

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

**Grazia Davidović**

**Sirtuin 3 i hiperoksija: saveznici u borbi protiv tumora**

Zagreb, 2017

Ovaj rad izrađen pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Domagoja Đikića, Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, i neposrednim vodstvom dr.sc. Sandre Sobočanec, Laboratorij za bioenergetiku mitohondrija i dijabetes, Institut Ruđer Bošković, predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

## POPIS KRATICA

ATP	adenozin trifosfat
cDNA	komplementarna DNA
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol (engl. <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DCF	2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (engl. <i>2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> )
DiOC6(3)	3,3'-diheksiloksakarbacijanin jodid (engl. <i>3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide</i> )
DMSO	dimetilsulfoksid
DNAza	deoksiribonukleaza
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin (engl. <i>2,4-dinitrophenylhydrazine</i> )
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ELISA	enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ER $\alpha$	estrogen receptor $\alpha$
esr-1	gen za estrogen receptor $\alpha$
FBS	serum fetusa goveda (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	fluorescein izocijanat
HRP	peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IgG	imunoglobulin G
LDH	laktat dehidrogenaza
MLS	mitohondrijska lokalizirana sekvenca
MMP	matriks metaloproteinaza

mmp2	gen za matriks metaloproteinazu 2
mt-nd1	gen za podjedinicu kompleksa I respiratornog lanca
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NAO	10-N-nonil akridin narančasto (engl. <i>10-N-nonyl acridine orange</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PVDF	polivinilidenfluorid
qPCR	kvantitativni PCR
qH <sub>2</sub> O	pročišćena voda
RKV	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS-PAGE	natrij-dodecil sulfat elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. <i>sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
sirt-3	gen za sirtuin 3
sod-2	gen za superoksid dismutazu 2
Vegf	vaskularni endotelni faktor rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
vegf-a	gen za vaskularni endotelni faktor rasta a

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Oksidacijski stres i nastanak tumora.....	1
1.2. Mitohondriji i oksidacijski stres.....	1
1.3. Sirtuini.....	2
1.4. Povezanost Sirt-3 i tumora.....	3
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	5
3.1. Kultura stanica in vitro.....	5
3.2. Transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA.....	5
3.3. Metode za određivanje ekspresije gena.....	6
3.3.1. Izolacija RNA (TRIzol Reagent).....	6
3.3.2. Reverzna transkripcija.....	6
3.3.3. Real-time PCR analiza.....	7
3.4. Metode za određivanje ekspresije proteina.....	8
3.4.1. Izolacija proteina iz stanica.....	8
3.4.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom.....	8
3.4.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida.....	8
3.4.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu.....	10
3.4.5. Analiza proteina metodom Western blot.....	10
3.5. Metoda za određivanje vijabilnosti stanica – MTT test.....	11
3.6. Metoda za određivanje preživljenja stanica – CFA (test formiranja kolonija).....	12
3.7. Metoda za određivanje karbonilacije proteina.....	12
3.8. Metoda za određivanje lipidne peroksidacije.....	14
3.9. FACS analiza – mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutarstaničnih RNV-a.....	14
3.10. Imunofluorescencija i konfokalna mikroskopija.....	15
3.10.1. Imunofluorescencija.....	15
3.10.2. Konfokalna mikroskopija.....	15
3.11. Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI.....	17
4.1. Karakterizacija klonova.....	17
4.2. Utjecaj hiperoksije na ekspresiju Sirt-3.....	17
4.3. Konfokalna analiza stanične lokalizacije i inteziteta fluorescencijskog signala za Sirt-3 i mitohondrije unutar MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji.....	19

4.4. Utjecaj Sirt-3 na vijabilnost MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji .....	23
4.5. Utjecaj Sirt-3 na sposobnost preživljenja MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji (test formiranja kolonija) .....	24
4.6. Utjecaj Sirt-3 na lipidnu peroksidaciju (LPO) u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji .....	25
4.7. Utjecaj Sirt-3 na oksidacijska oštećenja proteina (karbonilacija) u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji.....	26
4.8. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju vegf-a, mmp2 sod-2, mt-nd1 i esr-1 gena u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji.....	27
4.9. Utjecaj Sirt-3 na ekspresiju proteina Sod-2, ER- $\alpha$ i Ldh-A u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji.....	31
4.10. Utjecaj Sirt-3 na broj mitohondrija, mitohondrijski potencijal i proizvodnju unutarstaničnih RKV-a u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji.....	34
5. RASPRAVA .....	38
6. ZAKLJUČCI.....	44
7. ZAHVALA .....	45
8. LITERATURA .....	46
9. SAŽETAK .....	50
10. SUMMARY.....	51

## **1. UVOD**

## ***1.1. Oksidacijski stres i nastanak tumora***

Sve više istraživanja pokazuje da visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost, koji dovode do reprogramiranja staničnog metabolizma i u konačnici do gubitka kontrole staničnog ciklusa. Na ovaj način podržava se kontinuirani rast i proliferacija, glavno obilježje tumorskih stanica<sup>1,2</sup>. Otkriveno je da tumorske stanice koriste veliku količinu glukoze i pri tome proizvode velike količine mliječne kiseline čak i pri normalnim koncentracijama kisika (normoksija). Taj fenomen pretvorbe glukoze u mliječnu kiselinu u prisustvu kisika poznat je kao Warburgov efekt ili aerobna glikoliza<sup>3</sup>. Pokazalo se da su energijom bogati spojevi, nastali u glikolizi, povezani s aktivnim onkogenima (RAS, myc) i inaktivnim tumor supresor genima (p53) čija promjena u stanicama u prvom redu izaziva nekontroliranu proliferaciju i inhibiciju apoptoze<sup>2</sup>. Iako se u početku smatralo da je aerobna glikoliza rezultat prilagodbe na okoliš u prekarinogenim lezijama, njena prisutnost u primarnim i metastatskim stanicama raka čak i u uvjetima normoksije upućuje na to da upravo aerobna glikoliza osigurava jaki selektivni rast kojeg prati progresija raka. Time se sugerira da je stjecanje takvog glikolitičkog fenotipa preduvjet za invazivni rast tumora i njegovu progresiju<sup>4</sup>.

## ***1.2. Mitohondriji i oksidacijski stres***

Mitohondriji su organeli stanice koji se nalaze u svim aerobnim organizmima. Sudjeluju u regulaciji važnih staničnih procesa kao što su apoptoza, stanični metabolizam i održavanje razine kalcija<sup>5</sup>. Tijekom procesa staničnog disanja (oksidacijske fosforilacije), elektroni se prenose uz pomoć transportnog lanca elektrona (ETC) kako bi stvorili transmembranski elektrokemijski gradijent protona. Nastali gradijent koristi se za proizvodnju ATP-a pomoću enzima ATP-sintaze. Održavanje normalnog mitohondrijskog transmembranskog potencijala je od presudne važnosti za život stanice. Slabljenje mitohondrijske funkcije, osim što smanjuje sposobnost mitohondrija za stvaranje ATP-a, pojačava proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (RKV), kao što su superoksidni anion  $O_2^-$ , vodikov peroksid  $H_2O_2$  i hidroksil radikal  $OH^-$ <sup>6</sup>. Pri niskim koncentracijama RKV sudjeluju u fiziološkim staničnim procesima prijenosa signala i regulaciji staničnog ciklusa, a pri visokim koncentracijama dovode do oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina<sup>7,8</sup>. Osim što



nastaju u normalnim metaboličkim procesima, RKV mogu biti produkti oksidacijskog stresa uzrokovanog povećanom koncentracijom kisika u stanici. Povećane koncentracije kisika posljedica su povećanog parcijalnog tlaka kisika pri atmosferskom tlaku koji uzrokuje hiperoksiju ( $pO_2 > 95\%$ )<sup>9</sup>. Dugotrajno izlaganje organizma hiperoksiji uzrokuje oksidacijski stres, stanja narušenog balansa između stvaranja RKV-a i mehanizma antioksidacijske obrane u stanici. Oksidacijski stres jedan je od glavnih čimbenika koji uzrokuju kronične upalne procese, degenerativne bolesti, pojavu tumora, kao i proces starenja<sup>10</sup>.

### **1.3. Sirtuini**

Sirtuini (Sirt) su visoko očuvana obitelj proteina koja ima važnu ulogu u regulaciji procesa starenja u nižim organizmima, dok je njihova uloga u viših organizama znatno slabije istražena. Sirtuini djeluju kao  $NAD^+$ -ovisne protein deacetilaze koje reguliraju razinu acetilacije proteina i aktivnost transkripcijskih faktora i histona. Nadalje, sudjeluju u regulaciji staničnog metabolizma, stresa i posreduju u signalnim putevima odgovornima za preživljenje stanica. Da bi sirtuini mogli učinkovito deacetilirati i time aktivirati proteine, potreban je nikotinamid adenin dinukleotid ( $NAD^+$ ) kao kofaktor u reakciji deacetilacije. Povezanost između  $NAD^+$ ,  $NADH$  i aktivnosti sirtuina ukazuje na to da sirtuini mogu služiti kao pokazatelji energetskog statusa<sup>11,12</sup>.

U sisavaca je pronađeno sedam različitih gena koji kodiraju za sirtuin proteine (Sirt 1-7) s dobro očuvanim katalitičkim domenama. Istraživanja su pokazala da sirtuini kod sisavaca imaju jasnu lokalizaciju u stanici. Sirt-1, 6 i 7 su nuklearni proteini, iako se frakcije Sirt-1 mogu naći i u citosolu. Sirt-2 se pretežito nalazi u citosolu, a neka istraživanja pokazuju da se u određenim situacijama nalazi u jezgri. Sirt-3, 4 i 5 lokalizirani su samo u mitohondriju<sup>12</sup>. Istraživanja funkcije mitohondrijskog sirtuina Sirt-3 postala su iznimno atraktivna zbog njegovog utjecaja na produljenje životnog vijeka čovjeka<sup>13</sup>.

Gen sirt3 čovjeka nalazi se na 11p15.5 kromosomu i kodira za mitohondrijski protein Sirt-3. Duži, enzimatski inaktivni oblici Sirt-3 (44 kDa) unose se u mitohondrij N-terminalnim slijedom za unos u mitohondrij (MLS). Tijekom unosa dolazi do proteolitičkog uklanjanja MLS što rezultira katalitičkom aktivacijom kraćih oblika Sirt-3 (28 kDa), koji su sposobni aktivirati ciljne mitohondrijske proteine<sup>14</sup>. Sirt-3 je glavna mitohondrijska deacetilaza, a ukoliko nije prisutna u stanici, dolazi do hiperacetilacije mitohondrijskih proteina što dovodi do slabljenja

funkcije mitohondrija. Brojna istraživanja ukazuju na to da Sirt-3 utječe na signalne puteve u mitohondriju uključujući proizvodnju ATP-a, mitohondrijski stres i metaboličku oksidaciju<sup>15</sup>. Sirt-3 učinkovito održava ravnotežu između pretvorbe stanične energije i nepoželjnih nuspojava mitohondrijskih procesa kao što je nastanak RKV-a, tako što izravno deacetilira i aktivira glavni antioksidacijski enzim u mitohondriju, superoksid dismutazu 2 (SOD2)<sup>5,16</sup>. Aktivnost Sirt-3 smanjuje se starenjem, u uvjetima prehrane bogate masnoćama, te u stanjima poput dijabetesa<sup>17</sup>, a povećava se kao odgovor na kalorijsku restrikciju ili tijekom vježbanja<sup>11</sup>. Premda u uvjetima homeostaze Sirt-3 ne igra značajnu ulogu, postoje brojni dokazi o njegovoj ključnoj ulozi u regulaciji staničnog odgovora na stres, kao i u procesu starenja<sup>17</sup>.

#### **1.4. Povezanost Sirt-3 i tumora**

Noviji podaci iz literature ukazuju na povezanost Sirt-3 i progresije tumora, te je dokazano da Sirt-3 može djelovati i kao onkogen i kao tumor supresor<sup>18</sup>. S jedne strane, Sirt-3 je čuvar stanične homeostaze i ima ulogu tumor supresora, pa gubitak funkcije Sirt-3 doprinosi razvoju agresivnijeg fenotipa kod nekih tumora<sup>19,20</sup>. S druge strane, činjenice da Sirt-3 djeluje na mitohondrijske enzime uključene u aktivaciju oksidativnih puteva, i da RKV imaju glavnu ulogu u progresiji tumora, upućuju na djelovanje Sirt-3 kao onkogenena. Stoga je sasvim opravdano pretpostaviti da prekomjerna ekspresija Sirt-3 može održati povećanu razinu RKV-a za održavanje proliferacije i agresivnog fenotipa, čime se potiče karcinogeneza<sup>21</sup>.

Neovisno o tome što tumorske stanice često žive u hipoksičnim uvjetima<sup>22</sup>, njihovo opskrbljivanje krvlju, rast i preživljenje ovisi o njihovoj opskrbi kisikom i hranjivim tvarima. Stoga je za očekivati da će povećana koncentracija kisika (hiperoksija) djelovati kao promotor razvoja tumora. Međutim, neki radovi ukazuju na inhibiciju rasta tumorskih stanica u sisavaca nakon tretmana hiperoksijom<sup>23</sup>, što ukazuje da hiperoksija može inhibirati rast i proliferaciju tumorskih stanica. Sukladno tome, u ovom radu istraživali smo dva parametra:

- Utjecaj hiperoksije na proliferaciju, preživljenje, rast i vitalnost, te mitohondrijsku funkciju stanica raka dojke MCF-7
- Ulogu ekspresije Sirt-3 u regulaciji proliferacije, preživljenja, rasta i vitalnosti, te mitohondrijske funkcije stanica raka dojke MCF-7 nakon izlaganja hiperoksiji

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

U ovom radu ispitali smo učinak hiperoksije i Sirt-3 na proliferaciju, preživljenje, rast i vitalnost, te oksidacijski/antioksidacijski status i mitohondrijsku funkciju stanica raka dojke MCF-7. Do sada je pokazano da hiperoksija i Sirt-3 zasebno mogu imati inhibitorско djelovanje na progresiju tumora, ali nije pokazano njihovo međudjelovanje kao ni moguća kombinirana upotreba ova dva čimbenika u terapijske svrhe.

Opći cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj Sirt-3 i hiperoksije na stanice MCF-7. Iako se dugo sumnjalo da povećana koncentracija kisika ima promotorski učinak na razvoj raka, danas je ustanovljeno da čisti kisik ima inhibitorni učinak na tumorske stanicene ovisno o tome što povećana koncentracija RRV-a nastala izlaganjem hiperoksičnim uvjetima podržava kontinuirani rast i proliferaciju<sup>2</sup>. Danas se izlaganje čistom kisiku (hiperoksija) koristi kao metoda u liječenju zloćudnih oboljenja<sup>24</sup>. Do sada se pokazala kao vrlo uspješna, međutim točan mehanizam djelovanja hiperoksije na stanice raka još uvijek nije poznat. Jedan od ciljeva ovog rada je stoga bio odrediti utjecaj hiperoksije na proliferaciju, preživljenje, rast i vitalnost, te mitohondrijsku funkciju u stanicama MCF-7.

Specifični cilj rada bio je, u istom modelu stanica MCF-7, odrediti utjecaj ekspresije Sirt-3 na metabolizam, sposobnost metastaziranja i poticanja angiogeneze. U tu svrhu koristili smo suvremene molekularne, biokemijske i mikroskopske metode. Obzirom da stanice MCF-7 ekspimiraju vrlo malu količinu sirt-3, istražili smo utjecaj njegove pojačane ekspresije. Klonovi stanica stabilno transficiranih plazmidom koji sadrži gen za sirt-3 podvrgnuti su hiperoksiji kako bi se utvrdilo ima li sirt-3 zaštitni učinak na rast tumorskih stanica. S obzirom da se Sirt-3 nalazi u mitohondrijima istražena je uključenost mitohondrija u te procese s posebnim naglaskom na moguće reprogramiranje stanica na oksidacijsku fosforilaciju. Ispitan je i učinak djelovanja ekspresije sirt-3 u stanicama raka na njihov metastatski potencijal, te na čimbenike angiogeneze s ciljem procjene agresivnosti stanica MCF-7 prije i nakon tretmana hiperoksijom. U tu svrhu određena je ekspresija mRNA i proteina nekih čimbenika uključenih u razvoj raka.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. *Kultura stanica in vitro***

U ovom istraživanju korištena je stanična linije raka dojke MCF-7 (engl. *Human Caucasian breast adenocarcinoma* (Cat.no.: ECACC 86012803, Public Health, England)). Stanice MCF-7 su adherentne epitelne stanice osjetljive na estrogen. Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (engl. *Fetal bovine serum*, FBS), 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich, SAD), 1x neesencijalnih aminokiselina (EuroClone, Italija) i antibiotika GA-1000 koji sadrži 30 mg/mL gentamicina i 15 µg/m Lamfotericina (Lonza, SAD). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama za uzgoj kulture stanica u inkubatoru pri 37°C, vlažnoj atmosferi i prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2. *Transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA***

Za transfekciju je korišten plazmid pcDNA3.1+Flag-Sirt-3 koji sadrži gen za Sirt-3 označen s Flag (Flag-Sirt-3, Cat.No. 13814) nabavljen preko neprofitne banke plazmida Addgene (Cat.No. 13814) (dobiveno na dar od dr. Grbeša, Institut Ruđer Bošković). Ovaj plazmid osim toga sadrži gen za otpornost na ampicilin za selekciju u bakteriji, te gen za otpornost na neomicin za selekciju stanica u kulturi. Kao kontrola korišten je pcDNA3.1+ plazmid. Plazmidi su nakon umnažanja u bakteriji DH5α pročišćeni pomoću PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, USA) prema uputama proizvođača. Koncentracija dobivenog plazmida određena je na instrumentu za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina Qubit (TermoFisher Scientific, SAD), a odsutnost degradacije provjerena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Za transfekciju plazmida pcDNA3.1+ Flag-Sirt-3 u stanice MCF-7 korišten je Lipofectamine 2000 reagens (TermoFisher Scientific, SAD). Dan prije transfekcije, 150 000 stanica nasađeno je u pločicu za uzgoj kulture stanica s 24 bunarića u hranjivoj podlozi DMEM-FCS. Sljedeći dan su stanice transficirane pomoću Lipofectamine 2000 prema uputama proizvođača i ostavljene u inkubatoru 24 sata. Stanicama je zatim zamijenjena hranjiva podloga svježom, ostavljene su u svježem DMEM-FCS još 48 sati, rasađene i uzgajane dalje u selektivnoj podlozi sa Geneticinom (200 µL/mL G418, Sigma Aldrich, USA). Ekspresija Flag-Sirt-3 u izdvojenim klonovima provjerena je RT-qPCR metodom kako bismo potvrdili stabilnu ugradnju Flag-sirt-3 gena u stanice.

