

Uloga proteina deltaNp73alfa u senescenciji izazvanoj oštećenjem DNA u normalnim i tumorskim stanicama čovjeka

Katić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:111798>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Marina Katić

**Uloga proteina $\Delta Np73\alpha$ u senescenciji izazvanoj
oštećenjem DNA u normalnim i tumorskim
stanicama čovjeka**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Anđele Horvat, znanstvene suradnice. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Nemo6
- Struktura, funkcija i evolucija proteina Nme6/Nm23-H6 (IP-2016-06-4021).

Zahvale

Zahvaljujem od srca mojoj mentorici dr. sc. Anđeli Horvat na prilici da pod njenim mentorstvom izradim ovaj diplomski rad. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, svim savjetima, stalnoj podršci, brizi i strpljenju koji su mi puno pomogli pri izradi ovog rada. Bila mi je neizmjerena čast i zadovoljstvo raditi s Vama.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Marani Dulić na čitanju diplomskog rada, savjetima i susretljivosti.

Zahvaljujem članovima Laboratorija za proteinsku dinamiku i Laboratorija za nasljedni rak na pomoći i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem Kemijskom odsjeku i svim profesorima na prenesenom znanju. Hvala i Znanstvenim čarolijama koje su moje studentske dane učinile zanimljivijim i ljepšim.

Zahvaljujem svim mojim dragim prijateljicama koje su mi neizmjerena podrška uvijek i u svemu. Hvala vam na ljubavi, smijehu, razgovoru, nezaboravnim trenucima i što znam da se uvijek mogu osloniti na vas. Jako sam sretna što vas imam u životu!

Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima, mami Mirjani i tati Ivanu, koji su uvijek vjerovali u mene i bili mi neizmjerena podrška. Hvala vam na vašoj brizi, ljubavi, savjetu i poticaju u svemu što radim. Hvala mom bratu Peji i sestri Mateji na ljubavi i podršci, činite moj život puno ljepšim. Hvala i ostaloj obitelji koja je na bilo koji način pomogla da ovo studiranje bude puno ljepše i lakše. Veliki je blagoslov imati vas u svom životu!

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i svrha rada.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Stanična senescencija	3
2.1.1. Uzočnici stanične senescencije.....	3
2.1.2. Obilježja stanica u senescenciji	4
2.1.3. Dvostruka uloga senescencije u tumorigenezi	5
2.2. Odgovor na oštećenje DNA i regulacija staničnog ciklusa	6
2.2.1. Glavne komponente staničnog ciklusa	6
2.2.2. Odgovor na oštećenje DNA.....	8
2.2.3. Kontrolna točka G1/S.....	9
2.2.4. Kontrolna točka S.....	10
2.2.5. Kontrolna točka G2/M	11
2.3. Protein p73.....	11
2.3.1. Obitelj proteina p53	11
2.3.2. Strukturna i funkcionalna obilježja proteina p53 i p73	12
2.3.3. Izoforme proteina p73	14
2.3.4. Protein p73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA	16
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Otopine i puferi	17
3.1.3. Komercijalni kompleti.....	18
3.1.4. Stanične linije.....	19
3.1.5. Hranjive podloge.....	19
3.1.6. Protutijela	19
3.1.7. Standardi i markeri veličine.....	20
3.1.8. Laboratorijski pribor	20
3.1.9. Instrumenti	20
3.2. Metode rada sa staničnim kulturama	21

3.2.1. Odmrzavanje stanica.....	21
3.2.2. Uzgoj stanica.....	21
3.2.3. Brojanje stanica.....	22
3.2.4. Izlaganje stanične kulture γ -zračenju.....	22
3.2.5. Metoda klonalnog rasta stanica.....	23
3.2.6. Testiranje endogene β -galaktozidazne aktivnosti.....	23
3.2.7. Smrzavanje stanica.....	23
3.3. Priprema proteina za Western hibridizaciju.....	24
3.3.1. Izolacija proteina iz stanica.....	24
3.3.2. Određivanje ukupne koncentracije izoliranih proteina metodom BCA.....	24
3.4. Analiza proteina metodom Western hibridizacije.....	25
3.4.1. Priprema uzoraka za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	25
3.4.2. Priprema gelova i pufera za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	25
3.4.3. Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu.....	27
3.4.4. Prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu.....	28
3.4.5. Bojanje nitrocelulozne membrane i blokiranje nespecifičnih interakcija.....	28
3.4.6. Priprema i nanošenje primarnog i sekundarnog protutijela.....	29
3.4.7. Vizualizacija ciljnog proteina.....	29
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1. Utjecaj γ-zračenja na sposobnost klonalnog rasta stanične linije U2OS.....	30
4.2. Određivanje udjela stanica u senescenciji praćenjem endogene β-galaktozidazne aktivnosti povezane sa starenjem.....	31
4.2.1. Utjecaj izoforme $\Delta Np73a$ na SA- β -Gal aktivnost u stanicama NHF nakon izlaganja γ -zračenju.....	32
4.2.2. Utjecaj izoforme $\Delta Np73a$ na SA- β -Gal aktivnost u staničnoj liniji U2OS nakon izlaganja γ -zračenju.....	35
4.3. Provjera ekspresije proteina koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA metodom Western hibridizacije.....	38
4.3.1. Utjecaj izoforme $\Delta Np73a$ na ekspresiju proteina <i>cA</i> , <i>pRb</i> , <i>p21</i> i <i>PCNA</i> nakon izlaganja stanica NHF γ -zračenju.....	38
4.3.2. Utjecaj izoforme $\Delta Np73a$ na ekspresiju proteina <i>cA</i> , <i>pRb</i> , <i>p21</i> i <i>PCNA</i> nakon izlaganja stanične linije U2OS γ -zračenju.....	40
§ 5. ZAKLJUČAK.....	43
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	44
§ 7. ŽIVOTOPIS.....	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Uloga proteina $\Delta Np73\alpha$ u senescenciji izazvanoj oštećenjem DNA u normalnim i tumorskim stanicama čovjeka

Marina Katić

Stanična senescencija je trajni izlazak stanica iz ciklusa do kojeg dolazi zbog skraćivanja telomera, aktivacije onkogenih i oštećenja DNA. Protein p73 (član obitelji proteina p53) ima niz uloga u odgovoru na oštećenje DNA, a njegova uloga u tumorigenezi je složena. Postoje mnogobrojne izoforme proteina p73 svrstane u dvije glavne skupine: TAp73 i $\Delta Np73$. Potaknuti potencijalnim onkogenim djelovanjem izoforme $\Delta Np73\alpha$ ispitali smo njezin utjecaj na ulazak stanica u senescenciju izazvanu oštećenjem DNA γ -zračenjem u normalnim fibroblastima i staničnoj liniji osteosarkoma čovjeka. Senescentne stanice detektirane su praćenjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti povezane sa starenjem, pri čemu je pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ dovela do umjerenog porasta udjela senescentnih stanica. Metodom Western hibridizacije ispitana je ekspresija proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA, a dobiveni rezultati ukazuju na višu ekspresiju markera stanične proliferacije pod utjecajem $\Delta Np73\alpha$. Dobiveni rezultati predstavljaju vrijednu podlogu za buduća istraživanja uloge izoforme $\Delta Np73\alpha$ u tumorigenezi.

(46 stranica, 19 slika, 3 tablice, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: $\Delta Np73$, kontrola staničnog ciklusa, oštećenje DNA molekule, senescencija

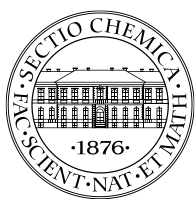
Mentor: dr. sc. Anđela Horvat, znanstvena suradnica

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

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
 2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 23. veljače 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

The role of $\Delta Np73\alpha$ protein in DNA damage-induced senescence in normal and cancer human cells

Marina Katić

Cellular senescence is permanent cell cycle exit caused by telomere shortening, oncogene activation and DNA damage. P73 protein (a p53 protein family member) has different functions in DNA damage response, and its role in tumorigenesis is complex. There are multiple p73 protein isoforms divided into two main groups: TAp73 and $\Delta Np73$. Encouraged by potentially oncogenic activity of $\Delta Np73\alpha$ isoform, we investigated its impact on senescence onset after DNA damage induced by γ -irradiation in normal human fibroblasts and osteosarcoma cell line. Senescent cells were detected by analysis of endogenous senescence associated β -galactosidase activity, showing moderate increase in the frequency of senescence in cells overexpressing $\Delta Np73\alpha$. Expression of proteins involved in cell cycle regulation after DNA damage was analyzed by Western blot, suggesting higher expression of the markers of cellular proliferation caused by overexpression of $\Delta Np73\alpha$. These results represent a valuable basis for future investigation of the $\Delta Np73\alpha$ role in tumorigenesis.

(46 pages, 19 figures, 3 tables, 51 references, original in croatian)

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

Keywords: $\Delta Np73\alpha$, cell cycle control, DNA damage, senescence

Mentor: Dr. Anđela Horvat, Research Associate

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

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 23rd February 2021.

§ 1. UVOD

Tijekom svog životnog vijeka stanice su izložene mnogim unutarnjim i vanjskim čimbenicima koji mogu narušiti cjelovitost njihovog genetskog materijala. Kako bi se održala stabilnost genoma i spriječio prijenos eventualnih oštećenja DNA na stanice kćeri razvijen je složeni mehanizam odgovora na oštećenje DNA molekule.¹ Rezultat odgovora na oštećenje DNA može, ovisno o intenzitetu i vrsti oštećenja, te tipu stanica, biti popravak DNA molekule, stanična smrt ili ulazak stanice u senescenciju. Senescencija (stanično starenje) je otkrivena prije više od 50 godina, a definirana je kao potpuni gubitak sposobnosti stanice za diobom.² Zbog toga se senescencija smatra jednim od mehanizama sprječavanja nastanka tumora. Nasuprot tome, otkriveno je da senescentne stanice mogu izlučivati različite tvari koje nepovoljno utječu na susjedne stanice i na taj način doprinijeti razvoju tumora.³

Nakon pojave oštećenja DNA molekule aktiviraju se signalni putevi odgovora na oštećenje u kojima sudjeluje niz molekula koje, između ostaloga, reguliraju kontrolne točke staničnog ciklusa sprječavajući ulazak stanice s oštećenjem u replikaciju i mitozu. U prijenosu signala nakon oštećenja DNA ključnu ulogu imaju proteinske kinaze ATM (od engl. *Ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (od engl. *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) koje fosforiliranjem aktiviraju niz drugih molekula.⁴ Jedna od najvažnijih nizvodnih meta ovih proteinskih kinaza je tumorski supresor protein p53. On djeluje kao transkripcijski faktor potičući ekspresiju niza ciljnih gena, među kojima je za regulaciju staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA najznačajniji p21, inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima.⁵

Protein p53 otkriven je 1979. godine kao protein koji stvara kompleks s velikim T-antigenom poliovirusa SV40.⁶ Danas je poznato da p53 ima značajnu ulogu među supresorima tumora te je u većini tumorskih stanica mutiran.⁶ 1997. godine otkriven je protein p73 te je na temelju značajne strukturne sličnosti s p53 svrstan u istu obitelj proteina. Za razliku od p53, protein p73 rijetko je mutiran u tumorskim stanicama te je njegova uloga u tumorigenezi složena.⁷ Razlog tome je postojanje mnogobrojnih izoformi ovog proteina kao posljedica postojanja dva promotora i mogućnosti alternativnog izrezivanja na 5' i 3' kraju transkripta.⁸ Dvije glavne skupine izoformi su TAp73, koje sadrže transaktivacijsku domenu i ΔNp73 izoforme koje je ne sadrže.⁸ Iako utjecaj izoformi p73 nije još u potpunosti ispitan i objašnjen,

niz istraživanja pokazuje da izoforme TAp73 djeluju kao supresori tumora, dok izoforme $\Delta Np73$ pokazuju antiapoptotičko i onkogeno djelovanje.⁹

1.1. Cilj i svrha rada

Pojačana ekspresija izoforme $\Delta Np73\alpha$ pronađena u nizu različitih tumora, povezana sa povećanom otpornošću na terapiju snažno govori u prilog njezinom djelovanju kao onkogen.^{8,9} Potaknuti hipotezom da izoforma $\Delta Np73\alpha$ doprinosi tumorigenezi zaobilazeći kontrolne mehanizme staničnog ciklusa cilj ovog rada je istražiti kako ova izoforma djeluje na ulazak stanica u senescenciju nakon oštećenja DNA. Budući da je senescencija jedan od mogućih odgovora stanice na oštećenje DNA koji zaustavlja daljnju proliferaciju smatrali smo da bi izoforma $\Delta Np73\alpha$ mogla smanjivati udio stanica koje ulaze u senescenciju utječući na regulatore uključene u kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA.

Ciljevi ovog rada su bili:

- Ispitati utjecaj γ -zračenja doze 5 i 10 Gy na sposobnost klonalnog rasta stanične linije osteosarkoma U2OS.
- Ispitati utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na ulazak stanica u senescenciju izazvanu oštećenjem DNA γ -zračenjem u normalnim stanicama fibroblasta čovjeka i staničnoj liniji osteosarkoma U2OS praćenjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti.
- Ispitati utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na ekspresiju regulatora staničnog ciklusa (cA, pRb, p21, PCNA) nakon oštećenja DNA γ -zračenjem u normalnim stanicama fibroblasta čovjeka i staničnoj liniji osteosarkoma U2OS metodom Western hibridizacije.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

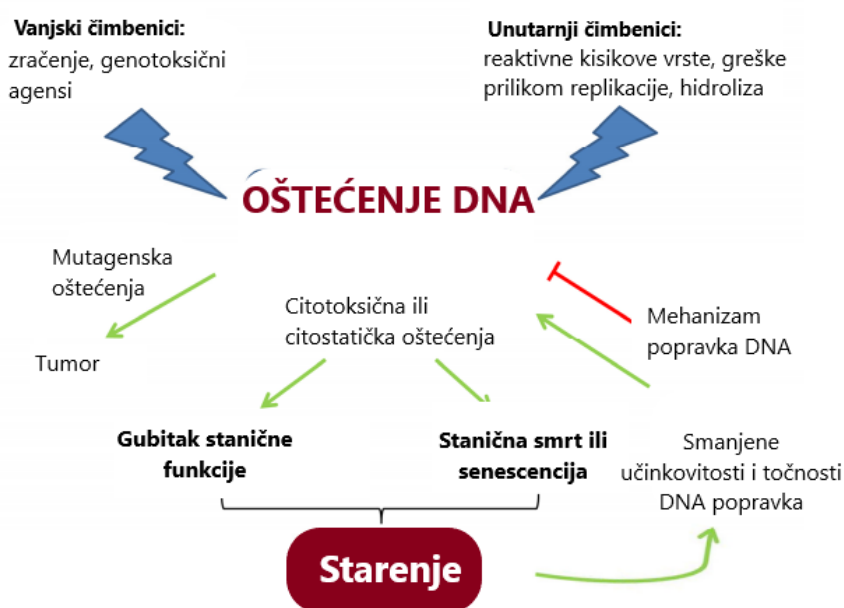
2.1. Stanična senescencija

2.1.1. Uzročnici stanične senescencije

Stanična senescencija (stanično starenje) prvi put je opisana prije više od 50 godina kada su Leonard Hayflick i suradnici otkrili da se normalne stanice čovjeka ne dijele beskonačan broj puta.² Broj dioba kroz koje stanica prođe prije kraja svog replikativnog života označava se kao Hayflickova granica. Polimeraza koja sintetizira lanac kalup DNA treba početnicu i ne može samostalno sintetizirati krajeve linearne DNA molekule.¹⁰ To dovodi do skraćivanja telomera sa svakom diobom te kada se postigne Hayflickova granica aktivira se odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA damage response*) koji dovodi do niza reakcija koje uzrokuju pojavu senescencije označene kao replikativna senescencija.¹¹ Budući da ulaskom u senescenciju stanica gubi sposobnost daljnje diobe, senescencija se tradicionalno smatra jednim od supresora nastanka tumora.

Stanice su stalno izložene unutarnjim i vanjskim čimbenicima koji ugrožavaju stabilnost njihove DNA i mogu dovesti do preuranjene senescencije.¹² Neki od najčešćih vanjskih faktora su oksidativni stres, genotoksični agensi i ionizacijsko zračenje. Unutarnji čimbenici koji mogu dovesti do oštećenja DNA predstavljaju reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species* – *ROS*) koje nastaju kao produkti metabolizma mitohondrija, greške pri replikaciji DNA i reakcije nastale spontanom hidrolizom.¹²

Do preuranjene senescencije može doći i nakon aktivacije onkogena (engl. *Oncogene-induced senescence*).³ Ova vrsta senescencije je otkrivena prije više od 20 godina kao rezultat mutacije H-rasV12 koja je prisutna u većini tumora. Ova mutacija uzrokuje veliko povećanje razine reaktivnih kisikovih vrsta i na taj način omogućava pojavu senescentnih stanica.³



Slika 1. Shematski prikaz različitih faktora i puteva koji dovode do procesa starenja (preuzeto i prilagođeno prema¹²).

