

# Tumor supresorski učinak Sirt3 i hiperoksije na stanice tumora dojke MCF-7

---

**Davidović, Grazia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:459040>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Grazia Davidović

**Tumor supresorski učinak Sirt3 i hiperoksije na stanice  
tumora dojke MCF-7**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, pod stručnim vodstvom dr. sc. Sandre Sobočanec i neposrednim vodstvom izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikića, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem mentorici dr.sc. Sandri Sobočanec na uloženom vremenu i trudu, ukazanom povjerenju, savjetima prilikom izvođenja eksperimenata, te vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem komentoru izv.prof.dr.sc. Domagoju Đikiću na njegovim savjetima, podršci i bezuvjetnoj pomoći.*

*Zahvaljujem dr.sc. Tihomiru Balogu koji je omogućio moj dolazak u Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, te na ukazanom povjerenju i podršci.*

*Zahvaljujem dr.sc. Ivi Škrinjar i mag.mol.biol. Mariji Pinterić na prijateljskim i znanstvenim savjetima.*

*Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na podršci tijekom izrade ovog rada.*

*Na kraju posebna zahvala i jedno veliko hvala mojoj obitelji i Luki na razumijevanju i podršci tijekom studija. Zahvaljujem na svim razgovorima i savjetima kojima su me usmjeravali na pravi put.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Tumor supresorski učinak Sirt3 i hiperoksije na stanice tumora dojke MCF-7

Grazia Davidović  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Oksidacijski stres i visoke razine reaktivnih kisikovih radikala izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost, koje dovode do promjene staničnog metabolizma i do gubitka kontrole staničnog ciklusa. Takvi uvjeti podržavaju stalni rast i proliferaciju, glavno obilježje tumorskih stanica. Iako se dugo raspravljalo o djelovanju čistog kisika (hiperoksije) kao promotora malignih bolesti, danas se hiperoksija koristi kao rutinska terapija u liječenju upravo takvih oboljenja. Sirtuin 3 (Sirt3) je glavna mitohondrijska NAD<sup>+</sup>-ovisna deacetilaza koja učinkovito sudjeluje u održavanju energetske homeostaze u stanicama. U ovom radu pokazan je tumor supresorski učinak Sirt3 u kombinaciji s hiperoksijom na humanim stanicama MCF-7. Pokazano je da *de novo* ekspresija Sirt3 u uvjetima normoksije uzrokuje tumor-supresivni fenotip smanjujući metaboličku aktivnost, stanični rast i proliferaciju tumorskih stanica. To je dodatno posredovano smanjenom ekspresijom pro-angiogenih gena i gena uključenih u epitelno mezenhimalnu tranziciju, povećanjem mitohondrijske funkcije, te smanjenjem broja tumorskih stanica i njihovim potencijalom za stvaranje kolonija. Dok tretman hiperoksijom samostalno inhibira rast tumorskih stanica, učinak Sirt3 kao tumor supresora u tim je uvjetima još izraženiji. Kombinirani učinak Sirt3 i hiperoksije na tumorske stanice MCF-7 ukazuje da bi njihov sinergistički učinak na lokalizaciju tumora i smanjivanje metastatskog potencijala trebalo dodatno istražiti kao potencijalnu terapiju za liječenje malignih oboljenja.

(57 stranica, 11 slika, 4 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: hiperoksija, sirtuin 3, rak dojke, angiogeneza, proliferacija

Voditelj: Dr. sc. Sandra Sobočanec, Dr. sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 5.4.2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### Tumor suppressive effect of Sirt3 and hyperoxia on MCF-7 breast cancer cells

Grazia Davidović  
Roosevelt square 6, 10000 Zagreb, Croatia

Oxidative stress and high levels of reactive oxygen species cause DNA damage and genomic instability, thus leading to changes in cell metabolism and loss of the cell cycle control. These conditions support continuous growth and proliferation, the main characteristics of tumor cells. Although the role of pure oxygen (hyperoxia) as a promoter of malignant diseases has long been debated, today hyperoxia is used as a routine therapy to treat such diseases. Sirtuin 3 (Sirt3) is the major mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase which keeps the cell in energetic homeostasis. This thesis presents tumor suppressing effect of Sirt3 combined with hyperoxia in human MCF-7 cells. *De novo* expressed Sirt3 in normoxia causes a tumor-suppressive phenotype that reduces metabolic activity, growth and proliferation of tumor cells, expression of pro-angiogenic genes and genes involved in epithelial mesenchymal transition, increases mitochondrial function, decreases number of tumor cells and potential for colony creation. Whilst hyperoxia alone inhibits the growth of tumor cells, Sirt3 exhibits even more pronounced tumor suppressing effects under these conditions. The combined effect of Sirt3 and hyperoxia on MCF-7 cells suggests that their synergistic effect on tumor localization and reduction of metastatic potential should be further explored as a potential therapy for malignant diseases.

(57 pages, 11 figures, 4 tables, 76 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: hyperoxia, sirtuin 3, breast cancer, angiogenesis, proliferation

Supervisor: Dr. sc. Sandra Sobočanec, Dr.sc. Domagoj Đikić, Assoc. Prof

Reviewers: Dr. sc. Domagoj Đikić, Assoc. Prof

Dr. sc. Tomislav Ivanković, Asst. Prof

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

Thesis accepted: 5.4.2018.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Oksidacijski stres i nastanak tumora.....	1
1.2. Sirtuini .....	4
1.3. Povezanost Sirt3 i tumora.....	7
1.4. Opći i specifični ciljevi rada.....	10
2. MATERIJALI I METODE .....	12
2.1. Kultura stanica in vitro.....	12
2.2. Transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA .....	12
2.3. Uvjeti normoksije i hiperoksije .....	13
2.4. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija .....	13
2.4.1. Imunofluorescencija.....	13
2.4.2. Konfokalna mikroskopija .....	14
2.5. Metode za određivanje ekspresije gena .....	14
2.5.1. Izolacija RNA (TRIZOL Reagent).....	14
2.5.2. Reverzna transkripcija .....	15
2.5.3. Real-time PCR analiza.....	16
2.6. Metode za određivanje ekspresije proteina.....	17
2.6.1. Izolacija proteina iz stanica .....	17
2.6.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom.....	17
2.6.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida.....	17
2.6.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu.....	18
2.6.5. Analiza proteina metodom Western blot .....	19
2.7. Metoda za određivanje vijabilnosti stanica – MTT test.....	20
2.8. Metoda za određivanje preživljenja stanica – CFA (test formiranja kolonija).....	21
2.9. FACS analiza – mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutarstaničnih RNV-a.....	21
2.10. Određivanje omjera mtDNA/nDNA.....	22
2.11. Određivanje konzumacije kisika.....	23
2.12. Utvrđivanje staničnog starenja bojanjem na endogenu $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost u kulturi stanica (SA- $\beta$ -gal).....	23
2.13. Statistička obrada podataka .....	24
3. REZULTATI .....	25
3.1. Karakterizacija klonova sa stabilnom ekspresijom Sirt3 u normoksiji i hiperoksiji .....	25
3.2. Konfokalna analiza stanične lokalizacije Sirt3 i mitohondrija unutar MCF-7 stanične linije .....	27

3.3. Tumor- supresijsko djelovanje Sirt3 na ekspresiju gena i proteina pojačano je u hiperoksiji	29
3.4. Sirt3 smanjuje metaboličku aktivnost i sposobnost stvaranja kolonija MCF-7 stanica.....	33
3.5. Sirt3 i hiperoksija povećavaju proizvodnju citosolnih i mitohondrijskih RKV-a.....	36
3.6. Hiperoksija inducira promjenu mitohondrijskih parametara ovisno o ekspresiji Sirt3 .....	37
3.7. Sirt3 antagonizira senescenciju.....	38
4. DISKUSIJA.....	41
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA.....	50
7. ŽIVOTOPIS.....	56



## POPIS KRATICA

ATP	adenozin trifosfat
cDNA	komplementarna DNA
cat	gen za katalazu
CoA	koenzim A
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol (engl. <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DCF	2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (engl. <i>2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> )
DiOC6(3)	3,3'-diheksiloksakarbocijanin jodid (engl. <i>3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide</i> )
DMSO	dimetilsulfoksid
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ER $\alpha$	estrogen receptor $\alpha$
ETC	transportni lanac elektrona (engl. <i>electron transport chain</i> )
esr-1	gen za estrogen receptor $\alpha$
FBS	serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	fluorescein izocijanat
GDH	glutamat dehidrogenaza
HRP	peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IDH2	izocitrat dehidrogenaza
IgG	imunoglobulin G
LCAD	dugolančana acil-CoA-dehidrogenaza (engl. <i>long-chain acyl CoA dehydrogenase</i> )
LDH	laktat dehidrogenaza
MLS	mitohondrijska lokalizirana sekvenca
mmp2	gen za matriks metaloproteinazu 2

mtDNA	mitohondrijska DNA
mt-nd1	gen za podjedinicu kompleksa I respiratornog lanca
mtRKV	mitohondrijske reaktivne kisikove vrste
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NAO	10-N-nonil akridin narančasto (engl. <i>10-N-nonyl acridine orange</i> )
nDNA	nuklearna DNA
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PGC-1 $\alpha$	receptor aktivacije proliferacije peroksisoma gamma koaktivator 1 alfa
PVDF	polivinilidenfluorid
qPCR	kvantitativni PCR
qH <sub>2</sub> O	pročišćena voda
RKV	reaktivne kisikove vrste
SDS-PAGE	natrij-dodecil sulfat elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Sirt3	sirtuin 3
sirt3	gen za sirtuin 3
Sod2	superoksid dismutaza 2
sod2	gen za superoksid dismutazu 2
Vegf	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
vegf-a	gen za vaskularni endotelni faktor rasta a
vegfr-1	gen za receptor vaskularno endotelnog faktora rasta 1

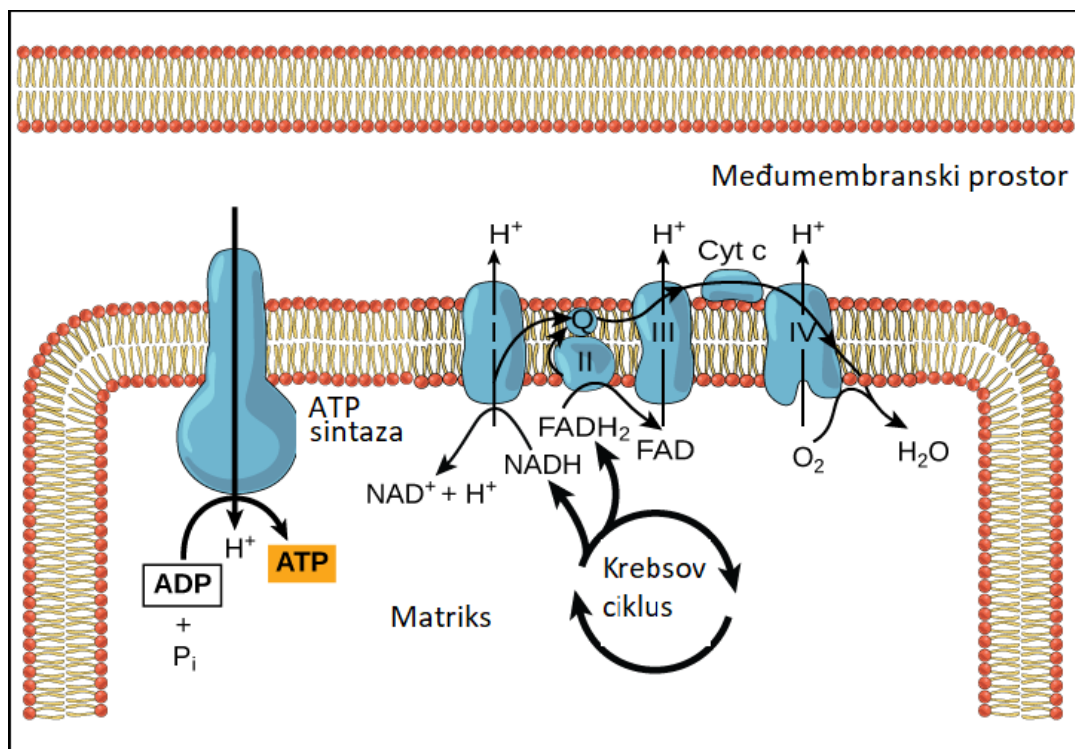
# 1.UVOD

## 1.1. Oksidacijski stres i nastanak tumora

Mitochondriji su organeli stanice koji se nalaze u svim aerobnim organizmima. Sudjeluju u regulaciji važnih staničnih procesa kao što su apoptoza, stanični metabolizam i održavanje razine kalcija (Murphy 2009). Tijekom procesa oksidacijske fosforilacije, elektroni se prenose uz pomoć transportnog lanca elektrona (ETC), a tijekom tog prijenosa stvara se transmembranski elektrokemijski gradijent protona (**Slika 1**). Nastali gradijent koristi se za proizvodnju ATP-a pomoću enzima ATP-sintaze. Održavanje transmembranskog potencijala preko unutrašnje membrane mitohondrija od presudne je važnosti za život stanice. Slabljenje mitohondrijske funkcije, osim što smanjuje sposobnost mitohondrija za stvaranje ATP-a, pojačava proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (RKV). RKV su proizvod molekularnog kisika, a generiraju se endogeno u procesu oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima, te u stanicama općenito fotokemijskim i enzimatskim reakcijama, te kao posljedica izloženosti ultraljubičastom zračenju ili ionima teških metala (Ray i sur. 2012; Nita i Grzybowski 2016). Mogu se podijeliti u dvije skupine: slobodni radikali (molekule s jednim ili više nesparenih elektrona) i neradikali.

U stanici kao produkte staničnog metabolizma nalazimo tri glavne RKV-a koje su od fiziološkog značaja za stanicu: superoksidni anion ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) (Birben i sur. 2012). Superoksidni anion nastaje izravno redukcijom kisika, te se dismutira u vodikov peroksid. Vodikov peroksid je molekula s niskom reaktivnošću, ali može lako prodrijeti u stanične membrane i Fentonovom reakcijom generirati najreaktivniju formu kisika, hidroksilni radikal (Nita i Grzybowski 2016). Niske razine RKV imaju važnu fiziološku ulogu, uključujući aktivaciju i modulaciju puteva prijenosa signala, modulaciju

aktivnosti redoks-osjetljivih transkripcijskih faktora i regulaciju aktivnosti mitohondrijskih enzima (Oberley 2002). Pri visokim razinama toksični su za stanicu i uzrokuju oksidacijski stres, stanje koje se definira kao poremećaj ravnoteže između proizvodnje RKV-a i antioksidacijske obrane (Betteridge 2000; Ray i sur. 2012; Oberley 2002). Oksidacijski stres dovodi do izavnog ili neizravnog oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida posredovanog djelovanjem RKV-a (Ray i sur 2012). Sve više istraživanja pokazuje da visoke razine RKV-a izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost, koji dovode do reprogramiranja staničnog metabolizma i u konačnici do gubitka kontrole staničnog ciklusa. Na ovaj način podržava se kontinuirani rast i proliferacija, glavno obilježje tumorskih stanica (Panieri i Santoro 2016; Hanahan i Weinberg 2011).



**Slika 1.** U oksidativnoj fosforilaciji, gradijent  $H^+$  koji nastaje na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani koristi ATP-sintazu za stvaranje ATP-a.  
(prilagođeno: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/oxidative-phosphorylation/a/oxidative-phosphorylation-etc>)

Osim što nastaju u normalnim metaboličkim procesima, RKV mogu biti produkti oksidacijskog stresa uzrokovanog povećanom koncentracijom kisika u stanici. Povećane koncentracije kisika posljedica su povećanog parcijalnog tlaka kisika pri atmosferskom tlaku koji uzrokuje hiperoksiju ( $pO_2 > 95\%$ ) (Berridge i Tan 1993). Dugotrajno izlaganje organizma hiperoksiji uzrokuje oksidacijski stres, stanje narušenog balansa između stvaranja RKV-a i mehanizma antioksidacijske obrane u stanici. Oksidacijski stres jedan je od glavnih čimbenika koji uzrokuju kronične upalne procese, degenerativne bolesti, pojavu tumora, kao i proces starenja (Ott i sur. 2007).

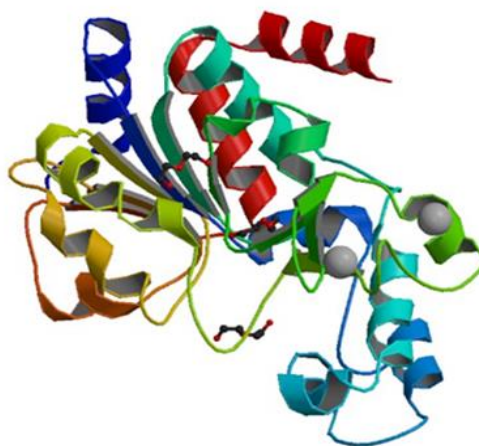
Pokazano je da tumorske stanice čak i pri normalnim koncentracijama kisika (normoksija) koriste veliku količinu glukoze i pri tome proizvode velike količine mliječne kiseline. Taj fenomen pretvorbe glukoze u mliječnu kiselinu u prisustvu kisika poznat je kao Warburgov efekt ili aerobna glikoliza (Yu i sur. 2016). Warburgov efekt je izvorna hipoteza da tumorske stanice razvijaju poremećaj u mitohondrijima koji dovodi do poremećaja u aerobnom disanju i naknadnom oslanjanju na glikolitički metabolizam (Vander Heiden i sur. 2009). Pokazalo se da su energijom bogati spojevi, nastali u glikolizi, povezani s aktivnim onkogenima (RAS, myc) i inaktivnim tumor supresor genima (p53) čija promjena u stanicama u prvom redu izaziva nekontroliranu proliferaciju i inhibiciju apoptoze (Hanahan i Weinberg 2011). Iako se u početku smatralo da je aerobna glikoliza rezultat prilagodbe na okoliš u prekarcinogenim lezijama, njena prisutnost u primarnim i metastatskim stanicama raka čak i u uvjetima normoksije upućuje na to da upravo aerobna glikoliza osigurava jaki selektivni rast kojeg prati progresija raka. Time se sugerira da je stjecanje takvog glikolitičkog fenotipa preduvjet za invazivni rast tumora i njegovu progresiju (Gatenby i Gillies 2004).