### **3.3. Metode za određivanje ekspresije gena**

#### *3.3.1. Izolacija RNA (TRIzol Reagent)*

Nakon tretmana hiperoksijom stanice su isprane ledenim PBS puferom, te je na stanice dodan 1 mL trizola (TRIzol Reagent, Life technologies, USA) i lizat je resuspendiran nekoliko puta. Stanice su zatim inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodano 200  $\mu$ L kloroforma (Kemika, Hrvatska). Stanice su inkubirane 5 minuta na ledu, centrifugirane pri 12000 g 15 minuta pri 4°C, nakon čega su dobivene tri faze. Gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNA pažljivo je odvojena, te joj je dodan isti volumen izopropanola (Kemika, Hrvatska). Otopina je nekoliko puta lagano promiješana, inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirana 10 minuta pri 12000 g i 4°C. Supernatant je dekantiran, na talog je dodan 1 mL etanola 75% (Kemika, Hrvatska) te su uzorci promiješani i centrifugirani 5 minuta pri 7500 g i 4°C. Ovaj postupak ispiranja 75%-tnim etanolom ponovljen je još jednom, nakon čega je supernatant dekantiran. Nakon 10 minuta sušenja na zraku, talog je otopljen u 20  $\mu$ L qH<sub>2</sub>O tretirane DEPC-om (Sigma Aldrich, SAD). Koncentracija i kvaliteta (čistoća) RNA izmjerena je na uređaju NanoDrop (ThermoFisher Scientific, USA) koji iz omjera apsorbancije 260/280 određuje čistoću izolirane RNA (omjer treba biti oko 2.0). Kvaliteta RNA dodatno je provjerena elektroforezom na 1% agaraznom gelu (1 g/100 mL 1x TAE pufera) 20 minuta na 80V. Po završetku elektroforeze gel je stavljen na 10 minuta u etidij bromid (Sigma Aldrich, SAD) i slikan na instrumentu UVITEC (UVItec Limited, UK).

#### *3.3.2. Reverzna transkripcija*

Izolirana RNA prevedena je u cDNA reverznom transkripcijom u konačnom volumenu 10  $\mu$ L. Na 1  $\mu$ g RNA dodan je 1  $\mu$ L 1 U/ $\mu$ L deoksiribonukleaze (DNAze) (Life technologies, SAD), 1  $\mu$ l 10x pufera za DNAzu (Life technologies, SAD) i qH<sub>2</sub>O do konačnog volumena. Nakon inkubacije 15 minuta pri sobnoj temperaturi dodan je 1  $\mu$ L 25 mM EDTA (pH 8.0; Invitrogen, SAD) kako bi se inhibirala DNAza te su uzorci inkubirani 10 minuta pri 65°C. Potom su uzorci stavljeni u led i u svaki je dodan 1  $\mu$ l 10x početnica oligo d(T)<sub>18</sub> i 1  $\mu$ l 100 mM dNTP-a, te su inkubirani 5 minuta pri 94°C. Zatim je dodano 4  $\mu$ l 5x First-Strand Buffera (Life technologies, SAD), 2  $\mu$ l 0,1 M DTTa (Life technologies, SAD) i 1  $\mu$ l 20 U/ $\mu$ L ribonukleaznog inhibitora (Life technologies, SAD). Nakon inkubiranja 2 minute pri 94°C, u uzorke je dodan po 1  $\mu$ L 200 U/ $\mu$ L reverzne transkriptaze, te je uslijedila reakcija reverzne transkripcije pri 42°C tijekom 90 minuta. Cjelokupni produkt reakcije (cDNA) razrijeđen je s

qH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena od 100 µL i spremljen pri -20°C. Tako dobivena cDNA korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom (PCR analiza).

### 3.3.3. Real-time PCR analiza

Real-time PCR (qPCR) proveden je na ABI 7300 Real Time PCR System-u (Applied Biosystems) korištenjem komparativne CT ( $\Delta\Delta C_T$ ) metode opisane u protokolu Taqman® Gene Expression Assay Protocol (Applied Biosystems) za određivanje razine ekspresije gena sirt-3, a prema uputama proizvođača. Reakcije su se odvijale u ukupnom volumenu od 20 µL korištenjem 10 µL reagensa TaqMan® Gene Expression Master Mix reagent (Applied Biosystems, USA), 50 ng cDNA kao kalupa, 1 µl 20x odgovarajućih početnica (**Tablica 1**), te qH<sub>2</sub>O do konačnog volumena. Uzorci su nanešeni u triplikatu. Relativna razina ekspresije gena izračunata je korištenjem  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metode.

**Tablica 1.** Početnice korištene za real-time PCR analizu

<b>Gen</b>	<b>ID</b>	<b>Veličina produkta (bp)</b>
<b>beta-aktin</b>	Hs99999903_m1	171
<b>sirt-3</b>	Hs00953477_m1	83
<b>vegf-a</b>	Hs00900058_m1	81
<b>sod2</b>	Hs01553554_m1	69
<b>mmp2</b>	Hs01548733_m1	84
<b>mt-nd1</b>	Hs02596873_s1	143
<b>esr-1</b>	Hs01046816_m1	65



### **3.4. Metode za određivanje ekspresije proteina**

#### **3.4.1. Izolacija proteina iz stanica**

Nakon tretmana hiperoksijom stanice su isprane hladnim sterilnim PBS-om, tripsinizirane te potom centrifugirane 5 minuta pri 300 g i 4°C. Dobiveni talog resuspendiran je u 50 µL RIPA pufera (Radioimmunoprecipitation Assay buffer) (TermoFisher Scientific, SAD) s inhibitorima proteaza (Roche, USA). Stanice su premještene u mikroeprovete i razbijene ultrazvukom pomoću ultrazvučne sonde veličine 1 mm (1 ciklus, 80 amplituda) (Labsonic® M, B. Braun Biotech International, Sartorius group, SAD). Nakon toga lizat stanica je centrifugiran 20 minuta pri 16000 g i 4°C, a iz dobivenog supernatanta izmjerena je koncentracija proteina BCA metodom (engl. *Bicinchoninic acid protein assay*).

#### **3.4.2. Određivanje koncentracije proteina BCA metodom**

Za određivanje proteina BCA metodom korištena je mikrotitarska pločica s 96 bunarića. U bunariće je nanoseno 25 µL odgovarajućeg standarda otopine albumina iz goveđeg seruma, 1 µL uzorka proteina razrijeđenog s 24 µL PBS-a i 25 µL PBS-a kao slijepe probe. U svaki bunarić dodano je 200 µL otopine za određivanje proteina (BCA Protein Assay Kit, TermoFisher Scientific, SAD) razrijeđenog u omjeru 1:50. Uzorci su inkubirani 30 minuta pri 37°C. Nakon inkubacije, apsorbancija je izmjerena pri valno duljini  $\lambda=570$  nm na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD). Na temelju podataka dobivenih za otopine proteina albumina različitih koncentracija izrađena je baždarna krivulja pomoću koje je određena koncentracija proteina u pojedinim uzorcima.

#### **3.4.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida**

Proteini su, ovisno o veličini, razdvojeni u 10% ili 12% denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Gel se sastoji od dva dijela puferirana pri različitom pH: 10% donji gel (pH 8.8) za razdvajanje (**Tablica 2**) i 4% gornji gel (pH 6.8) za sabijanje uzoraka (**Tablica 3**).

**Tablica 2.** Sastav smjese za donji gel

<b>Sastojak</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>4xTris HCl</b>	3,75
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7,5
<b>Akrilamid (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,00375
<b>APS (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,15
<b>TEMED (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,015

Elektroforeza je tekla pod naponom 100 V u 10% puferu za elektroforezu (30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5) dok proteini nisu došli do dna gela, što je određeno praćenjem standarda molekularne težine proteina Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BIO-RAD, SAD).

**Tablica 3.** Sastav smjese za gornji gel

<b>Sastojak</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>4xTris HCl</b>	1,25
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,25
<b>Akrilamid (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,5
<b>APS (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,025
<b>TEMED (Sigma Aldrich, USA)</b>	0,005

#### 3.4.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu

Nakon razdvajanja proteina denaturirajućom elektroforezom u gelu poliakrilamida, proteini su s gela prenešeni na odgovarajuću membranu. Korištena je PVDF membrana (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, BIO-RAD, USA), veličine pora 0,2 µm. Prijenos je tekao pri konstantnoj jakosti struje od 350 mA (90 minuta) uz pufer za prijenos (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5). Za prijenos proteina korišten je sustav Mini Trans-Blot Module (BIO-RAD, SAD).

#### 3.4.5. Analiza proteina metodom Western blot

Nakon prijena proteina membrana je uz lagano miješanje ispirana 10 minuta u PBS-u te je određena učinkovitost prijena i kontrola nanošenja proteina korištenjem boje Amido black 10B (Merck Millipore, USA). Membrana je inkubirana 30 sekundi u otopini za bojanje (0,1% (m/V) Amido black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O), odbojana u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) 2 puta po 30 minuta i isprana u ReH<sub>2</sub>O kako bi se uklonila octena kiselina. Zatim je membrana inkubirana 2 puta po 15 minuta u TN puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, dH<sub>2</sub>O). Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, membrana je inkubirana u otopini za blokiranje (5% mlijeko u prahu u TN puferu) 1 sat pri 37°C. Nakon toga je uslijedilo vezanje primarnog protutijela inkubacijom membrane u otopini odgovarajućeg primarnog protutijela pri 4°C preko noći (**Tablica 4**). Prije primjene sekundarnog protutijela membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u TNT puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton-X, dH<sub>2</sub>O). U otopini sekundarnog protutijela membrana je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje. Sekundarno protutijelo je porijeklom iz kunića, a konjugirano je s peroksidazom hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Nakon inkubacije membrane u otopini sekundarnog protutijela, membrana je isprana 2 puta po 15 minuta u TNT puferu. Za detekciju signala membrana je inkubirana tijekom 1 minute u luminiscentnom supstratu ECL (PerkinElmer, SAD, Pierce, SAD) pripremljenom miješanjem otopina A i B u omjeru 1:1. Nakon toga membrana je prekrivena prozirnom plastičnom folijom i signal reakcije kemiluminiscencije izmjeren je pomoću uređaja UVITEC (UVItec Limited, UK).

**Tablica 4.** Primarna i sekundarna protutijela korištena u Western blot analizi

<b>Protutijelo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Razrjeđenje (u otopini za blokiranje)</b>
<b>Monoklonsko anti-Sirt-3</b>	Cell Signaling Technology, USA	Zec	1:400
<b>Poliklonsko anti-LDH</b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	Zec	1:500
<b>Poliklonsko anti-SOD2</b>	Abcam, UK	Zec	1:1000
<b>Monoklonsko anti-ER<math>\alpha</math></b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	Miš	1:500
<b>Sekundarno anti-rabbit IgG</b>	Amersham Biosciences, UK	Magarac	1:2000
<b>Sekundarno anti-mouse IgG</b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	Govedo	1:2000

### **3.5. Metoda za određivanje vijabilnosti stanica – MTT test**

Tetrazolijeva sol MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid] se koristi za ispitivanje proliferacije i citotoksičnosti, tj. vijabilosti stanica <sup>25</sup>. Metaboličkom redukcijom MTT-a (blijedo-žuti supstrat) nastaje formazan (intenzivno tamno-plavo obojeni krajnji produkt). Test je proveden u mikrotitarskoj pločici s 96 bunarića u koje je dan prije tretmana nasadeno 7000 stanica. Nakon tretmana hiperoksijom, uklonjena je hranjiva podloga sa stanica, dodano je 40  $\mu$ l 1x MTT-a te su stanice inkubirane 4 sata u inkubatoru. Nakon inkubacije u svaki bunarić je dodano po 160  $\mu$ L DMSO (dimetilsulfoksid) i stanice su inkubirane 20 minuta uz lagano miješanje. Apsorbancija je izmjerena pri valnoj duljini  $\lambda=570$  nm na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD).

### ***3.6. Metoda za određivanje preživljenja stanica – CFA (test formiranja kolonija)***

Metoda bojenja kolonija stanica bojom Giemsa koristi se za određivanje preživljenja stanica nakon tretmana citostatikom ili zračenjem. Obzirom da se ovaj test temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da stvori koloniju, isti je pogodan za određivanje stupnja malignosti stanica<sup>26</sup>. U Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica od 6 cm nasadeno je po 2000 stanica u 5 mL DMEM-FCS, stanice su inkubirane preko noći te su idući dan stavljene u hiperoksiju. Nakon tretmana svim stanicama (normoksija/hiperoksija) promijenjena je hranjiva podloga te su Petrijeve zdjelice inkubirane 14 dana dok nisu izrasle golim okom vidljive kolonije stanica. Kolonije stanica isprane su 1x PBS-om, fiksirane 10 minuta u 100%-tnom metanolu i sušene 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim su bojane Giemsa bojom tijekom 30 minuta te isprane vodom i sušene. Kolonije su izbrojane i preživljenje stanica je određeno u odnosu na kontrolni uzorak u kojem stanice nisu bile izložene hiperoksiji.

### ***3.7. Metoda za određivanje karbonilacije proteina***

U Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica od 6 cm nasadeno je po 750 000 stanica u 5 mL DMEM-FCS hranjive podloge, stanice su inkubirane preko noći te su idući dan stavljene u hiperoksiju. Nakon tretmana stanice su tripsinizirane, isprane 1x PBS-om i centrifugirane pri 1400 g 5 minuta. Talog je resuspendiran u 100 µL PBS-a u kojem se nalazi inhibitor proteaza. Stanice su razbijene ultrazvukom (4x15 sekundi), te je tako dobiveni stanični lizat centrifugiran pri 10000 g 10 minuta. Supernatant je odvojen, na njega dodana „smola“ za uklanjanje lipida (Sigma Aldrich, SAD) i nakon toga je inkubiran 1 sat. Uzorci su zatim centrifugirani 20 minuta pri 15700 g, te je supernatant odvojen i na njega dodano 10% streptomycin sulfata (Sigma Aldrich, SAD). Uslijedila je inkubacija uzoraka 15 minuta na sobnoj temperaturi, te centrifugiranje 10 minuta na 6000 g. Supernatant je odvojen i alikvot od 10 µL iskorišten za određivanje količine proteina BCA metodom. Potom je na Maxisorb well (Sigma Aldrich, SAD) mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanesen 1 µg proteina po uzorku u tehničkom duplikatu. Na pločicu su nanesena i dva nasumična uzorka za oksidaciju željezom kao kontrola metode. Proteini su inkubirani preko noći pri 4°C kako bi se adsorbirali na pločicu. Sljedeći dan su uzorci za oksidaciju željezom isprani puferom za ispiranje I (**Tablica 5**) i dodano je 150

μL oksidacijske otopine (**Tablica 5**), te inkubirano 1 sat. Nakon inkubacije svi uzorci su isprani puferom za ispiranje I, dodano je 200 μL DNPH otopine (**Tablica 5**) te su inkubirani 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Uzorci su potom isprani puferom za ispiranje II (**Tablica 5**) i I, te je dodano 250 μL pufera za blokiranje (**Tablica 5**) uz inkubaciju od 90 minuta na termomikseru pri 25°C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije slijedilo je ispiranje puferom za ispiranje III (**Tablica 4**) te je dodano 100 μL primarnog protutijela (Rabbit anti-DNP primary antibody, D9656, Sigma Aldrich, SAD). Primarno protutijelo inkubirano je 120 minuta na termomikseru pri 25°C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije uzorci su isprani puferom za ispiranje III te je dodano 100 μL HRP-obilježenog sekundarnog protutijela usmjerenog protiv zečjih imunoglobulina (Goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP, Jackson ImmunoResearch, SAD) uz inkubaciju od 1 sat na termomikseru pri 25°C. Uzorci su isprani puferom za ispiranje III te je na uzorke dodano 100 μL TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine) (ThermoFisher Scientific, SAD) uz inkubaciju tijekom 10 minuta, nakon čega je dodano 100 μL stop otopine (0,3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Apsorbancija je izmjerena na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD), na valnoj duljini λ=450nm.

**Tablica 4.** Sastav otopina za Elisu

Otopina	Sastav
<b>Pufer za ispiranje I</b>	1x PBS
<b>Pufer za ispiranje II</b>	1x PBS + 96% EtOH (50:50)
<b>Pufer za ispiranje III</b>	1x PBS + 0.1% Tween
<b>Pufer za blokiranje</b>	0.5 g mlijeka u 10 ml pufera za ispiranje III
<b>Oksidacijska otopina</b>	25 mM Hepes + 25 mM C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> + 0.1 mM FeCl <sub>3</sub>
<b>DNPH otopina</b>	0.02 g DNPH u 1 ml TCA

### **3.8. Metoda za određivanje lipidne peroksidacije**

U Petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica od 6 cm nasadeno je po 750 000 stanica u 5 mL DMEM-FCS hranjive podloge, stanice su inkubirane preko noći te su idući dan stavljene u hiperoksiju. Nakon tretmana stanice su isprane 1x PBS-om, tripsinizirane i nakon toga centrifugirane 4 minute pri 300 g. Talog je ispran 1x PBS-om, ponovno centrifugiran i resuspendiran u 100  $\mu$ L 1x PBS-a. Alikvot od 10  $\mu$ L iskorišten je za određivanje količine proteina BCA metodom, a alikvot od 40  $\mu$ L u duplikatu je razbijen ultrazvukom (3x10 sekundi). Na 40  $\mu$ L uzorka dodano je po 40  $\mu$ L 2% SDS (Sigma Aldrich, SAD), uzorci su vorteksirani i inkubirani 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Po 100  $\mu$ L TBA dodano je na uzorke uz lagano vorteksiranje nakon čega slijedi inkubacija 1 sat na termomikseru (95°C). Uzorci su potom ohlađeni u ledu i centrifugirani 15 minuta pri 800 g. Nakon centrifugiranja uzorci su zagrijani par minuta pri 37°C kako bi se spriječila kristalizacija uzoraka. Po 50  $\mu$ L uzorka nanoseno je na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića u tehničkom duplikatu te je izmjerena apsorbanacija na ELISA čitaču (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group, SAD), na valnoj duljini  $\lambda=532$  nm.

### **3.9. FACS analiza – mjerenje mitohondrijskog membranskog potencijala, mitohondrijske mase i unutarstaničnih RKV-a**

Za određivanje mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi$ ) korištena je cijanin kationska boja DiOC6(3) (3,3-diheksiloksakarbacijanin jodid, Enzo Life Science, SAD) koja se akumulira u matriksu mitohondrija i ovisna je o  $\Delta\Psi$ <sup>27</sup>. Za mjerenje mase mitohondrija korištena je boja NAO (10-N-nonyl acridine orange, Invitrogen, SAD) koja se specifično veže na kardiolipin, fosfolipid prisutan samo u mitohondrijskoj unutarnjoj membrani<sup>27</sup>. Za mjerenje unutarstaničnih RKV-a korištena je boja H2DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, Sigma, SAD) koja se prilikom oksidacije pretvara u fluorescentni DCF (2',7'-dichlorofluorescein)<sup>28</sup>. Stanice u suspenziji (300 000 stanica/uzorak) su inkubirane 30 minuta u mraku pri 37°C s odgovarajućom bojom u PBS-u (40 nM DiOC6(3), 50 nM NAO, 5  $\mu$ M H2DCFDA). Nakon inkubacije stanice su isprane 1x PBS-om i resuspendirane u 200  $\mu$ L PBS-a, te su analizirane protočnim citometrom (FACSCalibur flow cytometer, BD Biosciences, SAD) u FL1 kanalu. Za isključivanje mrtvih stanica korišten je propidij jodid (10  $\mu$ M) koji je dodan u suspenziju stanica neposredno prije analize i praćen u FL3 kanalu. Kao negativna

kontrola korištene su stanice tretirane s 1x PBS-om. Prilikom analize sakupljeno je minimalno 10000 događaja. Sakupljeni podaci analizirani su u programu FCS Express version 3.

