

Hrvoje Knežević

**Inhibicija proteina toplinskog stresa Hsp90
pomoću male interferirajuće RNA**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jerke Dumić.

Zahvalio bih se mentorici prof. dr. sc. Jerki Dumić jer je prihvatila biti mentor mog diplomskog rada za kojeg smatram da se bavi iznimno interesantnom problematikom.

Zahvalio bih se, također i kolegici Tamari Zorbaz, mag. med. biochem. na strpljenju i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

POPIS KRATICA

ADP – adenzin difosfat (*eng.* adenosine diphosphate)

ATP – adenzin trifosfat (*eng.* adenosine triphosphate)

BCA – bicinkoninična kiselina (*eng.* biconchonic acid)

BSA – albumin goveđeg seruma (*eng.* bovine serum albumin)

CAK – Cdk-aktivirajuća kinaza (*eng.* CDK-activating kinase)

Cdk – ciklin-ovisna kinaza (*eng.* Cyclin-dependent kinase)

CdkI – inhibitor ciklin-ovisnih kinaza (*eng.* Cyclin-dependent kinase Inhibitor)

17-DMAG – 17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoksigeldanamincin

FBS – fetalni teleći serum (*eng.* fetal bovine serum)

HRP – peroksidaza iz hrena (*eng.* horseradish peroxidase)

HSF-1 – faktor toplinskog šoka (*eng.* heat shock factor-1)

Hsp – proteini toplinskog šoka (*eng.* heat shock proteins)

NF- κ B – jezgreni čimbenik kappa B (*eng.* nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

RIP – protein za interakciju s receptorom (*eng.* receptor interaction protein)

RISC - RNA-induciran stišavajući kompleks (*eng.* RNA-induced silencing complex)

PVDF – poliviniliden fluorid

TBS – Tris pufer (*eng.* Tris-buffered saline)

TBST – TBS uz dodatak Tween-a (*eng.* Tris-buffered saline-Tween)

TNF α - faktor tumorske nekroze alfa (*eng.* tumor necrosis factor alpha)

SDS – natrij dodecil sulfat (*eng.* sodium dodecyl sulfate)

siRNA – kratka ometajuća RNA (*eng.* short interfering RNA)

SDS-PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz SDS (*eng.* sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis)

sHsp – mali proteini toplinskog šoka (*eng.* small Heat shock proteins)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Proteini toplinskog stresa (<i>eng.</i> Heat shock proteins, Hsp).....	1
1.2. Ciklini i ciklin ovisne kinaze.....	10
1.3. Inhibitori Hsp 90 proteina.....	14
1.3.1. RNA interferencija.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37
7. SAŽETAK/SUMMARY	41
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	43

1. UVOD

1.1. Proteini toplinskog stresa (*eng.* Heat shock proteins, Hsp)

Proteini toplinskog stresa (*eng.* Heat shock proteins, Hsp) su ubikvintarna skupina proteina koja se može naći u svakoj stanici od dosad brojnih proučenih organizama. Različite vrste stresa, uključujući i toplinski stres induciraju ekspresiju gena koje nazivamo genima proteina toplinskog stresa koji su prvi put otkriveni u žlijezdama slinovnicama voćne muhe *Drosophila melanogaster*. DNA slijed koji kodira za ovu obitelj gena evolucijski je visoko očuvan između brojnih vrsta.

Premda su otkriveni pri izlaganju stanica toplinskom stresu, njihov udio u ukupnoj količini proteina u stanicama raste i pri drugim vrstama stresa: hipoksiji, ishemiji, u prisutnosti teških metala, etanola, nikotina, kirurške ozljede, virusne infekcije zbog čega bismo ih praktički mogli zvati samo "stresnim proteinima". Brojne protektivne uloge dokazane su u *in vivo* eksperimentalnim modelima za proučavanje srčane ishemije, arterijskih oštećenja, endotoksičnog šoka, bubrežne i jetrene ishemije, želučanih ulceracija induciranih etanolom, starenju, febrilnosti, reperfuziji ishemije skeletnih mišića, autoimunih poremećaja i malignim bolestima (Whitley i sur., 1999; Garrido i sur., 2007). Ključna uloga proteina toplinskog stresa je ta da imaju ulogu u formiranju trodimenzionalne tercijarne strukture aminokiselinskih sljedova poslije translacije glasničke RNA osiguravajući pravilnu funkciju proteina zbog postizanja odgovarajuće konformacije. Oni također, pomažu u popravku denaturiranih proteina i promoviraju njihovu degradaciju nakon stresa i ozljede zbog čega se zovu i molekulskim "skrbiteljima" tj. molekulskim šaperonima (*eng.* chaperone). Premda ovisno o patofiziološkom kontekstu, smatra se da imaju uglavnom protektivnu funkciju.

Proteini toplinskog stresa su kodirani velikim brojem gena, a podijeljeni su obzirom na molekulsku masu koja je u rasponu od 8-150 kDa na temelju čega su dobili i nazive. Jedna od najvećih je obitelj šaperona Hsp90 od 90 kDa, pa Hsp70 od 70 kDa itd. Neke od ostalih obitelji su još i Hsp60, Hsp40 i mali proteini toplinskog stresa sHsp (*eng.* small Heat shock proteins).

Inaktivni, proteini toplinskog stresa su monomeri, a aktivni oni se udružuju u oligomere i mogu vezati promotorsko mjesto gena Hsp proteina i inicirati njihovu transkripciju i translaciju (Whitley i sur. 1999). Hsp proteini djeluju vežući se za hidrofobnu površinu ne-

nativnog proteina nekovalentnim interakcijama, a oslobađanje od pravilno smotanog proteina vrši se uz hidrolizu ATP-a kataliziranom pomoću njihove ATP-azne regije.

Postoji i druga vrsta šaperona, tzv. šaperonini koji također, pomažu u pravilnom smatanju proteina. Različiti šaperonski sustavi zajedno stupajući u međusobne interakcije surađuju u pravilnom smatanju proteina i sprječavanju njihove ireverzibilne agregacije s drugim proteinima što je povezano s razvitkom različitih fizioloških, patofizioloških i drugih posljedica kao što su starenje i neurodegenerativne bolesti. Kao uzrok ovih poremećaja, prirodno uspostavljen balans između supstrata Hsp proteina i njihovih košaperona će biti poremećen što potencijalno ima snažne posljedice na fenotip stanice.

Unatoč tome, promjene u razini aktivnosti šaperona i košaperona mogle bi rezultirati novom kombinacijom različitih Hsp proteina koji će u konačnici drugačije preusmjeriti intramolekulski signal i promijeniti ukupan odgovor na početni signal. Kao primjer možemo uzeti negativnu promjenu u ekspresiji proteina Hsp90 u već spomenutom organizmu *Drosophila melanogaster* uz ekspresijski inhibitorne mutacije Hsp70 proteina čija se ekspresija kompenzatorno povećala, imaju teže posljedice nego samo promjena u razini košaperona specifičnog za određen supstrat. Primjer za to je košaperon Cdc37 koji ulazi u interakcije sa staničnim kinazama (Morimoto, 2002; Slavotinek, 2001).

Šaperoni djeluju i u regulaciji translokacije odgovarajuće konformacije proteina kroz stanične odjeljke te mogu sudjelovati i u degradaciji pogrešno smotanih proteina olakšavajući vezanje takvih, stanici štetnih proteina, za E3 ubikvintin ligazu te posljedično ubikvintinilaciju te usmjeravanje takvih proteina ka razgradnji prema proteasomima.

Premda konačan broj ljudskih šaperona i šaperonina još nije poznat, prema rezultatima Projekta ljudskog genoma smatra se da je više od 750 eukariotskih proteina uključeno u smatanje proteina i njihovu degradaciju (Slavotinek, 2001). Ime, karakteristike strukture, položaj u stanici te najosnovnije uloge nekih proteina toplinskog stresa u eukariota (šaperona i šaperonina) prikazane su sumarno u Tablici 1.

Tablica 1. Proteini toplinskog stresa, karakteristike i uloge.

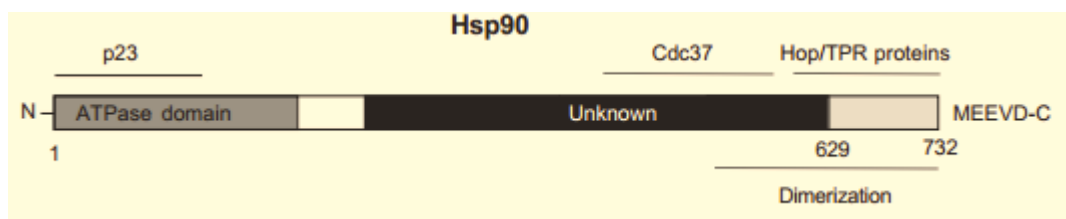
Šaperoni i Šaperonini	Masa (kDa)	Stanični Odjeljak	Struktura	Uloga	U interakciji
Hsp90 α i β , TRAP1	90	C, ER	Dimer uz α helikse i β nabrane ploče	Hormonski odgovor, transdukcija signala, apoptoza, odgovori na stres	Hsp 70, Hsp 40
Hsp70, Hsc70, Bip, Mhsp70	70	C, M, ER	N i C terminalne domene	Inducibilan visokim stresom, transdukcija signala	Hip, Hop, GrpE
Hsp60	60	M	-	Molekulski šaperon	-
Hsp40	40	C, M, ER	2 heliksa	-	Hsp 70, Hsc 73
Hsp 20-Hsp30	20-30	C, N	-	Regulacija citoskeleta, usmjeravanje st. migracije	-
Mali Hsp	12-43	C	Oligomeri, α -kristalininska domena	Defekti njihovih gena uzrokuju različite bolesti	Hsp 70
Hsp60-Hsp10 šaperonini	57	M	Dva heptamerska prstena	Prevenција proteinske agregacije, pomoć u njihovom slaganju	GimC
TCP-1 šaperonini	55	C, J	Okta/nonamerni prstenovi, heteromerni	-	-

Hsp proteini su koevoluirali kao integralne komponente mreže signalne transdukcije gdje sudjeluju u funkciji, sazrijevanju, aktivaciji i inaktivaciji signalnih molekula. Buduće studije u sustavima višestaničnih modela će u većoj mjeri pomoći rasvijetliti važnu ulogu ovih proteina kao molekulskih šaperona u razvitku organizma, razvitka bolesti i njihova odgovora na promijenjenu razinu šaperona i košaperona povezanim s fluktuirajućim okolišnim uvjetima i bolesti (Morimoto, 2002). Obzirom na temu ovog rada, potrebno je naglasiti da su Hsp proteini također uključeni u razvoj tumora i zaštitu stanice od apoptoze te tako mogu inducirati neželjenu rezistenciju na lijekove (Asea i Pedersen, 2010).

1.1.1. Hsp90 šaperoni

Hsp 90 je fosforilirani homodimer koji može kovalentno vezati molekule fosfata na oba monomera (Goetz i sur., 2003) i koji se sastoji od dviju visoko konzerviranih domena od 25 i 50 kDa lociranim na C i N krajevima, a povezanim visoko nabijenom poveznicom. Domena na N kraju ima ATP-aznu aktivnost i odgovorna je za njegovu ulogu molekuskog šaperona tj.

za vezanje supstrata (Slika1). Vezanje ATP-a na mjestu blizu N-kraja mijenja konformaciju proteina Hsp90 i utječe na mogućnost njegove interakcije s proteinima klijentima i košaperonima. Drugo aktivno mjesto za vezanje nukleotida nalazi se na C kraju i smatra se ključnim u dimerizaciji Hsp90 proteina tj. postavljanje u aktivnu konformaciju i vezanje faktora p60i imunofilina. Postoje dvije izoforme proteina Hsp90, α i β izoforme koje pokazuju visoku homologiju u strukturi i bez posebnih razlika u njihovoj aktivnosti, a njihov udio u citosolu iznosi 1-2% te se može povećati stresom do 4-6% ukupnih proteina citosola (Goetz i sur., 2003).



Slika 1. Struktura Hsp90 proteina.

Premda postoji velik broj poznatih proteina koji se s ciljem prijenosa određenog signala vežu za Hsp90, sam proces vezanja je proučen za tek za dio ovih proteina koje nazivamo proteinima klijentima, a kao model koristi se vezanje Hsp90 za progesteronske receptore.

Ono započinje uz inicijalno prepoznavanje i vezanje Hsp70 i Hsp40 kao košaperona uz potrošnju ATP-a od strane Hsp70. Nakon toga slijedi regrutacija HIP i p60/Hop koji pomažu vezanje Hsp90. U konačnom koraku slijedi gubitak većine Hsp70, Hip, p60/Hop i regrutiranje dva p23 i jednog imunofilina što rezultira interakcijom Hsp90 s ATP-om uz nastanak visokoselektivnog mjesta za vezanje progesterona.

Razine proteina Hsp90 su regulirane djelomično vezanjem faktora toplinskog stresa HSF-1 (*eng.* Heat Shock Factor), transkripcijskog faktora koji je normalno vezan za Hsp90 kada je inaktivan. Uz stres, on se odvaja, bude fosforiliran proteinskim kinazama i formira trimere koji ulaze u jezgru kako bi vezali elemente toplinskog stresa na promotorskoj regiji Hsp90 gena i drugih Hsp gena. Nakon daljnje fosforilacije HSF, Hsp90 mRNA poslije transkripcije napušta jezgru i odlazi u citosol gdje se translatira u novi Hsp90 kompleks.

