na mitohondrijske parametre	28
4.6. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na proizvodnju mitohondrijskih i citosolnih ROS-ova	29
4.7. Uloga sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na stanični ciklus.....	31
4.8. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na aktivnost antioksidacijskog enzima glutacion peroksidaze (GPx).....	32
4.9. Konfokalna analiza ekspresije γ H2AX proteina u uvjetima normoksije i hiperoksije	33
§ 5. RASPRAVA	35
§ 6. ZAKLJUČAK	40
§ 7. POPIS KRATICA.....	41
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	43
§ 9. ŽIVOTOPIS	XLVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Utjecaj sirtuina 3 u tretmanu hiperoksijom na tumorske karakteristike trostruko negativnih stanica raka dojke (MDA-MB-231)

Dora Marčinko

Sirtuin 3 (Sirt3) je glavna mitohondrijska NAD^+ -ovisna deacetilaza s ulogom u održavanju energetske homeostaze. U nedostatku Sirt3 dolazi do povišenog oksidacijskog stresa, visokih razina reaktivnih kisikovih vrsta, oštećenja DNA i genomske nestabilnosti te kontinuiranog rasta tumorskih stanica. Sirt3, ovisno o tipu stanica, pokazuje dvojnu ulogu u stanicama raka. Ovo istraživanje je provedeno na trostruko negativnim stanicama raka dojke MDA-MB-231 s nadeksprimiranim Sirt3 u uvjetima normoksije i hiperoksije (95% O_2) kako bi se ispitao utjecaj Sirt3 na proliferaciju, metaboličku aktivnost i mitohondrijsku funkciju. Sirt3 je poboljšao funkciju mitohondrija (pojačani metabolizam, mitohondrijska masa i potencijal), ali unatoč aktivnijim antioksidativnim enzimima, uzrokovao je i više mitohondrijskih ROS-ova, veće oštećenje DNA te manju sposobnost stvaranja kolonija, s izraženijim efektom u hiperoksiji. Stoga su Sirt3 i hiperoksija pokazali i tumor-supresorski učinak u MDA-MB-231 stanicama, te bi se trebali proučiti dodatni mehanizmi njihovog utjecaja u svrhu pronalaska potencijalnih terapijskih meta u liječenju trostruko negativnih tumora dojke.

(47 stranica, 20 slika, 5 tablica, 62 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: hiperoksija, MDA-MB-231, oksidacijski stres, rak dojke, sirtuin 3

Mentor: dr. sc. Sandra Sobočanec, viši zn. sur., Institut Ruđer Bošković

Neposredni voditelj: dr. sc. Iva Škrinjar, Institut Ruđer Bošković

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

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. doc. dr. sc. Ivica Đilović
 3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Datum diplomskog ispita: 5. srpnja 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

The role of Sirtuin 3 upon hyperoxic treatment on tumorigenic characteristics of triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231)

Dora Marčinko

Sirtuin 3 (Sirt3) is the major mitochondrial NAD⁺-dependent deacetylase with role in maintaining the energetic homeostasis. The absence of Sirt3 causes elevated oxidative stress, high levels of reactive oxygen species (ROS), DNA damage and genomic instability, as well as a continuous tumor cell growth. Sirt3 has a dual role in cancer cells depending on the cell type. This study has been conducted on the triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 with overexpressed Sirt3 in normoxia and hyperoxia (95% O₂) to investigate the effect of Sirt3 on proliferation, metabolic activity and mitochondrial function. Sirt3 improved the function of mitochondria (increased metabolism, mitochondrial mass and potential), however, despite more active antioxidant enzymes, it also induced more mitochondrial ROS, greater DNA damage and lower colony forming, with a more pronounced effect in hyperoxia. Therefore Sirt3 and hyperoxia have a tumor-suppressing effect on MDA-MB-231 and the additional mechanism of their effect should be further explored in order to find potential therapeutic targets in the treatment of triple-negative breast cancer.

(47 pages, 20 figures, 5 tables, 62 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: breast cancer, hyperoxia, MDA-MB-231, oxidative stress, sirtuin 3

Mentor: Dr. Sandra Sobočanec, Research Associate, IRB

Assistant mentor: Dr. Iva Škrinjar, IRB

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

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
- Substitute: Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Date of exam: 5th July 2019.

§ 1. UVOD

Mitochondriji su stanični organeli koji služe kao glavni izvor energije u eukariotskim stanicama. U njima se odvijaju važni procesi: oksidacijska fosforilacija i ciklus limunske kiseline koji su bitni biokemijski procesi u razgradnji glukoze u stanici¹. Mitochondriji imaju ključnu ulogu u proizvodnji ATP-a, signalnim putevima, staničnoj diferencijaciji, staničnoj proliferaciji te u staničnoj smrti². Ti visoko dinamični organeli imaju sposobnost promjene svoje funkcije, morfologije i broja kao odgovor na brojne fiziološke uvjete³. U posljednjih nekoliko desetljeća mnogi znanstvenici su uspoređivali ulogu mitohondrija u zdravim i bolesnim stanicama na temelju čega ukazuju na varijacije u mitohondrijskim genima koji mogu biti potencijalni pokazatelji u dijagnosticiranju raznih bolesti². Sukladno tome, mitohondrijska regulacija ima vrlo bitnu ulogu i u stanicama raka gdje regulira proliferaciju, rast i apoptozu stanica raka⁴.

Obitelj sirtuina (Sirt) sisavaca opisana je sa sedam proteina (Sirt1-7), dok su od toga samo tri mitohondrijski sirtuini (Sirt3-5)³. Sirtuin 3 (Sirt3) je glavna mitohondrijska NAD⁺-ovisna deacetilaza koja ima bitnu ulogu održavanja energetske homeostaze, te ukoliko nije prisutna u stanici dolazi do slabljenja funkcije mitohondrija odnosno mitohondrijski proteini postaju hiperacetilirani što smanjuje sposobnost mitohondrija za stvaranje ATP-a. Također ukoliko Sirt3 nije prisutan stanice pokazuju povišen oksidacijski stres⁵. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), te se takvo stanje definira kao poremećaj ravnoteže između proizvodnje ROS-ova i antioksidacijske obrane⁶⁻⁷. Također, brojna istraživanja potvrđuju da visoke razine ROS-ova izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost te na taj način dolazi do kontinuiranog rasta i proliferacije tumorskih stanica⁸⁻⁹.

Rak dojke je najučestaliji maligni tumor kod žena i peti uzrok smrti u svijetu¹⁰. Epidemiološka istraživanja potvrđuju nekoliko rizičnih čimbenika za nastanak tumora dojke, a to su: dob, prehrana i način života, nasljedna predispozicija (najčešće mutacije gena BRCA1 i BRCA2¹¹), reproduktivna aktivnost, socioekonomski status i rasna pripadnost¹²⁻¹³. Jedan od bitnijih činitelja etiologije tumora dojke jest estrogen koji se veže na estrogenske receptore (ER) α i β , koji se potom aktiviraju, promijene konformaciju, vežu na staničnu DNA i reguliraju prepisivanje gena. Na taj način estrogeni reguliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju, ne samo u dojki nego i u drugim tkivima i organima¹⁰. Međutim, posljednjih desetak godina brojni

znanstvenici su usmjereni na trostruko negativne stanice raka dojke (eng. *triple-negative breast cancer*, TNBC) koje su zbog nedostatka ekspresije ER, progesteron receptora (PR) i ljudskog epidermalnog faktora rasta, tip 2 (HER2; engl. *human epidermal growth factor receptor type 2*) puno agresivnije i otpornije na liječenje endokrinom terapijom, dok su u liječenju ER pozitivnih podtipova tumora dojke već pronađene terapijske strategije koje ometaju signalni put estrogena¹⁴. Iz tog razloga pokazan je interes za daljnja istraživanja na molekularnoj razini kako bi se dobila što preciznija dijagnoza, a i poboljšao sam način liječenja¹⁵.

ROS-ovi osim što su posljedica uobičajenih biokemijskih procesa, mogu biti i posljedica povećane koncentracije kisika u stanici. Povećane koncentracije kisika su uzrokovane povećanim parcijalnim tlakom kisika pri atmosferskom tlaku koji uzrokuje hiperoksiju (95% O₂). Hiperoksija izaziva oksidacijski stres, odnosno narušava utjecaj antioksidacijskih enzima na ROS-ove¹⁶.

1.1. Ciljevi i svrha rada

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak povišene razine kisika (hiperoksije) i pojačane ekspresije mitohondrijskog proteina sirtuina 3 (Sirt3) na proliferaciju, stanični ciklus, metaboličku aktivnost, oštećenje DNA i mitohondrijsku funkciju trostruko negativnih stanica raka dojke MDA-MB-231. Kako bi se došlo do navedenog cilja korištene su suvremene metode molekularne biologije i biokemije (izolacija RNA-reverzna transkripcija-*real time* PCR, Western blot, protočna citometrija, testovi proliferacije i antioksidativnih enzima, konfokalna mikroskopija).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

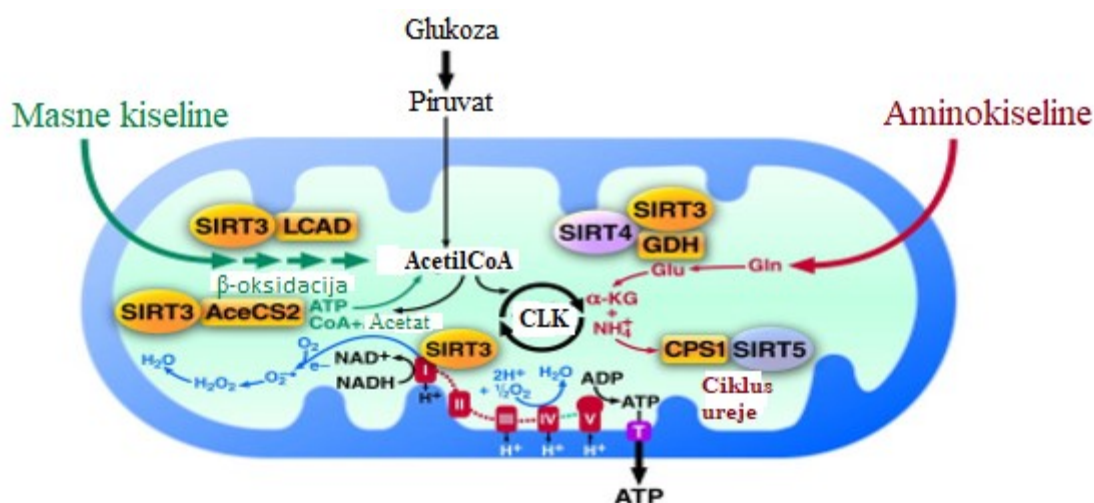
2.1. Sirtuini

Sirtuini su obitelj enzima koji se ponašaju kao NAD^+ - ovisne deacetilaze i samim time vrše brojne biološke funkcije, no za razliku od ostalih proteinskih deacetilaza oni zahtijevaju NAD^+ kao kofaktor u reakciji deacetilacije. Sirtuini djeluju i kao senzori energijskog statusa, jer njihova enzimska ovisnost o NAD^+ direktno povezuje njihovu funkciju s metaboličkim statusom stanice ili organizma. Omjer NAD^+ -a mijenja se između različitih količina NAD^+ i NADH , prema metaboličkom statusu stanice, a promjene u tom omjeru mogu utjecati na enzimsku aktivnost sirtuina koja je izrazito povećana kod visoke razine NAD^+ ¹⁷. Oni imaju mnogo funkcija u različitim fiziološkim procesima kao što su regulacije ekspresije gena, metabolička kontrola, apoptoza i preživljenje stanice, popravak DNA i neuroprotekcija. Zbog tolikih uloga u fiziološkim procesima postoji ogroman interes ne samo za njihove funkcije, nego i za različite spojeve koji mogu modificirati njihove funkcije³.

Kod sisavaca postoji sedam članova obitelji sirtuina (Sirt1-7), od toga se tri člana nalaze isključivo u mitohondrijima, a to su: Sirt3, Sirt4 i Sirt5 dok su Sirt1, Sirt6 i Sirt7 lokalizirani u jezgri, a Sirt2 u citosolu. Sirt1 je homolog kvašćevom (*S. cerevisiae*) Sirt2, koji je prvi član obitelji sirtuina povezan sa starenjem kod manje odvedenih organizama, te su iz tog razloga početna istraživanja sirtuina kod sisavaca bila usmjerena na Sirt1 čije se frakcije mogu pronaći i u citosolu¹⁸. Na temelju tih istraživanja dokazano je kako Sirt1 ima bitnu ulogu u regulaciji metabolizma i deacetilira peroksisomalni receptor aktivacije proliferacije 1 α (PGC-1 α), a kod sisavaca deacetilira i deaktivira protein p53¹⁷. PGC-1 α je transkripcijski faktor koji služi kao regulator mitohondrijske biogeneze i funkcije, te reagira na metabolički stres³. S druge strane, Sirt2 je citosolni sirtuin, koji deacetilira transkripcijske faktore: HIF1 α (transkripcijski aktivator glikolize) i citosolni FOXO, te općenito služi za koordinaciju dinamike mikrotubula i aktivnost transkripcijskih faktora koji se nalaze izvan jezgre¹⁷.

Mitohondrijski sirtuini Sirt3-5 sudjeluju u proizvodnji ATP-a, metabolizmu, apoptozi i staničnoj signalizaciji. Za razliku od Sirt1 (veliĉine 100 kDa), mitohondrijski sirtuini su puno manji, od 30 do 40 kDa. Sirt3 i Sirt5 funkcioniraju kao NAD^+ -ovisne deacetilaze, dok Sirt4 nema identificirani acetilirani supstrat pa pokazuje samo ADP-riboziltransferaznu aktivnost.

U oksidativnoj fosforilaciji elektroni prolaze kroz lanac prijenosa elektrona (I-IV), generirajući na taj način protonski gradijent koji aktivira ATP-sintazu koja stvara ATP. Sirt3 se veže na kompleks I i II, aktivira ih i tako regulira energetske stanice. Nadalje, Sirt3 veže i deacetilira acetyl-CoA-sintetazu 2 (AceCS2), glutamat-dehidrogenazu (GDH) i dugolančanu acil-CoA-dehidrogenazu (LCAD), te tako aktivira njihovu enzimsku aktivnost. Pošto Sirt3 ima i interakciju s nekoliko enzima ciklusa limunske kiseline (CLK), uključujući sukcinat-dehidrogenazu (SDH) i izocitrat-dehidrogenazu 2 (IDH2), pretpostavlja se da Sirt3 regulira protok intermedijera kroz CLK. Sirt4 indirektno regulira CLK tako što veže i inhibira aktivnost GDH, dok Sirt5 sudjeluje u prvom koraku ciklusa ureje, tako što deacetilira i aktivira karbamoil-fosfat sintetazu 1 (CPS1) (Slika 1.)³.



