

Učinak citrinina na proteine Chk2 i FANCD2 u humanim staničnim linijama HepG2 i A549

Homar, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:107316>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sonja Homar

**Učinak citrinina na proteine Chk2 i FANCD2 u
humanim staničnim linijama HepG2 i A549**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sanje Dabelić.

Zahvala

Veliko hvala mojim roditeljima i sestri na velikoj podršci i strpljenju. Također, hvala mojoj mentorici dr. sc. Sanji Dabelić na uloženom trudu, vremenu i stručnosti.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Mikotoksini	1
1.1.1. Citrinin	1
1.2. Stanični ciklus i stanična smrt	3
1.3. Signalni putevi proteina Chk2 i FANCD2	7
2. Obrazloženje teme	10
3. Materijali i metode	11
3.1. Uzgoj staničnih kultura	11
3.2. Tretiranje staničnih kultura citrininom	11
3.3. Određivanje relativne količine proteina metodom ELISA	12
3.3.1. Princip i tipovi metode ELISA	12
3.3.2. Metoda ELISA za određivanje relativne količine i fosforilacije proteina Chk2 i FANCD2	13
3.4. Statistička obrada podataka	14
4. Rezultati	15
4.1. Učinak citrinina na preživljenje stanica	15
4.2. Učinak citrinina na količinu proteina GAPDH	15
4.3. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 u stanicama HepG2	16
4.4. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina FANCD2 u stanicama HepG2	17
4.5. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 u stanicama A549	18
4.6. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina FANCD2 u stanicama A549	20
5. Rasprava	22
6. Zaključci	25
7. Popis kratica, oznaka i simbola	27
8. Literatura	29
9. Sažetak/Summary	33
10. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

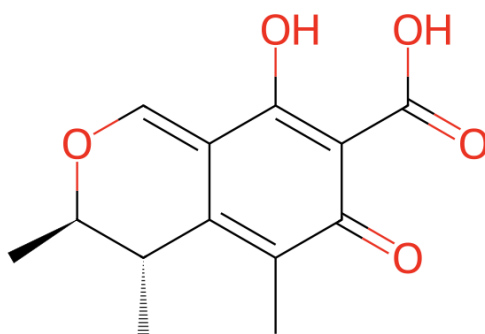
1. Uvod

1.1. Mikotoksini

Mikotoksini su produkti sekundarnog metabolizma filamentoznih gljivica. Smatra se da sintezom mikotoksina gljivice potiskuju druge organizme s kojima se natječu za stanište i nutrijente u okolišu. Neki sekundarni metaboliti gljivica djeluju kao antibiotici, a najpoznatiji primjer toga je penicilin iz plijesni roda *Penicillium*. Drugi mikotoksini pak djeluju kao fitotoksini, tj. djeluju toksično na biljke.

Po kemijskim svojstvima vrlo su heterogeni, a općenito njihovo djelovanje možemo opisati kao akutnu toksičnost prilikom jednokratne izloženosti ili kao kroničnu toksičnost. Trovanje mikotoksinima nazivamo mikotoksikozama. One su relativno rijetka pojava, a možemo ih podijeliti po organskom sustavu koji zahvaćaju - probavne, respiratorne, kožne itd. Najčešći put unosa je ingestija kontaminirane hrane koja predstavlja problem u područjima s nižom razinom kontrole skladištenja i obrade žitarica i drugih prehrambenih sirovina. Za razliku od otrova pravih gljiva koji su najčešće velike proteinske molekule, mikotoksini su manje i jednostavnije molekule koje proizvode kvasci (jednostanične gljivice) (Bennett i Kilch, 2003).

1.1.1. Citrinin



Slika 1. Kemijska struktura citrinina (preuzeto s ChEMBL baze podataka, <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)

Citrinin je poliketidni mikotoksin koji su prvi put izolirali Hetherington i Raistrick iz gljivice *Penicillium citrinum* 1931. godine. Danas je poznato da citrinin sintetiziraju i rodovi gljivica *Aspergillus* i *Monascus*. U čistom obliku citrinin tvori igličaste žute kristale, a kemijska struktura prikazana je na Slici 1. Otopine citrinina u kiselom su mediju žute boje, a u lužnatom crvene. Talište mu je na 175 °C, netopljiv je u hladnoj vodi i slabo topljiv u vrućoj vodi. Najbolje se otapa u organskim otapalima poput etanola, metanola i acetonitrila te u

natrijevoj lužini, otopini natrijevog karbonata i natrijevog acetata (Kamle i sur., 2022).

Citrinin je termolabilan u vodenim otopinama na temperaturi iznad 70 °C te se raspada na dva metabolita, citrinin H2 koji ne pokazuje toksične učinke i citrinin H1 koji je dimer i ima veću toksičnost od izvornog spoja (Pleadin i sur., 2015).

Biosintetski put citrinin dijeli s drugim sličnim metabolitima i pigmentima poput monakolina K, a taj se put naziva poliketidni put. Geni odgovorni za sintezu citrinina i sličnih poliketidnih metabolita opisani su u *Monascus purpureus* te su grupirani u klaster BCRC33325 CIT.

Smatra se da je gen *ctnA* glavni aktivator transkripcije gena za proizvodnju citrinina u *M. purpureus*, a njegov je genski produkt Zn(II)2Cys6 binuklearni DNA vezujući protein koji aktivira transkripciju ostalih gena uključenih u sintetski put (Kamle i sur., 2022).

Toksična svojstva citrinina su raznolika i još predstavljaju predmet istraživanja kao i ovog diplomskog rada. Za sad je poznato da citrinin ima antibakterijska, antitumorska i neuroprotektivna svojstva, ali je istovremeno jako nefrotoksičan i genotoksičan. Postoje i snažni dokazi o njegovoj reproduktivnoj toksičnosti i teratogenosti te je svrstan u grupu 3 karcinogena jer još ne postoje dokazi o kancerogenosti citrinina za ljude (Ostry i sur., 2013). Neka od ranijih istraživanja kao mehanizam toksičnosti citrinina predlažu povećanje propusnosti staničnih membrana u gljiva i biljaka te inhibiciju biosinteze kolesterola i triglicerida u životinja (Pleadin i sur., 2015).

Istraživanjima na štakorima utvrđeno je da se nakon injektiranja radioaktivno obilježenog ¹⁴C-citrinina on nakuplja u jetri i bubrezima, nakon čega se izlučuje uglavnom mokraćom, ali i fecesom (IARC, 1986).

Za detekciju citrinina i drugih mikotoksina u raznim supstratima koristi se niz analitičkih metoda. Možemo ih podijeliti na kolorimetrijske, kromatografske i imunokemijske metode. Kolorimetrijske metode zasnivaju se tome da citrinin posjeduje prirodnu fluorescenciju koju je moguće mjeriti, no takve metode obično imaju nisku osjetljivost. Kromatografske metode koje se koriste su tankoslojna kromatografija (engl. *thin layer chromatography*, TLC) i tekuća kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) koja je često povezana s masenim spektrometrom koji djeluje kao osjetljiv detektor. Ovakvo određivanje vrlo je točno, osjetljivo i specifično (Xu i sur., 2006).

Citrinin i drugi mikotoksini česti su onečišćivači hrane i stočne hrane. Kontaminacija plijesnima pa i mikotoksinima može se dogoditi tijekom svih faza uzgoja, obrade i pohrane prehrambenih namirnica. Namirnice u kojima je citrinin detektiran su riža, pšenica, kukuruz te brašna koja se od njih proizvode. S obzirom da u žitaricama često nalazimo mješovite kulture plijesni, važno je napomenuti da često takve kulture proizvode potentniji biokemijski i toksični efekt od čistih kultura kakve se najčešće istražuju. Upravo zbog toga važno je detaljno istražiti toksične učinke pojedinih mikotoksina, ali i njihovih kombinacija, što u slučaju citrinitina još nije dovoljno detaljno provedeno. Osim u žitaricama, citrinin je detektiran i na površini suhomesnatih proizvoda na području Hrvatske, 2013. godine od strane Markov i sur. (Pleadin i sur., 2015).

Kontaminacija hrane plijesnima predstavlja javnozdravstveni problem te je važno implementirati dobre preventivne prakse kako bi se ona spriječila ili primijeniti postupke uklanjanja kontaminacije nakon njenog nastanka. Preventivne mjere su poštivanje preporuka za ispravno skladištenje i obradu namirnica, održavanje odgovarajuće temperature i vlažnosti zraka te dodatno sušenje žitarica tijekom skladištenja. Postupci za uklanjanje kontaminacije moraju inaktivirati mikotoksin i druge štetne metabolite plijesni, a da se istovremeno nutritivna i organoleptička svojstva proizvoda ne naruše. Većina mikotoksina dobro podnosi uobičajene temperature na kojima se priprema hrana (80 - 120 °C) pa se kuhanjem, prženjem i pasterizacijom njihova koncentracija ne smanjuje značajno. Suprotno tome, citrinin loše podnosi visoke temperature na kojima se njegova koncentracija jako smanjuje (Kitabatake i sur., 1991).

1.2. Stanični ciklus i stanična smrt

Stanični ciklus je slijed događaja tijekom kojeg stanica raste, razvija se, priprema za diobu i naposljetku dijeli na dvije nove stanice kćeri. Stanični ciklus sastoji se od nekoliko faza: G1 (engl. *Gap 1*), S (engl. *Synthesis*), G2 (engl. *Gap 2*) i M (engl. *Mitosis*). Moguća su i odstupanja od ove progresije kod nekih tipova stanica koje se nakon određenog broja diobi prestaju dijeliti te ulaze u tzv. G0 fazu (Maller, 1990).

Tijekom G1 i G2 faza stanica raste i obavlja svoje fiziološke funkcije. Tijekom S faze dolazi do umnažanja DNA koje je nužno kako bi nakon mitoze obje stanice kćeri imale istovjetan sadržaj genetskog materijala. M faza označava sam proces mitoze koji podrazumijeva više faza (profaza, metafaza, anafaza, telofaza) tijekom kojih se genski sadržaj stanice majke i

organeli ravnomjerno raspodjeljuju i razdvajaju na dvije stanice kćeri (Barnum i O'Connel, 2014).

Stanični ciklus temeljni je proces koji zahtijeva strogu regulaciju jer pogreške u njegovom tijeku mogu dovesti do dramatičnih posljedica za samu stanicu, ali i za cjelokupno tkivo i organizam u kojem se ona nalazi, poput razvoja tumora, nepravilne diobe i aneuploidije stanica kćeri. Glavni izvršitelji kontrole staničnog ciklusa su o ciklinu ovisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDK). To su protein-kinaze koje svojom aktivacijom osiguravaju napredovanje staničnog ciklusa na način da fosforiliraju svoje proteinske mete. Kako i samo ime sugerira, za aktivnost CDK potrebne su molekule ciklina, regulacijske podjedinice koje u kombinaciji s katalitičkom podjedinicom koja ima funkciju kinaze stvaraju funkcionalan kompleks ciklin-CDK. Aktivnost CDK osim kompleksiranjem s ciklinima regulira se i na razini sinteze i proteolize, posttranslacijskom modifikacijom ubikvitinilacijom, te se CDK mogu i inhibirati djelovanjem malih molekula inhibitora CKI ili fosforilacijom na aminokiselini tirozinu na određenoj poziciji (Carvajal i sur., 2012).

