Određivanje promjene u ekspresiji gena citokrom c u stanicama izloženim derivatima N-9 sulfnilurea

Klasan, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:878206

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sara Klasan

Određivanje promjene ekspresije gena *citokroma c* u stanicama izloženim derivatima *N*-9 sulfonilurea

Završni rad

Osijek, 2017. godine

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sara Klasan

Određivanje promjene ekspresije gena *citokroma c* u stanicama izloženim derivatima *N*-9 sulfonilurea

Završni rad

Osijek, 2017. godine

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš-Obrovac

Rad ima 27 listova, 1 tablicu i 8 slika.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš–Obrovac na iskazanoj potpori i sugestijama tijekom istraživanja i izrade završnog rada.

Posebno se zahvaljujem dr.sc. Marijani Jukić na velikoj pomoći i potpori tijekom izrade rada.

Zahvaljujem se i gospođi Meliti na pomoći te se zahvaljujem svim svojim prijateljima koji su bili uz mene sve ovo vrijeme.

Posebnu zahvalu upućujem mojoj obitelji za bezgranično strpljenje, podršku, brigu i svaku pomoć.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Tumori i njihovo liječenje 1
1.1.1. Tumori 1
1.1.2. Liječenje tumora 2
1.2. Apoptoza 3
1.2.1. Vanjski put 4
1.2.2. Unutarnji put 5
1.3. Citokrom c 6
1.4. Stanične linije 7
1.4.1. Humane epitelne stanice karcinoma vrata maternice 7
1.4.2. Stanice kronične mijeloidne leukemije 8
1.5. Protutumorski učinci *N*-9 sulfonilurea 8
2. HIPOTEZA 9
3. CILJ 10
4. MATERIJALI I METODE 11
4.1. Materijali 11
4.1.1. Derivati *N*-9 sulfonilurea 11
4.1.2. Stanične linije 11
4.1.3. Kemikalije 12
4.2. Metode 12
4.2.1. Kultura stanica *in vitro* 12
4.2.2. Izolacija RNA 13
4.2.3. Sinteza cDNA 13
4.2.4. Real-time PCR 14
4.2.5. Obrada podataka 16
5. REZULTATI 17
6. RASPRAVA 19
7. ZAKLJUČCI 21
8. SAŽETAK 22
9. SUMMARY 23
10. LITERATURA 24
11. ŽIVOTOPIS 27

POPIS KRATICA

ATP *(eng. Adenosine triphosphate)* adenozin trifosfat

Apaf-1 *(eng. Apoptotic protease activating factor 1)* aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze

DD *(eng. death domain)* domena smrti

DED *(eng. death effector domain)* domena smrti adapterskih molekula

DISC *(eng. Death Inducing Signaling Complex)* molekularni kompleks

DMEM *(eng.* Dulbecco's Modified Eagle's medium**)** Dulbecco modificirani Eagleov medij

FADD *(eng. Fas-associated death domain)* FADD adapterskog proteina

FBS *(eng. Fetal bovine serum)* fetalni goveđi serum

PBS (*eng. Phosphate Buffered Saline*) fosfatni pufer

RPMI 1640 *(eng. Roswell Park Memorial Institute*) Institute medij

TNF *(eng. Tumor Necrosis Factor)* faktor tumora nekroze

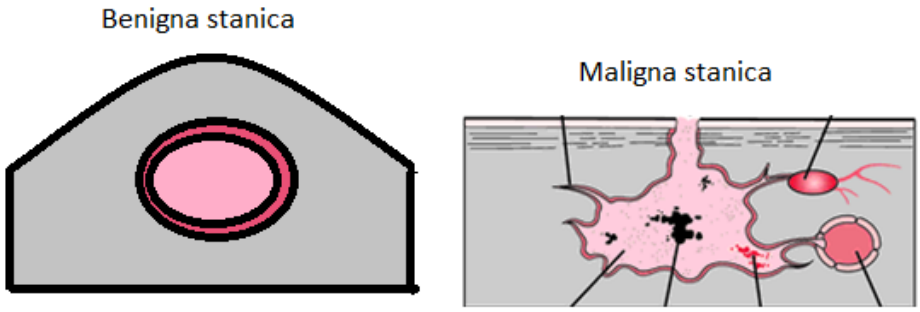
1. UVOD

1.1. Tumori i njihovo liječenje

1.1.1. Tumori

Svaka stanica u organizmu ima svoj životni vijek. Ljudski organizam funkcionira kao dječja klackalica. Kako bi se održala ravnoteža „klackalice“ u zdravom organizmu broj stanica koje umiru jednak je broju novonastalih stanica. Kada dođe do poremećaja u proliferaciji stanica dolazi do nastanka tumora (1).

Tumori ili neoplazije su stanice koje su izmijenjene te imaju nepravilan i progresivan rast, odnosno imaju nekontroliranu proliferaciju stanica u tijelu. Incidencija novih tumora je velika te oni postaju veliki javnozdravstveni problem. Prema podatcima Europske statističke agencije u Europskoj uniji 2013. godine bilo je registrirano 1 milijun i 294.194 smrti kao posljedica tumorske bolesti od čega je u Hrvatskoj bilo 13.803 smrti (2). Tumori se dijele na benigne i maligne. Benigni su oni u kojima tumorske stanice nalikuju normalnim stanicama, ali ostaju samo na jednom mjestu te se ne šire dalje. Maligne neoplazije imaju karakteristiku da se šire putem krvožilnog i limfnog sustava u druge dijelove organizma te stvaraju metastaze (Slika 1).



Slika 1. Razlika između benignih i malignih tumorskih stanica

(Slika preuzeta iz knjige autora Damnjanov I (3) i prilagođena).

Iako je mehanizam nastanka tumora složen i još uvijek nije do kraja istražen, poznato je da na njegov nastanak utječe više čimbenika: okolišni čimbenici (npr. dugotrajno izlaganje karcinogenim kemikalijama), kemijske tvari, način života (dokazana povezanost pušenja s rakom pluća) te svakako i unutrašnji čimbenik kao što je poremećena regulacija mehanizama

zaduženih za kontrolu staničnog rasta. Nastanak tumora je proces koji se sastoji od nekoliko koraka koji dovode do poremećaja funkcije stanice. Prvi korak u nastanku tumora je inicijacija gdje dolazi do genetske promjene u stanici koja vodi do poremećaja homeostaze. Slijede promocija i progresija u kojima nastaje niz novih mutacija te na samom kraju dolazi do metastaziranja – širenja tumorskih stanica u ostale dijelove organizma pomoću krvožilnog ili limfnog sustava (4).

Sve tumorske stanice imaju zajedničke osobine. Poremećen im je mehanizam koji regulira diferencijaciju, preživljavanje i proliferaciju. Kada normalne stanice dođu do kraja životnog vijeka, one uđu u fazu mirovanja (G_0) za razliku od tumorskih stanica koje same proizvode faktor rasta koji ih potiče na proliferaciju. Sve maligne stanice imaju mogućnost metastaziranja i životni vijek im je duži, jer izostaje programirana stanična smrt – apoptoza.