Interakcijom šaperona Hsp90 zasada uključuje oko 200 proteina i njihov broj s novim otkrićima konstantno raste te tako dodatno otežava postojeće koncepte i sugerira nove hipoteze u selektivnosti proteina Hsp90 (Tsaytler i sur., 2009). Inhibitori Hsp90 bi mogli onemogućiti djelovanje ovog šaperona što bi njegove proteine klijente usmjerilo na razgradnju proteasomskim sustavom uz zaustavljanje staničnog ciklusa i poticanje diferencijacije stanica (Wang i sur., 2009).

Hsp90 se dakle udružuje s nizom signalnih proteina, uključujući ligand-ovisne transkripcijske faktore kao i spomenute steroidne receptore ili Myo D, zatim tirozin kinaze poput v-Src i serin/treoninske kinaze kao što je Raf-1 itd. Glavna šaperonska uloga je, ako što je već rečeno da promovira konformacijsko sazrijevanje ovih receptora i signal-prijenosnih kinaza (Garrido i sur., 1999).

Hsp90 proteini klijenti se općenito mogu podijeliti u tri kategorije: (Goetz i sur., 2003)

1. proteinske kinaze (Her-2, Akt-kinaza, transformirajući protein Rous virusa sarkoma, Cdk4/ciklinD kompleks povezan s progresijom kroz G1 fazu, Raf-1 kinaza, P210 protein Abeldardovog protoonkogeno i dr.);
2. transkripcijske faktore/polimeraze (receptori steroidnih hormona, mutirani p53, hipoksijom inducirani faktor 1 α)
3. skupina ostalih klijenata.

Vrlo važan put staničnog preživljavanja u koji Hsp90 može biti uključen je put preko p53. Dokazano je da p53 potiskuje ekspresiju gena koji kodiraju za Hsp90 α u stanicama poslije UV zračenja (Morimoto, 2002). Jedna od ključnih uloga proteina p53 je zaustavljanje staničnog ciklusa sisavaca u kontrolnoj G1 točki. Fosforilacija pomoću proteina ATM i Chk2 ga stabilizira što ujedno povećava razinu p53 u odgovoru na razinu oštećenja DNA. Protein p53 zatim aktivira transkripciju gena koji kodira p21, inhibitor ciklin-ovisne kinaze, Cdk, (*eng.* Cyclin-dependent kinase) što vodi ka inhibiciji kompleksa Cdk2/ciklin E i zaustavlja stanični ciklus u G1 fazi (Cooper i Hausmann, 2010).

Hsp90 proteini također mogu i zaštititi stanicu od apoptoze inhibirajući akciju kalcij-ovisnih proteaza: kalpaina. Protein iz obitelji Hsp90, Grp94 pokida kalpain kako bi zaštitio ljudske stanice neuroblastoma od apoptoze induciranom stresom hipoksije/reoksigenacije.

Pokazano je da Hsp90 sudjeluje i u stabilizaciji proteina za interakciju za receptore, RIP (*eng.* Receptor Interaction Protein). Nakon ligacije TNFR-1, RIP-1 je regrutiran prema receptoru promovirajući aktivaciju transkripcijskih faktora NF- κ B i JNK. Degradacija RIP-1 u odsutnosti Hsp90 isključuje aktivaciju NF- κ B puta preko faktora tumorske nekroze TNF α i senzibilizira stanice ka apoptozi. Drugi signalni put kojim Hsp90 može povećati NF- κ B aktivnost preživljavanja je preko IKK kompleksa. Ovaj se kompleks sastoji od 2 katalitičke i jedne regulatorne podjedinice. Određeno je da su Hsp90 i Cdc37 također prisutni uz asocijaciju potpomognutu interakcijama s kinaznom domenom katalitičkih podjedinica (Garrido i sur., 2007).

Od dosad poznatih protoonkogeno, C-myc protoonkogen direktno aktivira transkripciju Hsp90 proteina u različitim modelima tumorskih stanica. Hsp90 ovdje ima i ulogu u podupiranju polimorfizama i mutacija koje su zaslužne za "evoluciju" rezistentnih staničnih klonova. Ovaj šaperon stabilizira i konformaciju mutantnih proteina koji nastanu zbog transformacija Bcr-Abl i p53 (Morimoto, 2002).

Jedna od zajedničkih karakteristika različitih vrsta raka je zakazivanje funkcije sustava regulacije staničnog ciklusa, pogotovo pogreška u točki G2/M. S ciljem boljeg razjašnjavanja tog problema, a vezanog uz proteine toplinskog stresa, utvrđeno je da je regulacija baš te točke usko povezana sa asocijacijom Hsp90 proteina s proteinima klijentima Chk1, Cdk1, Wee1, Myt1, Plk1, ciklinom B, ali i brojnim drugim ciklin-ovisnim kinazama kroz regulaciju stabilnosti njihove strukture (Wang i sur., 2009). Hsp90 je zato pretjerano eksprimiran u tumorima dojke, tumoru pluća, leukemijama, Hodgkinovoj bolesti i u B stanicama non-Hodgkinovog limfoma. Konkretno, u tumoru dojke, poznato je da pretjerana ekspresija Hsp90 kao i Hsp70 korelira s lošom prognozom (Morimoto, 2002).

Zaključno rečeno, možemo reći da je vrlo mnogo proteina klijenata Hsp90 uključeno u staničnu signalizaciju, proliferaciju i preživljavanje te je Hsp 90 potencijalna meta za protutumorsku terapiju. Neki od navedenih proteina klijenata Hsp90 prikazani su u Tablici 2.

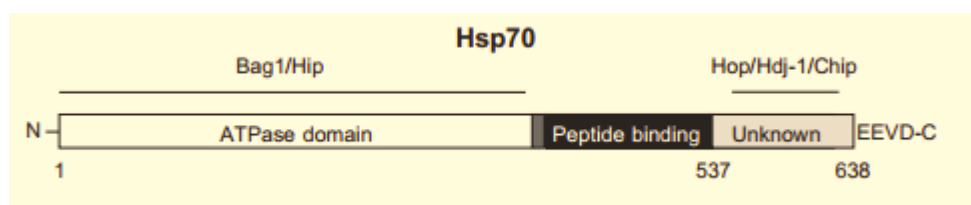
Za ovaj rad najvažnija će biti je interakcija Hsp90 proteina u aktivaciji ciklin-ovisnih kinaza 1 i 2 čija će uloga u kontroli staničnog ciklusa bit razmotrena u kasnijem poglavlju.

Tablica 2. Prikaz osnovnih ko-šaperona proteina Hsp90, njihovih proteina klijenata i funkcija:

Stanična funkcija	Košaperon	Protein klijent
Prevođenje signala	Cdc37	Kinaze
Hormonski odgovor	PP5 imunofilin CYP 40 FKBP52	glukokortikoidni receptori hormonski receptori estrogenski receptori steroidni receptori
Stanična smrt	-	Apaf-1
Odgovor na stres	-	HSF-1
Sastavljanje kompleksa	p23, Hop	Šaperonski kompleks

1.1.2. Hsp70 šaperoni

Proteini porodice Hsp70 su također važan dio stanične mreže molekularnih šaperona za smatanje proteina. Dijelimo ih na konstitutivne (Hsc70) i inducibilne (iHsp70) izoforme. Regulacija povratnom spregom ekspresijom iHsp70 proteina pomaže održavanju ukupnog Hsp70 na razini potrebnoj za potrebe njegove šaperonske funkcije (Tutar i sur., 2005). Ovi proteini sastoje se od visokokonzerviranih N-terminalnih ATP-aznih domena od 45 kDa i C-terminalne supstrat-vezajuće domene od oko 25 kDa (Slika 2) koja je dalje podijeljena na β -sendvič poddomenu od 15 kDa i C-terminalne α -helikalne subdomene. ATP-azna domena se sastoji od dvije velike globularne poddomene, obje dalje podijeljene u dvije manje poddomene. Ove poddomene su odijeljene dubokim razdjeljkom na čijem dnu se nukleotidi vežu u kompleks s jednim ionom magnezija i dva iona kalija koji povezuju sve 4 poddomene.



Slika 2. Struktura Hsp70 proteina.

Molekulska kaskada započinje kad protein Hip veže ATP-aznu domenu i povećava šaperonsku aktivnost Hsp70 vežući se kada je vezan i ADP što ujedno predstavlja stanje u kojem je za Hsp70 vezan i supstrat. S druge strane Bag1, inhibira šaperonsku aktivnost Hsp70 ubrzavajući

nukleotidnu izmjenu supstrata koje posljedično prerano otpušta ne-smotan tj. "ne popravljen" supstrat (Morimoto, 2002). Podjelu važnijih košaperona proteina Hsp70 uz njihove funkcije i molekule na koje djeluju možemo vidjeti u Tablici 3.

Tablica 3. Sumarni prikaz košaperona Hsp70 proteina i njihovih interakcijskih partnera.

Stanična funkcija	Košaperon	Ciljni protein
Prevođenje signala	Bag1	Raf-1 kinaza i receptor za faktore rasta
Hormonski odgovor	Bag1 Hip	Hormonski receptori Steroidni receptori
Stanična smrt	Bag1 -	Bcl-2 Apaf-1
Odgovor na stres	-	HSF-1
Sastavljanje kompleksa	Hop, Hdj-1	Šaperonski kompleks

Hsp70 također, kao i proteini Hsp90 pomaže u raznim vrstama smatanja proteina kroz prolazno vezanje njihove domene za supstrat s kratkim hidrofobnim peptidnim segmentom unutar njegovih proteina klijenata. Ciklus vezanja klijenta i otpuštanja vođen je promjenom Hsp70 proteina između nisko-afinitetnog ATP vezanog stanja i visoko afinitetnog ADP vezanog stanja *in vitro* i *in vivo* (Mayer i Bukau, 2004). Ovaj ciklus je potpomognut košaperonima obitelji proteina s J-domenom koji pomaže u usmjeravanju Hsp70 proteina ka klijentima i koji ih štiti od intermolekulskih interakcija (uloga "držača") te koji kroz faktore zamjene nukleotida određuje poluživot kompleksa Hsp70-klijent.

Spomenuti dodatni košaperoni fino kontroliraju ovaj ciklus: npr. Hsp40 koordinira hidrolizu ATP-a s vezanjem za supstrat (Tutar i sur., 2009). Za neke druge specifične zadatke, Hsp70 ciklus je povezan s akcijom drugih košaperona: Hsp90 i Hsp110.

Ukupna funkcija proteina Hsp70 u smatanju ne-nativnih proteina može biti podijeljena u tri povezane uloge: prevencija agregacije, promocija slaganja u nativno stanje, solubilizacija i preslagivanje agregiranih proteina (Mayer i Bukau, 2004). U brojnim tumorskim stanicama razine Hsp70 koreliraju s povećanom malignošću i rezistencijom na terapiju.

Neki od proteina klijenata čija je aktivnost kontrolirana kroz interakciju s proteinima Hsp70 su nuklearni receptori (receptori za steroidne hormone), kinaze (Raf, eIF2 α -kinaze, za ovaj rad bitni ciklin B1/Cdk1) i transkripcijski faktori (HSF, c-Myc, pRb) (Mayer i Bukau, 2004).

1.1.3. Hsp27 šaperoni

Hsp27 šaperoni spadaju u skupinu malih proteina toplinskog stresa (sHsp) mase 12-43 kDa. Oni nemaju vezno mjesto za ATP, no također nekim zasad nepoznatim mehanizmom utječu na strukturu i interakciju s proteinom klijentom. Mali proteini toplinskog stresa također mogu stupati u parcijalne interakcije sa denaturiranim proteinima, prevenirati njihovu agregaciju i u određenim okolnostima prenijeti parcijalno denaturirane supstrateka šaperonima koji posjeduju punu ATP-aznu aktivnost.

U strukturi imaju veoma evolucijski očuvanu tzv. α -kristalinsku domenu s 80-100 aminokiselina duž C-terminalnog kraja (Gusev i sur., 2009). Ova domena sastoji se od α A i α B kristalinskih podjedinica, a mutacije u genima koji kodiraju za ove podjedinice uzrokuju bolesti kao što su miopatije skeletnih mišića i srčanog mišića povezanih s nemogućnošću agregacije mišićnih filamenata (Slavotinek, 2001). Homologija ovih domena varira od 20% kod međusobno udaljenih članova obitelji malih proteina toplinskog stresa izoliranih iz bakterija i sisavaca do 60% između bliskih članova ove obitelji izoliranih iz tkiva sisavaca. Proteini sHsp obitelji obično formiraju velike funkcionalne oligomerne komplekse (Gusev i sur., 2001).

Hsp27 je ATP-neovisan šaperon koji posjeduje antiapoptozna svojstva kroz različite signalne puteve uključujući i direktnu interakciju s citokromom c prevenirajući formiranje apoptosoma i to nakon što je citokrom c oslobođen iz mitohondrija. Povećana ekspresija Hsp27 također povećava degradaciju ubikvitiniliranih proteina pomoću proteasoma 26S in vitro i in vivo u odgovoru na stresne stimulanse kao što su protutumorski lijekovi (npr. etopozid) i TNF α . U ovom slučaju, u ubikvintin-proteasomski put uključena je aktivacija transkripcijskog faktora NF- κ B uz smanjenje aktivnosti svog glavnog inhibitora, I- κ B α njegovom razgradnjom proteasomom aktiviranim Hsp27 proteinom. Ovaj signalni put započinje povećanom ekspresijom Hsp27 jer on povećava NF- κ B nuklearnu relokalizaciju, vezanje za DNA i transkripcijsku aktivnost induciranu etopozidom, TNF α i interleukinom 1 β (Garrido i sur.,

2003). Hsp27 se aktivira fosforilacijom uz pomoć proteinske kinaze D na serinskim ostatcima 15,78 i 82 (Stetler i sur., 2012).

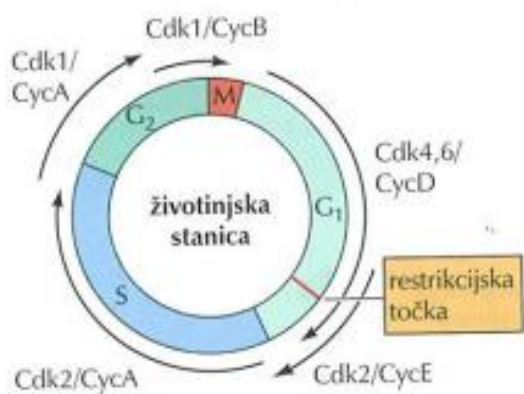
1.2. Ciklini i ciklin ovisne kinaze

Ciklin ovisne kinaze, Cdk (eng. *Cyclin-dependent kinases*) su dio CMGC obitelji humanih proteinskih kinaza nazvanom prema njenim članovima: Ciklin ovisnim kinazama, Mitogenima-aktiviranim proteinskim kinazama, Glikogen sintaza kinazama i Ciklin-sličnim kinazama.

Postoji više od 20 članova obitelji ovih serin/treoninskih Cdk, od kojih je svaki karakteriziran s konzerviranom katalitičkom jezgrom sastavljenom od veznog mjesta za ATP, PSTAIRE motiva za vezanje ciklina blizu N-kraja i motiva T-omče. Zajednički, ove strukture sudjeluju u aktivaciji Cdk koja uključuje vezanje ciklina za PSTAIRE heliks tako da on prema unutrašnjem dijelu strukture razmakne T-omču za 90 stupnjeva i izloži mjesto za vezanje supstrata te dodatno posloži ključne aminokiselinske ostatke unutar aktivnih mjesta tako da se Cdk pripremi za reakciju primanja fosfata (Kaldis i Lim, 2013).

Cdk možemo podijeliti u dvije skupine: one koje reguliraju progresiju stanica kroz određene faze staničnog ciklusa (Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6) i one koje reguliraju transkripciju (Cdk7-9 i Cdk11-13) (Bermont i Mariaule, 2014). Njihova je aktivnost je dakle modulirana na tri načina: interakcijama sa ciklinima (čijih je članova zasad poznato oko 25), fosforilacijom i inhibitorima ciklin ovisnih kinaza (CdkI).

Bliska suradnja ciklina, Cdk i CdkI je nužna za osiguravanje urednog prolaska stanice kroz stanični ciklus (Slika 3). Kao dodatak već utvrđenoj funkciji Cdk u smatanju denaturiranih proteina za stanice sisavaca, sve više raste i važnost uloge ciklina i inhibitora ciklin ovisnih kinaza koji igraju nezamjenjivu ulogu u procesima kao što su transkripcija, DNA popravak, epigenetska regulacija, metabolizam, samoobnova matičnih stanica, održavanje funkcije živčanog sustava, opći metabolizam i spermatogeneza. Neke od ovih funkcija ciklin ovisne kinaze mogu izvršavati i bez nastanka Cdk/ciklin kompleksa i bez prisustva točno određene kinaze, ali uz pomoć bliskih članova iste porodice proteina (Chung i Bunz 2010; Kaldis i Lim, 2013; Belmont i Mariaule, 2014).



Slika 3. Faze staničnog ciklusa u odnosu na Cdk/ciklin kompleks koji ih regulira.

Premda je ekspresija Cdk prilično konstantna tijekom staničnog ciklusa, koncentracije ciklina variraju, a abnormalne ekspresije ciklina imaju i direktan utjecaj na poremećaje u regulaciji samog staničnog ciklusa (Tablica 4) što među ostalim dovodi i do nastanka tumora. Od ostalih ciklin ovisnih kinaza, Cdk11 i 12 su uključene u regulaciju dorade RNA, a Cdk5 i Cdk10 u održavanju neuronske funkcije (Belmont i Mariaule, 2014).

Treći regulacijski mehanizam Cdk obuhvaća aktivaciju/inhibiciju fosforilacijom. Aktivacija Cdk1 i Cdk2 odvija se fosforilacijom ostatka Thr161, a inhibicija fosforilacijom na Thr14 i Tyr15 uz pomoć Cdk-aktivirajućih kinaza (CAK, *eng.* Cdk-activating kinase). Fosforilacija na Thr14 i Tyr15 odvija se unutar ATP-veznog mjesta uz pomoć inhibitornih kinaza Wee1 i Myt te interferira sa pravilnim vezanjem ATP-a dok fosforilacija T-omče na Thr191 uz Cdk-aktivirajuće kinaze povećava vezanje supstrata i stabilnost kompleksa kako bi se omogućila puna aktivacija Cdk (Kaldis i Lim, 2013).

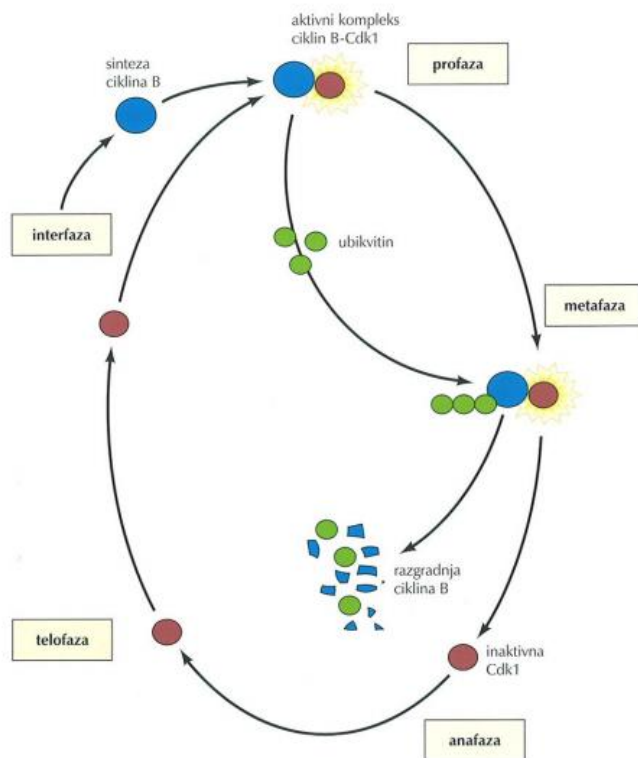
Tablica 4. Prikaz ciklin ovisnih kinaza, njihovih regulatornih ciklina u odnosu na regulaciju određene faze staničnog ciklusa.

Ciklin ovisna kinaza	Vezajući ciklin	Faza staničnog ciklusa
Cdk3	C	G ₀
Cdk4, Cdk2, Cdk6	D, E	G ₁
Cdk2	A, E	S
Cdk2, Cdk1	A	G ₂
Cdk1	B	M

1.2.1. Cdk1(cdc2), Cdk2, [pTyr¹⁵]Cdk1 u regulaciji staničnog ciklusa

Ciklin ovisna kinaza 1 (Cdk1) veže ciklin A (kako bi ciklus prešao iz S u G2 fazu) za dvije regije koje uključuju ostatke od 189 do 241 i 275 do 320 unutar konzervirane domene ciklina tzv. *cyclin box* od oko 100 aminokiselina unutar linearne sekvence ciklinskog proteina slične u strukturi kao i regije ciklina B (za prelazak iz G2 u M) za vezanje Cdk1 *in vitro* (Lees i Harlow, 1992). Cdk je kodirana genom *cdc2* po kojemu nosi svoje drugo ime.

Aktivacija Cdk1 je višestruki proces koji se sastoji od vezanja Cdk1 za ciklin B, relokalizacije kompleksa u jezgu, aktivacije fosforilacijom Cdk1 na Thr161 ciklin-aktivirajućom kinazom i odstranjivanje inhibitornih fosfata na Thr14 i Tyr15 (Slika 4). Defosforilacija je katalizirana specifičnom fosfatazom Cdc25, koja se u stanicama sisavaca pojavljuje u tri izoforme Cdc25A, -25B i -25C (Timoeef i sur., 2009).

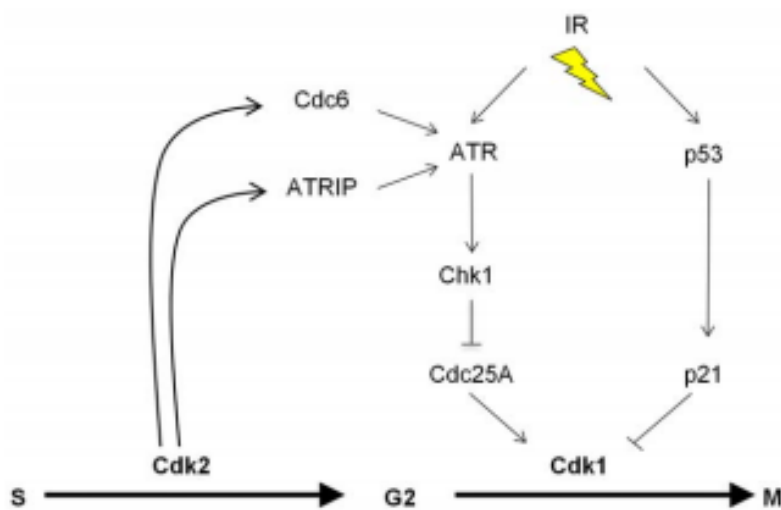


Slika 4. Nastanak kompleksa CiklinB/Cdk1 i njegova uloga u mitozu.

Po pitanju apoptoze, inaktivna fosforilirana kaspaza 8 (bez proapoptotskih svojstava) fosforilirala se je uz pomoć kompleksa Cdk1/ciklinB na Ser-387. Gubitkom normalne signalne regulacije fosforilacija se odvija i u tumorskim staničnim linijama. Ovim se inhibira apoptoza i prevodi ulaz u mitozu iz G2 faze staničnog ciklusa čime se tumorska stanica uspješno nastavlja dijeliti te se štiti od vanjskih stimulansa za staničnu smrt (Mathees, Raab i

sur., 2010). Inhibicijom Cdk1 odnosno inhibicijom nastanka Cdk1/ciklinB kompleksa, aktivirana kaspaza 8 bi aktivirala nizvodnu kaspazu 9 koja bi onda uz prisustvo citokroma c aktivirala nizvodne efektorske kaspaze i inducirala programiranu staničnu smrt, apoptozu. Također bi se zaustavljanjem staničnog ciklusa u toj točki inhibirala funkcija centrosoma čime bi opet došlo do indukcije apoptoze, ali drugim signalnim putem (Wang i sur., 2009).

Cdk2 u kompleksu s ciklinom E kontrolira G1/S kontrolnu točku koja sprječava ulazak stanica s oštećenom DNA u mitozu. Gubitak aktivnosti Cdk2 tj. kompleksa Cdk2/ciklinA mijenja regulacijsku aktivnost brojnih nizvodnih proteina koji reguliraju progresiju kroz S fazu i također kontroliraju ulaz u mitozu uključujući Cdc25A, Chk1, Cdc6 i ATRIP proteine. Štoviše, Cdk2 igra veoma važnu ulogu u kontroliranju nastale DNA štete (u ovom primjeru uzrokovane infracrvenim, IR zračenjem), (Slika 5) pomoću kontrolne točke ATR-Chk1-Cdc25A puta. Cdk2 promovira nastajanje ATR kompleksa na dva načina: fosforilacijom ATRIP i stabilizacijom Cdc6 i u regulaciji staničnog ciklusa regulirana je spomenutom aktivacijskom fosforilacijom na Thr160, a inhibirana fosforilacijom Thr14 i Tyr15 kao i Cdk1 (Chung i Bunz, 2010).



Slika 5. Prikaz prolaska kroz stanični ciklus u odnosu na Cdk1 i 2.

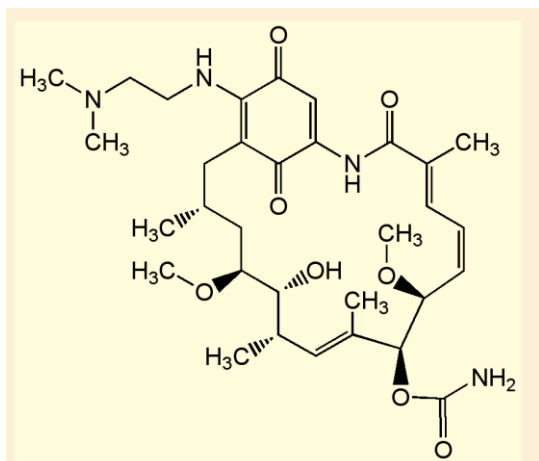
Dok je Cdk1 najaktivnija u mitozu, Cdk2 je najaktivnija tijekom S i G2 faza. Koordinacija između rada centrosoma i DNA duplikacije je kontrolirana kompleksom Cdk2/ciklinE (Chung i Bunz, 2010; Gu, Rosenblatt i Morgan, 1992; Cooper i Hausmann, 2010).

1.3. Inhibitori Hsp90 proteina

Učinkoviti antitumorski lijekovi trebali bi djelovati indukcijom apoptoze u ciljnom tkivu. Iako je veza između staničnog ciklusa i apoptoze veoma kompleksna, polako se sve više i više otkriva. Dok višestruki putevi u staničnoj signalizaciji vode do apoptoze, neki od njih zahtijevaju aktivirane komplekse Cdk1-Cdk2/ciklinA ili Cdk1/ciklinB dok neki drugi uopće ne zahtijevaju Cdk. Apoptoza može biti inducirana u fazi G1 ili G2 nakon oštećenja DNA različitim kemikalijama, UV zračenjem ili X zrakama uz aktivaciju p53-ovisnog puta, dok se neki stanični zastoji dogode se u G1 uz aktivaciju p53-neovisnog puta (Meijer i sur., 1996).

Brojne nove male molekule i protutijela su dizajnirani kako bi inhibirali specifične ciljne molekule u tumorskim stanicama ili su trenutačno u fazi predkliničkih i kliničkih ispitivanja. Unatoč tome sve je više jasno da su specifičnom i potentnom inhibicijom specifične ciljne molekule *in vivo*, tumorske stanice sklone aktivaciji drugih signalnih puteva koji u konačnici mogu deaktivirati proapoptotske signalne puteve i dovesti do otpornosti na lijek. Ovo otkriće je doduše preusmjerilo interes istraživača ka otkrivanju nespecifičnih staničnih citostatskih lijekova kao što su npr. antraciklini ili taksani u kombinaciji s ciljanom terapijom npr. trastuzumabom koji mogu rezultirati aditivnom ili sinergijskom interakcijom među lijekovima (Goetz i sur., 2009).

Iz skupine benzokinonskih anamicina u ovom radu bit će spomenut 17-DMAG[17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoksigeldanamicin], dobiven iz geldanamicina, prvog specifičnog inhibitora Hsp90, no koji je zbog svojih hepatotoksičnih svojstava isključen iz daljnjih istraživanja. Potencijalni citostatici iz ove skupine djeluju na visoko očuvanu N-terminalnu domenu Hsp90 proteina vežući mjesto za vezanje ATP-a čime se ometa funkcija Hsp90 i posljedično interakcije s njegovim proteinima klijentima te se promovira njihova degradacija ubikvintin-proteasomskim putem (Goetz i sur., 2009). U ovom kontekstu mislimo na Cdk, klijente Hsp90 koje bi inhibirane eventualno mogle i inducirati apoptozu tumorskih stanica. Za 17-DMAG (Slika 6) je također dokazano da smanjuje oksidativni stres u uvjetima eksperimentalne ateroskleroze uz pojavu dodatnih pleiotropnih učinaka posredovanih modulacijom kaskade MAPK uz smanjenu fosforilaciju i aktivaciju preko ERK kinaze *in vivo* (Madrigal i Matute i sur., 2012).



Slika 6. Struktura 17-DMAG-a.

Još jedan primjer inhibicije ciljanih signalnih molekula je ona koja djeluje na razini inhibicije translacije mRNA koja kodira za protein koji je potrebno inhibirati. Radi se o genskom utišavanju ili utišavanju genske ekspresije, tzv. RNA interferenciji.

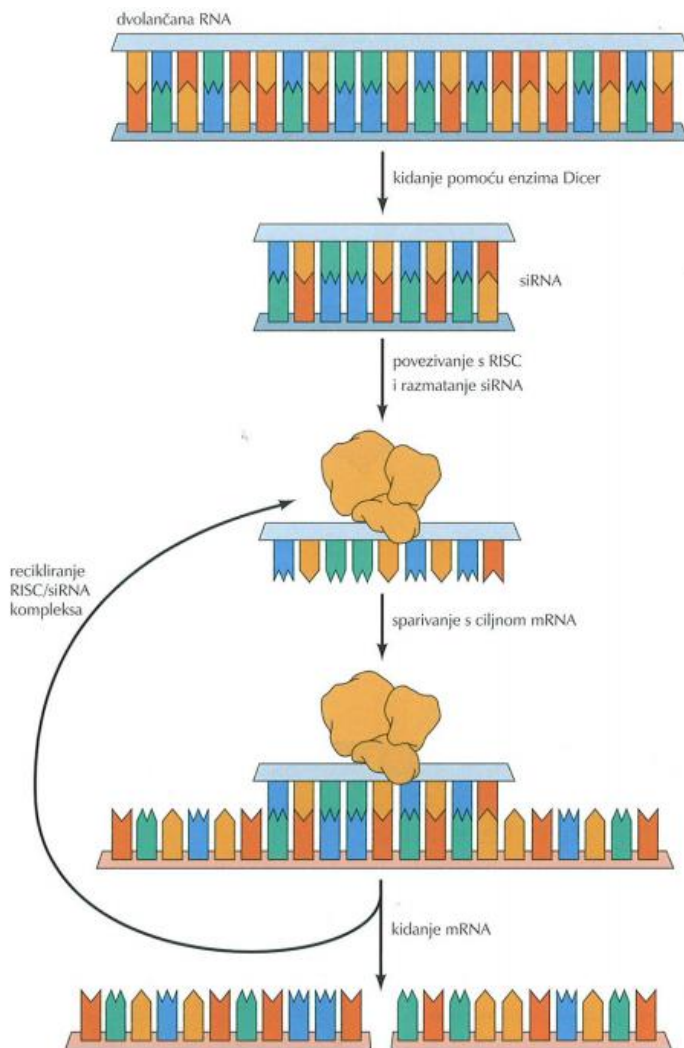
1.3.1. RNA interferencija

Jedna od metoda za inhibiciju ekspresije ciljnog proteina je uvođenje protusmislenih, *antisense*, nukleinskih kiselina u stanice u *kulturi in vitro*. Unesena molekula RNA ili jednolančane DNA komplementarna bi bila smisljenoj *sense* molekuli mRNA koju želimo inhibirati. Ona dakle hibridizira s njom i blokira njenu translaciju u protein. Ovakve protusmislene RNA mogu se izravno unijeti u stanicu ili same stanice mogu biti transfektirane s vektorom konstruiranim da eksprimira protusmislenu RNA s mogućim terapijskim svojstvima. Ovim nastaju RNA-DNA hibridi ili RNA-RNA molekule koje se najčešće brzo razgrađuju u stanici.

U zadnjih nekoliko godina, ova metoda, tzv. RNA interferencija postala je jedna od izuzetno učinkovitih i široko primjenjivanih metoda za ometanje ekspresije gena na razini mRNA. RNA interferencija prvo je otkrivena u obliku *Caenorhabditis elegans* 1998. godine.

Duže dvolančane molekule RNA koje su prekursori malih ometajućih RNA, siRNA (*eng.* short interfering RNA) mogu se u stanicu unijeti dakle eksperimentalno ili nastaju unutar same stanice od preklapajućih transkriptata. Sukladno tome prekursori ovih malih mikroRNA molekula (miRNA) se prepisuju pomoću RNA-polimeraze II kao primarni transkripti

izgrađeni od približno 70 nukleotida koji se zatim postupno kidaju pomoću nukleaze Dicer ili Dicer nakratke dvolančane molekule molekule siRNA od oko 22 nukleotida koje se onda vežu s kompleksom proteina poznatijim kao utišavajući kompleks induciran molekulom RNA, RISC (*eng.* RNA-induced silencing complex). Kada postanu dio kompleksa, dva lanca siRNA molekule se razdvoje i lanac komplementaran s mRNA (protusmisleni lanac) na osnovi komplementarnog sparivanja baza usmjeri kompleks do ciljne mRNA. Molekulu smislene mRNA tada kida jedan od enzima RISC-siRNA kompleksa. Nakon degradacije mRNA, RISC-siRNA kompleks se rasformira te nastavlja sudjelovati u višestrukim ciklusima cijepanja mRNA dovodeći na taj način do efikasne destrukcije ciljne mRNA molekule i inhibicije genske ekspresije proteina za kojeg je kodirala ta razgrađena mRNA (Slika 7) (Cooper i Hausmann,2010).



Slika 7. Mehanizam RNA interferencije.

Važnost miRNA za prirodnu gensku regulaciju je također golema. Procjenjuje se da je najmanje 1000 molekula miRNA kodirano u genomu sisavaca. Nadalje čini se da svaka molekula miRNA može djelovati na stotinjak različitih molekula mRNA pa se procjenjuje da je najmanje trećina gena koji kodiraju proteine podložna regulaciji putem miRNA. Premda se njihova biološka uloga tek počinje vrednovati, utvrđeno je da djeluju u različitim razvojnim procesima, uključujući rani embrionalni razvoj, razvoj živčanog sustava, mišića, pluća, srca i imunološkog sustava. Pokazano je također da miRNA reguliraju staničnu proliferaciju i preživljavanje, a utvrđeno je i da nenormalna ekspresija miRNA pridonosi razvoju bolesti srca te nekoliko vrsta raka. Upravo je zbog toga razumijevanje kako mehanizma djelovanja miRNA tako i svih njihovih bioloških uloga od iznimnog zdravstvenog interesa.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Proteini toplinskog stresa su veoma raznovrsna, ubikvintarna i za organizam zaštitna skupina proteina važna u nastanku i razvitku brojnih kako fizioloških tako i patofizioloških procesa. Svoju zaštitnu ulogu ispoljavaju osiguravajući pravilnu konformaciju svojih proteina klijenata. Povezani su, također s drugim staničnim proteinima i signalnim molekulama u iznimno kompleksnoj mreži intrastanične signalizacije gdje je promjenjena aktivnost njenih članova presudna u nastanku danas u svijetu vrlo raširenih bolesti kao što su i tumorske bolesti. Samim time od iznimne je važnosti bolje rasvijetliti molekulsku pozadinu inhibicije ili indukcije aktivnosti Hsp proteina koja nije još u potpunosti istražena kako bismo mogli izliječiti, a možda i spriječiti bolesti povezane s njihovom aktivnošću.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost inhibicije proteina toplinskog stresa Hsp90 α te kako ta inhibicija utječe na ekspresiju drugih proteina klijenta šaperona Hsp90 kao što su ciklini i ciklin ovisne kinaze važne za upravljanje staničnog ciklusa ili u induciranju programirane stanične smrti – apoptoze.

THP-1 stanična linija bila je tretirana siRNA molekulama koje su komplementarne s dijelom glasničke RNA koja kodira za Hsp90 protein i koju mogu vezati komplementarnim sparivanjem baza te tako onemogućiti njezinu ekspresiju. Uzorci su dobiveni iz suspenzija stanica sakupljenih 24 i 48 sati nakon tretiranja uz odgovarajuću negativnu kontrolu dobivenu za ista vremena.

Ekspresija je analizirana razdvajanjem proteina Hsp90 α i β , Hsp70 i Hsp 27 te proteina klijenata Hsp90 tj. ciklin ovisnih kinaza Cdk1, Cdk2 i pCdk1 elektroforezom na poliakrilamidnom gelu te njihovim obilježavanjem protutijelima (Western blot), a ekspresija je kvantificirana kemiluminescencijom. U svrhu normalizacije dobivenih mjerenja praćena je ekspresija β -aktina.

Očekivalo se da izlaganje stanica siRNA komplementarnoj izoformi Hsp90 α izazove inhibiciju ekspresije izoforme Hsp90 proteina, te se željelo ispitati izaziva li ta inhibicija promjenu ekspresije Hsp90 β , Hsp70, Hsp27 te proteina klijenata Hsp90, Cdk1, fosforiliranog Cdk1 i Cdk2.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Akrilamid/bisakrilamid mix, 30%, 37, 5:1 (Sigma)
- Albumin goveđeg seruma, BSA (*eng.* bovine serum albumin) (Sigma)
- APS, amonijev persulfat (Sigma)
- Bakrov(II)-sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- Bicinkoninična kiselina, BCA (*eng.* bicinchoninic acid) (Sigma)
- Bromfenol plavo (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Glicin (Sigma)
- Kloridna kiselina, HCl (Sigma)
- β -merkaptoetanol (Sigma)
- Metanol (Kemika)
- Natrijev dodecilsulfat, SDS (*eng.* sodium dodecyl sulphate) (Sigma)
- Natrijev klorid, NaCl (Sigma)
- Obojeni proteinski standard molekulskih masa (Novex® Sharp Protein Standard; Life Technologies™)
- TEMED, N, N, N', N' -, tetrametil-etilen-diamin (Sigma)
- Tris, tris[hidroksimetil]aminometan – Trizma base (Sigma)
- Triton X-100 (Merck)
- Tween-20 (Sigma)

3.1.2. Proteini i protutijela

- inhibitori proteaza, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Complete, Mini, EDTA-free; Roche)
- mišje monoklonsko IgG2a protutijelo protiv ljudskog Hsp90 α (Enzo)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog Hsp90 β (Enzo)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog Hsp70/72 (Enzo)

- mišje monoklonsko IgG1 protutijelo protiv ljudskog Hsp27 (Enzo)
- mišje monoklonsko protutijelo protiv ljudskog Cdk1/cdc2 (Enzo)
- mišje monoklonsko IgG1 protutijelo protiv ljudskog Cdk2 (Enzo)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv [pTyr¹⁵]Cdk1 (Enzo)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv [pTyr¹⁵]Cdk2 (Enzo)
- mišje IgM protutijelo protiv pilećeg β -aktina (Calbiochem)
- kozje poliklonsko protutijelo protiv zečjeg IgG obilježeno peroksidazom iz hrena (Sigma)
- zečje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno peroksidazom iz hrena (Sigma)
- kozje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg IgM obilježeno peroksidazom iz hrena (Calbiochem)

3.1.3. Komercijalne smjese analitičkih reagensa

- Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma)
- Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences)

3.1.4. Stanične linije

- THP-1 stanična linija humanih monocita iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom

3.1.5. Software

- Amersham Imager 600
- ImageQuant 5.0
- Microsoft Excel

3.1.6. siRNA molekule

- siRNA za HSP90 α : Silencer Select Pre-designed siRNA – s6995, *Ambion*[®]
- scrambled siRNA: Silencer[®] Select Negative Control No. 2 siRNA, *Ambion*[®]

3.1.7. Sastav korištenih pufera

1. Pufer za lizu stanica, pH 8,0

- Tris HCl 50 mM
- NaCl 150 mM
- Triton X-100 1%
- Natrij-dezoksikolat 0,5%
- SDS 0,1%
- smjesa inhibitora proteaza
- u destiliranoj vodi

2. Pufer za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni gel (PAG), pH 6,8

- Tris HCl 187,5 mM
- glicerol 20%
- SDS 6%
- β -merkaptoetanol 5%
- bromfenol plavo 0,1%
- u destiliranoj vodi

3. Pufer za elektroforezu u SDS-PAG, pH 8,3

- glicin 192,0 mM
- Tris HCl 25,0 mM
- SDS 3,5 mM
- u destiliranoj vodi

4. Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer I, pH 10,4

- Tris HCl 300 mM
- metanol 20%
- u destiliranoj vodi

5. Pufer za prijenos na membranu - anodni pufer II, pH 10,4

- Tris HCl 25 mM
- metanol 20%
- u destiliranoj vodi

6. Pufer za prijenos na membranu - katodni pufer, pH 9,4

- Tris HCl 25 mM
- glicin 40 mM
- metanol 20%
- u destiliranoj vodi

7. Pufer TBS (*eng.* Tris-buffered saline), pH 7,5

- Tris HCl 50 mM
- NaCl 150 mM
- u destiliranoj vodi

8. Pufer TBST, pH 7,5

- Tween-20 0,1%
- u TBS, pH 7,5

3.1.7. Gelovi za elektroforezu

1. Gel za sabijanje 5%

- akrilamid/bisakrilamid mix (37,5:1) 5%
- Tris HCl, pH 6,8 250 mM
- SDS 0,1%
- APS 0,1%
- TEMED 0,05%
- u destiliranoj vodi

2. Gel za razdvajanje 12%

- akrilamid/bisakrilamid mix (37,5:1) 12%
- Tris HCl, pH 8,8 375 mM
- SDS 0,1%
- APS 0,1%
- TEMED 0,05%
- u destiliranoj vodi

3.2. METODE

3.2.1. Tretiranje THP-1 stanične kulture sa siRNA molekulama

Suspenzija THP-1 stanica je humana monocitna stanična linija dobivena od tvrtke *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, SAD). Prikladna je za održavanje kontinuiranih kultura, a prosječno vrijeme diobe je 35-50 sati. Gustoća kulture se mora održavati unutar $2-9 \times 10^5$ stanica/mL. Ove stanice pokazuju ekspresiju nekih antigena na svojoj površini kao npr. HLA A2, A9, B5, DRw1, DRw2 itd., te ekspresiju nekih receptora kao što su komplement C3b i Fc receptor. Površinska i citoplazmatska prisutnost imunoglobulina je smanjena. U dosadašnjim istraživanjima dokazana je diferencijacija monocita do aktiviranih makrofaga uz pomoć kemijskih induktora kao što je TPA/PMA (forbol ester-12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat/forbol-12-miristat-13-acetat).

Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u plastičnim bocama za uzgoj staničnih kultura uz termostat pri 37°C i u struji zraka s 5% CO_2 te relativne vlažnosti 95%. Kao hranidbeni medij korišten je RPMI 1640 medij obogaćen dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FBS, *eng.* fetal bovine serum), 100 U/mL penicilina G, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin-sulfata, 250 ng/ml amfotericina te 2,5 $\mu\text{g/ml}$ plazmocina. THP-1 stanice su nasadiwane u koncentraciji od $1,5 \times 10^5$ stanica/mL kulture, odnosno u tretman se krenulo s ukupno 200 mL kulture (3×10^7 stanica). Vijabilnost stanica određena je tripan plavim (0,04%) pomoću hemocitometra, a broj stanica se odredio pomoću uređaja *Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer* (Beckman Coulter). Za eksperiment genskog utišavanja, stanice su sakupljene i ponovno suspendirane u mediju bez antibiotika za postizanje koncentracije od 105 stanica/mL.

Otopine molekula siRNA za inhibiciju ekspresije Hsp90 α i negativne kontrole kupljene su od tvrtke Ambion, suspendirane u vodi do koncentracije od 50 mM, a alikvoti su pohranjeni na -20°C . 120 μL radne siRNA otopine (10 μM) lagano se pomiješa sa 20 mL OPTI-MEM medija, i 200 μL lipofektamina RNAiMAX. Otopina se zatim miješa i inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon inkubacije, smjesa se doda u 100 mL suspenzije stanica tako da je konačna koncentracija siRNA 10 nM.

Tretirane THP-1 stanice su sakupljane nakon 24 i 48 h od nasadivanja. Kod kontrola uzet je dodatan uzorak netretiranih THP-1 stanica u nultoj točki vremena (0h, 24h i 48h). Nakon sakupljanja, stanice su centrifugirane 10 minuta na 600g. Supernatant je odbačen te se u daljnji postupak išlo s talogom stanica koji sadrži 3×10^6 stanica.

3.2.2. Homogenizacija uzoraka soniciranjem

Uzorcima sa 3×10^6 stanica dodano je po 150 μ L pufera za lizu stanica. Nakon resuspenzije staničnog taloga u lizirajućem puferu uzorci su postavljeni na led, što je posebno bitno kod samog soniciranja uzoraka. Korišten je ultrazvučni sonikator *Ultrasonic Processor UP100H* (Hielscher-Ultrasound Technology) pri uvjetima od 100 W, 30 kHz te amplitudi 20%. Svaki uzorak homogeniziran je 3 puta po otprilike 30 sekundi s određenim vremenskim razmacima između svakog soniciranja. Uzorci se zatim centrifugiraju 10 minuta pri 600 g na 4°C kako bi se odvojili stanični homogenati od netopljivih taloga.

3.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina BCA metodom

Koncentracija proteina određivana je metodom bicinkonične kiseline gdje se u alkalnom uvjetima promjeni boja bicinkonične kiseline proporcionalno koncentraciji proteina u uzorku. Koristio se *BCA Protein Assay Kit, Sigma*. Cu^{2+} ion iz otopine ulazi u kompleks s proteinima, nakon čega slijedi njegova redukcija u Cu^+ ion proporcionalna koncentraciji proteina. Sposobnost redukcije imaju cistein, cistin, triptofan, tirozin te peptidne veze u molekulama proteina. Bicinkonična kiselina s Cu^+ ionom daje ljubičasto-plavi kompleks čija se koncentracija određuje spektrofotometrijski na 560 nm.

Pripravljen je niz razrjeđenja matične 1 mg/ mL BSA (*eng.* bovine serum albumin) otopine za konstrukciju baždarnog dijagrama (0 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,90 mg/mL). Zatim je pripravljena radna BCA otopina dodavanjem 1 dijela reagensa B (4 % w/v CuSO_4) na 50 dijelova reagensa A (BCA, natrijev karbonat, natrijev tartarat, natrijev bikarbonat u 0,1 M NaOH, pH 11,25).

U mikrotitarsku pločicu dodano je po 100 μ L BCA otopine i po 25 μ L standardne BSA otopine za sva razrjeđenja, odnosno za određivanje koncentracije proteina u uzorcima homogenata na 100 μ L BCA otopine nanosi se po 2 μ L staničnog homogenata i 23 μ L

destilirane vode. Mikrotitarska pločica se inkubira 30 minuta na temperaturi od 37°C , nakon čega se spektrofotometrijski očitava apsorbancija jažica pri 560 nm na spektrofotometru *Victor 1420 Multilabel Counter* (PerkinElmer). Uzorci standardne otopine te sami uzorci priređeni su u duplikatu.

Koncentracija uzoraka se odredi usporedbom s dobivenim baždarnim dijagramom koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatim koncentracijama proteina BSA otopina. Pri izračunavanju potrebno je uzeti u obzir faktor razrjeđenja u mikrotitarskim pločicama (razrjeđenje 1:12,5).

3.2.4. SDS –PAGE elektroforeza

Princip SDS-PAGE elektroforeze

SDS (*eng.* sodium-dodecyl sulfate) ili natrij dodecil-sulfat je anionski detergent koji se koristi u SDS-poliakrilamidnoj elektroforezi primarno iz razloga što omogućava razdvajanje proteina koje ovisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi, ali ne i naboju. U puferu za nanošenje uzorka nalaze se i β -merkaptotanol i SDS koji uz dodatno zagrijavanje uzoraka na termobloku, služe za denaturaciju proteina. SDS utječe i na jednoliko raspoređivanje negativnog naboja na svim proteinima tako što se veže na njih u omjeru 1,4 g SDS/g proteina, pa je u konačnici omjer mase/naboja konstantan. SDS se nalazi i u sastavu gela. Bromfenol plavo u puferu za nanošenje služi kako bi se mogao pratiti napredak elektroforeze, a glicerol služi za povećanje viskoznosti uzoraka i olakšanja nanošenja u jažice.

Ova elektroforeza spada u diskontinuiranu s obzirom na to se temelji na prolasku proteina kroz dva gela različita po gustoći umreženja i pH vrijednosti. Sabijajući gel (3-5%) služi za koncentriranje uzoraka u jednu vrpcu proteina koji se potom prolaskom kroz razdvajajući gel (10-15%) razdvajaju prema molekularnim masama, s tim da najbrže putuju najmanji proteini i obrnuto.

3.2.4.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE

Uzorci za nanošenje na elektroforezu pripremljeni su miješanjem određenih volumena uzoraka, pufera za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni gel (*eng.* sample buffer) te destilirane vode i trebaju imati konačnu koncentraciju proteina od 1 mg/mL. Nakon određivanja ukupne koncentracije proteina u homogenatima izračunat je ukupni volumen

uzoraka za nanošenje na elektroforezu koji će imati željenu koncentraciju proteina, uzevši i u obzir da se u daljnji postupak uzima alikvot od 100 μL homogenata koji se miješa sa volumenom pufera za nanošenje uzoraka na SDS-poliakrilamidni gel koji iznosi 1/3 konačnog volumena. Ostatak volumena se nadopuni destiliranom vodom. Pripravljene uzorci se stavljaju 5 minuta na termoblok na temperaturu od 95° C kako bi se pospješio proces denaturacije proteina.

3.2.4.2. Priprema gela za SDS-PAGE elektroforezu

Za SDS-PAGE elektroforezu potrebno je pripremiti dva gela različitih gustoća i pH vrijednosti. Na specijalizirani stalak se postavljaju dva stakla priljubljena jedno uz drugo, s tim da se na vertikalnim rubovima jednog stakla između njih nalaze razmaknice (*eng.* spacers) koje određuju debljinu gela (0,75 mm). Prvi gel koji se izlijeva između stakala je Gel za razdvajanje 12% (*eng.* resolving gel; 12% Tris-glicin-SDS-poliakrilamidni gel). Sastav i priprema gela opisani su u potpoglavlju 3.1, Materijali. Nakon izlijevanja tog gela potrebno je poravnati njegovu površinu dodatkom izopropanola. Kada se razdvajajući gel umreži dodaje se i manja količina gela za sabijanje 5% (*eng.* stacking gel; 5% Tris-glicin-SDS-poliakrilamidni gel u koji se umetne češalj za formiranje jažica za nanošenje uzoraka. Po umrežavanju sabijajućeg gela češalj se izvadi te se jažice isperu destiliranom vodom i osuše.

3.2.4.3. Elektroforeza

Stakla s gelom se prenose u elektroforetsku kadnicu. Uzorci se nanose u jažice u manjem volumenu (5-15 μL) te se ostatak volumena jažica pažljivo ispuni puferom za elektroforezu u SDS-PAG (*eng.* running buffer) uz pomoć mikropipete kako bi se uzorci u daljnjem postupanju zadržali unutar njih. Također, puferom za elektroforezu u SDS-PAG treba ispuniti dno kadice na način da dolazi u kontakt i prelazi donji rub gela, te se dodatno ulijeva i u središnji prostor koji omogućuje zadržavanje pufera iznad gornjeg ruba gela. Bitno je da je uspostavljen protok pufera kroz gel pod utjecajem usmjerenog električnog polja kako bi proteini mogli putovati iz smjera katode prema anodi. Napon električnog polja u sabijajućem gelu je 80 V, dok se u razdvajajućem gelu povisi na 120 V.

Osim uzoraka, na gel je potrebno nanijeti i po 3-5 μL obojanog standarda proteina poznatih molekulskih masa (Novex® Sharp Protein Standard, Life Technologies) kako bi se kasnije mogli analizirati proteini točno određenih veličina.

3.2.5. Western blot metoda

3.2.5.1. Prenošenje proteina s gela na PVDF membranu

Nakon elektroforeze stakla se razdvajaju i gel se prenosi u složeni sustav za polu-suhi prijenos makromolekula s gela na PVDF (poliviniliden fluorid; Immobilon-PVDF membrane, Millipore) membranu. Redoslijed slaganja sustava od vrha do dna je sljedeći: tri filter papira namočena i gel namočeni u puferu za prijenos na membranu - katodnom puferu (pH 9,4), membrana i jedan filter papir namočeni u puferu za prijenos na membranu - anodnom puferu I (pH 10,4), te dva filter papira s puferom za prijenos na membranu - anodnim puferom II (pH 10,4). Filter papiri i membrana se prije vađenja gela stavljaju u navedene pufere, a hidrofobnu PVDF membranu je potrebno prije unošenja u pufer namočiti metanolom. Nakon postavljanja spomenutog niza na uređaj za polu-suhi prijenos (Semi-Dry Blotting System IMM 1-A, The W.E.P. Company) namješta se gustoća struje od 0,8 mA /cm² membrane i prijenos od 1 h.

3.2.5.2. Inkubacija membrane sa specifičnim protutijelima

Nakon prijenosa proteina na membranu režu se vrpce te membrane sa proteinima određene molekulske mase koje se zatim inkubiraju sa specifičnim protutijelima na željene proteine. Kao orijentacija služi standard molekulskih masa. U Tablici 5 predočene su veličine analiziranih proteina. Primarna protutijela razrjeđuju se s puferom TBS uz dodatak 3% govedeg serumskog albumina BSA (*eng.* bovine serum albumin). BSA služi za blokiranje nespecifičnog vezanja primarnih protutijela na membrane. Inkubacija membrane s primarnim protutijelima ostavlja se preko noći. Nakon inkubacije, membrane se ispiru 3 puta po 15 minuta u puferu TBST. Zatim slijedi inkubacija s obilježenim sekundarnim protutijelima razrijeđenim u puferu TBS koja traje jedan sat, a prati ju ispiranje na isti način kao kod primarnih protutijela. Razrjeđenja za pojedina protutijela korištena u analizama prikazana su u Tablici 6.

Tablica 5. Približne veličine analiziranih proteina.

Analizirani protein	Molekularna masa (kDa)
Hsp90 α	90
Hsp90 β	90
Hsp70	70
Hsp27	27
Cdk1	33
Cdk2	33
[pTyr ¹⁵]Cdk1	33
β -aktin	42

Tablica 6. Prikaz razrjeđenja pojedinih protutijela korištenih u analizi.

Analizirani protein	Primarno protutijelo	razrjeđenje s 3% BSA/TBS otopinom
Hsp90 α	mišje mAt	1:1000
Hsp90 β	zečje pAt	1:1000
Hsp70/72	zečje pAt	1:1000
Hsp27	mišje mAt	1:1000
Cdk1	mišje mAt	1:1000
Cdk2	mišje mAt	1:500
[pTyr ¹⁵]Cdk1	zečje pAt	1:1000
β -aktin	mišje IgM mAt	1:1000
Primarno protutijelo	Sekundarno protutijelo	razrjeđenje s puferom TBS
mišje mAt	zečje pAt protiv IgG obilježeno HRP-om	1:100 000
zečje pAt	kozje pAt protiv IgG obilježeno HRP-om	1:100 000
mišje IgM mAt	kozje pAt protiv IgM obilježeno HRP-om	1:10 000

mAt-monoklonsko protutijelo; pAt-poliklonsko protutijelo; HRP- peroksidaza iz hrena

3.2.5.3. Vizualizacija kemiluminescencijom

Za vizualizaciju se koristi princip kemiluminescencije koja je rezultat reakcije ECL reagensa (*eng.* enhanced chemiluminescence; Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare Life Sciences) sa sekundarnim protutijelom koje je obilježeno peroksidazom iz hrena, HRP (*eng.* horseradish peroxidase). ECL reagens pripravlja se neposredno prije nanošenja na membranu miješanjem jednakih količina otopine peroksida (*eng.* Peroxide Solution) i luminol pojačivačke otopine (*eng.* Luminol Enhancer Solution). Ukupna količina reagensa iznosi 0,07 mL po cm² membrane. Nanosi se na membranu u tamnoj prostoriji te se inkubira 2-5 minuta. Nakon toga membrana se postavlja u *AmershamTM Imager 600* (GE Healthcare) koji detektira kemiluminescenciju. Kvantifikacija intenziteta pojedinih vrpca izvedena je pomoću programa ImageQuantTM 5.0.

Reakcija vodikovog peroksida i luminola katalizirana je HRP enzimom te nastaje oksidirani luminol koji prilikom raspada emitira svjetlost valne duljine 428 nm koju instrument detektira. Pojačivačka otopina sadrži dodatne modificirane fenole koji produžuju vrijeme emisije i pojačavaju njezin intenzitet 1000 puta.

3.2.6. Statističke metode

Statistička analiza kvantificiranih signala izračunate su pomoću računala uporabom programa *Excel, Microsoft*. Ona je uključivala izračun srednje vrijednosti i standardne devijacije dobivenih signala. Razlike između skupina određene su neparnim Student t-testom i značajnom razlikom rezultata smatrani su rezultati s razinom značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati analiza ekspresije proteina Western blot metodom

Nakon što su stanice tretirane sa siRNA molekulama, ekspresija proteina je provedena Western blot metodom uz specifična primarna i sekundarna protutijela. Na sekundarna protutijela je bio vezan enzim peroksidaze hrena koji je u reakciji s luminolom omogućio kemiluminescencijsku vizualizaciju i kvantifikaciju proteina sakupljenima u elektroforetske vrpce na koje se vezalo primarno protutijelo.

Kao rezultati dobivene su fotografije pomoću sustava za detekciju kemiluminescencije *Amersham Imager 600* pomoću CCD kamere (*eng. charge-coupled device*). Vrijeme ekspozicije PVDF membrane protutijelima s enzimom vezanima za protein i tretirana s luminolom od 2-8 minuta. Kvantifikacija vizualiziranih proteina obavljena je pomoću računalnog programa *ImageQuant 5.0*. Rezultati su normalizirani prema β -aktinu.

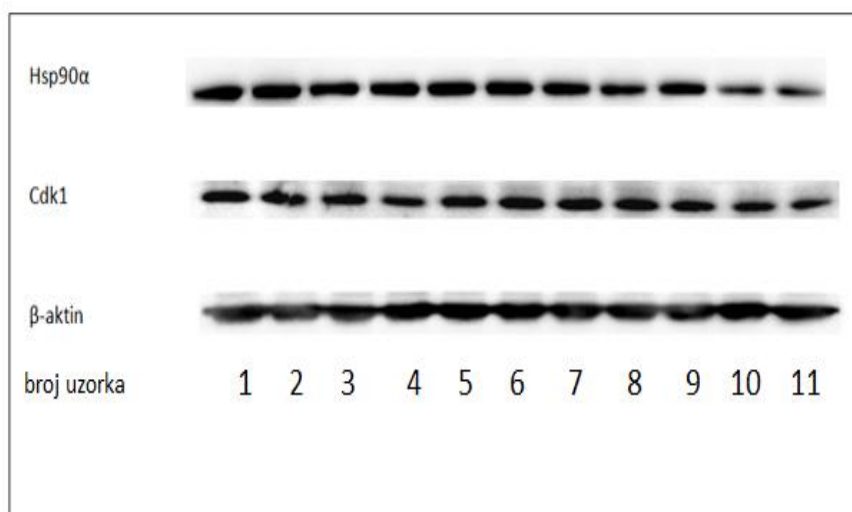
Uzorci su podijeljeni u tri skupine: kontrolni uzorci THP-1 stanica sakupljenih u nultoj točki, nakon 24 sata i 48 sati, zatim duplikati negativne kontrole sakupljene nakon 24 i 48 sati te duplikati uzoraka stanica tretiranih siRNA molekulama sakupljenima 24 i 48 sati nakon tretiranja. Ovakav redoslijed nanošenja (Tablica 7) i sakupljanja uzoraka osigurava i proučavanje ovisnosti ekspresije ispitivanih proteina o vremenu.

Tablica 7. Redoslijed nanošenja uzoraka.

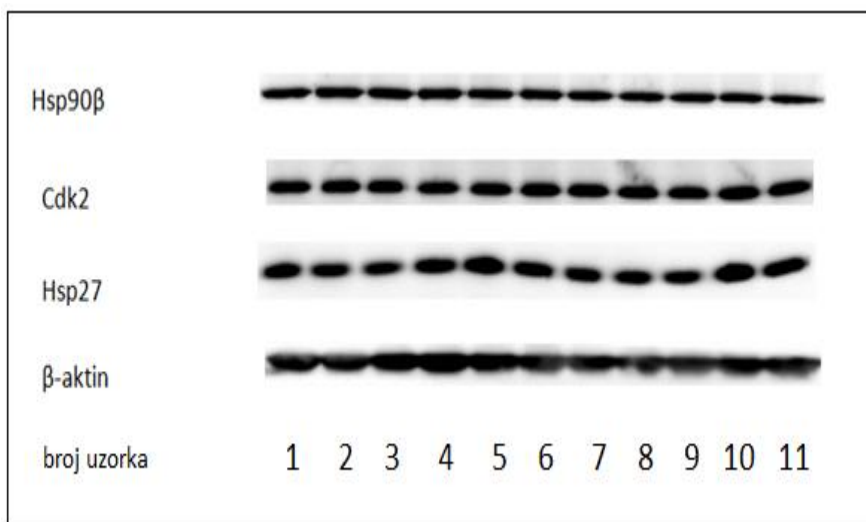
broj uzorka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
vrsta uzorka	THP-1			NK RNA				siRNA			
vrijeme*	0	24	48	24	24	48	48	24	24	48	48

*vrijeme sakupljanja uzoraka od nasadivanja stanica; THP-1 označava kontrolne uzorke; NK RNA negativne kontrole, a siRNA uzorke stanica tretiranih siRNA molekulama

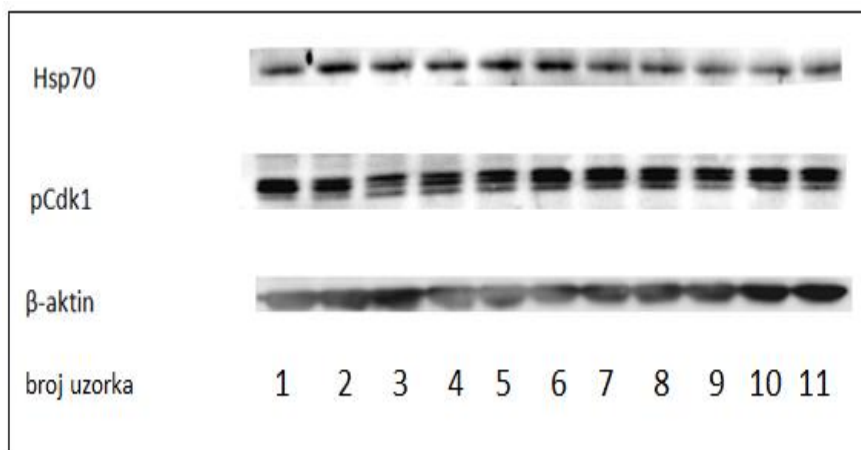
Na sljedećim slikama (Slika 8, 9, 10) prikazani su reprezentativni elektroferogrami dobiveni Western blot tehnikom.



Slika 8. Western blot analiza Hsp 90α i Cdk1 te βaktina.

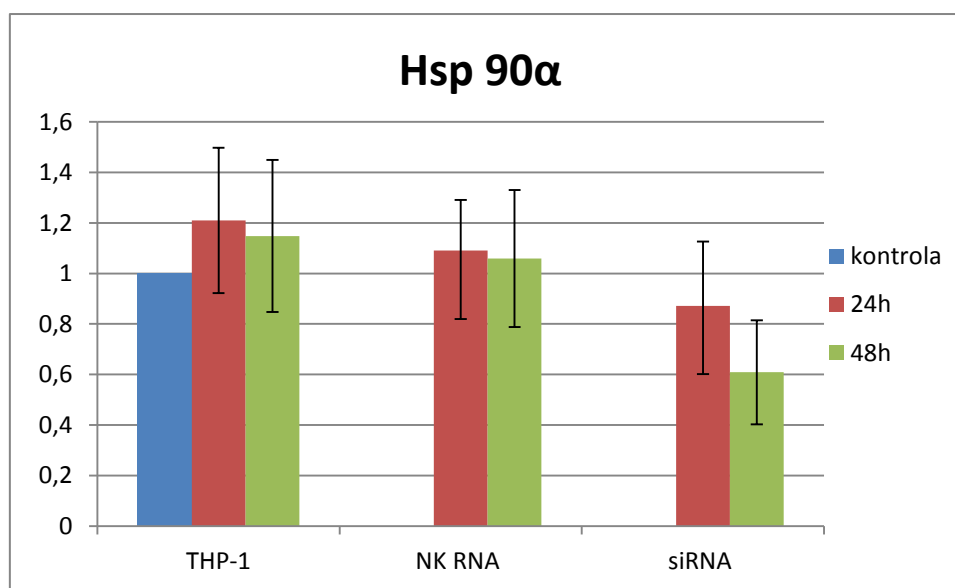


Slika 9. Western blot analiza Hsp90β, Cdk2 i Hsp27 te β aktina.

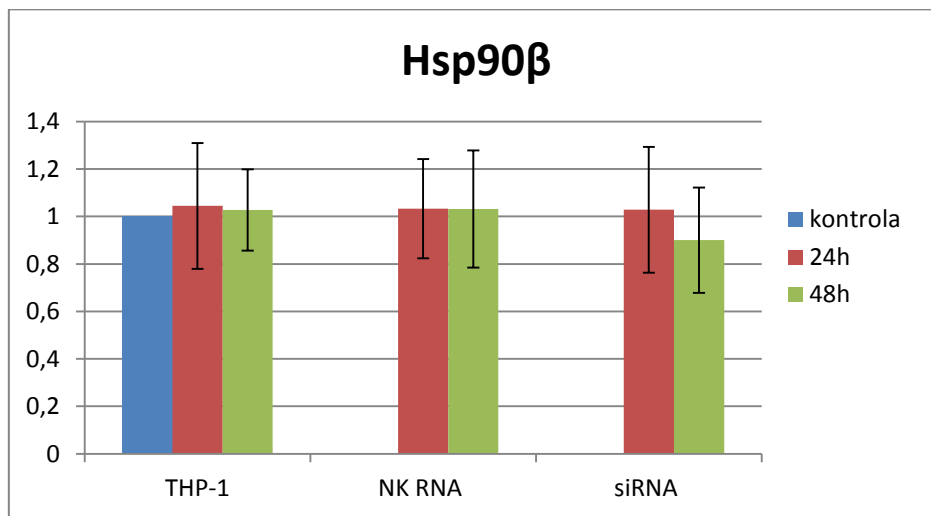


Slika 10. Western blot analiza Hsp70, pCdk1 te β aktina.

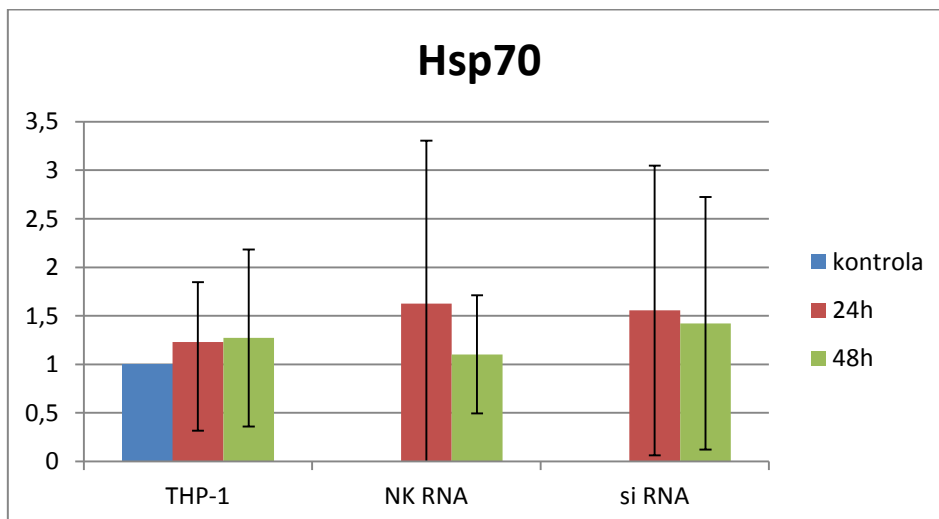
4.2. Statistička analiza rezultata



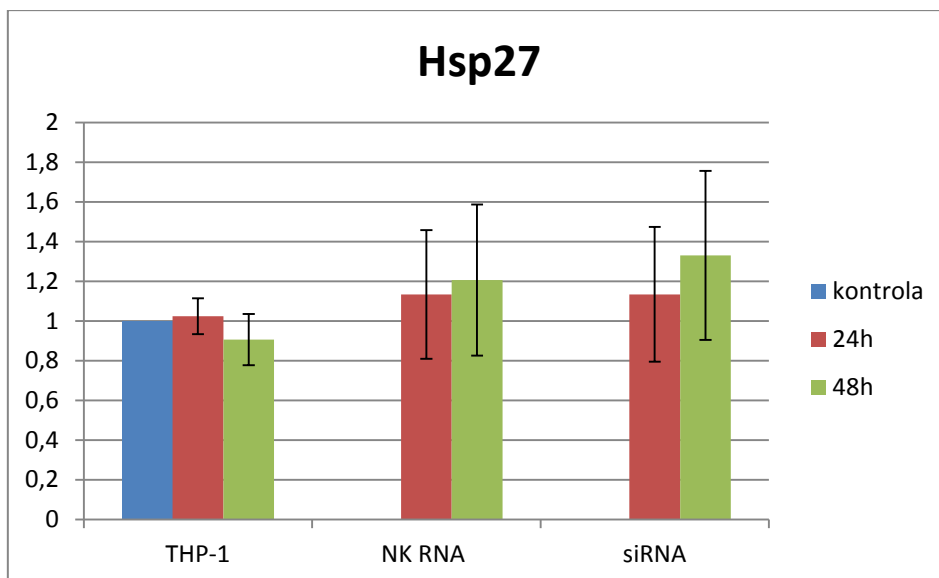
Slika 11. Stupčasti grafikon za relativnu kvantitativu analizu ekspresija Hsp 90α ovisno o vremenu sakupljanja stanica tretiranih siRNA-ma. (Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ±SD.)



Slika 12. Stupčasti grafikon za relativnu kvantitativnu analizu ekspresije Hsp 90 β ovisno o vremenu sakupljanja stanica tretiranih siRNA-ma. (Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD)



Slika 13. Stupčasti grafikon za relativnu kvantitativnu analizu ekspresije Hsp 70 ovisno o vremenu sakupljanja stanica tretiranih siRNA-ma. (Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD)



Slika 14. Stupčasti grafikon za relativnu kvantitativnu analizu ekspresije Hsp 27 ovisno o vremenu sakupljanja stanica tretiranih siRNA-ma. (Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD)

Rezultati analize ekspresije sa siRNA molekulama inhibiranih Hsp90 proteina i njegovih proteina klijenata Cdk1, Cdk2 i pCdk1 kao i drugih proteina toplinskog stresa Hsp70 i Hsp27 Western blot tehnikom pokazuju za većinu ispitivanih proteina gotovo neznatnu razliku između netretiranih stanica, negativnih kontrola i stanica tretiranih molekulama siRNA. Po pitanju ekspresije Hsp90 α proteina vidljiv je značajan pad ekspresije ovisan o vremenu. Stanice uzorkovane 48 sati nakon tretiranja molekulama siRNA pokazuju veću inhibiciju ekspresije nego one uzorkovane nakon 24 sata. S druge strane, inhibicija izoforme Hsp90 β pokazuje pad ekspresije koji je neznatan u usporedbi s inhibicijom ekspresije Hsp90 α , a također ovisan o vremenu sa također neznatnijom inhibicijom ekspresije tek 48 sati nakon uzorkovanja tretiranih stanica. Hsp70 proteini i Hsp27 proteini nisu pokazali značajniju promjenu ekspresije. Takva njihova gotovo početna ekspresija neznatno opada i s vremenom što se može pripisati činjenici da nakon što je ispravljanje trodimenzionalne strukture proteina klijenata inhibirane izoforme Hsp90 α obavljeno, koncentracije citosolnih Hsp70 i Hsp27 proteina 48 sati nakon tretiranja se vraćaju na one prije tretiranja stanica siRNA molekulama. Ekspresija spomenutih proteina klijenata (Cdk1, Cdk2 i pCdk1) šaperona Hsp90 bila je nepromijenjena što upućuje na to da je inhibicija Hsp90 siRNA molekulama nije imala utjecaj na njihovo pravilno smatanje. Ovo se može pripisati preusmjeravanjem intrastanične

signalizacije sa šaperonske aktivnosti Hsp90 proteina ka dovoljnoj kompenzatornoj aktivnosti šaperona Hsp 70 i Hsp27 na osiguravanje njihova pravilnog smatanja.

Premda su svi spominjani proteini toplinskog stresa tek dijelovi veoma kompleksnog sustava usko povezanog u složenoj unutarstaničnoj signalizaciji kojoj je cilj među ostalim obrana stanice od različitih štetnih utjecaja te regulacija staničnog ciklusa, navedeni rezultati u skladu su sa postojećim rezultatima prethodno proučenih studija. Uloga siRNA molekula pokazala se slabije učinkovita u inhibiciji šaperonske aktivnosti proteina toplinskog stresa Hsp90 za razliku od njegovih pravih inhibitora kao što su već spomenuti analogi geldanamicina (npr. 17-DMAG) u studijama gdje su se proučavali različiti načini inhibicije proteina toplinskog stresa s ciljem poboljšanja razumijevanja tumorogeneze i održavanja tumora kolona, jajnika, endometrija, želudca, gušterače i kod raznih poremećaja mijeloidne diferencijacije (Chen i sur., 2013). Od drugih zdravstvenih poremećaja uočena je važna veza inhibicije Hsp90 proteina siRNA molekulama i drugim (ne)peptidnim inhibitorima u poticanju diferencijacije ili zaustavljanju staničnog ciklusa u G2 fazi i posljedičnu indukciju apoptoze također na THP-1 stanicama (Forrest i sur., 2010), razvitka upale povezanog s nastankom pretilosti, dijabetesa i kardiovaskularnih oboljenja (Xie i sur., 2013), nastanku toplinskog stresa i gubitka mase kod miševa te srčanog udara povezanog s toplinom kao i rabdomioliza (Islam i sur, 2013). Proučavan je i monocitno-makrofagni odgovor uz proupalne medijatore kao što je npr. LDL gdje su THP-1 stanice ujedno oponašale *in situ* promjene makrofaga u adipoznom tkivu pretilih ispitanika i bile dio aterosklerotskih lezija (Qin, 2011).

siRNA molekule su široko prisutne u biljkama, životinjama i ljudima čime će pojašnjavanje mehanizma i funkcije siRNA molekula pružiti nam potrebnu molekularnu pozadinu za rasvjetljavanje brojnih bioloških procesa i neizlječivih bolesti kako u tumorima gdje je dokazano da mogu djelovati kao onkogeni ili tumor-supresorski geni tako i u drugim poremećajima. Iako primjena siRNA molekula u dijagnosticiranju i liječenju tumorskih bolesti pokazuje veliku nadu, još je ju je relativno teško dovesti do direktne kliničke primjene (Liu, 2013).

5. ZAKLJUČCI

- Tretiranjem THP-1 stanica siRNA molekulama došlo je do smanjenja ekspresije izoforme šaperona Hsp90 α , dok inhibicija ekspresije izoforme šaperona Hsp90 β nije uočena.
- Smanjenje ekspresije izoformi šaperona Hsp90 je ovisno o vremenu uz značajniju inhibiciju α izoforme.
- Tretiranje THP-1 stanica siRNA molekulama ne izaziva promjenu ekspresije Hsp70 i Hsp27 proteina.
- Tretiranje THP-1 stanica siRNA molekulama ne izaziva promjenu ekspresije proteina klijenata šaperona Hsp90.

6. LITERATURA

1. Asea AAA, Pedersen BK. Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology, Heat Shock Proteins Vol. 5. Springer, 2010, str. 4-5, 57-58.
2. Belmont P, Mariaule Gaele. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marked Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey; *Molecules*, 2014, 19, 14366-14382.
3. Chen YC, Wu MS, Lien GS, Shen SC, Yang LY. Hsp Inhibitors, Geldanamycin and Radicicol, Enhance Fisetin-Induced Cytotoxicity via Induction of Apoptosis in Human Colonic Cancer Cells. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 2013, 11 stranica.
4. Chung JH, Bunz F. Cdk2 Is Required for p53-Independent G2/M Checkpoint Control. *PLoS Genet*, 2010, 6, e1000863.
5. Cooper GM, Hausmann RE. Stanica, molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb, 2010, 143-146, 326-327.
6. Forrest ARR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, Lassmann T. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia*, 2010, 24, 460-466.
7. Garrido C, Multhoff G, Bruet M, Gehrman M, Schmitt E. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukocyte Biol*, 2007, 81, 15-27.
8. Garrido C, Parcellier A, Schmitt E. HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I- κ B α Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23, 5790-5802.
9. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*, 2003, 14, 1169–1176.

10. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *Embo J*, 1992, 11, 199 3995 – 4005.
11. Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins. *Biochemistry-Moscow+*, 2002, 67, 511-519.
12. Islam A, Deuster PA, Devaney JM, Ghimbovschi S, Chen Y. An Exploration of Heat Tolerance in Mice Utilizing mRNA and microRNA Expression Analysis. *PLoS ONE*, 2013, 8, e72258.
13. Madrigal-Matute J, Fernandez-Garcia CE, Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Munoz-Garcia B, Egido, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2012, 95, 116–123.
14. Meijer L, Borgne A, Mulner O. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk 5. *Eur J Biochem*, 2007, 243, 527-536.
15. Morimoto RI, Nollen EAA. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins. *J Cell Sci*, 2002, 115, 2809-2816.
16. Lees EM, Harlow E. Sequences within the Conserved Cyclin Box of Human Cyclin A Are Sufficient for Binding to and Activation of cdc2 Kinase. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 1194-1201.
17. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 2013, 140, 3079-3093.
18. Liu C. The role of microRNAs in tumors. *Arch Pharm Res*, 2013, 10.1007/s12272-013-0213-4.

19. Matthes Y, Raab M, Sanhaji M, Lavrik IN, Strebhardt K. Cdk1/Cyclin B1 Controls Fas-Mediated Apoptosis by Regulating Caspase-8 Activity. *Mol Cell Biol*, 2010, 30, 5726–5740.
20. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62, 670–684.
21. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 2012, 221, 2-11.
22. Slavotinek AM, Biesscker LG. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet*, 2001, 17, 528-535.
23. Stetler RA, Gao Y, Cao G, Sun D, Graham SH. Phosphorylation of HSP27 by Protein Kinase D Is Essential for Mediating Neuroprotection against Ischemic Neuronal Injury. *J Neurosci*, 2012, 32, 2667-2682.
24. Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I. Cdc25 Phosphatases Are Required for Timely Assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M Transition. *J Biol Chem*, 2010, 285, 16978–16990.
25. Tsaytler PA, Krijgsveld J, Goerdayal SS, Rudiger S, Egmond MR. Novel Hsp90 partners discovered using complementary proteomic approaches. *Cell Stress Chaperon*, 2009, 14, 629-638.
26. Tutar Y, Song Y, Masison DC. Primate Chaperones Hsc70 (Constitutive) and Hsp70 (Induced) Differ Functionally in Supporting Growth and Prion Propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2006, 172, 851-861.
27. Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W. Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer*, 2009, 8, 1-13.

28. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg*, 1999, 29, 749-751.
29. Xie W, Li M, Xu N, Lv Q, Huang N, He J, Zhang Y. miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. *PLoS ONE*, 2013, 8, e58639.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Proteini toplinskog stresa su ubikvintarna zaštitna skupina proteina iznimno važna u regulaciji brojnih staničnih funkcija. Pod tim uključujemo i posredno osiguravanje pravilnog smatanja i sprečavanja agregacije proteina ključnih u prelasku faza staničnog ciklusa iz jedne u drugu ulaskom u interakciju s njima sa ili bez potrošnje ATP-a. Proteini toplinskog stresa podijeljeni su po svojoj molekulskoj masi u brojne skupine, a za ovaj rad su najbitniji Hsp90 α , Hsp90 β , Hsp70 i Hsp27 koji spada u posebnu skupinu malih proteina toplinskog stresa. Proteine koje pravilno smata određena skupina proteina toplinskog stresa nazivamo njegovim proteinima klijentima. Slično kao i kod drugih Hsp proteina, proteini klijenti šaperona Hsp90 različiti su transkripcijski faktori i polimeraze, proteinske kinaze i skupina ostalih klijenata od kojih su svi veoma važni u radu kompleksne mreže unutarstanične signalizacije koja među ostalim kontrolira upalne procese, tumorigenezu, razvitak rezistencije na protutumorske lijekove, apoptozu, prelazak stanice kroz različite faze staničnog ciklusa, diferencijaciju itd. U kontroli staničnog ciklusa najznačajniji su nastanak kompleksa različitih proteina klijenata Hsp90, tzv. ciklin-ovisnih kinaza sa pripadajućim ciklinima. Samim time inhibitori Hsp90 proteina kao što je analog geldanamicina 17-DMAG ili siRNA molekule koje vežu sebi komplementarnu mRNA i onemogućavaju translaciju (tj. RNA interferencija) pokazali su obećavajući potencijal za uspješnu terapijsku primjenu.

U ovom radu tretirane su stanice THP-1 stanične linije akutne monocitne leukemije siRNA molekulama te se pratila ekspresija proteina Hsp90 α i β , Hsp70 i Hsp27 te aktivnost njihovih proteina klijenata Cdk1, Cdk2 i [pTyr¹⁵] Cdk1. Pokazalo se da je ekspresija Hsp90 α izoforme jedina značajnije smanjena ovisno o vremenu za razliku od β izoforme čija je ekspresija neznatno smanjena. Ekspresija Hsp70 i Hsp27 je također nepromijenjena i skoro ne opada s vremenom. Ekspresija proteina klijenata Hsp90 je ostala istom što se može pripisati kompenzatornom mehanizmu stanice da kod inhibicije Hsp90 proteina drugi proteini toplinskog stresa preuzmu njegovu šaperonsku aktivnost i osiguraju pravilno smatanje njegovih proteina klijenata.

Ključne riječi: Hsp90 proteini, siRNA molekule, RNA interferencija,

8. SUMMARY

Heat shock proteins are ubiquitous group of protector proteins which are extremely important in regulation of many cellular functions. That includes indirect ensuring of proper folding and preventing aggregation of proteins critical in cell cycle transition from one phase to another by joining to interact with them, with or without ATP consumption. Heat stress proteins are divided by their molecular mass in a number of groups, and the ones discussed in this paper are Hsp90 α , Hsp90 β , Hsp70 and Hsp27, which belongs to a special group of small heat shock proteins. Proteins that are properly folded by a particular group of heat shock proteins are called its client proteins. Similar to other Hsp proteins, client proteins of Hsp90 chaperone are different kinds of transcription factors and polymerases, protein kinases and a group of other clients of which all are very important in the work of a complex network of intracellular signaling that among other things controls inflammation, tumorigenesis, development of resistance to anti-tumor drugs, apoptosis, cells transition through different phases of the cell cycle, differentiation and so on. In controlling the cell cycle the most important is formation of complexes of Hsp90 client proteins called cyclin-dependent kinases with their appropriate cyclins. Therefore Hsp90 inhibitors such as geldanamycin analogue 17-DMAG or siRNA molecules that bind to the complementary mRNA and prevent translation (that is RNA interference) showed promising potential for a successful therapy.

In this paper, THP-1 cell line of acute monocytic leukemia was treated with siRNA molecules and the expression of Hsp90 α and β , Hsp70 and Hsp27 proteins and the activity of clients Cdk1, Cdk2 and [pTyr15] Cdk1 was observed afterwards . It has been shown that expression of only one isoform, Hsp90 α , was significantly reduced depending on time as opposed to β isoform whose expression is insignificantly reduced. The expression of Hsp70 and Hsp27 was also unchanged and it barely decreases with time. The expression of the Hsp90 client proteins remained the same, which is attributable to a compensatory mechanism of cell to inhibition of Hsp90 proteins where other heat stress proteins take its chaperone activity and ensure proper folding of its client proteins.

Keywords: Hsp90 proteins, siRNA molecules, RNA interference

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INHIBICIJA PROTEINA TOPLINSKOG STRESA HSP90 POMOĆU MALE INTERFERIRAJUĆE RNA

Hrvoje Knežević

SAŽETAK

Proteini toplinskog stresa su ubikvintarna zaštitna skupina proteina iznimno važna u regulaciji brojnih staničnih funkcija. Pod tim uključujemo i posredno osiguravanje pravilnog smatanja i sprečavanja agregacije proteina ključnih u prelasku faza staničnog ciklusa iz jedne u drugu ulaskom u interakciju s njima sa ili bez potrošnje ATP-a. Proteini toplinskog stresa podijeljeni su po svojoj molekularnoj masi u brojne skupine, a za ovaj rad su najbitniji Hsp90 α , Hsp90 β , Hsp70 i Hsp27 koji spada u posebnu skupinu malih proteina toplinskog stresa. Proteine koje pravilno smata određena skupina proteina toplinskog stresa nazivamo njegovim proteinima klijentima. Slično kao i kod drugih Hsp proteina, proteini klijenti šaperona Hsp90 različiti su transkripcijski faktori i polimeraze, proteinske kinaze i skupina ostalih klijenata od kojih su svi veoma važni u radu kompleksne mreže unutarstanične signalizacije koja među ostalim kontrolira upalne procese, tumorigenezu, razvitak rezistencije na protutumorske lijekove, apoptozu, prelazak stanice kroz različite faze staničnog ciklusa, diferencijaciju itd. U kontroli staničnog ciklusa najznačajniji su nastanak kompleksa različitih proteina klijenata Hsp90, tzv. ciklin-ovisnih kinaza sa pripadajućim ciklinima. Samim time inhibitori Hsp90 proteina kao što je analog geldanamicina 17-DMAG ili siRNA molekule koje vežu sebi komplementarnu mRNA i onemogućavaju translaciju (tj. RNA interferencija) pokazali su obećavajući potencijal za uspješnu terapijsku primjenu.

U ovom radu tretirane su stanice THP-1 stanične linije akutne monocitne leukemije siRNA molekulama te se pratila ekspresija proteina Hsp90 α i β , Hsp70 i Hsp27 te aktivnost njihovih proteina klijenata Cdk1, Cdk2 i [pTyr¹⁵] Cdk1. Pokazalo se da je ekspresija Hsp90 α izoforme jedina značajnije smanjena ovisno o vremenu za razliku od β izoforme čija je ekspresija neznatno smanjena. Ekspresija Hsp70 i Hsp27 je također nepromjenjena i skoro ne opada s vremenom. Ekspresija proteina klijenata Hsp90 je ostala istom što se može pripisati kompenzatornom mehanizmu stanice da kod inhibicije Hsp90 proteina drugi proteini toplinskog stresa preuzmu njegovu šaperonsku aktivnost i osiguraju pravilno smatanje njegovih proteina klijenata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 14 grafičkih prikaza, 7 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hsp90 proteini, siRNA molekule, RNA interferencija

Mentor: **Dr. sc. Jerka Dumić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

INHIBITION OF HEAT SHOCK PROTEIN HSP90 WITH SMALL INTERFERING RNA

Hrvoje Knežević

SUMMARY

Heat shock proteins are ubiquitous group of protector proteins which are extremely important in regulation of many cellular functions. That includes indirect ensuring of proper folding and preventing aggregation of proteins critical in cell cycle transition from one phase to another by joining to interact with them, with or without ATP consumption. Heat stress proteins are divided by their molecular mass in a number of groups, and the ones discussed in this paper are Hsp90 α , Hsp90 β , Hsp70 and Hsp27, which belongs to a special group of small heat shock proteins. Proteins that are properly folded by a particular group of heat shock proteins are called its client proteins. Similar to other Hsp proteins, client proteins of Hsp90 chaperone are different kinds of transcription factors and polymerases, protein kinases and a group of other clients of which all are very important in the work of a complex network of intracellular signaling that among other things controls inflammation, tumorigenesis, development of resistance to anti-tumor drugs, apoptosis, cells transition through different phases of the cell cycle, differentiation and so on. In controlling the cell cycle the most important is formation of complexes of Hsp90 client proteins called cyclin-dependent kinases with their appropriate cyclins. Therefore Hsp90 inhibitors such as geldanamycin analogue 17-DMAG or siRNA molecules that bind to the complementary mRNA and prevent translation (that is RNA interference) showed promising potential for a successful therapy.

In this paper, THP-1 cell line of acute monocytic leukemia was treated with siRNA molecules and the expression of Hsp90 α and β , Hsp70 and Hsp27 proteins and the activity of clients Cdk1, Cdk2 and [pTyr15] Cdk1 was observed afterwards. It has been shown that expression of only one isoform, Hsp90 α , was significantly reduced depending on time as opposed to β isoform whose expression is insignificantly reduced. The expression of Hsp70 and Hsp27 was also unchanged and it barely decreases with time. The expression of the Hsp90 client proteins remained the same, which is attributable to a compensatory mechanism of cell to inhibition of Hsp90 proteins where other heat stress proteins take its chaperone activity and ensure proper folding of its client proteins.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 14 figures, 7 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hsp90 proteins, siRNA molecules, RNA interference, 17-DMAG

Mentor: **Jerka Dumić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.