Kontrola staničnog ciklusa temelji se na prepoznavanju kontrolnih točaka (engl. *checkpoints*). Kontrolne točke su trenuci tijekom staničnog ciklusa kada se određenim mehanizmima provjerava uspješnost procesa u stanici, te se odlučuje hoće li stanica nastaviti progresiju ili zaustaviti napredovanje staničnog ciklusa. Kontrolne točke mogu biti vezane uz kontrolu veličine i oblika stanice, kontrolu integriteta DNA, praćenje replikacije DNA ili uz kontrolu funkcije diobenog vretena (Barnum i O'Connel, 2014).

Primjerice, kontrolne točke koje služe za provjeru integriteta DNA pod nadzorom su dva glavna proteina, p53 i Chk1. U slučaju oštećenja DNA ovi proteini pomažu zaustaviti stanični ciklus i regrutiraju druge proteine koji nastoje popraviti oštećenje. Ako je taj proces uspješan, stanični ciklus može nastaviti, a u suprotnom dolazi do apoptoze stanice (O'Connel i sur., 2000).

Apoptoza je programirana stanična smrt. Proces apoptoze detaljno se proučavao na modelnom organizmu oblića *Caenorhabditis elegans* te je otkriveno da od ukupno 1090 stanica od kojih je taj mali oblič izgrađen, njih točno 131 u točno određenom trenutku razvoja organizma ulazi u apoptozu. Takvi su pokusi potvrdili da je apoptoza strogo kontroliran proces koji ovisi o genskoj regulaciji te je nužan za pravilan razvoj organizma (Lockshin i Zakeri, 2004).

Apoptoza je sastavni dio procesa rasta, starenja te homeostatske regulacije populacija stanica u tkivima (D'Arcy MS, 2019), a ima i ulogu pri eliminaciji oštećenih stanica ili stanica inficiranih virusima (Berg, 2019).

Postoji više do sad opisanih puteva koji mogu dovesti do apoptoze stanice. Možemo ih podijeliti na intrinzični, ekstrinzični i perforin/granzimski put, a sva tri puta imaju zajednički završni dio koji se naziva izvršni put, engl. *execution pathway* (D'Arcy MS, 2019).

Ekstrinzični put ili engl. *death-receptor pathway* ovisan je o interakciji specifičnih receptora i njihovih liganda, koji međusobnim interakcijama i angažiranjem drugih proteina dovode do aktivacije kaspaze-8 i ulaska u izvršni put. U ovom mehanizmu važnu ulogu imaju proteini iz obitelji faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*; TNF), konkretno receptori i pripadajući ligandi TNFR1/TNF α , FasR/FasL, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4, Apo2L/DR5. Sam ekstrinzični put aktivira se na način da klasteriranjem receptora TNFR1 i FasR te vezanjem na TNF α i FasL dolazi do regrutacije proteina FADD i TRADD redom. Nakon toga vezanjem proteina RIP nastaje kompleks DISC (engl. *death-inducing signaling complex*) koji potiče autoaktivaciju prokaspaze-8 u kaspazu-8 te inicijaciju izvršnog puta (Igney i Krammer, 2002).

Intrinzični put apoptoze ili mitohondrijski put neovisan je o receptorima te se signal za njegovo pokretanje proizvodi u samoj stanici na poticaj određenih čimbenika. Ti čimbenici mogu biti pozitivni ili negativni. Kad govorimo o negativnim čimbenicima, mislimo na izostanak tvari poput faktora rasta, hormona ili citokina koji svojim signaliziranjem suprimiraju apoptozu. Prestankom njihovog djelovanja na stanicu dolazi do prestanka supresije apoptoze. Pozitivni čimbenici su oni podražaji koji djeluju proapoptotički na stanicu, poput zračenja, hipertermije, hipoksije, povišene intracelularne koncentracije kalcijevih iona, toksina, virusa i slobodnih radikala (D'Arcy MS, 2019).

Intrinzični put apoptoze u velikoj mjeri reguliraju proteini iz obitelji Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), koja se dijeli na proapoptotičke i antiapoptotičke proteine. Njihov glavni učinak je kontrola permeabilnosti unutrašnje membrane mitohondrija, čime kontroliraju otpuštanje citokroma c i drugih proteina koji dovode do aktivacije apoptoze intrinzičnim putem. (Cory i Adams, 2002). Konkretnije, translokacijom proteina Bax iz citosola u mitohondrij i aktivacijom membranskog proteina Bac dolazi do povećanja propusnosti vanjske membrane

mitohondrija te do izlaska citokroma c, Smac, DIABLO i drugih proteina u citosol, čime se pokreće daljnja kaskada koja vodi u apoptozu.

Članove Bcl-2 obitelji proteina možemo klasificirati po sadržaju BH domena (engl. *Bcl-2 homology domain*). Naime, postoje 4 vrste BH domena, od kojih su BH1 i BH2 odgovorne za dimerizaciju s drugim proapoptotičkim proteinima, BH4 je N-terminalna domena, a BH3 je zajednička svim pripadnicima Bcl-2 obitelji, a služi za ostvarivanje interakcija između antiapoptotičkih i proapoptotičkih proteina. Stoga se po sadržaju podjedinica ovi proteini dijele na višedomenske antiapoptotičke koji sadrže BH3 i BH4 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Bcl-B), višedomenske proapoptotičke koji sadrže BH1, Bh2 i BH3 (Bax, Bak, Bok) i proapoptotičke koji sadrže samo BH3 domenu (Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, BMF, HRK, BIK) (Pistritto i sur., 2016).

Perforin/granzimski put karakterističan je za citotoksične T stanice. Temelji se na djelovanju transmembranskog proteina perforina koji formira poru u ciljnoj stanici te omogućuje prolazak toksičnih granula koje sadrže enzime granzime, serinske proteaze koje unutar ciljne stanice aktiviraju o kaspazama ovisne i neovisne apoptotske procese (Fan i sur., 2003).

Glavni enzimi koji sudjeluju u procesu apoptoze su kaspaze. To su cisteinske proteaze koje se sintetiziraju u obliku zimogena, inaktivnih inačica enzima, a aktiviraju se proteolizom (Chan, 2008). Kaspaze kidaju svoje proteinske mete nakon aminokiseline aspartata, a razlikuju se po specifičnosti u odnosu na ostale aminokiseline koje okružuju mjesto cijepanja. Možemo ih podijeliti u nekoliko skupina po ulozi: inicijacijske Cas-2, -8, -9, -10), izvršne (Cas-3, -6, -7), upalne kaspaze (Cas-1, -4, -5) i ostale (Rai i sur., 2005).

Svi prije navedeni mehanizmi završavaju na isti način, uključivanjem u izvršni put (engl. *execution pathway*). Glavna izvršna kaspaza tog puta je Cas-3, koja je odgovorna za procese unakrsnog povezivanja proteina, stvaranje apoptotičkih tjelešaca i poticanje fagocitoze, što će biti opisano u nastavku.

Morfološki, apoptoza ima nekoliko glavnih obilježja. Na razini jezgre dolazi do kondenzacije kromatina i kidanja DNA endonukleazama na spojevima između nukleosoma, čime nastaju fragmenti DNA veličine od 180 do 200 parova baza ili višekratnici tog broja. Navedeni fenomen može se vizualizirati elektroforezom DNA, gdje se može uočiti karakterističan

izgled ljestava koji stvaraju pravilni segmenti pokidane DNA (D'Arcy MS, 2019). Ekspresijom i aktivacijom tkivne transglutaminaze dolazi do unakrsnog povezivanja i inaktivacije staničnih proteina (Budillon i sur., 2013). Dolazi do postupnog stezanja stanice i engl. *blebbing*-a ili pupanja membrane. Pupanje membrane završava stvaranjem apoptotičkih tjelešaca, malih fragmenata stanice obavijenih membranom koje fagocitiraju makrofagi ili stanice parenhima. Zbog toga što ne dolazi do otpuštanja staničnog sadržaja u tkivo, apoptoza nije upalni proces. Prepoznavanje apoptotske stanice od strane fagocita omogućuju promjene u ekspresiji površinskih molekula. Dolazi do translokacije molekula fosfatidilserina iz unutrašnjeg sloja membrane na vanjski (Bratton i sur., 1997), te se eksprimiraju i druge molekule poput aneksina I, aneksina V i kalretikulina (Gardai i sur., 2005).

Neuspješna apoptoza važan je događaj tijekom razvoja i progresije tumora. Stanice koje trpe teška oštećenja genetskog materijala koja se ne mogu popraviti mehanizmima popravka u riziku su da ta oštećenja genoma prenesu na stanice kćeri, čime može doći do maligne transformacije stanica. Zbog toga je važno da apoptoza nastupi pravovremeno i da se potencijalno maligne stanice eliminiraju. Također, tumorske stanice pomoću stečenih promjena u genima za apoptotičke proteine uspješno izbjegavaju apoptozu na način da pojačavaju ekspresiju antiapoptotičkih i smanjuju ekspresiju proapoptotičkih proteina (Xi i sur., 2022).

1.3. Signalni putevi proteina *Chk2* i *FANCD2*

Kinaza kontrolne točke 2 (engl. *checkpoint kinase 2*, CHEK2 ili Chk2) serinska je kinaza smještena u jezgri humanih stanica. Sastoji se od 543 aminokiseline, a kao kofaktor koristi ione magnezija. Ova kinaza ima važnu ulogu aktivacije popravka DNA ili pak sudjeluje u pokretanju apoptoze u slučaju opsežnih dvolančanih lomova DNA. CHEK2 kinaza aktivira se putem proteina ATM koji je fosforilira na poziciji Thr-68 kao odgovor na dvolančane lomove DNA. Nakon toga slijedi homodimerizacija i autofosforilacija CHEK2 dimera koji time postiže punu aktivnost (<https://www.uniprot.org>). Ova kinaza dalje fosforilira efektorske proteine koji sudjeluju u prije spomenutom popravku DNA, regulaciji staničnog ciklusa, signalizaciji putem p53 i u procesu apoptoze (Zannini i sur., 2014).

Tijekom replikacije DNA CHEK2 glavna je efektorska kinaza koja pomaže stabilizirati replisom u slučaju zastoja replikacijskih rašlji. Zastoj replikacije mogu uzrokovati nedostatak

dNTP-ova, modificirani dNTP-ovi, detekcija abazičnih mjesta u DNA ili kompleksi DNA i proteina koji fizički blokiraju napredovanje replisoma niz molekulu DNA (Barnum i O'Connel, 2014).

Popravlak DNA CHEK2 ostvaruje fosforilacijom BRCA2 proteina koji aktivira asocijaciju RAD51 s kromatinom te potiče popravak DNA mehanizmom homologne rekombinacije, a osim toga pojačava i sintezu BRCA2 proteina aktivacijom i fosforilacijom FOXM1 proteina.

