

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KAPACITETA SINTEZE PROTEINA U STANICAMA A549 I MIŠJIM EMBRIONALNIM FIBROBLASTIMA

Ražov, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:264199>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lucija Ražov

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KAPACITETA
SINTEZE PROTEINA U STANICAMA A549 I MIŠJIM
EMBRIONALNIM FIBROBLASTIMA

Završni rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lucija Ražov

OPTIMIZACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE KAPACITETA
SINTEZE PROTEINA U STANICAMA A549 I MIŠJIM
EMBRIONALNIM FIBROBLASTIMA

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Slađana Bursać, dipl. sanit. ing.

Komentor: Prof.dr.sc. Siniša Volarević, dr.med.

Završni rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica, _____ literaturnih navoda.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Slađani Bursać na prenesenom znanju i vodstvu pri izradi ovog završnog rada. Hvala Vam na izdvojenom vremenu, uloženom trudu i potpori koju ste mi pružali za vrijeme pisanja ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima i sestrama koji su mi oduvijek pružali potporu i vjerovali u mene u svakom trenutku. Hvala vam na strpljenju i podršci.

SAŽETAK

Proteini su makromolekule koje čine 80% suhe mase stanice i aktivno sudjeluju u većini staničnih procesa. Brojni signalni putevi potiču njihovu sintezu, a količina proteina u stanici povećava se sintezom proteina na ribosomima ili sintezom novih ribosoma koji povećavaju kapacitet sinteze proteina. Molekularni procesi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Promjena ukupne sinteze proteina važna je u odgovoru stanice na fiziološke i patološke uvjete. U organizmu postoje brojni signalni putevi koji potiču sintezu ribosoma, odnosno proteina, a ključni su za normalan rad svih stanica u organizmu, ali i unatoč tome u organizmu dolazi do narušavanja homeostaze proteina uzrokovane unutarstaničnim ili izvanstaničnim čimbenicima. Stoga je od iznimne važnosti odrediti intenzitet sinteze proteina u stanici kako bi se dobio uvid o funkciji stanice.

U ovom radu testirana je primjena metode za praćenje intenziteta sinteze proteina, a koja se temelji na mjerenju količine ugradnje O-propargil-puromicina, analoga puromicina, u novosintetizirane proteine metodom imunoflorescentne mikroskopije. Intenzitet sinteze proteina određen je u stanicama A549 i u stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta u različitim vremenskim intervalima nakon dodatka O-propargil-puromicina. Dobiveni rezultati pokazuju da je optimalno vrijeme inkubacije stanica A549 i stanica mišjih embrionalnih fibroblasta s O-propargil-puromicinom 60 minuta te da je primjena O-propargil-puromicina učinkovita metoda za određivanje kapaciteta sinteze proteina u stanicama A549 i stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta

Ključne riječi: proteini, homeostaza proteina, intenzitet sinteze proteina, O-propargil-puromicin, stanice A549, stanice mišjih embrionalnih fibroblasta

SUMMARY

Macromolecules proteins constitute in the range of 80% of the cell dry mass and actively participate in most cellular processes. Multiple signaling pathways stimulate the protein synthesis. Amount of protein in the cell is increased by protein synthesis on ribosomes or by synthesis of new ribosomes that increase protein synthesis capacity. Molecular processes that regulate the synthesis of new proteins and their degradation are key to the normal functioning of all mammalian cells. In responding to physiological and pathological conditions in the cell they appear the changes in total protein synthesis. There are numerous signaling pathways in the body that encourage the synthesis of ribosomes or proteins, and are key for the normal functioning of all cells in the body. However, in the cell, protein homeostasis is impaired by intracellular or extracellular factors. Therefore, it is extremely important to determine the intensity of protein synthesis in the cell to get a information about cell function.

In this work was tested a method for monitoring the protein synthesis intensity which is based on the measurement of the amount of O-propargyl puromycin, the puromycin analogue, in the newly synthesized proteins by immunofluorescence analysis. The protein synthesis intensity was determined in A549 cells and in mouse embryonic fibroblast cells at different times after the addition of O-propargyl-puromycin. The results showed that the optimal incubation time for A549 cells and mouse embryonic fibroblast cells with O-propargyl puromycin is 60 minutes and that the use of O-propargyl puromycin is an effective method for determining protein synthesis capacity in A549 cells and mouse embryonic fibroblasts cells.

Key words: proteins, protein homeostasis, protein synthesis intensity, O-propargyl-puromycin, A549 cells, mouse embryonic fibroblast cells

SADRŽAJ:

SAŽETAK.....	III
SUMMARY	IV
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. OPĆENITO O PROTEINIMA.....	1
1.1.1. Građa proteina	1
1.2. SINTEZA RIBOSOMA	3
1.3. SINTEZA PROTEINA	5
1.3.1. Translacija.....	7
1.4. SIGNALNI PUTEVI KOJI POTIČU SINTEZU RIBOSOMA	8
1.4.1. Signalni put Ras-MAPK-c-Myc	8
1.4.2. Signalni put mTOR	9
1.5. Poremećaj sinteze proteina.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica	14
3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. <i>phosphate buffered saline</i>), pH 7,4	14
3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica	14
3.1.3. Otopine korištene za imunofluorescenciju	14
3.1.3.1. Otopina za ispiranje stanica nakon fiksacija.....	14
3.1.3.2. Otopina za permeabilizaciju stanica TBST	14
3.1.4. Stanične linije	15
3.1.4.1. Humana stanična linija A549 stanica.....	15
3.1.4.2. Mišji embrionalni fibroblasti	15
3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor	15
3.1.6. Uređaji	16
3.2. METODE.....	16

3.2.1. Određivanje kapaciteta sinteze proteina	16
3.2.1.1. Mehanizam djelovanja O-propargil-puromicina	18
4. REZULTATI.....	19
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČCI	24
7. LITERATURA	25

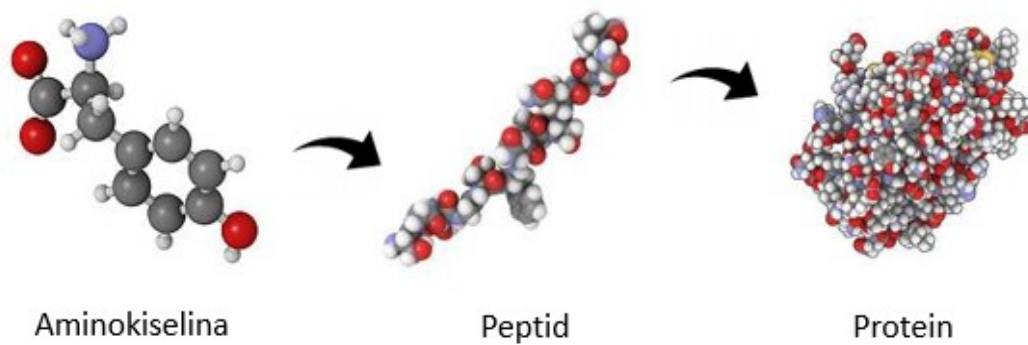
1.UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. OPĆENITO O PROTEINIMA

Proteini su makromolekule koje čine 80% suhe mase stanice i aktivno sudjeluju u većini staničnih procesa.^[1] Brojni signalni putevi potiču njihovu sintezu, a količina proteina u stanici povećava se sintezom proteina na ribosomima ili sintezom novih ribosoma koji povećavaju kapacitet sinteze proteina.^[2] Proteini ostvaruju svoju najvažniju ulogu djelujući kao enzimi koji kataliziraju gotovo sve kemijske reakcije koje se odvijaju u organizmu. Također, sudjeluju i u izgradnji različitih stanica i tkiva, prenošenju informacije od stanice do stanice, pohrani, ali i prenošenju malih molekula te zaštiti organizma od različitih infekcija.^[3]

