

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Tea Bruketa

**Analiza LC3-II kao markera autofagije u različitim
razvojnim stadijima megakariocita**

Završni rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Tea Bruketa

**Analiza LC3-II kao markera autofagije u različitim
razvojnim stadijima megakariocita**

Završni rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Antonija Jurak Begonja

Završni rad obranjen je dana 18.09.2018. u 11:00h

pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Ivana Munitić (predsjednica povjerenstva)

2. doc. dr. sc. Jelena Ban

3. doc. dr. sc. Antonija Jurak Begonja

Rad ima 37 stranica, 9 slika, 0 tablica i 31 literaturnih navoda.

SAŽETAK

Autofagija je unutarstanični proces uključen u razgradnju neželjenih citoplazmatskih komponenti poput proteina, lipida, nukleotida i sl., ali i staničnih organela s ciljem ponovnog korištenja degradiranog sadržaja u biosintetskim procesima ili za stvaranje energije. Upravo zbog toga autofagija se smatra jednim od glavnih mehanizama adaptacije stanice na nepovoljne unutarstanične uvjete kao što su deprivacija hranjivih tvari, hipoksija, signali urođene imunosti i brojni drugi. Osim fizioloških signala, proces autofagije može biti ometen korištenjem različitih farmakoloških agensa koji potiču njenu aktivnost, ili pak inhibiciju. Poznate su njene brojne fiziološke uloge, a jedna od najvažnijih je ona u razvoju i diferencijaciji. Budući da između ostalog ima utjecaj i na megakariopoezu i trombopoezu, u ovom radu Western blot analizom i korištenjem protutijela na LC3-II specifični marker autofagije, pratili smo njenu razinu u različitim razvojnim stadijima primarnih mišjih megakariocita i trombocita, te u ljudskoj megakariocitnoj staničnoj liniji DAMI. Nadalje, razinu autofagije analizirali smo i u megakariocitima iz koštane srži tretiranim induktorom ili inhibitorima autofagije. U konačnici, LC3 protein u DAMI stanicama pratili smo njihovom transfekcijom mRFP-GFP-LC3 plazmidom s ciljem analize autofagijskog fluksa. Prisutstvo LC3 proteina vidljivo je u obliku fluorescentno obojenih vezikula koje koreliraju s autofagijskim strukturama unutar stanice. Na temelju dobivenih rezultata, utvrdili smo da razina LC3-II raste s diferencijacijom megakariocita, te da je autofagijski fluks veći u nezreljim stanicama.

Ključne riječi: autofagija, LC3, megakariociti, DAMI stanice, autofagijski fluks

SUMMARY

Autophagy is an intracellular process involved in degradation of both unwanted cytoplasmic components such as proteins, lipids or nucleotides, and different cellular organelles. Its goal is to reuse degraded content in biosynthetic processes or to generate energy. Because of that, autophagy is considered to be one of the main mechanisms for cell adaptation to unfavorable intracellular conditions such as nutrient starvation, hypoxia, innate immune signals etc. In addition to physiological signals, the autophagy process can be disrupted by the use of various pharmacological agents that stimulate its activity or inhibition. There are plenty of autophagy physiological roles, but one of the most important is in the development and differentiation. Because it also affects megakaryopoiesis and thrombopoiesis, in this study, using Western blot analysis and antibody against LC3-II autophagy marker, we examined its levels in different developmental stages of primary mouse megakaryocytes and platelets, and also in the human cell line DAMI. Furthermore, we analyzed the level of autophagy in the bone marrow derived megakaryocytes that were treated with inducer or inhibitors of autophagy. Finally, LC3 was also monitored by transfecting DAMI cells with mRFP-GFP-LC3 plasmid, in order to assess autophagic flux. The presence of LC3 was visualised in the form of punctate structures that correlate with autophagy structures within the cells. Based on the results obtained, we determined that LC3-II levels increase with differentiation of megakaryocytes and that autophagy flux is higher in less mature cells.

Key words: autophagy, LC3, megakaryocytes, DAMI cells, autophagic flux

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Autofagija.....	1
1.1.1 Podjela autofagije	2
1.2. Makroautofagija i nastanak autolizosoma.....	3
1.2.1 Indukcija	3
1.2.2. Nukleacija	4
1.2.3. Elongacija	4
1.2.4. Fuzija autofagosoma i lizosoma	6
1.3. Regulacija autofagije.....	7
1.4. Indukcija i inhibicija autofagije	9
1.5. Megakariociti	10
1.5.1. Utjecaj autofagije na megakariopoezu i trombopoezu	11
2. Cilj rada	13
3. Materijali i metode.....	14
3.1. Primarni megakariociti	14
3.1.1. DAMI stanična linija	14
3.2. Modulacija autofagije u uzorcima primarnih stanica	15
3.3. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot	15
3.4. Transfekcija DAMI stanica.....	16
4. Rezultati	18
4.1. Usporedba autofagije u megakariocitima i trombocitima	18
4.2. Indukcija i inhibicija autofagije u različitim razvojnim stadijima megakariocita razvijenih iz koštane srži	20
4.3. Ispitivanje razine autofagije u DAMI staničnoj liniji	23
4.4. Mjerenje autofagijskog fluksa unutar DAMI stanica	26
4.4.1. Nestimulirane DAMI stanice.....	26
4.4.2. DAMI stanice stimulirane s PMA	27
5. Rasprava.....	29
6. Zaključak	33
7. Literatura.....	34
8. Životopis	41

1. Uvod

1.1. Autofagija

Autofagija je unutarstanični proces u kojem dolazi do lizosomalne razgradnje citoplazmatskih komponenti uključujući makromolekule poput većine dugoživućih proteina i njihovih agregata, lipida, nukleotida, ali i organela kao što su mitohondriji, peroksisomi i endoplazmatski retikulum. Ovaj degradacijski sustav prisutan je u eukariota i osobito je aktivan za vrijeme diferencijacije i razvoja [1]. Brojne su fiziološke beneficije ovog procesa koje su otkrivene tek 90-ih godina prošlog stoljeća zajedno s otkrićem gena koji reguliraju autofagiju (ATG, engl. *autophagy related genes*) potrebnih za ostvarenje autofagije [2]. One uključuju održavanje stanične homeostaze, supresiju nastanka tumora, eliminaciju unutarstaničnih patogena, prezentaciju antigena i sl. Međutim, najznačajnija uloga autofagije zasigurno je omogućavanje adaptivnog odgovora stanice u uvjetima gladovanja [3].

Osim navedenih uloga, važno je napomenuti njen utjecaj za vrijeme diferencijacije i razvoja pa je tako autofagija nužna za preimplantacijski razvoj kod sisavaca, preživljavanje tijekom neonatalnog gladovanja te diferencijaciju različitih vrsta stanica tijekom eritropoeze, trombopoeze, limfopoeze i adipogeneze [1].

Iako je glavna zadaća autofagije prvenstveno protektivne prirode, ona može sudjelovati i u staničnoj smrti. Dva su načina na koji disfunkcija autofagije rezultira staničnom smrću: aktivacijom apoptoze ili kao posljedica nemogućnosti stanice da preživi nespecifičnu degradaciju citoplazmatskih komponenti [4].

Osim stanične smrti, nekontrolirana degradacija makromolekula i proteina može dovesti do nastanka brojnih bolesti kao što su različiti tipovi karcinoma i neurodegenerativne bolesti. Upravo je rak jedna od prvih bolesti za koju je dokazano da je vezana uz poremećenu autofagiju,

najvjerojatnije zbog njene uloge u supresiji tumora [5]. Kod neurodegeneracije, postoje brojni dokazi da autofagija zaista štiti neurone od propadanja, ali sam mehanizam još nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da krivo smotani proteini stvaraju agregate koji uzrokuju različite bolesti pa je jedna od pretpostavki da se u procesu lizosomalne razgradnje takvi proteini uklanjaju. Primjer proteina koji se autofagijom degradira je alfa-sinuklein koji uzrokuje Parkinsonovu bolest te proteini koji sadrže poliglutamin, a uzrokuju Huntingtonovu bolest [6][7].

1.1.1 Podjela autofagije

Tri su poznata tipa autofagije: mikroautofagija, šaperonima-posredovana autofagija (CMA, engl. *chaperone-mediated autophagy*) i makroautofagija [3].

Mikroautofagija je neselektivan proces u kojem dolazi do direktnog unosa topljivih citoplazmatskih komponenti u lizosome. Molekule ili organele dospjevaju u lumen lizosoma putem invaginacija lizosomalne membrane [8].

Sljedeći tip je CMA, visoko specifična autofagija koja se odvija isključivo u sisavaca. Ovaj proces razlikuje se od makroautofagije i mikroautofagije prvenstveno u načinu na koji su proteini prepoznati za lizosomalnu razgradnju, ali i načinu njihova transporta do lumena lizosoma [9].

U CMA dolazi do razgradnje velikog broja različitih supstrata uključujući glikolitičke enzime, transkripcijske faktore i njihove inhibitore, proteine koji se vežu za lipide, one uključene u vezikularni promet i brojne druge. Svi navedeni sadrže pentapeptidnu sekvencu (motiv) KFERQ. Upravo taj motiv prepoznaju citosolni šaperoni, od kojih je najpoznatiji HSPA8/HSC70 (engl. *heat shock 70kDa protein 8*) protein. HSPA8/HSC70 prenosi supstrat do lizosomalne membrane i ondje ga odmotava. Tako odmotan

supstrat veže se za monomer LAMP2A (engl. *lysosomal-associated membrane protein 2A*) što dovodi do multimerizacije receptora i ulaska samog supstrata u unutrašnjost lizosoma [3]

Posljednji i najpoznatiji tip autofagije, o kojem će u ovom radu i biti riječ, je makroautofagija.

1.2. Makroautofagija i nastanak autolizosoma

Makroautofagija (dalje referirana kao autofagija) je proces čiji je glavni korak *de novo* sinteza autofagosoma koji sadrži makromolekule i organele namijenjene za degradaciju. Autofagosomi se potom spajaju s lizosomima prilikom čega nastaje autolizosom u čijem lumenu, zahvaljujući niskom pH i hidrolazama, konačno dolazi do razgradnje neželjenih molekula ili oštećenih organela [10]. Sam proces autofagije podijeljen je u nekoliko koraka: indukcija, nukleacija i elongacija prethode nastanku autofagosoma, nakon čega slijedi njegovo sazrijevanje i fuzija s lizosomom [3]. U svim navedenim koracima sudjeluju različiti proteinski kompleksi, a najvažniju ulogu imaju ATG proteini [10].

1.2.1 Indukcija

Sinteza autofagosoma u sisavaca započinje zahvaljujući inicijacijskom kompleksu kojeg prvenstveno čine ULK1 ili ULK2 Ser/Thr kinaza (engl. *Unc-51-like kinase family*), ATG13 te RB1CC1 (engl. *RB1-inducible coiled-coil 1*) proteini. Kompleks također čini i C12orf44/ATG101 koji se direktno veže na ATG13. ULK1/2-ATG13-RBCC1 kompleks je stabilan te nastaje uvijek, neovisno o statusu hranjivih tvari [3].

Unutar inicijacijskog kompleksa može doći do asocijacije mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*). mTORC1 je važan regulator rasta stanica koji svoju ulogu ostvaruje ovisno o statusu

hranjivih tvari unutar stanice, npr. količini aminokiselina [13]. Ukoliko u stanici prevladava obilje hranjivih tvari, mTORC1 je vezan za inicijacijski kompleks. U tom slučaju, on fosforilira ULK1/2 i ATG13 i inaktivira ih, pa je daljnji put sinteze autofagosoma zaustavljen.