Zastoj staničnog ciklusa CHEK2 kinaza ostvaruje fosforilacijom ciljnih proteina CDC25A, CDC25B i CDC25C koji se inaktiviraju i prekidaju napredovanje staničnog ciklusa. Inhibicijom fosfataze CDC25C pojačava se inhibitorna fosforilacija CDK-ciklinskih kompleksa te se također zaustavlja progresija staničnog ciklusa.

CHEK2 ima i ulogu u regulaciji apoptoze putem fosforilacije p53, proteina MDM4 i PML kao i transkripcijskog faktora E2F1 koji kontrolira transkripciju gena za neke proapoptotičke proteine. Tumor-supresijska aktivnost CHEK2 njena je o DNA neovisna funkcija, a očituje se fosforilacijom BRCA1 proteina i posljedičnim sudjelovanjem u asocijaciji diobenog vretena (<https://www.uniprot.org>).

Protein Fanconijeve anemije grupe D2 (engl. *Fanconi anemia group D2*, FANCD2) jezgri je protein građen od 1451 aminokiseline i ima ulogu u održavanju kromatinske stabilnosti. Tijekom mejoze, FANCD2 pomaže pri točnom sparivanju homolognih kromosoma, a uključen je i u popravak dvolančanih lomova DNA mehanizmom homologne rekombinacije kao i CHEK2, te dodatno i mehanizmom engl. *single strand annealing-a*. Tijekom procesa popravka FANCD2 olakšava vezanje kompleksa BRCA2/FANCD1 na oštećeni kromatin. Fosforilacijom FANCD2 na Ser-222 od strane ATM proteina dolazi do zastoja staničnog ciklusa u S-fazi (Bartek i sur., 2004).

Svi ovi procesi u kojima sudjeluju i mnogi drugi proteini iz grupe Fanconi anemija proteina nazivaju se FA put (engl. *Fanconi anemia pathway*). To je biokemijska mreža koja pomaže pri popravku i replikaciji DNA. Ako tijekom replikacije dođe do zastoja ili prepreke u području replikacijskih rašlji, FA mehanizam pomaže ukloniti zastoj i osigurati ispravno umnažanje genetskog materijala stanice. FANCD2 i drugi proteini FA puta vežu razdvojene lance DNA i sprječavaju razgradnju endonukleazama u periodu dok se zastoj replikacije pokušava

razriješiti. Također, smatra se da FA put ima ulogu u procesu održavanja duljine telomera, zaštitnih krajeva kromosoma. Osim ovih mehanizama vezanih uz procese u jezgri stanice, smatra se da FA put ima i ulogu pri uklanjanju oštećenih mitohondrija, tj. pri mitofagiji, što je posebno važno jer oštećenja mitohondrija izlažu stanicu oksidacijskom stresu te dolazi do oslobađanja proupalnih citokina (Rodriguez i D'Andrea, 2017).

2. Obrazloženje teme

Mikotoksin citrinin nalazimo u hrani koju konzumiraju ljudi te životinje koje se koriste u ljudskoj prehrani, što predstavlja javnozdravstveni problem. Premda je danas jasno da se toksičnost citrinina na različitim razinama (nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, teratogenost itd.) ostvaruje različitim mehanizmima, oni su u najvećoj mjeri ipak nepoznati.

Hipoteza je ovoga istraživanja da citrinin utječe na konačnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 i FANCD2, koji su dijelovi signalnih puteva kojima se reguliraju različiti procesi u stanici.

Cilj je ovoga istraživanja bio odrediti relativnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 i FANCD2 tijekom tretmana stanica humane stanične tumorske linije hepatocelularnog karcinoma HepG2 kao i stanica humane stanične tumorske linije plućnog adenokarcinoma A549, različitim koncentracijama citrinina.

Relativne razine proteina te relativne razine fosforilacije točno određenih aminokiselinama unutar istraživanih proteina su mjerene primjenom metode ELISA izravno na stanicama u kulturi, a rezultati su analizirani prikladnim statističkim testovima kako bi se utvrdila potencijalna korelacija.

3. Materijali i metode

3.1. Uzgoj staničnih kultura

Za istraživanja su korištene dvije komercijalno dostupne smrznute stanične linije: HepG2 (stanice humanog hepatocelularnog karcinoma) i A549 (stanice humanog plućnog adenokarcinoma), obje podrijetlom iz Europske kolekcije staničnih kultura, Salisbury, Ujedinjeno Kraljevstvo. Stanice su otopljene i premještene u puni medij (RPMI-1640, 10% FCS, s 2 mmol/L L-Gln i antibioticima (penicilin 100 IU/mL i streptomycin 100 ug/mL)). Navedene kemikalije za uzgoj podrijetlom su iz Lonze (Basel, Švicarska). Nakon centrifugiranja pri 200 g 10 minuta odbačen je nadsloj koji sadržava medij za smrzavanje i puni medij, te su stanice resuspendirane u svježem punom mediju i premještene u Petrijeve posudice za adherirajuće stanične kulture (TPP, 100*20 mm). Korak centrifugiranja i otklanjanja medija za smrzavanje je važan jer takav medij sadrži DMSO (dimetilsulfoksid) koji je u normalnim uvjetima za stanice toksičan, no tijekom skladištenja u zamrzivaču služi za sprječavanje formiranja kristalića leda koji bi oštetili stanice.

Kulture su uzgajane u inkubatoru na 37°C uz 5% koncentraciju CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Pregledane su dnevno na mikroskopu i pasažirane po potrebi (3-5 pasaža) kako bi se pripremile za pokus.

Pasažiranje stanica provedeno je na način da se iz pojedine kulture pomoću vakuum sisaljke uklonio medij i stanice su isprane fosfatnim puferom (PBS, engl. phosphate buffer saline, Euro Clone, ECB4004L). Nakon odsisavanja fosfatnog pufera dodana je otopina tripsina (Trypsin-EDTA (0,25%) in HBSS+Phenol Red, Capricorn Scientific) koji svojim endoproteaznim djelovanjem razgrađuje veze između stanica i podloge te se takva kultura držala u inkubatoru 2-3 min kako bi tripsin mogao djelovati. Nakon što su se stanice odvojile od posudice, uzete su u špricu s iglom i nekoliko puta resuspendirane prije nego što su prenesene u čiste Petrijeve zdjelice, kako bi se osiguralo da u novu pasažu nanosimo pojedinačne stanice, a ne nakupine stanica. Nova kultura nadopunjena je punim medijem i vraćena u inkubator.

3.2. Tretiranje staničnih kultura citrininom

Nakon što su stanice pasažirane 3-5 puta, prebrojane su i u koncentraciji od 10 000 stanica po jažici nasadene u jažice 96-well mikrotitarske pločice. Stanice su nakon toga inkubirane 24 sata kako bi adherirale. Idući dan uklonjen je medij nad stanicama i dodan medij bez seruma

kako bi se stanice sinkronizirale u istu fazu staničnog ciklusa. Pločice su inkubirane preko noći, odnosno oko 12 sati. Slijedio je tretman stanica različitim koncentracijama citrinina. Otopine citrinina pripremljene su iz stock otopine 0,03 M citrinina u DMSO-u na način da se odgovarajući volumen otopine citrinina pomiješao s odgovarajućim volumenom punog medija. Stock otopina dobivena je otapanjem čistog praška citrinina u DMSO-u (Cayman Chem Company, 1-800-364-9897). Za tretman stanica HepG2 korištene su otopine punog medija (K0), 0,33% DMSO u punom mediju (K2) te 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M otopina citrinina u punom mediju. Za stanice A549 korištene su iste kontrole, ali uz koncentracije citrinina 50, 100 i 200 μ M. Nakon inkubacije 24 h započeto je mjerenje relativnih količina proteina od interesa te relativnih fosforilacija točno određenih aminokiselina unutar tih proteina metodom ELISA prema protokolu proizvođača, opisanog u poglavlju 3.3.2.

3.3. *Određivanje relativne količine proteina metodom ELISA*

3.3.1. *Princip i tipovi metode ELISA*

Jedan od načina detekcije i kvantifikacije proteina je s enzimom povezani imunosorpcijski test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). To je imunokemijska tehnika koja se zasniva na specifičnoj reakciji epitopa ciljanog proteina s protutijelom na koji je vezan enzim, a dodatkom supstrata dolazi do enzimske reakcije u kojoj nastaje obojeni produkt.

Postoji više tipova ELISA testova, koje možemo podijeliti po tome kakav analit se detektira - antigen ili protutijelo. Tako testovi koji detektiraju antigen podrazumijevaju fiksiranje protutijela koje veže antigen u jažicu nakon čega se dodaje uzorak. Antigen se veže na imobilizirano protutijelo i potom se na njega veže prikladno protutijelo obilježeno enzimom. U testovima koji detektiraju protutijela, jažice se prvo oblažu antigenom na koji se tražena protutijela vežu, zatim se dodaje uzorak i drugo protutijelo obilježeno enzimom.

Varijanta korištena u ovom radu specifična je po tome što se detektira antigen izravno u staničnoj kulturi koja ga eksplicira, i to dodatkom primarnog protutijela (mišjeg ili zečjeg) te sekundarnog (anti-mišjeg ili anti-zečjeg) protutijela na koje je vezan enzim peroksidaza iz hrena. Pritom se podrazumijeva da sama adherirajuća stanična kultura imobilizira antigen u jažice, a ako se postupak provodi na neadherirajućoj kulturi, stanice je prethodno potrebno fiksirati u jažice prema preporučenom protokolu koji navodi proizvođač testa.

Specifičnost vezanja protutijela na ciljni protein može se poboljšati upotrebom monoklonskih protutijela, a pojačavanje analitičkog signala može se postići varijantom testa u kojoj se na primarno monoklonsko protutijelo veže sekundarno poliklonsko protutijelo usmjereno na Fc domenu primarnog protutijela. Na sekundarno protutijelo je vezan enzim, a dodatkom supstrata dobiva se obilnije nastajanje obojenog produkta pri niskim koncentracijama ciljnog proteina. Time je omogućena detekcija proteina koji se u uzorku nalaze i u vrlo niskim koncentracijama (Berg, 2019).

3.3.2. Metoda ELISA za određivanje relativne količine i fosforilacije proteina Chk2 i FANCD2

Korišten je komercijalno dostupan komplet za ELISA-u (CytoGlow™ Chk2 (phosphoThr-68) i CytoGlow™ FANCD2 (phosphoSer-222) colorimetric cell-based ELISA kit (AssayBioTech, Fremont, CA, USA), jedan koji detektira protein Chk2 i drugi koji detektira FANCD2 te njihove fosforilirane inačice na točno određenim spomenutim položajima.