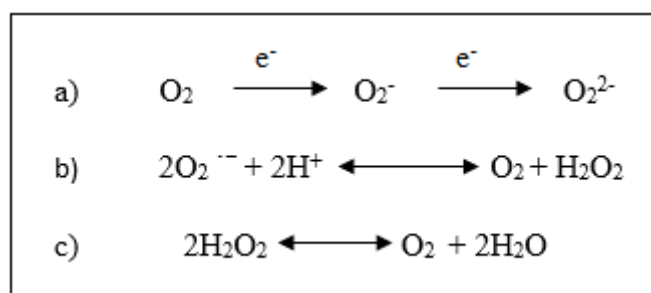
Slika 1.: „Mreža“ mitohondrijskih proteina (prilagođeno prema³)

2.2. Utjecaj aktivnosti sirtuina 3 i hiperoksijske na nastanak oksidacijskog stresa

2.2.1. Nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)

U ciklusu limunske kiseline nastaju elektroni visoke energije u obliku NADH i FADH₂ i oni zatim prolaze kroz respiracijski lanac koji pokreće protonske crpke i završava redukcijom kisika¹⁹. Molekulski kisik je idealni krajnji akceptor elektrona zbog svojeg visokog afiniteta za elektrone. U redukciji O₂ dolazi do prijenosa četiriju elektrona što vodi do nastanka „sigurnog“

produkta, odnosno dvije molekule H_2O . No, ukoliko redukcija nije potpuna nastaju opasni spojevi poput superoksidnog iona (O_2^-), hidroksilnog radikala ($\bullet\text{OH}$) i vodikovog peroksida (H_2O_2) (**Slika 2.a**). Navedeni spojevi i molekulske vrste koje nastaju iz njih nazivaju se reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Stoga je glavni izvor ROS-ova mitohondrijski respiracijski lanac, koji je ujedno i „meta“ za štetne učinke ROS-ova²⁰. ROS-ovi uzrokuju brojna oksidacijska oštećenja, što dovodi do niza promjena u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Na temelju toga definira se oksidacijski stres kao poremećaj ravnoteže prooksidansa (slobodnih radikala i ROS-ova) i antioksidansa, u smjeru prooksidansa. Do takvog pomaka ravnoteže dolazi ukoliko je smanjena antioksidativna zaštita organizma ili ako je pojačano stvaranje radikala i ROS-ova, te se samim time narušava homeostaza iona, prijenos signala u stanici i genska transkripcija, što naposljetku dovodi do nastanka raznih poremećaja i patoloških stanja⁸⁻⁹. Kao obrambenu strategiju protiv oksidacijskih oštećenja koje uzrokuju ROS-ovi, stanica najčešće upotrebljava enzimske antioksidanse superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (Cat), glutation-peroksidazu (GPx) i glutation-reduktazu²¹. Enzim SOD odstranjuje superoksidne radikale katalizirajući pretvaranje dvaju radikala u vodikov peroksid i molekularni kisik (**Slika 2.b**)¹⁹. Glavna uloga tog enzima je smanjenje oksidacijskog stresa, te je zbog toga vrlo učinkovit antioksidativni čimbenik u obrani svih stanica koje sudjeluju u procesu aerobnog metabolizma²³. Enzim Cat je sveprisutni hemoprotein koji katalizira dismutaciju vodikova peroksida u vodu i molekularni kisik (**Slika 2.c**)¹⁹.



Slika 2. a) prijenosom jednog elektrona na O_2 nastaje superoksidni anion, a prijenosom dvaju elektrona nastaje peroksid; **b)** SOD katalizira pretvaranje dvaju radikala u molekularni kisik i vodikov peroksid; **c)** Cat katalizira dismutaciju vodikova peroksida u molekularni kisik i vodu

Glutation-peroksidaza također katalizira redukciju vodikovog peroksida do vode ili odgovarajućeg alkohola²³, dok je glutathion-reduktaza zaslužna za katalizu regeneracije reduciranog oblika glutathiona iz NADPH kao donora elektrona¹⁹.

Brojna istraživanja potvrđuju da ROS-ovi mogu biti i produkti oksidacijskog stresa uzrokovanog hiperoksijom, odnosno povećane koncentracije kisika u stanici koja nastaje kada su stanice izložene povećanom parcijalnom tlaku kisika (95% O₂) pri atmosferskom tlaku¹⁶.

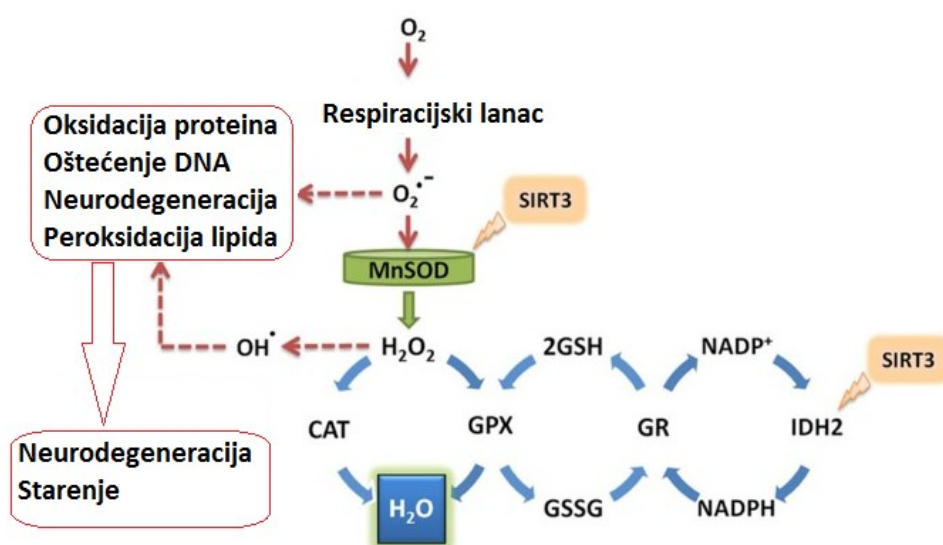
2.2.2. Sirtuin 3 kao posrednik u produljenju životnog vijeka

Sirtuin 3 (Sirt3) kao glavna mitohondrijska NAD⁺ - ovisna deacetilaza ima bitnu ulogu u održavanju energetske homeostaze. Za njegovu mitohondrijsku lokalizaciju odgovorno je 25 aminokiselinskih ostataka na N- kraju koji se prilikom translokacije u mitohondrijski matriks odvajaju proteolitičkim cijepanjem, te se tako formira katalitički aktivan Sirt3 (28 kDa) koji potom stimulira odgovarajuće mitohondrijske enzime²⁴⁻²⁵.

Između ostalog, Sirt3 ima ključnu ulogu u deacetiliranju antioksidacijskih enzima koji sprječavaju nastanak ROS-ova. Superoksid-dismutaza 2 kao jedna od glavnih „meta“ nadeksprimiranog Sirt3 se aktivira i potom uklanja superoksidne radikale. Osim što aktivira superoksid-dismutazu 2, Sirt3 aktivira i katalazu tako što tvori kompleks s FOXO3a, transkripcijskim faktorom superoksid-dismutaze 2 i katalaze²⁵. Nadalje, IDH2 kao kofaktor koristi NADPH i ima skoro upola manju aktivnost u acetiliranom obliku. Stoga djelovanjem Sirt3 IDH2 postaje maksimalno aktivna, povećava se razina NADPH, te i na taj način Sirt3 štiti stanice od oksidacijskog stresa²⁶. Aktivnost Sirt3 povećava se osim uz kalorijsku restrikciju i tijekom fizičke aktivnosti, a njegova aktivnost smanjuje se prilikom nezdrave prehrane, u stanju dijabetesa i starenjem²⁶⁻²⁸.

Oko 90% staničnih ROS-ova nastaje u mitohondrijima, te se smatra da se razine ROS-ova povećavaju starenjem zbog akumulacije oštećenih mitohondrija. Visoka razina ROS-ova u starenju inducira prekomjernu ekspresiju antioksidacijskih enzima, koji prema brojnim studijama produljuju životni vijek²⁹⁻³⁰. Kao što je već spomenuto aktivnost Sirt3 može smanjiti razinu ROS-ova izravnim djelovanjem na antioksidacijske enzime, djelujući tako kao obrana protiv oksidacijskih oštećenja i samim time kao obrana protiv starenja. Sirt3 osim što djeluje na SOD2, Cat i IDH2, neposredno djeluje i na glutathion (GSH) koji ima ulogu glavnog antioksidansa u stanicama, smanjujući tiolne skupine oksidiranih proteina i služeći kao

posrednik u reakcijama oksidacijskog stresa. Oksidirani glutation (GSSH) može se regenerirati do GSH uz djelovanje glutation-reduktaze. Povećana aktivnost IDH2 posredovana deacetilacijom Sirt3 povećava razinu NADPH, što povećava aktivnost glutation-reduktaze za daljnju olakšanu regeneraciju GSH i GSSG (Slika 3.). Tijekom starenja oksidirani glutation se akumulira i mijenja omjer mitohondrijskog GSH u GSSG. Stoga se omjer GSH prema GSSG može upotrijebiti kao marker za stanični oksidacijski stres i starenje³¹.



Slika 3.: Djelovanje Sirt3 na obrambeni sustav ROS-ova³¹

2.2.3. Sirtuin 3: tumor-supresor ili tumor-promotor?

Novija istraživanja pokazuju da Sirt3 može djelovati kao tumor-supresor i kao tumor-promotor. Tumorske stanice obično pokazuju višu razinu ROS-ova u odnosu na zdrave stanice što daje prednost u promociji i napredovanju tumora, kao i otpornosti na kemoterapiju³². Kako Sirt3 ima ključnu ulogu u regulaciji puteva oksidacijskog stresa, tako može i održavati razine ROS-ova na odgovarajućim razinama za održavanje proliferacijskog i agresivnog fenotipa, čime se sprečava apoptoza i potiče karcinogeneza. Sirt3 je također i deacetilaza koja reagira na stres, te njegova povećana ekspresija može štititi tumorske stanice od staničnog oštećenja održavanjem mitohondrijskog integriteta i funkcije³³.

S druge strane, otkrivena je proapoptotička uloga Sirt3 u tumorima. Gubitak Sirt3 povećava proizvodnju ROS-ova što dovodi do stabilizacije HIF1 α koji inducira visoku koncentraciju

proapoptotičkih proteina, te može uzrokovati i stabilizaciju p53. Osim toga i povećana ekspresija Sirt3 dovodi do stabilizacije glavnog tumorskog supresora p53. Visoka razina Sirt3 smanjuje unutarstanične razine ROS-ova te tako održava staničnu homeostazu i povećava otpornost stanica na apoptozu. Iz tih razloga Sirt3 postaje sve popularniji kao moguće rješenje u razvoju novih terapijskih strategija protiv raka³⁴.

Kisik je nužno potreban tumorskim stanicama za preživljavanje i rast, stoga bi bilo očekivano da će povećana koncentracija kisika (hiperoksija) povećati rast tumorskih stanica. No, neka istraživanja dokazuju upravo suprotno, to jest da hiperoksija ima inhibitorni učinak na rast određenih staničnih linija raka. Utvrđeno je i pojačano kemoterapijsko djelovanje na ROS-ove pod tretmanom hiperoksije, što upućuje na to da bi bilo vrlo korisno povezati određene kemoterapeutike s hiperoksijom kako bi se otkrilo njihovo zajedničko djelovanje i razvoj terapije³⁴.

2.3. Trostruko negativne stanice raka dojke (MDA-MB-231)

Čak 10-15% oboljelih od raka dojke boluje upravo od raka s trostruko negativnim stanicama, te zbog njihovih karakteristika imaju puno lošiji ishod u liječenju u usporedbi s drugim podtipovima raka dojke³⁵. Svaka podskupina TNBC ima jedinstveni molekularni profil i može zahtijevati specifične tretmane liječenja, zbog čega su posljednjih godina brojna istraživanja usmjerena upravo na trostruko negativne stanice raka dojke. Za pacijente s TNBC-om kao standardni način liječenja koristi se kombinacija operacije i kemoterapije nakon čega slijedi radijacijska terapija³⁶. Do sada je potvrđeno 27 staničnih linija raka dojke koje se klasificiraju kao TNBC, a upravo jedna od njih je i MDA-MB-231 stanična linija. Te stanice osim što ne posjeduju ER i PR receptore, te HER2, eksprimiraju i mutirani p53, pa su stoga jedna od najčešće korištenih staničnih linija u medicinskim znanstvenim istraživanjima³⁵. MDA-MB-231 se često naziva i „besmrtna stanična linija“ jer ima aktivnu telomerazu koja sprečava skraćivanje njihovih telomera i omogućuje neprekidne diobe.

Status kisika u tumoru (hipoksija) je ključni čimbenik koji može ugroziti učinkovitost liječenja zračenjem, stoga su brojna istraživanja usmjerena na liječenje tumora s povećanom koncentracijom kisika (hiperoksija). Hiperoksija slabi rast tumora, odnosno smanjuje agresivno ponašanje tumora. Također, neka istraživanja su potvrdila manji broj metastaza TNBC-a u hiperoksičnim uvjetima³⁷.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Standardne kemikalije

DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), serum fetusa goveda (engl.FBS, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka), neesencijalne aminokiseline (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka), otopina antibiotika/antimikotika (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka), Trizol (TRIZOL Reagent, Life technologies, SAD), kloroform (Kemika, Hrvatska), izopropanol (Kemika, Hrvatska), etanol (Kemika, Hrvatska), DEPC H₂O (Sigma, Aldrich, SAD), Midori Green boja (Nippon Genetics, Njemačka), deoksiribonukleaza (DNAza; TURBO DNA-free Kit, Thermo Fisher Scientific, SAD), *Taqman assay* (Thermo Fisher Scientific, SAD), tripsin (Capricorn Scientific, Njemačka), inhibitori proteaza (cOmpleteTM EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska), BCA reagens (BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific SAD), proteinski standard Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color (BIO-RAD, SAD), akrilamid-bisakrilamid, 40% 29:1 (Sigma Aldrich, SAD), APS (Sigma Aldrich, SAD), TEMED (Sigma Aldrich, SAD), ECL (PerkinElmer, SAD, Pierce, SAD), *Mitotracker Deep Red* (ThermoFisher Scientific, SAD), NAO (10-N-nonyl acridine orange, Invitrogen, SAD), DHE (dihidroetidij; Sigma Aldrich, SAD), *MitoSOX Red* (ThermoFisher Scientific, SAD), *SytoxRed* boje (ThermoFisher Scientific, SAD), Rnaza A (iNtRON Biotechnology, Južna Koreja), DAPI boja (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Aldrich, SAD), medij za uklapanje (Dako North America, Inc., CA, SAD)

3.2. Stanična kultura *in vitro*

U ovom istraživanju korištene su adherentne, epitelne stanice MDA-MB-231 koje svojim obilježjima agresivnih i invazivnih stanica spadaju u trostruko negativnu staničnu liniju raka dojke. Prije istraživanja stanice su transfecirane plazmidom pcDNA3.1 + Flag-Sirt3 koji sadrži gen za Sirt3 označen s Flag (Flag-Sirt3, Addgene Cat.No.13814) opisane kao MDA-S3. Kao kontrola (MDA-C) korištene su stanice transfecirane praznim plazmidom pcDNA3.1+. Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) koja se kompletira s dodatkom 10 % seruma fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 1% neesencijalnih aminokiselina i 1% otopinom antibiotika/antimikotika. Stanice su uzgajane u

plastičnim bocama za staničnu kulturu različitih veličina s filterom na čepu koji omogućuje protok zraka, te su držane u inkubatoru pri temperaturi od 37°C i 5% CO₂.

3.3. Uvjeti normoksije i hiperoksije

Prije svakog eksperimenta stanice su podvrgnute uvjetima normoksije i hiperoksije (95% O₂). Kako bi se postigli hiperoksični uvjeti stanice su držane u komori za hiperoksiju (StemCell™ Technology Inc., Canada) tijekom 16h u inkubatoru, dok su kontrolne stanice držane (normoksija) pri standardnim uvjetima (5% CO₂). Prije tretmana hiperoksijom, svim stanicama je omogućeno 24 sata da se prihvate na podlogu.

3.4. Metode za određivanje ekspresije gena

3.4.1. Izolacija RNA (Trizol reagent)

Nakon tretmana hiperoksijom, sa stanica je uklonjen medij, isprane su PBS-om i dodan je 1 mL Trizola, a lizati su zatim prebačeni u sterilne tubice od 1,5 mL. Stanice su potom inkubirane 5 minuta pri sobnoj temperaturi i dodano je 200 µL kloroforma. Tubice su vorteksirane 15 sekundi i inkubirane 5 minuta na ledu, a zatim su centrifugirane 15 minuta na 12000 g (4°C). Nakon centrifugiranja dobivene su tri faze, gdje je gornja, vodena faza oprezno odvojena jer se u njoj nalazi RNA. Na vodenu fazu dodan je isti volumen 100% izopropanola, tubice su lagano promiješane nekoliko puta i stavljene su na inkubaciju 10 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom centrifugirane 10 minuta na 12000 g (4°C), a nakon centrifugiranja uklonjen je supernatant i talogu je dodan 1 mL 75% etanola. Uzorci su kratko vorteksirani i centrifugirani 5 minuta na 7500 g (4°C), nakon čega je ponovljen korak s etanolom. Supernatant je uklonjen, te ponovno dekantiran i talog je sušen na ledu 10 minuta, pritom pazеći da se ne presuši jer se na taj način smanjuje njegova topivost. Talog je zatim otopljen u 20 µL DEPC H₂O (voda s dietilpirokarbonatom) i ostavljen je na ledu sve do mjerenja koncentracije i kvalitete RNA na UV/Vis spektrofotometru malih volumena koji iz omjera apsorbancije 260/280 određuje čistoću izolirane RNA (omjer bi trebao biti oko 2.0) (NanoPhotometer N60/N50, IMPLLEN, SAD).