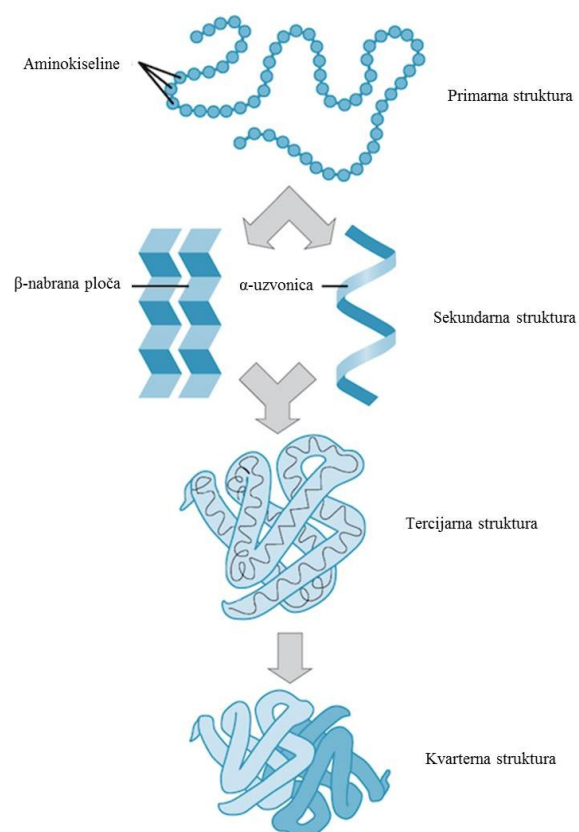
1.1.1. Građa proteina

U izgradnji proteina sudjeluje dvadeset različitih aminokiselina. Aminokiseline su molekule koje sadrže ugljikov atom na kojeg su vezane karboksilna skupina, amino skupina, atom vodika te bočni ogranak.^[4] Upravo po tom bočnom ogranaku, razlikuju se četiri vrste aminokiselina; nepolarne, polarne, bazične i kisele aminokiseline. Veza između dviju aminokiselina je peptidna veza, a nalazi se između α -amino-skupine prve aminokiseline i α -karboksilne skupine druge aminokiseline. Nadalje, velik broj povezanih aminokiselina čini polipeptide koji imaju dva različita kraja; N-kraj (koji završava α -amino skupinom) i C-kraj (koji završava α -karboksilnom skupinom). Tri međusobno povezane aminokiseline tvore jedan peptid. Proteini su sastavljeni iz peptida (**slika 1.**). Određeni aminokiselinski slijed odgovoran je za svojstva proteina.^[5]



Slika 1. Nastajanje proteina iz aminokiselina i peptida. Tri međusobno povezane aminokiseline tvore jedan peptid. Proteini su sastavljeni iz peptida.

Unutar samog proteina razlikuju se četiri razine strukture (**slika 2.**).



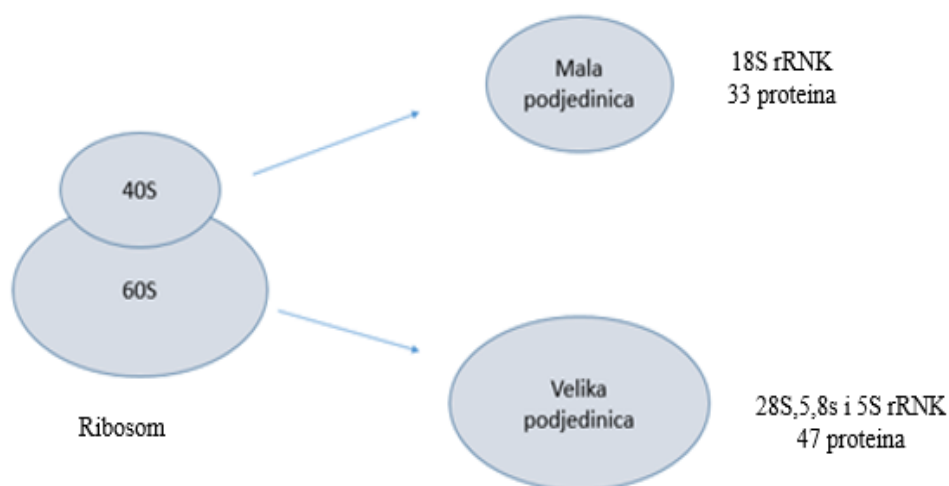
Slika 2. Struktura proteina. Primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina čine četiri strukturne razine u proteinu.

Primarna struktura je aminokiselinski slijed u polipeptidnom lancu. Sekundarna struktura je nabiranje kraćih susjednih dijelova polipeptida u geometrijski oblik. Najčešće vrste sekundarnih struktura su α -uzvojnica i β -nabrana ploča.^[6] Najvažniji faktor koji dovodi do stabilnosti proteina su vodikove veze unutar peptidne veze te amfipatski karakter uzvojnice koji pogoduje vanjskom vodenom okruženju, ali i unutrašnjosti proteina. R-skupine susjednih aminokiselinskih ostataka okrenute su u suprotnim smjerovima zbog čega β - ploča ima nabrani izgled. Kao i kod α -uzvojnice, vodikove veze imaju vrlo bitnu ulogu u stabilnosti same strukture. Dvije susjedne ploče mogu biti paralelne ili antiparalelne, tj. slijedovi od N-terminalnog do C-terminalnog kraja mogu biti usmjereni u istu, odnosno suprotnu stranu. Skup sekundarnih struktura koje čine veće podjedinice polipeptida tvore tercijarnu strukturu. Tercijarna struktura proteina se odnosi na trodimenzionalnu sliku sekundarne strukture. Dio proteina koji ima mogućnost samostalnog obavljanja pojedine funkcije u organizmu nazvan je domenom. Domene su najčešće uključene u vezivanju supstrata, no mogu imati i ključnu ulogu u promjeni funkcije samog proteina. Kvaterna struktura sastoji se od još većeg broja polipeptidnih jedinica, a uključuje i njihov prostorni raspored.^[7]

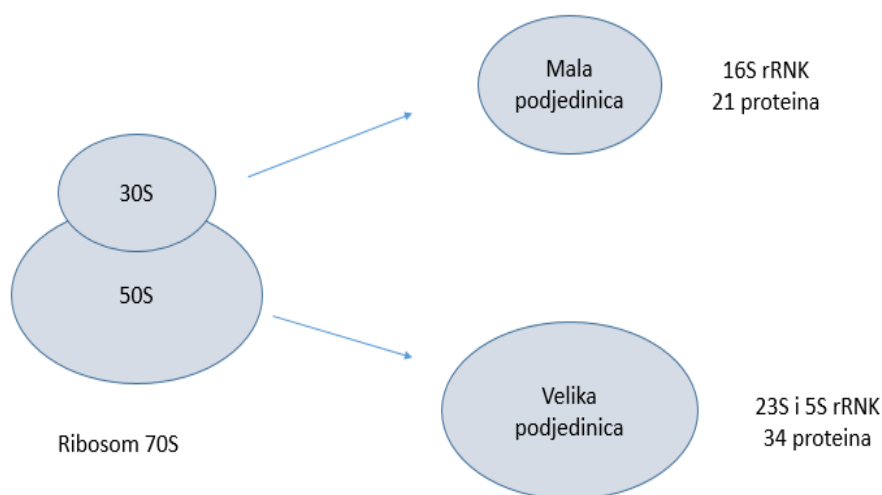
1.2. SINTEZA RIBOSOMA

Sinteza proteina odvija se na staničnim strojevima, ribosomima. Ribosomi se sintetiziraju najvećim dijelom u jezgri, a manjim dijelom u jezgri i citoplazmi.^[8] Proces sinteze ribosoma počinje prepisivanjem 47S ribosomske RNK, rRNK (engl. *ribosomal RNA*) putem RNK-polimeraze I (Pol I). 47S rRNK se zatim cijepa djelovanjem endonukleaza i egzonukleaza u 18S, 5,8S i 28S rRNK.^[9] Nakon modifikacije i cijepanja 47S pre-rRNK slijedi udruživanje s 80 različitih ribosomskih proteina i 5S rRNK. U tom procesu sudjeluju