### ***3.10. Imunofluorescencija i konfoklana mikroskopija***

#### *3.10.1. Imunofluorescencija*

U svaki od 24 bunarića pločice za uzgoj kulture stanica stavljeno je stakalce na koje je dodano 300  $\mu$ L seruma. Nakon 2 sata nasadeno je 7000 stanica po stakalcu te su inkubirane 72 sata kako bi se prihvatile na stakalca, a zatim 44 sata u uvjetima hiperoksije. Nakon tretmana stanice su isprane 1x PBS-om i na njih je dodan 200 nM MitoTracker Deep red (ThermoFisher Scientific, SAD) pripremljen u hranjivoj podlozi DMEM-FCS. Stanice su inkubirane 45 minuta u inkubatoru u mraku. Nakon inkubacije stanice su isprane 2 puta 1x PBS-om i fiksirane 2%-tnim PFA u PBS-u 15 minuta u inkubatoru. Uslijedila je permeabilizacija stanica s 0.1% tritonom u PBS-u tijekom 10 minuta u inkubatoru u mraku. Stanice su isprane 3 puta s 1x PBS-om i inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi s 1% BSA u PBS-u. Zatim je na stanice dodano primarno protutijelo anti-Sirt-3 (razrjeđenje 1:100, Santa Cruz Biotechnology, SAD) i inkubirano 3 sata u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon ispiranja 3 puta s 1x PBS-om stavljeno je sekundarno protutijelo FITC GaM (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Proteintech, SAD) i inkubirano 1 sat u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije stanice su isprane 1x PBS-om i na njih je dodano 100  $\mu$ L DAPI boje (4,6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Aldrich, SAD) za bojanje jezgara, te su stanice inkubirane 2 minute na sobnoj temperaturi. Stanice su potom isprane 1x PBS-om i pohranjene u mediju za uklapanje pri 4°C do analize na konfokalnom mikroskopu.

#### *3.10.2. Konfokalna mikroskopija*

Uzorci dobiveni metodom imunofluorescencije analizirani su pomoću konfokalnog mikroskopa tj. sekvencijalnim skeniranjem na Leica TCS SP8 X laser skenirajućem mikroskopu, opremljenom s HC PL APO CS2 63 $\times$ /1.40 imerzijskim objektivom i laserom bijele svjetlosti (Leica Microsystems). Valne duljine ekscitacije i emisije korištenih za detekciju iznose: 405 nm i 420-477 nm za DAPI, 490 nm i 500-600 nm za FITC, 644 nm i 667-780 nm za Deep red.



### **3.11. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka napravljena je u programu R v2.15.3 (CRAN, <http://cran.r-project.org>) i RStudio for Windows, v 0.97 (<http://www.rstudio.com/>) programima. Rezultati svih metoda obrađeni su korištenjem parametarskih ili neparametarskih metoda ovisno o broju uzoraka, njihovoj raspodjeli i veličini. Prije svih obrada, uzorci su ispitani za normalitet raspodjele Shapiro-Wilk testom. U slučaju normalne raspodjele uzoraka, parametarski testovi napravljeni su pomoću jednosmjerne ANOVA analize uz post-hoc Tukey test za međusobno uspoređivanje više od dvije skupine uzoraka. Ukoliko podaci nisu ulazili u normalnu raspodjelu, provedene su neparametarske analize: neparametrijska Kruskal-Wallis ANOVA uz Mann-Whitney U test za određivanje razlike između dvije grupe. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5% ( $p < 0.05$ ).

## **4. REZULTATI**

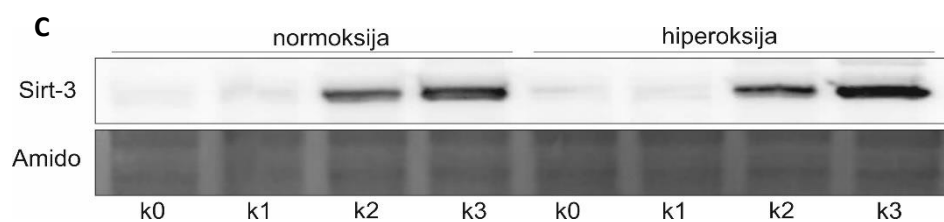
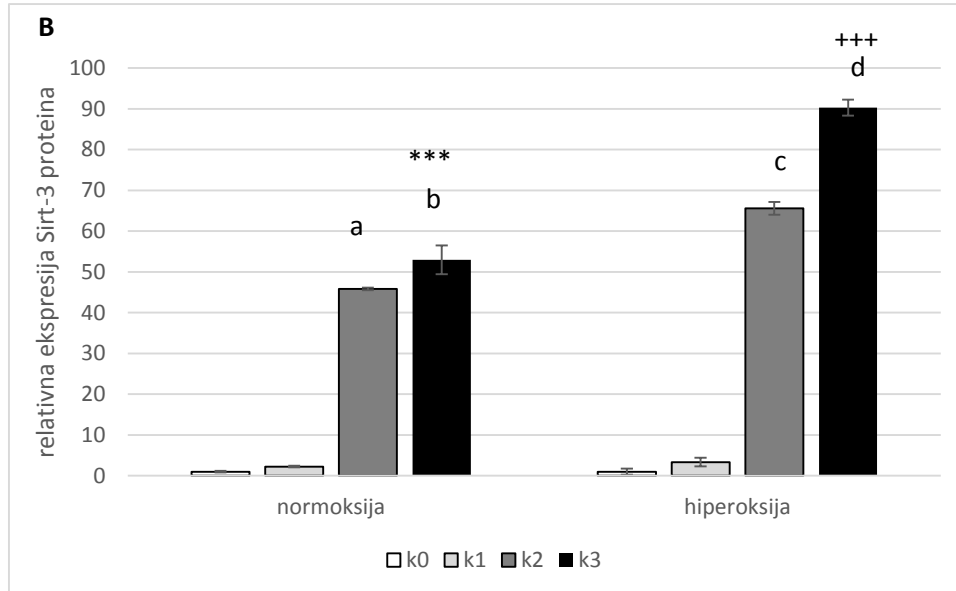
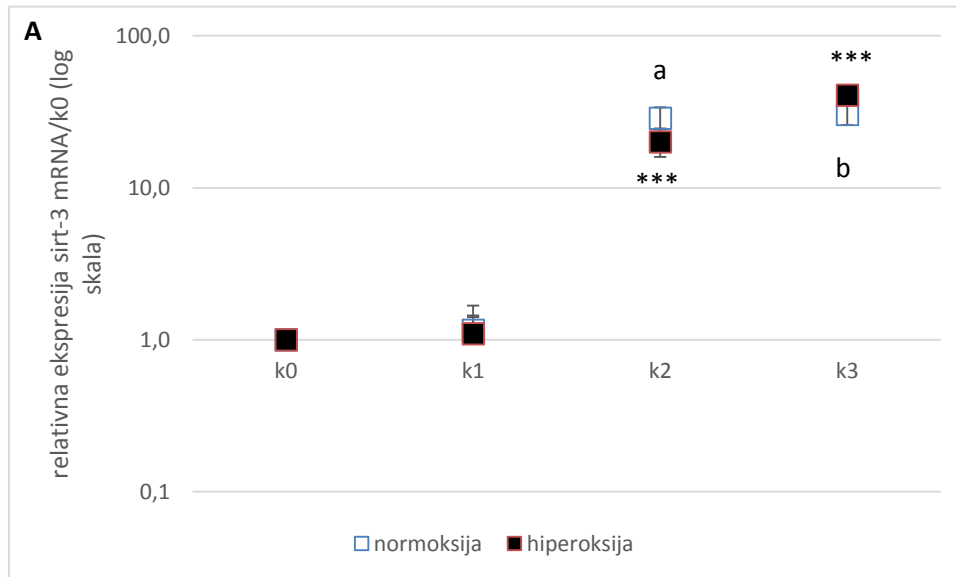
#### 4.1. Karakterizacija klonova

Kako bi se utvrdio učinak stabilne ekspresije proteina Sirt-3 na karakteristike MCF-7 stanica u uvjetima normoksije i hiperoksije, u ovom radu korišten je plazmid pcDNA3.1.+ Flag-Sirt-3 s Flag-označenim Sirt-3 (6618 pb) izoliran iz bakterija, koji je zatim transfekcijom unesen u MCF-7 stanice. Kao kontrola korištene su MCF-7 stanice bez ugrađenog plazmida, za koje se prethodno utvrdilo da imaju vrlo slabu endogenu gensku i proteinsku ekspresiju Sirt-3. Ova je skupina stanica definirana kao klon **k<sub>0</sub>**. Kao negativna kontrola za plazmid Flag-Sirt-3, korištene su MCF-7 stanice s ugrađenim praznim plazmidom (pcDNA3.1.+ vektor) koje su također imale vrlo slabu ekspresiju Sirt-3. Ova je skupina stanica definirana kao klon **k<sub>1</sub>**. Zatim su kreirana dva različita klona MCF-7 stanica koji su definirani obzirom na različitu razinu ekspresije Sirt-3 proteina: **k<sub>2</sub>** klonovi su MCF-7 stanice s nisko eksprimiranom razinom Sirt-3 proteina, dok su **k<sub>3</sub>** klonovi MCF-7 stanice s visoko eksprimiranom razinom Sirt-3 proteina. Kako bi se potvrdilo da odabrani klonovi imaju različitu razinu ekspresije, korišten je RT-qPCR i western blot analiza.

#### 4.2. Utjecaj hiperoksije na ekspresiju Sirt-3

Rezultati RT-qPCR analize pokazali su u normoksiji značajno povećanu ekspresiju gena sirt-3 u klonovima **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** u odnosu na kontrole **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>** (jednosmjerna ANOVA:  $F=210.5$ ,  $p<0.001$ ). Značajni porast od 28.6 puta zamijećen je u klonu **k<sub>2</sub>** i 30.4 puta u klonu **k<sub>3</sub>** (post-hoc Tukey test:  $^{a,b}p<0.001$ ), u odnosu na kontrolu **k<sub>0</sub>**, koja je definirana kao jedan. Klon **k<sub>1</sub>** imao je istu razinu ekspresije mRNA u odnosu na klon **k<sub>0</sub>** (1.5 puta u odnosu na **k<sub>0</sub>**,  $p=n.s.$ ). Isto tako, u hiperoksiji su klonovi **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** imali značajno višu razinu ekspresije mRNA obzirom na kontrolu (jednosmjerna ANOVA:  $F=378.73$ ,  $p<0.001$ ) gdje je klon **k<sub>2</sub>** imao porast od 20 puta, a klon **k<sub>3</sub>** porast od 40 puta u odnosu na kontrolne klonove **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>** (post-hoc Tukey test:  $^{c,d}p<0.001$ , **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** vs. **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>**) (**Slika 1A**). Western blot analiza pokazala je da količina proteina u klonovima **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** prati porast količine mRNA u istim klonovima, u odnosu na klonove **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>** (jednosmjerna ANOVA,  $F=125.75$ ,  $p<0.001$ ). Klonovi **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** su u normoksičnim uvjetima pokazali značajan porast ekspresije proteina Sirt-3 u odnosu na kontrolne klonove **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>** (post-hoc Tukey test:  $^{a,b}p<0.001$ ). U hiperoksiji je ekspresija proteina bila još izraženija u klonovima **k<sub>2</sub>** i **k<sub>3</sub>** u odnosu na kontrolne klonove **k<sub>0</sub>** i **k<sub>1</sub>** (jednosmjerna ANOVA,  $F=2043.7$ ,  $p<0.001$ , post-

hoc Tukey test: <sup>c,d</sup>p<0.001). Osim toga, klon k<sub>3</sub> je pokazao značajno veću ekspresiju proteina u odnosu na klon k<sub>2</sub> u uvjetima normoksije (Studentov t-test: <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, k<sub>2</sub> vs. k<sub>3</sub>) i hiperoksije (Studentov t-test: <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, k<sub>2</sub> vs. k<sub>3</sub>). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Pokusi su napravljeni najmanje tri puta, a na slici je prikazan reprezentativan grafički prikaz (**Slika 1B**) kao i reprezentativan prikaz membrane (**Slika 1C**).

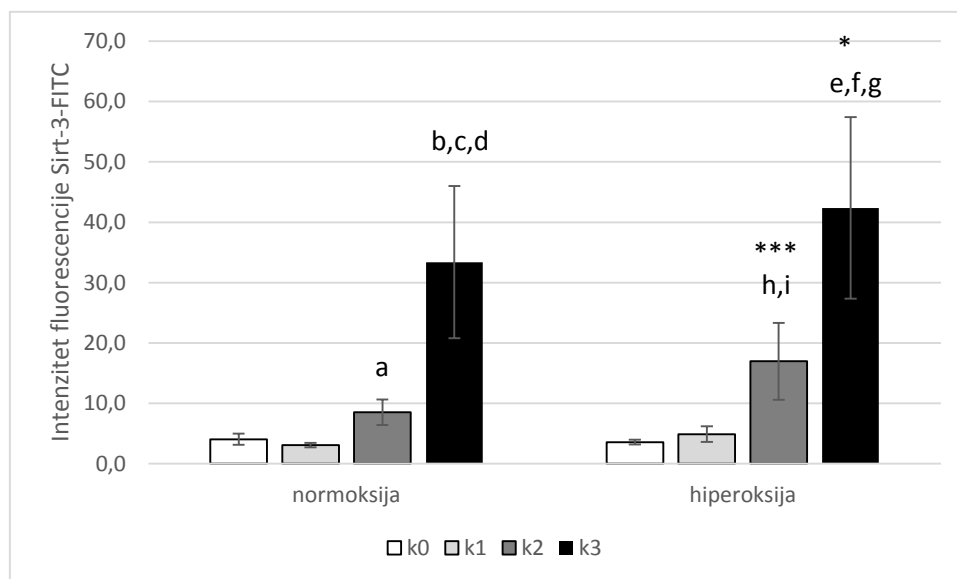


**Slika 1. Karakterizacija klonova stanica MCF-7 i ekspresija Sirt-3 u normoksiji i hiperoksiji.** RT-qPCR analiza genske ekspresije sirt-3 u klonovima  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$ . Normoksija:  $^{a,b}p < 0.001$ ,  $k_2$  i  $k_3$  vs.  $k_0$  i  $k_1$ . Hiperoksija:  $^{c,d}p < 0.001$ ,  $k_2$  i  $k_3$  vs.  $k_0$  i  $k_1$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost promjene ekspresije  $\pm$  S.E. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati (**1A**). Western blot analiza proteinske ekspresije klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija:  $^{a,b}p < 0.001$ ,  $k_3$  i  $k_2$  vs.  $k_0$  i  $k_1$ . Hiperoksija:  $^{c,d}p < 0.001$ ,  $k_3$  i  $k_2$  vs.  $k_0$  i  $k_1$ . Studentov t-test:  $^{***}p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$  normoksija;  $^{***}p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$  hiperoksija (**1B**). Reprezentativni prikaz gela western blot analize ekspresije Sirt-3 proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala (**1C**).

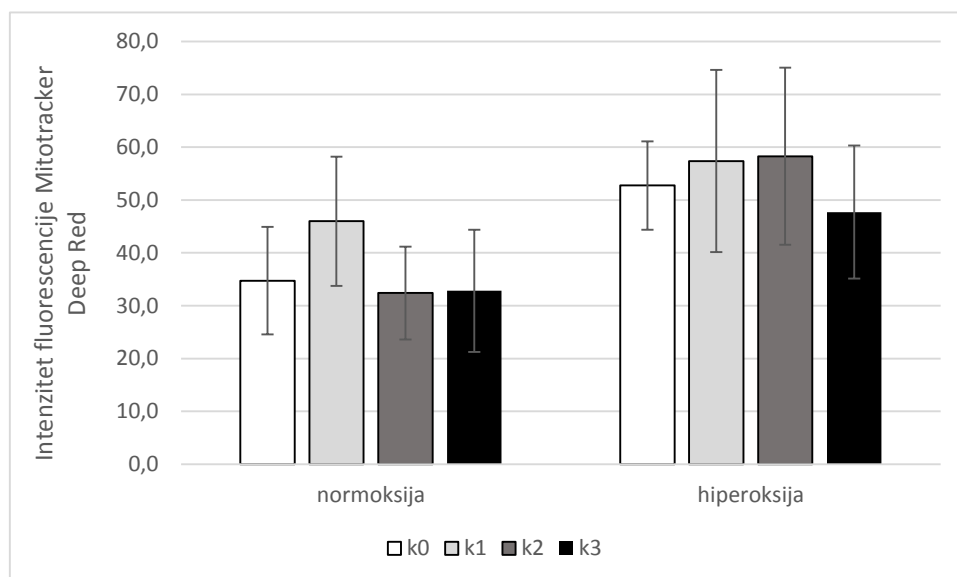
#### **4.3. Konfokalna analiza stanične lokalizacije i inteziteta fluorescencijskog signala za Sirt-3 i mitohondrije unutar MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji**

Lokalizacija Sirt-3 unutar stanice kao i inteziteti fluorescencijskih signala analizirani su metodom imunofluorescence uz korištenje konfokalnog mikroskopa. U normoksiji smo potvrdili povećanje inteziteta fluorescencijskog signala za Sirt-3 kod klonova  $k_2$  i  $k_3$  u odnosu na kontrole  $k_0$  i  $k_1$ , pri čemu klon  $k_3$  pokazuje najveći porast u intezitetu signala (jednosmjerna ANOVA:  $F=111.75$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Tukey:  $^ap < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ ;  $^{b,c,d}p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_3$ ). U hiperoksiji je intezitet signala bio povećan kod klonova  $k_2$  i  $k_3$  u odnosu na kontrole  $k_0$  i  $k_1$ , s time da klon  $k_3$  ima najviši intezitet signala (jednosmjerna ANOVA;  $F=122.33$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Tukey:  $^{h,i}p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ ,  $k_0$ ;  $^{e,f,g}p < 0.001$ ,  $k_3$  vs.  $k_2$ ,  $k_1$ ,  $k_0$ ). Isto tako, analiza je potvrdila da je u hiperoksiji došlo do povećanja inteziteta signala za Sirt-3 kod klonova  $k_2$  i  $k_3$  u odnosu na pripadajuće grupe u normoksiji (Studentov t-test:  $k_2$ ,  $p < 0.001$ ;  $k_3$   $p < 0.05$  normoksija vs. hiperoksija) (**Slika 2A**). Analizom inteziteta fluorescencijskog signala smo zatim utvrdili utjecaj Sirt-3 i tretmana hiperoksije na promjene u mitohondrijima pomoću boje Mitotracker Deep red, koja specifično boji mitohondrije (**Slika 2B**). Rezultati pokazuju da nije bilo promjena u intezitetu signala za mitohondrije kod klonova  $k_2$  i  $k_3$  u odnosu na kontrolne klonove u normoksiji. U hiperoksiji je taj intezitet nešto veći, premda razlika nije značajna zbog velikih varijacija između uzoraka, iako postoji trend u smanjenju signala za mitohondrije kod klona  $k_3$  u odnosu na ostale klonove u hiperoksiji. Također nije dokazana povezanost između Sirt-3 i mitohondrija u normoksiji (Pearsonov koeficijent korelacije:  $\rho=0.105$ ,  $p=0.303$ ) kao ni u hiperoksiji (Pearsonov koeficijent korelacije:  $\rho=-0.106$ ,  $p=0.27$ ). Konfokalna analiza je također pokazala da se signal za Sirt-3 i signal za mitohondrije preklapa kod svih klonova,