Za razumijevanje samih tumora potrebno je poznavati gene koji su dominantno uključeni u nastanak raka, a to su onkogeni i tumor-supresorski geni. Onkogeni su transformirani oblici protoonkogena, gena koji regulira normalnu staničnu proliferaciju i diferencijaciju. Do transformacije dolazi kada dođe do mutacije ili nekontrolirane ekspresije protoonkogena. Tumor-supresorski geni su geni koji sprječavaju diobu stanica ukoliko dođe do oštećenja DNA ili do mutacije. Kada dođe do mutacije tumor-supresorskih gena, ne dolazi do popravka oštećene DNA što pogoduje nastanku tumora. Najpoznatiji tumor-supresorski gen je gen *p53* koji je vrlo važan u sprječavanju nastanka tumora (5).

1.1.2. Liječenje tumora

Danas postoji veliki spektar mogućnosti liječenja tumora, od kirurških metoda do radioterapije, hormonske terapije, kemoterapije i imunoterapije (6). Kod liječenja tumora potrebno je dobro poznavati strukturu i mehanizam rasta i razvoja tumora kako bi se odabrala najdjelotvornija terapija koja će imati minimalan učinak na normalne stanice. Kako bi se postigao što bolji rezultat, često se u kliničkoj praksi koristi kombinirana terapija. U ovakvim terapijama potrebno je da svaki lijek, koji se koristi u kombinaciji, sam po sebi bude protutumorski djelotvoran. Lijekovi ne bi smjeli imati križnu reaktivnost te moraju imati različite mehanizme djelovanja.

Kombiniranom terapijom pokušava se riješiti sve veća rezistencije na lijekove što je jedan od velikih problema u liječenju tumora. Jedan od mehanizama nastanka rezistencije na kemoterapijske lijekove je proizvodnja pumpi koje izbacuju lijekove iz stanice. Ostali mehanizmi su: defektna apopotoza, amplifikacija gena te promjene u genskoj ekspresiji.

Citostatici su lijekovi koji se koriste protiv tumorskih stanica, ali svojim djelovanjem utječu i na normalne, zdrave stanice, pogotovo na stanice koje se brzo dijele (npr. krvne stanice, stanice usne sluznice, crijeva, želudac). Svi citostatici imaju nuspojave te se mora paziti kako se uzimaju kako ne bi došlo do većeg oštećenja organizma. Pri određivanju terapije potrebno je dobro odrediti dozu, što može biti teško. Ako se primjeni premala doza, terapija neće imati nikakav učinak protiv tumorskih stanica. Neprimjereno velika doza, pak može uzrokovati neželjene posljedice, poput toksičnog djelovanja na organizam pacijenta. Neke vrste citostatika su: alkilirajući citostatici, antimetaboliti te inhibitori topoizomeraza.

Najstarija skupina citostatika su alkilirajući citostatici koji imaju sposobnost alkiliranja mnogih molekula kao što su proteini, RNA i DNA. Temelj njihovog učinka protiv tumora je upravo stvaranje jake kovalentne veze prijenosom alkilne skupine na DNA. Drugu skupinu citostatika čine antimetaboliti, molekule građom nalik na nukleozide, koje djeluju kao inhibitori aktivnosti enzima uključenih u sintezu velikih makromolekula poput DNA i RNA. Za razliku od alkilirajućih citostatika, antimetaboliti djeluju u samo određenom dijelu staničnog ciklusa (za vrijeme sinteze). Konačno, inhibitori topoizomeraza čine aktivne tvari lijekova koji utječu na dva enzima: topoizomerazu I i II. To su enzimi koji sudjeluju u sintezi DNA tako što tijekom sinteze smanjuju napetost DNA lanca (7).

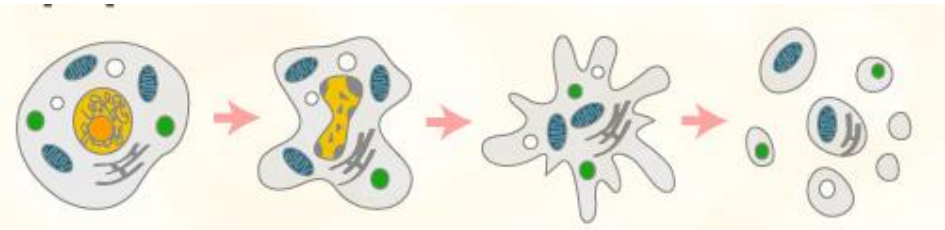
1.2. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt jedna je od najbolje istraženih i objašnjenih mehanizama stanične smrti kod višestaničnih organizama. Ona predstavlja poseban oblik stanične smrti bez kojeg se ne može održavati homeostaza. Inhibicija apoptoze može dovesti do razvitka raznih bolesti kao što su autoimune i upalne bolesti te posredovati nastanak raznih vrsta tumora (8).

Princip apoptoze prvi je opisao njemački znanstvenik Karl Vogt (1842. godine), koji je proučavao stanice u embriju žabe koje umiru, dok je 1972. godine Kerr prvi dao detaljan opis

samog mehanizma programirane stanične smrti te prvi put upotrijebio naziva apoptoza kako bi razlikovao apoptozu od nekroze. Apoptoza je energetski ovisan mehanizam koji je značajan u mnogim biološkim procesima kao što su uklanjanje stanica u embriogenezi, diferencijacija, razvoj apoptozi ovisnih bolesti te regulacija imunološkog sustava. Programirana stanična smrt prisutna je u većini tkiva u kojima umiru stanice, ali ne izazivaju upalno stanje jer stanice ne otpuštaju svoj sadržaj u okolinu te apoptotske stanice vrlo brzo fagocitiraju medijatore upale i okolne stanice. Time se sprječava nastanak sekundarne nekroze i produkcije citokina (9).

Sve morfološke i biokemijske promjene apoptoze vidljive su svjetlosnim i elektronskim mikroskopom. Za apoptozu je karakteristično da se vidi smanjenje stanica, kondenziranje kromatina (koji je izdvojen iz matriksa), te su vidljiva apoptotska tjelešca koja nastaju pupanjem stanične membrane pri čemu se s površine stanica odvajaju djelići citoplazme i jezgre (Slika 2) .



