Utjecaj Sirtuina 3 na oksidativni stres izazvan rotenonom u MCF-7 stanicama raka dojke

Kučar, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:095787

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Ivana Kučar

Utjecaj Sirtuina 3 na oksidativni stres izazvan rotenonom u MCF-7 stanicama raka dojke

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Biotehnologija u medicini

Ivana Kučar

Utjecaj Sirtuina 3 na oksidativni stres izazvan rotenonom u MCF-7 stanicama raka dojke

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: doc.dr.sc. Sandra Sobočanec, viša znanstvena suradnica

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

University Graduate Study

Biotechnology in medicine

Ivana Kučar

The effect of Sirtuin 3 on rotenon-induced oxidative stress in MCF-7 breast cancer cells

Master's thesis

Rijeka, 2019.

Master's thesis mentor: doc.dr.sc. Sandra Sobočanec, Senior Research Associate

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc.dr.sc. Sandri Sobočanec, što me je svojim smjernicama, pohvalama, kritikama i šalama motivirala i usmjeravala u svim koracima izvedbe diplomskog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr.sc. Ivi Škrinjar na uloženom trudu i vremenu, svim savjetima, potpori, strpljenju i pruženom znanju tijekom rada u laboratoriju.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Tihomiru Balogu što mi je izašao u susret i omogućio izradu ovog rada dolaskom u Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes.

Hvala Mariji i svim ostalim zaposlenicima Laboratorija na svakom istraživačkom i prijateljskom savjetu.

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji i dečku na neizmjernoj podršci tijekom studiranja, bezuvjetnoj ljubavi i beskrajnoj podršci.

Veliko hvala svima!

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković.

Mentor rada: doc.dr.sc. Sandra Sobočanec, viša znanstvena suradnica

Diplomski rad obranjen je dana 26.09.2019. pred povjerenstvom:

1. izv.prof.dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić
2. prof.dr.sc. Tihomir Balog
3. doc.dr.sc. Sandra Sobočanec

Rad ima: 38 stranica, 9 slika, 2 tablice i 50 literaturnih navoda.

Sažetak

Visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanici izazivaju oksidativni stres koji može dovesti do genomskog oštećenja i nestabilnosti te nekontrolirane proliferacije ili smrti stanica. Stanična linija raka dojke MCF-7 okarakterizirana je slabom genskom ekspresijom te izostankom proteinske ekspresije Sirtuina 3 (Sirt3), mitohondrijske NAD^+ ovisne deacetilaze koja kontrolira brojne biološke aktivnosti, a između ostalog i štiti od ROS-a. Stoga se u ovom radu istraživala uloga Sirt3 u MCF-7 stanicama tretiranima rotenonom, inhibitorom mitohondrijskog lanca transporta elektrona i supstancom koja potiče oksidativni stres. Za tu svrhu korištene su transfecirane MCF-7 stanice koje nemaju ili pak imaju stabilnu ekspresiju proteina Sirt3, a istražen je njegov utjecaj na stvaranje ROS-a, starenje, metabolizam, ekspresiju određenih proteina te je istražena uloga u rotenonom-izazvanom oštećenju proteina, lipida i DNA. Za analizu navedenih parametara korištene su sljedeće metode: fluorescencijska analiza količine ROS-a, analiza senescencije, MTT test, Western blot, te metoda lipidne peroksidacije i karbonilacije proteina. Dobiveni rezultati su jasno pokazali da rotenon u MCF-7 stanicama izaziva oksidativni stres na svim analiziranim razinama, te da je Sirt3 stanice zaštitio od oksidativnog stresa na način da je smanjio razinu ROS-a, senescenciju i oštećenje lipida u odnosu na kontrolne stanice. Ipak, Sirt3 nije djelovao zaštitno na proteine i DNA, niti je u značajnoj mjeri spriječio staničnu smrt, što implicira da je aktivirao staničnu zaštitu, ali ne u dovoljnoj mjeri. Nadalje, stanice sa Sirt3 imaju veće oštećenja DNA i lipida što ukazuje da Sirt3 sam ili u kombinaciji s rotenonskim tretmanom ne održava niti poboljšava tumorske karakteristike MCF-7 stanica. Štoviše, s obzirom na faktore u kojima stanice sa ekspresijom Sirt3 pokazuju veću osjetljivost na stres izazvan rotenonom, ovi rezultati upućuju da bi Sirt3 mogao imati ulogu inhibitora rasta tumora, odnosno tumor-supresorsku ulogu u MCF-7 stanicama.

Ključne riječi: oksidativni stres, ROS, MCF-7, Sirtuin 3, rotenon

Summary

In the cell, high levels of reactive oxygen species (ROS) cause oxidative stress that can lead to genomic damage and instability and uncontrolled proliferation or cell death. MCF-7 breast cancer cell line is characterized by low gene expression and lack of protein expression of Sirt3, a mitochondrial NAD^+ dependent deacetylase that controls many biological activities and, among other things, protects against ROS. Therefore, the role of Sirt3 in MCF-7 cells treated with rotenone, an inhibitor of the mitochondrial electron transport chain, and a causative agent of oxidative stress, was investigated in this thesis. For this purpose, transfected MCF-7 cells with or without stable expression of Sirt3 protein were used, and its effect on ROS generation, aging, metabolism, expression of certain proteins, and role in rotenone-induced damage to proteins, lipids and DNA was explored. The following methods were used to analyze these parameters: fluorescence analysis of ROS with MitosoxRed dye, senescence analysis with SA-β-gal staining, MTT assay, Western blot, and determination of lipid peroxidation and protein carbonylation. The results clearly showed that rotenone in MCF-7 cells induces oxidative stress at all analyzed levels, and that in several cell parameters, Sirt3 protected against oxidative stress (decreased ROS levels, senescence, and lipid damage relative to control cells). However, Sirt3 failed to protect proteins and DNA from damage, and to prevent the cell death, implying that it activated several protective cellular systems, but not sufficiently to fully protect cells. Furthermore, cells with overexpressed Sirt3 showed more DNA and lipid damage, which implies that Sirt3 alone or in combination with rotenone treatment does not maintain or improve the tumor characteristics of the MCF-7 cells. Moreover, given the factors in which Sirt3-overexpressing cells show greater sensitivity towards stress, the possibility to consider Sirt3 as a tumor suppressor in MCF-7 cells is not excluded.

Key words: oxidative stress, ROS, MCF-7, Sirtuin 3, rotenone

Sadržaj

1.UVOD 1

1.1. Sirtuini 1

1.1.1. Sirtuin 3 1

1.1.2. Sirtuin 3 - tumor supresor ili tumor promotor 2

1.2. Estrogen-osjetljive stanice raka dojke (MCF-7) 3

1.3. Oksidativni stres i rotenon 4

2. CILJ RADA 6

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. Kultura stanica *in vitro* 8

3.2. Tretman rotenonom 8

3.3. Određivanje količine ROS-a metodom fluorometrije 8

3.4. Analiza senescencije određivanjem aktivnosti beta-galaktozidaze (SA-β-Gal) 9

3.5. Određivanje ekspresije proteina 9

3.5.1. Izolacija proteina 9

3.5.2. BCA analiza 10

3.5.3. SDS-PAGE (denaturirajuća elektroforeza) 10

3.5.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu 11

3.5.5. Analiza Western blot metodom 11

3.6. MTT test 12

3.7. Metoda za određivanje lipidne peroksidacije (LPO) 13

3.8. Mjerenje karbonilacije proteina 13

4. REZULTATI 16

4.1. Karakterizacija klonova 16

4.2. Utjecaj Sirt3 i rotenona na mitohondrijske reaktivne kisikove vrste u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima 17

4.3. Utjecaj Sirt3 i rotenona na senescenciju u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima 18

4.4. Utjecaj Sirt3 i rotenona na ekspresiju proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima 19

4.5. Utjecaj Sirt3 i rotenona na metaboličku aktivnost MCF-7C i MCF-7S3 klonova 21

4.6. Utjecaj Sirt-3 i rotenona na lipidnu peroksidaciju (LPO) u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima 22

4.7. Utjecaj Sirt-3 i rotenona na oksidativna oštećenja proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima 23

5. RASPRAVA 25

6. ZAKLJUČAK 31

7. LITERATURA 32

8. ŽIVOTOPIS 37

1.UVOD

1.1. Sirtuini

Sirtuini su proteinske deacetilaze koje imaju centralnu ulogu u kontroli glavnih staničnih procesa kao što je starenje, regulacija metabolizma i transkripcije, kontrola stanične smrti i preživljavanje [1]. Građeni su od konzervirane sekvence koja sadrži 275 aminokiselina koje čine katalitičku jezgru te od jedinstvenih N- i C-terminalnih regija različitih duljina [2]. Za razliku od ostalih deacetilaza, sirtuinima je od ključne važnosti kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid (NAD+) koji sudjeluje u procesu deacetilacije [3]. Njihova zadaća jest kataliza prijenosa jedne acetilne skupine s lizina na međuprodukt O-AADPr (2'-O-acetil-ADP-riboza) koji nastaje iz NAD+ [2]. Postoji sedam članova obitelji sirtuina (Sirt1-7). Sirt3, Sirt4 i Sirt5 nalaze se isključivo u mitohondrijima, Sirt1, Sirt6 i Sirt7 smješteni su u jezgri, dok je Sirt2 lokaliziran u citosolu iako se u određenim situacijama može pronaći i u jezgri [4]. Među njima se posebno ističu Sirt1 i Sirt3 koji imaju najjaču deacetilaznu aktivnost, dok druge izoforme imaju slabu ili nikakvu deacetilaznu aktivnost [5].

1.1.1. Sirtuin 3

Sirtuin 3 (Sirt3) je jedini sirtuin u sisavaca koji je povezan s ljudskim životnim vijekom [6]. Kao glavna NAD+ ovisna deacetilaza prvenstveno smještena u mitohondrijima, ima važnu ulogu u aktivaciji mitohondrijskih proteina koji sudjeluju u stvaranju ATP-a, energetskom metabolizmu i biogenezi mitohondrija. Prema novim istraživanjima moguća je i prisutnost Sirt3 i u jezgri gdje vrši regulaciju genske ekspresije nakon stresa [7]. Na 11p15.5 kromosomu nalazi se gen *sirt3* koji kodira za mitohondrijski protein Sirt3. Kako bi Sirt3 bio u mogućnosti deacetilirati mitohondrijske proteine mora se nalaziti u svojoj kraćoj formi (28kDa). MLS sekvenca (engl. *N-terminal mitochondrial localisation sequence*) u mitohondrij uvodi inaktivnu formu Sirt3 (44kDa) te ga proteolitički cijepa do njegove aktivne forme (28kDa) [8]. Kroz respiratorni lanac, β-oksidaciju masnih kiselina i

ketogenezu Sirt3 kao ključni regulator metabolizma kontrolira mitohondrijske oksidativne puteve te naposljetku i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) [1,9]. Osim što aktivira enzime, sudjeluje u stvaranju samih mitohondrija kroz PGC-1α ovisni put, koji je ujedno i glavni regulator mitohondrijske biogeneze, te povećava aktivnost antioksidansa i potiče uklanjanje ROS-a koje su povezani s rakom i starenjem [6,10].