još i male RNK iz jezgrice i neribosomski proteini.^[10] Nastala mala i velika podjedinica transportiraju se u citoplazmu gdje se formira funkcionalni 80S ribosom nakon vezanja glasničke RNK, gRNK (engl. *messenger RNA*).^[11] Zreli ribosom građen je od dvije podjedinice (velike i male) koje sadrže karakteristične proteine i molekule rRNK. Velika podjedinica je oko dva puta veća od male. Mala podjedinica služi kao centar za dekodiranje kako bi se spojile gRNK i transporta, tRNK (engl. *transfer RNA*) prilikom translacije genetskog koda. Ribosomske RNK se na principu komplementarnosti spajaju stvarajući tako sekundarne strukture, a vezivanjem s ribosomskim proteinima dodatno se smataju u tercijarne strukture. Mnogi eksperimenti su dokazali kako rRNK izravno sudjeluju, odnosno kako su ključan i neizostavan segment u procesu stvaranja peptidne veze.^[12] Na **slikama 3. i 4.** prikazana je građa ribosoma u eukariota i prokariota, te se na njima može vidjeti kako su eukariotski ribosomi veći od prokariotskih ribosoma.



Slika 3. Građa eukariotskog ribosoma. 80S ribosom građen je od velike 60S i male 40S podjedinice ribosoma. 18S rRNK zajedno s 33 ribosomska proteina izgrađuje malu podjedinicu ribosoma 40S dok 5S, 5,8S i 28S rRNK zajedno s 47 ribosomskih proteina grade zreli veliku podjedinicu ribosoma 60S.



Slika 4. Građa prokariotskog ribosoma. 70S ribosom građen je od velike 50S i male 30S podjedinice ribosoma. 16S rRNK zajedno s 21 ribosomskim proteinom izgrađuje malu podjedinicu ribosoma 30S dok 5S i 23S rRNK zajedno s 34 ribosomska proteina grade zrelu veliku podjedinicu ribosoma 50S.

Eukariotski ribosom se sastoji od velike podjedinice (60S) i male podjedinice (40S), koje zajedno čine česticu 80S, a prokariotski ribosom se sastoji od velike podjedinice (50S) i male podjedinice (30S) koje zajedno čine česticu 70S. Kod eukariota podjedinica 40S sadrži 18S rRNK, a homologna je prokariotskoj 16S rRNK. Podjedinica 60S sadrži tri RNA: 5S, 28S i 5.8S rRNK. Podjedinicu 50S kod prokariota grade 5S i 23S rRNK molekule.^[13]

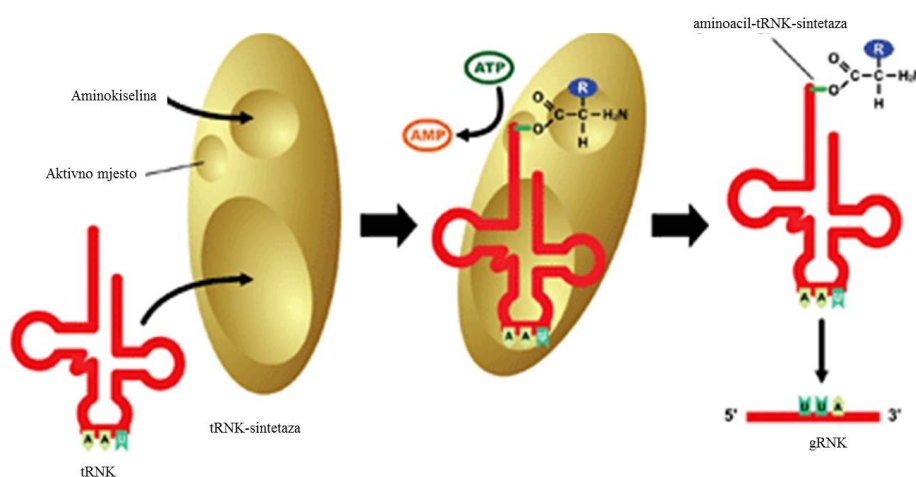
1.3. SINTEZA PROTEINA

Transportne RNA (tRNA) igraju ključnu ulogu u procesu sinteze proteina, translaciji, djelujući kao adapteri između informacijske razine nukleinskih kiselina i funkcionalne razine proteina. Pokazuju visoko očuvanu sekundarnu i tercijarnu strukturu, a vrlo konzervirani oblik tRNK ključan je za interakciju s različitim proteinima i drugim molekulama RNK.^[14] U građi tRNK sudjeluje 70 do 80 nukleotida, a u molekuli se razlikuju dvije različite regije. Jedna od

njih nalazi se na 3' kraju i sadrži slijed CCA i na nju se vežu određene aminokiseline. Na drugoj regiji se nalazi antikodonska petlja koja prepoznaje i veže kodon u kalupu gRNK.^[15]

U procesu translacije važnu ulogu imaju enzimi aminoacil-tRNK-sintetaze od kojih svaka aktivira aminokiselinu vezanjem za ATP i prenosi je na 3' kraj srodne tRNK. Sintetaze čine obitelj od 20 staničnih enzima koji su odgovorni za specifičnu esterifikaciju tRNK s njihovim srodnim aminokiselinama, i stoga su bitni u održavanju procesa biosinteze proteina.

Reakcija aminoacilacije katalizirana aminoacil-tRNK-sintetazama se postiže u dva koraka. Prvo, aminokiselina se aktivira reakcijom s molekulom ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-AMP-sintetazni međuprodukt. U drugom koraku, aktivirana aminokiselina se prenosi na 3' kraj tRNK, čime se dobiva specifična aminoacil-tRNK i AMP (**slika 5.**). Točnost aminoacilacije kontrolira se pozitivnim (identitetnim) i negativnim regulatornim elementima u tRNK i aminoacil-tRNK-sintetazama koji omogućuju i prepoznavanje i produktivno vezanje srodnih parova.^[16]



Slika 5. Vezanje aminokiselina na tRNA, reakcija aminoacilacije. U reakciji aminoacilacije, aminokiselina se aktivira reakcijom s molekulom ATP-a stvarajući međuprodukt koji se naziva aminoacil-AMP-sintetazni međuprodukt. Zatim se aktivirana

aminokiselina prenosi na 3' kraj tRNK i dobiva se specifična aminoacil-tRNK i AMP.