Kako bi se potvrdila kvaliteta RNA, provedena je elektroforeza na 1% (w/V) agaroznom gelu (1g agaroze otopljene u 100 mL 1x TAE pufera). Prije svega otopi se agarozu u TAE puferu (2 mL 50x TAE + 98 mL ReH₂O) u koji se potom doda 4 µl Midori Green boje gel se potom izlije u kadu i ostavi 30 minuta da se polimerizira. Nakon provedene elektroforeze (40 minuta pri 80 V) gel je slikan na uređaju za oslikavanje UVITEC (UVItec Limited, UK).

3.4.2. Reverzna transkripcija

Reverznom transkripcijom sintetizira se cDNA iz izolirane RNA. Kako bi spriječili onečišćenje uzorka s genomskom DNA na 3 µg RNA dodan 1 µL 1 U/ µL deoksiribonukleaze (DNAza), 2 µL 10x pufera za DNAzu i do konačnog volumena od 20 µL dodana je qH₂O (pročišćena voda). Nakon inkubacije 25 minuta pri 37°C dodano je 3 µL DNAznog inhibitora te su uzorci dobro promiješani i inkubirani na sobnoj temperaturi 5 minuta. Uzorci su zatim centrifugirani na 10000 g 1,5 minuta da se istaloži inhibitor i supernatant je oprezno prebačen u čiste tubice. Do ponovne upotrebe dobivene RNA, tubice su držane na ledu. Na temelju izmjerenih koncentracija RNA pripremljena je mješavina prema **Tablici 1.**, koja je potom raspodijeljena po 6,8 µL po PCR tubici. Zatim je provedena reverzna transkripcija uz sljedeći program: 25°C 15 minuta, 37°C 2 sata, 85°C 5 minuta. Dobivenoj cDNA dodano je 80 µL qH₂O i uzorci su spremljeni na -20°C.

Tablica 1. Mješavina za reverznu transkripciju po uzorku

OTOPINA	V/ µl	Konačna koncentracija
10x RT pufer	2	1x
25x dNTP	0,8	4 mmol dm ⁻³
10x nasumične početnice	2	1x
reverzna transkriptaza	1	1 U/µl
ribonukleazni inhibitor	1	2,5 U/µl

3.4.3. Kvantitativni PCR (*qPCR*)

Kvantitativni PCR (engl. *Quantitative PCR*, *qPCR*), odnosno *real time PCR* omogućuje određivanje početne količine uzorka na temelju mjerenja fluorescencije koja odgovara količini

umnožene DNA. U PCR tubice (triplikat za svaki uzorak) dodano je 10 μL mješavine za qPCR, 1 μL *Taqman assay-a* koji sadrži dvije fluorescentno označene specifične početnice, 5 μL cDNA i 4 μL qH₂O. qPCR proveden je na qPCR uređaju (Applied Biosystems, 7300 Real time PCR system, SAD) uz korištenje komparativne CT ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metode za određivanje relativne razine ekspresije gena *sirt3*.

3.5. Metode za određivanje ekspresije proteina

Western blot je metoda koja se koristi u svrhu identifikacije određenih proteina ili za određivanje bitnih karakteristika proteinskih antigena iz otopine proteina ekstrahiranih iz stanica. Prije same metode potrebno je izolirati proteine iz kulture stanica. Western blot metoda provodi se u tri koraka: 1. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *Polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE), 2. Prijenos proteina na membranu i 3. Imunodetekcija proteina na membrani³⁸.

3.5.1. Izolacija proteina

Nakon tretmana hiperoksijom, iz kulture adherentnih stanica uklonjen je medij i stanice su isprane PBS-om. Zatim su odvojene od podloge primjenom enzima tripsina, a nakon toga su centrifugirane 5 minuta pri 300 g (4°C). Dobiveni talog resuspendiran je u 300 μL RIPA pufera (50 mmol dm⁻³ Tris pufer, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1% SDS, 12 mmol dm⁻³ Na-deoksikolat, 1% Triton) s inhibitorima proteaza. Stanice su potom prebačene u 1,5 mL tubice i sonificirane dva puta po 20 sekundi pomoću ultrazvučne sonde promjera 1mm (u ciklusu 1 i amplitude 80%, Labsonic, Biotech International) na ledu. Nakon sonifikacije, lizat stanica je centrifugiran 20 minuta pri 16000 g (4°C), a zatim je supernatant prebačen u novu 1,5 mL tubicu iz čega je izmjerena koncentracija proteina BCA metodom (engl. *bicinchonic acid protein assay*, test bikinkonične kiseline).

3.5.2. BCA analiza

BCA analiza provodi se u mikrotitarskoj pločici s 96 jažica, a uzorci se najčešće nanose u duplikatima. Kao standardi koriste se otopine albumina iz goveđeg seruma (koncentracija: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL i 0,06 mg/mL). U jažice je dodano

po 25 μL standarda, po 25 μL PBS-a kao slijepa probe i 5 μL uzorka proteina razrijeđenog u 20 μL PBS-a. U sve jažice dodano je po 200 μL BCA reagensa koji je pripremljen od reagensa A i B u omjeru 50:1. Uzorci su zatim inkubirani 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD) pri valnoj duljini $\lambda=570$ nm. Dobiveni podatci obrađeni su u Excel-u i prema jednadžbi pravca izračunate su koncentracije proteina na temelju kojih je izračunat potreban volumen pojedinog uzorka za Western blot.

3.5.3. SDS-PAGE ili denaturirajuća elektroforeza

Poliakrilamidna elektroforeza na gelu uz natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je proces razdvajanja proteina na temelju razlike u njihovoj masi.

Prije svega su složena stakla na postolje za izljevanje gelova. Za razdvajanje proteina potrebna su dva gela: donji gel za razdvajanje (10% ili 12%, ovisno o veličini proteina) i 4% gornji gel za sabijanje uzoraka. Smjesa donjeg gela (**Tablica 2.**) ulivena je pomoću pipete između dva stakla, te je na rub nepolimeriziranog gela dodan 1 mL izopropanola i ostavljen tijekom 20 minuta da gel polimerizira. Nakon toga je izopropanol odliven i pipetom je dodana smjesa gornjeg gela (**Tablica 3.**), te je stavljen češljic za formiranje jažica. Nakon 30 minuta češljic je pažljivo uklonjen, te je pripremljen ostatak aparature za elektroforezu. U kadu za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra (BIO-RAD, SAD) dodan je 1xpufer za elektroforezu (sastav 10x pufera za elektroforezu: 30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5), a u jažice su nanoseni uzorci i proteinski standard Precision Plus Protein™ Standards Dual Color. Zatim je puštena elektroforeza pri naponu od 80 V sve dok uzorci nisu stigli do granice gornjeg i donjeg gela (oko 30 minuta), a potom je napon od 110 V održavan sve dok fronta boje 1x pufera (sastav 5x pufera za nanošenje uzorka: 312,5 mmol dm⁻³ pufera za sabijanje, 12% SDS, 30% glicerol, 0,2% bromfenol blue, 1,716 M merkptoetanol) nije dostigla donji rub gela (oko 1,5 sat).

Tablica 2. Sastav smjese za gel za razdvajanje SDS-PAGE-a

SASTOJAK	VOLUMEN (mL)
4x Tris-HCl	3,75
H ₂ O	7,5
akrilamid-bisakrilamid 40%, 29:1	3,75
APS	0,15
TEMED	0,015

Tablica 3. Sastav smjese za gel za sabijanje SDS-PAGE-a

SASTOJAK	VOLUMEN (mL)
4x Tris-HCl	1,25
H ₂ O	3,25
akrilamid-bisakrilamid 40%, 29:1	0,5
APS	0,025
TEMED	0,005

3.5.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

Nakon završene denaturirajuće elektroforeze u poliakrilamid gelu uklonjen je gel za sabijanje, a gel za razdvajanje je ispran u puferu za prijenos (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5) kako bi se uklonili ostaci soli i deterdženta, te je izrezana PVDF (poliviniliden difluorid; Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, BIO-RAD, SAD) membrana prema dimenzijama gela, koja je nakon aktiviranja u metanolu također prebačena u pufer za prijenos. Sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, SAD) je sastavljen postavljanjem spužvice i filter papira namočenih puferom za prijenos na otvorenu kazetu. Zatim je složen sendvič za prijenos tako da je na jednu stranu kazete posloženo redom: spužvica, filter papir, gel, membrana, drugi filter papir i spužvica, te je kotrljanjem valjka istisnut zrak i zatvorena kazeta. Kazeta je postavljena u kadicu koja je napunjena hladnim puferom za prijenos tako da je cijela kazeta uronjena u pufer. Zatim je proveden prijenos proteina na membranu pri uvjetima konstantne struje od 100 mA tijekom 18 sati pri 4°C.

3.5.5. Imunodetekcija proteina na membrani

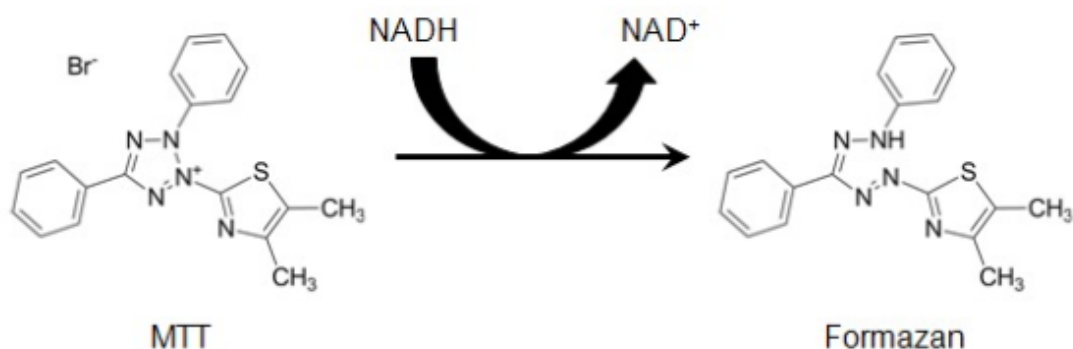
Nakon prijenosa proteina, njihova prisutnost određena je pomoću primarnih i sekundarnih protutijela (**Tablica 4.**). Neposredno poslije prijenosa, membrana je ispirana 10 minuta u PBS-u uz lagano miješanje na klackalici, a zatim je inkubirana u otopini za bojanje (0,1% (m/V) Amido black 10B, 20% v/v metanol, 2% v/v octena kiselina, dH₂O), odbojana u otopini za odbojavanje (45% v/v metanol, 7% v/v octena kiselina, dH₂O) dva puta po 30 minuta i isprana 4 puta u ReH₂O kako bi se isprala octena kiselina. Nakon toga membrana je inkubirana dva puta po 15 minuta u TN puferu (50 mmol dm⁻³ Tris, 150 mmol dm⁻³ NaCl, dH₂O). Membrana je zatim blokirana u 5% mlijeku (mlijeko u prahu otopljeno TN puferu) 1 sat pri sobnoj temperaturi kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu. Primarno protutijelo je pripremljeno u 5% mlijeku u određenom razrjeđenju, te je nanešeno na membranu i inkubirano tijekom noći na 4°C. Nakon inkubacije, membrana je isprana tri puta po 10 minuta u TNT puferu (50 mmol dm⁻³ Tris, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1% Triton-X, dH₂O). Membrana je zatim inkubirana sa sekundarnim protutijelom (pripremljeno u 5% mlijeku u određenom razrjeđenju) 1 sat pri sobnoj temperaturi uz lagano miješanje, te je ispirana tri puta po 10 minuta u TNT-u. Za razvijanje membrane potrebno je pripremiti luminiscentni supstrat ECL miješanjem otopina A i B u omjeru 1:1, koji se potom pipetom nanese na membranu i uz lagano miješanje inkubira tijekom 1 minute. Kemiluminescencija je najčešća metoda detekcije koja uključuje detekciju sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Prije detekcije signala, membrana je prekrivena prozirnom plastičnom folijom, te je signal reakcije kemiluminescencije detektiran pomoću uređaja UVITEC (UVItec Limited, UK).

Tablica 4. Primarna i sekundarna protutijela korištena u detekciji proteina metodom Western blot

PROTUTIJELO	PROIZVODAČ	DOMAĆIN	RAZRJEĐENJE
γH2AX	Abcam	Kunić	1:8000
AcSOD2	Abcam	Kunić	1:500
CAT	Abcam	Kunić	1:1000
Sirt3	Santa Cruz Biotechnology	Miš	1:500
Anti-Rabbit	GE Healthcare	Magarac	1:5000
Anti-Mouse	BIO-RAD	Koza	1:5000

3.6. MTT test- metoda za određivanje metaboličke aktivnosti stanica

U ovom testu NAD(P)H i dehidrogenaze iz metabolički aktivnih stanica reduciraju žutu tetrazolijevu sol MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazonijev bromid] u tamno ljubičasti formazan (Slika 4.)³⁹.



Slika 4.: Struktura tetrazolijeve soli MTT i obojenog produkta formazana ³⁹

Test se provodi u mikrotitarskoj pločici s 96 jažica u koje je nasadeno 5000 stanica po jažici. Nakon 16-satnog tretmana hiperoksijom, pločice su ostavljene dodatnih 48 sati u inkubatoru u normalnim uvjetima. Potom je s pločica uklonjen medij i jažice su isprane s 200 μ L PBS-om, te je po jažici dodano 40 μ L 1x MTT-a pripremljenog u PBS-u. Zatim su mikrotitarske pločice zamotane u foliju i inkubirane tijekom 4 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije dodano je 160 μ L DMSO-a po jažici (u mraku) i stanice su stavljene na termomikser (450 rpm) tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi, kako bi se otopili stvoreni kristali. Izmjerena apsorbanacija uzoraka pri valnoj duljini $\lambda=570$ nm očitana je na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD).

3.7. CFU – metoda za određivanje preživljenja stanica

CFU (engl. *colony-forming unit*) je test formiranja kolonija koji se temelji na sposobnosti jedne stanice da stvori koloniju koja sadrži najmanje 50 stanica. Metoda se također može definirati kao test preživljenja stanica nakon utjecaja zračenja ili djelovanja citotoksičnih sredstava⁴⁰.

Za eksperiment je nasadeno 1500 stanica po Petrijevoj zdjelici promjera 6 cm u 5 mL medija. Nakon tretmana hiperoksije stanice su ostavljene tijekom 10 dana dok nisu nastale kolonije vidljive golim okom. Potom su kolonije isprane PBS-om, fiksirane inkubacijom 10 minuta u 100% metanolu, a potom su sušene 30 minuta pri sobnoj temperaturi i bojane dodatkom boje Giemsa (10%) 30 minuta. Nakon inkubacije uklonjena je boja, te su petrijeve zdjelice pažljivo isprane vodovodnom vodom i osušene. Kolonije su izbrojane pomoću lupe i zatim je izračunato preživljenje stanica u odnosu na kontrolne uzorke koji nisu bili podvrgnuti hiperoksiji.

3.8. Protočna citometrija

Protočna citometrija je biofizička metoda mjerenja fizikalnih i optičkih karakteristika stanica u biološkim uzorima. Princip rada temelji se na obasjavanju laserom stanicu po stanicu, a stupanj raspršenja svjetlosti pokazatelj je fizikalnih svojstava stanica⁴¹. Za multiparametarske analize stanice se obilježavaju fluoroforima koji se vežu za protutijela (specifično bojanje) i zatim se detektira njihova fluorescencija. Protočni citometri (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) su vrlo korisni iz razloga što omogućuju vrlo brzo mjerenje signala ($>10^3$ stanica/sekundi), sortiranje stanica te istodobno mjerenje više parametara (fizikalnih parametara i fluorescentnih signala)⁴².