1.1.2. Sirtuin 3 - tumor supresor ili tumor promotor

Istraživanja su nedavno pokazala da Sirt3 može imati dvojnu ulogu u tumorima, djelovati kao tumor supresor ili kao tumor promotor [11]. Njegova funkcija može biti različita ovisno o tipu stanice i tipu tumora. Također, prisutnost različitih stimulansa koji izazivaju stres ili staničnu smrt odlučuju koju će ulogu preuzeti Sirt3. Sa sposobnošću ciljanja više od pola ključnih metaboličkih enzima, Sirt3 je savršeno pozicioniran da organizira koordinirane pomake u metabolizmu mitohondrija, s potencijalnim implikacijama za različite bolesti, a osobito rak. Sirt3 održava mitohondrijski integritet i otpornost na apoptozu čime omogućava opstanak i zaštitu stanica od oksidativnog oštećenja, dok njegova prekomjerna ekspresija u stanicama tumora smanjuje signale za apoptozu, pojačava signale za preživljavanje i potiče tumorigenezu [12]. Poznato je da je Sirt3 uključen u aktivaciju oksidativnih puteva djelovanjem na mitohondrijske enzime te da ROS imaju vodeću ulogu u progresiji tumora. Stoga se pretpostavlja da prekomjerna ekspresija Sirt3 može održavati povećanu razinu ROS-a koje potiču proliferaciju i agresivni fenotip te naposljetku karcinogenezu [13]. Ove činjenice ukazuju na onkogeno djelovanje Sirt3. Ulogu tumor supresora Sirt3 obavlja očuvanjem stanične homeostaze. Pod određenim uvjetima, Sirt3 može zaštititi DNA od oštećenja i oksidativnog stresa, održati genomsku stabilnost i ograničiti replikativni životni vijek, sugerirajući na ulogu u zaštiti organizma od raka. U slučaju da se smanji ili izgubi njegova funkcija, dolazi do razvoja agresivnijeg fenotipa nekih tumora [1,14].

1.2. Estrogen-osjetljive stanice raka dojke (MCF-7)

Rak dojke najčešći je oblik raka u ženskoj populaciji. Upravo iz tog razloga predstavlja kritičan zdravstveni problem koji još uvijek zahtjeva mnoga istraživanja na molekularnoj razini. Kako bi ova istraživanja ispunila svoj zadatak, ona u prvim fazama uključuju i istraživanja na staničnim linijama koja se standardno koriste u mnogim aspektima laboratorijskih istraživanja, a posebno kao *in vitro* modeli u istraživanju raka [15].

Stanična linija raka dojke MCF-7 (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*) standardni je model istraživanja u mnogim laboratorijima i najčešće je istraživana stanična linija humanog raka dojke u svijetu. Rezultati dobiveni na toj staničnoj liniji su imali temeljni utjecaj na istraživanja raka dojke. Izolirana je iz pleuralnog izljeva 69-godišnje pacijentice s metastaziranim rakom dojke te je uspostavljena na Institutu *Michigan Cancer Foundation* (MCF) u Detroitu [16].

MCF-7 spadaju u luminalni tip A, jedan od pet molekularnih podtipova karcinoma dojke [17]. Stanice su estrogen receptor (ER) i progesteron receptor (PR) pozitivne te HER2 (humani epidermalni faktor rasta 2) negativne [18], njihova proliferacija ovisi o estrogenu, a karakteriziraju ih neinvazivnost, slaba agresivnost i niski metastatski potencijal [15]. Ova stanična linija pripada adherentnim stanicama koje su sklone formiranju kupolastih monoslojeva dok morfološki pripada u epitelne tipove stanica [19].

Stanice MCF-7, kao i većina tipova stanica raka dojke, imaju smanjenu razinu ekspresije Sirt3. Uglavnom ih karakterizira slaba genska te izostanak proteinske ekspresije tog proteina [20]. Istraživanja su pokazala da je najmanje jedna kopija gena *sirt3* izbrisana kod 20% svih karcinoma u ljudi, te u čak 40% karcinoma dojke [21].

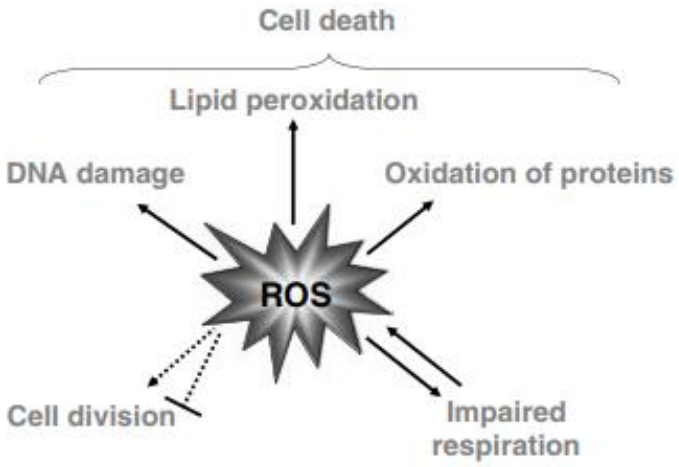
1.3. Oksidativni stres i rotenon

Oksidativni stres stanica javlja se kao odgovor na visoke razine ROS-a koje su kao takve postale vrlo čest predmet istraživanja [22]. ROS se definiraju kao najvažnija skupina slobodnih radikala koje karakteriziraju jedan ili više nesparenih elektrona u atomskoj orbitali što ih čini vrlo nestabilnima i visoko reaktivnima [23].

U mitohondriju se odvija proces staničnog disanja (oksidativne fosforilacije) gdje se elektroni prenose uz pomoć transportnog lanca elektrona (ETC) stvarajući transmembranski elektrokemijski gradijent protona. Enzim ATP-sintaza koristi nastali gradijent za proizvodnju ATP-a. Kako bi stanice imale normalnu funkciju, održavanje normalnog mitohondrijskog transmembranskog potencijala je od velike važnosti [24]. Najveći udio (čak 90%) staničnih ROS-a stvara se u mitohondrijima i to u elektronskim transportnim lancima kompleksa I i III. Elektroni iskaču iz elektronskih lanaca i reagiraju s molekulama kisika stvarajući superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilne radikale (•HO) [25]. O_2^- nastaje redukcijom jednog elektrona kisika dok se H_2O_2 stvara redukcijom dva elektrona. Hidroksilni radikal je najpotentniji prooksidans koji nastaje u Fentonovoj reakciji u kojoj željezo prebaci treći elektron na vodikov peroksid [26]. Takvo stanje dovodi do poremećaja ravnoteže između antioksidativne obrane stanica i proizvodnje ROS-a. ROS tada mogu reagirati s DNA, proteinima i lipidima, narušiti staničnu signalizaciju te samim time sudjelovati u raznim fiziološkim i patofiziološkim stanjima kao što su dijabetes, ateroskleroza, rak, neurodegenerativne bolesti i starenje (Slika 1) [6]. ROS ne moraju uvijek nastati u elektronskim transportnim lancima već ih mogu stvarati i neki vanjski izvori, najčešće zračenje, pesticidi, dim cigareta, industrijska otapala i sl [23].

Rotenon, prirodni spoj dobiven iz korijena dvije vrste biljaka *Derris* i *Lonchorcarpus*, aktivni je sastojak stotina pesticidnih proizvoda [27]. Na staničnoj razini inhibira biokemijske procese, od čega je najbitnija inhibicija mitohondrijskog kompleksa I što rezultira blokiranjem oksidativne

fosforilacije i povećanom proizvodnjom ROS-a te naposljetku inducira oksidativni stres stanica [28]. Osim što stvara slobodne radikale, rotenon također uzrokuje gubitak ATP-a i membranskog potencijala mitohondrija [29]. Istraživanja na humanim stanicama poteklih iz B stanica limfoma, mijeloične leukemije i neuroblastoma, između ostalih i na humanim stanicama raka dojke MCF-7, pokazala su da rotenon uzrokuje smanjenje proliferacije [30], citotoksičnost posredovanu oksidativnim stresom te apoptozu [31].



Slika 1. Utjecaj ROS na stanične funkcije i indukciju stanične smrti. ROS izazivaju oštećenje DNA, oksidaciju proteina, narušavaju mitohondrijsko disanje i ovisno o dozi ili stimuliraju ili inhibiraju staničnu proliferaciju. (*preuzeto: Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis, 2007.*)

U ovom radu oksidativno oštećenje MCF-7 stanica raka dojke izazvano je tretmanom spojem rotenon, a ispitano je njegovo djelovanje na oštećenje proteina, lipida i DNA, metaboličku aktivnost i starenje stanica kao i na ekspresiju proteina uključenih u proces oštećenja DNA, oksidativne fosforilacije, metabolizam energije te deacetilaciju. S obzirom da je poznato da stanice raka dojke imaju slabu ekspresiju Sirt3, ispitan je njegov mogući obrambeni učinak protiv oksidativnog stresa izazvanog rotenonom.

2. CILJ RADA

Pod pretpostavkom temeljenoj na ranijim istraživanjima da Sirt3 ima antioksidativno djelovanje, svrha ovog rada bila je ispitati pomaže li Sirt3 staničnoj liniji raka dojke MCF-7 u borbi protiv oksidativnog stresa. Klonovi MCF-7 stanica koji su bili stabilno transfecirani s plazmidom za ekspresiju Sirt3 (MCF-7S3) bili su podvrgnuti tretmanu rotenonom kako bi se izazvalo oksidativno oštećenje stanica, a uspoređivani su s klonovima bez Sirt3 (MCF-7C). Opći cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj rotenona na metaboličke karakteristike i oksidativna oštećenja MCF-7 stanica ovisno o Sirt3. Za istraživanje ovih hipoteza korištene su suvremene molekularne i biokemijske metode (Western blot, test senescencije, analiza reaktivnih kisikovih vrsta, MTT test, lipidna peroksidacija, test karbonilacije proteina, te Floid mikroskop).

Ciljevi istraživačkog rada:

1. S obzirom da se Sirt3 nalazi u mitohondrijima, odredilo se kako Sirt3 djeluje na mitohondrijske ROS nakon tretmana rotenonom.

2. Zbog činjenice da rotenon uzrokuje oksidativna oštećenja, ali također i da utječe na starenje stanica, odredila se uloga Sirt3 u senescenciji uzrokovanoj rotenonom.

3. Poznato je da Sirt3 aktivira mitohondrijske proteine te indirektno utječe na proteine u drugim staničnim odjeljcima. Stoga se ispitivao utjecaj Sirt3 na smanjenje ili povećanje ekspresije proteina koji sudjeluju u metabolizmu stanične energije, oksidativnoj fosforilaciji i lomovima nukleinskih kiselina (PGC-1α, NDUFA9 (kompleks I), SDH-A (kompleks II), UQCRC2 (kompleks III), ATP5A (kompleks V), ɤH2AX, Sirt1) nakon što su stanice tretirane rotenonom.