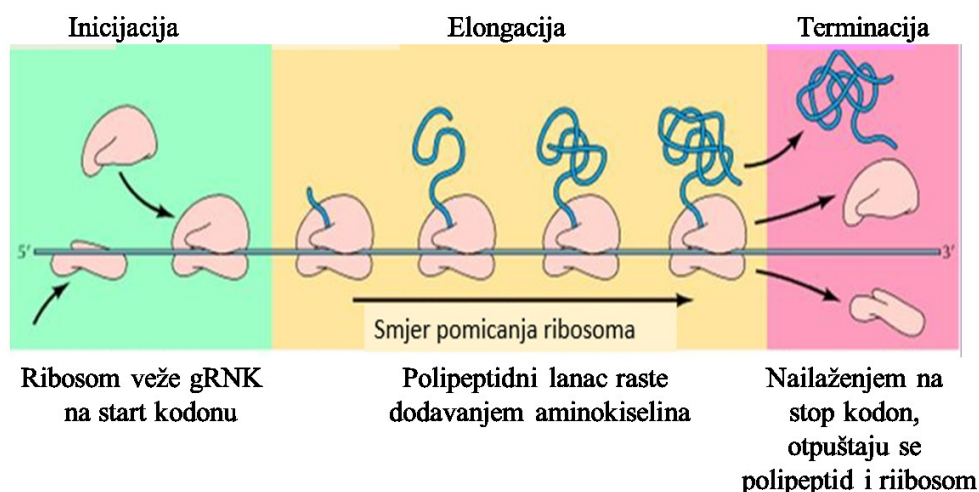
Preuzeto:

https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=3&p_RefId=3263&p_IsPs=Y

1.3.1. Translacija

Proces translacije se odvija u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija (**slika 6.**).

U inicijaciji dolazi do vezanja inicijacijske tRNK na startni kodon u gRNK. Nakon što se vezala mala ribosomska podjedinica, nastalom kompleksu se pridružuje i velika podjedinica pri čemu nastaje funkcionalni ribosom koji je spreman za sljedeći korak translacije, odnosno elongaciju.^[17] Na ribosomu postoje tri mjesta vezanja tRNK; mjesto P, mjesto A i mjesto E. Inicijacijska tRNK se postavlja na mjesto P (peptidno mjesto) ribosoma, a mjesto A je prazno. Elongacija započinje vezanjem aminoacil-tRNK na drugo mjesto ribosoma, nazvano mjesto A (aminokiselinsko mjesto).^[18] Tada nastaje peptidna veza između amino skupine ulazne aminoacil-tRNA i karboksilne skupine formil metionina, kojeg nosi inicijacijska tRNK. Nastaje dipeptid, koji se zatim premješta sa mjesta A na mjesto P, dok druga molekula tRNK napušta ribosom te dolazi do pomaka ribosoma za tri nukleotida uzduž gRNK. Nakon toga nova se aminoacil-tRNK veže za ispražnjeno mjesto A i započinje novi ciklus elongacije koji se odvija po upravo opisanom postupku. Do završetka elongacije, odnosno do terminacije dolazi kad u mjesto A na ribosomu dođe »stop« kodon (UGA, UAG, UAA) u molekuli gRNK što dovodi do završetka sinteze proteina uslijed faktora otpuštanja.^[19]



Slika 6. Translacija proteina. Translacija se odvija u tri koraka: inicijacija, elongacija i terminacija. U fazi inicijacije ribosom se veže gRNK na start kodonu. U fazi elongacije stvara se polipeptidni lanac dodavanjem aminokiselina. Proces translacije završava kad na ribosomu dođe stop kodon pri čemu dolazi do otpuštanja polipeptida i ribosoma.

1.4. SIGNALNI PUTEVI KOJI POTIČU SINTEZU RIBOSOMA

Za rast stanica važna je dostupnost nutrijenata. Organizmu trebaju aminokiseline kao izvor energije, građivni elementi za sintezu proteina i kao signalne molekule.^[20] Brojni signalni putevi potiču sintezu ribosoma, a posljedično i sintezu proteina.^[21]

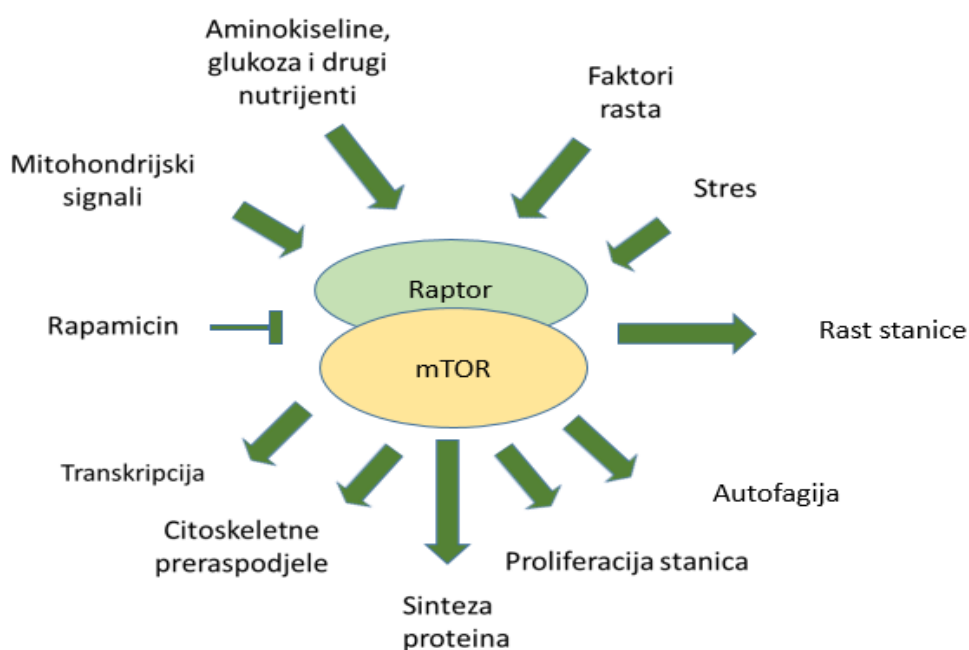
1.4.1. Signalni put Ras-MAPK-c-Myc

Signalni put Ras-MAPK-c-Myc utječe na rast i diobu stanica regulirajući prepisivanje ciljnih gena i ostalih procesa. Prvi korak uključuje vezanje GTP-a za Ras mijenjajući njegovu konformaciju, što dovodi do mogućnosti vezivanja serin-treoninske kinaze Raf za Ras i njezino smještanje u membrani gdje će se aktivirati. Tako aktivirana Raf kinaza dalje aktivira i fosforilira kinazu MEK, koja aktivira i fosforilira kinazu MAPK. Kinaza MAPK potom

odlazi u jezgru i tamo fosforilira c-Myc i ostale transkripcijske faktore.^[22] c-Myc potiče sintezu komponenti ribosoma, faktora koji sudjeluju u sintezi ribosoma, ali i faktora koji utječu na sintezu proteina.^[23] Nadalje, c-Myc se veže na promotore gena koji kodiraju faktore translacije i tako omogućuje intenzivnu sintezu proteina na ribosomima.^[24]

1.4.2. Signalni put mTOR

mTOR je serin/treoninska kinaza koja integrira signale potaknute receptorima za faktore rasta prisutnošću energije u stanici i regulira sintezu ribosoma i proteina te rast stanice (slika 7.). mTOR / je cilj djelovanja imunosupresivnog lijeka rapamicina.^[25] mTOR formira stehiometrijski kompleks s raptorom, evolucijski sačuvanim proteinom s najmanje dvije uloge u mTOR putu. Pozitivna uloga raptora je povezana sa signaliziranjem potaknutim hranjivim tvarima, održavanjem veličine stanice i ekspresijom mTOR proteina. Negativna uloga povezanosti raptora s mTOR-om se odnosi na regulaciju aktivnosti mTOR kinaze. Stanja koja potiskuju put, kao što su nedostatak hranjivih tvari i mitohondrijsko razdvajanje, stabiliziraju asocijaciju mTOR-raptora i inhibiraju aktivnost mTOR kinaze.