3.8.1. Mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutarstaničnih ROS-ova

Za praćenje promjena u mitohondrijskom membranskom potencijalu ($\Delta\Psi$) korištena je boja *Mitotracker Deep Red* koja se akumulira u matriksu mitohondrija i ovisi o $\Delta\Psi$, a za praćenje promjena mase mitohondrija korištena je boja NAO koja se veže za kardiolipin, fosfolipid koji je prisutan samo u mitohondrijskoj membrani. *Mitotracker Deep Red* boja ulazi u mitohondrije ovisno o potencijalu, te se na temelju jačine signala boje odredi da li membranski potencijal raste ili pada. Na isti način se prati povećanje mase, tako da NAO boja uđe u mitohondrije i gleda se njezina jačina signala. Za mjerenje unutarstaničnih ROS-ova korištene su boje DHE (dihidroetidij) za detekciju citosolnih ROS-ova, a *MitoSOX Red* za detekciju mitohondrijskih ROS-ova.

Nakon tretmana hiperoksije sa stanica je uklonjen medij te su dva puta isprane PBS-om, tripsinizirane, djelovanje tripsina inhibirano s PBS + 10% FCS-a te su stanice skupljene u 15 mL tubice. Uzorci su zatim centrifugirani na 300 g 5 minuta, uklonjen je supernatant, a stanice su resuspendirane u 5 mL PBS-a + 1% FCS. Nakon resuspendiranja, stanice su prebrojane i raspoređene po 300000 u tubice za FACS. Zatim su ponovno centrifugirane, uklonjen je PBS, te su resuspendirane u 200 µL 100 nM *Mitotracker Deep Red* boje ili u 200 µL 0,5 nM NAO boje, obje pripremljene u PBS-u s 1% FCS-om. Stanice su inkubirane s bojom 30 minuta u inkubatoru, te su potom centrifugirane pri 300 g (4°C) tijekom 5 minuta. Uklonjen je supernatant, stanice su isprane 1x PBS-om i resuspendirane u 300 µL PBS-a + 1% FCS-om. Za isključivanje mrtvih stanica korišten je propidijev jodid (PI) koncentracije 1,5 µg/mL, koji je dodan u tubice 15 minuta prije analiziranja uzoraka na FACS uređaju.

Za mjerenje unutarstaničnih ROS-ova uzorci su pripremljeni kao što je opisano u prethodnom odlomku sve do primjene boje. Za bojanje mitohondrijskih i citosolnih ROS-ova korišteno je 200 µL 5 µM *MitoSOX Red* boje, odnosno 300 µL 20 µM DHE boje, obje pripremljene u PBS-u s 1% FCS-om. Stanice su inkubirane s bojama tijekom 30 minuta u inkubatoru, nakon čega su stanice obojane s *MitoSOX Red* bojom centrifugirane na 300 g tijekom 5 minuta, uklonjen je supernatant i talog je resuspendiran u 200 µL PBS-a + 1% FCS, te je postupak centrifugiranja i resuspendiranja ponovljen, ovaj put u 300 µL PBS-a + 1% FCS. Zatim je u svaku tubicu dodano 3 µL *SytoxRed* boje (konačne koncentracije 500 nM). Stanicama obojanim s DHE bojom je odmah nakon inkubacije dodano 3 µL *Sytox Red* (konačne koncentracije 500 nM) po tubici. Uzorci su držani na ledu 15 minuta i potom analizirani na protočnom citometru (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences, SAD) u FL1 (NAO), FL2 (DHE i *MitoSOX red*), FL3 (PI), FL4 (*Mitotracker Deep Red* i *Sytox red*) kanalu.

3.8.2. Stanični ciklus

Stanični ciklus definira se kao ciklus rasta i diobe, a čine ga dva osnovna dijela: mitozu (M) i interfazu (G1, S i G2). Tijekom interfaze stanica raste i replicira se DNA, a u mitozu dolazi do diobe stanične jezgre. S obzirom da su tumori posljedica nekontrolirane diobe stanica, njihov razvoj i progresija znatno ovise o staničnom ciklusu, odnosno o regulatorima staničnog ciklusa¹.

Za eksperiment je nasadeno po 1,5 milijuna stanica u Petrijeve zdjelice od 10 cm. Nakon tretmana hiperoksije sakupljen je medij iz Petrijevih zdjelica u 15 mL tubice, stanice su isprane

dva puta PBS-om, dodano je 2 mL tripsina, a nakon što su se stanice odvojile od podloge tripsin je inhibiran s medijem iz odgovarajućih tubica. Stanice su zatim centrifugirane pri 300 g (4°C) tijekom 5 minuta, isprane dva puta PBS-om, uklonjen je supernatant i potom su resuspendirane u PBS-u. Uzorci su prebačeni u 1,5 mL tubice i centrifugirani na 300 g (4°C) tijekom 5 minuta. Supernatant je uklonjen, dodano je 500 µL hladnog PBS-a po tubici, a uzorci su resuspendirani i stavljeni na led. Zatim je na blagom vorteksu dodano kap po kap 1000 µL 100%-tnog etanola ohlađenog na -20°C, te su uzorci spremljeni na -20°C sve do nastavka eksperimenta. Nakon tjedan dana uzorci su centrifugirani pri 800 g (4°C) tijekom 5 minuta, oprezno je uklonjen supernatant, stanice su isprane u 1 mL PBS-a i potom su centrifugirane na 800 g (4°C) tijekom 5 minuta. Nakon centrifugiranja uklonjen je supernatant, te su stanice resuspendirane u 100 µL Rnaze A koncentracije 0,1 µg/µL. Uzorci su inkubirani na termomixeru 25 minuta pri 37°C. Potom im je dodano 100 µL otopine PI (PI otopljen u destiliranoj vodi) koncentracije 50 µg/mL, uzorci su resuspendirani i prebačeni u tubice za FACS, te su držani u mraku na ledu sve do analize na protočnom citometru.

3.9. Mjerenje antioksidacijskog enzima GPx

Za provođenje eksperimenta 200000 stanica je nasadeno po jažici na mikrotitarske pločice sa 6 jažica. Nakon tretmana hiperoksije uklonjen je medij, stanice su isprane 2 puta PBS-om, dodano je 400 µL PBS-a s inhibitorima proteaza, stanice su postrugane i skupljene u 1,5 mL tubice, te je po potrebi u jažice dodano još 400 µL PBS-a s inhibitorima proteza i skupljeno u iste tubice. Stanice su zatim centrifugirane na 400 g (4°C) tijekom 5 minuta. Dobiveni talog je resuspendiran u 90 µL PBS-a s inhibitorima proteaza, te su stanice sonificirane 2 puta po 20 sekundi pomoću ultrazvučne sonde veličine 1mm (u ciklusu 1 i amplitude 80%). U međuvremenu je napravljena BCA analiza, gdje su uzorci razrijeđeni 5 puta. Pripremljene su otopine iz RANSEL kita prema uputama proizvođača (RANDOX, UK). R1A otopljena u 10 mL R1b, 5 µL R2 u 5 mL fiziološke otopine. Na mikrotitarske pločice s 96 jažica je nanešeno po 4 µL uzorka i slijepa kontrola, na to je dodano 200 µL pripremljenog reagensa R1A, zatim 8 µL otopine R2 te je pločica stavljena u uređaj za mjerenje apsorbancije Tecan Infinite 200 (Švicarska). Uzorci su miješani 60 sekundi nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda=340$ nm, te su uzorci miješani dodatnih 120 sekundi i ponovno je izmjerena apsorbancija. Količina GPx-a je izračunata prema uputama proizvođača.

3.10. Imunofluorescencija

Imunofluorescencija je metoda koja se temelji na upotrebi specifičnog protutijela obilježenog fluorescentnom bojom kako bi se prikazao i lokalizirao odgovarajući antigen u stanicama i tkivima, a vezanje se prati na fluorescentnom ili konfokalnom mikroskopu⁴⁴.

Na mikrotitarsku pločicu s 24 jažice stavljena su stakalca za imunocitokemiju i u svaku od njih nasadeno je po 40 000 stanica. Nakon tretmana hiperoksije stanicama je dodana 100 nM *MitoTracker Deep Red* boja pripremljena u DMEM-u. Stanice su inkubirane 20 minuta u inkubatoru, potom je uklonjen medij sa svih stakalaca i stanice su nježno isprane s PBS-om + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (sadrži Ca^{2+} i Mg^{2+} zbog bolje fiksacije stanica za podlogu). Za fiksiranje stanica dodan je 4% paraformaldehyd (PFA) u PBS-u i stanice su inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije uklonjen je PFA, a svakajažica isprana je s 500 μL PBS-a + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, tri puta po 4 minute. U jažice je zatim dodano 500 μL PBS-a s 0,1% Triton-X za permeabilizaciju stanica te su stanice inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon permeabilizacije jažice su isprane dva puta s PBS-om + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ po 4 minute. Za sprječavanje nespecifičnog vezivanja protutijela dodano je 500 μL blokirajućeg pufera (PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 0,1% Triton-X + 1% BSA) uz inkubaciju 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon blokiranja stakalca su inkubirana s primarnim protutijelom anti- γH2AX (Abcam, UK; domaćin kunić, razrjeđenje 1:5000 u blokirajućem puferu) u vlažnoj komori na 4°C preko noći. Sljedeći dan stakalca su isprana tri puta s PBS-om + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 0,1% Triton-X. Pripremljeno je sekundarno protutijelo Alexa 594 anti-*rabbit* (ThermoFischer Scientific, SAD, domaćin koza, razrjeđenje 1:1000 u blokirajućem puferu) u kojem su stakalca inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije stakalca su ispirana 3 puta s PBS-om + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 0,1% Triton-X, te je svako stakalce inkubirano u 1x DAPI boji (4,6-diamidino-2-fenilindol) za bojanje jezgara tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi u mraku. Slijedilo je ponovno ispranje tri puta s PBS-om + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Nakon toga su stakalca sa stanicama uklopljena na predmetnicu u medij za uklapanje, te su spremljena na 4°C do analize konfokalnim mikroskopom.

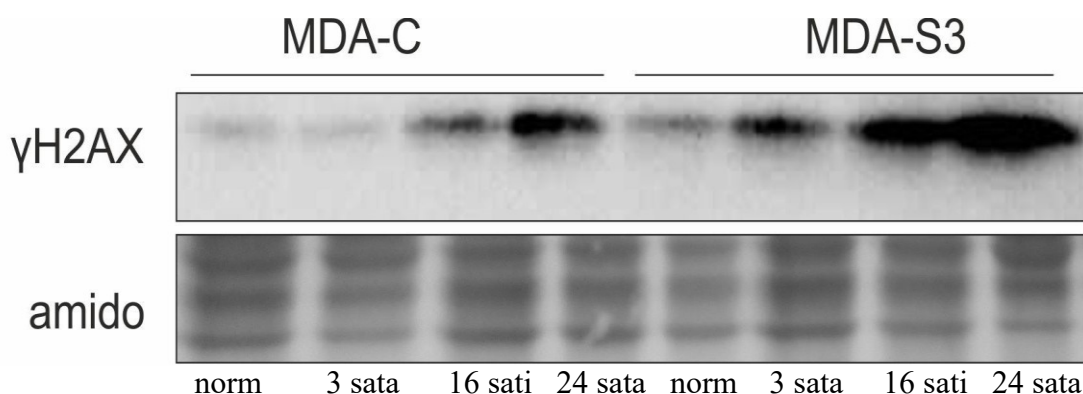
3.11. Konfokalna mikroskopija

Nakon imunofluorescencije dobiveni uzorci su analizirani konfokalnim mikroskopom, odnosno sekvencijalnim skeniranjem na Leica TCS SP8 X laser skenirajućem mikroskopu uz HC PL APO CS2 63x/1.40 imerzijski objektiv i laser bijele svjetlosti (Leica Microsystems, Njemačka) koji pobuđuje sve valne duljine. S obzirom da se konfokalni mikroskop temelji na sekvencijalnom detektiranju bitno je podesiti odgovarajuće valne duljine ekscitacije i emisije koje iznose: 405 nm i 420-477 za DAPI, 644 nm i 665-780 nm za *MitoTracker Deep Red*, 594 nm i 618 nm za Alexa 594.

§ 4. REZULTATI

4.1. Određivanje ekspresije proteina γ H2AX u svrhu određivanja trajanja tretmana

Na početku istraživanja kako bi se odredilo trajanje tretmana hiperoksijom napravljena je Western blot analiza γ H2AX proteina (marker dvostrukih lomova DNA) u MDA-C i MDA-S3 stanicama nakon 3 sata, 16 sati i 24 sata izloženosti hiperoksiji, te je potvrđena gotovo neprimjetna ekspresija γ H2AX u normoksiji kod obje stanične linije, dok se pod utjecajem hiperoksije ekspresija povećava, a najviše je izražena u MDA-S3 nakon 16 sati i 24 sata (**Slika 5.**). S obzirom da je vidljivo pojačanje oštećenja DNA u odnosu na normoksiju u obje stanične linije nakon 16 sati, odlučeno je da će se za sve naredne eksperimente koristiti tretman od 16 sati.

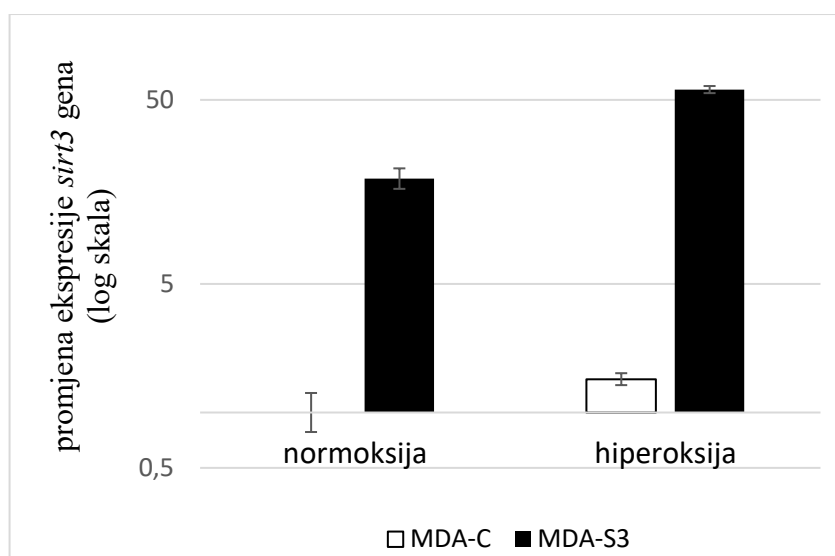


Slika 5. Ekspresija γ H2AX proteina u MDA-C staničnoj liniji i MDA-S3 staničnoj liniji u uvjetima normoksije (norm) i hiperoksije (3 sata, 16 sati, 24 sata). Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani su reprezentativni rezultati Western blot analize. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala.

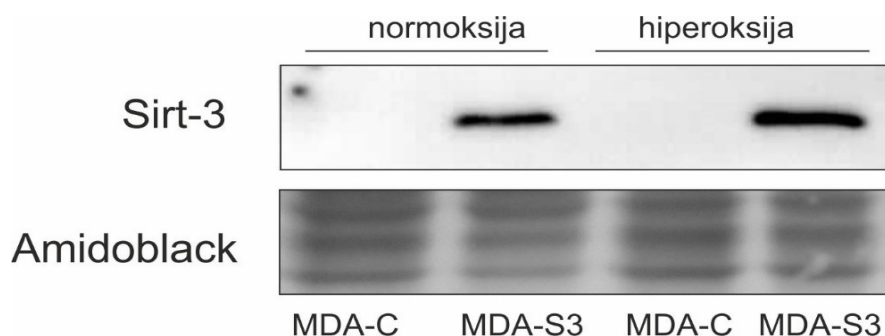
4.2. Karakterizacija klonova sa stabilnom ekspresijom sirtuina 3 u normoksiji i hiperoksiji

U radu su korištene MDA-MB-231 stanice raka dojke koje nemaju ekspresiju proteina Sirt3. Stoga su korištene stanice sa stabilno transfeciranim plazmidom pcDNA3.1 + Flag-Sirt3 koje su potom definirane kao MDA-S3, te stanice sa stabilno transfeciranim praznim plazmidom pcDNA3.1+ koje su definirane kao MDA-C (kontrola). Za utvrđivanje genske (*sirt3*) i proteinske (Sirt3) ekspresije staničnih linija MDA-S3 i MDA-C korištene su qPCR i Western blot analiza.