4. Dokazano je da Sirt3 sudjeluje u regulaciji metaboličkih puteva u stanici, stoga je određen utjecaj Sirt3 na metaboličku aktivnost MCF-7 stanica nakon tretmana rotenonom.

5. S obzirom na ulogu Sirt3 u regulaciji mitohondrijske proizvodnje ROS-a, odredilo se jesu li promjene lipidne peroksidacije povezane s oksidativnim stresom izazvanim rotenonom i da li Sirt3 ima obrambenu ulogu.

6. Visoke razine ROS-a mogu uzrokovati nepovratno oštećenje proteina, što dovodi do mitohondrijskog stresa i na kraju do smrti stanice. Određivanjem karbonilacije proteina ispitivao se stupanj oštećenja proteina induciranog rotenonom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica *in vitro*

Za ovo istraživanje korištena je stanična linija tumora raka dojke MCF-7 (engl. *Michigan Cancer Foundation-7*; Cat.no.: ECACC 86012803, Public Health, England) ranije transficirana plazmidom pcDNA3.1+Flag-Sirt3 koji sadrži gen za *sirt3* označen s Flag (Flag-Sirt3, Cat.No. 13814) te su nazvane MCF-7S3. MCF-7 stanice transficirane pcDNA3.1+ plazmidom (bez gena za *sirt3*) korištene su kao kontrola (MCF-7C). Stanice su uzgajane u plastičnim sterilnim posudama u inkubatoru pri 37°C i u vlažnoj atmosferi s 5% CO_2. Stanice su rasle u crvenom hranjivom mediju DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) koji je sadržavao 10% fetalnog seruma goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 1% neesencijalnih aminokiselina (EuroClone, Italija) i antibiotik/antimikotik (amfotericin B, penicilin G, streptomicin sulfat; Capricorn, SAD). Stanice su nasađivane za svaki eksperiment posebno po dvije skupine (kontrolna (C) i skupina tretirana rotenonom (R)) za oba klona MCF-7C i MCF-7S3.

3.2. Tretman rotenonom

Za svaki pokus stanice su nasađene u određenom broju i dozvoljeno im je minimalno 24 sata da se prihvate za podlogu, nakon čega je jedna skupina nasađenih stanica (MCF-7C_R i MCF-7S3_R) tretirana rotenonom (0,5 μM) tijekom 17 sati u uvjetima inkubatora 37°C i u vlažnoj atmosferi s 5% CO_2, a druga skupina (MCF-7C i MCF-7S3) je držana u istim uvjetima, ali bez rotenona.

3.3. Određivanje količine ROS-a metodom fluorometrije

Za mjerenje količine ROS-a u mitohondrijima korištena je boja MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific, SAD) konačne koncentracije 5 μM. U crne mikrotitarske pločice za fluorometriju s 96 jažica nasađeno je po 15000 stanica (za kontrolu nasađivanja, paralelno su stanice nasađene i na prozirne pločice kako bi se mogle provjeriti pod mikroskopom). Nakon

tretmana medij je uklonjen i stanice su isprane s PBS-om, te je dodano po 100 µL boje pripremljene u PBS+Mg/Ca (Mg/Ca za što bolje držanje stanica za podlogu). Nakon 30 minuta u inkubatoru, boja je uklonjena sa stanica te su stanice jednom isprane s PBS-om, i u jažice je naneseno po 100 µL PBS+Mg/Ca. Izmjerena je fluorescencija MitosoxRed boje na uređaju Tecan Infinite 200 (Švicarska) pri ekscitaciji od 510 nm i emisiji od 590 nm.

3.4. Analiza senescencije određivanjem aktivnosti beta-galaktozidaze (SA-β-Gal)

Stanice ($4x10^5$ stanica po jažici) su nasađene na pločicu od 24 jažice te su nakon tretmana bojane sa SA-β-Gal: uklonjen je medij te su stanice isprane dva puta s PBS-om, fiksirane 8 minuta u 1% glutaraldehidu u DMEM, isprane dva puta PBS-om i inkubirane 16 sati na 37°C u otopini koja sadrži X-gal (1 mg/ml), 40 mM limunska kiseline/Na fosfatni pufer pH 6.0, 5 mM kalijev ferocijanid, 5 mM kalijev fericijanid, 150 mM NaCl i 2 mM $MgCl_2$. Nakon toga otopina je uklonjena i na stanice je dodan PBS. Senescentne stanice izbrojane su pomoću mikroskopa Olympus I x 50 (Olympus, Tokio, Japan) pod lećom 20x. Stanice su fotografirane te je izračunat postotak SA-β-Gal-pozitivnih stanica.

3.5. Određivanje ekspresije proteina

3.5.1. Izolacija proteina

Stanice su nasađene na pločice sa 6 jažica, po dvije jažice s $2x10^5$ stanica za svaku skupinu. Nakon tretmana uklonjen je medij te su stanice isprane dva puta PBS-om. Dodano je nekoliko mL PBS-a i stanice se ostrugane i skupljene u 15 mL tubice. Zatim je uslijedila centrifuga stanica 5 minuta na 300 g pri 4°C. Uklonjen je supernatant, a talog je resuspendiran u 100 µL Ripa pufera (50 mM Tris pufer, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 12 mM Na-deoksikolat, 1% Triton) s inhibitorima proteaza (cOmpleteTM EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska). Stanice su prebačene u 1,5 mL tubice te su sonificirane ultrazvučnom sondom (0,5 mm) dva puta po 20 sekundi (ciklus 1 i amplituda 80%, Labsonic, Biotech International). Dobiveni lizat

centrifugiran je 20 minuta na 16000 g pri 4°C. Nakon toga, supernatant je prebačen u nove tubice i napravljena je BCA analiza (engl. *bicinchonic acid protein assay*) kojom je izmjerena koncentracija proteina.

3.5.2. BCA analiza

Za BCA analizu korištena je mikrotitarska pločica s 96 jažica. Standardi su se sastojali od otopine goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumine*, BSA) pripremljenog u Ripa puferu (u koncentracijama 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,06 mg/mL). U jažice je naneseno po 25 µL standarda u triplikatima, po 25 µL PBS-a kao slijepe probe te po 2,5 µL uzorka proteina razrijeđeno u 22,5 µL PBS-a u duplikatima (10x razrjeđenje). Zatim je u svaku jažicu dodano 200 µL BCA otopine (BCA Protein Assay Kit, TermoFisher Scientific SAD) sastavljene od reagensa A i B u omjeru 50:1. Mikrotitarska pločica s uzorcima stavljena je na inkubaciju 30 minuta na 37°C. Nakon toga izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini λ=570 nm na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD). Pomoću dobivenih podataka napravljena je baždarna krivulja iz koje su izračunate koncentracije proteina u pojedinim uzorcima te su miješanjem s PBS-om i puferom za nanošenje pripremljeni za denaturirajuću elektroforezu (za svaki uzorak: 15 µg proteina, 3 µL 5x pufera za nanošenje, PBS do volumena od 15 µL).

3.5.3. SDS-PAGE (denaturirajuća elektroforeza)

Proteini su razdvojeni na temelju njihove molekulske mase koristeći denaturirajuću elektroforezu ili SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Za razdvajanje je korišten 10% donji gel (2,75 mL akrilamida (Sigma Aldrich, SAD), 2,75 mL 4x koncentriranog pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl, pH=8,8), 5,5 mL ReH2O, 110 µL 20% APS (Sigma Aldrich, SAD), i 11 µL TEMED (Sigma Aldrich, SAD)) te 4% gornji gel za sabijanje uzoraka (0,35 mL akrilamida 3,75 mL 4x koncentriranog pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl, pH=6,8), 2,275 mL ReH2O, 17,5 µL 20% APS, i 3,5 µL TEMED). U jažice na gelu naneseno je po 15 µL uzorka proteina i 5 µL standarda za proteine Precision Plus

ProteinTM Standards Dual Color (BIO-RAD, SAD). Elektroforeza se provodila u kadici za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra (BIO-RAD, SAD) u kojoj se nalazio pufer za elektroforezu (30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5). Za vrijeme kretanja uzoraka kroz gel za sabijanje koristio se napon od 80 V tijekom 30 minuta, dok je kod gela za razdvajanje napon bio 130 V sve dok fronta uzoraka nije stigla do ruba gela.

3.5.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

Proteini s poliakrilamidnog gela prebačeni su na PVDF membranu (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, BIO-RAD, USA) aktiviranu metanolom. Prijenos se provodio u sustavu Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, SAD) u puferu za prijenos (25mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol, pH=8,5) pri uvjetima konstantne struje od 100 mA tijekom 18 sati pri 4°C.

3.5.5. Analiza Western blot metodom

Membrana s prenesenim proteinima isprana je 10 minuta u PBS-u te je 30 sekundi bojana u otopini Amido black (0,1% (m/V) Amido black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH2O). Zatim je stavljena u otopinu za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH2O) dva puta po 30 minuta i isprana četiri puta po dvije minute u reH2O. Slijedila je inkubacija dva puta po 15 minuta u TN puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, dH2O) i blokiranje membrane 1 sat u 5% mlijeku (mlijeko u prahu otopljeno u TN puferu) na sobnoj temperaturi (room temperature, RT) radi sprječavanja nespecifičnog vezanje protutijela. Nakon blokiranja membrana je inkubirana s primarnim protutijelom u odgovarajućem razrjeđenju (Tablica 1.) u 5% mlijeku preko noći na 4°C. Prije inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrana je isprana tri puta po 10 minuta u TNT puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X, dH2O). Sekundarno protutijelo (Tablica 1.) pripremljeno je u 5% mlijeku (mlijeko u prahu otopljeno u TN puferu), a inkubacija je trajala sat vremena uz miješanje nakon čega je uslijedilo ispiranje tri puta po 10 minuta u TNT-u.

Kako bi se detektirao signal, membrana je inkubirana 30 sekundi u kemiluminiscentnom supstratu SuperSignal Pico (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji je pripremljen miješanjem otopina A i B u omjeru 1:1 te je pokrivena plastičnom prozirnom folijom. Signal reakcije izmjeren je pomoću uređaja UVITEC (UVItec Limited, UK).

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela u Western blot analizi.

Protutijelo	**Proizvođač**	**Domaćin**	**Razrjeđenje**
γH2AX	Abcam	zec	1:8000
PGC-1α	Novus Biologicals	zec	1:1000
Sirt1	Novus Biologicals	zec	1:500
Sirt3	Santa Cruz Biotechnology	miš	1:500
BN kompleksi	Abcam	miš	1:500
Anti-Rabbit	GE Healthcare	magarac	1:5000
Anti-Mouse	BIO RAD	koza	1:5000

3.6. MTT test

Stanice su nasađene na prozirnu mikrotitarsku pločicu s 96 jažica (10000 stanica po jažici). Nakon tretmana uklonjen je medij i stanice su isprane s PBS-om. U svaku jažicu dodano je po 40 µL MTT otopine te je slijedila inkubacija 4 sata u inkubatoru. Zatim je dodano po 160 µL DMSO-a i pločica je stavljena 20 minuta na termomikser (400 rpm) pri RT u mraku kako bi se otopili stvoreni kristali. Rezultati su očitani na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD) pri valnoj duljini λ=570 nm.