S druge strane, u uvjetima deprivacije hranjivih tvari ili nakon tretmana stanica s rapamicinom, makrolidnim antibiotikom koji inducira autofagiju, mTORC1 disocira s inicijacijskog kompleksa. Tada dolazi do defosforilacije na prethodno navedenim mjestima što rezultira stvaranjem tzv. izolacijske membrane, odnosno fagofora kao početne autofagijske strukture (Slika 1.) [3][13].

1.2.2. Nukleacija

Sljedeći kompleks proteina je ATG14 kompleks koji sadrži PI3K (engl. *class III phosphatidylinositol 3 kinase*) kinazu klase III. Kompleks čini nekoliko različitih proteina: PIK3C3/VPS34, PIK3R4/VPS15 te BECN1 (beclin1).

Proteini ovog kompleksa odgovorni su za fosforilaciju fosfatidilinozitola (PI, engl. *phosphatidylinositol*) čime nastaje fosfatidilinozitol 3-fosfat (PI3P, engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*). U uvjetima deprivacije aminokiselina dolazi do akumulacije PI3P na površini fagofora što privlači druge proteine koji se na njega vežu. Primjer su WIPI1 i WIPI2 te ZFYVE/DFCP1 (engl. *zinc finger, FYVE domain containing 1*). Iako su uključeni u autofagiju, funkcija ovih proteina još je uvijek nepoznata [3][10].

1.2.3. Elongacija

U procesu autofagije su dva sustava koja uključuju proteine nalik ubikvitinu (UBL, engl. *ubiquitin-like*) te doprinose ekspanziji izolacijske membrane, a to su ATG12 i ATG8/LC3 konjugacijski sustav [10].

ATG12 konjugacijski sustav rezultira stvaranjem ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksa. Do konjugacije ATG12 i ATG5 proteina dolazi pod utjecajem ATG7 i ATG10 enzima koji kataliziraju reakciju. ATG7 djeluje slično kao E1 aktivacijski enzim (*E1-like*) koji aktivira ubikvitinu slične proteine. U ovom slučaju katalizira kovalentnu konjugaciju karboksilnog kraja ATG12 glicina na ATG5 lizinski ostatak [14]. ATG10 pak djeluje kao E2 enzim (*E2-like*), a njegova zadaća je transfer novostvorenog ATG12-ATG5 kompleksa kroz stanicu [15]. U konačnici dolazi do direktnog nekovalentnog vezanja između ATG12-ATG5 kompleksa i ATG16L1 [10].

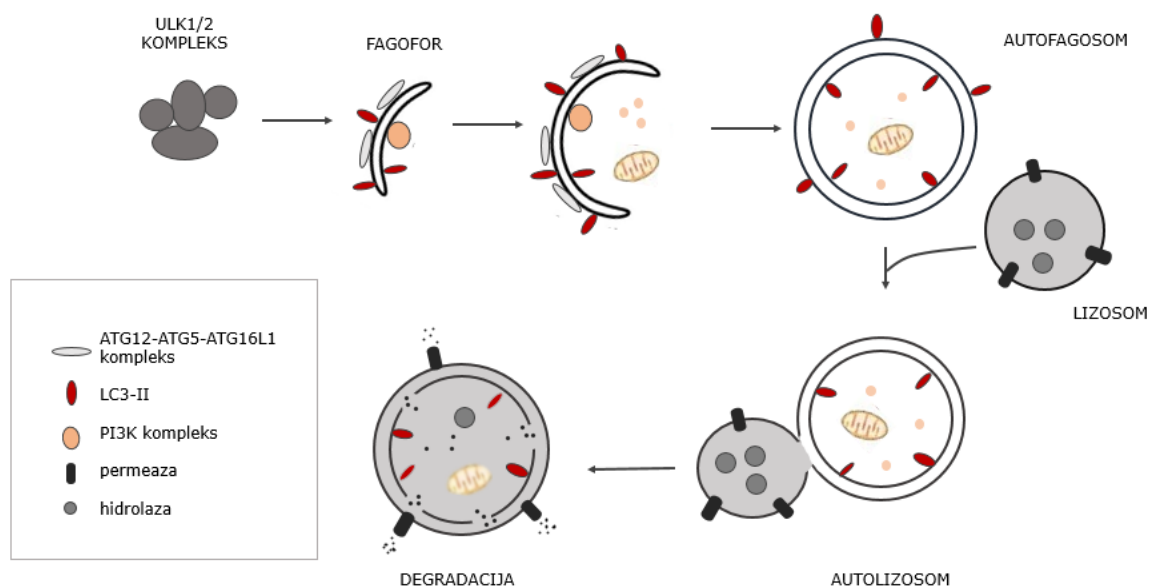
ATG12, ATG5 i ATG16L1 su često korišteni markeri autofagije. Njihov konjugacijski kompleks lokaliziran je na membrani fagofora, ali disocira s membrane odmah nakon završetka formiranja autofagosoma. Upravo zbog toga koriste se kao markeri samo za početne korake u sintezi autofagosoma [10].

Sljedeći UBL sustav koji je uključen u ekspanziju izolacijske membrane je ATG8/LC3 (engl. *light chain 3*) sustav. Njegova razlika u odnosu na ATG12-ATG5-ATG16L1 je ta što ne dolazi do konjugacije s proteinima već sa molekulom fosfatidiletanolamina (PE, engl. *phosphatidylethanolamine*) [10]. Ovaj konjugacijski put započinje procesuiranjem prekursora LC3 od strane proteaze ATG4, prilikom čega dolazi do izlaganja glicinskog ostatka na njegovom C kraju. Tako procesuiran LC3 poznat je pod nazivom LC3-I. ATG7 protein ovdje ponovno djeluje slično kao E1 enzim koji aktivira LC3-I i prenosi ga do enzima sličnog E2, odnosno ATG3. LC3-I potom biva kovalentno konjugiran s molekulom PE te nastaje LC3-II. Ovaj posljednji korak katalizira prethodno opisan ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleks koji djeluje slično kao E3 enzim (*E3-like*), odnosno E3 ligaza [3][10].

LC3-II asocira s izolacijskom membranom, ali i autofagosomima, pa je uz ULK1, WIPI1/2 i ATG5 jedan od najpoznatijih markera za analizu autofagije [16].

1.2.4. Fuzija autofagosoma i lizosoma

Svi prethodno opisani koraci rezultiraju ekspanzijom izolacijske membrane koja nakon određenog vremena sazrije i zatvori se, te konačno nastaje autofagosom (Slika 1.). Autofagosom sadrži dvije membrane, a u njegovoj unutrašnjosti zarobljen je sadržaj kojeg je potrebno razgraditi. Zahvaljujući mikrotubulima, autofagosomi kroz stanicu putuju prema multivezikularnim tijelima- kasnim endosomima ili lizosomima. Pod utjecajem proteina syntaxin 17, SNAP29, VAMP3 i VAMP8 dolazi do fuzije vanjske membrane autofagosoma i lizosoma te nastaje autolizosom [17]. Njegov je lumen izuzetno kiseo, a sadrži i hidrolaze, što rezultira razgradnjom neželjenog sadržaja, ali i same unutrašnje membrane autolizosoma. Degradirani sadržaj vraća se u citoplazmu gdje ga stanica koristi u biosintetskim procesima ili za stvaranje energije [3].



Slika 1. Morfologija autofagije. Proces sinteze autolizosoma započinje inicijacijskim kompleksom ULK1/2-ATG12-RBCC1 te se stvara izolacijska membrana, odnosno fagofor. Izolacijska membrana sazrijeva i zatvara se oko neželjenog sadržaja te nastaje autofagosom koji fuzijom s lizosomom u konačnici daje autolizosom. Na površini svake autofagijske strukture mogu se pronaći specifični markeri poput LC3-II, proteina PI3K

kompleksa itd. (Slika napravljena po uzoru na Katherine R. Parzych, Daniel J. Klionsky. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. Discoveries. 2014;20.)

1.3. Regulacija autofagije

Već je spomenuto da je autofagija nužna za održavanje stanične homeostaze te da ima brojne fiziološke prednosti. Međutim, neregulirana degradacija citoplazmatskog sadržaja može biti i letalna te dovesti do pojave brojnih poremećaja i bolesti. Stoga je veoma važno da je proces autofagije strogo reguliran, odnosno da se ona unutar stanice održava na bazalnoj razini te inducira onda kada je to potrebno [5].

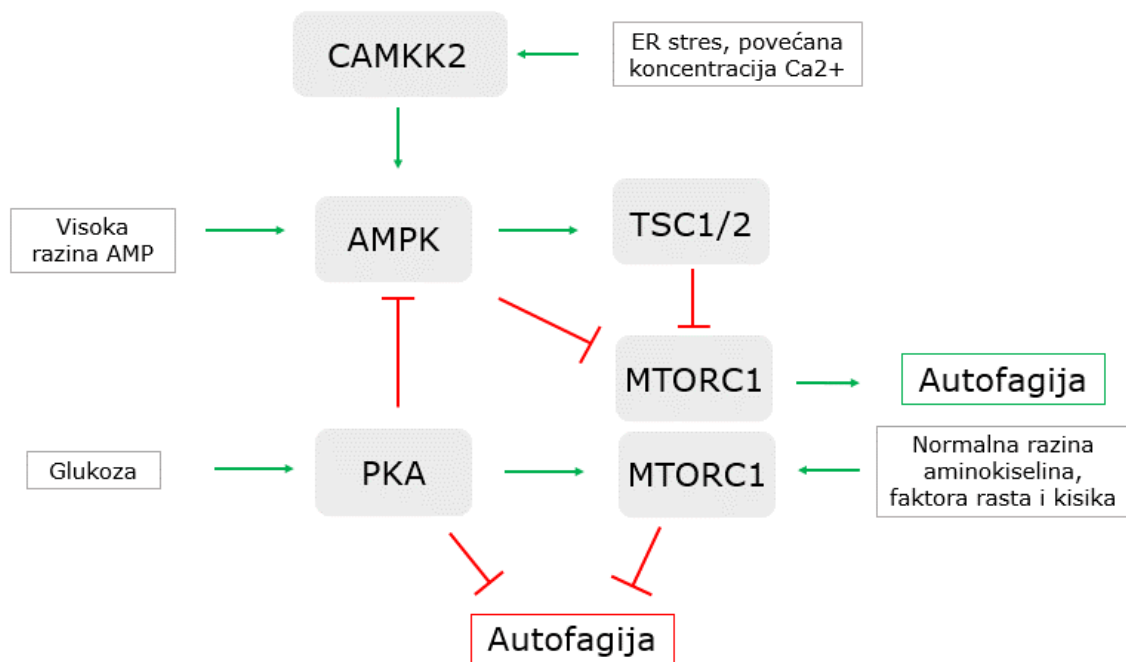
Za regulaciju makroautofagije potrebne su tri različite kinaze: PKA (engl. **protein kinase A**), AMPK (engl. **AMP-activated protein kinase**) i mTORC1. Sve tri reagiraju i vrše svoju funkciju ovisno o različitim izvanstaničnim i unutarstaničnim signalima, poput razine glukoze, aminokiselina, kisika, faktora rasta, ATP-a [3].