Rezultati qPCR analize pokazuju da MDA-S3 ima 19 puta veću ekspresiju gena *sirt3* u odnosu na MDA-C u normoksiji, i čak 38 puta veću u hiperoksiji (Slika 6.). Western blot analizom nije uočena ekspresija proteina Sirt3 u MDA-C, dok je jasno vidljiva u MDA-S3 (28 kDa) (Slika 7.) s nešto jačim signalom u hiperoksiji, što je također u skladu s rezultatima genske ekspresije.



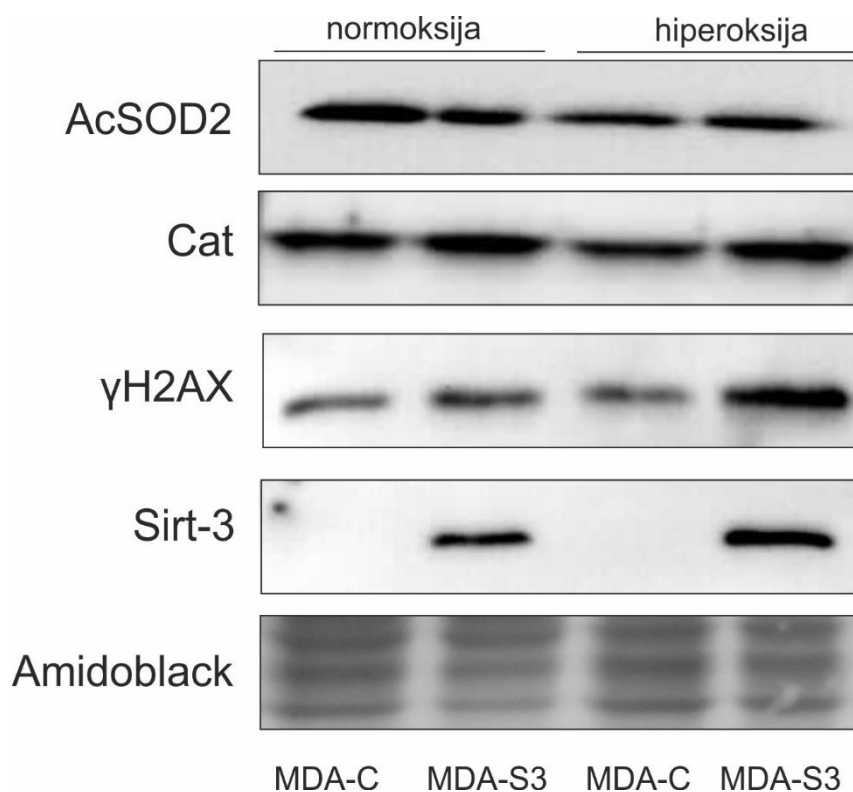
Slika 6. Kvantitativna PCR analiza genske ekspresije *sirt3* u staničnim linijama MDA-C i MDA-S3 u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata sa standardnom devijacijom.



Slika 7. Ekspresija Sirt3 proteina u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani su reprezentativni rezultati Western blot analize. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala.

4.3. Utjecaj sirtuina 3 na ekspresiju antioksidacijskih proteina u uvjetima hiperoksije

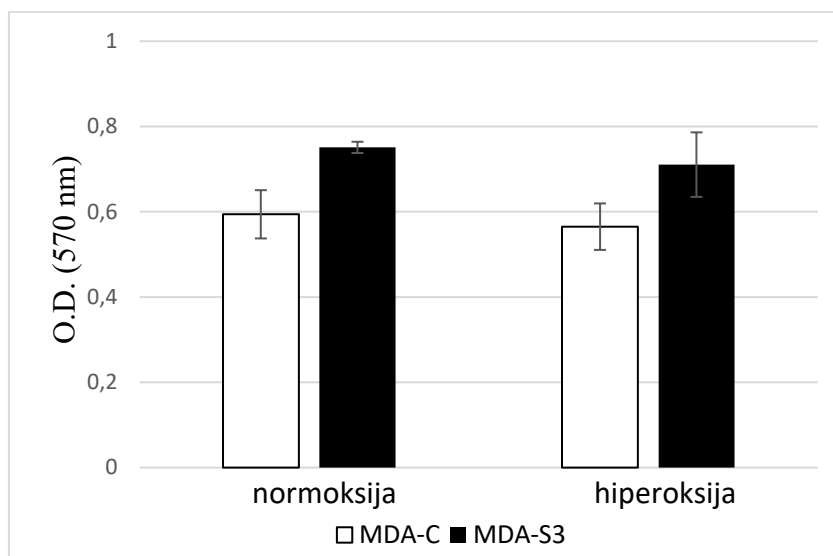
Za određivanje utjecaja sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije, istražena je ekspresija proteina koji sudjeluju u antioksidacijskoj obrani, acetiliranog SOD2 (AcSOD2) i katalaze (Cat): AcSOD2 pokazuje nešto manju ekspresiju u uvjetima normoksije u MDA-S3 stanicama u odnosu na MDA-C. Hiperoksija smanjuje ekspresiju AcSOD2 u obje stanične linije, no vidljiva je nešto jača ekspresija u prisustvu Sirt3 u odnosu na MDA-C. Ekspresija Cat je povećana u MDA-S3 stanicama u uvjetima normoksije u odnosu na MDA-C, dok je u uvjetima hiperoksije općenito smanjena u odnosu na normoksiju, a što je izraženije u MDA-C stanicama. Kako bi se potvrdilo oštećenje DNA, još jednom je provedena Western blot analiza proteina γ H2AX-markera dvostrukih lomova DNA, te je potvrđeno da zajednički učinak hiperoksije i Sirt3 pojačavaju ekspresiju γ H2AX. (**Slika 8.**)



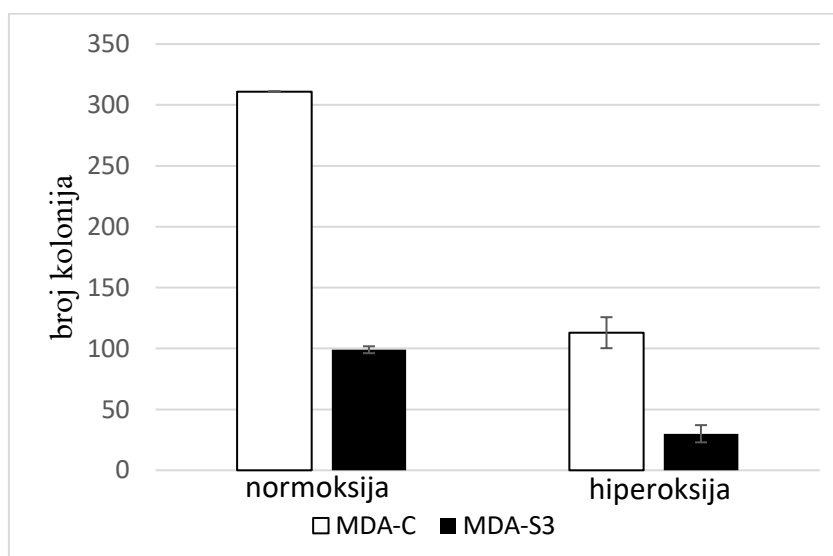
Slika 8. Ekspresija AcSOD2, Cat, γ H2AX i Sirt3 proteina u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani su reprezentativni rezultati Western blot analize. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala.

4.4. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na metaboličku aktivnost i stvaranje kolonija

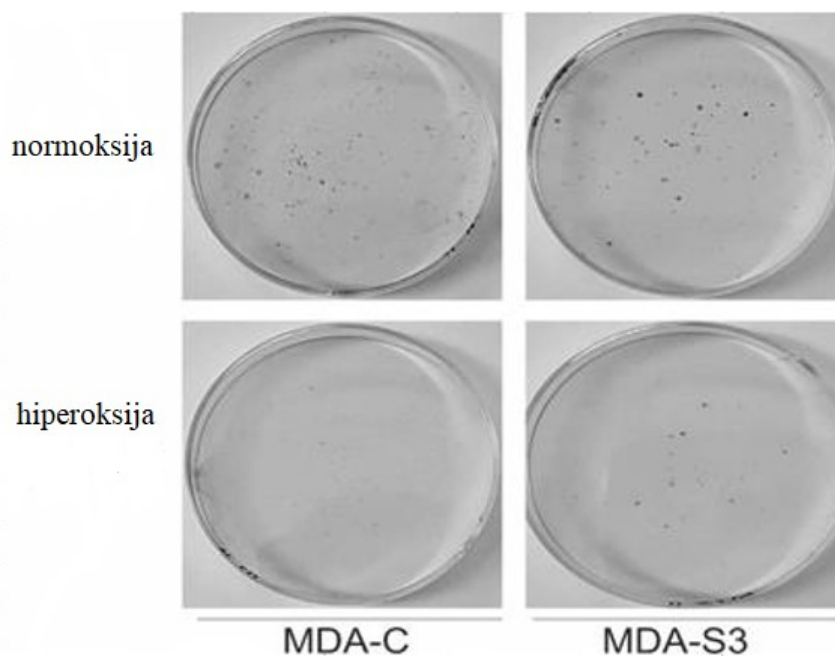
Kako bi se ispitala metabolička aktivnost MDA-C i MDA-S3 stanica korišten je MTT test. Rezultati testa pokazuju povećanje metaboličke aktivnosti uz prisutnost Sirt3 (**Slika 9.**), dok hiperoksija neznatno smanjuje metaboličku aktivnost u obje stanične linije. Za određivanje stanične proliferacije proveden je CFU test kojim je potvrđeno da ekspresija Sirt3 smanjuje sposobnost stvaranja kolonija, a hiperoksija pokazuje izrazito negativan efekt na obje stanične linije u odnosu na normoksiju (**Slika 10.-11.**). Izgled kolonija je praćen pod lupom i na EVOS FLoid mikroskopu (Thermo Fisher Scientific, SAD; **Slika 12.**).



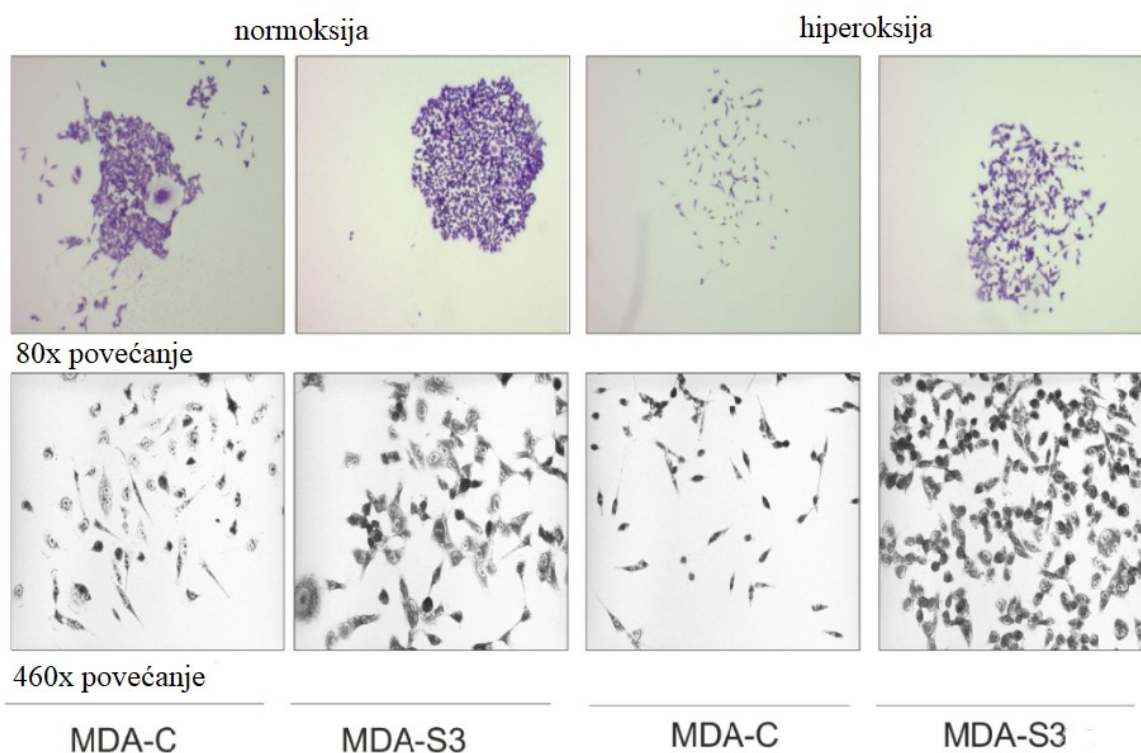
Slika 9. Grafički prikaz metaboličke aktivnosti MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije i hiperoksije određene MTT test-om. Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata sa standardnom devijacijom.



Slika 10. Grafički prikaz broja kolonija MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije i hiperoksije dobivenih testom formiranja kolonija (CFU). Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata sa standardnom devijacijom.



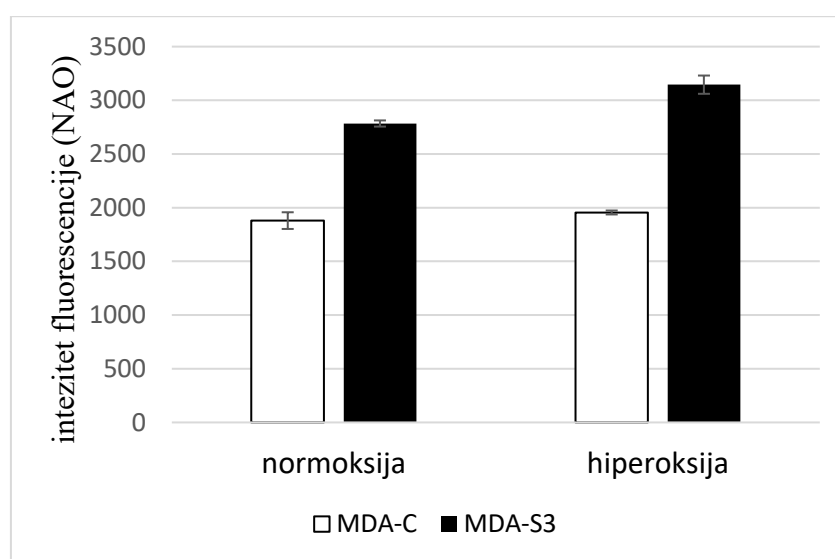
Slika 11. Reprezentativne Petrijeve zdjelice testa formiranja kolonija (CFU) MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije i hiperoksije obojene Giemsa bojom.



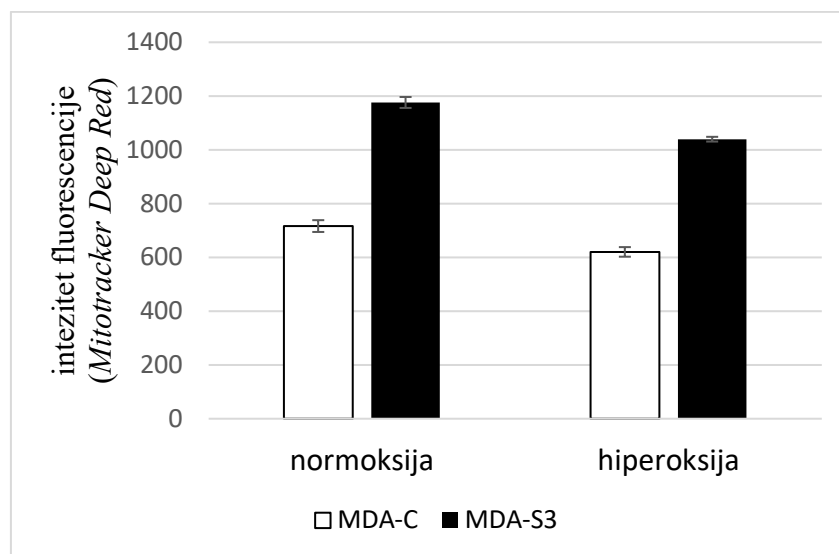
Slika 12. Izgled kolonija MDA-C i MDA-S3 staničnih linija dobivenih CFU testom u uvjetima normoksije i hiperoksije pod lupom (80x povećanje) i na EVOS FLoid mikroskopu (460x povećanje).