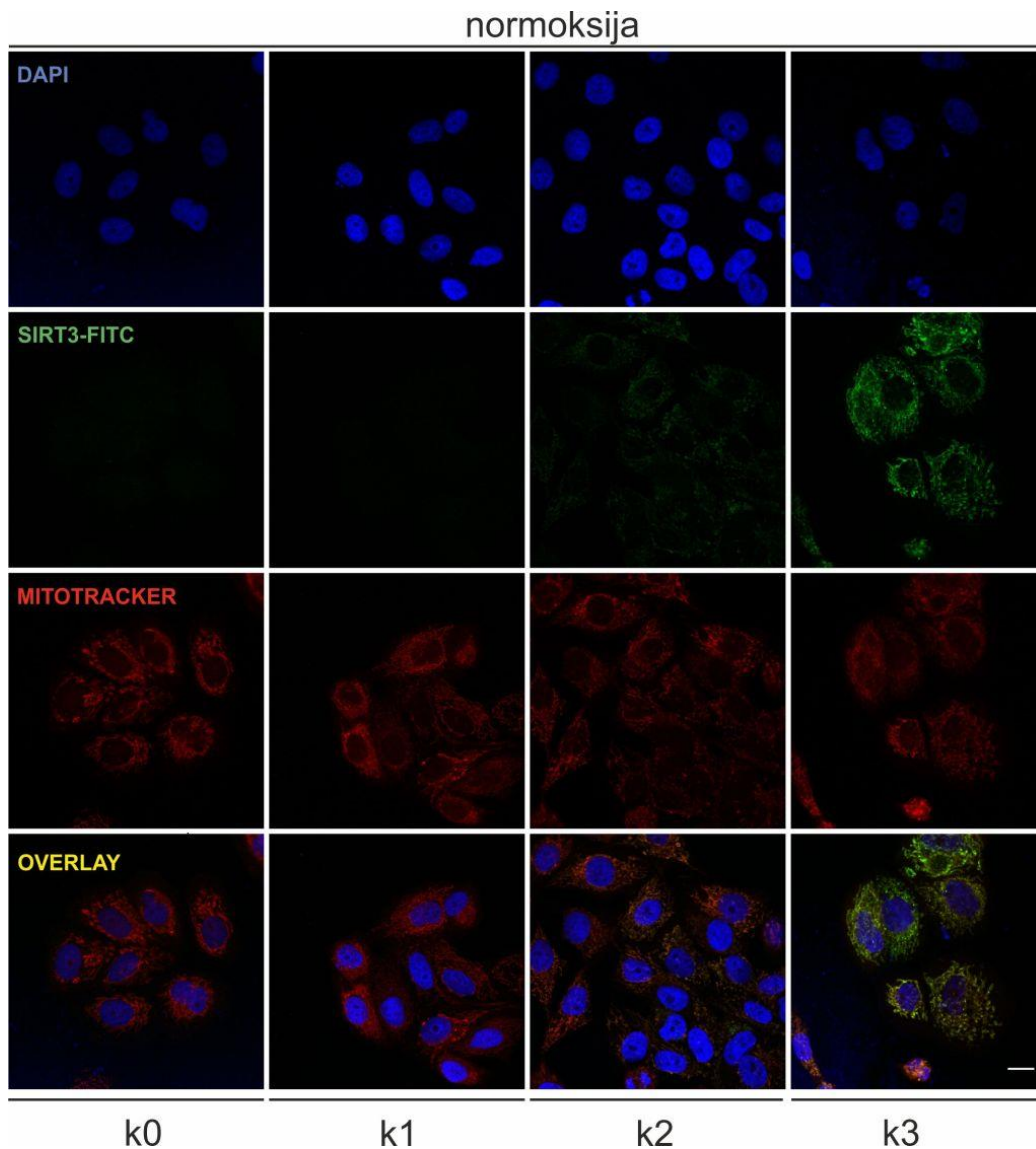
neovisno o tretmanu, što pokazuje da je Sirt-3 unutar stanice lokaliziran u mitohondrijima (Slika 2C, 2D).



**Slika 2A. Grafički prikaz intenziteta signala imunofluorescencije mjereno konfokalnom mikroskopijom za Sirt-3 u normoksiji i hiperoksiji.** Lokalizacija Sirt-3 unutar stanice određena je metodom imunofluorescencije kod klonova k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija: <sup>a</sup>p<0.05, k<sub>2</sub> vs. k<sub>1</sub>; <sup>b,c,d</sup>p<0.001, k<sub>2</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>3</sub>. Hiperoksija: <sup>h,i</sup>p<0.001, k<sub>2</sub> vs. k<sub>1</sub>, k<sub>0</sub>; <sup>e,f,g</sup>p<0.001, k<sub>3</sub> vs. k<sub>2</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>0</sub>. Studentov t-test: k<sub>2</sub>, p<0.001; k<sub>3</sub>, p<0.05 normoksija vs. hiperoksija. Pokusi su napravljeni najmanje tri puta, a na slici je prikazan reprezentativan rezultat.

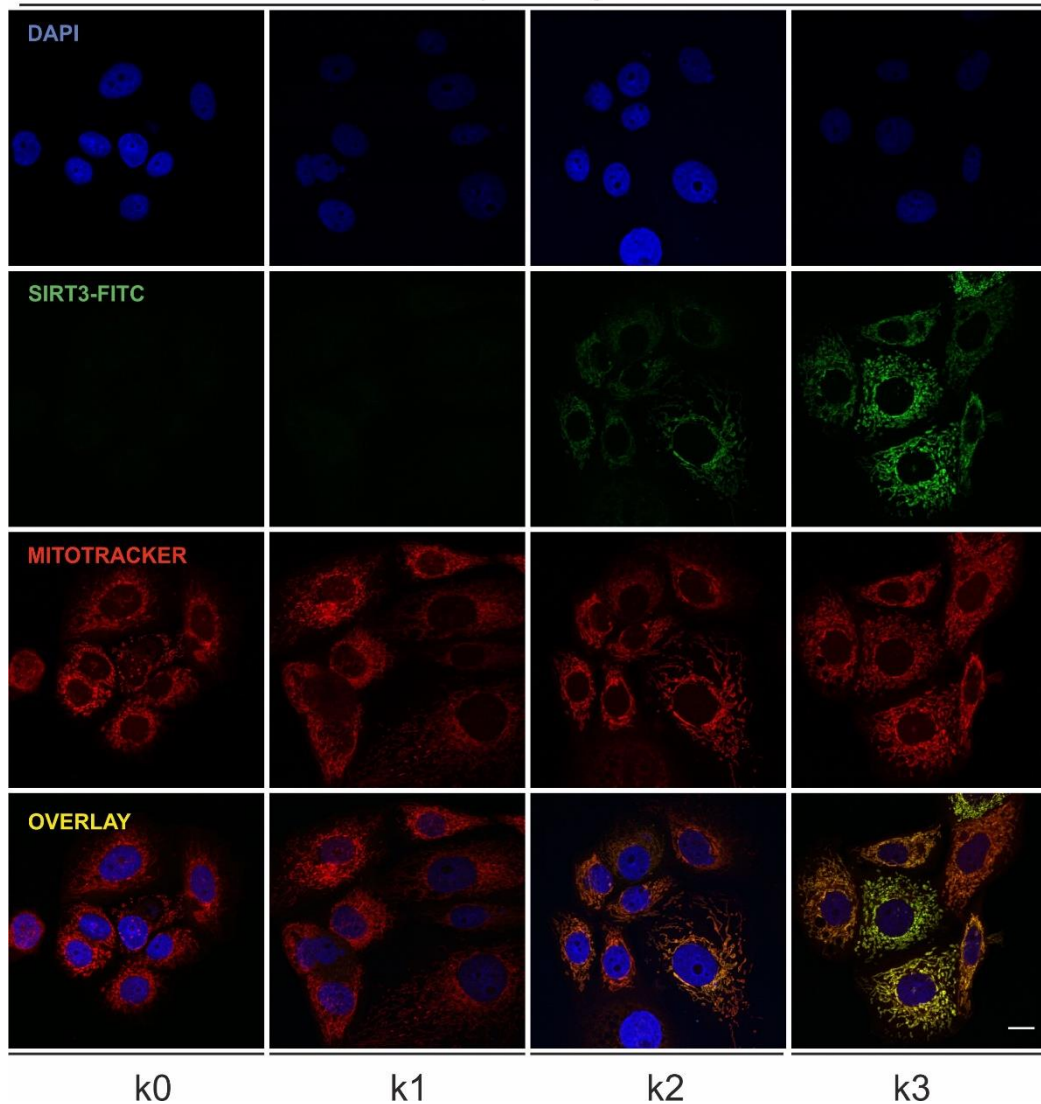


**Slika 2B. Grafički prikaz inteziteta signala imunofluorescencije mjerene konfokalnom mikroskopijom.** Lokalizacija mitohondrija unutar stanice određena je imunofluorescencijskom analizom kod klonova k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji i hiperoksiji bojom Mitotracker Deep red koja specifično boji mitohondrije.



**Slika 2C. Imunofluorescencijska analiza stanične lokalizacije Sirt-3 u klonovima k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji.** Sirt-3 je detektiran uz pomoć protutitijela vezanog na FITC (Sirt-3-FITC, zelena boja). Lokalizacija mitohondrija je detektirana bojom Mitotracker Deep red (MITOTRACKER, crvena boja). Na preklopljenim slikama (OVERLAY) vidi se potpuno preklapanje signala za Sirt-3 (zeleno) s mitohondrijskim signalom (crveno) u klonovima k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub>. Jezgre su obojene u plavo uz pomoć boje DAPI. Mjerilo iznosi 15 μm.

## hiperoksija

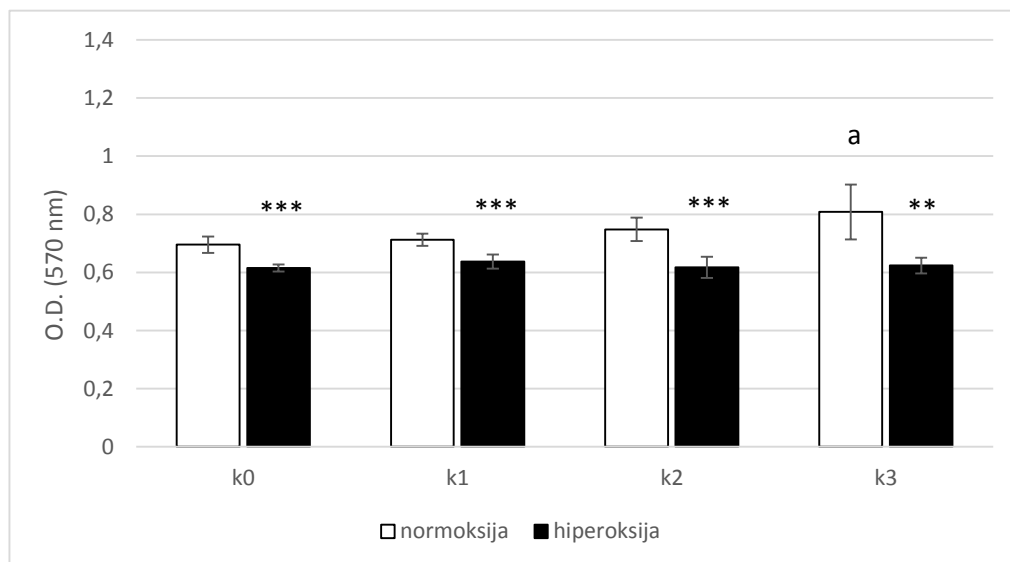


**Slika 2D. Imunofluorescencijska analiza stanične lokalizacije Sirt-3 u klonovima k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u hiperoksiji.** Sirt-3 je detektiran uz pomoć protutijela vezanog na FITC (SIRT3-FITC, zelena boja). Lokalizacija mitohondrija je detektirana bojom Mitotracker Deep red (MITOTRACKER, crvena boja). Na preklopljenim slikama (OVERLAY) vidi se potpuno preklapanje signala za Sirt-3 (zeleno) s mitohondrijskim signalom (crveno) u klonovima k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub>. Jezgre su obojene u plavo uz pomoć boje DAPI. Mjerilo iznosi 15  $\mu$ m.



#### 4.4. Utjecaj Sirt-3 na vijabilnost MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji

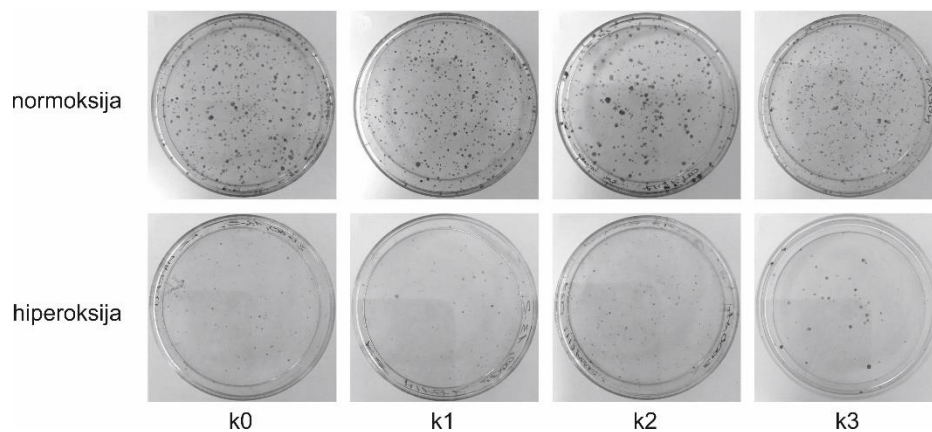
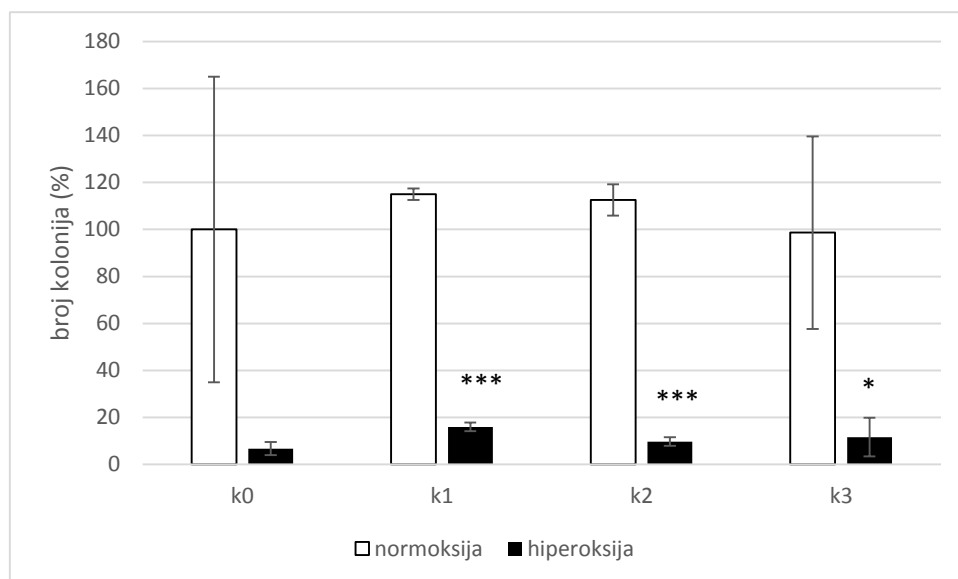
Kako bismo odredili utjecaj ekspresije Sirt-3 na vijabilnost stanica u normoksiji i hiperoksiji, proveli smo MTT test na klonovima  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u uvjetima normoksije i hiperoksije. Rezultati MTT testa pokazali su da klonovi u normoksiji pokazuju trend povećanja metaboličke aktivnosti ovisno o ekspresiji Sirt-3, pri čemu klon  $k_3$  ima najveću metaboličku aktivnost, u odnosu na kontrole (jednosmjerna ANOVA:  $F=3.48$ ,  $p<0.05$ ; post-hoc Tukey test:  $^a p<0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ), dok se metabolička aktivnost između klonova u hiperoksiji ne razlikuje. Osim toga, uočen je manji, ali značajan pad u metaboličkoj aktivnosti klonova u hiperoksiji s obzirom na odgovarajuće klonove u normoksiji za 10%, neovisno o ekspresiji Sirt-3 (Studentov t-test:  $***p<0.001$ ;  $**p<0.01$ , normoksija vs. hiperoksija) (Slika 3).



**Slika 3. Određivanje metaboličke aktivnosti stanica MTT testom.** Metabolička aktivnost  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  klonova u uvjetima normoksije i hiperoksije. Normoksija:  $^a p<0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ . Studentov t-test:  $***p<0.001$ ;  $**p<0.01$ , normoksija vs. hiperoksija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati.

#### 4.5. Utjecaj Sirt-3 na sposobnost preživljenja MCF-7 stanične linije u normoksiji i hiperoksiji (test formiranja kolonija)

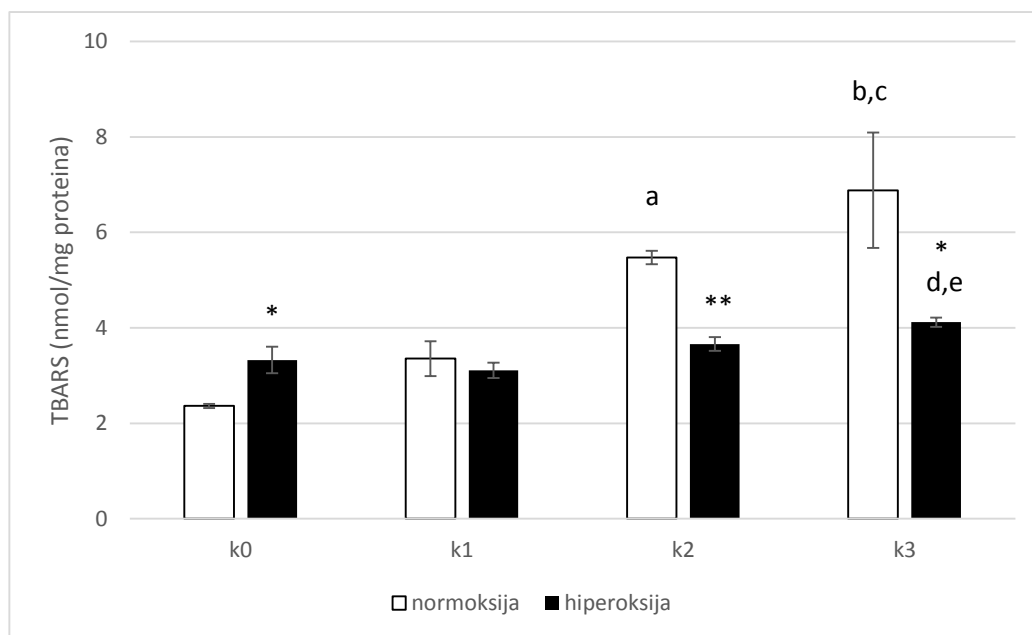
Test formiranja kolonija (engl. *colony formation assay*) koristio se kako bismo odredili utjecaj ekspresije Sirt-3 na sposobnost preživljenja klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u normoksiji i hiperoksiji. Rezultati su pokazali da u normoksiji ekspresija Sirt-3 nije imala učinka na sposobnost formiranja kolonija. Hiperoksija je drastično smanjila sposobnost stvaranja kolonija u odnosu na normoksične uvjete, i to neovisno o prisutnosti Sirt-3 (90% smanjenja u usporedbi s pripadajućim klonovima u normoksiji) (Studentov t-test:  $***p < 0.001$ ,  $k_1$  i  $k_2$  normoksija vs. hiperoksija;  $*p < 0.05$ ,  $k_3$  normoksija vs. hiperoksija). Premda je klon  $k_3$  pokazao gotovo dvostruko veći postotak proliferacije u odnosu na kontrolni klon  $k_0$  u hiperoksiji, zbog velike varijabilnosti klonova razlika nije statistički značajna. Ovi rezultati upućuju na zaključak da hiperoksija ima jaki inhibicijski učinak na sposobnost formiranja kolonija, bez obzira na ekspresiju Sirt-3 (**Slika 4**).