3.7. Metoda za određivanje lipidne peroksidacije (LPO)

Za ovaj pokus po $1x10^6$ stanica je nasađeno u Petrijeve zdjelice površine 10 cm^2. Nakon tretmana stanice su isprane dva puta PBS-om i tretirane s 1x tripsinom kako bi se odvojile od podloge. Reakcija je inhibirana dodatkom PBS-a s 10% FBS-a, te su stanice skupljene i prebačene u 15 mL epruvete i centrifugirane na 300 g 4 minute pri 4°C. Postupak ispiranja stanica u PBS-u i centrifugiranja ponovljen je dva puta. Talog je resuspendiran u 100 µL PBS-a te je prebačen u 1,5 mL mikroepruvete. Slijedila je sonikacija ultrazvučnom sondom (0,5 mm) tri puta po 5 sekundi (ciklus 1 i amplituda 80%, Labsonic, Biotech International). Alikvot od 10 µL uzet je za određivanje koncentracije proteina BCA metodom, a alikvot od 40 µL prebačen je u nove mikroepruvete kojem je dodano 40 µL 2% SDS-a (Sigma Aldrich, SAD). Zatim je dodano po 100 µL tiobarbiturne kiseline (TBA) po uzorku. Uzorci su stavljeni 1 sat na termomikser (400 rpm) na 95°C. Potom su kratko ohlađeni na ledu i centrifugirani 10 minuta na 2000 g pri RT. Po 50 µL uzorka naneseno je u tehničkom duplikatu na crnu mikrotitarsku pločicu s 384 jažice. Apsorbancija je izmjerena na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD) pri valnoj duljini λ=532 nm.

3.8. Mjerenje karbonilacije proteina

Po $1x10^6$ stanica je nasađeno u Petrijeve zdjelice površine 10 cm^2. Nakon tretmana stanice su isprane dva puta PBS-om i tretirane s 1x tripsinom da se odvoje od podloge. Reakcija je inhibirana dodatkom PBS-a s 10% FBS-a, te su stanice skupljene i prebačene u 15 mL epruvete i centrifugirane na 300 g 4 minute, isprane PBS-om i ponovno centrifugirane. Na talog je dodano 100 µL PBS-a s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche, Švicarska) te je prebačen u 1,5 mL mikroepruvete. Nakon toga provedena je sonikacija ultrazvučnom sondom (0,5 mm) tri puta po 5 sekundi (ciklus 1 i amplituda 80%, Labsonic, Biotech International). Alikvot od 10 µL iskorišten je za određivanje koncentracije proteina BCA metodom. Na Maxisorb well (Sigma Aldrich, SAD)

mikrotitarsku pločicu s 96 jažica naneseno je 100 µg proteina po uzorku u tehničkom triplikatu te su nanesena još dva dodatna uzorka za oksidaciju željezom kao pozitivne kontrole za provjeru metode. Da bi se adsorbirali na pločicu uzorci su ostavljeni preko noći na 4°C.

Idući dan su pripremljene otopine za ispiranje i inkubaciju s antitijelima (Tablica 2.).

Tablica 2. Sastav otopina za mjerenje karbonilacije proteina

Otopina	Sastav
Pufer za ispiranje I	1x PBS
Pufer za ispiranje II	1x PBS + 96% EtOH (50:50)
Pufer za ispiranje III	1x PBS + 0.1% Tween
Pufer za blokiranje	0.5 g mlijeka u prahu u 10 mL pufera za ispiranje III
Oksidacijska otopina	25 mM Hepes + 25 mM $C_6H_7NaO_6$ + 0.1 mM $FeCl_3$
DNP derivacijska otopina	0.02 g DNPH u 1 mL 3-fluorooctene kiseline

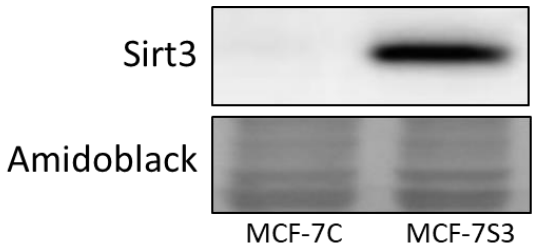
Jažice za provjeru metode isprane su s 200 µL pufera za ispiranje I te su inkubirane 10 minuta sa 150 µL oksidacijske otopine na RT. Zatim su sve jažice isprane dva puta s po 200 µL pufera za ispiranje I, dodano je po 200 µL DNP derivacijske otopine i uslijedila je inkubacija u mraku 45 minuta na RT. Nakon derivatizacije, sadržaj iz jažica je uklonjen, a pločica je isprana tri puta s po 200 µL pufera za ispiranje II. Jažice su dodatno isprane puferom za ispiranje I, tri puta s po 200 µL, te su inkubirane u 250 µL pufera za blokiranje 1 sat na RT na termomikseru (300 rpm). Potom su isprane s 300 µL pufera za ispiranje III. U jažice je zatim dodano po 100 µL otopine primarnog protutijela (Rabbit anti-DNP primary antibody, D9656, Sigma Aldrich, SAD) nakon čega je uslijedila inkubacija 2 sata na RT na termomikseru (300 rpm). Nakon inkubacije, jažice su isprane 4 puta

s po 200 µL pufera za ispiranje III. Zatim je uslijedila inkubacija od sat vremena u 100 µL otopine sekundarnog protutijela (Goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP, Jackson ImmunoResearch, SAD) na termomikseru (300 rpm) pri RT. Jažice su potom isprane 4 puta s po 200 µL pufera za ispiranje III i dodano je po 100 µL TMB otopine (3,3’,5,5’-Tetrametilbenzidine; ThermoFisher Scientific, SAD). Kada se počela razvijati plava boja (nakon par minuta), u jažice je dodano po 100 µL STOP otopine (0,3 M H_2SO_4) jednakim redoslijedom kojim se dodavala TMB otopina. Apsorbancija je očitana na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD), na valnoj duljini λ=450nm.

4. REZULTATI

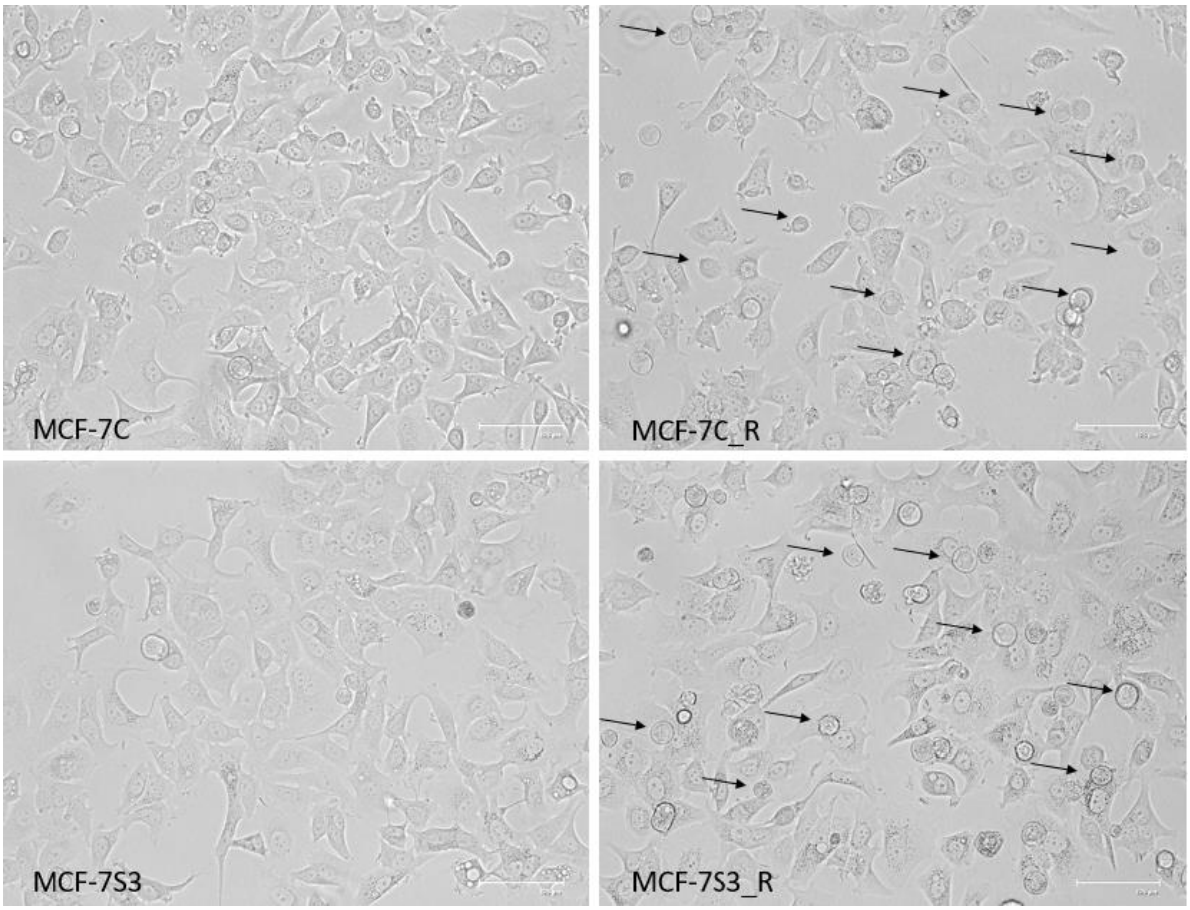
4.1. Karakterizacija klonova

Stanice raka dojke MCF-7 imaju smanjenu ekspresiju proteina Sirt3, koji može djelovati kao tumor supresor ili kao tumor promotor, ovisno o vrsti raka [32]. Stoga su u ovom radu korištene stanice raka dojke MCF-7 transfecirane s plazmidom pcDNA3.1+Flag-Sirt3 (MCF-7S3). Kao kontrola korišteni su MCF-7C klonovi transfecirani praznim pcDNA3.1+plazmidom. Western blot analiza korištena je za provjeru ekspresije Sirt3 proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima (Slika 2).



Slika 2. Reprezentativni prikaz Western blot analize za provjeru ekspresije proteina Sirt3 u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima. Boja 'amidoblack' je korištena kao kontrola nanošenja uzoraka.

Kako bi se ispitalo da rotenon uistinu ima očekivani učinak na stanice i da uzrokuje stres, prvo je promatrana morfologija stanica nakon tretmana. Promatranjem stanica pod mikroskopom primijećeno je da su MCF-7C stanice nešto manje i zaobljenije u usporedbi s MCF-7S3 stanicama koje su veće i izduženije. Klonovi obje stanične linije koji su bili podvrgnuti tretmanu rotenonom pokazali su morfološke promjene te su imali puno veći broj mrtvih stanica neovisno o Sirt3, što se vidi na Slici 3 označeno crnim strelicama.