Slika 2. Proces apoptoze, slika preuzeta s interneta Abnova (10) i prilagođena

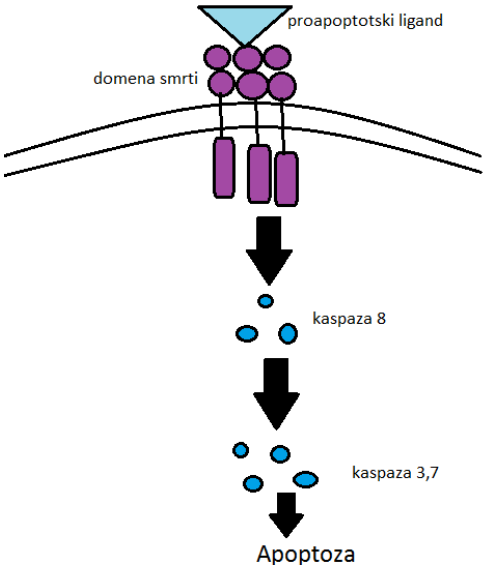
Poznajemo dva apoptotska puta: unutarnji ili mitohondrijski i vanjski ili receptorski put. Oba apoptotska puta aktiviraju se i reguliraju pomoću složenog kaskadnog sustava kaspaza, citoplazmatskih aspartat-specifičnih proteaza, koje svojim djelovanjem dovode do cijepanja specifičnih supstrata te već navedenih biokemijskih i morfoloških promjena koje su specifične za apoptozu (11).

1.2.1. Vanjski put

Vanjski ili receptorski put je put u kojem signalna molekula dolazi iz izvanstaničnog prostora. Put započinje najčešće vezanjem signalne molekule za transmembranski receptor faktor tumor nekroze (*eng. Tumor Necrosis Factor,* TNF). Aktivnost TNF receptora potaknuta je vezanjem različith toksina, lijekova, citokina te steroidnih hormona. Najčešći ligandi koji se vežu za transmembranske receptore, te time potiče apoptozu, su TNFα ligand za TNF-R1 receptor i Fas ligand (koji se još naziva i APO-1 ili CD95) za Fas receptor. Navedeni receptori sadrže

domenu smrti (*eng. death domain*, DD) koja posjeduje sposobnost prepoznavanja i vezanja domene smrti adapterskih molekula (e*ng. death effector domain*, DED) koje dalje aktiviraju kaskadni sustav kaspaza.

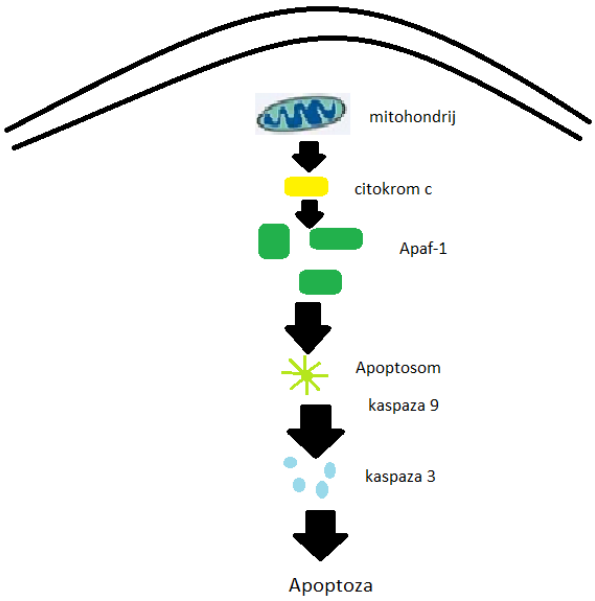
Nakon vezanja Fas liganda za Fas receptor, domena se utrostručuje te se oblikuje molekularni kompleks (*eng. Death Inducing Signaling Complex*, DISC) koji se sastoji od Fas receptora, FADD adapterskog proteina (*eng. Fas-associated death domain*, FADD) i prokaspaze 8. Prokaspaza 8 se proteolitičkim cijepanjem prevodi u aktivni oblik kaspazu 8 te kaskadnom reakcijom aktivira izvršne kaspaze, 3 ili 7, ili aktivira inicijator apoptoze BID. Koji god se od ova dva puta aktivira, rezultat je uvijek stanična smrt (Slika 3) (12).



Slika 3. Vanjski put apoptoze. (Slika izrađena prema shemi s interneta (13))

1.2.2. Unutarnji put

Esencijalnu ulogu u unutarnjem putu ima mitohondrij koji je odgovoran za prijenos i usklađivanje signala ključnih za poremećaj propusnosti membrane te otpuštanje apoptotičkih proteina u citoplazmu. Sam put apoptoze potiču razni događaji kao što su oštećenje DNA, oksidativni stres, nedostatak faktora rasta te mnogi drugi čimbenici (Slika 4).



Slika 4. Unutarnji put apoptoze. (Slika izrađena prema shemi s interneta (13))

Pod utjecajem proapoptotskih signala dolazi do povećanja propusnosti unutrašnje membrane mitohondrija, narušavanja membranskog potencijala i oslobađanja proapoptotskih proteina iz mitohondrijskog međumembranskog prostora u citoplazmu, među kojima je i citokrom c. Kada se otpusti citokrom c, on se veže za aktivirajući faktor-1 apoptozne proteaze (*eng. Apoptotic protease activating factor 1*, Apaf-1) i adenozin trifosfat (*eng. Adenosine triphosphate*, ATP), koji se potom vežu te aktiviraju prokaspazu-9 te zajedno oblikuju kompleks koji se naziva apoptosom. Apoptosom cijepa prokaspaze što aktivira efektorsku kaspazu-3 te dovodi do stanične smrti. Na regulaciju unutarnjeg puta apoptoze utječe i gen *p53*. To je tumor supresorski gen koji potiče ekspresiju proapoptotskih članova Bcl-2 obitelji te dovodi do razaranja DNA (14).

1.3. Citokrom c

Citokrom c je mali, gotovo kuglast hemoprotein povezan s unutarnjom membranom mitohondrija. Sastoji se od polipeptidnog lanca koji je dug 104 aminokiseline te je kovalentno vezan za skupinu hema. On je visoko topljiv u vodi za razliku od ostalih citokroma i bitna je sastavnica lanca elektronskog transporta gdje nosi jedan elektron (15).

Zbog svoje topljivosti u vodi olakšano je njegovo pročišćavanje i kristalizacija te time i samo istraživanje osobitosti tog proteina. Danas znamo više o strukturi citokroma c od bilo kojeg drugog proteina koji prenosi elektrone (16).

Citokrom c prenosi elektrone između kompleksa III (koenzim Q – Cyt c reduktaza) i IV (Cyt c oksidaza). Kod ljudi ovaj je hemoprotein kodiran CYCS genom te pripada porodici Bcl-2 proteina. Osim za transport elektrona važan je i za apoptozu, točnije unutarnji put apoptoze gdje je ključni aktivator izvršne faze (15).

1.4. Stanične linije

U ovom radu korištene su dvije vrste komercijalnih staničnih linija. Korištene su adherentne stanične linije HeLa stanica (humane epitelne stanice karcinoma vrata maternice) u 2D i 3D kulturi i stanične linije u suspenziji K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi). Stanice koje rastu u 2D kulturi puno doprinose istraživanjima. Stanice koje rastu u 3D kulturi pokazuju različitu ekspresiju gena u usporedbi sa stanicama koje su rasle u 2D kulturi odnosno u jednom sloju. Kod uzgoja trodimenzionalne kulture, stanične linije tvore sferoide koji imitiraju obilježja same tumorske stanice (stanična polarnost i heterogena struktura) što je velika prednost kod istraživanja protutumorskih lijekova.

1.4.1. Humane epitelne stanice karcinoma vrata maternice

HeLa stanice su prve stanice koje su bile izolirane te se pomoću njih uzgoj kultura stanica i tkiva razvio do zavidne razine. Ove stanice su vrlo izdržljive i brzo progresivne te su kao takve najčešće korištene u znanstvenim istraživanjima. To su humane epitelne stanice raka grlića maternice, zloćudne bolesti koja zahvaća sve veći broj mladih žena. Stanice su prvo izolirane iz uzorka uzetog od Henriette Lacks koja je imala tumor vrata maternice te zbog kojeg je umrla. Tumor vrata maternice povezan je s infekcijama HPV 16 i HPV 18, ali infekcija HPV 16 i 18 ne mora nužno značiti i nastanak tumora vrata maternice. Osim u svrhu istraživanja HeLa stanične linije dale su svoj doprinos i u testiranju cjepiva (npr. cjepivo za poliovirus) (17).

1.4.2. Stanice kronične mijeloidne leukemije

K562 bile su prve humane izolirane stanice mijeloidne leukemije. Linija je izvedena iz 53-godišnje žene koja je oboljela od kronične mijeloidne leukemije. Kronična mijeloidna leukemija je bolest u kojoj dolazi do poremećaja u sazrijevanju hematopoetskih matičnih stanica. Bolest je popraćena velikom proizvodnjom leukocita pogotovo granulocita koji se mogu naći i u zrelim i u nezrelim oblicima. Od ove bolesti obolijevaju odrasle osobe, a rjeđe djeca (18).

1.5. Protutumorski učinci *N*-9 sulfonilurea

Nukleozidi su organske molekule koje se sastoje od purinskih ili pirimidinskih baza vezanih za šećer (ribozu ili deoksiribozu) pomoću N-glikozidne veze. Ove molekule sudjeluju u mnogim važnim biološkim procesima.

Nakon brojnih istraživanja zaključilo se kako na rast tumorskih stanica možemo utjecati korištenjem molekula koje nalikuju na kritične metabolite i time interferiraju normalno djelovanje njihovih enzima. Derivati sulfonilurea modificirane su nukleobaze koje su postale vrlo zanimljive za brojna istraživanja vezanih za liječenje malignih oboljenja (1).

2. HIPOTEZA

Razina ekspresije gena *citokroma c* u stanicama izloženim novosintetiziranim derivatima *N*-9 sulfonilurea bit će promijenjena.

3. CILJ

Cilj istraživanja bio je ispitati učinke novosintetiziranih spojeva (R-191 i D7-23) na HeLa i K562 stanice u uvjetima *in vitro*. Postavljen je sljedeći cilj u istraživanju:

- ispitati promjene u ekspresiji gena *citokroma c* u staničnim kulturama HeLa i K562 koji su tretirani novosintetiziranim derivatima *N*-9 sulfonilureje

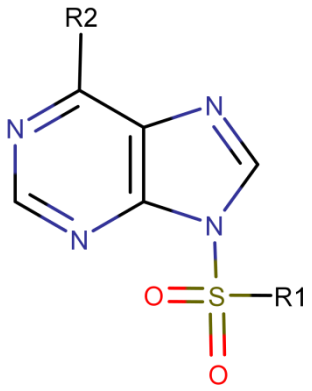
.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Derivati *N*-9 sulfonilurea

Novosintetizirani derivati (Slika 5) sintetizirani su na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Zagrebu. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su spojevi R-191 i D7-23. Derivati su otopljeni u DMSO kao stock otopine u koncentraciji od $1x10^{-2}$ mol/L (M). Neposredno prije upotrebe derivati su otopljeni u vodi ili mediju do željene koncentracije.



Slika 5. Opća struktura *N*-9 sulfonilureje.

4.1.2. Stanične linije

Za potrebe ovog istraživanja koristili smo dvije komercijalne stanične linije kako bi ispitali potencijal novosintetiziranih *N*-9-sulfonilurea derivata.

Korištene su HeLa (humane epitelne stanice karcinoma vrata maternice) adherentne stanične linije u 2D i 3D kulturi i stanične linije leukemije K562 (kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi).

4.1.3. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su kemikalije različitih proizvođača: Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) Lonza (Basel, Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS) GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), L-glutamin 200 mM GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640) Lonza (Basel, Switzerland), 4-(2-hidroksietil)-1piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) Sigma-Aldrich (St.Louis, SAD), fosfatni pufer (*eng. Phosphate Buffered Saline*, PBS), 0,25 % tripsin EDTA GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), Tripansko plavilo 0,4 % GIBCO Invitrogen (Paisley, Velika Britanija), dimetil sulfoksid (DMSO) Acros Organics (New Jersey, SAD), komplet za sintezu cDNA (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, TAKARA NIO INC.), komplet GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA).

4.2. Metode

4.2.1. Kultura stanica *in vitro*

Kultura stanica je proces u kojem se uzgajaju stanice koje rastu u kontroliranim uvjetima. Stanice se održavaju u CO_2 inkubatorima (37° C) na pločama u hranjivom mediju (DMEM, RPMI 1640) s raznim dodatcima koji stvaraju što bolje uvjete za rast stanica.

Stanice tijekom svakog eksperimenta moramo definirati kako bi imali što kvalitetnije rezultate. Stoga moramo izbrojiti žive stanice u staničnoj suspenziji (unutar 4 kvadratića) te pomoću formule izračunati ukupan broj stanica u 1 ml. Kako bi se izbrojale stanice potrebno je 50 µL resuspendirane stanične suspenzije i 100 µL tripan plavila. Nakon što smo pomiješali staničnu suspenziju i tripan plavilo, otopina se nanosi na Bürker- Türkovu komoricu koja služi za brojanje stanica koje se gledaju pod invertnim mikroskopom.

$$\text{Broj stanice/ 1 ml} = N/4 \times R \times 10^4$$

N je ukupan broj živih stanica izbrojanih u 4 kvadratića dok je R razrjeđenje koje se koristilo. U ovom istraživanju razrjeđenje je 3.

Komercijalne stanice smo nasadili u bočice, specijalizirane za uzgoj stanica, u koncentraciji od 5×10^6 stanica za K562 stanice i u koncentraciji od 1×10^6 stanica za 2D HeLa kulturu stanica, dok smo HeLa stanice koje su uzgojene u 3D kulturi nasadili u koncentraciji od 1 x

10^4 stanica/ml na ploču koja sadrži 96 jažica sa slabo prijanjajućim konusnim dnom. Ploču smo centrifugirali na sobnoj temperaturi 10 min pri 1000 rpm. Stanični sferoidi oblikuju se u CO_2 inkubatoru tijekom 72 sata pri temperaturi od 37° C.

Stanice smo tretirali sa R-191 i D7-23 derivatima u koncentracijama od 2 x 10^{-6} M za K562 stanice, odnosno 5 x 10^{-6} M za HeLa stanice. Nakon 24 satne inkubacije stanice su pokupljene zajedno s medijem u kojemu su uzgajane, centrifugirane na 600 x g, 4 min pri 4 °C. Za izolaciju RNA prikupljeno je sferoida iz 96 jažica. Za pomoć pri skidanju stanica koristili smo tripsin.

4.2.2. Izolacija RNA

Ukupna RNA izolirana je pomoću RNeasy Mini Kit (50) proizvođača (Qiagen, Njemačka) koji je dizajniran za pročišćavanje RNA iz malih količina početnog materijala. RNeasy Mini Kit (50) se pokazao kao brza i jednostavna metoda pripreme do 100 µg ukupne RNA visoke čistoće, koja može poslužiti za daljnju analizu Northern blot, selekciju RNA, diferencijalni prikaz te za sintezu cDNA i RT-PCR koji smo koristili dalje u ovom istraživanju.

Važno je prilikom izolacije koristiti sterilno posuđe, sterilne pipete, rukavice i prije samog početka potrebno je sve tretirati otopinom dietilpirokarbonata (*eng. Diethylpyrocarbonate, DEPC)*, koja inaktivira ribonukleaze (RNaze), enzime koji razgrađuju RNA. RNeasy Mini Kit (50) bazira se na selektivnom vezanju RNA za slika-gel membranu. Prije samog vezanja potrebno je nakon odvajanja stanica tripsinom stanice lizirati i homogenizirati u prisustvu pufera. Stanice liziramo pomoću reagensa dostupnog u kitu.

Nakon liziranja stanica u uzorak se dodaje etanol, koji stvara uvjete za selektivno vezanje RNA za silika-gel membranu. Nakon tretiranja uzorka s etanolom lizat se prebacuje na RNeasy mini kolonu. RNA se dalje veže za RNeasy silika-gel membranu te se naposljetku RNA ispire s membrane pomoću DEPC-tretirane vode koja ne sadrži RNaze. Nakon cijelog procesa dobili smo RNA koja se dalje može obrađivati ili pohraniti na -20°C.

4.2.3. Sinteza cDNA

Da bi ispitali gensku ekspresiju potrebno je dalje pomoću enzima reverzne transkriptaze prepisati dobivenu RNA u komplementarnu DNA (cDNA). Ukupna RNA je prepisana u cDNA pomoću pribora PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Njemačka).

Prema protokolu za sintezu cDNA prvo smo pripremili 10 µL smjese koja je sadržavala 1 µL Oligo (dT) početnica, 1 µL nasumičnih heksamera, 1 µL dNTP mješavine i 7 µL ukupne RNA. Ovu smjesu smo inkubirali 5 minuta na 65°C te odmah nakon toga stavili na led.

U drugom koraku pripremili smo smjesu volumena 20 µL koja je sadržavala 10 µL Template RNA Primer Mixture (smjesu koju smo priredili u prvom koraku), 4 µL 5x PrimeScript Buffer pufera, 0.5 µL inhibitora RNaza, 1 µL enzima PrimeScript reverzne transkriptaze te 4.5 µL DEPC-tretirane H_2O. Dobivenu otopinu smo lagano promiješali te inkubirali 60 minuta na 50°C. Kako bi inaktivirali enzime, nakon inkubacije na 50°C, inkubirali smo otopinu 5 minuta na 95°C i odmah nakon toga stavili na led da se ohladi.

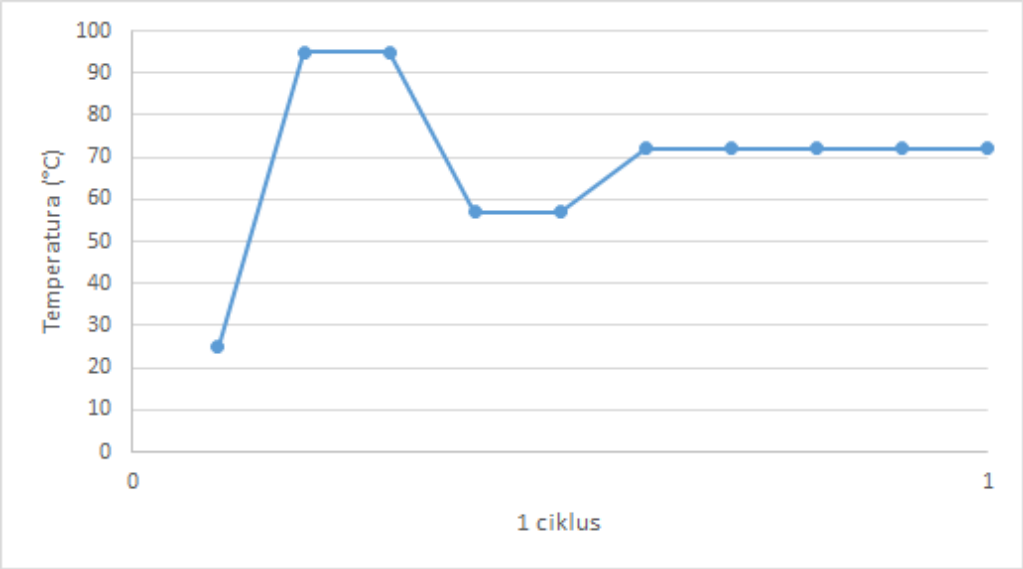
Ovakvo pripremljena otopina korištena je za RT-PCR bez dodatnih koraka (npr. pročišćavanje).

4.2.4. Real-time PCR

Nakon prepisivanja RNA u cDNA složili smo real-time PCR. Za potrebe ovog istraživanja koristili smo pribor GoTaq G2 Flexi DNA Polimerase (Promega, SAD) za RT-PCR, koji je izveden na uređaju QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

RT-PCR omogućio je veliki napredak u odnosu na običnu lančanu sintezu te je postao jedan od često korištenih metoda u molekularnoj dijagnostici, pogotovo kod analize genske ekspresije. Kao što i samo ime kaže, real-time PCR omogućuje praćenje reakcije tijekom same analize uz pomoć fluorescentne boje, koja emitira signal proporcionalan broju novosintetiziranih PCR produkata te skraćuje vrijeme analize rezultata (nije potrebna dodatna obrada). U ovom istraživanju kao fluorescentnu boju koristili smo Syber Green.

Svaki ciklus PCR reakcije sastoji se od ponavljajućih koraka denaturacije, vezanja oligonukleotida, početnica i elongacije DNA lanca kao što je prikazano na slici (Slika 6). Početna denaturacija odvija se na 95°C 30 sekundi. Vezanje početnica, u drugom koraku, odvija se pri temperaturi od 57°C tijekom 1 minute i 30 sekundi, nakon čega, pri temperaturi od 72°C, slijedi sinteza DNA lanca komplementarnog kalupu. Amplifikacija DNA odvija se tijekom 40 uzastopnih PCR ciklusa. Jedan ciklus PCR reakcije ponavlja se do 40 puta.



Slika 6. Jedan ciklus u PCR reakciji. (Slika izrađena u excelu.)

Reakcijska PCR smjesa koju smo koristili sadržavala je 0,2 mM dNTP, 3mM $MgCl_2$, 1,25 U enzima Taq polimeraze, 1x Syber Green boja i 0,5 µM specifičnih početnica. Nukleotidni sljedovi početnica koje smo koristili prikazani su u Tablici 1. Osim početnica citokroma c koristili smo i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (*eng.Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)* početnice koje su nam poslužile kao kontrolni gen.

Tablica 1. Nukleotidni slijed početnica gena za citokrom c i GAPDH.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed	Referenca
GAPDH (F)	5`-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTG ACC-3`	(19)
GAPDH (R)	5`-GAA GGC CAT GCC AGT GAG CTT CC-3`	(19)
Citokrokrom c (F)	5`-AGA ACA AAG GCA TCA TCT GGG-3`	NBCI/primer-BLAST
Citokrokrom c (R)	5`-TCA GCT GTA GCC GAG AGT CA-3`	NBCI/primer-BLAST

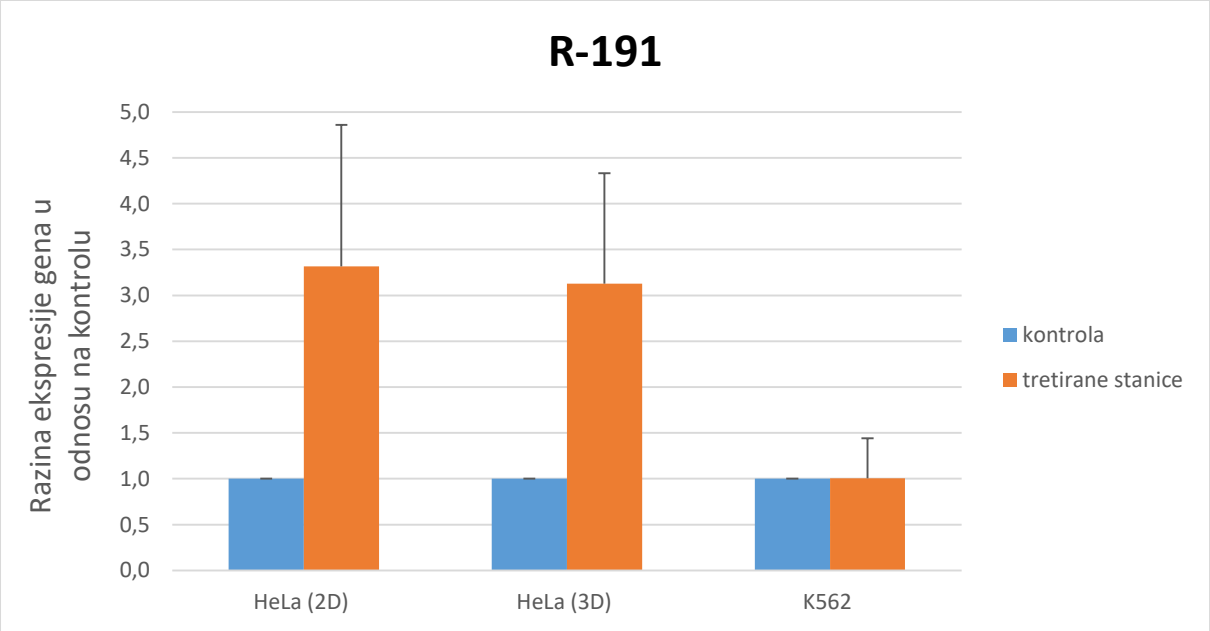
4.2.5. Obrada podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u tri nezavisna testiranja te su rezultati dobiveni metodom real-time PCR prikazani u obliku grafičkog prikaza na temelju srednje vrijednosti i pripadajuće standardne derivacije (±SD). Za analizu statističke značajnosti razlike između tretiranih kultura i kontrolnih kultura korišten je Mann-Whitney test (p=0,050) u MedCalc-u (inačica 17.8.6, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

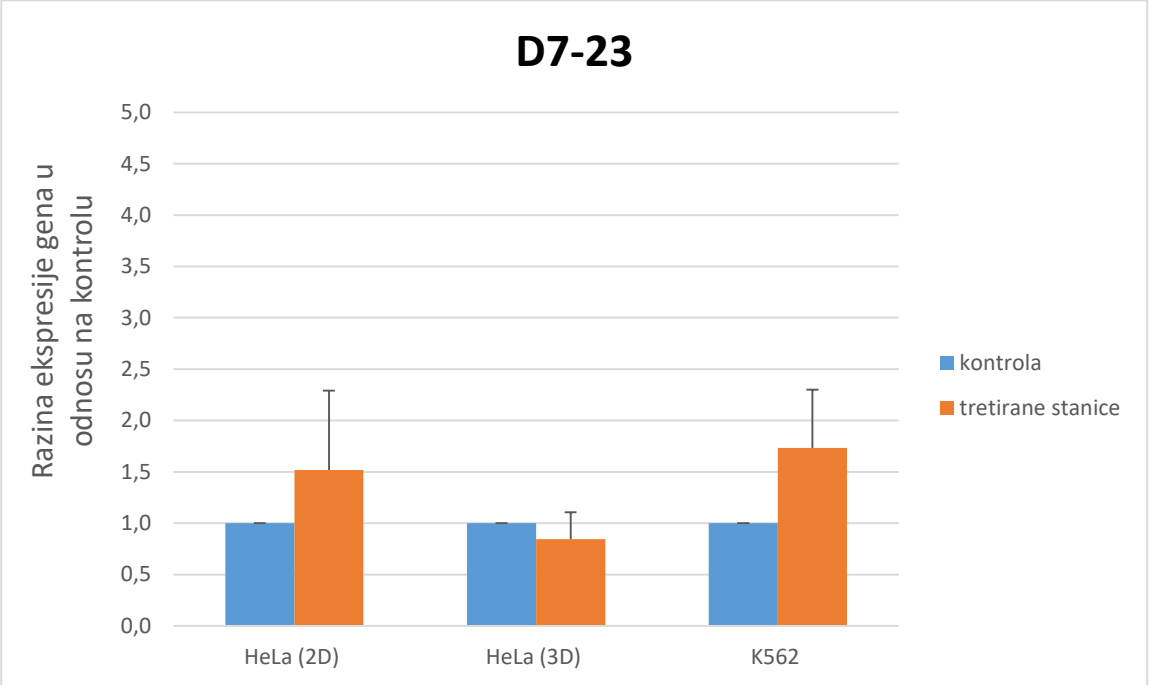
Učinak novosintetiziranih derivata *N*-9 sulfonilureje na ekspresiju gena *citokroma* c istražen je na HeLa stanicama uzgojenim u 2D i 3D kulturi stanica i K562 staničnoj liniji. Stanice su bile izložene djelovanju R-191 i D7-23 derivatima u koncentraciji od $2x10^{-6}$ M za K562 stanice, odnosno $5x10^{-6}$ M za HeLa stanice.

Uočava se podjednako povišena ekspresija gena *citokroma c* nakon tretmana s derivatima R-191 u HeLa stanicama uzgojenim u monosloju i u 3D kulturi stanica. Djelovanjem R-191 derivata nije dovelo do promjene u ekspresiji *citokroma c* u K562 staničnoj liniji (Slika 7).



Slika 7. Ispitivane stanične linije tretirane R-191 derivatom tijekom 24 sata.

U 2D kulturi HeLa stanica vidljiva je povišena ekspresija *citokroma c* nakon tretmana s D7-23 derivatom, za razliku od snižene ekspresije gena u HeLa staničnim sferoidima. Povišena ekspresija *citokroma c* uočena je u K562 stanicama nakon tretmana s D7-23 derivatom (Slika 8).



Slika 8. Ispitivane stanične linije tretirane D7-23 derivatom tijekom 24 sata.

6. RASPRAVA

Tumori predstavljaju sve veći javnozdravstveni problem. Prema podatcima iz Zavoda za javno zdravstvo u Hrvatskoj, ukupan broj bolesnika kojima je 2014. dijagnosticiran rak bio je 21 434 te je stopa incindencije iznosila 500,2/100 000. Od raka u 2014. godini u Hrvatskoj umrlo je 13 939 ljudi (stopa mortaliteta 325,3/100 000) (20). Rak je postao drugi uzrok smrti nakon bolesti srca i krvnih žila. Danas imamo širok spektar mogućnosti liječenja tumora, ali sve češća je pojava rezistencije na lijekove koja otežava liječenje te može dovesti do smrti. Zbog ove činjenice nametnula se potreba za sintetiziranjem novih spojeva koji će imati minimalan štetan učinak na normalne stanice i organizam, a maksimalnu efikasnost u liječenju tumorskih stanica.

Upravo je apoptoza jedna od zanimljivijih ciljanih mjesta u liječenju tumora. Apoptoza je programirana stanična smrt koja igra veliku ulogu u sprječavanju nastanka tumora. Ona u svom djelovanju šteti tumorskih stanicama, a ne djeluje na normalne stanice. Ovo je razlog i sve većem broju znanstvenih istraživanja u kojima se ispituje povezanost apoptotskih putova i tumora (21). Unutarnji i vanjski put apoptoze dosta se razlikuju, ali na kraju završavaju istim rezultatom. Jedan od zanimljivijih proteina unutarnjeg puta je citokrom c koji još sudjeluje i u transportu elektrona.

U ovom radu proučavali smo ekspresiju gena *citokroma c* u staničnim linijama HeLa (2D i 3D) i K562 koji su bili tretirani s novosintetiziranim derivatima *N*-9 sulfonilureje (R-191 i D7-23). Cilj nam je bio utvrditi imaju li novi derivati sposobnost utjecati na ekspresiju ovog gena i time utjecati na osjetljivost apoptoze kod tumorskih stanica.

Prema dobivenim rezultatima dokazali smo da u ovisnosti o tipu stanica ovisi utjecaj derivata na ekspresiju gena *citokroma c*. Nakon 24 satnog tretmana stanica s derivatima R-191 i D7-23 uočili smo kako se ekspresija gena kod nekih staničnih linija promijenila. R-191 derivat podjednako je povisio ekspresiju gena kod HeLa stanica uzgojenih u monosloju i u 3D kulturi stanica, dok kod K562 stanične linije nije doveo do promjene u ekspresiji. Nakon tretmana s D7-23 derivatom pokazala se povišena ekspresija gena kod HeLa stanica u monosloju i K562 staničnoj liniji. D7-23 derivat na HeLa stanicama uzgojenim u 3D kulturi stanica pokazala je sniženu razinu ekspresije gena. Ispitivani derivati pokazali su kako u većini slučajeva povisuju gensku ekspresiju *citokroma c* koji dalje može sudjelovati u unutarnjem putu

apoptoze te preko Apaf-1, ATP-a i kaspaze 9 aktivirati kaspazu 3 i tako potencijalno dovesti tumorsku stanicu do apoptoze, koja neće oštetiti normalnu stanicu.

Zanimljiva je razlika utjecaja D7-23 derivata na HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi stanica. Ova razlika u rezultatima može biti posljedica već proučavane razlike između ove dvije vrste kultura stanica. Znanstvenik Wei Sun je proveo istraživanje o razlikama uzgoja 2D i 3D kultura HeLa stanica te je zaključio da stanice uzgojene u 3D kulturi pokazuju veću proliferaciju, izražajnost proteina te višu kemorezistenciju u odnosu na 2D kulturi (22). Viša kemorezistencija 3D kulture stanica potkrijepila bi činjenicu da D7-23 derivat nije jednako djelovao kao i na 2D kulturu stanica.

Sva novija istraživanja pokazuju kako novosintetizirani derivati *N*-9 sulfonilureje imaju veliki potencijal kao kemoterapeutici te su svakako vrijedni daljnjeg istraživanja. Kod R-191 i D7-23 derivata uočili smo promjenu genske ekspresije *citokroma c* ovisno o tipu stanice. Zaključili smo kako bi to moglo biti ciljno mjesto djelovanja budućih kemoterapeutika te je svakako potrebno daljnje detaljnije istraživanje ovih spojeva (23).

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- R-191 derivat pri koncentraciji od $5x10^{-6}$ M ima podjednak učinak na HeLa stanice uzgojene u 2D i 3D kulturi stanica gdje je došlo do povećane ekspresije gena *citokroma c*
- R-191 derivat nije utjecao na ekspresiju *citokroma c* u K562 staničnoj liniji
- D7-23 derivat pokazao je povišenu ekspresiju gena u 2D kulturi HeLa stanica i K562 stanica dok je uočena snižena ekspresija *citokroma c* u 3D kulturi HeLa stanica
- Stanice koje su bile tretirane novosintetiziranim derivatima *N*-9 sulfonilurea (R-191 i D7-23) pokazali su promjene u genskoj ekspresiji *citokroma c* te pokazali potencijal kao kemoterapeutici

8. SAŽETAK

Uvod: Tumori su veliki javnozdravstveni problem. Iz dana u dan raste rezistencija na lijekove te time nameće potrebu za sintezom novih terapeutskih pristupa. Novosintetizirani derivati *N*-9 sulfonilureje pokazuju veliki protutumorski potencijal.

Ciljevi istraživanja: Ispitati učinke novosintetiziranih derivata N-9-sulfonilureje (R-191 i D7-23) na HeLa i K562 stanicama u uvjetima *in vitro*.

Materijali i metode: Novosintetizirani derivati *N*-9-sulfonilurea sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Zagrebu na Institutu Ruđera Boškovića. U istraživanju su korišteni R-191 i D7-23 spojevi koji su se pokazali kao najučinkovitiji. Komercijalne stanice HeLa (2D i 3D) i K562 uzgajane su u bočicama za uzgoj kulture stanica u CO_2 inkubatoru na 37°C. Nakon uzgoja stanice su odvojene tripsinom te je izolirana RNA pomoću RNeasy Mini Kit (50). Za potrebe istraživanja koristili smo PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit za prepisivanje RNA u cDNA te QuantStudio5 RT-PCR za analizu genske ekspresije.

Rezultati: R-191 derivat pri koncentraciji od $5x10^{-6}$ M potiče povećanu ekspresiju gena *citokroma c* u HeLa stanicama uzgojenim u monosloju i 3D kulturi. U K562 staničnoj liniji nije zabilježen učinak R-191 derivata na ekspresiju gena *citokroma c.* D7-23 derivat pokazuje nasuprotne učinke u 2D i 3D HeLa staničnoj kulturi te istovremeno potiče ekspresiju *citokroma c* u K562 stanicama.

Zaključak: Dokazano je da ispitivani derivati mijenjaju razinu ekspresije gena citokroma c pod utjecajem derivata N-9-sulfoniureje.

Ključne riječi: apoptoza; citokrom c; ekspresija gena; kultura stanica; sulfonilurea; tumori

9. SUMMARY

Introduction: Tumors are a major public health problem. The resistence to pharmaceuticals increases day after day and that imposes the need for the synthesis of the new ones. The newly synthesized *N*-9 sulfonyurea derivatives have a strong anti-inflammatory potential.

The aims of the study: To investigate the effects of the newly synthesized *N*-9 sulfonylurea (R-191 and D7-23) derivatives on HeLa and K562 cells in *in vitro* conditions.

Materials and methods: The newly synthesized *N*-9-sulfonylurea derivatives have been synthesized at the Department of Organic Chemistry and Biochemistry in Zagreb, at the Ruđer Bošković Institute. The R-191 and D7-23 compounds, used in the study, have manifested themselves as the most specific. The commercial HeLa (2D and 3D) and K562 cells have been cultivated in the bottles for the cultivation in a CO_2 incubator at 37° C. After having been cultivated, the cells have been separated by the trypsin and the RNA has been isolated by RNeasy Mini Kit (50). For the purposes of this research, we have used PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit for the RNA transcription in the cDNA and QuantStudio 5 RT-PCR for the gene expression analysis.

Results: The R-191 derivative at a concentration of $5x10^{-6}$ M promotes gene expression of *cytochrome c* in the HeLa cells, grown in the monolayer and in 3D cell cultures. The R-191 derivative has no effect on the gene expression at the K562 cell line. The D7-23 derivative shows opposite effects in 2D and 3D culture of the HeLa cells and at the same time stimulates expression of *cytochrome c* in the K562 cells.

Conclusion: It has been proved that the studied derivatives change the level of the *cytochrome c* gene expression under the influence of the *N*-9 sulfonylurea derivatives.

Keywords: apoptosis; cell culture; cytochrome c; gene expression; sulfonylurea; tumors.

10. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.

2.Eurostat Statistics Explained. Cancer statistics, 2013. Dostupno na adresi: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Cancer_statistics. Datum pristupa: 30.8.2017.

3.Damnjanov I. Pathology for the Health Professions. 4. izd. USA: Saunders; 2000.

4.Mršić-Krmpotić Z, Roth A, suradnici. Internistička onkologija. Zgreb: Medicinska naklada; 2014. ,630pp.

5.Čvorišćec D, Čepelek I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009., str. 530.-533.

6.Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.

7.Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

8.Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007; 35: 495-516.

9. Lynch RG. Apoptosis: Programmed Cell Death. Originally published in ASIP Pathways, Volume 4, No. 1 - April 2009.

10.Abnova.Apoptosis. Dostupno na adresi: http://www.abnova.com/images/content/support/Apoptosis_B.gif. Datum pristupa: 30.8.2017.

11. Ichim G, Tait S. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. Nature Reviews Cancer 16. 2016; 539-548 doi:10.1038/nrc.2016.58.

12. Abraha A.M, Ketema E.B. Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. World J Gastrointest Oncol. 2016; 8: 583 -591.
doi: 10.4251/wjgo.v8.i8.583

13.Apoptosis.Dostupno na adresi: https://www.slideshare.net/saquibkhan5/apoptosis-28305415 Datum pristupa: 30.8.2017.

14. Johnson D.E. Cell Death Signalling in Cancer Biology and Treatment; Humana Press;2013.

15. Hüttermann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson T.H, Kagan V.E, Samavati L, i sur. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis. Mitohondrion, 2011. May: 11(3) 369-381;

doi: 10.1016/j.mito.2011.01.010.

16. Stryer L, Berg J, Tymoczko J. Biokemija. Zagreb: Školska knjiga; 2013.

17. ATCC. HeLa (ATCC CCL-2). Dostupno na adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx?geo_country=hr. Datum pristupa: 30.8.2017.

18. Klein E, Vanky F, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, i sur. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. International Journal of Cancer. 1976; Volume 18: 421-431.

19. Marczi S, Glavas-Obrovac L, Belovari T, Stojković R, Ivanković S, Serić V, Piantanida I, Zinić M. Biological properties of 4-methyl-2,7-diamino-5,10-diphenyl-4,9-diazapyrenium hydrogensulfate (ADAP). Cancer Chemother Pharmacol. 2008; 62: 595-604.

20. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.

21. Sun S, Li Z, Sun L, Yang C, Mei Z, Ouyang W, Yang B, i sur. Results on efficacy and safety of cancer treatment with or without tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-related agents: a meta-analysis. Molecular and Clinical Oncology 2014; 2(3): 440-448.

22. Zhao Y ,Yao R, Ouyang L, Ding H, Zhang T, Zhang T, i sur. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model *in vitro.* Biofabrication. 2014 Sep;6(3):035001.

doi:10.1088/1758-5082/6/3/035001

23. Savić D, Stanković T, Lavrnja I, Podolski-Renić A, Banković J,Peković S, i sur. Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation. Molecular inhibitors in targeted therapy. 2015;1:1

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Sara Klasan

Datum i mjesto rođenja:

2.5.1995., Osijek

Obrazovanje

- 2014. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2010. - 2014. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku
- 2002. – 2010. Osnovna škola Franje Krežme u Osijeku