Slika 7. Aktivacija mTOR signalnog puta. Nakon vezanja faktora rasta, aminokiselina i drugih nutrijenata dolazi do aktivacije mTOR-kinaznog kompleksa koji sudjeluje u regulaciji rasta stanice. Rapamicin je inhibitor mTOR-a i rasta stanice.

Ovaj signalni put integrira unutarstanične i izvanstanične signale i središnji je regulator staničnog metabolizma, rasta, proliferacije i preživljavanja. Brojni procesi ga aktiviraju (angiogeneza, tumori, otpornost na inzulin), a poremećaji u regulaciji se očituju pri razvoju bolesti poput raka ili dijabetesa tipa 2. Već je poznato korištenje poznatih inhibitora mTOR-a, rapamicina, u liječenju tumora, pri organskim transplantacijama te reumatoidnom artritisu.^[26]

1.5. Poremećaj sinteze proteina

Molekularni procesi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Ravnoteža između sinteze i razgradnje proteina regulira ukupnu količinu proteina u organizmu. Tijekom života organizma sisavaca postepeno se narušava homeostaza proteina.^[27] Pretpostavlja se da upravo ovi poremećaji u homeostazi proteina imaju ključnu ulogu u razvoju bolesti koje su povezane sa starenjem, kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, zloćudne bolesti, dijabetes oblika 2, katarakta i progresivni gubitak tkiva mišića. Međutim, vrlo malo se zna o izvanstaničnim i staničnim čimbenicima koji dovode do poremećaja homeostaze što posljedično rezultira razvojem patoloških stanja u ljudi.^[27] Poznato je da povećani unos hranjivih tvari može poremetiti signalne puteve koji reguliraju sintezu proteina. Osim toga, do smanjenog broja ribosoma ili promjene njihove kvalitete mogu dovesti različiti poremećaji funkcije komponenti ribosoma ili faktora koji reguliraju njihovu sintezu, a što u konačnici dovodi do promjena i u sintezi proteina. Razina proteina u stanici određena je intenzitetom sinteze, ali isto tako i udjelom njihove razgradnje. Prema tome, od velike je važnosti u stanici

odrediti intenzitet sinteze proteina kako bi se dobio uvid o funkciji stanice. Stoga je u ovom radu testirana primjena metode za praćenje intenziteta sinteze proteina odnosno procjenu kapaciteta sinteze proteina u stanici.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Molekularni procesi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Promjena ukupne sinteze proteina važna je u odgovoru stanice na fiziološke i patološke uvjete. Stoga je od velike važnosti postojanje metode pomoću koje se može odrediti kapacitet sinteze proteina u stanici. U ovom završnom radu korištene su dvije vrste stanica, stanice A549 i primarne stanice mišjih embrionalnih fibroblasta kako bi se pokazala primjenjivost i optimizirala metoda za određivanje intenziteta sinteze proteina.

U ovom radu cilj je u stanicama A549 i u stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta odrediti intenzitet sinteze proteina u različitim vremenskim intervalima mjerenjem količine ugradnje analoga puromicina u novosintetizirane proteine metodom imunofluorescencije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. *MATERIJALI*

3.1.1. Kemikalije

Bakar sulfat (CuSO_4)

Cikloheksimid ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$)

DAPI (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*, $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$), Sigma-Aldrich

DMEM medij, Gibco BRL

Etanol (CH_3OH), Kemika

Fetalni teleći serum (FCS, engl. *fetal calf serum*), Gibco BRL

L-Glutamin ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$), Gibco BRL

Izopropanol (2-propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), Kemika

Kalcij klorid (CaCl_2), Kemika

Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika

Kalij hidrogenkarbonat (KHCO_3), Kemika

Metanol (CH_3OH), Kemika

Natrij-askorbat ($\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$)

Natrij dihidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), Kemika

Natrij klorid (NaCl), Kemika

2-Merkaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), Sigma-Aldrich

Otopina penicilina i streptomicina, Gibco

ProLong Gold antifade reagent, Invitrogen

Trizma-baza ($\text{C}_4\text{H}_11\text{NO}_3$), Sigma-Aldrich

Triton X-100, Pharmacia Biotech

3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica

3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (PBS, engl. *phosphate buffered saline*), pH 7,4

Natrij klorid (NaCl) 137 mM, kalij klorid (KCl) 2,7 mM, natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 4,3 mM, kalij-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) 1,4 mM.

3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica

Medij DMEM, L-glutamin 2 mM, 2-merkaptetanol 50 μM , penicilin 105 U/L, streptomycin 0,1 g/L, gentamicin 0,035 g/L, FCS 12% (v/v)

3.1.3. Otopine korištene za imunofluorescenciju

Fiksacija stanica

Hladni methanol

3.1.3.1. Otopina za ispiranje stanica nakon fiksacija

Tris buffer saline (TBS, TRis 10 mM pH 7,5, 150 mM NaCl)

3.1.3.2. Otopina za permeabilizaciju stanica TBST

Triton X-100, 0,2 %-tna otopina u TBS

3.1.4. Stanične linije

3.1.4.1. Humana stanična linija A549 stanica

Humana stanična linija A549 iz alveolarnog adenokarcinoma, ATCC. Stanice A549 su adherentne. Uzgajala sam ih na 37 °C i atmosferi od 5 % CO₂ u DMEM mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma (10 % v/v), glutamina i otopine penicilina/streptomicina.

3.1.4.2. Mišji embrionalni fibroblasti

Mišji embrionalni fibroblasti (MEF) već su prethodno izolirani na Zavodu za molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci iz miševa s C57Bl6/c (tzv. divlji tip). Uzgajala sam ih na 37 °C i atmosferi od 5 % CO₂ u DMEM mediju uz dodatak fetalnog telećeg seruma (10 % v/v), glutamina i otopine penicilina/streptomicina.

3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor

Boce od 200 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL

Bürker-Türk Hemocitometar

Epruvete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, Greiner

Magneti

Mikrocentrifugalne tubice od 1,5 mL i 2 mL, Greiner

Nastavci za pipete, univerzalni (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000 µL), Gilson

Nastavci za pipete, filter (0,1-2, 2-20, 20-200 i 100-1000 µL), Gilson

Odmjerne menzure, tikvice i čaše

Pinceta

Pipete, Eppendorf i Gilson

Pipetori, Gilson

Plastični lijevci i kadice

Ploče za kulturu (6 cm, 10 cm, 15 cm), Greiner

Plastične pipete (2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL), Orange Scientific

Predmetna i pokrovna stakalca

Škare

3.1.6. Uređaji

Centrifuge (rashladne): Eppendorf, Chill Spin, Sorvall

Hladnjaci (+4 °C, −20 °C, −80 °C, −140 °C)

Inkubator, Jouan

Konfokalni mikroskop, LSM 700, Zeiss

Magnetska mješalica, Ika

pH metar, Mettler Toledo

Vodena kupelj, Biosan

Vibracijska mješalica, Ika

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje kapaciteta sinteze proteina