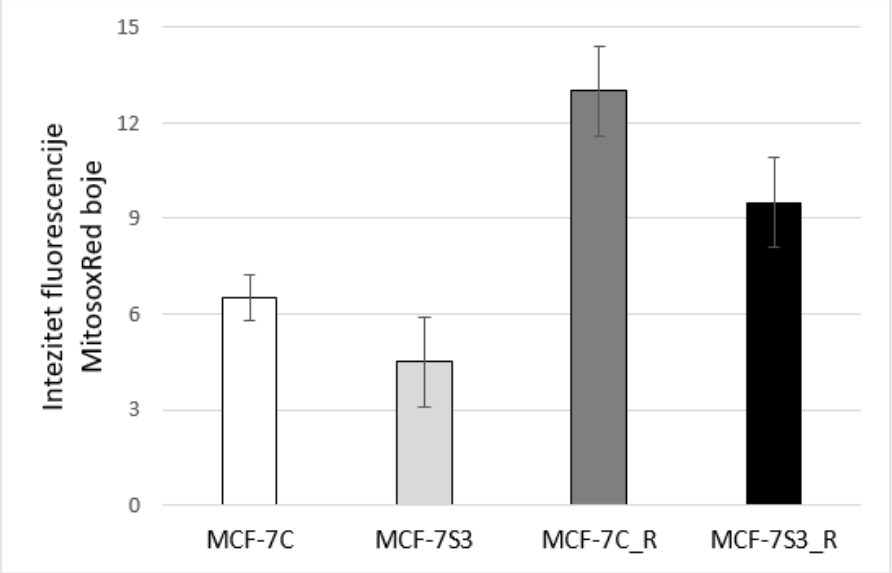


Slika 3. Reprezentativni prikaz morfologije kontrolnih MCF-7C i MCF-7S3 stanica (lijevo) i istih stanica tretiranih 0,5 μM rotenonom tijekom 17 sati (desno). Slike su dobivene na EVOS FLoid mikroskopu (povećanje 460x; Thermo Fisher Scientific, SAD). Crnim strelicama označene su okrugle mrtve stanice.

4.2. Utjecaj Sirt3 i rotenona na mitohondrijske reaktivne kisikove vrste u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima

S obzirom da je uočeno da rotenon ima učinak na morfologiju stanica na način da povećava broj mrtvih stanica, uslijedila je analiza količine ROS-a u mitohondrijima (mtROS) kako bi se ispitao učinak Sirt3 nakon inhibicije mitohondrijskog kompleksa I transportnog lanca elektrona. Za detekciju mtROS-a u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima korištena je MitoSOX Red boja. Slika 4 pokazuje da Sirt3 klonovi imaju tendenciju pada mtROS-a u odnosu

na MCF-7C, dok rotenon povisuje razinu mtROS-a u oba klona s nešto većim utjecajem u MCF-7C klonovima u odnosu na MCF-7S3.

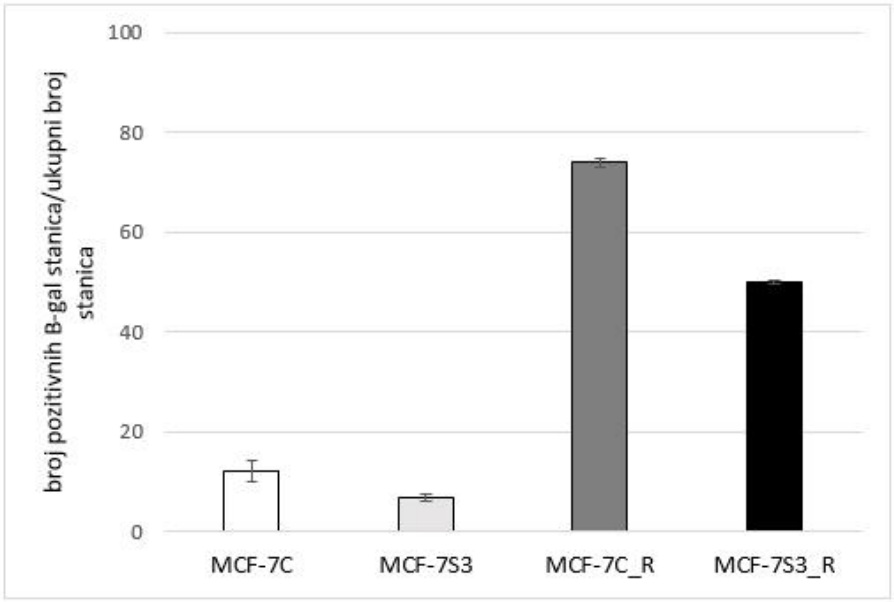


Slika 4. Utjecaj Sirt3 i rotenona na mitohondrijske reaktivne kisikove vrste (mtROS) u MCF7-C i MCF-7S3 klonovima. Za detekciju mtROS korištena je boja MitosoxRed koja je specifična za mtROS. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta.

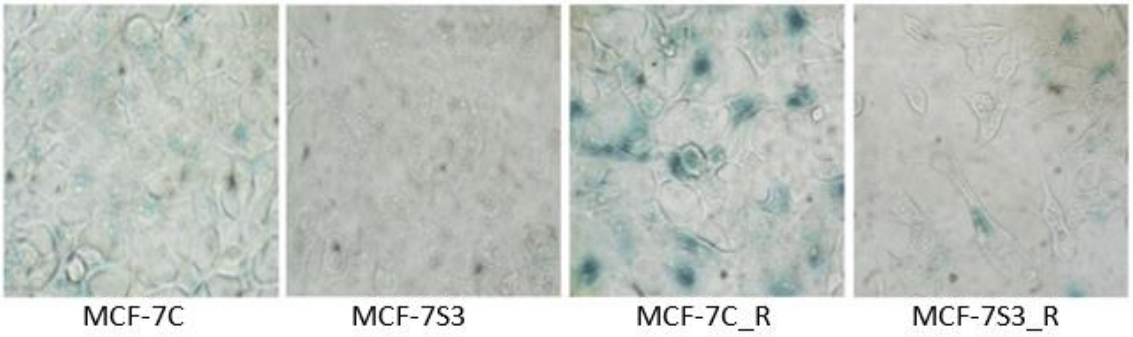
4.3. Utjecaj Sirt3 i rotenona na senescenciju u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima

S obzirom da je pokazano da rotenon, osim što uzrokuje povećanje ROS-a, može uzrokovati i senescenciju [33], ispitan je utjecaj Sirt3 na fenotip stanica povezan sa starenjem, a uzrokovan rotenonom. Analiza aktivnosti SA-β-Gal pokazala je da MCF-7S3 stanice imaju niži postotak SA-β-Gal pozitivnih stanica u odnosu na MCF-7C stanicama, dok rotenon uzrokuje porast SA-β-Gal pozitivnih stanica u obje skupine (Slika 5). Ipak, Sirt3 umanjuje učinak rotenona za 25% u usporedbi s MCF-7C stanicama.

A)



B)

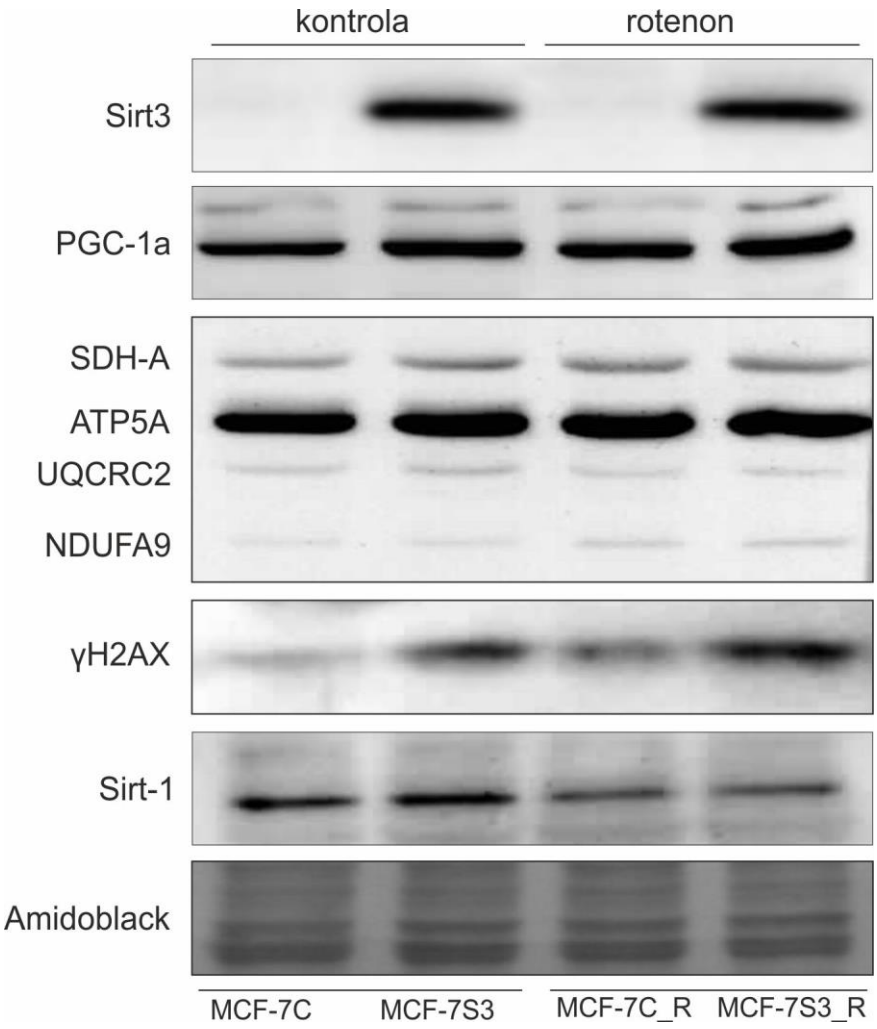


Slika 5. Sirt3 smanjuje senescenciju MCF-7 stanica. (A) Grafički prikaz postotka pozitivnih senescentnih stanica analiziranih bojenjem β-galaktozidazom (β-gal) u klonovima MCF-7C i MCF-7S3. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. **(B)** Reprezentativne slike β-gal pozitivnih stanica. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta.

4.4. Utjecaj Sirt3 i rotenona na ekspresiju proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima

S obzirom da Sirt3 ima važnu ulogu u aktivaciji mitohondrijskih proteina koji sudjeluju u stvaranju ATP-a, energetskom metabolizmu i biogenezi

mitohondrija, a može indirektno može utjecati i na proteine u drugim staničnim odjeljcima, Western blot analizom pratio se utjecaj Sirt3 prilikom tretmana rotenonom na ekspresiju proteina koji sudjeluju u određenim staničnim procesima. Ekspresija proteina PGC-1α, koji sudjeluje u mitohondrijskoj biogenezi i metabolizmu, povećana je u MCF-7S3 klonovima u odnosu na MCF-7C (Slika 6). U oba klona povećana je ekspresija PGC-1α nakon tretmana rotenonom.