Ukratko, nakon uklanjanja medija u kojem se stanice tretiraju za potrebe istraživanja, stanice se ispiru puferom TBS, a potom fiksiraju 4% otopinom formaldehida. Otopina za fiksiranje se nakon 20 minuta uklanja i pločice se peru puferom za pranje (engl. *Wash Buffer*). Nakon toga puferom za gašenje (engl. *Quenching Buffer*) uklanja se endogena peroksidazna aktivnost u stanicama koja bi mogla prouzročiti pogreške mjerenja, s obzirom da je enzim za detekciju peroksidaza iz hrena konjugirana na sekundarno protutijelo. Nakon 20 minuta pločice se peru i nanosi se pufer za blokiranje (engl. *Blocking Buffer*) koji se inkubira 1 sat. Nakon uklanjanja i pranja pufera za blokiranje nanose se otopine primarnih protutijela usmjerenih naspram proteina (Chk2 ili FANCD2), fosforiliranih proteina (p-Chk2 na položaju Thr-68 ili p-FANCD2 na položaju Ser-222) i naspram GAPDH, proteina za koji se smatra da ima stabilnu ekspresiju te se koristi kao referentni protein. Primarna protutijela inkubiraju se preko noći u hladnjaku. Sljedeći dan primarna protutijela se uklanjaju i pločice se peru. Nanose se sekundarna protutijela, anti-zečja protutijela za protein i fosforilirani protein, a anti-mišja za GAPDH i inkubiraju se 1,5 sati na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Nakon uklanjanja i pranja sekundarnog protutijela nanosi se supstrat i inkubira 30 minuta uz miješanje u mraku. Nanosi se otopina za prekidanje reakcije i odmah mjeri apsorbancija na 450 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Victor2-1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

Nakon očitavanja apsorbancije na 450 nm provodi se bojanje kristal violetom kako bi se utvrdila količina stanica preostalih u svakoj pojedinačnoj jažici. Pločica se pere puferom za pranje i puferom TBS te suši na sobnoj temperaturi. Nanosi se kristal violet boja i inkubira 30 minuta. Boja se pažljivo odlije i pločice se više puta peru vodom, sve dok voda za pranje ne postane potpuno bistra. Pločice se suše 30 minuta i dodaje im se otopina natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) koja se inkubira 1 sat uz miješanje. Nakon toga se očitava apsorbancija na 595 (600) nm, uz poseban oprez da se po potrebi uklone mjehurići nastali zbog dodatka SDS-a koji djeluje kao detergent.

3.4. Statistička obrada podataka

Sirovi podaci apsorbancija na 450 i 600 nm preuzeti su s čitača mikrotitarskih pločica i uneseni u Excel tablice. Za procjenu citotoksičnosti promatrane su vrijednosti apsorbancija na 600 nm. Poolirane su vrijednosti tretmanskih skupina K0, K2 i skupina tretiranih s citrininom i to s pločice za analizu oba proteina za svaku staničnu liniju posebno. Odbačene su po dvije najniže i najviše vrijednosti iz svake skupine te su stavljene u omjer s prosječnom vrijednosti kontrolne skupine K0. Na isti način je analizirana ekspresija GAPDH i izražena kao omjer s kontrolnom skupinom K0, izbačena je po jedna najviša i najniža vrijednost.

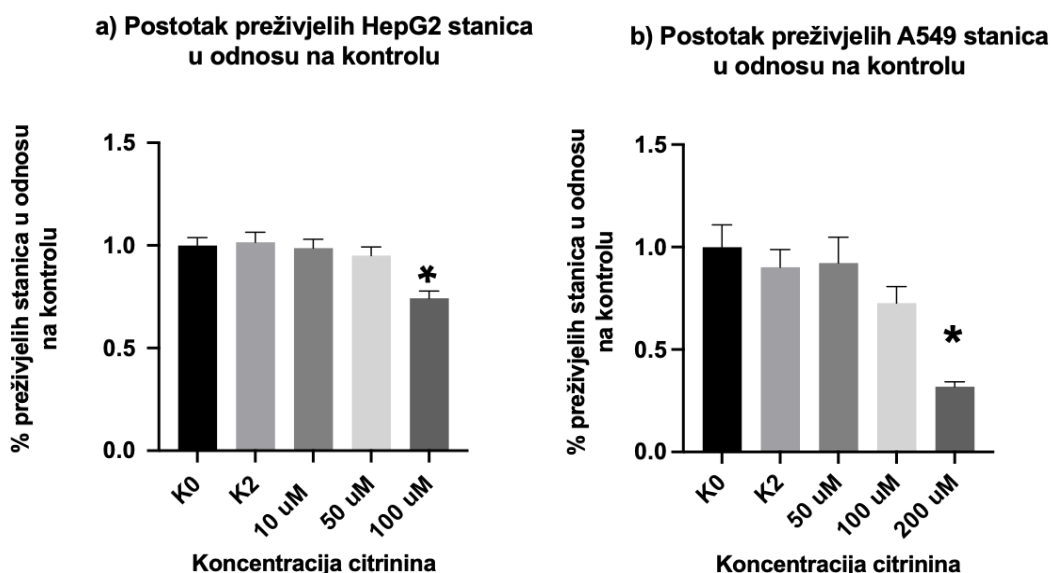
Za procjenu ekspresije ukupnog Chk2 ili FANCD2 uzete su apsorbancije na 450 i 600 nm, stavljene u omjer i od njih je za svaku jažicu oduzeta srednja vrijednost omjera dobivenog za jažice u kojima se ispitivalo obojenje sekundarnog protutijela bez primjene primarnog (pozadinski šum). Tako dobiveni omjeri ponovno su uzeti u omjer s kontrolnom skupinom te su odbačene najniža i najniža vrijednost, čime se dobiva engl. *trimmed mean* vrijednost. Postupak je bio isti za fosforilirane inačice proteina. Tako dobivene vrijednosti fosforiliranih i ukupnih proteina stavljene su u omjer i također izražene kao omjer s kontrolnom skupinom za svaki protein i svaku staničnu liniju.

Nakon provedenih računskih postupaka gotovi podaci su preneseni u program GraphPad Prism 9 za statističku obradu i uređivanje grafičkih prikaza. Provedena je statistička analiza korištenjem jednosmjerne analize varijance (engl. *one-way ANOVA, Analysis of Variance*) uz korištenje Bonferronijeve korekcije α . Korišten je i test za višestruke usporedbe kako bi se utvrdilo točno koje tretmanske skupine međusobno pokazuju statistički značajnu promjenu u ekspresiji proteina. Provjereno je jesu li vrijednosti unutar tretmanskih skupina raspodijeljene po normalnoj razdiobi.

4. Rezultati

4.1. Učinak citrinina na preživljenje stanica

Apsorbancija pri 600 nm nakon bojanja stanica bojom kristal ljubičasto proporcionalna je broju živih stanica. Stanice tretirane otapalom DMSO u najvećoj koncentraciji koja je bila prisutna i kod tretmana citrininom, odnosno u koncentraciji 0,33% (K2), nisu pokazale značajnu razliku u preživljenju stanica u odnosu na stanice uzgajane u punom mediju (K0), neovisno o tome je li bilo riječ o stanicama stanične linije HepG2 (Slika 4.1 a) ili stanicama stanične linije A549 (Slika 4.1 b). Stoga su u pokusima u kojima je istraživana utjecaj citrinina vrijednosti izražene u odnosu na netretirane stanice, odnosno na kontrolne stanice K0. Citrinin u koncentracijama do 50 μM tijekom 24-satnog tretmana nije djelovao na preživljenje stanica HepG2, kao ni na preživljenje stanica stanične linije A549. Koncentracije citrinina od 100 μM smanjile su preživljenje obje vrste stanica za oko 25%. Učinak 200 μM citrinina ispitan je samo na stanicama A549 na kojima je preživljenje stanica smanjio za 69% (Slika 4.1).



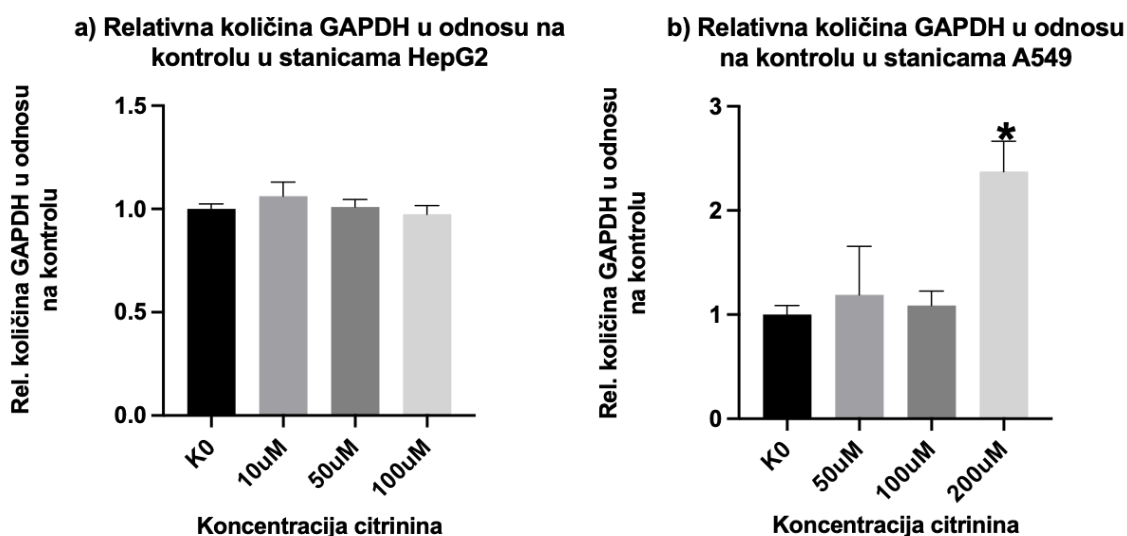
Slika 4.1. Učinak citrinina na preživljenje stanica

Stanice staničnih linija HepG2 (a) i A549(b) izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata, obojane bojom kristal ljubičasto u sklopu metode ELISA, a intenzitet obojenja je izmjereno pri 600 nm na mikrotitarskom čitaču pločica. Rezultati su izraženi kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

4.2. Učinak citrinina na količinu proteina GAPDH

Glicerinaldehid-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH) često se koristi kao referentni gen uz pretpostavku da se njegova količina ne mijenja pod utjecajima različitih tvari. Citrinin u istraživanim koncentracijama nije imao učinak na količinu proteina GAPDH u stanicama HepG2 (Slika 4.2 a), a samo je veća koncentracija citrinina (200 μM) utjecala na količinu

GAPDH u stanicama A549, u kojima je uočeno povećanje relativne razine GAPDH za 137%, odnosno više od dva puta (Slika 4.2 b).

