

# Učinak DMAG-a i utišavanja Hsp90 na vijabilnost THP-1 stanica

---

Živković, Dubravka

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:608725>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Dubravka Živković**

**Učinak DMAG-a i utišavanja Hsp90 na  
vijabilnost THP-1 stanica**

**DIPLOMSKI RAD**

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Molekularna dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i prof. dr. sc. Józsefa Petrika.

Zahvaljujem se svojim mentorima prof. dr. sc. Karmeli Barišić i prof. dr. sc. Józsefu Petriku na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali ove godine studiranja.

Najveće hvala mojim roditeljima i Josipu na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci tokom studiranja.

# SADRŽAJ

1	Uvod.....	1
1.1	Apoptoza.....	1
1.1.1	Kaspaze: izvršitelji apoptoze .....	3
1.1.2	Vanjski mehanizam pokretanja apoptoze .....	3
1.1.3	Unutarnji mehanizam pokretanja apoptoze .....	4
1.2	Detekcija apoptoze .....	5
1.2.1	Morfološke tehnike .....	6
1.2.2	Imunohistokemijske tehnike .....	7
1.2.3	Biokemijske tehnike .....	8
1.2.4	Imunokemijske tehnike.....	9
1.2.5	Tehnike molekularne biologije .....	9
1.3	Proteini toplinskog stresa.....	10
1.3.1	Hsp 90.....	10
1.4	RNA interferencija .....	12
1.4.1	siRNA .....	14
2	Obrazloženje teme .....	16
3	Materijali i metode.....	17
3.1	Materijali .....	17
3.1.1	Kemikalije .....	17
3.1.2	Oprema .....	17
3.1.3	Stanične linije .....	17
3.1.4	Opis priprave korištenih otopina .....	17
3.2	Metode .....	17
3.2.1	Procjena preživljenja stanica bojanjem tripanskim plavilom .....	17
3.2.2	TUNEL reakcija .....	20
4	Rezultati i rasprava .....	21

4.1	Rezultati.....	21
4.1.1	Rezultati dobiveni bojenjem tripanskim plavilom.....	21
4.1.2	Rezultati dobiveni TUNEL reakcijom.....	24
4.2	Rasprava .....	27
5	Zaključci .....	30
6	Literatura.....	31
7	Sažetak / Summary .....	35
7.1	Sažetak.....	35
7.2	Summary.....	36
8	Prilozi.....	37
	Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card.....	

# 1 UVOD

## 1.1 APOPTOZA

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanja stanične homeostaze, tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života. 1972. godine Kerr i suradnici jasno su je, na osnovi morfoloških karakteristika, odvojili od druge vrste stanične smrti, nekroze, te potvrdili njezinu pojavnost u odraslom organizmu, a koja se nastavlja sve do smrti. Apoptoza pojedinačnih stanica traje od 6 do 24 sata (Elmore, 2007; Žlender, 2006; Žlender, 2003).

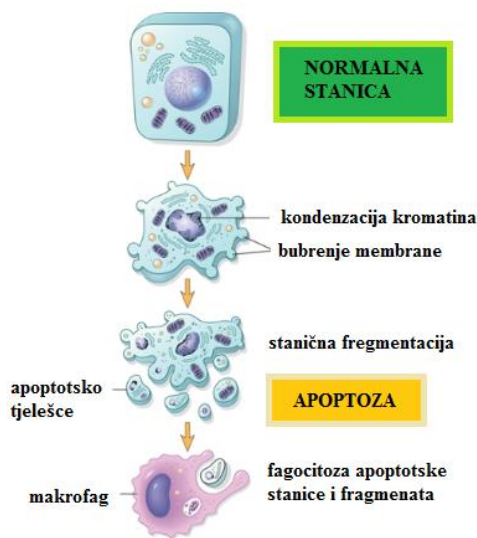
Apoptoza može nastati zbog slabljenja ili izostanka (pozitivnih) signala potrebnih za preživljavanje stanica ili zbog primanja (negativnih) signala (Žlender, 2003). Kontinuirana signalizacija čimbenicima rasta, hormonima, citokinima, ali i međuodnos između dvije susjedne stanice te između stanice i matriksa potrebni su kako ne bi došlo do pokretanja procesa programirane stanične smrti ili apoptoze (Vermes i sur., 2000). Stanice pokreću apoptozu u sklopu različitih fizioloških procesa ili zbog patoloških oštećenja stanice (uzrokovanih različitim vanjskim ili unutrašnjim čimbenicima), zbog čega one postaju opasne i/ili nekorisne za organizam (Elmore, 2007; Žlender, 2003).

Premali broj apoptoza u organizmu može dovesti do malignih bolesti, limfoproliferativnih bolesti, otpornosti prema kemoterapiji, učestalosti virusnih infekcija ili pojave autoimunih bolesti. Prevelik broj apoptoza u organizmu može dovesti do deficijencije imuniteta te degenerativnih stanja (Elmore, 2007; Vermes i sur., 2000).

Nekroza ili akutna patološka smrt jest proces koji nastaje nakon opsežnih kemijskih, biokemijskih, mehaničkih i sličnih oštećenja stanice. Nekroza je okarakterizirana bubrenjem i puknućem stanične membrane i organela, dolazi do izlivanja staničnog sadržaja i na taj način do onečišćenja i upalnih promjena okolnog tkiva (Karlović i Buljan, 2008). Apoptoza se razlikuje od nekroze morfološki, biokemijski i molekularno (Vermes i sur., 2000). Katkad isti uzrok u nekom tkivu dovodi do istodobne pojave i nekroze i apoptoze. Hoće li će stanica umrijeti apoptozom ili nekrozom ovisi o koncentraciji nekog štetnog čimbenika ili dužini trajanja njegovog djelovanja, tipu oštećenja uzrokovanim navedenim čimbenicima, te o vrsti stanica (Karlović i Buljan, 2008).

Apoptotične stanice podliježu nizu vidljivih morfoloških promjena na putu do svoje smrti. Pojave koje karakteriziraju stanice u apoptozi su: 1. kondenzacija kromatina i stvaranje

mjehurića na membranama, 2. kidanje molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) na ulomke veličine nukleosoma, 3. razlaganje citoskeleta i formiranje apoptotičkih tjelešaca (Slika 1.) (Petrik i sur, 2003a). Makrofagi i susjedne stanice odmah prepoznaju i fagocitiraju takve apoptotične stanice i stanične fragmente, tako da se stanice koje umiru apoptozom učinkovito uklanjaju iz tkiva, ne izazivajući upalni proces. Tijekom apoptoze fosfatidilserin (PS, engl. *phosphatidylserine*) se premješta na staničnu površinu gdje ga prepoznaju specifični receptori izraženi na fagocitima (Cooper i sur., 2010; Kujundžić i sur., 2003; Žlender, 2003).



Slika 1. Morfološke promjene u apoptozi (preuzeto i prilagođeno prema: <http://emcephalgia.com/acem-primary-exam-notes/physiology/basic-physiology/cell-growthinjury-necrosis/>).

U sisavaca su opisana dva glavna puta programirane stanične smrti, unutarnji i vanjski, a oba u konačnici rezultiraju aktivacijom izvršnih kaspaza. Apoptoza pokrenuta putem "receptora smrti" uobičajeno se naziva vanjskim putem, za razliku od unutarnjeg puta koji ovisi o općem metaboličkom stanju stanice i signalima prenošenim kroz mitohondrije (Janković i Markotić, 2007). Iako je način aktivacije ovih putova različit, između njih postoji povezanost, a na kraju, oba puta izazivaju karakteristične biokemijske i strukturne promjene stanice svojstvene apoptozi (Karlović i Buljan, 2008).

### 1.1.1 Kaspaze: izvršitelji apoptoze

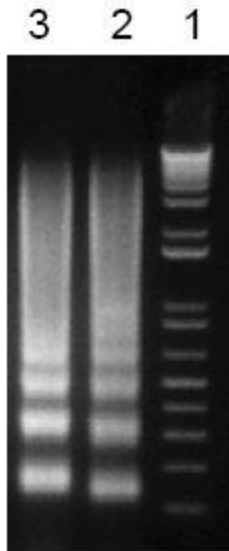
Kaspaze su proteaze koje imaju cisteinske (Cys) ostatke na svojim aktivnim mjestima i kidaju proteinski supstrat iza aspartata (Asp). Do sada je otkriveno i identificirano 14 takvih enzima u sisavaca. Dijele se na one koje su potrebne za dozrijevanje citokina, kao što su kaspaze 1, 4 i 5, i one koje su izravno uključene u proces apoptoze. Kaspaze, koje sudjeluju u procesu apoptoze, prema strukturnim i funkcijskim obilježjima dijele se u dvije skupine: inicijacijske kaspaze (kaspaze 8, 9 i 10) i izvršne kaspaze (kaspaze 3, 6 i 7) (Cooper i sur., 2010; Janković i Markotić, 2007). Kaspaze su konačni efektori ili izvršitelji programirane stanične smrti koji uzrokuju apoptozu kidanjem više od stotinu različitih ciljnih proteina u stanici. Jedna od ključnih meta kaspaza je inhibitor DNaze koji je u svom aktivnom obliku odgovoran za fragmentaciju jezgrine DNA. Sve se kaspaze sintetiziraju kao inaktivne preteče, a pretvaraju se u aktivni oblik proteolitičkim kidanjem koje kataliziraju druge kaspaze. Inicijatorske kaspaze aktiviraju se kao izravni odgovor na signale koji uzrokuju apoptozu. Inicijatorske kaspaze tada kidaju i aktiviraju efektorske kaspaze koje su odgovorne za razgradnju ciljnih staničnih proteina koji posreduju u događajima apoptoze (Cooper i sur., 2010).

### 1.1.2 Vanjski mehanizam pokretanja apoptoze

Vanjski put aktiviraju ligandi vezanjem na receptore smrti. Ti receptori mogu biti različiti, a pripadaju receptorskoj obitelji tumorskih nekrotizirajućih faktora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*). TNF-receptorska obitelj skupina je membranskih proteina koja se proteže od vanjske do unutrašnje površine membrana stanica. U njih se ubrajaju receptor za Fas (CD95, Apo1), receptori za ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (TRAIL-R1 i TRAIL-R2, engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 i 2*) i receptor za sam faktor tumorske nekroze (TNFR-1, engl. *tumor necrosis factor receptor*). Vezanjem liganada (FasL/CD95, TNF, TRAIL) na pripadajući receptor smrti dolazi do trimerizacije receptora i regrutacije adaptorskih proteina i stvaranja signalnog kompleksa koji inducira smrt (DISC, engl. *death inducing signaling complex*). Citoplazmatski dijelovi receptora nazivaju se domene smrti (DD, engl. *death domain*). Pozicioniranjem prokaspaze 8 i/ili 10 proksimalno u DISC-u putem efektorske domene smrti (DED, engl. *death effector domain*) dolazi do aktivacije navedenih kaspaza. Razina aktivacije kaspaze 8 upravlja daljnjim slijedom događaja. Ukoliko je razina dovoljna, dolazi do izravne aktivacije kaspaze 3 i posljedične smrti stanice (Slika 3.). U slučaju nedovoljne količine aktivirane kaspaze 8, apoptoza se nastavlja amplifikacijom kroz mitohondrije i to putem aktivacije proteina Bid (Janković i



Markotić, 2007; Žlender, 2003). Nakon vezivanja liganada na receptore, na taj kompleks vežu se molekule prilagodbe i inicijacijske kaspaze (kaspaza-8 i kaspaza-10). To dovodi do aktivacije prokaspaza, do kidanja izvršnih kaspaza 3 i 7, kidanja jezgrine DNA u fragmente veličine oko 200 parova baza, tzv. „ljestve“, te konačno do osobitih strukturnih promjena (Slika 2.) (Karlović i Buljan, 2008).



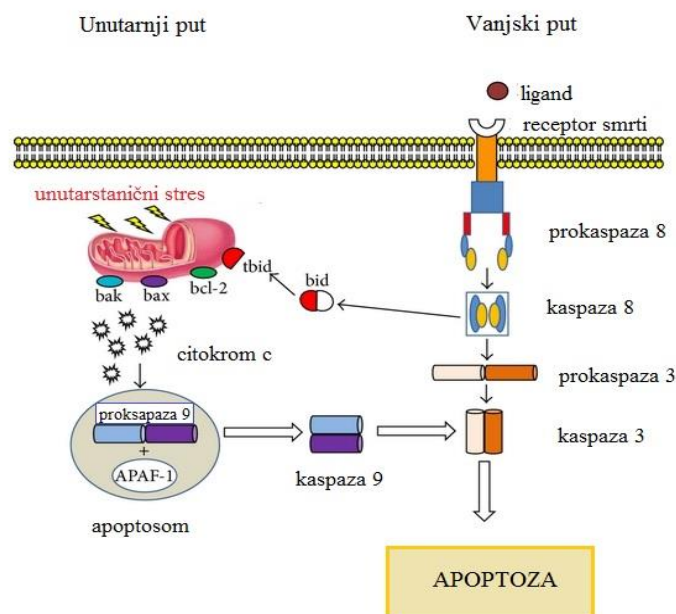
Slika 2. Prikaz gel-elektroforeze DNA iz apoptotične stanice, tzv. "ljestve" (preuzeto prema: <http://www.abcam.com/apoptotic-dna-ladder-isolation-kit-ab65627.html>).

### 1.1.3 Unutarnji mehanizam pokretanja apoptoze

U slučajevima kada je oštećenje DNA uzrok pokretanja smrti stanice ključni protein jest p53 koji je u normalnim stanicama prisutan u inaktivnom obliku. Sposobnost p53 da zaustavi proliferaciju stanica jest njegova funkcija tumorskoga supresora. Mnogi tumori odnosno tumorske stanice imaju mutiran gen za sintezu p53 proteina. Oštećenja DNA potiču transkripcijsku aktivnost p53 i njegovo nakupljanje u stanici, a posljedično dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u G1-fazi i popravljivanja oštećene DNA ili do pokretanja apoptoze stanice ako su ta oštećenja nepopravljiva (Žlender, 2003).

Unutarnji put može aktivirati oštećenje DNA, nedostatak hormona rasta, prisutnost dvolančane RNA (dsRNA, engl. *double stranded ribonucleic acid*), kemoterapijski agensi ili virusna infekcija (Janković i Markotić, 2007). Unutarnji put započinje otvaranjem pora na mitohondrijskoj membrani, otpuštanjem citokroma c (i drugih proteina) iz mitohondrija, stvaranjem Apaf-1 čimbenika (engl. *apoptotic protease activating factor*) te stvaranjem apoptosoma (Slika 3.) (Karlović i Buljan, 2008). Apoptosom je sastavljen od citokroma c,

kaspaze-9 i Apaf-1 čimbenika. Taj je kompleks zadužen za aktivaciju prokaspaze-9 i pokretanje izvršnih kaspaza. Unutarnji apoptotički put ovisan je o adenosin-trifosfatu (ATP, engl. *adenosine triphosphate*) (Janković i Markotić, 2007). Ključni u regulaciji apoptoze, odnosno preživljenja stanica, su članovi obitelji protein B limfoma tipa 2 (Bcl-2, engl. *B cell lymphom 2 protein*). Bcl-2 proteini obuhvaćaju proapoptotske (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik) i antiapoptotske (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1) proteine (Karlović i Buljan, 2008). Omjer proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika određuje osjetljivost stanice na apoptozu (Žlender, 2003). Bcl-2 proteini kontroliraju (izravno ili vezivanjem na proapoptotske proteine) propusnost mitohondrija oblikovanjem pora na vanjskoj membrani ili reguliranjem otvaranja i zatvaranja pora za propusnost (engl. *permeability pores*) (Karlović i Buljan, 2008). Bax sadržava mjesta za vezanje p53 proteina tako da je njegova funkcija i regulirana ovisno o oštećenju DNA i porastu p53 u citosolu stanice (Žlender, 2003).



Slika 3. Prikaz unutarnjeg i vanjskog puta apoptoze (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/616149/fig1/>).

## 1.2 DETEKCIJA APOPTOZE

Kod testova koji se koriste za detekciju apoptoze, smatra se da je osim kvantifikacije opsega apoptoze, važno i moći razlikovati različite putove apoptoze. Metode koje se koriste za detekciju prisutnosti apoptoze mogu se podijeliti u skupine:

1. morfološke tehnike

2. imunohistokemijske tehnike
3. biokemijske tehnike
4. imunološke tehnike
5. tehnike molekularne biologije

Postoje preklapanja u značajkama različitih vrsta smrti stanice, stoga jedna metoda nije dovoljna za potvrdu apoptoze. No, te metode ne smiju biti iz iste skupine. Npr. ako se detekcija apoptoze bazira na morfološkom izgledu jezgre, potvrda se provodi biokemijskom metodom kao što je agarozna gel elektroforeza kojom se dokazuje kidanje DNA (Ulukaya i sur., 2011).

### **1.2.1 Morfološke tehnike**

Većina strukturnih promjena može se detektirati pomoću svjetlosnog mikroskopa. U *in vitro* uvjetima prilikom detekcije apoptoze na kulturama stanica, često se uvode dodatni testovi i boje (MTT test, tripansko plavilo, Giemsa, hematoksilin) koje omogućavaju lakšu diferencijaciju živih stanica, u odnosu na one u kojima su započeli procesi staničnog umiranja (Ulukaya i sur., 2011; Žlender, 2006). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) test je prvi homogeni test vijabilnosti stanica. Žive stanice s aktivnim metabolizmom konvertiraju MTT u ljubičasto obojeni formazan koji apsorbira na 570 nm. Kada stanice umiru, gube mogućnost konverzije MTT-a u formazan. Na taj način promjena boje pomaže pri raspoznavanju živih stanica (Riss i sur., 2016). Bojenjem stanica tripanskim plavilom, žive stanice ostaju nebojane, dok se one mrtve oboje plavo. Ovim postupkom ne mogu se razlikovati nekrotične od apoptotičnih stanica. Metoda bojenja stanica Giemsa bojom, brza je i jeftina metoda kojom se promatra morfologija stanice. Slično toj metodi, postoji i metoda bojenja hematoksilinom, pri čemu se također promatra stanična morfologija (Ulukaya i sur., 2011).

Pomoću fluorescentne mikroskopije može se bolje uočiti razlika između živih i mrtvih stanica (Ulukaya i sur., 2011). Fluorescentna mikroskopija također se u velikoj mjeri koristi pri detektiranju brojnih morfoloških i biokemijskih apoptotičkih promjena koje se mogu vizualizirati specifičnim fluorokromima (Žlender, 2006). Kod ove vrste mikroskopije koriste se sljedeće boje: Hoechst, propidijev jodid i akridin oranž. Stanice se obojavu Hoechst 33342 bojom prilikom promjena u organizaciji lipidnog sloja. Promjene u organizaciji lipida događaju se u ranoj fazi apoptoze, prije ostalih apoptotskih promjena, čime se omogućuje osjetljiva i rana detekcija apoptoze (Schmid i sur., 2007). Propidijevim jodidom obojavu se

nekrotične stanice, dok apoptotične ostaju nebojane. Razlog tome je intaktnost membrane koje apoptotične stanice imaju, ali ne i nekrotične stanice (Ulukaya i sur., 2011). Akridin oranž je metakromatski fluorokrom koji različito oboji dvostruke lomove DNA (zelena fluorescencija) naspram jednostrukih lomova (crvena fluorescencija). Na osnovi toga moguće je pratiti promjene u kondenzaciji i denaturaciji kromatina tijekom apoptoze (Ulukaya i sur., 2011; Žlender, 2006).

Kod proučavanja apoptoze, elektronski mikroskop smatra se "zlatnim standardom" jer su morfološke promjene najuočljivije (Ulukaya i sur., 2011). Velika prednost elektronske mikroskopije je njena visoka osjetljivost. Morfološke promjene mogu se otkriti na unutarstaničnoj razini, pri čemu se povećava osjetljivost i specifičnost u odnosu na svjetlosnu mikroskopiju. Otežavajuće okolnosti ove tehnike su zahtjevne pripreme materijala i ograničen broj stanica koje se mogu istraživati. Elektronska mikroskopija je specifična i osjetljiva tehnika, ali samo kao kvalitativna metoda u otkrivanju apoptoze (Petrik i sur., 2003a).

Fazno-kontrastnim mikroskopom detektiraju se umrle plutajuće stanice u staničnoj kulturi, a to je moguće jer se one za razliku od živih odvoje od stijenki posudice gdje stanice rastu (Ulukaya i sur., 2011).

## 1.2.2 Imunohistokemijske tehnike

Aneksin V obilježen sa fluorescentnom bojom kao što je fluorescein izocijanat (FITC, engl. *fluorescein-isothiocyanate*) detektira fosfatidilserin koji se translocira na vanjsku stranu membrane. Aneksin V je protein iz skupine aneksina koji označen fluorescentnim bojama specifično veže fosfatidilserin. Bojanje aneksinom V je vrlo specifična metoda, osobito u početnoj fazi apoptoze kada je očuvana cjelovitost stanične membrane, jer nakon fragmentacije DNA postupno dolazi i do promjene propusnosti stanične membrane. Jednako tako aneksin V će se vezati i na fosfatidilserin s unutrašnje membrane ako je narušena njezina cjelovitost, kao primjerice u slučaju nekroze stanice (Ulukaya i sur., 2011; Žlender, 2006; Petrik i sur., 2003a).

TUNEL (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase Mediated dUTP nick and labeling*) se koristi za označavanje jednostrukih i dvostrukih prekida lanca pomoću terminalne deoksiribonukleotidil-transferaze (Žlender, 2003). TUNEL metoda omogućuje detekciju apoptoze na razini jedne stanice, a kao uzorak mogu se koristiti suspenzija stanica, stanice koštane srži, tkiva uklopljena u parafinski blok ili fiksirana u formalinu, uzorak dobiven biopsijom, limfociti i leukemične stanice iz periferne krvi (Watanabe i sur., 1999; Roche, 2012). Stanične jezgre u kojima je došlo do fragmentiranja DNA, TUNEL-pozitivne

jezgre, emitiraju žuto-zelenu fluorescenciju (Petrik i sur., 2003b). TUNEL podrazumijeva obilježavanje 3'-OH krajeva pomoću nukleotida označenog fluorescein-izotiocijanatom, stvaranjem kompleksa fluorescein-deoksiuridin-trifosfat (dUTP, engl. *2'-deoxyuridine 5'-triphosphate*) (Žlender, 2006). Osjetljivost TUNEL metode limitirana je detekcijom kasne apoptoze kod koje se događa intranukleosomalna degradacija DNA. TUNEL metodom ne obojaju samo apoptotične stanice, već i neke nekrotične stanice. Proučavanje apoptoze i nekroze u jetri pokazalo je kako TUNEL može dovesti do pogrešnog zaključka ako ju koristimo kao metodu evaluacije načina smrti stanice (Watanabe i sur., 1999).

Aktivnost kaspaze može se odrediti imunohistokemijskim tehnikama, koristeći antitijela protiv neoepitopa, koji se otkrivaju nakon proteolitičke aktivacije kaspaza. Nadalje, aktivnost kaspaza može se detektirati primjenom antitijela koja prepoznaju samo već degradirane stanične supstrate kaspaza. U novije vrijeme opisana su antitijela koja prepoznaju razgrađeni citokeratin 18, aktin i poli-ADP-riboza-polimeraze (PARP, engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*) (Petrik i sur., 2003a).

### **1.2.3 Biokemijske tehnike**

Tijekom apoptoze aktivirane endonukleaze kidaju molekule DNA u ulomke koje su po veličini višekratnici 180-200 parova baza (zbog kidanja DNA između nukleosoma). Fragmentirana DNA u stanicama koje su podvrgnute apoptozi mogu se proučavati različitim tehnikama gel-elektroforeze kao što su konvencionalna gel-elektroforeza i elektroforeza u pulsirajućem polju. Nakon provedene konvencionalne elektroforeze na agaroznom gelu ovi fragmenti DNA izgledaju poput "ljestvi". Ograničavajuća okolnost ove metode je ta da je potrebno imati relativno velik broj stanica u apoptozi kako bi se degradacijski produkti mogli opaziti. Kod elektroforeze u pulsirajućem polju, promjenom električnog polja između parova elektroda, visokomolekularna DNA i DNA veličine kromosoma od 200 do preko 12000 kb mogu se odvojiti jer se mogu reorijentirati i različito pomicati kroz pore agaroznog gela. (Archana i sur., 2013; Petrik i sur., 2003a).

Razvijeno je mnogo tehnika za identifikaciju, kvantifikaciju i karakterizaciju apoptoze, no protočna citometrija je metoda izbora za proučavanje apoptotične kaskade u svezi sa staničnim tipom, poticajem i vremenom trajanja apoptoze (Vermes i sur., 2000). Bilo koji površinski protein, čija se ekspresija mijenja tijekom apoptoze, može se određivati protočnom citometrijom uz pomoć antitijela obilježenih fluorescentnom bojom (Ulukaya i sur., 2011). Protočna citometrija omogućava analizu velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu. Postupci manipuliranja sa stanicama u većini slučajeva vrlo su jednostavni (Petrik i

sur., 2003a). Prednost ove metode je mogućnost kombiniranja detekcije svjetlosnih signala, detektora prednjeg raspršenja (FSC, engl. *forward-angle light scatter*) i detektora bočnog raspršenja (SSC, engl. *side-angle light scatter*) s analizom staničnih pokazatelja u obliku fluorescentno obilježenih antitijela (Vermes i sur., 2000). Kako su apoptotične stanice kondenzirane (suprotno od nekrotičnih stanica koje nabubre), to rezultira smanjenjem raspršivanja svjetla, a bočno se raspršivanje slabo povećava. Kod ove tehnike kao uzorak koristimo suspenziju stanica (Petrik i sur., 2003a).

#### **1.2.4 Imunokemijske tehnike**

M30 antigen, odnosno degradiran citokeratin 18, novi je biopokazatelj apoptoze. Može se kvantitativno odrediti ELISA testom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Ulukaya i sur., 2011). Citoplazmatski fragmenti DNA (mono- i oligonukleosomalni) mogu se također detektirati pomoću ELISA metode, koristeći monoklonska protutijela za DNA i histone. Aktivnost efektorskih kaspaza koje kidaju vitalne dijelove stanice, koristi se za detekciju apoptoze, pri čemu najveću primjenu i pouzdanost ima lamin B. Lamin A, B i C su glavni strukturni proteini jezgrine ovojnice smješteni na njenoj unutrašnjoj strani. Njihova razgradnja tijekom apoptoze uzrokuje strukturne promjene jezgre i konačno gubitak njenog integriteta i fragmentaciju. Pomoću antitijela za lamin B moguće je imunohistokemijski odrediti pozitivan signal, tj. prstenasto obojenje kod stanica koje nisu u apoptozi i negativan signal kod stanica koje su u kasnijoj fazi apoptoze (Žlender, 2006).

Fluorometrijskom metodom određujemo aktivnost kaspaza (npr. kaspaze-3 ili kaspaze-9) u kulturi stanica. Aktivne kaspaze iz staničnog lizata najprije se vežu specifičnim antitijelima na mikrotitarsku pločicu. Zatim se dodaje supstrat kojeg degradiraju kaspaze. Intenzitet fluorescencije ovisi o aktivnosti kaspaze u uzorku (Ulukaya i sur., 2011).

#### **1.2.5 Tehnike molekularne biologije**

DNA microarray je nova i relativno skupa metodologija kojom se u jednoj reakciji odjednom može detektirati mnogo gena vezanih za apoptozu. Neke tvrtke su predstavile nove i učinkovite metode za detekciju gena vezanih uz apoptozu. Primjer tome je mogućnost analiziranja 84 gena/dijelova gena u jednoj reakciji odjednom koristeći mikrotitarsku pločicu od 96 jažica uz pomoć RT-PCR-a. Zbog toga što apoptoza zauzima vrlo važno mjesto u medicini, očekuje se velika promjena medicinske prakse u budućnosti otkrivanjem gena relevantnih za apoptozu uz pomoć metoda analiza genske ekspresije (Ulukaya i sur., 2011).

### 1.3 PROTEINI TOPLINSKOG STRESA

Proteini toplinskog stresa (Hsp, engl. *heat shock protein*) otkriveni su kao skupina proteina koji su snažno inducirani toplinskim šokom te ostalim kemijskim i fizičkim stresom kod velikog broja vrsta. Neki proteini iz ove velike obitelji djeluju kao molekularni šaperoni, proteini koji sudjeluju u procesu nabiranja, strukturiranja drugih proteina kako u fiziološkim uvjetima tako i u uvjetima stresa (Ciocca i Calderwood, 2005). Pojam šaperon prvi su upotrijebili Ron Laskey i suradnici da bi opisali protein (nukleoplazmin) koji je bio potreban za stvaranje nukleosoma iz histona i DNA (Cooper i sur., 2010). Hsp se mogu klasificirati prema relativnoj molekularnoj masi u nekoliko podobitelji: obitelj Hsp 110, obitelj Hsp 90, obitelj Hsp 70, Hsp 60 i obitelj malih Hsp-ova (Goloudina i sur., 2012). Hsp djeluju kao katalizatori koji olakšavaju udruživanje, a da se pri tome ne ugrađuju u kompleks. Važno je uočiti da ne prenose dodatne informacije potrebne za smatanje polipeptida u njihove pravilne trodimenzionalne konformacije već da je krajnja konformacija proteina određena isključivo slijedom aminokiselina. U odsutnosti ovih proteina, nesmotani ili djelomično smotani polipeptidni lanci bili bi nestabilni unutar stanice, pa bi se smatali nepravilno ili bi se agregirali u netopljive komplekse. Vežanje Hsp-a stabilizira aminoterminalni dio u nesmotanoj konformaciji sve dok preostali dio polipeptidnog lanca ne bude sintetiziran, odnosno dok se dovršeni protein ne bude mogao pravilno smotati (Cooper i sur., 2010).

Hsp su povećano eksprimirani kod širokog spektra humanih tumora i uključeni su u proliferaciju, diferencijaciju, invaziju te metastaziranje tumorskih stanica. Iako sama razina Hsp-a nije informativna na razini dijagnostike tumora, oni su korisni biopokazatelji za karcinogenezu u nekim tkivima i signal stupnja diferencijacije i agresivnosti nekih oblika tumora, kao i odgovora na antitumorsku terapiju (Sherman i Multhoff, 2015). Transkripcija gena za Hsp zahtijeva aktiviran *heat shock* transkripcijski faktor 1 (HSF1, engl. *heat shock factor 1*). Uočeno je da je povišena transkripcija *hsp* gena povezana s većom invazivnošću tumora i njihovoj sklonosti metastaziranju. Upletenost Hsp-a u progresiju tumora i odgovor na terapiju dovelo je do uspješne ciljane terapije koja ima dva glavna cilja: (1) farmakološku izmjenu ekspresije *hsp* gena ili aktivnosti molekularnih šaperona i (2) korištenje Hsp-a kod antitumorskih cjepiva, iskorištavajući njihovu sposobnost da djeluju kao imunološki adjuvansi (Ciocca i Calderwood, 2005).

#### 1.3.1 Hsp 90

Heat shock protein 90 (Hsp90) je molekularni šaperon ovisan o ATP-u koji je esencijalan kod eukariota. Potreban je za aktivaciju i stabilizaciju širokog spektra proteina (Li

i Buchner, 2012). Udio Hsp90 u citoplazmi iznosi 1-2 %, a može se povećati stresom do 4-6 % ukupnih proteina u citoplazmi (Goetz i sur., 2003). Strukturno, Hsp90 je fleksibilni dimer, a svaki monomer sastavljen je od 3 različite domene koje imaju različite konformacije (Li i Buchner, 2012). Poznato je da je N-terminalna domena važna za hidrolizu ATP-a u adenzin difosfat (ADP, engl. *adenosine diphosphate*) (Den i Lu, 2012). Kako bi postigao svoju funkciju, Hsp 90 djeluje s velikom skupinom kofaktora, nazvanim ko-šaperoni. Ko-šaperoni formiraju definirane binarne ili ternarne komplekse s Hsp90, koji olakšavaju sazrijevanje drugih proteina klijenata. Posttranslacijske modifikacije Hsp90, kao što su fosforilacija i acetilacija, pružaju drugi nivo regulacije. One utječu na konformacijski ciklus, interakciju sa ko-šaperonima i komunikaciju unutar domene (Li i Buchner, 2012).

Nakon brzog vezanja ATP-a, Hsp90 polako zauzima položaj prvog intermedijarnog stanja (I1), u kojem je poklopac za ATP zatvoren, ali N-domene su još uvijek otvorene. N-terminalna dimerizacija dovodi do stvaranja drugog intermedijarnog stanja (I2), gdje se M-domena premješta i dolazi u interakciju s N-domenom. Zatim Hsp90 dostiže potpuno zatvoreno stanje u kojem ATP hidrolizira. Nakon hidrolize ATP-a, N-domena disocira, oslobađa se ADP i anorganski fosfat (Pi), te se Hsp90 ponovno vraća u otvorenu konformaciju (Li i Buchner, 2012). Iako je vezanje supstrata za Hsp90 neovisno o ATP-u, otpuštanje supstrata zahtijeva hidrolizu molekule ATP-a. Ciklus vezanja supstrata za Hsp90 i otpuštanja tih istih supstrata zahtijeva interakciju sa ko-šaperonima Hop, p23 i Cdc37 (Morimoto i Nollen, 2002). Postoje dvije izoforme Hsp90 kod ljudi,  $\alpha$  i  $\beta$  izoforme, koje pokazuju visoku homologiju u strukturi i bez velikih razlika u njihovoj aktivnosti (Goetz i sur., 2003).

Postoji više od 175 proteina s kojima Hsp-i stupaju u interakciju i uključuju u mnoge stanične putove (npr. kontrola staničnog ciklusa, proliferativna/antiproliferativna signalizacija) (Den i Lu, 2012). Većina proteina klijenata Hsp90 su proteini koji sudjeluju u prijenosu signala, uključujući receptore steroidnih hormona (npr. androgeni, estrogenski receptori), različite proteinske kinaze (npr. Akt, MEK), te strukturne proteine (npr. tubulin, aktin) (Den i Lu, 2012; Cooper i sur., 2010; Morimoto i Nollen, 2002).

Farmakološka inhibicija Hsp90 destabilizira protein i dovodi do degradacije putem proteasoma. Zbog toga što je Hsp90 uključen u više ključnih putova kritičnih za preživljavanje stanica, njegova inhibicija u više tumorskih modela životinja postiže značajne rezultate kod antitumorske terapije (Den i Lu, 2012). Još od 1980.-ih godina poznato je da geldanamycin (GA; NSC 122750) ima antitumorska svojstva. U početku se mislilo da je



njegova funkcija blokiranja kinaza, no daljnja istraživanja su otkrila kako GA blokira vezanje ATP-a na Hsp90 u njegovoj aktivnoj konformaciji. Analog geldanamicina, 17-(dimetilaminoetilamino)-17-demetoksigidanamicin (DMAG; NSC 707.545), hidrofilni je GA derivat koji se može davati oralno uz dobru biodostupnost i bolju aktivnost *in vitro* i *in vivo* nego njegov prethodnik 17-(alilamino)-17-demetoksigidanamicin (17-AAG) (Koll i sur., 2008). 17-AAG i DMAG se vežu na ATP/ADP vezujuće mjesto na Hsp90, inhibirajući vezanje ATP-a i samim time i funkciju šaperona. Time se uzrokuje pogrešno savijanje, poliubikvitinilacija i degradacija proteina klijenata Hsp 90. Posljedica tih događaja su zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptoza (Rao i sur., 2009). DMAG se pokazao učinkovit kao samostalna terapija kod tumora, ali i u kombinaciji s kemoterapijom (Den i Lu, 2012). Trenutno postoji 10 različitih inhibitora Hsp90 proteina, koji su u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Li i Buchner, 2012).

#### **1.4 RNA INTERFERENCIJA**

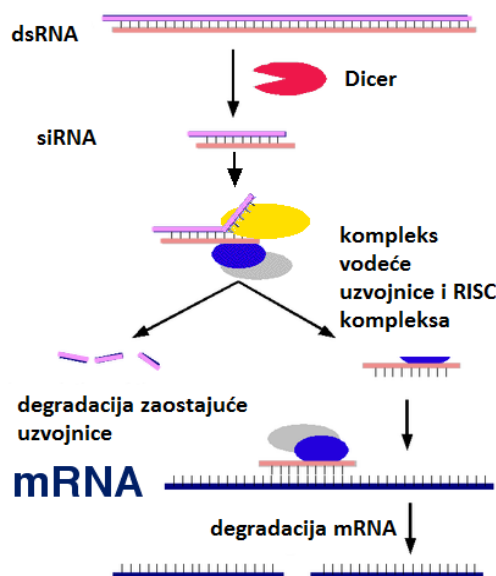
Transkripcija je proces u jezgri kojim RNA-polimeraza II prepisuje slijed gena sa DNA i nastaje glasnička RNA, mRNA (engl. *messenger RNA*). Translacijom mRNA nastaju proteini, komponente stanice koje sudjeluju u mnogim procesima. Kako bi se mRNA prevela u protein, mRNA se prvo mora premjestiti iz jezgre u citoplazmu. Ribosomi, koji se nalaze na endoplazmatskom retikulumu ili slobodni u citoplazmi, prevode mRNA u proteinski lanac. Taj proces RNA interferencija pokušava inhibirati (Chery, 2016).

RNA interferencija (RNAi, engl. *RNA interference*) je stanični put utišavanja ekspresije gena na razini mRNA (Cioca i sur., 2003). Cijeli proces utišavanja ekspresije gena je jednostavan, brz i učinkovit, a prisutan je u različitim organizmima (Agrawal i sur., 2003; Cooper i sur., 2010). RNAi je prvi put otkriven u nematoda *Caenorhabditis elegans*, ali je prisutna i u mnogim drugim organizmima poput voćne mušice (*Drosophila melanogaster*), kukaca, protozoa i hidra i čini se da predstavlja drevni put. Kako su razne istraživačke skupine uvidale tragove da stanice imaju neki novi način da se isključe ili "utišavaju" geni, ovaj je fenomen dobio niz imena kao što su kosupresija, gušenje, utišavanje gena, te RNAi. RNAi je uključena u stanični mehanizam obrane protiv virusa i u premještanje transpozona u genomu (Cioca i sur., 2003).

RNAi je obično pokrenuta endogenom malom interferirajućom RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) no također može biti aktivirana injektiranjem egzogene dvolančane RNA. Kako stanice sisavaca ne mogu pocijepati dsRNA na male interferirajuće RNA,

injekcija dugačke dsRNA pokreće otpuštanje interferona. Kasnije je otkriveno da 21 nukleotid dugačke RNA molekule mogu uz pomoć mehanizma RNAi utišati gene u stanicama sisavaca. Postoje tri vrste malih RNA koje mogu utišati mRNA u citoplazmi mehanizmom RNAi: piwi-RNA (piRNAs), mikroRNA (miRNA, engl. *microRNA*) i siRNA (Chery, 2016).

Posljedica razgradnje RNA na kratke RNA koje aktiviraju ribonukleaze je utišavanje gena (Agrawal i sur., 2003). Osnovni mehanizam RNAi je razdvajanje i kidanje dvolančane RNA (dsRNA) koja odgovara specifičnoj sekvenci gena na kratke dijelove koji se nazivaju interferirajuće RNA. Te interferirajuće RNA aktiviraju degradaciju mRNA koja odgovara njihovoj sekvenci. Brojne genetske i biokemijske analize otkrile su da se mehanizam utišavanja gena RNA interferencijom odvija u dva koraka. Prvi korak uključuje kidanje dsRNA na male interferirajuće RNA (siRNA), veličine od 21 do 25 nukleotida, putem aktivnosti RNaze III. U drugom koraku, siRNA se veže na kompleks RNaze, RNA-induciran stišavajući kompleks (RISC, engl. *RNA-induced silencing complex*) koji razgrađuje mRNA. Nekoliko ključnih komponenti uključenih u RNAi poput Dicer-a, RNA-ovisne-RNA-polimeraze, helikaze i dsRNA-endonukleaze pronađene su kod različitih organizama (Slika 4.) (Agrawal i sur., 2003). U ovom radu korišten je mehanizam RNA interferencije uz pomoć siRNA, tako da će naglasak biti stavljen na siRNA i njeno procesuiranje, prednosti i mane pri dostavljanju u stanice, te potencijal siRNA kao lijeka.



Slika 4. Mehanizam RNA interferencije (preuzeto i prilagođeno prema: <https://legumelaboratory.wordpress.com/2015/08/28/rna-interference-sprays-as-an-alternative-to-transgenic-agriculture/>).

### 1.4.1 siRNA

Dvolančana mala interferirajuća RNA (siRNA) inkorporira se u RISC kompleks, poslije čega ATP-ovisna helikaza odmota dupleks, omogućujući jednoj od uzvojnica da samostalno prepozna glasničku RNA (mRNA). Vodeća uzvojnica siRNA komplementarna je mRNA, a zaostajuća uzvojnica pruža stabilnost dsRNA. Ago 2 (Argonaute 2 protein), dio RISC kompleksa, odabire koja će od dvije uzvojnice biti vodeća, dok drugu uzvojnici razgrađuje i udaljuje od RISC kompleksa. Ago 2 se sastoji od dvije različite domene: Piwi domane i PAZ domene (Piwi-Argonaute-Zwille), koje se vežu na 5' i 3' kraj vodeće uzvojnice (Matokanović i Barišić, 2009). Nakon što se siRNA vezala za ciljnu mRNA s potpunom komplementarnošću, Ago2 kida mRNA 10 ili 11 nukleotida nizvodno od 5' kraja gdje se vodeća uzvojnica vezala (Chery, 2016).

Utišavanje gena pomoću siRNA koja se transfekcijom unosi u stanice kod sisavaca je dugotrajna. Utišavanje gena ovisi o broju siRNA molekula ubačenih u stanicu, te se broj dupleksa po stanici smanjuje kako se stanica dijeli. Kod mnogih bolesti, posebno karcinoma, koje su karakterizirane nekontroliranom diobom stanica, ponovna supresija ciljnog gena je nužna kako bi se spriječila progresija bolesti. Terapija siRNA uvjetuje ponovnu transfekciju stanica utišavajućom siRNA. Kako je upotreba siRNA postala sve raširenija, bazična struktura učinkovite siRNA definira se kao dvolančana mala RNA koja prosječno sadrži 21 nukleotid, a 2 nukleotida strše na 3' kraju (Matokanović i Barišić, 2009).

Izazovi koje sa sobom nosi tehnologija utišavanja gena uz pomoć siRNA molekula uključuju *off-target* učinke, učinkovitost terapije, dostavu siRNA molekule te aktivaciju imunskog sustava. Kada se odabere specifičan gen, ciljna sekvenca mora biti identificirana kako bi se postiglo uspješno utišavanje gena s minimalnim *off-target* učincima. siRNA bi trebala biti potpuno komplementarna mRNA. *Off-target* učinci dolaze do izražaja u dvije situacije. Prva opisuje vezanje siRNA na neku drugu mRNA s nedovoljnom komplementarnošću i time se utišava neka druga mRNA. Druga situacija predstavlja ulazak siRNA u endogeni miRNA sustav, koji tolerira nepotpuno sparivanje za ciljnu mRNA izvan područja djelovanja miRNA na mRNA slijedu, utišavajući tu mRNA. Najveći problem RNAi su ovi *off-target* učinci. Oni se događaju jer siRNA može ciljati više mRNA zbog toga što tolerira nekoliko krivo sparenih baza prilikom sparivanja sa mRNA. Jedna krivo sparena baza između siRNA i ciljne mRNA može značajno smanjiti učinkovitost specifičnog utišavanja. No, s druge strane, siRNA može utišati ekspresiju drugih gena koji sadrže regiju gena koja je parcijalno komplementarna (Chery, 2016; Matokanović i Barišić, 2009).

Ciljanje siRNA na identičnu regiju na mRNA može imati varirajuću učinkovitost. Postoji više razloga zašto je to tako, a neki od njih su kemijske modifikacije siRNA, stabilnost hibrida siRNA i ciljne sekvence, termodinamika integracije siRNA u RISC kompleks (Chery, 2016). RNA molekule su nestabilne, a samim time ih je teško dostaviti u ciljane tkiva u dovoljnim količinama zbog bubrežnog klirensa i degradacije nukleazama u krvotoku. Prijenos i dostava siRNA je limitirana brzom degradacijom, nedovoljnim ulaskom u ciljane stanice, nemogućnosti prolaska kroz biološke barijere, te ulaskom siRNA u neželjena tkiva i stanice što dovodi do neželjenog utišavanja gena i toksičnosti (Shahabipour i sur., 2016).

Dostava siRNA može se odvijati na više načina: 1. uz upotrebu kemijskih modifikacija, 2. uz pomoć viralnih vektora, egzosoma, lipidnih nanočestica (LNP, engl. *lipid nanoparticle*) 3. elektroporacijom, 4. topičkim gelovima, 5. kompleksiranjem s atelokolagenom, kitozanom, polietiliminom (PEI, engl. *polyethylenimine*), kolesterolom, te litoholnom ili lauričnom kiselinom (Shahabipour i sur., 2016; Zatsepin i sur., 2016; Matokanović i Barišić, 2009).

Iako dostava siRNA putem virusa postiže dugotrajno utišavanje gena u ciljnom tkivu, viralni vektori uzrokuju probleme poput toksičnosti i imunostimulacije. Zbog svoje unikatne veličine, strukturalnih i funkcionalnih karakteristika, egzosomi su postali važan novi način dostave za biološke terapeutike i dijagnostičke molekule, uključujući siRNA i rekombinantne proteine. Prednost dostave siRNA putem egzosoma: inherentan prolazak kroz biološke barijere i mogućnost izbjegavanja fagocitoze od strane retikulo-endotelnog sustava, biokompatibilnost, netoksičnost, imunološka inertnost (Shahabipour i sur., 2016). Način prijenosa utemeljen na uporabi kationskih lipida (liposomi i LNP-ovi) najčešće je korišten put dostave RNA za neviralne vektore. LNP su sastavljeni od kationskih lipida i kolesterola. Kako bi se smanjila glomerularna filtracija, renalni klirens i aktivacija imunskog sustava, treba paziti na veličinu (od 50-100 nm) i vanjski naboj LNP. Najčešći način aplikacije siRNA uklopljene u LNP je intravenski način (Zatsepin i sur., 2016).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Apoptoza je programirana stanična smrt, a može nastati zbog slabljenja ili izostanka (pozitivnih) signala potrebnih za preživljavanje stanica ili zbog primanja (negativnih) signala.

Hsp su proteini toplinskog šoka koji sudjeluju u više procesa u stanici koji su nužni za normalni rast i razvoj same stanice. Hsp su povećano izraženi kod velikog broja humanih tumora i uključeni su u proliferaciju, diferencijaciju, invaziju te metastaziranje tumorskih stanica. Hsp90 potreban je za aktivaciju i stabilizaciju mnogih staničnih proteina.

Inhibicijom Hsp90 u stanici se nakupljaju nepravilno smotani proteini i stanici nedostaju proteini kako bi normalno funkcionirala. Time se potiče ulazak stanice u apoptozu. Ovaj mehanizam je zanimljiv kod liječenja tumora kada je cilj selektivno inhibirati Hsp90 u tumorskim stanicama, čime se potiče apoptoza tumorskih stanica.

Cilj ovog rada je utvrđivanje apoptoze u THP-1 stanicama, od kojih su neke tretirane DMAG-om u različitim koncentracijama, a nekima je RNA interferencijom utišana mRNA za Hsp90. THP-1 je stanična linija humanih monocita iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom. DMAG, analog geldanamicina, inhibitor je Hsp90.

Postoje  $\alpha$  i  $\beta$  izomer Hsp90. DMAG inhibira i  $\alpha$  i  $\beta$  izomer, dok je siRNA dizajnirana za utišavanje samo  $\alpha$  izomera. Opseg apoptoze određuje se dvjema metodama, a to su bojanje stanica tripanskim plavilom i TUNEL reakcijom.

Bojenjem stanica tripanskim plavilom obojaju se mrtve stanice, dok one žive ostaju neobojene. Pomoću hemocitometra stanice se broje pod mikroskopom u određenom volumenu stanične suspenzije. Negativna strana ove metode je ta što se ovom metodom ne mogu razlikovati stanice umrle apoptozom od onih umrlih nekrozom.

TUNEL reakcijom fluorescentno se označavaju završeci pokidane DNA u jezgri, što se kasnije promatra pod fluorescentnim mikroskopom na staklenoj predmetnici. Ovom se metodom specifično oboje stanice umrle apoptozom, što je prednost ove metode nad bojanjem stanica tripanskim plavilom.

## **3 MATERIJALI I METODE**

### **3.1 MATERIJALI**

#### **3.1.1 Kemikalije**

- Trypan Blue (SIGMA CHEMICAL. St. Luis)
- Enzimaska otopina (Roche)
- Otopina za označavanje (Roche)
- PBS pufer
- Paraformaldehid 4%
- Otopina Triton X-100 0,1% i Na-citrata 0,1%

#### **3.1.2 Oprema**

- Vortex
- epruvete od 1,5 mL (Eppendorf)
- vlažna i tamna komora

#### **3.1.3 Stanične linije**

THP-1 je stanična linija humanih monocita iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom (Bowdish, 2011).

#### **3.1.4 Opis pripreve korištenih otopina**

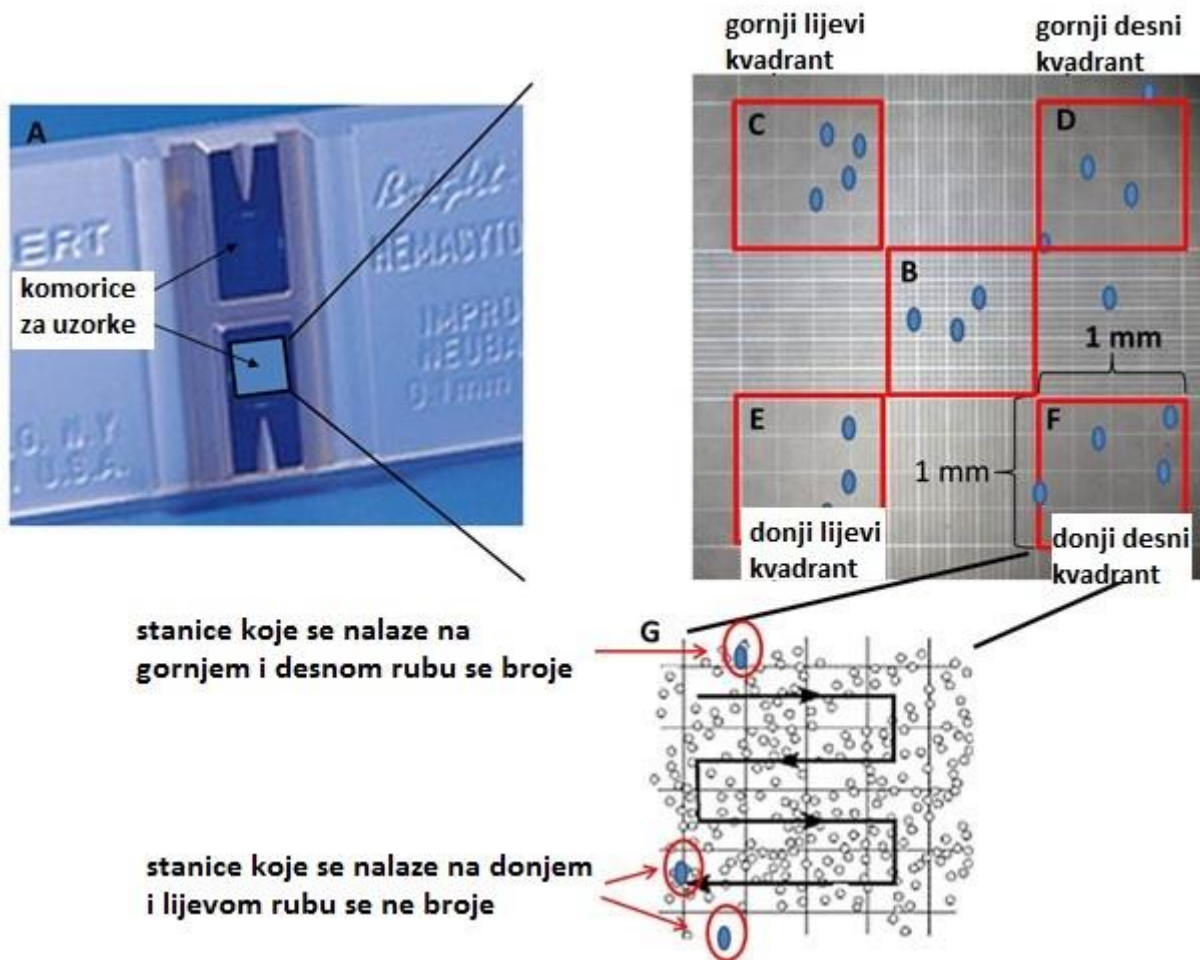
Na-citrat 0,1%, pripravlja se na taj način da se odvaži 1 gram Na-citrata u prahu i miješanjem rastopi u odmjernoj tikvici od 100 mL u malo destilirane vode. Triton X-100, 0,1 %, pripravlja se tako da se automatskom pipetom uzme volumen tekućine Tritona X-100 od 94  $\mu$ L i doda u odmjernu tikvicu u kojoj je prethodno dodan Na-citrat. Zadnji korak pripreve ove otopine je dodavanje destilirane vode do crte, odnosno do volumena od 100 mL.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Procjena preživljenja stanica bojanjem tripanskim plavilom**

Dodaje se 0,5 ml 0,4% otopine tripanskog plavila (SIGMA CHEMICAL. St. Luis) 0,3 mL PBS i 0,2 mL suspenzije stanica u epruvetu. Promiješa se i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice se broje promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju nebojane, dok se one mrtve oboje plavo. Ovim postupkom ne mogu se razlikovati nekrotične

od apoptotičnih stanica. Pomoću hemocitometra (Slika 5.) stanice se broje pod mikroskopom u određenom malom volumenu stanične suspenzije. Uz poznavanje veličine kvadratića i količine pripremljene suspenzije može se izračunati broj (koncentracija) stanica u suspenziji. Pod malim povećanjem mrežica hemocitometra se sastoji od 9 velikih kvadrata i izgleda na sljedeći način:



Slika 5. Hemocitometar. Stanice se broje u 4 velika kvadrata naznačena slovima C, D, E i F.

C, D, E i F su kvadrati sa 16 manjih kvadrata (preuzeto i prilagođeno prema: <http://bitesizebio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>).

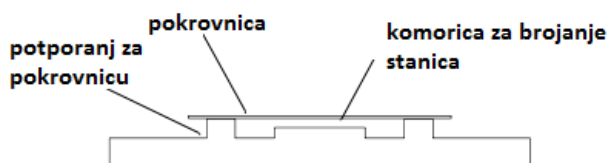
Prostor između dobro postavljene pokrovnice i predmetnice iznosi 0,1 mm. Dužina i širina svakog od 9 velikih kvadrata iznosi 1 mm. Prema tome, iznad svakog velikog kvadrata nalazi se ukupni volumen od  $10^{-4}$  mL tekućine.

$$\begin{aligned} 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} &= 0,1 \text{ mm}^3 \\ &= 0,0001 \text{ cm}^3 \\ &= 10^{-4} \text{ mL} \end{aligned}$$

Kapljica stanične suspenzije uzme se s automatskom pipetom. Vrh pipete se postavi uz rub pokrovnice i tekućina kapilarnim efektom ulazi ispod stakalaca (Slika 6. i 7.). Tekućina mora ispuniti prostor, ali ne smije izlaziti izvan stakalaca. Račun: Stanice se broje (n) u 4 kvadrata (C, D, E i F) pod mikroskopom te se izračunava srednja vrijednost ( $n_o$ ). Umnožak srednje vrijednosti broja stanica ( $n_o$ ) s  $1 \times 10^4$  izražava broj stanica / mL suspenzije: broj stanica / mL suspenzije =  $(n_o) \times 10^4$



Slika 6. Prikaz stavljanja uzorka automatskom pipetom (preuzeto prema: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html>).



Slika 7. Prikaz položaja pokrovnice na hemocitometru (preuzeto prema: <http://www.wikiwand.com/en/Hemocytometer>).



Stanice se moraju izbrojati kroz 10-20 minuta nakon dodatka tripanskog plavila. Ukoliko prođe 30 minuta od dodatka tripanskog plavila postoji mogućnost pogreške pri zbrajanju mrtvih stanica jer se tada bojjaju i žive stanice.

### **3.2.2 TUNEL reakcija**

Uzorci sa stanicama ispiru se tri puta PBS puferom i suspenzije se prilagode na  $2 \times 10^7$  stanica/mL. Uzima se 100  $\mu$ L iz svakog uzorka suspenzije stanica i stavlja se u male epruvete od 1,5 mL. Dodaje se 100  $\mu$ L svježe pripremljene otopine za fiksaciju (paraformaldehid 4%) u svaku epruvetu (u omjeru 1:1). Suspenzije se resuspendiraju i inkubiraju 60 minuta na temperaturi između +15 i +25 °C. Uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 300 g, zatim se pipetira 80  $\mu$ L supernatanta sa vrha i baca se. Stanice se ispiru s 200  $\mu$ L PBS-a. Uzorci se centrifugiraju 10 minuta na 300 g, zatim se odpipetira i baci 200  $\mu$ L supernatanta. Stanice se resuspendiraju u 100  $\mu$ L otopine za permeabilizaciju (otopina Tritona X-100 0,1% u Na-citrata 0,1%) i ostavi 2 minute na ledu (+2 do +8 °C).

Pomiješaju se enzimska otopina i otopina za označavanje DNA te se dobiva TUNEL reakcijska otopina. Stanice se ispiru dodatkom 500  $\mu$ L PBS-a i epruvete se centrifugiraju 10 minuta na 300 g. Odvoji se 500  $\mu$ L supernatanta i baca se. Dodaje se 50  $\mu$ L TUNEL reakcijske otopine. Stalak s epruvetama obloži se folijom i inkubira u vlažnoj i tamnoj komori 60 minuta pri 37 °C. Stanice se ispiru dodatkom 950  $\mu$ L PBS-a, epruvete se centrifugiraju, te se odvoji 950  $\mu$ L supernatanta koji se baci. Stanice se prebacuju u nove epruvete i dodaje se 100  $\mu$ L PBS-a. Uzorci se analiziraju pod fluorescentnom mikroskopom. Za analizu fluorescentnom mikroskopijom koristi se ekscitacijska valna duljina u rasponu od 450-500 nm (488 nm), a detekcijski raspon valnih duljina iznosi 515-565 nm (zelena) (Upute uz test komplet za TUNEL reakciju, Roche 2012).

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 REZULTATI

#### 4.1.1 Rezultati dobiveni bojenjem THP-1 stanica tripanskim plavilom

Tablica 1. Prikaz dobivenih rezultata uzoraka koji su bojani tripanskim plavilom.

uzorci	broj sati nakon kojih su stanice fiksirane		mrtve stanice/mL	žive stanice/mL	ukupan broj stanica/mL	% mrtvih stanica
	24h	48h				
<b>siRNA</b>						
uzorak br. 1	X		$9,5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	$12,25 \cdot 10^4$	77,6
uzorak br. 2		X	0	$6,375 \cdot 10^4$	$6,375 \cdot 10^4$	0
<b>NK RNA</b>						
uzorak br. 3	X		0	$0,75 \cdot 10^4$	$0,75 \cdot 10^4$	0
uzorak br. 4		X	$1,875 \cdot 10^4$	$6,75 \cdot 10^4$	$8,625 \cdot 10^4$	21,7
<b>0,5 M DMAG</b>						
uzorak br. 5	X		0	$19,125 \cdot 10^4$	$19,125 \cdot 10^4$	0
uzorak br. 6		X	0	$9,375 \cdot 10^4$	$9,375 \cdot 10^4$	0
<b>2 M DMAG</b>						
uzorak br. 7	X		$0,75 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$	$8,25 \cdot 10^4$	9,1
uzorak br. 8		X	0	$10,5 \cdot 10^4$	$10,5 \cdot 10^4$	0
<b>3 M DMAG</b>						
uzorak br. 9	X		$0,75 \cdot 10^4$	$8,625 \cdot 10^4$	$9,375 \cdot 10^4$	8
uzorak br. 10		X	0	$9 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	0
<b>5 M DMAG</b>						
uzorak br. 11	X		$2,25 \cdot 10^4$	$9,75 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^4$	18,8
uzorak br. 12		X	0	$14,625 \cdot 10^4$	$14,625 \cdot 10^4$	0
<b>kontrolni THP-1</b>						
uzorak br. 13	X		$0,75 \cdot 10^4$	0	$0,75 \cdot 10^4$	100
uzorak br. 14		X	$0,375 \cdot 10^4$	$7,875 \cdot 10^4$	$8,25 \cdot 10^4$	4,5
uzorak br. 15	X		$0,75 \cdot 10^4$	$7,875 \cdot 10^4$	$8,625 \cdot 10^4$	8,7
uzorak br. 16		X	$1,5 \cdot 10^4$	$12,375 \cdot 10^4$	$13,875 \cdot 10^4$	10,8
uzorak br. 17	X		0	$56,625 \cdot 10^4$	$56,625 \cdot 10^4$	0
uzorak br. 18		X	$0,75 \cdot 10^4$	$25,875 \cdot 10^4$	$26,625 \cdot 10^4$	2,8

Srednja vrijednosti kontrolnih THP-1 uzoraka nakon 24 h iznosi 8,7 %, a nakon 48 h 6 %, dok jedan uzorak odskače (100 %) i zanemaren je pri ovom izračunu.

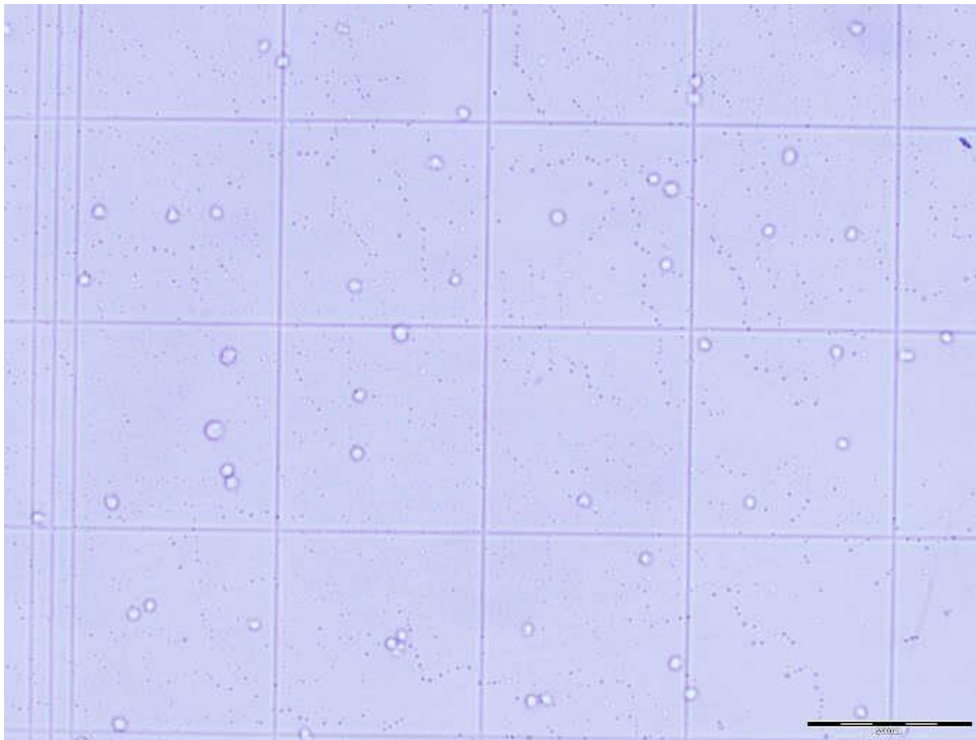
Uzorak THP-1 stanica koje su tretirane siRNA molekulama i fiksiran nakon 24 h pokazuje visok postotak mrtvih stanica, a on iznosi 77,6 %. U uzorku THP-1 stanica koje su također tretirane siRNA molekulama, ali je fiksiran nakon 48 h, nisu pronađene mrtve stanice.

Dva su uzorka tretirana nespecifičnom RNA i služe kao negativna kontrola, kako bi se evidentirao utjecaj postupka, ukoliko ga ima, te da se može procijeniti utjecaj specifičnog utišavanja (siRNA). Jedan od uzoraka fiksiran je nakon 24 h i u njemu nisu pronađene mrtve stanice, a drugi uzorak nakon 48 h i kod njega je postotak mrtvih stanica iznosio 21,7 %.

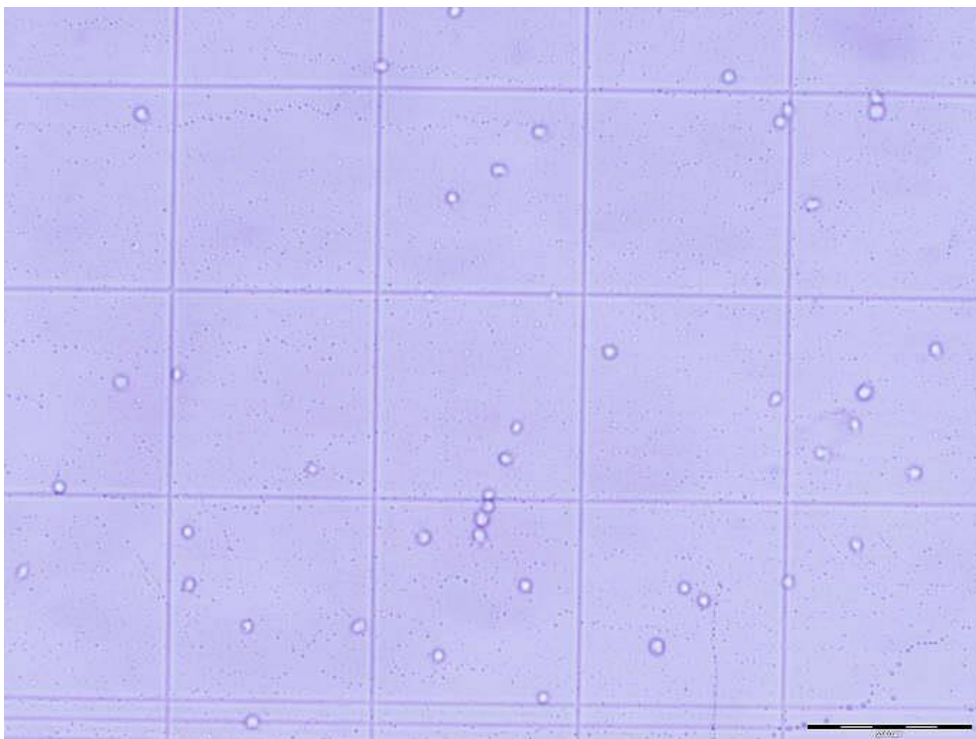
Kod oba uzorka THP-1 stanica tretiranih 0,5  $\mu$ M DMAG-om, od kojih je jedan fiksiran nakon 24 h, a drugi nakon 48 h, nisu identificirane mrtve stanice.

U uzorcima THP-1 stanica koje su tretirane 2 i 3  $\mu$ M DMAG-om i koji su fiksirani nakon 24 h, utvrđen je približno isti postotak mrtvih stanica (9,1% i 8%). U uzorku THP-1 stanica tretiranih 5  $\mu$ M DMAG-om koji je fiksiran nakon 24 h, utvrđeno je 18,8 % mrtvih stanica.

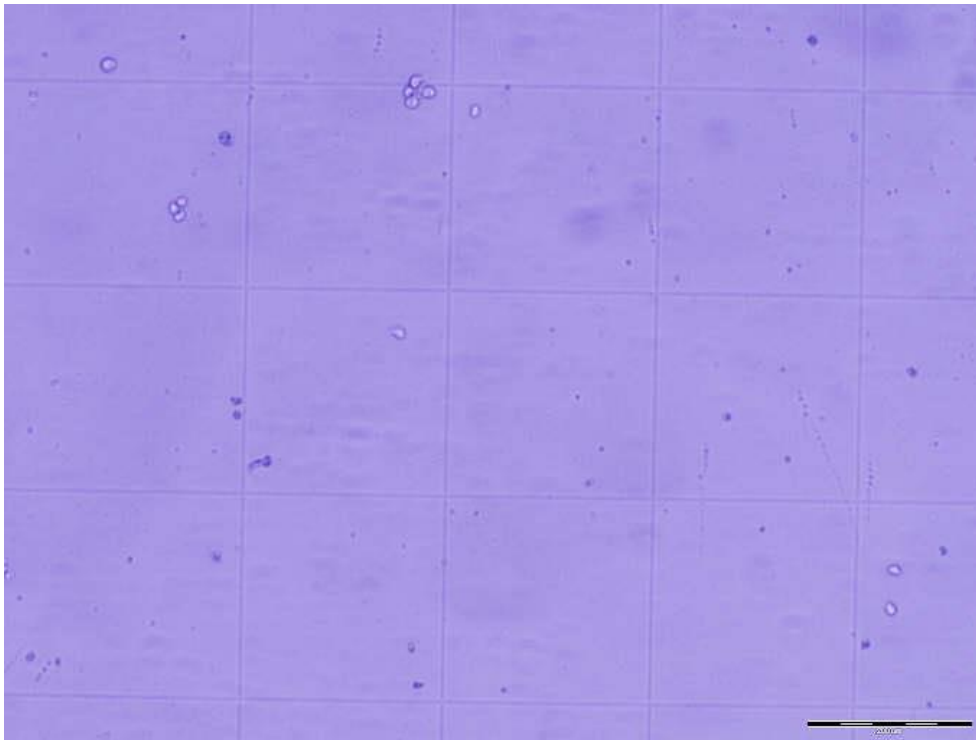
U uzorcima THP-1 stanica koje su tretirane 2, 3 i 5  $\mu$ M DMAG-om i koji su fiksirani nakon 24 h, nisu identificirane mrtve stanice.



Slika 8. Prikaz živih stanica tretiranih sa tripanskim plavilom. Stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 100x.



Slika 9. Prikaz živih stanica tretiranih sa tripanskim plavilom. Stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 100x.

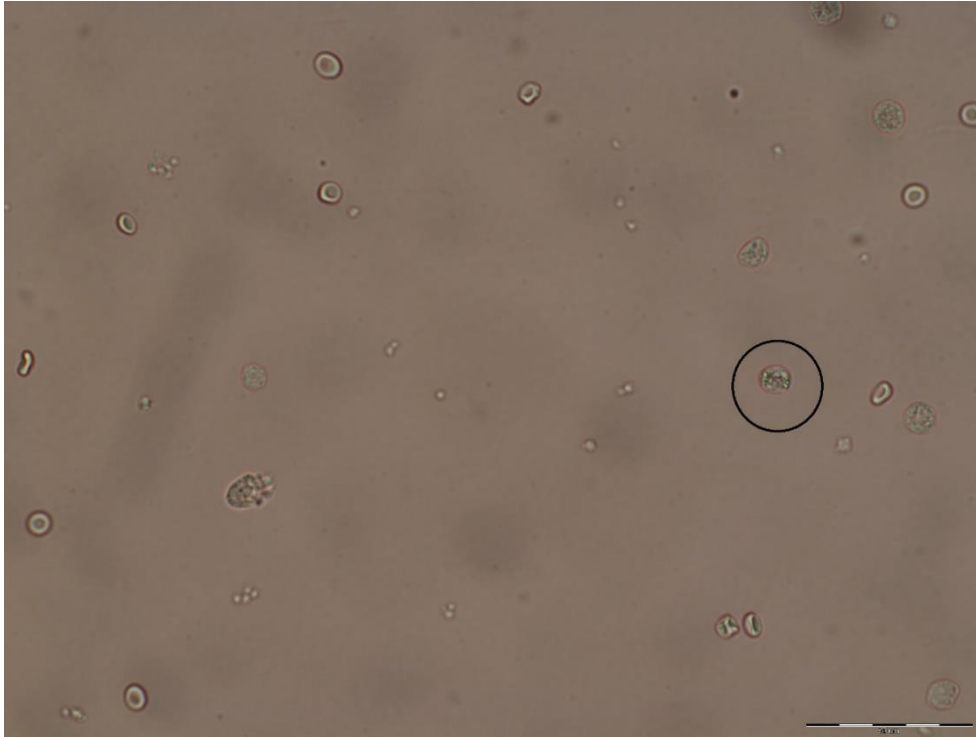


Slika 10. Prikaz živih i mrtvih stanica tretiranih sa tripanskim plavilom. Stanice su promatrane svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 100x.

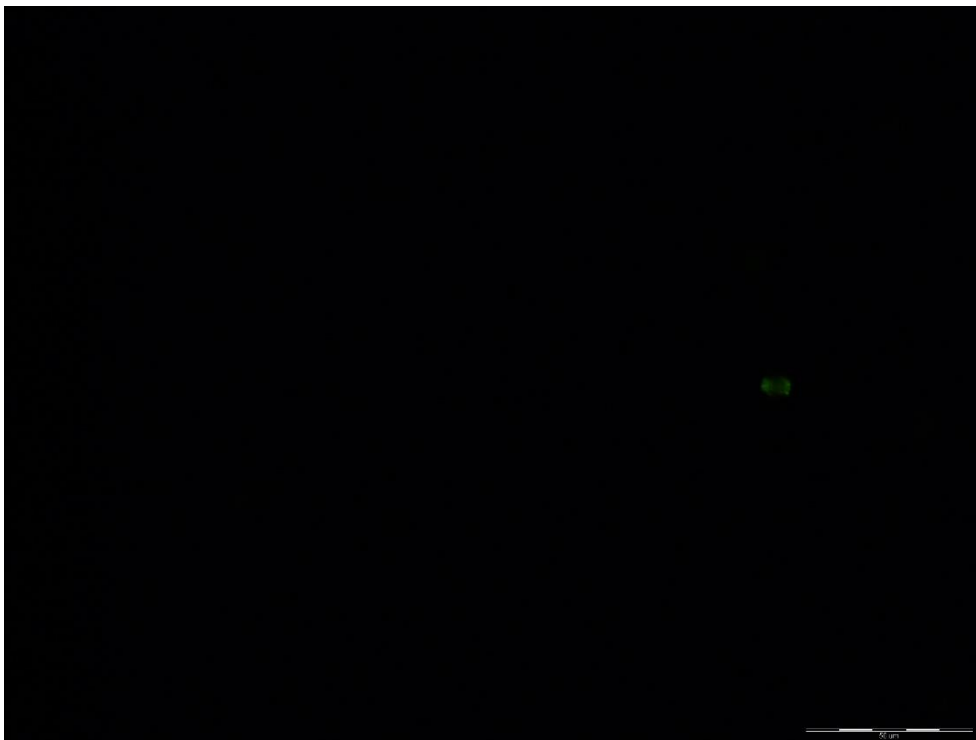
#### 4.1.2 Rezultati dobiveni TUNEL reakcijom

TUNEL reakcijom nisu identificirane apoptotične stanice. Uzorci u kojima je putem bojenja tripanskim plavilom dokazan veliki broj mrtvih stanica i u kojima se očekivao porast apoptotskih stanica, ponovljeno su bojani TUNEL reakcijom. Međutim, apoptoza nije bila detektirana niti nakon ponovljenih pokusa.

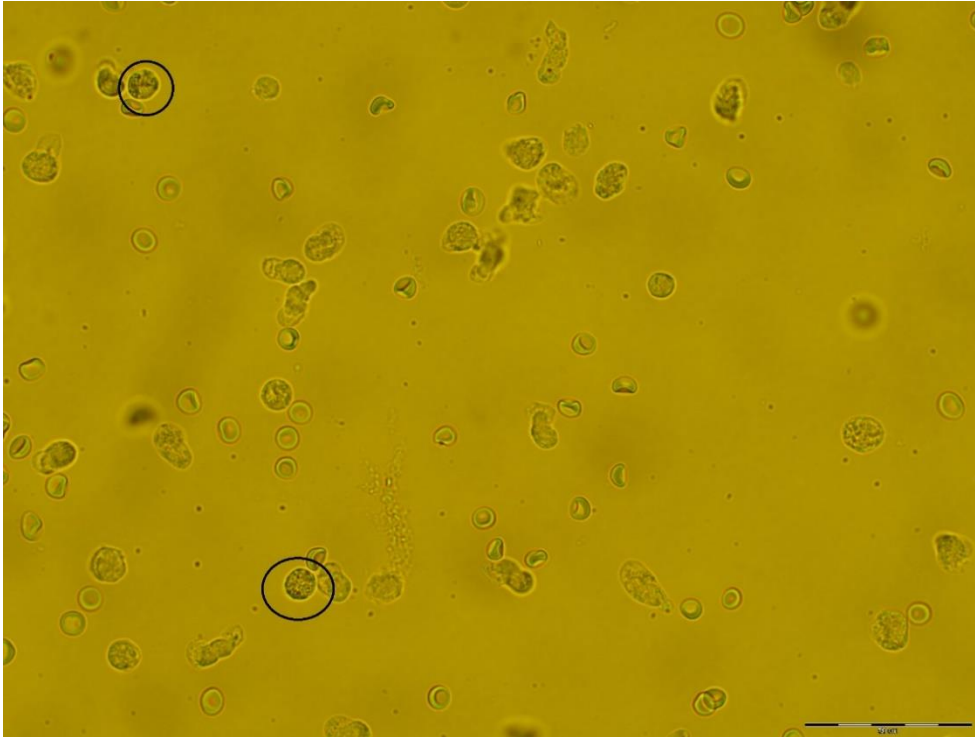
S obzirom na nemogućnost identifikacije THP-1 stanica u apoptozi, TUNEL metoda je ponovljena u uzorcima krvi bogatim leukocitima. Primjeri priloženih mikrografija (Slike 11.-14.) u parovima prikazuju isto vidno polje stanica krvi gledano pod svjetlosnim i fluorescentnim mikroskopom uz primjenu TUNEL metode.



Slika 11. Mikrografija prikazuje uzorak krvi bogat leukocitima, promatrano pod svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 400x. Zaokružena stanica je apoptotična stanica, koja na Slici 12. pokazuje fluorescenciju.



Slika 12. Mikrografija prikazuje uzorak krvi bogat leukocitima, promatrano pod fluorescentnim mikroskopom pod povećanjem od 400x. Fluorescentno obojana stanica je leukociti u apoptozi.



Slika 13. Mikrografija prikazuje uzorak krvi bogat leukocitima, promatrano pod svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 400x. Zaokružene stanice su apoptotične stanice, koje na Slici 14. pokazuju fluorescenciju.



Slika 14. Mikrografija prikazuje uzorak krvi bogat leukocitima, promatrano pod fluorescentnim mikroskopom pod povećanjem od 400x. Fluorescentno obojane stanice su leukociti u apoptozi.

## 4.2 RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi pojavu apoptoze u THP-1 stanicama, od kojih su neke tretirane DMAG-om u različitim koncentracijama, a nekima je RNA interferencijom utišana mRNA za Hsp90 iz citosola.

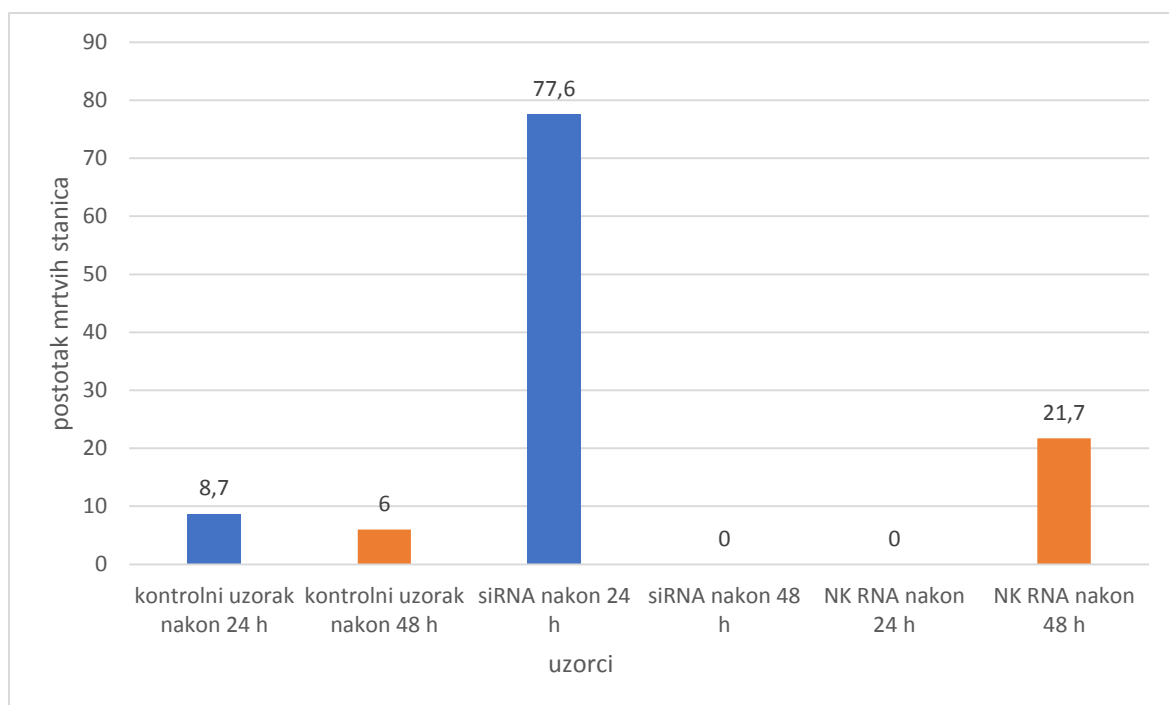
Postupkom bojenja stanica tripanskim plavilom ne mogu se razlikovati nekrotične od apoptotičnih stanica. Prema tome, rezultati su izraženi kao mrtve stanice, a ne apoptotične.

Među uzorcima s kontrolnim THP-1 stanicama jedan uzorak je odskakao po broju mrtvih stanica, a iznosio je 100 %. Pretpostavlja se da je razlog tome premali broj stanica, koji iznosi nekoliko puta manje u odnosu na ostale kontrolne uzorke. Taj uzorak se zanemaruje. Srednja vrijednosti kontrolnih THP-1 uzoraka nakon 24 h iznosi 8,7 %, a nakon 48 h 6 %.

U uzorku THP-1 stanica koje su tretirane RNAi-om (inhibicija  $\alpha$  izomera Hsp90) i koji je fiksiran nakon 24 h, utvrđen je najveći postotak mrtvih stanica (77,6 %). U uzorku THP-1 stanica koje su također tretirane RNAi-om, ali je fiksiran nakon 48 h, nisu utvrđene mrtve stanice.

U uzorku u kojem su THP-1 stanice tretirane sa NK RNA i koji je fiksiran nakon 24 h, nisu pronađene mrtve stanice. To ukazuje da nema nespecifičnog vezanja dodane molekule RNA za ciljnu mRNA. Kod uzorka u koji je dodana NK RNA, a koji je fiksiran nakon 48 h, pronađen je određeni postotak mrtvih stanica.





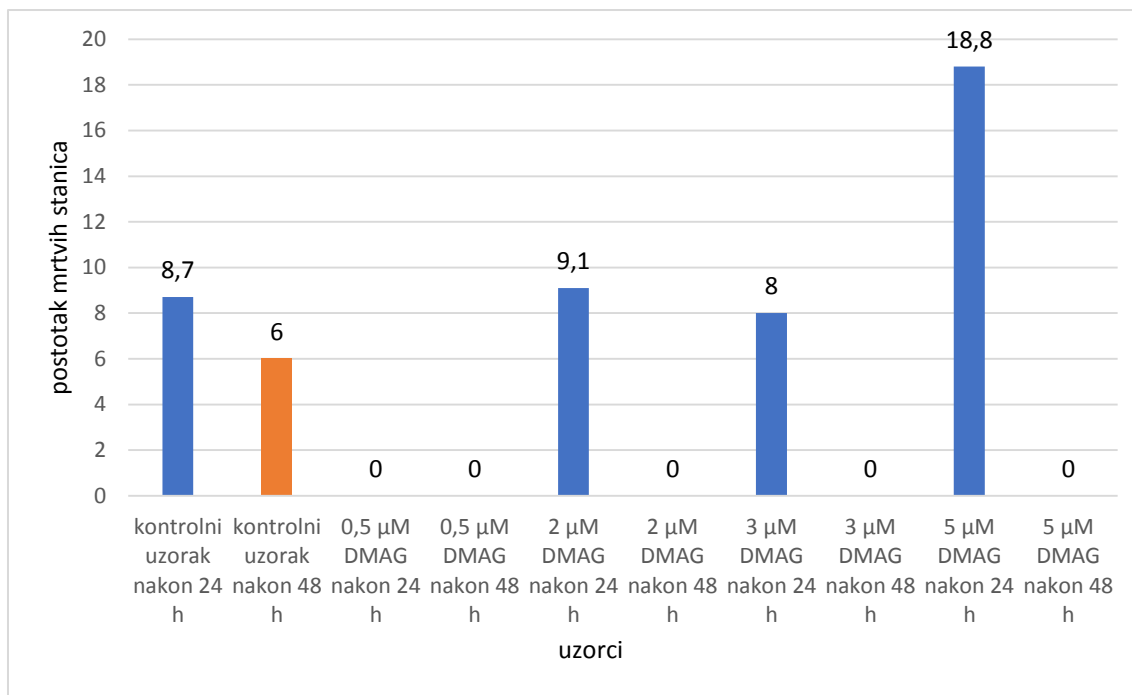
Graf 1. Grafički prikaz ovisnosti broja mrtvih stanica o vrsti (RNAi i NK RNA) i trajanju tretmana.

DMAG inhibira i  $\alpha$  i  $\beta$  izomer Hsp90. Kod oba uzorka THP-1 stanica tretiranih 0,5  $\mu\text{M}$  DMAG-om, od kojih je jedan fiksiran nakon 24 h, a drugi nakon 48 h, nisu identificirane mrtve stanice.

U uzorcima THP-1 stanica koje su tretirane 2 i 3  $\mu\text{M}$  DMAG-om i koji su fiksirani nakon 24 h, utvrđen je približno isti postotak mrtvih stanica (9,1 % i 8 %). U uzorku THP-1 stanica tretiranih 5  $\mu\text{M}$  DMAG-om koji je fiksiran nakon 24 h, identificirano je 18,8 % mrtvih stanica.

U uzorcima THP-1 stanica koje su tretirane 2, 3 i 5  $\mu\text{M}$  DMAG-om i koji su fiksirani nakon 48 h, nisu identificirane mrtve stanice.

Postotak mrtvih stanica raste s koncentracijom DMAG-a kojim su stanice bile izložene, a to se bolje vidi u uzorcima koji su bili tretirani 24 h.



Graf 2. Grafički prikaz ovisnosti trajanja izloženosti stanica DMAG-u.

Obzirom da je postupak označavanja kompleksan i uključuje mnogo reagensa mogući su lažno negativni rezultati pa je stoga neophodno uključiti pozitivnu i negativnu kontrolu. Iako je TUNEL jedna od najspecifičnijih metoda za detekciju apoptoze postoji mogućnost lažno pozitivnog označavanja lomova DNA stanica koje nisu u apoptozi (nekrotične stanice, Okazaki fragmenti u S-fazi staničnog ciklusa), međutim njihov broj je znatno manji od broja fragmenata apoptotičkih stanica (Žlender, 2006). S obzirom da niti nakon ponovljenih TUNEL reakcija na određenim uzorcima nije uočena fluorescencija, pretpostavlja se da je razlog tome premali broj stanica u staničnim suspenzijama.

Kombinacijom morfoloških i biokemijskih metoda, odnosno određivanjem više parametara za isti uzorak, može se znatno povećati osjetljivost i specifičnost mjerenja te kvalitetnije procijeniti proces apoptoze u tkivima i kulturama stanica (Petrik i sur., 2003a).

## 5 ZAKLJUČCI

- Tretman THP-1 stanica siRNA molekulama uzrokuje smrt u 77,6 % stanica nakon 24 h.
- U uzorku THP-1 stanica koje su tretirane siRNA molekulama i koji je fiksiran nakon 48 h, nisu identificirane mrtve stanice.
- U uzorcima THP-1 stanica tretiranih 0,5  $\mu\text{M}$  DMAG-om nakon 24 h nisu identificirane mrtve stanice.
- Usporedbom uzoraka fiksiranih nakon 24 h, uzorci THP-1 stanica tretiranih 5  $\mu\text{M}$  DMAG-om pokazale su puno veći postotak mrtvih stanica (18,8 %) nego uzorci stanica tretiranih sa 2 i 3  $\mu\text{M}$  DMAG-a, koje su pokazale međusobno podjednak učinak (9,1 % i 8 %).
- Tretman THP-1 stanica različitim koncentracijama DMAG-a (0,5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ) tijekom 48 h nije uzrokovao umiranje stanica.
- U uzorku THP-1 stanica u koji je dodana NK RNA, a koji je fiksiran nakon 24 h, nisu identificirane mrtve stanice.
- Tretman THP-1 stanica nespecifičnom DNA tijekom 48 h uzrokuje smrt 21,7 % stanica.

## 6 LITERATURA

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(4), 657–85.

Apoptotic DNA Ladder Isolation Kit (ab65627), <http://www.abcam.com/apoptotic-dna-ladder-isolation-kit-ab65627.html>, pristupljeno 23.5.2017.

Archana M, Bastian, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. Various methods available for detection of apoptotic cells- A review. *Indian J Cancer*, 2007, 50, 274-283.

Bowdish D. Maintenance & Culture of Thp-1 Cells. *In Pract*, 2011, 5–6.

Cell Growth/Injury and Necrosis, 2015., <http://emcephalgia.com/acem-primary-exam-notes/physiology/basic-physiology/cell-growthinjury-necrosis/>.

Cell viability assays, 2016., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343426/?report=reader>, pristupljeno 1.4.2017.

Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J*, 2016, 4(7), 35-50.

Cioca DP, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(2), 125–33.

Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10(2), 86–103.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica, Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str.143-146, 693-705,330-332

Den RB, Lu B. Heat shock protein 90 inhibition: rationale and clinical potential. *Ther Adv*

*Med Oncol*, 2012, 4(4), 211–8.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4), 495–516.

Goetz MP. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol*, 2003, 14(8), 1169–76.

Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett*, 2012, 325(2), 117–24.

Hemocytometer, <http://www.wikiwand.com/en/Hemocytometer>, pristupljeno 23.5.2017.

Janković, M., Markotić, A. (2007). Virusi i apoptoza. *Infektološki glasnik*, 27(2), 63-70.

Koll TT, Feis SS, Wright MH, Teniola MM, Mekel M, Robles AI, et al. HSP= inhibitor, DMAG, synergizes with radiation of lung cancer cells by interfering with base excision and ATM-mediated DNA repair. *Mol Cancer*, 2009, 7(7), 1985–92.

Kujundžić M i sur. Klinička patofiziologija. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003, str. 5-7.

Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed J*, 2012, 36(3), 106–17.

Matokanović M, Baršić K. RNA interference as a new tool in therapeutics. *Food Technol Biotechnol*, 2009, 47(3), 229–35.

Nollen E a a, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J Cell Sci*, 2002, 115(14), 2809–16.

Petrik J, Rumora L, Juretić D, Čepelak I. Apoptoza-detekcija i kvantifikacija. *Biochemia medica*, 2003, 13, 109-117.

Petrik, J, Žanić-Grubišić, T, Barišić K i sur. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch Toxicol*, 2003, 77, 685-693.

Popratne preporuke uz reagensiju Trypan Blue, SIGMA CHEMICAL. St. Luis

Rao R, Lee P, Fiskus W, i sur. Co-treatment with heat shock protein 90 inhibitor 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (DMAG) and vorinostat: a highly active combination against human Mantle Cell Lymphoma (MCL) cells. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(13), 1273-1280.

RNA interference sprays as an alternative to transgenic agriculture, 2015., pristupljeno 2.4.2017.

Schmid I, Uittenbogaart C, Jameison B. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc*, 2007, 2(1), 187-90.

Shahabipour F, Banach M, Sahebkar A. Exosomes as nanocarriers for siRNA delivery: Paradigms and challenges. *Arch Med Sci*, 2016, 12(6), 1324–6.

Sherman M, Multhoff G. Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1113, 192–201.

The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease, 2014., <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/616149/abs/>, pristupljeno 23.5.2017.

Ulukaya E, Acilan C, Ari F, Iktimur E, Yilmaz Y. Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish J Biochem*, 2011, 36(3), 261–9.

Upute za test komplet za TUNEL reakciju, Roche 2012.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1–2), 167–90.

Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods: antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90(2), 188–93.

Zatsepin TS, Koteliansky V. Lipid nanoparticles for targeted siRNA delivery – going from bench to bedside. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11, 3077–86.

Žlender, V. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2003, 54(4), 267-274.

Žlender V. Detection of Apoptosis. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2006, 57(7), 229–36.

## 7 SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1 SAŽETAK

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanja stanične homeostaze, tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života. Hsp su proteini toplinskog šoka koji sudjeluju u više procesa u stanici koji su nužni za normalni rast i razvoj same stanice. Inhibicijom Hsp90 u stanici se nakupljaju nepravilno smotani proteini i stanici nedostaju proteini kako bi normalno funkcionirala. Time se potiče ulazak stanice u apoptozu. DMAG inhibira  $\alpha$  i  $\beta$  izomer, dok je siRNA dizajnirana za utišavanje samo  $\alpha$  izomera. Cilj ovog rada je utvrđivanje apoptoze u THP-1 stanicama, od kojih su neke tretirane sa DMAG-om u različitim koncentracijama, a nekima je RNA interferencijom utišana mRNA za Hsp90 iz citosola. Opseg stanične smrti i apoptoze određuje se dvjema metodama, a to su bojanje stanica tripanskim plavilom i TUNEL reakcijom. TUNEL reakcijom nisu identificirane apoptotične stanice, niti nakon ponovljenog mjerenja. U uzorku THP-1 stanica, bojanih sa tripanskim plavilom, koje su tretirane siRNA molekulama i koji je fiksiran nakon 24 h, utvrđeno je 77,6 % mrtvih stanica. Postotak mrtvih THP-1 stanica bojanih tripanskim plavilom raste sa koncentracijom DMAG-a kojim su stanice bile izložene.



## 7.2 SUMMARY

Apoptosis is a special form of cell death, necessary for the development of an organism and maintenance of cellular homeostasis, that is the equilibrium between the loss and generation of normal-tissue cells during life. Hsp are the heat shock proteins which participate in several cellular processes, which are necessary for the normal growth and development of the cell itself. In the case of inhibition of Hsp90 the incorrectly folded proteins accumulate in the cell and the cell lacks the proteins to function normally. The transition of a cell to apoptosis is thereby induced. DMAG inhibits both  $\alpha$  and  $\beta$  isomers, while siRNA is designed to destroy only  $\alpha$  isomers. The aim of this thesis is to establish the apoptosis in THP-1 cells, of which some were treated with DMAG in various concentrations, and for some the mRNA level of cytosolic Hsp90 was silenced by RNA interference. The scale of cell death and apoptosis is determined by two methods, and those are cell coloration by Trypan Blue and TUNEL reaction. The TUNEL reaction has not identified any apoptotic cells, even not after repeated measurement. In the sample of THP-1 cells, coloured by Trypan Blue, which were treated by by siRNA molecules, and which was fixed after 24 hours, 77.6% dead cells were found. The percentage of dead THP-1 cells coloured by Trypan Blue increases with the DMAG concentration to which the cells had been exposed.

## 8 PRILOZI

### POPIS KRATICA:

- ADP- adenzin difosfat (engl. *adenosine diphosphate*)
- Ago 2- Argonaute 2 protein
- ATP- adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
- DD- domena smrti (engl. *death domain*)
- DED- efektorske domene smrti (engl. *death effector domain*)
- DISC- signalni kompleks koji inducira smrt (engl. *death inducing signaling complex*).
- DMAG- 17- (dimetilaminoetilamino) -17-demetoksigeldanamicin
- DNA- deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
- dsRNA- dvostrukouzvojita RNA (engl. *double-stranded RNA*)
- dUTP- deoksiuridin-trifosfat (engl. *2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate*)
- ELISA-enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FITC- fluorescein izotiocijanat (engl. *fluorescein-isothiocyanate*)
- FSC- detektor prednjeg raspršenja (engl. *forward scatter channel*)
- HSF1- heat shock transkripcijski faktor 1 (engl. *heat shock factor 1*)
- Hsp- protein toplinskog šoka (engl. *heat shock protein*)
- LNP- lipidne nanočestice (engl. *lipid nanoparticle*)
- miRNA- mikroRNA (engl. *microRNA*)
- mRNA- glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)
- PARP- poli-ADP-riboza-polimeraza (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*)
- PAZ- Piwi-Argonaute-Zwille
- PEI- polietilenimin (engl. *polyethylenimine*)
- piRNA- piwi-RNA
- PS- fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*)
- RISC- RNA-induciran stišavajući kompleks (engl. *RNA-induced silencing complex*)

RNA- ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNAi- RNA interferencija (engl. *RNA interference*)

siRNA- mala interferirajuća RNA (engl. *small interfering RNA*)

SSC- detektor bočnog raspršenja (engl. *side scatter channel*)

TNF- tumor nekrotizirajući faktor (engl. *tumor necrosis factor*)

TNFR- receptor za tumor nekrotizirajući faktor (engl. *tumor necrosis factor receptor*)

TRAIL-1- engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*

TRAIL-2- engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 2*

TUNEL- engl. *terminal deoxyribonucleotidyl transferasemediated dUTP nick and labelling*)

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UČINAK DMAGA-A I UTIŠAVANJA HSP90 NA VIJABILNOST THP-1 STANICA

Dubravka Živković

#### SAŽETAK

Apoptoza je poseban oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanja stanične homeostaze, tj. ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica normalnog tkiva tijekom života. Hsp su proteini toplinskog šoka koji sudjeluju u više procesa u stanici koji su nužni za normalni rast i razvoj same stanice. Inhibicijom Hsp90 u stanici se nakupljaju nepravilno smotani proteini i stanici nedostaju proteini kako bi normalno funkcionirala. Time se potiče ulazak stanice u apoptozu. DMAG inhibira  $\alpha$  i  $\beta$  izomer, dok je siRNA dizajnirana za utišavanje samo  $\alpha$  izomera. Cilj ovog rada je utvrđivanje apoptoze u THP-1 stanicama, od kojih su neke tretirane sa DMAG-om u različitim koncentracijama, a nekima je RNA interferencijom utišana mRNA za Hsp90 iz citosola. Opseg stanične smrti i apoptoze određuje se dvjema metodama, a to su bojanje stanica tripanskim plavilom i TUNEL reakcijom. TUNEL reakcijom nisu identificirane apoptotične stanice, niti nakon ponovljenog mjerenja. U uzorku THP-1 stanica, bojanih sa tripanskim plavilom, koje su tretirane siRNA molekulama i koji je fiksiran nakon 24 h, utvrđeno je 77,6 % mrtvih stanica. Postotak mrtvih THP-1 stanica bojanih tripanskim plavilom raste sa koncentracijom DMAG-a kojim su stanice bile izložene.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: apoptoza, siRNA, DMAG, tripansko plavilo, TUNEL metoda

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. József Petrik**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. József Petrik**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Haematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### EFFECT OF DMAG AND HSP90 SILENCING ON THE VIABILITY OF THP-1 CELLS

Dubravka Živković

#### SUMMARY

Apoptosis is a special form of cell death, necessary for the development of an organism and maintenance of cellular homeostasis, that is the equilibrium between the loss and generation of normal-tissue cells during life. Hsp are the heat shock proteins which participate in several cellular processes, which are necessary for the normal growth and development of the cell itself. In the case of inhibition of Hsp90 the incorrectly folded proteins accumulate in the cell and the cell lacks the proteins to function normally. The transition of a cell to apoptosis is thereby induced. DMAG inhibits both  $\alpha$  and  $\beta$  isomers, while siRNA is designed to destroy only  $\alpha$  isomers. The aim of this thesis is to establish the apoptosis in THP-1 cells, of which some were treated with DMAG in various concentrations, and for some the mRNA level of cytosolic Hsp90 was silenced by RNA interference. The scale of cell death and apoptosis is determined by two methods, and those are cell coloration by Trypan Blue and TUNEL reaction. The TUNEL reaction has not identified any apoptotic cells, even not after repeated measurement. In the sample of THP-1 cells, coloured by Trypan Blue, which were treated by siRNA molecules, and which was fixed after 24 hours, 77.6% dead cells were found. The percentage of dead THP-1 cells coloured by Trypan Blue increases with the DMAG concentration to which the cells had been exposed.

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

Thesis includes: 38 pages, 16 figures, 1 table and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: apoptosis, siRNA, DMAG, Trypan blue, TUNEL method

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**József Petrik, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**József Petrik, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.