

Utjecaj komponenata citoskeleta na diobu i diferencijaciju modelnog tkiva

Rastija, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:411463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Rastija

**Utjecaj komponenata citoskeleta na diobu i
diferencijaciju modelnog tkiva**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Marijete Kralj, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se dr.sc. Marijeti Kralj što mi je omogućila da ovaj diplomski rad izradim u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju te na podršci i vodstvu pri njegovoj izradi.

Zahvaljujem se i dr.sc Adriani Lepur na pruženom znanju i pomoći u laboratoriju, na divnom i veselom društvu te velikoj podršci za vrijeme izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se i prof.dr.sc. Maji Matulić na korisnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada i ljubaznosti.

Također zahvaljujem se svim djelatnicima laboratorija za Eksperimentalnu terapiju.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na velikoj podršci, potpori, vjeri, optimizmu i riječima ohrabrenja kroz sve godine studija. Također svim mojim dragim prijateljima i najboljim kolegama koji su uvijek bili puni podrške i bez kojih ovo studiranje ne bi bilo tako divno i zabavno iskustvo.

POPIS KRATICA

nfH₂O- od engl. *nuclease free H₂O*

MEM- od engl. *Minimum essential media*

PBS- fosfatni pufer

EDTA- etilendiamintetraoctena kiselina

RIPA-od engl. *radio-immunoprecipitation assay*

SDS- natrijev dodecilsulfat

PAGE- elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Tris- 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

AA- akrilamid

APS- amonijev persulfat

SDS- natrijev dodecilsulfat

TEMED- tetrametiletilendiamin

TBS-T- Tris-solni pufer s Tweenom

EMT- epitelno-mezenhimska tranzicija

MDCK II- stanična linija epitelnih stanica distalnog bubrega

LINC- od engl. *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj komponenata citoskeleta na diobu i diferencijaciju modelnog tkiva

Ana Rastija

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Poznavanje mehanizama odgovornih za diferencijaciju tkiva i razvoj organizma veliki je izazov razvojne biologije, ali i molekularne onkologije. Koordinirano ponašanje i kretanje stanica nužni su za morfogenezu, zacjeljivanje rana i tumorigenezu. Karakteristika stanica koje se gibaju ili diferenciraju jest promjena oblika ovisna o citoskeletu. U ovom radu istražili smo važnost citoskeleta u rastu i diferencijaciji stanica kružne kolonije MDCK II (Madin-Darby canine kidney epithelial cell) i razlike između dva tipa stanica koje nastaju treći dan rasta. Zbijene središnje stanice pojačano fosforiliraju eIF2 α što upućuje na povećani stanični stres. eIF2 α i fosforilirani eIF2 α detektirali smo metodom Western blot. Istom metodom smo pratili razinu citoskeletnih (aktin, β -tubulin, vimentin, vinkulin) i adhezijskih proteina (β -katenin, E kadherin). Pokazali smo da se dva tipa stanica značajno razlikuju u ekspresiji vimentina, β katenina i E kadherina. Narušavanjem aktina i mikrotubula kemijskim spojevima te utišavanjem ekspresije vimentina molekulama siRNA, stanice kružne kolonije su izgubile diferencirani izgled. Metodom PCR istražili smo razinu ekspresije nesprina - proteina koji povezuju stanični i jezgri skelet - na razini glasničke RNA. Narušavanje aktina i vimentina dovodi do promjene ekspresije nesprina 1 i nesprina 3. Rezultati ovog rada ukazuju na razlike između dva tipa stanica kružne kolonije te važnost integriteta citoskeleta u procesu rasta i diferencijacije modelnog tkiva.

(58 stranica, 19 slika, 11 tablica, 62 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: nesprini, kružna kolonija, latrunkulin B, kolhicin, siRNA

Voditeljice: dr. sc. Marijeta Kralj, znanstvena savjetnica IRB

Suvoditeljica: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.
dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
dr. sc. Duje Lisičić, doc.

Zamjena: dr.sc. Inga Marijanović, doc.

Rad prihvaćen: 30.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Influence of cytoskeletal components on division and differentiation of model tissue

Ana Rastija

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Knowing the mechanisms responsible for tissue differentiation and development of the organism is a major challenge both to developmental biology and molecular oncology. Coordinated behavior and cell movement are necessary for morphogenesis, wound healing and tumorigenesis. Change of the shape that is dependent on the cytoskeleton is the characteristic of the cells that move or differentiate. Here we investigated importance of the cytoskeleton in the growth and differentiation of MDCKII (Madin-Darby canine kidney epithelial cell) circular colonies and the differences between the two types of cells that emerged on the third day of growth. Compacted central cells increase phosphorylation of eIF2 α which indicates increased cellular stress. eIF2 α and phosphorylated eIF2 α were detected by the Western blot analysis. By the same method we analyzed the level of cytoskeletal (actin, β -tubulin, vimentin, vinculin) and adhesion proteins (β -catenin, E cadherin). We have shown that two types of cells differ significantly in the expression of vimentin, β catenin and E cadherin. Circular colony cells lost a differentiated appearance because of disruption of actin and microtubules by chemical compounds and suppression of the vimentin expression by siRNA. Expression of nesprin – protein linking the cellular and nuclear skeleton – was analyzed via PCR method at the level of the messenger RNA. Disruption of actin and vimentin leads to a change in expression of nesprin 1 and nesprin 3. The results of this research point out the differences between the two types of cells inside circular colonies and the importance of cytoskeletal integrity in the growth and differentiation of the model tissue.

(58 pages, 19 figures, 11 tables, 62 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: nesprins, circular colonies, latrunculin B, colchicine, siRNA

Supervisors: Dr. sc. Marijeta Kralj, Senior scientist, IRB

Cosupervisor: Dr. Maja Matulić, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. sc. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Substitution: Dr.sc. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Thesis accepted: 30.11.2017.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	CITOSKELET	2
1.1.1	TIPOVI CITOSKELETA.....	5
1.1.1.1	Aktinski citoskelet	5
1.1.1.2	Mikrotubuli	7
1.1.1.3	Intermedijarni filamenti	9
1.1.2	Uloga citoskeleta u razvoju i diferencijaciji.....	11
1.2	Kompleks LINC	12
1.3	Cilj istraživanja.....	14
2	MATERIJALI I METODE	16
2.1	Materijali	16
2.1.1	Osnovne kemikalije, reagensi, supstrati	16
2.1.2	Puferi i njihova priprema.....	17
2.1.3	Boje i markeri molekularnih masa	18
2.1.4	Komercijalni setovi kemikalija	19
2.1.5	Antitijela.....	19
2.1.6	Početnice za lančanu reakciju polimerazom, PCR.....	20
2.1.7	Male interferirajuće RNA molekule (siRNA).....	20
2.1.8	Stanična linija	21
2.2	Metode	22
2.2.1	Stanična kultura.....	22
2.2.2	Tretmani u kulturi.....	22
2.2.2.1	Tretman toksinima latrunkulinom b i kolhicinom	23
2.2.2.2	Transfekcija malih interferirajućih RNA molekula (siRNA)	23
2.2.3	Priprema staničnih lizata	24
2.2.4	Analiza ekspresije proteina metodom Western blot.....	24
2.2.4.1	Priprema uzoraka za analizu Western blot.....	24
2.2.4.2	Određivanje koncentracije proteina u staničom lizatu.....	25
2.2.4.3	Denaturirajuća elektorforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)	26
2.2.4.4	Prijenos proteina na membranu.....	27
2.2.4.5	Vežanje antitijela.....	27
2.2.4.6	Detekcija proteina na membrani kemiluminiscencijom.....	28
2.2.5	Izolacija RNA.....	28

2.2.6	Određvanje koncentracije izolirane RNA	29
2.2.7	Reverzna transkripcija.....	29
2.2.8	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	30
2.2.9	Touchdown PCR	31
2.2.10	Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	32
2.2.11	Mikroskopiranje i obrada slika.....	32
2.2.12	Statistička analiza	32
3	REZULTATI.....	33
3.1	Rast kružne kolonije stanica MDCK II	33
3.1.1	Istraživanje ekspresije i fosforilacije proteina eIF2 α u kružnoj koloniji.....	36
3.2	Ekspresija adhezijskih proteina i proteina citoskeleta u kružnoj/98 koloniji	37
3.3	Narušavanje morfologije kružne kolonije MDCK II stanica.....	43
3.3.1	Transfekcija siRNA.....	43
3.3.2	Tretman latrunkulinom B	44
3.3.3	Tretman kolhicinom	44
3.4	Analiza ekspresije mRNA nesprina metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).....	46
4	RASPRAVA.....	48
5	ZAKJUČAK.....	53
6	LITERATURA.....	54

1 UVOD

Precizna regulacija staničnog rasta i diobe ključna je za morfogenezu i razvoj organizma. Procesom diferencijacije dolazi do promjena koje rezultiraju specijalizacijom stanica. Stanična diferencijacija i razvoj tjelesnih struktura precizno su regulirani složenim međustaničnim signalnim putevima koji usklađuju aktivnost svake pojedine stanice te u konačnici dovode do nastanka složenih višestaničnih organizama. Suradnja stanica je nužna za optimalnu funkciju tkiva i organa, a narušena suradnja i deregulacija stanične signalizacije može dovesti do raznih patoloških promjena. Poznavanje mehanizama koji su odgovorni za diferencijaciju tkiva i razvoj organizma jedan je od velikih izazova razvojne biologije, ali i molekularne onkologije.

U višestaničnim organizmima istovrsne stanice se organiziraju u tkiva koja mogu vršiti specijalizirane funkcije efikasnije od pojedinačnih stanica. Stanice u tkivima neprestano primaju signale od susjednih stanica i svog okoliša - izvanstaničnog matriksa. Interakcija stanica, kao i stanica i izvanstaničnog matriksa, ključna je za razvoj i funkciju višestaničnih organizama (Cooper, 2004). Danas se zna da osim kemijskih signala, poput signalnih molekula i faktora rasta, i fizičke sile koje proizlaze iz staničnog mikrokruženja igraju važnu ulogu u staničnom razvoju i funkcijama. Na primjer, Tremblay i sur. (2013) su pokazali da uzgoj mezenhimskih matičnih stanica (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*) na podlogama različite čvrstoće potiče diferencijaciju stanica u različitom pravcu: uzgoj na mekanim podlogama potiče neuralnu i adipogenu diferencijaciju dok podloge tvrdoće mišićnog tkiva usmjeravaju diferencijaciju prema miocitima. Također, nepovoljne promjene tvrdoće potpornog tkiva u sloju epitelnih stanica narušavaju strukturu epitela te mogu potaknuti maligne promjene. Smatra se da citoskelet ima važnu ulogu u odgovoru na izvanstanične podražaje. Napetost nastala kontrakcijom citoskeleta služi percepciji mehaničkih uvjeta izvanstaničnog matriksa, koji pak utječe na organizaciju citoskeleta i stanično ponašanje (Fletcher i Mullins, 2010).

Razumijevanje procesa koji uključuje koordinirano stanično ponašanje, kakvo je prisutno u tkivu, a kao što je na primjer razvoj tkiva, zacjeljivanje rana i progresija raka, zahtjeva rad na modelima tkiva kod kojih je moguće dobro kontrolirati uvjete rasta. Modeli tkiva, kao što su stanične kolonije, vrlo su korisni u određivanju glavnih fizičkih čimbenika koji utječu na kooperativnost stanica (Kaliman i sur, 2014). Naime, stanične kolonije i zasebne

stanice imaju drugačiji odgovor na vanjske signale. Istraživanja upućuju na to da je osjetljivost monosloja na elastičnost supstrata u potpunoj suprotnosti s rezultatima dobivenim u eksperimentima s pojedinačnim stanicama (single-cell experiments) (Kaliman *i sur*, 2014).

Jedan od takvih staničnih modela koje služe kao model u istraživanju koordiniranog staničnog ponašanja predstavljaju stanice distalne cijevi bubrega, MDCK II. Ove su stanice zadržale sposobnosti kontaktne inhibicije i postižu karakterističnu epitelnu morfologiju u kulturi, što ih čini odličnim modelnim sustavom za *in vitro* proučavanje dinamike epitelnog tkiva (Kaliman *i sur*, 2014; Puliafito *i sur*, 2011). Stanice MDCK II rastu na dvodimenzionalnim površinama kao epitelni sloj debljine jedne stanice, tzv. monosloj.

1.1 CITOSKELET

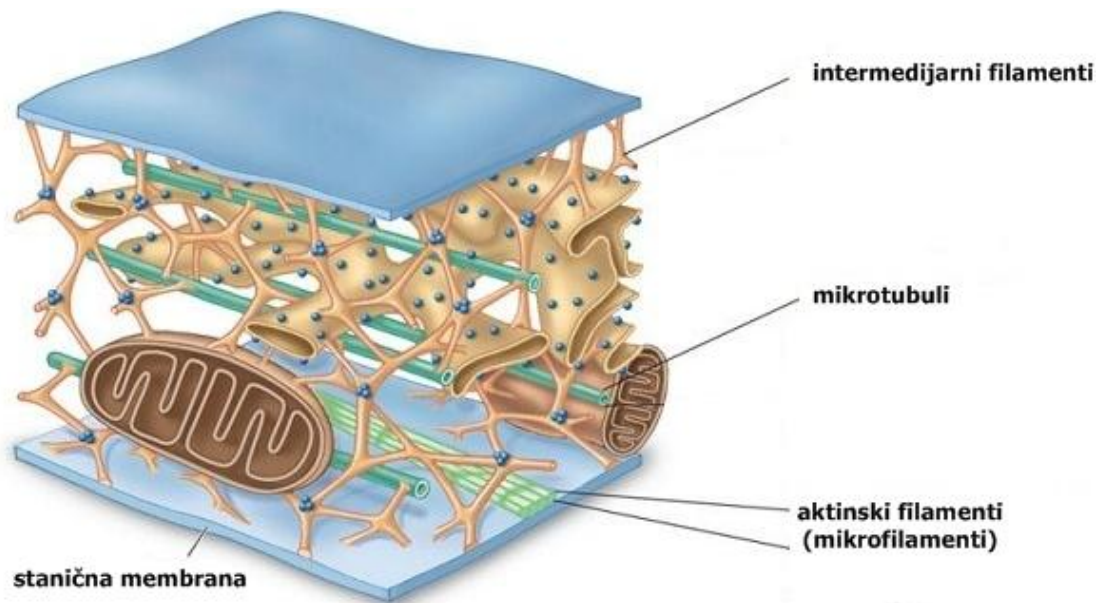
Za pravilno funkcioniranje organizma, stanice se moraju organizirati u prostoru, imati pravilan oblik, fizičku otpornost, pravilnu unutrašnju strukturu te ostvarivati mehaničku interakciju sa svojom okolinom (Usui, 2007). Citoskelet je sustav proteinskih filamenata koji se proteže kroz čitavu citoplazmu i stanici omogućuje održavanje oblika, unutarnju organizaciju te je odgovoran za prijenos signala iz okoline. Citoskelet fizički i biokemijski povezuje stanicu s vanjskim okolišem i može posredovati u kratkotrajnim ili dugotrajnim promjenama u ponašanju stanica (Fletcher i Mullins, 2010). Prisutan je u arhejama, bakterijama i eukariotima (Bocchiaro i Zamperini, 2017). Citoskelet je puno fleksibilniji i promjenjiviji nego što to njegovo ime govori. To je dinamična i prilagodljiva struktura čiji su sastavni elementi - polimeri i regulatorni proteini - u stalnom gibanju (Nakaseko i Yanagida, 2001). Za stanice je jako važna mogućnost reorganiziranja unutarnjih komponenata tijekom rasta, diobe i prilagodbe na promjenjive okolnosti. Proteini koji grade citoskelet se mogu složiti u širok raspon konstrukcija s različitim svojstvima koja ovise o načinu slaganja komponenti citoskeleta (Fletcher i Mullins, 2010). Struktura, funkcija i dinamičnost citoskeleta se razlikuju ovisno o organizmu i tipu stanica (Wickstead i Gull, 2011).

Činjenica da se citoskelet stalno mijenja i reorganizira pridonosi raznolikosti njegovih uloga u stanici (Nakaseko i Yanagida, 2001). Jedna od njegovih primarnih zadaća je da čini strukturnu okosnicu stanice, služi kao potporanj koji određuje oblik i prostorno organizira sadržaj stanice (Cooper 2004; Fletcher i Mullins, 2010; Wickstead i Gull 2011). Uz strukturnu ulogu citoskelet je odgovoran i za stanično kretanje: omogućuje stanicama spermija da plivaju,

fibroblastima i bijelima krvnim stanicama da pužu (Cooper, 2004; Usui, 2007). To ne uključuje samo kretanje cijele stanice, nego i unutrašnji transport organela i drugih komponenata s jednog dijela stanice u drugi (Alberts *i sur*, 2008; Dillon i Goda, 2005).

Elementi citoskeleta, osim što međusobno komuniciraju, ostvaruju i interakciju sa staničnom membranom te tako sudjeluju u važnim staničnim procesima. Tijekom morfogeneze citoskelet određuje raspored određenih struktura unutar stanice i polarnost stanice (Doherty i McMahon, 2008; Hall, 2009). Epitelnim stanicama u crijevima organizacija citoskeleta služi za održavanje razlike između dviju površina, apikalne i bazalne, koje imaju različite funkcije bitne za stanicu (Alberts *i sur*, 2008). Nadalje, citoskelet je jako važan tijekom stanične diobe i diferencijacije. Komponente citoskeleta sudjeluju i u prijenosu signala i utječu na transkripciju gena kao odgovor na izvanstanične faktore (Damania *i sur*, 2010). Izvanstanični faktori često djeluju tako da potiču promjene citoskeleta. Dijelovi citoskeleta djeluju istodobno kao receptori i kao ciljevi signalnih puteva, te tako povezuju stanični oblik i pokretanje s drugim staničnim odgovorima. Citoskelet je kao ključni regulator transkripcije i ekspresije mnogih gena uključen u različite, kako fiziološke tako i patofiziološke procese (Bocchiaro i Zamperini, 2017). Forgacs *i sur.* (2014) su pokazali da je citoskelet blisko povezan s mrežom signalnih proteina i da bez njega unutarstanični signalni aparat ne može pravilno funkcionirati. Postaje sve jasnije da promijene u arhitekturi citoskeleta ne mijenjaju samo fizičke osobine stanica već i preoblikuju mehanosenzorni signalni mehanizam unutar stanica (Uzer *i sur*, 2016). Citoskelet može modulirati signalne puteve, koordinirati događaje u udaljenim dijelovima stanica i povezivati mehaničke signale s biokemijskim odgovorima (Jaqaman i Grinstein, 2012).

Različite funkcije citoskeleta ovise o ponašanju triju osnovnih proteinskih filamenata: aktinskih filamenata (mikrofilamenata), mikrotubula i intermedijarnih filamenata koji zajedno kontroliraju oblik i mehaniku eukariotske stanice (Pessoa-Pureur *i sur*, 2014). (Slika 1)



Slika 1. Citoskelet se sastoji od triju osnovnih filamenata: aktinski filamenata (mikrofilamenti), mikrotubula i intermedijarnih filamenata koji čine mrežu rasprostranjenu po čitavoj stanici. Sva tri tipa međusobno surađuju i kontroliraju oblik i mehaniku eukariotske stanice (prilagođeno i preuzeto s: www.thinglink.com/scene/756592505989890050).

Citoskeletnim filamentima je pridružen veliki broj pomoćnih proteina koji kontroliraju njihovo sastavljanje i omogućuju im međusobno povezivanje i povezivanje s drugim komponentama u stanici (Alberts *i sur*, 2008). Remodeliranje proteinskih filamenata omogućuje citoskeletu upravljanje nevjerojatnom raznolikosti staničnih oblika, a time i mijenjanje staničnog ponašanja u odgovoru na signale iz okoline (Dillon i Goda, 2005). Svaki tip filamenata ima jedinstvena biofizička i biokemijska svojstva. Razlikuju se po smještaju unutar stanice, proteinskom sastavu, dinamici slaganja i polarnosti. Te odlike uvjetuju različitu arhitekturu i funkciju mreža koje te podjedinice stvaraju (Fletcher i Mullins, 2010). Unatoč različitim obilježjima, vlakna citoskeleta međusobno surađuju u mnogim staničnim procesima te sva tri tipa citoskeletnih elemenata podržavaju pravilan oblik, čvrstoću i sposobnost migracije stanice (Alberts *i sur*, 2008; Bocchiaro i Zamperini, 2017, 2017; Fletcher i Mullins, 2010).

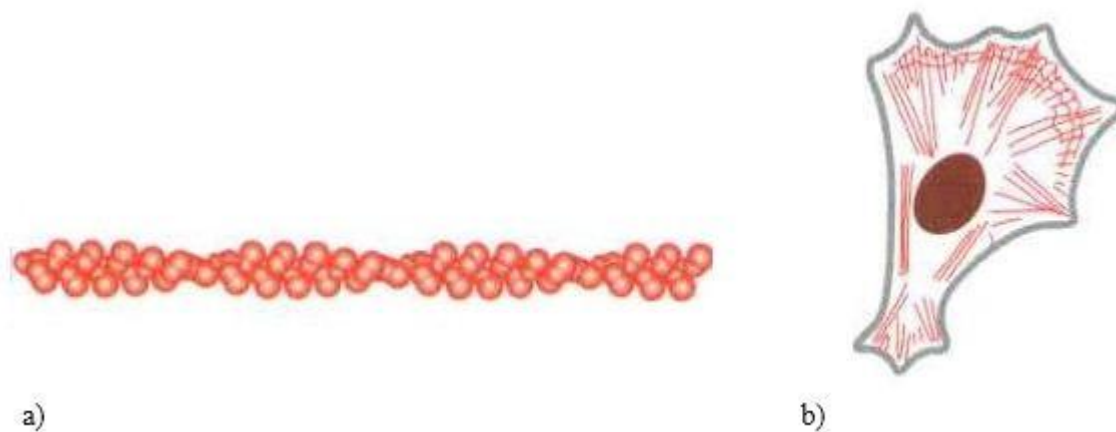
Zbog važnih i raznolikih uloga citoskeleta u stanici, promjene u građi ili deregulacija bilo kojeg od tri tipa citoskeletnih elemenata mogu doprinijeti razvoju različitih bolesti uključujući i tumore. Poremećaji u organizaciji mikrotubula mogu za posljedicu imati smanjenu pokretljivost cilija što rezultira respiratornim poremećajem poput Kartagenerovog sindroma

dok su abnormalnosti u aktinskom citoskeletu povezane s razvojem kongenitalne miopatije. Mutacije u genima koji kodiraju za proteine intermedijarnih filamenata su povezane s mnogim bolestima kod ljudi poput bulozne epidermolize (mutacije određenih keratina), Lou Gehrigove bolesti i bolesti preuranjenog starenja (Fletcher i Mullins, 2010). Obilježje mnogih tumorskih stanica je promijenjena arhitektura jezgre koja je povezana s promjenama u intermedijarnim filamentima laminima. Promjene u laminima A/C su potvrđene u tumorima debelog crijeva, pluća i prostate. U tumorskim stanicama su uočene i mutacije tubulina β I što uzrokuje rezistenciju tumorskih stanica na mitotičke lijekove kemoterapeutike koji djeluju na mitotske stanice (Bocchiaro i Zamperini, 2017).

1.1.1 TIPOVI CITOSKELETA

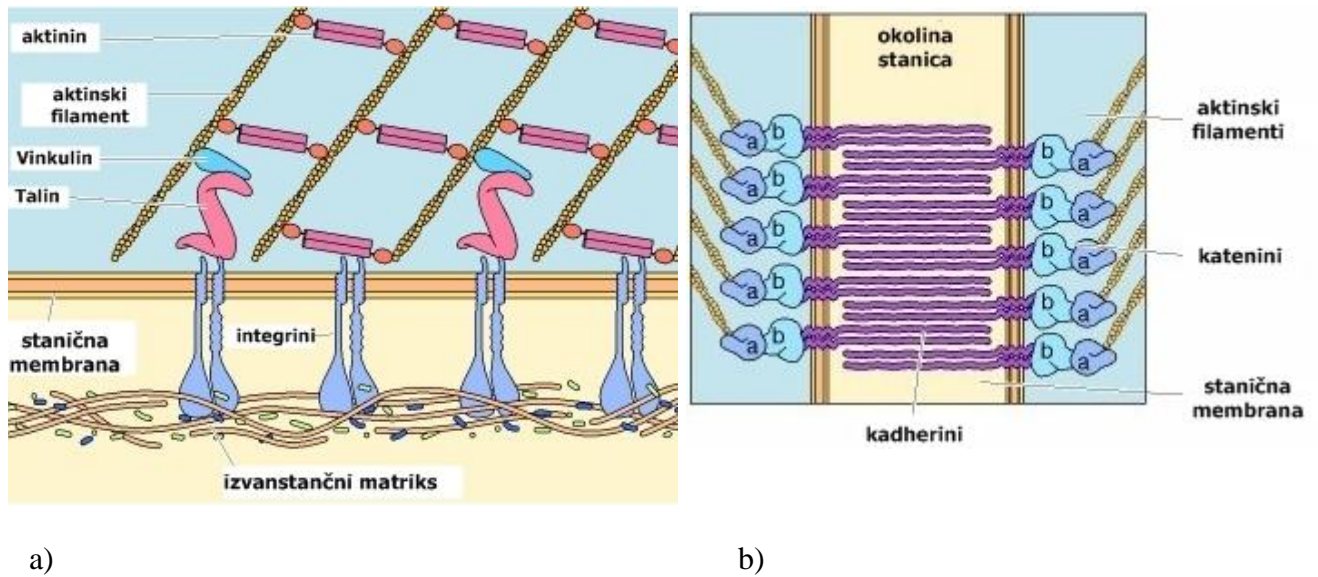
1.1.1.1 Aktinski citoskelet

Aktinski filamenti (mikrofilamenti) su građeni od dva međusobno isprepletana lanca aktina, promjera 7 nm. Monomeri aktina (G-aktin) se spontano združuju nekovalentnim interakcijama u polimere stvarajući gipka i savitljiva vlakna (F-aktin) (Dráber *i sur*, 2012, Schmidt i Hall, 1998). Aktinski filamenti su polarizirane i vrlo dinamične strukture koje imaju reverzibilnu polimerizaciju koja omogućuje i depolimerizaciju aktinskih vlakana kada je to potrebno (Schmidt i Hall, 1998). Unutar stanične citoplazme aktinski filamenti se povezuju u snopove ili u mreže. Osobito su gusti ispod stanične membrane te daju mehaničku potporu stanici i određuje njen oblik (Cooper 2004; Mattila *i sur*, 2016) (Slika 2). Aktinski filamenti omogućuju kretanje stanične površine te pomažu formiranju raznolikih staničnih izbočina. Neke od tih staničnih izbočina su dinamične strukture poput filopodija i lamelipodija koje stanice koriste za istraživanje okoline i za kretanje (Alberts *i sur*, 2008). U stanicama koje se dijele aktinski filamenti tvore kontraktilni prsten važan za citokinezu (Dráber *i sur*, 2012).



Slika 2. a) Aktinski filamenti su dvolančani helikalni polimeri proteina aktina. **b)** Aktinski filamenti su raspršeni u cijeloj stanici ali su osobito koncentrirani ispod stanične membrane (preuzeto i prilagođeno prema: Alberts *i sur*, 2008).

Aktinski citoskelet ispod plazma membrane osim što ima ulogu podrške, ujedno je u bliskoj interakciji s lipidima i proteinskim komponentama plazma membrane. Sudjeluje u različitim staničnim procesima koji se odvijaju u blizini stanične membrane poput endocitoze, egzocitoze, regulacije difuzije i organizacije membranskih proteina (Mattila *i sur*, 2016). Aktinski citoskelet je preko posredničkih proteina, talina i vinkulina, povezan s transmembranskim proteinima integrinima koji povezuju stanicu s izvanstaničnim matriksom. Takvi proteinski kompleks koji nastaju na mjestu kontakta stanica s podlogom se nazivaju fokalne adhezije i posreduju u mehaničkoj i biokemijskoj signalizaciji koja utječe na stanične procese (Chen *i sur*, 2003). Na sličan način je aktinski citoskelet pričvršćen u područjima stanično-staničnih dodira (adherentni spojevi) s transmembranskim proteinom kadherinom preko α - i β -katenina (Wang *i sur*, 2009) (Slika 3). Takve veze omogućuju aktinskom citoskeletu da osjeti što se zbiva oko stanice te da sudjeluje u staničnoj signalizaciji. Odgovori stanica na izvanstanične signale često uključuje preoblikovanje aktinskog citoskeleta što dovodi do promijene u staničnom kretanju i obliku (Cooper, 2004). Aretmenko *i sur*. (2016) su pokazali da je aktinski citoskelet ključan u odgovoru na mehaničke podražaje: stanice s depolimeriziranim aktinskim citoskeletom ne odgovaraju na mehaničke podražaje ali i dalje reagiraju na kemoatraktante.

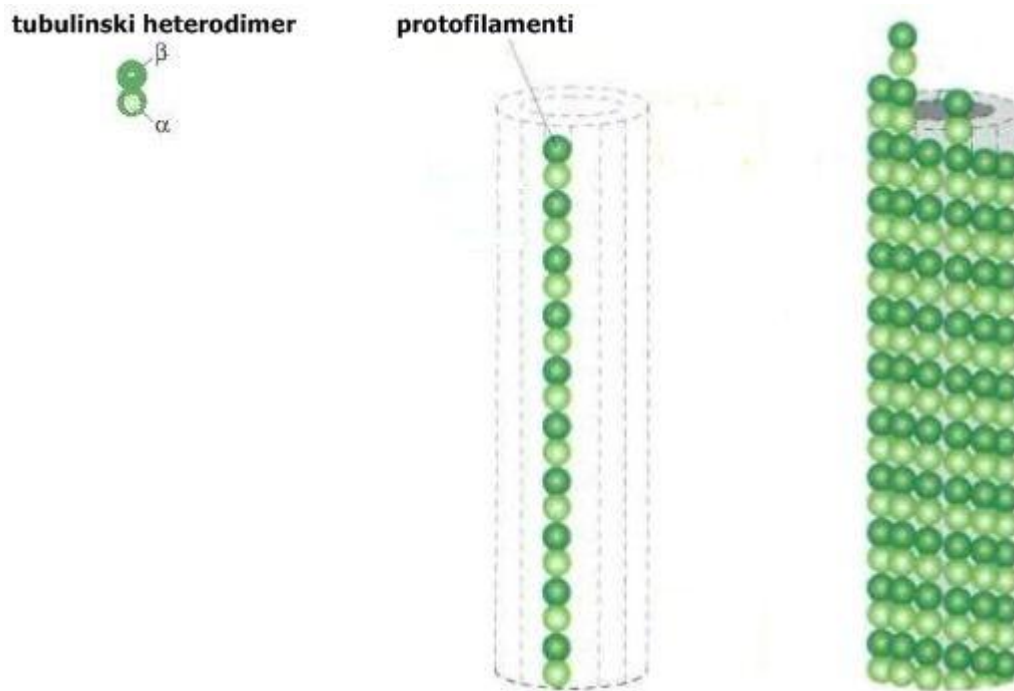


Slika 3. Povezivanje aktinskih vlakana s izvanstaničnim matriksom i adherentnim spojevima. a) Aktinski filamenti su preko proteina talina i vinkulina povezani s transmembranskim proteinima integrinima i preko njih sa staničnim okolišem. b) Kadherini su transmembranski proteini koji povezuju citoskelet susjednih stanica na mjestu međustaničnih spojeva. β katenin s jedne strane veže kadherine a s druge strane stupa u interakciju s α kateninom koji je vezno mjesto za aktinske filamente (preuzeto i prilagođeno prema: Cooper, 2004).

1.1.1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli su dugačaka polimerna vlakna, u obliku šupljih cijevi promjera oko 25 nm koji se protežu kroz čitavu citoplazmu. Najkrući su od tri tipa filamenata i izrazito su dinamičke strukture koji se stalno izgrađuju i razgrađuju što im omogućava brzu reorganizaciju (Cooper 2004; Fletcher i Mullins, 2010). Osnovna građevna jedinica mikrotubula je protein tubulin. Tubulin je heterodimerni protein koji se sastoji od dva polipeptidna lanaca, α i β . Dimeri tubulina se združuju u protofilamente, a bočnim povezivanjem 13 linearnih protofilamenata nastaje cilindrična struktura mikrotubula (Slika 4). Karakteristični način slaganja protofilamenata mikrotubula uvjetuje njihovu polarnost koja je bitna za njihovu biološku funkciju (Cooper, 2004). Stvaranje mikrotubula u stanicama sisavaca počinje od jednog ili više središta organizacije, MTOC (engl. *microtubule-organizing centres*). Središte organizacije mikrotubula (MTOC) i glavni dio – centrosom imaju ulogu u procesima poput stanične

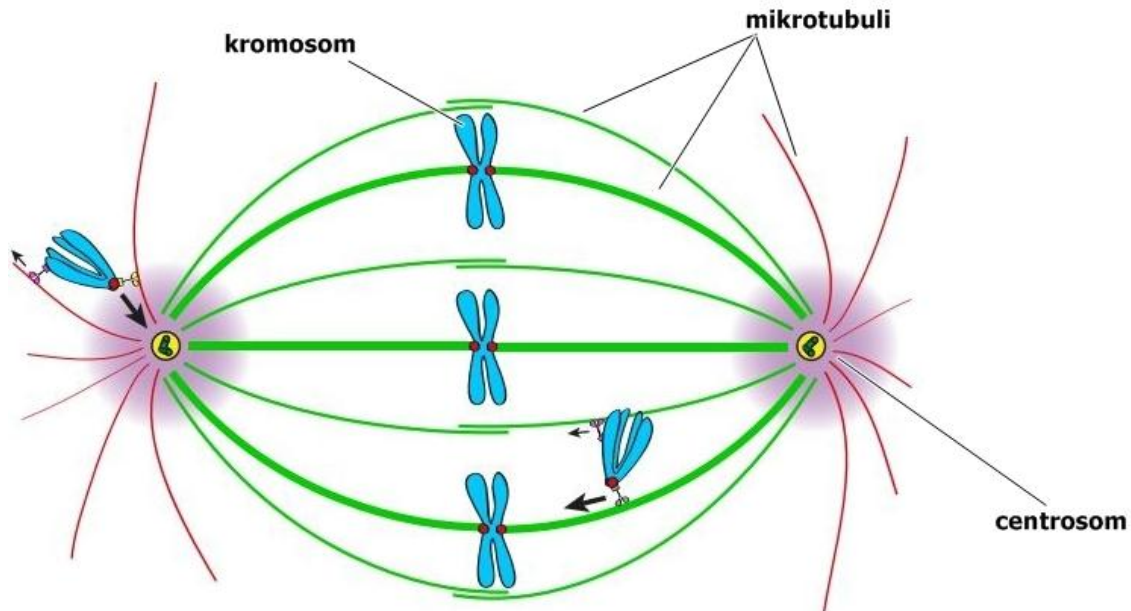
migracije, signalizacije, unutarstaničnom transportu i stvaranju polarnosti (Etienne-Manneville, 2013).



Slika 4. Struktura mikrotubula. α - i β -tubulin tvore dimere koji polimeriziraju i tvore mikrotubule koji se sastoje od 13 protofilamenata združenih oko središnje šupljine (preuzeto i prilagođeno prema: Alberts *i sur*, 2008).

Mnoge uloge mikrotubula se preklapaju s ulogama aktina. Mikrotubuli sudjeluju u stvaranju staničnog oblika i mogu tvoriti izbočine na površini stanica poput trepetiljki i bičeva koji određenim stanicama omogućavaju kretanje. Osim u staničnim gibanjima imaju ulogu i u unutarstaničnom smještaju i prijenosu vezikula i organela (Cooper, 2004; Dráber *i sur*, 2012). Da bi unutarstanični prijenos bio moguć potrebni su pomoćni proteini, molekularni motori-kinezini i dineini. Motorni proteini prenose duž mikrotubula komponente koje su važne za staničnu komunikaciju, preživljenje i progresiju staničnog ciklusa te narušeni prijenos komponenata može rezultirati brojnim poremećajima (Usui, 2007). Tijekom stanične diobe mikrotubuli se potpuno reorganiziraju, stvaraju diobeno vreteno te su odgovorni za razdvajanje kromosoma (Slika 5). Pravilan raspored mikrotubula potreban je za pravilnu orijentaciju i

integritet diobenog vretena što kod višestaničnih organizama igra važnu ulogu u usmjeravanju diferencijacije stanica tijekom ranog razvoja (Nakaseko i Yanagida, 2001)



Slika 5. Shematski prikaz diobenog vretena. (preuzeto i prilagođeno prema: Barisic i Maiato, 2016)

1.1.1.3 Intermedijarni filamenti

Intermedijarni filamenti (IF) su treći tip citoskeletnih filamenata koji su nalik užetu i promjera oko 10 nm. Za razliku od mikrofilamenata i mikrotubula koji su građeni od jednog tipa proteina, intermedijarni filamenti su građeni od različitih proteina eksprimiranih u različitim vrstama stanica (Cooper, 2004). Ekspresija intermedijarnih filamenata je tkivno specifična što upućuje na to da je tip intermedijarnih filamenata prisutnih u stanicama povezan s njihovom biološkom ulogom (Hendrix *i sur*, 1996). Intermedijarni filamenti su klasificirani u šest skupina na temelju sličnosti u aminokiselinskom slijedu (Pessoa-Pureur *i sur*, 2014; Szeverenyi *i sur*, 2008). Tip I čine kiseli, a tip II bazični keratini različito eksprimirani u većini epitelnih stanica u različitim fazama razvoja i diferencijacije (Fuchs, 1994). Proteini intermedijarnih filamenata tipa III su: dezmin u mišićnim stanicama, fibrilarni kiseli protein specifičan za glija stanice (GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*) i astrocite, periferin u neuronima perifernog živčanog sustava i vimentin (Herrmann *i sur*, 2009; Szeverenyi *i sur*, 2008). Od intermedijarnih filamenata tipa III, vimentin je ubikvitarno eksprimiran, proizvode

ga mezenhimske stanice, ali i različite transformirane i tumorske stanične linije (Fuchs, 1994). Vimentin se proteže od jezgre prema periferiji stanica i ima značajnu ulogu u organiziranju organela u citoplazmi (Dráber *i sur*, 2012). Intermedijarne filamenate tipa IV čine neurofilamenti (NF-L, NF-M, NF-H), nestini i α -interneksin. Lamini jezgrine ovojnice pripadaju tipu V i mogu se naći u većini eukariotskih stanica, dok filensin i pakinin čine zadnji tip proteina intermedijarnih filamenata, tip VI (Cooper, 2004; Herrmann *i sur*, 2009).

Unatoč velikoj različitosti proteina intermedijarnih filamenata svi imaju sličnu strukturu - središnju α uzvojnica koja je okružena N i C terminalnim domenama koje se nazivaju „glava“ i „rep“ (Slika 6). Za razliku od mikrofilamenata i mikrotubula, intermedijarni filamenti nisu polarni zbog antiparalelnog združivanja dimera (Herrmann *i sur*, 2007). IF su općenito puno stabilniji od aktinskih vlakana i mikrotubula i ne pokazuju slična dinamička svojstva (Dráber *i sur*, 2012). Intermedijarni filamenti imaju temeljnu strukturnu ulogu te pružaju mehaničku čvrstoću i stabilnost stanicama i tkivima (Cooper, 2004). Rasprostranjeni su po čitavoj citoplazmi gdje čine finu mrežu koja se pruža od prstena oko jezgre pa sve do stanične membrane. Oni se mogu povezivati sa staničnom membranom, ali i s ostalim elementima citoskeleta i na taj način integriraju različite dijelove citoskeleta i organiziraju unutrašnju strukturu stanica (Fletcher i Mullins, 2010; Cooper, 2004). Intermedijarni filamenti su, slično kao i aktinski, usidreni u staničnu membranu na dva područja specijaliziranih staničnih dodira, na dezmosomima (stanično-stanični dodir) i hemidezmosomima (stanica-izvanstanični matriks) preko guste ploče unutarstaničnih proteina. Povezanost intermedijarnih elemenata s izvanstaničnim matriksom i međustaničnim spojevima ih čini važnom karikom u signalnih puteva (Cooper, 2004; Herrmann *i sur*, 2007).



Slika 6. Struktura proteina intermedijarnih filamenata. Proteini intermedijarnih filamenata imaju središnju α uzvojitu štapčastu domenu. N terminalne domene glave i C terminalne domene repa razlikuju se u obliku i veličini (preuzeto i prilagođeno prema: Cooper 2004).

1.1.2 Uloga citoskeleta u razvoju i diferencijaciji

Citoskelet detektira i prenosi mehaničke podražaje, a interakcija citoskeletnih proteina, integrina i mehaničkih sila iz okoline može utjecati na promjenu oblika, proliferaciju pa čak i diferencijaciju stanica. Jedna od karakteristika stanica koje prolaze kroz diferencijaciju jest promjena oblika koja ovisi o citoskeletu. Primjerice, mezenhimske matične stanice diferenciraju u adipocite ili osteocite, ovisno jesu li prisiljene rasti u obliku rozete ili zvijezde. (Mathieu i Lobo, 2012). Istraživanja su pokazala promjenu aktinskog citoskeleta mezenhimskih matičnih stanica tijekom osteogene i hondrocitne diferencijacije, a i adipogena diferencijacija povezana je sa strukturom aktina.

Osim diferencijacije i proliferacije, citoskelet ima značajnu ulogu u još jednom procesu koji je važan za razvoj organizma, epitelno mezenhimske tranzicije (EMT). Epitelno mezenhimska tranzicija (EMT) je proces bitan za morfogenezu tj. nastanak tkiva i organa u višestaničnim organizmima, koji omogućuje nepokretnim epitelnim stanicama morfološke promjene nakon čega one postaju pokretljive, mezenhimalne stanice (Mendez *i sur*, 2010; Thiery *i sur*, 2009). Tijekom EMT-a epitelne stanice gube apikalno-bazalnu polarnost, što je posljedica nestanka međustaničnih spojeva, reorganizacije citoskeleta i organela (Thiery *i sur*, 2009). Osim za normalan razvoj, ovaj proces je karakterističan za tumore tj. metastaziranje tumorskih stanica (Yang i Weinberg, 2008). Reorganizacija aktinskog citoskeleta je važna za metastaziranje i diferencijaciju epitelnih stanica u mezenhimske stanice. Za razliku od normalnih stanica, u stanicama koje prolaze EMT, smanjuje se broj β -aktinskih vlakana odgovornih za stanično povezivanje i kontrakciju i dolazi do njihovog promijenjenog rasporeda u stanici tj. vlakna postaju raspršenija (Sun *i sur*, 2015). Porodica proteina Rho koji reguliraju aktinski citoskelet ima važnu ulogu tijekom migracije tumorskih stanica i EMT. Tijekom EMT dolazi do povećane aktivnosti proteina Rac 1, člana porodice Rho, koji potiče polimerizaciju aktina stvaranje i pokretnih membranskih struktura poput lamelipodija za staničnu migraciju (Yilmaz i Christofori, 2009). Mikrotubuli, kao drugi tip citoskeleta koji sudjeluju u migraciji, također imaju ulogu u procesu EMT tijekom kojeg dolazi do promjene u njihovoj organizaciji. Tijekom procesa EMT dolazi do smanjene aktivnosti enzima tubulin tirozinske ligaze što za posljedicu ima nakupljanje detiroziniranog α tubulina koji je ključan za stvaranje membranskih izbočina - mikrotentakula. Mikrotubuli su u stanicama koje prolaze proces EMT uglavnom koncentrirani u membraniskim izbočinama - protruzijama, koje

omogućuju pokretanje stanica, dok u normalnim stanicama imaju uniformnu raspodjelu u citoplazmi (Sun *i sur*, 2015). Intermedijarni filamenti pokazuju velike promjene u strukturi tijekom EMT. Epitelne stanice koje normalno eksprimiraju različite tipove keratina počinju eksprimirati velike količine vimentina, inače poznatog markera mezenhimskih stanica (Mendez *i sur*, 2010). U stanicama koje miruju vimentin je bitan za održavanje oblika dok je u pokretnim, migrirajućim stanicama uključen u vrlo dinamičnu remodelaciju citoskeleta (Sun *i sur*, 2015).

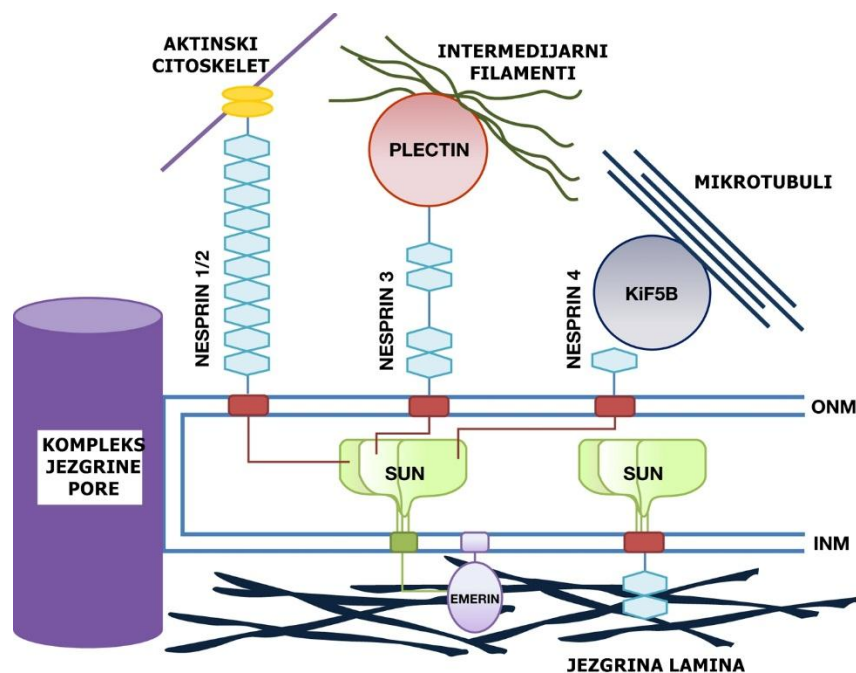
1.2 Kompleks LINC

Fizička veza između jezgre i citoskeleta važna je za mnoge stanične procese koji zahtijevaju koordinirano kretanje i pozicioniranje jezgre. Povezanost jezgre i citoskeleta ne održava samo prostorni i strukturni integritet nego služi i prijenosu mehaničkih podražaja od izvanstaničnog okoliša, preko citoskeleta, jezgrine ovojnice pa sve do kromatina čija se struktura može mijenjati ovisno o podražaju (Brosig *i sur*, 2010; Lombardi *i sur*; 2011, Uzer *i sur*, 2016). Mehaničke sile koje djeluju na stanicu su važni regulatori procesa poput razvoja tkiva, rasta, homeostaze i mogu imati važnu ulogu u usmjeravanju diferencijacije stanica (Driscoll *i sur*, 2015). Mehaničke sile ne utječu samo na oblik i čvrstoću jezgre već i na ekspresiju gena (Liu *i sur*, 2016).

Citoskelet je fizički povezan s jezgrom preko proteina jezgrine membrane tj. kompleksa LINC (engl. *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*). LINC kompleks se sastoji od proteina SUN u unutrašnjoj jezgrinoj membrani i proteina nesprina (engl. *nuclear envelope spectrin repeat proteins*) koji sadrže domenu KASH i smješteni su u vanjskoj jezgrinoj membrani (Ketema i Sonnenberg, 2011; Liu *i sur*, 2016). Proteini SUN vežu jezgrinu laminu, dok citoplazmatski krajevi nesprina mogu vezati signalne molekule i sva tri tipa citoskeletnih elemenata (Alam *i sur*, 2014; Chang *i sur*, 2015). Domene SUN i KASH ostvaruju fizičku interakciju u perinuklearnom prostoru i na taj način tvore most koji povezuje jezgru i citoplazmu (Morgan *i sur*, 2011, Roux *i sur*, 2009).

Nesprini su evolucijski očuvani proteini koji imaju N-terminalnu domenu bogatu spektrinskim ponavljanjima i može sadržavati specifične motive, te C-terminalnu domenu KASH. Do danas su u sisavcima otkrivena četiri gena (SYNE 1-4) koji kodiraju za četiri različita nesprina. Nesprini 1, 2 i 3 imaju više izoformi zbog različitog prekrajanja i različitih

mjesta inicijacije transkripcije (Liu *i sur*, 2016, Mellad *i sur*, 2011). Nesprini 1 i 2 sadrže N-terminalnu domenu koja veže aktin te im omogućuje interakciju s aktinskim filamentima. Pomoću domene bogate spektrinskim ponavljanjima stupaju u interakciju s molekularnim motorima dineinom i kinezinom te se tako vezuju s mikrotubulima (Lombardi *i sur*, 2011; Tremblay *i sur*, 2013). Nesprin 3 posreduje u interakciji s intermedijarnim filamentima vezivanjem za citoskeletalni protein plectin, dok nesprin 4 veže motorni protein kinezin i tako povezuje jezgrinu ovojnicu s mikrotubulima (Ketema i Sonnenberg, 2011) (Slika 7).



Slika 7. Nesprini povezuju jezgrin skelet s komponentama citoskeleta. Komplex LINC koji se sastoji od proteina SUN u unutarnjoj jezgrinoj membrani i proteina nesprina s domenom KASH smještenih u vanjskoj jezgrinoj membrani. Nesprini 1 i 2 povezuju jezgrin citoskelet s aktinskim filamentima. Nesprin 3 preko posredničkog proteina plectina veže intermedijarne filamente dok nesprin 4 preko motornog proteina kinezina veže mikortubule (preuzeto i prilagođeno prema: Rajgor *i sur*, 2013).

Veza između jezgre i citoskeleta bitna je kod prijenosa mehaničkih sila koje podržavaju različite stanične procese. Nesprin 1 i nesprin 2 imaju važnu ulogu u reguliranju staničnog oblika i migraciji (King *i sur*, 2014). Nedostatak nesprina 1 i 2 uzrokuje povećanje broja fokalnih adhezija i usporavanje migracije jezgre i cijele stanice što dovodi do poremećaja u neurogenezi i neuralnoj migraciji (Chancellory *i sur*, 2010; Liu *i sur*, 2016; Rajgor i Shanahan, 2013). Nesprin 2 i 4 imaju ulogu u pozicioniranju jezgre čiji je smještaj izuzetno bitan tijekom staničnih procesa i razvoja (Starr i Fridolfsson, 2014; Roux *i sur*, 2009). Osim pozicioniranja jezgre nesprini organiziraju i komponente citoplazme, tako nesprin 4 diktira pravilan smještaj centrosoma i Golgijevog aparata prema jezgri, dok nesprin 3 ima ulogu u organizaciji perinuklearnog citoskeleta i njegovo utišavanje dramatično utječe na oblik stanice (Mellad *i sur*, 2011; Morgan *i sur*, 2011). Nesprini kompleksa LINC pored strukturnih i mehaničkih uloga sudjeluju i u prijenosu signala - nesprin 2 vežući α i β katenin na jezgrinu ovojnica regulira signalni put Wnt (Neumann *i sur*, 2010). Nesprini imaju ulogu u uspostavljanju stanične polarnosti te u diferencijaciji stanica pri čemu mijenjaju razinu ekspresije (Rajgor i Shanahan, 2013; Ketema i Sonnenberg, 2011).

Kompleks LINC je potreban za normalnu funkciju stanica, njegova povezanost s citoskeletnim elementima omogućuje da čitava stanica, citoskelet i jezgra funkcioniraju kao uigrani mehanički sustav. Poremećaj kompleksa LINC nepovoljno utječe na proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i može dovesti do raznih neuroloških, mišićnih i kožnih poremećaja te do preranog starenja (Starr i Fridolfsson, 2014).

1.3 Cilj istraživanja

Jedna od karakteristika stanica koje prolaze diferencijaciju jest promjena oblika koja ovisi o citoskeletu, stoga je organizacija citoskeleta jedan od ključnih koraka u procesu diferencijacije. Cilj ovog rada je istražiti na koji način promjene ekspresije pojedinih komponenti citoskeleta ili narušavanje njegove strukture utječu na rast tkiva i diferencijaciju stanica. Epitelne stanice distalnog bubrega (stanična linija MDCK II) poslužile su kao model jer prolaze proces diferencijacije ukoliko se nasade u obliku kružne kolonije. Rezultat diferencijacije su dvije populacije stanica: manje, gusto pakirane stanice u sredini kolonije i veće, pokretljivije stanice na rubu kružne kolonije. Cilj je također bio ispitati ekspresiju

citoskeletnih i adhezijskih proteina u tim dvjema populacijama zbog uloge citoskeleta u staničnoj diferencijaciji. Ispitat ću i ekspresiju proteina, nesprina, koji povezuju jezgrin skelet s citoskeletom jer pretpostavljam da su odgovorni za brzu prilagodbu oblika stanice uvjetima okoline.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali

2.1.1 Osnovne kemikalije, reagensi, supstrati

1. medij MEM (engl. *Minimum essential media*) (Merck Milipore, SAD)
2. Serum govedeg fetusa (FBS, engl. *Fetal calf serum*) (Sigma, SAD)
3. L-glutamin (Sigma, SAD)
4. Antibiotik: penicilin, streptomycin (Sigma, SAD)
5. Tripsin (Sigma, SAD)
6. EDTA (Sigma, SAD)
7. Kolagen (Corning® Collagen I, Discovery Labware Inc.)
8. Octena kiselina (Kemika)
9. Latrunkulin B (Sigma, SAD)
10. Kolhicin (Sigma, SAD)
11. *Lipofectamine* RNAiMAX (Invitrogen, SAD)
12. medij Opti-MEM (ThermoFisherScientific, SAD)
13. Inhibitori fosfataza (Sigma, SAD)
14. Inhibitori proteaza (Sigma, SAD)
15. Qubit ® Protein *Reagent* (ThermoFisherScientific, SAD)
16. Qubit ® Protein pufer (ThermoFisherScientific, SAD)
17. Izopropanol (Kemika)
18. Metanol (Kemika)
19. Mlijeko u prahu (Milchpulver, Blotting grade)
20. Kemiluminiscentni reagens: Western Lightning Chemiluminisence Reagent Plus (PerkinElmer Inc.), SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (ThermoFischerScientific, SAD)
21. Qubit TM RNA *Reagent* (ThermoFisherScientific, SAD)
22. Qubit TM RNA HS *Assay kit* (ThermoFisherScientific, SAD)
23. Agaroza (Sigma, SAD)
24. Tween® 20 (Sigma, SAD)

2.1.2 Pufferi i njihova priprema

1. Fosfatni puffer (PBS, engl. Phosphate buffer saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄

2. Puffer za lizu stanica- RIPA (engl. *radio-immunoprecipitation assay*)

- 50 mM Tris-Cl pH 7.6 10ml 1.5 M
 - 150 mM NaCl 0.87g
 - 1% NP-40 1ml
 - 0.5% Na-deoxycholate 0.5g
 - 0.1% SDS 1ml 10%
-
- - 1 tableta inhibitora fosfataza - Complete MINI (Roche) dH₂O do 10 ml

3. Puffer za nanošenje na gel (engl. *loading buffer*, LB):

- 1,2 g SDS
- 6 mg Bromphenol Blue
- 4,7 ml glicerol
- 1,2 ml 0,5 M puffer Tris pH 6,8
- 0,75 ml β-merkaptotanol
- dH₂O do 10 ml

4. Puffer za elektroforezu (engl. *running buffer*):

- 3,03 g/L Tris base
- 14,4 g/L glicin
- 1 g/L SDS
- dH₂O do volumena od 1 L

5. Puffer za prijenos (engl. *transfer buffer*)

- 2,4 g Tris base

- 11,2 g glicin
- 200 ml metanol
- dH₂O do volumena od 1 L (pH 8.1-8.4)

6. Pufer za ispiranje membrane TBS-T (engl. *Tris buffered saline- Tween*)

- 2,4 g Tris base
- 8,8, g NaCl
- 1 ml Tween 20
- dH₂O do volumena 1 L (pH 7,6)

7. TAE pufer (pufer za elektorforezu u agaroznom gelu, engl. *Tris-acetate-EDTA buffer*)

- 4,84 g Tris base
- 1,142 ml octena kiselina
- 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ili
- 40 mM Tris (pH 7.6)
- 20 mM octena kiselina
- 1 mM EDTA

8. Otopina za odbojavanje

- 200 ml metanol
- 75 ml octena kiselina
- dH₂O do volumena 1 L

2.1.3 Boje i markeri molekularnih masa

1. DNA standard *Quick load 2-log DNA Ladder* (0.1-100 kb) (New England, Biolabs Inc.)

2. Proteinski standard *Page Ruller™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, SAD)

3. Naftolno modriilo (Sigma, SAD)
4. Etidij bromid (Sigma, SAD)

2.1.4 Komercijalni setovi kemikalija

1. High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
2. Quick-RNA™ Mini Prep (Zymo Research)
3. ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB)
4. EmeraldAmp Max PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)

2.1.5 Antitijela

Tablica 1. Primarna antitijela korištena u analizi Western blot

	molekularna masa	organizam domaćin	razrjeđenje	proizvođač	
E kadherin	120 kDa	miš	1:1000	BD	
β tubulin	50	zec	1:10000	Abcam	
vimentin	57	miš	1:1000	Santa Cruz	
aktin	42	miš	1:2500	Santa Cruz	
eIF2α	38	zec	1:1000	BD	
p- eIF2α	38	zec	1:1000	BD	
β katenin	88	miš	1:1000	sigma c7207	
vinkulin	117	miš	1:1000	sc-73614	

Tablica 2. Sekundarna antitijela korištena u analizi Western blot

	razrjeđenje	proizvođač
anti- mouse	1:10000	BD
anti- rabbit	1:10000	BD

2.1.6 Početnice za lančanu reakciju polimerazom, PCR

Tablica 3. Početnice korištene u lančanoj reakciji polimerazom

početnica	Sekvenca (5'-3')
SYNE1_F	ACAAAGTCCCCACTGACCTG
SYNE1_R	CCTCTGCAGGAAGTGTCTCC
SYNE2_F	TTTCACCAACCAAAGGGAAG
SYNE2_R	ACCAGGTGACAAAGGGACTG
SYNE3_F	GCTGAGCCTCATCAGAAACC
SYNE3_R	GCAGGTAGCCAGAGTCCTTG
SYNE4_F	TCCAGGTTCCACTGGTAAGG
SYNE4_R	TCAGCCTCCAATACCTCCTG
ACTB_F	TGCGTGACATCAAGGAGAAG
ACTB_R	ACATTTGCTGGAAGGTGGAC

2.1.7 Male interferirajuće RNA molekule (siRNA)

Za utišavanje ekspresije intermedijarnog filamena vimentina koristili smo tehnologiju koja se zasniva na specifičnoj razgradnji ciljane glasničke RNA - mRNA malim interferirajućim molekulama siRNA (engl. *small interfering RNA*) što za posljedicu ima smanjenje ekspresije gena. Prvi korak u dizajnu molekula siRNA je pronaći sljedove od 21

nukleotida unutar mRNA ciljnog gena koji počinje s dinukleotidom AA. Prilikom odabira ciljnih mjesta u sekvenci treba paziti da sadržaj GC nukleotida na tim mjestima bude 30-50% i treba izbjegavati dijelove s četiri uzastopna A ili T nukleotida. Koristili smo dvije različite molekule siRNA (engl. *small interfering RNA*) i pripadajuće kontrole C 9-11 kontrole (GE Healthcare Europe Gmb). Kontrole C 9-11 imaju isti slijed kao i siRNA osim baza koje se nalaze na poziciji 9, 10 i 11. Te promjene onemogućuju cijepanje ciljane mRNA, ali zadržavaju potencijal nespecifičnog vezanja mRNA. Upotreba dvije molekule siRNA također omogućuje bolju kontrolu mogućeg učinka nespecifičnog vezanja. Liofilizirane molekule siRNA otopili smo u vodi slobodnoj od nukleaza, nfH_2O (engl. *nuclease free*) tako da konačna koncentracija bude 10 μM .

Tablica 4. Molekule siRNA korištene za transfekciju

	Sekvenca
siRNA 1 sense	5' CCAUCAACACCGAGUUCAAUU 3'
siRNA 1 antisense	5' UUGAACUCGGUGUUGAUGGCG 3'
siRNA 2 sense	5' GGAGAUGCUUCAGAGAGAGUU 3'
siRNA 2 antisense	5' CUCUCUCUGAAGCAUCUCCUC 3'
siRNA 1 ctrl sense	5' CCA UCA AC CUC GAG UUC AA UU 3'
siRNA 1 ctrl antisense	3' gc GGU AGU UG GAG CUC AAG UU 5'
siRNA 2 ctrl sense	5' GG AGA UGC CAA AG AGA GAG UU 3'
siRNA 2 ctrl antisense	3' cU CC UCU ACG GUU UC UCU CUC 5'

2.1.8 Stanična linija

U istraživanju su korištene imortalizirane stanice epitela distalnog dijela bubrega MDCK II (Madin-Darby canine kidney epithelial cell) (DSMZ, Germany).

2.2 Metode

2.2.1 Stanična kultura

Stanice su uzgajane u hranjivom mediju MEM uz dodatak 5% goveđeg fetalnog seruma, aminokiseline L-glutamin i antibiotika penicilin/streptomycin na 37°C i pri 5% CO₂ u plastičnim bocama (T75, TPP) za uzgoj stanica. Rast stanica se pratio pod invertnim svjetlosnim mikroskopom. Stanice su presađivane kada su postigle 80% konfluentnosti. Stanicama se ukloni medij, isperu se PBS-om te se doda otopina tripsin-EDTA koncentracije 0,4 mM. Otopina tripsin-EDTA je ostavljena da djeluje 1-10 min pri sobnoj temperaturi, nakon čega je uklonjena, a stanice su stavljene u inkubator (37°C) još nekoliko minuta. Djelovanje tripsina je inaktivirano dodatkom medija. Tripsin je enzim koji cijepa peptidne lance iza aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom i tako omogućuje odvajanje stanica od podloge. EDTA djeluje kao kelator, veže metalne ione poput kalcijevih iona koji su potrebni integrinima za adheziju/povezivanje stanica i tako omogućuje lakše odvajanje stanica. Stanice su izbrojane u Neubauerovoj komorici (Heinz Herenz Hamburg) te su nasadiivane u pločicama sa šest bunarića za uzgoj stanica (engl. *6 well plate*). Prije nasadiivanja stanica u bunariće su stavljena stakalca za mikroskopiranje oprana u etanolu i isprana vodom. U bunarić je dodano 1.5 ml otopine kolagena (20 µg kolagena po cm² (Corning® Collagen I, Discovery Labware Inc.) u 0,05 M octenoj kiselini. Kolagen iz otopine se deponirao 1 h pri sobnoj temperaturi, nakon čega su bunarići tri puta isprani destiliranom vodom i ostavljeni da se osuše. Stanice su nasadiivane kao kružne kolonije u konačnoj koncentraciji 30000 st/ 40 µl. Nakon 30 min u inkubatoru (da se stanice prihvate za podlogu) uklonjen je medij, stanice su isprane s malo medija MEM te je dodan 1.5 ml svježeg medija MEM i stanice su vraćene u inkubator.

2.2.2 Tretmani u kulturi

Stanice u kulturi su tretirane spojevima koji se specifično vežu za pojedina vlakna citoskeleta te sprječavaju njihovu polimerizaciju.

2.2.2.1 Tretman toksinima latrunkulinom b i kolhicinom

Kolhicin je biljni alkaloid koji se veže za monomere tubulina i tako inhibira polimerizaciju mikrotubula. Stanice su nasadene na isti način kako je opisano u poglavlju 2.2.1. 72 h nakon nasadivanja stanicama se promijenio medij i dodan je 1 ml svježeg medija u koji je prethodno dodano 100 μ l matične otopine kolhicina (10 mM) tako da konačna koncentracija kolhicina bude 1 mM. Isti postupak je ponovljen i za tretman s latrunkulinom b. Latrunkulin b je toksin izoliran iz morske spužve koji sprječava polimerizaciju monomera aktina. U 1 ml svježeg medija je dodano 10 μ l matične otopine latrunkulina b (10 mM), stoga je konačna koncentracija bila 100 μ M. Nakon tretmana stanice su vraćene u inkubator. Tretman je trajao 45 min.

2.2.2.2 Transfekcija malih interferirajućih RNA molekula (siRNA)

Stanice su transficirane malim interferirajućim molekulama siRNA (engl. *small interfering RNA*) kako bi se smanjila ekspresija gena za intermedijarni filament vimentin. Za transfekciju je korišten komercijalno dostupan transfekcijski reagens Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) i pripadajući protokol. Lipofectamine omogućava siRNA molekulama prolazak kroz staničnu membranu u obliku liposoma. Stanice su nasadene na isti način kako je opisano u poglavlju 2.2.1. Prije transfekcije stanice su isprane s malo medija i dodan je 1 ml medija MEM bez antibiotika u koji je zatim dodana transfekcijska smjesa. Transfekcijska smjesa se sastojala od dvije otopine (sastav otopina u Tablici 5). Otopine su pomiješane u omjeru 1:1 i ostavljene 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije cijeli volumen transfekcijske smjese je pažljivo dodan kružnim pokretima u odgovarajući bunarić. Po završetku tretmana stanice su vraćene u inkubator 48h.

Tablica 5. Priprema otopina za tretiranje sa siRNA

Smjesa 1	siRNA	Optimem
	1,2 μ l	98,8 μ l
Smjesa 2	RNAiMAX	Optimem
	2 μ l	98 μ l

2.2.3 Priprema staničnih lizata

Sedamdeset dva sata nakon nasadivanja stanica u obliku kružnih kolonija može se vrlo dobro razlikovati unutarnji, gušći sloj sačasto poslaganih manjih stanica koje čvrsto prijanjaju za podlogu te vanjski, rjeđi sloj većih stanica koji pojačano proliferira i slabije prijanja za podlogu (kolagenom prekriveno mikroskopsko stakalce). Stanice su skupljane nakon 72 h, 96 h, 120 h. Stanicama je uklonjen medij i isprane su PBS-om. U svaki bunarić dodano je 800 µl tripsina, stanice su stavljene u inkubator 6-8 min nakon čega su skupljene stanice rubnog/vanjskog dijela klastera. Nakon skupljanja stanica rubnog dijela isti postupak je ponovljen za skupljanje stanica u sredini klastera kojima treba dulji tretman tripsinom kako bi se odvojile od podloge. Stanice rubnog dijela i sredine klastera su skupljene u zasebne plastične epruvete u koje je prethodno dodan medij kako sam tripsin ne bi doveo do stanične smrti. Epruvete su potom centrifugirane pri brzini 400/350 rfc, 10 min (Eppendorf), nakon centrifugiranja supernatant je pažljivo uklonjen. Talog je dobro resuspendiran u 500 µl PBS-a te je prebačen u malu epruvetu od 1.5 ml koja je centrifugirana pri brzini 400 rfc, 5 min. Postupak ispiranja PBS-om je ponovljen dva puta. Talog je spremljen u zamrzivač na -20°C.

2.2.4 Analiza ekspresije proteina metodom Western blot

2.2.4.1 Priprema uzoraka za analizu Western blot

Pripremljeni talozi su resuspendirani na ledu u puferu RIPA (engl. *radio-immunoprecipitation assay*) u koji su dodani inhibitori proteaza i fosfataza te su inkubirani 30 min na ledu. Nakon inkubacije na ledu stanice su dodatno lizirane pomoću sonikatora (Bioruptor®Plus, Diagenode) 7 ciklusa od 30 s (uz 30 s pauze među ciklusima) pri +4°C. Uzorci su zatim centrifugirani na 21130 rfc, 30 min u ohlađenoj centrifugi na +4°C kako bi se istaložili stanični ostatci nakon razbijanja stanica. Supernatant, u kojem se nalaze proteini, je sakupljen u nove epruvete od 1.5 ml. Cijeli postupak se radi na ledu kako se proteini ne bi razgradili.

2.2.4.2 Određivanje koncentracije proteina u staničom lizatu

Koncentracija proteina je određena pomoću fluorimetra Qubit 3 (Invitrogen) i njemu pripadajućeg protokola. Fluorimetar QubitTM 3.0 nova je generacija stolnih fluorimetra koji precizno mjere DNA, RNA i proteine koristeći osjetljiv Qubit kvantitativni test. Koncentracije ciljane molekule u uzorku određuje se pomoću fluorescentne boje koja emitira signal samo kada se veže na ciljnu molekulu, što smanjuje učinke onečišćenja-pozadinskog signala, kao što su degradirana RNA, DNA, na rezultate mjerenja. Ovaj sustav je osjetljiviji od kvantifikacije UV apsorpcije jer detektira ciljno specifičnu fluorescenciju, što ga čini dobrim za uzorke u niskim koncentracijama. Za potrebe mjerenja uzorci su razrijeđeni s dH₂O u omjeru 1:10. Pripremljena je radna otopina razrjeđivanjem Qubit[®] Protein Reagent u Qubit[®] Protein puferu u omjeru 1:200. Uzorci za mjerenje su pripremljeni prema Tablici 6. Prije mjerenja uzorci su kratko i snažno pomiješani na mješaatici (vortex). Nakon inkubacije od 15 min pri sobnoj temperaturi izmjerena je koncentracija proteina (izražena u mg/ml).

Tablica 6. Priprema otopina za određivanje koncentracije proteina

volumen	standardi	uzorci
radna otopina	190 μ l	199 μ l
standard	10 μ l	-
uzorak	-	1 μ l
ukupan volumen	200 μ l	200 μ l

Nakon mjerenja u uzorke je dodan 6x koncentriran pufer za nanošenje uzoraka na gel i dH₂O kako bi se SDS vezao na proteine te proteini dobili negativni naboj. Uzorci su potom stavljeni u termoblok (Eppendorf Thermomix) 5 min na 99°C. Količina proteina prije analize je u svim uzorcima bila jednaka. Uzorci su pohranjeni u zamrzivač na -20°C.

2.2.4.3 Denaturirajuća elektorforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteini su razdvojeni vertikalnom denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis*) koristeći komercijalni sustav za elektroforezu (Biorad). U denaturirajućoj elektroforezi u poliakrilamidnom gelu denaturacija se postiže dodatkom anionskog deterdženta SDS-a, a pospješuje se zagrijavanjem uzoraka u puferu za nanošenje čiji agensi razbijaju sekundarnu, tercijarnu i kvartarnu strukturu proteina. Proteini se denaturiraju (lineariziraju) i oblažu SDS-om čime svi proteini postaju negativno nabijeni pa se razdvajanje u električnom polju ostvaruje samo na temelju razlike u njihovoj veličini. Pripremljen je donji gel (Tablica 7.) za razdvajanje koji je izliven između dviju staklenih pločica debljine 1.5 mm. Na izliveni gel je dodan 1 ml izopropanola te su ostavljeni da polimeriziraju oko 45 min. Nakon što su gelovi polimerizirali, izopropanol je uklonjen te su gelovi isprani vodom kako bi se uklonili ostatci izopropanola. Nakon toga pripremljen je gornji sabijajući gel (Tablica 7.) koji je izliven na donji gel i u koji je umetnut češljic.

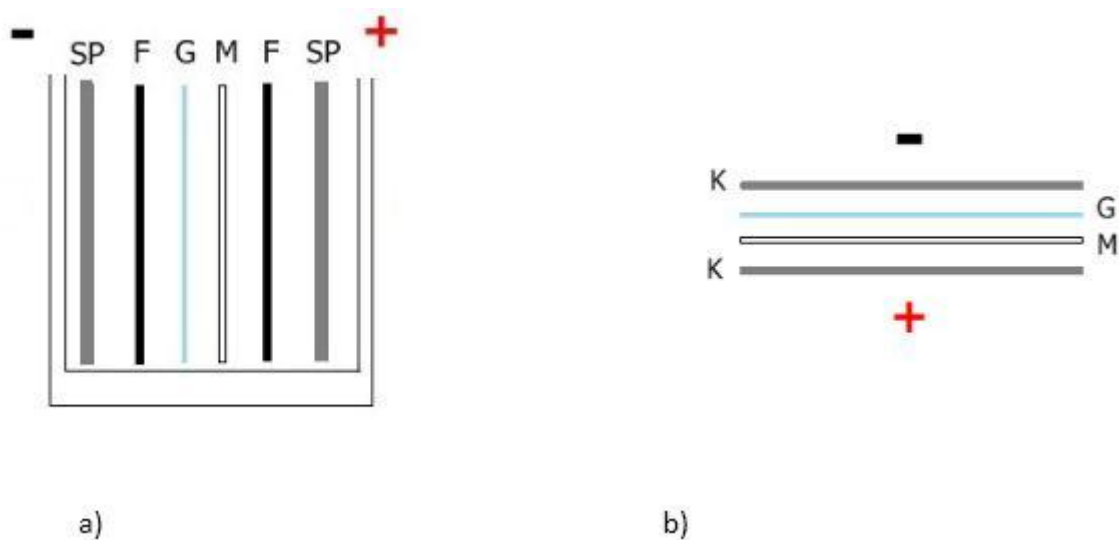
Tablica 7. Sastav gelova za razdvajanje (10%, 8%) i sabijanje (5%)

Komponente gelova	10%-tni gel (15 ml)	8%-tni gel (15 ml)	5%-tni gel (5 ml)
dH ₂ O	5.3 ml	6.9 ml	3.4 ml
30% AA	2.0 ml	4.0 ml	0.83 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	3.8 ml	-
1.5 M Tris (pH 6.8)	-	-	0.63ml
10% SDS	0.1 ml	0.15 ml	0.05 ml
10% APS	0.1 ml	0.15 ml	0.05 ml
TEMED	0.0008 ml	0.010 ml	0.005 ml

Uzorci su nanoseni u odgovarajuće jažice, a u prvu jažicu je nanoseno 3 μ l proteinskog markera poznate molekulske mase. Elektorforeza se odvijala pri konstantnom naponu struje u puferu za elektorforezu. Prvih 10 min elektorforeza je tekla pri 100 V, a nakon što su uzorci prešli u gel za razdvajanje napon je povećan na 200 V te je razdvajanje trajalo oko 50 min.

2.2.4.4 Prijenos proteina na membranu

Nakon što su proteini razdvojeni elektorforezom u poliakrilamidnom gelu preneseni su na nitroceluloznu membranu FluoroTrans (Carl Roth GmbH+Co.KG) koja je prethodno natopljena u puferu za prijenos. Prema shemi (Slika 8.) u puferu za prijenos se složio tzv. *sandwich*. Prijenos proteina s gela na membranu se odvija metodom „mokrog“ prijenosa (engl. *wet blotting*) ili brzim transferom. Prijenos proteina metodom mokrog prijenosa se odvija 60 min pri stalnoj jakosti struje od 200 mA. Brzi transfer je trajao 7 min, 1.3 A, 25 V u uređaju Trans-Blot Turbo (Biorad). Nakon prijenosa membrana je stavljena u naftolno modrilo, 5 min na horizontalnoj miješalici kako bi se obojila i kako bi se provjerila uspješnost prijenosa. Nakon bojanja membrana je kratko stavljena na tresilicu u otopinu za odbojavanje.



Slika 8. Prikaz tzv. *sandwich-a* za Western blot. a) mokri prijenos: SP-spužvica, F- filter papir, G-gel, M-membrana b) brzi prijenos: K-krpice (7 kom), G- gel, M-membrana. Minus predstavlja katodu a plus anodu. Proteini se kreću od katode prema anodi.

2.2.4.5 Vežanje antitijela

Prije inkubacije s primarnim antitijelima membrana je isprana u puferu TBS-T. Blokiranje i inkubacija membrane s primarnim antitijelima su napravljeni u istom koraku. Primarna antitijela su pripremljena u puferu za blokiranje koji se sastoji od 5% mlijeka u prahu (Carl Roth GmbH+Co.KG) otopljenog u puferu TBS-T. Membrane su inkubirane preko noći

na + 4°C na horizontalnoj miješalici, u otopini primarnih antitijela. Korištena primarna antitijela i njihova razrjeđenja su navedena u Tablici 1. u poglavlju Materijali.

Sljedeći dan, nakon preko noćne inkubacije u primarnim antitijelima, membrane su isprane tri puta po 10 min u TBST puferu na horizontalnoj miješalici. Zatim su membrane inkubirane 60 min u otopini određenog sekundarnog antitijela koje je obilježeno peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP). Sekundarna antitijela te njihova razrjeđenja se nalaze u Tablici 2. u poglavlju Materijali. Nakon inkubacije membrane sa sekundarnim antitijelom ponovljen je postupak ispiranja u puferu TBS-T.

2.2.4.6 Detekcija proteina na membrani kemiluminiscencijom

Obilježena sekundarna antitijela koja su se vezala na membranu su detektirana pomoću dva kemiluminiscentna reagensa. Western Lighting Chemiluminisence Reagent Plus (PerkinElmer Inc.) je korišten za detekciju proteina koji su u velikoj količini prisutni u stanici dok je za detekciju manje količine proteina bio potreban osjetljiviji supstrat, SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (ThermoFischerScientific). Princip reakcije se temelji na oksidaciji supstrata luminola preoksidazom pri čemu dolazi do emisije svjetla na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna antitijela. Oba reagensa su pripremljena prema uputama proizvođača, miješanjem dviju otopina u omjeru 1:1. Otopina supstrata je direktno dodana na membranu. Nakon inkubacije 5 min na sobnoj temperaturi membrana je stavljena u prozirnu foliju. Signali s membrane su detektirani i analizirani na uređaju Uvitec Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

2.2.5 Izolacija RNA

Iz staničnih lizata različito tretiranih modelnih tkiva čija je priprema opisana u poglavlju 2.2.3. izolirana je RNA prema standardnom protokolu dobivenom u setu za izolaciju RNA (*High Pure RNA Isolation Kit*, Roche, *Quick-RNATM MiniPrep*, Zymo Reserch). Prije postupka izolacije sve površine i pribor su prebrisane s otopinom *RNAse away*. Stanični talog je resuspendiran u 200 µl PBS-a, zatim je dodano 400 µl pufera za lizu i vorteksirano 15 s. Cijeli uzorak je stavljen u kolonicu i centrifugiran 15 s na 8000 g nakon čega je uklonjen tekući dio. Na kolonicu je dodano 100 µl smjese *DNase* inkubacijskog pufera (90 µl) i *DNase I* (10 µl) i

inkubirano 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodano je 500 μ l pufera za ispiranje I na kolonicu i centrifugirano 15 s na 8000 g, nakon čega je uklonjen tekući dio. Isti postupak je ponovljen dva puta s puferom za ispiranje II, a zadnji put je centrifugirano 2 min na 13000g. Na kolonicu je dodano 50 μ l elucijskog pufera i centrifugirano 1 min na 8000 g. U sterilnoj epruvetici se sakupila RNA koja je pohranjena na -80°C .

2.2.6 Određivanje koncentracije izolirane RNA

Koncentracija izolirane RNA određena je fluorometrom Qubit 3. Postupak je isti kao i za određivanje koncentracije proteina koji je opisan u poglavlju 2.2.4.2. Razlika je u korištenim kemikalijama i programu koji je namješten za RNA. Radna otopina je pripremljena miješanjem reagensa *QubitTM RNA Reagent* s puferom *QubitTM RNA HS*. Nakon inkubacije od 2 min na sobnoj temperaturi je izmjerena koncentracija RNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$).

2.2.7 Reverzna transkripcija

Izolirana RNA je reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNA (engl. *cDNA*, *complementary DNA*). Reverzna transkripcija provedena je prema modificiranom protokolu iz seta *ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit* (NEB). Ukupan volumen reakcije je bio 40 μl , a volumen RNA je određen prema izmjerenim koncentracijama, kako bi svi uzorci imali istu količinu RNA prije reverzne transkripcije. Prva reakcijska smjesa je sadržavala izračunati volumen RNA i H_2O te 4 μl početnica oligo-dT ($(\text{d}(\text{T})_{23}\text{VN})$). Druga reakcijska smjesa se sastojala od 20 μl reakcijske smjese M-MuLV (reverzna transkriptaza M-MuLV i inhibitor RNaza) i 4 μl M-MuLV smjese dNTPs i pufera. Prva smjesa je stavljena 5 min na 70°C . Nakon denaturacije RNA u uzorke je dodana druga reakcijska smjesa. Program za reverznu transkripciju se nalazi u Tablici 8. Nakon reverzne transkripcije, u svaki uzorak je dodano 60 μl H_2O (engl. *nuclease free*). Produkti reakcije pohranjeni su na -20°C .

Tablica 8. Program za reverznu transkripciju za uređaj PCR

	Korak 1	Korak 2
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	42	80
Vrijeme (min)	60	5

2.2.8 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Metodom PCR analizirana je ekspresija gena za proteine nesprine (SYNE1, SYNE2, SYNE3, SYNE4) koji povezuju jezgrinu ovojnicu sa staničnim skeletom. Kao kalup za ovu reakciju je poslužila cDNA koja je dobivena reverznom transkripcijom izolirane RNA. Za lančanu reakciju polimerazom korištena je komercijalno dostupna smjesa *EmeraldAmp Max PCR Master Mix* (TaKaRa Bio Inc.) te ciljano dizajnirane početnice za gene *SYNE 1*, *SYNE2*, *SYNE3*, *SYNE4* (Tablica 3). Kao kontrola uspješnosti reverzne transkripcije umnožen je gen za aktin B, koji se u svim uvjetima rasta stanica jednako eksprimira. Sastav reakcijskih smjesa se nalazi u Tablici 8. Nakon pripreme, reakcijske smjese su kratko vorteksirane i centrifugirane. Ukupan volumen za jednu reakciju je bio 12,5 μ l. Reakcija PCR se odvijala pri uvjetima koji se nalaze u Tablici 10. Produkti reakcije su pohranjeni na + 4°C.

Tablica 9. Reakcijska smjesa za jedan uzorak

	za nesprine	za aktin
sastojak	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)
smjesa Emerald	6,25	6,25
parovi početnica (F+R) (5 μM)	0,5	0,5
cDNA	2,5	1,0
nf H₂O	3,25	4,75
ukupni volumen reakcije	12,5	12,5

Tablica 10. Uvjeti reakcije PCR (PCR program)

	temperatura	vrijeme	
početna denaturacija	98°C	10s	
denaturacija	98°C	10s	35x
sparivanje početnica	55°C	30s	

elongacija	72°C	25s	
završna sinteza/elongacija	72°C	5 min	
	4°C	∞	

2.2.9 Touchdown PCR

Touchdown PCR je metoda za povećavanje specifičnosti PCR reakcije. To je izmijenjena metoda PCR u kojoj početnice izbjegavaju umnažanje nespecifičnih sekvenci tako što se koristi ciklički program u kojem se temperatura sparivanja početnica postepeno snižava (npr. 1-2 °C/ svaki ciklus). Početna temperatura sparivanja je nekoliko stupnjeva viša od procijenjene T_m početnica. Temperatura se postepeno smanjuje dok ne dosegne izračunatu temperaturu sparivanja početnice ili nekoliko stupnjeva nižu. Umnažanje se zatim nastavlja pri toj temperaturi. Za ovaj postupak reakcijske smjese su pripremljene kao u poglavlju 2.2.8. Reakcija se odvijala u uređaju *TProfessional Thermocycler* (Biometra) pri uvjetima koji su navedeni u Tablici 11.

Tablica 11. Uvjeti „*touchdown*“ PCR

	temperatura	vrijeme	
početna denaturacija	98°C	10s	
denaturacija	98°C	10s	10x
sparivanje početnica	65°C*	30s	
elongacija	72°C	25s	
denaturacija	98°C	10s	35x
sparivanje početnica	55°C	30s	
elongacija	72°C	25s	
završna sinteza	72°C	5 min	
	4°C	∞	

*temperatura sparivanja početnica se smanjivala za 1 stupanj po ciklusu

2.2.10 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Uspješnost umnažanja odsječaka DNA metodom PCR provjerena je horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu. Pripremljen je 2 % gel. Agaroz je otopljen zagrijavanjem u puferu TAE. Nakon što se smjesa malo ohladila dodano je 5 μ l etidij bromida (EtBr od engl. *ethidium bromide*), boje koja se interkalira u dvolančanu molekulu DNA te u kompleksu s DNA emitira svjetlost u UV dijelu spektra. Otopljen agaroz je izlivena u kadnicu za elektroforezu u koju su prethodno stavljene češljice. Nakon što je gel polimerizirao nanoseni su uzorci kao i 1 μ l molekularnog biljega/DNA standarda prema kojem je određena veličina umnoženog DNA odsjeka. Elektroforeza se odvijala pri stalnom naponu od 129 V, 25 / 50 min u komercijalnom sustavu za elektroforezu (Biorad). Dobivene vrpce DNA na gelu su vizualizirane na uređaju Uvitec (Uvitec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo).

2.2.11 Mikroskopiranje i obrada slika

Stanice su promatrane pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Olympus, Japan) koji omogućava vizualizaciju različito diferenciranih stanica i morfologiju rastućeg tkiva. Naime, fazni kontrast nastaje prolaskom dvije paralelne zrake svjetlosti kroz preparat od kojih je jedna pomaknuta u fazi. Interferencijom te dvije zrake dobije se slika znatnog boljeg kontrasta među strukturama različitog indeksa loma svjetlosti (npr. membrana-citoplazma). Radi još boljeg uočavanja razlika među strukturama u koloniji stanica, mikroskopske slike su pretvorene u 2 bit-ne te je učinjena inverzija. Za obradu slike koristili smo programe Adobe Photoshop CS6 i Image J.

2.2.12 Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korištena je MS Office Excel aplikacija. Pokusi su ponavljani minimalno tri puta u triplicatima, a rezultati su uspoređeni t testom. Statistički značajnost je određena prema p vrijednost manjoj od 10% ($p < 0,1$).

3 REZULTATI

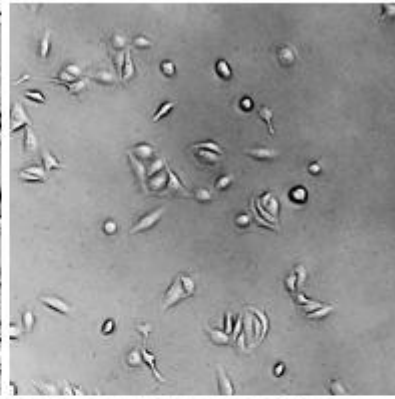
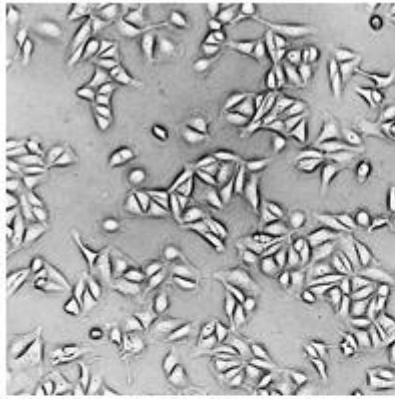
3.1 Rast kružne kolonije stanica MDCK II

Nasađivanje stanica MDCK II na specifičan način, u obliku kapljice, rezultiralo je nastankom kružne kolonije. Nakon 24 h rasta stanice formiraju konfluentnu kružnu koloniju koja tijekom trećeg dana počinje diferencirati u dvije populacije stanica: stanice središnjeg (B, od engl. *bulk*) i stanice rubnog sloja (E, od engl. *edge*). Te dvije populacije stanica razlikuju se u veličini i obliku, gustoći, brzini rasta i pokretljivosti. Stanica u središnjem sloju su manje, gusto posložene nalik saću i ne migriraju. Stanice na rubu su veće i pokretljivije, imaju vretenasti oblik i protruzije- membranske izbočine koje služe radijalnom gibanju stanica te širenju tkiva. Daljnjim rastom kružne kolonije povećavaju se morfološke razlike između stanica središnjeg i rubnog sloja (Slika 9). Zbog uočenih razlika odabrali smo dane tri, četiri i pet kao model za daljnja istraživanja.

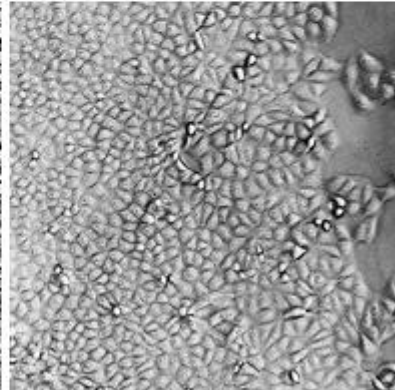
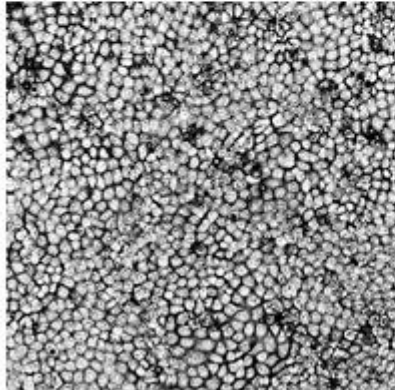
središte kolonije

rub kolonije

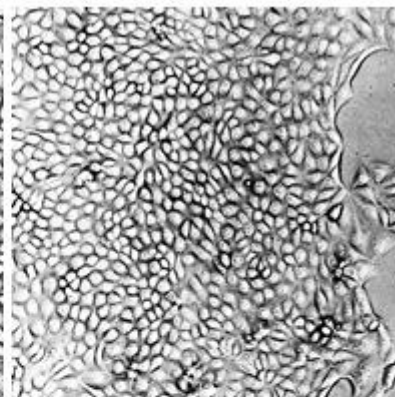
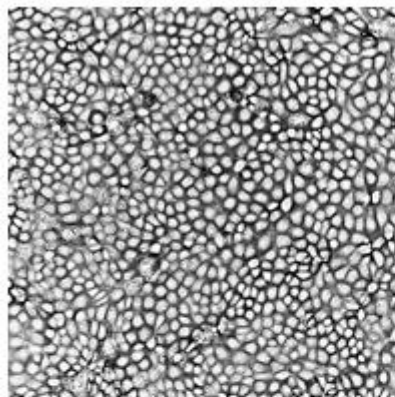
0. dan



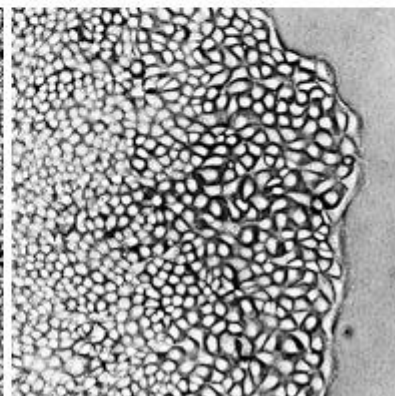
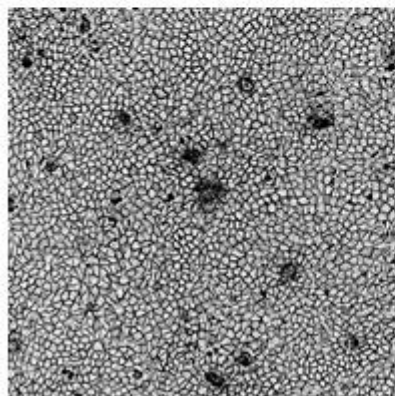
1. dan



2. dan



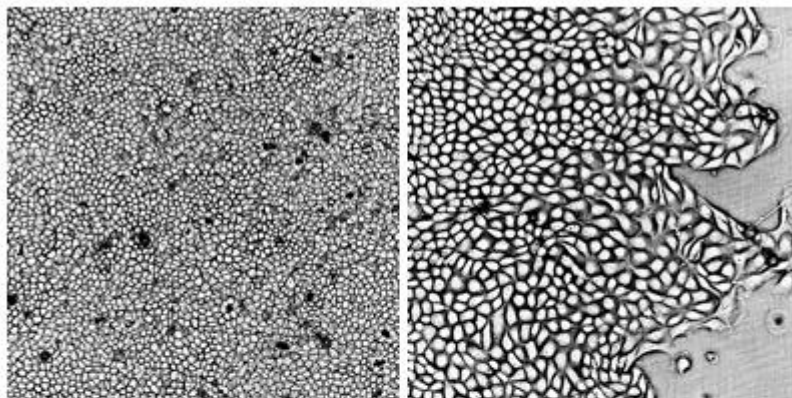
3. dan



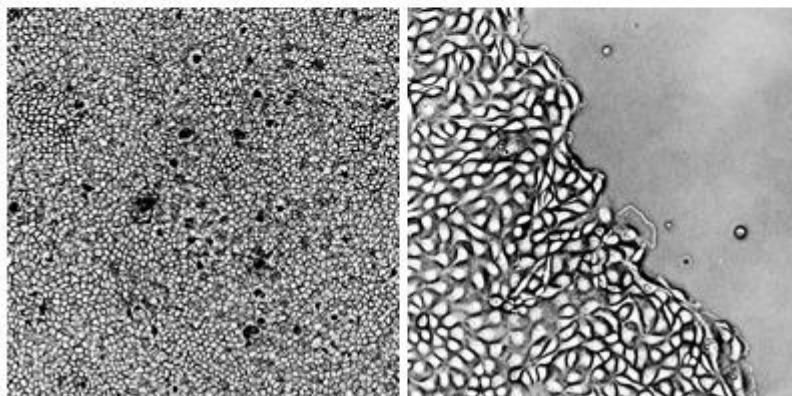
središte kolonije

rub kolonije

4. dan



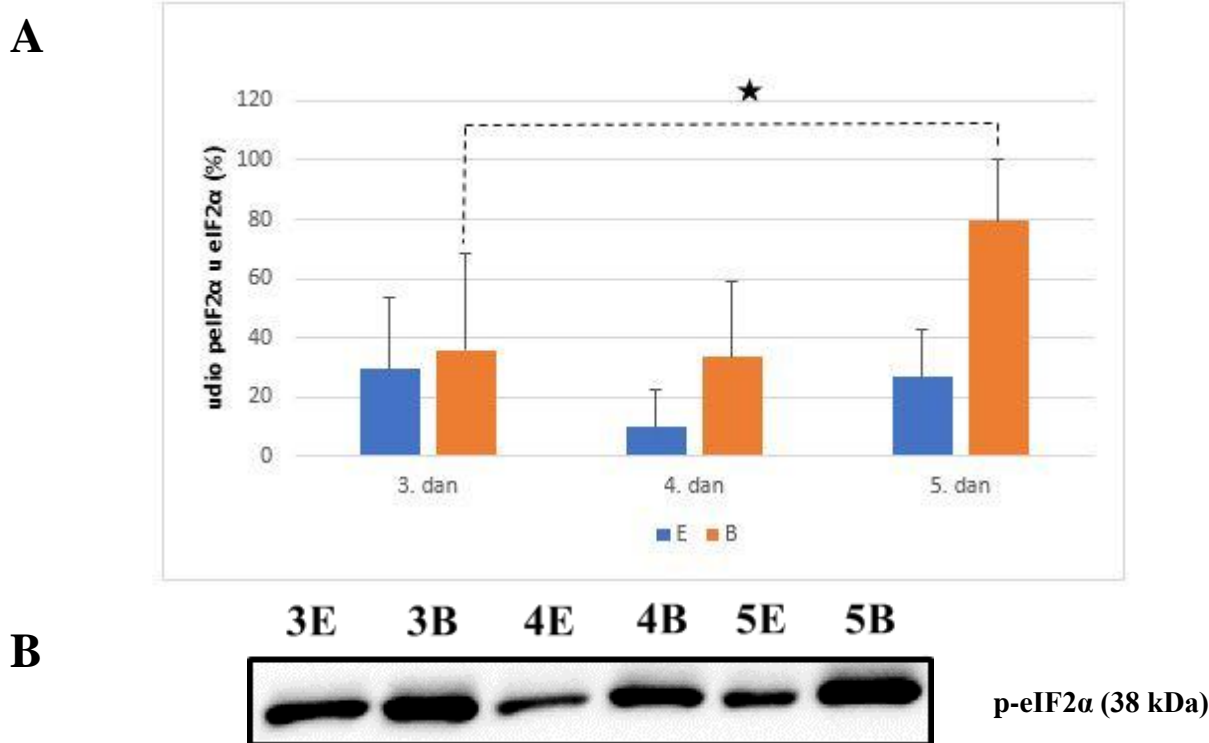
5. dan



Slika 9. Rast kružne kolonije stanica MDCK II prvi, drugi, treći, četvrti i peti dan nakon nasađivanja. Treći dan se jasno vide dvije populacije stanica: stanice središnjeg sloja i stanice rubnog sloja koje se razlikuju u svojoj morfolologiji i načinu rasta.

3.1.1 Istraživanje ekspresije i fosforilacije proteina eIF2 α u kružnoj koloniji

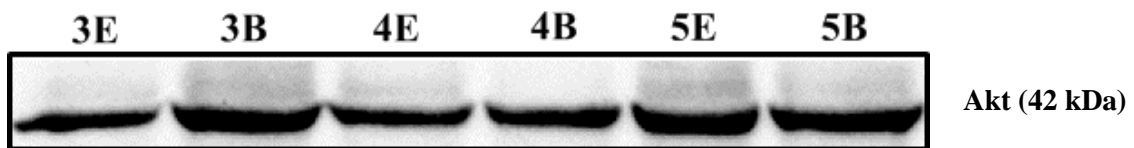
Kao što je rečeno, stanice rubnog i središnjeg sloja razlikuju se u gustoći pa posljedično trpe različit pritisak okolnih stanica što utječe na njihov rast. Kako bismo ispitali kakav učinak na stanice ima ograničavajući prostor za rast koji je posljedica povećanja gustoće stanica istražili smo ekspresiju i fosforilaciju proteina eIF2 α . eIF2 α je eukariotski inicijacijski faktor. Različiti oblici stresa potiču fosforilaciju eIF2 α što za posljedicu ima smanjenje translacije mnogih mRNA i utjecaj na stanične procese. Smatramo kako je fosforilacija eIF2 α indikator staničnog stresa koji nastaje u stanicama zbog ograničenog prostora za rast. Ekspresiju i fosforilaciju eIF2 α ispitali smo treći, četvrti i peti dan rasta kružne kolonije. Slika 10. prikazuje udio fosforiliranog oblika eIF2 α u ukupno eksprimiranom eIF2 α . Vidimo da se fosforilacija u središnjem, gusto pakiranom sloju stanica, povećava tijekom rasta kružne kolonije i dolazi do značajnog povećanja fosforilacije tijekom petog dana.