4.5. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na mitohondrijske parametre

Korištenjem NAO boje praćena je masa mitohondrija. Rezultati pokazuju da Sirt3 inducira porast mase mitohondrija u odnosu na MDA-C, a što je dodatno potaknuto hiperoksičnim tretmanom (Slika 13.). Kako bi se ispitao mitohondrijski potencijal, korištena je *Mitotracker Deep Red* boja. Vidljivo je da je prisutstvo Sirt3 dovelo do značajnog porasta mitohondrijskog potencijala u odnosu na MDA-C, dok ga je hiperoksija smanjila u obje stanične linije u odnosu na njihove pripadajuće skupine u normoksiji (Slika 14.).



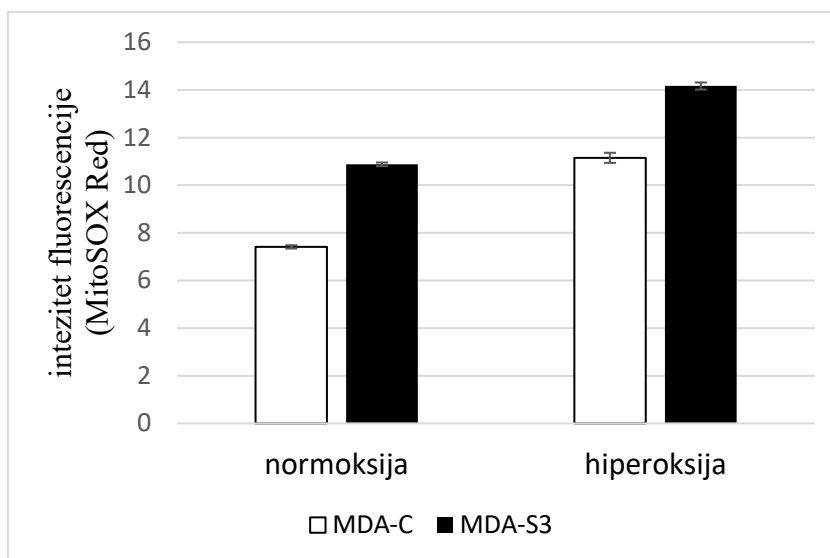
Slika 13. Grafički prikaz mitohondrijske mase (NAO) MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata reprezentativnog pokusa sa standardnom devijacijom.



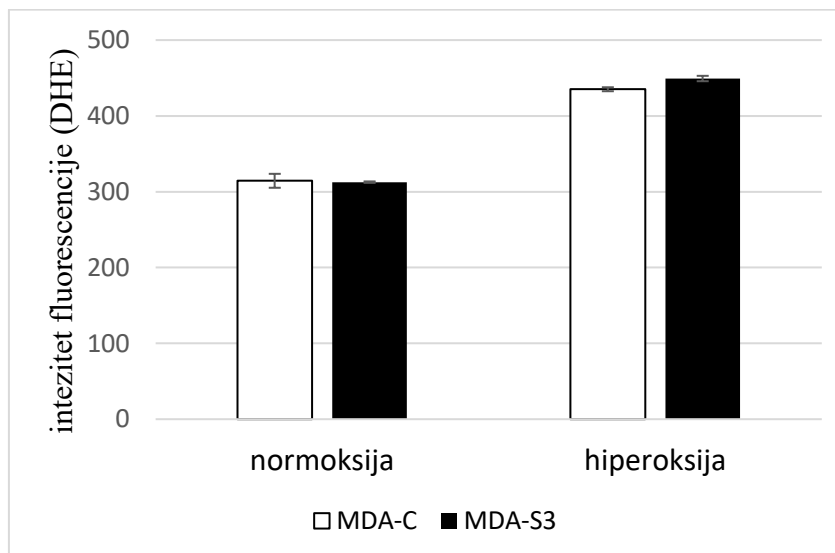
Slika 14. Grafički prikaz mitohondrijskog potencijala (*Mitotracker Deep Red*) MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata reprezentativnog pokusa sa standardnom devijacijom.

4.6. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na proizvodnju mitohondrijskih i citosolnih ROS-ova

Za detekciju mitohondrijskih ROS-ova (mtROS) korištena je *MitoSOX Red* boja. **Slika 15.** pokazuje da Sirt3 povećava razinu mtROS u odnosu na MDA-C, a hiperoksija povećava mtROS u obje stanične linije. Razina citosolnih ROS-ova (citoROS) detektirana je pomoću DHE boje, te je iz **Slike 16.** vidljivo da prisutstvo Sirt3 nema utjecaj kao kod mtROS, dok hiperoksija povećava proizvodnju citoROS-ova u obje stanične linije.



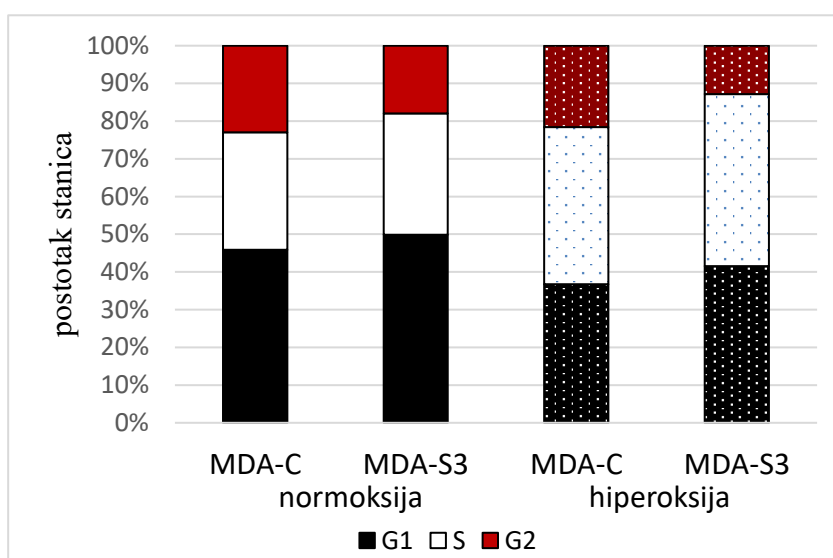
Slika 15. Grafički prikaz mitohondrijskih ROS-ova (MitoSOX Red) u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponavljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata reprezentativnog pokusa sa standardnom devijacijom.



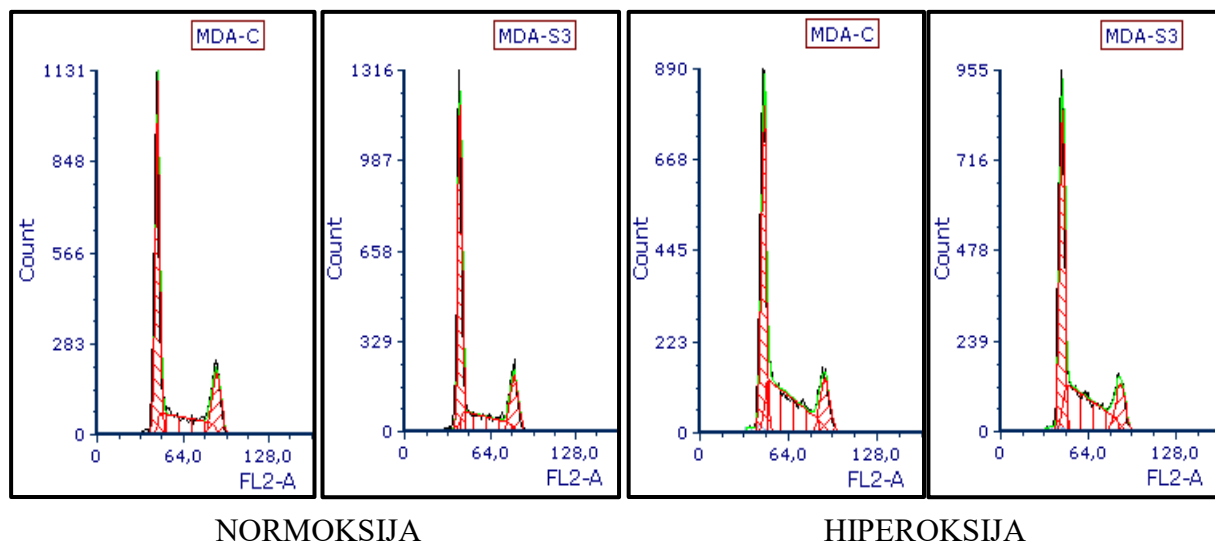
Slika 16. Grafički prikaz citosolnih ROS-ova (DHE) u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponavljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata reprezentativnog pokusa sa standardnom devijacijom.

4.7. Uloga sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na stanični ciklus

Kako bi se odredio mehanizam djelovanja Sirt3 i hiperoksije na proliferaciju stanica, praćen je njihov učinak na stanični ciklus metodom protočne citometrije. Ekspresija Sirt3 povećava broj stanica u G1 fazi, a smanjuje postotak stanica u G2 fazi (Slika 17.). Pod utjecajem hiperoksije došlo je do promjene izgleda grafova za obradu (ne mogu se jasno razlučiti granice između G1 i S faze zbog nepravilnog nagiba grafova) zbog kojih je onemogućena pravilna obrada tih rezultata (Slika 18.).



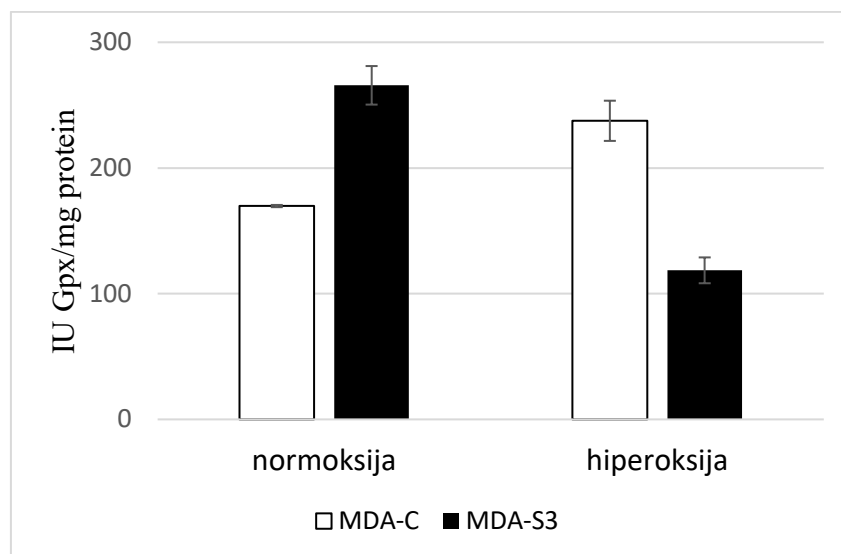
Slika 17. Grafički prikaz postotka G1, S i G2 faze staničnog ciklusa u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Točkasti prikaz grafa u hiperoksiji predstavlja nepravilni nagib grafa između G1 i S faze, odnosno nemogućnost obrade podataka. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati.



Slika 18. Izgled grafova za obradu staničnog ciklusa MDA-C i MDA-S3 staničnih linija u uvjetima normoksije u hiperoksije. Vidljivo je da u hiperoksiji dolazi do velike pomjene u nagibu grafova zbog čega nije moguća pravilna obrada rezultata. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni grafovi.

4.8. Utjecaj sirtuina 3 u uvjetima hiperoksije na aktivnost antioksidacijskog enzima glutathion peroksidaze (GPx)

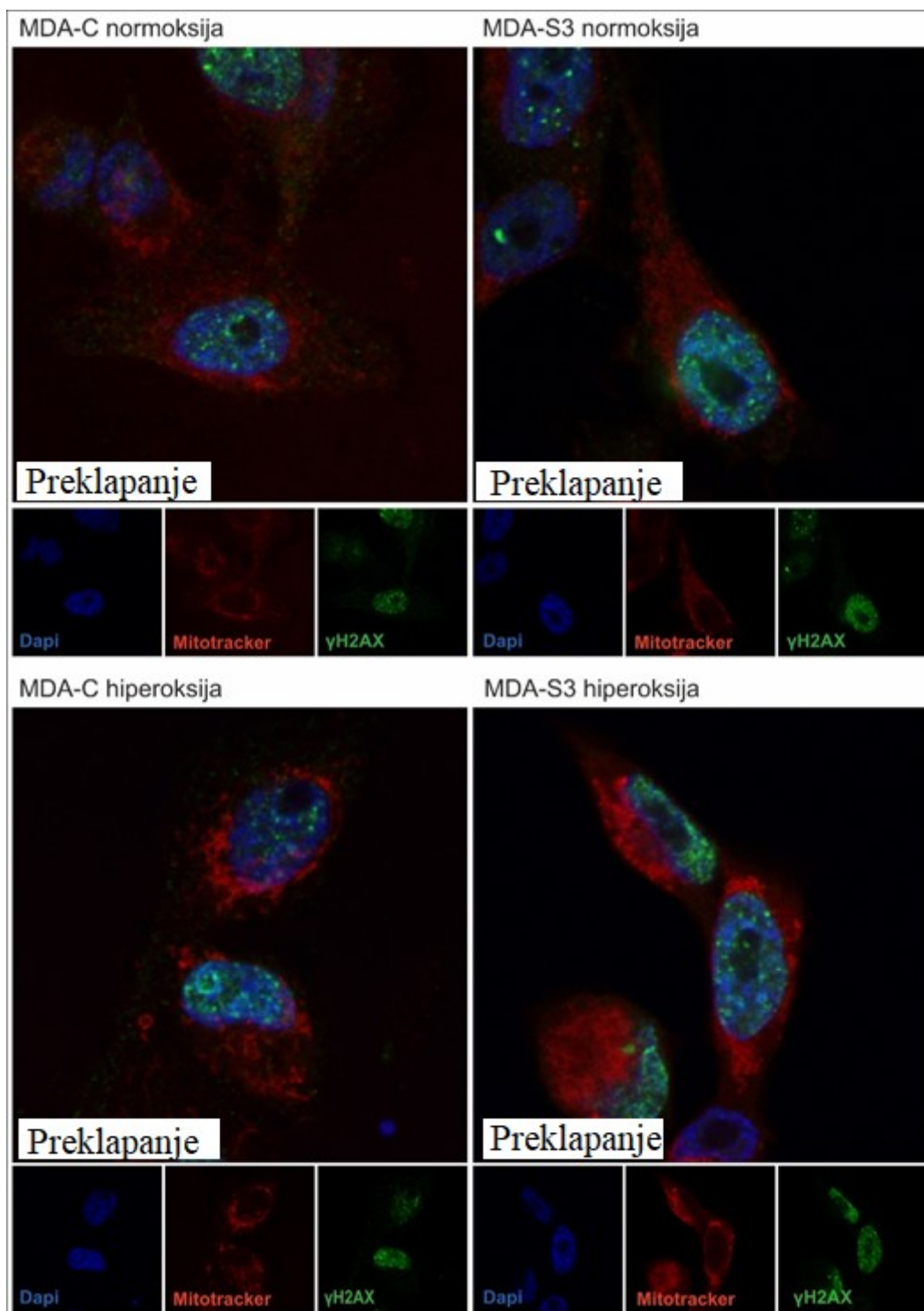
Na temelju izračunatih apsorbancija pri valnoj duljini $\lambda=340$ nm, određena je aktivnost enzima GPx. U uvjetima normoksije ekspresija Sirt3 pojačava aktivnost GPx-a, dok u hiperoksiji prisutnost Sirt3 smanjuje njegovu aktivnost. S druge strane, u hiperoksiji se pojačava aktivnost enzima GPx u MDA-C klonu (**Slika 19.**).



Slika 19. Grafički prikaz aktivnosti antioksidacijskog enzima GPx u MDA-C i MDA-S3 klonu u uvjetima normoksije i hiperoksije. Pokus je ponovljen najmanje tri puta i rađeni su triplikati, te su prikazane srednje vrijednosti triplikata reprezentativnog pokusa sa standardnom devijacijom.