**Slika 4. Utjecaj ekspresije Sirt-3 na sposobnost preživljenja k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> klonova u uvjetima normoksije i hiperoksije.** Studentov t-test: \*\*\*k<sub>1</sub> (p<0.001), \*\*\*k<sub>2</sub> (p<0.001) i \*k<sub>3</sub> (p<0.05) normoksija vs. hiperoksija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati.

#### ***4.6. Utjecaj Sirt-3 na lipidnu peroksidaciju (LPO) u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji***

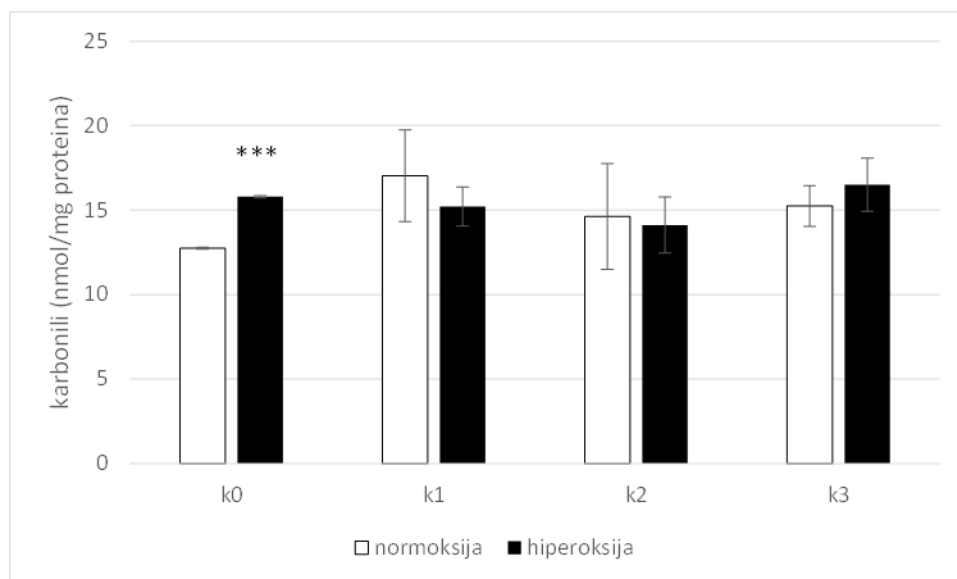
Metoda lipidne peroksidacije (LPO) korištena je u ovom radu kako bi se odredilo oksidacijsko oštećenje membrane na klonovima k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u uvjetima normoksije i hiperoksije. Rezultati pokazuju povećanje lipidne peroksidacije u normoksiji kod klonova k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u odnosu na kontrole k<sub>0</sub> i k<sub>1</sub>, pri čemu klon k<sub>3</sub> pokazuje najveće povećanje oksidacijskog oštećenja lipida u odnosu na kontrolu k<sub>1</sub> (jednosmjerna ANOVA: F=20.611, p<0.01; post-hoc Tukey test: <sup>a</sup>p<0.05, k<sub>2</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>b</sup>p<0.01, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>c</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>1</sub>). U hiperoksiji LPO uglavnom nema promjene između klonova, osim klona k<sub>3</sub>, koji pokazuje značajno povećanje u odnosu na kontrole k<sub>0</sub> i k<sub>1</sub> (jednosmjerna ANOVA: F=11.67, p<0.05; post-hoc Tukey test: <sup>d</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>e</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>1</sub>). Klon k<sub>1</sub> nije pokazao razliku u LPO obzirom na hiperoksiju, dok su klonovi k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji imali značajno povećano oksidacijsko oštećenje lipida u odnosu na pripadajuće klonove u hiperoksiji (Studentov t-test: k<sub>0</sub> (\*p<0.05), k<sub>2</sub> (\*\*p<0.01); k<sub>3</sub> (\*p<0.05) normoksija vs. hiperoksija), za razliku od klona k<sub>0</sub> koji ima značajno veću LPO u hiperoksiji u odnosu na normoksiju (Studentov t-test: p<0.05) (**Slika 5**).



**Slika 5. Određivanje razine lipidne peroksidacije klonova stanica MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p < 0.01$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_1$ . Hiperoksija: <sup>d,e</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ; Studentov t-test:  $k_0$  (\* $p < 0.05$ ),  $k_2$  (\*\* $p < 0.01$ ) i  $k_3$  (\* $p < 0.05$ ) normoksija vs. hiperoksija.

#### **4.7. Utjecaj Sirt-3 na oksidacijska oštećenja proteina (karbonilacija) u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji**

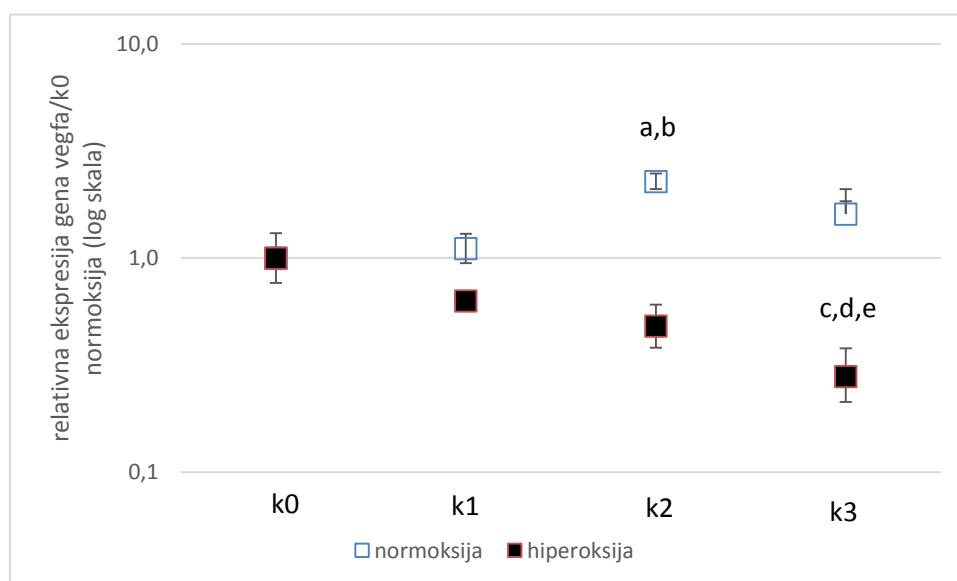
Kako bismo odredili oksidacijsko oštećenje proteina u ovisnosti o ekspresiji Sirt-3 u uvjetima normoksije i hiperoksije, odredili smo stupanj karbonilacije proteina u svim klonovima. Rezultati su pokazali da kontrolni klon  $k_0$  pokazuje povećanje oksidacijskog oštećenja u hiperoksiji u odnosu na odgovarajući klon u normoksiji (Studentov t-test:  $k_0$ , \*\*\* $p < 0.001$ , normoksija vs. hiperoksija), dok među klonovima  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  nije bilo promjene u oksidacijskom oštećenju proteina, bez obzira na hiperoksiju i ekspresiju Sirt-3 (**Slika 6**).



**Slika 6. Utjecaj Sirt-3 na oksidacijska oštećenja proteina u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Studentov t-test: \*\*\* $p < 0.001$ ,  $k_0$  normoksija vs. hiperoksija.

#### **4.8. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju vegf-a, mmp2, sod-2, mt-nd1 i esr-1 gena u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji**

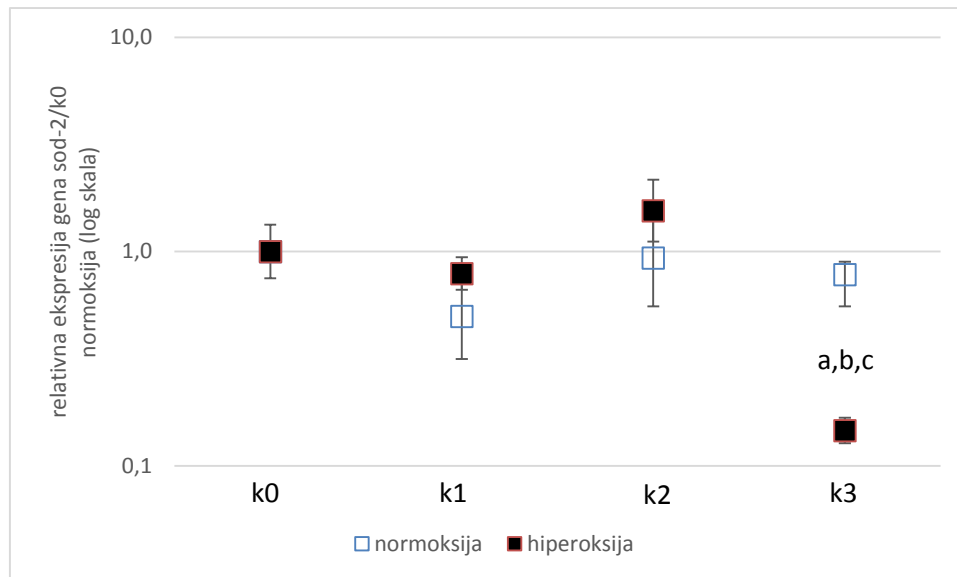
Kako bismo odredili utjecaj stabilno eksprimiranog Sirt-3 na promjene u relativnoj ekspresiji gena koji sudjeluju u procesima stanične proliferacije, angiogeneze, mitohondrijske funkcionalnosti i antioksidacijske zaštite, u normoksičnim uvjetima i nakon izlaganja hiperoksiji, odredili smo relativnu promjenu ekspresije sljedećih gena: vegf-a, mmp-2, sod-2, mt-nd1 i esr-1 u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine. Rezultati RT-qPCR analize pokazali su potpuno odsustvo ekspresije mRNA za mmp-2 koji kodira za matriks metaloproteinazu 2. Promjena u ekspresiji vegf-a gena u normoksiji bila je značajno povećana kod klona  $k_2$  koji je imao najveći porast u odnosu na kontrolni klon  $k_0$ , dok klon  $k_3$  ima trend u povećanju no razlika nije statistički značajna (jednosmjerna ANOVA:  $F=13.057$ ,  $p < 0.05$ ; post-hoc Tukey test: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ ). U hiperoksiji svi klonovi pokazuju značajan pad u ekspresiji mRNA za vegf u odnosu na kontrolu, pri čemu klon  $k_3$  pokazuje najveći pad u odnosu na kontrole  $k_0$  i  $k_1$ , ali i u odnosu na klon  $k_2$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=21.581$ ,  $p < 0.01$ ; post-hoc Tukey's test: <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_1$ ; <sup>e</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_2$ ) (Slika 7A).



**Slika 7A. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju gena vegf-a u normoksiji i hiperoksiji.**

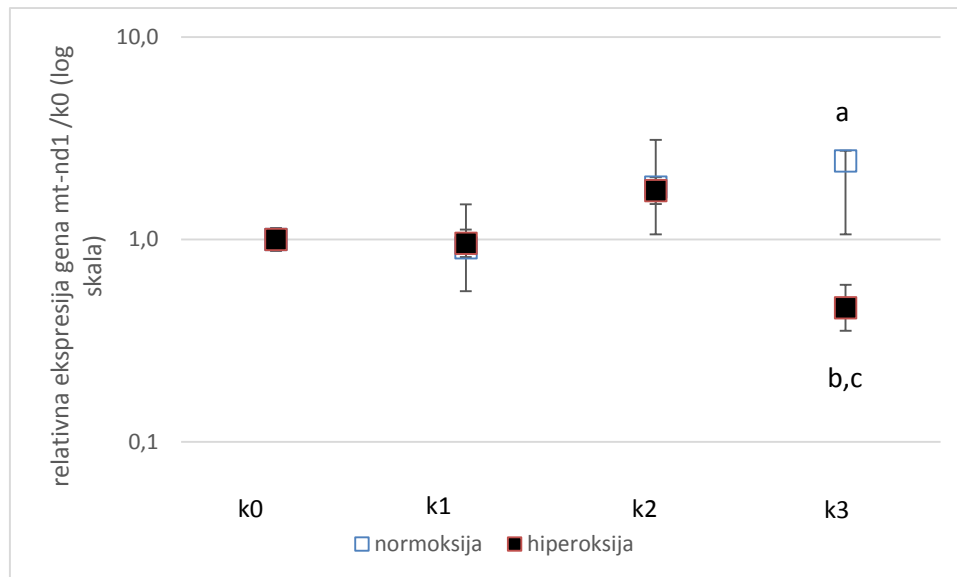
Rezultati su prikazani kao promjena ekspresije gena  $\pm$  standardna pogreška (S.E.) Promjena u ekspresiji izračunata je koristeći metodu  $2^{\Delta\Delta CT}$  i  $\beta$ -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su normalizirani u odnosu na klon  $k_0$ . Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ . Hiperoksija: <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_1$ ; <sup>e</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_2$ .

Kako bismo odredili utjecaj ekspresije Sirt-3 na ekspresiju mRNA najvažnijeg mitohondrijskog „hvatača“ radikala sod-2 u normoksiji i hiperoksiji, odredili smo ekspresiju sod-2 mRNA i pokazali da u normoksiji nema promjene (jednosmjerna ANOVA:  $F=2.87$ ,  $p=n.s.$ ). Međutim, u hiperoksiji postoji statistički značajan pad u ekspresiji sod-2 gena kod klona  $k_3$  u odnosu na kontrole  $k_0$  i  $k_1$ , ali i u odnosu na klon  $k_2$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=90.487$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Tukey test: <sup>a,b,c</sup> $p < 0.001$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ) (**Slika 7B**).



**Slika 7B. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju gena sod-2 u u normoksiji i hiperoksiji.** Rezultati su prikazani kao promjena ekspresije gena  $\pm$  standardna pogreška (S.E.) Promjena u ekspresiji izračunata je koristeći metodu  $2^{\Delta\Delta CT}$  i  $\beta$ -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su normalizirani u odnosu na klon  $k_0$ . Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Hiperoksija: <sup>a,b,c</sup> $p < 0.001$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ .

Kako bismo odredili utjecaj ekspresije Sirt-3 na mitohondrijsku funkciju u uvjetima normoksije i hiperoksije, RT-qPCR analizom odredili smo ekspresiju gena mt-ND1 koji se nalazi na mtDNA. Gen mt-ND1 kodira za kompleks I respiratornog lanca, koji je njegov esencijalni dio. Rezultati pokazuju trend u povećanju ekspresije mt-ND1 mRNA kod klonova  $k_2$  i  $k_3$  u odnosu na kontrole  $k_0$  i  $k_1$ , pri čemu klon  $k_3$  u normoksiji pokazuje najveće povećanje u genskoj ekspresiji u odnosu na kontrolu (jednosmjerna ANOVA:  $F=7.11$ ,  $p < 0.05$ ; post-hoc Tukey test: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ). U hiperoksiji uočavamo pad u ekspresiji kod klona  $k_3$  u odnosu na kontrolu  $k_0$  i u odnosu na klon  $k_2$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=18.93$ ,  $p < 0.01$ ; post-hoc Tukey test: <sup>b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_1$ ; <sup>c</sup> $p < 0.01$ ,  $k_3$  vs.  $k_2$ ) (**Slika 7C**).

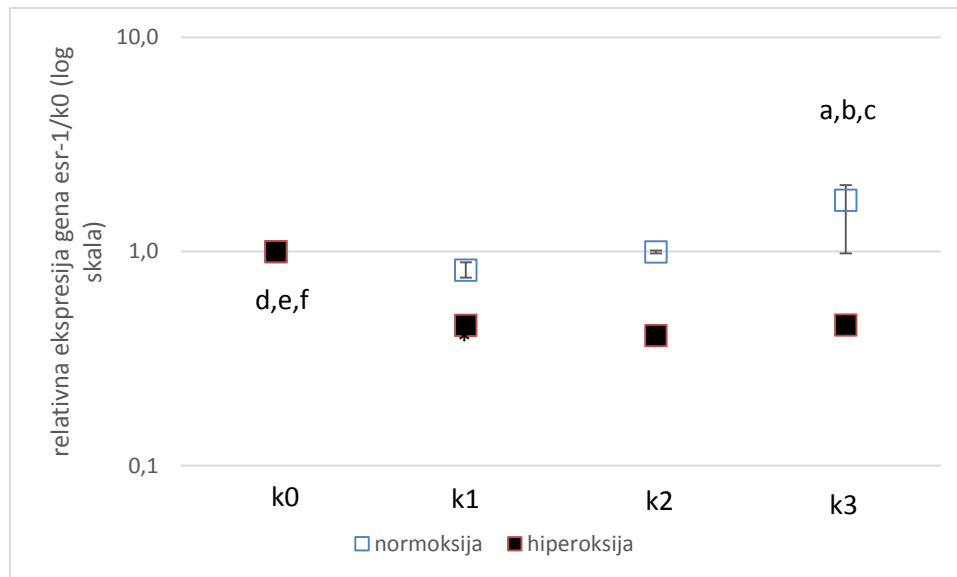


**Slika 7C. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju gena mt-ND1 u u normoksiji i hiperoksiji.**

Rezultati su prikazani kao promjena ekspresije gena  $\pm$  standardna pogreška (S.E.) Promjena u ekspresiji izračunata je koristeći metodu  $2^{\Delta\Delta CT}$  i  $\beta$ -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su normalizirani u odnosu na klon  $k_0$ . Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ . Hiperoksija: <sup>b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_1$ ; <sup>c</sup> $p < 0.01$ ,  $k_3$  vs.  $k_2$ .

Esr-1 (estrogen receptor alfa) je transkripcijski faktor kojeg aktivira estrogen i ima ključnu ulogu u proliferaciji stanica, a njegova povećana ekspresija prisutna je u stanicama određenih tipova raka dojke, pa tako i u stanicama MCF-7<sup>29,30</sup>. Analiza ekspresije mRNA za esr-1 pokazala je povišenu ekspresiju kod klona  $k_3$  u odnosu na ostale klonove  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  u normoksiji (jednosmjerna ANOVA:  $F=14.13$ ,  $p < 0.05$ ; post-hoc Tukey test: <sup>a,b,c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ ). Klonovi  $k_1$  i  $k_2$  ne pokazuju značajnu promjenu u ekspresiji u odnosu na kontrolu  $k_0$ . Klonovi  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u hiperoksiji pokazuju značajan pad ekspresije u odnosu na kontrolu  $k_0$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=76.32$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Tukey test: <sup>d,e,f</sup> $p < 0.001$ ,  $k_0$  vs.  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ) (Slika 7D).