## 1.2. Sirtuini

Prvi puta okarakterizirani kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kao regulatori životnog vijeka (Sack i Finkel 2012), sirtuini (Sirt) su visoko očuvana obitelj proteina koja ima važnu ulogu u regulaciji procesa starenja u nižim organizmima, dok je njihova uloga u viših organizama znatno slabije istražena. Sirtuini djeluju kao NAD<sup>+</sup>-ovisne protein deacetilaze koje reguliraju razinu acetilacije proteina i aktivnost transkripcijskih faktora i histona. Nadalje, sudjeluju u regulaciji staničnog metabolizma, stresa i posreduju u signalnim putevima odgovornima za preživljenje stanica. Da bi sirtuini mogli učinkovito deacetilirati i time aktivirati proteine, potreban je nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) kao kofaktor u reakciji deacetilacije. Povezanost između NAD<sup>+</sup>, NADH i aktivnosti sirtuina ukazuje na to da sirtuini mogu služiti kao pokazatelji energetskeg statusa stanice. U sisavaca je pronađeno sedam različitih gena koji kodiraju za sirtuin proteine (Sirt1-7) s dobro očuvanim katalitičkim domenama. Istraživanja su pokazala da sirtuini kod sisavaca imaju jasnu lokalizaciju u stanici. Sirt1, 6 i 7 su nuklearni proteini, iako se frakcije Sirt-1 mogu naći i u citosolu. Peroksisomalni receptor aktivacije proliferacije 1 alfa (PGC-1 $\alpha$ ), glavni regulator mitohondrijske biogeneze, glavna je meta deacetilacije Sirt1 (Sack i Finkel 2012). Sirt2 se pretežito nalazi u citosolu, a neka istraživanja pokazuju da se u određenim situacijama nalazi u jezgri. Sirt3, 4 i 5 lokalizirani su samo u mitohondriju. Mitohondrijski sirtuini imaju važnu ulogu u kontroli RKV (Sack i Finkel 2012), a procjenjuje se da je čak 35% mitohondrijskih proteina uključenih u energetskeg metabolizam regulirano acetiliranjem, što upućuje na to da je acetiliranje jedan od ključnih oblika posttranslacijskog modificiranja proteina (Torrens-Mas i sur. 2017). Ova regulatorna uloga može biti posebno relevantna za moduliranje razvoja degeneracijskih stanja povezanih sa starošću (Sack i Finkel 2012). Istraživanja funkcije mitohondrijskog sirtuina Sirt3 postala su iznimno atraktivna zbog njegovog utjecaja na produljenje životnog vijeka čovjeka (Kincaid i Bossy-Wetzel 2013). Istodobno, dinamika acetiliranja mitohondrijskih proteina kao odgovor

na promjene u kalorijskoj restrikciji i kalorijskom suvišku sugeriraju da, kao što je slučaj sa Sirt1, Sirt3 može imati regulatornu ulogu koja regulira funkciju mitohondrijskih proteina (Sack i Finkel 2012).

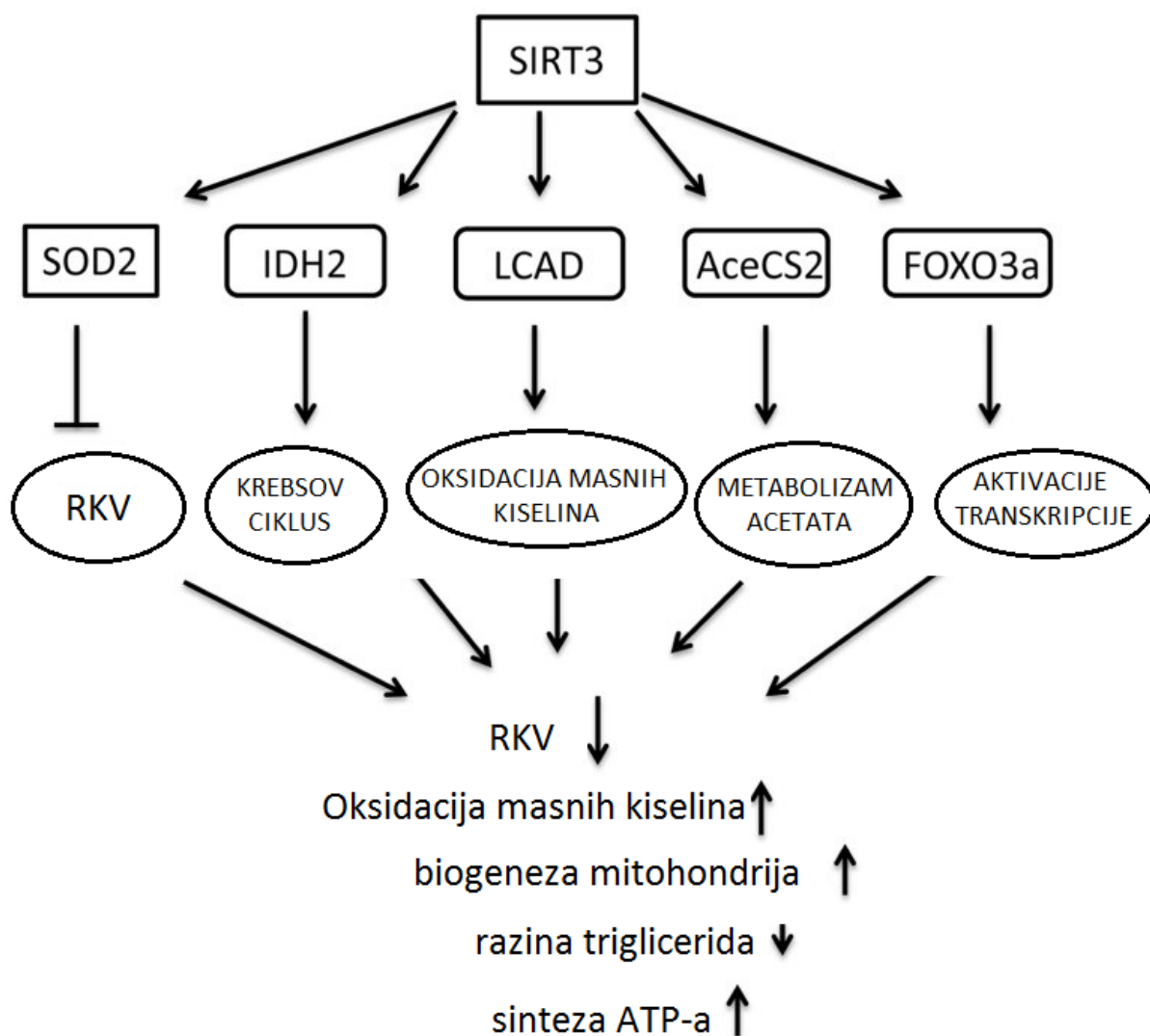
Gen *sirt3* čovjeka nalazi se na 11p15.5 kromosomu i kodira za mitohondrijski protein Sirt3 (**Slika 2**). Duži, enzimatski inaktivni oblici Sirt3 (44 kDa) unose se u mitohondrij N-terminalnim slijedom za unos u mitohondrij (MLS). Tijekom unosa dolazi do proteolitičkog uklanjanja MLS što rezultira katalitičkom aktivacijom kraćih oblika Sirt3 (28 kDa), koji su sposobni aktivirati ciljne mitohondrijske proteine (Schwer i sur. 2002). Sirt3 je glavna mitohondrijska deacetilaza, a ukoliko nije prisutna u stanici, dolazi do hiperacetilacije mitohondrijskih proteina što dovodi do slabljenja funkcije mitohondrija (McDonnell i sur. 2015). Sirt3 deacetilira dugolančanu acil-CoA-dehidrogenazu (LCAD), a među enzimima uključenim u Krebsov ciklus, deacetilira izocitrat dehidrogenazu (IDH2) i glutamat dehidrogenazu (GDH) (Dang 2014). Gubitak funkcije Sirt3 povezan je s razvojem tumora, jer mitohondrijski proteini postaju hiperacetilirani i stanice pokazuju povišen oksidacijski stres, što dovodi do nepravilnog funkcioniranja mitohondrija (Torrens-Mas i sur. 2017).



**Slika 2.** 3D struktura humanog proteina Sirt3 (preuzeto: <http://www.rcsb.org>)

Brojna istraživanja ukazuju na to da Sirt3 utječe na signalne puteve u mitohondriju uključujući proizvodnju ATP-a, mitohondrijski stres i metaboličku oksidaciju (McDonnell i sur. 2015). Sirt3 učinkovito održava ravnotežu između pretvorbe stanične energije i nepoželjnih nuspojava mitohondrijskih procesa kao što je nastanak RKV-a, tako što izravno deacetilira i aktivira glavni antioksidacijski enzim u mitohondriju, superoksid dismutazu 2 (Sod2) (Zhong i Mostoslavsky 2011; Murphy 2009). Aktivnost Sirt3 smanjuje se starenjem, u uvjetima prehrane bogate masnoćama, te u stanjima poput dijabetesa (Brown i sur. 2013), a povećava se kao odgovor na kalorijsku restrikciju ili tijekom vježbanja (Lombard i sur. 2007). Premda u uvjetima homeostaze Sirt3 ne igra značajnu ulogu, postoje brojni dokazi o njegovoj ključnoj ulozi u regulaciji staničnog odgovora na stres, kao i u procesu starenja (Brown i sur. 2013) (**Slika 3**).





**Slika 3.** Uloga Sirt3 (prilagođeno: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-molecular-targets-of-SIRT3-and-the-role-in-regulating-metabolism-in\\_fig2\\_252325451](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-molecular-targets-of-SIRT3-and-the-role-in-regulating-metabolism-in_fig2_252325451) )

### 1.3. Povezanost Sirt3 i tumora

Noviji podaci iz literature ukazuju na povezanost Sirt3 i progresije tumora, te je dokazano da Sirt3 može djelovati i kao onkogen i kao tumor supresor (Chen i sur. 2014). Sirt3 također ima značajnu ulogu u različitim signalnim putevima koji dovode do razvoja tumora. Tumorski supresor p53 je nedavno identificiran kao nova meta deacetiliranja putem Sirt3 (TY 2011). S jedne strane, Sirt3 je čuvar stanične homeostaze i ima ulogu tumor supresora, pa

gubitak funkcije Sirt3 doprinosi razvoju agresivnijeg fenotipa kod nekih tumora (Schumacker 2011; Giralt i Villarroya 2012). S druge strane, činjenice da Sirt3 djeluje na mitohondrijske enzime uključene u aktivaciju oksidativnih puteva, i da RKV imaju glavnu ulogu u progresiji tumora, upućuju na djelovanje Sirt3 kao onkogen. Stoga je sasvim opravdano pretpostaviti da prekomjerna ekspresija Sirt3 može održati povećanu razinu RKV-a za održavanje proliferacije i agresivnog fenotipa, čime se potiče karcinogeneza (Lai i sur. 2013). Ukratko, Sirt3 potiče opstanak i štiti stanice od oštećenja održavanjem mitohondrijskog integriteta, te povećanjem njihove otpornosti na apoptozu. Slično tome, prekomjerna ekspresija Sirt3 u tumorskim stanicama potiče signale preživljavanja, istovremeno suzbijajući apoptotičke signale, čime se potiče karcinogeneza (TY et al. 2011).

Neovisno o tome što tumorske stanice često žive u hipoksičnim uvjetima (McGranahan i Swanton 2017), njihovo opskrbljivanje krvlju, rast i preživljenje ovisi o njihovoj opskrbi kisikom i hranjivim tvarima (Stuhr i sur. 2007). Uz oksidativnu fosforilaciju, glikoliza je još jedan put koji stanicama daje energiju. U tumorskim stanicama često dolazi do značajnih promjena stope glikolize i oksidativne fosforilacije, ovisno o mikrookolišu i dostupnosti kisika. Tako se tumorske stanice pri niskim koncentracijama kisika (hipoksija) prebacuju na glikolizu. Stanice tumora, kao i različite zdrave stanice, često pokazuju visoke stope glikolize čak i u prisutnosti normalnih koncentracija kisika (normoksija) zbog čega važnu ulogu u njihovom metabolizmu ima Warburgov efekt (Epstein i sur. 2017). Promjenom metabolizma dolazi do povećanog lučenja laktata i do pada pH u tumorskom mikrookolišu koji djeluje proliferacijski i metastatski. Hipoteza invazije posredovana kiselinom sugerira da se  $H^+$  ioni izlučuju iz stanica tumora i difundiraju u mikrookoliš i uzrokuju promjenu u strukturi strome koja omogućuje povećanu invazivnost (Liberti i Locasale 2016). Stoga je za očekivati da će povećana koncentracija kisika (hiperoksija) djelovati kao promotor razvoja tumora.

Međutim, neki radovi su pokazali inhibiciju rasta tumorskih stanica u sisavaca nakon tretmana hiperoksijom (Stuhr i sur. 2007), što ukazuje da hiperoksija može inhibirati rast i proliferaciju tumorskih stanica. Pokazano je da hiperoksija smanjuje srednju gustoću žila kod tumora dojke, ukazujući na anti-angiogeni učinak hiperoksije u tumorskim stanicama, što je suprotno onome što se očekuje u "zdravom" tkivu (Raa i sur. 2007).

Sukladno takvim rezultatima, u ovom radu pokazani su:

- Utjecaj hiperoksije na proliferaciju, preživljenje, rast i vijabilnost, te mitohondrijsku funkciju stanica tumora dojke MCF-7
- Ulogu *de novo* ekspresije Sirt3 u regulaciji proliferacije, preživljenja, rasta i vijabilnosti, te mitohondrijske funkcije stanica tumora dojke MCF-7
- Sinergistički učinak Sirt3 i hiperoksije u regulaciji proliferacije, preživljenja, rasta i vijabilnosti, te mitohondrijske funkcije stanica tumora dojke MCF-7

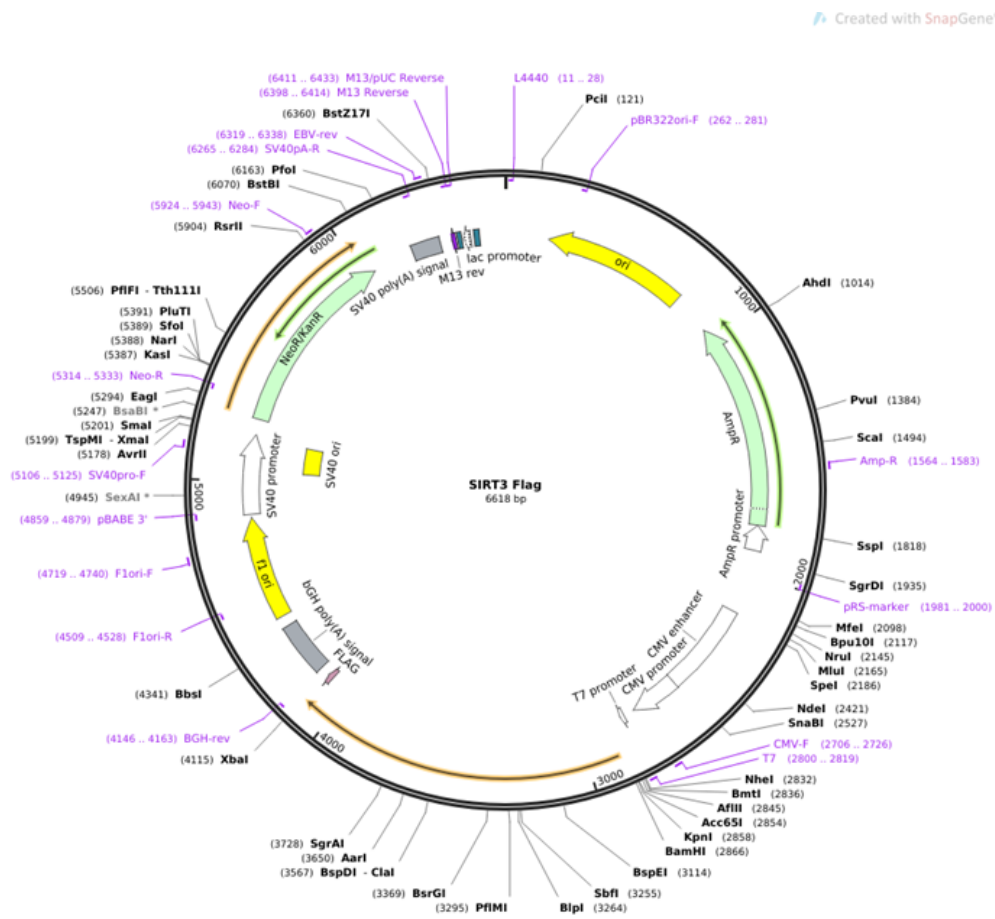
#### 1.4. Opći i specifični ciljevi rada

U ovom radu ispitali smo učinak hiperoksije i Sirt3 na proliferaciju, preživljenje, rast i vijabilnost, te oksidacijski/antioksidacijski status i mitohondrijsku funkciju stanica tumora dojke MCF-7. Do sada je pokazano da hiperoksija i Sirt3 zasebno mogu imati inhibitorско djelovanje na progresiju tumora, ali nije pokazano njihovo međudjelovanje kao ni moguća kombinirana upotreba ova dva čimbenika u terapijske svrhe.

Opći cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj Sirt3 i hiperoksije na stanice MCF-7. Iako se dugo sumnjalo da povećana koncentracija kisika ima promotorski učinak na razvoj raka, danas je ustanovljeno da čisti kisik ima inhibitorni učinak na tumorske stanice neovisno o tome što povećana koncentracija RKV-a nastala izlaganjem hiperoksičnim uvjetima podržava kontinuirani rast i proliferaciju (Hanahan i Weinberg 2011). Danas se izlaganje čistom kisiku (hiperoksija) koristi kao metoda u liječenju zloćudnih oboljenja (Moen i Stuhr 2012). Do sada se pokazala kao vrlo uspješna, međutim točan mehanizam djelovanja hiperoksije na stanice raka još uvijek nije poznat. Jedan od ciljeva ovog rada je stoga bio odrediti utjecaj hiperoksije na proliferaciju, preživljenje, rast i vijabilnost, te mitohondrijsku funkciju u stanicama MCF-7.