2.1.2. Obilježja stanica u senescenciji

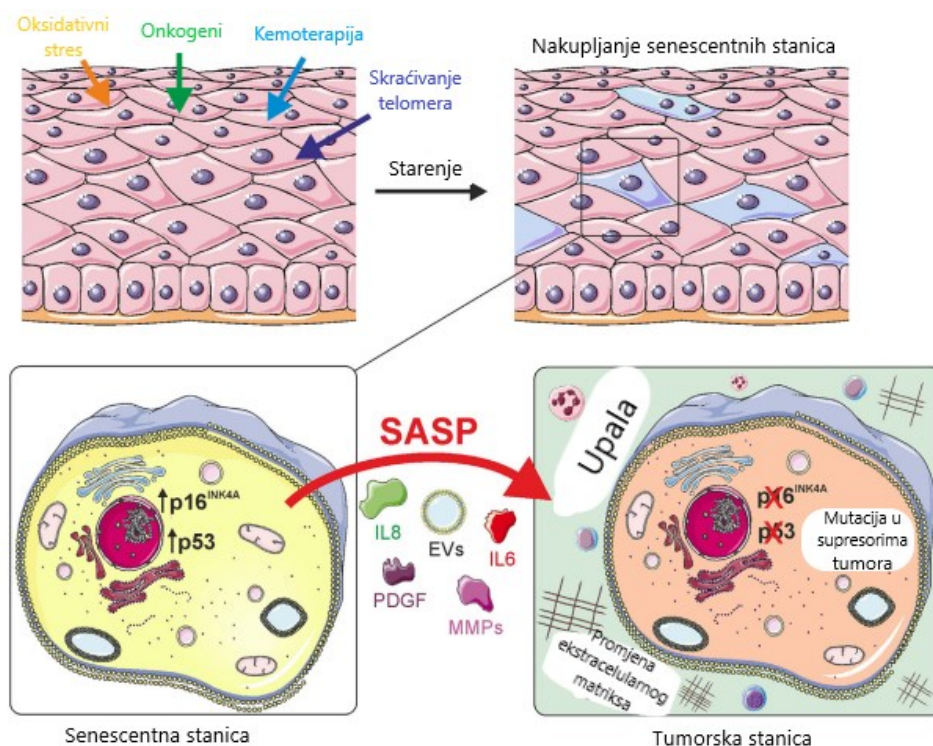
Stanice u senescenciji mogu poprimiti niz različitih obilježja koja omogućavaju njihovu identifikaciju i razlikovanje od normalnih stanica. Kao što je već prije spomenuto, temeljna osobina stanica koje su ušle u senescenciju je gubitak sposobnosti diobe te kao takve nisu osjetljive na djelovanje faktora rasta.¹³ Stoga se odsutnost markera stanične proliferacije (npr. Ki67, PCNA) može koristiti u dokazivanju senescencije, no nikako kao jedini marker. Velika razlika između stanica u senescenciji i normalnih stanica prisutna je i u njihovoj morfologiji. Stanice u senescenciji su uglavnom velike i spljoštene te mogu sadržavati veći broj jezgri koje su većinom deformirane. Stoga se gubitak lamina B1 koji je vezan uz strukturne promjene jezgre također može koristiti kao biomarker senescencije.³

Jedan od najčešće korištenih markera senescencije je β -galaktozidazna aktivnost povezana sa starenjem (SA- β -Gal, od engl. *Senescence-associated β -galactosidase*).^{11,14} β -galaktozidaza je enzim koji katalizira hidrolizu glikozidne veze i smješten je u lizosomu. Kod nesenescentnih stanica optimalna aktivnost ovog enzima je pri pH 4, dok je u senescentnim stanicama uočena njegova aktivnost pri pH 6.¹¹ No, otkriveno je da i u nekim drugim okolnostima koje pridonose povećanju broja lizosoma, samim time i aktivnosti β -galaktozidaze, može doći do pojave njezine aktivnosti i pri pH 6. Zbog toga samo mjerenje β -galaktozidazne aktivnosti nije dovoljno specifično za dokazivanje senescencije.¹⁵

Proteini koji sudjeluju u kaskadi signala tijekom odgovora na oštećenje DNA (npr. p53, p16, p21) također se mogu koristiti u proučavanju senescencije. Razina proteina p53 i njegova fosforiliranost na položaju Ser 15 povišene su u senescentnim stanicama.¹¹ Protein p53 se aktivira kao posljedica onkogene aktivnosti, skraćivanja telomera, odgovora na oštećenja DNA i pojavu reaktivnih kisikovih vrsta i na taj način čini most između uzročnika senescencije i same senescencije. Proteini p16 i p21, inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima, također se akumuliraju u senescentnim stanicama i mogu se koristiti za dokazivanje senescencije.

2.1.3. Dvostruka uloga senescencije u tumorigenezi

Senescencija označava trajni izlazak stanica iz staničnog ciklusa i zbog toga se primarno promatra kao mehanizam koji sprječava razvoj tumora. S druge strane, senescentne stanice mogu izlučivati različite citokine, faktore rasta, ekstracelularne vezikule i metaloproteinaze matriksa koji čine sekretorni fenotip povezan sa senescencijom (engl. *SASP – Senescence-associated secretory phenotype*).³ Ishod djelovanja tvari koje izlučuju senescentne stanice najviše ovisi o vrsti tkiva i stanica koje okružuju senescentne stanice. U većini slučajeva je uočeno da SASP uzrokuje rast tumora stvarajući okruženje koje je povoljno za razvoj tumora koje se očituje u promjeni ekstracelularnog matriksa i pojavi raznih upalnih infekcija (slika 2). No, SASP može i pozitivno djelovati na stanice imunološkog sustava dovodeći do smanjenja broja tumorskih stanica.³



Slika 2. Prikaz nastanka senescentnih stanica kao odgovor na oštećenje DNA. Senescentno stanje je karakterizirano aktivacijom tumorskih supresora p16 i p53 te izlučivanjem različitih citokina, faktora rasta i ekstracelularnih vezikula (EV). Izlučivanje tih tvari može dovesti do promjene ekstracelularnog matriksa i raznih upalnih infekcija čime se stvara povoljno okruženje za nastanak tumora (preuzeto i prilagođeno prema ³).

2.2. Odgovor na oštećenje DNA i regulacija staničnog ciklusa

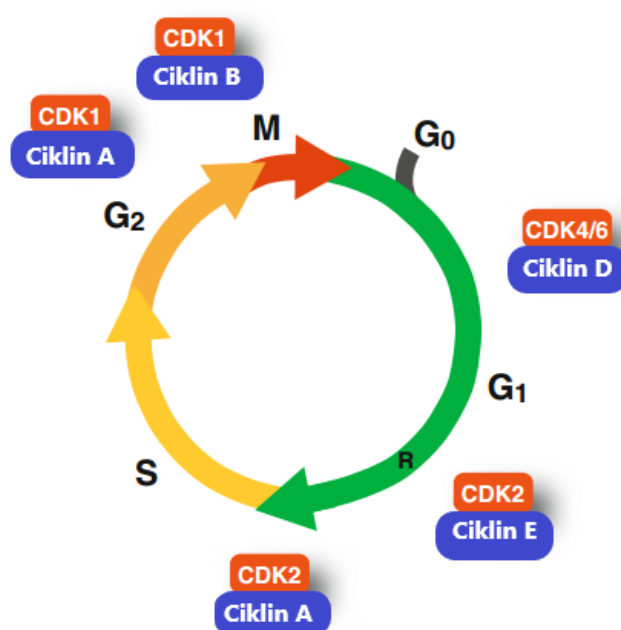
2.2.1. Glavne komponente staničnog ciklusa

Stanični ciklus je proces tijekom kojeg stanica udvostručava svoj genom, raste i dijeli se na dvije stanice kćeri. On se sastoji od četiri faze: G1, S, G2 i M (slika 3).¹⁶ U fazi G1 stanica raste, sintetiziraju se razne makromolekule kao što su proteini i RNA te se izgrađuje stanična membrana. Ova faza slijedi nakon što se stanica podijelila. Nakon faze G1 slijedi faza S u kojoj se vrši replikacija DNA. Nakon replikacije DNA stanica ulazi u fazu G2 u kojoj se priprema za mitozu. Tijekom mitoze stanica se dijeli na dvije stanice kćeri.

Prolazak stanica kroz stanični ciklus omogućava obitelj proteinskih kinaza koje se nazivaju kinazama ovisnima o ciklinima (Cdk, od engl. *Cyclin-dependent kinases*).¹⁶ Iako stanični ciklus ovisi o mnogim faktorima, za njegovu kontrolu ključan je prelazak Cdk iz aktivnog u neaktivno stanje i obrnuto. Jedni od nužnih aktivatora Cdk su ciklini. Postoje četiri

vrste ciklina (A, B, D i E) i svaki je karakterističan za pojedinu fazu staničnog ciklusa u kojoj se veže na odgovarajuću Cdk i aktivira je (slika 3). Na samom početku faze G1 javlja se ciklin D koji u kompleksu sa Cdk4/6 pomaže aktivirati ciklin E. Ciklin E se veže na Cdk2 u kasnoj fazi G1 i omogućava ulazak stanice u replikaciju nakon čega njegova razina opada. Ciklin A je prisutan u fazi S i vezanjem za Cdk2 stimulira umnažanje kromosoma.¹⁷ Njegova razina ostaje povišena do početka mitoze (u kompleksu sa Cdk1). Ciklin B vezanjem na Cdk1 stimulira ulazak stanice u mitozu. Njegova razina ostaje povećana do sredine mitoze nakon čega opada. Osim ciklina, za potpunu aktivaciju Cdk potrebna je i kinaza koja aktivira Cdk (CAK, od engl. *Cdk-activating kinase*).⁵

Uz uloge u replikaciji i mitozu, najvažnija uloga Cdk je u fosforiliranju tumorskog supresora proteina retinoblastoma (pRb) što dovodi do njegove inaktivacije i oslobađanja transkripcijskog faktora E2F te transkripcije niza gena uključenih u napredovanje ciklusa.¹⁸⁻¹⁹ Cdk su zbog svoje važnosti u odvijanju staničnog ciklusa jedne od glavnih meta signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA molekule što će biti detaljnije opisano u daljnjem dijelu teksta.

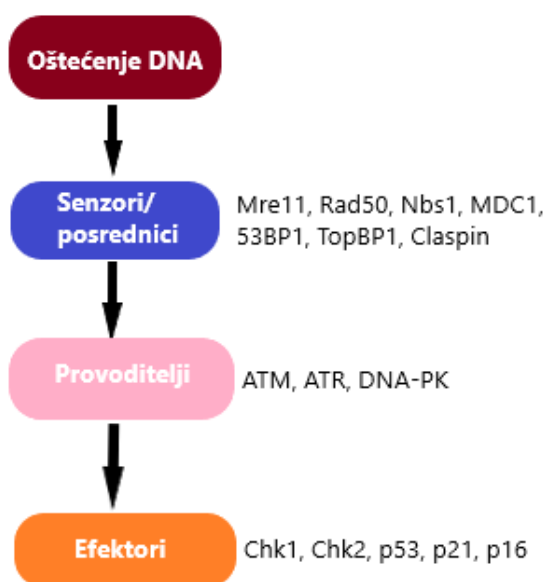


Slika 3. Prikaz faza staničnog ciklusa i aktivnosti pojedinog kompleksa ciklin-Cdk (preuzeto i prilagođeno prema¹⁶).

2.2.2. Odgovor na oštećenje DNA

Kao što je već prije spomenuto, stanice su tijekom svog životnog vijeka izložene mnogim vanjskim (zračenje, štetne kemikalije i mutageni) i unutarnjim čimbenicima (greške tijekom replikacije, štetni produkti metabolizma) koji mogu narušiti cjelovitost njihove DNA. Takvi faktori mogu uzrokovati nastanak jednolančanih i dvolančanih lomova DNA molekule. Dvolančani lomovi se rjeđe javljaju od jednolančanih, ali su opasniji jer mogu dovesti do preraspodjele kromosoma, delecija te genomske nestabilnosti što u konačnici može rezultirati nastankom tumora.¹

Kako bi se održala stabilnost genoma i spriječio prijenos eventualnih oštećenja DNA na stanice kćeri razvijen je mehanizam odgovora na oštećenje DNA molekule. Glavne komponente signalne kaskade odgovora na oštećenje DNA su: senzori, posrednici, provoditelji i efektori (slika 4).¹ Senzori i posrednici prepoznaju oštećenje i o tome obavještavaju provoditelje koji zatim signal šalju prema efektorskim kinazama. Rezultat ovog signalnog puta i djelovanja njegovih komponenata može biti popravak DNA molekule, senescencija ili apoptoza.

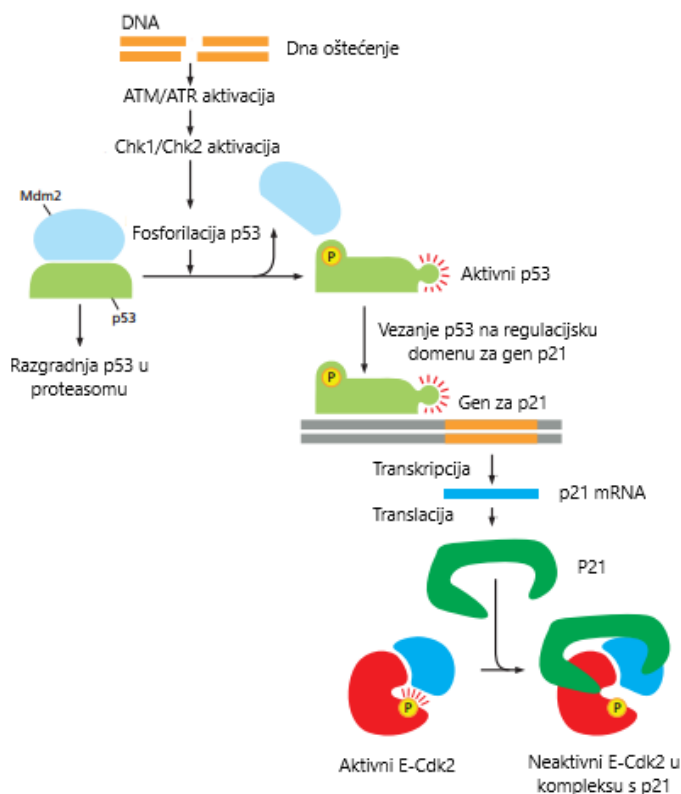


Slika 4. Glavne komponente signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA (preuzeto i prilagođeno prema¹)

U središtu odgovora na oštećenje DNA molekule nalaze se proteinske kinaze ATM i ATR.⁴ One fosforilacijom serinskog ili treoninskog aminokiselinskog ogranka supstrata omogućavaju aktivaciju ostalih bitnih komponenti signalnih puteva.²⁰ Dvije glavne mete ATM/ATR su proteinske kinaze Chk1 i Chk2 koje zajedničkim djelovanjem smanjuju aktivnost Cdk čime se zaustavlja stanični ciklus i osigurava dovoljno vremena za popravak DNA molekule.²⁰ Osim proteinskih kinaza Chk1 i Chk2, značajan supstrat kinaza ATM/ATR je i protein p53 koji može biti aktiviran direktnom fosforilacijom od strane ATM/ATR ili djelovanjem nekih drugih proteina koji su također pod utjecajem ATR/ATM.²⁰ Glavna zadaća složene mreže signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA jest regulacija kontrolnih točaka staničnog ciklusa sprječavajući ulazak stanice s oštećenjem u replikaciju i mitozu te prijenos oštećenja DNA na stanice kćeri. Postoje tri kontrolne točke staničnog ciklusa nakon oštećenja: G1/S, S i G2/M kontrolna točka.

2.2.3. Kontrolna točka G1/S

Ukoliko dođe do oštećenja molekule DNA tijekom faze G1 aktivira se kontrolna točka G1/S koja sprječava ulazak stanice s oštećenjem u replikaciju, zaustavlja stanični ciklus i omogućava popravak greške.¹⁶ Glavna uloga ove kontrolne točke je inhibicija kompleksa ciklin D-Cdk4/6 i ciklin E-Cdk2 koji su potrebni za ulazak u replikaciju. Najvažniji način na koji se to postiže je aktivacija puta p53-p21 (slika 5).¹⁶ Signalni put p53-p21 započinje aktivacijom proteinskih kinaza ATM/ATR koje zatim fosforiliraju i aktiviraju Chk1 ili Chk2. Glavna meta proteinskih kinaza Chk1 i Chk2 je protein p53 koji je u normalnim uvjetima prisutan u jako malim količinama u stanicama zbog interakcije s Mdm2.²¹ Mdm2 je E3-ubikvitinska ligaza koja vezanjem na N-terminalni dio proteina p53 uzrokuje njegovu razgradnju. U stanicama s oštećenjem Chk1 ili Chk2 fosforiliraju p53 na N-terminalnom dijelu i onemogućavaju vezanje Mdm2¹⁶ što dovodi do povećanja razine p53 i njegove transkripcijske aktivnosti. Temeljna uloga proteina p53 u ovom signalnom putu je poticanje transkripcije gena za protein p21 koji inhibira kompleks ciklin E-Cdk2.²² Time je onemogućena fosforilacija pRb koji stupa u interakciju s transkripcijskim faktorom E2F što blokira ekspresiju niza gena bitnih za ulazak u replikaciju i zaustavlja stanični ciklus u fazi G1.¹⁸⁻¹⁹



Slika 5. Regulacija kontrolne točke G1/S (preuzeto i prilagođeno prema⁵).