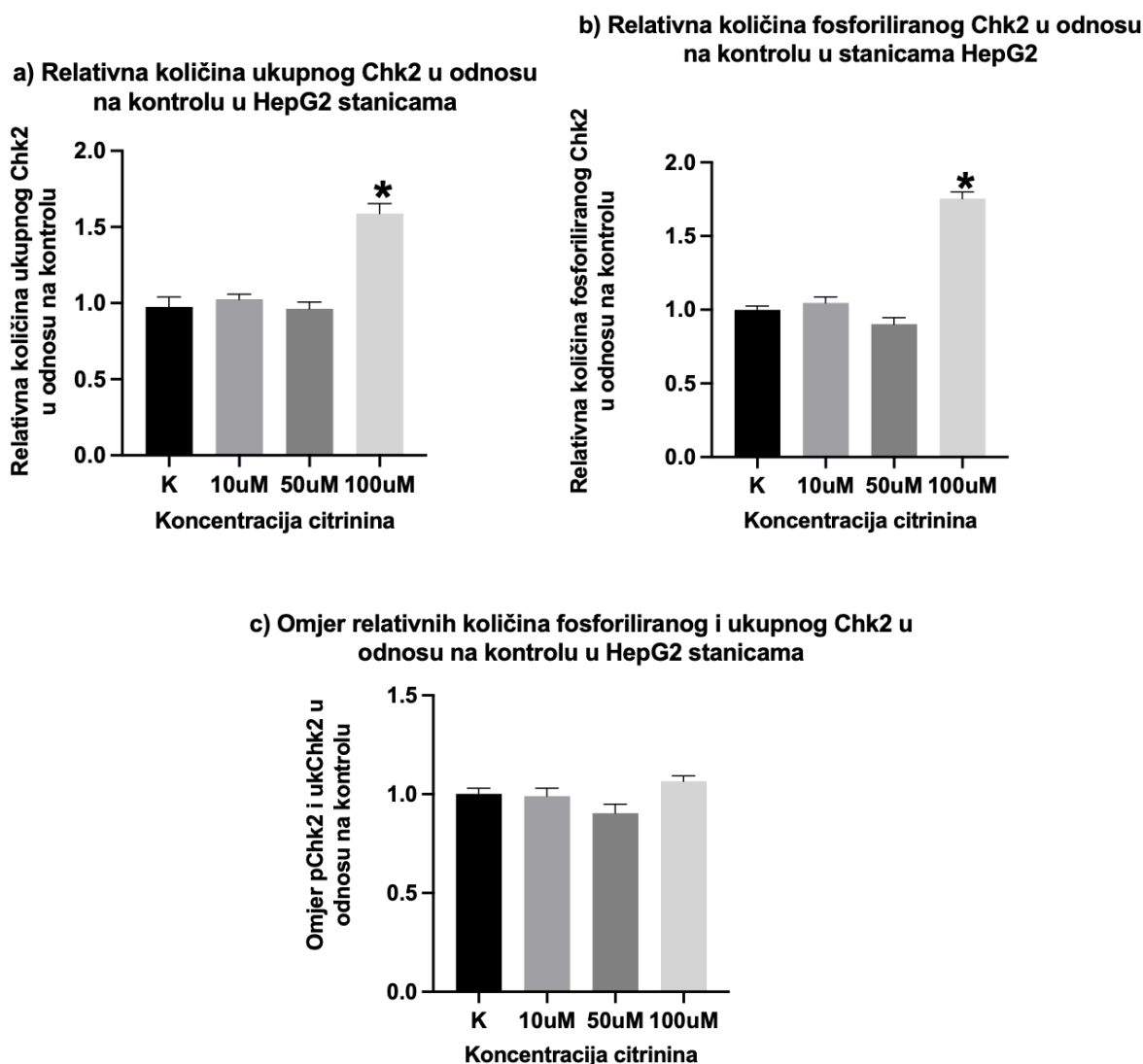


Slika 4.2. Učinak citrinina na ekspresiju GAPDH

Stanice staničnih linija HepG2 i A549 izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata. Relativna razina proteina GAPDH određena je metodom ELISA. Rezultati su izraženi kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolne, netretirane stanice, normirano u odnosu na broj preživjelih stanica.

4.3. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 u stanicama HepG2

Najniža (10 µM) i srednja (50 µM) koncentracija citrinina nisu utjecale na relativnu razinu ekspresije ni ukupnog proteina Chk2 (Slika 4.3 a), niti njegovog fosforiliranog oblika na položaju Thr 68 (Slika 4.3 b) na stanicama HepG2. Najveća primijenjena koncentracija citrinina (100 µM) uzrokovala je porast ukupne količine proteina Chk2 za 58%, a njegovog fosforiliranog oblika za 78%. Posljedično, omjer fosforiliranog i ukupnog proteina Chk2 pod utjecajem 100 µM citrinina, nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne stanice HepG2 (Slika 4.3 c).



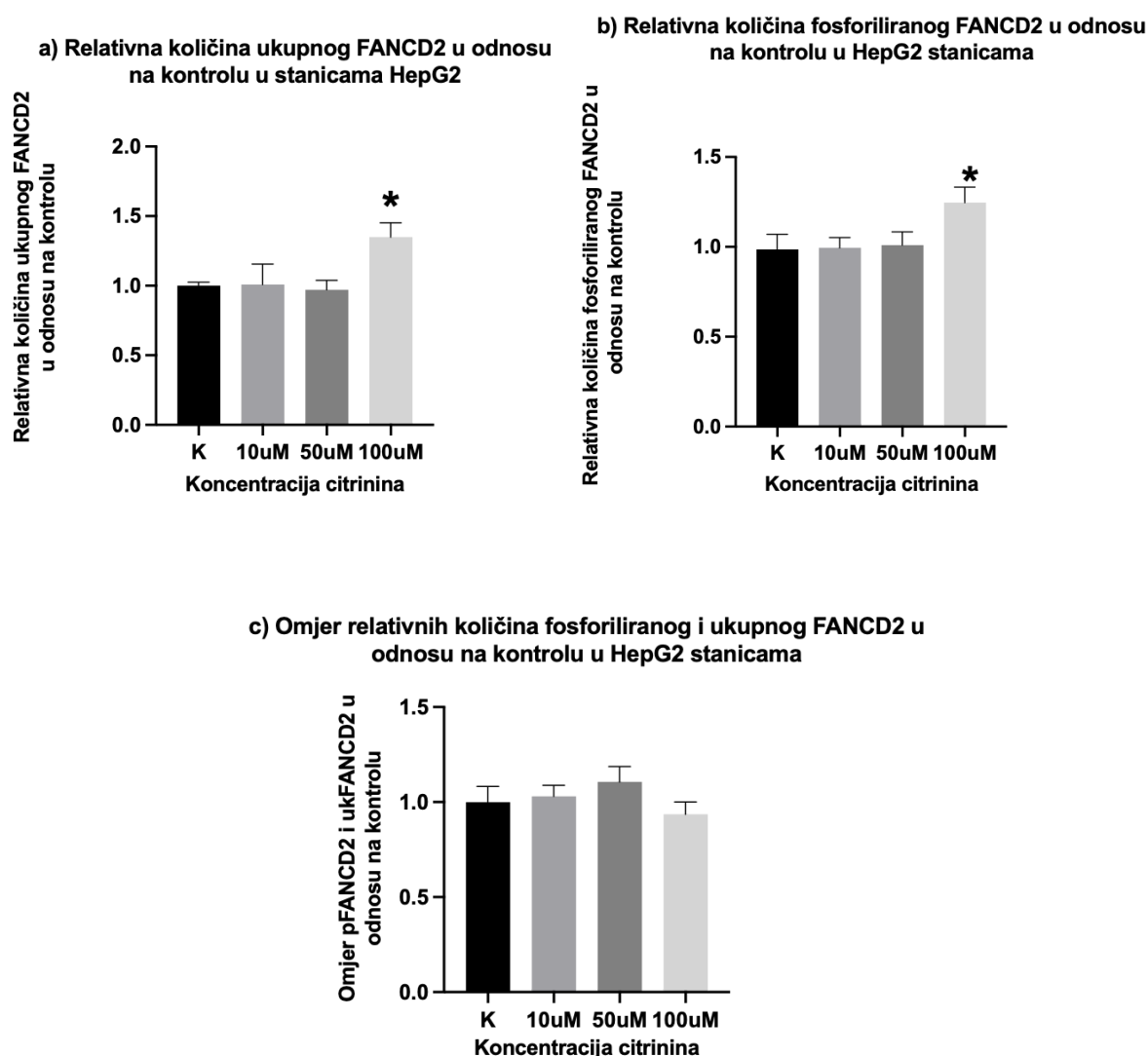
Slika 4.3. Učinak citrinina u stanicama HepG2 na a) relativnu količinu proteina Chk2, b) fosforilaciju proteina Chk2 na položaju Thr 68 i c) omjer fosforiliranog i ukupnog proteina Chk2

Stanice stanične linije HepG2 izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata a relativna količina proteina Chk2 i fosforilacija proteina Chk2 na položaju Thr 68 određena je metodom ELISA. Rezultati su normirani na broj preživjelih stanica i izraženi kao relativan omjer u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

4.4. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina FANCD2 u stanicama HepG2

Najniža (10 μ M) i srednja (50 μ M) koncentracija citrinina nisu utjecale na relativnu razinu ekspresije ni ukupnog proteina FANCD2 (Slika 4.4 a), niti njegovog fosforiliranog oblika na položaju Ser 222 (Slika 4.4 b) na stanicama HepG2. Najveća primijenjena koncentracija citrinina (100 μ M) uzrokovala je porast ukupne količine proteina FANCD2 za 35%, a njegovog fosforiliranog oblika za 25%. Posljedično, omjer fosforiliranog i ukupnog proteina

FANCD2 pod utjecajem 100 μ M citrinina nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne stanice HepG2 (Slika 4.4 c).