Slika 10. **A)** Grafički prikaz udjela ekspresije fosforiliranog proteina p-eIF2 α u ukupno eksprimiranom eIF2 α u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija fosforiliranog oblika eIF2 α analizirana metodom Western blot trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

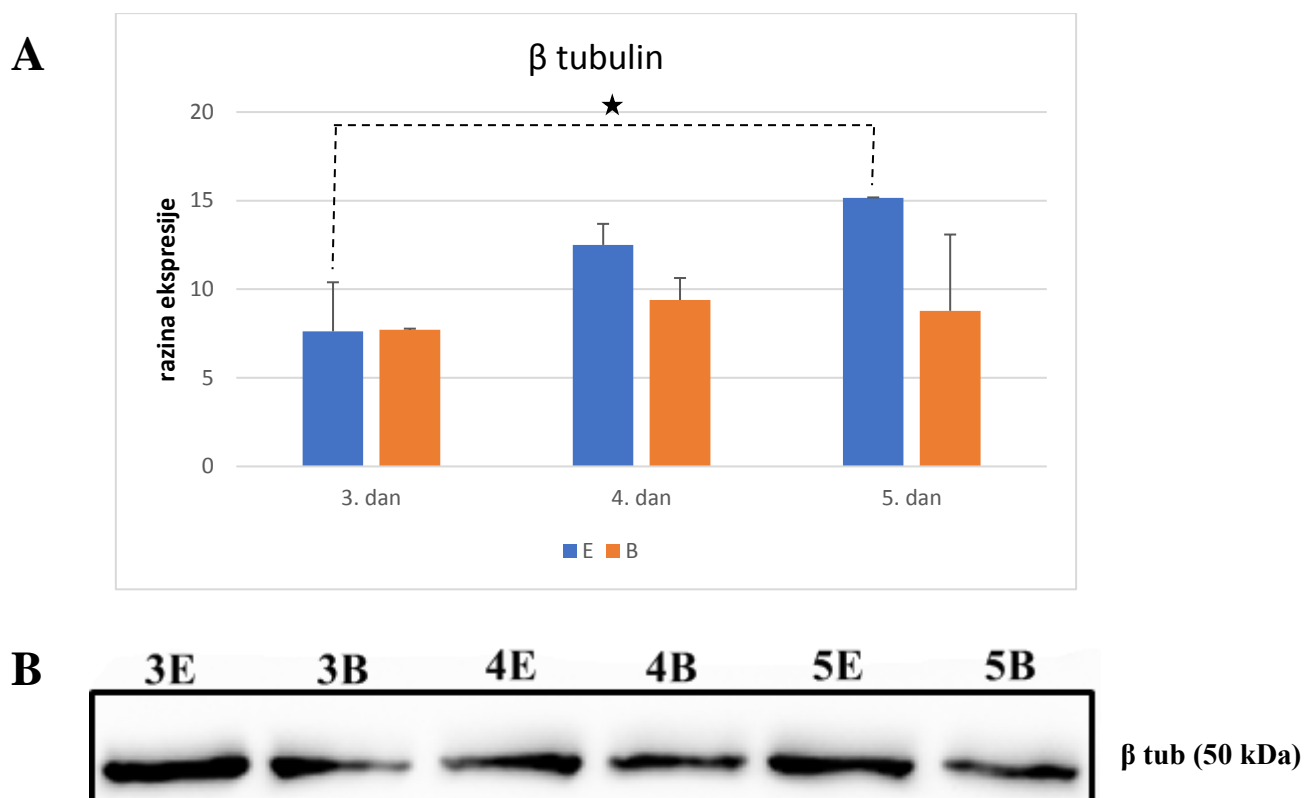
3.2 Ekspresija adhezijskih proteina i proteina citoskeleta u kružnoj/98 koloniji

U stanicama središnjeg i rubnog sloja kružne kolonije pratili smo ekspresiju citoskeletnih proteina: aktina, β -tubulina, vimentina, vinkulina, te adhezijskih proteina: E kadherina i β katenina, uspoređujući treći, četvrti i peti dan rasta kružne kolonije. Napravili smo denzitometrijsku analizu signala u programu Image J na sljedeći način: relativnu ukupnu količinu proteina u svakom uzorku odredili smo bojanjem s naftolskim modrilom te smo vrijednosti ekspresije, dobivene analizom specifičnog kemiluminiscencijskog signala pojedinog proteina, normalizirali na ukupnu količinu proteina. Ukupna količina citoskeletnog proteina aktina je ista u obje populacije, stanica na rubu i u sredini kružne kolonije, i ne mijenja se tijekom rasta stanične kolonije (Slika 9.). Razine ekspresije ostalih proteina prikazane su na Slikama 12 - 16.



Slika 11. Ekspresija aktina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije MDCK II stanica. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

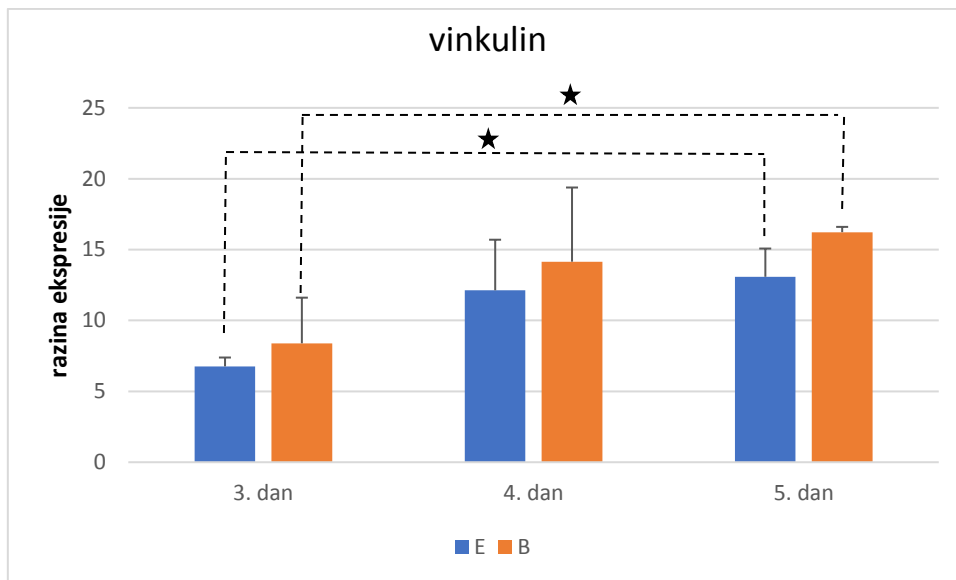
Na Slici 12. vidljivo je da se ekspresija β tubulina u stanicama rubnog sloja povećava tijekom rasta kolonije, te bi daljnjom propagacijom kružne kolonije nakon 5. dana količina β tubulina mogla pridonijeti značajnoj razlici stanica na rubu i u sredini kružne kolonije.



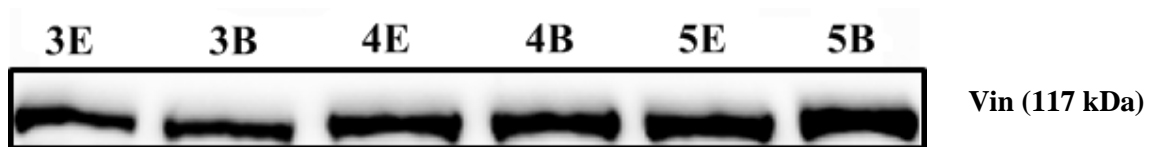
Slika 12. A) Grafički prikaz ekspresije proteina β tubulina u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija β tubulina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

Na Slici 13. vidljivo je da se ekspresija proteina vinkulina povećava tijekom rasta kolonije u obje populacije stanica kružne kolonije (Slika 12.), pri čemu nema značajne razlike u njegovoj ekspresiji između rubnog i središnjeg sloja.

A

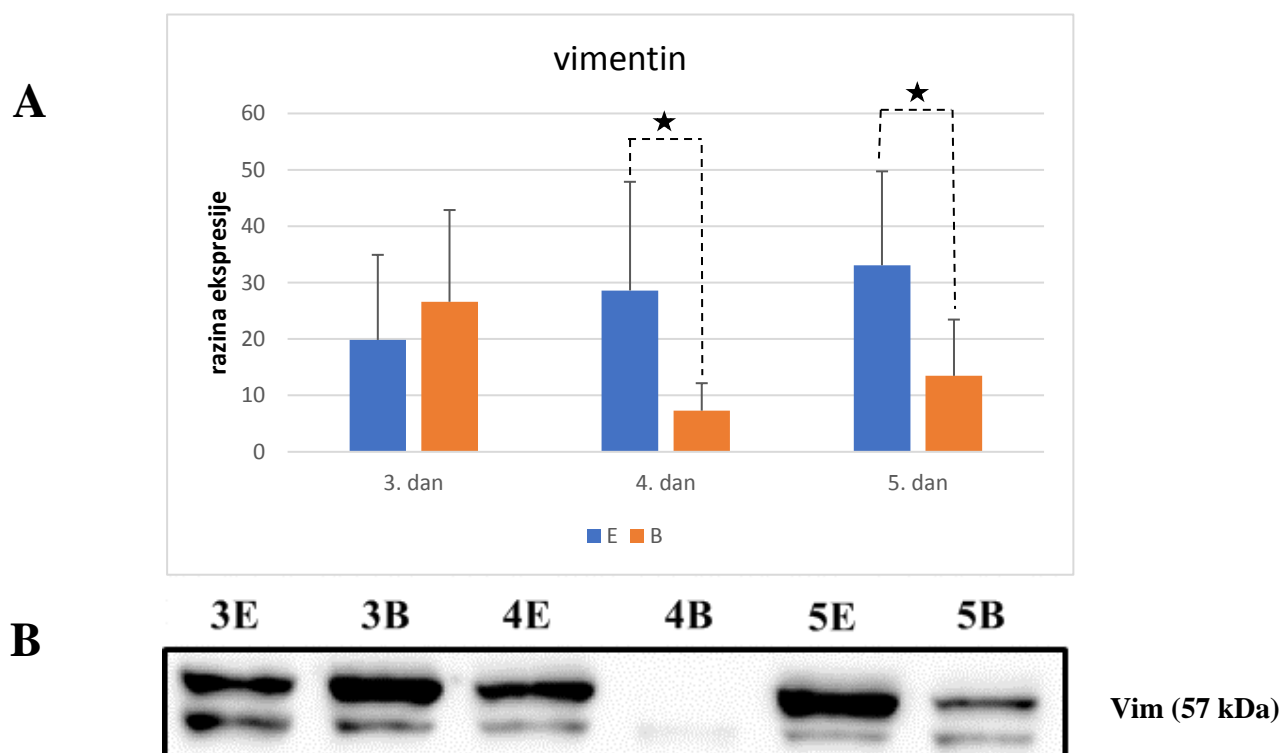


B



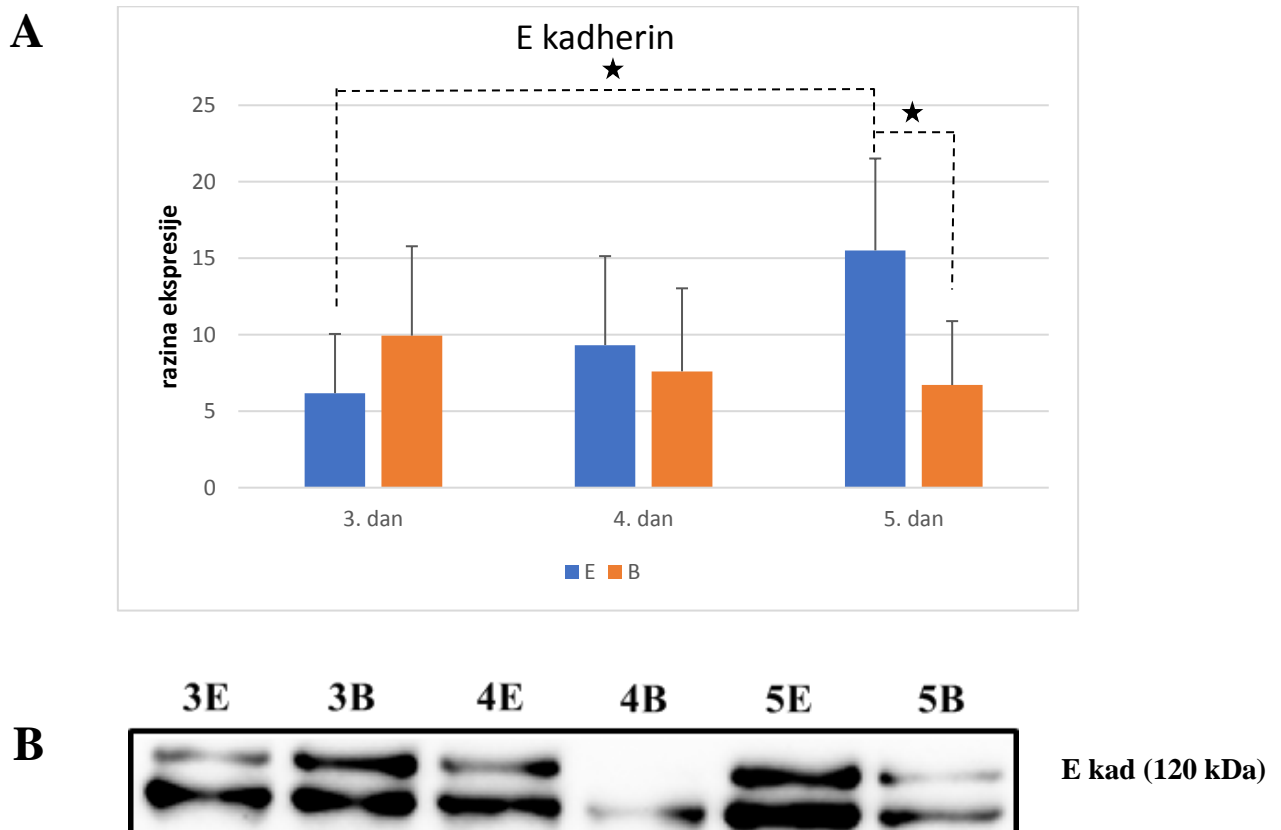
Slika 13. A) Grafički prikaz ekspresije proteina vinkulina u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija vinkulina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

Slika 14. prikazuje ekspresiju vimentina koja se povećava u stanicama rubnog sloja tijekom rasta stanične kolonije te je vidljiv značajan pad ekspresije u stanicama središnjeg sloja četvrti i peti dan rasta kolonije što rezultira značajnom razlikom u ekspresiji između stanica rubnog i središnjeg sloja.



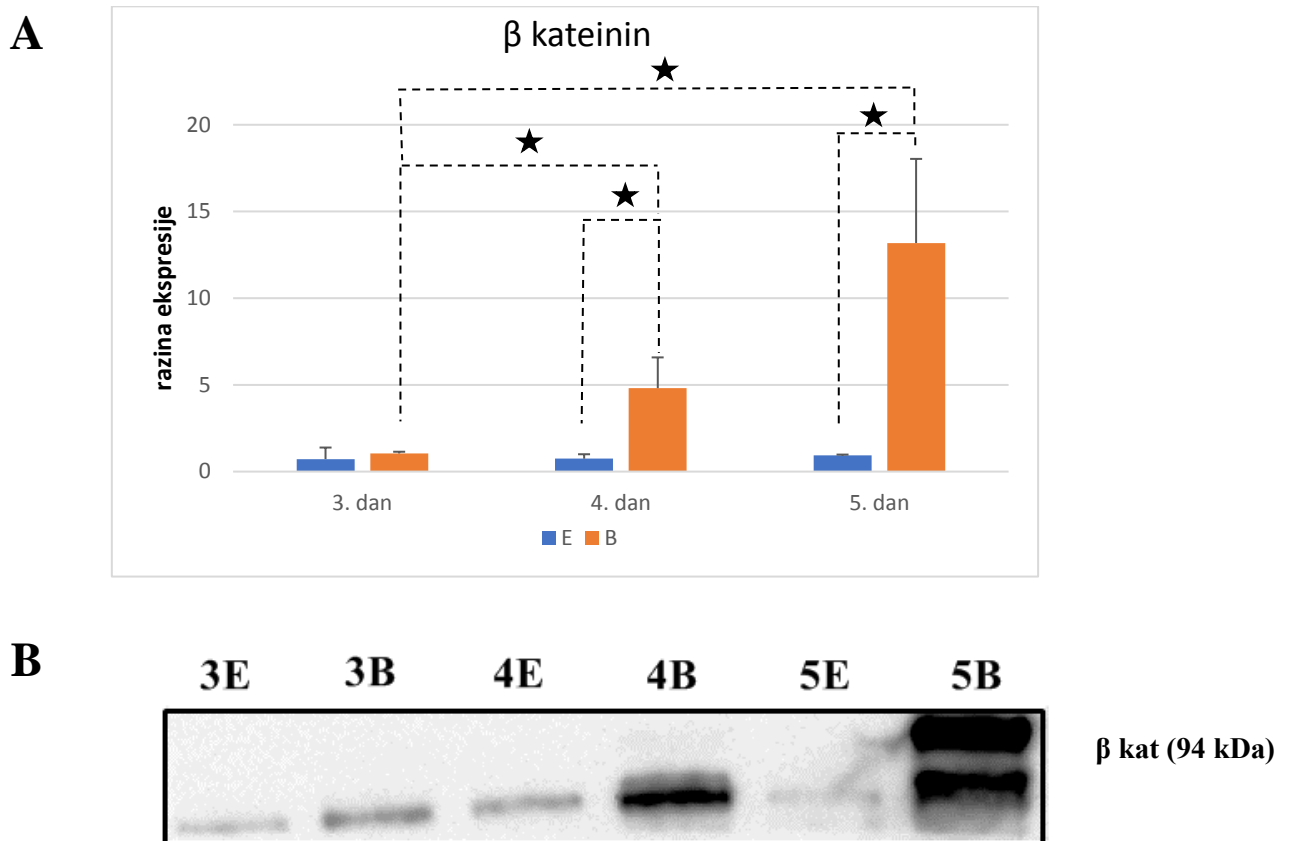
Slika 14. A) Grafički prikaz ekspresije proteina vimentina u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija vimentina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

Ekspresija E kadherina povećava se u stanicama rubnog sloja tijekom rasta kružne kolonije dok se njegova ekspresija u stanicama središnjeg sloja smanjuje (Slika 15). Peti dan rasta dolazi do značajne razlike u ekspresiji E kadherina između stanica rubnog i središnjeg sloja.



Slika 15. **A)** Grafički prikaz ekspresije proteina E kadherina u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija E kadherina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

Na Slici 16. je vidljivo da se ekspresija β katenina u stanicama središnjeg sloja povećava tijekom rasta stanične kolonije, dok stanice rubnog sloja održavaju nisku količinu β katenina tijekom rasta. Četvrti i peti dan rasta kružne kolonije ekspresija β katenina je značajno veća u stanicama središnjeg sloja.



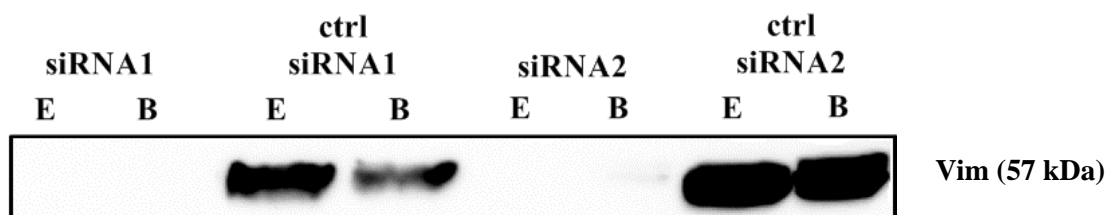
Slika 16. A) Grafički prikaz ekspresije proteina β katenina u stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kolonije. Graf predstavlja srednju vrijednost tri nezavisna pokusa i standardnu devijaciju među rezultatima pojedinih pokusa. Statistička značajnost je određena t-testom (\star - $p < 0,1$). **B)** Ekspresija β katenina analizirana metodom Western blot tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne.