Specifični cilj rada bio je, u istom modelu stanica, odrediti utjecaj ekspresije Sirt3 na metabolizam, sposobnost metastaziranja i poticanja angiogeneze. U tu svrhu koristili smo suvremene molekularne, biokemijske i mikroskopske metode. Obzirom da stanice MCF-7 ekspimiraju vrlo malu količinu sirt3, istražili smo utjecaj njegove pojačane ekspresije. Klonovi stanica stabilno transficiranih plazmidom koji sadrži gen za Sirt3 (**Slika 4**) podvrgnuti su hiperoksiji kako bi se utvrdilo ima li Sirt3 zaštitni učinak na rast tumorskih stanica. S obzirom da se Sirt3 nalazi u mitohondrijima istražena je uključenost mitohondrija u te procese s posebnim naglaskom na moguće reprogramiranje stanica na oksidacijsku fosforilaciju. Ispitan je i učinak djelovanja ekspresije sirt3 u stanicama raka na njihov metastatski potencijal,

te na čimbenike angiogeneze s ciljem procjene agresivnosti stanica MCF-7 prije i nakon tretmana hiperoksijom. U tu svrhu određena je ekspresija mRNA i proteina nekih čimbenika uključenih u razvoj raka.



Slika 4. Plazmid pcDNA3.1+Flag-Sirt3 (preuzeto: <https://www.addgene.org/13814/>)

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Kultura stanica in vitro

U ovom istraživanju korištena je stanična linije tumora dojke MCF-7 (engl. *Human Caucasian breast adenocarcinoma* (Cat.no.: ECACC 86012803, Public Health, England)). Stanice MCF-7 su adherentne epitelne stanice osjetljive na estrogen. Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi (DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*), Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (engl. *Fetal bovine serum*, FBS, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 1% neesencijalnih aminokiselina (EuroClone, Italija) i antibiotika GA-1000 koji sadrži 30 mg/mL gentamicina i 15 µg/mL amfotericina (Lonza, SAD). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama za uzgoj kulture stanica u inkubatoru pri 37°C, vlažnoj atmosferi i prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA

Za transfekciju je korišten plazmid pcDNA3.1+Flag-Sirt3 koji sadrži gen za Sirt3 označen s oznakom Flag (Flag-Sirt3, Addgene Cat.No. 13814). Ovaj plazmid osim toga sadrži gen za otpornost na ampicilin za selekciju u bakteriji, te gen za otpornost na neomicin za selekciju stanica u kulturi. Kao kontrola korišten je neoznačeni pcDNA3.1+ plazmid. Plazmid i su nakon umnažanja u bakteriji DH5α pročišćeni pomoću PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Koncentracija dobivenog plazmida određena je na instrumentu za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina Qubit (ThermoFisher Scientific, SAD), a odsutnost degradacije provjerena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Za transfekciju plazmida pcDNA3.1+ Flag-Sirt3 u stanice MCF-7 korišten je Lipofectamine 2000 reagens (ThermoFisher Scientific, SAD). Dan prije transfekcije, 150 000 stanica nasadeno je u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića u hranjivoj podlozi DMEM-FCS. Sljedeći

dan su stanice transficirane pomoću Lipofectamine 2000 prema uputama proizvođača i ostavljene u inkubatoru 24 sata. Stanicama je zatim zamijenjena hranjiva podloga svježom, ostavljene su u svježem DMEM-FCS još 48 sati, rasadene i uzgajane dalje u selektivnoj podlozi s Geneticinom (200  $\mu$ L/mL G418, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Ekspresija Flag-Sirt3 u izdvojenim klonovima provjerena je real-time PCR (qPCR) metodom kako bi se potvrdila stabilna ugradnja Flag-sirt3 gena u stanice.

### 2.3. Uvjeti normoksije i hiperoksije

Kako bi se uspostavili uvjeti normoksije i hiperoksije, stanice su izložene hiperoksiji (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) kroz 44 sata u komori za hiperoksiju (StemCell™ Technology Inc., Canada) pri 37°C, dok su kolonije stanica za uvjete normoksije bile izložene standardnim uvjetima za rast u inkubatoru (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.4. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija

#### 2.4.1. Imunofluorescencija

U svaki od 24 bunarića pločice za uzgoj kulture stanica stavljeno je stakalce na koje je dodano 300  $\mu$ L seruma. Nakon 2 sata serum je uklonjen i nasadeno je 7000 stanica po stakalcu te su inkubirane 72 sata kako bi se prihvatile na stakalca, a zatim 44 sata u uvjetima hiperoksije. Nakon tretmana stanice su isprane 1x PBS-om i na njih je dodan 200 nM MitoTracker Deep red (TermoFisher Scientific, SAD) pripremljen u hranjivoj podlozi DMEM-FCS. Stanice su inkubirane 45 minuta u inkubatoru u mraku. Nakon inkubacije stanice su isprane 2 puta 1x PBS-om i fiksirane 2%-tnim PFA u PBS-u 15 minuta u inkubatoru. Uslijedila je permeabilizacija stanica s 0.1% tritonom u PBS-u tijekom 10 minuta u inkubatoru u mraku. Stanice su isprane 3 puta s 1x PBS-om i inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi s 1% BSA u PBS-u. Zatim je na stanice dodano primarno protutijelo anti-Sirt3 (razrjeđenje 1:100, Santa

Cruz Biotechnology, SAD) i inkubirano 3 sata u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon ispiranja 3 puta s 1x PBS-om stavljeno je sekundarno protutijelo anti-mouese iz kože konjugirano sa FITC GaM (engl. Goat anti-Mouse IgG (H+L) Fluorescein-5-isothiocyanate Secondary Antibody, Proteintech, SAD) i inkubirano 1 sat u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije stanice su isprane 1x PBS-om i na njih je dodano 100 $\mu$ l DAPI boje (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Aldrich, SAD) za bojanje jezgara, te su stanice inkubirane 2 minute na sobnoj temperaturi. Stanice su potom isprane 1x PBS-om i pohranjene u mediju za uklapanje pri 4°C do analize na konfokalnom mikroskopu.

#### 2.4.2. Konfokalna mikroskopija

Uzorci dobiveni metodom imunofluorescencije analizirani su pomoću konfokalnog mikroskopa tj. sekvencijalnim skeniranjem na Leica TCS SP8 X laser skenirajućem mikroskopu, opremljenom s HC PL APO CS2 63 $\times$ /1.40 imerzijskim objektivom i laserom bijele svjetlosti (Leica Microsystems). Valne duljine ekscitacije i emisije korištenih za detekciju iznose: 405 nm i 420-477 nm za DAPI, 490 nm i 500-600 nm za FITC, 644 nm i 667-780 nm za Deep red.

### 2.5. Metode za određivanje ekspresije gena

#### 2.5.1. Izolacija RNA (TRIzol Reagent)

Nakon tretmana hiperoksijom stanice su isprane ledenim PBS puferom, te je na stanice dodan 1 mL trizola (TRIzol Reagent, Life technologies, SAD) i lizat je resuspendiran nekoliko puta. Stanice su zatim inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodano 200 $\mu$ L kloroforma (Kemika, Hrvatska). Stanice su inkubirane 5 minuta na ledu, centrifugirane pri 12000 g 15 minuta pri 4°C, nakon čega su dobivene tri faze. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo je odvojena, te joj je dodan isti volumen izopropanola (Kemika,



Hrvatska). Otopina je nekoliko puta lagano promiješana, inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirana 10 minuta pri 12000 g i 4°C. Supernatant je dekantiran, na talog je dodan 1 mL 75% etanola (Kemika, Hrvatska) te su uzorci promiješani i centrifugirani 5 minuta pri 7500 g i 4°C. Ovaj postupak ispiranja 75%-tnim etanolom ponovljen je još jednom, nakon čega je supernatant dekantiran. Nakon 10 minuta sušenja na zraku, talog je otopljen u 20 µL qH<sub>2</sub>O tretirane DEPC-om (Sigma Aldrich, SAD). Koncentracija i kvaliteta (čistoća) RNA izmjerena je na uređaju NanoDrop (ThermoFisher Scientific, USA) koji iz omjera apsorbancije 260/280 određuje čistoću izolirane RNA (omjer treba biti oko 2.0). Kvaliteta RNA dodatno je provjerena elektroforezom na 1% agaraznom gelu (1 g/100 mL 1x TAE pufera) 20 minuta na 80 V. Po završetku elektroforeze gel je stavljen na 10 minuta u etidij bromid (Sigma Aldrich, SAD) i slikan na instrumentu UVITEC (UVItec Limited, UK).

#### 2.5.2. Reverzna transkripcija

Izolirana RNA prevedena je u cDNA reverznom transkripcijom u konačnom volumenu 10 µL. Na 1 µg RNA dodan je 1 µL 1 U/µL deoksiribonukleaze (DNAze) (Life technologies, SAD), 1 µl 10x pufera za DNAzu (Life technologies, SAD) i qH<sub>2</sub>O do konačnog volumena. Nakon inkubacije 15 minuta pri sobnoj temperaturi dodan je 1 µL 25 mM EDTA (pH 8.0; Invitrogen, SAD) kako bi se inhibirala DNAza te su uzorci inkubirani 10 minuta pri 65°C. Potom su uzorci stavljeni u led i u svaki je dodan 1 µl 10x početnica oligo d(T)<sub>18</sub> i 1 µl 100mM dNTP-a, te su inkubirani 5 minuta pri 94°C. Zatim je dodano 4 µl 5x First-Strand Buffera (Life technologies, SAD), 2 µl 0,1 M DTTa (Life technologies, SAD) i 1 µl 20 U/µL ribonukleaznog inhibitora (Life technologies, SAD). Nakon inkubiranja 2 minute pri 94°C, u uzorke je dodan po 1 µL 200 U/µL reverzne transkriptaze, te je uslijedila reakcija reverzne transkripcije pri 42°C tijekom 90 minuta. Cjelokupni produkt reakcije (cDNA) razrijeđen je s qH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 100 µL i spremljen pri -20°C. Tako dobivena cDNA korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR analiza).

### 2.5.3. Real-time PCR analiza

Real-time PCR (qPCR) proveden je na ABI 7300 Real Time PCR System-u (Applied Biosystems) korištenjem komparativne CT ( $\Delta\Delta C_T$ ) metode opisane u protokolu Taqman® Gene Expression Assay Protocol (Applied Biosystems) za određivanje razine ekspresije gena *sirt3*, a prema uputama proizvođača. Reakcije su se odvijale u ukupnom volumenu od 20  $\mu$ L korištenjem 10  $\mu$ L reagensa TaqMan® Gene Expression Master Mix reagent (Applied Biosystems, SAD), 50 ng cDNA kao kalupa, 1  $\mu$ L 20x odgovarajućih početnica (**Tablica 1**), te qH<sub>2</sub>O do konačnog volumena. Za 2 gena (*vimentin* i *slug*) korišten je Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK) prema uputama proizvođača, s početnicama napravljenima isključivo za tu analizu (**Tablica 1**). Uzorci su nanešeni u triplikatu. Relativna razina ekspresije gena izračunata je korištenjem  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metode.

**Tablica 1.** Početnice korištene za real-time PCR analizu

Gen	ID (TaqMan®) / početnice (Power SYBR™ Green)	Veličina produkta (bp)
<b>beta-aktin</b>	Hs99999903_m1	171
<b>sirt3</b>	Hs00953477_m1	83
<b>vegf-a</b>	Hs00900058_m1	81
<b>sod2</b>	Hs01553554_m1	69
<b>mt-nd1</b>	Hs02596873_s1	143
<b>vegfr1</b>	Hs01052936_m1	72
<b>sirt1</b>	Hs01009005_m1	94
<b>Cat</b>	Hs00156308_m1	68
<b>slug</b>	5'-GAGGAGAAAATGCCTTTG -3' 5'-ATGAGCAATCTGGCTGCT -3'	119
<b>vimentin</b>	5'-CGTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA -3' 5'-CCAAACTTTTCTCCCTGAACC-3	142

## 2.6. Metode za određivanje ekspresije proteina

### 2.6.1. Izolacija proteina iz stanica

Nakon tretmana hiperoksijom stanice su isprane hladnim sterilnim PBS-om, tripsinizirane, te potom centrifugirane 5 minuta pri 300 g i 4°C. Dobiveni talog resuspendiran je u 50 µL RIPA pufera (Radioimmunoprecipitation Assay buffer) (TermoFisher Scientific, SAD) s inhibitorima proteaza (Roche, SAD). Stanice su premještene u mikroeprevete i razbijene ultrazvukom pomoću ultrazvučne sonde veličine 1 mm (1 ciklus, 80 amplituda) (Labsonic® M, B. Braun Biotech International, Sartorius group, SAD). Nakon toga lizat stanica je centrifugiran 20 minuta pri 16000 g i 4°C, a iz dobivenog supernatanta izmjerena je koncentracija proteina BCA metodom (engl. *Bicinchoninic acid protein assay*).

### 2.6.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom

Za određivanje proteina BCA metodom korištena je mikrotitarska pločica s 96 bunarića. U bunariće je nanoseno 25 µL odgovarajućeg standarda otopine albumina iz goveđeg seruma, 1 µL uzorka proteina razrijeđenog s 24 µL PBS-a i 25 µL PBS-a kao slijepe probe. U svaki bunarić dodano je 200 µL otopine za određivanje proteina (BCA Protein Assay Kit, TermoFisher Scientific, SAD) razrijeđenog u omjeru 1:50. Uzorci su inkubirani 30 minuta pri 37°C. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija pri valno duljini  $\lambda=570$  nm na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD). Na temelju podataka dobivenih za otopine proteina albumina različitih koncentracija izrađena je baždarna krivulja pomoću koje je određena koncentracija proteina u pojedinim uzorcima.

### 2.6.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida

Proteini su, ovisno o veličini, razdvojeni u 10% ili 12% denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Gel se sastoji od dva dijela puferirana pri različitom pH: 10% donji gel (pH 8.8) za razdvajanje (**Tablica 2**) i 4% gornji gel (pH 6.8) za sabijanje uzoraka (**Tablica 3**). Elektroforeza je tekla pod naponom 100 V u 10% puferu za elektroforezu (30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5) dok proteini nisu došli do dna gela, što je određeno praćenjem standarda molekularne težine proteina Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BIO-RAD, SAD).

**Tablica 2.** Sastav smjese za donji gel

Sastojak	Volumen (mL)
4xTris HCl	3,75
H <sub>2</sub> O	7,5
Akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)	0,00375
APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,15
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	0,015

**Tablica 3.** Sastav smjese za gornji gel

Sastojak	Volumen (mL)
4xTris HCl	1,25
H <sub>2</sub> O	3,25
Akrilamid (Sigma Aldrich, SAD)	0,5
APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,025
TEMED (Sigma Aldrich, SAD)	0,005

#### 2.6.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

Nakon razdvajanja proteina denaturirajućom elektroforezom u gelu poliakrilamida, proteini su s gela prenešeni na odgovarajuću membranu. Korištena je PVDF membrana (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, BIO-RAD, SAD), veličine pora 0,2 µm. Prijenos je tekao pri konstantnoj jakosti struje od 350 mA 90 minuta uz pufer za prijenos (0,025

M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5). Za prijenos proteina korišten je sustav Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, SAD).

#### 2.6.5. Analiza proteina metodom Western blot

Nakon prijenosa proteina, membrana je uz lagano miješanje ispirana 10 minuta u PBS-u, te je određena učinkovitost prijenosa i kontrola nanošenja proteina korištenjem boje Amido black 10B (Merck Millipore, SAD). Membrana je inkubirana 30 sekundi u otopini za bojanje (0,1% (m/V) Amido black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O), odbojana u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) 2 puta po 30 minuta i isprana u ReH<sub>2</sub>O kako bi se uklonila octena kiselina. Zatim je membrana inkubirana 2 puta po 15 minuta u TN puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, dH<sub>2</sub>O). Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, membrana je inkubirana u otopini za blokiranje (5% mlijeko u prahu u TN puferu) 1 sat pri 37°C. Nakon toga je uslijedilo vezanje primarnog protutijela inkubacijom membrane u otopini odgovarajućeg primarnog protutijela pri 4°C preko noći (**Tablica 4**). Prije primjene sekundarnog protutijela membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u TNT puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X, dH<sub>2</sub>O). U otopini sekundarnog protutijela membrana je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje. Sekundarno protutijelo anti-rabbit porijeklom iz kunića konjugirano s peroksidazom hrena HRP (engl. ECL Anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase, Amersham, Biosciences, UK). Nakon inkubacije membrane u otopini sekundarnog protutijela, membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u TNT puferu. Za detekciju signala membrana je inkubirana tijekom 1 minute u luminiscentnom supstratu ECL (PerkinElmer, SAD, Pierce, SAD) pripremljenom miješanjem otopina A i B u omjeru 1:1. Nakon toga membrana je prekrivena prozirnrom plastičnom folijom i signal reakcije kemiluminiscencije izmjeren je pomoću uređaja UVITEC (UVItec Limited, UK).

**Tablica 4.** Primarna i sekundarna protutijela korištena u Western blot analizi

<b>Protutijelo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Razrjeđenje (u otopini za blokiranje)</b>
<b>Monoklonsko anti-Sirt3</b>	Cell Signaling Technology, SAD	Zec	1:400
<b>Poliklonsko anti-LDH</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	Zec	1:500
<b>Poliklonsko anti-Sod2</b>	Abcam, UK	Zec	1:1000
<b>Poliklonsko anti-PGC1<math>\alpha</math></b>	Novus Biologicals, SAD	Zec	1:1000
<b>Poliklonsko anti-Cat</b>	Abcam, UK	Zec	1:500
<b>Monoklonsko anti-p53 (DO-1)</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	Miš	1:2000
<b>Poliklonsko anti-gammaH2AX</b>	Abcam, UK	Zec	1:2000
<b>Monoklonsko anti-Sirt1</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	Zec	1:300
<b>Sekundarno anti-rabbit IgG</b>	Amersham Biosciences, UK	Magarac	1:2000
<b>Sekundarno anti-mouse IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	Govedo	1:2000

## 2.7. Metoda za određivanje vijabilnosti stanica – MTT test

Tetrazolijeva sol MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] se koristi za ispitivanje proliferacije i citotoksičnosti, tj. vijabilosti stanica (Mosmann 1983). Metaboličkom redukcijom MTT-a (blijedo-žuti supstrat) nastaje formazan (intenzivno tamno-plavo obojeni krajnji produkt). Test je proveden u mikrotitarskoj pločici s 96 bunarića u koje je dan prije tretmana nasadeno 7000 stanica. Nakon tretmana hiperoksijom, uklonjena je

hranjiva podloga sa stanica, dodano je 40  $\mu$ l 1x MTT-a te su stanice inkubirane 4 sata u inkubatoru. Nakon inkubacije u svaki bunarić je dodano po 160  $\mu$ L DMSO (dimetilsulfoksid) i stanice su inkubirane 20 minuta uz lagano miješanje. Apsorbancija je izmjerena pri valnoj duljini  $\lambda=570$  nm na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD).