Drugi način regulacije kontrolne točke G1/S je inaktiviranjem proteinske fosfataze Cdc25A.²³ Ona je važna za regulaciju aktivnosti Cdk. Kao što je ranije opisano za aktivnost Cdk potrebni su ciklini i CAK, ali sama regulacija aktivnosti Cdk je postignuta fosforilacijom i defosforilacijom.⁵ Fosforilacija aminokiseline u aktivnom mjestu Cdk djelovanjem kinaze Wee1 dovodi do njihove inaktivacije. Defosforilacijom Cdk djelovanjem fosfataze Cdc25A dolazi do njihove aktivacije. Ovaj način regulacije G1/S kontrolne točke odvija se tako da se nastankom oštećenja DNA molekule aktivira ATM ili ATR koje zatim fosforiliraju Chk1 ili Chk2, nakon čega oni fosforiliraju Cdc25A koja se inaktivira. Inaktivacijom Cdc25A dolazi do nakupljanja fosforiliranog (neaktivnog) oblika kompleksa ciklin E-Cdk2 i stanica ostaje u G1 fazi.²³

2.2.4. Kontrolna točka S

Replikacija molekule DNA regulirana je kontrolnom točkom S. Djelovanjem ionizirajućeg zračenja dolazi do jednolančanih lomova koji aktiviraju ATR. Aktivacija se odvija tako da se na jednolančani lom prvo veže protein RPA koji zatim direktno veže ATRIP (od engl. *ATR-*

interacting protein) koji je regulatorna podjedinica ATR.²³ Aktivirani ATR zatim fosforilira Chk1 koji fosforilira i inaktivira Cdc25A. Inaktivacija Cdc25A onemogućava aktivaciju Cdk2 što dovodi do odvajanja Cdc45 od kromatina i inhibicije početka replikacije DNA.²³ Pojavom oštećenja molekule DNA može doći do aktivacije ATM/ATR koji zatim fosforiliraju NBS1, BRC1 i SMC1 čime se omogućava popravak zastoja postojećih replikacijskih rašlji i inhibicija početka replikacije s novih ishodišta.²³

Protein PCNA (od engl. *Proliferating-cell nuclear antigen*) stvara klizajući prsten oko molekule DNA koji omogućava bolju procesivnost i točnost DNA-polimeraze i esencijalan je za odvijanje procesa replikacije. PCNA sudjeluje u mnogim esencijalnim staničnim procesima kao što su: odgovor na oštećenje DNA, održavanje strukture kromatina, razdvajanje kromosoma i napredovanje staničnog ciklusa.²⁴⁻²⁵

2.2.5. Kontrolna točka G2/M

Signalni putevi regulacije kontrolne točke G2/M aktiviraju se s pojavom oštećenja DNA molekule u fazi G2 i na taj način se sprječava ulazak stanice u mitozu.¹⁶ Regulacija kontrolne točke G2/M je složena i obuhvaća dva glavna signalna puta (slično kontrolnoj točki G1/S). U sklopu brzog odgovora na oštećenje DNA dolazi do aktivacije ATM/ATR koje zatim fosforiliraju Chk1 ili Chk2. One zatim fosforiliraju fosfatazu Cdc25 i kinazu Wee1. Fosforilacijom fosfataze Cdc25 dolazi do njezine inaktivacije, dok se kinaza Wee1 aktivira.¹⁶ Ovi događaji uzrokuju inaktivaciju kompleksa ciklina B-Cdk1 i zastoj staničnog ciklusa u G2 fazi.

Drugi, sporiji odgovor uključuje aktivaciju proteina p53, koji onda potiče ekspresiju p21 što dovodi do inhibicije kompleksa ciklin B-Cdk1. p21 uz to sprječava fosforilaciju (inaktivaciju) pRb čime se onemogućava transkripcija mitotskih regulatora u konačnici dovodeći do trajnog izlaska stanica iz ciklusa (senescencija).²⁶

2.3. Protein p73

2.3.1. Obitelj proteina p53

Obitelj proteina p53 čine proteini p53, p63 i p73. Protein p53, prvi i najviše istražen član ove obitelji proteina, otkriven je 1979. godine kao protein koji stvara kompleks s velikim antigenom T poliovirusa SV40.⁶ U to vrijeme veliki antigen T smatran je glavnim onkogenim proteinom virusa SV40 zaduženim za početak i održavanje stanične transformacije.⁶ Otkriće kompleksa

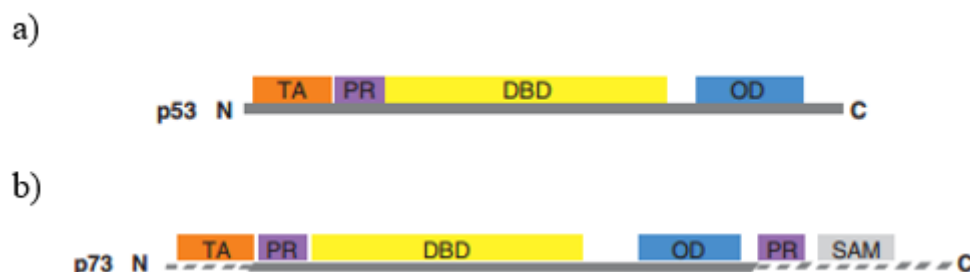
kojeg on stvara s proteinom p53 izazvalo je mnogo interesa za novo-otkrivenim proteinom. Daljnjim istraživanjem otkriveno je da p53 stvara kompleks s mnogim virusnim onkogenim proteinima što je dovelo do zaključka da je njegova funkcija vezana uz virusnu transformaciju i tumorigenezu. Nakon što je otkriveno da su oba alela *p53* mutirana u preko 50% različitih tumora te da odsutnost divljeg tipa p53 dovodi do povećane učestalosti tumora kod čovjeka i laboratorijskih životinja, p53 je prepoznat kao jedan od ključnih supresora tumora.⁶

1997. godine Daniel Caput i suradnici otkrili su drugog člana obitelji p53 - protein p73, a nedugo nakon toga otkriven je i treći član obitelji – protein p63.²⁷ Ovi proteini pokazuju značajnu strukturnu i funkcionalnu sličnost s p53, no postoje i brojne razlike u njihovom djelovanju. Za razliku od p53 koji je često mutiran u tumorskim stanicama, mutacije p63 i p73 su rijetke, no unatoč tome mogu sudjelovati u tumorigenezi.⁷

2.3.2. Strukturna i funkcionalna obilježja proteina p53 i p73

Sličnost u strukturi proteina p53 i p73 očituje se ponajprije u postojanju tri glavna funkcionalna područja (domene): N-terminalne transaktivacijske domene (TA, od engl. *transactivation domain*), središnje domene za vezanje DNA (DBD, od engl. *DNA-binding domain*) i C-terminalne oligomerizacijske domene (OD, od engl. *oligomerization domain*) (slika 6).²⁸ Stupanj podudarnosti slijeda pojedinih domena između proteina p73 i p53 iznosi 30% za TA, 63% za DBD i 38% za OD.²⁸ Uloga transaktivacijske domene jest ostvarivanje interakcija s transkripcijskim faktorima. Osim toga, oba proteina sadrže domenu bogatu prolinom (PR, od engl. *proline-rich domain*) koja povezuje TA i DBD te signalno područje za lokalizaciju u jezgru (NLS, od engl. *nuclear localization signal*) između DBD i OD.²⁹ Za razliku od p53, protein p73 sadrži na C-kraju sterilni α motiv (SAM, od engl. *Sterile α -motive*) koji je uključen u proteinske interakcije i transaktivacijsku inhibitornu domenu (TID, od engl. *Transactivation-inhibitory domain*).⁸ U svojoj aktivnoj formi, u kojoj veže DNA, p53 je tetramer koji se sastoji od 4 identične podjedinice od kojih svaka sadrži 393 aminokiselinska ogranka, a do oligomerizacije dolazi posredovanjem oligomerizacijske domene koja upravlja strukturom i funkcijom cijele molekule.²⁹ Domena za vezanje DNA molekule je mutirana u većine tumora (oko 90%) čime je pokazano koliko je bitno specifično vezanje DNA molekule na ovu regiju za ispravno, supresorsko djelovanje proteina p53.²⁹

Uz sličnost u sastavu glavnih domena, proteini p53 i p73 javljaju se u obliku mnogobrojnih proteinskih izoformi koje nastaju zbog postojanja dvaju promotora i alternativnog izrezivanja na 5' i 3' kraju transkripta.



Slika 6. Prikaz strukture proteina p53 (a) i p73 (b). Narančastom bojom je označena N-terminalna transaktivacijska domena (TA), ljubičastom bojom je označena domena bogata prolinom (PR), žutom bojom je označena domena za vezanje DNA molekule (DBD), a plavom bojom je označena oligomerizacijska domena (OD). Protein p73 ima i dodatni sterilni α motiv (SAM) na C-kraju (preuzeto i prilagođeno prema²⁸).

Što se tiče funkcije p53, primarno je njegovo djelovanje kao tumorskog supresora. U normalnim uvjetima razina p53 je niska, no u uvjetima stresa kao što su oštećenje DNA ili aktivacija onkogene dolazi do stabilizacije p53 i povećanja njegove razine.³⁰ Aktivacija proteina p53 postiže se posttranslacijskim modifikacijama, najčešće fosforilacijom. Aktivirani p53 uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptozu ili senescenciju, a uglavnom djeluje kao transkripcijski faktor i aktivira transkripciju gena nužnih za odvijanje različitih procesa.³⁰ Kao što je već ranije spomenuto, jedna od najvažnijih uloga proteina p53 jest poticanje ekspresije inhibitora Cdk proteina p21. Zbog njegove središnje uloge tumorskog supresora u staničnom odgovoru na oštećenje DNA protein p53 često nazivaju „čuvarom genoma“, ali osim ove funkcije pokazano je da regulira i gene esencijalne za odvijanje mnoštva staničnih procesa.³¹ Neki od tih procesa su: regulacija plodnosti, regulacija proliferacije i diferencijacije embrionalnih matičnih stanica, zaštita od štetnog UV zračenja i nastanka raka kože, imunološki odgovor te metabolizam.³¹

Protein p73 kao transkripcijski faktor sudjeluje u nizu procesa u koje je uključen i p53, no ima i niz specifičnih uloga što se velikim dijelom pripisuje djelovanju većeg broja različitih proteinskih izoformi.

2.3.3. Izoforme proteina p73

Gen *TP73* koji kodira za protein p73 sastoji se od 14 eksona i jednog alternativnog eksona 3' smještenog u intronu 3. Organizacija gena *TP73* je složena te ovaj gen sadrži dva promotora čijim korištenjem nastaju dvije različite skupine proteina. Zbog postojanja dva promotora i mogućnosti alternativnog izrezivanja nastaju različite mRNA molekule koje stvaraju različite izoforme proteina s različitim domenama (slika 7).³² Prepisivanjem sa promotora 1 nastaju izoforme koje sadrže N-terminalnu transaktivacijsku domenu i nazivaju se TAp73, dok izoforme nastale korištenjem promotora 2 ne sadrže TA domenu i zajednički se označavaju kao ΔNp73 ili ΔTAp73.³³⁻³⁶ Alternativnim izrezivanjem na 5' kraju primarnog transkripta nastaju dodatne izoforme proteina označene kao p73Δex2, p73Δex2/3 i ΔN'p73.³³⁻³⁶ Izoforme ΔNp73 imaju očuvanu domenu za vezanje DNA i oligomerizacijsku domenu, te stoga imaju dominantno-negativni učinak na TAp73 i p53 divljeg tipa koji se očituje u stvaranju inaktivnih heretokompleksa s ovim proteinima ili u natjecanju za vezanje na promotore ciljnih gene ovih proteina.^{35,37} Osim izoformi koje su rezultat djelovanja različitog promotora ili alternativnog izrezivanja na 5' kraju transkripta, postoje i izoforme koje su rezultat alternativnog izrezivanja na 3' kraju transkripta. Takvih izoformi ima 9 i označavaju se grčkim alfabetom (α, β, γ, δ, ε, ζ, θ, η, Ιη).⁸

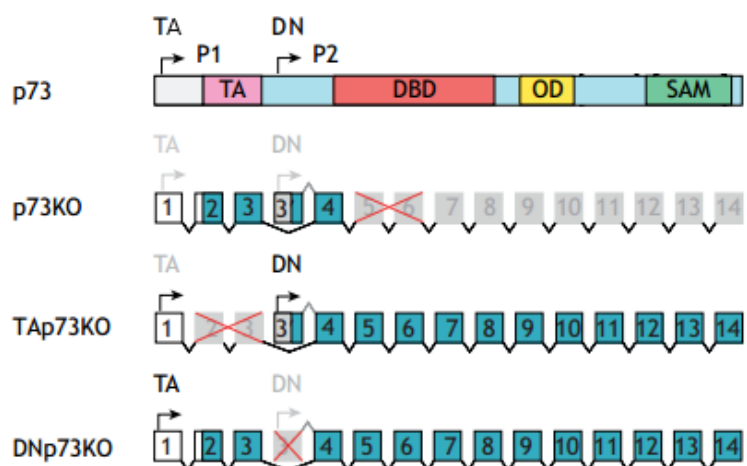


Slika 7. Prikaz strukture različitih izoformi proteina p73. Žutom bojom označena je N-terminalna transaktivacijska domena (TA), crvenom bojom označena je domena za vezanje DNA (DBD), plavom bojom označena je oligomerizacijska domena (OD), zelenom bojom označen je sterilni α motiv (SAM), a bež bojom označena je transaktivacijska inhibitorna domena (TID). Izoforme ΔN ne sadrže N-terminalnu transaktivacijsku domenu (preuzeto i prilagođeno prema³²).

S obzirom na veliki broj izoformi, uloga i funkcija proteina p73 nije jednoznačna. Izoforme TAp73 mogu djelovati kao tumorski supresori, dok $\Delta Np73$ mogu poticati nastanak i razvoj tumora. Uloga ovih izoformi u tumorigenezi zadnjih godina postala je predmet izučavanja mnogih znanstvenika jer se smatra da bi one mogle biti ključ u liječenju malignih oboljenja.

Dosadašnja istraživanja i proučavanje miševa koji ne eksprimiraju izoforme TAp73 (engl. *TAp73-knockout mice*) pokazala su da ove izoforme djeluju proapoptotički i tumorsupresorski, budući da su takvi miševi bili skloni spontanom razvoju tumora.³⁸ Osim sklonosti razvoju tumora, *TAp73-knockout* miševi su i neplodni te pokazuju abnormalnosti u razvoju centralnog živčanog sustava.³⁸

Za razliku od izoformi TAp73, izoforme $\Delta Np73$ pokazuju antiapoptotičko i onkogeno djelovanje.⁹ Osim toga, izoforma $\Delta Np73$ ima bitnu funkciju u razvoju i diferencijaciji neurona, a njezin gubitak dovodi do gubitka neurona, neurodegeneracije, pojave hidrocefalusa i abnormalnosti u razvoju hipokampusa.⁹ Novija istraživanja ukazuju na moguću ulogu $\Delta Np73$ u zaštiti neurona tijekom starenja. Proučavanjem starih miševa koji imaju smanjenu razinu $\Delta Np73$ primjećeno je da razvijaju patološke promjene proteina tau i kongnitivne poremećaje što bi se u budućnosti moglo iskoristiti u liječenju Alzheimerove bolesti.⁹



Slika 8. Prikaz gena p73 divljeg tipa i neaktivnog gena p73 i njegovih izoformi TAp73 i $\Delta Np73$ dobivenih delecijom pojedinih eksona. Miševi koji ne eksprimiraju ovaj gen (engl. *Knockout mice*) imaju poteškoće u razvoju centralnog živčanog sustava (preuzeto i prilagođeno prema³⁸).

2.3.4. Protein p73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA

Protein p73 kao dio obitelji proteina p53 ima niz uloga u staničnoj proliferaciji, kontroli staničnog ciklusa i održavanju genomske stabilnosti. Istraživanja su pokazala da protein p73 ima važnu ulogu u sprječavanju poliploidije i aneuploidije u stanicama koje ne posjeduju funkcionalan protein p53.³⁹ Naime, stanice koje ne sadrže p53 ni p73 nemaju funkcionalnu kontrolnu točku G2/M i pokazuju povećanu razinu ciklina E, A i B u odnosu na stanice koje sadrže protein p73 u odsutstvu p53.³⁹

Izoforme TAp73 pozitivno djeluju na regulaciju staničnog ciklusa. Mogu dovesti do zastoja staničnog ciklusa u kontrolnoj točki G1/S potičući transkripciju proteina p21 i G2/M inhibicijom CDC25, ciklin B1, ciklin B2 te Cdk1.⁴⁰ Pokazalo se da izoforma TAp73 ima važnu ulogu i u formiranju diobenog vretena u mitozu i mejozi te da utječe na kontrolnu točku na prijelazu metafaza-anafaza (engl. *Spindle assembly checkpoint*).⁴¹ TAp73 stupa u interakciju s proteinima koji su važni za ovu kontrolnu točku (Bub1, Bub3 i BubR1) i potiče njihovu aktivnost, a gubitak ove izoforme dovodi do smanjene mogućnosti zaustavljanja mitoze što u konačnici dovodi do genetičke nestabilnosti i aneuploidije.⁴¹

Za razliku od izoformi TAp73, izoforme Δ Np73 uglavnom negativno djeluju na regulaciju staničnog ciklusa. U novije vrijeme su istraživanja na miševima koji ne ekspimiraju izoforme Δ Np73 (engl. *Δ Np73-knockout mice*) dovela do niza bitnih spoznaja o njihovoj ulozi. Izoforme Δ Np73 djeluju kao dominantno-negativni inhibitori proteina p53 te smanjuju transkripciju ciljnih gena proteina p53 kao što su p21, Mdm2 i Puma.⁴² Osjetljivost stanica na agense koji uzrokuju oštećenje DNA uključujući cisplatinu, doksorubicin i γ -zračenje znatno je povećana u stanicama koje ne ekspimiraju izoformu Δ Np73.⁴² Smanjena osjetljivost stanica na DNA oštećenja u prisutnosti više razine Δ Np73 može se dijelom objasniti otkrićem da ova izoforma inhibira fosforilaciju p53 i ATM, odnosno njihovu aktivaciju u signalnom putu.⁴² Izoforme Δ Np73 također imaju sposobnost inaktivacije proteina pRb remeteći njegovu ulogu supresora nastanka tumora.⁴²⁻⁴³ Budući da je i senescencija jedan od mogućih ishoda signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA u sklopu ovog Diplomskog rada istražen je utjecaj potencijalno onkogene izoforme Δ Np73 α na ulazak stanica u senescenciju.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Akrilamid (Sigma-Aldrich, SAD), amonijev persulfat ($[\text{NH}_4]_2\text{S}_2\text{O}_8$, APS, od engl. *ammonium persulfate*; Sigma-Aldrich, SAD), bisakrilamid (Sigma-Aldrich, SAD), bromfenolno plavilo (Sigma-Aldrich, SAD), deionizirana voda (pripravljena korištenjem uređaja *Milli Q*, qH_2O), destilirana voda (dH_2O), dimetil-sulfoksid ($[\text{CH}_3]_2\text{SO}$, DMSO; Kemika, Hrvatska), ditioneitol (DTT; Sigma-Aldrich, SAD), etanol (Kemika, Hrvatska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*; Kemika, Hrvatska), glicerol (Kemika, Hrvatska), glicin (Kemika, Hrvatska), kalijev klorid (KCl; Kemika, Hrvatska), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 ; Kemika, Hrvatska), kalijev fericijanid ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; Kemika, Hrvatska), kalijev ferocijanid ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Kemika, Hrvatska), kristal violet (Sigma-Aldrich, SAD), L-glutamin (Sigma-Aldrich, SAD), metanol (CH_3OH , Kemika, Hrvatska), monohidratna limunska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Kemika, Hrvatska), naftolno plavilo (Kemika, Hrvatska), natrijev dodecil sulfat (SDS, od engl. *sodium dodecyl sulphate*; Sigma-Aldrich, SAD), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 ; Kemika, Hrvatska), natrijev klorid (NaCl ; Kemika, Hrvatska), natrijev piruvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$; Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD), NP-40 (Calbiochem, SAD), natrijev vanadat (Na_3VO_4 ; Sigma-Aldrich, SAD), obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska), penicilin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD), serum fetusa goveda (FBS, od engl. *fetal bovine serume*; Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD), streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD), N,N,N,N-tetrametiletildiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, SAD), tripsin (Sigma Aldrich, SAD), Tris-baza (Sigma Aldrich, SAD), Tween-20 (Sigma-Aldrich, SAD), X-gal (5-bromo-3-indolil- β -D-galaktopirozid; Sigma-Aldrich, SAD).

3.1.2. Otopine i puferi

10 x pufer za elektroforezu (10 x RB): 25 mmol dm^{-3} Tris-baza, 192 mmol dm^{-3} glicin, 0,1 % (w/v) SDS, dH_2O .

10 x pufer za prijenos proteina (10 x TB): 184 mmol dm^{-3} Tris-baza, 140 mmol dm^{-3} glicin, dH_2O .

10 x pufer za ispiranje membrane TBST (od engl. *Tris buffered saline Tween*): 150 mmol dm⁻³ NaCl, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 0,1 % (v/v) Tween-20, dH₂O.

4 x pufer za nanošenje uzoraka na gel (LB, od engl. *Laemmli buffer*), pH 6,8: 0,2 mol dm⁻³ Tris-HCl, 0,4 mol dm⁻³ DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) glicerol, 0,001 % (w/v) bromfenolno plavilo, dH₂O.

Fosfatni pufer (PBS, od engl. *Phosphate buffered saline*) pH 7,4: 8 g dm⁻³ NaCl, 0,2 g dm⁻³ KCl, 1,44 g dm⁻³ Na₂HPO₄, 0,24 g dm⁻³ KH₂PO₄, dH₂O.

Matična otopina akrilamida i bisakrilamida (AAS, od engl. *acrylamide/bisacrylamide stock*): 29,2 % (w/v) akrilamid, 0,8 % (w/v) bisakrilamid.

Otopina APS-a za pripremu poliakrilamidnog gela: 10 % (w/v) APS, dH₂O.

Otopina X-gal: 1 mg ml⁻¹ otopina X-gal (5-bromo-3-indolil-β-D-galaktopirozid), 40 mmol dm⁻³ limunska kiselina/natrijev fosfatni pufer, pH 6, 5 mmol dm⁻³ kalijev ferocijanid, 5 mmol dm⁻³ kalijev fericijanid, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 2 mmol dm⁻³ MgCl₂, dH₂O.

Otopina limunske kiseline: 0,1 mol dm⁻³ monohidratna limunska kiselina (C₆H₈O₇×H₂O), dH₂O.

Natrijev fosfatni pufer: 0,2 mol dm⁻³ natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), dH₂O.

Otopina SDS-a za pripremu poliakrilamidnog gela: 10 % (w/v) SDS, dH₂O.

Otopina za odvajanje stanica od podloge: 0,25 % (w/v) tripsin, 1 mmol dm⁻³ EDTA.

Otopina za bojanje membrane: 1 g dm⁻³ naftolno plavilo, 10 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) octena kiselina, dH₂O.

Otopina za odbojavanje membrane: 40 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) octena kiselina, dH₂O.

Otopina za blokiranje membrane: 4 % (w/v) obrano mlijeko u prahu otopljeno u puferu 1 x TBST.

Pufer za pripremu poliakrilamidnog gela za sabijanje, pH 6,8: 1 mol dm⁻³ Tris, dH₂O.

Pufer za pripremu poliakrilamidnog gela za razdvajanje, pH 8,8: 1,5 mol dm⁻³ Tris, dH₂O.

3.1.3. Komercijalni kompleti

Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina: *BCA Protein Assay Kit*, (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Komercijalni kompleti za detekciju proteina kemiluminescencijom: *Western Lightning[®] Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska), *Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate*

(Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD), *Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.1.4. Stanične linije

Normalne stanice fibroblasta čovjeka (NHF, od engl. *normal human fibroblasts*)⁴⁴ i stanična linija osteosarkoma čovjeka U2OS (dostupna u bazi American Type Culture Collection, ATCC[®] pod nazivom HTB-96TM) s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (NHF- ΔN , odnosno U2OS- ΔN) postignutom retrovirusnom infekcijom i kontrolne stanice (NHF-K, odnosno U2OS-K) s praznim retrovirusnim vektorom.⁴⁵

3.1.5. Hranjive podloge

Kompletirana tekuća hranjiva podloga DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) korištena za uzgoj staničnih linija U2OS i NHF pripravljena je od 500 mL tekuće hranjive podloge DMEM, 10 % (v/v) FBS, 1 mmol dm⁻³ natrijevog piruvata, 2 mmol dm⁻³ L-glutamina, 100 µg cm⁻³ penicilina i 100 µg cm⁻³ streptomicina.

Krioprotektivna tekuća hranjiva podloga korištena za smrzavanje stanica pripravljena je od 45 % (v/v) tekuće hranjive podloge DMEM, 45 % (v/v) FBS-a i 10 % (v/v) DMSO.

3.1.6. Protutijela

Korištena primarna protutijela prikazana su u tablici 1, a sekundarna u tablici 2.

Tablica 1. Prikaz primarnih protutijela, njihovo porijeklo, korišteno razrjeđenje i proizvođač.

Naziv protutijela	Porijeklo	Razrjeđenje	Proizvođač
Protu-cA (sc-751)	Kunić	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Protu-pRb (#554136)	Miš	1:400	BD Pharmingen, SAD
Protu-p21 (sc-397)	Kunić	1:200	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Protu-PCNA (#13110T)	Kunić	1:500	Cell Signalling Technology, Njemačka
Protu- β -aktin (#60008-1-Ig)	Miš	1:250	Proteintech, SAD

Tablica 2. Prikaz sekundarnih protutijela, njihovo porijeklo, korišteno razrjeđenje i proizvođač.

Naziv protutijela	Porijeklo	Razrjeđenje	Proizvođač
Protumišje protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (#7076S)	Konj	1:3000	Cell Signalling Technology, Njemačka
Protukuničje protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (#7074S)	Koza	1:3000	Cell Signalling Technology, Njemačka

3.1.7. Standardi i markeri veličine

Marker veličine *Precision Plus Protein Standards Dual Color* za određivanje molekulske mase proteina u rasponu od 10 do 250 kDa (BioRad, SAD). Albumin iz seruma goveda (BSA, od engl. *bovine serume albumine*) - standard za određivanje koncentracije proteina, korištene koncentracije: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

3.1.8. Laboratorijski pribor

Automatske mikropipete za raspon volumena od 0,5 do 1000 μL uz odgovarajuće nastavke (Eppendorf, Njemačka), petrijeve zdjelice promjera 100 mm (Falcon, Corning Incorporated, SAD), petrijeve zdjelice promjera 35 mm (Falcon, Corning Incorporated, SAD) plastične epruvete volumena 15 mL (Falcon, Corning Incorporated, SAD), staklene epruvete volumena 15 mL, mikroepuvete volumena 1 mL, 1,5 mL, 2 mL (Eppendorf Njemačka), mikrotitarske pločice s 96 jažica (Falcon, Corning Incorporated, SAD), krio-tubice volumena 2 mL (Greiner Bio-One, Njemačka), staklene čaše raznih volumena, menzure raznih volumena, parafilm, strugalica, škare, nitrocelulozna membrana veličine pora 0,2 μm (Whatman, GE Healthcare, UK), filter papir.

3.1.9. Instrumenti

Centrifuga Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital (MSE, UK), Centrifuga tip 5414 R (Eppendorf, Njemačka), inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija), kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija), zibalica Gyro-rocker SSL3 (Stuart[®], Cole-Parmer Ltd., UK), magnetska miješalica MSH Basic (Ika, Njemačka), spektrofotometar za mikrotitarske

pločice Multiskan MS (Labsystems, Finska), sustav za elektroforezu Mini-Protean II (BioRad, SAD), sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot (BioRad, SAD), termoblok Thermomixer Comfort (Eppendorf, Njemačka), uređaj za vizualizaciju Uvitec Alliance Q9 mini (UVItec, UK), vaga tip PM 4000 (Mettler Toledo, SAD), vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip 1083 (GFL, Njemačka).

3.2. Metode rada sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama se provodi u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima sa sterilnim priborom i otopinama kako bi se spriječilo zagađenje mikroorganizmima.

3.2.1. Odmrzavanje stanica

Stanične linije čuvaju se u tekućem dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ u krio-tubicama u krioprotektivnom hranjivom mediju. Prilikom otvaranja spremnika s tekućim dušikom potrebno je nositi rukavice zbog mogućih smrztina. Proces odmrzavanja stanica obuhvaća njihovo djelomično taljenje te prebacivanje u sterilnu staklenu epruvetu u koju je prethodno dodano 5 ml kompletiranog hranjivog medija DMEM. Otapanje i prijenos otopljenih stanica u hranjivi medij treba obaviti u što kraćem vremenu jer krioprotektivni hranjivi medij sadrži DMSO koji je toksičan za stanice pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterilna staklena epruveta koja sadrži otopljene stanice se zatim centrifugira 5 minuta pri $1200 \times g$ i temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital, MSE, UK). Nakon centrifugiranja, supernatant koji sadrži toksičan DMSO se baci, a talog stanica se resuspendira u 3 ml kompletiranog tekućeg hranjivog medija DMEM. Suspenzija stanica se prebaci u Petrijevu zdjelicu i doda se odgovarajući volumen kompletiranog tekućeg hranjivog medija DMEM kako bi ukupan volumen iznosio 10 ml. Petrijeva zdjelica sa stanicama se zatim pohrani u inkubator pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5% CO_2 u atmosferi zasićenoj vlagom.

3.2.2. Uzgoj stanica

Dan nakon odmrzavanja staničnu kulturu potrebno je pogledati pod svjetlosnim mikroskopom te po potrebi promijeniti medij ili rasaditi stanice. Sterilne otopine koje se koriste za rasađivanje stanica (kompletirani tekući hranjivi medij DMEM, otopina PBS-a za ispiranje i tripsin za odvajanje stanica od podloge) čuvaju se pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ te ih je prije upotrebe potrebno ugrijati u vodenoj kupelji pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hranjivi medij je potrebno promijeniti ukoliko je pod mikroskopom uočen veliki broj mrtvih stanica ili je došlo do promjene boje medija. Naime, boja medija je

indikator kiselosti te promjena boje iz crvene u žutu ukazuje na povećanje kiselosti uzrokovano nakupljanjem otpadnih produkata metabolita stanica. Rasađivanje stanica se provodi ukoliko je popunjenost Petrijeve zdjelice oko 80 % površine ili više. Sa stanične kulture se prvo ukloni tekući hranjivi medij te se zatim stanice isperu u 5 ml otopine PBS-a kako bi se uklonili inhibitori proteaza koji onemogućavaju djelovanje tripsina. Na isprane stanice doda se 1 ml otopine tripsina te se Petrijeva zdjelica vrati u inkubator pri 37 °C na 2-3 minute. Tripsin se dodaje kako bi se stanice odvojile od podloge, što se može provjeriti pod mikroskopom. Na stanice se zatim doda 5 ml tekućeg hranjivog medija kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina i zatim se resuspendiraju višestrukim propuštanjem kroz pipetu. Željeni volumen stanica se prebaci u nove Petrijeve zdjelice i doda tekućeg hranjivog medija do ukupnog volumena od 10 mL. Tako rasađene stanice se vrata u inkubator pri 37 °C i 5 % CO₂.

3.2.3. Brojanje stanica

Za nasadivanje željenog broja stanica potrebno je znati koliko izvorna stanična suspenzija sadrži stanica i koliki je volumen suspenzije potrebno uzeti za nasadivanje.

Za određivanje broja stanica u mL koristi se komora za brojanje stanica (Neubauer, Blaubrand). Na komoru je prije punjena potrebno staviti pokrovno stakalce koje mora dobro prijanjati, a to se postiže tako da se rubovi komore navlaže vodom. Zatim se komora puni staničnom suspenzijom kroz utor na gornjoj, odnosno donjoj strani komore. Stanična suspenzija se sastoji od 20 µL suspenzije stanica i 80 µL tripanskog modrila. Komora je podijeljena na 9 polja, ali se stanice broje samo u 4 velika kvadranta u kutevima. Nakon brojanja stanica pomoću komore i svjetlosnog mikroskopa, odredi se gustoća stanica (broj stanica/mL) pomoću formule:

$$\frac{\text{Broj stanica}}{\text{mL}} = \frac{\text{broj izbrojanih stanica}}{\text{broj izbrojanih kvadranata}} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 10^4$$

Kada je poznata gustoća stanica, volumen izvorne stanične suspenzije koji je potrebno uzeti za određeni broj stanica dobije se pomoću formule:

$$\text{Volumen} = \frac{\text{broj stanica}}{\text{broj stanica} \times (\text{mL})^{-1}}$$

3.2.4. Izlaganje stanične kulture γ -zračenju

Za postizanje oštećenja DNA, stanične kulture su izložene γ -zračenju u panoramskom izvoru ⁶⁰Co (Institut Ruđer Bošković, Zagreb). Doze γ -zračenja koje su korištene u sklopu ovog diplomskog rada su 5 i 10 Gy.

3.2.5. *Metoda klonalnog rasta stanica*

Utjecaj γ -zračenja na diobu stanica ispituje se metodom klonalnog rasta stanica. Dan nakon nasađivanja stanica, stanice se izlože γ -zračenju (ne sve, dio nasađenih stanica se ostavi za kontrolu) te 24h nakon izlaganja γ -zračenju, ozračene i neozračene U2OS (K i Δ N) se nasade na pločicu sa šest bunarića. Pločica sadrži neozračene K i Δ N U2OS stanice te ozračene K i Δ N U2OS stanice s 5 i 10 Gy. Pločica se zatim ostavi u inkubatoru pri 37 °C s 5 % CO₂ 10-14 dana. Nakon što je prošao željeni vremenski period, pločica sa stanicama se izvadi iz inkubatora, ukloni se medij i stanice se isperu dva puta u PBS. Zatim se doda 1 ml 4 % otopine formaldehida i ostavi se da stoji 10 minuta. Formaldehid se ukloni i stanice se isperu dva puta u PBS. U svaki bunarić se zatim doda po 1 ml 1 % otopine kristal violet zbog vizualizacije izraslih kolonija stanica i ostavi se da stoji 1 h na sobnoj temperaturi. Otopina se ukloni i ostatak boje ispere vodovodnom vodom.

3.2.6. *Testiranje endogene β -galaktozidazne aktivnosti*

Detektiranje senescentnih stanica provodi se testiranjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti. 24 sata nakon izlaganja U2OS i NHF stanica γ -zračenju, stanice se isperu 2 puta otopinom PBS-a, doda se 1 mL otopine formaldehida, ostavi se 5 minuta da stoji, otkloni se formaldehid i stanice se ponovo isperu 2 puta otopinom PBS-a i zatim se doda 1 mL otopine X-gal i stanice se ostave u inkubatoru preko noći. Sljedeći dan se stanice izvade iz inkubatora, ukloni se otopina za dokazivanje β -galaktozidaze, stanice se isperu dva puta s otopinom PBS-a i zatim se na stanice doda 2 mL otopine PBS-a i ostave se u ledenici. Pomoću svjetlosnog mikroskopa uočavaju se plavo obojene stanice za koje se može reći da su ušle u senescenciju.

3.2.7. *Smrzavanje stanica*

Ukoliko se uzgoji dovoljno stanica, dio se može pohraniti za kasnije potrebe. Smrzavanje stanica se provodi tako da se stanice prvo isperu u PBS-u, zatim tripsiniziraju i doda se 5 mL tekućeg hranjivog medija. Dio stanične suspenzije se prebaci u sterilnu epruvetu, a mali dio se ostavi u Petrijevoj zdjelici, doda tekući hranjivi medij i vrati u inkubator. Stanična suspenzija u sterilnoj epruveti se centrifugira 5 minuta pri 1200 x g i temperaturi od 4 °C. Supernatant se odbaci, a talog resuspendira u 1 mL krioprotektivnog medija koji sadrži 45 % kompletiranog tekućeg hranjivog medija DMEM, 45 % otopine FBS-a i 10 % otopine DMSO koja omogućava

stanicama da prežive prilikom smrzavanja. Stanice se zatim prebace u krio-tubicu i pohrane u frižideru pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a nakon nekoliko dana prebace u tekući dušik pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. Priprema proteina za Western hibridizaciju

3.3.1. Izolacija proteina iz stanica

Stanicama koje su rasle u 35 mm Petrijevim zdjelicama tijekom određenog vremenskog perioda nakon γ -zračenja ukloni se hranjivi medij te se isperu u 1 mL PBS-a. Zatim se na stanice doda 200 μL otopine tripsina, ostavi se 2-3 minute u inkubatoru te se resuspendira u 800 μL tekućeg hranjivog medija. Suspenzija stanica se zatim prebaci u prethodno označenu mikroeprevetu volumena 1,5 mL. Sadržaj u mikroepreveti se centrifugira 5 minuta pri 1200 x g i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja uzorak se stavi na led, ukloni supernatant pazeći da se ne izgubi talog, te doda 500 μL otopine hladnog PBS-a i zatim ponovo centrifugira. Postupak se ponovi još jednom. Nakon drugog centrifugiranja, ukloni se supernatant i na talog doda 50 μL pufera za lizu s dodanim inhibitorima proteaza. Uzorci se inkubiraju 15 minuta na ledu kako bi se omogućila liza stanica te se zatim sadržaj u mikroepreveti resuspendira i ostavi još 15 minuta na ledu. Uzorci se zatim centrifugiraju pri 13000 x g i $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon čega se supernatant, koji sadrži proteinski ekstrakt, otpipetira u prethodno označenu mikroeprevetu i pohrani pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Određivanje ukupne koncentracije izoliranih proteina metodom BCA

Ukupna koncentracija izoliranih proteina određuje se korištenjem komercijalnog kompleta *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). Postupak određivanja koncentracije izoliranih proteina provodi se u mikrotitarskoj pločici s 96 jažica u koje se u duplikatima prvo nanosi po 20 μL standardnih otopina BSA koncentracija 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 $\mu\text{g cm}^{-3}$ i u dvije jažice po 20 μL qH₂O, a zatim uzorci koji se razrjeđuju 10 puta s qH₂O (u svaku jažicu se nanosi po 18 μL qH₂O i 2 μL uzorka). Standardne otopine BSA koriste se za konstrukciju baždarnog pravca. U svaku od jažica dodaje se po 200 μL BCA reagensa koji se dobije miješanjem BCA reagensa A s BCA reagensom B u omjeru 50:1. Mikrotitarska pločica s uzorcima se poklopi i stavi na tresilicu za mikrotitarske pločice, a zatim inkubira 30 minuta u vodenoj kupelji pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije mikrotitarska pločica se stavi na spektrofotometar za mikrotitarske pločice i snimi se apsorbancija pri 570 nm. Od apsorbancije standardnih otopina BSA i uzorka oduzme se apsorbancija slijepe probe (qH₂O). Iz apsorbancija standardnih otopina BSA poznatih koncentracija konstruira se baždarni pravac te se pomoću

njega odredi koncentracija pojedinih uzoraka. Pošto su uzorci razrijeđeni 10 puta, dobivenu koncentraciju na kraju je potrebno pomnožiti s 10.

3.4. Analiza proteina metodom Western hibridizacije

Western analiza vrlo je korisna i osjetljiva metoda za određivanje i identifikaciju malih količina određenog proteina u smjesi različitih proteina. Temelji se na prepoznavanju i ostvarivanju kompleksa između antigena i protutijela. Protutijelo se veže na antigen koji se nalazi na sintetskoj membrani. Metoda Western hibridizacije se sastoji od nekoliko koraka: elektroforeze na gelu kojom se proteini razdvajaju prema molekularnoj masi, prijenosu proteina na nitroceluloznu membranu, inkubiranja membrane u mlijeku za blokiranje nastanka nespecifičnih interakcija, vezanju primarnog protutijela, vezanju sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom iz hrena i detekciji ciljnog proteina kemiluminiscencijom nakon dodatka specifičnog supstrata.

3.4.1. Priprema uzoraka za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu

Prije izvođenja elektroforeze potrebno je pripremiti uzorke proteina, poliakrilamidne gelove i pufer za elektroforezu. Nakon što se odredi koncentracija ukupnih proteina u uzorcima, odredi se koliki volumen uzoraka proteina treba nanijeti na gel tako da na gelu bude po 20 µg proteina svakog od uzoraka. Odredi se i volumen 4 x pufera za nanošenje uzoraka na gel (4 x LB) koji treba dodati pojedinom uzorku proteina da se razrijedi 4 puta. Ukoliko se uzorci dosta razlikuju u izračunatom volumenu koji se nanosi na gel, uzorcima se doda 1 x LB kako bi se volumeni izjednačili. Izračunati volumen uzorka i 4 x LB pufera se otpipetira u prethodno označene mikroeprevete, kratko promiješa na tresilici i zagrije 5 min pri 96 °C. Tako pripremljeni uzorci mogu se spremati na -20 °C i nanijeti na gel drugi dan, ili se može odmah provesti elektroforeza. Uzorke je prije nanošenja na gel potrebno još jednom dobro promiješati.

3.4.2. Priprema gelova i pufera za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu

Za provedbu elektroforeze na SDS-poliakrilamidnom gelu potrebno je pripremiti gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Gel za razdvajanje je donji gel i njegov postotak se razlikuje ovisno o veličini proteina koji se namjeravaju analizirati. Za analizu proteina veće molekulske mase priprema se gel za razdvajanje s manjim postotkom poliakrilamida, dok se za proteine manje molekulske mase priprema gel većeg postotka poliakrilamida. Gel za sabijanje je gornji gel koji je uvijek 5 %-tni poliakrilamidni gel i u njemu se formiraju jažice korištenjem češljica

s 10 ili 15 jažica. Sastav smjese potreban za pripremu pojedinih poliakrilamidnih gelova i postotak gelova za razdvajanje koji se koriste za analizu određenog proteina prikazan je u tablici 3. Prije pripreme gelova potrebno je napraviti sendvič-konstrukciju u koju se gel izlijeva. Odabere se tanje i deblje stakalce i međusobno se učvrste plastičnim hvataljkama. Tako dobivena sendvič-konstrukcija se pozicionira na postolje za izlijevanje gela i učvrsti pomoću držača. Zatim se pripravi gel za razdvajanje (APS i TEMED se dodaju zadnji jer oni omogućavaju polimerizaciju). Smjesa za donji gel dodaje se između stakalaca na stalku do otprilike dvije trećine visine nižeg stakalca. Na rub nepolimeriziranog gela pažljivo se nanosi sloj dH₂O i ostavi da gel polimerizira. Kad je gel za razdvajanje polimerizirao, izlije se voda te se nanese smjesa za gel za sabijanje, koji je neposredno prije pripremljen, do gornjeg ruba nižeg stakalca. U gel za sabijanje umetne se češalj koji omogućava formiranje jažica. Pufer za elektroforezu na poliakrilamidnom gelu (RB, od engl. *Running Buffer*) pripravlja se deseterostrukim razrjeđivanjem 10 x RB-a u dH₂O.

Tablica 3. Sastav smjese potreban za pripremu određenih poliakrilamidnih gelova korištenih za analizu pojedinih proteina

Vrsta gela i postotak poliakrilamida	Sastav gela	Analizirani proteini
Gel za sabijanje (5 %-tni)	2,7 mL dH ₂ O, 0,67 mL AAS, 0,5 mL 1 mol dm ⁻³ Tris (pH=6,8), 0,04 mL 10 % (w/v) SDS, 0,04 mL 10 % (w/v) APS, 0,004 mL TEMED	cA, pRb, p21, PCNA, β-aktin
Gel za razdvajanje (8 %-tni)	4,6 mL dH ₂ O, 2,7 mL AAS, 2,5 mL 1,5 mol dm ⁻³ Tris (pH=8,8), 0,1 mL 10 % (w/v) SDS, 0,1 mL 10 % (w/v) APS, 0,006 mL TEMED	cA, pRb, β-aktin
Gel za razdvajanje (12 %-tni)	3,3 mL dH ₂ O, 4,0 mL AAS, 2,5 mL 1,5 mol dm ⁻³ Tris (pH=8,8), 0,1 mL 10 % (w/v) SDS, 0,1 mL 10 % (w/v) APS, 0,004 mL TEMED	p21, PCNA

3.4.3. Razdvajanje proteina elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu je metoda koja se koristi za razdvajanje proteina na temelju njihove mase. Naime, na migraciju proteina u poliakrilamidnom gelu utječu masa, naboj i struktura proteina. Denaturacijom proteina u SDS-u dolazi do gubitka sekundarne strukture i nastaju kompleksi koji se sastoje od polipeptidnog lanca i SDS-a. Količina SDS-a koja se veže po molekuli proteina je konstantna (jedna molekula SDS-a se veže na dvije aminokiseline). Naboj nastalog kompleksa protein-SDS ovisi isključivo o naboju SDS-a koji maskira naboj proteina i zbog toga se svi proteini ponašaju kao da imaju isti oblik i omjer naboja

i mase. Primjenom električne struje proteini migriraju u poliakrilamidnom gelu, svaki različitom brzinom ovisno o svojoj masi.

Pripremljeni poliakrilamidni gelovi zajedno sa stakalcima postavljaju se u sustav za elektroforezu i zatim se ulije prethodno pripremljeni 1 x RB. Prije nanošenja uzoraka na gel, potrebno je isprati jažice, a uzorke dobro promiješati. U jažice gelova nanose se pripremljeni uzorci proteina dobiveni iz stanica. Na svaki gel je potrebno nanijeti i 3 μ L markera veličine za određivanje molekulske mase proteina. Nakon što su uzorci nanešeni, sustav za elektroforezu se spoji na sustav za napajanje i pokrene se elektroforeza, prvo pri 80 V, a zatim se povisi na 100 V ili 110 V ovisno o putovanju i razdvajanju proteina. Elektroforeza se provodi oko 2 sata.

3.4.4. Prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

Nakon završetka elektroforeze slijedi prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu. Stakla s poliakrilamidnim gelom izvade se iz sustava za elektroforezu, odvoje se te se ukloni gel za sabijanje. U kadicu se ulije pufer za transfer (1 x TB s 20 % v/v metanola)) te se složi kazeta za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Kazeta za prijenos proteina sastoji se od nekoliko slojeva: mrežice, dva filter papira, poliakrilamidnog gela, nitrocelulozne membrane, dva filter papira i mrežice. Bitno je svaki sloj prije dodavanja namočiti u puferu za prijenos. Tako pripremljena kazeta se stavi u sustav za prijenos proteina te se ulije pufer za prijenos tako da gel i membrana budu u puferu. U sustav se doda i posuda s ledom te magnet kako prilikom prijenosa proteina ne bi došlo do pretjeranog zagrijavanja sustava. Sustav se priključi na uređaj za napajanje i stavi na magnetsku miješalicu. Prijenos se provodi jedan sat pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA.

3.4.5. Bojanje nitrocelulozne membrane i blokiranje nespecifičnih interakcija

Nakon što je prijenos proteina završio, membrana se prebaci u kadicu, doda se otopina naftalnog plavila za bojanje membrane i ostavi se na zibalici oko 10 minuta. Bojanjem membrane provjerava se uspješnost prijenosa proteina te se nakon fotografiranja ili skeniranja može koristiti kao kontrola nanošenja pojedinih uzoraka ukupnih proteina. Otopina za bojanje se zatim ukloni i membrana se dva puta ispere u otopini za odbojavanje. Membranu je zatim potrebno isprati tri puta po 10 minuta u 1 x TBST. U međuvremenu se pripremi otopina 4 %-tnog mlijeka u puferu 1 x TBST za blokiranje nespecifičnih interakcija u kojoj se membrana inkubira najmanje 20 minuta.

3.4.6. Priprema i nanošenje primarnog i sekundarnog protutijela

Nakon blokiranja membrane, na membranu se nanosi otopina primarnog protutijela u otopini za blokiranje. Izbor primarnog protutijela ovisi o proteinu koji se želi detektirati. Korištena primarna protutijela i omjer njihovih razrjeđenja prikazani su u tablici 1. Nakon što je primarno protutijelo pripravljeno, nanosi se na membranu u najlonu. Najlon se zatim zavari s aparatom za varenje. Bitno je da prilikom zavarivanja ne zaostanu mjehurići na membrani koji bi smetali jednolikoj raspodjeli primarnog protutijela. Na veličinu membrane dovoljna je količina primarnog protutijela od 1 mL. Tako zavarena membrana se inkubira na tresilici preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, protutijelo se ukloni, a membrana se na tresilici ispire 3 puta po 10 minuta u 1 x TBST. Nakon što je membrana isprana, doda se sekundarno protutijelo također razrijeđeno u određenom omjeru (tablica 2). Sekundarna protutijela su obilježena s peroksidazom iz hrena koja reakcijom sa supstratom daju netopivi obojeni produkt na mjestu na kojem se nalazi kompleks protein:primarno protutijelo:sekundarno protutijelo. Membrana se inkubira u otopini sekundarnog protutijela na tresilici 1 sat pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, sekundarno protutijelo se ukloni i membrana se na tresilici ispire 3 puta po 10 minuta u 1 x TBST.

3.4.7. Vizualizacija ciljnog proteina

Nakon što je membrana isprana na nju se dodaje oko 1,5 mL supstrata za peroksidazu iz hrena. Supstrat se ostavi na membrani oko 1 minutu te se zatim ukloni. Membrana se stavi u uređaj za vizualizaciju Uvitec Alliance Q9 mini (UVItec, UK) i snimi se kemiluminescencija. Dodatak supstrata za peroksidazu iz hrena rezultirat će nastankom kemiluminescentnog spoja na mjestu proteina od interesa što je vidljivo kao tanka vrpca. Ukoliko protein od interesa nije prisutan na membrani, željena vrpca neće biti vidljiva. Ovisno o količini proteina koji se želi detektirati koriste se različiti supstrati. Za većinu proteina koristi se supstrat *Western Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska). Ukoliko vrpca nije dovoljno intenzivna ili uočiva primjeni se *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* pomiješan s *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). Svaki od navedenih supstrata sadrži dva reagensa koji se miješaju u omjeru 1:1. Kvantifikacija intenziteta pojedinih proteinskih vrpca provedena je pomoću programa Image Lab 6.1 (BioRad, SAD).

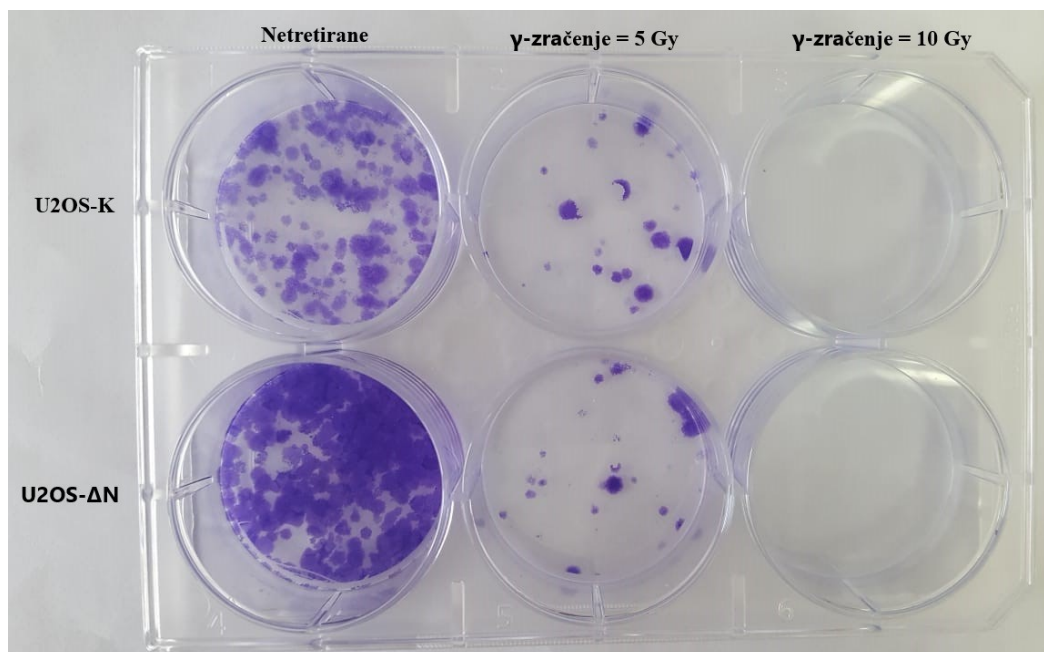
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog Diplomskog rada ispitan je utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ proteina p73 na ulazak stanica u senescenciju izazvanu oštećenjem DNA. Eksperimenti su provedeni na normalnim fibroblastima čovjeka (NHF) i na staničnoj liniji osteosarkoma čovjeka U2OS u kojima je pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ ranije postignuta retrovirusnom infekcijom. Za izazivanje oštećenja DNA stanične kulture izložene su γ -zračenju doze 5 i 10 Gy. Utjecaj γ -zračenja na proliferaciju stanica ispitan je metodom klonalnog rasta stanica. Kao marker za detekciju senescentnih stanica korištena je endogena β -galaktozidazna aktivnost povezana sa starenjem (SA- β -Gal). Metoda Western hibridizacije korištena je za provjeru ekspresije proteina koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA (pRb, ciklin A, p21, PCNA) i uključuju često korištene markere stanične proliferacije (ciklin A i PCNA).

4.1. Utjecaj γ -zračenja na sposobnost klonalnog rasta stanične linije U2OS

Ispitivanje utjecaja γ -zračenja doze 5 i 10 Gy na proliferaciju stanica osteosarkoma U2OS provedeno je metodom klonalnog rasta stanica. Metoda je provedena na kontrolnim U2OS stanicama (U2OS-K) koje ne pokazuju značajnu endogenu ekspresiju izoforme $\Delta Np73\alpha$ te na stanicama U2OS u kojima je pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ postignuta retrovirusnom infekcijom (U2OS- ΔN). Ukratko, stanice su tretirane zračenjem doze 5 ili 10 Gy te su nakon 24 sata presađene u pločicu sa šest bunarića, pri čemu je za svaki uzorak nasadeno po 1000 stanica u jedan bunarić. Stanične kulture su ostavljene u inkubatoru pri 37 °C s 5 % CO₂ te je povremeno pod mikroskopom provjeravan rast kolonija iz pojedinačnih stanica. Devet dana nakon nasadivanja procijenjeno je da su kolonije stanica dovoljno velike (otprilike po 50 stanica) te su uzorci obojeni kristal violetom (Slika 9). Iz rezultata je vidljivo da netretirane kontrolne U2OS stanice i U2OS stanice koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ pokazuju značajnu sposobnost klonalnog rasta, pri čemu su stanice koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ formirale veći broj kolonija. Prema dosadašnjim spoznajama inducibilna pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ u nekoliko različitih tumorskih staničnih linija čovjeka nije dovela do bržeg rasta broja stanica, no pritom nije korištena ista vrsta testa.^{46,47} Nakon ozračivanja stanica γ -zračenjem doze 5 Gy dolazi do smanjenja broja izraslih kolonija stanica što upućuje na smanjenje broja stanica koje su pri ovim eksperimentalnim uvjetima sposobne za diobu i formiranje kolonija. Nakon izlaganja stanica γ -

zračenju doze 10 Gy nismo uočili rast staničnih kolonija nakon bojanja kristal violetom što upućuje na trajnije zaustavljanje proliferacije stanica (Slika 9). Navedene doze smo stoga koristili u daljnjim istraživanjima za proučavanje senescencije.



Slika 9. Utjecaj γ -zračenja doze 5 i 10 Gy na sposobnost klonalnog rasta kontrolnih U2OS stanica (U2OS-K) te U2OS stanica s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ (U2OS- ΔN) nakon devetodnevne inkubacije pri 37 °C s 5 % CO_2 .

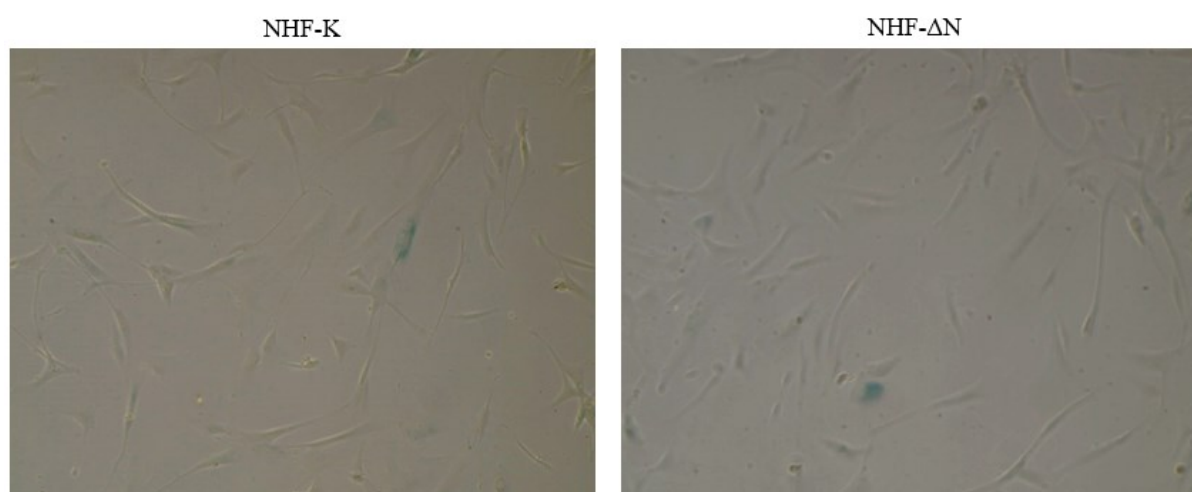
4.2. Određivanje udjela stanica u senescenciji praćenjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti povezane sa starenjem

Jedan od najčešće korištenih biomarkera za određivanje stanične senescencije jest praćenje aktivnosti SA- β -Gal pri pH 6.¹⁴⁻¹⁵ U sklopu ovog diplomskog rada praćenje endogene aktivnosti SA- β -Gal provedeno je na kontrolnim stanicama NHF i U2OS (NHF-K i U2OS-K) te na stanicama NHF i U2OS u kojima je pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ postignuta retrovirusnom infekcijom (NHF- ΔN i U2OS- ΔN). SA- β -Gal aktivnost praćena je 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 5 Gy te 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy. Uzorci stanica slikani su na svjetlosnom mikroskopu opremljenom s digitalnom kamerom te je nakon brojanja izračunat udio stanica pozitivnih na aktivnost SA- β -Gal (prisutnost plavog obojenja) u

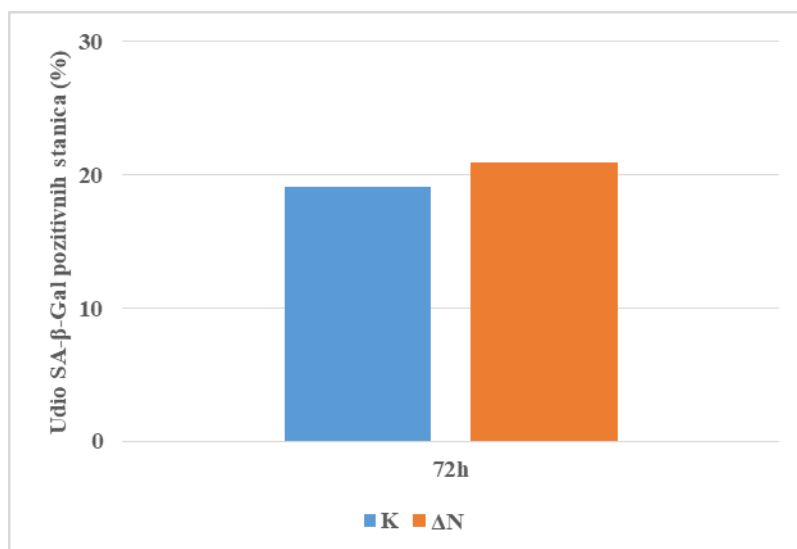
ukupnom broju stanica. Rezultati su grafički prikazani u obliku srednje vrijednosti dobivenih analiziranjem više pojedinačnih slika za svaki od uzoraka.

4.2.1. Utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na SA- β -Gal aktivnost u stanicama NHF nakon izlaganja γ -zračenju

Rezultati dobiveni praćenjem aktivnosti SA- β -Gal u stanicama NHF-K i NHF- ΔN 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 5 Gy prikazani su na slikama 10 i 11.

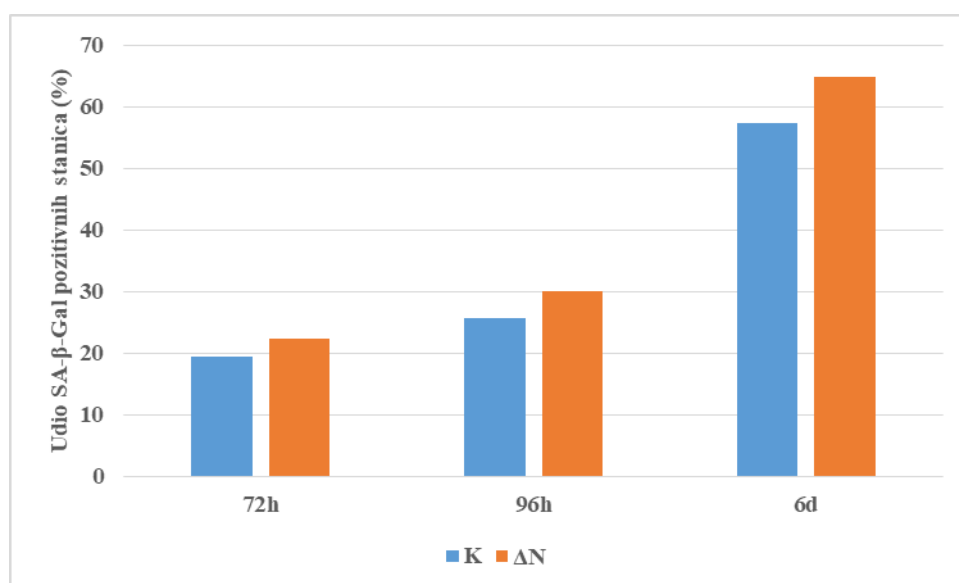


Slika 10. Endogena β -galaktozidazna aktivnost (plavo obojenje) dobivena 72 h nakon izlaganja kontrolnih stanica NHF (NHF-K) i stanica NHF s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (NHF- ΔN) γ -zračenju doze 5 Gy.

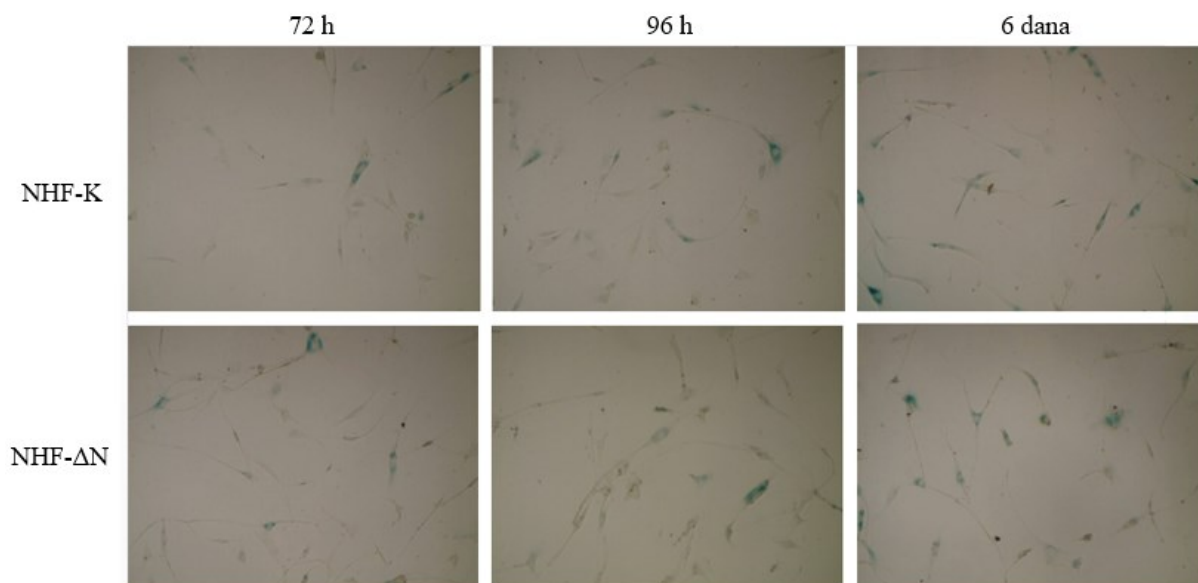


Slika 11. Udio SA-β-Gal-pozitivnih stanica dobiven 72 h nakon izlaganja kontrolnih stanica NHF (K) i stanica s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) γ -zračenju doze 5 Gy.

Rezultati dobiveni praćenjem aktivnosti SA-β-Gal na stanicama NHF-K i NHF- ΔN 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy prikazani su na slikama 12 i 13.



Slika 12. Udio SA-β-Gal pozitivni stanica dobivenih 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja kontrolnih stanica NHF (K) i stanica s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) γ -zračenju doze 10 Gy



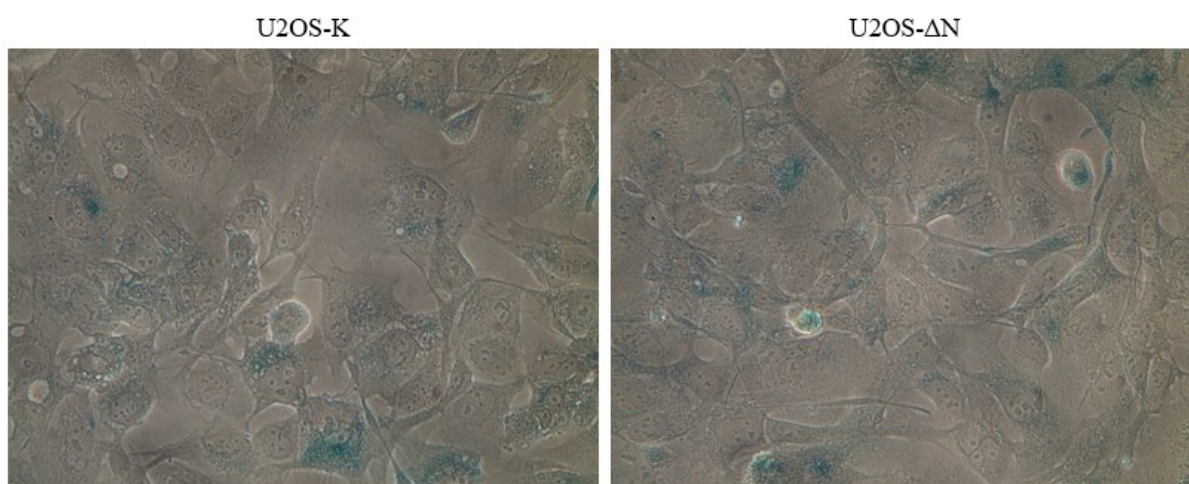
Slika 13. Endogena β -galaktosidazna aktivnost (plavo obojenje) dobivena 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja kontrolnih stanica NHF(NHF-K) i stanica NHF s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (NHF- ΔN) γ -zračenju doze 10 Gy

Na osnovu rezultata prikazanih na slikama 10 i 11 možemo vidjeti da je udio stanica koje pokazuju aktivnost SA- β -Gal nakon izlaganja γ -zračenju doze 5 Gy za oko 2 % veći kod stanica NHF- ΔN u usporedbi s kontrolnim stanicama. Taj rezultat se ne podudara s pretpostavkom da bi udio senescentnih stanica trebao biti manji kod stanica koje eksprimiraju izoformu $\Delta Np73\alpha$ jer ona sudjeluje u tumorigenezi.^{7,9} Slični rezultati dobiveni su i kod stanica koje su izložene γ -zračenju doze 10 Gy. Udio SA- β -Gal-pozitivnih stanica 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy za oko 3 % je veći kod stanica NHF koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ nego kod kontrolnih stanica, nakon 96 h razlika iznosi oko 4,5 %, a nakon 6 dana oko 8 %. Razlog ovakvih rezultata može biti taj što određivanje β -galaktosidazne aktivnosti povezane sa starenjem nije u potpunosti specifičan biomarker za senescenciju iako se zbog jednostavnosti izvođenja ove metode dosta koristi.^{14,15} Njezina aktivnost pri pH 6 uočena je i kod nekih nesenescentnih stanica što je posljedica povećanja lizosoma uzrokovanih nekim drugim uvjetima.^{14,15} Također pokazano je da i sama senescencija ima dvostruku ulogu i da osim što djeluje kao supresor tumora, senescentne stanice mogu izlučivati različite citokine, faktore rasta, ekstracelularne vezikule, metaloproteinaze matriksa koji mogu nepovoljno djelovati na susjedne stanice.³ U novije vrijeme pokazano je da pojava senescentnih stanica može doprinijeti tumorigenezi i s aspekta da jedan manji dio stanica koje pokazuju senescentna svojstva može s vremenom

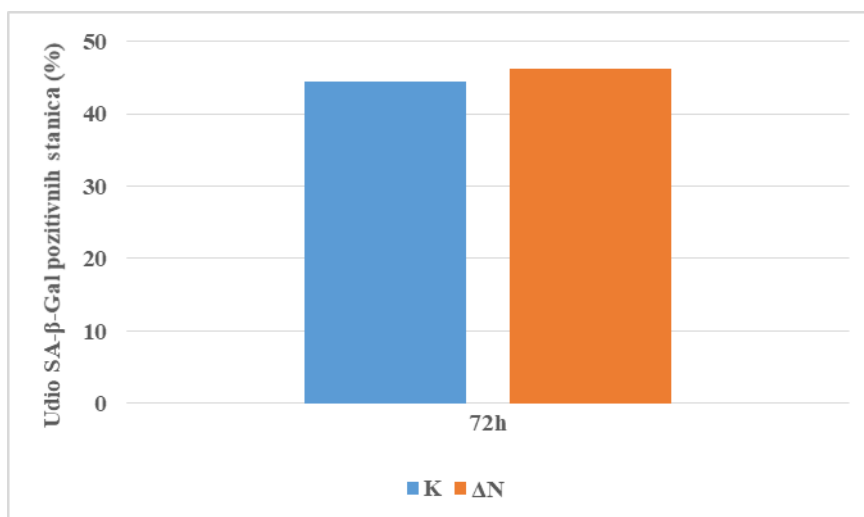
„umaknuti“ djelovanju terapije doprinoseći tumorigenezi. Ta je pojava povezana s pojavom poliploidnih stanica nakon djelovanja različitih terapeutika.⁴⁸ Štoviše, ranije je pronađeno da pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ u stanicama NHF dovodi do povećane učestalosti poliploidije nakon zračenja⁴⁵ što bi također jednim dijelom moglo utjecati na udio stanica s endogenom β -galaktozidaznom aktivnošću u ovim eksperimentima.

4.2.2. Utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na SA- β -Gal aktivnost u staničnoj liniji U2OS nakon izlaganja γ -zračenju

Rezultati dobiveni praćenjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti na staničnoj liniji osteosarkoma U2OS (kontrolnim U2OS-K i stanicama koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ U2OS- ΔN) 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 5 Gy prikazani su na slikama 14 i 15.

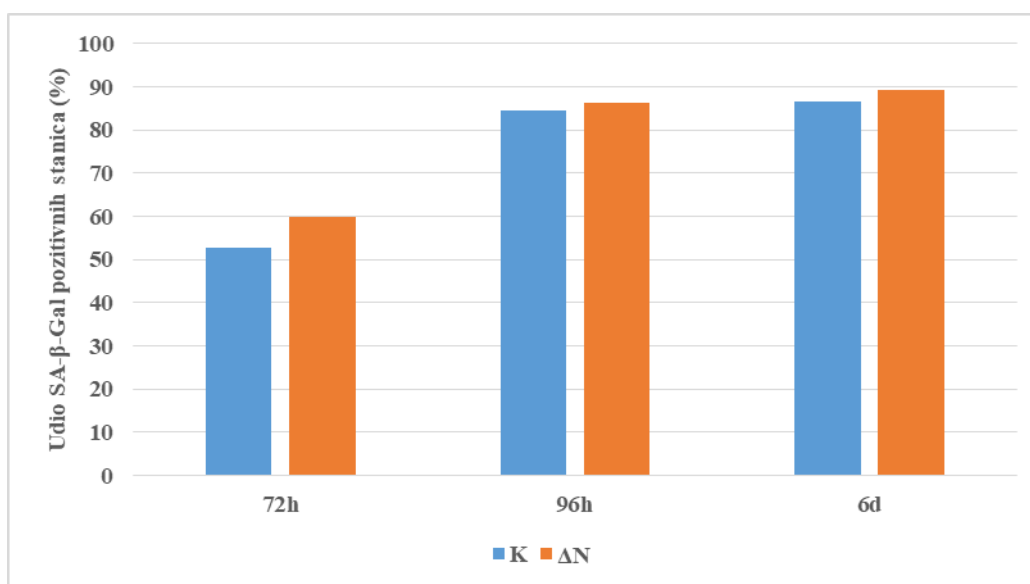


Slika 14. Endogena β -galaktozidazna aktivnost (plavo obojenje) dobivena 72 h nakon izlaganja kontrolnih stanica U2OS (U2OS-K) i stanica U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (U2OS- ΔN) γ -zračenju doze 5 Gy.

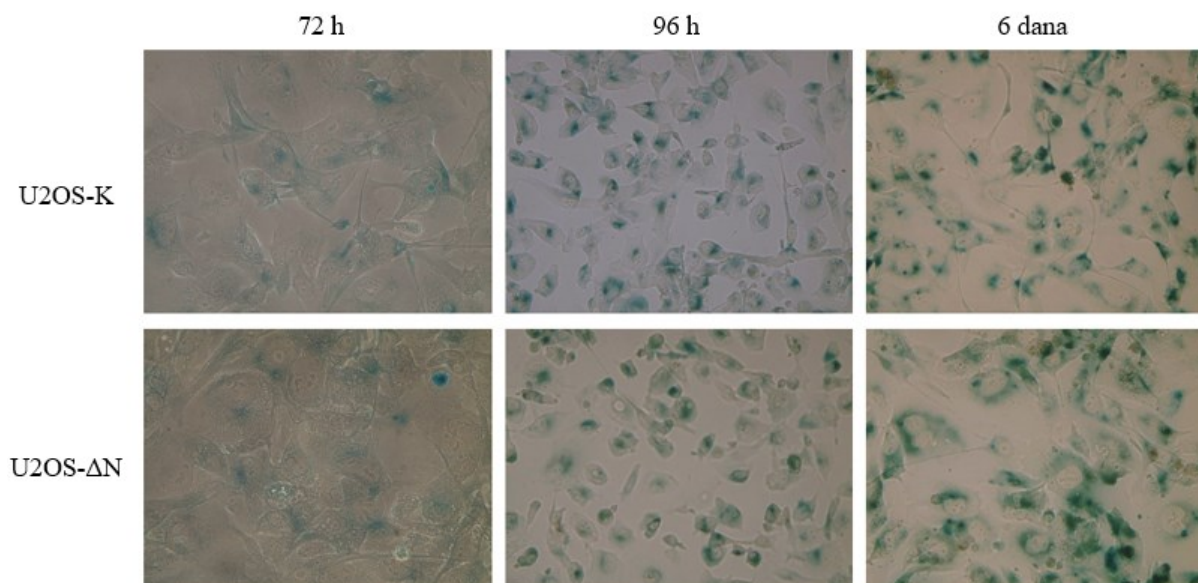


Slika 15. Udio SA-β-Gal-pozitivnih stanica dobiven 72 h nakon izlaganja kontrolnih stanica U2OS (K) i stanica U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) γ -zračenju doze 5 Gy.

Rezultati dobiveni praćenjem endogene β -galaktozidazne aktivnosti na staničnoj liniji osteosarkoma U2OS (kontrolne i stanice koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$) 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy prikazani su na slikama 16 i 17.



Slika 16. Udio SA-β-Gal-pozitivnih stanica dobiven 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja kontrolnih stanica U2OS (K) i stanica U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) γ -zračenju doze 10 Gy.



Slika 17. Endogena β -galaktozidazna aktivnost (plavo obojenje) dobivena 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja kontrolnih stanica U2OS (U2OS-K) i stanica U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme Δ Np73 α (U2OS- Δ N) γ -zračenju doze 10 Gy.

Na osnovu dobivenih rezultata nije uočena značajna razlika u udjelu SA- β -Gal-pozitivnih stanica između U2OS-K i U2OS- Δ N nakon izlaganja γ -zračenju doze 5 Gy (oko 2 % veći udio kod stanica U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme Δ Np73 α , slike 14 i 15). Isti trend je prisutan i kod stanica koje su izložene γ -zračenju doze 10 Gy (slike 16 i 17). Udio SA- β -Gal-pozitivnih stanica 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy za oko 7 % je veći kod U2OS- Δ N u odnosu na kontrolne U2OS stanice, nakon 96 h razlika iznosi oko 2 %, a nakon 6 dana oko 3 %. Iako razlika u udjelu SA- β -Gal-pozitivnih stanica između kontrolnih stanica U2OS i U2OS stanica koje sadrže izoformu Δ Np73 α nije izrazita, dobiveni rezultati ne idu u prilog hipotezi da bi onkogeno izoforma Δ Np73 α mogla inhibirati senescenciju kao tumorsko-supresorski mehanizam.^{7,9} Naša hipoteza bila je utemeljena na spoznajama da izoforma Δ Np73 α inhibira tumorske supresore p53 i pRb koji imaju ulogu u indukciji senescencije nakon oštećenja DNA.^{35,37,43} Kao i kod normalnih fibroblasta ovakav rezultat može se objasniti kompleksnom dvojkom ulogom senescencije u nastanku i razvoju tumora.³ S jedne strane izlaskom stanica iz ciklusa senescencija sprječava daljnji prijenos oštećenja na stanice kćeri što inhibira nastanak tumora, dok senescencija može predstavljati i mehanizam svojevrsnog “latentnog stanja” kojim tumorske stanice izbjegnu djelovanje terapije i posljedično staničnu smrt. U novije vrijeme sve više istraživanja govori u prilog tome da jedan manji dio stanica u

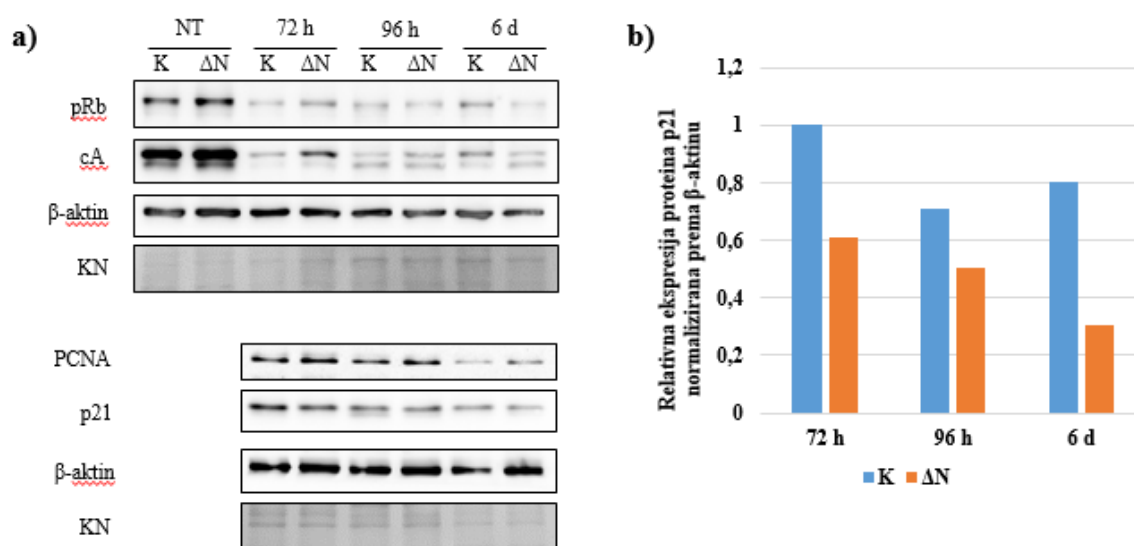
senescenciji izazvanoj različitim terapijama može izaći iz zastoja staničnog ciklusa i doprinijeti širenju tumora.⁴⁹ Senescentne stanice osim toga mogu, kao što je opisano ranije, izlučivanjem različitih tvari koje nepovoljno djeluju na susjedne stanice dovesti do različitih promjena i u konačnici do nastanka tumora što naravno ovisi o vrsti izlučenih tvari i tipu stanica koje okružuju senescentne stanice. Dodatno, β -galaktozidazna aktivnost povezana sa starenjem nije specifičan biomarker isključivo za senescenciju i ne smije se sam koristiti za njezino određivanje.^{14,15} Iz tog razloga, ispitivanje ulaska stanica u senescenciju potkrijepljeno je analizom ekspresije proteina uključenih u progresiju i regulaciju staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA.

4.3. Provjera ekspresije proteina koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA metodom Western hibridizacije

Provjera ekspresije proteina cA, pRb, p21 i PCNA provedena je metodom Western hibridizacije. Eksperimenti su provedeni na kontrolnim stanicama NHF i U2OS te na stanicama NHF i U2OS s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$. Ekspresija ovih proteina praćena je 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja stanica γ -zračenju doze 10 Gy.

4.3.1. Utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na ekspresiju proteina cA, pRb, p21 i PCNA nakon izlaganja stanica NHF γ -zračenju

Rezultati dobiveni praćenjem ekspresije proteina cA, pRb, p21 i PCNA metodom Western hibridizacije 72 h, 96 h i 6 dana nakon izlaganja kontrolnih stanica NHF i stanica koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ γ -zračenju doze 10 Gy prikazani su na slici 18a. Za proteine p21 i PCNA nisu prikazane netretirane stanice.



Slika 18. Analiza ekspresije regulatora staničnog ciklusa metodom Western hibridizacije. a) Stanice NHF s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) i kontrolne stanice (K) ozračene su s 10 Gy, sakupljene nakon 72 h, 96 h i 6 dana te je analizirana ekspresija pRb, ciklina A (cA), PCNA i p21. Kao kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija β -aktina i slika membrane obojene naftolnim plavilom (KN). NT-netretirane stanice. b) Relativna ekspresija proteina p21 normalizirana prema ekspresiji β -aktina u kontrolnim stanicama (K) i stanicama NHF s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) sakupljenima 72 h, 96 h i 6 dana nakon zračenja dozom 10 Gy. Intenziteti signala proteinskih vrpce kvantificirani su korištenjem programa Image Lab 6.1 (Bio-Rad, SAD).

Ciklin A je član obitelji ciklina koji se počinje akumulirati u S fazi staničnog ciklusa i vezanjem na Cdk1/2 omogućava replikaciju DNA i prijelaz stanice iz S u G2 fazu.¹⁷ Ukoliko dođe do oštećenja DNA i ulaska stanice u senescenciju, razina cA bi se trebala smanjiti jer se replikacija DNA ne odvija. Rezultati dobiveni metodom Western hibridizacije provedene na stanicama NHF (slika 18a) pokazuju višu razinu ekspresije cA u stanicama s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ u odnosu na kontrolne stanice nakon oštećenja DNA zračenjem. Ovakav trend uočljiv je kod netretiranih stanica te kod stanica analiziranih 72 i 96 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy. Nasuprot tome, 6 dana nakon izlaganja γ -zračenju razina cA viša je kod kontrolnih stanica. Općenito gledano, signal vrpce koje odgovaraju cA slabog je intenziteta što upućuje na smanjenje količine ovog proteina prisutnog u stanicama kao posljedice izlaska stanica iz ciklusa nakon zračenja. Dobiveni rezultati ukazuju da je udio stanica koje su ostale u

ciklusu (ili repliciraju DNA) veći kod stanica NHF- ΔN u odnosu na kontrolne stanice, tj. da stanice s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ slabije ulaze u senescenciju.

Aktivacija tumorskog supresora pRb smanjenjem razine fosforiliranosti važna je za zastoj i održavanje zastoja staničnog ciklusa i posljedično za ulazak stanica u senescenciju. S ulaskom stanica u senescenciju dolazi postupno do smanjenja ekspresije pRb. Podudarno s rezultatima dobivenim analizom ekspresije ciklina A, razina pRb u većini uzoraka bila je viša kod stanica s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ nego kod kontrolnih stanica, što je u skladu s dosadašnjim spoznajama.⁴³ Kao i kod ciklina A, razina ekspresije pRb se općenito smanjuje nakon zračenja, što upućuje na zaustavljanje većine stanica.

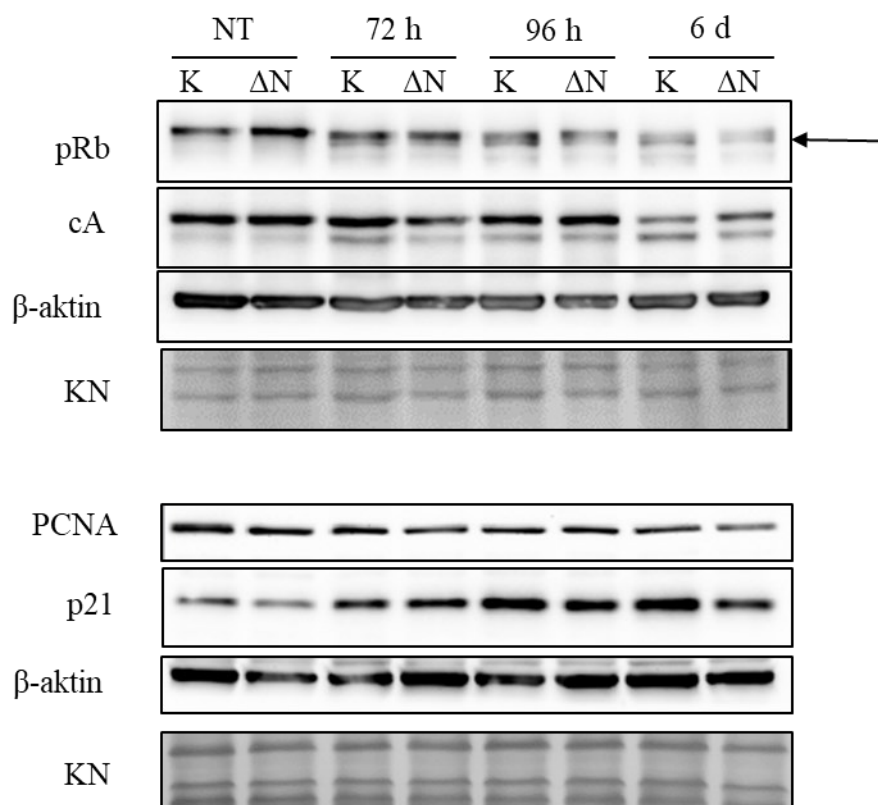
Protein PCNA važan je u mnogim esencijalnim staničnim procesima kao što su replikacija DNA, odgovor na oštećenje DNA, održavanje strukture kromatina, razdvajanje kromosoma i napredovanje staničnog ciklusa te se koristi kao marker stanične proliferacije.⁵⁰ Rezultati prikazani na slici 18a ukazuju na prisutnost više razine ovog proteina u stanicama NHF s pojačanom ekspresijom izoforme $\Delta Np73\alpha$ u odnosu na kontrolne stanice, što bi upućivalo na manji udio stanica u senescenciji.

Nasuprot gore analiziranim čimbenicima proliferacije stanica, razina inhibitora Cdk proteina p21 povećava se nakon oštećenja DNA te ovaj protein ima značajnu ulogu u odgovoru na oštećenje, uključujući ulazak stanica u senescenciju.²² Imajući to na umu razina p21 trebala bi biti veća u stanica koje su u senescenciji. Prema rezultatima prikazanim na slici 18a i b možemo zaključiti da je razina proteina p21 nakon izlaganja stanica γ -zračenju doze 10 Gy viša kod kontrolnih stanica fibroblasta u odnosu na NHF- ΔN

Dobiveni rezultati prikazani na slici 18a nisu u potpunosti jednoznačni za sve ispitivane proteine. Promatrajući vrpce koje pripadaju β -aktinu kao kontroli nanošenja uzoraka na gel, vidi se da te vrpce nisu u potpunosti jednake između svih uzoraka što može ukazivati na pogreške prilikom nanošenja uzoraka na gel (nije nanijeta u potpunosti jednaka količina proteina za sve uzorke) ili prilikom provođenja elektroforeze i odvajanja proteina.

4.3.2. Utjecaj izoforme $\Delta Np73\alpha$ na ekspresiju proteina cA, pRb, p21 i PCNA nakon izlaganja stanične linije U2OS γ -zračenju

Stanice U2OS (kontrolne i stanice s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$) izložene su zračenju doze 10 Gy te je nakon 72 h, 96 h i 6 dana analizirana ekspresija proteina cA, pRb, p21 i PCNA metodom Western hibridizacije (slika 19).



Slika 19. Analiza ekspresije regulatora staničnog ciklusa metodom Western hibridizacije. Stanice U2OS s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ (ΔN) i kontrolne stanice (K) ozračene su dozom 10 Gy, sakupljene nakon 72 h, 96 h i 6 dana te je analizirana ekspresija proteina pRb, ciklina A (cA), PCNA i p21. Strelica označava hipofosforilirani (aktivni) oblik proteina pRb. Kao kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka ukupnih staničnih proteina korištena je ekspresija β -aktina i slika membrane obojene naftolnim plavilom (KN). NT-netretirane stanice.

Ekspresija ciklina A 72 h nakon zračenja bila je niža u stanicama U2OS- ΔN u usporedbi s kontrolnim stanicama, dok je nakon 96 h i 6 dana situacija bila obrnuta. Oštećenjem DNA i ulaskom stanica u senescenciju razina cA u tim stanicama bi se trebala smanjivati jer se replikacija DNA i dioba stanica ne odvijaju. Rezultati dobiveni metodom Western hibridizacije (slika 19) ukazuju da je veća razina cA prisutna u kontrolnim netretiranim stanicama i stanicama 72 h nakon izlaganja γ -zračenju doze 10 Gy te u stanicama koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ dobivenih 96 h i 6 dana nakon izlaganja stanica γ -zračenju doze 10 Gy. Općenito, primijećeno

je da se razina ciklina A sporije smanjuje u stanicama U2OS u odnosu na NHF nakon zračenja, što upućuje na otežan izlazak stanica iz ciklusa i ulazak u senescenciju.

Razina hipofosforiliranog (aktivnog) oblika pRb bila je nešto manja kod U2OS stanica s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ u odnosu na kontrolne stanice nakon zračenja, što upućuje na smanjen izlazak stanica iz ciklusa (Slika 19). Može se primijetiti da se razina hiperfosforiliranog pRb općenito sporije smanjuje kod stanica U2OS nego kod NHF.

Razlike između stanica U2OS- ΔN i kontrolnih stanica u ekspresiji proteina PCNA nisu bile konzistentne, stoga nije bilo moguće izvući jednoznačan zaključak o izlasku stanica iz ciklusa na temelju njegove ekspresije.

U većini vremenskih točaka nakon zračenja pronađena je smanjena razina ekspresije inhibitora staničnog ciklusa p21 kod stanica koje sadrže izoformu $\Delta Np73\alpha$ u odnosu na kontrolne stanice (osim 72 h nakon izlaganja γ -zračenju),

Iz analiziranih ekspresija proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA, uz određena odstupanja (varijabilnost) rezultata, moglo bi se zaključiti da pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ narušava stanični odgovor na zračenje. Niža razina proteina p21 i hipofosforiliranog pRb, uz povišenu ekspresiju ciklina A u stanicama s pojačanom ekspresijom $\Delta Np73\alpha$ ukazuju na manju učinkovitost zastoja staničnog ciklusa i izlaska stanica iz ciklusa u senescenciju. Ovi rezultati podudarni su s prethodnim istraživanjima utjecaja izoformi $\Delta Np73$ na regulatore staničnog ciklusa,^{43,51} no ne i sa rezultatima analize aktivnosti endogene β -galaktozidaze povezane sa starenjem (slike 16 i 17). Jedno od mogućih objašnjenja uočenih razlika između ovih dvaju pristupa proučavanja senescencije leži u općenitim poteškoćama u definiranju markera koji su specifični isključivo za senescenciju. Također, kod oba pristupa radi se o promatranju cjelokupne stanične populacije u određenom ciklusu, koja ne uzima u obzir heterogenost populacije, tj. specifičnosti pojedinih subpopulacija stanica. Dobiveni rezultati prikazani na slici 19, kao i kod fibroblasta, nisu jednoznačni za sve ispitivane proteine. Jedan od razloga nepodudaranja rezultata mogu biti pogreške prilikom nanošenja uzoraka na gel ili prilikom odvajanja proteina tijekom elektroforeze na što nam ukazuju i vrpce koje odgovaraju β -aktinu kao kontroli nanošenja uzoraka na gel.

§ 5. ZAKLJUČAK

- γ -zračenje doze 5 i 10 Gy dovodi do smanjenja sposobnosti proliferacije stanica U2OS analizirano metodom klonalnog rasta
- Pojačana ekspresija $\Delta Np73\alpha$ u stanicama NHF i U2OS ne uzrokuje značajne razlike u ulasku stanica u senescenciju nakon izlaganja stanica γ -zračenju na temelju detekcije endogene aktivnosti β -galaktozidaze povezane sa starenjem. Pritom je ipak uočen blagi porast udjela stanica koje pokazuju aktivnost β -galaktozidaze nakon ekspresije $\Delta Np73\alpha$ kod obje stanične linije, što bi upućivalo na povećan udio senescentnih stanica.
- Analiza ekspresije markera stanične proliferacije i regulatora staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA ukazuje na smanjen/slabiji izlazak stanica iz ciklusa pod utjecajem pojačane ekspresije $\Delta Np73\alpha$ u stanicama NHF i U2OS.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. D. Delia, S. Mizutani, *Int. J. Hem.* **106** (2017) 328–334.
2. J. Campisi, *Annu. Rev. Physiol.* **75** (2013) 685–705.
3. M. Schosserer, J. Grillari, M. Breitenbach, *Front. Oncol.* **7** (2017) 1–13.
4. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **461** (2009) 1071–1078.
5. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 2014, str. 967–1015.
6. D. Lane, A. Levine, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (2010) 1–10.
7. E. M. Alexandrova, U. M. Moll, *Leuk. Lymphoma* **53** (2012) 2116–2129.
8. R. Jancalek, *Br. J. Neurosurg.* **28** (2014) 598–605.
9. C. Di, L. Yang, H. Zhang, X. Ma, X. Zhang, C. Sun, H. Li, S. Xu, L. An, X. Li, Z. Bai, *Cell Cycle* **12** (2013) 1861–1867.
10. B. Arezi, R. D. Kuchta, *Trends Biochem. Sci.* **25** (2000) 572–576.
11. T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, D. S. Peeper, *Genes Dev.* **24** (2010) 2463–2479.
12. S. Nicolai, A. Rossi, N. D. Daniele, G. Melino, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Raschella, *Aging* **7** (2015) 1050–1065.
13. R. Salama, M. Sadaie, M. Hoare, M. Narita, *Genes Dev.* **28** (2014) 99–114.
14. A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, *Trends Cell Biol.* **28** (2018) 436–453.
15. B. Y. Lee, J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, E. S. Hwang, *Aging Cell* **5** (2006) 187–195.
16. R. Y. C. Poon, *Methods Mol. Biol.* **1342** (2016) 3–19.
17. C. H. Yam, T. K. Fung, R. Y. C. Poon, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (2002) 1317–1326.
18. B. N. Nicolay, N. J. Dyson, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **25** (2013) 735–740.
19. R. S. Soletti, D. Biasoli, N. A. L. V. Rodrigues, J. M. A. Delou, R. Maciel, V. L. A. Chagas, R. A. P. Martins, S. K. Rehen, H. L. Borges, *Transl. Oncol.* **10** (2017) 726–733.
20. A. N. Blackford, S. P. Jackson, *Mol. Cell* **66** (2017) 801–817.

21. S. Wang, Y. Zhao, A. Aguilar, D. Bernard, C. Y. Yang, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7** (2017) 1–11.
22. A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi, *DNA Repair* **42** (2016) 63–71.
23. A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.* **73** (2004) 39–85.
24. S. C. Wang, *Trends. Pharmacol.* **35** (2014) 178–186.
25. I. Stoimenov, T. Helleday, *Biochem. Soc. Trans.* **37** (2009) 605–613.
26. V. Gire, V. Dulić, *Cell Cycle* **14** (2015) 297–304.
27. M. S. Irwin, W. G. Kaelin Jr. *Apoptosis* **6** (2001) 17–29.
28. V. Dotsch, F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi, G. Melino, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** (2010) 1–14.
29. G. Chillemi, S. Kehroesser, F. Bernassola, A. Desideri, V. Dotsch, A. J. Levine, G. Melino, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7** (2017) 1–16.
30. X. Wang, E. R. Simpson, K. A. Brown, *Cancer Res.* **75** (2015) 5001–5007.
31. D. W. Meek, *Biochem. J.* **469** (2015) 325–346.
32. C. Hall, P. A. J. Muller, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1–16.
33. O. Ishimoto, C. Kawahara, K. Enjo, M. Obinata, T. Nukiwa, S. Ikawa, *Cancer Res.* **62** (2002) 636–641.
34. M. Kaghad, H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J. C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J.M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon, D. Caput, *Cell* **90** (1997) 809–819.
35. T. Stiewe, C. C. Theseling, B. M. Putzer, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 14177–14185.
36. T. Stiewe, S. Zimmermann, A. Frilling, H. Esche, B. M. Putzer, *Cancer Res.* **62** (2002) 3598–3602.
37. A. I. Zaika, N. Slade, S. H. Erster, C. Sansome, T. W. Joseph, M. Pearl, E. Chalas, U. M. Moll, *J. Exp. Med.* **196** (2002) 765–780.
38. A. Nemajerova, U. M. Moll, *J. Cell Sci.* **132** (2019) 1–11.
39. F. Talos, A. Nemajerova, E. R. Flores, O. Petrenko, U. M. Moll, *Mol. Cell* **27** (2007) 647–659.
40. N. Allocati, C. Di Ilio, V. De Laurenzi, *Exp. Cell Res.* **318** (2012) 1285–1290.

41. E. Mikulenkova, J. Neradil, K. Zitterbart, J. Sterba, R. Veselska, *Tumor Biol.* **36** (2015) 7483–7491.
42. M. T. Wilhelm, A. Rufini, M. K. Wetzel, K. Tsuchihara, S. Inoue, R. Tomasini, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M. Arsenian-Henriksson, G. Melino, D. R. Kaplan, F. D. Miller, T. W. Mak, *Genes. Dev.* **24** (2010) 549–560.
43. T. Stiewe, J. Stanelle, C. C. Theseling, B. Pollmeier, M. Beitzinger, B. M. Putzer, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 14230–14236.
44. F. Baus, V. Gire, D. Fisher, J. Piette, V. Dulić, *Embo. J.* **22** (2003) 3992–4002.
45. A. Horvat, *Utjecaj proteina $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA u stanicama čovjeka*, Doktorski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015.
46. M. Marabese, S. Marchini, M. A. Sabatino, F. Polato, F. Vikhanskaya, E. Marrazzo, E. Riccardi, E. Scanziani, M. Brogini, *Cell Death Differ.* **12** (2005) 805–814.
47. E. Marrazzo, S. Marchini, S. Previdi, M. Brogini, *Cancer Biol. Ther.* **5** (2006) 794–803.
48. Q. Wang, P. C. Wu, D. Z. Dong, I. Ivanova, E. Chu, S. Zeliadt, H. Vesselle, D. Y. Wu, *Int. J. Cancer* **132** (2013) 1505–1515.
49. T. Saleh, L. Tyutyunyk-Massey, D. A. Gewirtz, *Cancer Res.* **79** (2019) 1044–1046.
50. W. Strzalka, A. Ziemienowicz, *Ann. Bot.* **107** (2011) 1127–1140.
51. A. Tannapfel, K. John, N. Mise, A. Schmidt, S. Buhlmann, S. M. Ibrahim, B. M. Putzer, *Carcinogenesis* **29** (2008) 211–218.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marina Katić

Datum rođenja: 07.10.1996.

Mjesto rođenja: Tešanj, Bosna i Hercegovina

Obrazovanje

2003-2007. Osnovna škola 1. mart, Jelah

2007-2011. Osnovna škola Ivana fra Frane Jukića, Žabljak

2011-2015. Gimnazija, Mješovita srednja škola Stjepan Radić, Žabljak

2015-2018. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2018-2021. Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Sudjelovanje u popularizaciji znanosti

2017. Otvoreni dan kemije

2018. Otvoreni dan kemije

2019. Otvoreni dan kemije

2016-2020. Volontiranje u projektu Studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva - *Znanstvene čarolije*