4.9. Konfokalna analiza ekspresije γ H2AX proteina u uvjetima normoksije i hiperoksije

Stanična lokalizacija i jačina fluorescencijskog signala γ H2AX, markera oštećenja DNA, analizirane su metodom imunofluorescencije uz korištenje konfokalnog mikroskopa. Rezultati pokazuju jači intenzitet fluorescencijskog signala u obje stanične linije nakon tretmana hiperoksijom, uz još nešto jači signal u MDA-S3 u odnosu na MDA-C staničnu liniju (**Slika 20.**). Preklapanjem dvaju signala (engl. *Overlay*) se potvrdila lokalizacija γ H2AX u jezgri.



Slika 20. Imunofluorescencijska analiza stanične lokalizacije γ H2AX u MDA-C i MDA-S3 staničnim linijama u uvjetima normoksije i hiperoksije. Jezgre su obojene plavom bojom DAPI, mitohondriji crvenom bojom Mitotracker, a γ H2AX zelenom bojom.

§ 5. RASPRAVA

Suvremena znanost i medicina pokušavaju naći odgovor za liječenje raka dojke. Dosadašnje metode liječenja kemoterapijom i zračenjem imaju mnoge nedostatke i vrlo često uzrokuju neželjene zdravstvene probleme, stoga se i dalje traga za idealnim lijekom protiv raka dojke. Obzirom da većina staničnih linija raka dojke ne posjeduje mitohondrijski protein sirtuin 3 (Sirt3), u ovom istraživanju korištene su trostruko negativne stanice raka dojke MDA-MB-231 transfecirane s plazmidom koji nosi gen za ekspresiju Sirt3 (MDA-S3), kako bi se ispitao utjecaj Sirt3 na tumorske karakteristike te stanične linije. Ovim radom se također htio potvrditi i tumor supresorski učinak povećane koncentracije kisika na MDA-MB-231 staničnu liniju, ali i ispitati efekt Sirt3 u takvim uvjetima.

Osim MDA-S3 stanica, korištene su i kontrolne stanice transfecirane s praznim plazmidom (MDA-C). Najprije je ispitan utjecaj hiperoksije na ekspresiju Sirt3, te je qPCR i Western blot analizom pokazano da stanice jače eksprimiraju Sirt3 u hiperoksiji, najvjerojatnije zbog oksidativnog oštećenja prilikom kojeg dolazi do pojačanja aktivnosti Sirt3 kako bi došlo do što bolje zaštite od oksidativnog stresa⁴⁵. Obzirom da je Sirt3 glavna mitohondrijska deacetilaza, aktivira acetilirane mitohondrijske enzime uključene u obranu od oksidacijskog stresa, a i bitan je faktor u metabolizmu za regulaciju rasta tumorskih stanica. Prema nekim istraživanjima utvrđeno je da čak 40% stanica raka dojke ima deleciju Sirt3, što je značajno više u odnosu na ostale tipove tumora. Također je potvrđeno da Sirt3 umanjuje tzv. Warburgov efekt u ljudskim stanicama raka dojke koji se javlja kao metabolički znak mnogih tumora, a definira se kao aerobna glikoliza koju tumorske stanice koriste kao izvor energije tijekom proliferacije⁴⁶. Istraživanja pokazuju i da Sirt3 djeluje kao tumor supresor putem regulacije ROS-ova, jer u odsutnosti Sirt3 povišeni ROS povećava genomsku nestabilnost, stabilizira HIF1 α pa time povećava unos glukoze i potiče prekursore potrebne za visoku stopu proliferacije, i u konačnici potiče tumorigenezu⁴⁷.

Kako bi obrana od oksidacijskog stresa bila što uspješnija potrebna je međusobna suradnja antioksidacijskih enzima. Primjerice, liposomi koji sadrže Cat i SOD2 imaju puno veću zaštitu od toksičnog utjecaja O₂ u usporedbi s liposomima koji sadrže samo jedan od ta dva enzima⁴⁸. Najstariji i prvi otkriveni antioksidacijski enzim jest Cat. Tumorske stanice karakterizira povećana proizvodnja ROS-ova i promijenjena ekspresija antioksidacijskih enzima⁴⁹.

Istraživanja su također pokazala da tumorske stanice pokazuju određenu neravnotežu antioksidacijskih enzima u odnosu na normalne stanice, kao i niske razine Cat, posebice u stanicama raka dojke, što ukazuje na to da takve stanice ne mogu efikasno razgraditi vodikov peroksid⁵⁰. Rezultati ovog rada pokazuju da Cat ima pojačanu ekspresiju u MDA-S3 stanicama (**Slika 8.**), neovisno o tretmanu hiperoksijom što ukazuje na potencijalnu ulogu Sirt3 u poticanju aktivacije Cat. U MDA-C stanicama primjećuje se blagi pad Cat nakon tretmana hiperoksijom, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da povećane količine ROS-ova najčešće induciraju pojačanu aktivnost SOD2 i Gpx, ali ne i Cat. Upravo zbog toga postoje naznake da bi povećane razine Cat mogle pridonijeti liječenju raka dojke⁵¹. Sukladno tome, uloga Sirt3 da pojača ekspresiju Cat može ukazivati na njegovu tumor supresivnu ulogu u ovim stanicama. Dosadašnja istraživanja su potvrdila da povećanje ROS-ova stimulira transkripciju Sirt3, što dovodi do posttranslacijske regulacije i aktivacije SOD2 putem Sirt3 kao odgovor na oksidacijski stres⁵². Tu činjenicu potvrđuje i povećana ekspresija AcSOD2 u MDA-C jer one nemaju Sirt3 koji bi ga deacetilirao (**Slika 8.**). Nakon tretmana hiperoksijom, u MDA-S3 stanicama se dodatno smanjuje ekspresija AcSOD2, najvjerojatnije zbog pojačane deacetilacije od strane Sirt3 kako bi zaštitio od novonastalih ROS-ova uslijed hiperoksije. MDA-C u hiperoksiji imaju manje AcSOD2, što se može objasniti s pojavom vidljive genske ekspresije *sirt3* u hiperoksiji (**Slika 6.**), te najvjerojatnije i pojavom male količine proteina Sirt3 ali koja nije dovoljna da bi se uočila na Western blot gelu uz jaku ekspresiju u MDA-S3 staničnoj liniji (**Slika 7.**). Osim toga, u mitohondriju postoje i drugi enzimi s deacetilaznom aktivnosti, npr. Sirt5, no za sada još nije poznato može li deacetilirati SOD2⁵³. U svakom slučaju, uslijed pojačanog oksidativnog stresa, u obje stanične linije dolazi do pojačane deacetilacije AcSOD2 kako bi se stanice bolje zaštitile od novonastalih ROS-ova. Osim SOD2 i Cat, ispitana je i aktivnost antioksidacijskog enzima GPx, koji je pokazao pojačanu aktivnost u MDA-S3 stanicama u odnosu na MDA-C u normoksiji, te pojačanu aktivnost u MDA-C stanicama u hiperoksiji u odnosu na normoksiju (**Slika 15.**). Navedeni rezultati su očekivani pošto u uvjetima u kojima nastaje više DNA oštećenja pretpostavljamo da ima više ROS-ova pa je samim time i GPx aktivniji. Iznenadujuće je smanjenje aktivnosti GPx u MDA-S3 u hiperoksiji. S obzirom da u hiperoksiji raste aktivnost SOD2, koji superoksidne radikale pretvara u vodikov peroksid i molekularni kisik, očekivali smo i porast GPx-a pošto on katalizira redukciju vodikovog peroksida do vode ili odgovarajućeg alkohola. Vidljivo je da se u MDA-S3 stanicama razgradnja vodikovog peroksida odvija više preko Cat nego preko GPx. Obzirom

da je Cat jako efikasna u tom otklanjanju, reklo bi se da MDA-S3 stanice imaju učinkovitije otklanjanje vodikova peroksida. Osim toga, Cat se aktivira u oksidacijskom stresu, dok GPx otklanja fiziološke koncentracije vodikovog peroksida.

Marker oštećenja DNA, γ H2AX, pokazuje veću ekspresiju u MDA-S3 stanicama, posebice nakon tretmana hiperoksijom i to čak već nakon samo 3 sata tretmana (**Slika 5.**). Poznato je da Sirt3 kao mitohondrijski protein štiti mitohondrijsku DNA od oksidativnog oštećenja, no isto tako i da deacetilira p53 protein i time ga inaktivira^{54,55}, onemogućujući njegov pravilan odgovor na oštećenje jezgrine DNA. Stanična linija raka dojke MDA-MB-231 ima visoke razine mutiranog p53, koji inače djeluje kao tumor supresor⁵². Iako je p53 mutiran, u određenoj mjeri može odgovoriti na prekomjerno oštećenje DNA u ovoj staničnoj liniji⁵⁷, ali u uvjetima s pojačanom ekspresijom Sirt3 kao što su MDA-S3, vjerojatno dolazi do inhibicije i tog slabog djelovanja mutiranog p53, što rezultira nepravilnim odgovorom na DNA oštećenje i prekomjernim nakupljanjem istoga. Konfokalna mikroskopija je potvrdila da se oštećenje DNA, odnosno jačina signala γ H2AX pojačava u MDA-S3 stanicama, a posebice nakon tretmana hiperoksijom.

Odras prekomjernog oštećenja DNA u MDA-S3 staničnoj liniji u odnosu na MDA-C se vidi u njihovoj smanjenoj sposobnosti da stvore kolonije (CFU; **Slika 10.**), pošto zbog prevelikog oštećenja DNA najčešće dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa te ne može doći do pravilnog izlaza iz mitoze i podjele stanica⁵⁸. U hiperoksiji je u obje stanične linije najizraženiji pad proliferacijskog potencijala, što je u skladu s drugim rezultatima koji upućuju na tumor supresorski učinak hiperoksije na stanice raka dojke³³. Dosadašnje studije o hiperoksiji su razmatrale djeluje li hiperoksija kao tumor promotor ili tumor supresor. Budući da je kisik potreban za sve glavne procese zacjeljivanja rana, mislilo se da će hiperoksija promicati rast tumora, te da će se pacijentima koji su već liječeni od tumora bolest vratiti. Ipak, novija istraživanja nisu naišla na dokaze o hiperoksiji kao tumor promotoru, nego su potvrdila inhibitorne učinke hiperoksije na tumore³³.

S obzirom na rezultat sposobnosti stanica da stvore kolonije, a koji je pokazao da je puno manja u MDA-S3, te da hiperoksija uvelike smanjuje sposobnost obje stanične linije, protočnom citometrijom se pratio broj stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa (G1, S, G2). Kod MDA-S3 stanica u normoksiji primjećeno je nešto više G1 faze (**Slika 17.**), što ukazuje na to da se stanice uz prisutnost Sirt3 manje dijele, ili da su sporije pa se više zadržavaju u G1 nego MDA-C, a to je i u skladu s CFU. Kontrolne točke reguliraju napredovanje kroz stanični

ciklus. One omogućuju proliferaciju stanica, odnosno prijelaz iz G1 u S fazu i prijelaz iz G2 u M fazu, ali također zaustavljaju napredovanje kroz stanični ciklus u slučaju oštećenja DNA. Ukoliko dođe do pogreške u kontrolnim točkama dolazi do genetičke nestabilnosti i naposljetku dolazi do razvoja tumora¹. Regulaciju stanica kroz stanični ciklus omogućuju inhibitori ciklin ovisnih kinaza (CDK, engl. *cyclin dependent kinases*) među kojima je i p53, koji čuvaju stanice od nastanka tumora⁵⁹. Obzirom da je utvrđeno da MDA-MB-231 stanična linija raka dojke ima mutirani p53, teško je pretpostaviti njegov utjecaj na stanični ciklus kao takav, ali rezultati pokusa pokazuju da dolazi do smanjenja proliferacije, najvjerojatnije zbog prekomjernog oštećenja DNA koje onemogućuje pravilnu mitozu. U hiperoksiji je došlo do promjene izgleda grafova za obradu (nemogućnost pravilnog analiziranja G1 i S faze zbog velikog nagiba kod prelaska jedne faze u drugu) zbog kojih je onemogućena obrada tih rezultata (**Slika 18.**). Pretpostavljamo da je do takvih promjena u izgledu grafa došlo uslijed velikog oštećenja DNA stanica zbog čega se ne može jasno razlučiti granica između pojedinih faza, pa se zapravo ne dobiva prava informacija o G1/S/G2 fazi ciklusa.

Analizom mitohondrijskih i citosolnih ROS-ova, uočena je povećana količina mitohondrijskih ROS-ova u MDA-S3 staničnoj liniji (**Slika 15.**) iako one imaju Sirt3 koji aktivira SOD2 za obranu od oksidacijskog stresa. Ali također, Sirt3 aktivira respiratorne komplekse koji su odgovorni za stvaranje ROS-ova, te je sukladno tome povećan broj mitohondrijskih ROS-ova u MDA-S3 staničnoj liniji koji imaju aktivnije mitohondrije, jer se zapravo s jačim metabolizmom i respiracijom povećava i količina ROS-ova. Razina citosolnih ROS-ova je ista bez obzira na ekspresiju Sirt3 (**Slika 16.**) pošto on djeluje u mitohondrijima. Nakon tretmana hiperoksijom dolazi do povećanja količine obje vrste ROS-ova. Unatoč pojačanome ROS-u u MDA-S3, izgleda da Sirt3 kao mitohondrijski protein uspijeva poboljšati funkciju mitohondrija što pokazuju između ostalog i rezultati MTT testa gdje je vidljiva pojačana metabolička aktivnost u MDA-S3 staničnoj liniji (**Slika 9.**). Povećana metabolička aktivnost je i očekivana jer Sirt3 regulira brojne mitohondrijske enzime koji su uključeni u procese energetskog metabolizma⁶⁰. Osim toga, rezultati protočne citometrije pokazuju veću masu mitohondrija u MDA-S3 staničnoj liniji, a utjecaj hiperoksije još dodatno djeluje na povećanje mase, što znači da ekspresija Sirt3 i hiperoksija imaju zajednički učinak na masu mitohondrija (**Slika 13.**). Veća masa mitohondrija potvrđuje i ulogu Sirt3 u poboljšanju funkcije mitohondrija. Upravo su mitohondriji ti koji su ključni u energetskoj homeostazi, metabolizmu, regulaciji apoptoze i pravilnoj vijabilnosti stanica. Mitohondrijska biogeneza je

proces koji vodi do veće količine mitohondrijske membrane i DNA, posebice u uvjetima staničnog stresa, te kao odgovor na tjelovježbu ili kalorijsku restrikciju. Pojačana mitohondrijska biogeneza rezultira većom mitohondrijskom masom i povećanom ekspresijom metaboličkih enzima^{55,61}. U radu je također ispitan i mitohondrijski potencijal ($\Delta\Psi$). Rezultati pokazuju povećan $\Delta\Psi$ uslijed ekspresije Sirt3, što je također u skladu s teorijom da Sirt3 poboljšava mitohondrijsku funkciju. Nakon tretmana hiperoksijom mitohondrijski potencijal se smanjuje, ali je svejedno veći u MDA-S3 nego li u MDA-C. Studije potvrđuju da je Sirt3 važan regulator bazalnog ATP-a, a time i ukupne energetske homeostaze. U tkivima poput tumora, koja nemaju izraženu ekspresiju Sirt3 zabilježeno je značajno smanjenje ATP-a⁶². Prema nekim istraživanjima utvrđeno je da Sirt3 može zaštititi respiracijski lanac od oksidacijskog stresa⁶², pa je vjerojatno iz tog razloga smanjen mitohondrijski potencijal nakon hiperoksije.

Bez obzira što rezultati MTT testa, mase mitohondrija i $\Delta\Psi$ potvrđuju da Sirt3 kao mitohondrijski protein uspijeva poboljšati funkciju mitohondrija MDA-MB-231 stanične linije raka dojke, stanice se u konačnici ne uspiju podijeliti i stvoriti kolonije što je najvjerojatnije rezultat prevelikog oštećenja DNA. Prekomjerno oštećenje DNA kao posljedica velike koncentracije ROS-ova nam je najbolji pokazatelj mogućeg tumor supresorskog učinka Sirt3 i hiperoksije. Pojačana ekspresija Sirt3 u MDA-MB-231 inducira nastanak ROS-ova, i iako su aktivirani antioksidacijski enzimi, nisu dovoljni da bi stanicu zaštitili od prekomjernog oksidacijskog stresa.