Prva od navedenih je PKA ovisna o cAMP. Kada stanica obiluje hranjivim tvarima, ona djeluje kao inhibitor autofagije na način da fosforilira i inaktivira LC3. Uz ovu, ima i indirektnu funkciju koju ostvaruje putem interakcije s mTORC1 i AMPK. U takvim uvjetima fosforilira i aktivira mTORC1 koji tako aktivan inhibira proces autofagije. Također može i inaktivirati AMPK što rezultira aktivacijom mTORC1 i ponovnom inhibicijom procesa [3].

mTORC1 je pozitivno reguliran razinom aminokiselina unutar stanice i to putem RAG proteina (engl. **recombination-activating genes**). mTORC1 je u prisutstvu aminokiselina aktivan i proces autofagije je zaustavljen [3].

AMPK je kinaza koja ovisi o razini AMP, tj. ATP unutar stanice. Ona se aktivira kada poraste koncentracija unutarstaničnog AMP u odnosu na ATP pod utjecajem različitih vrsta stresa kao što su hipoksija, deprivacija

hranjivih tvari ili glukoze itd [18]. AMP se veže za AMPK i tako ju aktivira. Svoju kinaznu aktivnost ona dalje ostvaruje putem direktne ili indirektno interakcije s mTORC1. Jedan način na koji inducira autofagiju je direktna inhibicija mTORC1 koji tada disocira s ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleksa te dolazi do formiranja izolacijske membrane. Drugi mogući način je fosforilacija i aktivacija TSC1/2 kompleksa koja također rezultira inhibicijom mTORC1 [3]. Osim zbog povećane razine AMP u stanici, AMPK može biti aktivirana pod utjecajem CAMKK2 (engl. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*) kinaze koja se aktivira kao rezultat povišene koncentracije citosolnog Ca^{2+} [3].



Slika 2. Regulacija autofagije. Tri glavne kinaze za regulaciju autofagije su AMPK, PKA i mTORC1 koje, uz ostale proteine poput CAMKK2 i TSC1/2 odgovaraju na različite signale te, ovisno o njima, reguliraju proces autofagije. Zelene strelice označavaju aktivaciju ciljnih meta pojedinih kinaza, a crvene njihovu inhibiciju. (Slika napravljena po uzoru na Katherine R. Parzych, Daniel J. Klionsky. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. Discoveries. 2014;20.)

1.4. Indukcija i inhibicija autofagije

Najpoznatiji induktor autofagije zasigurno je deprivacija hranjivih tvari u stanici. Štoviše, autofagija zapravo i predstavlja mehanizam kojim se stanica adaptira na stanje gladovanja. U takvim uvjetima, stanica je prisiljena razgraditi dio svog citoplazmatskog sadržaja u metabolite koji mogu sudjelovati u stvaranju energije ili različitim biosintetskim procesima, te na taj način osigurati preživljenje [5]. Uz deprivaciju hranjivih tvari, autofagiju mogu inducirati i druge vrste stresa poput hipoksije, visoke temperature itd, ali i hormonalna stimulacija, signali urođene imunosti, različite bolesti i sl. [2]

Osim navedenih veoma je važan učinak farmakoloških agensa kao alata u izučavanju autofagije. Najpoznatije kemijske tvari koje mogu modulirati proces autofagije su rapamicin, bafilomicin i VPS34-IN1 [19].

Rapamicin je lipofilni makrolidni antibiotik koji se koristi kao fungicid, imunosupresiv te u terapiji različitih vrsta tumora [20]. Njegova glavna i specifična meta je mTORC1. Rapamicin se veže za imunofilin FKBP12 (engl. **FK506 binding protein**) prilikom čega nastaje FKBP12-rapamicin kompleks. Takav kompleks ulazi u interakciju s mTORC1 i inaktivira ga. Inaktivirani mTORC1 disocira s ULK1/2-ATG12-RBCC1 inicijacijskog kompleksa zbog čega isti postaju aktivni. To rezultira promocijom autofagije te sintezom fagofora [20].

Za razliku od rapamicina koji inducira autofagiju, bafilomicin A1 i VPS34-IN djeluju kao njeni inhibitori [19]. Bafilomicin A1 je specifičan i potentan inhibitor V-ATPaze koja je lokalizirana u organelama kao što su vezikule, endosomi, lizosomi ili Golgijev aparat. Glavna zadaća V-ATPaze u navedenim staničnim odjeljcima je održavanje kiselog pH u njihovom lumenu. Acidifikacija lumena lizosoma od strane V-ATPaze nužna je za njegovu fuziju s autofagosomom. Stoga, inhibicija V-ATPaze ne dovodi do sazrijevanja autofagosoma u autolizosome, već do njihovog nakupljanja

unutar stanice. Posljedično dolazi do nemogućnosti razgradnje endogenih proteina i neželjenih staničnih organela [21].

VPS34-IN1 je specifičan i potentan inhibitor PIK3C3/VPS34 proteina koji autofagiju inhibira za vrijeme nukleacije. VPS34 pripada skupini PI3 kinaze koja ulazi u interakciju s dva prethodno spomenuta proteina- BECN1 (beclin 1) i PIK3R4/VPS15 te zajedno s njima sudjeluje u fosforilaciji PI u PI3P.

Inhibicijom VPS34, znatno se smanjuje razina PI3P na površini fagofora i ostalih autofagijskih struktura. Time je onemogućeno stvaranje platforme za vezanje drugih proteina i sama daljnja sinteza autofagosoma [22].

1.5. Megakariociti

Megakariociti su malobrojne stanice nastale iz mijeloidne progenitorske loze koje je prvenstveno moguće pronaći u koštanoj srži, ali i u plućima te perifernoj krvi. Ove stanice prekursori su za sintezu trombocita, malih krvnih stanica bez jezgre koje su odgovorne za zaustavljanje krvarenja. Megakariociti su promjera 50-100 μm te time nadmašuju veličinu ostalih krvnih stanica. Osim veličine, njihovo specifično svojstvo je i ploidnost jezgre [23].

Trenutno jedini poznati citokin koji potiče potpuno sazrijevanje megakariocita je trombopoetin. Iako on svoju ulogu ostvaruje putem interakcije s brojnim drugim citokinima poput IL-3, IL-6 i IL-11, oni nisu nužni za proces maturacije [23]. Prilikom sazrijevanja, megakariociti postaju veći, povećavaju i mijenjaju sadržaj citoskeleta unutar citoplazme i dobivaju specifičan membranski sustav bogat cisternama i tubulima. Sam proces stvaranja trombocita započinje endomitozom jezgre kojom megakariociti postaju poliploidni kroz cikluse replikacija DNA, bez citokineze. Endomitozu prati sinteza organela te sazrijevanje i ekspanzija citoplazme. Proces sazrijevanja karakteriziraju i promjene unutar samog citoskeleta. Naime, mikrotubuli putuju prema staničnoj membrani, a

pseudopodiji bogati tubulinom se izdužuju i granaju što dovodi do stvaranja protrombocita. Protrombociti prolaze kroz spojeve endotelne stanice krvnih žila u koštanu srž, a iz njih se, u konačnici, oslobađaju zreli trombociti [24].

1.5.1. Utjecaj autofagije na megakariopoezu i trombopoezu

Pokazalo se da je osim uz neurodegenerativne bolesti i različite vrste karcinoma, poremećena autofagija rezultirala različitim hematološkim poremećajima kao što su mijelodisplastični sindrom i akutna mijeloidna leukemija [25]. Osim navedenog, izostanak autofagije rezultira i disfunkcijom mitohondrija i staničnog ciklusa što također dovodi do brojnih poremećaja poput limfopenije [26].

Uloga autofagije istraživana je i u megakariopoezi i trombopoezi. Indukcija ili inhibicija autofagije farmakološkim agensima poput rapamicina i bafilomicina ili pak izlaganje nezrelih megakariocita gladovanju dovelo je do brojnih poremećaja u procesu stvaranja trombocita. Ukoliko se radi o stanicama fetalne jetre koje predstavljaju rani stadij sazrijevanja megakariocita dolazi do abnormalne megakariopoeze, redukcije poliploidnosti megakariocita te smanjene proizvodnje protrombocita, kao i otpuštanja trombocita u koštanu srž [27].

Potpuni gubitak autofagije uzrokovan delecijom ATG7 gena u nezrelim megakariocitima također dovodi do poremećaja u megakariopoezi i trombopoezi, rezultirajući proizvodnjom abnormalnih trombocita. Takvi trombociti su malobrojniji i mnogo veći od uobičajenog, a raznim testovima utvrđeno je da je njihova agregacija nakon ozljede smanjena, zbog čega je vrijeme krvarenja produljeno. Međutim, ometanje autofagije u zrelim megakariocitima nije rezultiralo abnormalnom megakariopoezom te nije uočena razlika u ploidnosti i broju megakariocita, kao ni broju trombocita, što upućuje na to da inhibicija ili indukcija autofagije suprimira megakariopoezu i trombopoezu samo ako se ona odvija u

ranom stadiju megakariopoeze [17] [27].

Sva ova saznanja upućuju na to da je autofagija proces koji se aktivno odvija tijekom nastanka trombocita te da je nužna za održavanje broja trombocita u organizmu.

2. Cilj rada

Autofagija je važan unutarstanični proces koji sudjeluje u održavanju stanične homeostaze u uvjetima deprivacije hranjivih tvari.

Nedavnim istraživanjima pokazalo se da ometanje autofagije u ranom razvojnom stadiju megakariocita negativno utječe na megakariopoezu i trombopoezu, dok poremećena autofagija u zreлом stadiju megakariocita ne daje iste rezultate. Ova saznanja daju naslutiti da je u ranom stadiju sazrijevanja megakariocita, važnost i uloga autofagije mnogo veća u odnosu na već zrele stanice [27].

Kao što je navedeno u uvodnom dijelu ovoga rada, pokazalo se da se autofagija može omesti na nekoliko različitih načina: farmakološkim agensima ili pak deprivacijom hranjivih tvari. Inhibicijom ili indukcijom autofagije dolazi do promjene u broju autofagosoma unutar stanice koja korelira s količinom LC3-II kao markera autofagije [2]. Stoga je cilj ovog rada bio:

1. Western blot analizom LC3-II proteina ispitati razinu autofagije u različitim stadijima primarnih mišjih megakariocita razvijenih iz fetalne jetre, u mišjim trombocitima te u različitim stadijima humane megakariocitne stanične linije DAMI.
2. Western blot analizom LC3-II proteina ispitati razinu autofagije u primarnim mišjim megakariocitima razvijenim iz koštane srži tretiranih različitim kombinacijama farmakoloških agensa koji induciraju ili inhibiraju autofagiju.
3. Ispitati razinu autofagijskog fluksa u različitim razvojnim stadijima megakariocitne stanične linije DAMI, uz rapamicin kao pozitivnu kontrolu. U tu svrhu, DAMI stanice transficirane su s mRFP-GFP-LC3 plazmidom i vizualizirane fluorescentnim mikroskopom.

3. Materijali i metode

3.1. Primarni megakariociti

Za Western blot analize korišteni su već pripremljeni uzorci mišjih megakariocita iz koštane srži i fetalne jetre dobiveni ljubaznošću doktorandice Ivane Bertović (Laboratorij za hematopoezu, Odjel za biotehnologiju). Ukratko, primarne stanice kultivirane su u DMEM mediju uz 10% fetalni goveđi serum (FBS, engl. *fetal bovine serum*, *Pan-Biotech*), penicilin i streptamicin (*Pan-Biotech*) uz prisustvo trombopoetina na 37°C, pri 4-5% CO₂.

