

# UTJECAJ RAZLIČITIH GENOTOKSIČNIH STRESOVA NA AKTIVNOST RNK POLIMERAZE I I STRUKTURU I FUNKCIJU JEZGRICE KAO ODGOVOR NA STRES

---

**Barišić, Lalita**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:201369>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lalita Barišić

UTJECAJ RAZLIČITIH GENOTOKSIČNIH STRESOVA NA  
AKTIVNOST RNK POLIMERAZE I I STRUKTURU I FUNKCIJU  
JEZGRICE KAO ODGOVOR NA STRES

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lalita Barišić

UTJECAJ RAZLIČITIH GENOTOKSIČNIH STRESOVA NA  
AKTIVNOST RNK POLIMERAZE I I STRUKTURU I FUNKCIJU  
JEZGRICE KAO ODGOVOR NA STRES

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Slađana Bursać dipl.san.ing.

Diplomski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima \_\_\_\_\_ stranica, \_\_\_\_\_ slika, \_\_\_\_\_ tablica, \_\_\_\_\_ literaturnih  
navoda.

## **ZAHVALA**

*Veliko hvala mojoj divnoj i dragoj mentorici doc.dr.sc. Slađani Bursać dipl.san.ing. na uloženom vremenu, trudu i susretljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se na svim stručnim savjetima bez kojih ovaj rad ne bi imao jednaku kvalitetu.*

*Hvala mojim najbližim prijateljima i mom partneru što su u svim trenucima bili uz mene. Svojom prisutnošću uljepšali ste i obogatili moj život.*

*Hvala mojoj obitelji na neizmjernoj ljubavi i podršci tijekom svih godina studija. Hvala vam što ste uvijek podržavali moj izbor i moje odluke. Hvala vam što ste me upoznali s najvećim životnim vrijednostima.*

*I najveća hvala tebi dida na beskrajnoj ljubavi i što si uvijek vjerovao u mene! Bio si, i uvijek ćeš biti moja inspiracija. Ovaj rad pišem za tebe!*

*Ovaj rad posvećujem mom djedu, Branku Laziću.*

## SAŽETAK

Jezgrica ima značajnu ulogu u sintezi ribosoma te je važan senzor stresa u stanici. Sinteza ribosoma neophodna je za povećanje kapaciteta sinteze proteina tijekom rasta, diobe i diferencijacije stanica. Poznato je da su jezgrice povećane u većini zloćudnih tumora zbog intenzivne sinteze ribosoma koja je potrebna za brzi rast i diobu stanica. Kao posljedica povećane sinteze ribosoma često dolazi do morfoloških promjena struktura u jezgri. Brojni protutumorski lijekovi svoj učinak ostvaruju putem inhibicije sinteze ribosoma na različitim koracima i inhibicije rasta stanice te na taj način onemogućuju rast i diobu zloćudno preobraženih stanica. Za bolje razumijevanje molekularnih mehanizama putem kojih protutumorski lijekovi, etopozid i doksorubicin, ostvaruju svoj učinak u liječenju zloćudnih tumora u ljudi, u humanim stanicama A549 ispitala sam njihov utjecaj na aktivaciju supresora tumora p53 upotrebom metode Western blot. Osim toga, ispitala sam njihov učinak na morfološka svojstva jezgrice određivanjem izražaja biljega UBF-a i fibrilarina upotrebom metode imunofluorescencije te njihov utjecaj na aktivnost RNK polimeraze I određivanjem izražaja glasničke RNK za 47S pre-rRNK metodom qRT-PCR. Tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom doveo je do aktivacije supresora tumora p53 kao i aktivacije njegovog ciljnog gena, p21. Tretman stanica s doksorubicinom doveo je do značajnih morfoloških promjena jezgrice koje se očituju u formiranju nakupina fibrilarina i UBF-a na rubovima oštećene jezgrice, dok tretman stanica s etopozidom nije imao utjecaj na morfološka svojstva jezgrice. Osim toga, doksorubicin je spriječio izražaj 47S pre-rRNK što je rezultiralo inhibicijom sinteze ribosoma, dok etopozid nije imao utjecaj na izražaj 47S pre-rRNK. Poznavanje molekularnih mehanizama djelovanja protutumorskih lijekova ima važnu ulogu kod izbora terapije za liječenje.

**Ključne riječi:** sinteza ribosoma, jezgrica, etopozid, doksorubicin, supresor tumora p53, p21, RNK polimeraza I, 47S pre-rRNK

## SUMMARY

The nucleolus has a significant role in ribosome biogenesis and is an important sensor of stress in the cell. Ribosome biogenesis is necessary to increase protein synthesis capacity during cell growth, cell division and differentiation. It is known that in most malignant tumors, nucleolus has been increased due to the intense ribosome biogenesis which is needed for rapid growth and cell division. As a result of increased ribosome biogenesis, morphological changes in the structure of the nucleus often occur. The effects of numerous anti-inflammatory drugs are achieved by inhibition of ribosomal biogenesis at different steps and inhibition of cell growth thus prevent the growth and division of malignant cells. For a better understanding of the molecular mechanisms by which anti-inflammatory drugs, etoposide and doxorubicin, have an effect on the treatment of malignant tumors in humans, in human A549 cells I tested their influence on the activation of p53 tumor suppressors using the Western blot method. In addition, I tested their effect on the morphological properties of nucleolus by determining expression of UBF and fibrillarin using the immunofluorescence method. Also I tested their influence on the activity of RNA polymerase I and the expression of the messenger RNA for 47S pre-rRNA using the qRT-PCR method. The treatment of cells with etoposide and doxorubicin resulted in activation of p53 tumor suppressor as well as activation of its target gene, p21. Also, treatment with doxorubicin resulted in significant morphological changes in the nucleolus manifested in the formation of fibrillarin and UBF clots at the edges of the damaged nucleolus, while the treatment with etoposide had no effect on the morphological properties of the nucleolus. In addition, doxorubicin prevented the expression of 47S pre-rRNA resulting in inhibition of ribosome biogenesis, while etoposide had no effect on the expression 47S pre-rRNA. Understanding the molecular

mechanisms of anti-inflammatory drugs plays an important role in selecting treatment therapy.

**Key words:** ribosome biogenesis, nucleolus, etoposide, doxorubicin, p53 tumor suppressor, p21, RNA polymerase I, 47S pre-rRNA



## SADRŽAJ

SAŽETAK.....	II
SUMMARY .....	IV
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. RIBOSOMI.....	1
1.1.1. Geni za ribosomsku rRNK .....	2
1.1.2. Transkripcija i doradba ribosomske rRNK.....	3
1.1.3. Formiranje 80S ribosoma .....	5
1.1.4. Signalni put Ras-RAF-MEK-MAPK koji potiče sintezu ribosoma .....	6
1.2. JEZGRICA.....	8
1.2.1. Morfologija jezgrice .....	8
1.2.2. Proteini jezgrice .....	9
1.2.3. Formiranje jezgrice.....	11
1.2.4. Transkripcijska uloga jezgrice.....	12
1.2.5. Jezgrice u tumorskim stanicama.....	12
1.3. SUPRESOR TUMORA p53 .....	13
1.3.1. Uloga p53 .....	14
1.3.2. Djelovanje p53.....	15
1.3.3. Regulacija p53 .....	15
1.3.4. Aktivacija supresora tumora p53.....	16
1.3.5. p53 u tumorskim stanicama.....	20
1.4. KEMOTERAPEUTICI.....	22
1.4.1. Vrste kemoterapije.....	22
1.4.2. Vrste kemoterapeutika .....	23
1.4.3. Kombinirana terapija .....	25
1.4.4. Otpornost tumorskih stanica na lijekove .....	25
1.4.5. Nuspojave .....	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	27
3. MATERIJALI I METODE .....	28

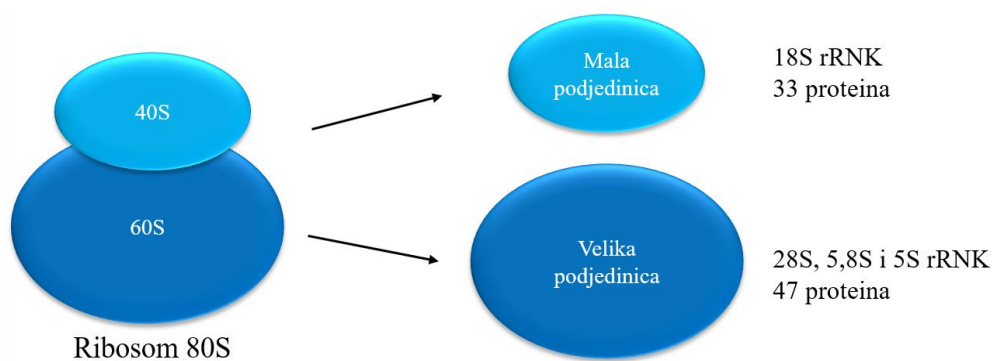
3.1. MATERIJALI .....	28
3.1.1. Kemikalije .....	28
3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica.....	31
3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNK.....	32
3.1.4. Otopine korištene za imunofluorescenciju .....	32
3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu .....	33
3.1.6. Protutijela za Western blot analizu i imunofluorescenciju.....	34
3.1.7. Stanične linije .....	35
3.1.8. Laboratorijsko posuđe i pribor .....	35
3.1.9. Uređaji .....	36
3.2. METODE .....	37
3.2.1. Kultura stanica i tretman stanica s genotoksičnim agensima .....	37
3.2.2. Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja p53 i p21 .....	38
3.2.3. Mikroskopiranje biljega jezgrice .....	39
3.2.4. Izolacija ukupne RNK .....	40
3.2.5. Elektroforeza RNK .....	41
3.2.6. Sinteza komplementarne DNK .....	42
3.2.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	43
3.2.8. Određivanje disocijacijske krivulje za produkt lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu .....	45
4. REZULTATI.....	46
5. RASPRAVA .....	54
6. ZAKLJUČCI.....	56
7. LITERATURA .....	57
ŽIVOTOPIS .....	62

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. RIBOSOMI

Ribosomi su stanični strojevi prokariotskih i eukariotskih organizama na kojima se odvija sinteza proteina. Unutar stanice, ribosomi se nalaze slobodno smješteni u citosolu ili vezani za membranu endoplazmatskog retikuluma, u nakupinama zvanim poliribosomi. Ribosomi vezani za glasničku RNK (engl. *messenger RNA*, mRNA) aktivno su mjesto sinteze proteina (1).

Ribosomi prokariota, iako su sitniji i sadrže manji broj različitih proteina, imaju sličnu građu kao i ribosomi eukariota. Oni su sastavljeni od velike i male podjedinice, a svaka od njih sadrži karakteristične proteine i molekule rRNK (engl. *ribosomal RNA*, rRNA). Prokariotski ribosomi (70S) izgrađeni su od male podjedinice (30S) i velike podjedinice (50S). Podjedinica 30S sastoji se od 16S rRNK i 21 proteina, dok se 50S podjedinica sastoji od 23S i 5S rRNK te 31 proteina. Za razliku od njih, eukariotski ribosomi izgrađeni su od male podjedinice (40S) koja je građena od 18S rRNK i 33 proteina te velike podjedinice (60S) izgrađene od 28S, 5,8S i 5S rRNK te 47 proteina (1) (**slika 1**).



**Slika 1. Građa eukariotskog ribosoma.** Eukariotski ribosom (80S) sastavljen je od male i velike podjedinice. Mala podjedinica (40S) građena je od 18S rRNK te 33 proteina, a velika podjedinica (60S) od 28S, 5,8S i 5S rRNK te 47 proteina.

Podjedinica „S” izražava koeficijent sedimentacije te označava brzinu taloženja pri centrifugiranju. Ona se još naziva i Svedbergova jedinica/konstanta koja predstavlja jedinicu vrijednosti  $1 \times 10^{13}$  s. (2)

Jezgrica (engl. *nucleolus*), najistaknutije tjelešce jezgre, predstavlja mjesto transkripcije i obrade rRNK te mjesto formiranja ribosoma. Ona je odgovorna za formiranje potrebnih uvjeta kako bi se zadovoljile potrebe za reguliranom i efikasnom proizvodnjom rRNK, kao i za sintezu ribosomskih podjedinica (1). Njezina uloga je izuzetno značajna jer je potreban veliki broj ribosoma kako bi se mogle zadovoljiti potrebe stanica za sintezom proteina koji čine 80 % suhe mase stanice.

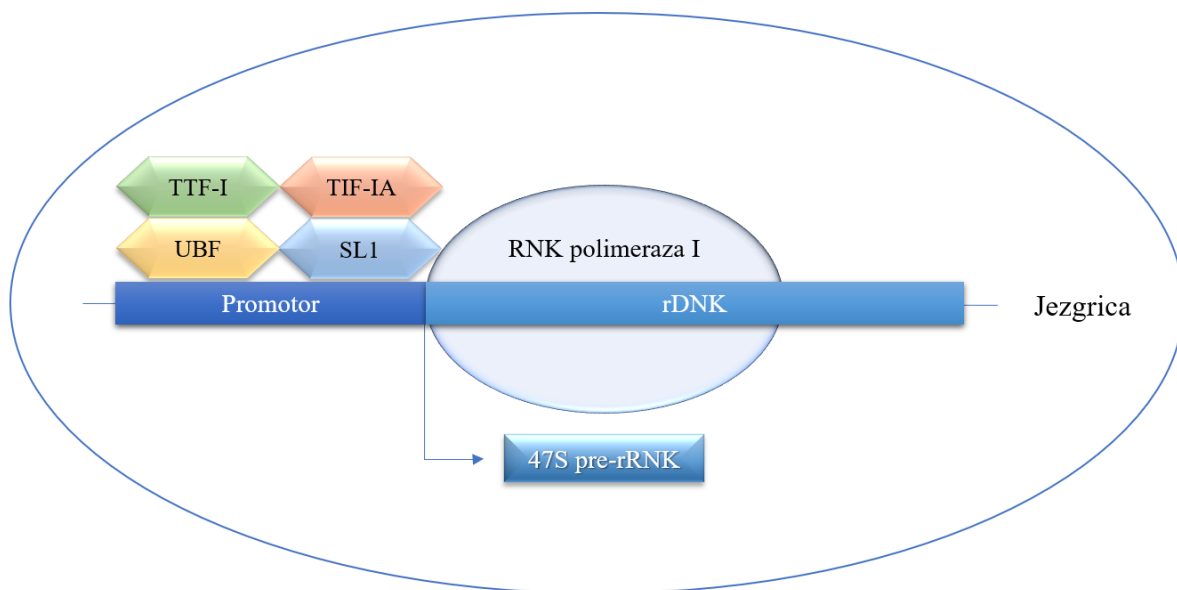
Poremećena regulacija u sintezi ribosoma pokazuje značajnu povezanost s povećanim rizikom od razvoja tumora. Pojačana sinteza ribosoma rezultat je mutacije gena, aktivacije brojnih onkogenih ili gubitka tumor supresorskih gena te ima ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora (3).

### **1.1.1. Geni za ribosomsku rRNK**

Dijelovi kromosoma koji sadrže gene za 28S, 18S i 5,8S rRNK nazivaju se nuklearnim organizacijskim regijama (engl. *nucleolus organizer regions*, NOR). Te regije sadrže skupinu uzastopno ponavljajućih gena za rRNK, koji su međusobno odijeljeni nekodirajućim sljedovima (1).

### 1.1.2. Transkripcija i doradba ribosomske rRNK

Prepisivanje gena za rRNK odvija se unutar jezgrice pomoću RNK polimeraze. RNK polimeraze, za transkripciju gena, trebaju dodatne transkripcijske faktore. RNK polimeraza I odgovorna je za transkripciju gena rRNK u uzastopnim ponavljanjima (4). Promotori gena za rRNK obuhvaćaju približno 150 parova baza od inicijacijskog mjesta transkripcije (1). Transkripcijski faktori UBF (engl. *upstream binding factor*), SL1 (engl. *selectivity factor 1*), TIF-IA (engl. *transcription initiation factor IA*) i TTF-I (engl. *thyroid transcription factor 1*) vežu se na promotor rDNK (engl. *ribosomal DNA*, rDNA) te reguliraju aktivnost RNK polimeraze I čineći inicijacijski kompleks (1) (**slika 2**).



**Slika 2. Prepisivanje gena rDNK.** RNK polimeraza I odgovorna je za prepisivanje gena rDNK u 47S pre-rRNK. Transkripcijski faktori UBF, SL1, TTF-I i TIF-IA vežu se na promotor gena rDNK i potiču sintezu 47S pre-rRNK u jezgrici.