Naposljetku se može reći da Sirt3 i hiperoksija imaju zajednički tumor supresorski učinak u MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke, te da bi se trebali proučiti dodatni mehanizmi kojima oni utječu na smanjenje proliferacije i invazivnosti tumorskih stanica u svrhu pronalaska potencijalnih terapijskih meta u liječenju trostruko negativnih tumora dojke.

§ 6. ZAKLJUČAK

Ovim radom se pokazao tumor supresorski utjecaj proteina Sirt3 u MDA-MB-231 stanicama raka dojke, a koji je u kombinaciji s hiperoksijom imao još jači učinak. Sirt3 je kao mitohondrijski protein poboljšao funkciju mitohondrija tako što je povećao metaboličku aktivnost, mitohondrijsku masu i potencijal, dok je hiperoksija pokazala negativan utjecaj na mitohondrijski potencijal te je uzrokovala porast sveukupnih staničnih reaktivnih kisikovih vrsta. Bez obzira na povoljne učinke Sirt3 na mitohondrije, Sirt3 je uzrokovao i dodatno povećanje mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta, što je u konačnici dovelo do prekomjernog DNA oštećenja i smanjenja proliferacije MDA-MB-231 stanične linije raka dojke. Ovim istraživanjem se pokazao zajednički učinak Sirt3 i hiperoksije na smanjivanje rasta MDA-MB-231 što upućuje na potrebu za dodatnim istraživanjima Sirt3 i hiperoksije kao metodama liječenja tumora dojke.

§ 7. POPIS KRATICA

Tablica 5. Popis kratica koje su korištene u radu navedenih abecednim redoslijedom.

KRATICA	PUNI NAZIV NA HRVATSKOM JEZIKU	PUNI NAZIV NA ENGLLESKOM JEZIKU
AceCS2	Acetil-CoA sintetaza 2	<i>acetyl-coA synthetase 2</i>
ATP	Adenozin-5'-trifosfat	<i>adenosine triphosphate</i>
Cat	Katalaza	<i>catalase</i>
cDNA	Komplementarna cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFU	Test formiranja kolonija	<i>colony-forming unit</i>
CLK	Ciklus limunske kiseline	<i>the citric acid cycle</i>
CoA	Koenzim A	<i>coenzyme A</i>
CPS1	Karbamoil-fosfat sintetaza 1	<i>carbamoyl phosphate synthetase 1</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol	<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i>
DHE	Dihidroetidij	<i>Dihydroethidium</i>
DEPC voda	Voda s dietilpirokarbonatom	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DMSO	Dimetilsulfoksid	<i>dimethyl sulfoxide</i>
Dnaza	Deoksiribonukleaza	<i>Deoxyribonuclease</i>
dNTP	Deoksiribonukleotid trifosfat	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Enzimski imunotest na čvrstoj fazi	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Estrogen receptor	<i>estrogen receptor</i>
FACS	Razvrstavanje stanica aktivirano fluorescencijom	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetalni serum goveda	<i>fetal cow serum</i>
FOXO3a	Transkripcijski faktor	<i>forkhead box O3</i>
GDH	Glutamat-dehidrogenaza	<i>glutamat dehydrogenase</i>
GPx	Glutation-peroksidaza	<i>glutathione peroxidase</i>
GSH	Glutation	<i>Glutathione</i>

GSSH	Oksidirani glutation	<i>oxidized glutathione</i>
HER2	Ljudski epidermalni faktor rasta, tip 2	<i>human epidermal growth factor receptor type 2</i>
IDH2	Izocitrat-dehidrogenaza 2	<i>isocitrate dehydrogenase 2</i>
LCAD	Dugolančana acil-CoA-dehidrogenaza	<i>long-chain acyl CoA dehydrogenase</i>
MDA-MB-231	-	<i>MD Anderson Metastasis Breast cancer 231</i>
mtROS	Mitohondrijski ROS	<i>mitochondrial ROS</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NAO	10-N-nonil akridin narančasto	<i>10-N-nonyl acridine orange</i>
PBS	Fosfatni pufer	<i>phosphate-buffered soline</i>
PCR	Lančana reakcija polimerazom	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehid	<i>Paraformaldehyde</i>
PGC-1 α	Peroxisomalni receptor aktivacije proliferacije 1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator</i>
PI	Propidijev jodid	<i>propidium iodide</i>
PVDF	Poliviniliden difluorid	<i>polyvinylidene fluoride</i>
qH ₂ O	Pročišćena voda	<i>ultra pure water</i>
qPCR	Kvantitativni PCR	<i>quantitative PCR</i>
ROS	Reaktivne kisikove vrste	<i>reactive oxygen species</i>
SDH	Sukcinat-dehidrogenaza	<i>succinate dehydrogenase</i>
SDS-PAGE	Natrij-dodecil sulfat elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>sirt3</i>	gen za sirtuin 3	<i>sirt3 gene</i>
Sirt3	sirtuin 3	<i>sirtuin 3</i>
SOD2	Superoksid-dismutaza 2	<i>superoxide dismutase 2</i>
TEMED	Tetrametiletilendiamin	<i>Tetramethylethylenediamine</i>

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, Sinauer Associates, 2000.
2. S. P. Kabekkodu, S. Chakrabarty, V. Shukla, V. K. Varghese, K. K. Singh, K. Thangaraj, K. Satyamoorthy, Mitochondrial biology: From molecules to diseases, *Mitochondrion* **24** (2015) 93-98.
3. E. Verdin, M. D. Hirschey, L. W. S. Finley, M. C. Haigis, Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling, *Trends Biochem. Sci.* **35** (2010) 669-675.
4. S. Mishra, S. R. Ande, B. L. Nyomba, The role of prohibition in cell signaling, *FEBS* **277** (2010) 3937-3946.
5. M. Pinterić, I. I. Podgorski, S. Sobočanec, M. Popović Hadžija, M. Paradžik, A. Dekanić, M. Marinović, M. Halasz, R. Belužić, G. Davidović, A. Ambriović Ristov, T. Balog, De novo expression of transfected sirtuin 3 enhances susceptibility of human MCF-7 breast cancer cells to hyperoxia treatment, *Free Radic Res.* **52** (2018) 672-684.
6. D. J. Betteridge, What is oxidative stress?, *Metabolism* **49** (2000) 3-8.
7. P. D. Ray, B. W. Huang, Y. Tsuji, reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell Signal.* **24** (2012) 981-990.
8. E. Panieri, M. M. Santoto, ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liaison in cancer cells, *Cell Death Dis.* **7** (2016) 2253.
9. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.* **144** (2011) 646-674.
10. M. Boranić, Etiology and pathogenesis of breast cancer, *Med. Vjesn* **38** (2006) 33-41.
11. Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, PA Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian i sur., A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science.* **266** (1994) 66-71.
12. BS Hulka, ET Liu, RA Lininger, Steroid hormones and risk of breast cancer, *Cancer.* **74** (1994) 1111-1124.
13. K. McPherson, CM Steel, JM Dixon, Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics, *Br Med J.* **321** (2000) 624-628.
14. W. D. Foulkes, I. E. Smith, J. S. Reis-Filho, Triple-Negative Breast Cancer, *N Engl J Med* **363** (2010) 1938-1948.

15. S. Comşa, AM Cîmpean, M. Raica, The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research, *Anticancer Res.* **35** (2015) 3147-3154.
16. W. J. Mach, A. R. Thimmersch, J. T. Pierce, J. D. Pierce, Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxyfen in the Lung, *Nursing Research and Practice.* **2011** (2011) 1-7.
17. N. J. German, M. C. Haigis, Sirtuins and the metabolic hurdles in cancer, *Curr Biol.* **25** (2015) 569-583.
18. M. N. Sack, T. Finkel, Mitochondrial Metabolism, Sirtuins and Aging, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012) 1-11.
19. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Strayer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 517-519.
20. M. Ott, V. Gogvazde, S. Orrenius, B. Zhiovotovskiy, Mitochondria, oxidative stress and cell death, *Apoptosis* **12** (2007) 913-922.
21. V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich, Mechanisms of suppression of free radical overproduction by antioxidants, *Frontiers in bioscience* **1** (2009) 179-188.
22. B. Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, *Biochem Soc Trans.* **35** (2007) 1147-1150.
23. R. Margis, C. Dunand, FK Teixeira, M. Margis-Pinheiro, Glutathione peroxidase family-an evolutionary overview, *FEBS J.* **275** (2008) 3959-3970.
24. B. Schwer, N. BJ, F. RA, M. Ott, E. Verdin, The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase, *J Cell Biol* **158** (2002) 647-657.
25. M. Roth, Z. Wang, WY Chen, Sirtuins in Hematological Aging and Malignancy, *Crit Rev Oncog.* **18** (2013) 531-547.
26. W. Yu, K. E. Dittenhafer-Reed, J. M. Denu, SIRT3 Protein Deacetylates Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) and Regulates Mitochondrial Redox Status, *JBC* **287** (2012) 14078-14086.
27. D. B. Lombard, F. W. Alt, H.-L. H.-L. Cheng, J. Bunkenborg, R. S. Streeper, R. Mostoslavsky, J. Kim, G. Yancopoulos, D. Valenzuela, A. Murphy, Y. Yang, Y. Chen, M. D. Hirshey, R. T. Bronson, M. Haigis, L. P. Guarente, R. V. Farese, S. Weissman, E. Verdin, B. Schwer, Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation, *Molecular and cellular biology* **27** (2007) 8807-8814.
28. K. Brown, S. Xie, X. Qiu, M. Mohrin, J. Skin, Y. Liu, D. Zhang, D. T. Scadden, D. Chen, SIRT3 Reverses Aging-associated Degeneration, *Cell reports* **3** (2013) 319-327.

29. J. Sun, D. Folk, TJ Bradley, J. Tower, Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*, *Genetics* **161** (2002) 661–672.
30. S. E. Schriener, N. J. Linford, G. M. Martin, P. Treuting, C. E. Ogburn, M. Emond i sur., Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria, *Science* **308** (2005) 1909–1911.
31. B. Kincaid, E. Bossy-Wetzel, Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration, *Front Aging Neurosci.* **5** (2013) 48.
32. M. Torrens-Mas, J. Oliver, P. Roca, J. Satre-Serra, SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer, *Cancers (Basel)*. **9** (2017) 90.
33. Y. Chen, L. L. Fu, X. Wen, X. Y. Wang, J. Liu, Y. Cheng, J. Huang, Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis.* **5** (2014) 14-19.
34. I. Moen, L. E. B. Stuhr, Hyperbaric oxygen therapy and cancer- a review, *Target Oncol.* **7** (2012) 233-242.
35. KJ Chavez, SV Garimella, S. Lipkowitz, Triple Negative Breast Cancer Cell lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer, *Breast Dis* **32** (2010) 35-48.
36. JM Mast, P. Kuppusamy, Hyperoxygenation as a Therapeutic Supplement for Treatment of Triple Negative Breast Cancer, *Front. Oncol.* **8** (2018) 1-9.
37. K. Yttersian Sletta, M. K. Tveitaras, N. Lu, A. S. T. Engelsen, R. K. Reed, A. Garmann-Johnsen, L. Stuhr, Oxygen-dependent regulation of tumor growth and metastasis in human breast cancer xenografts, *PLOS ONE* **12** (2017) 1-19.
38. T. Mahmood, PC Yang, Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, *N Am J Med Sci.* **4** (2012) 429-434.
39. TL Riss, RA Moravec, AL Niles, i sur., Cell Viability Assays, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, 2013, 1-41.
40. N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat. Protocols* **1** (2006) 2315-2319.
41. J. A. Welsh, J. A. Holloway, J. S. Wilkinson, N. A. Englyst, Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization, *Front. Cell Dev. Biol.* **5** (2017) 1-7.

42. A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit. Biotechnol.* **37** (2017) 163–176.
43. S. W. Perry, J. P. Norman, J. Barbieri, E. B. Brown, H. A. Gelbard, Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide, *BioTechniques* **50** (2011) 98-115.
44. JG Donaldson, Immunofluorescence staining, *Curr Protoc Cell Biol.* **1** (1998) 4.3.1-4.3.6.
45. A. S. Bause, M. C. Haigis, SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress, *Exp Gerontol.* **48** (2013) 634-639.
46. L.W.S. Finley, A. Carracedo, J. Lee, A. Souza, A. Egia, J. Zhang, M. C. Haigis, SIRT3 Opposes Reprogramming of Cancer Cell Metabolism through HIF1 α Destabilization, *Cancer Cell* **19** (2011) 416-428.
47. H.S. Kim, K. Patel, K. Muldoon-Jacobs, K.S. Bisht, N. Aykin-Burns, J.D. Pennington, R. van der Meer, P. Nguayen, J. Savage, K.M. Owens, i ostali, SIRT3 is amitochondria-localized tumor suppressor requiredformaintenance ofmitochondrial integrity and metabolism during stress, *Cancer Cell* **17** (2010) 41–52.
48. B. Halliwell, JMC Gutteridge, Free radicals in biology and medicine, 2.izdanje, Clarendon Press (1989), Oxford.
49. C. Glorieux, PB Calderan, Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach, *Biol Chem.* **398** (2017) 1095-1108.
50. K. Asaduzzaman, M. Tania, D. Zhang, H. Chen, Antioxidant enzymes and cancer, *Chin. J. Cancer Res.* **22** (2010) 87-92.
51. F. Tas, H. Hansel, A. Belce, Oxidative stress in breast cancer, *Med Oncol* **22:11** (2005)
52. Y. Chen, J. Zhang, Y. Lin, Q. Lei, KL Guan, S. Zhao, Y. Xiong, Tumor suppresor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutaze to scavenge ROS, *EMBO reports* **12** (2011) 534-541.
53. C. K. Singh, G. Chhabra, M. A. Ndiaye, LM Garcia-Peterson, N. J. Mack, N. Ahmad, The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling, *Antioxid. Redox Signal* **8** (2018) 643-661.
54. S. M. Reed, D. E. Quelle, p53 Acetylation: Regulation and Consequences, *Cancer (Basel)* **7** (2015) 30-69.
55. S. Li, M. Banck, S. Mujtaba, MM Zhou, M. M. Sugrue, M. J. Walsh, p53-Induced Growth Arrest is Regulated by the Mitochondrial SirT3 Deacetylase, *PloS ONE* **5** (2010).

56. L. Hui, Y. Zheng, Y. Yan, J. Bargonetti, DA Foster, Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D, *Oncogene* **25** (2006) 7305-7310.
57. M. Keimling, L. Wiesmüller, DNA double-strand break repair activities in mammary epithelial cells—influence of endogenous p53 variants, *Carcinogenesis* **30** (2009) 1260-1268.
58. A. Mikhailov, R. W. Cole, C. L. Rieder, DNA damage during Mitosis in Human Cells Delays the Metaphase/Anaphase Transition via the Spindle-Assembly Checkpoint, *Current Biology* **12** (2002) 1797-1806.
59. PM Fischer, DP Lane, Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics, *Curr Med Chem.* **7** (2000) 1213-1245.
60. A. Giralt, F. Villarroya, SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochemical Journal* **444** (2012) 1–10.
61. J. Brenmoehl, A. Hoeflich, Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3, *Mitochondrion* **13** (2013) 755-761.
62. BG Ahn, HS Kim, S. Song, IH Lee J. Liu, A. Vassilopoulos, CX Deng, T. Finkel, A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis, *Proc Natl Acad Sci USA.* **105** (2008) 14447-14452.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dora Marčinko

Datum rođenja: 19. prosinca 1994.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2013. završena Gimnazija Lucijana Vranjanina (smjer: prirodoslovno-matematički), Zagreb

2017. završen preddiplomski studij kemije na Sveučilištu J.J.Strossmayera u Osijeku (Tema završnog rada: Uloga vitamina D u razvoju mozga i neurodegenerativnih bolesti)

2017.-2019. Diplomski studij kemije, grane: Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. Festival znanosti, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019. Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković (IRB), Zagreb

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Simpozij „Prvih 10 godina HDIR-a“, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 4.lipnja 2019.