3.1.1. DAMI stanična linija

Za Western blot analizu korišteni su uzorci DAMI megakariocitne stanične linije dobiveni ljubaznošću diplomandice Ane Bura (Laboratorij za hematopoezu, Odjel za biotehnologiju).

DAMI stanična linija je humana megakariocitična linija dobivena iz krvi pacijenata s megakarioblastičnom anemijom. Ova linija predstavlja rani razvojni stadij megakariocita te služi kao prikladan stanični model za proučavanje biokemije, funkcije i diferencijacije megakariocita. DAMI stanice rastu primarno u suspenziji, karakterizira ih svojstvo samoobnavljanja, a dostižu veličinu od 12-120 µm. Diferencijacija ovih stanica može biti potaknuta korištenjem forbol miristat acetata (PMA, engl. *phorbol myristate acetate*) [28].

Za pokuse DAMI stanice kultivirane su u RPMI 1640 mediju uz 10% FBS (*Pan-Biotech*), penicilin i streptamicin (*Pan-Biotech*) na 37°C, pri 4-5% CO₂. Stanice su potom centrifugirane na 1000 rpm 5 minuta te resuspendirane u novom, zagrijanom potpunom RPMI mediju u koncentraciji od 10⁶ stanica. Za diferencijaciju stanice su kultivirane u

prisutstvu 100 nM PMA u navedenim vremenima.

3.2. Modulacija autofagije u uzorcima primarnih stanica

Mišji primarni megakariociti iz koštane srži tretirani su različitim kombinacijama farmakoloških agensa koji moduliraju autofagiju u punom mediju. Za indukciju autofagije korišten je 200 nM rapamicin. Za inhibiciju autofagije korišteni su 100 nM bafilomicin A1 te 5 μ M VPS34-IN1. Vrijeme inkubacije s induktorima i inhibitorima je 2h, nakon čega su uzorci pripremljeni za analizu Western blotom. Ovako tretirane i pripremljene stanice također su dobivene ljubaznošću doktorandice Ivane Bertović.

3.3. SDS-PAGE elektroforeza i Western blot

Prije nanošenja na gel, uzorci stanica držani su na ledu i kratko centrifugirani. Proteini su razdvojeni natrij dodecil sulfat-poliakrilamid elektroforezom (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Pripremljen je 15% poliakrilamidni donji gel za razdvajanje (TRIS-HCl [1.5 M, pH 8.8], 10% SDS, 30% akrilamid, TEMED, 10% amonij persulfat [APS, engl. *ammonium persulfate*], destilirana voda), te 5% poliakrilamidni gornji gel za sabijanje uzoraka (TRIS-HCl [1.0 M, pH 6.8], 10% SDS, 30% akrilamid, TEMED, 10% APS, destilirana voda). Uzorci su razdvajani na gelu u puferu za elektroforezu (250 mM Tris, 192 mM glicin, 35 mM natrijev dodecil sulfat) koja je prvih 15 minuta provedena na 70V, a potom na 130V nešto dulje od sat vremena. Za praćenje veličine proteina korišten je proteinski standard (*Thermo Scientific #26619*).

Proteini su s gela potom preneseni na PVDF membranu (*Millipore*) u puferu za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol). Transfer je proveden na 1A tijekom dva sata. Membrane su potom blokirane u 3%

goveđem serumskom albuminu (BSA, engl. *bovine serum albumine*) u TBS-T (engl. *Tris buffered saline-Tween*: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) čime je spriječeno nespecifično vezanje protutijela na membrane. Nakon 45-minutnog blokiranja, membrane su inkubirane poliklonalnim zečjim primarnim protutijelom na LC3 (*Mbl*, razrjeđenje 1:1000 u 3% BSA u TBS-T uz 5% natrijevog azida) te mišjim anti-GAPDH primarnim protutijelom (*Calbiochem*) preko noći na +4°C uz trešnju.

Sljedeći dan membrane su isprane 3x po 10 minuta sa 0,1% TBS-T nakon čega su dodana sekundarna protutijela. Korišteno je anti-zečje i anti-mišje protutijelo (1:5000, *Cell Signaling*) konjugirano s peroksidazom hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) i te su membrane inkubirane na tresilici 1h. Nakon sat vremena, membrane su isprane 3x po 10 minuta sa 0,1% TBS-T. Proteinski bendovi vizualizirani su korištenjem reagensa otopine luminola i otopine peroksida (*Thermo Scientific*) u omjeru 1:1 i slikani na *ChemiDoc MP* (*Bio-Rad*).

3.4. Transfekcija DAMI stanica

Po 500 µL DAMI stanica nasađeno je na stakalca u pločici s 24 jažice u koncentraciji 200 000 stanica/mL.

Za transfekciju je korišten Lipofectamine™ 3000 reagens (*ThermoFisher*). Prema protokolu proizvođača, pripravljena su dva MasterMix-a za transfekciju. Prvi MasterMix sadrži 24,25 µL Opti-MEM medija te 0,75 µL Lipofectamine 3000 reagensa. Drugi MasterMix sadrži 23,17 µL Opti-MEM medija, 1 µL P3000 reagensa i 500 ng plazmidne DNA (mRFP-GFP-LC3, dobiven ljubaznošću dr. sc. Ivane Munitić, Laboratorij za molekularnu imunologiju, Odjel za biotehnologiju). Oba MasterMix-a su pomiješana te inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon inkubacije, stanice su transficirane s 50 µL MasterMix-a po jažici te je dodan 100 nM PMA koji rezultira sazrijevanjem megakariocita. Stanice su ostavljene preko noći, a uspješnost transfekcije praćena je fluorescentnim mikroskopom.

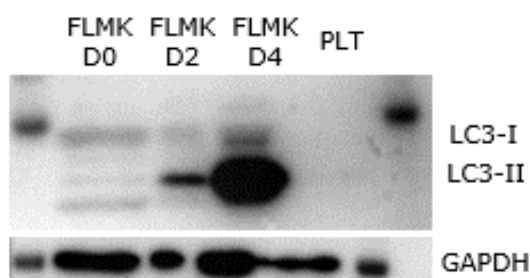
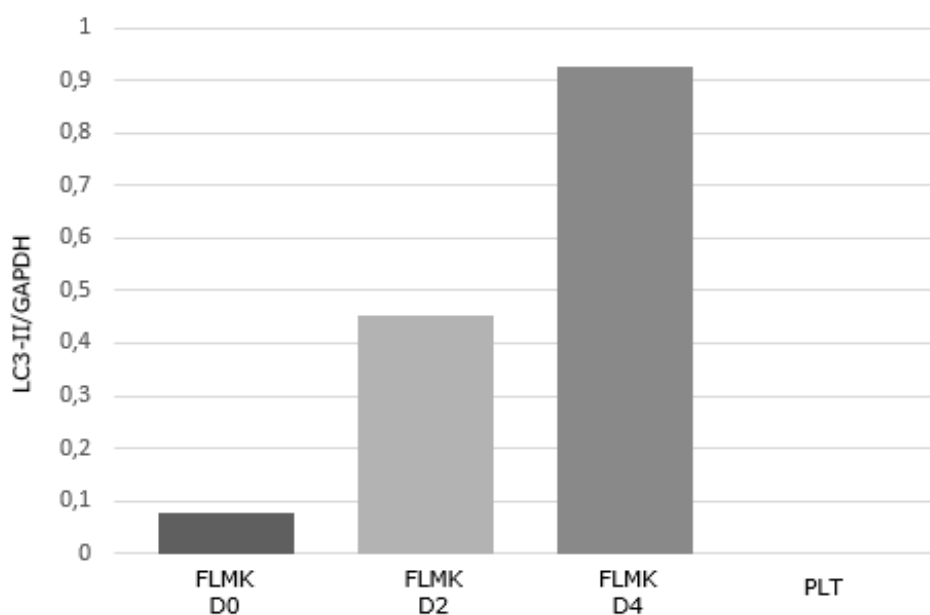
Stanice su tretirane s rapamicinom (*Calbiochem*) 22h nakon transfekcije. 24h nakon transfekcije, odnosno 2h nakon dodatka rapamicina, stanicama je dodan 4% paraformaldehid (PFA, engl. ***paraformaldehyde***) s ciljem zaustavljanja reakcije i fiksacije stanica. 15 minuta nakon inkubacije s PFA, stanice su isprane PBS-om. Svi uzorci analizirani su fluorescentnim mikroskopom (*Olympus IX 83*).

4. Rezultati

4.1. Usporedba autofagije u megakariocitima i trombocitima

Jedan od najkorištenijih markera autofagije zasigurno je LC3 protein. Njegov modificirani oblik, LC3-II jedini je protein lokaliziran na membranama svih autofagijskih struktura, uključujući izolacijske membrane, autofagosome i autolizosome [29].

Za praćenje ekspresije LC3-II i ekspresije njegova prekursora LC3-I, provedena je Western blot analiza. U pokusima su korištene progenitorske stanice (dan 0), nezreli (dan 2) i zreli (dan 4) megakariociti razvijeni iz fetalne jetre te mišji trombociti. Kao što je vidljivo na Slici 3A, prisutna su dva očekivana proteinska *benda* u uzorcima progenitorskih stanica i megakariocita: LC3-I na 14 kDa te LC3-II na 16 kDa. Diferencijacijom progenitorskih stanica (dan 0) u megakariocite (dan 2) raste razina LC3-II proteina. Sazrijevanjem megakariocita (dan 4), nadalje raste razina LC3-II proteina, odnosno dolazi do njegove akumulacije unutar stanice što bi upućivalo na visoku razinu autofagije (Slika 3A i 3B, kvantifikacija). Suprotno tome, ekspresija LC3-I i LC3-II u trombocitima nije uočljiva. Ovi rezultati sugeriraju da tijekom diferencijacije megakariocita iz fetalne jetre raste razina autofagije te da je u zrelijim stanicama visoka razina bazalne autofagije.

A**B****Slika 3. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima i trombocitima.**