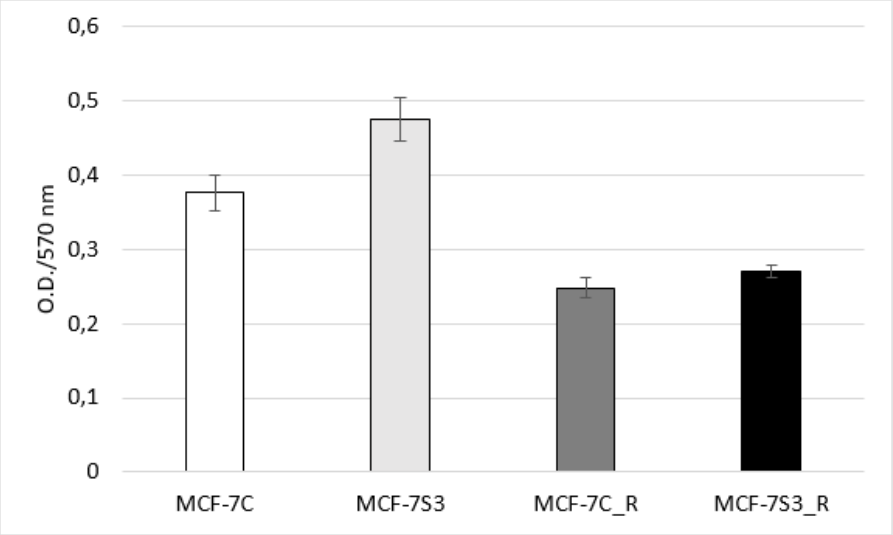


Slika 6. Reprezentativni prikaz Western blot analize utjecaja Sirt3 i rotenona na relativnu ekspresiju proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta. Boja amidoblack je korištena kao kontrola nanošenja uzoraka.

Također se pratila razina ekspresije mitohondrijskih proteina transportnog lanca elektrona uključenih u proces oksidativne fosforilacije: kompleksa II - SDH-A (engl. *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*), kompleksa V - ATP5A (engl. *ATP synthase F1 subunit alpha*), kompleksa III - UQCRC2 (engl. *ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2*) i kompleksa I - NDUFA9 (engl. *NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A9*). Iako razlike nisu velike, tretman rotenonom rezultira laganim pojačanjem ekspresije kompleksa SDH-A, ATP5A i NDUFA9 u oba klona, dok UQCRC2 pokazuje smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolne klonove (Slika 6). ɣH2AX, marker dvostrukih lomova DNA, ima jaču ekspresiju u MCF-7S3 klonovima, a dodatkom rotenona ekspresija ɣH2AX raste u oba klona. Ekspresija Sirt1, proteina koji deacetilira jezgrine i citoplazmatske proteine i ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, modifikacijama kromatina i metabolizmu [34] pada u oba klona nakon tretmana rotenonom.

4.5. Utjecaj Sirt3 i rotenona na metaboličku aktivnost MCF-7C i MCF-7S3 klonova

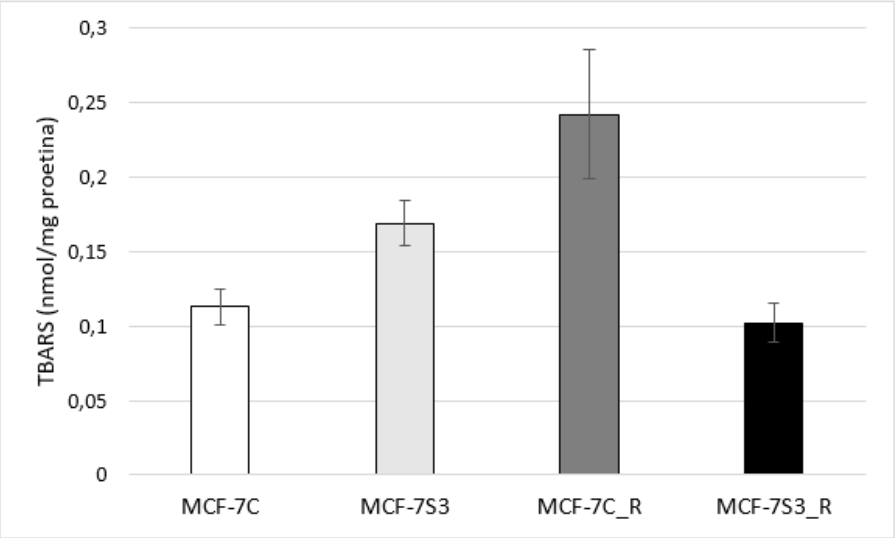
S obzirom da Sirt3 sudjeluje u regulaciji metaboličkih puteva u stanici, MTT testom je određena metabolička aktivnost MCF-7C i MCF-7S3 klonova nakon inkubacije rotenonom. Iz grafičkog prikaza na Slici 7 vidi se da MCF-7S3 stanice koje sadrže Sirt3 imaju veću metaboličku aktivnost od MCF-7C klonova. Tretman rotenonom smanjuje metaboličku aktivnost u oba klona, s time da u MCF-7S3 klonu uzrokuje veći pad.



Slika 7. Utjecaj Sirt3 i rotenona na metaboličku aktivnost MCF7-C i MCF-7S3 klonova. Metabolička aktivnost klonova određena je MTT testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta.

4.6. Utjecaj Sirt-3 i rotenona na lipidnu peroksidaciju (LPO) u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima

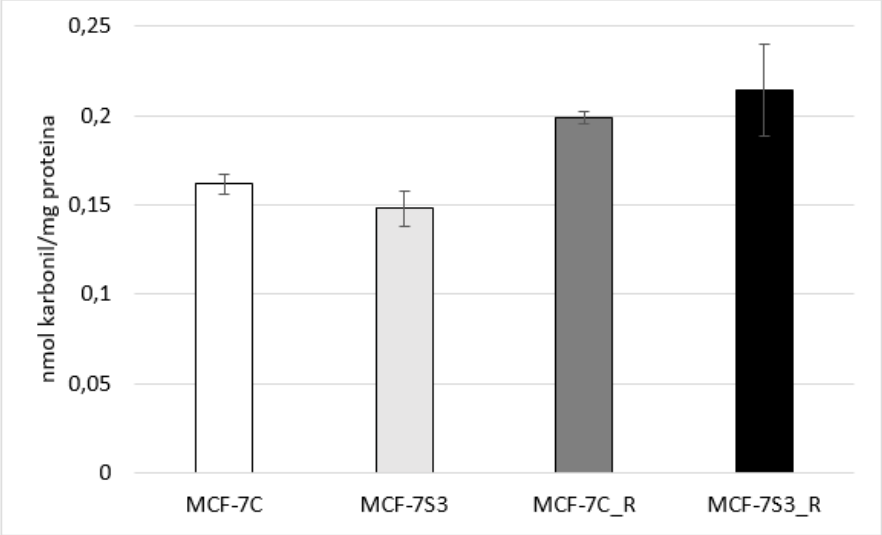
U ovom radu korištena je metoda lipidne peroksidacije (LPO) kako bi se pokazalo oksidativno oštećenje staničnih membrana MCF-7C i MCF-7S3 klonova nakon tretmana rotenonom. Klonovi koji sadrže Sirt3 pokazuju bazalno veću razinu lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne klonove, ali nakon tretmana rotenonom ta razina u Sirt3 klonovima pada, dok u klonovima bez Sirt3 raste (Slika 8).



Slika 8. Utjecaj Sirt3 i rotenona na lipidno oštećenje u MCF7-C i MCF-7S3 klonovima. Lipidno oštećenje klonova je određeno metodom lipidne peroksidacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta.

4.7. Utjecaj Sirt-3 i rotenona na oksidativna oštećenja proteina u MCF-7C i MCF-7S3 klonovima

Kako bi se prikazao stupanj oštećenja proteina izazvan oksidativnim stresom u MCF-7C i MCF-7S3 stanicama određena je karbonilacija proteina nakon tretmana rotenonom. MCF-7S3 klonovi pokazuju manji stupanj oštećenja od MCF-7C kontrolnih skupina. U oba klona oksidativno oštećenje proteina raste nakon tretmana rotenonom u odnosu na kontrolu. Iz grafičkog prikaza na Slici 9 vidi se da rotenon uzrokuje približno jednako oštećenje proteina, bez obzira na ekspresiju Sirt3 proteina.



Slika 9. Utjecaj Sirt3 i rotenona na oksidativno oštećenje proteina u MCF7-C i MCF-7S3 klonovima. Oksidativno oštećenje proteina je određeno metodom karbonilacije proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Na slici su prikazani reprezentativni rezultati pokusa ponovljenog najmanje tri puta.

5. RASPRAVA

Sirt3 igra ulogu u višestrukim metaboličkim procesima kontroliranjem mitohondrijskih puteva mehanizmom deacetilacije ciljnih enzima. Općenito, aktivnost Sirt3 i naknadna kontrola enzima uključenih u energetski metabolizam u skladu je s općom ulogom zaštite od bolesti povezanih sa starenjem, te eksperimentalni i genetski dokazi ukazuju na korelaciju aktivnosti Sirt3 i produljenja životnog vijeka. Mitohondrijska disfunkcija povezana sa starenjem i neurodegeneracijom može se usporiti ili čak spriječiti aktivacijom Sirt3 [35]. Također je poznato da Sirt3 cilja enzime koji su uključeni u procese energetskog metabolizma te na taj način kontrolira tijek mitohondrijskih oksidativnih puteva i, posljedično, brzinu proizvodnje ROS-a [1]. Slobodni radikali kao što su superoksidni anion i vodikov peroksid mogu uzrokovati značajno oksidativno oštećenje proteina, lipida i DNA. Štetni učinci ROS-a postaju izraženiji s godinama zbog ograničenja staničnih antioksidacijskih obrambenih sustava [36].

Deacetilacija posredovana proteinom Sirt3 aktivira enzime koji su odgovorni za uklanjanje ROS-a, te na taj način Sirt3 ima značajno zaštitno djelovanje protiv patoloških stanja ovisnih o oksidativnom stresu. U različitim tipovima tumora prisutnost određenih stimulansa koji izazivaju stres ili staničnu smrt odlučuje koju će ulogu preuzeti Sirt3. Stoga smo u ovom radu ispitivali utjecaj Sirt3 na starenje, oksidativno oštećenje lipida, proteina i DNA te promjene staničnog metabolizma izazvane tretmanom rotenonom u stanicama raka dojke MCF-7. Cilj je bio ispitati ulogu Sirt3 u potencijalnoj obrani od oksidativnog stresa izazvanog rotenonom. Istraživanja su pokazala da je barem jedna kopija gena *sirt3* izbrisana u 20% svih vrsta raka u ljudi, od kojih čak 40% ženske populacije čini karcinom dojke [21]. S obzirom na činjenicu da stanice raka dojke imaju smanjenu ekspresiju Sirt3, u svrhu ovog istraživanja korištene su stabilno transfecirane MCF-7 stanice tumora dojke s pojačanom ekspresijom Sirt3 (Slika 2).

Kako bi se ispitalo da rotenon uistinu ima očekivani učinak na stanice i da uzrokuje stres, najprije je promatrana morfologija stanica nakon tretmana. Što se tiče netretiranih skupina, primijećene su nešto veće i razvučenije stanice u prisustvu Sirt3 (Slika 3). S obzirom da je Sirt3 mitohondrijski protein koji svojom pojačanom ekspresijom i utjecajem na druge proteine i metaboličke puteve dovodi do promjena u metabolizmu stanice, moguće je da mitohondriji kao glavni energetski pokretači stanice utječu u konačnici i na morfologiju stanica koje su onda nešto drukčije u odnosu na one koje nemaju Sirt3 [37]. Iz stanične morfologije se također vidi da je tretman rotenonom očekivano izazvao stanicama stres i više stanične smrti, kao što je pokazano i u ranijim istraživanjima [31,33]. Prema dobivenim slikama ne može se primijetiti značajna razlika u broju mrtvih stanica obzirom na prisutnost Sirt3 nego samo između tretiranih i netretiranih klonova. Na temelju primijećene promjene morfologije i literaturnih podataka o vremenu trajanja tretmana i koncentraciji rotenona, ali koja ipak ne izaziva prekomjerno umiranje stanica, napravljene su daljnje molekularne analize koje će razjasniti ulogu Sirt3 u ovim stanicama u potencijalnoj obrani od stresa izazvanog rotenonom.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da rotenon, kao inhibitor kompleksa I mitohondrijskog respiratornog lanca, može izazvati staničnu smrt u različitim tipovima stanica [38]. Pošto je u ovom radu uočeno da rotenon ima učinak na morfologiju stanica u smjeru povećanog broja mrtvih stanica, uslijedila je analiza količine mtROS-a kako bi se ispitao učinak Sirt3 kao mitohondrijskog proteina nakon inhibicije mitohondrijskog kompleksa I transportnog lanca elektrona izazvanog rotenonom. Tretman rotenonom je izazvao dvostruko veće količine mtROS-a u oba klona (Slika 5), s time da je ta razlika nešto manja u Sirt3 klonovima. Budući da je poznato da Sirt3 aktivira SOD2 (superoksid dismutazu 2) koja uspješno uklanja mtROS [39], iz dobivenih rezultata može se zaključiti da bi Sirt3 mogao aktivirati neke stanične mehanizme zaštite koji su u određenoj mjeri uspjeli umanjiti učinak rotenona u odnosu na stanice bez Sirt3. S obzirom da ovi rezultati

upućuju na to da rotenon ima sposobnost induciranja mtROS-a u MCF-7 stanicama, a prijašnja istraživanja pokazuju da rotenon može inducirati apoptozu [31], može se zaključiti da niža razina mtROS-a dobivena u MCF-7 stanicama ukazuje na mogući zaštitni učinak Sirt3 jer smanjuje mtROS te na taj način posljedično i apoptozu (koja u ovom radu nije mjerena).

S obzirom da je ranije pokazano da rotenon izaziva i senescenciju [33], ispitan je njegov učinak u ovom sustavu. Dobiveni rezultati pokazuju da Sirt3 klonovi imaju nešto manju bazalnu senescenciju u odnosu na kontrolne klonove, a rotenon je izazvao izraženiju senescenciju u stanicama bez Sirt3 (Slika 4), te se može zaključiti da Sirt3 štiti stanice od senescentnog fenotipa. Ipak, bez dodatnih analiza tumorskih karakteristika stanica ne može se zaključiti da li je to u ovom sustavu blagotvorno ili štetno za njih pošto je poznato da senescencija može imati ulogu u sprečavanju progresije tumora, ali isto tako i u stvaranju određenog mikrookoliša koji u određenim uvjetima može aktivirati pro-onkogene faktore [40].

Osim što aktivira SOD2, Sirt3 osigurava i efektivan transport elektrona tako što deacetilira komponente određenih kompleksa (I, II i V), a na taj način i indirektno reducira proizvodnju ROS-a [41], posebice zato što je ETC glavni izvor ROS-a u stanici. Ranija istraživanja su pokazala da tretman rotenonom negativno utječe na interakciju Sirt3 i kompleksa I (NDUFA9), tj. uzrokuje razdvajanje navedenih proteina, čime Sirt3 više ne može vršiti normalnu funkciju na transportnom lancu elektrona [42], a posljedično dolazi i to smanjene proizvodnje ATP-a pošto je stanici smanjena sposobnost korištenja energetski povoljne oksidativne fosforilacije. Western blot analizom mitohondrijskih kompleksa je vidljivo da je ekspresija NDUFA9 (kompleks I) i ATP5A (kompleks V) u MCF-7C i MCF-7S3 stanicama nešto povećana nakon tretmana rotenonom (Slika 6), što je pokazano i u nekim drugim sustavima [42]. Razlog povećanja ekspresije tih proteina nije poznat, ali možda bi se mogao pripisati povećanoj energetskoj potrebi stanice nakon oksidativnog stresa zbog kojeg stanica počinje proizvoditi veće količine kompleksa koji sintetiziraju potrebne količine ATP-a. Zanimljivo je da se

količina NDUFA9 bez obzira na prisutnost ili odsutnost Sirt3 ne mijenja. Stoga zaključujemo da Sirt3 nema utjecaja na jačinu ekspresije NDUFA9. S druge strane, Sirt3 uzrokuje nešto jaču ekspresiju ostalih kompleksa, što nije iznenađujuće s obzirom da ga ranija istraživanja dovode u vezu s mitohondrijskom DNA (mtDNA) pa se pretpostavlja da može djelovati na količinu kompleksa na translacijskom ali najvjerojatnije i na transkripcijskom nivou [41]. Ukratko, promjene u ekspresiji nekih kompleksa transportnog lanca elektrona nakon tretmana rotenonom mogu imati za posljedicu povećane razine ROS-a koje u konačnici dovode do senescencije čime se potvrđuje inhibitorni učinak rotenona na kompleks I.

Poznato je da Sirt1 i Sirt3 posreduju u mitohondrijskoj biogenezi inducirajući transkripciju i aktivaciju fosforilacijom i/ili deacetilacijom. Sirt1 aktivira PGC-1α-posredovanu transkripciju nuklearnih i mitohondrijskih gena koji kodiraju za proteine s ulogom poticanja stvaranja mitohondrija, oksidativne fosforilacije i proizvodnje energije, dok Sirt3 direktno djeluje kao aktivator proteina važnih za oksidativnu fosforilaciju, ciklus trikarboksilne kiseline (TCA) i oksidaciju masnih kiselina, a indirektno na PGC-1α [43]. Pošto je u Sirt3 klonovima nešto jača ekspresija Sirt1, koji deacetilira i aktivira PGC-1α, može se reći da pojačana ekspresija Sirt3 indirektno utječe na pojačanu ekspresiju PGC-1α (Slika 6). Iako su neka istraživanja pokazala da rotenon može pojačati ekspresiju PGC-1α i Sirt1 [44], noviji radovi ukazuju na njegov negativan utjecaj na ekspresiju Sirt1 [45], što je viđeno i u ovom sustavu. Manje količine Sirt1 mogu posljedično dovesti do pojačanja ekspresije p53 koji inače djeluje kao tumor supresor [46], te bi u ovom istraživanju to mogao biti mogući razlog umiranja stanica nakon tretmana: rotenon uzrokuje povišene razine ROS-a i smanjenje ekspresije Sirt1, a onda najvjerojatnije i aktivaciju p53 te staničnu smrt. Stoga bi se u budućim istraživanjima trebalo fokusirati na ekspresiju p53 u ovim stanicama te moguće posljedice na stanični ciklus.

Metabolizam klonova sa Sirt3 se može usporediti sa ekspresijom SDH-A proteina koji je inače u direktnoj korelaciji s MTT-om. SDH-A, poznat i kao

kompleks II, je mitohondrijska reduktaza čija se aktivnost mjeri MTT testom [47]. Stoga povećane količine ovog proteina u MCF-7S3 stanicama odgovaraju povećanju metaboličke aktivnosti (Slika 7) koja je izmjerena navedenim testom. Rotenon smanjuje metabolizam stanica što je bilo očekivano pošto inhibira kompleks I i na taj način sprečava normalan rad ETC-a. Neka ranija istraživanja su pokazala da tek koncentracije iznad 20 μM smanjuju metaboličku aktivnost MCF-7 stanica [31]. U ovom sustavu koncentracija 0,5 μM je bila dovoljna da bi se uočio pad metaboličke aktivnosti, što i nije iznenađujuće s obzirom da su neka druga istraživanja s rotenonom pokazala da u različitim sustavima i staničnim linijama može imati inhibitoran učinak na metabolizam već pri vrlo niskim, nanomolarnim koncentracijama [48].

ROS su vrlo štetne za stanice, stoga ih stanični antioksidativni enzimi obično štite od toksičnih učinaka ROS-a. Međutim, kada stvaranje ROS-a nadvlada antioksidativnu obranu stanica, dolazi do oksidativnog oštećenja staničnih makromolekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline [49]. Kad se izgubi ravnoteža između proizvodnje ROS-a i antioksidativne obrane, nastaje oksidativni stres. Oksidacija proteina, peroksidacija lipida i oštećenje DNA su dobro poznati ishodi djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta što dovodi do poremećaja u staničnim funkcijama koje su uzrok različitih patoloških stanja (kardiovaskularna disfunkcija, neurodegenerativne bolesti, metabolička disfunkcija gotovo svih vitalnih organa, rak, prerano starenje) te naposljetku i stanične smrti. U ovom istraživanju je iznenađujuće da Sirt3 klonovi imaju bazalno veće lipidno oštećenje od kontrola, a rotenonskim se tretmanom oštećenje u Sirt3 klonovima smanjuje, dok u kontrolnima očekivano raste (Slika 8). Sirt3 klonovi pokazuju tendenciju manjeg oštećenja proteina u kontrolnim uvjetima, po čemu se vidi da Sirt3 ima djelomičan zaštitni učinak od oksidativnog oštećenja proteina (Slika 9), ali u tretmanu rotenonom, Sirt3 uzrokuje tendenciju ka povećanom oštećenju proteina. Prijašnja istraživanja su pokazala da Sirt3 u nekim sustavima može zaštititi i lipide i proteine od

oštećenja izazvanog ROS-om [50], ali kao što je već i ranije naglašeno, o samom sustavu i tipu stanica ovisi koliko jaka će ta zaštita biti i hoće li u svakoj skupini stanica ići u istom smjeru. Naposljetku, analiza markera dvolančanih lomova DNA (Slika 6) je pokazala da Sirt3 klonovi imaju općenito nešto više oštećenja DNA, dok se s rotenonom pojačava u oba klona, i u konačnici bude najjače u Sirt3 klonovima. Kao što je ranije spomenuto, lomovi DNA također uzrokuju aktivaciju tumor-supresora p53 i posljedično staničnu smrt.

Rezultati analize oštećenja lipida, proteina i DNA u konačnici ukazuju da Sirt3, unatoč tome što je uspio smanjiti razinu ROS-a i senescenciju izazvanu rotenonom te pojačati metaboličku aktivnost stanica, nije uspio zaštiti sve glavne komponente stanica od oštećenja, što u konačnici može biti vrlo nepovoljno za tumorske stanice i smanjiti im proliferativni potencijal. Osim toga, treba imati na umu da su senescencija i ROS parametri koji u tumorskom mikrosustavu mogu imati različitu ulogu i vrlo male razlike mogu dovesti do promjene u ponašanju stanica i metabolizmu, dok će prekomjerno oštećenje glavnih staničnih komponenti u većini slučajeva dovesti do stanične smrti i smanjene proliferacije.

6. ZAKLJUČAK

Poznato je da prekomjerne količine reaktivnih kisikovih vrsta doprinose staničnoj smrti oksidacijom za stanicu neophodnih komponenti - lipida, proteina i nukleinskih kiselina, a što dovodi do narušavanja integriteta mitohondrijske membrane i smanjenja proizvodnje energije. U načelu, Sirt3 u kontrolnim uvjetima pokazuje obrambenu ulogu u stanicama. U ovom istraživanju je rotenon u MCF-7 stanicama raka dojke izazvao očekivani stres – povećanje ROS-a, senescencije, oštećenje DNA, lipida i proteina, promjene u ekspresiji mitohondrijskih kompleksa transportnog lanca elektrona, te je smanjio metaboličku aktivnost, a što je sve u konačnici dovelo do većeg broja mrtvih stanica. Sirtuin 3 je pokazao da može zaštititi stanice od stresa uzrokovanog rotenonom tako da je smanjio senescenciju, nastanak ROS-a i oštećenje lipida u usporedbi sa stanicama bez Sirt3. S druge strane uzrokovao je povećanu osjetljivost stanica na oštećenje DNA i tendenciju ka povećanom oksidativnom oštećenju proteina. Također, treba uzeti u obzir i da su stanice sa Sirt3 same po sebi pokazale više oštećenja DNA i lipida, što u konačnici govori u prilog da Sirt3 u kombinaciji s rotenonskim tretmanom u ovim stanicama nema zaštitnu ulogu kakva bi tumorskim stanicama trebala da bi održale ili poboljšale svoje tumorske karakteristike. S obzirom na faktore u kojima stanice sa ekspresijom Sirt3 pokazuju veću osjetljivost na stres izazvan rotenonom, kao takav bi mogao imati ulogu tumor supresora u MCF-7 stanicama raka dojke. Stoga bi svakako u budućnosti trebalo ispitati parametre kao što su proliferacija stanica i tumorski faktori poput migracije i ekspresije onkogena da bi se dodatno razjasnio učinak Sirt3 u kombinaciji s rotenonskim tretmanom.

7. LITERATURA

1 Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochemical Journal* 2012; **444**: 1–10.

2 Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal* 2007; **404**: 1–13.

3 Choi J-E, Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Current Opinion in Genetics & Development* 2014; **26**: 24–32.

4 Sack MN, Finkel T. Mitochondrial Metabolism, Sirtuins, and Aging. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012; **4**: a013102–a013102.

5 Al-Khaldi A, Sultan S. The expression of sirtuins, superoxide dismutase, and lipid peroxidation status in peripheral blood from patients with diabetes and hypothyroidism. *BMC Endocrine Disorders* 2019; **19**. doi:10.1186/s12902-019-0350-y.

6 Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y *et al.* Sirtuin 3, a New Target of PGC-1α, Plays an Important Role in the Suppression of ROS and Mitochondrial Biogenesis. *PLoS One* 2010; **5**: e11707.

7 Iwahara T, Bonasio R, Narendra V, Reinberg D. SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2012; **32**: 5022–5034.

8 Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide–dependent deacetylase. *The Journal of Cell Biology* 2002; **158**: 647–657.

9 Pinterić M, Podgorski II, Sobočanec S, Popović Hadžija M, Paradžik M, Dekanić A *et al. De novo* expression of transfected sirtuin 3 enhances susceptibility of human MCF-7 breast cancer cells to hyperoxia treatment. *Free Radical Research* 2018; **52**: 672–684.

10 Brown K, Xie S, Qiu X, Mohrin M, Shin J, Liu Y *et al.* SIRT3 Reverses Aging-Associated Degeneration. *Cell Reports* 2013; **3**: 319–327.

11 Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y *et al.* Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death & Disease* 2014; **5**: e1047.

12 Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2011; **1816**: 80–88.

13 Lai C-C, Lin P-M, Lin S-F, Hsu C-H, Lin H-C, Hu M-L *et al.* Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* 2013; **34**: 1847–1854.

14 Schumacker PT. SIRT3 Controls Cancer Metabolic Reprogramming by Regulating ROS and HIF. *Cancer Cell* 2011; **19**: 299–300.

15 Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 2015; **35**: 3147-3154.

16 Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line'. *Cancer Research* 1997; **57**: 3071-3078.

17 Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 2010; **4**: 117822341000400.

18 Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard L-L, Petit A, Dulong C *et al.* Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 2013; **13**. doi:10.1186/1471-2407-13-63.

19 Vantangoli MM, Madnick SJ, Huse SM, Weston P, Boekelheide K. MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PLoS One* 2015; **10**: e0135426.

20 Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD *et al.* SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* 2010; **17**: 41–52.

21 Finley LWS, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J *et al.* SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1α destabilization. *Cancer Cell* 2011; **19**: 416–428.

22 Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 2012; **24**: 981–990.

23 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; **39**: 44–84.

24 Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of

Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012; **16**: 1295–1322.

25 Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 2005; **120**: 483–495.

26 McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000; **108**: 652–659.

27 Radad K, Rausch W-D, Gille G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International* 2006; **49**: 379–386.

28 Siddiqui MA, Ahmad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP *et al.* Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013; **384**: 59–69.

29 Won J-H, Park S, Hong S, Son S, Yu J-W. Rotenone-induced Impairment of Mitochondrial Electron Transport Chain Confers a Selective Priming Signal for NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2015; **290**: 27425–27437.

30 Srivastava P, Panda D. Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding: Antiproliferative mechanism of action of rotenone. *FEBS Journal* 2007; **274**: 4788–4801.

31 Siddiqui MA, Saquib Q, Ahamed M, Ahmad J, Al-Khedhairy AA, Abou-Tarboush FM *et al.* Effect of Trans-resveratrol on Rotenone-induced Cytotoxicity in Human Breast Adenocarcinoma Cells. *Toxicology International* 2011; **18**: 105–110.

32 Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. *Cancers* 2017; **9**: 90.

33 Gonçalves AP, Máximo V, Lima J, Singh KK, Soares P, Videira A. Involvement of p53 in cell death following cell cycle arrest and mitotic catastrophe induced by rotenone. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; **1813**: 492–499.

34 Islam S, Abiko Y, Uehara O, Chiba I. Sirtuin 1 and oral cancer. *Oncol Lett* 2019; **17**: 729–738.

35 Guarente LP. Sirtuins , Aging , and Medicine. *The New England Journal of Medicine* 2011; **364**: 2235-2244.

36 Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2013; **5**. doi:10.3389/fnagi.2013.00048.

37 Miettinen TP, Björklund M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. *Trends in Cell Biology* 2017; **27**: 393–402.

38 Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA *et al.* Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: 8516–8525.

39 Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan K-L, Zhao S *et al.* Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO reports* 2011; **12**: 534–541.

40 Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; **23**: 2919–2933.

41 van de Ven RAH, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. *Trends in Molecular Medicine* 2017; **23**: 320–331.

42 Ahn B-H, Kim H-S, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A *et al.* A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2008; **105**: 14447–14452.

43 Brenmoehl J, Hoeflich A. Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion* 2013; **13**: 755–761.

44 Yuyun X, Jinjun Q, Minfang X, Jing Q, Juan X, Rui M *et al.* Effects of Low Concentrations of Rotenone Upon Mitohormesis in SH-SY5Y Cells. *Dose-Response* 2013; **11**: 270-280.

45 Feng Y, Liu T, Dong S-Y, Guo Y-J, Jankovic J, Xu H *et al.* Rotenone affects p53 transcriptional activity and apoptosis via targeting SIRT1 and H3K9 acetylation in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 2015; **134**: 668–676.

46 Harris CC. Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *Journal of the National Cancer Institute* 1996; **88**: 1442–1455.

47 Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports* 2018; **8**: 1531.

48 Dolga AM, de Andrade A, Meissner L, Knaus H-G, Höllerhage M, Christophersen P *et al.* Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons. *Cell Death & Disease* 2014; **5**: e999.

49 Bandyopadhyay U, Das DK, Banerjee RK. Reactive oxyfen spicies: oxiative damage and pathogenesis. *Current Science* 1999; **77**: 658-666.

50 Dai S-H, Chen T, Wang Y-H, Zhu J, Luo P, Rao W *et al.* Sirt3 attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress through the preservation of mitochondrial function in HT22 cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2014; **34**: 1159–1168.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE Kučar Ivana

Bocakova 15, 10380 Sveti Ivan Zelina (Hrvatska)

0989245138

ivana.kucar@hotmail.com

Datum rođenja 25/09/1995 | Državljanstvo hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2017.–danas Diplomski studij

Odjel za Biotehnologiju, Biotehnologija u medicini

Ul. Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

http://www.biotech.uniri.hr

2014.–2017. Prvostupnik Biotehnologije i istraživanja lijekova

(univ.bacc.biotech.et pahrm.inv.)

Odjel za Biotehnologiju, Biotehnologija i istraživanje lijekova

Ul. Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

http://www.biotech.uniri.hr

2010.–2014. Opća gimnazija

Srednja škola Dragutina Stražimira

Gundulićeva 2, 10380 Sveti Ivan Zelina (Hrvatska)

ured@ss-dstrazimira-svetiivanzelina.skole.hr

RADNO ISKUSTVO

travanj 2019.–danas Izrada diplomskog rada

Institut Ruđer Bošković

Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb (Hrvatska)

Djelatnost ili sektor Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes

veljača 2019.–travanj 2019. Erasmus+ stručna praksa

Sveučilište u Ljubljani, Biotehnički fakultet

Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana (Slovenija)

Djelatnost ili sektor Odjel za biologiju

svibanj 2017.–lipanj 2017. Stručna praksa

Jadran galenski laboratorij JGL d.d.

Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)

Djelatnost ili sektor Odjel za proizvodnju

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici engleski

Komunikacijske vještine Vrlo komunikativna i pristupačna osoba, prilagodljiva i spremna na timski rad.

Studentski posao promotora mi je omogućio upoznavanje s osnovnim prodajnim vještinama te iskustvo u komunikaciji s kupcima.

Organizacijske / rukoviteljske vještine Vrlo sposobna za organizaciju. Sudjelovanje i vođenje grupe na zajedničkim seminarskim radovima.

Digitalne vještine Osnove rada na računalu

Poznavanje rada u MS Office

Rad u programima za računalnu biokemiju: Avogadro, Chimera,

PyMOL, Vina, VMD, NAMD, Spark

Korištenje Interneta i društvenih mreža

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Stipendije Erasmus stipendija za stručnu praksu 2018./2019.
Stipendist zaklade "Stjepan Antolković-Šimunjek" 2015.- 2018.

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti Otvoreni dan Instituta Ruđer Bošković (IRB) 2019, Zagreb
Sajam stipendija 2018. Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Festival znanosti 2018. Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Članstva Udruga studenata biotehnologije USBRI 2014.-2019.