## 2.8. Metoda za određivanje preživljenja stanica – CFA (test formiranja kolonija)

Metoda bojenja kolonija stanica bojom Giemsa koristi se za određivanje preživljenja stanica nakon tretmana citostatikom ili zračenjem. Obzirom da se ovaj test temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da stvori koloniju, isti je pogodan za određivanje stupnja malignosti stanica (Franken i sur. 2006). U Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica od 6 cm nasadeno je po 2000 stanica u 5 mL DMEM-FCS, stanice su inkubirane preko noći, te su idući dan stavljene u hiperoksiju. Nakon tretmana, svim eksperimentalnim grupama promijenjena je hranjiva podloga, te su Petrijeve zdjelice inkubirane 14 dana dok nisu izrasle golim okom vidljive kolonije stanica. Kolonije stanica isprane su 1 x PBS-om, fiksirane 10 minuta u 100%-tnom metanolu i sušene 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim su bojane Giemsa bojom tijekom 30 minuta te isprane vodom i sušene. Kolonije su izbrojane i preživljenje stanica je određeno u odnosu na kontrolni uzorak u kojem stanice nisu bile izložene hiperoksiji.

## 2.9. FACS analiza – mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutarstaničnih RNV-a

Za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi$ ) korištena je cijanin kationska boja DiOC6(3) (3,3-dihexiloksakarbocijanin jodid, Enzo Life Science, SAD) koja se akumulira u matriksu mitohondrija i ovisna je o  $\Delta\Psi$  (Perry et al. 2011). Za mjerenje mase mitohondrija korištena je boja NAO (10-N-nonyl acridine orange, Invitrogen, SAD) koja se specifično veže na kardiolipin, fosfolipid prisutan samo u mitohondrijskoj unutarnjoj

membrani (Perry et al. 2011). Za mjerenje unutarstaničnih RKV-a korištene su boje H2DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Sigma, SAD; prilikom oksidacije se pretvara u fluorescentni DCF (2',7'-dichlorofluorescein (Abdel Khalek i sur. 2014))) i MitoSOX Red (ThermoFisher Scientific, SAD). Stanice u suspenziji (300 000 stanica/uzorak) su inkubirane 30 minuta u mraku pri 37°C s odgovarajućom bojom u PBS-u (40 nM DiOC6(3), 50 nM NAO, 5 µM H2DCFDA, 5 µM MitoSOX Red). Nakon inkubacije stanice su isprane 1x PBS-om i resuspendirane u 200 µL PBS-a, te su analizirane protočnim citometrom (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences, SAD) u FL1 ili FL2 kanalu. Za isključivanje mrtvih stanica korišten je propidij jodid (10 µM) koji je dodan u suspenziju stanica neposredno prije analize i praćen u FL3 kanalu. Kao negativna kontrola korištene su stanice tretirane s 1x PBS-om. Prilikom analize sakupljeno je minimalno 10000 događaja. Sakupljeni podaci analizirani su u programu FCS Express version 3.

## 2.10. Određivanje omjera mtDNA/nDNA

Ukupna DNA izolirana je pomoću AccuPrepR genomskog DNA ekstrakcijskog kita (Bioneer, Inc., SAD) iz taloga stanične kulture MCF-7 stanica koji sadrži 2-5 x 10<sup>5</sup> stanica, koristeći protokol proizvođača. Kvaliteta i količina izolirane DNA ispitivana je pomoću gel elektroforeze i Qubit™ 3.0 Fluorometra (ThermoFisher Scientific, SAD). DNA uzorci su fragmentirani do veličine od oko 1000 bp pomoću Bioruptor® sonication sustava (Diagenode, Liège, Belgija). Broj kopija mitohondrijske DNA (mtDNA) određen je qPCR kvantifikacijom mitohondrijskog gena mt-ND1 (NADH dehidrogenaza, podjedinica 1, kompleks I) u odnosu na nuklearnu endogenu kontrolu, gen β-aktin (Taqman® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Velika Britanija). Standardni uvjeti termičkog ciklusa postignuti su korištenjem ABI PRISM Sequence Analyzer 7300 (Applied Biosystems, UK). Broj kopija mtDNA određen je za svaki uzorak posebno korištenjem omjera mtDNA / nDNA. Prosječne C<sub>T</sub> vrijednosti izračunate su iz tehničkih replikacija za mtDNA i nDNA. Relativni sadržaj mtDNA izračunat



je kako je opisano (Sobočanec i sur. 2010), koristeći formulu:  $2 \times 2 (\Delta C_T)$ , pri čemu je  $\Delta C_T$  iznosio razliku između gena  $\beta$ -aktin i  $C_T$ -vrijednosti za mt-ND1 gen (nDNA  $C_T$ -mtDNA  $C_T$ ).

### 2.11. Određivanje konzumacije kisika

Stanična konzumacija kisika određena je polarografički pomoću Clark type elektrode (Oxygraph, Hansatech, Norfolk, UK) u hermetički zatvorenoj komori pri 35°C. Stanice ( $10^7$ ) su se tijekom mjerenja nalazile u respiracijskom puferu: 20 mM HEPES pH=7.4, 10 mM  $MgCl_2$  i 250 mM saharoza otopljena u  $qH_2O$ . Nakon mjerenja bazalnog respiracijskog stanja, na stanice je dodan 2,5  $\mu M$  antimicin, inhibitor kompleksa III, kako bi se zaustavila stanična respiracija. Konzumacija kisika izražena je kao  $pmol/min/10^6$  stanica, a rezultati su normalizirani u odnosu na kontrolu.

### 2.12. Utvrđivanje staničnog starenja bojanjem na endogenu $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost u kulturi stanica (SA- $\beta$ -gal)

Aktivnost endogene  $\beta$ -galaktozidaze u stanicama se koristi kao biljeg za stanično starenje, a takve stanice pokazuju gubitak sposobnosti stvaranja kolonija. U posudu za kulturu stanica (4 x 1 cm) 24 sata prije tretiranja hiperoksijom nasadeno je po 4 x  $10^5$  stanica. SA- $\beta$ -gal bojanje izvedeno je tako što su stanice fiksirane 10 minuta u 1% glutaraldehidu otopljenom u DMEM mediju pri sobnoj temperaturi, isprane dva puta s 1 x PBS i inkubirane u otopini koja je sadržavala 1 mg/ml supstrata za  $\beta$ -galaktozidazu X-gal (engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoides*) u puferu za bojanje (sadrži 40 mM limunske kiseline / Na fosfatnog pufera pH=6.0, 0,5 mM kalij-ferocijanida, 5 mM kalijevog ferocijanida, 150 mM NaCl i 2 mM  $MgCl_2$ ) pri 37°C. Nakon inkubacije od 16 sati, senescentne stanice su izbrojane korištenjem Olympus IX50 mikroskopa (Olympus, Japan) pod objektivom povećanja 20x. Stanice su fotografirane i izračunat je postotak SA- $\beta$ -gal-pozitivnih stanica.

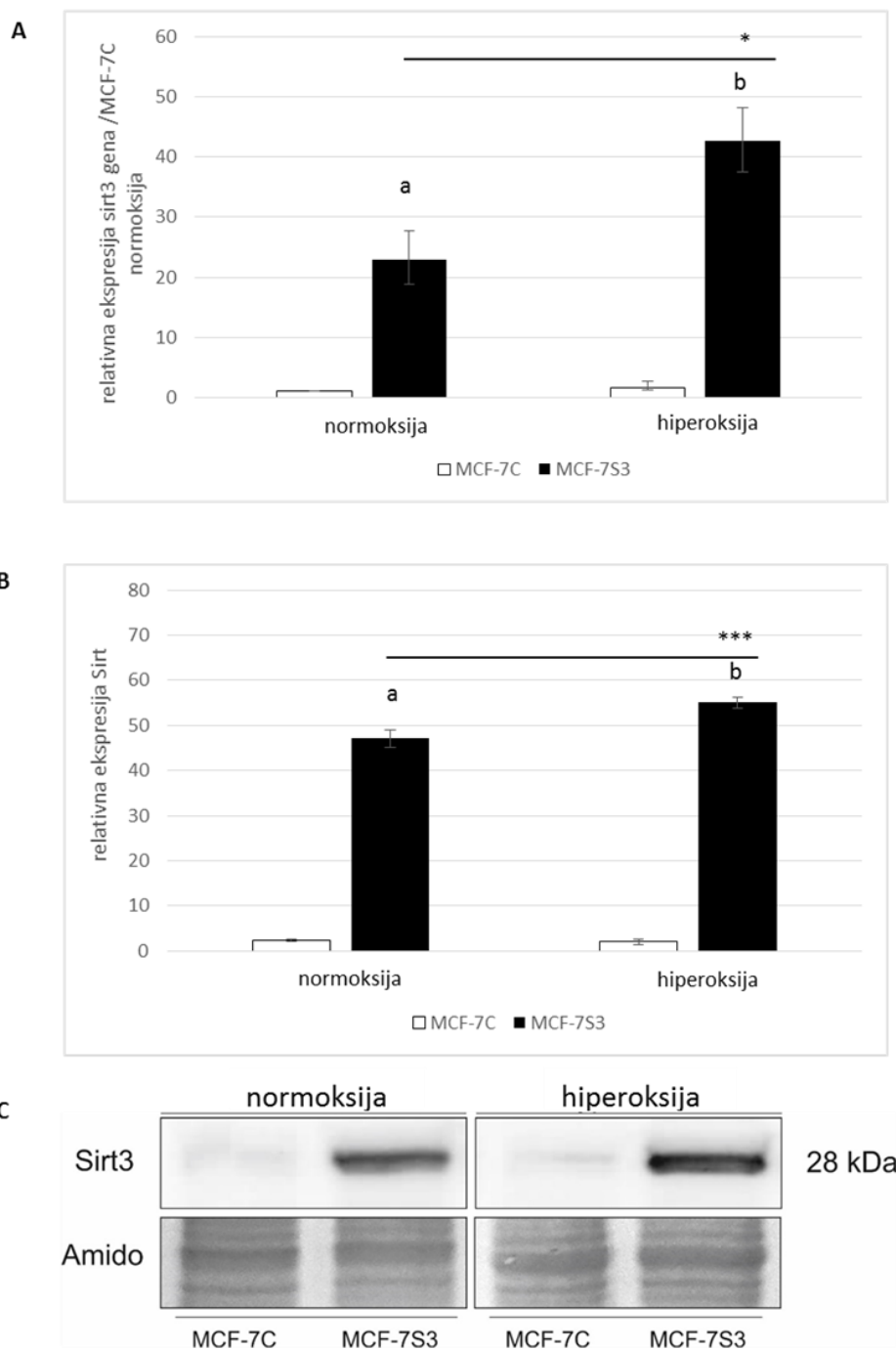
### 2.13. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je u programu R v2.15.3 (CRAN) i RStudio for Windows, v 0.97 programima. Rezultati svih metoda obrađeni su korištenjem parametrijskih ili neparametrijskih metoda ovisno o broju uzoraka, njihovoj raspodjeli i veličini. Prije svih obrada, uzorci su ispitani na normalitet raspodjele Shapiro-Wilk testom. U slučaju normalne raspodjele uzoraka, parametrijski testovi napravljeni su pomoću jednosmjerne ANOVA analize uz post-hoc Tukey test za međusobno uspoređivanje više od dvije skupine uzoraka. Ukoliko podaci nisu ulazili u normalnu raspodjelu, provedene su neparametrijske analize: neparametrijska Kruskal-Wallis ANOVA uz Mann-Whitney U test za određivanje razlike između dvije grupe. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5% ( $p < 0.05$ ).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Karakterizacija klonova sa stabilnom ekspresijom Sirt3 u normoksiji i hiperoksiji

S obzirom na činjenicu da MCF-7 stanice tumora dojke pokazuju nisku gensku ekspresiju sirt3, za koji je pokazano da ima svojstva tumor supresora i tumor promotora u različitim stanicama raka, kreirani su klonovi sa stabilnom endogenom ekspresijom Sirt3. Kako bi se utvrdio učinak stabilne ekspresije proteina Sirt3 na karakteristike MCF-7 stanica u uvjetima normoksije i hiperoksije, u ovom radu korišten je plazmid pcDNA3.1.+ Flag-Sirt3 s Flag-označenim Sirt3 (6618 pb) (**Slika 4**) izoliran iz bakterija, koji je zatim transfekcijom unesen u MCF-7 stanice. Kao kontrola korištene su MCF-7 stanice s ugrađenim praznim plazmidom pcDNA3.1.+ , za koje se prethodno utvrdilo da imaju prosječnu gensku ekspresiju , ali nemaju endogenu proteinsku ekspresiju Sirt3. Ova je skupina stanica definirana kao klon MCF-7C i korištena je kao negativna kontrola. Stanice s ugrađenim pcDNA3.1.+ Flag-Sirt3 definirane su kao klon MCF-7S3 s visoko eksprimiranom razinom Sirt3 proteina. Kako bi se potvrdilo da odabrani klonovi imaju različitu razinu ekspresije, korištene su metode qPCR i western blot analize (**Slika 5A**). Western blot analizom potvrdili smo vrlo slab signal proteina Sirt3 kod MCF-7C, dok je razina proteinske ekspresije Sirt3 kod MCF-7S3 ekvivalentna molekularnoj težini od 28 kDa, a povećava se nakon tretmana hiperoksijom (**Slika 5B, 5C**).

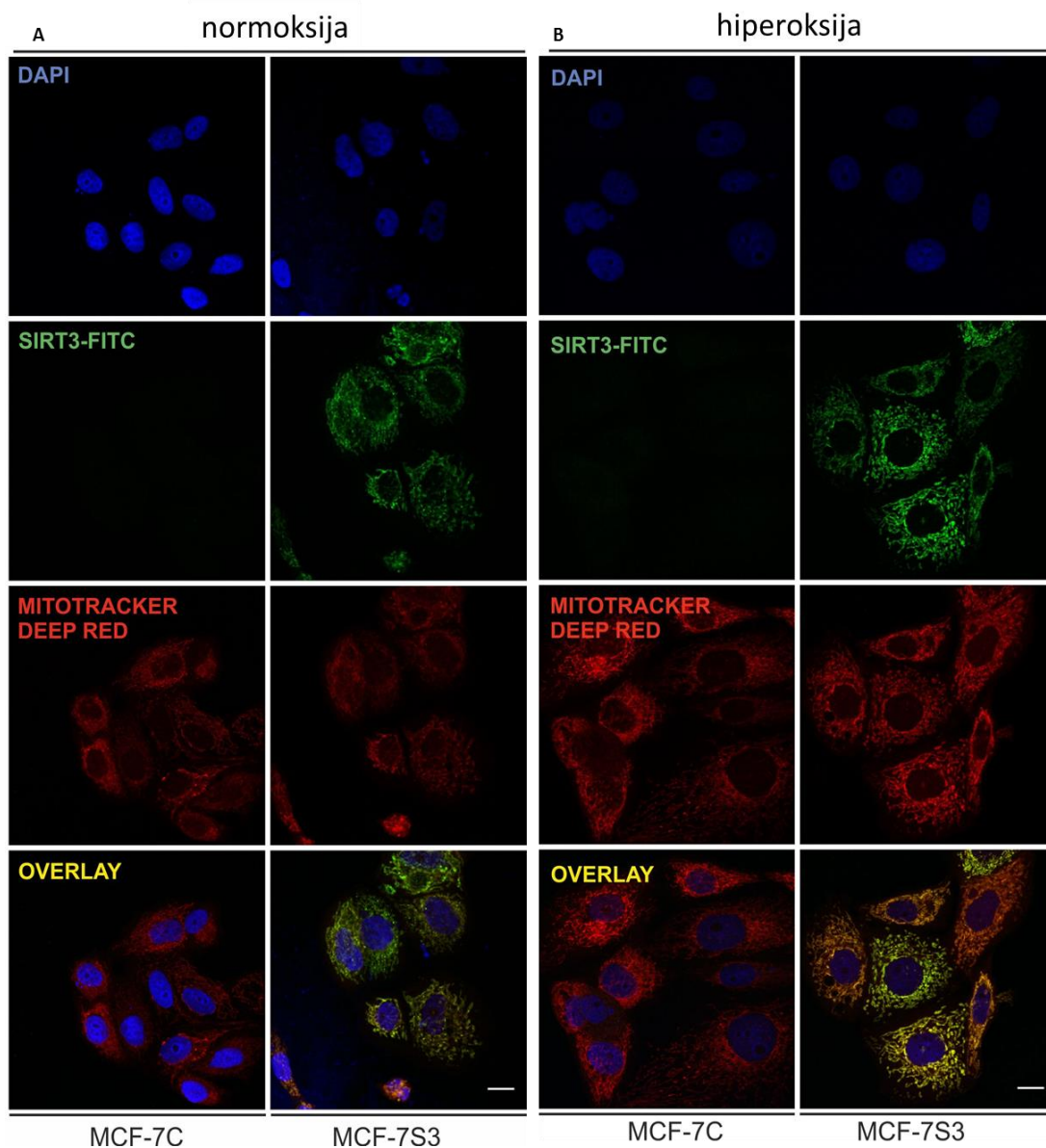


**Slika 5. Karakterizacija klonova MCF-7 stanične linije i ekspresija Sirt3 u normoksiji i hiperoksiji.** (A) Real-time PCR analiza genske ekspresije sirt3 u klonovima MCF-7C i MCF-7S3. Povećanje od 23 puta kod klona MCF-7S3 u normoksiji i povećanje od 43 puta u hiperoksiji: <sup>a,b</sup> $p < 0.001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; \* $p < 0.05$ , MCF-7S3 normoksija vs. hiperoksija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost promjene ekspresije  $\pm$  S.E. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. (B) Western blot analiza proteinske ekspresije klonova MCF-7 i MCF-7S3 u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija:

<sup>a</sup>p<0.001, MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup>p<0.001, MCF-7C vs. MCF-7S3; <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, MCF-7S3 normoksija vs. hiperoksija. (C) Reprezentativni prikaz gela western blot analize ekspresije Sirt3 proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala.