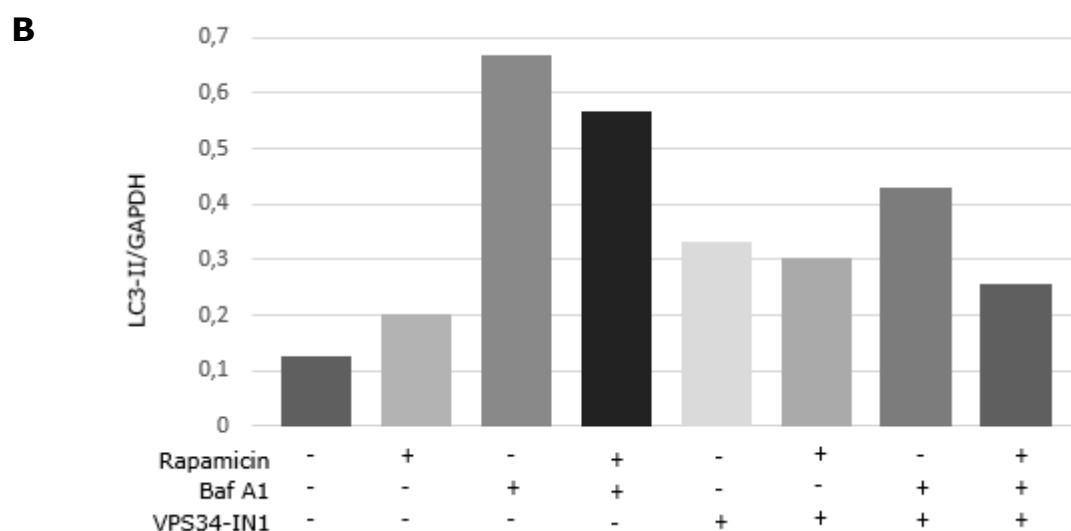
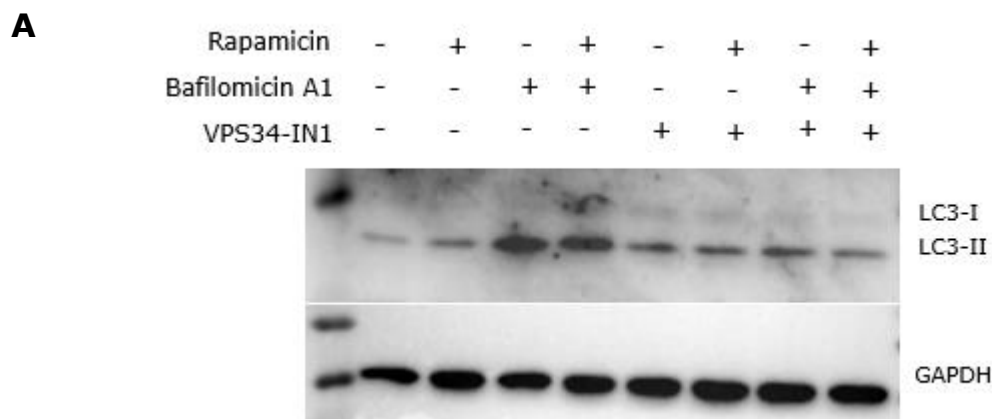
Analizirani su uzorci megakariocita nultog, drugog i četvrtog dana razvoja iz fetalne jetre (FLMK D0, FLMK D2, FLMK D4) te trombociti (PLT). Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom. **(A)** Prikaz rezultata Western blot analize ekspresije LC3-I i LC3-II, uz vizualizaciju glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) kao kontrole količine proteina nanese na gel. LC3 je vizualiziran korištenjem primarnog zečjeg anti-LC3 protutijela (1:1000, *Mbl*) i sekundarnog anti-zečjeg protutijela (1:5000, *Cell Signaling*). **(B)** Grafički prikaz kvantifikacije rezultata Western blot analize za LC3-II. Kvantifikacija Western blot analize napravljena je u ImageJ programu.

4.2. Indukcija i inhibicija autofagije u različitim razvojnim stadijima megakariocita razvijenih iz koštane srži

Western blot analizom nadalje je praćena razina autofagije u primarnim megakariocitima razvijenim iz koštane srži. Ove stanice tretirane su u različitim razvojnim stadijima (nezreli, dan 3, Slika 4A i 4B; zreli, dan 6, Slika 5A i 5B) kombinacijama farmakoloških agensa koji moduliraju proces autofagije- rapamicinom, bafilomicinom i VPS34-IN1.

Na Slici 4A i 5A vidljive su razine LC3-II nakon trećeg i šestog dana razvoja megakariocita iz koštane srži. Budući da prvi uzorak nije tretiran niti jednim od tri navedena modulatora, on predstavlja kontrolu, odnosno ukazuje na bazalnu razinu autofagije u megakariocitima. Uočena je razlika u bazalnoj razini autofagije. Ona je u zrelijim megakariocitima (dan 6, Slika 5A, prvi uzorak) relativno viša u odnosu na onu u nezrelijim stadijima megakariocita (dan 3, Slika 4A, prvi uzorak), te se može inhibirati s VPS34-IN1 (Slika 5A). Viša razina bazalne autofagije u zrelijim stadijima megakariocita iz koštane srži u skladu je s rezultatima dobivenim na megakariocitima razvijenim iz fetalne jetre.

U stanicama trećeg dana razvoja bafilomicin, pojedinačno, a i u kombinaciji s rapamicinom, rezultira povećanjem razine LC3-II što korelira s akumulacijom autofagosoma unutar stanice (Slika 4A). Rapamicin sam nije imao značajan učinak. U stanicama tretiranim s VPS34-IN1 inhibitorom, neočekivano, ekspresija LC3-II je povećana u odnosu na kontrolni uzorak što bi ukazivalo na povećanu razinu autofagosoma. Nadalje, vidljivo je da je ekspresija LC3-II proteina smanjena kod uzoraka tretiranih VPS34-IN1 u odnosu na one tretirane samo sa bafilomicinom i kombinacijom rapamicina i bafilomicina (Slika 4A, kvantifikacija 4B).



Slika 4. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima tretiranih

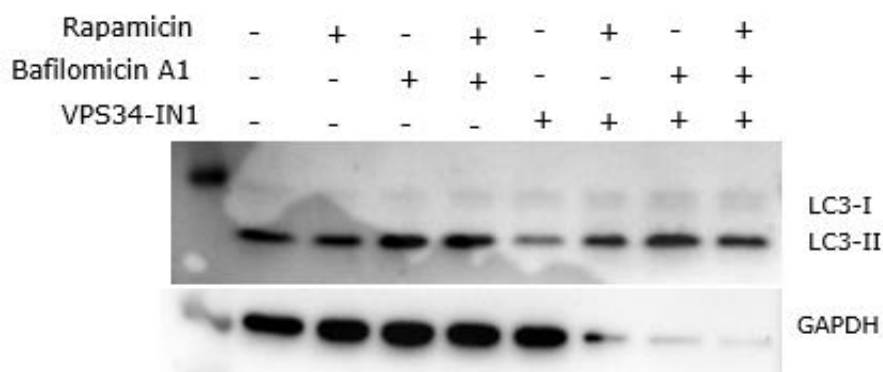
induktorima i inhibitorima autofagije. Analizirani su uzorci megakariocita trećeg dana razvoja iz koštane srži. Uzorci su tretirani različitim kombinacijama farmakoloških agensa koji utječu na autofagiju. Korišteni su rapamicin (200 nM), bafilomicin A1 (100 nM) i VPS34-IN1 (5 µM), u vremenu inkubacije 2h. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom. **(A)** Prikaz rezultata Western blot analize ekspresije LC3-I i LC3-II, uz vizualizaciju GAPDH kao kontrole količine proteina nanasene na gel. LC3 je vizualiziran korištenjem primarnog zečjeg anti-LC3 protutijela (1:1000, *Mbl*) i sekundarnog anti-zečjeg protutijela (1:5000, *Cell Signaling*). **(B)** Grafički prikaz kvantifikacije rezultata Western blot analize za LC3-II. Kvantifikacija Western blot analize napravljena je u ImageJ programu.

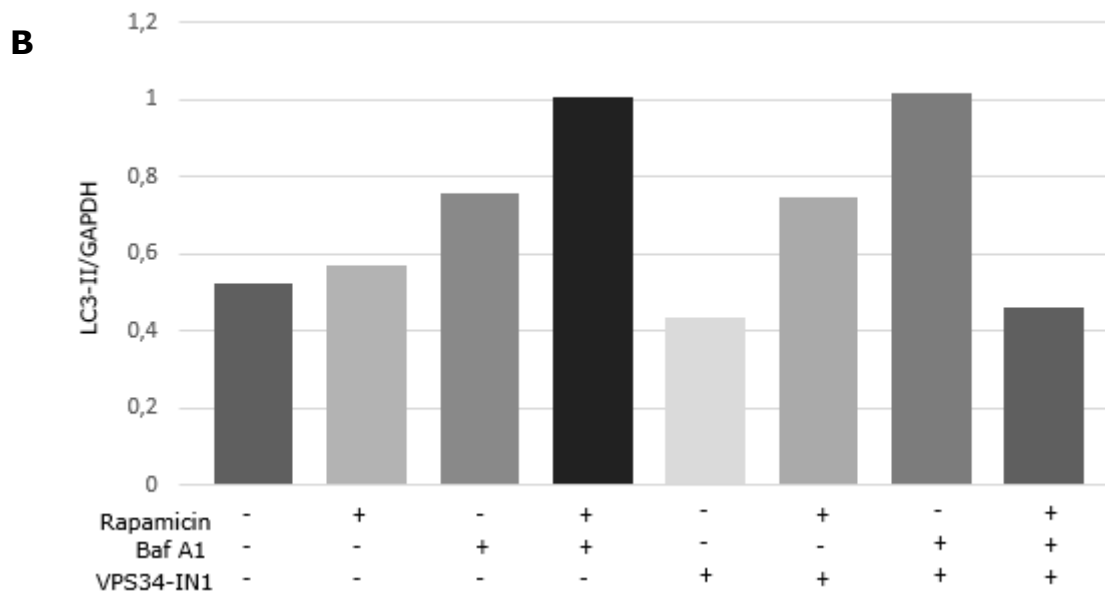
Isti uvjeti pokusa provedeni su i na zrelih megakariocitima koji su kultivirani šest dana iz koštane srži. Promjene u razini LC3-II su bile male u usporedbi s nezrelim megakariocitima. Tretman bafilomicinom i kombinacijom rapamicina i bafilomicina rezultirao je blagim povećanjem ekspresije LC3-II, te je VPS34-IN1 kod zajedničkog tretmana rapamicinom i bafilomicinom, uzrokovao sniženje LC3-II (Slika 5A, kvantifikacija 5B). Kao što je ranije napomenuto, VPS34-IN1 je smanjio razinu bazalne autofagije. Rapamicin sam nije uzrokovao značajnu promjenu u razini LC3-II.

Na Slici 5A vidljivo je da zadnja tri uzorka GAPDH nisu u skladu sa ostalima. Budući da GAPDH predstavlja kontrolu količine proteina nanesenih na gel, a svi LC3 proteinski *bandovi* su pravilni, vjerojatni uzrok ove nepravilnosti je pogreška na gelu. Zbog toga je kvantifikacija zadnja tri uzorka zrelih megakariocita (Slika 5B) izražena preko srednje vrijednosti GAPDH korektnih uzoraka.

Povećana osjetljivost megakariocita trećeg dana razvoja na bafilomicin upućuje na povećani autofagijski fluks u mlađim stadijima.