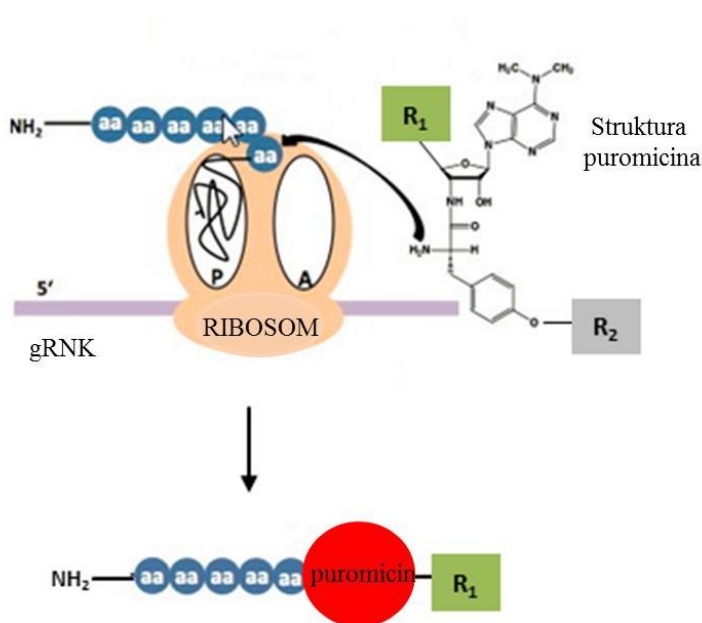
Kapacitet za sintezu proteina u stanicama A549 i stanica mišjih embrionalnih fibroblasta (MEF) određen je pomoću analoga puromicina, O-propargil-puromicin (OPP), Jena Bioscience i fluorescentne boje AF549-azid. Prvi dan, stanice A549 i MEF, nasadene su

na 10 cm ploče na koje su prethodno stavljena predmetna stakalca na koja će se adherirati stanice kako bi se stakalca nakon fiksacije stanica mogla koristiti za metodu imunofluorescencije. Spoj cikloheksimid inhibira sintezu proteina te je korišten kao negativna kontrola i dodan je u koncentraciji 50 ug/mL 15 minuta prije dodatka O-propargil-puromicina. O-propargil-puromicin dodan je na stanice (A549 i MEF) u koncentraciji 50 uM tijekom 30 minuta, 60 minuta i 3 sata. OPP se ugrađuje u C-terminalni kraj polipeptida u translaciji te na taj način zaustavlja translaciju (**slika 8.**). Tako obilježene bjelančevine vizualiziraju se inkubacijom s fluorescentnom bojom. Po završetku inkubacije stanica s OPP-om, stanice su oprane dva puta sa PBS-om, a potom su fiksirane hladnim metanolom u trajanju 2 minute na temperaturi -20°C. Po završetku fiksacije stanice su oprane dva puta s TBS puferom te je nakon toga provedena permeabilizacija s TBST otopinom u trajanju 7 minuta nakon čega su stanice oprane dva puta s TBS-om. Po završetku permeabilizacije pripremljena je otopina za vizualizaciju količine ugrađenog OPP-a te su stanice inkubirane sa fluorescentnom bojom tijekom 30 minuta. Komponente otopine u koju se dodaje fluorescena boja su slijedeće:

u 200 uL PBS-a dodano je 10 uL 2 M Tris pH 8,5, 3 uL 50 mM CuSO₄, 30 uL 0,5 M Na-askorbata te 2 uL fluorescentne boje alexa 549-azid koncentracije 2mM. Nakon inkubacije s fluorescentnom bojom stanice su oprane dva puta s otopinom TBS-a. Osim toga, dodala sam fluorescentnu boju DAPI koja boji DNK, u trajanju od 5 minuta, u mraku, pri sobnoj temperaturi. Dobiveni fluorescentni signal analizirala sam primjenom konfokalnog mikroskopa LSM 700 (Zeiss).

3.2.1.1. Mehanizam djelovanja O-propargil-puromicina

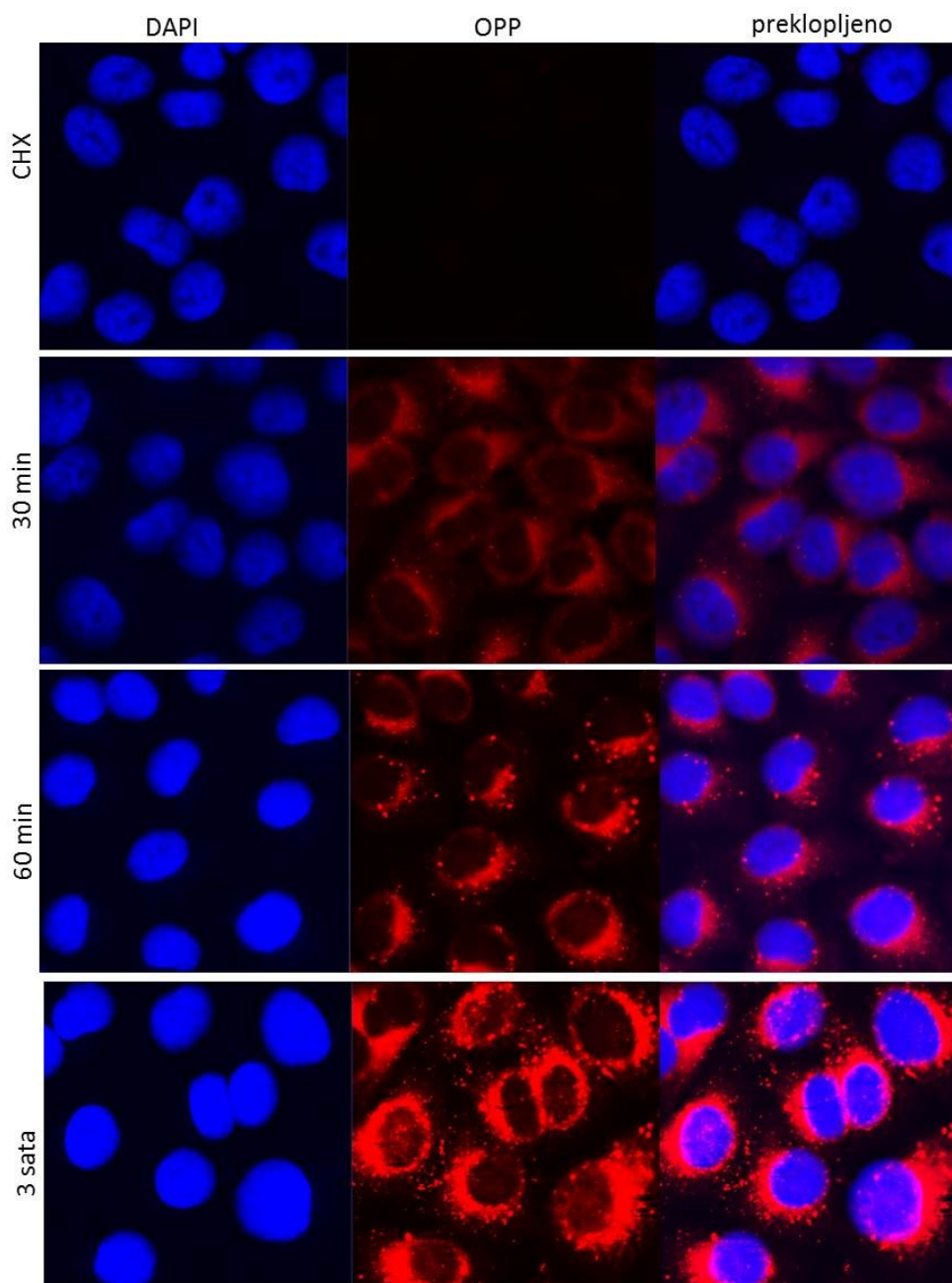
Većina metoda koje su se ranije koristile za mjerenje sinteze proteina ovisile su o metaboličkom obilježavanju velikog broja stanica radioaktivno označenim aminokiselinama ili njihovim analozima. Primjena O-propargil-puromicina (OPP), analoga puromicina, olakšala je kvantifikaciju sinteze proteina unutar pojedinačnih stanica, a isto tako i u *in vivo* modelima. Naime, puromicin je strukturni analog aminoacil-tRNK koji se koristi kao inhibitor sinteze proteina. Do inhibicije sinteze dolazi uslijed zaustavljanja translacije jer puromicin ima sposobnost vezanja za C-terminalni kraj polipeptidnog lanca. Njegov spomenuti analog, O-propargil-puromicin, lako se ugrađuje u proteine, čime se osigurava osjetljiva, neradioaktivna metoda za izravno praćenje sinteze proteina. Dakle, OPP ulazi u vezno mjesto ribosoma i ugrađuje se u polipeptidne lance koji nastaju. Ugrađeni OPP se može otkriti kemijskom reakcijom u kojoj se povezuje s fluorescentno označenom molekulom azida.