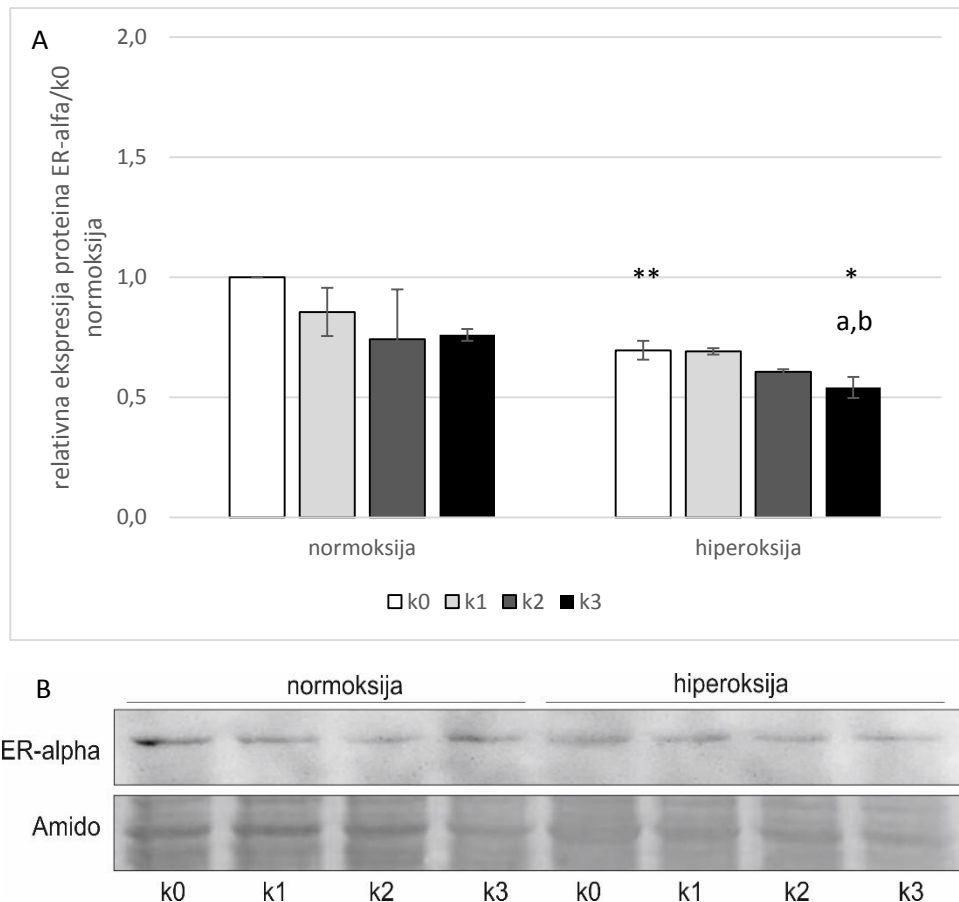




**Slika 7D. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju gena esr-1 u u normoksiji i hiperoksiji.** Rezultati su prikazani kao promjena ekspresije gena  $\pm$  standardna pogreška (S.E.) Promjena u ekspresiji izračunata je koristeći metodu  $2^{\Delta\Delta CT}$  i  $\beta$ -aktin kao endogenu kontrolu. Rezultati su normalizirani u odnosu na klon  $k_0$ . Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija:  $^{a,b,c}p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ . Hiperoksija:  $^{d,e,f}p < 0.001$ ,  $k_0$  vs.  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ .

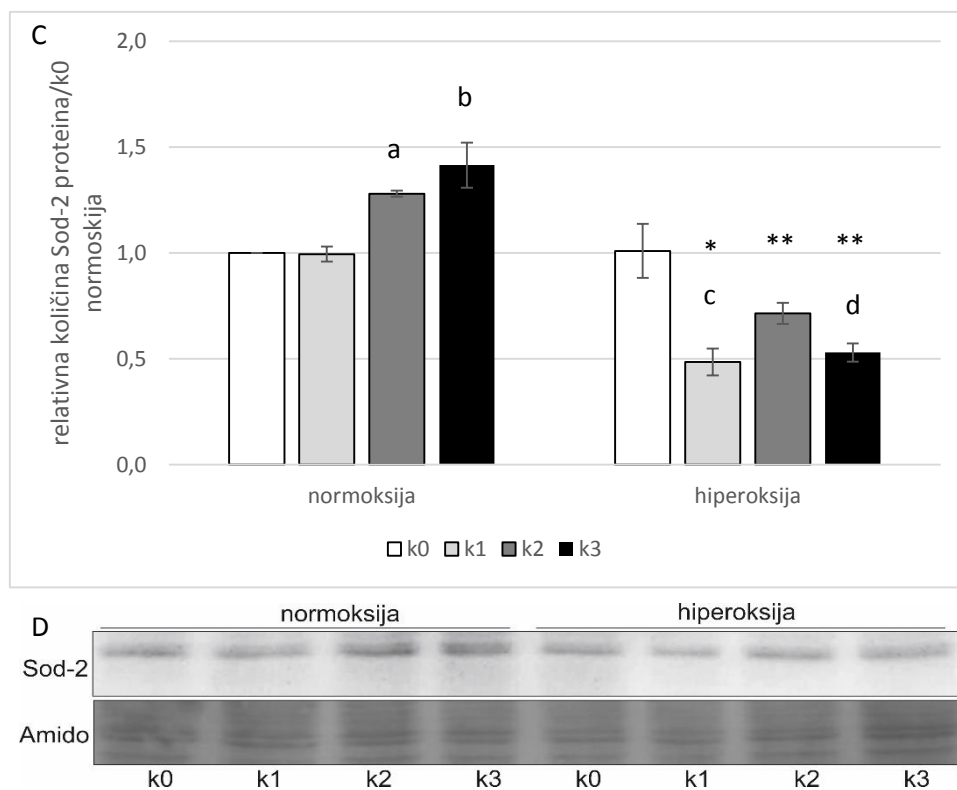
#### **4.9. Utjecaj Sirt-3 na ekspresiju proteina Sod-2, ER- $\alpha$ i Ldh-A u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji**

Kako bismo odredili utjecaj stabilno eksprimiranog Sirt-3 na promjene u ekspresiji proteina koji sudjeluju u procesima proliferacije stanica, aerobne glikolize, mitohondrijske funkcionalnosti i antioksidacijske zaštite u normoksičnim uvjetima i nakon izlaganja hiperoksiji, odredili smo ekspresiju proteina ER- $\alpha$ , Sod-2 i Ldh-A. Rezultati western blot analize pokazuju da kontrola  $k_0$  u normoksiji ima najveću, a klon  $k_3$  najmanju ekspresiju ER- $\alpha$ . Iako između ta dva klona u normoksiji postoji razlika u ekspresiji ER- $\alpha$  ona nije statistički značajna (jednosmjerna ANOVA:  $F=0.21$ ,  $p=n.s.$ ). U hiperoksiji je ekspresija ER- $\alpha$  značajno smanjena (jednosmjerna ANOVA:  $F=11.56$ ,  $p < 0.05$ ), a najmanja je kod klona  $k_3$  u odnosu na kontrolne klonove  $k_0$  i  $k_1$  (post-hoc Tukey test:  $^{a,b}p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_1$ ). U hiperoksiji klonovi  $k_0$  i  $k_3$  pokazuju manju ekspresiju ER- $\alpha$  u odnosu na odgovarajuće klonove u normoksiji (Studentov t-test:  $k_0$   $^{**}p < 0.05$  i  $k_3$   $^{*}p < 0.05$ , normoksija vs. hiperoksija) (Slika 8A, 8B).



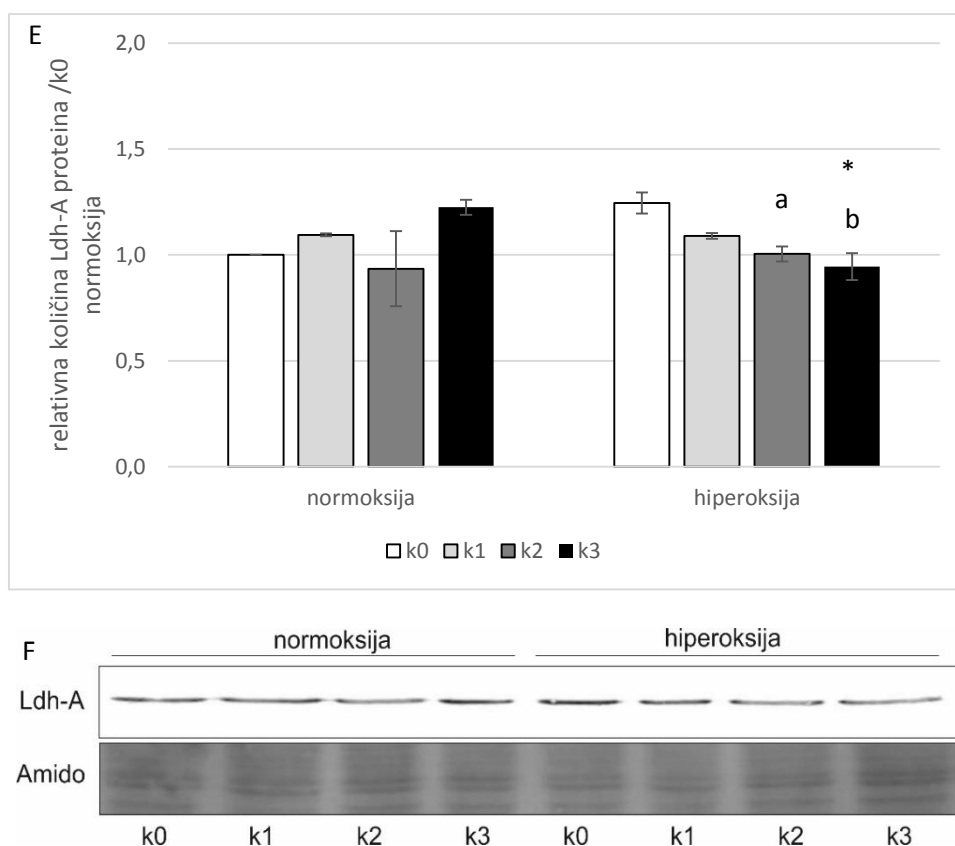
**Slika 8A, 8B. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju proteina ER- $\alpha$  u normoksiji i hiperoksiji.** Western blot analiza proteinske ekspresije klonova k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija: p=n.s. Hiperoksija: <sup>a,b</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>. Studentov t-test: k<sub>0</sub> (\*\*p<0.05) i k<sub>3</sub> (\*p<0.05), normoksija vs. hiperoksija (**8A**). Reprezentativni prikaz gela western blot analize ekspresije ER- $\alpha$  proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala. (**8B**).

Proteinska ekspresija glavnog mitohondrijskog antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze 2 (Sod-2) u normoksiji pokazuje značajan porast ekspresije Sod-2 (jednosmjerna ANOVA: F=27.64, p<0.01), gdje klonovi k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> imaju povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolne klonove k<sub>0</sub> i k<sub>1</sub> (post-hoc Tukey: <sup>a</sup>p<0.01, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>; <sup>b</sup>p<0.05, k<sub>2</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>). U hiperoksiji najmanju ekspresiju Sod-2 ima klon k<sub>3</sub> u odnosu na ostale klonove (ANOVA: F=18.56, p<0.01; post-hoc Tukey: <sup>c</sup>p<0.01, k<sub>1</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>d</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>). Također je uočena smanjena ekspresija Sod-2 proteina u hiperoksiji u odnosu na normoksiju (Studentov t-test: k<sub>1</sub> (\*p<0.05) i k<sub>3</sub> (\*\*p<0.05), normoksija vs. hiperoksija (**Slika 8C, 8D**)).



**Slika 8C, 8D. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju proteina Sod-2 u u normoksiji i hiperoksiji.** Western blot analiza proteinske ekspresije klonova k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija: <sup>a</sup>p<0.01, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>; <sup>b</sup>p<0.05, k<sub>2</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>. Hiperoksija: <sup>c</sup>p<0.01, k<sub>1</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>d</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>. Studentov t-test: k<sub>1</sub> (\*p<0.05) i k<sub>3</sub> (\*\*p<0.05), normoksija vs. hiperoksija (**8C**). Reprezentativni prikaz gela western blot analize ekspresije Sod-2 proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala (**8D**).

Ldh-A je ključan enzim uključen u Warburgov efekt koji katalizira pretvorbu piruvata u laktat. Iako klon k<sub>3</sub> pokazuje porast ekspresije Ldh-A u odnosu na kontrolne klonove k<sub>0</sub> i k<sub>1</sub>, razlika nije statistički značajna (jednosmjerna ANOVA: F=3.9, p=n.s.). U hiperoksiji dolazi do pada ekspresije Ldh-A kod klonova k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> u odnosu na kontrolni klon k<sub>0</sub>. Najmanju ekspresiju Ldh-A pokazuju klonovi k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> (jednosmjerna ANOVA: F=17.06, p<0.01; post-hoc Tukey: <sup>a</sup>p<0.05, k<sub>2</sub> vs. k<sub>0</sub>; <sup>b</sup>p<0.01, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>). Kontrola k<sub>0</sub> u normoksiji pokazuje manju, dok klon k<sub>3</sub> pokazuje veću ekspresiju Ldh-A u odnosu na pripadajuće klonove u hiperoksiji (Studentov t-test: k<sub>0</sub> p=0.05; k<sub>3</sub> (\*p<0.05), normoksija vs. hiperoksija) (**Slika 8E, 8F**).

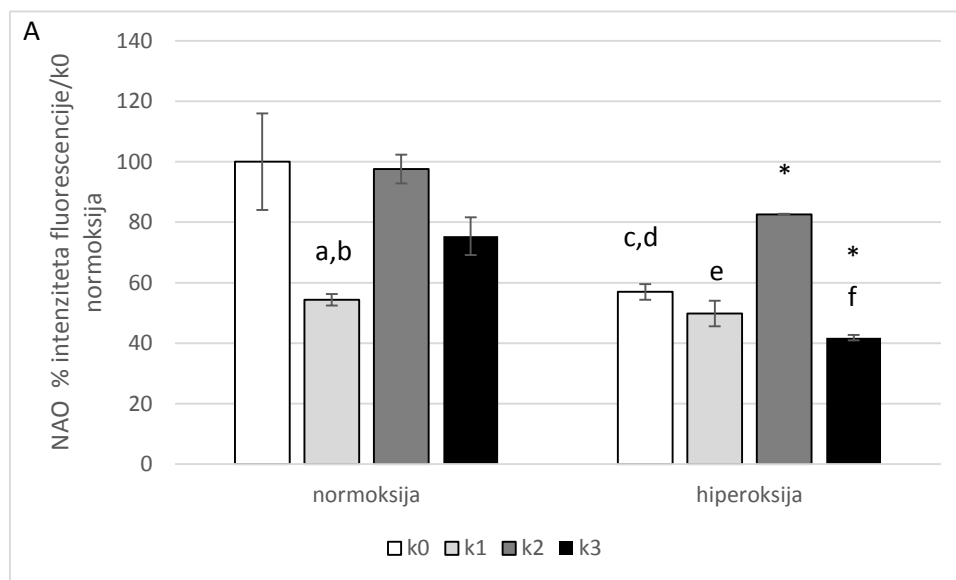


**Slika 8E, 8F. Utjecaj Sirt-3 na relativnu ekspresiju proteina Ldh-A u u normoksiji i hiperoksiji.** Western blot analiza proteinske ekspresije klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u normoksiji i hiperoksiji. Normoksija:  $p=n.s.$  Hiperoksija: <sup>a</sup> $p<0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p<0.01$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ . Studentov t-test:  $k_0$  ( $p=0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija;  $k_3$  ( $*p<0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija (**8E**). Reprezentativni prikaz gela western blot analize ekspresije Ldh-A proteina. Amidoblack je korišten za normalizaciju signala (**8F**).

#### **4.10. Utjecaj Sirt-3 na broj mitohondrija, mitohondrijski potencijal i proizvodnju unutarstaničnih RKV-a u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji**

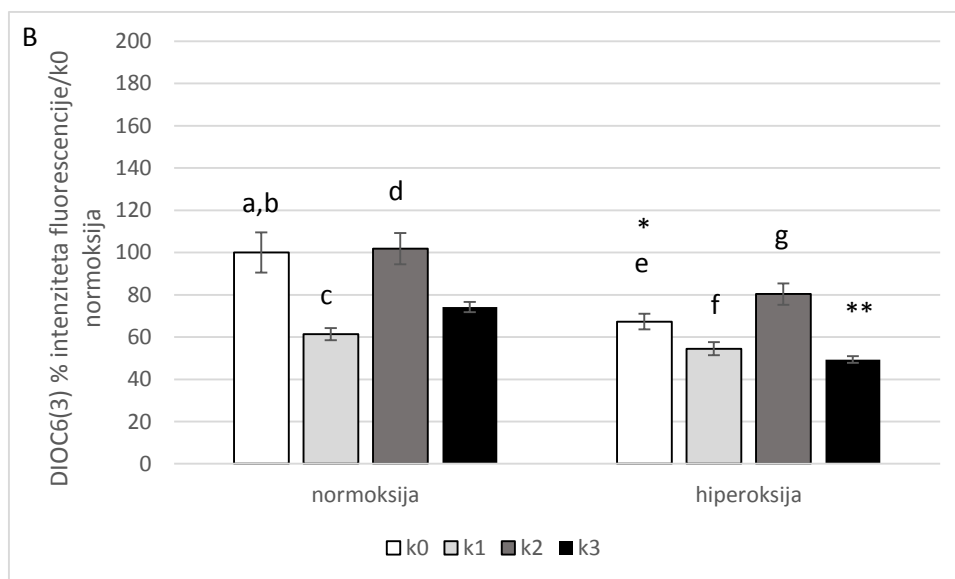
Parametre mitohondrijske funkcije u klonovima  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u normoksiji i hiperoksiji pratili smo korištenjem boje NAO, kojom se određuje mitohondrijska masa, i boje DIOC6(3) kojom se određuje mitohondrijski membranski potencijal (MMP). Analiza rezultata pokazuje pad mitohondrijske mase kod klona  $k_1$  u odnosu na kontrolu  $k_0$  i klon  $k_2$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=11.45$ ,  $p<0.05$ ; post-hoc Tukey: <sup>a</sup> $p<0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p<0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ). U hiperoksiji je došlo do pada mase mitohondrija kod svih klonova, pri čemu klon  $k_2$  pokazuje najveću, a klon  $k_3$  najmanju masu mitohondrija (jednosmjerna ANOVA:  $F= 97.15$ ,  $p<0.001$ ;

post-hoc Tukey: <sup>c</sup> $p < 0.001$ ,  $k_0$  vs.  $k_2$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_0$  vs.  $k_3$ ; <sup>e</sup> $p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ ; <sup>f</sup> $p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ ). Usporedbom klonova u normoksiji i hiperoksiji, zapazili smo da klonovi  $k_2$  i  $k_3$  pokazuju značajno manju masu mitohondrija u hiperoksiji u usporedbi s pripadajućim klonovima u normoksiji (Studentov t-test:  $k_2$  (\* $p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija;  $k_3$  (\* $p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija) (Slika 9A).