A





Slika 5. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima tretiranih

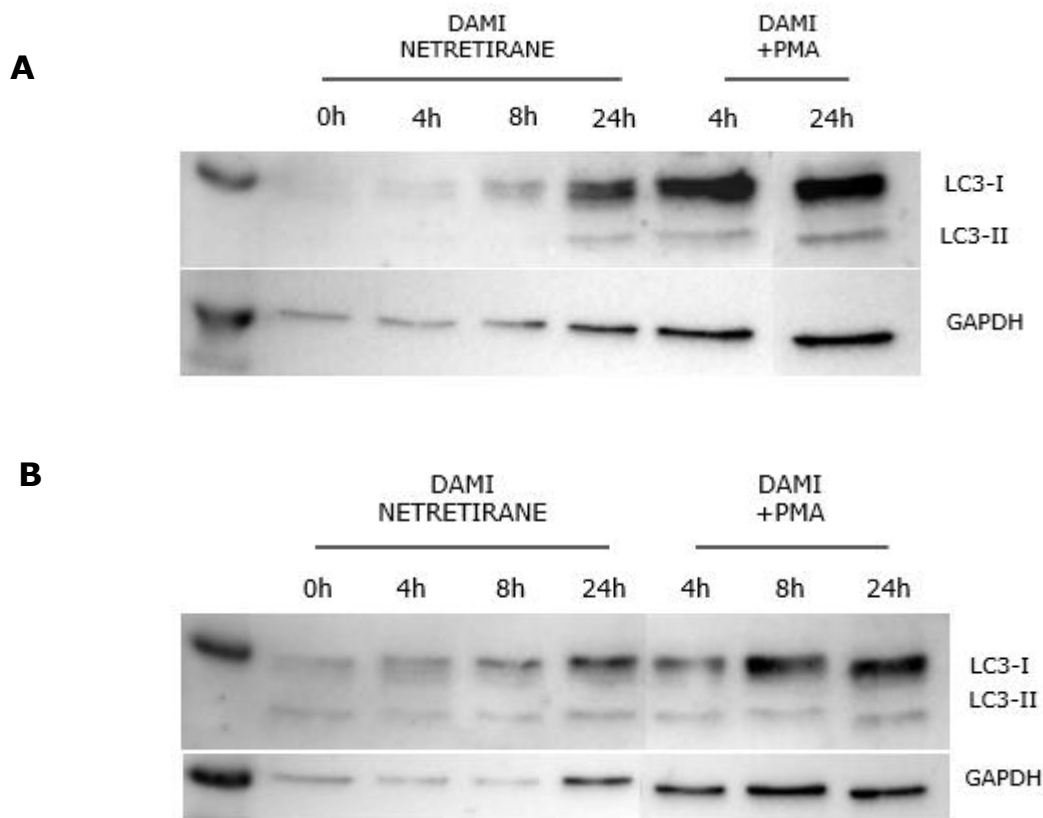
induktorima i inhibitorima autofagije. Analizirani su uzorci megakariocita šestog dana razvoja iz koštane srži. Uzorci su tretirani različitim kombinacijama farmakoloških agensa koji utječu na autofagiju. Korišteni su rapamicin (200 nM), bafilomicin A1 (100 nM) i VPS34-IN1 (5 μ M), u vremenu inkubacije 2h. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom. **(A)** Prikaz rezultata Western blot analize ekspresije LC3-I i LC3-II, uz vizualizaciju GAPDH kao kontrole količine proteina nanese na gel. LC3 je vizualiziran korištenjem primarnog zečjeg anti-LC3 protutijela (1:1000, *Mbl*) i sekundarnog anti-zečjeg protutijela (1:5000, *Cell Signaling*). **(B)** Grafički prikaz kvantifikacije rezultata Western blot analize za LC3-II. Kvantifikacija Western blot analize napravljena je u ImageJ programu.

4.3. Ispitivanje razine autofagije u DAMI staničnoj liniji

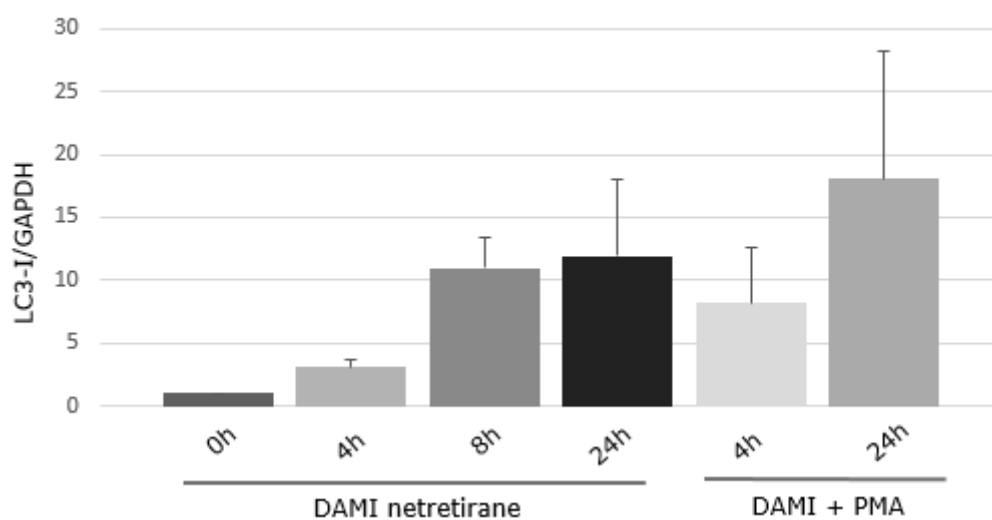
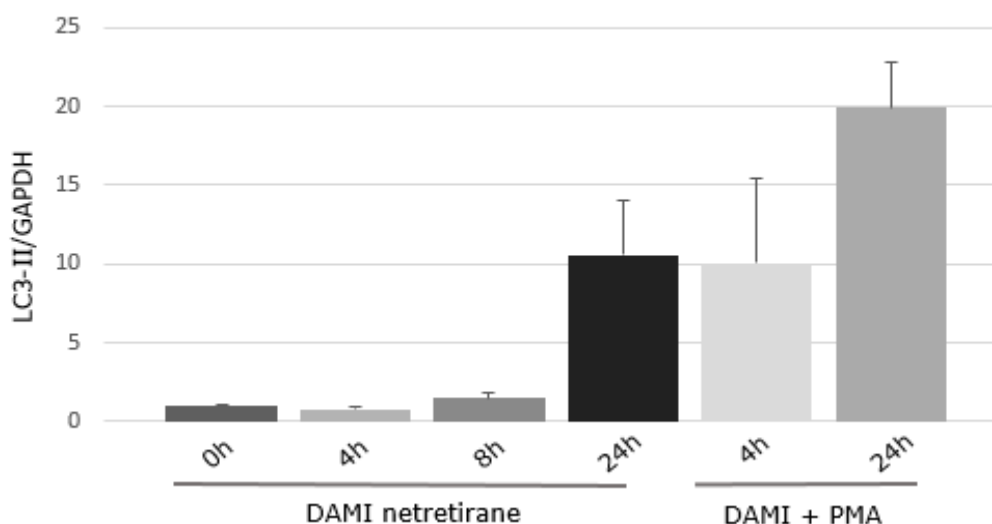
Osim na mišjim megakariocitima, zanimala nas je i razina autofagije u humanoj megakariocitnoj liniji DAMI dobivenoj iz krvi pacijenata s megakarioblastičnom anemijom te kako se ona mijenja kada stanice tretiramo s PMA koji potiče njihovu diferencijaciju. U stanicama je analizirana razina LC3-II nakon kultivacije bez PMA (netretirane, Slika 6 i 7) ili uz tretman 100 nM PMA (+PMA, Slika 6 i 7).

U odnosu na mišje primarne megakariocite, u DAMI stanicama

dominantna je forma LC3-I (Slika 6A i 6B, prikazuje dva neovisna pokusa). Uspoređujući nezrele i netretirane stanice s onim diferenciranim, vidljivo je da je ekspresija LC3-I i LC3-II mnogo izraženija u diferenciranim stanicama te da ona raste zajedno s porastom vremena inkubacije s PMA (Slika 6A i 6B, kvantifikacija 7A i 7B). Iako je dijelom posljedica povećane ekspresije vjerojatno ukupnog LC3, s obzirom na razinu LC3-II u odnosu na GAPDH, može se zaključiti da razina autofagije raste s vremenom kultivacije (netretirane DAMI, 24h), te s diferencijacijom (PMA tretirane, 4h, 24h).



Slika 6. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u DAMI stanicama. Analizirana su dva seta uzoraka netretiranih DAMI stanica (0h, 4h, 8h i 24h) te onih tretiranih s PMA (100 nM; vrijeme inkubacije 4h i 24h za prvi set uzoraka te 4h, 8h i 24h za drugi set uzoraka). Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom. **(A)**, **(B)** Prikaz rezultata Western blot analize ekspresije LC3-I i LC3-II, uz vizualizaciju GAPDH kao kontrole količine proteina nanese na gel. LC3 je vizualiziran korištenjem primarnog zečjeg anti-LC3 protutijela (1:1000, *Mbl*) i sekundarnog anti-zečjeg protutijela (1:5000, *Cell Signaling*).

A**B****Slika 7. Grafički prikaz kvantifikacije Western blot analize DAMI stanica.**

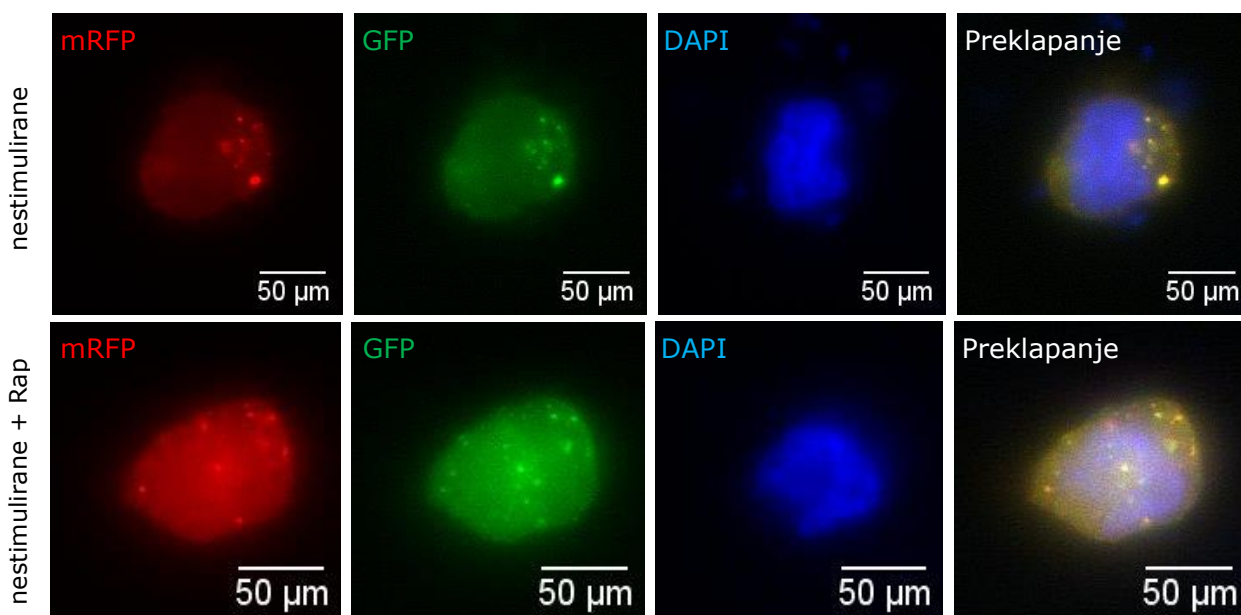
Analizirana su dva seta uzoraka netretiranih DAMI stanica te onih tretiranih s PMA (100 nM). Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom. **(A)**, **(B)** Kvantifikacija Western blot analize ekspresije LC3-I (A) i ekspresije LC3-II (B) u netretiranim i tretiranim DAMI stanicama. Svaki stupac predstavlja dva nezavisno provedena pokusa na različitim setovima uzoraka. Kvantifikacija je napravljena u ImageJ programu.

4.4. Mjerenje autofagijskog fluksa unutar DAMI stanica

Western blot analizom detektirali smo razinu LC3-II koji korelira s brojem autofagosoma unutar stanica. Stoga je sljedeći cilj bio utvrditi razinu autofagijskog fluksa, odnosno autofagosoma i autolizosoma. U tu svrhu DAMI stanice su transficirane s mRFP-GFP-LC3 plazmidom čime je omogućena vizualizacija autofagijskih struktura unutar stanica pomoću fluorescentnog mikroskopa. Naime, GFP je osjetljiv na niski pH, odnosno na kiselo područje, dok je mRFP u istom stabilan. Kolokalizacija GFP i mRFP rezultira žutim obojenjem koje označava fagofore ili autofosome, dok su autolizosomi označeni crveno, budući da je u njihovom kiselom lumenu GFP signal utišan [30].