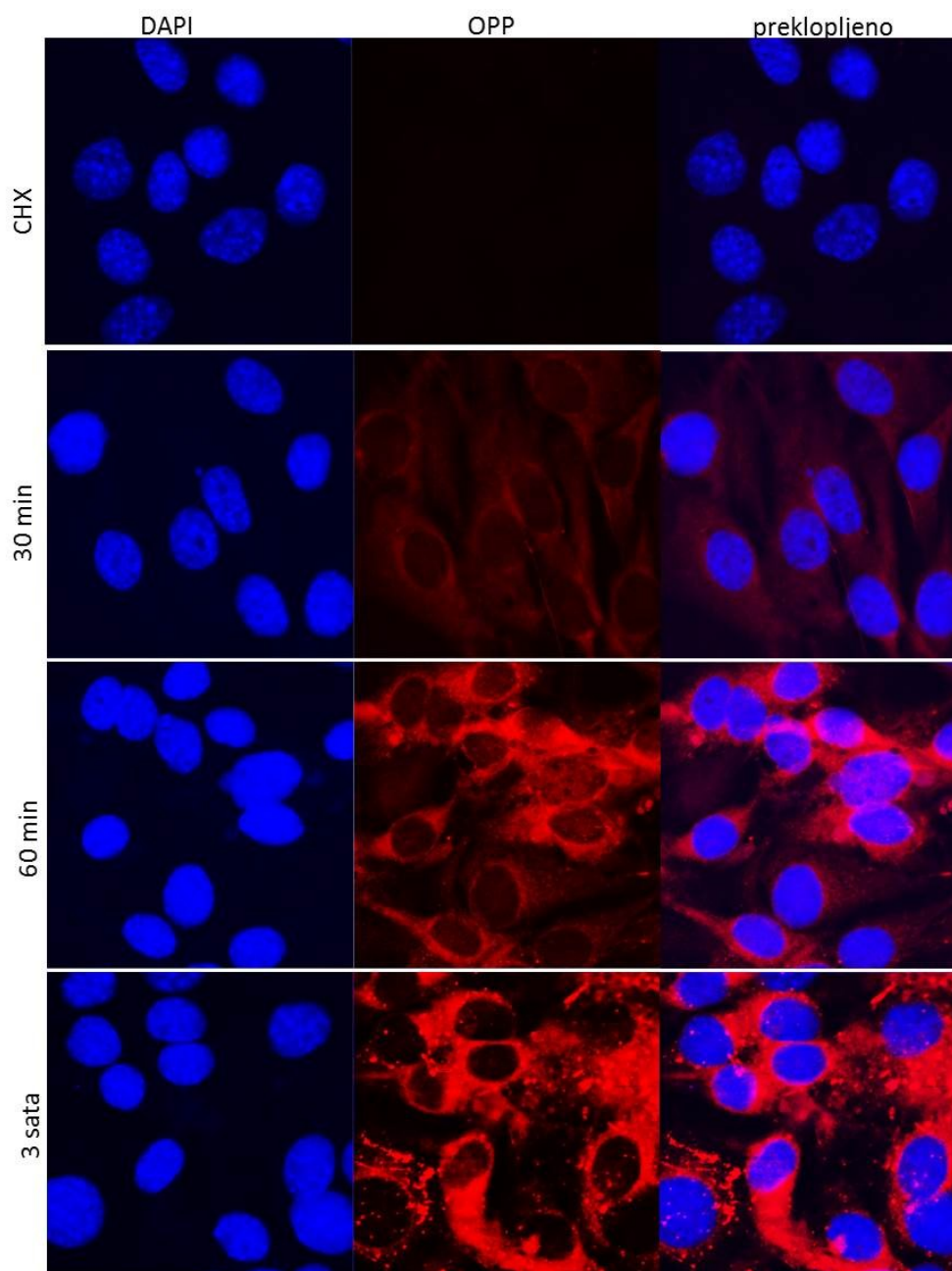
Slika 8. Mehanizam djelovanja O-propargil-puromicina. O-propargil-puromicin ulazi u vezno mjesto ribosoma i ugrađuje se u polipeptidne lance koji nastaju. Do inhibicije sinteze dolazi uslijed zaustavljanja translacije jer puromicin ima sposobnost vezanja za C-terminalni kraj polipeptidnog lanca.

4. REZULTATI

Signalni putevi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Promjene u sintezi proteina utječu na odgovor stanice na fiziološke i patološke uvjete. Većina metoda koje su se ranije koristile za mjerenje sinteze proteina ovisile su o obilježavanju velikog broja stanica radioaktivno označenim aminokiselinama. Metoda koju sam ja koristila u ovom radu temelji se na primjeni O-propargil-puromicina (OPP), analoga puromicina, koji se ugrađuje na C-terminalni kraj polipeptida u translaciji te na taj način zaustavlja translaciju. Tako obilježeni proteini vizualiziraju se inkubacijom s fluorescentnom bojom. Kapacitet sinteze proteina može se procijeniti na temelju količine ugrađenog OPP-a u proteine upotrebom metode imunofluorescencije. U ovom radu je testirana primjenjivost upotrebe O-propargil-puromicina u određivanju kapaciteta sinteze proteina u stanicama A549 i stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta (**slika 9. i 10.**) Spoj cikloheksimid inhibira sintezu proteina te je korišten kao negativna kontrola, a na obje slike (**slika 9. i slika 10.**) je vidljivo da je sinteza proteina u potpunosti spriječena u prisutnosti cikloheksimida. Iz rezultata prikazanih na **slikama 9. i 10.** vidljivo je da se u prvih 30 minuta OPP tek počinje ugrađivati u stanice te je i stoga intenzitet fluorescencije najslabiji. Inkubacija stanica A549 i stanica mišjih embrionalnih fibroblasta s OPP-om u vremenu od tri sata rezultirala je najjačim intenzitetom sinteze proteina što ukazuje da je intenzitet ugradnje OPP-a proporcionalan količini sintetiziranih proteina. Intenzitet fluorescencije nakon inkubacije stanica s OPP-om tijekom 3 sata je prejak. Iz rezultata prikazanih na **slikama 9. i 10.** vidljivo je da je optimalno vrijeme inkubacije stanica s OPP-om u vremenu od 60 minuta. U tom vremenu u stanice je ugrađena dovoljna količina OPP-a na temelju koje se može procijeniti intenzitet sinteze proteina.



Slika 9. Kapacitet sinteze proteina u stanicama A549. Kapacitet za sintezu proteina u stanicama A549 određen je pomoću analoga puromicina, O-propargil-puromicina (OPP-a). OPP je dodan u koncentraciji 50 uM tijekom 30 minuta, 60 minuta i 3 sata, a spoj cikloheksimid (CHX), inhibira sintezu proteina i dodan je u 15 minuta prije dodatka OPP-a. Fluorescentna boja DAPI boji jezgru i prikazana je plavo dok se bjelančevine obilježene OPP-om vizualiziraju dodatkom crvene fluorescentne boje. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.