Prepisivanje 47S ribosomske RNK (rRNK) putem RNK Polimeraze I (Pol I), ključni je događaj tijekom sinteze ribosoma pri čemu nastaje 47S prekursor ribosomske RNK (pre-

rRNK) (3). Nadalje, 47S pre-rRNK obrađuje se do 18S rRNK, koja gradi malu podjedinicu ribosoma (40S) te do 5,8S i 28S rRNK, koji grade veliku podjedinicu ribosoma (60S). Za razliku od njih, prepisivanje 5S rRNK, koja gradi veliku podjedinicu, odvija se izvan jezgrice, u jezgri, uz pomoć RNK polimeraze III (5). Nakon sinteze, 5S rRNK udružuje se s pretečom podjedinice 60S ribosoma.

Na 5' i 3' kraju 47S pre-rRNK nalaze se 5' ETS i 3' ETS (engl. *external transcribed spacer*, ETS) nekodirajući sljedovi, dok su ITS (engl. *internal transcribed spacer*, ITS) nekodirajući sljedovi prisutni između 28S, 18S i 5,8S rRNK (6). ITS i ETS sljedovi se izrezuju prilikom dozrijevanja rRNK. Osim toga, dorada pre-rRNK zahtjeva aktivnost proteina i jezgrinih RNK (engl. *small nuclear RNA*, snRNA). U jezgri, snRNK zajedno s proteinima formiraju male jezgrine ribonukleoproteine (engl. *small nucleolar ribonucleoprotein*, snRNP). Kompleksi za doradu i sazrijevanje formiraju se tako da se snRNP vežu na pre-rRNK. Pojedine snRNK odgovorne su za kidanje pre-rRNK u 28S, 18S i 5,8S molekule. Glavna uloga većine snRNK je usmjeravanje specifične modifikacije baza u pre-rRNK tijekom sinteze rRNK. Modifikacija baza u pre-rRNK uključuje metilaciju riboznih ostataka i formiranje pseudouridina (1).

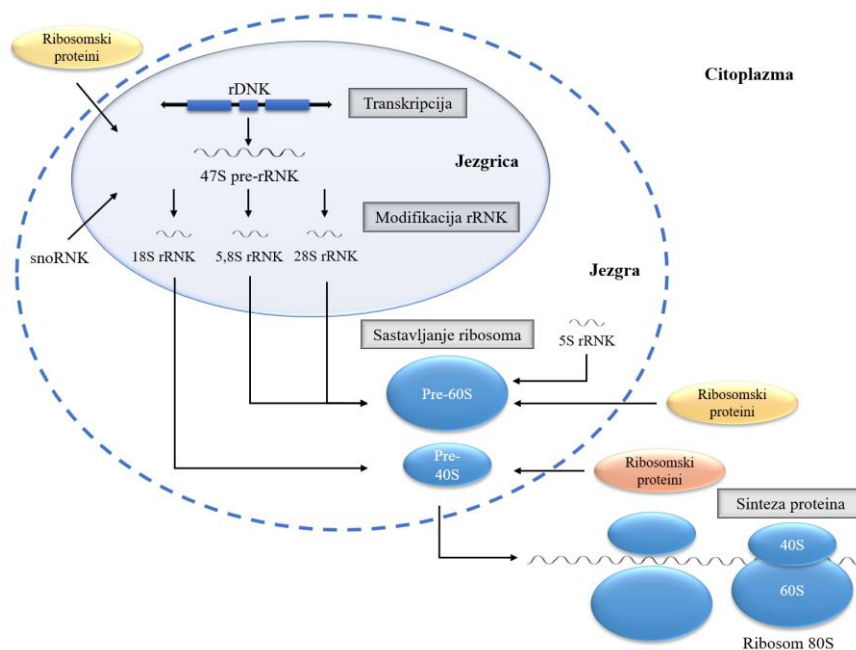
Ulazak proteina iz citoplazme, kao i izlazak molekula RNK kroz komplekse jezgrinih pora, aktivan je proces kojemu je potrebna energija. Molekule RNK izlaze iz jezgrine ovojnice u obliku ribonukleoproteinskih kompleksa (engl. *ribonucleoprotein complex*, RNP). Prvo se rRNK povezuje s ribosomskim proteinima, zatim sa specifičnim proteinima za sazrijevanje RNK u jezgri (1). Tako nastale podjedinice ribosoma (40S i 60S) transportiraju se odvojeno u citoplazmu gdje formiraju funkcionalni 80S ribosomi nakon vezanja glasničke RNK.

### 1.1.3. Formiranje 80S ribosoma

Formiranje ribosoma sastoji se od vezanja pre-rRNK s ribosomskim proteinima i s 5S rRNK.

Ribosomski proteini sintetiziraju se izvan jezgrice djelovanjem RNK polimeraze II, prepisivanjem s glasničke RNK na ribosomima. Nastali ribosomski proteini prelaze iz citoplazme u jezgricu, vezuju se s ribosomskim molekulama RNK te tako formiraju preribosomske čestice. Tijekom sinteze pre-rRNK, više od polovice ribosomskih proteina veže se na pre-RNK (1).

Važno je istaknuti da se sinteza i sazrijevanje male i velike podjedinice ribosoma odvija odvojeno. Sinteza male podjedinice (40S) obuhvaća 18S rRNK, jednostavnija je te obuhvaća četiri kidanja pre-rRNK djelovanjem endonukleaza. Sinteza velike podjedinice (60S), obuhvaća 5S, 5,8S i 28S rRNK te uključuje opsežnija kidanja djelovanjem nukleaza (1). Završetak formiranja zrelog ribosoma, odvija se nakon izlaska preribosomskih čestica iz jezgrice u citoplazmu, kada dolazi do formiranja aktivnih 40S i 60S podjedinica eukariotskih ribosoma, odnosno zrelog 80S ribosoma (slika 3).



**Slika 3. Shematski prikaz formiranja ribosoma.** Prepisivanjem gena s rDNK nastaje 47S pre-rRNK. Cijepanjem i modifikacijom 47S pre-rRNK nastaju 18S, 5,8S i 28S rRNK. Spajanjem 18S rRNK s odgovarajućim ribosomskim proteinima formira se mala preribosomska čestica (pre-40S), a spajanjem 5,8S, 28S i 5S rRNK s ribosomskim proteinima, formira se velika preribosomska čestica (pre-60S). Formiranje aktivnih 40S i 60S podjedinica, odnosno formiranje zrelog ribosoma (80S) na kojemu se odvija sinteza proteina, odvija se nakon izlaska preribosomskih čestica iz jezgre u citoplazmu.

#### **1.1.4. Signalni put Ras-RAF-MEK-MAPK koji potiče sintezu ribosoma**

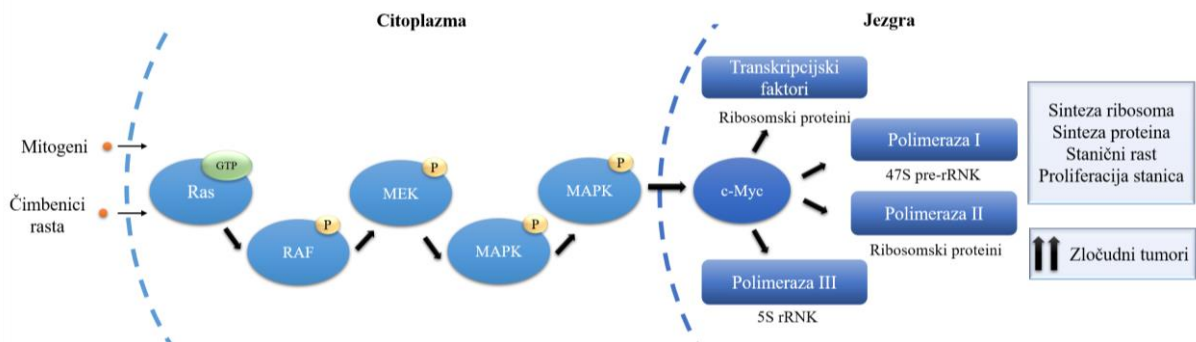
Sinteza ribosoma regulirana je mnogim signalnim putevima. MAPK signalni put odgovoran je za sintezu rRNK i sintezu pirimidina koji izgrađuje RNK, DNK i fosfolipide. Budući da djeluje na rast i proliferaciju stanica, njegov poremećaj može rezultirati razvojem tumora. Upravo je poremećaj MAPK signalnog puta zamijećen u velikom broju različitih tumora.

MAPK signalni put, još poznat kao Ras-RAF-MEK-MAPK signalni put, čini lanac proteina kojima se u stanici prenosi signal s receptora na membrani do molekule DNK u jezgri (7). Ovaj signalni put obuhvaća mnoštvo proteina. Kada je jedan od njih mutiran, njegovo stanje ostaje nepromijenjeno, trajno aktivirano ili inhibirano te može doći do razvoja tumora.

Aktivacijom MAPK signalnog puta, putem brojnih mitogena i čimbenika rasta, dolazi do staničnog rasta i proliferacije. Vezanjem mitogena na membranu omogućava se fosforilacija, a time i aktivacija G proteina Ras. Nakon toga, slijedi aktivacija proteina kinaze RAF (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*). Aktivirani RAF fosforilira i aktivira protein kinazu MEK, koja dalje fosforilira i aktivira protein kinazu MAPK (engl. *mitogen-activated protein*



*kinases*) (8). Nakon aktivacije, MAPK fosforilira ključne citoplazmatske molekule te prelazi u jezgru gdje fosforilira c-Myc i druge transkripcijske faktore. U citoplazmi, MAPK aktivira ribosomsku protein kinazu koja indirektno aktivira mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) signalni put, odgovoran za sintezu proteina (5). Aktivnost MAPK u jezgri potiče stanični rast i proliferaciju. On potiče sintezu rRNK indirektnom aktivacijom RNK polimeraze I (9). Osim toga, potiče sintezu pirimidina koji izgrađuje RNK, DNK i fosfolipide. Također, preko aktivacije c-Myc, MAPK uzrokuje aktivaciju transkripcijskih faktora E2F, koji reguliraju velik broj gena odgovornih za odvijanje staničnog ciklusa i sintezu DNK (10). Često je ovaj signalni put aktiviran u zloćudnim tumorima (**slika 4**).



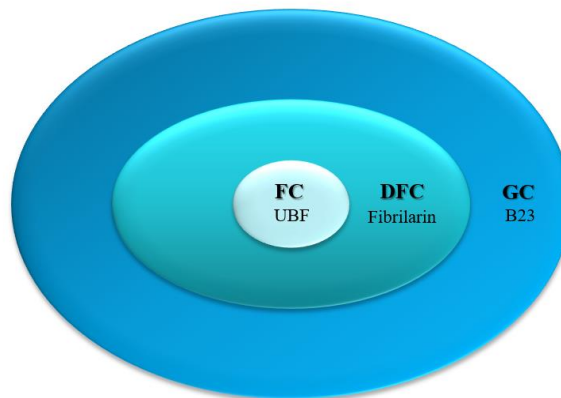
**Slika 4. Signalni put Ras-MAPK potiče sintezu proteina i sintezu ribosoma.** Brojnim mitogenima i čimbenicima rasta dolazi do aktivacije Ras-MAPK signalnog puta. Aktivacija započinje vezivanjem GTP-a za Ras. Aktivirana Ras aktivira protein kinazu RAF koja fosforilira i aktivira protein kinazu MEK. Protein kinaza MEK dalje fosforilira i aktivira protein kinazu MAPK. MAPK u jezgri djeluje na c-Myc i druge transkripcijske faktore te na RNK polimerazu I, II i III.

## 1.2. JEZGRICA

Stanična jezgrica (engl. *nukleolus*) najistaknutije je tjelešce jezgre. To je subnuklearna organela koja predstavlja mjesto odvijanja transkripcije i dorade rRNK, mjesto sinteze ribosoma te mjesto modifikacije malih molekula RNK (11).

### 1.2.1. Morfologija jezgrice

Jezgrica se sastoji od tri subnukleolarna odjeljaka. Čini ju fibrilarni centar (engl. *fibrillar center*, FC), gusti fibrilarni dio (engl. *dense fibrillar component*, DFC) i zrnata komponenta (engl. *granular component*, GC) (12). Svaki odjeljak sadrži specifične proteine koji omogućuju vizualizaciju pomoću odgovarajućih protutijela, metodama imunofluorescencije i imunohistokemije. Biljeg za FC je protein UBF, za DFC je protein fibrilarin, a za GC je protein B23 (**slika 5**).



**Slika 5. Shematski prikaz građe i strukture jezgrice.** Jezgrica se sastoji od fibrilarnog centra (FC), gustog fibrilarnog dijela (DFC) i zrnate komponente (GC) te specifičnih proteina UBF-a, fibrilarina i B23.

Osim toga, specifični proteini unutar jezgrice mogu se obojiti srebrom putem čega se vizualiziraju regije NOR te se ti proteini nazivaju AgNOR (engl. *silver-stained nucleolar organizer region*). Ova metoda se koristi u patologiji za određivanje veličine i aktivnosti jezgrice.

Jezgrica je organel bez membrane te joj upravo to svojstvo omogućuje sudjelovanje u dinamičkim promjenama staničnog ciklusa poput diferencijacije, starenja i nukleolarnog stresa. Kompaktna struktura jezgrice ostvarena je prisustvom rDNK, rRNK, snRNK i proteina jezgrice (1). Ovisno o položaju jezgrice u jezgri, može se odrediti njezina aktivna funkcija. Centralni položaj u jezgri ukazuje na povećanje funkcije gena, a periferni položaj na smanjenje funkcije gena (13). Prema tome, veća proliferacija tj. veća transkripcija rDNK, povezana je s centralnim položajem u jezgri, dok je u suprotnom slučaju jezgrica pomaknuta periferno, uz jezgrinu membranu. Važno je istaknuti da promjena položaja jezgrice označava samo promjenu intenziteta funkcije, a ne i promjenu funkcije. Unatoč dinamičkim promjenama koje se zbivaju u stanici, ukoliko je ostvarena pravilna funkcija gena za nuklearnu laminu (fibrilarnu jezgrinu mrežu), jezgrica ima sposobnost očuvanja svoje građe i funkcije te joj upravo to daje dobra senzorska svojstva za promjene u metabolizmu.

### **1.2.2. Proteini jezgrice**

Ribosomi nastali u jezgri putuju do citoplazme gdje se procesom translacije sintetiziraju proteini. Nastali proteini vraćaju se u jezgru i jezgricu te su nositelji regulatorne uloge stvaranja ribosoma. Prijenos proteina u jezgricu, reguliran je nuklearnim i nukleolarnim lokalizacijskim signalom (engl. *nuclear/nucleolar localization signal*, NLS/NoLS) (13). NLS i NoLS su sekvence aminokiselina koje označavaju proteine koje je potrebno unijeti u jezgru i jezgricu (15).

Proteine jezgrice možemo podijeliti na rezidentne i tranzitorne (13). Za normalnu funkciju i oblik jezgrice, podjednako su važne obje vrste proteina. Ukoliko dođe do njihovog poremećaja dolazi do poremećaja u građi i funkciji ribosoma. Osim toga, proteini jezgrice dijele se na ribosomske i neribosomske proteine, histonske i nehistske proteine te na proteine koji direktno ili indirektno sudjeluju u formiranju ribosoma. Proteini jezgrice nalaze se isključivo na području jezgrice, slobodno ili u nakupinama, a njihova prisutnost označava aktivnost ribosomskih gena. Vjeruje se da se broj aktivnih gena smanjuje sa starenjem stanice (13).

Proliferacija stanica proporcionalna je veličini jezgrice te broju slobodnih i grupiranih proteina jezgrice (13). Promjene na jezgri izražavaju promjene u jačini transkripcije. Ekspresija proteina je niska u stanicama koje ne proliferiraju, a visoka u stanicama koje patološki proliferiraju.

Najznačajnije molekule u organizaciji transkripcije ribosomskih gena su proteini nukleolin (C23), nukleofosmin (B23) i fibrilarin.

Nukleolin (engl. *nucleolin*, NCL) ili C23 je nukleolarni protein koji je uključen u sintezu i sazrijevanje ribosoma (16). Njegova interakcija i vezivanje s rDNK i rRNK regulira aktivnost RNK polimeraze I. On se nalazi na području guste fibrilarne komponente jezgrice, a svoje funkcije osim u jezgri, ostvaruje i u ostatku stanice (17).