4.4.1. Nestimulirane DAMI stanice

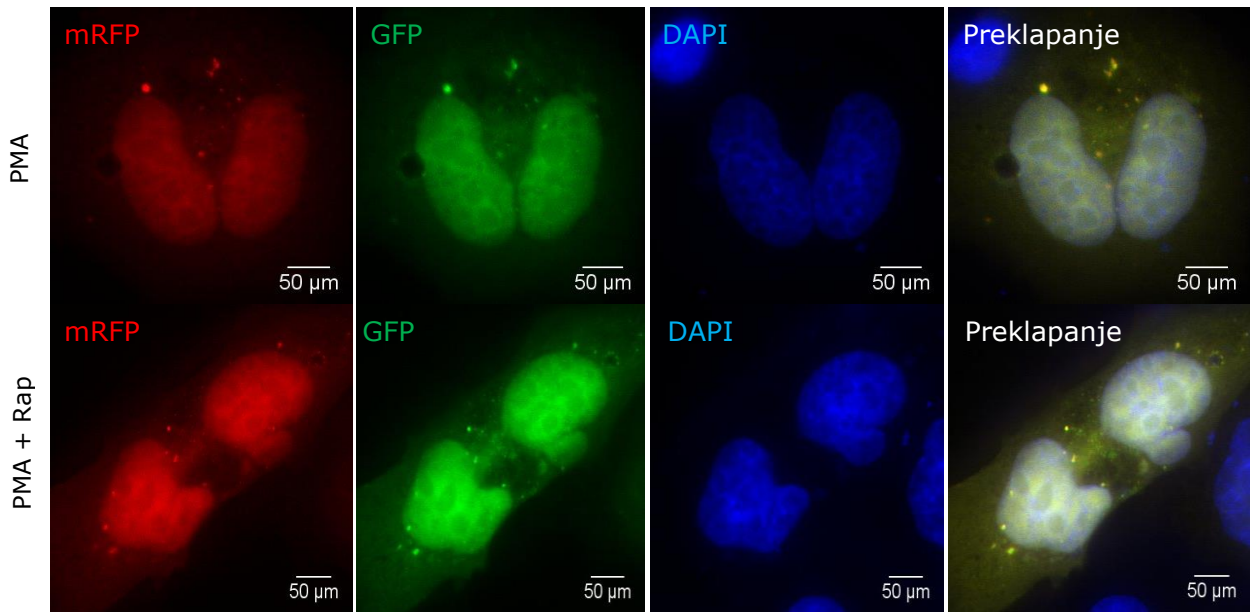
Slika 8 prikazuje nestimulirane DAMI stanice transficirane s mRFP-GFP-LC3 plazmidom. Autofagijske strukture vidljive su u obliku fluorescentno obojenih točaka unutar stanice. U nestimuliranim DAMI stanicama vidljivo je isključivo žućkasto točkasto obojenje smješteno perinuklearno. Žuti signal označava autofosome koji nisu sazreli u autolizosome. Veći broj žutih, ali i crvenih vezikula koje predstavljaju autolizosome uočen je kod stanica tretiranih rapamicinom što upućuje na indukciju autofagije te da je u ovakvim stanicama autofagijski fluks veći.



Slika 8. Ekspresija mRFP-GFP-LC3 u nestimuliranim DAMI stanicama. DAMI stanice transficirane su s mRFP-GFP-LC3 plazmidom. Njegova ekspresija vidljiva je u obliku točkastog obojenja koje korelira s autofagijskim strukturama unutar stanice. Rezultati su prikazani za nestimulirane DAMI stanice, te one tretirane rapamicinom (200nM) u vremenu inkubacije 2h. Mjerilo: 50 µm.

4.4.2. DAMI stanice tretirane s PMA

Stanice tretirane s PMA, za razliku od nestimuliranih stanica, imaju jezgru s dva ili više lobula, što je vidljivo na Slici 9. Unutar ovih stanica, uočen je veći broj točkastih struktura, ali ponajprije žutih što upućuje na akumulaciju autofagosoma. Točkasta žuta obojenja još su izraženija i mnogobrojnija u stimuliranim stanicama koje su dodatno inkubirane rapamicinom (200 nM, 2h). I u ovom slučaju, autofagijske strukture smještene su perinuklearno. S obzirom da u oba slučaja nisu uočene crvene vezikule, može se zaključiti da je autofagijski fluks niži u diferenciranim DAMI stanicama.



Slika 9. Ekspresija mRFP-GFP-LC3 u DAMI stanicama tretiranim s PMA. DAMI stanice transficirane su s mRFP-GFP-LC3 plazmidom. Njegova ekspresija vidljiva je u obliku točkastog obojenja koje korelira s autofagijskim strukturama unutar stanice. Rezultati su prikazani na DAMI stanicama tretiranim samo s PMA (100 nM) te onima tretiranim s PMA i rapamicinom (200 nM) u vremenu inkubacije 2h. Mjerilo: 50 µm.

5. Rasprava

Autofagija je put razgradnje molekula unutar stanice koji ima važnu ulogu u njenom održavanju te predstavlja jedan od glavnih mehanizama prilagodbe stanice na neželjene uvjete, primjerice stanje deprivacije hranjivih tvari [3]. Brojnim israživanjima pokazalo se da je ovaj proces aktivan u velikom broju različitih stanica, pa tako i u megakariocitima i trombocitima. Upravo zbog toga željeli smo ispitati kolika je razina autofagije u megakariocitima te kako se ona mijenja s njihovim razvojnim stadijem. Analizirali smo megakariocite drugog i četvrtog dana razvoja iz fetalne jetre te trombocite, a razinu autofagije procijenili preko razine ekspresije LC3-II markera autofagije koji korelira s brojem autofagosoma unutar stanice. Rezultati su pokazali da ekspresija LC3-II raste s razvojnim stadijem megakariocita iz fetalne jetre što upućuje na to da je reakcija konjugacije LC3-I u LC3-II pojačana, odnosno da je autofagija inducirana. Suprotno tome, ekspresija LC3-II u trombocita nije uočena. Opisani rezultati upućuju na uključenost autofagije u razvoju megakariocita od najranijih prekursora pa sve do zrelijeg stadija, budući da se njena razina tijekom razvoja povećava.

Nadalje, željeli smo provjeriti kako se razina LC3-II mijenja ovisno o tretmanu megakariocita trećeg i šestog dana razvoja iz koštane srži različitim inhibitorima ili induktorima autofagije. Na stanicama trećeg dana razvoja pokazalo se da razina autofagije blago raste nakon inkubacije s rapamicinom te značajno nakon tretmana bafilomicinom i njihovom kombinacijom. Budući da rapamicin inducira autofagiju, akumulacija LC3-II unutar stanice bila je očekivana. Bafilomicin je pak inhibitor V-ATPaze koja je nužna za fuziju autofagosoma s lizosomom. Akumulacija LC3-II koja korelira s akumulacijom autofagosoma unutar stanica tretiranih bafilomicinom posljedica je nemogućnosti njihova sazrijevanja u autolizosome i privođenja procesa autofagije kraju. Stoga porast u razini

LC3-II nakon tretmana bafilomicinom odražava povećani autofagijski fluks u nezrelim megakariocitima.

Megakariociti tretirani VPS34 inhibitorom pokazuju manju ekspresiju LC3-II u odnosu na one tretirane samo bafilomicinom ili kombinacijom rapamicina i bafilomicina. Za razliku od bafilomicina koji blokira fuziju već sintetiziranog autofagosoma s lizosomom, VPS34-IN1 onemogućuje sintezu PI3P na površini izolacijskih membrana pa je onemogućeno daljnje vezanje proteina i stvaranje samog autofagosoma. Sukladno tome, ekspresija LC3-II u stanicama s VPS34-IN1 trebala bi biti niža od one u netretiranim, što ovdje nije slučaj.

Nešto drugačiji rezultati uočeni su u zrelih megakariocitima razvijenim iz koštane srži kod kojih je bazalna razina autofagije znatno viša te je bila inhibirana VPS34-IN1, upućujući na ovisnost o PI3P u ovom stadiju. Iako rapamicin nije imao učinak, bafilomicin i kombinacija bafilomicina i rapamicina blago su povišili razinu LC3-II. Međutim, taj je porast bio značajno niži u odnosu na nezrele megakariocite te se može zaključiti da je autofagijska aktivnost, odnosno autofagijski fluks značajno veći u nezrelim nego u zrelih megakariocitima. Međutim, uzevši u obzir vizualizaciju GAPDH kao kontrole količine proteina nanosene na gel, u slučaju zrelih megakariocita (Slika 5A) nužno bi bilo ponoviti ove pokuse.

Osim mišjih megakariocita, provjerili smo i razinu autofagije u DAMI stanicama. Pokazalo se da razina LC3-II raste s porastom vremena kultivacije stanica, kako u netretiranim stanicama, tako i u onima čija je diferencijacija potaknuta pomoću PMA. I ovi rezultati slažu se s prethodno dobivenim, kao i literaturnim, te potvrđuju porast autofagije tijekom diferencijacije megakariocita.

Prateći ekspresiju LC3-II u prethodno opisanim pokusima, moglo se zaključiti da porastom njegove razine unutar stanice, dolazi do indukcije autofagije koja se očituje kroz akumulaciju autofagosoma. Međutim, ovakva nas vrsta analize, u kojoj se detektira samo broj autofagosoma, ne informira o tome je li proces autofagije dovršen, odnosno je li došlo do

sinteze autolizosoma i konačne razgradnje, ali i je li proces stvaranja autolizosoma ubrzan. Očekivano je da aktivacija autofagije rezultira povećanjem broja autofagosoma unutar stanice, ali njihova akumulacija može nastati kao posljedica dva potpuno različita procesa. Jedan od njih je dakle indukcija procesa, a drugi blokirano sazrijevanje autofagosoma u autolizosome što je pokazano u pokusu sa bafilomicinom. Stoga je uz detekciju broja autofagosoma unutar stanice potrebno analizirati i autofagijski fluks. Autofagijski fluks je izraz koji se koristi za opis dinamičkog procesa autofagije koji uključuje sintezu autofagosoma, ali i njegovu fuziju s lizosomom te konačnu degradaciju neželjenih supstrata, a koji može biti detektiran različitim metodama [2]. Jedna od takvih upravo je transfekcija stanica s mRFP-GFP-LC3 plazmidom koja je korištena u ovom radu. Ekspresija LC3 proteina u ovom slučaju vidljiva je u obliku žutog ili crvenog točkastog obojenja unutar stanice. Korištenje mRFP-GFP-LC3 plazmida omogućuje procjenu autofagijskog fluksa zahvaljujući različitom signalu fluorescentnih proteina u različitom pH području. Naime GFP je osjetljiv na kiseli i/ili proteolitički okoliš koji prevladava unutar lizosoma pa je njegov signal unutar autolizosoma utišan. Suprotno tome, mRFP je u istim uvjetima stabilan [31].

Analizom nestimuliranih DAMI stanica fluorescentnim mikroskopom, uočili smo da broj točaka unutar stanice raste nakon njihove inkubacije s rapamicinom. Kod netretiranih stanica, uočeno je samo žuto točkasto obojenje koje korelira s autofagosomima, a u onih inkubiranih rapamicinom ponegdje je prisutan i isključivo crveni signal koji upućuje na prisutstvo autolizosoma. Na temelju opisanih rezultata moguće je zaključiti da je rapamicin uspješno inducirao autofagiju i povećao autofagijski fluks unutar stanice. Provjerili smo i razinu ekspresije u diferenciranih stanica tretiranih PMA te uvidjeli da je broj točaka povećan u odnosu na nestimulirane stanice. Iako je njihov broj i u ovom slučaju porastao nakon tretmana stanica rapamicinom, prisutan je isključivo žuti signal što upućuje na to da su u stanici prisutni samo autofagosomi. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim na primarnim mišjim

megakariocitima tretiranim s bafilomicinom gdje je također uočen veći autofagijski fluks u ranijim razvojnim stadijima megakariocita.