### 3.2. Konfokalna analiza stanične lokalizacije Sirt3 i mitohondrija unutar MCF-7 stanične linije

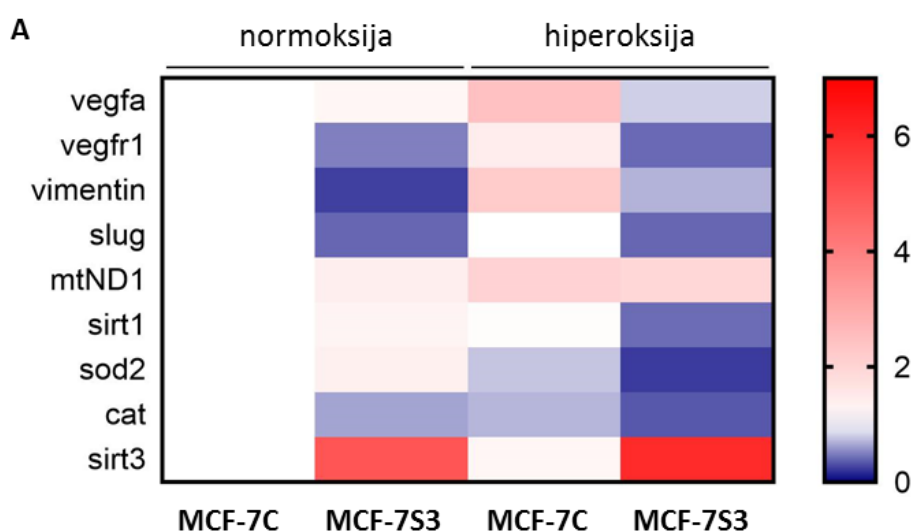
Lokalizacija Sirt3 unutar stanice kao i inteziteti fluorescencijskih signala analizirani su metodom imunofluorescencije uz korištenje konfokalnog mikroskopa. Rezultati pokazuju odsutnost signala kod MCF-7C, dok je jasan signal uočen kod MCF-7S3 i povećava se u hiperoksiji. Takvi rezultati ukazuju na *de novo* ekspresiju Sirt3 u MCF-7S3 stanicama u normoksiji i hiperoksiji s jačim signalom u stanicama nakon tretmana hiperoksijom (**Slika 6A, 6B**). Daljnjom konfokalnom analizom htjeli smo utvrditi potencijalnu lokalizaciju Sirt3 (zeleno) u mitohondrijima pomoću boje Mitotracker Deep red (crveno) koja specifično boji mitohondrije. Preklapanjem dvaju signala (žuto) potvrđena je lokalizacija Sirt3 u mitohondrijima. Isto tako, pokazano je da hiperoksija potiče mitohondrijski signal u oba klona. Takvi podaci pokazuju da hiperoksija povećava neke od mitohondrijskih parametara kao što su masa i potencijal u oba klona, dok je to povećanje još veće kod klona s *de novo* ekspresijom Sirt3.



**Slika 6. Imunofluorescencijska analiza stanične lokalizacije Sirt3 u klonovima MCF-7C i MCF-7S3 u normoksiji i hiperoksiji.** Sirt3 je detektiran uz pomoć antitijela vezanog na FITC (Sirt3-FITC, zelena boja). Lokalizacija mitohondrija je detektirana bojom Mitotracker Deep red (MITOTRACKER, crvena boja). Na preklopljenim slikama (OVERLAY) vidi se potpuno preklapanje signala za Sirt3 (zeleno) s mitohondrijskim signalom (crveno) u klonovima MCF-7S3. Jezgre su obojene u plavo uz pomoć boje DAPI. Mjerilo iznosi 15  $\mu\text{m}$ . (A) Normoksija, (B) hiperoksija.

### 3.3. Tumor- supresijsko djelovanje Sirt3 na ekspresiju gena i proteina pojačano je u hiperoksiji

Kako bi se utvrdio mehanizam kojim Sirt3 i hiperoksija utječu na tumorigenske karakteristike i potencijal MCF-7 stanica, istražili smo ekspresiju gena uključenih u antioksidacijsku zaštitu (sod2, cat), metaboličku regulaciju (sirt1), mitohondrijski prijenos elektrona (mtND1), angiogenezu (vegfa i vegfr1) i epitelno mezenhimalnu tranziciju (EMT, vimentin i slug) (**Slika 7A**). Otkrili smo da de novo Sirt3 ekspresija u normoksičnim MCF-7S3 stanicama regulira pro-angiogeni gen vegfr1 koji je uključen u proliferaciju stanica bez utjecaja na ekspresiju gena vegfa. Osim toga, Sirt3 je snažno regulirao EMT markere - vimentin i slug, u usporedbi s kontrolnim klonovima. Ekspresija pro-angiogenih gena vegfa, vimentin i mtND1 povećana je u hiperoksiji. Sirt3 u hiperoksiji smanjuje ekspresiju gena uključenih u antioksidacijsku obranu, sod2 i cat, zajedno sa sirt1, a smanjuje se i ekspresija gena slug i vegfr1. Takvi rezultati upućuju na tumor supresorski učinak Sirt3 u normoksiji na pro-angiogene gene i gene uključene u metastaziranje. Tumor supresorski učinak Sirt3 još je više izražen nakon tretmana hiperoksijom.



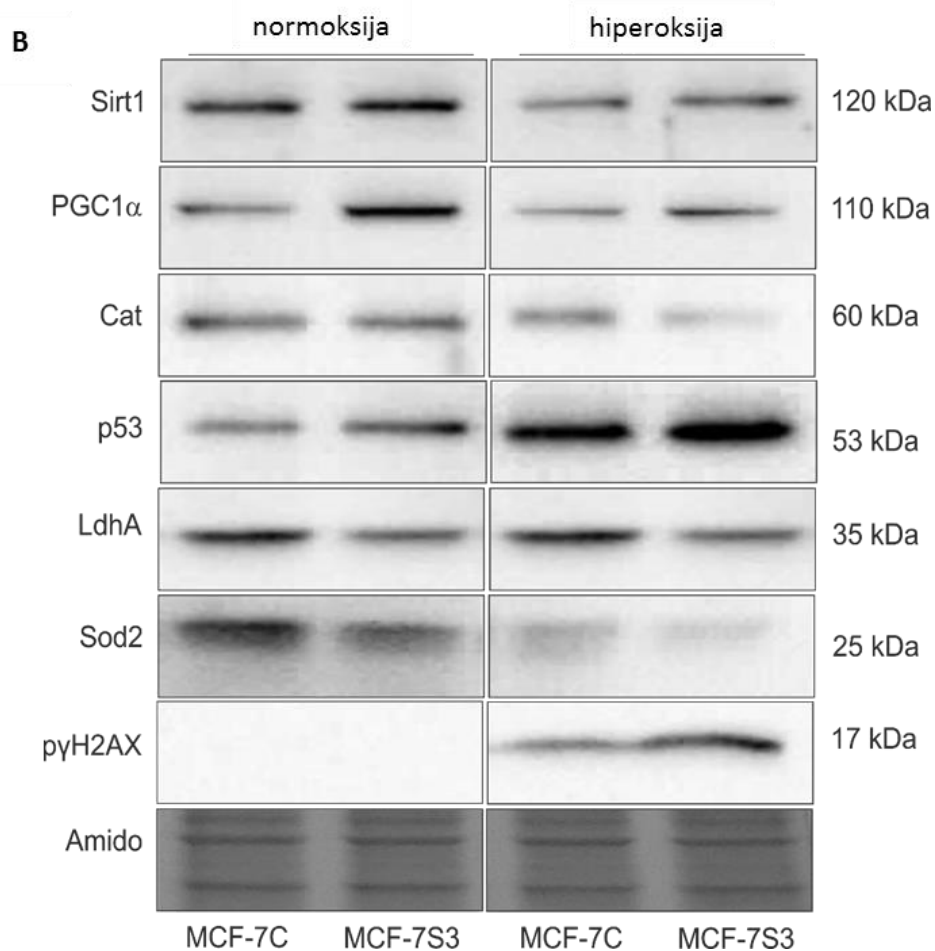
**Slika 7A.** „Heat mapa“ diferencijalne ekspresije gena, određena pomoću kvantitativne PCR metode u realnom vremenu. Promjena u genskoj ekspresiji izračunata je metodom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$\Delta\Delta CT$  koristeći  $\beta$ -aktin kao endogenu kontrolu. Boja kvadrata odgovara srednjoj logaritamskoj vrijednosti promjena iz tri biološka i tri tehnička replikata Beta aktin je korišten za normalizaciju. Normoksija MCF-7S3: vegfr1-fold change -2,0, p <0,05; vimentin - fold-change: -4,76, p <0,001; slug - fold-change: -2,70, p <0,05. Hiperoksija MCF-7C: vegfa - fold-change: +2,0, p <0,05; vimentin - fold-change: +2,17, p <0,01; mtND1 - fold-change: +2,0, p <0,05. Hyperoxia MCF-7S3: vegfr1 - fold-change: -2,43, p <0,05; slug - fold-change: -3,84, p <0,01; sirt1 - fold-change: -2,38, p <0,05; sod2-fold-change: -4,34, p <0,001; cat - fold-change: -2,94, p <0,01.

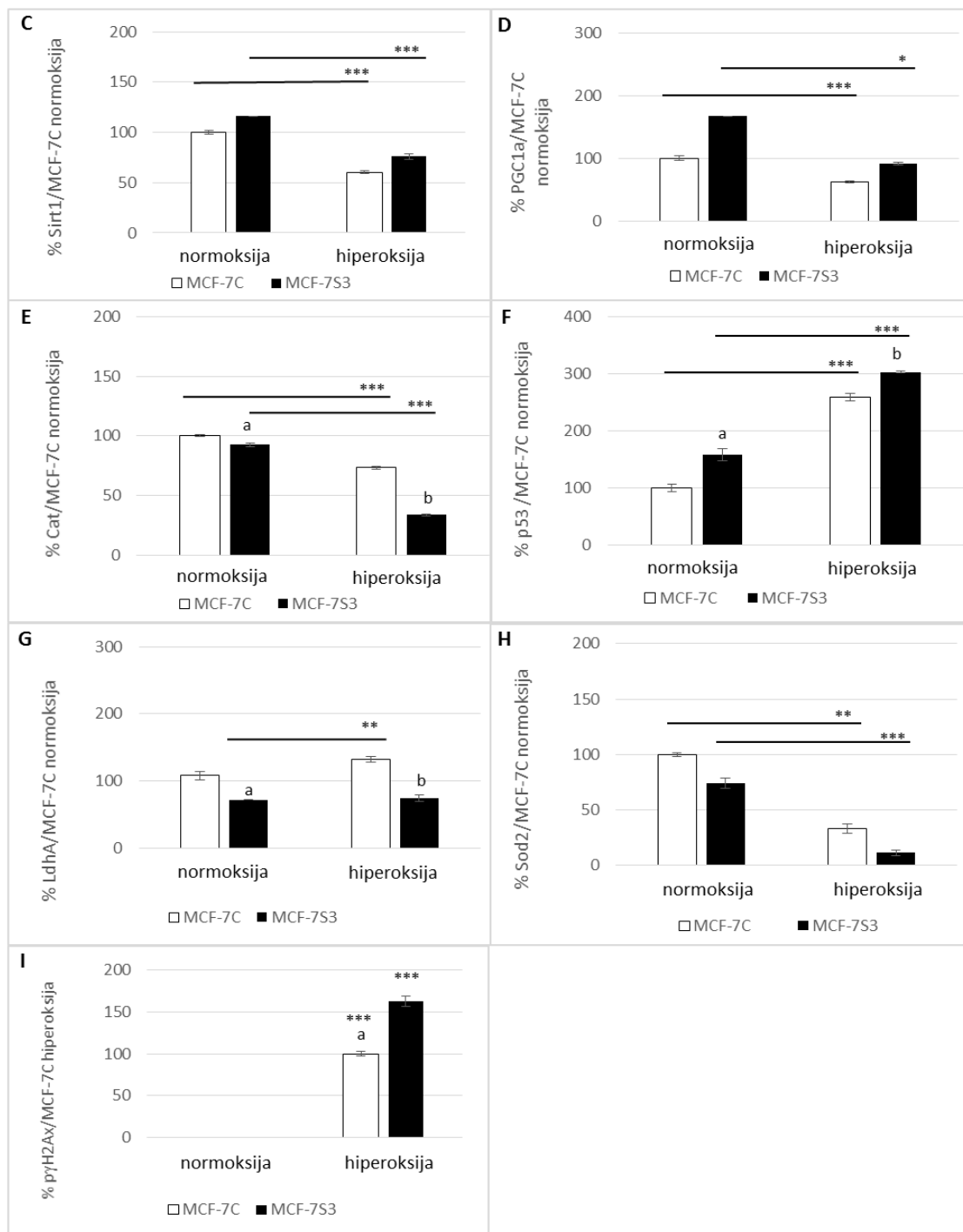
Dalje smo htjeli istražiti je li ovaj uzorak regulacije slijedio promjene u ekspresiji proteina uključenih u antioksidacijsku zaštitu, mitohondrijski prijenos elektrona, angiogenezu i epitelno mezenhimalnu tranziciju. Stoga smo testirali ekspresiju proteina koji su uključeni u glikolizu (LdhA), antioksidacijsku obranu (Sod2 i Cat), staničnu homeostazu (Sirt1) i mitohondrijsku biogenezu (PGC-1 $\alpha$ ) stanica MCF-7. LdhA, marker aerobne glikolize, koji se smatra ključnim enzimom glikolitičkog fenotipa tumorskih stanica, inhibiran je u MCF-7S3 stanicama. Hiperoksija je značajno povećala LdhA ekspresiju u MCF-7C u usporedbi s njihovom normoksičnom skupinom, dok je Sirt3 dokinuo taj učinak. Sod2 i Cat pokazali su sličan uzorak ekspresije: ekspresija je smanjena u MCF-7S3 stanicama, dodatno smanjena u hiperoksiji, a gotovo potpuno odsutna u MCF-7S3 stanicama u hiperoksiji. Hiperoksija smanjuje razinu Sirt1 proteina, neovisno o ekspresiji Sirt3. Ekspresija PGC-1 $\alpha$  znatno je povećana u MCF-7S3 stanicama, ali je smanjena kod MCF-7C stanica u hiperoksiji, dok je Sirt3 djelomično povećao razinu ekspresije u MCF-7S3 stanicama u hiperoksiji. Budući da je poznato da hiperoksija inducira oštećenje DNA, željeli smo provjeriti ekspresiju markera dvolančanog loma DNA – fosforilirani histon  $\gamma$ H2AX (p $\gamma$ H2AX) i glavnog tumorskog supresora, p53. U MCF-7C stanicama u normoksiji p $\gamma$ H2AX je odsutan, zbog čega je ekspresija p53 slaba, ali ipak malo povećana u MCF-7S3 stanicama. Kao što se očekivalo, hiperoksija je inducirala p $\gamma$ H2AX, što pokazuje jasan znak oštećenja DNA, inducirano



velikom koncentracijom RKV-a, koji je u korelaciji sa ekspresijom Sirt3. To je također povezano s povećanom ekspresijom p53, kolektivno sugerirajući da u kombinaciji s hiperoksijom, Sirt3 regulira glavni supresor tumora nakon oštećenja DNA, što može djelovati u korist inhibicije promocije tumora (**Slika 7B-7I**).



**Slika 7B. Razine proteinske ekspresije Sirt1, PGC-1 $\alpha$ , Cat, p53, LdhA, Sod2 i pyH2AX.** Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani su reprezentativni gelovi western blot analize ekspresije proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala.

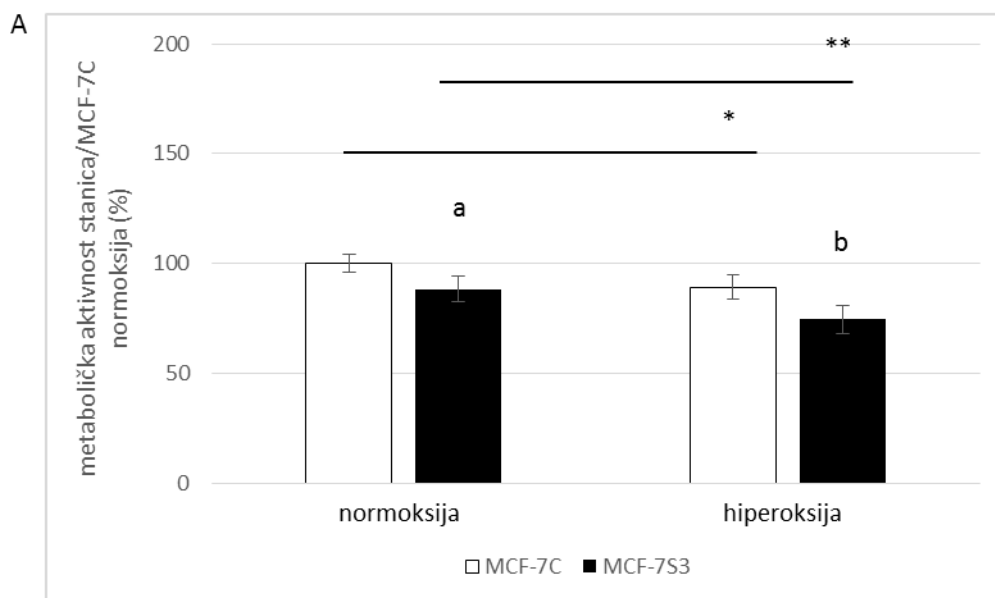


**Slika 7C-I. Grafička analiza gelova western blot analize ekspresije proteina.** Jednosmjerna ANOVA spost-hoc Tukey testom: **(C)** Sirt1, normoksija: <sup>a</sup>p<0.01, MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup>p<0.01, MCF-7C vs. MCF-7S3. \*\*\*p<0.001, normoksija vs. hiperoksija. **(D)** PGC-1α, normoksija: <sup>a</sup>p<0.001, MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup>p<0.001, MCF-7C vs. MCF-7S3. \*\*\*p<0.001, normoksija vs. hiperoksija; \*p<0.05, normoksija vs. hiperoksija. **(E)** Cat, normoksija: <sup>a</sup>p<0.05, MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup>p<0.001, MCF-7C vs. MCF-

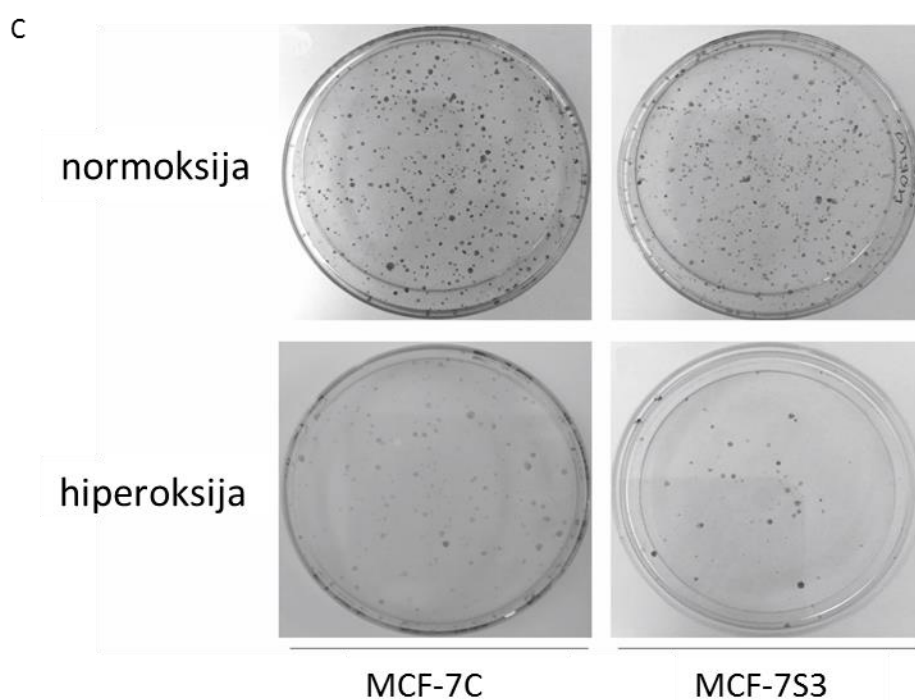
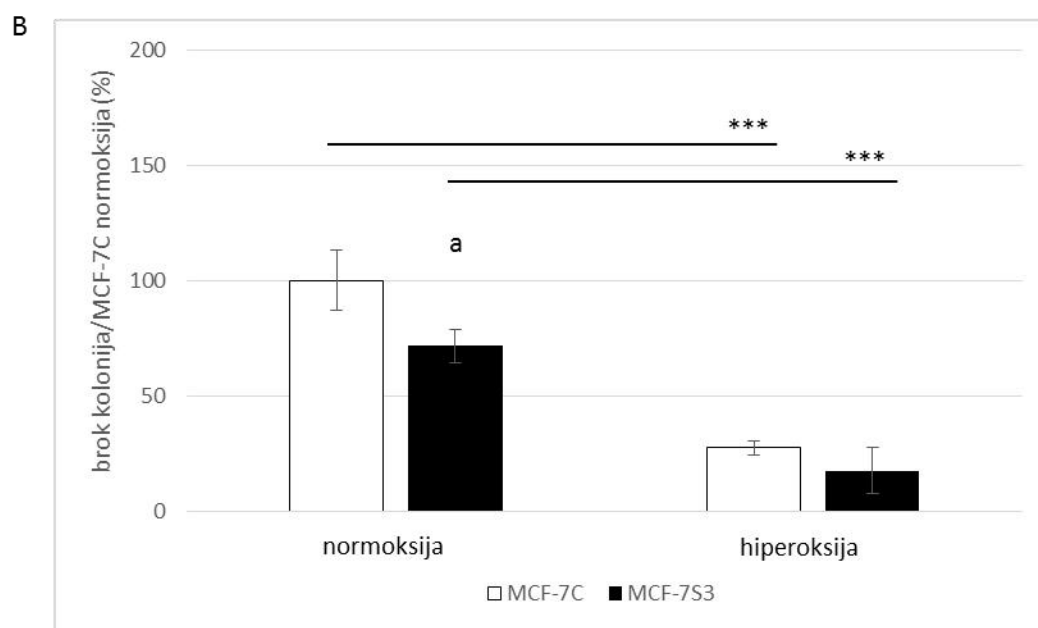
7S3. \*\*\* $p < 0.001$ , normoksija vs. hiperoksija. **(F)** p53: <sup>a</sup> $p < 0.01$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; <sup>b</sup> $p < 0.001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; \*\*\* $p < 0.001$ , normoksija vs. hiperoksija. **(G)** LdhA, normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.05$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup> $p < 0.001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. \*\* $p < 0.01$ , normoksija vs. hiperoksija. **(H)** Sod2, normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.01$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. Hiperoksija: <sup>b</sup> $p < 0.01$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. \*\* $p < 0.01$ , normoksija vs. hiperoksija; \*\*\* $p < 0.001$ , normoksija vs. hiperoksija. **(I)**  $\gamma$ H2Ax: <sup>a</sup> $p < 0.001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; \*\*\* $p < 0.001$ , normoksija vs. hiperoksija.

#### 3.4. Sirt3 smanjuje metaboličku aktivnost i sposobnost stvaranja kolonija MCF-7 stanica

Budući da smo otkrili da su neki od proliferacijskih i angiogenih čimbenika koji su ključni za tumorigeničnost bili smanjeni nakon *de novo* ekspresije Sirt3, odlučili smo testirati ima li Sirt3 ulogu u metaboličkoj aktivnosti i proliferativnom potencijalu (sposobnosti stvaranja kolonija) MCF-7 stanica. MTT test je pokazao da MCF-7S3 stanice imaju malu, ali značajno smanjenu metaboličku aktivnost u odnosu na MCF-7C (**Slika 8A**). Hiperoksija je dodatno smanjila metaboličku aktivnost u obje skupine bez obzira na ekspresiju Sirt3. Pad metaboličke aktivnosti MCF-7S3 klona u normoksiji popraćen je smanjenom sposobnošću stvaranja kolonija, kao što je pokazano s testom CFU (**Slika 8**). Kao što se očekivalo, hiperoksija je uzrokovala značajno smanjenu sposobnost stvaranja kolonija u oba klona, bez obzira na Sirt3 ekspresiju.



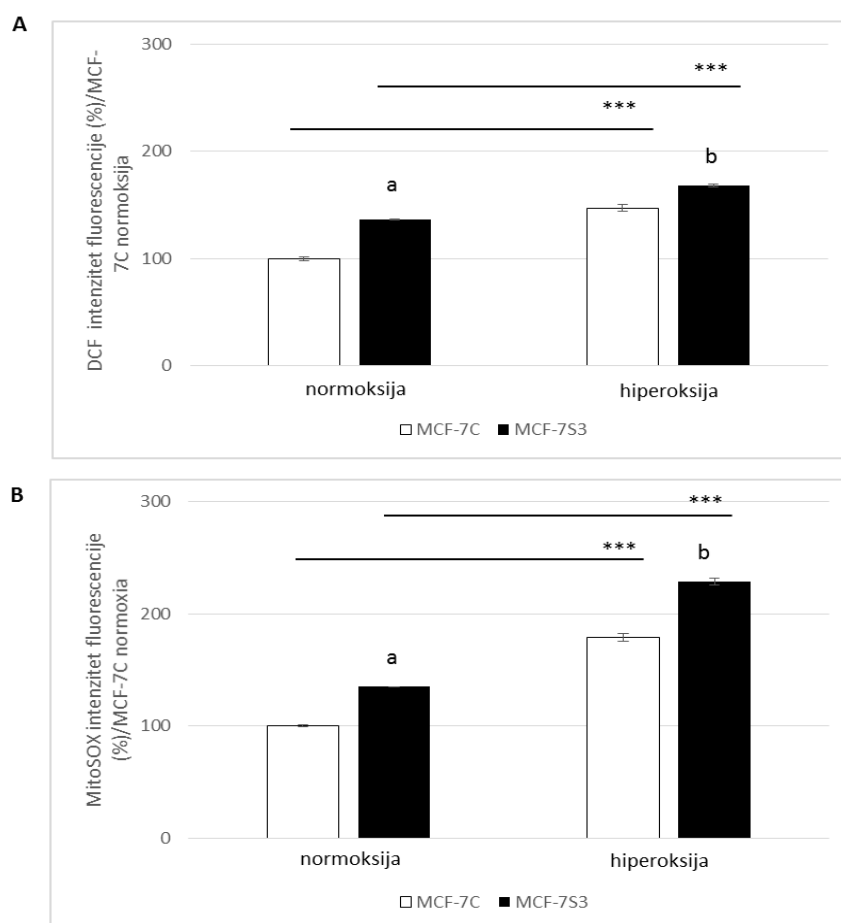
**Slika 8A. Postotak metaboličke aktivnosti MCF-7C i MCF-7S3 klonova u normoksiji i hiperoksiji.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. Normoksija: <sup>a</sup> $p < 0,05$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. MCF-7C: \* $p < 0,05$ , normoksija vs. hiperoksija; MCF-7S3: \*\* $p < 0,01$ , normoksija vs. hiperoksij. Hiperoksija: <sup>b</sup> $p < 0,01$ , MCF-7C vs. MCF-7S3. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.



**Slika 8B-C. Grafički prikaz broja kolonija (test CFU) u odnosu na normoksični MCF-7C. Normoksija: <sup>a</sup>p <0,05, MCF-7C vs. MCF-7S3; \*\*\*p <0,001, normoksija vs. hiperoksija. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.**

### 3.5. Sirt3 i hiperoksija povećavaju proizvodnju citosolnih i mitohondrijskih RKV-a

Hiperoksija ima dobro poznati učinak povećanja staničnih RKV. Budući da se Sirt3 smatra proteinom koji specifično regulira proizvodnju mitohondrijskih RKV (mtRKV), testirali smo da li će *de novo* ekspresija Sirt3 utjecati na mitohondrijsku ili proizvodnju citosolnih RKV-a. Mjerenjem proizvodnje citosolnih RKV-a s DCF fluorescentnom bojom, pokazali smo da ekspresija Sirt3 povećava citosolni oksidacijski stres u normoksiji i hiperoksiji (Slika 9A). Međutim, sama hiperoksija je povećala citosolni RKV u MCF-7C, a dodatno povećanje RKV je zabilježeno u MCF-7S3klonu. Sličan rezultat pokazuje i razina mtRKV: ekspresija Sirt3 i hiperoksija povećavaju razinu mtRKV u oba klona (Slika 9B). Takvi rezultati sugeriraju da Sirt3 i hiperoksija povećavaju razinu RKV u citosolu i mitohondrijima.

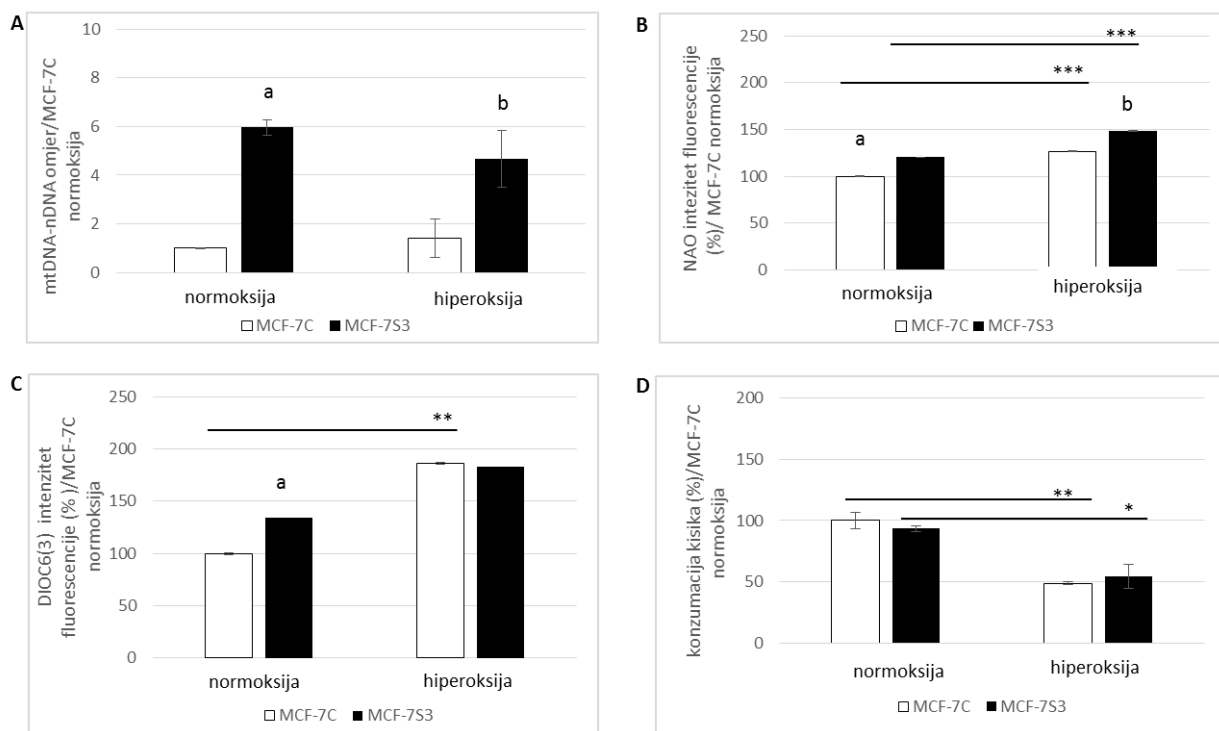


**Slika 9. Sirt3 i hiperoksija uzrokuju povećanu razinu citosolnih i mitohondrijskih RKV-a.** (A) Razina citosolnih RKV ispitivana je bojanjem DCF-om. Rezultati su prikazani kao

srednja vrijednost  $\pm$  S.D. Eksperimenti su izvedeni najmanje tri puta i prikazani su reprezentativni podaci. Jednosmjerna ANOVA s post-hoc Tukey: normoksija: <sup>a</sup>p <0,001, MCF-7C nasuprot MCF-7S3; hiperoksija: <sup>b</sup>p <0,01, MCF-7C nasuprot MCF-7S3; \*\*\*p <0,001, normoksija vs hiperoksija. **(B)** mtRKV razine izmjerene su s MitoSOX Red bojom. Srednji intenzitet fluorescencije uspoređen je s normoksičnim kontrolnim klonom. Jednosmjerna ANOVA s post-hoc Tukey;; normoksija: <sup>a</sup>p <0,001, MCF-7C vs. MCF-7S3; hiperoksija: <sup>b</sup>p <0,001, MCF-7C nasuprot MCF-7S3. \*\*\*p <0,001, normoksija vs. hiperoksija.

### 3.6. Hiperoksija inducira promjenu mitohondrijskih parametara ovisno o ekspresiji Sirt3

Pokazano je da veće razine mtRKV uzrokovane većom ekspresijom Sirt3 imaju sposobnost inducirati oštećenja mtDNA, što dovodi do potencijalne mitohondrijske disfunkcije (Kim i sur. 2010). Stoga smo htjeli utvrditi može li Sirt3 utjecati na razinu mtDNA, zajedno s drugim mitohondrijskim parametrima, poput mitohondrijske mase, mitohondrijskog potencijala i konzumacije kisika. Najprije smo ispitali omjer mitohondrijske i nuklearne DNA u svim eksperimentalnim skupinama i primijetili značajno povećanje razine mtDNA u stanicama MCF-7S3, što je također zadržano u hiperoksičnim uvjetima (**Slika 10A**). Ovi rezultati sugeriraju da u uvjetima normoksije i hiperoksije povećana ekspresija Sirt3 uzrokuje povećane razine mtDNA u odnosu na jezgrenu DNA (nDNA). Iako zajednički učinak Sirt3 i hiperoksije povećava masu mitohondrija, a hiperoksija povećava mitohondrijski potencijal, hiperoksija smanjuje potrošnju O<sub>2</sub> od strane mitohondrija u oba klona MCF-7C i MCF-7S3, neovisno o ekspresiji Sirt3 (**Slika 10B-D**).



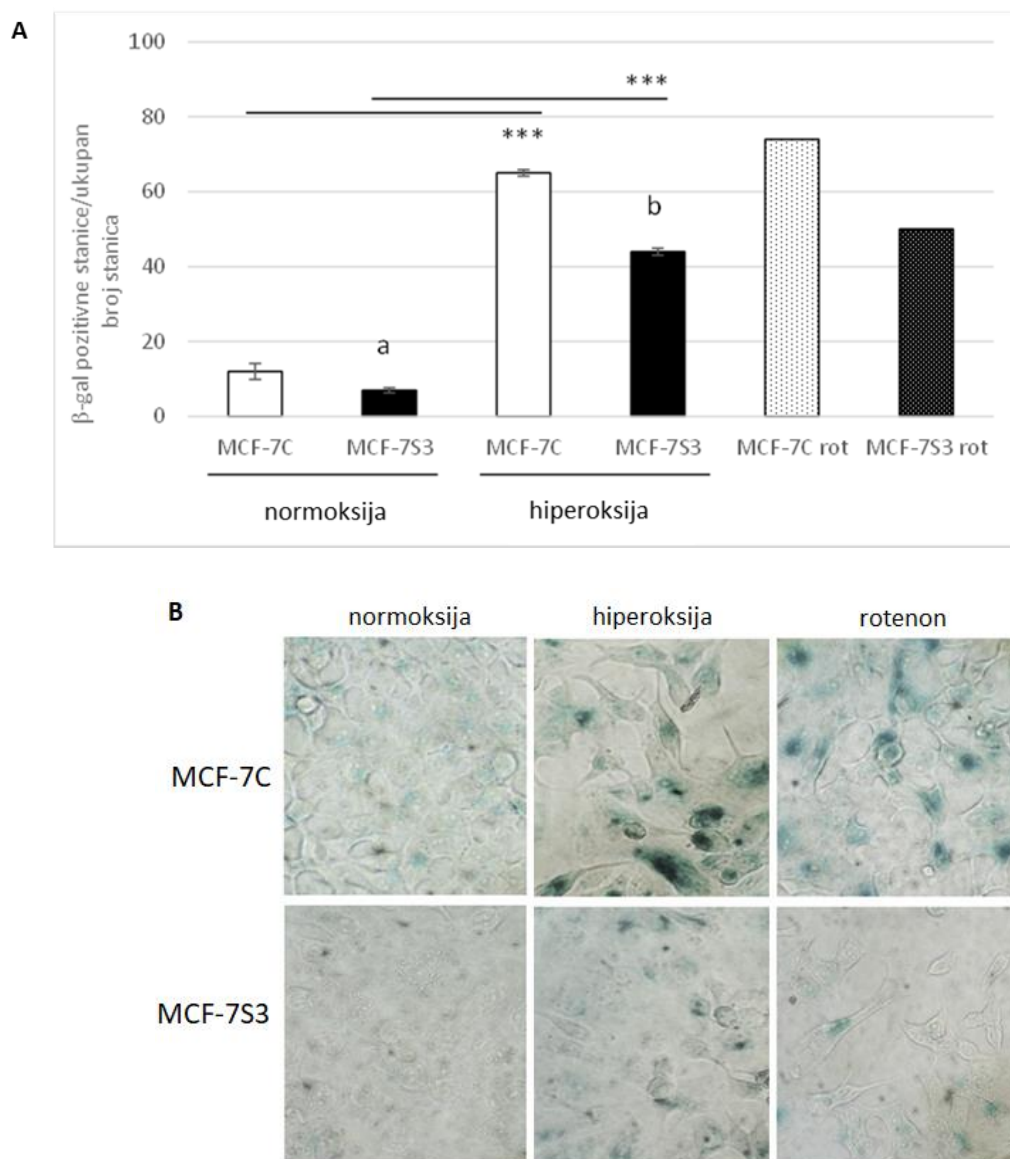
**Slika 10. Hiperoksijom inducirana promjena parametara mitohondrijske funkcije povezana je s prekomjernom ekspresijom Sirt3. (A)** mtDNA sadržaj MCF-7S3 je povećan u normoksiji (<sup>a</sup> $p < 0.01$ , MCF-7C vs. MCF-7S3) i hiperoksiji (<sup>b</sup> $p < 0.05$ , MCF-7C vs. MCF-7S3). **(B)** Mitohondrijski potencijal (DIOC6 (3)) i **(C)** mitohondrijska masa (NAO) u normoksiji i hiperoksiji. Srednji intenzitet fluorescencije uspoređen je s kontrolnim klonom MCF-7C u normoksiji. Jednosmjerna ANOVA s post-hoc Tukey testom: DIOC6 (3), normoksija: <sup>a</sup> $p < 0,001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , normoksija vs. hiperoksija; NAO, normoksija: <sup>a</sup> $p < 0,001$ , MCF-7C vs. MCF-7S3; hiperoksija: <sup>b</sup> $p < 0,001$ , MCF-7C vs MCF-7S3; <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$ , normoksija vs. hiperoksija. **(D)** konzumacija kisika: <sup>\*</sup> $p < 0,05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$ , normoksija vs. hiperoksija. Podaci su prikazani kao postotak srednje vrijednosti  $\pm$  S.D. Eksperimenti su izvedeni najmanje tri puta i prikazani su reprezentativni podaci.

### 3.7. Sirt3 antagonizira senescenciju

Stanični odgovor na stres u obliku senescencije široko je prepoznat kao snažan mehanizam supresije tumora (Campisi 2013). Kako prijašnji rezultati upućuju na to da hiperoksija uzrokuje oštećenje DNA koja naposljetku dovodi do stanične smrti, testirali smo



jesu li oštećenja DNA uzrokovana hiperoksijom utjecala na senescentni fenotip u oba klona. Test je proveden bojanjem na SA- $\beta$ -gal, a pokazao je da MCF-7S3 stanice imaju niži omjer SA- $\beta$ -gal pozitivnih stanica u usporedbi s MCF-7C stanicama (**Slika 11A, 11B**), dok je povećanje SA- $\beta$ -gal inducirano hiperoksijom bilo prisutno u obje skupine. Slično kao i normoksija, ekspresija Sirt3 inhibira hiperoksijom induciranu staničnu senescenciju za 20% u usporedbi s MCF-7C stanicama tretiranim hiperoksijom. Rotenon je korišten kao pozitivna kontrola za indukciju senescencije (Gonçalves i sur. 2011).



**Slika 11. Sirt3 smanjuje senescenciju kod MCF-7 stanica u normoksiji i hiperoksiji. (A)** Grafički prikaz omjera  $\beta$ -gal pozitivnih stanica u normoksičnim i hiperoksičnim uvjetima.

Podaci prikazuju postotak pozitivnih stanica koje su analizirane bojanjem  $\beta$ -galaktozidazom. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i prikazani su reprezentativni podaci. Jednosmjerna ANOVA s post-hoc Tukey testom: normoksija: <sup>a</sup>p <0,05, MCF-7C vs. MCF-7S3; hiperoksija: <sup>b</sup>p <0.001 MCF-7C vs. MCF-7S3. \*\*\*p <0.001 normoksija vs. hiperoksija. **(B)** Rotenon je korišten kao pozitivna kontrola za indukciju senescencije.

## 4. DISKUSIJA

Sirt3 je glavna mitohondrijska deacetilaza metaboličkih i respiratornih enzima važnih za funkciju mitohondrija i kao takva sudjeluje u održavanju homeostaze RNV-a, te tako čuva stanicu od oksidacijskih oštećenja (Bause i Haigis 2013). Sirt3 deacetilira i aktivira komponente mitohondrijskog respiratornog lanca povećavajući na taj način efikasnost oksidacijske fosforilacije. Stoga je ova mitohondrijska deacetilaza prepoznata kao jedan od glavnih proteina koji sudjeluje u održavanju energetske homeostaze u stanicama (Hall i sur. 2013). S obzirom na sve veći broj podataka koji ukazuju na dvojak ulogu Sirt3 kao onkogeni ili tumor supresora u malignim oboljenjima (Chen i sur. 2014), pokazuje se potreba za definiranjem uloge Sirt3 kao čuvara stanične homeostaze (Brown i sur. 2013) u razvoju tumora. Osim toga, vrlo se malo zna o mogućim faktorima koji utječu na aktivnost Sirt3 u tumorigenezi. Stoga smo odlučili istražiti ulogu Sirt3 u stanicama tumora dojke MCF-7 u kombinaciji s hiperoksijom, koja se sve više koristi u liječenju malignih oboljenja (Moen i Stuhr 2012). U ovom istraživanju pokazali tumor supresorski potencijal Sirt3 u normoksiji i sinergistički tumor supresorski učinak Sirt3 i hiperoksije u humanim MCF-7 stanicama tumora dojke. Ovaj se učinak vjerojatno ostvaruje putem reprogramiranja staničnog metabolizma s aerobne glikolize na oksidacijsku fosforilaciju, a koja se događa u mitohondrijima. Na taj način tumorska stanica djelomično gubi svoja agresivna obilježja.

Mnogi su radovi pokazali dvojak funkciju Sirt3, onkogeni i tumor supresorsku, koja je u ovisnosti o tkivu i tipu metabolizma u tumorskim stanicama (Torrens-Mas i sur. 2017). S obzirom da stanice raka dojke imaju smanjenu količinu Sirt3, a kod čak 20% stanica tog tipa se Sirt3 ne može detektirati, stabilno smo pojačali ekspresiju Sirt3 u MCF-7 stanicama tumora dojke kako bi ispitali njegov učinak na tumorske karakteristike tih stanica.

Kako bismo mogli utvrditi mehanizam djelovanja Sirt3 i hiperoksije na karakteristike stanica MCF-7, najprije smo izdvojili klon sa stabilnom ekspresijom Sirt3, što smo utvrdili analizom ekspresije mRNA i proteina. Nakon toga smo ispitali utjecaj hiperoksije na obrazac ekspresije Sirt3. Rezultati su pokazali povećanu ekspresiju Sirt3 u hiperoksiji kod klona sa stabilno pojačanom ekspresijom Sirt3, što se može tumačiti na način da hiperoksija pojačava dozno-ovisni obrazac ekspresije Sirt3. Ti su rezultati potvrđeni i lokalizacijom Sirt3 u normoksiji i hiperoksiji analizom konfokalnim mikroskopom. Usporedbom lokalizacije Sirt3 u uvjetima normoksije i hiperoksije vidljivo je da stanice izložene povećanoj koncentraciji kisika ne pokazuju razliku u distribuciji Sirt3 proteina, nego u intenzitetu signala koji je veći u odnosu na normoksiju. Povećani intenzitet signala ukazuje na povećanu količinu Sirt3 proteina u stabilno eksprimiranom klonu. Takvi rezultati upućuju na moguću ulogu hiperoksije kao aktivatora Sirt3 proteina, koji u uvjetima hiperoksije djeluje kao antioksidacijski faktor s ciljem smanjivanja RKV-a, pa tako i tumorskih karakteristika (LW et al. 2011). Mitohondrijska lokalizacija Sirt3 je također potvrđena analizom konfokalnim mikroskopom, koja je pokazala da se fluorescencijski signal za Sirt3 unutar stanice potpuno preklapa sa signalom za mitohondrije, što je u skladu s ostalim podacima iz literature (Onyango i sur. 2002).

Odredili smo neke od parametara angiogeneze i proliferacije, a koji karakteriziraju stanice MCF-7 (Applanat i sur. 2008), a to su vegf-a i vegfr1. Vaskularni endotelni faktor rasta (Vegf) jedan je od najviše istraženih faktora diferencijacije i razvoja vaskularnog sustava. On je visokospecifičan i selektivni mitogen koji s jedne strane potiče proliferaciju i migraciju vaskularnih endotelnih stanica, a s druge inhibira apoptozu. Neophodan je za angiogenezu, proces stvaranja krvnih žila, čime promovira rast tumora. Pokazalo se da blokiranje Vegf inhibira rast primarnog tumora i smanjuje njegov metastatski potencijal (Gasparini 2000). Vegf-a se veže na Vegf receptor 1 (Vegfr1). U našem smo istraživanju pokazali da su vegf-a i sirt3 u normoksiji u pozitivnoj korelaciji: veća genska ekspresija sirt3 ne utječe na gensku

ekspresiju vegf-a. Povećani Vegf-a karakteristika je rasta tumora, odnosno ukazuje na metastatski potencijal tumora (Nishida i sur. 2006). Rezultati pokazuju negativnu korelaciju ekspresije vegf-a i sirt3 u hiperoksiji. Takav rezultat ukazuje na tumor supresorski učinak Sirt3 tako što smanjuje diferencijacijski potencijal stanice za stvaranje vaskularnog sustava. U prilog tome ide i smanjena ekspresija gena vegfr koji kodira za receptor Vegf. Vegfr ima ulogu posrednika u staničnom odgovoru induciranom proteinom Vegf. Vegfr je uključen u stimulaciju endotelne migracije, proliferaciju, propusnost membrana i stanično preživljavanje, pa je logično za zaključiti da njegova smanjena genska ekspresija smanjuje proliferativni odgovor stanica tumora (Srabovic i sur. 2013). Blokiranjem razvoja i diferencijacije vaskularnog sustava smanjuje se opskrba tumorskih stanica kisikom i hranjivim tvarima što indirektno utječe na proliferaciju i rast tumora (Adams i sur. 2000; Guo i sur. 2010).

Osim što smanjuje ekspresiju vegfr-1, Sirt3 nema značajniji utjecaj na ekspresiju gena za angiogenezu. Međutim, rezultati pokazuju supresivno djelovanje Sirt3 na dva markera epitelno mezenhimalne tranzicije (EMT), slug i vimentin, uključenih u napredovanje tumora, a čiju smo ekspresiju pratili u našem radu. EMT je biološki proces koji uslijed biokemijskih promjena mijenja mezenhimalni stanični fenotip tako što povećava metastatski potencijal, invazivnost, te otpornost na apoptozu (Kalluri i Weinberg 2009), a samim time utječe na progresiju tumora. Vimentin održava strukturu citoskeleta i mehaničku stabilnost što zauzvrat doprinosi polarnosti i pokretljivosti stanica. Vimentin također regulira ekspresiju EMT-vezanog transkripcijskog faktora, slug, kako bi se dodatno poboljšali EMT fenotip i povećala malignost tumorskih stanica (Liu i sur. 2015). Veća razina vimentina ukazuje na lošiju prognozu i uznapredovalost bolesti. Rezultati pokazuju negativnu korelaciju ekspresije slug i vimentina s ekspresijom sirt3 u normoksiji i hiperoksiji što dodatno ukazuje na potencijalni tumor supresorski učinak Sirt3 tako što djelomično smanjuje EMT, a samim time i rast tumora. U prilog tumor supresorskom učinku ide pad ekspresije gena za metabolizam sirt1 i gena antioksidacijske zaštite sod2 i cat,

koja je u skladu s njihovom proteinskom ekspresijom. Ekspresija proteina Sirt1, Sod2 i Cat veća je kod kontrolnog klon MCF-7C u odnosu na klon MCF-7S3 sa stabilno pojačanom ekspresijom Sirt3 u normoksiji, dok je ta razlika još jače vidljiva u hiperoksiji. Takvi rezultati ukazuju da veća ekspresija Sirt3 smanjuje metastatski potencijal MCF-7 stanica, ali isključivo u uvjetima hiperoksije.

Nadalje, kako bismo odredili utjecaj Sirt3 na metabolički status stanica MCF-7 u normoksiji i nakon tretmana hiperoksijom, mjerili smo ekspresiju proteina Ldh-A. Laktat dehidrogenaza A (Ldh-A) katalizira pretvorbu piruvata u laktat što ju čini jednim od ključnih pokazatelja aerobne glikolize, glavnog obilježja tumorskih stanica (Allison i sur. 2014). Također, smanjena ekspresija Ldh-A smanjuje mogućnost staničnog reprogramiranja u tumorski fenotip i inhibira progresiju tumorskih stanica (Fantin i sur. 2017). Rezultati pokazuju da Sirt3 smanjuje metaboličku aktivnost i kapacitet za stvaranje kolonija stanica MCF-7 u uvjetima normoksije. Moguće objašnjenje za ovo opažanje je da broj stanica raka dojke, osobito MCF-7, ovisi o ravnoteži između glikolize i oksidacijske fosforilacije kako bi se podržala njihova proliferacija (Zheng 2012). Brži rast kontrolnih klonova u mediju s visokim udjelom glukoze podrazumijeva da te stanice koriste glukozu i glikolizu kako bi se olakšao unos i ugradnja hranjivih tvari u staničnu biomasu čime bi se potaknula njihova brža proliferacija (Vander Heiden i sur. 2009). Stoga, na temelju drugih radova (LW et al. 2011) i podataka iz ovog istraživanja, može se pretpostaviti da Sirt3 mijenja metabolizam MCF-7 stanica u korist oksidacijske fosforilacije, čime se smanjuje brzina opskrbe hranjivim tvarima koje se osiguravaju glikolizom. Time se smanjuje metabolička održivost, a samim time i mogućnost za preživljavanje stanica u takvim uvjetima. U prilog tome ide povećana razina PGC-1 $\alpha$ , glavnog regulatora mitohondrijske biogeneze (Antico Arciuch i sur. 2012) u uvjetima normoksije kod MCF-7S3 klon. To ukazuje na potencijalnu ulogu Sirt3 u poticanju promjene metabolizma djelovanjem preko PGC-1 $\alpha$ . Takvi rezultati impliciraju da Sirt3 utječe na

metabolizam stanica tako što smanjuje glikolizu i tjera stanice u metabolički sporiju oksidacijsku fosforilaciju, što dovodi do smanjene metaboličke održivosti i smanjene sposobnosti stanica za stvaranje kolonija u uvjetima normoksije.

Drugi ključni tumorski supresor koji ima središnju ulogu u prevenciji raka, p53, često je mutiran ili negativno reguliran u mnogim tipovima malignih oboljenja kod ljudi (Murray-Zmijewski i sur. 2008). Malo povećani p53 u uvjetima normoksije kod MCF-7S3 klona može imati blagotvoran učinak na suzbijanje tumorskog potencijala jer bez funkcionalnog gena p53, stanice nemaju mogućnost otkrivanja oštećenja DNA (Burkhart i Sage 2008). Hiperoksija snažno aktivira p53, kako kod MCF-7C tako i kod MCF-7S3 klona, opravdavajući na taj način supresijski učinak na stanice tumora. Uzimajući u obzir sve ove čimbenike, može se zaključiti da u normoksiji i hiperoksiji Sirt3 djeluje kao inhibitor stanične tumorigeneze, te da aktiviranjem p53 ima potencijalnu ulogu u poticanju stanične senescencije. Pokazano je da su prekomjerni RKV važni za uspostavljanje senescencije (Ziegler i sur. 2015), koja obično djeluje kao odgovor na stres i visoko je ovisna o funkcionalno aktivnom p53 proteinu (Burkhart i Sage 2008). Budući da je p53 tumor supresor, može se očekivati da stanice s više oštećene DNA ulaze u apoptozu. Međutim, MCF-7 stanice nemaju funkcionalnu ekspresiju kaspaze 3 (Kagawa i sur. 2001), što bi upućivalo na to da umjesto u apoptozu ulaze u senescenciju. Osim toga, hiperoksija uzrokuje nepravilno funkcioniranje mitohondrija, uzrokujući paralelno smanjenu ekspresiju PGC-1 $\alpha$ , Sirt1 i Sod2 proteina i gubitak ER $\alpha$  receptora, što također može djelomično utjecati na smanjenu staničnu proliferaciju i preživljenje u hiperoksiji, kao što je pokazano u ranijim istraživanjima (Resseguie i sur. 2015; Moore i Faller 2013). Ovi rezultati pokazuju da hiperoksija sama po sebi inhibira proliferaciju i preživljenje stanica raka, što je u skladu s drugim radovima (Marinello i sur. 2016). Ovaj učinak supresije postiže se djelomično kroz nepravilno funkcioniranje mitohondrija, ali uglavnom aktivacijom p53 nakon oštećenja DNA i induciranjem senescencije.

Postoje istraživanja koja pokazuju da MCF-7 stanice većinu energije u obliku ATP-a dobivaju oksidacijskom fosforilacijom, dok aerobna glikoliza nije toliko zastupljena, što stanice čini manje invazivnima od stanica drugih oblika raka dojke kao što je ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup> (*engl.* triple negative) oblik raka dojke koji predstavlja najagresivniji tip s vrlo lošom prognozom (Lim i sur. 2016). S obzirom na to da je dokazano da su stanice raka koje koriste oksidacijsku fosforilaciju manje agresivne (Zheng 2012), modifikacija metabolizma stanica raka s aerobne glikolize na oksidacijsku fosforilaciju je potencijalno dobar model za terapiju. U našem smo istraživanju kombinacijom hiperoksije i ekspresije Sirt3 dobili upravo takav, manje agresivan fenotip.