Slika 10. Kapacitet sinteze proteina u stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta.

Kapacitet za sintezu proteina u stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta određen je pomoću analoga puromicina, O-propargil-puromicina (OPP-a). OPP je dodan u koncentraciji 50 μ M tijekom 30 minuta, 60 minuta i 3 sata, a spoj cikloheksimid (CHX), inhibira sintezu proteina i dodan je u 15 minuta prije dodatka OPP-a. Fluorescentna boja DAPI boji jezgru i prikazana je plavo dok se bjelančevine obilježene OPP-om vizualiziraju dodatkom crvene fluorescentne boje. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom.

Prema tome, rezultati prikazani na **slikama 9. i 10.** pokazuju da je primjena O-propargil-puromicina (OPP), analoga puromicina, učinkovita u ovoj metodi koja se koristi za određivanje kapaciteta sinteze proteina u stanicama. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je optimalno vrijeme inkubacije stanica s OPP-om tijekom 60 minuta i da se ti uvjeti mogu koristiti za praćenje intenziteta sinteze proteina. Brojna patološka stanja mogu poremetiti sintezu proteina u stanici stoga je praćenje intenziteta sinteze proteina u stanici važan parametar za praćenje odgovora stanice u tim uvjetima.

5. RASPRAVA

Molekularni procesi koji reguliraju obim i kvalitetu novosintetiziranih proteina te njihovu razgradnju ključni su za normalno funkcioniranje svih stanica sisavaca. Promjena ukupne sinteze proteina važna je u odgovoru stanice na fiziološke i patološke uvjete.

U ovom radu za određivanje kapaciteta sinteze proteina u stanicama A549 i stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta korišten je analog puromicina, O-propargil-puromicin (OPP). Kako je metoda u kojoj se koristi OPP brza, osjetljiva, netoksična i neradioaktivna, pogodna je za određivanje intenziteta sinteze proteina u stanici upotrebom fluorescentne mikroskopije. OPP djeluje na način da inhibira sintezu proteina ometanjem prijenosa peptida na ribosomima i tako uzrokuje prijevremeni završetak lanca tijekom translacije. Za razliku od većine metoda korištenih za mjerenje sinteze proteina, ova metoda ne ovisi o obilježavanju velikog broja stanica radioaktivno označenim aminokiselinama ili analozima aminokiselina. OPP formira kovalentne konjugate s novosintetiziranim polipeptidnim lancima koji se mogu vizualizirati. Ova metoda se može koristiti za slikovit prikaz sinteze proteina i identificiranje proteina sintetiziranih pod različitim fiziološkim i patološkim stanjima u *in vitro* i u *in vivo* modelima. Ova metoda je vrlo jednostavna i efikasna te je iz tog razloga važna njena primjena u određivanju intenziteta sinteze proteina.

6. ZAKLJUČCI

1. Primjena O-propargil-puromicina (OPP), analoga puromicina, učinkovita je metoda za određivanje kapaciteta sinteze proteina u stanicama A549 i stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta
2. Optimalno vrijeme inkubacije stanica A549 i stanica mišjih embrionalnih fibroblasta s OPP-om je 60 minuta.

7. LITERATURA

1. Warner JR. Nascent ribosomes. *Cell* 2001;107:133-6
2. Thomas, G An encore for ribosomes biogenesis in the control of cell proliferation, *Nature Cell Biology*, 2(5), ppE71-E72
3. G.M. Cooper, R.E. Hausmann; Stanica: molekularni pristup, peto izdanje; Medicinska naklada, 2010. Zagreb; 52-55.
4. Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1–17. doi:10.1007/s00726-009-0269-0
5. R.K. Murray, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J Kennelly, V.W. Rodwell, P.A. Weil; Harperova ilustrirana biokemija, Dvadeset osmo izdanje; Medicinska naklada, 2011. Zagreb; 14-21.
6. <https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>
7. R.K. Murray, D.A. Bender, K.M. Botham, P.J. Kennelly, V.W. Rodwell, P.A. Weil; Harperova ilustrirana biokemija, Dvadeset osmo izdanje; Medicinska naklada, 2011. Zagreb; 32-36.
8. Sebastian Klinge and John L. Woolford Jr; *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 20, pages116–131 (2019).
9. Granneman S., Baserga S.J.; Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res.* 2004; 296(1):43-50.

10. Ferreira-Cerca S., Pöll G., Gleizes P.E., Tschochner H., Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Molecular Cell*, 2005; 20(2), 263–75.
11. Finch A.J., Hilcenko C., Basse N i sur.; Uncopuling of GTP hydrolisis from eIF 6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* 2011.; 25(9); 917-29.
12. de la Cruz J, Karbstein K, Woolford JL Jr.; Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo; *Annu Rev Biochem.* 2015;84:93-129.
13. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L; *Biochemistry*, 5th edition; Section 29.5 Eukaryotic Protein Synthesis Differs from Prokaryotic Protein Synthesis Primarily in Translation Initiation; 2002. New York.
14. Lorenz C., Lünse C.E., Mörl M.; tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation.; *Biomolecules.* 2017; 7(2)
15. G.M. Cooper, R.E. Hausmann; Stanica: molekularni pristup, peto izdanje; Medicinska naklada, 2010. Zagreb; 310-11.
16. Szymański M, Deniziak M, Barciszewski J.; The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases.; *Acta Biochim Pol.* 2000;47(3):821-34.
17. <https://www.thoughtco.com/protein-synthesis-translation-373400>
18. <https://www.sparknotes.com/biology/molecular/translation/section2/>
19. G.M. Cooper, R.E. Hausmann; Stanica: molekularni pristup, peto izdanje; Medicinska naklada, 2010. Zagreb; 318-23.
20. Wu G., Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health; *Adv Nutr.* 2010; 1(1): 31–37

21. Teng T., Thomas G., Mercer C.; Growth control and ribosomopathies.; *Current Opinion in Genetics and Development.*; 2013,23:1-9.
22. Eilers M., Eisenman R. N.; Myc's broad reach.; *Genes Development*; 2008; 22(20), 2755–2766.
23. Golomb L., Bublik D.R., Wilder S. I sur.; Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis.; *Mol Cell*. 2012;45(2); 222-31.
24. Grandori C., Gomez-Roman N., Felton-Edkind Z.A. i sur.; c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I.; *Nat Cell Biol* 2005;7:311-8.
25. Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N.; TOR signaling in growth and metabolism.; *Cell*. 2006; 124(3):471-84.
26. Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., King J.E., Latek R.R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D.M.; mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.; *Cell*. 2002; 110(2):163-75.
27. Olga Sin, Ellen A., A. Nollen., Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: the role of coding and non-coding genes, *Cell. Mol. Life Sci.* (2015) 72:4027–4047

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lucija Ražov

Datum rođenja: 26. prosinca 1997.

Mjesto rođenja: Zadar

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

Adresa: Put Ražovljeve glavice 19, Škabrnja 23223

Telefon: +385 91 726 85 19

E-mail: lucija.razov97@gmail.com

Obrazovanje:

2004. – 2012. Osnovna škola Vladimira Nazora Škabrnja

2012. – 2016. Gimnazija Vladimira Nazora Zadar, opći smjer

2016. – 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Preddiplomski sveučilišni studij
sanitarnog inženjerstva

Vještine:

Strani jezici: engleski i talijanski jezik