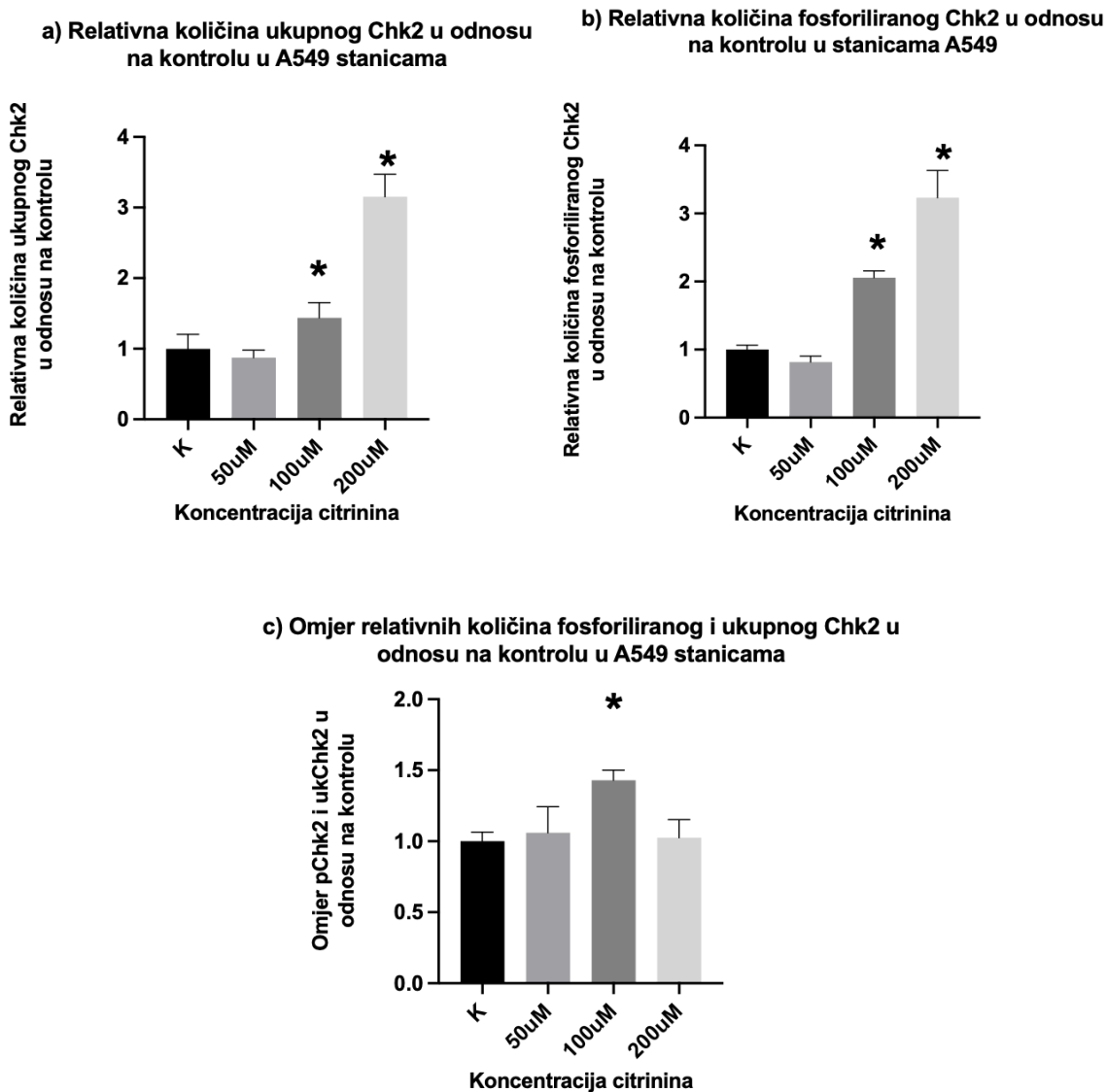
Slika 4.4. Učinak citrinina u stanicama HepG2 na a) relativnu količinu proteina FANCD2, b) fosforilaciju proteina FANCD2 na položaju Ser 222 i c) omjer fosforiliranog i ukupnog proteina FANCD2

Stanice stanične linije HepG2 izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata a relativna količina proteina FANCD2 i fosforilacija proteina FANCD2 na položaju Ser 222 određena je metodom ELISA. Rezultati su normirani na broj preživjelih stanica i izraženi kao relativan omjer u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

4.5. Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina Chk2 u stanicama A549

Citrinin koncentracije 50 μ M nije pokazao učinak na relativnu razinu ekspresije ni ukupnog proteina Chk2 (Slika 4.5 a), niti njegovog fosforiliranog oblika na položaju Thr 68 (Slika 4.5 b) na stanicama A549. Citrinin u koncentraciji 100 μ M uzrokovao je povećanje razine

ukupnog Chk2 za 43% (Slika 4.5 a) i fosforiliranog oblika za 105% (Slika 4.5 b). Najveća primijenjena koncentracija citrinina (200 μ M) uzrokovala je povećanje razine ukupnog Chk2 za 215% (Slika 4.5 a) i fosforiliranog oblika za 223% (Slika 4.5 b). Statistički značajno povećanje omjera fosforiliranog oblika u odnosu na ukupni oblik proteina Chk2 detektirano je posljedično samo kod tretmana citrininom koncentracije 100 μ M (za 43%) (Slika 4.5 c).

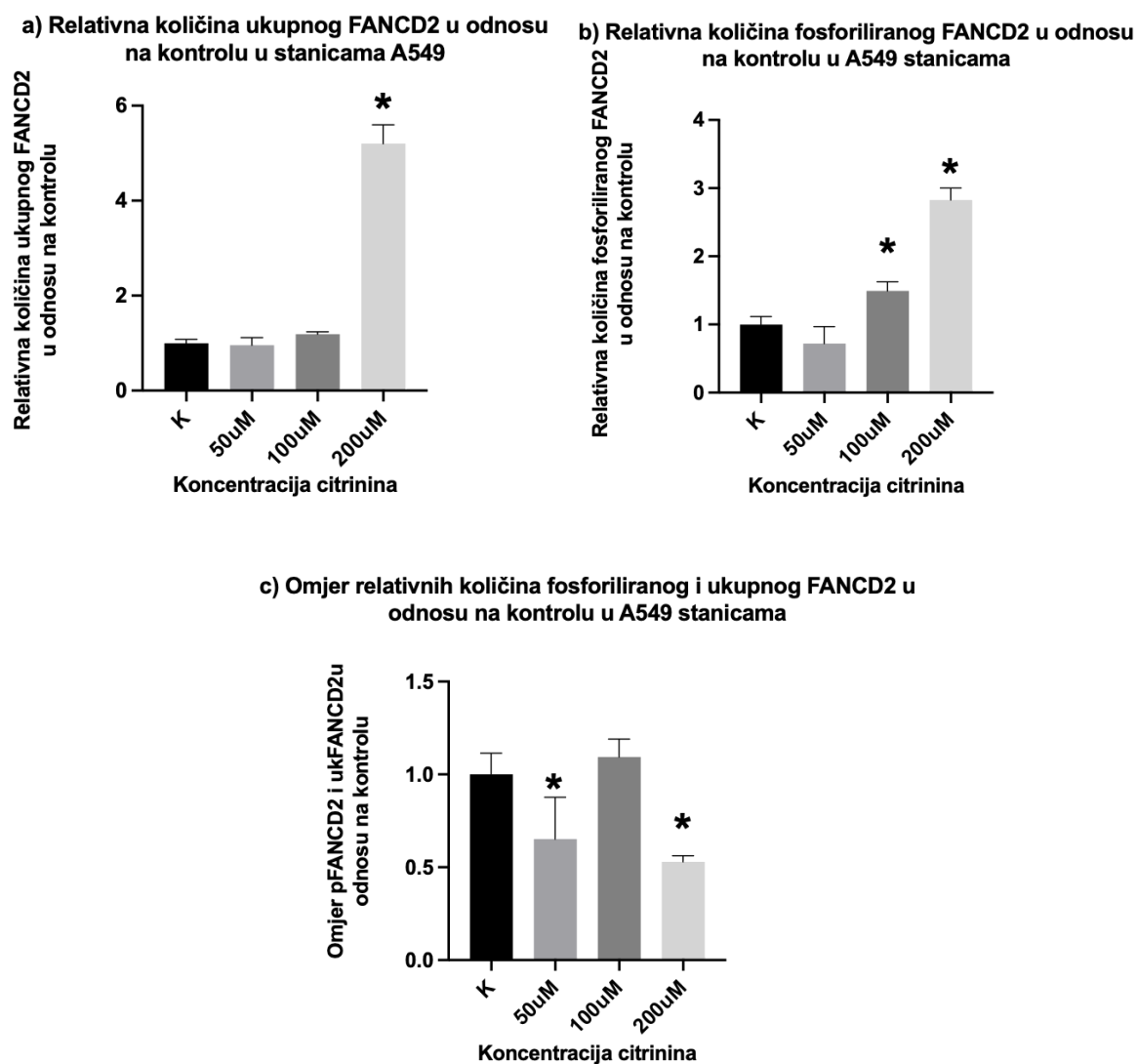


Slika 4.5. Učinak citrinina u stanicama A549 na a) relativnu količinu proteina Chk2, b) fosforilaciju proteina Chk2 na položaju Thr 68 i c) omjer fosforiliranog i ukupnog proteina Chk2

Stanice stanične linije A549 izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata a relativna količina proteina Chk2 i fosforilacija proteina Chk2 na položaju Thr 68 određena je metodom ELISA. Rezultati su normirani na broj preživjelih stanica i izraženi kao relativan omjer u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

4.6. *Učinak citrinina na relativnu količinu i fosforilaciju proteina FANCD2 u stanicama A549*

Od tri koncentracije citrinina (50, 100 i 200 μM) ispitane na staničnoj liniji A549, samo je najveća koncentracija (200 μM) uzrokovala povećanje količine ukupnog FANCD2, i to za čak više od 5 puta (odnosno za 492%) (Slika 4.6 a). Ta najveća koncentracija uzrokovala je i povećanje količine oblika fosforiliranog na položaju Ser 222 za gotovo tri puta (odnosno za 182%), a povećanje fosforilacije od 50% u odnosu na kontrolu uočeno je i pri koncentraciji citrinina od 100 μM (Slika 4.6 b). Za tretman 200 μM citrininom stoga je omjer fosforiliranog i ukupnog proteina, komparativno s netretiranim stanicama, smanjen na gotovo 50%, a smanjenje je uočeno i kod 50 μM citrinina (Slika 4.6 c), no obzirom na veliku standardnu devijaciju upitno je je li taj rezultat pouzdan i biološki značajan.



Slika 4.6. Učinak citrinina u stanicama A549 na a) relativnu količinu proteina FANCD2, b) fosforilaciju proteina FANCD2 na položaju Ser 222 i c) omjer fosforiliranog i ukupnog proteina FANCD2
 Stanice stanične linije A549 izložene su djelovanju različitih koncentracija citrinina tijekom 24 sata a relativna količina proteina FANCD2 i fosforilacija proteina FANCD2 na položaju Ser 222 određena je metodom ELISA. Rezultati su normirani na broj preživjelih stanica i izraženi kao relativan omjer u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

5. Rasprava

Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) glikolitički je enzim koji se smatra *housekeeping* proteinom te se često koristi kao referentni protein u istraživanjima ekspresije proteina (Zhang i sur., 2015). Smatra se da je njegova ekspresija približno konstantna bez obzira na promjene uvjeta ili tretman stanica različitim tvarima. Međutim, rezultati ovoga istraživanja su pokazali da je ekspresija GAPDH stabilna samo u određenom rasponu primijenjenih koncentracija citrinitina, a da se njegova ekspresija mijenja u stanicama A549 pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 200 μM .

Zhang i sur. (2015) navode GAPDH kao jedan od potencijalnih markera progresije tumorskih stanica. Zbog toga što se tumorske stanice većinom oslanjaju na glikolizu kao glavni metabolički put za dobivanje energije dolazi do promjena u regulaciji GAPDH te njegove pojačane aktivnosti. To tumorske stanice postižu različitim posttranslacijskim modifikacijama poput fosforilacije, ADP-ribozilacije i acetilacije.

Također, spominje se i da kao rezultat oštećenja DNA i aktivacije p53 može doći do pojačane ekspresije GAPDH. Točan mehanizam još je nejasan, ali pokazano je i da se GAPDH može translocirati u jezgru i vezati i stabilizirati SIAH1 (engl. *seven in absentia homolog 1*), E3 ubikvitin-ligazu koja sudjeluje u razgradnji jezgrinih proteina tijekom apoptoze (Zhang i sur., 2015). Time se uloga GAPDH kao *housekeeping* proteina u ovom ispitivanju dovodi u pitanje jer citrinitin potiče apoptozu, a time i prije spomenute promjene u aktivnosti i ekspresiji GAPDH, kao što i pokazuju rezultati u staničnoj kulturi A549. Zbog toga su rezultati mjerenja relativne količine Chk2 i FANCD2 kao i njihovih fosforiliranih inačica normirani u odnosu na broj preživjelih stanica obojanih bojom kristal ljubičasto, a nisu normirani obzirom na količinu GAPDH.

Mnogi toksini mogu inducirati apoptozu stanica, pa tako i citrinitin. Literaturno je poznato da tretman stanica citrinitinom izravno potiče nastajanje reaktivnih kisikovih specija (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Dolazi do porasta koncentracije kalcija u stanici što inducira sintazu dušikova(II) oksida (engl. *nitrogen oxide synthetase*, NOS) i dovodi do proizvodnje dušikova(II) oksida. U apoptotičko signaliziranje uključene su kaspaze 3 i 9, a aktivacijom kaspaze 3 dolazi do aktivacije PAK2 puta, JNK aktivacije i do apoptoze. Citrinitin također pokreće o mitohondriju i o ROS ovisne mehanizme apoptoze u embrijskim stanicama miša, istovremeno s utišavanjem molekula za preživljavanje poput HSP90, Ras, Raf-1 i ERK- $\frac{1}{2}$.

Smanjena količina ovih proteina koji potiču preživljenje stanica rezultat je pojačane razgradnje putem ubikvitinilacije i posljedične razgradnje u proteasomu, proteinskom kompleksu koji razgrađuje stanične proteine označene molekulama ubikvitina (Chan, 2008).

Dakle, kombinacijom proapoptotičkih učinaka i negativnim djelovanjem na molekule koje potiču preživljenje stanica citrinin postiže aktivaciju procesa apoptoze, što potvrđuju i rezultati dobiveni u ovom diplomskom radu. Povećanje relativne količine Chk2 i FANCD2 te njihovih fosforiliranih inačica pri najvišim ispitivanim koncentracijama citrinina uočeno je u obje stanične linije. S obzirom da su oba promatrana proteina važni sudionici u procesima popravka dvolančanih lomova DNA možemo posumnjati da povećanje njihove ekspresije sugerira upravo to da citrinin takve dvolančane lomove potiče. Smanjenje preživljenja stanica pri višim koncentracijama citrinina pokazuje da usprkos povećanju količine proteina koji sudjeluju pri popravku DNA, jedan dio stanica takve lomove ne uspijeva popraviti te dolazi do stanične smrti.

S obzirom da u obje stanične linije pri visokim koncentracijama citrinina dolazi do povećane ekspresije fosforiliranog FANCD2, možemo naslutiti da dolazi do zastoja staničnog ciklusa u S-fazi (Bartek i sur., 2004). To nam govori da stanice pokušavaju popraviti citrininom uzrokovane lomove DNA. Pokazani pad preživljenja stanica pri visokim koncentracijama citrinina u obje stanične kulture pokazuje da usprkos pokušajima popravka DNA ipak dolazi do eliminacije određenog udjela previše oštećenih stanica apoptozom.

Zanimljivo je da postoji velika razlika u omjeru fosforiliranog i ukupnog Chk2 i FANCD2 kod HepG2 i A549 stanica. U slučaju HepG2 stanica navedeni omjer fosforiliranih i ukupnih inačica ovih proteina ostaje konstantan, neovisno o koncentraciji tretmana citrininom. Bez obzira na konstantan omjer, pokazalo se da relativna količina ukupnih i fosforiliranih proteina raste s višim koncentracijama citrinina, što upućuje na aktivaciju ATM, Chk2 i FA te puta popravka DNA (Rodriguez i D'Andrea, 2017).

Kod stanica A549 nalazimo značajne promjene u omjeru fosforiliranog i ukupnog Chk2 i FANCD2. U slučaju Chk2 naslućuje se uzlazni trend omjera kako se povećava koncentracija citrinina, što bi moglo značiti da se povećanjem koncentracije citrinina i veći dio molekula Chk2 u stanicama aktivira. U slučaju proteina FANCD2 takav trend ne možemo odrediti. Promatranjem apsolutnih količina proteina primjećujemo porast ekspresije sličan onome u

HepG2 staničnoj kulturi, što daje naslutiti da se putevi ATM, a time i Chk2 i FANCD2 ipak aktiviraju na sličan način.

6. Zaključci

Temeljem rezultata ovog istraživanja o utjecaju 10, 50 i 100 μM citrinina na staničnu liniju HepG2, te 50, 100 i 200 μM citrinina na staničnu liniju A549, a vezano uz relativnu količinu proteina Chk2 i FANCD2 i fosforilaciju tih proteina na položajima Thr 68 (Chk2) i Ser 222 (FANCD2), određenih metodom ELISA, moguće je zaključiti sljedeće:

- Citrinin u koncentracijama do 50 μM ne utječe na preživljenje niti stanica HepG niti stanica A549. Preživljenje stanica ovisno je o primijenjenoj koncentraciji citrinina i vrsti stanica, pri čemu je značajnije smanjenje preživljenja pri 100 μM koncentraciji citrinina uočeno u obje stanične linije, no statistički se značajnim pokazalo samo na staničnoj liniji HepG2, iz čega se daje zaključiti da je stanična linija HepG2 nešto osjetljivija na toksično djelovanje citrinina od stanične linije A549.
- Citrinin pri koncentracijama do 100 μM ne utječe na relativnu količinu proteina GAPDH niti u stanicama HepG2 niti u stanicama A549, no koncentracija citrinina od 200 μM čije je djelovanje ispitano samo na stanicama A549 mijenja količinu proteina GAPDH, te je stoga GAPDH kao referentni protein moguće u ove dvije stanične linije koristiti isključivo pri koncentracijama do 100 μM .
- Citrinin pokazuje sličan obrazac utjecaja na ukupnu količinu i fosforilaciju kako proteina Chk2 tako i proteina FANCD2 u stanicama HepG2. Pritom samo najveća ispitana koncentracija citrinina od 100 μM uzrokuje blago (u rasponu od oko 25% do 80%) povećanje ukupne količine istraživanih proteina te ukupne količine fosforilacije na položajima Thr 68 odnosno Ser 222, pri čemu ne dolazi do promjena u omjerima fosforiliranih i ukupnih oblika tih proteina u odnosu na kontrolne stanice. Uočene promjene u stanicama HepG2 manjeg su intenziteta kod proteina FANCD2 u odnosu na protein Chk2.
- Niža koncentracija citrinina (50 μM) nema učinka niti na ukupnu količinu niti na fosforilaciju bilo proteina Chk2, bilo proteina FANCD2 u stanicama A549.
- Citrinin u koncentracijama 100 μM i 200 μM utječe i na ukupnu količinu proteina Chk2 i na njegovu fosforilaciju, a intenzitet promjene je intenzivniji uz veću primijenjenu koncentraciju citrinina. Sličan, ali po intenzitetu ipak drukčiji učinak uočen je i kod proteina FANCD2.
- Citrinin može, ukoliko je dovoljne koncentracije, uzrokovati povećanje ukupne količinu proteina Chk2 i FANCD2 u stanicama tumorskih staničnih linija HepG2 i

A549, potaknuti njihovu fosforilaciju odnosno aktivaciju te tako modulirati stanične puteve u kojima ti proteini sudjeluju.

- S obzirom da aktivaciju proteina Chk2 i FANCD2 potiču dvolančani lomovi DNA, možemo pretpostaviti da citrinin kao jedan od mehanizama svoje toksičnosti ima izazivanje upravo takvih dvolančanih lomova DNA.

7. Popis kratica, oznaka i simbola

ANOVA (analiza varijance, engl. *analysis of variance*)

ATM (ataksija-telangiektazija mutirani protein, engl. *ataxia-telangiectasia mutated*)

BH domena (Bcl-2 proteinu homologna domena, engl. *Bcl-2 homology domain*)

BRCA1 (protein tumora dojke 1, engl. *BReast CAncer 1*)

BRCA2 (protein tumora dojke 2, engl. *BReast CAncer 2*)

Bcl-2 (protein B-staničnog limfoma, engl. *B-cell lymphoma 2*)

CDC25A, 25B, 25C (protein stanične diobe 25A, 25B, 25C, engl. *Cell Division Cycle 25A, 25B, 25C*)

CDK (o ciklinu ovisna kinaza, engl. *cyclin-dependent kinase*)

Chk1 (kinaza kontrolne točke 1, engl. *checkpoint kinase 1*)

Chk2, CHEK2 (kinaza kontrolne točke 2, engl. *checkpoint kinase 2*)

DIABLO (protein koji direktno veže proteine inhibitore apoptoze s niskom izoelektričnom točkom, engl. *direct IAP binding protein with low pI*)

DISC (kompleks koji inducira smrt stanice, engl. *death inducing signaling complex*)

E2F1 (transkripcijski faktor E2F, engl. *E2F Transcription Factor 1*)

ELISA (s enzimom povezani imunosorpcijski test, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Erk ½ (kinaza regulirana izvanstaničnim signalima, engl. *Extracellular signal-regulated kinase*)

FA put (put proteina Fanconi anemija)

FADD (protein povezan s Fas putem domene smrti, engl. *Fas Associated Via Death Domain*)

FANCD2 (protein Fanconi anemije grupe D2, engl. *Fanconi anemia group D2*)

FOXM1 (engl. *forkhead box protein M1*)

GAPDH (gliceraldehidfosfat dehidrogenaza, engl. *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*)

HPLC (tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, engl. *high performance liquid chromatography*)

HSP90 (protein toplinskog šoka 90, engl. *heat shock protein 90*)

JNK (c-Jun N-terminalna kinaza, engl. *c-Jun N-terminal kinases*)

MDM4 (engl. *double minute 4 protein*)

NOS (sintaza NO, engl. *nitric oxide synthase*)

PAK2 (kinaza koju aktivira p21, engl. *p21-activated kinase 2*)

PBS (fosfatni pufer, engl. *phosphate-buffered saline*)

PML (protein promijelocitne leukemije, engl. *Promyelocytic leukemia protein*)

RAD51 (rekombinaza RAD51, engl. *RAD51 recombinase*)

RIP (protein koji inaktivira ribosome, engl. *ribosome-inactivating protein*)
ROS (kisikovi radikali, engl. *reactive oxygen species*)
Raf (protein akcelerirajućeg fibrosarkoma, engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)
Ras (protein iz virusa štakorskog sarkoma, engl. *Rat sarcoma virus*)
SDS (natrijev dodecilsulfat, engl. *sodium dodecil sulphate*)
SIAH1 (engl. *Seven in absentia homolog 1*)
Smac (drugi mitohondrijski aktivator kaspaze, engl. *second mitochondria-derived activator of caspase*)
TBS (tris pufer, engl. *tris-buffered saline*)
TLC (tankoslojna kromatografija, engl. *thin layer chromatography*)
TNF (faktor nekroze tumora, engl. *tumour necrosis factor*)
TRADD (s TNF receptorom 1 povezan protein s domenom smrti, engl. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*)
dNTP (deoksinukleozid trifosfat)
p53 (protein 53)
pChk2 (fosforilirana kinaza kontrolne točke 2, engl. *phosphorylated checkpoint kinase 2*)
pFANCD2 (fosforilirani protein Fanconi anemije grupe D2, engl. *phosphorylated Fanconi anemia group D2*)

8. Literatura

Barnum KJ & O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods mol biol*, 2014, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2

Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA Damage in S Phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5, 792–804.

Bennett JW & Klich M. Mycotoxins. *Clin microbiol rev*, 2003, 16(3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>

Berg JM, Tymoczko JL i Stryer L. 'Istraživanje proteina i proteoma' u Biokemija. 9. izdanje (englesko). W.H. Freeman, 2019, ISBN: 1319114679

Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 1997, 272:26159–65.

Budillon A, Carbone C, Di Gennaro E. Tissue transglutaminase: a new target to reverse cancer drug resistance. *Amino Acids*, 2013, 44(1): 63–72.

Carvajal LA, Hamard PJ, Tonnessen C, Manfredi JJ. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev*, 2012, 26(14):1533–1545.

Chan WH. Citrinin induces apoptosis in mouse embryonic stem cells. *IUBMB Life*, 2008, 60: 171-179. <https://doi.org/10.1002/iub.30>

ChEMBL. Compound report card. Citrinin.

https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL510139/, pristupljeno 8.6.2023.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:647–56.

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137

Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 2003, 112:659–72.

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 2005, 123:321–34.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 277–88.

International Agency for Research on Cancer. Citrinin. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. *IARC*, 1986, volume 40, 67.

Kamle M, Mahato DK, Gupta A, Pandhi S, Sharma N, Sharma B, Mishra S, Arora S, Selvakumar R, Saurabh V, Dhakane-Lad J, Kumar M, Barua S, Kumar A, Gamlath S, Kumar P, Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins*, 2022, 14, 85.
<https://doi.org/10.3390/toxins14020085>

Kitabatake N, Trivedi AB, Doi E. Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions. *J Agric Food Chem*, 1991, 39 (12), 2240-2244.

Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2405–19.

Maller JL. MPF and cell cycle control. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1990, 24:323–328.

Ostry V, Malir F, Ruprich J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 2013, 5, 1574–1586.

O’Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(7):296–303.

Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, & D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 2016, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Pleadin J, et al. Citrinin u hrani i hrani za životinje, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 2015, 10(3-4), str. 84-90.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*, 2005, 4:138–44.

Rodríguez A & D’Andrea A. Fanconi anemia pathway. *Curr Biol*, 2017, CB, 27(18), R986–R988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.043>

The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase, *Nucleic Acids Res*, 2023, 51:D523–D531. <https://www.uniprot.org>, pristupljeno 8.6.2023.

Xi H, Wang S, Wang B, Hong X, Liu X, Li M, Shen R, & Dong Q. The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (Review). *Oncol rep*, 2022, 48(6), 208. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8423>

Xu B, Jia X, Gu L, Sung C. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*, 2006, 17, 271-285.

Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 Kinase in the DNA Damage Response and Beyond. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6, 442–457.

Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, Zhang GJ, & Cui YK. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer biol med*, 2015, 12(1), 10–22. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019>

9. Sažetak/Summary

Mikotoksini su produkti sekundarnog metabolizma filamentoznih gljivica. Citrinin, čest onečišćivač ljudske i stočne hrane, poliketidni je mikotoksin koji pokazuje antibakterijska, antitumorska i neuroprotektivna svojstva, ali je istovremeno jako nefrotoksičan i genotoksičan. Mehanizmi kojima ostvaruje svoju toksičnost su nedovoljno poznati, a pretpostavlja se da je jedan od njih, kao i kod drugih mikotoksina, poticanje apoptoze te moduliranje različitih signalnih puteva. U ovom radu istražen je učinak citrinina na ukupnu količinu i fosforilaciju dva proteina, Chk2 i FANCD2, koji su ključni u mehanizmima dvolančanog popravka DNA i to na dvije stanične linije humanih tumorskih stanica, HepG2 (hepatocelularni karcinom) i A549 (plućni adenokarcinom). Za ispitivanje je korišten s enzimom povezani imunosorpcijski test (ELISA), CytoGlow™ koji se izvodi izravno na stanicama uzgajanima mikrotitarskim pločicama. Dobiveni podaci analizirani su u statističkom programu GraphPad Prism. Utvrđeno je da citrinin može, ukoliko je dovoljne koncentracije, uzrokovati povećanje ukupne količine proteina Chk2 i FANCD2 i u stanicama HepG2 kao i u stanicama A549 te potaknuti njihovu fosforilaciju odnosno aktivaciju. Intenziteti uočenih promjena su relativno blagi do osrednji, ovisni o primijenjenim koncentracijama i vrsti stanica. S obzirom da aktivaciju proteina Chk2 i FANCD2 potiču dvolančani lomovi DNA, možemo pretpostaviti da je jedan od mehanizama kojima citrinin ostvaruje svoju toksičnost upravo izazivanje takvih dvolančanih lomova DNA i moduliranje signalnih puteva u kojima sudjeluju proteini Chk2 i FANCD2.

Mycotoxins are products of the secondary metabolism of filamentous fungi. Citrinin, a common food and animal feed pollutant, is a polyketide mycotoxin, demonstrating antibacterial, antitumour and neuroprotective properties. It is also highly nephrotoxic and genotoxic. Mechanisms of its action are still insufficiently explored, but it is assumed that one of those mechanisms, like in other mycotoxins, is inducing apoptosis and modulating various signaling pathways. In this paper, it was explored how citrinin impacts the total amount and phosphorylation of two proteins, Chk2 and FANCD2, which are essential in double-strand DNA break repairs. This was done on two human tumour cell culture lines, HepG2 (hepatocellular carcinoma) and A549 (lung adenocarcinoma). To conduct the experiment, the CytoGlow™ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used directly on seeded cell cultures in 96-well plates. The data was analysed using the GraphPad Prism statistical software. It has been shown that citrinin can, if present in a high enough dosage, cause the increase in total amounts of Chk2 and FANCD2 proteins, as well as induce their

phosphorylation and activation in both tested cell lines. The intensity of these changes is relatively mild to moderate, depending on the concentration of citrinin which was applied and the type of cells. Because the activation of Chk2 and FANCD2 is induced by double-stranded DNA breaks, we can assume that one of citrinin's mechanisms of toxicity is precisely the induction of double-stranded DNA breaks and the modulation of signaling pathways in which Chk2 and FANCD2 take part in.

10. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

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

Diplomski rad

Učinak citrinina na proteine Chk2 i FANCD2 u humanim staničnim linijama HepG2 i A549

Sonja Homar

SAŽETAK

Mikotoksini su produkti sekundarnog metabolizma filamentoznih gljivica. Citrinin, čest onečišćivač ljudske i stočne hrane, poliketidni je mikotoksin koji pokazuje antibakterijska, antitumorska i neuroprotektivna svojstva, ali je istovremeno jako nefrotoksičan i genotoksičan. Mehanizmi kojima ostvaruje svoju toksičnost su nedovoljno poznati, a pretpostavlja se da je jedan od njih, kao i kod drugih mikotoksina, poticanje apoptoze te moduliranje različitih signalnih puteva. U ovom radu istražen je učinak citrinina na ukupnu količinu i fosforilaciju dva proteina, Chk2 i FANCD2, koji su ključni u mehanizmima dvolančanog popravka DNA i to na dvije stanične linije humanih tumorskih stanica, HepG2 (hepatocelularni karcinom) i A549 (plućni adenokarcinom). Za ispitivanje je korišten s enzimom povezani imunisorpcijski test (ELISA), CytoGlow™ koji se izvodi izravno na stanicama uzgajanima mikrotitarskim pločicama. Dobiveni podaci analizirani su u statističkom programu GraphPad Prism. Utvrđeno je da citrinin može, ukoliko je dovoljne koncentracije, uzrokovati povećanje ukupne količine proteina Chk2 i FANCD2 i u stanicama HepG2 kao i u stanicama A549 te potaknuti njihovu fosforilaciju odnosno aktivaciju. Intenziteti uočenih promjena su relativno blagi do osrednji, ovisni o primijenjenim koncentracijama i vrsti stanica. S obzirom da aktivaciju proteina Chk2 i FANCD2 potiču dvolančani lomovi DNA, možemo pretpostaviti da je jedan od mehanizama kojima citrinin ostvaruje svoju toksičnost upravo izazivanje takvih dvolančanih lomova DNA i moduliranje signalnih puteva u kojima sudjeluju proteini Chk2 i FANCD2.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 7 grafičkih prikaza i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citrinin, stanične linije, HepG2, A549, Chk2, FANCD2, mehanizam toksičnosti

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

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

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Domagoj Kifer, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 15. lipnja 2023.

Citrinin effect on Chk2 and FANCD2 proteins in human cell lines HepG2 and A549

Sonja Homar

SUMMARY

Mycotoxins are products of the secondary metabolism of filamentous fungi. Citrinin, a common food and animal feed pollutant, is a polyketide mycotoxin, demonstrating antibacterial, antitumour and neuroprotective properties. It is also highly nephrotoxic and genotoxic. Mechanisms of its toxicity are still insufficiently explored, but it is assumed that one of those mechanisms, like in other mycotoxins, is apoptosis induction and modulation of various signaling pathways. In this study, it was explored how citrinin impacts the total amount and phosphorylation of two proteins, Chk2 and FANCD2, which are essential in double-strand DNA break repairs. The experiments were performed on two human tumour cell culture lines, HepG2 (hepatocellular carcinoma) and A549 (lung adenocarcinoma), using CytoGlow™ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), directly on cells seeded in 96-well plates. The data was analysed using the GraphPad Prism statistical software. It has been shown that citrinin can, if present in a high enough dosage, cause the increase in total amounts of Chk2 and FANCD2 proteins, as well as induce their phosphorylation and activation in both tested cell lines. The intensity of these changes is relatively mild to moderate, depending on the concentration of citrinin which was applied and the type of cells. Because the activation of Chk2 and FANCD2 is induced by double-stranded DNA breaks, we can assume that one of citrinin's mechanisms of toxicity is precisely the induction of double-stranded DNA breaks and the modulation of signaling pathways in which Chk2 and FANCD2 take part in.

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

Thesis includes: 34 pages, 7 figures and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: citrinin, cell culture lines, HepG2, A549, Chk2, FANCD2, mechanism of toxicity

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

Reviewers: **Sanja Dabelić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Domagoj Kifer, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 15th 2023.