3.3 Narušavanje morfologije kružne kolonije MDCK II stanica

Za narušavanje integriteta vlakana citoskeleta koristili smo različite pristupe. Tako smo na primjer, za narušavanje vlakana vimentina stanice transficirali malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA) kako bi se smanjila ekspresija gena za protein vimentin. Za narušavanje integriteta ostalih vlakana citoskeleta stanice smo tretirali latrunkulinom B (5 μ M), koji sprječava polimerizaciju monomera aktina te kolihicinom (100 μ M) koji sprječava polimerizaciju mikrotubula. Odabrali smo koncentraciju spojeva koja vidljivo narušava morfologiju stanica u kružnoj koloniji, ali ne uzrokuje odvajanje stanica od podloge što bi moglo uzrokovati staničnu smrt.

3.3.1 Transfekcija siRNA

Prvo smo provjerili uspješnost transfekcije metodom Western blot na razini proteina, 72 h nakon transfekcije, uz kontrolne, takozvane C9-11 siRNA. Na Slici 17. prikazana je membrana inkubirana s protutijelima za vimentin nakon tretmana stanica s dvije različite siRNA i pripadajuće C9-11. Možemo zaključiti da je došlo do utišavanja ekspresije vimentina. Nakon provjere uspješnosti transfekcije gledali smo kako narušena ekspresija intermedijarnog proteina vimentina utječe na stanice u koloniji.



Slika 17. Utišavanje gena za vimentin. Ekspresija vimentina u stanicama MDCK II analizirana je metodom Western blot. Stanice su transfecirane dvjema siRNA molekulama (siRNA 1 i siRNA 2) i njihovim pripadajućim kontrolama. U uzorcima transficiranim sa siRNA za vimentin nema ekspresije proteina vimentina. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

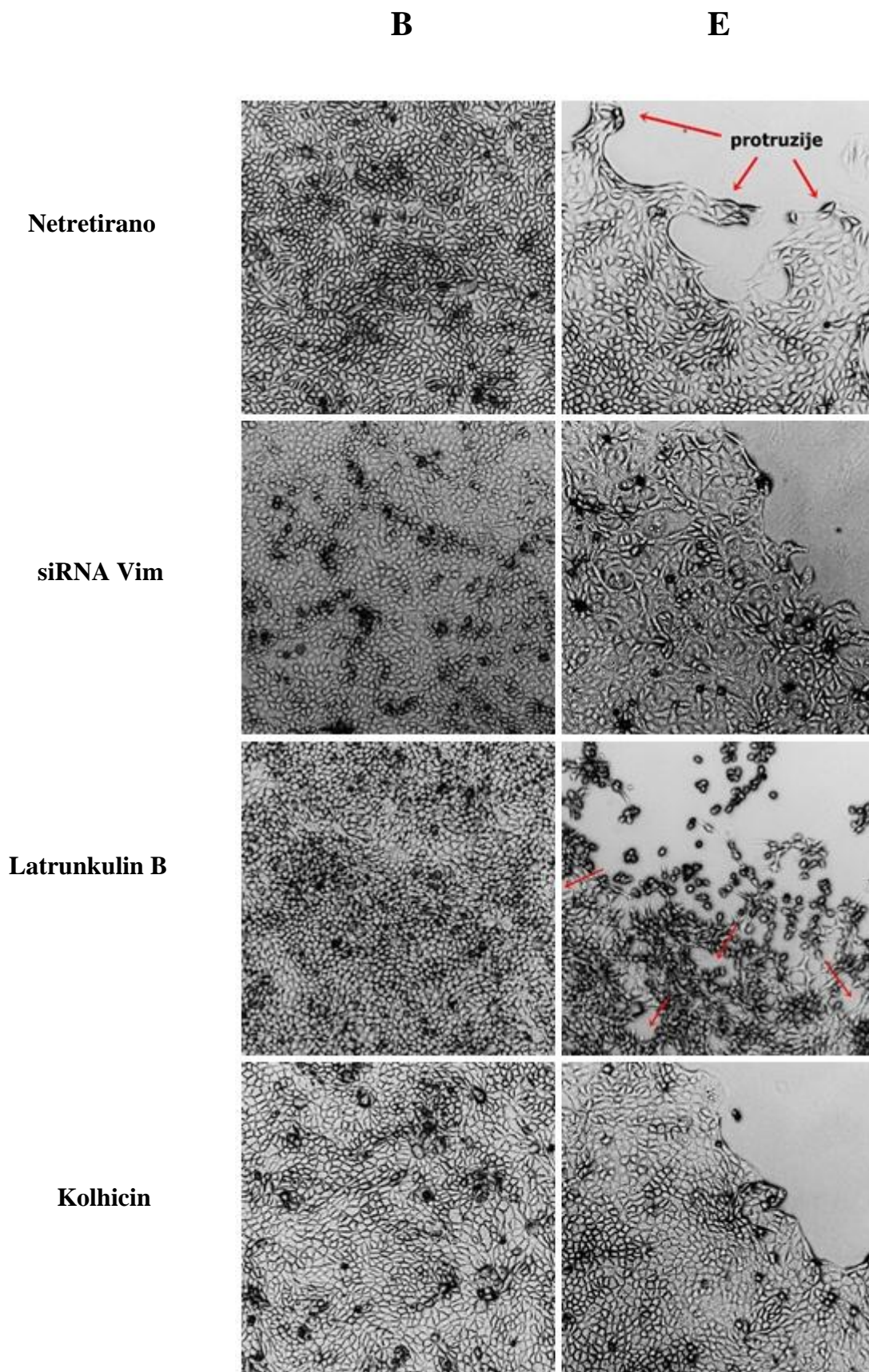
Narušena ekspresija intermedijarnog proteina vimentina utječe na rast i morfologiju kolonije. Na Slici 18. vidljive su promjene koje su posljedica tretmana. Tretmanom se narušava dobro složena masa stanica središnjeg sloja koja je prisutna u netretiranoj koloniji. Usporedbom netretirane i tretirane kolonije vidi se utjecaj tretmana na stanično povezivanje. Kako u središnjem, tako i u rubnom sloju tretirane kolonije slabe veze između stanica što se vidi kao manje intenzivni, blijedi kontakti između stanica. Stanice rubnog sloja tretirane kolonije gube karakteristični raspored vretenastih stanica koji je prisutan u netretiranim kolonijama. Oblik stanica postaje nepravilniji i stanice ne stvaraju protruzije.

3.3.2 Tretman latrunkulinom B

Na Slici 18. su vidljive morfološke promjene tkiva tretiranog latrunkulinom B (5 μ M) u odnosu na netretirano tkivo. Tretman latrunkulinom B trajao je 45 min. Usporedbom snimljenih fotografija netretiranih i tretiranih kolonija možemo primijetiti kako stanice gube karakteristični oblik, poprimaju uniformniji izgled i gube se razlike između središnje i rubne populacije stanica. Također smo primijetili da su stanice izgubile kontaktnu inhibiciju koja je tipična za rast netretirane kolonije. U tretiranoj koloniji stanice središnjeg i rubnog sloja postaju više okrugle za razliku od netretirane kolonije gdje se vidi jasna razlika između stanica središnjeg sloja koje su manje, gusto posložene nalik saću i većih stanica na rubu koje imaju vretenasti oblik i membranske protruzije na samom rubu kolonije. Stanice u tretiranoj kružnoj koloniji gube kontakt, kako s površinom na kojoj se uzgajaju, tako i s drugim stanicama što je vidljivo u prazninama između stanica. Na rubnom sloju stanica dolazi do nestanka karakterističnih protruzija.

3.3.3 Tretman kolhicinom

Tretman kolhicinom, koji je trajao 45 min, (Slika 18) utječe na oblik i raspored stanica u središnjem i rubnom sloju kolonije te u odnosu na netretiranu koloniju stanice središnjeg sloja gube urednu sačastu strukturu gusto pakiranih stanica, koje postaju veće i izduženije nego stanice u netretiranoj koloniji. Stanice na rubnom sloju tretirane kolonije gube karakteristični vretenasti izgled, poprimaju sličan oblik kao stanice središnjeg sloja i nemaju protruzija.

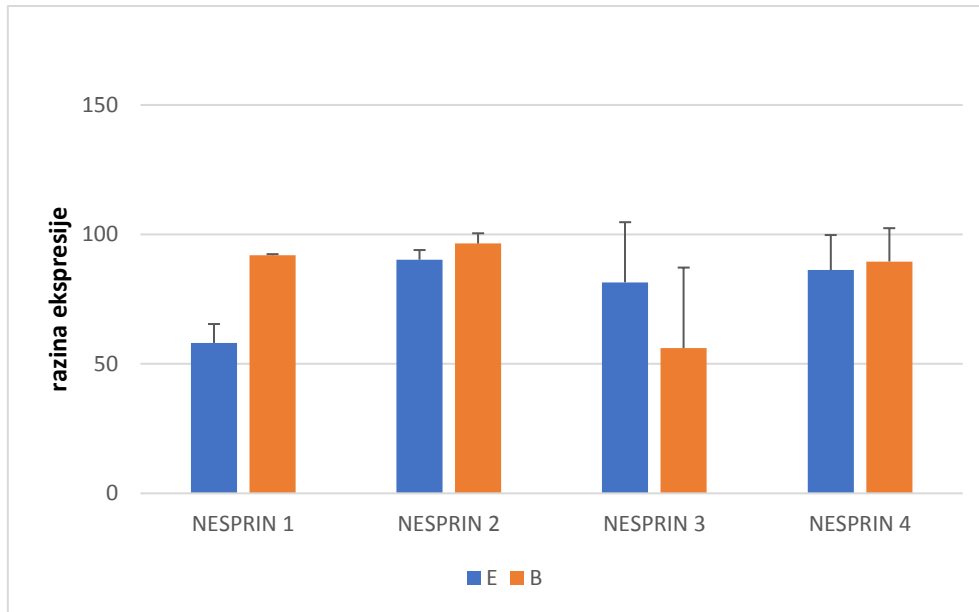
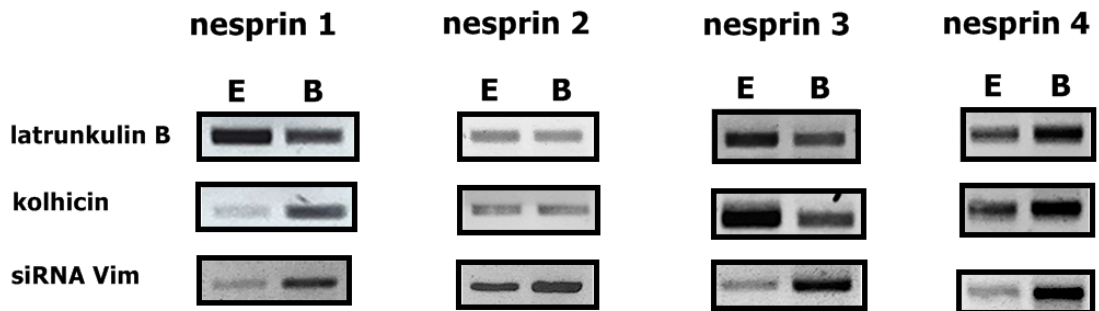


Slika 18. Promjena morfologije kružnih kolonija stanica MDCK II tretiranih kemijskim spojevima: latrunkulinom B (5 μ M), kolhicinom (100 μ M) i molekulama siRNA za utišavanje intermedijarnog filameta vimentina. Prikazani su središnji i rubni sloj netretiranih i tretiranih staničnih kolonija 72 h nakon nasađivanja. Stanice su vizualizirane fazno-kontrastnim mikroskopom. E- stanice rubnog sloja, B-stanice središnjeg sloja.

3.4 Analiza ekspresije mRNA nesprina metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

Kako bismo istražili spregu između jezgre i citoskeleta u stanicama netretiranih i različito tretiranih staničnih kolonija analizirali smo ekspresiju nesprina koji vežu različite komponente citoskeleta i na taj način povezuju jezgrinu ovojnici s citoskeletom. Kako bismo vidjeli neposredni učinak tretmana na ekspresiju nesprina analizirali smo količinu njihove mRNA metodom PCR nakon reverzne transkripcije (RT-PCR). Ekspresiju nesprina u netretiranim kolonijama kvantificirali smo u programu Image J i normalizirali prema kontrolnoj mRNA aktina. Nakon pojedinih tretmana pratili smo kvalitativnu promjenu ekspresije 4 različita nesprina te su rezultati sažeti na Slici 19 B.

U netretiranim kružnim kolonijama vidljivo je da je ekspresija sve četiri mRNA nesprina različita u stanicama središnjeg i rubnog sloja kolonije (Slika 19 A). U netretiranim kolonijama ekspresija nesprina 1 je veća u stanicama središnjeg sloja, sve dok se ne naruši aktinski citoskelet, kada je više nesprina 1 na rubu kolonije. Tretman kolhicinom i siRNA za vimentin nema učinka na nesprin 1. Ekspresija nesprina 2 i nesprina 4 veća je u središnjem sloju stanica bez obzira na tretman stanične kolonije. S druge strane, ekspresija nesprina 3 je veća u stanicama rubnog sloja u netretiranim kolonijama. Međutim, ako se utiša vimentin, stanice središnjeg sloja pokazuju veću ekspresiju nesprina 3. Tretmani latrunkulinom B i kolhicinom nemaju učinka na nesprin 3.

A**B**

Slika 19. A) Grafički prikaz ekspresije mRNA nesprina 1,2,3,4, normaliziran u odnosu na ekspresiju mRNA aktina, u netretiranim stanicama rubnog i središnjeg sloja kružne kolonije MDCK II stanične linije 72 h nakon nasađivanja. **B)** Ekspresija mRNA nesprina 1,2,3,4 analizirana metodom PCR u stanicama kružnih kolonija MDCK II stanične linije, 72 h nakon nasađivanja te nakon tretmana kemijskim spojevima latrunculinom B (100 μ M) i kolhicinom (1mM) u trajanju od 45 min te molekulama siRNA za protein vimentin u trajanju od 48 h. E- stanice rubnog sloja kružne kolonije, B- stanice središnjeg sloja kružne kolonije.

4 RASPRAVA

Proučavanje rasta i diferencijacije modelnih tkiva/staničnih kolonija važno je za razumijevanje koordiniranog ponašanja i kretanja stanica koji su prisutni u procesima poput morfogeneze, zacijeljivanja rana i progresije tumora (Kaliman *i sur*, 2014). U ovom radu smo koristili imortalizirane epitelne stanice bubrega psa (MDCK II), dobro okarakteriziran model za istraživanje stanične diferencijacije. Ukoliko nasadimo MDCKII stanice kao kap, u obliku kružne kolonije, one nakon trećeg dana rasta diferenciraju u dva tipa stanica – stanice u središnjem i rubnom sloju kružne kolonije koje se međusobno razlikuju u brzini rasta i morfologiji. Željeli smo proučiti razlike između te dvije populacije stanica.

Tijekom rasta kružne kolonije dolazi do povećanja gustoće stanica središnjeg sloja zbog toga što se stanice na rubu ne šire dovoljno brzo kako bi podržale proliferaciju stanica središnjeg sloja (Puliafito *i sur*, 2010). Ograničavanje prostora za proliferaciju može povećati stanični stres. Jedan od pokazatelja stresa uslijed koncentriranja stanica u tkivu je povećanje fosforilacije inicijacijskog faktora eIF2 α (Gerlitz *i sur*, 2002). Pokazali smo kako je udio fosforiliranog oblika eIF2 α veći u središtu kružne kolonije tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta, dok je peti dan rasta fosforilacija značajno povećana u odnosu na treći dan. Kemijski signali te fizičke sile koje proizlaze iz staničnog mikrokoliša imaju važnu ulogu u staničnom razvoju i funkcijama (Tremblay *i sur*, 2013). Ograničavanje prostora u kojem stanice rastu povećava stres u stanicama središnjeg sloja našeg modelnog sustava što može usporiti proliferaciju i usmjeriti stanice prema diferencijaciji. Stoga je fosforilacija eIF2 α jedan od pokazatelja razlike između dvije populacije stanica rastuće kružne kolonije.

Stanice rubnog i središnjeg sloja se nakon trećeg dana rasta jasno razlikuju u svom obliku, a upravo je promjena oblika karakteristika stanica koje diferenciraju. Za promjenu oblika stanica ključan je citoskelet (Mathieu i Lobo, 2012). Kako bismo istražili ulogu citoskeleta u diferencijaciji kružne kolonije ispitali smo ekspresiju citoskeletnih (aktin, β -tubulin, vimentin, vinkulin) i adhezijskih proteina (β -katenin, E kadherina) tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta kružne kolonije. Razina ekspresije aktina može varirati ovisno o fazi razvoja ili tipu tkiva, (Lin i Redies, 2012), međutim mi nismo pronašli značajne razlike ($p < 0,1$) u ekspresiji aktina između stanica središnjeg i rubnog sloja kružne kolonije tijekom sva tri ispitivana dana rasta. β tubulin, zajedno s α tubulinom, izgrađuje mikrotubule koji između ostalog imaju ulogu i u staničnom kretanju (Kaverina i Straube, 2011) te bi pokretljivije stanice rubnog dijela kružne kolonije mogle imati povećanu ekspresiju β tubulina. Međutim, ekspresija

β tubulina se ne razlikuje značajno između stanica središnjeg i rubnog sloja. Nadalje, vinkulin je jedan od proteina fokalnih adhezija koji sudjeluje u povezivanju aktinskih vlakana s izvanstaničnim matriksom (Cooper 2004). Tijekom rasta kolonije dolazi do povećanja njegove ekspresije u obje populacije stanica, što je vjerojatno povezano s činjenicom da stanice koje rastu ostvaruju sve više kontakata s podlogom.

Vimentin je intermedijarni filament, a epitelne stanice povećavaju ekspresiju vimentina prilikom tranzicije u puno pokretljivije mezenhimske stanice u procesu koji se naziva epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT) (Mendez *i sur*, 2010). U našem modelnom sustavu pokretljivije stanice rubnog sloja također imaju povećanu razinu vimentina i to četvrti i peti dan rasta kružne kolonije. Osim što podržava pokretljivost stanica rubnog sloja, vimentin služi i za održavanje njihovog vretenastog oblika (Sun *i sur*, 2015). Tijekom četvrtog dana rasta u stanicama središnjeg sloja dolazi do velikog pada u ekspresiji vimentina. Naime, tijekom četvrtog dana rasta kružna kolonija ulazi u takozvano ustaljeno stanje gdje stanice središnjeg dijela dosegnu maksimalnu gustoću te više ne proliferiraju (Kaliman *i sur*, 2014). Pokazali smo da se četvrti dan rasta kružne kolonije događaju i promjene u ekspresiji ključnih citoskeletnih proteina, a tek trebamo istražiti značenje tih promjena za staničnu diferencijaciju.

E kadherin je transmembranski protein, koji je u velikoj količini eksprimiran u epitelnim stanicama gdje posreduje u njihovom međusobnom povezivanju (Kim *i sur*, 2011). Sukladno ulozi E kadherina u stvaranju adhezivnih spojeva nađeno je da njegova povećana ekspresija smanjuje pokretljivost stanica (Silvestre *i sur*, 2009). Naši rezultati pokazuju suprotan trend - pokretljivije stanice na rubu kružne kolonije imaju povećanu ekspresiju E kadherina, a petog dana rasta kolonije ta je razlika značajna. Iako točna uloga E kadherina u migraciji epitelnih stanica nije poznata, neka istraživanja upućuju da je adhezivna funkcija E kadherina ključna kako bi epitelne stanice mogle kolektivno migrirati tijekom razvoja organizma (Pàmies, 2014). β katenin je adhezijski protein međustaničnih spojeva gdje ima ulogu u njihovoj stabilizaciji i služi kao prenosnica između E kadherina i aktinskih vlakana (Prejac, 2012). Stanice središnjeg sloja kružne kolonije imaju povećanu ekspresiju β katenina, ostvaruju veći broj staničnih kontakata i imaju kompaktniji izgled. Premda su β katenin i E kadherin direktno povezani, stanice koje imaju više β katenina nemaju i više E kadherina. Naprotiv, pronašli smo obrnuti odnos u našem modelu. Združivanje E kadherina s aktinskim vlaknima samo je jedna od uloga β katenina u stanicama. On ima ulogu i signalnom putu Wnt pa povećanje njegove ekspresije može značiti aktivnost tog signalnog puta gdje potiče transkripciju gena koji nadziru staničnu sudbinu (Prejac, 2012). Tijekom rasta kružne kolonije dolazi do razlike u ekspresiji ispitivanih

adhezijskih i citoskeletnih proteina među rubnim i središnjim stanicama što upućuje na njihovu ulogu u diferencijaciji. Iako za neke citoskeletne i adhezijske proteine nismo pronašli značajne razlike u razini ekspresije bilo bi zanimljivo istražiti da li se procesom diferencijacije promijenio njihov unutarstanični smještaj i organizacija u stanicama rubnog i središnjeg sloja.

Kako bismo dodatno ispitali važnost citoskeleta u rastu i diferencijaciji stanica istražili smo što se dogodi kada narušimo integritet vlakana citoskeleta. Za narušavanje integriteta aktinskog citoskeleta i mikrotubula koristili smo kemijske spojeve latrunkulin B i kolhicin. Za narušavanje trećeg tipa vlakana –intermedijarnih filamenata- stanice smo transficirali malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA) naspram vimentina. Sva tri tipa tretmana su dovela do promjena u morfologiji stanica kružne kolonije jer sva tri tipa vlakana zajedno surađuju u održavanju oblika stanice (Fletcher i Mullins, 2010). Stanice sa smanjenom ekspresijom vimentina nakon siRNA tretmana pokazuju manje promjena u morfologiji u odnosu na stanice s narušenim aktinskim filamentima i mikrotubulima. Naime, utjecaj siRNA tretmana smo promatrali nakon 72 h, stoga su stanice imale vremena za prilagodbu novonastaloj situaciji. Kako bi pri smanjenoj količini vimentina posljedice po stanicu bile što manje, došlo je do reorganizacije citoskeleta gdje su preostala vlakna citoskeleta podnijela sav teret održavanja morfologije. S druge strane, kemijski spojevi koji razaraju aktin i mikrotubule djeluju trenutačno, unutar nekoliko minuta, a učinak smo promatrali 45 min nakon tretmana pa su stanice imale daleko manje vremena za prilagodbu i reorganizaciju citoskeleta, u usporedbi sa stanicama s poremećenim citoskeletom vimentina.

Kod oba tretmana kemijskim spojevima, latrunkulinom B i kolihicinom, nakon 45 min stanice u koloniji su postale morfološki uniformnije i izgubile su se odlike po kojima su se razlikovale dvije populacije stanica. Kada bi već diferenciranu kružnu koloniju odvojili od podloge i presadili kao suspenziju, sve stanice bi izgledale jednako, bez ikakvih naznaka da su pojedine stanice nekoć pripadale središnjem ili rubnom sloju kolonije, čak ni nakon 72 h rasta. Sličnu plastičnosti stanične diferencijacije vidimo i kada narušimo komponente citoskeleta i stanice izgube morfološke karakteristike rubnih odnosno središnjih stanica kolonije. Stoga, za održavanje diferencijacije stanica unutar tkiva bitni su očuvanost i integritet citoskeleta kao i mehanička svojstva okoline (mikrokoliš). Isto su pokazali Zouibane i sur. - očuvani integritet citoskeleta neophodan je za diferencijaciju mliječnih epitelnih stanica (Zoubiane i sur, 2004).

Stanični citoskelet ima ulogu i u regulaciji proteinske ekspresije, a s jezgrom je povezan posredstvom nesprina-proteina vanjske jezgrine ovojnice (Liu i sur, 2016). Kako bismo istražili spregu jezgre i citoskeleta ispitali smo ekspresiju nesprina treći dan rasta kružne kolonije.

Nesprini 1, 2 i 4 su više eksprimirani u gusto pakiranim stanicama središnjeg sloja, a imaju uloge u reguliranju staničnog oblika, migraciji i pozicioniranju jezgre (King *i sur*, 2014; Rajgor i Shanahan, 2013) .

Nesprin 3 ima ulogu u organiziranju perinuklearnog citoskeleta (Morgan *i sur*, 2011) i više ga ima u nediferenciranim stanicama te mu se ekspresija smanjuje kako stanice diferenciraju (Ketema i Sonnenberg, 2011). Shodno, u našem modelu je više nesprina 3 u stanicama rubnog sloja koje su veće i pokretljivije. Stanicama rubnog sloja je puno veći izazov održati organizaciju perinuklearnog citoskeleta zbog dinamičnih promjena oblika stanica koje se kreću za razliku od statičnih stanica u sredini kolonije. Stanice središnjeg i rubnog sloja, zbog različitih biomehaničkih svojstava, imaju različitu vezu između jezgre i citoskeleta (Mellad *i sur*, 2011).

Kada smo različitim tretmanima narušili komponente citoskeleta došlo je do promjene odnosa ekspresije nekih od nesprina između rubnih i središnjih stanica kolonije. Narušavanje citoskeletnih vlakana potencijalno utječe i na arhitekturu same jezgre, a promjena oblika jezgre za posljedicu može imati promjenu genske ekspresije. Nakon narušavanja mikrotubula kolhicinom nije se promijenila ekspresija nesprina, iako je poznato da nesprini 1, 2 i 4 stupaju u interakciju s mikrotubulima (Ketema i Sonnenberg, 2011). Nakon narušavanja aktina latrunkulinom B dolazi do promjene u ekspresiji nesprina 1, veznog partnera aktina. Utišavanje intermedijarnog filameta vimentina mijenja ekspresiju nesprina 3 koji je do sada jedini istražen nesprin koji stupa u interakciju s intermedijarnim filamentima (Morgan *i sur*, 2011). Nesprini su proteini čije su uloge i vezni partneri još uvijek predmet brojnih istraživanja (Warren *i sur*, 2005), a do sada nema literaturnih podataka o trenutačnom učinku narušavanja komponenti citoskeleta na ekspresiju nesprina. Eksperimenti kojima smo kvalitativno opisali razlike u ekspresiji nesprina dali su nam uvid u moguće promjene u arhitekturi jezgre nakon narušavanja komponenti citoskeleta. Obrat ekspresije nesprina 1 i 3 trebalo bi dodatno istražiti i kvantificirati ekspresiju na razini proteina, a eksperimentom na živim stanicama mogli bi vidjeti promjene u arhitekturi jezgre u stvarnom vremenu nakon narušavanja određenih vlakana citoskeleta. Naši rezultati otvaraju novi prostor za istraživanje dinamike rastućeg tkiva i sprege jezgra-citoskelet.

Proučavanje dinamike rasta modelnih tkiva omogućuje nova saznanja o mehanizmima koji su odgovorni za razvoj i diferencijaciju tkiva. U ovom istraživanju vidjeli smo da je integritet citoskeleta važan u procesu rasta i diferencijacije. Bolje poznavanje međuovisnosti adhezije, migracije i kolektivnog ponašanja u normalnom tkivu može poslužiti za bolje

razumijevanje patoloških procesa poput metastaziranja tumora. Jedan od daljnjih ciljeva je da se bazična saznanja o rastu modelnih tkiva prošire na kompleksnije modele poput tumorskih stanica jer bolje poznavanje kolektivnog ponašanja stanica u tumorskom tkivu može pridonijeti razvoju novih protutumorskih terapija.

5 ZAKJUČAK

U ovom radu istraživali smo rast kružne kolonije stanične linije MDCK II. Stanice nasadene kao kap nakon trećeg dana rasta diferenciraju u 2 tipa stanica- stanice u središnjem i rubnom sloju kružne kolonije koje se međusobno razlikuju u brzini rasta i morfologiji. Ispitali smo razlike između dvije populacije stanica na razini citoskeletnih i adhezijskih proteina, te proteina nesprina koji povezuju stanični s jezgrinim skeletom.

1. Ograničavajući prostor u kojem stanice rastu povećava stres u stanicama središnjeg sloja, a fosforilacija inicijacijskog faktora eIF2 α jedan je od pokazatelja staničnog stresa i povećana je u gusto pakiranim stanicama u središtu kružne kolonije.
2. U stanicama središnjeg i rubnog sloja tijekom trećeg, četvrtog i petog dana rasta nema značajne razlike u ekspresiji proteina aktina, β tubulina i vinkulina. Četvrti i peti dan rasta pokretljivije stanice na rubu kružne kolonije imaju značajno veću količinu proteina vimentina.
3. Premda su β katenin i E kadherin u direktnoj interakciji, pronašli smo obrnuto proporcionalan odnos ekspresije E kadherina i β katenina u stanicama ruba i središta kružne kolonije. Pokretljivije stanice ruba imaju povećanu ekspresiju E kadherina, dok stanice središnjeg sloja imaju povećanu ekspresiju β katenina.
4. Očuvanost i integritet citoskeleta kao i mehanička svojstva okoline (mikrookoliš) su bitni za održavanje diferencijacije stanica unutar tkiva. Narušavanjem citoskeletnih vlakana gubi se diferencirani izgled stanica kružne kolonije.
5. Dva tipa stanica kružne kolonije razlikuju se u razini ekspresije nesprina-proteina vanjske jezgrine ovojnice koji su direktno vezani na vlakna citoskeleta. Stanice središnjeg sloja imaju više nesprina 1 dok stanice ruba imaju više nesprina 3.
6. Narušavanjem aktinskog citoskeleta dolazi do promjene u ekspresiji nesprina 1 te ga je nakon tretmana više u rubnim, a manje u središnjim stanicama. Utišavanje intermedijarnog filamena vimentina mijenja ekspresiju nesprina 3 te stanice ruba imaju manje nesprina 3 od središnjih stanica. Kvalitativno opisane razlike u ekspresiji nesprina daju uvid u moguće promjene u arhitekturi jezgre nakon narušavanja komponenti citoskeleta.

6 LITERATURA

- Alam S, Lovett DB, Dickinson RB, Roux KJ, Lele TP (2014). Nuclear forces and cell mechanosensing. *Prog Mol Biol Transl Sci* **126**: .
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York
- Artemenko Y, Axiotakis L, Borleis J, Iglesias PA, Devreotes PN (2016). Chemical and mechanical stimuli act on common signal transduction and cytoskeletal networks. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E7500–E7509.
- Barisic M, Maiato H (2016). The Tubulin Code: A Navigation System for Chromosomes during Mitosis. *Trends Cell Biol* **26**: 766–775.
- Bocchiaro P, Zamperini A World's largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The Visible Light Activity of the TiO₂ and TiO₂ : V₄ + Photocatalyst. *Biomed Eng trends Mater Sci*.
- Brosig M, Ferralli J, Gelman L, Chiquet M, Chiquet-Ehrismann R (2010). Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 1717–1728.
- Chancellory TJ, Lee J, Thodeti CK, Lele T (2010). Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation. *Biophys J* **99**: 115–123.
- Chang W, Worman HJ, Gundersen GG (2015). Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol* **208**: 11–22.
- Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE (2003). Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 355–361.
- Cooper GM, Hausman RE (2004). Stanica: Molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb
- Damania D, Subramanian H, Tiwari AK, Stypula Y, Kunte D, Pradhan P, *i sur* (2010). Role of cytoskeleton in controlling the disorder strength of cellular nanoscale architecture. *Biophys J* **99**: 989–996.
- Dillon C, Goda Y (2005). THE ACTIN CYTOSKELETON: Integrating Form and Function at

- the Synapse. *Annu Rev Neurosci* **28**: 25–55.
- Doherty GJ, McMahon HT (2008). Mediation, Modulation, and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions. *Annu Rev Biophys* **37**: 65–95.
- Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E (2012). Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front Immunol* **3**: 1–18.
- Driscoll TP, Cosgrove BD, Heo SJ, Shurden ZE, Mauck RL (2015). Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys J* **108**: 2783–2793.
- Etienne-Manneville S (2013). Microtubules in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 471–499.
- Fletcher DA, Mullins RD (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**: 485–492.
- Forgacs G (2004). Role of the cytoskeleton in signaling networks. *J Cell Sci* **117**: 2769–2775.
- Fuchs E (1994). Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease. *Annu Rev Biochem* **63**: 345–382.
- Gerlitz G, Jagus R, Elroy-Stein O (2002). Phosphorylation of initiation factor-2 α is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* **269**: 2810–2819.
- Hall A (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 5–14.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **15**: 507–525.
- Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov S V., Aebi U (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 562–573.
- Herrmann H, Strelkov S V., Burkhard P, Aebi U (2009). Intermediate filaments: Primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* **119**: 1772–1783.
- Jaqaman K, Grinstein S (2012). Regulation from within: The cytoskeleton in transmembrane signaling. *Trends Cell Biol* **22**: 515–526.
- Kaliman S, Jayachandran C, Rehfeldt F, Smith AS (2014). Novel growth regime of MDCK II model tissues on soft substrates. *Biophys J* **106**: .

- Kaverina I, Straube A (2011). Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 968–974.
- Ketema M, Sonnenberg A (2011). Nesprin-3: a versatile connector between the nucleus and the cytoskeleton. *Biochem Soc Trans* **39**: 1719–1724.
- Kim N-G, Koh E, Chen X, Gumbiner BM (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 11930–11935.
- King SJ, Nowak K, Suryavanshi N, Holt I, Shanahan CM, Ridley AJ (2014). Nesprin-1 and nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. *Cytoskeleton* **71**: 423–434.
- Lin J, Redies C (2012). Histological evidence: Housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol* **222**: 369–376.
- Liu L, Luo Q, Sun J, Song G (2016). Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. *Exp Cell Res* **348**: 56–65.
- Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem* **286**: 26743–26753.
- Mathieu PS, Lobo EG (2012). Cytoskeletal and Focal Adhesion Influences on Mesenchymal Stem Cell Shape, Mechanical Properties, and Differentiation Down Osteogenic, Adipogenic, and Chondrogenic Pathways. *Tissue Eng Part B Rev* **18**: 436–444.
- Mattila PK, Batista FD, Treanor B (2016). Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *J Cell Biol* **212**: 267–280.
- Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM (2011). Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 47–54.
- Mendez MG, Kojima SI, Goldman RD (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* **24**: 1838–1851.
- Morgan JT, Pfeiffer ER, Thirkill TL, Kumar P, Peng G, Fridolfsson HN, *i sur* (2011). Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-

- induced polarization. *Mol Biol Cell* **22**: 4324–4334.
- Nakaseko Y, Yanagida M (2001). Cytoskelton in the cell cycle. *Nature* **412**: 291–292.
- Neumann S, Schneider M, Daugherty RL, Gottardi CJ, Eming SA, Beijer A, *i sur* (2010). Nesprin-2 interacts with α -catenin and regulates Wnt signaling at the nuclear envelope. *J Biol Chem* **285**: 34932–34938.
- Pàmies P (2014). E-cadherin-guided migration. *Nat Mater* **13**: 664–664.
- Pessoa-Pureur R, Heimfarth L, Rocha JB (2014). Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2014**: .
- Prejac J (2012). UNUTARSTANIČNI SIGNALNI PUTEVI U KARCINOGENEZI KOLOREKTALNOG TUMORA Intracellular pathways in colorectal carcinogenesis. 25–34.
- Puliafito A, Hufnagel L, Neveu P, Streichan S, Sigal A (2011). Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition.
- Rajgor D, Shanahan CM (2013). Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Rev Mol Med* **15**: e5.
- Roux KJ, Crisp ML, Liu Q, Kim D, Kozlov S, Stewart CL, *i sur* (2009). Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2194–2199.
- Schmidt A, Hall MN (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 305–338.
- Silvestre J, Kenis PJA, Leckband DE (2009). Cadherin and integrin regulation of epithelial cell migration. *Langmuir* **25**: 10092–9.
- Starr DA, Fridolfsson HN (2014). Sun-kash Nuclear-envelope bridges. *HHS Public Access* 421–444.
- Sun B, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J (2015). Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression (Review). *Biomed Reports* 603–610.
- Szeverenyi I, Cassidy AJ, Cheuk WC, Lee BTK, Common JEA, Ogg SC, *i sur* (2008). The human intermediate filament database: Comprehensive information on a gene family

- involved in many human diseases. *Hum Mutat* **29**: 351–360.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**: 871–890.
- Tremblay D, Andrzejewski L, Leclerc A, Pelling AE (2013). Actin and microtubules play distinct roles in governing the anisotropic deformation of cell nuclei in response to substrate strain. *Cytoskeleton* **70**: 837–848.
- USUI T (2007). Actin- and Microtubule-Targeting Bioprobes: Their Binding Sites and Inhibitory Mechanisms. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 300–308.
- Uzer G, Fuchs RK, Rubin J, Thompson WR (2016). Concise Review: Plasma and Nuclear Membranes Convey Mechanical Information to Regulate Mesenchymal Stem Cell Lineage. *Stem Cells* **34**: 1455–1463.
- Wang N, Tytell JD, Ingber DE (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 75–82.
- Warren DT, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2005). Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* **7**: 1–15.
- Wickstead B, Gull K (2011). The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **194**: 513–525.
- Yang J, Weinberg RA (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev Cell* **14**: 818–829.
- Yilmaz M, Christofori G (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 15–33.
- Zoubiane GS, Valentijn A, Lowe ET, Akhtar N, Bagley S, Gilmore AP, *i sur* (2004). A role for the cytoskeleton in prolactin-dependent mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* **117**: 271–80.

www.thinglink.com/scene/756592505989890050

ŽIVOTOPIS

Ime

Ana Rastija

Obrazovanje:

2015. – 2017. **Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb (Hrvatska)
2012. – 2015. **Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije**
- Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zagreb (Hrvatska)
2008. – 2012. **XV. gimnazija**

Iskustvo:

- studeni 2016. – srpanj 2017. **Izrada diplomskog rada**
Institut Ruđer Bošković
Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za
eksperimentalnu terapiju
Tema: Utjecaj komponenata citoskeleta na diobu i
diferencijaciju modelnog tkiva
Mentorice: dr. sc. Marijeta Kralj, znanstvena savjetnica IRB, izv.
prof. dr. sc. Maja Matulić
- studeni 2015. – ožujak 2016. **Laboratorijska praksa**
Institut Ruđer Bošković
Zavod za molekularnu medicinu, laboratorij za translacijsku
medicinu
Tema: Istraživanje deficijencije enzima S-adenozilhomocistein
hidrolaze
Voditelj: dr.sc. Oliver Vugrek
- ožujak 2014. – lipanj 2015. **Laboratorijska praksa**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zavod za molekularnu biologiju, Laboratorij za epigenetiku
Voditelj: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
- listopad 2013. – studeni 2014. **Demonstratorica (kolegij Opća i anorganska kemija)**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Zavod za opću i anorgansku kemiju
- srpanj 2014. **Terenska nastava iz botanike i zoologije**

Projekti i ostalo:

2016.- voditelj radionice 'Stanica' na manifestaciji „Dan za znanost“ u Koprivnici

2016. - voditelj radionice „Noći biologije“, PMF

2016. - volontirala na „Znanstvenom pikniku 2016“

2015. – Organizacijski odbor za prvi „Simpozij Studenata Bioloških Usmjerenja“ 2015. g

2015. - Smotra Sveučilišta u Zagrebu