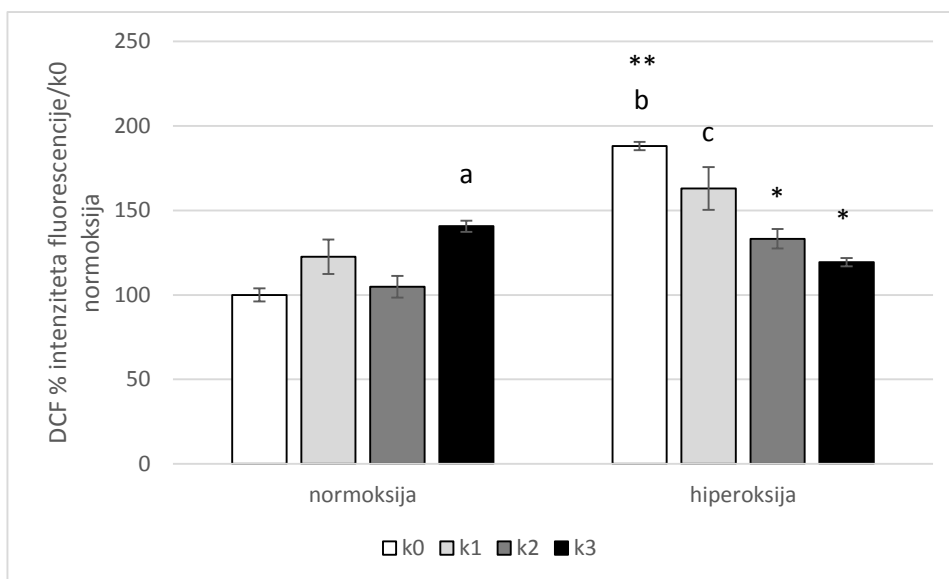
**Slika 9A. Utjecaj Sirt-3 na masu mitohondrija u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji.** Određivanje mase mitohondrija kod klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  protočnom citometrijom korištenjem NAO boje. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_0$ ; <sup>b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ . Hiperoksija: <sup>c</sup> $p < 0.001$ ,  $k_0$  vs.  $k_2$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_0$  vs.  $k_3$ ; <sup>e</sup> $p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_1$ ; <sup>f</sup> $p < 0.001$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ . Studentov t-test:  $k_2$  (\* $p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija;  $k_3$  (\* $p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija.

Rezultati određivanja mitohondrijskog potencijala pokazuju da klonovi  $k_0$  i  $k_2$  u normoksiji imaju veći mitohondrijski potencijal u odnosu na klonove  $k_1$  i  $k_3$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=19.64$ ,  $p < 0.01$ ; post-hoc Tukey: <sup>a,b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_0$  vs.  $k_1$ ,  $k_3$ ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ ). U hiperoksiji je došlo do pada mitohondrijskog potencijala kod svih klonova. Klon  $k_3$  pokazuje najveći pad potencijala, dok klon  $k_2$  ima najveći potencijal u odnosu na kontrolu  $k_0$  i klonove  $k_1$  i  $k_3$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=29.3$ ,  $p < 0.05$ ; post-hoc Tukey: <sup>e</sup> $p < 0.01$ ,  $k_0$  vs.  $k_3$ ; <sup>f</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ; <sup>g</sup> $p < 0.01$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ ). Osim toga, klonovi  $k_0$  i  $k_3$  u hiperoksiji imaju značajni pad potencijala u odnosu na pripadajuće klonove u normoksiji (Studentov t-test:  $k_0$  (\* $p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija;  $k_3$  (\*\* $p < 0.01$ ), normoksija vs. hiperoksija) (Slika 9B).



**Slika 9B. Utjecaj Sirt-3 na mitohondrijski potencijal u stanicama MCF-7 u normoksiji i hiperoksiji.** Određivanje mitohondrijskog potencijala kod klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  protočnom citometrijom pomoću DiOC6(3) boje. Pokus je ponovljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a,b</sup> $p < 0.05$ ,  $k_0$  vs.  $k_1$ ,  $k_3$ ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ; <sup>d</sup> $p < 0.05$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ . Hiperoksija: <sup>e</sup> $p < 0.01$ ,  $k_0$  vs.  $k_3$ ; <sup>f</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ; <sup>g</sup> $p < 0.01$ ,  $k_2$  vs.  $k_3$ . Studentov t-test:  $k_0$  ( $*p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija;  $k_3$  ( $**p < 0.01$ ), normoksija vs. hiperoksija.

Produkciju unutarstaničnih RKV-a kod klonova  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  u normoksiji i hiperoksiji mjerili smo protočnom citometrijom koristeći boju H2DCF-DA. Rezultati pokazuju postupno povećanje RKV-a u normoksiji, pri čemu klon  $k_3$  ima najviše RKV-a u odnosu na kontrolni klon  $k_0$  i klon  $k_2$  (jednosmjerna ANOVA:  $F=16.2$ ,  $p < 0.05$ ; post-hoc Tukey: <sup>a</sup> $p < 0.05$ ,  $k_3$  vs.  $k_0$ ,  $k_2$ ). U hiperoksiji dolazi do postupnog pada količine RKV-a u citosolu, u ovisnosti o ekspresiji Sirt-3. Kontrolni klonovi  $k_0$  i  $k_1$  pokazuju najveću količinu RKV-a u odnosu na ostale klonove u hiperoksiji, a klon  $k_3$  najmanju količinu RKV-a (jednosmjerna ANOVA:  $F=36.64$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Tukey : <sup>b</sup> $p < 0.0$ ,  $k_0$  vs.  $k_2$ ,  $k_3$ ; <sup>c</sup> $p < 0.05$ ,  $k_1$  vs.  $k_2$ ,  $k_3$ ). U hiperoksiji je došlo do povećanja količine RKV-a kod klonova  $k_0$  i  $k_2$ , dok je klon  $k_3$  imao značajno nižu proizvodnju RKV-a od pripadajućeg klona u normoksiji (Studentov t-test:  $k_0$  ( $**p < 0.01$ ),  $k_1$   $p = n.s.$ ,  $k_2$  ( $*p < 0.05$ ),  $k_3$  ( $*p < 0.05$ ), normoksija vs. hiperoksija) (slika 9C).



**Slika 9C. Utjecaj Sirt-3 na proizvodnju unutarstaničnih RKV-a u MCF-7 staničnoj liniji u normoksiji i hiperoksiji.** Proizvodnja unutarstaničnih RKV-a kod klonova k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub> određena je protočnom citometrijom pomoću H2DCF-DA boje. Pokus je ponavljen najmanje tri puta, a na slici su prikazani reprezentativni rezultati. Normoksija: <sup>a</sup>p<0.05, k<sub>3</sub> vs. k<sub>0</sub>, k<sub>2</sub>. Hiperoksija: <sup>b</sup>p<0.01, k<sub>0</sub> vs. k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub>; <sup>c</sup>p<0.05, k<sub>1</sub> vs. k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub>. Studentov t-test: k<sub>0</sub> (\*\*p<0.01), k<sub>1</sub> (p=n.s.), k<sub>2</sub> (\*p<0.05), k<sub>3</sub> (\*p<0.05), normoksija vs. hiperoksija.

## **5. RASPRAVA**



Sirt-3 je glavna mitohondrijska deacetilaza metaboličkih i respiratornih enzima važnih za funkciju mitohondrija i kao takva sudjeluje u održavanju homeostaze RKV-a, te tako čuva stanicu od oksidacijskih oštećenja <sup>31</sup>. Sirt-3 deacetilira i aktivira komponente mitohondrijskog respiratornog lanca povećavajući na taj način efikasnost oksidacijske fosforilacije. Stoga je ova mitohondrijska deacetilaza prepoznata kao jedan od glavnih proteina koji sudjeluje u održavanju energetske homeostaze u stanicama <sup>32</sup>. S obzirom na sve veći broj podataka koji ukazuju na dvojak ulogu Sirt-3 kao onkogeni ili tumor supresora u malignim oboljenjima <sup>18</sup>, pokazuje se potreba za definiranjem uloge Sirt-3 kao čuvara stanične homeostaze <sup>17</sup> u razvoju tumora. Osim toga, vrlo se malo zna o mogućim faktorima koji utječu na aktivnost Sirt-3 u tumorigenezi. Stoga smo odlučili istražiti ulogu Sirt-3 u stanicama raka dojke MCF-7 u kombinaciji s hiperoksijom, koja se sve više koristi u liječenju malignih oboljenja <sup>24</sup>.

U ovom smo istraživanju utvrdili da u uvjetima normoksije Sirt-3 djeluje kao onkogen, te potiče oksidacijski stres i neke druge faktore odgovorne za tumorski rast, dok kombinirani učinak hiperoksije i Sirt-3 umanjuje tumorske karakteristike MCF-7 stanica raka dojke. Ovaj se učinak vjerojatno ostvaruje putem reprogramiranja staničnog metabolizma s aerobne glikolize na oksidacijsku fosforilaciju, a koja se dešava u mitohondrijima. Na taj način tumorska stanica djelomično gubi svoja agresivna obilježja.

Kako bismo bili u mogućnosti utvrditi mehanizam djelovanja Sirt-3 i hiperoksije na karakteristike stanica MCF-7, najprije smo izdvojili stabilne klonove koji ekspimiraju Sirt-3 u različitoj količini, a to smo utvrdili analizom ekspresije mRNA i proteina. Nakon toga smo ispitali da li je hiperoksija utjecala na obrazac ekspresije Sirt-3. Rezultati su pokazali povećanu ekspresiju Sirt-3 u hiperoksiji, no samo kod klonova koji su imali stabilno ekspimiran Sirt-3. Ono što je zanimljivo jest činjenica da je hiperoksija pojačala dozno-ovisni obrazac ekspresije Sirt-3 u klonovima k<sub>2</sub> i k<sub>3</sub>, dok kod kontrolnih klonova s niskom endogenom ekspresijom Sirt-3 taj učinak izostaje, a što je potvrđeno uz pomoć konfokalne analize. Naime, usporedbom lokalizacije Sirt-3 u uvjetima normoksije i hiperoksije vidljivo je da stanice izložene povećanoj koncentraciji kisika ne pokazuju razliku u distribuciji Sirt-3 proteina, nego u intenzitetu signala koji je veći obzirom na normoksiju. Povećani intenzitet signala ukazuje na povećanu količinu Sirt-3 proteina u stabilno ekspimiranim klonovima. Takvi rezultati upućuju na moguću ulogu hiperoksije kao aktivatora Sirt-3 proteina, koji u uvjetima hiperoksije djeluje kao antioksidacijski faktor s ciljem smanjivanja RKV-a, pa tako i tumorskih karakteristika <sup>33</sup>. Mitohondrijska lokalizacija Sirt-3 je također potvrđena analizom konfokalnom

mikroskopijom, koja je pokazala da se fluorescencijski signal za Sirt-3 unutar stanice potpuno preklapa sa signalom za mitohondrije, što je u skladu s ostalim podacima iz literature <sup>34</sup>.

Nadalje, kako bismo definirali učinak hiperoksije i ekspresije Sirt-3 na oksidacijski status stanica MCF-7 izmjerili smo oksidacijska oštećenja lipida i proteina u navedenim grupama. Klonovi  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  nakon tretmana hiperoksijom ne pokazuju veća oksidacijska oštećenja proteina u odnosu na normoksiju za razliku od kontrolnog klona  $k_0$ , koji pokazuje obrnuto ponašanje. Međutim, klon  $k_0$  pokazuje veća oštećenja proteina nakon tretmana hiperoksijom u odnosu na normoksiju. Ovaj rezultat ukazuje da je hiperoksija izazvala oksidacijski stres u kontrolnom klonu  $k_0$ . Međutim, odsustvo oštećenja u ostalim klonovima upućuje na antioksidativnu ulogu Sirt-3 u hiperoksiji. Lipidna peroksidacija je proces koji nastaje djelovanjem RKV-a na lipide u membrani i koristi se kao marker oksidacijskog stresa <sup>35</sup>. U normoksiji klonovi pokazuju povećano oštećenje membranskih lipida koje je u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom Sirt-3, što upućuje na mogućnost da Sirt-3 u normoksiji ne sudjeluje u smanjenju oksidacijskog oštećenja, nego upravo suprotno, Sirt-3 povećava produkciju RKV-a. Ova činjenica ukazuje na onkogeno djelovanje Sirt-3, obzirom da umjereno povećana količina RKV-a u tumorskim stanicama doprinosi povećanju metaboličke aktivnosti, te razvoju tumorskog fenotipa, a povezana je s promjenama u ekspresiji Sirt-3 <sup>36,37</sup>.

U hiperoksiji općenito dolazi do smanjenja oksidacijskog oštećenja membranskih lipida u odnosu na pripadajuće klonove u normoksiji, premda je i dalje prisutan slab porast LPO povezan s ekspresijom Sirt-3. Već je prije pokazano da Sirt-3 može djelovati kao onkogen i kao tumor supresor gen <sup>18</sup>, ali nije pokazan uzrok, kao ni mehanizam njegovog dvojakog djelovanja. Osim toga, važno je spomenuti da hiperoksija u tom smislu igra ključnu ulogu, jer je poznato da prevelika koncentracija RKV-a, što je značajka hiperoksije, može uzrokovati stanično starenje, inhibiciju proliferacije, pa i smrt <sup>38</sup>. Obzirom na pad oksidacijskog stresa i smanjenje tumorskih značajki klonova u hiperoksiji, a koje su ovisne o ekspresiji Sirt-3, ovi rezultati pokazuju da smanjenje tumorskih značajki klonova  $k_2$  i  $k_3$  u hiperoksiji uzrokuje upravo kombinirani učinak hiperoksije i Sirt-3, koji u tom slučaju ima antioksidacijsku ulogu i ulogu „čistača“ RKV-a <sup>39</sup>.

Međutim, u hiperoksiji se pokazalo da je i oksidacijski stres smanjen kod klonova koji stabilno ekspimiraju Sirt-3, što se vidi iz smanjene LPO u odnosu na klonove u normoksiji, nepromijenjenog oštećenja proteina, i smanjenja citosolnih RKV-a u odnosu na kontrolne

klonove bez Sirt-3. Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju da su smanjena oksidacijska oštećenja posljedica dozno-ovisnog djelovanja Sirt-3 kao umanjivača oksidacijskog stresa <sup>31</sup>.

Proliferativni potencijal stanica MCF-7 određen je i pomoću testa formiranja kolonija (CFA). Obzirom da se ovaj test temelji na sposobnosti pojedinačne stanice da tvori koloniju, isti je pogodan za određivanje stupnja malignosti stanica <sup>26</sup>. Rezultati testa CFA pokazuju da Sirt-3 nije imao utjecaja na proliferacijski potencijal klonova bez obzira na tretman. Međutim, u hiperoksiji je došlo da značajnog pada proliferacijskog potencijala od 90% u odnosu na klonove u normoksiji, što je u skladu s ostalim rezultatima koji također upućuju na smanjeni proliferacijski potencijal stanica raka nakon tretmana hiperoksijom <sup>24</sup>. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost korištenja hiperoksije za uspješno liječenje malignih bolesti, kao što se to koristi i za neke druge bolesti <sup>40</sup>.

Kako bismo potvrdili hipotezu dualne uloge Sirt-3 kao onkogeni ili tumor supresora, a koja je uvjetovana hiperoksijom, odredili smo neke od parametara angiogeneze i proliferacije, a koji karakteriziraju stanice MCF-7 <sup>41</sup>, a to su vegf-a i esr-1. Vaskularni endotelni faktor rasta (Vegf) jedan je od najviše istraženih faktora diferencijacije i razvoja vaskularnog sustava. On je visokospecifičan i selektivni mitogen koji s jedne strane potiče proliferaciju i migraciju vaskularnih endotelnih stanica, a s druge inhibira apoptozu. Neophodan je za angiogenezu, proces stvaranja krvnih žila, čime promovira rast tumora. Pokazalo se da blokiranje Vegf inhibira rast primarnog tumora i smanjuje njegov metastatski potencijal <sup>42</sup>. U našem smo istraživanju pokazali da su vegf-a i sirt-3 u normoksiji u pozitivnoj korelaciji: veća genska ekspresija sirt-3 uzrokuje veću gensku ekspresiju vegf-a. Povećani vegf-a karakteristika je rasta tumora, odnosno ukazuje na njegov metastatski potencijal <sup>43</sup>. Iz toga proizlazi jasan zaključak da Sirt-3 u normoksiji djeluje kao onkogen i to na način da aktivira vegf-a, premda mehanizam ove interakcije nismo istražili u ovom radu. U hiperoksiji pak uočavamo negativnu korelaciju između genske ekspresije vegf-a i sirt-3, gdje je klon s najviše eksprimiranim sirt-3 pokazao najmanju ekspresiju vegf-a, što ukazuje da veća ekspresija sirt-3 smanjuje metastatski potencijal MCF-7 stanica, ali isključivo u uvjetima hiperoksije.

Estrogen i njegovi receptori imaju važnu ulogu u malignoj progresiji raka dojke. Estrogen receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) eksprimiran je u 70% pacijentica oboljelih od raka dojke i jedan je od glavnih meta hormonskih terapija <sup>44</sup>. Kao transkripcijski faktor, ER- $\alpha$  regulira transkripciju velikog broja gena <sup>45</sup>, a ima i ključnu ulogu u proliferaciji tumorskih stanica <sup>46</sup>. Stanice MCF-7 ovisne su o estrogenu i klasificiraju se kao ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>-</sup>. Od svih mogućih tipova raka dojke ovaj

oblik je najčešći, ali i najmanje agresivan, te dobro odgovara na terapije <sup>47</sup>. Rezultati genske ekspresije *esr-1* pokazali su malo ali značajno povećanje samo kod klon s najvećom ekspresijom *Sirt-3*, koje nije bilo popraćeno povećanjem na proteinskom nivou, pa stoga ne možemo tvrditi da je proliferativni potencijal stanica u našem slučaju uvjetovan s ekspresijom *ER-α*. S obzirom na rezultate, možemo zaključiti da ekspresija *ER-α* u normoksičnim uvjetima nije dobar pokazatelj za proces proliferacije, nego da se isti vjerojatno odvija preko nekog drugog signalnog puta, ili uključuje neke druge procese u stanici, kao što je povećanje *vegf-a*, te mitohondrijskih parametara (*sod-2*, unutarstanična produkcija *RKV-a*, te metabolička aktivnost stanica).

S druge strane, *ER-α* se pokazao kao puno informativniji pokazatelj gore navedenih parametara proliferacije u uvjetima hiperoksije, gdje je pokazan pad u ekspresiji *ER-α*, a što je u obrnutoj korelaciji s ekspresijom *Sirt-3*. Obzirom da klon s najvećom ekspresijom *Sirt-3* ima najmanju ekspresiju *ER-α* u hiperoksiji, uz ostale dobivene parametre možemo pretpostaviti da u uvjetima hiperoksije *Sirt-3* djeluje kao tumor supresor na način da utječe na smanjenje ekspresije *ER-α*, jer su druga istraživanja pokazala da inhibicija *Sirt-1* aktivira *ER-α*, i na taj način stimulira proliferativni potencijal stanica <sup>48</sup>. Međutim, nema informacija o povezanosti *Sirt-3* i *ER-α*, stoga je ovo istraživanje važno u smislu rasvjetljavanja povezanosti *ER-α*, *Sirt-3* i mitohondrijske funkcije u liječenju malignih bolesti.

Nadalje, kako bismo odredili utjecaj *Sirt-3* na metabolički status stanica MCF-7 u normoksiji i nakon tretmana hiperoksijom, mjerili smo ekspresiju proteina *Ldh-A*. Laktat dehidrogenaza A (*Ldh-A*) katalizira pretvorbu piruvata u laktat što ju čini jednim od ključnih pokazatelja aerobne glikolize, glavnog obilježja tumorskih stanica <sup>49</sup>. Također, smanjena ekspresija *Ldh-A* smanjuje mogućnost staničnog reprogramiranja u tumorski fenotip i inhibira progresiju tumorskih stanica <sup>50</sup>. U našem radu pokazali smo da klonovi u normoksiji imaju trend povećanja *Ldh-A* u ovisnosti o ekspresiji *Sirt-3*, što ukazuje na mogućnost da su MCF-7 stanice u normoksiji u aerobnoj glikolizi. Tome u prilog govore i ostali podaci koji upućuju na aerobnu glikolizu, kao što je povećana proizvodnja unutarstaničnih *RKV-a* u normoksiji, ovisna o ekspresiji *Sirt-3*, a dokazano je da povećana koncentracija  $H_2O_2$  čini glikolizu povoljnijim procesom za ubranu staničnu respiraciju tumorske stanice od oksidacijske fosforilacije <sup>51</sup>.