Količina Sirt3 može utjecati na vijabilnost stanica s obzirom na njegovu lokalizaciju na unutarnjoj membrani i matriksu mitohondrija (Kincaid i Bossy-Wetzel 2013), koji sudjeluju u regulaciji staničnog metabolizma i apoptozi (Murphy 2009). Rezultati pokazuju da je metabolička aktivnost klonova u normoksiji u negativnoj korelaciji s proteinskom ekspresijom Sirt3, što znači da veća razina ekspresije Sirt3 negativno utječe na metabolizam stanica tumora. Ovaj podatak također upućuje na ulogu Sirt3 kao tumor supresora u uvjetima normoksije, gdje njegova pojačana ekspresija smanjuje metaboličku aktivnost stanica, a što je u skladu s drugim istraživanjima (Finley i sur. 2011). Isto tako, hiperoksija je izazvala značajni pad u metaboličkoj aktivnosti stanica za oko 10% u odnosu na klonove u normoksiji, neovisno o povećanoj ekspresiji Sirt3. Ovaj podatak ukazuje na mogućnost reprogramiranja staničnog metabolizma s aerobne glikolize na efikasniji način potrošnje energije, a to je oksidacijska fosforilacija u ovisnosti o Sirt3 ekspresiji, što je još izraženije u uvjetima hiperoksije. Kako bismo to ispitali, odredili smo parametre mitohondrijske biogeneze, funkcionalnosti, i mitohondrijskog antioksidacijskog statusa. Rezultati pokazuju da se masa mitohondrija u hiperoksiji povećala, što bi izravno mogla biti posljedica supresorskog djelovanja Sirt3 u hiperoksiji. Membranski potencijal se također povećao, što upućuje na povećani metabolizam



mitohondrija, a u skladu je s povećanom ekspresijom mtND-1 koji kodira za kompleks I respiratornog lanca. Kao što je i očekivano, količina citosolnih i mitohondrijskih RKV-a povećana je u klonovima MCF-7C i MCF-7S3 u ovisnosti o ekspresiji Sirt3, neovisno o tome što Sirt3 ima supresorski učinak na tumorske stanice. Na temelju takvih rezultata možemo pretpostaviti da je u pitanju povećana efikasnost cjelokupnog metaboličkog aparata u smislu učinkovitijeg utroška energije, a koja je uzrokovana djelovanjem Sirt3 na staničnoj razini. Osim toga povećani potencijal mitohondrija u hiperoksiji, a u ovisnosti o ekspresiji Sirt3, uzrok je povećane razine RKV-a kako u mitohondriju (Suski i sur. 2012). Takva pozitivna korelacija između mitohondrijskog potencijala, uzrokovanog protonskim gradijentom (Zorova i sur. 2017), i RKV-a dovodi do nepravilnog rada mitohondrija. Takvi mitohondriji gube sposobnost metaboliziranja kisika, što dodatno ukazuje na pad mitohondrijskog metabolizma u uvjetima hiperoksije kod MCF-7S3 klonova, a što je uzrok smanjenog proliferativnog potencijala tumorskih stanica. Proliferativni potencijal stanica MCF-7 određen je i pomoću testa formiranja kolonija (CFA). Obzirom da se ovaj test temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da tvori koloniju, isti je pogodan za određivanje stupnja malignosti stanica (Franken i sur. 2006). Rezultati CFA testa pokazuju da Sirt3 ima značajan utjecaj na proliferacijski potencijal MCF-7S3 klona u odnosu na kontrolni klon MCF-7C u normoksiji. U hiperoksiji je došlo do još značajnijeg pada proliferacijskog potencijala od 90% u odnosu na klonove u normoksiji, što je u skladu s ostalim rezultatima koji također upućuju na smanjeni proliferacijski potencijal stanica raka nakon tretmana hiperoksijom (Moen i Stuhr 2012). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost korištenja hiperoksije za uspješno liječenje malignih bolesti, kao što se koristi i za neke druge bolesti (Gill i Bell 2004).

Novost ovog rada je to što pokazuje da se tumor supresorski učinak Sirt3 potencijalno aktivira hiperoksijom, uslijed čega se smanjuje proliferacija, invazivnost i metastatski

potencijal stanica tumora dojke. Do sada još nije pokazano da zajednički učinak hiperoksije i Sirt3 smanjuje stupanj malignosti tumorskih stanica.

Glavno ograničenje s kojim smo se susreli u ovom radu proizlazi iz činjenice da su tumorske stanice vrlo heterogene (Meacham i Morrison 2013), pa stoga i ne čudi varijabilno ponašanje klonova sa stabilno eksprimiranim plazmidom. Osim toga, varijacije u ponašanju klona MCF-7C mogu biti uzrokovane nasumičnom ugradnjom praznog plazmida u bilo koji dio genoma stanice zbog čega takav klon ne predstavlja idealnu negativnu kontrolu. Sukladno tome, u daljnjim istraživanjima potrebno je razmotriti mogućnost adekvatnijeg sustava negativne kontrole.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom smo radu pokazali tumor supresorski učinak Sirt3 u normoksiji i sinergistički supresijski učinak Sirt3 i hiperoksije u MCF-7 ljudskim stanicama tumora dojke. Sirt3 u normoksiji smanjuje proliferacijski i metastatski potencijal, ekspresiju pro-angiogenih gena i metaboličku aktivnost tumorskih stanica dojke MCF-7, ali povećava metabolizam mitohondrija. Isto tako Sirt3 u normoksiji smanjuje sposobnost tumorskih stanica da stvaraju kolonije i povećava senescenciju. Time se može zaključiti da *de novo* ekspresija Sirt3 u normoksiji smanjuje tumorske karakteristike stanica tumora dojke MCF-7. Takav učinak još je izraženiji u hiperoksiji. Kombinirani učinak Sirt3 i hiperoksije na smanjivanje metastatskog potencijala i rasta MCF-7 stanica ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima Sirt3 i hiperoksije kao potencijalne terapije za liječenje malignih oboljenja kao što je tumor dojke.

## 6. LITERATURA

Abdel Khalek W., Cortade F., Ollendorff V., Lapasset L., Tintignac L., Chabi B. and Wrutniak-Cabello C. (2014): SIRT3, a Mitochondrial NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase, Is Involved in the Regulation of Myoblast Differentiation. *PLOS ONE* **9**: 1-20

Adams J., Carder P. J., Downey S., Forbes M. A., MacLennan K., Algar V., Kaufman S., Hallam S., Bicknell R., Walker J. J., Cairnduff F., Selby P. J., Perren T. J., Lansdown M. and Banks R. E. (2000): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Breast Cancer: Comparison of Plasma, Serum, and Tissue VEGF and Microvessel Density and Effects of Tamoxifen. *Cancer Research* **60**: 2898-2905

Allison S. J., Knight J. R. P., Granchi C., Rani R., Minutolo F., Milner J. and Phillips R. M. (2014): Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* **3**: 1-11

Antico Arciuch V. G., Elguero M. E., Poderoso J. J. and Carreras M. C. (2012): Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling*. **16**: 1150-1180

Applanat M. P., Buteau-Lozano H., Herve M. A. and Corpet, A. (2008): Vascular Endothelial Growth Factor Is a Target Gene for Estrogen Receptor and Contributes to Breast Cancer Progression. *Hormonal Carcinogenesis V* **617**: 437-444

Bause A. S. and Haigis M. C. (2013): SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Experimental Gerontology* **48**: 634-639

Berridge M. V and Tan A. S. (1993): Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction', *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**: 474-482

Betteridge D. J. (2000): What is oxidative stress?. *Metabolism* **49**: 3-8

Birben E., Murat U., Md S., Sackesen C., Erzurum S. and Kalayci O. (2012): Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* **5**: 9-19

Brown K., Xie S., Qiu X., Mohrin M., Shin J., Liu Y., Zhang D., Scadden D. T. and Chen D. (2013): SIRT3 Reverses Aging-associated Degeneration. *Cell reports* **3**: 319-327

Burkhardt D. L. and Sage J. (2008): Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* **8**: 671-682

Campisi J. (2013): Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual review of physiology* **75**: 685-705

- Chen Y., Fu L. L., Wen X., Wang X. Y., Liu J., Cheng Y. and Huang J. (2014): Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis.* **5**: 14-19
- Dang W. (2014): The controversial world of sirtuins. *Drug discovery today* **12**: 9–17
- Epstein T., Gatenby R. A. and Brown J. S. (2017): The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLOS ONE* **12**
- Fantin V. R., St-Pierre J. and Leder P. (2017): Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**: 425–434
- Finley L. W. S., Carracedo A., Lee J., Souza A., Egia A., Zhang J., Teruya-Feldstein J., Moreira P. I., Cardoso S. M., Clish C. B., Pandolfi P. P. and Haigis M. C. (2011): SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cancer cell* **19**: 416–428
- Franken N. A. P., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J. and van Bree C. (2006): Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protocols* **1**: 2315–2319
- Gasparini G. (2000): Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *The Oncologist* **5**: 37–44
- Gatenby R. A. and Gillies R. J. (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat Rev Cancer* **4**: 891–899
- Gill A. L. and Bell C. A. N. (2004): Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q J Med* **97**: 385-395
- Giralt A. and Villarroya F. (2012): SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochemical Journal* **444**: 1-10
- Gonçalves A. P., Máximo V., Lima J., Singh K. K., Soares P. and Videira A. (2011): Involvement of p53 in cell death following cell cycle arrest and mitotic catastrophe induced by rotenone. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 492–499
- Guo S., Colbert L. S., Fuller M., Zhang Y. and Gonzalez-Perez R. R. (2010): Vascular Endothelial Growth Factor Receptor -2 in Breast Cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1806**: 108–121
- Hall J. A., Dominy J. E., Lee Y. and Puigserver P. (2013): The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *The Journal of Clinical Investigation* **123**: 973–979
- Hanahan D. and Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646–674
- Kagawa S., Gu J., Honda T., McDonnell T. J., Swisher S. G., Roth J. A. and Fang, B. (2001): Deficiency of Caspase-3 in MCF7 Cells Blocks Bax-mediated Nuclear Fragmentation but not Cell Death. *Clinical Cancer Research* **7**: 1474-1480

- Kalluri R. and Weinberg R. A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* **119**: 1420–1428
- Kim H.-S., Patel K., Muldoon-Jacobs K., Bisht K. S., Aykin-Burns N., Pennington J. D., van der Meer R., Nguyen P., Savage J., Owens K. M., Vassilopoulos A., Ozden O., Park S.-H., Singh K. K., Abdulkadir S. A., Spitz D. R., Deng C.-X. and Gius D. (2010): SIRT3 is a Mitochondrial Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism During Stress. *Cancer cell* **17**: 41–52
- Kincaid B. and Bossy-Wetzel E. (2013a): Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience* **5**: 1–13
- Kincaid B. and Bossy-Wetzel, E. (2013b): Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience* **5**: 48
- Lai C.-C., Lin P.-M., Lin S.-F., Hsu C.-H., Lin H.-C., Hu M.-L., Hsu C.-M. and Yang M.-Y. (2013): Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* **34**: 1847–1854
- Liberti M. V and Locasale J. W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences* **41**: 211–218
- Lim S.-O., Li C.-W., Xia W., Lee H.-H., Chang S.-S., Shen J., Hsu J. L., Raftery D., Djukovic D., Gu H., Chang W.-C., Wang H.-L., Chen M.-L., Huo L., Chen C.-H., Wu Y., Sahin A., Hanash S. M., Hortobagyi G. N. and Hung M.-C. (2016): EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape. *Cancer research* **76**: 1284–1296
- Liu C.-Y., Lin H.-H., Tang M.-J. and Wang Y.-K. (2015): Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* **6**: 15966–15983
- Lombard D. B., Alt F. W., Cheng H.-L. H.-L., Bunkenborg J., Streeper R. S., Mostoslavsky R., Kim J., Yancopoulos G., Valenzuela D., Murphy A., Yang Y., Chen Y., Hirschey M. D., Bronson R. T., Haigis M., Guarente L. P., Farese R. V., Weissman S., Verdin E. and Schwer B. (2007): Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and cellular biology* **27**: 8807–14
- LW F., Carracedo A., Lee J., Souza A., Egia A. and Zhang J. (2011): SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1[alpha] destabilization. *Cancer Cell* **19**: 416–428
- Marinello P. C., da Silva T. N. X., Panis C., Neves A. F., Machado K. L., Borges F. H., Guarnier F. A.,

- Bernardes S. S., de-Freitas-Junior J. C. M., Morgado-Díaz J. A., Luiz R. C., Cecchini R. and Cecchini A. L. (2016): Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor  $\beta$ 1 induction. *Tumor Biology* **37**: 5337–5346
- McDonnell E., Peterson B. S., Bomze H. M. and Hirschey M. D. (2015): SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends in endocrinology and metabolism* **26**: 486–492
- McGranahan N. and Swanton C. (2017): Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**: 613–628
- Meacham C. E. and Morrison S. J. (2013): Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**: 328–337
- Moen I. and Stuhr L. E. B. (2012): Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *Targeted Oncology* **7**: 233–242
- Moore R. L. and Faller D. V. (2013): SIRT1 represses estrogen-signaling, ligand-independent ER $\alpha$ -mediated transcription, and cell proliferation in estrogen-responsive breast cells. *Journal of Endocrinology* **216**: 273–285
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**: 55–63
- Murphy M. P. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**: 1–13
- Murray-Zmijewski F., Slee E. A. and Lu X. (2008): A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 702
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T. and Kojiro M. (2006): Angiogenesis in Cancer', *Vascular Health and Risk Management* **2**: 213–219
- Nita M. and Grzybowski A. (2016): The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**
- Oberley T. D. (2002): Oxidative Damage and Cancer. *The American Journal of Pathology* **160**: 403–408
- Onyango P., Celic I., McCaffery J. M., Boeke J. D. and Feinberg A. P. (2002): SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD- dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 13653–13658

- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. and Zhivotovsky B. (2007): Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913–922
- Panieri E. and Santoro M. M. (2016): ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* **7**: 2253
- Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B. and Gelbard H. A. (2011): Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* **50**: 98–115
- Raa A., Stansberg C., Steen V. M., Bjerkvig R., Reed R. K. and Stuhr L. E. B. (2007): Hyperoxia retards growth and induces apoptosis and loss of glands and blood vessels in DMBA-induced rat mammary tumors. *BMC Cancer* **7**: 23
- Ray P. D., Huang B.-W. and Tsuji Y. (2012): Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **24**: 981–990
- Resseguie E. A., Stavarsky R. J., Brookes P. S. and O'Reilly M. A. (2015): Hyperoxia activates ATM independent from mitochondrial ROS and dysfunction. *Redox Biology* **5**: 176–185
- Sack M. N. and Finkel T. (2012): Mitochondrial Metabolism, Sirtuins, and Aging. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**
- Schumacker P. T. (2011): SIRT3 Controls Cancer Metabolic Reprogramming by Regulating ROS and HIF. *Cancer cell* **19**: 299–300
- Schwer B., BJ N., RA F., Ott M. and Verdin E. (2002): The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* **158**: 647–657
- Sobočanec S., Balog T., Šarić A., Šverko V., Žarković N., Gašparović A. Č., Žarković K., Waeg G., Mačak-Šafranko Ž., Kušić B. and Marotti T. (2010): Cyp4a14 overexpression induced by hyperoxia in female CBA mice as a possible contributor of increased resistance to oxidative stress. *Free Radical Research* **44**: 181–190
- Srabovic N., Mujagic Z., Mujanovic-Mustedanagic J., Softic A., Muminovic Z., Rifatbegovic A. and Begic L. (2013): Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Expression in Breast Cancer and Its Correlation to Vascular Endothelial Growth Factor A. *International Journal of Breast Cancer* **2013**: 6
- Stuhr L. E. B., Raa A., Øyan A. M., Kalland K. H., Sakariassen P. O., Petersen K., Bjerkvig R. and Reed R. K. (2007): Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats. *Journal of Neuro-Oncology* **85**: 191–202
- Suski J. M., Lebiezinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J. and Wieckowski M. R. (2012): Relation Between Mitochondrial Membrane Potential and ROS Formation. *Mitochondrial*



*Bioenergetics: Methods and Protocols* **810**: 183–205

Torrens-Mas M., Oliver J., Roca P. and Sastre-Serra J. (2017): SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. *Cancers* **9**: 90

TY A., Kamarajan P., Verdin E. and YL K. (2011): SIRT3 and cancer: tumor promoter or suppressor?. *Biochim Biophys Acta* **1816**: 80–88

Vander Heiden M. G., Cantley L. C. and Thompson, C. B. (2009): Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)* **324**: 1029–1033

Yu L., Chen X., Wang L. and Chen S. (2016): The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget* **7**: 38908–38926

Zheng J. I. E. (2012): Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncology Letters* **4**: 1151–1157

Zhong L. and Mostoslavsky R. (2011): Fine Tuning our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology. *Cell metabolism* **13**: 621–626

Ziegler D. V., Wiley C. D., and Velarde M. C. (2015): Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell* **14**: 1–7

Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Babenko V. A., Zorov S. D., Balakireva A. V., Juhaszova M., Sollott S. J. and Zorov D. B. (2017): Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry* **528**

<http://cran.r-project.org>

<http://www.rstudio.com/>

<https://www.khanacademy.org>

<http://www.rcsb.org>

<https://www.researchgate.net>

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9. srpnja 1991 godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja završila sam Plesnu školu Ane Maletić, priznate plesne škole u Europi. Maturirala sam 2010. godine u V. Gimnaziji u Zagrebu, te upisala integrirani studij biologije i kemija na Biološkog odsjeku PMF-a, Sveučilišta u Zagrebu. Nakon četvrte godine na integriranom studiju biologije i kemije u Zagrebu, prebacujem se na drugu godinu preddiplomskog studija biologije i kemije na PMF, Sveučilišta u Splitu. Završni rad pod nazivom „Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u razvoju dijabetesa“ na Odjelu za kemiju PMF-a u Splitu. Zvanje prvostupnice biologije i kemije stekla sam 16. rujna 2016. godine. Iste godine u listopadu upisujem diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku PMF-a, Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme diplomskog studija u listopadu 2016. počinjem volontirati u Laboratoriju za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković na HrZZ projektu „Sirtuin3 kao posrednik mitohondrijske funkcije u estrogen-ovisnoj otpornosti na oksidativni stres i prehranu s visokim udjelom masti“. U sklopu volontiranja izrađujem rad za Rektorovu nagradu i diplomski rad. Za vrijeme diplomskog studija sudjelovala sam na 4 konferencije, od kojih sam na jednom bila pozvani predavač sa usmenim izlaganjem, a na drugom sam izlagala znanstveni rad u obliku postera. Također sam za vrijeme diplomskog studija sudjelovala na jednoj praktičnoj radionici molekularnog modeliranja.

Dobitnica sam Rektorove nagrade za individualni znanstveni i umjetnički rad za akademsku godinu 2016./2017. s radom pod naslovom „Sirtuin 3 i hiperoskija: saveznici u borbi protiv tumora“.

Članica sam Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR), ogranak Europskog društva za istraživanje raka (EACR).