Nukleofosmin (engl. *nucleophosmin*, NPM) je poznat još pod nazivom jezgrični protein B23. On je povezan s jezgričnim ribonukleoproteinskim strukturama, sudjeluje u formiranju nukleinskih kiselina, formiranju i transportu ribosoma te potpomaže u prijenosu malih proteina u jezgricu (18). Osim toga, značajan je za stabilnost genoma, popravak DNK, ali i brojne druge funkcije. Sve ovo naglašava njegovu važnost kao proteina jezgrice.

Osim prethodno navedenih proteina, ključni protein za održavanje funkcije jezgrice je fibrilarin (19). On je sastavni dio nekoliko ribonukleoproteina uključujući male jezgrične ribonukleoproteine snRNP i snoRNP. Ima značajnu ulogu u obradi pre-rRNK tijekom sinteze ribosoma. snRNP svoju funkciju ostvaruje u cijepanju u pre-rRNK, dok snoRNP svoju funkciju ostvaruje u obradi pre-rRNK .

Zbog navedenih svojstava, nukleolin, nukleofosmin i fibrilarin se koriste kao biljezi jezgrice (20). U patološkim stanjima, njihove vrijednosti su povećane, stoga imaju značajnu ulogu prilikom praćenja patoloških promjena stanice. Navedene karakteristike čine ih važnim markerima tumorogeneze. Važno je naglasiti da su jezgrice povećane u većini zloćudnih tumora zbog intenzivne sinteze ribosoma koja je potrebna za brzi rast i diobu stanica.

### **1.2.3. Formiranje jezgrice**

Nakon stanične diobe, jezgrice nastaju na dijelovima kromosoma koji sadrže gene za rRNK tzv. nukleolarnim organizacijskim regijama (engl. *nucleolus organizer regions*, NOR) (12).

Prepisivanjem 47S pre-rRNK dolazi do fuzije pre-nukleolarnih tjelešaca. Ta tjelešca sadrže faktore koji su potrebni za doradu ostalih komponenta jezgrice. Za organizaciju jezgrice, neophodno je prisustvo proteina nukleolina (C23), nukleofosmina (B23), fibrilarina, RNK polimeraze I i UBF-a (engl. *upstream binding factor*) (14). To su kiseli nehistski i argirofilni proteini (AgNOR) koji se okupljaju oko NOR-a te na taj način omogućavaju formiranje jezgrice. Za vrijeme mitoze, neki proteini jezgrice ostaju povezani s NOR-om. Za vrijeme mitoze, za NOR ostaju vezani RNK polimeraza I i UBF, a za vrijeme interfaze nukleolin i nukleofosmin. U slučaju supresije nukleolina, dolazi do smanjenja funkcije RNK polimeraze I i porasta funkcije supresora tumora p53.

U velikom broju stanica, odvojene jezgrice spajaju se u jednu (13). Veličina jezgrice ovisi o njezinoj metaboličkoj aktivnosti. Prema tome, povećane jezgrice prisutne su u stanicama koje su aktivno uključene u sintezu proteina. U tumorskim stanicama povećana je sinteza proteina.

#### **1.2.4. Transkripcijska uloga jezgrice**

Transkripcija rRNK odvija se na mjestu spajanja fibrilarnog centra i guste fibrilarne komponente. Udaljavanjem od rDNK, pre-rRNK kreće se kroz gustu fibrilarnu komponentu i zrnatu komponentu (13). Glavna molekula odgovorna za transkripciju je RNK polimeraza I, ali važnost ostalih RNK polimeraza (II i III) nije zanemariva. Sve one surađuju međusobno, bilo direktno ili indirektno, sintezom jezgričnih proteina (13). Ukoliko prilikom interfaze dođe do izostanka neke od molekula koje su nužne za aktivnost RNK polimeraze I, izostaje funkcija jezgrice u pogledu transkripcije rDNK i sinteze ribosoma (21).

#### **1.2.5. Jezgrice u tumorskim stanicama**

Dinamičke promjene u stanici povećavaju potrebu za sintezu ribosoma i proteina (12). Povećana sinteza ribosoma i proteina usko je povezana s razvojem tumorskih stanica. U jezgricama tumorskih stanica, transkripcijska aktivnost RNK polimeraze I i sinteza ribosoma su povišene (14), mehanizmi opstanka stanice su pojačani, a normalna funkcija supresora tumora p53 je spriječena (13). Prema tome, za tumorske stanice karakteristične su hipertrofične i hiperplastične jezgrice (12).

Postoji velika povezanost između pretjeranog stvaranja ribosoma u tumorskim stanicama i u nukleolarnom stresu. Nukleolarni stres je poremećaj organizacije kretanja molekula kroz

jezgricu. Kronični nukleolarni stres može dovesti do promjena u organizaciji genoma. Uslijed nukleolarnog stresa dolazi do ometanja normalnih zbivanja u stanici, dolazi do poremećaja transkripcije, translacije i gibanja molekula (13).

Novi načini liječenja tumora zasnivaju se na smanjenju transkripcije rDNK tj. smanjenju pretjerane sinteze ribosoma te izazivanju nukleolarnog stresa koji dovodi do apoptoze tumorskih stanica (13). Tako, na primjer mnogi protutumorski lijekovi inhibiraju aktivnost RNK Polimeraze I i RNK polimeraze II te sprječavaju sintezu ribosoma. Tretman stanica s doksorubicinom dovodi do inhibicije 47S pre-rRNK, smanjenja jezgrica, odvajanja FC i GC regije i nakupljanja fibrilarina i UBF-a oko smanjene i oštećene jezgrice. Osim toga, 5-fluorouracil u stanici prevodi se u 5-fluorouridin trifosfat koji sprječava cijepanje rRNK i posljedično uzrokuje minimalne morfološke promjene jezgrice (13) dok etopozid inhibira topoizomerazu II, replikaciju i transkripciju te također uzrokuje minimalne morfološke promjene jezgrice. Mehanizmi djelovanja spomenutih kemoterapeutika, doksorubicina i etopozida, bit će još detaljno opisani u poglavlju 1.4.

### **1.3. SUPRESOR TUMORA p53**

Tumor supresorski geni su geni koji kodiraju proteine odgovorne za kontrolu staničnog rasta (1), inhibiciju staničnog ciklusa i nadzora popravka oštećenja DNK. U tumorskim stanicama vrlo često dolazi do promjene ili gubitka funkcije i/ili strukture tih gena (22). Najčešće dolazi do potpunog gubitka njihovih funkcija kao posljedica mutacija. Mutacije tumor supresorskih gena uglavnom imaju recidivan učinak te njihova inaktivacija zahtjeva inaktivaciju oba alela (23). Gubitak ekspresije ovih gena u stanicama tumora dovodi do pojačane proliferacije stanica i razvoja tumora.

Osim toga, tumor supresorski geni imaju značajnu ulogu u diferencijaciji stanica. Inhibiranjem staničnog ciklusa, oni dovode do inhibicije diferencijacije. Proteinski produkti tumor supresorskih gena imaju značajnu ulogu u nadzoru ekspresije gena i regulaciji staničnog rasta (1).

Jedan od najpoznatijih gena supresora tumora, sa značajnom ulogom u nadzoru staničnog ciklusa je p53. On je smješten na kromosomu 17, a njegova veličina iznosi 20 kb. Njegov proteinski produkt je fosfoprotein molekularne mase 53 kDA, smješten u jezgri (22).

### **1.3.1. Uloga p53**

Tumor supresor p53 mutiran je u oko 50-60 % zloćudnih tumora u ljudi. Transkripcijski je faktor koji regulira izražaj nekoliko stotina gena (24), od kojih su mnogi odgovorni za stanični rast, diobu, preživljavanje i/ili programiranju smrt stanica (25). Kao odgovor na različite stresne podražaje, uključujući onkogene (hiperproliferaciju), nukleolarni stres i razne oblike oštećenja DNK, aktivira se p53 blokirajući svoju razgradnju i dovodeći do povećanja na staničnoj razini. Povišene razine p53 potiču usporavanje rasta, starenje ili programiranu smrt stanice (26).

Širok raspon staničnih stres stimulansa potiče aktivaciju p53. Ovisno o tipu stanica, vrsti, intenzitetu i trajanju stresa, dolazi do koordiniranih promjena u ekspresiji gena pa tako i zbivanjima u stanici (25).

Ukoliko dođe do oštećenja genetičkog materijala stanice, p53 zadržava stanicu u G1 fazi staničnog ciklusa čime omogućava popravak oštećenja DNK prije nego što dođe do njezinog umnožavanja (1). Molekularni mehanizam kojim p53 zaustavlja stanični ciklus uključuje indukciju transkripcije gena p21 (27). Nastali proteinski produkt p21 veže se na ciklin/Cdk



(engl. *cyclin dependent kinase*) kompleks koji je odgovoran za regulaciju staničnog ciklusa (28). Na taj način p53 zajedno s p21 sprječava nastavak staničnog ciklusa. Ukoliko se radi o većim oštećenjima DNK koja se ne mogu ispraviti, p53 izaziva programiranu smrt stanice (apoptozu) (29). Na taj način p53 uklanja i sprječava diobu oštećene stanice čije bi daljnje umnažanje dovelo do razvoja genomske nestabilnosti.

### **1.3.2. Djelovanje p53**

Tumor supresor p53 predstavlja važnu barijeru za razvoj tumora blokiranjem proliferacije ili uklanjanjem tumorskih stanica. Ključni mehanizmi pomoću kojih p53 ostvaruje svoju tumor-supresorsku ulogu su: indukcija ekspresije gena ključnih za inhibiciju staničnog ciklusa i apoptozu, zaustavljanje angiogeneze i popravak DNK (30). Osim uloge p53 kao supresora tumora, utvrđeno je da normalne razine p53 u stanicama imaju važnu ulogu u mnogim biološkim procesima uključujući plodnost, obnovu matičnih stanica, imunološki odgovor, stanično starenje, pigmentaciju i metabolizam (25).

### **1.3.3. Regulacija p53**

U normalnim uvjetima u stanici prisutne su niske razine p53 (31). Razina p53 regulirana je s E3 ubikvitin ligazom, MDM2 (engl. *murine double minute 2*) koja ga usmjerava na razgradnju u proteasome (32). Enzimi ubikvitin ligaze izvor su malih proteina ubikvitina koji se vežu za ciljani protein, tako ga obilježavaju i predodređuju za razgradnju u proteasomima.

Mala količina proteina p53 u stanici, zahtjeva malu količinu enzima MDM2. Povećanje aktivnosti p53 rezultira povećanjem količine MDM2. MDM2 razgrađuje p53 i smanjuje

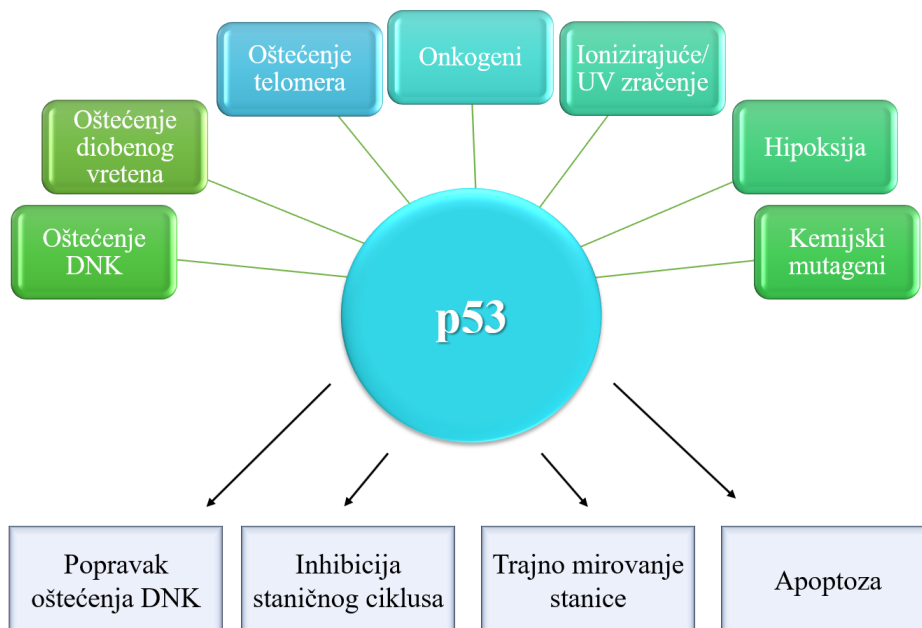
njegovu količinu u stanici. Na ovaj način uspostavljena je negativna povratna sprega između p53 i njegovog regulatora MDM2 (25).

E3 ligaza MDM4 (engl. *murine double minute 4*), također poznata kao MDMX, strukturno je slična MDM2 (33). Ona ima značajnu ulogu stimulacije MDM2 te djeluje kao supresor p53. Postoji najmanje 15 E3 ubikvitin ligaza koje imaju sposobnost regulacije p53, međutim, najznačajnija je MDM2 (34). MDM2 smatra se slabom E3 ligazom, ali njezina sposobnost modificiranja p53 pojačava se u kontaktu s velikim brojem proteina i supstrata od kojih su mnogi vrlo značajni za razvoj tumora (25).

Iako MDM2 ima središnju ulogu u regulaciji izražaja i funkcije p53 (35), aktivnost p53 posredovana je i brojnim transkripcijskim faktorima, posttranslacijskim modifikacijama (36) te mnogim drugim faktorima. Jedan od glavnih transkripcijskih faktora, odgovoran za regulaciju izražaja p53 je protein ARF (engl. *alternative reading frame*) (25). ARF protein stimulira izražaj p53 kao odgovor na hiperproliferacijske signale i ribosomske proteine odgovorne za induciranje p53 nakon nukleolarnog stresa.

#### **1.3.4. Aktivacija supresora tumora p53**

Brojni stanični stresovi uzrokuju aktivaciju p53 (23). Stanični stres nastaje kao posljedica različitih oblika oštećenja DNK, diobenog vretena ili telomera te kao posljedica djelovanja onkogena, ionizirajućeg i UV zračenja, slobodnih kisikovih radikala ili kemijskih mutagena (25) (**slika 6**).



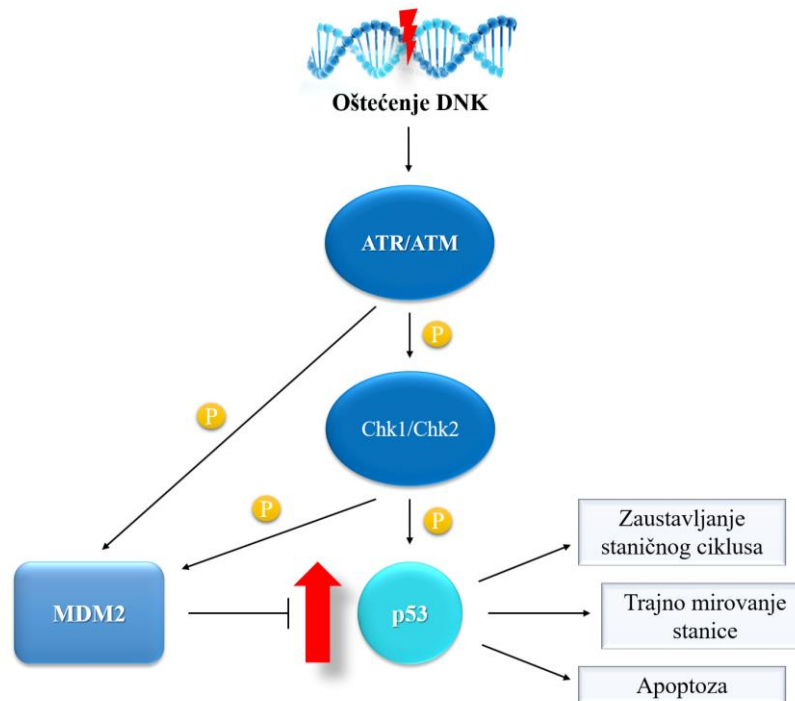
**Slika 6. Aktivacija supresora tumora p53.** Brojni stanični stres stimulansi uzrokuju aktivaciju p53. Aktivirani p53, ovisno o oštećenju genetičkog materijala stanice može dovesti do različitih bioloških odgovora.

Neovisno o poticajnom stimulansu koji inducira p53, ključni događaj u indukciji je sprječavanje MDM2 posredovane razgradnje p53 (25). Stabilizacija p53 može se postići blokiranjem njegovih inhibitora kroz različite mehanizme. Nakon stabilizacije, dolazi do posttranslacijskih modifikacija i aktivacije p53.

Poznato je nekoliko molekularnih mehanizama aktivacije p53, kao odgovor na oštećenje DNK.

U slučaju oštećenja DNK, aktivacija p53 uključuje dva srodna proteina kinaze, ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (engl. *ataxia telangiectasia i Rad3-related*). Oni potiču popravak DNK i aktiviraju signalne puteve za posttranslacijske modifikacije p53. Glavna uloga ATM-a i ATR-a je inhibicija MDM2 posredovane razgradnje p53 (37). Ključni

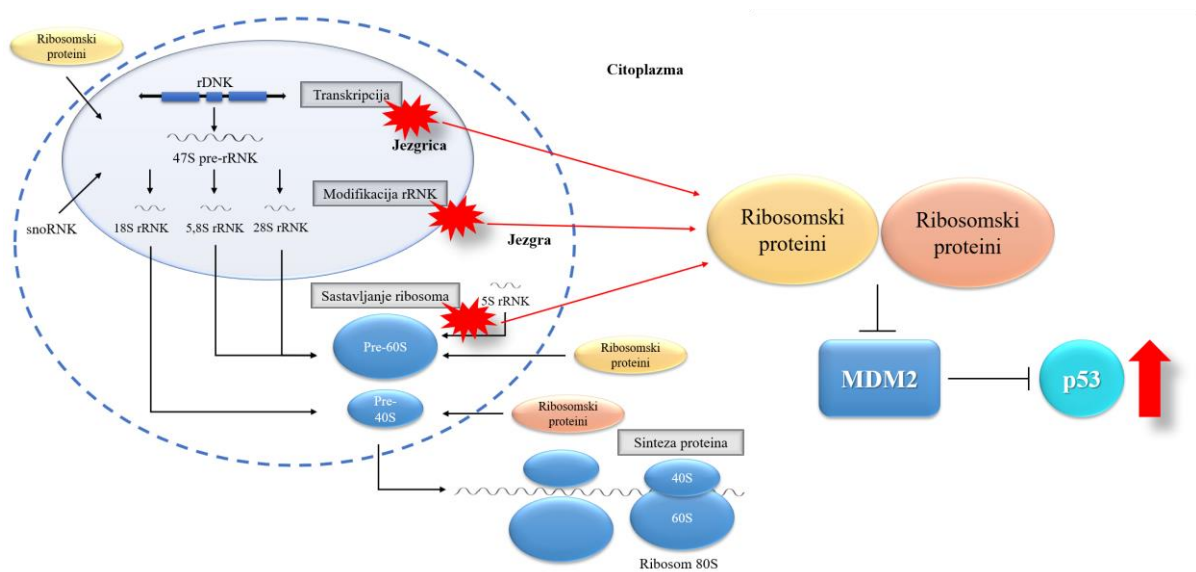
dogadjaj u aktiviranju p53, kao odgovor na oštećenje DNK je fosforilacija MDM2 posredovana uglavnom ATM-om (37). Fosforilacija inhibira aktivnost MDM2 (38) što dovodi do stabilizacije p53 i deaktivacije negativne povratne sprege (**slika 7**).



**Slika 7. Aktivacija p53 nakon oštećenja DNK.** Prilikom nastanka oštećenja DNK, dolazi do aktivacije kinaza ATR i ATM. Aktivirane kinaze ATR i ATM sprječavaju MDM2 posredovanu razgradnju p53 što dovodi do porasta izražaja p53 u stanici i pokretanja različitih bioloških odgovora.

Ribosomski stres, također poznat kao nukleolarni stres, nastaje u slučaju prekida strogo reguliranog procesa sinteze i formiranja ribosoma (39). To može biti posljedica oštećenja DNK na području ribosomskih gena, ometane ekspresije rDNK ili obrade rRNK (25). Poremećaji sinteze ribosoma u jezgri dovode do aktivacije tumor supresora p53 neovisno o oštećenju DNK. Prisutnost ribosomskih proteina u nukleoplazmi dovodi do njihovog

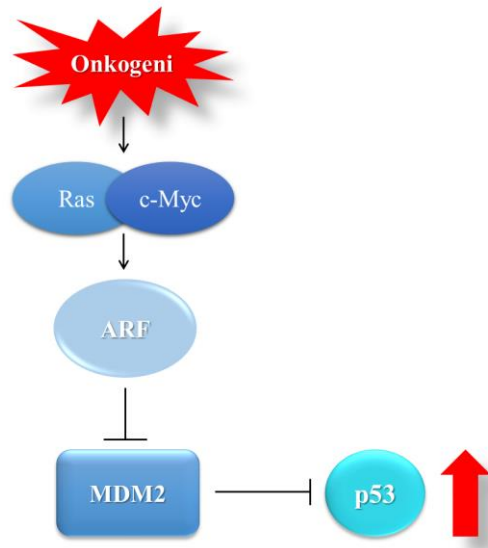
vezivanja za MDM2 ubikvitin ligazu (40). Nakon vezanja ribosomskih proteina na MDM2, MDM2 ne može ostvariti svoju funkciju i razgraditi p53 u sustavu proteasoma. To dovodi do porasta i nakupljanja p53 što uzrokuje apoptozu stanice. U pojedinim slučajevima, ribosomski proteini ulaze u interakciju s drugim ribosomskim proteinima čime se spječava vezivanje za MDM2 (13). U tom slučaju, MDM2 ostvaruje svoju funkciju razgradnje p53 te pogoduje patološkom razvoju stanice (**slika 8**).



**Slika 8. Aktivacija p53 nakon poremećaja u sintezi ribosoma.** Prekid sinteze i formiranja ribosoma u jezgri dovodi do razaranja jezgri i oslobađanja ribosomskih proteina u jezgru. U jezgri, ribosomski proteini vežu se za MDM2, inhibirajući njegovu funkciju razgradnje p53 te posljedično dovode do porasta i nakupljanja p53 u stanici.

Aktivacijom onkogenih (Ras, c-Myc, E2F) u stanici, pomoću različitih mehanizama, dolazi do povećanja razine ARF proteina, inhibitora MDM2. Mehanizam indukcije ARF-a uključuje stimulaciju transkripcije, inhibiciju razgradnje i razdvajanje ARF-a od ciljane ubikvitin ligaze (25). Aktivirani ARF veže se za MDM2 i inhibira njegovu aktivnost prema p53. Posljedično, ne dolazi do razgradnje p53, već do povećanja njegove ekspresije. Osim toga, aktivirani ARF

djeluje kao aktivator p53 tako što stimulira vezu između MDM2 i MDM4 te potiče razgradnju MDM4 (41) (slika 9).



**Slika 9. Aktivacija supresora tumora p53 putem onkogeni.** Aktivacijom onkogeni (Ras, c-Myc) u stanici, dolazi do povećanja izražaja ARF proteina. Aktivirani ARF veže se za MDM2 i inhibira njegovu aktivnost prema p53. Posljedično, dolazi do povećanja ekspresije p53.

Svi navedeni molekularni mehanizmi aktivacije p53 imaju važnu ulogu u sprječavanju nastanka zloćudnih tumora. Ukoliko u stanici zakažu spomenuti mehanizmi aktivacije supresora tumora p53, dolazi do zloćudne preobrazbe stanica.

### 1.3.5. p53 u tumorskim stanicama

Supresor tumora p53 najčešće je mutirani gen u stanicama tumora, javlja se u 50-60 % tumora (22). Njegova inaktivacija prisutna je kod leukemije, limfoma, sakroma, tumora mozga i karcinoma različitih organa poput dojki, pluća i debelog crijeva (1).

Poremećaj njegove funkcije i/ili strukture rezultira nekontroliranom proliferacijom stanice, a mehanizmi njegove inaktivacije mogu biti različiti. Može se raditi o točkastim mutacijama, delecijama ili gubitku heterozigotnosti (22). U tumorskim stanicama prisutan je velik broj mutacija koje su u najvećem broju slučajeva posljedice genomske nestabilnosti. To mogu biti poremećaji mehanizama popravka oštećenja DNK, nastalih bilo pogreškom u replikaciji, bilo zbog djelovanja mutagena.

Inaktivacijom gena stanica izbjegava apoptozu i dalje umnožava oštećenu DNK (22). Ukoliko u diobu ulaze stanice s oštećenom DNK dolazi do razvoja genomske nestabilnosti i potencijalnog razvoja tumora. Izostanak apoptoze, u slučaju oštećenja DNK, dovodi do nastanka otpornosti velikog broja tumora na kemoterapiju.

Važan faktor u kontroli proliferacije stanica je stabilizacija supresora tumora p53. U tom slučaju, ako nukleoplazmatska molekula MDM2 ubikvitin ligaza, formira kompleks s drugom molekulom, ne dolazi do narušavanja p53 (13). Na taj način omogućeno je slobodno djelovanje p53 na apoptozu stanice. Upravo se na ovom principu, namjernim uvođenjem stanice raka u apoptozu, zasniva moderna terapija tumora. Međutim, za indukciju supresora tumora p53, nije dovoljno samo oštećenje DNK molekule, već je potreban prekid molekularnih mehanizama jezgrice. Takav poremećaj jezgrice dovodi do oslobađanja mnogih faktora u nukleoplazmu, poput fibrilarina i raznih ribosomskih proteina, ali i tumor supresora ARF-a, još nazvanog p19 (13). Za vrijeme normalnog funkcioniranja jezgrice, nukleofosmin sprječava izlazak ARF-a u nukleoplazmu gdje bi se vezao s MDM2 i stabilizirao funkciju p53 u apoptozi stanice.

Danas, razvijaju se male molekule inhibitora MDM2 s terapijskim ciljem reaktivacije p53 u tumorskim stanicama. U ispitivanjima na životinjskim modelima, otkriveno je da je

reaktivacijom p53 moguće potisnuti razvoj tumora (42). Ovo otkriće dovelo je do formiranja nove strategije liječenja tumora.

## **1.4. KEMOTERAPEUTICI**

Kemoterapija ima ključnu ulogu u liječenju malignih bolesti. Ona za liječenje koristi kemijska sredstva koja uništavaju tumorske stanice (43). Lijekovi koji se koriste u liječenju tumora imaju mnogobrojne nazive. Nazivaju se kemoterapeutici, citostatici, citotoksični lijekovi ili antineoplastici (44).

Djelovanje kemoterapeutika na tumorske stanice ima višestruki učinak. Oni zaustavljaju i sprječavaju dijeljenje stanica, uzrokuju spontanu smrt stanica i sprječavaju stvaranje krvnih žila kako bi se smanjila opskrba tumorskog tkiva za hranom i kisikom (45).

Uloga kemoterapeutika zasniva se na uklanjanju svih tumorskih stanica, usporavanju rasta i širenja tumora u druge dijelove tijela, ublažavanju simptoma, produljenju života i poboljšanju kvalitete življenja kod onih osoba kod kojih je došlo do velikog uznapredovanja bolesti (43).

### **1.4.1. Vrste kemoterapije**

Za što uspješnije liječenje tumora, često se uz primjenu kemoterapeutika primjenjuju i/ili kirurški postupci i/ili radioterapija, ovisno o dijagnozi.

Kemoterapija se može podijeliti na primarnu induksijsku kemoterapiju, neoadjuvantnu kemoterapiju i adjuvantnu kemoterapiju. Primarno induksijsko liječenje primjenjuje se u slučajevima uznapredovale bolesti. Neoadjuvantno liječenje primjenjuje se kod lokaliziranih



bolesti kod kojih kirurški zahvati ili zračenje nisu dovoljno učinkoviti. Adjuvantno liječenje primjenjuje se kao pomoćno liječenje kirurškim zahvatima i/ili radioterapijom.

#### **1.4.2. Vrste kemoterapeutika**

Prema mehanizmu djelovanja i kemijskom sastavu, kemoterapeutici se dijele na alkilirajuće lijekove, antimetabolite, antitumorske antibiotike, mitotičke inhibitore, inhibitore topoizomerase i skupinu ostalih kemoterapeutika (23).

Alkilirajući lijekovi obuhvaćaju skupinu spojeva koji imaju sposobnost formiranja kovalentnih veza s DNK. Svoj citotoksični učinak ostvaruju interakcijom i alkiliranjem molekule DNK. To rezultira inhibicijom, nepravilnim udvajanjem DNK ili oštećenjem DNK molekule, što dovodi do mutacije ili do stanične smrti. Na ovu skupinu lijekova najosjetljivije su stanice koje se nalaze u G2 fazi staničnog ciklusa te stanice koje se nalaze na prijelazu iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Najznačajniji predstavnici ove skupine lijekova su ciklofosfamin, cisplatin, karboplatin, ifosfamid i lomustin (23).

Antimetaboliti čine skupinu lijekova koji ometaju fiziološke procese, posebno one bitne za rast tumorskih stanica. Djelotvornost im je utemeljena na strukturnoj sličnosti sa spojevima koji imaju važnu fiziološku ulogu. Oni zamjenjuju normalne metabolite u staničnim procesima, vežu se na ključne enzime u sintezi nukleinskih kiselina ili izravno za nukleinske kiseline. Tako onemogućuju daljnji rast stanice i dovode do njezine smrti. Najčešće se primjenjuju analozi metabolita nukleinskih kiselina te analozi purinskih i pirimidinskih baza. Zbog djelovanja na sintezu nukleinskih kiselina, djelovanje im je ograničeno na S fazu staničnog ciklusa. Među najznačajnije predstavnike ubrajaju se 5-fluorouracil, metotreksat i gemcitabin (23).

Antitumorski antibiotici proizvodi su različitih sojeva bakterija roda *Streptomyces*. Oni obuhvaćaju skupinu spojeva koji su dobiveni na sličan način kao i klasični antibiotici. Djeluju slično kao i klasični antibiotici te na tumorskim stanicama uzrokuju oštećenja DNK i promjene na staničnoj membrani. Citotoksični učinak zasniva se na inhibiranju enzima topoizomeraze, interkalaciji DNK i RNK i formiranju slobodnih radikala koji oštećuju nukleinske kiseline i stanične membrane. Oni ne djeluju tijekom cijelog staničnog ciklusa, stoga imaju jače neželjene efekte (46). U najznačajnije predstavnike ubrajaju se doksorubicin, epirubicin, bleomicin i mitomicin (23). U ovom radu testirat će se učinak doksorubicina na aktivnost RNK polimeraze I i strukturu jezgrice.

Mitotički inhibitori, kako im sam naziv govori, inhibiraju mitozu odnosno staničnu diobu. Djeluju tako da inhibiraju mikrotubule, stanične strukture odgovorne za razdvajanje stanica prilikom diobe. Time prekidaju staničnu diobu tijekom M faze staničnog ciklusa (47). Najznačajniji predstavnici mitotičkih inhibitora su paklitaksel, docetaksel, vinkristin, vinblastin (23).

Inhibitori topoizomeraza lijekovi su koji ometaju aktivnost enzima topoizomeraze I ili II (48). Enzimi topoizomeraze kataliziraju reverzibilno kidanje i naknadno spajanje lanaca DNK prilikom udvajanja DNK (1). Topoizomeraza I uzrokuje jednolančane lomove DNK, a topoizomeraza II uzrokuje dvolančane lomove molekule DNK (49). Nastali prekidi omogućuju slobodno razmotavanje lanaca kalupa DNK te nesmetano udvajanje DNK. Primjenom inhibitora topoizomeraze, ovi procesi se blokiraju što rezultira staničnom smrću. Najznačajniji predstavnici ove skupine lijekova su etopozid, irinotekan i topotekan (23). Osim doksorubicina, u ovom radu testirat će se i učinak etopozida na aktivnost RNK polimeraze I i strukturu jezgrice.

### **1.4.3. Kombinirana terapija**

Kombinirana kemoterapija je važna jer omogućuje maksimalno uništenje stanica s podnošljivom toksičnošću svakog lijeka ukoliko su primijenjene odgovarajuće doze. Pri tome, mora se voditi računa o djelotvornosti i toksičnosti lijeka, optimalnom režimu primjene i mehanizmu interakcije (50). Prema tome, cilj je kombinirati one kemoterapeutike čiji se mehanizmi djelovanja i neželjene posljedice ne poklapaju (23).

### **1.4.4. Otpornost tumorskih stanica na lijekove**

Glavni problem koji se može pojaviti prilikom liječenja tumora je razvoj stanične otpornosti (rezistencije) na lijekove. Stanična otpornost je sposobnost tumorskih stanica da prežive djelovanje kemoterapeutika. Najvažniji mehanizmi tumorske rezistencije su: smanjena djelotvornost enzima odgovornih za aktivaciju/metaboliziranje lijeka, pojačano djelovanje enzima odgovornih za inaktivaciju lijeka, mutacije ciljnih molekula unutar stanice tumora, povećan popravak DNK molekule, promjena aktivnosti ciljnih molekula, povećan izlazak lijeka iz stanice, smanjena količina lijeka koji ulazi u stanicu te sprječavanje apoptoze mutacijom gena supresora tumora p53 (23).

### **1.4.5. Nuspojave**

Nuspojave su nepoželjne posljedice koje se javljaju nakon pravilne primjene uobičajene doze lijeka. Javljaju se kao odgovor na neselektivno djelovanje kemoterapeutika koji osim na tumorske stanice djeluju i na zdrave stanice. To sve dovodi do negativnih reakcija organizma na lijek. Nuspojave se razlikuju po ozbiljnosti i težini. Neke od njih su blaže, a neke

intenzivnije. Prema tome, potrebno je držati se uputa proizvođača i upozorenja o kontraindikacija, interakcija s drugim lijekovima, terapijama, hranom i bolestima (43).

Za razliku od klasične terapije, moderna terapija bazira se na specifičnom i selektivnom liječenju s blažim nuspojavama. Ona se temelji na selektivnoj inhibiciji transkripcijske funkcije RNK polimeraze I. Naglasak je na zaustavljanju transkripcije rDNK u rRNK i induciranju nukleolarnog stresa koji tumorsku stanicu ciljano i selektivno uvodi u apoptozu. Ovaj princip omogućava očuvanje normalnih i zdravih stanica kod kojih djelovanje p53 nije ometano te se stanice mogu prilagoditi na postojeći stres.

Liječenje tumora koje uključuje indukciju apoptoze tumorskih stanica može biti direktnom ili indirektnom aktivacijom p53 preko indukcije nukleolarnog stresa. Tumorske stanice su puno osjetljivije na nukleoarni stres od zdravih stanica. Na taj način izbjegnut je genotoksični stres.

Povećanu osjetljivost stanica raka na inhibitore sinteze RNK-a podržavaju već narušeni mehanizmi regulacije staničnog ciklusa, aktivacije onkogeni i oporavka DNK-a zbog čega pojačani nukleolarni stres aktivira mehanizme apoptoze bez obzira na mutaciju supresora tumora. (13)

U ovom diplomskom radu prikazat će se mehanizam djelovanja dva kemoterapeutika, doksorubicina i etopozida, na aktivnost RNK polimeraze I, morfološka svojstva jezgrice i aktivaciju p53.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Jezgrica ima vrlo važnu ulogu u sintezi ribosoma, a osim toga značajan je senzor stresa unutar stanice. Poznato je da su jezgrice povećane u većini zloćudnih tumora što je posljedica intenzivne sinteze ribosoma koja im je potrebna za brzi rast i diobu. Ta povećana sinteza ribosoma često rezultira morfološkim promjenama struktura u jezgri. U jezgricama tumorskih stanica povećana je transkripcijska aktivnost RNK polimeraze I, sinteza ribosoma te mehanizmi opstanka stanice, a spriječena je normalna funkcija supresora tumora p53. Brojni protutumorski lijekovi svoj učinak ostvaruju putem inhibicije sinteze ribosoma na različitim koracima i inhibicije rasta stanice te na taj način onemogućuju rast i diobu zloćudno preobraženih stanica. Danas se ovakvi lijekovi koriste za uspješno liječenje nekih zloćudnih tumora.

U ovom diplomskom radu cilj je odrediti putem kojih molekularnih mehanizama protutumorski lijekovi, etopozid i doksorubicin, ostvaruju svoj učinak u liječenju zloćudnih tumora. U tu svrhu predlažem sljedeće specifične ciljeve:

1. Odrediti utjecaj doksorubicina i etopozida na aktivaciju supresora tumora p53
2. Odrediti utjecaj doksorubicina i etopozida na strukturu jezgre
3. Odrediti utjecaj doksorubicina i etopozida na aktivnost RNK polimeraze I

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Agaroz, Sigma

Akrilamid/bisakrilamid 30 % (29:1), Bio-Rad laboratories GmbH

Albumin govedeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*), Sigma-Aldrich

Amonij klorid (NH<sub>4</sub>Cl), Kemika

Amonijev persulfat (APS, engl. *ammonium persulfate*, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), Sigma-Aldrich

Aprotinin, Fluka

Bio-Rad protein assay, Bio-Rad laboratories GmbH

Bromfenol modriilo (engl. *bromphenol blue*), Merck

DAPI (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*, C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>), Sigma-Aldrich

Dietil pirokarbonat (DEPC, engl. *diethyl pyrocarbonate*, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), Sigma-Aldrich

DMEM medij, Gibco BRL

Doxorubicin, Sigma

DTT (engl. *1,4-dithiothreitol*, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>), Sigma-Aldrich

ECL Prime Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences

Etanol (CH<sub>3</sub>OH), Kemika

Etidij bromid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>), Gibco BRL

Etilendiamintetraacetat- $\text{Na}_2$  (EDTA; Kompleksal III), Kemika

Etopozid, Sigma

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$ ), Sigma-Aldrich

Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ), Kemika

Fetalni teleći serum (FCS, engl. *fetal calf serum*), Gibco BRL

Formaldehid 36 % ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), Kemika

Formamid, deionizirani ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ), Sigma-Aldrich

Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Sigma-Aldrich

Glicin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ ), Sigma-Aldrich

L-Glutamin ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ ), Gibco BRL

Gvanidin tiocijanat ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$ ), Sigma-Aldrich

Izopropanol (2-propanol,  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), Kemika

Kalcij klorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Kemika

Kalij dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Kemika

Kalij hidrogenkarbonat ( $\text{KHCO}_3$ ), Kemika

Kalij klorid (KCl), Kemika

Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), Kemika

Leupeptin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4$ ), Sigma-Aldrich

Magnezij klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), Kemika

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Kemika

Metilensko plavilo, Merck

Natrij deoksikolat (NaDOC, engl. *sodium deoxycholate*,  $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$ ), Sigma-Aldrich

Natrij dihidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), Kemika

Natrij dodecil sulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*,  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ), Sigma-Aldrich

Natrij fluorid ( $\text{NaF}$ ), Sigma-Aldrich

di-Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ), Kemika

Natrij hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), Kemika

Natrij klorid ( $\text{NaCl}$ ), Kemika

Natrij ortovanadat (engl. *sodium orthovanadate*,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), Sigma-Aldrich

2-Merkaptoetanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ), Sigma-Aldrich

3-Morfolinopropansulfonska kiselina (MOPS, engl. *3-morpholinopropanesulfonic acid*,  $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ ), Sigma-Aldrich

Otopina penicilina i streptomicina, Gibco

Paraformaldehid, Fluka

Power SYBR Green, Applied Biosystems

ProLong Gold antifade reagent, Invitrogen

Proteinski markeri, obojeni, Bio-Rad laboratories GmbH



Reverse transcription-PCR (RT-PCR) kit, Applied Biosystems

RNase inhibitor, Ambion

TEMED (C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>), Sigma-Aldrich

Tergitol (Nonidet P-40), Sigma-Aldrich

Trizma-baza (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>), Sigma-Aldrich

Trizma-hidroklorid (C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>3</sub>), Sigma-Aldrich

Triton X-100, Pharmacia Biotech

Trizol reagens, Invitrogen

Tween 20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat, C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>), Sigma-Aldrich

### **3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica**

#### **3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. *phosphate buffered saline*), pH 7,4**

Natrij klorid (NaCl) 137 mM, kalij klorid (KCl) 2,7 mM, natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) 4,3 mM, kalij-dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1,4 mM.

#### **3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica**

Medij DMEM, L-glutamin 2 mM, 2-merkaptoetanol 50 uM, penicilin 105 U/L, streptomycin 0,1 g/L, gentamicin 0,035 g/L, FCS 12% (v/v)

### **3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNK**

#### **3.1.3.1. Organska otapala u izolaciji RNK**

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola 49:1 (v/v), izopropanol 100 %, etanol 75 % u destiliranoj vodi tretiranoj DEPC-om.

#### **3.1.3.2. Denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNK za elektroforezu**

MOPS (pH 7,0) 40 mM, formaldehid 6,54 % (v/v), deionizirani formamid 50 % (v/v).

#### **3.1.3.3. Pufer za nanošenje uzoraka RNK na gel**

EDTA (pH 8,0) 1 mM, bromfenol modriilo 0,25 % (w/v), ksilen cijanol 0,25 % (w/v), glicerol 50 % (v/v).

#### **3.1.3.4. Voda tretirana s DEPC-om**

DEPC 1 % (v/v) u destiliranoj vodi (H<sub>2</sub>O).

#### **3.1.3.5. Pufer za elektroforezu RNK (10x)**

MOPS (pH 7,0) 0,4 M, natrij acetat (CH<sub>3</sub>COONa) 0,1 M, EDTA 0,01 M.

### **3.1.4. Otopine korištene za imunofluorescenciju**

#### **3.1.4.1. Otopina za fiksaciju stanica**

Paraformaldehid 0,4 g/L otopljen u PBS-u, pH 7,4.

#### **3.1.4.2. Otopina za permeabilizaciju stanica**

Triton X-100, 0,5 %-tna otopina u PBS-u.

### **3.1.4.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela**

BSA 3 %, Triton X-100 0,2 % u PBS-u.

### **3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu**

#### **3.1.5.1. Pufer za izolaciju proteina (RIPA, engl. *radiation immunoprecipitation assay*)**

Tris Cl (pH 8,0) 50 mM, NP-40 1 % (v/v), SDS 0,1 % (w/v), natrij deoksikolat 0,5 % (v/v), natrij klorid (NaCl) 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinin 1 µg/mL, leupeptin 1 µg/mL, natrij ortovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 1 mM, natrij fluorid (NaF) 1mM.

#### **3.1.5.2. Komponente za izradu 12% poliakrilamidnog gela za elektroforezu proteina**

##### **3.1.5.2.1. Gel za razdvajanje proteina (donji gel)**

Voda (H<sub>2</sub>O) 3,3 mL, 30 % otopina akrilamid/bisakrilamida (37,5:1) 4,0 mL, 1,5 M Tris Cl (pH 8,8) 2,5 mL, 10 % SDS 100 µL, APS 100 µL, TEMED 4 µL.

##### **3.1.5.2.2. Gel za koncentriranje (gornji gel)**

Voda (H<sub>2</sub>O) 2,7 mL, 30 % otopina akrilamid/bisakrilamida (37,5:1) 670 µL, 1 M Tris Cl (pH 6,8) 50 µL, 10 % SDS 40 µL, APS 40 µL, TEMED 4 µL.

#### **3.1.5.3. Otopina za ispiranje membrana**

1X TBS-Tween 20 0,05 % (Tris baza 50 mM, natrij klorid 150 mM ), pH 7,6.

### **3.1.5.4. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela**

Nemasno mlijeko 5 % (w/v) u TBS-Tween 20; albumin govedjeg seruma (BSA) 5 % (w/v) u TBS-Tween 20.

### **3.1.5.5. Otopina za vizualizaciju proteina vezanih na membranu**

Ponceau S 0,5 % (w/v) u 1 %-tnoj (v/v) octenoj kiselini (CH<sub>3</sub>COOH).

### **3.1.5.6. Pufer za nanošenje uzoraka proteina na gel (5x)**

Tris Cl (pH 6,8) 300 mM, glicerol 50 % (v/v), SDS 10 % (w/v), bromfenol modriilo 0,05 % (w/v), 2-merkaptoetanol 10 % (v/v).

### **3.1.5.7. Pufer za elektroforezu proteina (Laemmli pufer) (5x)**

Tris baza 12,5 mM, glicin 100 mM, SDS 0,5 % (w/v), pH 8,5.

### **3.1.5.8. Pufer za prijenos proteina s gela na membranu**

Tris baza 48 mM, glicin 390 mM, SDS 0,1 % (w/v), metanol 20 % (v/v).

## **3.1.6. Protutijela za Western blot analizu i imunofluorescenciju**

### **3.1.6.1. Protutijela za Western blot analizu**

Protutijelo protiv aktina proizvedeno u mišu, Chemicon

Protutijelo protiv p21 proizvedeno u mišu, Santa Cruz

Protutijelo protiv p53 proizvedeno u mišu, DO-1 Santa Cruz

Protutijelo na mišje IgG konjugirano s peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *horse radish peroxidase*) i proizvedeno u kozi, Santa Cruz

### **3.1.6.2. Protutijela za imunofluorescenciju**

Protutijelo protiv fibrilarina proizvedeno u zecu, Abcam

Protutijelo protiv UBF-a proizvedeno u mišu, Santa CRuz

Protutijelo na zečje IgG konjugirano s fluorescentnom bojom Alexa 488 i proizvedeno u kozi, Molecular Probes

Protutijelo na mišje IgG konjugirano s fluorescentnom bojom Alexa 594 i proizvedeno u kozi, Molecular Probes

### **3.1.7. Stanične linije**

Humana stanična linija A549 iz alveolarnog adenokarcinoma, ATCC. Stanice A549 su adherentne. Uzgajala sam ih na 37 °C i atmosferi od 5 % CO<sub>2</sub> u DMEM mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma (10 % v/v), glutamina i otopine penicilina/streptomicina.

### **3.1.8. Laboratorijsko posude i pribor**

Biomax filmovi, Kodak

Boce od 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL

Bürker-Türk Hemicitometar

Epruvete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, Greiner

Filter papiri (Whatman), 3 mm, Sigma-Aldrich

Igla za nanašanje uzoraka proteina na gel, Hamilton Microliter Syringes

Immobilon P (PVDF membrana za transfer proteina), Millipore

Magneti

Mikrocentrifugalne tubice od 1,5 mL i 2 mL, Greiner

Nastavci za pipete, univerzalni (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000  $\mu$ L), Gilson

Nastavci za pipete, filter (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000  $\mu$ L), Gilson

Odmjerne menzure, tikvice i čaše

Pinceta

Pipete, Eppendorf i Gilson

Pipetori, Gilson

Plastični lijevci i kadice

Ploče za kulturu (6 cm, 10 cm, 15 cm), Greiner

Plastične pipete (2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL), Orange Scientific

Predmetna i pokrovna stakalca

Razvijač i fiksir (otopine) za razvijanje filmova, Kodak

Stakleni štapić

Škare

### **3.1.9. Uređaji**

Centrifuge (rashladne): Eppendorf , Chill Spin, Sorvall

Hladnjaci (+4 °C, -20 °C, -80 °C, -140 °C)

Horizontalna tresilica, KS 260 basic, Ika

Inkubator, Jouan

Konfokalni mikroskop, LSM 700, Zeiss

Magnetska mješalica, Ika

pH metar, Mettler Toledo

Polaroid kamera, Hoefer

Sustav za elektroforezu RNK i proteina, Bio-Rad laboratories

Termoblok, Grant Boekel

Transluminator, Hoefer

Uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom ABI Prism 7300, Applied Biosystems

Vodena kupelj, Biosan

Vibracijska mješalica, Ika

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Kultura stanica i tretman stanica s genotoksičnim agensima**

Utjecaj genotoksičnog stresa na aktivnost RNK polimeraze I, strukturu i funkciju jezgrice te na aktivaciju p53, ispitala sam u staničnim linijama A549. Prvi dan, nasadila sam  $1,2 \times 10^6$  stanica u 10 mL kompletnog DMEM medija, na ploče promjera 10 cm. Idući dan,

stanice sam tretirala s 20  $\mu$ M etopozidom u trajanju od 5 i 16 sati te s 1  $\mu$ M doksorubicinom, također u trajanju od 5 i 16 sati.

### **3.2.2. Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja p53 i p21**

Nakon tretiranja stanica A549 s genotoksičnim agensima, etopozidom i doksorubicinom, stanice sam skupila na način da sam ih isprala PBS-om te tretirala 5 minuta s tripsinom u inkubatoru na 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>. Po završetku tripsinizacije, stanice sam skupila u PBS-u i centrifugirala 5 minuta pri 1500 okretaja u minuti. Dobiveni talog stanica koristila sam za izolaciju ukupnih proteina. Na talog stanica dodala sam RIPA pufer uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza. Stanice resuspendirane u RIPA puferu držala sam na ledu (0 °C) 30 minuta. Nakon toga, centrifugirala sam uzorke na brzini od 13 000 okretaja u minuti tijekom 30 minuta. U čistu tubicu, izdvojila sam supernatant koji je sadržavao ukupne stanične proteine.

Koncentraciju proteina u staničnim lizatima odredila sam metodom po Bradfordu. Ova metoda temelji se na vezivanju Comassie brilliant blue boje na proteine pri čemu nastaje plava boja. Intenzitet nastale plave boje proporcionalan je koncentraciji proteina, a mjeri se pomoću spektrofotometra, određivanjem apsorbancije na valnoj duljini od 595 nm. Za određivanje koncentracije proteina pripremila sam u tubice 800  $\mu$ L vode i 200  $\mu$ L Bradforda te 2  $\mu$ L proteinskog lizata. Navedenu smjesu sam inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi te odredila apsorbanciju na 595 nm. Nakon što sam odredila koncentracije proteina, pripremila sam 20  $\mu$ g proteinskog lizata za nanošenje na gel.

Ukupnu količinu proteina p53, p21 i aktina odredila sam nakon razdvajanja proteina u 12 %-tnom poliakrilamidnom gelu, debljine 1,5 mm. Elektroforeza proteina odvijala se u denaturirajućim uvjetima, u prisutnosti detergenta (SDS-a), pod utjecajem električnog polja



jakosti 100 V. Nakon završene elektroforeze, pod utjecajem električnog polja, prenijela sam proteine s gela na pozitivno nabijenu PVDF membranu. Transfer se odvijao u električnom polju jakosti 400 mA u trajanju od 2 sata. Učinkovitost transfera provjerila sam bojanjem PVDF membrane bojom Ponceau. Zatim sam inkubirala membranu s blokirajućom otopinom u trajanju od 30 minuta. Potom sam inkubirala membranu s primarnim protutijelima (anti-p53 u razrjeđenju 1:10 000; anti-p21 u razrjeđenju 1:500; anti-aktin u razrjeđenju 1:40 000), preko noći pri 4 °C, na tresilici. Idući dan, isprala sam membranu otopinom za ispiranje, tri puta po 5 minuta te sam inkubirala s sekundarnim protutijelima u razrjeđenju 1:2000, u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi, na tresilici. Nakon toga, isprala sam membranu otopinom za ispiranje, tri puta u trajanju od 5 minuta. Potom sam prema uputama proizvođača nanijela supstrat ECL Prime koji ulazi u reakciju s enzimom HRP (engl. *horse radish peroxidase*) vezanim za sekundarno protutijelo. Nastala enzimska reakcija, u kojoj je došlo do oksidacije enzima HRP, rezultirala je pojavom kemiluminiscencije koja se registrirala na filmu. Kako bih dobila signal na filmu, nakon dodatka supstrata, membranu sam prekrila prozirnom folijom, stavila u kazetu i prislonila film za razvijanje. Razvijanje filma odvijalo se u uvjetima zaštićenim od svjetlosti, u trajanju od nekoliko minuta. Za vizualizaciju signala na filmu, film sam uronila 30 sekundi u otopinu za razvijanje, isprala u vodi, uronila 40 sekundi u otopinu za fiksiranje te ponovno isprala u vodi. Nakon ispiranja, film sam ostavila na sobnoj temperaturi da se posuši te sam ga koristila za detekciju proteina p53, p21 i aktina.

### **3.2.3. Mikroskopiranje biljega jezgrice**

Kako bih analizirala učinke dokorubicina i etopozida na strukturu i funkciju jezgrice, koristila sam metodu imunofluorescencije. Metoda imunofluorescencije omogućuje

dokazivanje prisutnosti proteina pomoću protutijela specifičnih za pojedini protein, a pri tome ne dolazi do narušavanja strukture stanice, već ona ostaje očuvana.

Tretirane i netretirane stanice fiksirala sam tijekom 10 minuta s 4 %-tnim paraformaldehidom. Za permeabilizaciju stanica, fiksirane stanice inkubirala sam s 0,5 %-tnim Triton X-100 u PBS-u, u trajanju od 7 minuta. Potom sam dva puta isprala stakalca u PBS-u te inkubirala s otopinom za sprječavanje nespecifičnog vezivanja protutijela, tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Kako bih odredila strukturu jezgrice, stanice sam inkubirala prako noći s primarnim protutijelima protiv biljega UBF-a i fibrilarina koji su specifični za različite odjeljke jezgrice. Zatim sam isprala primarno protutijelo i inkubirala stanice sa sekundarnim protutijelom, u razrjeđenju 1:1000, tijekom 45 minuta pri temperaturi od 37 °C. Za sekundarno protutijelo upotrijebila sam protu-zečje protutijelo obilježeno s bojom Alexa 594 te protu-mišje protutijelo obilježeno s bojom Alexa 488. Osim toga, dodala sam fluorescentnu boju DAPI koja boji DNK, u trajanju od 5 minuta, u mraku, pri sobnoj temperaturi. Dobiveni fluorescentni signal analizirala sam primjenom konfokalnog mikroskopa LSM 700 (Zeiss).

#### **3.2.4. Izolacija ukupne RNK**

Ploče sa stanicama isprala sam s PBS-om te sam direktno na ploče dodala 1 mL Trizol reagensa i skupila stanice u tube tretirane s DEPC-om. Trizol se dodaje direktno na ploče kako bi izolacija ukupne RNK bila što brža s ciljem da primarna 47S pre-rRNK, čiji će se izražaj određivati RT-PCR-om, ostaje očuvana. Nakon kratkog miješanja, dodala sam 400 µL smjese kloroforma i izoamilnog alkohola (v/v, 49:1) i centrifugirala na 14 000 okretaja u minuti tijekom 15 minuta pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, u čistu tubicu sam izdvojila 500 µL supernatanta (vodenu fazu) koji sadrži ukupnu RNK. Dodala sam 500 µL izopropanola i

ponovno centrifugirala na 14 000 okretaja u minuti, tijekom 15 minuta pri 4 °C te sam tako precipitirala ukupnu RNK. Talog RNK isprala sam od soli pomoću 75 % etanola (pripremljenog u vodi tretiranom DEPC-om) i centrifugirala na 11 000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, pažljivo sam uklonila supernatant i osušila uzorke. Potom sam uzorke otopila u 30 µL vode tretiranojom DEPC-om. Uzorcima sam izmjerila koncentraciju na spektrofotometru, mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Koncentraciju ukupne RNK izračunala sam prema formuli:

$$\text{Koncentracija (RNK)/ } \mu\text{g/mL} = A_{260} \times 40 \times \text{faktor razrijeđenja}$$

Odredila sam i čistoću izolirane RNK koja određuje kvalitetu izolirane RNK. Ona se dobiva iz omjera vrijednosti apsorbancija 260 nm i 280 nm pri čemu vrijednosti u rasponu 1,80-2,00 odgovaraju zadovoljavajućoj čistoći izolirane RNK.

### **3.2.5. Elektroforeza RNK**

Nakon što sam izolirala ukupnu RNK, kako bih razdvojila pojedine molekule RNK, provela sam elektroforezu RNK. Pripremila sam 1 %-tni agarozni gel tako što sam otopila 0,5 g agaroze u 40 mL vode tretirane DEPC-om i zagrijala do vrenja u mikrovalnoj pećnici. U djelomično ohlađenu otopinu dodala sam 5 mL 10x MOPS pufera, 9 mL formaldehida i 5 µL etidij bromida koncentracije 10 mg/mL, uz stalno miješanje. Pripremljenu smjesu izlila sam u kadicu za elektroforezu s prethodno postavljenim češljicima kojima se oblikuju bunarčići za nanošenje uzoraka. U svrhu zaštite RNK, kadicu i češljice isprala sam vodom tretiranom DEPC-om.

Uzorke za elektroforezu pripremila sam dodatkom 14 µL RNK SB pufera, 4 µL RNK LB pufera i 2 µL izolirane RNK. Pripremljenu smjesu temeljito sam izmješala te sam ju inkubirala u termobloku tijekom 10 minuta pri 60 °C. Nakon toga uzorke sam nanijela na gel.

Elektroforeza se odvijala na 1 %-tnom agaroznom gelu, u 1x MOPS puferu, u električnom polju jakosti 60 V.

Nakon elektroforeze, gel sam odbojavala u vodi tretiranoj DEPC-om, a uzorke sam vizualizirala koristeći UV-trasluminator te sam gel fotografirala polaroidnom kamerom (Hofer).

### 3.2.6. Sinteza komplementarne DNK

Od ukupne izolirane RNK, 2  $\mu$ g prevela sam u komplementarnu DNK (cDNA) pomoću kita „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*”, na ledu (0 °C). Reakcijsku smjesu za sintezu komplementarne DNK pripremila sam prema sastavu navedenom u **Tablici 1.**

**Tablica 1. Prikaz sastava reakcijske smjese za sintezu cDNA.**

Sastav	Volumen
10x RT pufer	2 $\mu$ L
25x dNTP mix (100 mM)	0,8 $\mu$ L
10x RT nasumične početnice	2,0 $\mu$ L
MSC	1,0 $\mu$ L
RNazni inhibitor	0,5 $\mu$ L
Voda tretirana DEPC-om	3,7 $\mu$ L
<b>UKUPNI VOLUMEN</b>	<b>10,0 <math>\mu</math>L</b>

Sinteza cDNA odvijala se u uređaju za lančanu reakciju polimerazom, prema programu navedenom u **Tablici 2.**

**Tablica 2. Program za sintezu cDNA.**

Faza	Temperatura	Vrijeme
1.	25 °C	10 min
2.	37 °C	120 min
3.	85 °C	5 min
4.	4 °C	konstantno

### 3.2.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Za određivanje aktivnosti RNK Polimeraze I odredila sam izražaj glasničke RNK za 47S pre-rRNK metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) pomoću uređaja ABI Prism 7300 (Applied Biosystems).

Nastalu cDNA koristila sam kao kalup za RT-PCR uz primjenu specifičnih početnica za određivanje izražaja specifičnih gena u stanicama. Sve početnice koje sam koristila navedene su u **Tablici 3.**

**Tablica 3. Sekvence početnica za qRT-PCR.**

Naziv početnice		Sekvenca
pre-rRNK	F	5'-CCTGTCTGTTCTCTCGCGCGTCCGAA-3'
pre-rRNK	R	5'-AACGCCTGACACGCACGGCACGGA-3'
GAPDH	F	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
GAPDH	R	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

Sintetiziranu cDNA razrijedila sam s vodom u omjeru 1:25 te sam pripremila reakcijsku smjesu prema sastavu navedenom u **Tablici 4.**

**Tablica 4. Prikaz sastava reakcijske smjese za qRT-PCR.**

Sastav	Volumen
2x SYBR Green	12,5 µL
Razrijeđena cDNA (1:25)	5,0 µL
Početnice (2 µM)	4,0 µL
Voda tretirana DEPC-om	3,5 µL
<b>UKUPNI VOLUMEN</b>	<b>25 µL</b>

Pripremljenju reakcijsku smjesu unijela sam u bunarčiće mikrotitarske ploče. Nanijela sam uzorke te sam mikrotitarsku ploču prekrila samoljepljivom folijom te centrifugirala na 1200 okretaja u minuti tijekom 2 minute pri 4 °C. Nakon toga, ploču sam stavila u uređaj za RT-PCR. Reakcija se odvijala po programu navedenom u **Tablici 5**.

**Tablica 5. Program za detekciju qRT-PCR produkta.**

Faza	Temperatura	Vrijeme	Ciklusi
<b>1.</b>	94 °C	10 min	
<b>2.</b>	94 °C	15 s	
	60 °C	60 s	40x

Detekcija qRT-PCR produkta omogućena je upotrebom fluorescentne boje SYBR Green. Tijekom 40 ciklusa mjerila se fluorescencija SYBER Greena. Prvi ciklus u kojem je bilo moguće odrediti nastajanje PCR fragmenta naziva se prag ciklusa (engl. *cycle treshold*, Ct). Dobivene rezultate usporedila sam s vrijednostima dobivenim iz GAPDH (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) koji ima isti izražaj u svim stanicama organizma (engl. *housekeeping gene*). Koristeći program Excel (Microsoft) izrazila sam rezultate u

obliku omjera između vrijednosti tretiranih u odnosu na netretirane (kontrolne) stanice za pojedini gen (engl. *fold change*).

### 3.2.8. Određivanje disocijacijske krivulje za produkt lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Nakon završetka programa za qRT-PCR, mikrotitarsku ploču s reakcijskim smjesama sam podvrgnula programu koji je naveden u **Tablici 7**.

**Tablica 7. Program za određivanje disocijacijske krivulje za produkte qRT-PCR.**

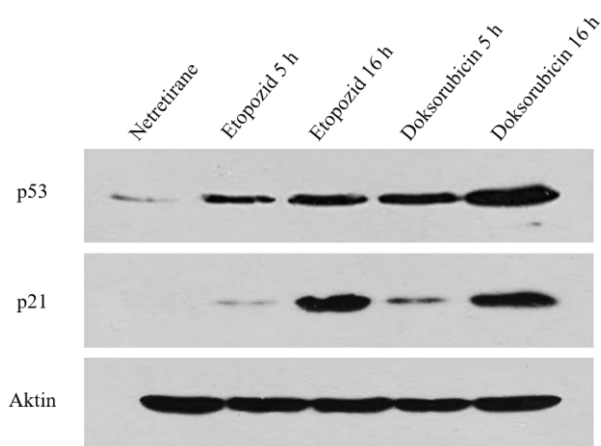
Faze	Temperatura	Vrijeme
1.	95 °C	15 s
2.	60 °C	30 s
3.	95 °C	15 s

Flouescencija SYBR Greena provodi se za vrijeme postepenog snižavanja temperature s 95 °C na 60 °C te je tada moguće određivanje disocijacijske krivulje za qRT-PCR produkte.

#### 4. REZULTATI

U ovom diplomskom radu cilj je bio pokazati koje mehanizme djelovanja koriste protutumorski lijekovi, etopozid i doksorubicin, u liječenju zloćudnih tumora. Poznato je da supresor tumora p53 ima ključnu ulogu u zaštiti stanice od zloćudne preobrazbe. Stoga sam stanicama A549, nakon tretmana s etopozidom i doksorubicinom, testirala izražaj p53 i njegovog ciljnog gena, p21, metodom Western blot. Stanice sam tretirala s 20  $\mu$ M etopozidom i 1  $\mu$ M doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati.

Tretman stanica u trajanju 5 i 16 sati s etopozidom i doksorubicinom rezultirao je aktivacijom supresora tumora p53 (**slika 10**). Osim toga, tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom u trajanju 16 sati rezultirao je aktivacijom p21, ciljnog gena supresora tumora p53. Nakon tretmana stanica s genotoksičnim agensima, u trajanju od 5 sati, transkripcijski cilj supresora tumora p53, p21, nije bio aktiviran ili je tek počela njegova aktivacija. Potrebno je određeno vrijeme da nakon aktivacije p53 započne transkripcija njegovih ciljnih gena.

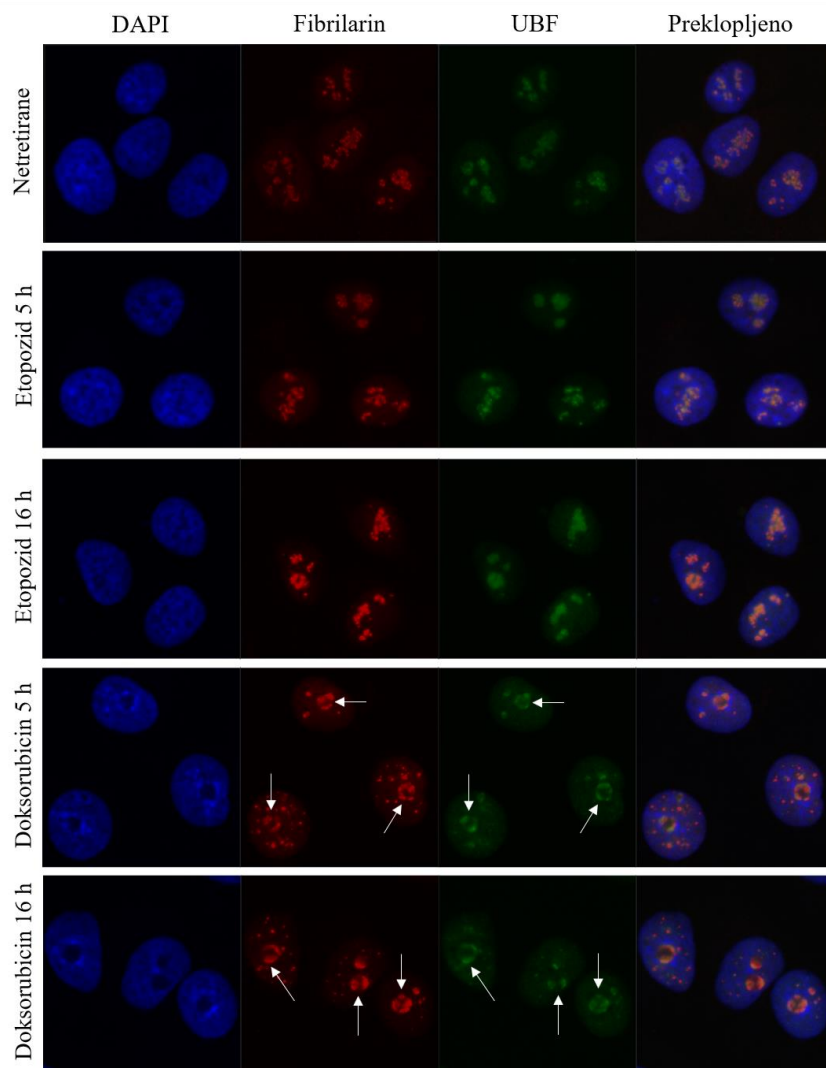


**Slika 10. Aktivacija supresora tumora p53 nakon tretmana stanica s etopozidom i doksorubicinom.** Stanice A549 tretirane su 20  $\mu$ M etopozidom i 1  $\mu$ M doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati. Izražaj proteina p53 i p21 određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina.



Prema tome, iz rezultata prikazanih na slici 10., vidljivo je da tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom dovodi do aktivacije supresora tumora p53 kao i aktivacije njegovog ciljnog gena, p21. Jedna od ključnih uloga p21 je inhibicija diobe stanica što je vrlo značajno jer doprinosi zaustavljanju diobe zloćudno preobraženih stanica.

Budući da jezgrica ima vrlo važnu ulogu u stanici te da je to ključno mjesto sinteze ribosoma i senzor stresa u stanici, odlučila sam odrediti da li tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom ima utjecaj na morfološka svojstva jezgrice. Izražaj biljega jezgrice fibrilarina i UBF-a odredila sam pomoću specifičnih protutijela upotrebom metode imunofluorescencije (**slika 11**). Na slici 11. prikazan je morfološki izgled jezgrica u stanicama A549 nakon tretmana s etopozidom i doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati.

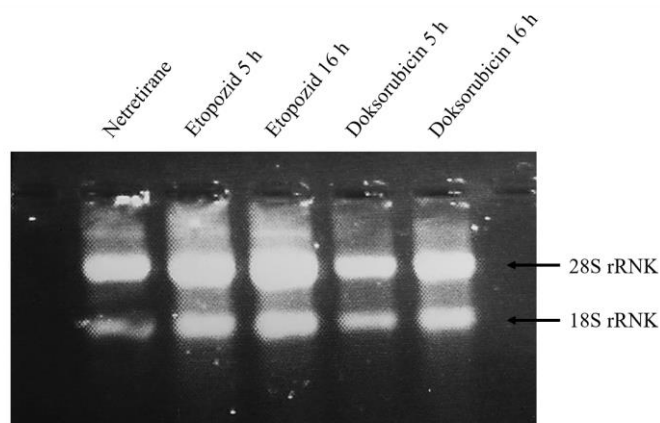


### **Slika 11. Morfološki izgled jezgrica nakon tretmana s etopozidom i doksorubicinom.**

Stanice A549 tretirane su 20  $\mu\text{M}$  etopozidom i 1  $\mu\text{M}$  doksorubicinom tijekom 5 i 16 sati. Nakon toga, stanice su fiksirane, inkubirane protutijelima protiv dva biljega jezgrice (fibrilarina, UBF-a) i analizirane metodom imunofluorescencije, upotrebom konfokalnog mikroskopa. Kolokalizacija između crvenog i zelenog signala prikazana je žutom bojom. Strelicama su naznačene nakupine fibrilarina i UBF-a na rubovima jezgrica nakon tretmana stanica s doksorubicinom.

Kao što je vidljivo na slici 11. tretman stanica s doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati dovodi do značajnih morfoloških promjena jezgrice koje se očituju u formiranju nakupina fibrilarina i UBF-a na rubovima oštećene jezgrice. Iako tretman stanica s etopozidom rezultira aktivacijom supresora tumora p53, ne uzrokuje nikakve morfološke promjene u strukturi jezgrice.

Nakon što sam odredila utjecaj etopozida i dokosorubicina na aktivaciju supresora tumora p53 i morfološka svojstva jezgrice, testirala sam njihov utjecaj na aktivnost RNK polimeraze I (Pol I) odnosno na sintezu 47S ribosomske RNK (rRNK). Sinteza 47S pre-rRNK u jezgri jedan je od ključnih događaja tijekom sinteze ribosoma. Za određivanje učinaka ovih genotoksičnih agenasa na aktivnost RNK Polimeraze I, odgovorne za sintezu rRNK u jezgri, odredila sam izražaj glasničke RNK za 47S pre-rRNK metodom RT-PCR. Kako bih odredila izražaj glasničke RNK za 47S pre-RNK, najprije sam izolirala ukupnu RNK i provjerila sam njenu kvalitetu elektroforezom (**slika 12**).



**Slika 12. Elektroforeza ukupne RNK izolirane iz A549 stanica nakon tretmana stanica s etopozidom i doksorubicinom.** Ukupna RNK razdvojena je elektroforezom na 1,2 % agaroznom gelu, a gel je obojan etidij bromidom. Strelicama su naznečene 28S i 18 S rRNK.

Koncentraciju ukupne RNK odredila sam spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 260 nm. Uz to, odredila sam i čistoću izolirane RNK koja određuje kvalitetu izolirane RNK. Ona se dobiva iz omjera vrijednosti apsorbancija 260 nm i 280 nm, pri čemu vrijednosti u rasponu 1,80-2,00 odgovaraju zadovoljavajućoj čistoći izolirane RNK. Izmjerene koncentracije i vrijednosti omjera apsorbancija A260 i A280 prikazane su u **Tablici 8.**

**Tablica 8. Koncentracija i čistoća RNK u uzoricima.**

Stanice	Koncentracija μg/μL	A260/A280
<b>A549 netretirane</b>	1,032	1,952
<b>A549 tretirane s etopozidom 5 h</b>	1,202	1,836
<b>A549 tretirane s etopozidom 16 h</b>	2,184	1,953
<b>A549 tretirane s doksorubicinom 5 h</b>	1,243	1,903
<b>A549 tretirane s doksorubicinom 16 h</b>	1,165	1,921

Omjeri apsorbancija na valnim duljinama od 260 nm i 280 nm bili su između 1,80 i 2,00 što ukazuje da je izolirana RNK dobre kvalitete.

Nakon izolacije ukupne RNK i provjere njezine kvalitete, prevela sam ukupnu RNK u cDNA. Nakon sinteze cDNA, za određivanje aktivnosti RNK Polimeraze I koristila sam metodu RT-PCR gdje sam kao kalup za reakciju koristila nastalu cDNA. Pomoću RT-PCR-a određen je izražaj glasničke RNK za 47S pre-rRNK, a izražaj je normaliziran prema količini glasničke RNK za GAPD (engl. *glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase*). Ciklusi reakcije u kojima su zabilježene umnožene cDNA (Ct vrijednosti) prikazani su u **Tablici 9**.

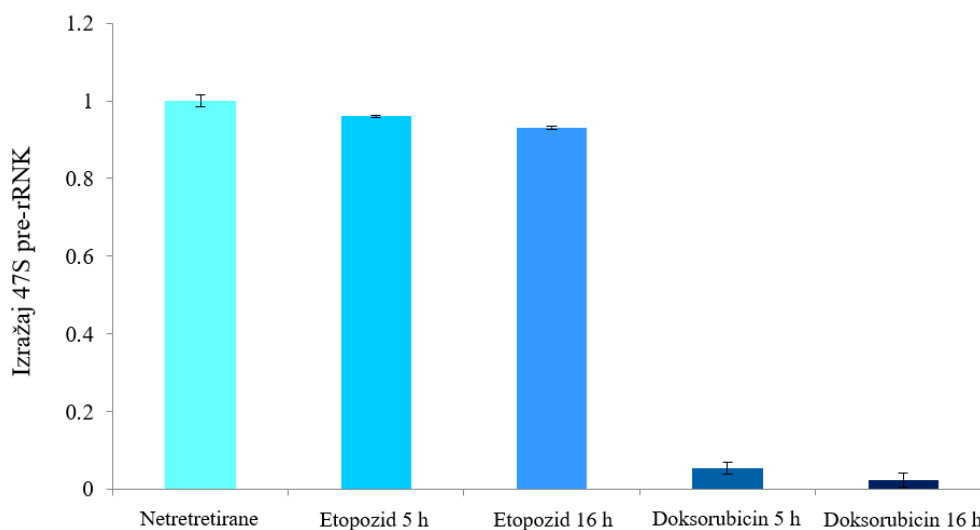
**Tablica 9. Brojevi ciklusa (Ct) u kojima su umnažene cDNA za 47S pre-rRNK i GAPDH pomoću qRT-PCR-a.**

	47S pre-rRNK	Prosječna vrijednost	Standardna pogreška	GAPDH	Prosječna vrijednost	Standardna pogreška
Netretirane	18.7488			14.9699		
	18.7174					
	18.7325	18.7329	0.0157	14.9559	14.9629	0.0099
Etopozid 5 h	18.3489			14.5174		
	18.3512			14.5295		
	18.3560	18.3520	0.0036		14.5235	0.0086
Etopozid 16 h	18.1720					
	18.1700			14.3038		
	18.1650	18.1690	0.0036	14.2872	14.2955	0.0117
Doksorubicin 5 h	22.3287					
	22.3486			14.3583		
	22.3573	22.3449	0.01466	14.3589	14.3586	0.0004
Doksorubicin 16 h	23.2358			14.1445		
	23.2187					
	23.2542	23.2362	0.0178	14.1286	14.1366	0.0112

Za svaki uzorak umnažanje je izvedeno u triplikatima. U tablici 9., prikazane su srednje vrijednosti i standardne pogreške za pojedine uzorke, nakon tretmana stanica s

etopozidom i doksorubicinom. Raspon brojeva ciklusa u kojima su zabilježene amplifikacije za cDNA za 47S rRNK kretao se od 18,16 do 23,25 a za cDNA za GAPDH u rasponu od 14,12 do 14,96.

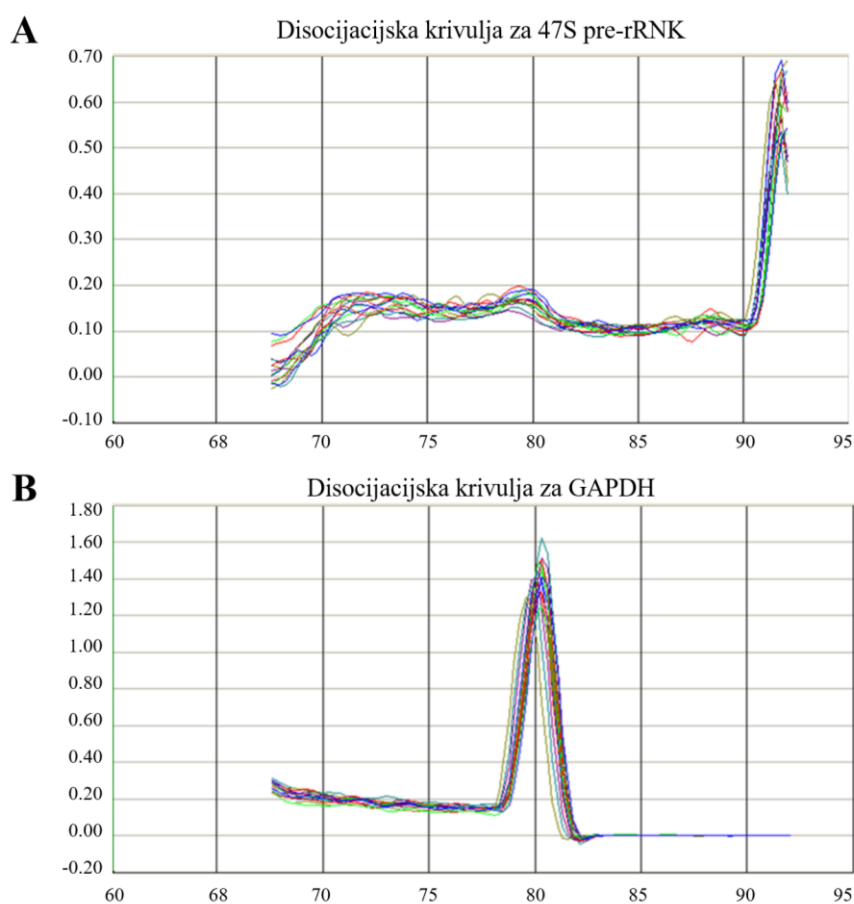
Primjenom relativne kvantifikacije uz upotrebu metode  $\Delta\Delta C_t$  izražena je promjena u količini cDNA za 47S pre-rRNK prema količini cDNA za GAPDH u i u odnosu na netretirane A549 stanice (**slika 13**).



**Slika 13. Izražaj glasničke RNK za 47S pre-rRNK nakon tretmana s etopozidom i doksorubicinom.**

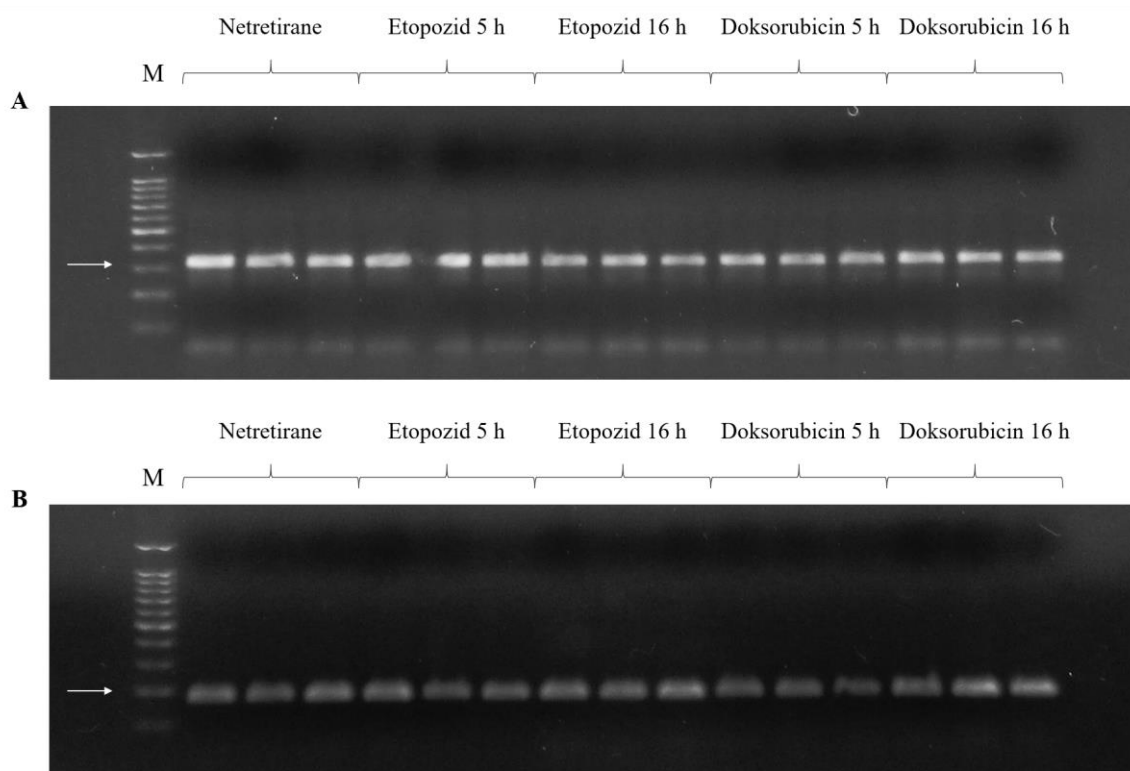
Iz rezultata prikazanih na slici 13., vidljivo je da tretman stanica s doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati inhibira sintezu 47S pre-rRNK. Ti rezultati ukazuju da doksorubicin dovodi do funkcionalnih promjena u jezgri koje su posljedica morfoloških promjena u strukturi jezgri. Te promjene u jezgri, uzrokovane djelovanjem doksorubicina, dovode do inhibicije sinteze ribosoma. Međutim, tretman stanica s etopozidom nema utjecaja na izražaj 47S pre-rRNK kao ni na strukturu jezgri, njegov glavni učinak je inhibicija enzima topoizomeraze II (23).

Kod metode qRT-PCR, signali se dobivaju ugrađivanjem boje SYBR Green u dvolančanu DNK. Prednost i pouzdanost temelje se na nastanku samo jednog produkta na koji se vezuje boja SYBR Green. Disocijacijska krivulja daje informaciju koliko je produkata nastalo primjenom qRT-PCR-a. Jedan pik na disocijacijskoj krivulji određuje nastanak jednog produkta što je i preduvjet pouzdanosti za qRT-PCR metodu (slika 14). Prva derivacija disocijacijskih krivulja svih produkata lančane reakcije polimerazom rezultirala je nastankom jednog pika po reakciji što ukazuje da je u svakoj reakciji nastao samo jedan produkt.



**Slika 14. Disocijacijska krivulja za 47S pre-rRNA (A) i za GAPDH (B).** Prva derivacija disocijacijskih krivulja za amplificirane dijelove komplementarne DNK za 47S pre-rRNA (A) i GAPDH (B).

Nakon određivanja disocijacijske krivulje, nastale produke dodatno sam provjerila elektroforezom na agaroznom gelu (**slika 15**).



**Slika 15. Elektroforeza produkata RT-PCR reakcije za 47S pre-rRNK (A) i GAPDH (B).** Elektroforeza je izvedena na 1,2 %-tnom agaroznom gelu, koji je obojan etidij bromidom. Naneseni su triplikati umnožene cDNA za 47 pre-rRNK (A) i GAPDH (B) te DNK marker čije su veličine pojedinih fragmenata naznačene strelicama.

Iz rezultata prikazanih na slici 16. A i B vidljivo je da je u svim lančanim reakcijama polimerazom nastao jedan produkt.

## 5. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitala sam mehanizme djelovanja protutumorskih lijekova, etopozida i doksorubicina, u liječenju zloćudnih tumora. Humane A549 stanice tretirala sam s 20  $\mu$ M etopozidom te s 1  $\mu$ M doksorubicinom u trajanju 5 i 16 sati. Nakon tretmana stanica s genotoksičnim agensima odredila sam njihov utjecaj na aktivnost RNK polimeraze I, strukturu i funkciju jezgrice te na aktivaciju supresora tumora p53.

Izražaj supresora tumora p53 i njegovog ciljnog gena, p21, odredila sam metodom Western blot. Dobiveni rezultati pokazuju da protutumorski lijekovi, etopozid i doksorubicin, aktiviraju supresor tumora p53, a njegova aktivacija je ključna za zaštitu stanica od zloćudne preobrazbe. Također, tijekom duljeg tretmana stanica s protutumorskim lijekovima, u trajanju od 16 sati, došlo je do aktivacije ciljnog gena supresora tumora, p21. Međutim, tretman u trajanju od 5 sati bio je prekratak za aktivaciju transkripcijskog cilja supresora tumora p53. Naime, tek nakon aktivacije p53 započinje transkripcija njegovih ciljnih gena, stoga je potrebno određeno vrijeme da dođe do njihovog izražaja. Prema tome, mogu zaključiti da je tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom, u trajanju 16 sati, bio dovoljan kako bi supresor tumora p53, putem svojih ciljnih gena, aktivirao specifične biološke odgovore u stanici i omogućio prilagodbu stanice na stres.

Budući da je jezgrica senzor stresa u stanici, ispitala sam učinak etopozida i doksorubicina na strukturu jezgrice metodom imunofluorescencije. Pomoću specifičnih protutijela odredila sam izražaj biljega jezgrice fibrilarina i UBF-a. Dobiveni rezultati pokazuju da doksorubicin dovodi do značajnih morfoloških promjena jezgrice koje se očituju u formiranju nakupina fibrilarina i UBF-a na rubovima oštećene jezgrice. Ti rezultati ukazuju da doksorubicin ima značajnu ulogu na strukturu i funkciju jezgrice. Osim toga, u ovom radu zbog nedostatka protutijela anti-B23 nije testiran utjecaj doksorubicina na izražaj biljega B23. Međutim, etopozid iako dovodi do aktivacije p53, ne mijenja morfologiju jezgrice.



Budući da je jezgrica ključno mjesto sinteze ribosoma i senzor stresa u stanici, u sljedećem koraku odredila sam aktivnost RNK polimeraze I koja je pokazatelj sinteze ribosoma te staničnog rasta. Aktivnost RNK polimeraze I odredila sam metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu određivanjem izražaja primarnog transkripta RNK polimeraze, 47S pre-rRNK. Dobiveni rezultati pokazuju da tretman stanica s doksorubicinom, u trajanju 5 i 16 sati, dovodi do inhibicije izražaja 47S pre-rRNK što kao posljedicu ima inhibiciju sinteze ribosoma. Zaustavljanje sinteze ribosoma i staničnog rasta neophodno je kako bi se onemogućio rast i dioba zloćudno preobraženih stanica. Tretman stanica s etopozidom nije imao utjecaj na izražaj 47S pre-rRNK što ukazuje da ne ometa sintezu ribosoma. Prema tome, doksorubicin uzrokuje morfološke promjene u strukturi jezgrice, dovodi do inhibicije 47S pre-RNK te aktivacije supresora tumora p53 što kao posljedicu ima inhibiciju diobe stanica. Etopozid dovodi do aktivacije p53, ali svoj učinak u zaštiti stanica od zloćudne preobrazbe ostvaruje putem inhibicije enzima topoizomeraze II, a ne putem inhibicije sinteze ribosoma. Stoga, poznavanje mehanizama djelovanja protutumorskih lijekova od velike je važnosti pri izboru ciljane terapije i uspješnom liječenju.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Tretman A549 stanica s etopozidom i doksorubicinom tijekom 5 i 16 sati dovodi do aktivacije supresora tumora p53.
2. Potreban je tretman stanica s etopozidom i doksorubicinom u trajanju od 16 sati kako bi se omogućila potpuna aktivacija transkripcijskog cilja p53, p21.
3. Doksorubicin dovodi do morfoloških promjena u strukturi jezgrice koje se očituju nakupinama fibrilarina i UBF-a na rubovima oštećene jezgrice.
4. Etopozid ne uzrokuje morfološke promjene jezgrice.
5. Tretman A549 stanica s doksorubicinom, u trajanju 5 i 16 sati, dovodi do inhibicije izražaja 47S pre-rRNK što dovodi do inhibicije sinteze ribosoma.
6. Tretman stanica s etopozidom, u trajanju 5 i 16 sati, nema utjecaja na izražaj 47S pre-rRNK.

## 7. LITERATURA

1. Cooper G.M., Hausmann R.E. Stanica: molekularni pristup. Peto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. 9-10, 45, 50-51, 263-264, 311, 313-324, 368-369, 376-379.
2. Wikipedia. Ribosom. Dostupno na: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Ribosom>
3. Pelletier J., Thomas G., Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature reviews, Cancer*. 2018; 18 (1): 51-63.
4. Jacob S. T. Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochem Journal*. 1995; 306: 617–626.
5. Mahoney S. J., Dempsey J. M., Blenis J. Cell Signaling in Protein Synthesis: Ribosome Biogenesis and Translation Initiation and Elongation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2009; 90: 53-107.
6. Raška I., Koberna K., Malínský J. i sur. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*. 2004; 96(8) : 579–594.
7. Wikipedia. MAPK/ERK pathway. Dostupno na: [https://en.wikipedia.org/wiki/MAPK/ERK\\_pathway](https://en.wikipedia.org/wiki/MAPK/ERK_pathway)
8. McCain J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *Pharmacy and Therapeutics*. 2013. 38(2): 96-108.
9. Hannan K. M., Sanij E., Hein N. i sur. Signaling to the Ribosome in Cancer: It Is More Than Just mTORC1. *IUBMB Life*. 2011; 63(2): 79–85.
10. R&D systems. MAPK Signaling Pathway: Mitogen Stimulation Pathway. Dostupno na: <https://www.rndsystems.com/pathways/mapk-signaling-mitogen-stimulation-pathway>
11. O'Day D. H., Catalano A. The Nucleolus: From Its Formation to the Future. O'Day D. H., A. Catalano, editors. *Proteins of the Nucleolus: Regulation, Translocation, & Biomedical Functions*. Springer. 2013; 361-365.

12. 11. O'Day D. H., Catalano A. Proteins of the Nucleolus: An Introduction. O'Day D. H., A. Catalano, editors. Proteins of the Nucleolus: Regulation, Translocation, & Biomedical Functions. Springer. 2013; 3-15.
13. Krstulja M., Đorđević G., Seili-Bekafigo I. i sur. Deskriptivna i funkcionalna definicija jezgrice: put prema terapiji raka. Medicina fluminensis. 2016; 3(52): 283-300.
14. Nalabothula N., Indig F. E., Carrier F. The Nucleolus Takes Control of Protein Trafficking Under Cellular Stress. Molecular and Cellular Pharmacology. 2010; 2(5): 203-212.
15. Martin R. M., Ter-Avetisyan G., Herce H. D. i sur. Principles of protein targeting to the nucleolus. Nucleus. 2015. 4(6): 314-325.
16. Liu Q. R., Chan P.K. Characterization of seven processed pseudogenes of nucleophosmin/B23 in the human genome. DNA Cell Biology. 2009; 2(12): 149-156.
17. Srivastava M., McBride O. W., Fleming P. J. i sur. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene, Journal of Biological Chemistry. 1990; 265(25): 14922-14931.
18. Lindström M. S. NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochemistry Research International. 2011;2011: 1-16.
19. Amin M. A., Matsunaga S., Ma N. i sur. Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. Biochemical and biophysical research communications. 2007; 360(2): 320-326
20. Wikipedia. Fibrillarin. Dostupno na <https://en.wikipedia.org/wiki/Fibrillarin>
21. Lindström M. S., Latonen L. The Nucleolus as a Stress Response Organelle. O'Day D. H., Catalano A, editors. Proteins of the Nucleolus: Regulation, Translocation, & Biomedical Functions. Springer. 2013; 251-273.
22. Šamija M. i sur. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. 1, 16-21, 26-29.

23. Vrdoljak E., Šamija M., Kusić Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. 1-10, 147, 149, 150.
24. Simabuco F. M., Morale M. G., Pavan I. C. B. i sur. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget*. 2018; 9(34): 23780–23823.
25. Meek D. W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical Journal*. 2015; 469(3): 325–346
26. Zorić A., Horvat A., Slade N. Obitelj gena p53: Uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina fluminensis*. 2010; 2(46): 135-143.
27. Bunz F., Dutriax A., Lengauer C. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998; 282(5393): 1497-1501.
28. He G., Siddik Z. H., Huang Z. i sur. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*. 2005; 24(18):2929-2943.
29. Žlender V. Apoptoza: Programirana smrt stanice. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2004; 4(54): 267-274.
30. Pažur K. Tumor supresorski gen p53 [seminarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet; 2011.
31. Goh A. M., Xue Y., Leushacke M. i sur. Mutant p53 accumulates in cycling and proliferating cells in the normal tissues of p53 R172H mutant mice. *Oncotarget*. 2015; 6(20): 17968-17980.
32. Boyd M. T., Vlatković N., Rubbi C. P. The nucleolus directly regulates p53 export and degradation. *The Journal of cell biology*. 2011; 194(5): 689–703.
33. Biderman L., Manley J. L., Prives C. Mdm2 and MdmX as regulators of gene expression. *Genes Cancer*. 2012; 3(3-4): 264–273.
34. Bouska A., Eischen C. M. Murine double minute 2: p53-independent roads lead to genome instability or death. *Trends in biochemical sciences*. 2009; 34(6): 279-286.

35. Brooks C. L., Gu W. New insights into p53 activation. *Cell Research*. 2010; 20(6): 614-621.
36. Reed S. M., Quelle D. E. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)*. 2015; 7(1): 30–69.
37. Gannon H. S., Woda B. A., Jones S. N. ATM phosphorylation of Mdm2 Ser394 regulates the amplitude and duration of the DNA damage response in mice. *Cancer Cell*. 2012; 21(5): 668–679.
38. Cheng Q., Cross B., Li B. i sur. Regulation of MDM2 E3 ligase activity by phosphorylation after DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 2011; 31(24): 4951-4963.
39. Miliani de Marval P. L., Zhang Y. The RP–Mdm2–p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget*. 2011; 2(3): 234–238.
40. Zhou X., Liao J.-M., Liao W.-J., Lu H. Scission of the p53-MDM2 Loop by Ribosomal Proteins. *Genes & Cancer*. 2012; 3(3-4): 298-310.
41. Li X., Gilkes D., Li B. i sur. Abnormal MDMX degradation in tumor cells due to ARF deficiency. *Oncogene*. 2012; 31(32): 3721-3732.
42. Cheok C. F., Verma C. S., Baselga J. i sur. Translating p53 into the clinic. *Nature reviews. Clinical oncology*. 2011; 8(1): 25-37.
43. Kiralj R., Pongrac M., Puharić Z. i sur. Primjena citostatika: Učinkovitost i štetnost. Bjelovar: Visoka tehnička škola Bjelovar, Stručni studij sestrinstva. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2017; 50(13): 96-105.
44. Roganović J. Kemoterapija: Moderni lijekovi pobjeđuju rak. Dostupno na: <http://www.zzjzpgz.hr/nzl/27/kemo.htm>
45. Stipić M. Rak dojke i sestrinska skrb [završni rad]. Bjelovar: Veleučilište u Bjelovaru, Stručni studij sestrinstva; 2017.

46. Moj farmaceut. Kemoterapija-kemoterapeutici. Dostupno na:  
<http://mojfarmaceut.com/magazin.php?naslov=hemoterapija%E2%80%93hemoterapeutici>
47. Wikipedia. Mitotički inhibitor. Dostupno na:  
[https://sh.wikipedia.org/wiki/Mitoti%C4%8Dki\\_inhibitor](https://sh.wikipedia.org/wiki/Mitoti%C4%8Dki_inhibitor)
48. Wikipedia. Inhibitori topoizomeraze. Dostupno na:  
[https://sh.wikipedia.org/wiki/Inhibitori\\_topoizomeraze](https://sh.wikipedia.org/wiki/Inhibitori_topoizomeraze)
49. Hanžić N. Novi lijekovi u kemoterapiji tumora [seminarski rad]. Zagreb: Preddiplomski studij molekularne biologije. 2010.
50. Akporiaye E. T., Aminoff M. J., Basbaum A. I. Temeljna i klinička farmakologija, 11. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada. 2011; 939.

## ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime/Prezime

**Lalita Barišić**

Nacionalnost

Hrvatica

Datum rođenja

28. lipnja 1994.

Spol

Žensko

E-mail

barisic.lalita@gmail.com

Address

Njivi 12, 51215 Kastav, Hrvatska

Telefonski broj

+385 (0) 51/224-393

Mobitel +385 (0) 91 344 18 85



### Obrazovanje

2016. – Danas

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci**

Diplomski sveučilišni studij Sanitaro inženjerstvo  
Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka, Hrvatska

2013. – 2016.

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci**

Preddiplomski sveučilišni studij Sanitaro inženjerstvo  
Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka, Hrvatska

2009. – 2013.

**Medicinska škola u Rijeci**

Farmaceutski tehničar  
Ljudevita Gaja 1, 51000 Rijeka, Hrvatska

2001. – 2009.

**Osnovna Waldorfska škola Rijeka**

Zametska 6, 51000 Rijeka, Hrvatska

### Osobne vještine i kompetencije

Materinski jezik

**Hrvatski**

Ostali jezici (Samoprocjena)

**Engleski**

Iskusna korisnica

**Njemački**

Početna korisnica

**Socijalne vještine**

- Komunikativnost, ambicioznost, pedantnost, optimizam
- Sklonost timskom radu

**Organizacijske vještine**

- Dobra organiziranost
- 2018. - Članica organizacijskog odbora 1. studentskog kongresa zaštite zdravlja „Sanitas 2018.”

**Sudjelovanje na kongresima**

- 2018. „ISC GREEN 2018.” (Osijek) – aktivna sudionica
- 2018. „Sanitas 2018.” (Rijeka) – aktivna sudionica
- 2016. „MEDRI znanstveni PIKNIK” (Rijeka) – aktivna sudionica

**Računalne vještine i sposobnosti**

- Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)

**Vozačka dozvola**

- **B kategorija**

### Radno iskustvo

**Studentski centar Rijeka**

**Unutarnja kontrola**

Radmile Matejčić 5

51000 Rijeka, Hrvatska

(Svibanj 2017 – Svibanj 2018)

- Kontrola higijene
- Kontrola HACCP-a