S druge strane, kod klonova u hiperoksiji dolazi do značajnog pada *Ldh-A*, pa tako klon s najvećom ekspresijom *Sirt-3* ima najmanje *Ldh-A*. Mogući razlog smanjenja ekspresije *Ldh-*

A u hiperoksiji je reprogramiranje stanica s aerobne glikolize na metabolizam oksidacijske fosforilacije i samim tim efikasnije korištenje kisika u metaboličkim reakcijama. Osim toga, sniženje RKV-a u klonovima u hiperoksiji pokazuje odsustvo aerobne glikolize i oksidacijskog stresa, a samim tim i gubitak tumorskog fenotipa, na što ukazuju i druga istraživanja <sup>52</sup>.

Postoje istraživanja koja pokazuju da MCF-7 stanice većinu energije u obliku ATP-a dobivaju oksidacijskom fosforilacijom, dok aerobna glikoliza nije toliko zastupljena, što stanice čini manje invazivnima od stanica drugih oblika raka dojke kao što je ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup> (*engl.* triple negative) oblik raka dojke koji predstavlja najagresivniji tip s vrlo lošom prognozom <sup>53</sup>. S obzirom na to da je dokazano da su stanice raka koje koriste oksidacijsku fosforilaciju manje agresivne <sup>54</sup>, modifikacija metabolizma stanica raka s aerobne glikolize na oksidacijsku fosforilaciju je potencijalno dobar model za terapiju. U našem smo istraživanju kombinacijom hiperoksije i ekspresije Sirt-3 dobili upravo takav, manje agresivan fenotip.

Količina Sirt-3 može pozitivno utjecati na vijabilnost stanica s obzirom na njegovu lokalizaciju na unutarnjoj membrani i matriksu mitohondrija <sup>55</sup>, koji sudjeluju u regulaciji staničnog metabolizma i apoptozi <sup>5</sup>. Mi smo pokazali da je metabolička aktivnost klonova u normoksiji u pozitivnoj korelaciji s proteinskom ekspresijom Sirt-3, što znači da veća razina ekspresije Sirt-3 pozitivno utječe na metabolizam stanica raka. Ovaj podatak također upućuje na ulogu Sirt-3 kao onkogene u normoksičnim uvjetima, gdje njegova pojačana ekspresija povećava metaboličku aktivnost stanica, a što je u skladu s drugim istraživanjima <sup>20,56</sup>. S druge strane, hiperoksija je izazvala mali, ali značajni pad u metaboličkoj aktivnosti stanica za oko 10% u odnosu na klonove u normoksiji, neovisno o povećanoj ekspresiji Sirt-3.

Ovaj podatak ukazuje na mogućnost reprogramiranja staničnog metabolizma s aerobne glikolize na efikasniji način potrošnje energije, a to je oksidacijska fosforilacija u ovisnosti o Sirt-3 ekspresiji u uvjetima hiperoksije. Kako bismo to ispitali, odredili smo parametre mitohondrijske biogeneze, funkcionalnosti, i mitohondrijskog antioksidacijskog statusa. Rezultati pokazuju da se masa mitohondrija u hiperoksiji smanjila, što bi izravno mogla biti posljedica štetnog djelovanja visoke koncentracije RKV-a na stanice u hiperoksiji <sup>57</sup>. Membranski potencijal je također pao, što upućuje na smanjeni metabolizam mitohondrija, a u skladu je sa smanjenom metaboličkom aktivnosti stanica. Smanjeni metabolizam djelomično je posljedica smanjene ekspresije mt-nd1 koji kodira za kompleks I respiratornog lanca. Međutim, iako je očekivano da će u hiperoksiji količina RKV-a biti veća u odnosu na normoksiju, odsustvo RKV-a kao i smanjena ekspresija glavnog antioksidacijskog enzima sod-

2 upućuje na pad oksidacijskog stresa, a vezana je uz ekspresiju Sirt-3. Bez obzira što su masa i potencijal mitohondrija u hiperoksiji smanjeni, možemo pretpostaviti da je u pitanju povećana efikasnost cjelokupnog metaboličkog aparata u smislu učinkovitijeg utroška energije, a koja je uzrokovana djelovanjem Sirt-3.

Ovi rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja upućuju na dualnu ulogu Sirt-3 kao onkogene i tumor supresora<sup>18,58</sup>. Novost ovog rada je to što pokazuje da je Sirt-3 jedna od ključnih meta hiperoksije koja aktivira njegovo djelovanje kao tumor supresora, pa tako Sirt-3 smanjuje oksidacijski stres, proliferaciju, invazivnost i metastatski potencijal stanica raka dojke. Do sada još nije pokazano da zajednički učinak hiperoksije i Sirt-3 smanjuje stupanj malignosti tumorskih stanica.

Glavno ograničenje s kojim smo se susreli u ovom radu proizlazi iz činjenice da su tumorske stanice vrlo heterogene<sup>59</sup>, pa s toga i ne čudi varijabilno ponašanje klonova sa stabilno eksprimiranim plazmidom. Osim toga, varijacije u ponašanju klona k<sub>1</sub> mogu biti uzrokovane nasumičnom ugradnjom praznog plazmida u bilo koji dio genoma stanice zbog čega takav klon ne predstavlja idealnu negativnu kontrolu. Sukladno tome, u daljnjim istraživanjima potrebno je razmotriti mogućnost adekvatnijeg sustava negativne kontrole.

Ovim smo istraživanjem pokazali da Sirt-3 regulira više staničnih procesa ključnih za proliferaciju i metastaziranje tumorskih stanica, te da hiperoksija potiče njegovo djelovanje kao tumor supresora. Navedene karakteristike čine ga potencijalnom terapijskom metodom u kombinaciji s hiperoksijom u liječenju malignih oboljenja.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Sirt-3 djeluje kao onkogen u uvjetima normoksije, te potiče oksidacijski stres, proliferaciju, invazivnost i metastatski potencijal stanica raka dojke MCF-7.
2. Sirt-3 djeluje kao tumor supresor u uvjetima hiperoksije tako da smanjuje oksidacijski stres, proliferaciju, invazivnost i metastatski potencijal stanica raka dojke MCF-7.
3. Obzirom da Sirt-3 u kombinaciji s hiperoksijom smanjuje stupanj malignosti stanica raka MCF-7, ove karakteristike čine ga potencijalnom metom u kombinaciji s hiperoksijom u liječenju malignih oboljenja.



## **7. ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentoru izv.prof.dr.sc. Domagoju Đikiću što je omogućio izradu ovog rada, na njegovim savjetima, podršci i bezuvjetnoj pomoći.

Posebna zahvala komentorici dr.sc. Sandri Sobočanec na uloženom vremenu i strpljenju, te savjetima prilikom izvođenja eksperimenata i pisanju ovog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Tihomoru Balogu koji je omogućio da se jedan dio eksperimentalnog rada odradi u Laboratoriju za bioenergetiku mitohondrija i dijabetes.

Zahvaljujem se dr.sc. Ivi Škrinjar i mag.mol.biol. Mariji Pinterić na prijateljskim i znanstvenim savjetima.

Također zahvaljujem Ivi Pešun-Međimorec na bezuvjetnoj podršci.

## **8. LITERATURA**

1. Panieri, E. & Santoro, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis* **7**, e2253 (2016).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Yu, L., Chen, X., Wang, L. & Chen, S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget* **7**, 38908–38926 (2016).
4. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**, 891–899 (2004).
5. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
6. Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W. & Aggarwal, B. B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1295–1322 (2012).
7. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* **5**, 9–19 (2012).
8. Held, P. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. *BioTek Instruments* 1–14 (2012). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
9. Berridge, M. V. & Tan, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474–482 (1993).
10. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913–922 (2007).
11. Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L.,unkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Faresse, R. V. Jr., Weissman, S., Verdin, E. & Schwer, B. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–14 (2007).
12. Sack, M. N. & Finkel, T. Mitochondrial Metabolism, Sirtuins, and Aging. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a013102 (2012).
13. Kincaid, B. & Bossy-Wetzell, E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 1–13 (2013).
14. Schwer, B., North, B. J., Frye, R. A., Ott, M. & Verdin, E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* **158**, 647–657 (2002).
15. McDonnell, E., Peterson, B. S., Bomze, H. M. & Hirschey, M. D. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 486–492 (2015).
16. Zhong, L. & Mostoslavsky, R. Fine Tuning our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology. *Cell Metab.* **13**, 621–626 (2011).
17. Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T. & Chen, D. SIRT3 Reverses Aging-associated Degeneration. *Cell Rep.* **3**, 319–327 (2013).

18. Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Wang, X. Y., Liu, J., Cheng, Y. & Huang, J. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis* **5**, e1047 (2014).
19. Schumacker, P. T. SIRT3 Controls Cancer Metabolic Reprogramming by Regulating ROS and HIF. *Cancer Cell* **19**, 299–300 (2011).
20. Giralt, A. & Villarroya, F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem. J.* **444**, 1 LP-10 (2012).
21. Lai, C. C., Lin, P. M., Lin, S. F., Hsu, C. H., Lin, H. C., Hu, M. L., Hsu, C. M. & Yang, M. Y. Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* **34**, 1847–1854 (2013).
22. McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613–628 (2017).
23. Stuhr, L. E., Raa, A., Oyan, A. M., Kalland, K. H., Sakariassen, P. O., Petersen, K., Bjerkvig, R. & Reed, R. K. Hyperoxia retards growth and induces apoptosis, changes in vascular density and gene expression in transplanted gliomas in nude rats. *J. Neurooncol.* **85**, 191–202 (2007).
24. Moen, I. & Stuhr, L. E. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *Target. Oncol.* **7**, 233–242 (2012).
25. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
26. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–2319 (2006).
27. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* **50**, 98–115 (2011).
28. Abdel Khalek, W., Cortade, F., Ollendorff, V., Lapasset, L., Tintignac, L., Chabi, B. & Wrutniak-Cabello, C. SIRT3, a Mitochondrial NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase, Is Involved in the Regulation of Myoblast Differentiation. *PLoS One* **9**, e114388 (2014).
29. Holst, F., Stahl, P. R., Ruiz, C., Hellwinkel, O., Jehan, Z., Wendland, M., Lebeau, A., Terracciano, L., Al-Kuraya, K., Jänicke, F., Sauter, G. & Simon, R. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* **39**, 655–660 (2007).
30. Ellison-Zelski, S. J., Solodin, N. M. & Alarid, E. T. Repression of ESR1 through Actions of Estrogen Receptor Alpha and Sin3A at the Proximal Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4949–4958 (2009).
31. Bause, A. S. & Haigis, M. C. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **48**, 634–639 (2013).
32. Hall, J. A., Dominy, J. E., Lee, Y. & Puigserver, P. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J. Clin. Invest.* **123**, 973–979 (2013).
33. Finley, L. W., Carracedo, A., Lee, J., Souza, A., Egia, A., Zhang, J., Teruya-Feldstein, J., Moreira, P. I., Cardoso, S. M., Clish, C. B., Pandolfi, P. P. & Haigis, M. C. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1[alpha] destabilization. *Cancer Cell* **19**, 416–428 (2011).
34. Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J. M., Boeke, J. D. & Feinberg, A. P. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD- dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13653–13658 (2002).

35. Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol.* **2012**, 137289 (2012).
36. Schafer, Z. T., Grassian, A. R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H. Y., Gao, S., Puigserver, P. & Brugge, S. J. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* **461**, 109–113 (2009).
37. Verdin, E., Hirschey, M. D., Finley, L. W. S. & Haigis, M. C. Sirtuin regulation of mitochondria: Energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 669–675 (2010).
38. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 85–95 (2011).
39. Ansari, A., Rahman, Md. S., Saha, S. K., Saikot, F. K., Deep, A. & Kim, K.-H. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell* **16**, 4–16 (2017).
40. Gill, A. L. & Bell, C. A. N. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q J Med* **97**, (2004).
41. Applanat, M. P., Buteau-Lozano, H., Herve, M. A. & Corpet, A. in (eds. Li, J. J., Li, S. A., Mohla, S., Rochefort, H. & Maudelonde, T.) 437–444 (Springer New York, 2008). doi:10.1007/978-0-387-69080-3\_42
42. Gasparini, G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *Oncol.* **5**, 37–44 (2000).
43. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* **2**, 213–219 (2006).
44. Powers, G. L., Ellison-Zelski, S. J., Casa, A. J., Lee, A. V & Alarid, E. T. Proteasome inhibition represses ER $\alpha$  gene expression in ER+ cells- a new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer. *Oncogene* **29**, 1509–1518 (2010).
45. Hayashi, S.-I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N. & Yamaguchi, Y. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer* **10**, 193–202 (2003).
46. Ellison-Zelski, S. J., Solodin, N. M. & Alarid, E. T. Repression of ESR1 through Actions of Estrogen Receptor Alpha and Sin3A at the Proximal Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4949–4958 (2009).
47. Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T. & Mukesh, B. N. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clin. Med. Res.* **7**, 4–13 (2009).
48. Moore, R. L. & Faller, D. V. SIRT1 represses estrogen-signaling, ligand-independent ER $\alpha$ -mediated transcription, and cell proliferation in estrogen-responsive breast cells. *J. Endocrinol.* **216**, 273–285 (2013).
49. Allison, S. J., Knight, J. R. P., Granchi, C., Rani, R., Minutolo, F., Milner, J. & Phillips, R. M. Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* **3**, e102 (2014).
50. Fantin, V. R., St-Pierre, J. & Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9**, 425–434 (2017).

51. Molavian, H. R., Kohandel, M. & Sivaloganathan, S. High Concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Make Aerobic Glycolysis Energetically More Favorable for Cellular Respiration. *Front. Physiol.* **7**, 362 (2016).
52. Liou, G.-Y. & Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**, 10.3109/10715761003667554 (2010).
53. Lim, S. O., Li, C. W., Xia, W., Lee, H. H., Chang, S. S., Shen, J., Hsu, J. L., Raftery, D., Djukovic, D., Gu, H., Chang, W. C., Wang, H. L., Chen, M. L., Huo, L., Chen, C. H., Wu, Y., Sahin, A., Hanash, S. M., Hortobagyi, G. N. & Hung, M. C. EGFR signaling enhances aerobic glycolysis in triple negative breast cancer cells to promote tumor growth and immune escape. *Cancer Res.* **76**, 1284–1296 (2016).
54. Zheng, J. I. E. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* **4**, 1151–1157 (2012).
55. Kincaid, B. & Bossy-Wetzel, E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 48 (2013).
56. George, J., Nihal, M., Singh, C. K., Zhong, W., Liu, X. & Ahmad, N. Pro-Proliferative Function of Mitochondrial Sirtuin Deacetylase SIRT3 in Human Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 809–818 (2016).
57. Suski, J. M., Lebedzinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J. & Wieckowski, M. R. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol. Biol.* **810**, 183–205 (2012).
58. Alhazzazi, T. Y., Kamarajan, P., Verdin, E. & Kapila, Y. L. SIRT3 and cancer: tumor promoter or suppressor? *Biochim Biophys Acta* **1816**, 80–88 (2011).
59. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).

## **9. SAŽETAK**



### Sirtuin 3 i hiperoksija: saveznici u borbi protiv tumora

Oksidacijski stres i visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost, koje dovode do promjene staničnog metabolizma i u konačnici do gubitka kontrole staničnog ciklusa. Takvi uvjeti podržavaju stalni rast i proliferaciju, glavno obilježje tumorskih stanica. Iako se dugo raspravljalo o djelovanju čistog kisika (hiperoksije) kao promotora malignih bolesti, danas se hiperoksija koristi kao rutinska terapija u liječenju upravo takvih oboljenja. Sirtuin 3 (Sirt-3) je glavna mitohondrijska deacetilaza koja učinkovito sudjeluje u održavanju energetske homeostaze u stanicama. Nadalje, Sirt-3 ima ulogu onkogen, ali i tumor supresora u tumorskim stanicama, no nije razjašnjeno pod kojim uvjetima dolazi do promjene njegovog djelovanja. U ovom istraživanju ispitali smo djelovanje Sirt-3 na proliferaciju, preživljenje, rast i metaboličku aktivnost, te oksidacijski/antioksidacijski status i mitohondrijske funkcije MCF-7 stanice raka dojke u normoksiji i nakon izlaganja hiperoksiji. Utvrdili smo da u uvjetima normoksije Sirt-3 djeluje kao onkogen, te potiče oksidacijski stres i neke druge faktore odgovorne za tumorski rast, dok u uvjetima hiperoksije Sirt-3 ima tumor supresorsko djelovanje jer smanjuje tumorske karakteristike MCF-7 stanice raka dojke. Ovaj se učinak vjerojatno ostvaruje putem reprogramiranja staničnog metabolizma s aerobne glikolize na oksidacijsku fosforilaciju u mitohondrijima i na taj način tumorska stanica djelomično gubi svoja agresivna obilježja. Ovim smo istraživanjem pokazali da Sirt-3 regulira više staničnih procesa ključnih za proliferaciju i metastaziranje tumorskih stanica, te da hiperoksija potiče njegovo djelovanje kao tumor supresora. Navedene karakteristike čine ga potencijalnom terapijskom metom u kombinaciji s hiperoksijom u liječenju malignih oboljenja.

Ključne riječi: hiperoksija, sirtuin 3, rak dojke, angiogeneza, proliferacija

## **10. SUMMARY**

Sirtuin 3 and hyperoxia: allies in the fight against tumors

Oxidative stress and high levels of reactive oxygen species (ROS) cause DNA damage and genomic instability, which lead to changes in cell metabolism and ultimately loss of control of the cell cycle. These conditions support continuous growth and proliferation, the main characteristics of tumor cells. Although the role of pure oxygen (hyperoxia) as a promoter of malignant diseases has long been debated, today hyperoxia is used as a routine therapy to treat such diseases. Sirtuin-3 (Sirt-3) is the main mitochondrial deacetylase which effectively keeps the cell in energetic homeostasis. In addition, Sirt-3 has a role as an oncogene, but also as a tumor suppressor in tumor cells, and it is not clear which factors lead to the change in the protein's function. In this research project we investigated the effect of Sirt-3 on the proliferation, survival, growth, metabolic activity, oxidant/antioxidant status, and mitochondrial function of the breast cancer MCF-7 cells in normoxia and after treatment in hyperoxia. We confirmed that in normoxic conditions, Sirt-3 functions as an oncogene, and causes oxidative stress and other factors responsible for tumor growth. We also confirmed that in hyperoxic conditions, Sirt-3 functions as a tumor suppressor because it decreases the tumor cell characteristics usually present in breast cancer MCF-7 cells. This effect is most likely realized by reprogramming the cell metabolism to utilize oxidative phosphorylation in the mitochondria instead of anaerobic glycolysis, which causes tumor cells to partially lose their aggressive characteristics. With our research we have shown that Sirt-3 regulates numerous cell processes essential for the proliferation and metastasis of tumor cells, and that hyperoxia encourages the tumor suppressor activity of Sirt-3. These characteristics make Sirt-3 a potential therapeutic target in combination with hyperoxia to treat malignant diseases.

Keywords: hyperoxia, sirtuin 3, breast cancer, angiogenesis, proliferation