Uspoređujući naše rezultate s onim literaturnim, vidljivo je da je broj LC3-II točaka unutar DAMI stanica relativno malen, kako u nestimuliranim stanicama, tako i u onima tretiranim s PMA. Isti bi se pokus, stoga, u budućnosti trebao ponoviti, ali koristeći druge uvjete ili drugu staničnu liniju, primjerice HeLa stanice humanog karcinoma cerviksa koje su se u različitim radovima [29], [30], [31] pokazale kao dobar model za procjenu autofagijskog fluksa.

6. Zaključak

Ovim radom praćena je ekspresija LC3-II markera koja korelira s razinom autofagije u različitim razvojnim stadijima mišjih megakariocita i trombocita te u humanoj megakariocitnoj staničnoj liniji DAMI. Pokazano je da:

1. Ekspresija LC3-II u megakariocitima iz fetalne jetre raste sa sazrijevanjem stanica, a u trombocitima nije vidljiva.
2. Inkubacija megakariocita iz koštane srži rapamicinom i/ili bafilomicinom dovodi do akumulacije LC3-II unutar stanice koja nastaje kao posljedica aktivacije autofagije ili blokiranja fuzije autofagosoma s lizosomom u ranijim razvojnim stadijima megakariocita. VPS34-IN1 smanjuje razinu LC3-II u stanicama tretiranim rapamicinom i bafilomicinom kao posljedica nemogućnosti sinteze PI3P na površini autofagijskih struktura.
3. Ekspresija LC3-II raste s diferencijacijom DAMI stanica.

Ekspresijom mRFP-GFP-LC3 u DAMI stanicama vizualiziran je veći broj autofagosoma i autolizosoma u nediferenciranim DAMI stanicama. Budući da se ekspresija LC3-II povećava paralelno s razvojnim stadijem megakariocita iz fetalne jetre te nakon tretmana bafilomicinom u nezrelim megakariocitima iz koštane srži, moguće je zaključiti da je važnost autofagije kao procesa adaptacije stanica u nepovoljnim uvjetima i puta razgradnje neželjenih tvari u stanici mnogo veća u primarnim stanicama, nego u već zrelih trombocitima. Isti rezultati dobiveni su i na DAMI stanicama što dodatno potvrđuje prethodne rezultate.

7. Literatura

1. Noboru Mizushima, Beth Levine. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):823–30.
2. Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, Beth Levine. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell.* 2010 Feb;140(3):313–26.
3. Katherine R. Parzych, Daniel J. Klionsky. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Discoveries.* 2014;20.
4. Tohru Yonekawa, Andrew Thorburn. Autophagy and Cell Death. *Essays Biochem.* 2013;55:105–17.
5. Noboru Mizushima, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, Daniel J. Klionsky. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008 Feb;451:1069–75.
6. Fiona M. Menzies, Angeleen Fleming, Andrea Caricasole, Carla F. Bento, Stephen P. Andrews, Avraham Ashkenazi, et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron Review.* 2018 Mar;
7. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Human Molecular Genetics.* 2002 May;11:1107–17.
8. M.A. Hayat. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging.* Vol. 11. Elsevier Inc; 2017. 430 p.
9. Susmita Kaushik, Urmi Bandyopadhyay, Sunandini Sridhar, Roberta Kiffin, Marta Martinez-Vicente, Maria Kon, et al. Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science.* 2011;124:495–9.
10. Shusaku T. Shibutani, Tamotsu Yoshimori. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Research.* 2014;24:58–68.

11. Sarah R. Elkin, Ashley M. Lakoduk, Sandra L. Schmid. Endocytic Pathways and Endosomal Trafficking: A Primer. *Wien Med Wochenschr.* 2016 May;166:196–204.
12. Sharon A. Tooze, Adi Abada, Zvulun Elazar. *Endocytosis and Autophagy: Exploitation or Cooperation?* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2014;
13. Liron Bar-Peled, David M. Sabatini. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 2014;24:400–6.
14. Brenda A. Schulman, J. Wade Harper. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:319–31.
15. Mikaela D. Stewart, Tobias Ritterhoff, Rachel E. Klevit, Peter S. Brzovic. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Research.* 2016;26:423–40.
16. Saori R. Yoshii, Noboru Mizushima. Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;
17. Madhu M. Ouseph, Yunjie Huang, Meenakshi Banerjee, Smita Joshi, Laura MacDonald, Yu Zhong, et al. Autophagy is induced upon platelet activation and is essential for hemostasis and thrombosis. *Blood.* 2015;126:1224–33.
18. Erik A. Richter, Neil B. Ruderman. AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. *Biochem J.* 2009;418:261–75.
19. Lorenzo Galluzzi, José Manuel Bravo-San Pedro, Beth Levine, Douglas R. Green, Guido Kroemer. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16:487–511.
20. Xue Li, Di Wu, Jinggang Shen, Meihua Zhou, Yan Lu. Rapamycin induces autophagy in the melanoma cell line M14 via regulation of the expression levels of Bcl-2 and Bax. *Oncology Letters.* 2012;
21. Akitsugu Yamamoto, Yoshihiro Tagawa, Tamotsu Yoshimori, Yoshinori Moriyama, Ryuichi Masaki, Yutaka Tashiro. Bafilomycin A1

- Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. *Cell Structure and Function*. 1998;23:33–42.
22. Ruzica Bago, Nazma Malik, Michael J. Munson, Alan R. Prescott, Paul Davies, Eeva Sommer, et al. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*. 2014;463:413–27.
 23. Sunita R. Patel, John H. Hartwig, Joseph E. Italiano Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:3348–54.
 24. Kellie R. Machlus, Joseph E. Italiano Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*. 201:785–96.
 25. Watson AS, Mortensen M, Simon AK. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cell Cycle*. 2011;10:1719–25.
 26. Yan Cao, Jinyang Cai, Suping Zhang, Na Yuan, Xin Li, Yixuan Fang, et al. Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice. *Experimental Hematology*. 2015;
 27. Qi Wang, Tao You, Hongqiong Fan, Yinyan Wang, Tinatian Chu, Mortimer Poncz, et al. Rapamycin and bafilomycin A1 alter autophagy and megakaryopoiesis. *Platelets*. 2016;
 28. Sheryl M. Greenberg, David S. Rosenthal, Tammy A. Greeley, Ramana Tantravahi, Robert I. Handin. Characterization of a New Megakaryocytic Cell Line: The Dami Cell. *Blood*. 72:1968–77.
 29. Shunsuke Timura, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods in Enzymology*. 2009;452.

30. Shunsuke Timura, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *Autophagy*. 2007;3.
31. Daniel J. Klionsky, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4:151-75.

Popis slika

Slika 1. Morfologija autofagije.	6
Slika 2. Regulacija autofagije.....	8
Slika 3. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima i trombocitima.	19
Slika 4. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima tretiranih induktorima i inhibitorima autofagije.....	21
Slika 5. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u megakariocima tretiranih induktorima i inhibitorima autofagije.....	23
Slika 6. Ekspresija LC3-I i LC3-II proteina u DAMI stanicama.. ...	24
Slika 7. Grafički prikaz kvantifikacije Western blot analize DAMI stanica.....	25
Slika 8. Ekspresija mRFP-GFP-LC3 u nestimuliranim DAMI stanicama..	27
Slika 9. Ekspresija mRFP-GFP-LC3 u DAMI stanicama tretiranim s PMA..	28

Rad je financiran projektom **UniRi potpore** br. 13.11.1.2.07, **ICGEB projekta** br. CRP/HRV15-04_EC i **HRZZ projekta** UIP-2014-09-2400, .

U radu je korištena oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „**Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci**“ RC.2.2.06-0001 financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR).

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Antoniji Jurak Begonja koja mi je svojim znanstvenim i stručnim savjetima, ali i izuzetnim trudom i strpljenjem pomogla pri izvođenju eksperimentalnog dijela i oblikovanju ovog završnog rada. Hvala na prenesenom znanju, kao i na pruženoj prilici za rad u Laboratoriju za hematopoezu gdje sam se upoznala s praktičnim radom i stekla uvid u brojne laboratorijske metode.

Veliku zahvalnost također dugujem članicama njena tima, Ivani Bertović, Robertini Kurelić i Ani Bura te Tacijani Zornada, koje su me strpljivo pratile kroz izvođenje svih pokusa, pomagale u svakom potrebnom trenutku te svojim radom i trudom dodatno obogatile moje praktično znanje.

Ujedno se želim zahvaliti doc. dr. sc. Ivani Munitić i članovima Laboratorija za molekularnu imunologiju na ustupku plazmida korištenog u ovom radu.

8. Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE

Bruketa Tea

📍 Prisika 4B, 51250 Novi Vinodolski (Hrvatska)

📞 0917826417

✉ tbruketa@student.uniri.hr

Spol Žensko | Datum rođenja 26. prosinca 1996. | Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

lipanj 2018.–danas

dm-drogerie markt, Novi Vinodolski (Hrvatska)

Studentski posao (rad na blagajni, slaganje polica)

28. svibnja 2018.–08. lipnja
2018.

Studentska stručna praksa

Jadran Galenski Laboratorij, odjel Proizvodnje, Rijeka (Hrvatska)

- mentor: Vladimir Maleš

2017.

Demonstrator iz kolegija "Organska kemija"

Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

- mentor: doc. dr. sc. Nela Malatesti

2016.

Demonstrator iz kolegija "Bioaktivne komponente mediteranske prehrane"

Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

- mentor: doc. dr. sc. Mladenka Malenica Staver

lipanj 2015.–rujan 2016.

Konobar

Trgovački obrt V.P.G., Novi Vinodolski (Hrvatska)

Sezonski posao

lipanj 2014.–rujan 2014.

Prodavač

Trgovački obrt V.P.G., Novi Vinodolski (Hrvatska)

Sezonski posao

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015.–danas

Preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova, Rijeka (Hrvatska)

2011.–2015.

Prva riječka hrvatska gimnazija, Rijeka (Hrvatska)

2003.–2011.

Osnovna škola Ivan Mažuranić, Novi Vinodolski (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
njemački	B1	B1	B1	B1	B1
talijanski	A2	A2	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Komunikacijske vještine

- dobre komunikacijske i prezentacijske vještine stečene na radnim mjestima te u sustavu obrazovanja
- osoba za timski rad

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

- vješto rukovanje Windows Office programima (Word, Excel, PowerPoint...)
- rad u programima za informatičko modeliranje molekula (Avogadro, MarvinSketch, Chimera, PyMOL, Gamess)
- pretraživanje baza podataka kao što je Protein Data Bank (PDB)
- poznavanje rada u ImageJ programu

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Volontiranje

- Festival znanosti Odjela za biotehnologiju 2016., 2017. i 2018. godine (Laboratorij za hematopoezu, Mikroskopiranje, info pult)
- humanitarna akcija "Kuglice dobrih želja"
- projekt Putujući znanstvenici
- Centar za rehabilitaciju Fortica, Kraljevica
- Dječji dom Braće Mažuranić, Novi Vinodolski

Članstva

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci