

medri

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Sladana Bursać

**ULOGA RIBOSOMSKIH PROTEINA U AKTIVACIJI SUPRESORA
TUMORA p53**

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

Sladana Bursac

**ULOGA RIBOSOMSKIH PROTEINA U AKTIVACIJI SUPRESORA
TUMORA p53**

Doktorski rad

Rijeka, 2013.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Siniša Volarević

Doktorski rad obranjen je dana 9. rujna 2013. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ivana Weygand Đurašević
2. Prof. dr. sc. Biserka Mulac Jeričević
3. Doc. dr. sc. Tihana Lenac Roviš
4. Prof. dr. sc. Siniša Volarević

Rad ima 124 lista.

UDK: _____

Rad je u cijelosti izrađen na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su dio znanstvenog projekta „Odgovor stanica sisavaca na pogrešku u sintezi ribosoma *in vivo*„ broj 062-1081347-0370 kojeg financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa, a voditelj projekta je prof. dr. sc. Siniša Volarević.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr. sc. Siniši Volareviću na prenesenom znanju, savjetima i vodstvu kroz sve godine mog doktorskog studija i tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem svom mentoru na ukazanom povjerenju i podršci od trenutka mog dolaska na Zavod. Hvala mu što je svojim znanjem i velikim iskustvom omogućio usmjeravanje mojih interesa prema znansveno-israđivačkom radu.

Posebnu zahvalu upućujem kolegici Maji Cokarić Brdovčak, koja mi je bila bezgranična potpora u svakom trenutku izrade ovoga rada i bez čije nesebične pomoći ovaj rad ne bi bilo moguće ostvariti.

Veliko hvala svim mojim kolegicama te tehničarkama na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju na ukazanom razumijevanju i pomoći tijekom istraživanja.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za histologiju i embriologiju, Zavoda za kemiju i biokemiju te Zavoda za fiziologiju i imunologiju na susretljivosti, savjetima i pomoći.

Najveće hvala mojoj kćerkici Kiari, mom suprugu, mojim roditeljima i prijateljima na bezgraničnom strpljenju, ljubavi, beskompromisnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja:

Na temelju rezultata istraživanja u zadnjih desetak godina predložen je model u kojem inhibicija sinteze ribosoma rezultira oštećenjem jezgrice i oslobađanjem ribosomskih proteina (RP) RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 iz jezgrice u jezgru, gdje vežu negativni regulator p53, Mdm2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*), inhibiraju njegovu ubikvitin-ligaznu aktivnost, te posljedično aktiviraju supresor tumora p53.

Ciljevi su :

1. Odrediti specifičnu ulogu RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 u aktivaciji p53 nakon inhibicije različitih koraka u sintezi ribosoma.
2. Razjasniti precizne molekularne mehanizme putem kojih ti RP aktiviraju p53.

Materijali i metode:

U stanicama A549 i U-2 OS sinteza ribosoma inhibirana je aktinomicinom D (AktD), 5-fluorouracilom (5-FU) ili primjenom specifičnih malih molekula RNA, siRNA (utišavajućih RNA, engl. *silencing RNA*) protiv komponenti koje sudjeluju u sintezi ribosoma. Podrijetlo, stabilnost i unutarstanični smještaj novosintetiziranih RP te njihova udruženost s drugim proteinima analizirana je brojnim metodama molekularne i stanične biologije te biokemije (tretman stanica inhibitorima sinteze proteina i proteasoma,

izolacija staničnih odjeljaka, metoda Western blot, imunotaloženje, lančana reakcija polimerazom i konfokalna mikroskopija).

Rezultati:

Dokazano je da su RPL5 i RPL11, a ne RPL23, RPL26 i RPS7, ključni pozitivni regulatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. Većina RP sintetizira se i nakon inhibicije sinteze ribosoma, ali se vrlo brzo razgrađuju u proteasomima. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 ne razgrađuju se u proteasomima, već se nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima gdje vežu negativni regulator p53, Mdm2. Sklop RPL5-RPL11-Mdm2-p53 transportira se u oštećenu jezgricu i udružuje s aktivatorom p53, proteinom PML (engl. *promyelocytic leukemia protein*), što rezultira potpunom aktivacijom p53.

Zaključci:

Dokazano je da su RPL5 i RPL11 ključni aktivatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma te su razjašnjeni precizni molekularni mehanizmi ove regulacije. Naši rezultati mogu pomoći u razumijevanju patogeneze bolesti uzrokovanih poremaćajima sinteze ribosoma.

Ključne riječi:

Inhibicija sinteze ribosoma; Jezgrica; Ribosomski proteini; Proteasom; Sinteza ribosoma; Supresor tumora p53.

SUMMARY

Title: The role of ribosomal proteins in activation of tumor suppressor p53

Objectives:

Overexpression experiments suggested that perturbation of ribosome biogenesis causes nucleolar disruption and translocation of a number of ectopically expressed ribosomal proteins (RPs), including RPL5, RPL11, RPL23, RPL26, and RPS7, from the nucleolus to the nucleoplasm, where they bind to Mdm2 and inhibit its ubiquitin ligase function toward p53, leading to p53 up-regulation.

Our objectives are:

1. To determine the role of specific endogenous RPs in p53 activation upon impairments of various steps of ribosome biogenesis.
2. To elucidate the molecular mechanisms by which specific RPs activate p53 under these conditions.

Material and Methods:

Ribosome biogenesis was inhibited with actinomycin D, 5- fluorouracil or siRNA-mediated depletion of RPs. A number of biochemical as well as molecular and cellular biological methods were used to analyze the source, stability and intracellular localization of newly synthesized RPL5 and RPL11 upon impairment of ribosome biogenesis, including treatment with protein synthesis or proteasome inhibitors, Western blot analysis, qRT-PCR, immunoprecipitation, cellular fractionations and live-cell imaging microscopy.

Results:

We showed that RPL5 and RPL11, but not RPL23, RPL26 and RPS7, are required for p53 activation upon inhibition of ribosome biogenesis. Whereas several other newly synthesized RP are degraded by proteasomes upon inhibition of Pol I activity by actinomycin D, RPL5 and RPL11 accumulate in the ribosome-free fraction where they bind to Mdm2. This selective accumulation of free RPL5 and RPL11 is due to their mutual protection from proteasomal degradation. Furthermore, the endogenous, newly synthesized RPL5 and RPL11 continue to be imported into nucleoli even after nucleolar disruption and colocalize with Mdm2, p53 and PML.

Conclusions:

We demonstrate the key role of RPL5 and RPL11 in p53 activation by impairments of ribosome biogenesis and uncover the molecular mechanisms of this regulation. Our findings may have important implications with respect to understanding the pathogenesis of diseases caused by impaired ribosome biogenesis.

Key words:

Inhibition of ribosome biogenesis; Nucleolus; p53 tumor suppressor; Proteasome; Ribosome biogenesis; Ribosomal proteins.

SADRŽAJ

| | |
|--|----------|
| 1. Uvod i prikaz područja | 1 |
| 1.1. Sinteza ribosoma | 2 |
| 1.1.1. Prepisivanje ribosomske RNA | 2 |
| 1.1.2. Cijepanje, modifikacije rRNA i njeno udruživanje s RP | 3 |
| 1.1.3. Morfologija jezgrice | 7 |
| 1.2. Signalni putevi koji potiču sintezu ribosoma | 8 |
| 1.2.1. Signalni put Ras-MAPK-c-Myc | 8 |
| 1.2.2. Signalini put PI3K-mTOR | 10 |
| 1.3. Supresori tumora p53, Rb i Arf inhibiraju sintezu ribosoma | 15 |
| 1.4. Bolesti uzrokovane poremećajem u sintezi ribosoma | 16 |
| 1.4.1. Bolesti koje su uzrokovane mutacijom RP | 16 |
| 1.4.1.1. Anemija Diamond-Blackfan | 16 |
| 1.4.2.1. Sindrom 5q ⁻ | 17 |
| 1.4.2. Bolesti uzrokovane mutacijom drugih faktora koji reguliraju sintezu ribosoma | 17 |
| 1.4.2.1. Nasljedna diskeratoza | 17 |
| 1.4.2.2. Sindrom Treacher-Collins | 18 |
| 1.4.2.3. Sindrom Shwachman-Diamond | 18 |
| 1.4.2.4. Displazija kose i hrskavice | 19 |
| 1.5. Inhibicija sinteze ribosoma <i>in vivo</i> rezultira aktivacijom p53-ovisnog kontrolnog mehanizma | 21 |
| 1.6. Supresor tumora p53 | 24 |
| 1.6.1. Mehanizam aktivacije p53 nakon oštećenja DNA | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.2. Mehanizam aktivacija p53 onkogenima | 27 |
| 1.6.3. Molekularni mehanizmi aktivacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma | 28 |
| 2. Cilj istraživanja | 32 |
| 3. Materijali i metode | 33 |
| 3.1. Materijali | 33 |
| 3.1.1. Kemikalije | 33 |
| 3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica | 36 |
| 3.1.2.1. Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom PBS | 36 |
| 3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica | 37 |
| 3.1.2.3. Mediji za transfekciju stanica | 37 |
| 3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNA | 37 |
| 3.1.3.1. Organska otapala u izolaciji RNA | 37 |
| 3.1.3.2. Denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNA za elektroforezu | 37 |
| 3.1.3.3. Pufer za nanošenje uzoraka RNA na gel | 37 |
| 3.1.3.4. Voda tretirana s DEPC-om | 37 |
| 3.1.3.5. Pufer za elektroforezu RNA(10X) | 38 |
| 3.1.4. Otopine korištene za imunofluorescenciju | 38 |
| 3.1.4.1. Otopina za fiksaciju stanica | 38 |
| 3.1.4.2. Otopina za permeabilizaciju stanica | 38 |
| 3.1.4.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela | 38 |
| 3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.1.5.1. Pufer za izolaciju proteina | 38 |
| 3.1.5.2. Otopina za ispiranje membrane | 38 |
| 3.1.5.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela | 39 |
| 3.1.5.4. Otopina za vizualizaciju proteina vezanih na membranu | 39 |
| 3.1.5.5. Pufer za nanošenje uzoraka proteina na gel (5x) | 39 |
| 3.1.5.6. Pufer za elektroforezu proteina (Laemmli pufer) (5x) | 39 |
| 3.1.5.7. Pufer za prijenos proteina s gela na membranu | 39 |
| 3.1.6. Otopine za imunotaloženje protein | 39 |
| 3.1.6.1. Pufer za imunotaloženje protein | 39 |
| 3.1.7. Otopine za razdvajanje staničnih odjeljaka | 40 |
| 3.1.7.1. Pufer za izolaciju ukupnog ribosomskog i izvanribosomskog odjeljaka stanice | 40 |
| 3.1.7.2. Otopina saharoze za razdvajanje ribosomskih i izvanribosomskih odjeljaka | 40 |
| 3.1.7.3. Pufer s niskom koncentracijom soli | 40 |
| 3.1.7.4. Pufer s visokom koncentracijom soli | 40 |
| 3.1.7.5. Pufer za izolaciju jezgrica | 40 |
| 3.1.8. Protutijela za Western blot analizu, imunotaloženje i imunofluorescenciju | 40 |
| 3.1.8.1. Komercijalna protutijela za Western blot analizu | 40 |
| 3.1.8.2. Protutijela za Western blot analizu proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci | 41 |
| 3.1.8.3. Komercijalna protutijela korištena za imunotaloženje | 42 |
| 3.1.8.4. Protutijela za imunotaloženje proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.1.8.5. Komercijalna protutijela za imunofluorescenciju | 42 |
| 3.1.8.6. Protutijela za imunofluorescenciju proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci | 43 |
| 3.1.9. Enzimi | 43 |
| 3.1.9.1. Nukleaze | 43 |
| 3.1.10. Uređaji i pribor | 43 |
| 3.1.11. Laboratorijsko posuđe | 44 |
| 3.1.12. Linije stanica i uzgoj stanica | 45 |
| 3.2. Metode | 46 |
| 3.2.1. Unos nukleinskih kiselina u stanice | 46 |
| 3.2.2. Izolacija ukupne RNA i dokazivanje mRNA-specifičnih RP | 47 |
| 3.2.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja p53, p21 i Mdm2 | 49 |
| 3.2.4. Izolacija ribosomskih i izvanribosomskih odjeljaka stanice | 49 |
| 3.2.5. Izolacija jezgrica | 50 |
| 3.2.6. Imunotaloženje specifičnih proteina iz ukupnih lizata i izvanribosomskih odjeljaka stanice | 50 |
| 3.2.7. Imunofluorescencija | 51 |
| 3.2.8. Analiza dinamike kretanja i smještaja endogenih „p53 aktivirajućih RP“ u živim stanicama upotrebom konfokalnog mikroskopa | 52 |
| 3.2.9. Analiza staničnog diobenog ciklusa | 52 |
| 4. Rezultati | 53 |
| 4.1. RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 i RPL26, aktiviraju supresor tumora p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma | 53 |

| | |
|--|------------|
| 4.2. RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma | 59 |
| 4.3. Jezgrica nije izvor slobodnih RPL5 i RPL11 nakon inhibicije sinteze ribosoma | 63 |
| 4.4. Slobodni RPL5 i RPL11 sintetizirani su nakon inhibicije sinteze ribosoma | 68 |
| 4.5. Slobodni RPL5 i RPL11 međusobno se štite od razgradnje u proteasomima | 76 |
| 4.6. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 transportiraju se u jezgricu nakon inhibicije sinteze ribosoma | 78 |
| 4.7. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 reguliraju smještaj p53 i njegovih regulatora u jezgri nakon inhibicije sinteze ribosoma | 81 |
| 5. Rasprava | 86 |
| 6. Zaključci | 91 |
| 7. Literatura | 92 |
| Popis skraćenica | 106 |
| Životopis | 107 |

1. Uvod i prikaz područja istraživanja

Rast i dioba stanica temeljni su biološki procesi u živim organizmima koji su precizno usklađeni tijekom proliferacije stanica i razvoja organizma. Rast stanice je povećanje njene mase i volumena (1). Dioba stanica povećanje je broja stanica (1). Rast stanica reguliran je brojnim signalnim putevima koji potiču sintezu makromolekula (2). Budući da proteini čine 80% suhe mase stanice, sinteza proteina i inhibicija njihove razgradnje ključni su za rast stanice (3). Količina proteina u stanici može se povećati učinkovitijom sintezom proteina na ribosomima ili sintezom novih ribosoma koji povećavaju kapacitet za sintezu proteina (4).

Glavno područje znanstvenoistraživačkog rada u našem laboratoriju je istraživanje sinteze novih ribosoma i analiza posljedica pogrešaka u tom procesu. Sinteza ribosoma vrlo je složen i precizno reguliran proces. Tako npr. HeLa stanice, koje proliferiraju troše 80% ATP-a na sintezu 7500 ribosoma u minuti što ukazuje na izuzetnu važnost tog procesa (5). Pogreške u različitim koracima sinteze ribosoma rezultiraju promjenama broja ili kakvoće ribosoma, što može poremetiti sintezu proteina i dovesti do razvoja brojnih patoloških procesa u ljudi i životinja.

Istraživanja zadnjih desetak godina dokazala su postojanje kontrolnog mehanizma koji se aktivira pogreškom u sintezi ribosoma (6). Njegova ključna komponenta je p53, jedan od najvažnijih supresora tumora (7). Iako se pretpostavljalo da taj kontrolni mehanizam štiti stanice od posljedica pogreška u sintezi ribosoma, noviji rezultati ukazuju na mogućnost da taj kontrolni mehanizam uzrokuje brojne patološke procese u sisavaca (8). Unatoč važnosti ovog signalnog puta u patogenezi bolesti u ljudi, vrlo se malo zna o molekularnim mehanizmima putem kojih pogreške u sintezi ribosoma rezultiraju aktivacijom p53. Stoga sam u

okviru istraživanja za izradu ove doktorske disertacije karakterizirala komponente tog kontrolnog mehanizma i razjasnila molekularne mehanizme aktivacije p53.

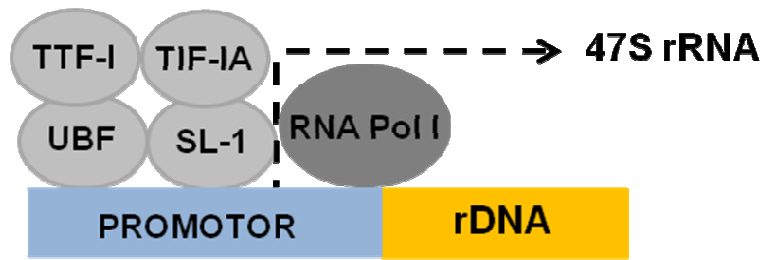
1.1. Sinteza ribosoma

Ribosomi su stanični strojevi na kojima se sintetiziraju proteini koji su neophodni za funkcioniranje svih bioloških procesa. Ribosomi se sintetiziraju najvećim dijelom u jezgri, a manjim dijelom u jezgri i citoplazmi (9).

Proces sinteze ribosoma je vrlo složen i precizno reguliran proces koji uključuje prepisivanje rRNA, njenu modifikaciju, cijepanje i udruživanje s 80 ribosomskih proteina te transport ribosoma u citoplazmu (10, 11). U procesu sinteze ribosoma osim RP i rRNA sudjeluje 100 malih snoRNA (engl. *small nucleolar RNA*) i 150 neribosomskih proteina (12). Zreli 80S ribosom sastoji se od male podjedinice 40S i velike podjedinice 60S. Podjedinicu 40S izgrađuje 18S rRNA i 33 RP, dok se podjedinica 60S sastoji od 5S, 5,8S i 28S rRNA i 47 RP (9).

1.1.1. Prepisivanje ribosomske RNA

Ključni događaj u sintezi ribosoma prepisivanje je 47S ribosomske RNA (rRNA) putem RNA-polimeraze I (Pol I) (13, 14). Na promotor rDNA vežu se slijedeći transkripcijski faktori koji reguliraju aktivnost Pol I: selektivni faktor 1 (SL-1), UBF (engl. *upstream binding factor*), TIF-1A (engl. *transcription initiation factor 1*) i TTF-1 (engl. *transcription termination factor*) (**slika 1**).



Slika 1. Prepisivanje rRNA. Na slici je prikazana Pol I koja sudjeluje u prepisivanju rDNA u rRNA. Transkripcijski faktori Pol I, SL-1, UBF, TIF-IA i TTF-I vežu se na promotor rDNA i pomažu u sintezi 47S rRNA.

Aktivnost ovog promotora regulirana je signalnim putevima koji potiču rast stanice, kao što su **Ras-MAPK-c-Myc** (engl. *Rat sarcoma; mitogen-activated protein kinase*) i **PI3K-mTOR** (engl. *phosphatidylinositide 3- kinase; mammalian target of rapamycin*) (3). Suprotno tome, nedostatak hranjivih tvari i različiti oblici stresa u stanici aktiviraju signalne puteve koji inhibiraju prepisivanje 47S rRNA te posljedično inhibiraju sintezu ribosoma. Tako na primjer neki stresovi u stanici aktiviraju c-Jun N-terminalnu kinazu-2 (engl. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK2) koja fosforilira TIF-IA i sprječava njegovo vezanje s Pol I, što rezultira inhibicijom prepisivanja 47S rRNA (15). Osim toga, supresori tumora, p53 i Rb (engl. *retinoblastoma protein*) inhibiraju aktivnost Pol I (16). Detaljni molekularni mehanizmi regulacije aktivnosti promotora Pol I bit će opisani kasnije u tekstu.

1.1.2. Cijepanje, modifikacije rRNA i njeno udruživanje s RP

Nakon sinteze, 47S rRNA se cijepa djelovanjem egzonukleaza i endonukleaza u manje rRNA (5,8S, 18S i 28S). Sklop 80 RP sintetizira se u citoplazmi te se transportira u jezgru putem importina koji su regulirani Ran-GTPazama (12, 13).

Nakon ulaska u jezgricu RP se vežu na rRNA te mijenjaju njenu konformaciju, što omogućuju daljne cijepanje rRNA. Međutim, neki RP vežu se na rRNA u jezgri i citoplazmi. Osim što su bitni za pravilno oblikovanje podjedinica 40S i 60S ribosoma, specifični RP uključeni su u transport podjedinica ribosoma u citoplazmu, održavanje normalne konformacije zrelih ribosoma i regulaciju specifičnih koraka u sintezi proteina (17). Uslijed nedostatka specifičnih RP zaustavlja se sazrijevanje ribosoma na specifičnim koracima. Na primjer, mi smo dokazali da smanjeni izražaj RPS6 zaustavlja cijepanje preteče rRNA 34S u 18S rRNA, ključnu komponentu podjedinice ribosoma 40S (18).

rRNA u jezgri modificira se metilnim skupinama i pseudouridinom. Te procese kataliziraju mali nukleolarni ribonukleoproteini (engl. *small nucleolar ribonucleoprotein particles*, snoRNP) koji se sastoje od snoRNA i različitih proteina. U metilaciji rRNA sudjeluju snoRNP koji se sastoje od snoRNA i proteina: fibrilarina, Nop56, Nop58/Nop5 i Snu13b. U pseudouridinaciji rRNA sudjeluju snoRNP koji se sastoje od snoRNA i proteina: Cbf5, Gar1, Nhp2, Nop10 i diskerina (12, 13). Te modifikacije imaju važnu ulogu u funkciji ribosoma. Važnost procesa pseudouridinacije za normalnu funkciju ribosoma pokazana je kod pacijenata koji imaju mutaciju u genu DKC1 koji kodira protein diskerin. Poremećaj pseudouridinacije rRNA uslijed mutacije diskerina uzrokuje nasljednu diskeratozu (19). Tako npr. manjak pseudouridinacije rRNA u stanicama pacijenata s nasljednom diskeratozom rezultira poremećajem u prevođenju mRNA koje imaju slijedove **IRES** (engl. *internal ribosome entry site*) u proteine (20). mRNA koje imaju slijedove IRES prevode se u proteine direktno vezanjem za ribosom, neovisno o faktorima inicijacije translacije. Slijedovi IRES česti su u mRNA virusa. Međutim, dokazano je postojanje mRNA koje imaju slijedove IRES u stanicama sisavaca, a zanimljivo je da te mRNA

kodiraju proteine koji reguliraju odgovore stanice na različite stresove, kao što su p53, p27 te anti-apoptotski faktor Bcl2 (21). Stoga, ti rezultati ukazuju na mogućnost da je pseudouridinacija rRNA važna za uspostavu kontakta tih mRNA s ribosomima tijekom njihovog prevođenja u proteine. 5S rRNA sintetizira se u jezgri pomoću RNA-polimeraze III (Pol III) te se transportira u jezgricu gdje se udružuje s pretečom ribosomske podjedinice 60S.

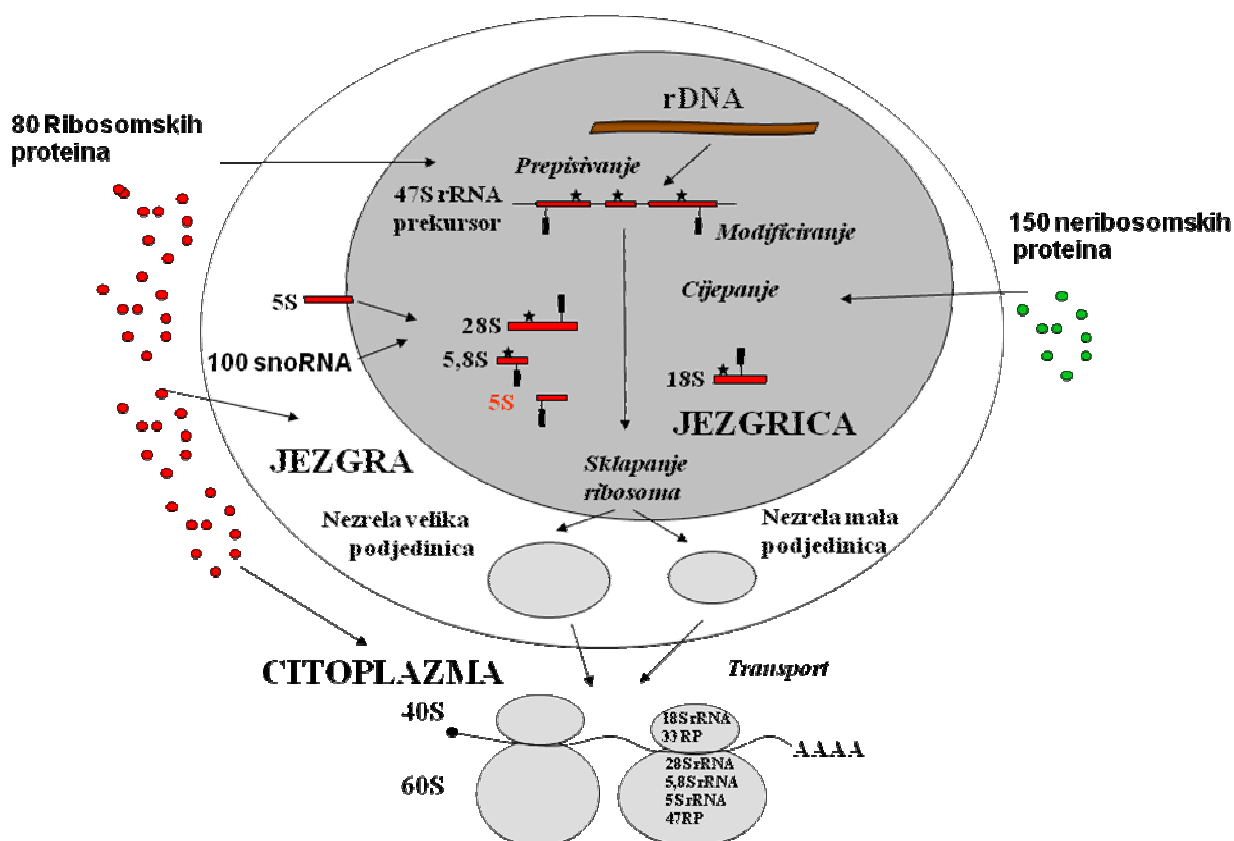
Nezrele ribosomske podjedinice 40S i 60S iz jezgri se transportiraju u jezgru i konačno u citoplazmu, a u tom procesu sudjeluju transporteri koji se nazivaju eksportini (eksportin 1, eksportin 5) i nukleoporini (Nup 62, Nup 54, Nup 50) (**tablica 1**), čija je aktivnost regulirana pomoću Ran-GTPaza (22).

Tablica 1. Faktori koji sudjeluju u prijenosu podjedinica ribosoma u citoplazmu.

| Faktori koji sudjeluju u prijenosu podjedinica ribosoma u citoplazmu | |
|---|---|
| Naziv | Funkcija |
| Eksportin 1 | Ran GTP-aza, regulira prienos preteče podjedinice 40S i preteče podjedinice 60S ribosoma u citoplazmu |
| Eksportin 5 | transport 60S podjedinice u citoplazmu |
| Nup 62 | nukleoporin, uključen u transport u jezgri |
| Nup54 | nukleoporin, uključen u transport u jezgri |
| Nup 50 | nukleoporin, uključen u transport u jezgri |

Osim ovih nabrojanih proteina brojni drugi faktori sudjeluju u različitim koracima sinteze ribosomskih podjedinica 40S (Dim1, Ltv1, Enp1, Nob1, Rio2, Tsr1) i 60S (Arx1, Nmd3, eIF6, Mrt4) u citoplazmi (23).

Nakon ulaska u citoplazmu preteče podjedinica 40S i 60S ribosoma dodatno sazrijevaju. Tako se npr. 20S rRNA cijepa u 18S rRNA, a serinska kinaza Rio2 potiče konformacijske promjene podjedinice 40S koje su potrebne za njeno konačno sazrijevanje. Osim toga, otpuštanje inicijacijskog faktora eIF6 (engl. *eukaryotic translation initiation factor 6*) sa podjedinice 60S neophodno je za njeno udruživanje s podjedinicom 40S u funkcionalni 80S ribosom nakon vezanja mRNA (engl. *messenger RNA*) (slika 2) (24).

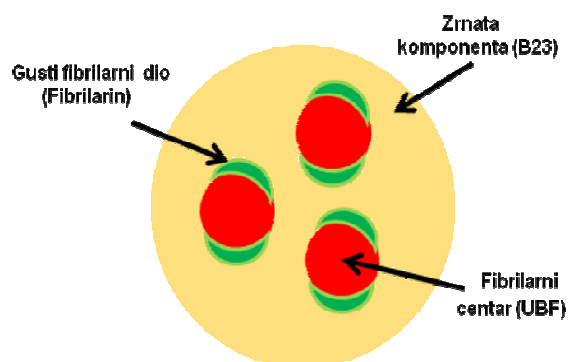


Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje ribosoma. rDNA prepisuje se u 47S rRNA pomoću Pol I. 47S rRNA cijepa se pomoću endonukleaza i egzonukleaza u 18S, 5,8S i 28S rRNA. U prekrajanju rRNA sudjeluje 80 RP koji se sintetiziraju u citoplazmi, a udružuju se s rRNA u jezgri, jezgri i citoplazmi. rRNA u jezgri modificira se pseudouridinom i metilnim skupinama, a u tim modifikacijama sudjeluju snoRNP, građeni od snoRNA i ne-ribosomskih proteina. 5S rRNA sintetizira se pomoću Pol III u jezgri. Zrela ribosomska podjedinica 60S sastoji se od 5S, 5,8S i 28S rRNA i 47 različitih RP, a 40S se sastoji od 18S rRNA i 33 RP.

1.1.3. Morfologija jezgrice

Jezgrica se morfološki može podijeliti u tri područja u kojima se događaju različiti koraci u sintezi ribosoma. Ta područja su: fibrilarni centar (engl. *fibrillar centar*, FC), gusti fibrilarni dio (engl. *dense fibrillar component*, DFC) i zrnata komponenta (engl. *granular component* GC) (25-28). 47S rRNA lokalizirana je na granici fibrilarnog centra i gustog fibrilarnog dijela. U gustom fibrilarnom dijelu smješteni su snoRNP, što ukazuje da se tu događaju rani koraci u cijepanju rRNA i njene modifikacije. Kasni koraci cijepanja rRNA i udruživanje sa specifičnim RP događaju se u zrnatoj komponenti jezgrice (29).

Ta područja mogu se razlikovati upotrebom elektronskog mikroskopa na temelju njihove različite gustoće, a metodom imunofluorescencije mogu se identificirati protutijelima protiv specifičnih biljega (30-32). B23 je biljeg zrnate komponente jezgrice, fibrilarin je biljeg gustog fibrilarnog dijela, a UBF je biljeg fibrilarnog centra (**slika 3**).



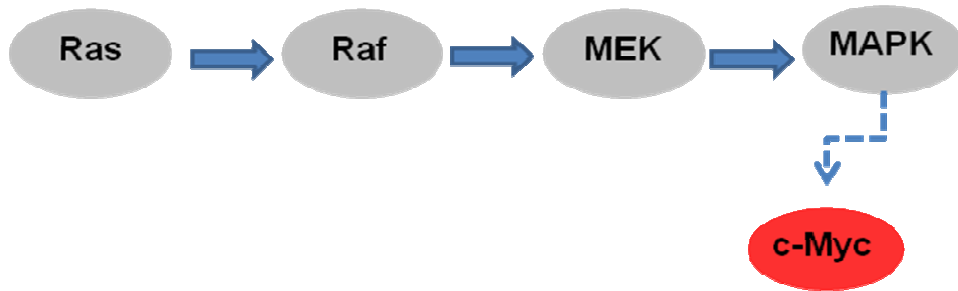
Slika 3. Shematski prikaz morfolologije jezgrice. Na slici su prikazani fibrilarni centar, gusti fibrilarni dio i zrnata komponenta od kojih se sastoji jezgrica te specifični proteini (UBF, fibrilarin i B23) koji se nalaze u pojedinim odjeljcima.

Poremećaji sinteze ribosoma često rezultiraju morfološkim promjenama tih struktura u jezgri. Brojni protutumorski lijekovi inhibiraju sintezu ribosoma na različitim koracima. Tako na primjer AktD u vrlo niskim koncentracijama (5 nM) inhibira prepisivanje 47S rRNA što rezultira smanjenjem jezgri, odvajanjem FC i GC regija i nakupljanjem fibrilarina i UBF-a oko smanjene i oštećene jezgri (33, 34). Osim toga, tretman s doksorubicinom dovodi do inhibicije 47S rRNA i do sličnih morfoloških promjena kao i tretman s AktD (35). Nadalje, 5-FU u stanici prevodi se u 5-fluorouridin trifosfat koji sprječava cijepanje rRNA, ali to rezultira minimalnim morfološkim promjenama jezgri (35, 36). Suprotno tome, jezgri su povećane u većini zloćudnih tumora zbog intenzivne sinteze ribosoma koja im je potrebna za brzi rast.

1.2. Signalni putevi koji potiču sintezu ribosoma

1.2.1. Signalni put Ras-MAPK-c-Myc

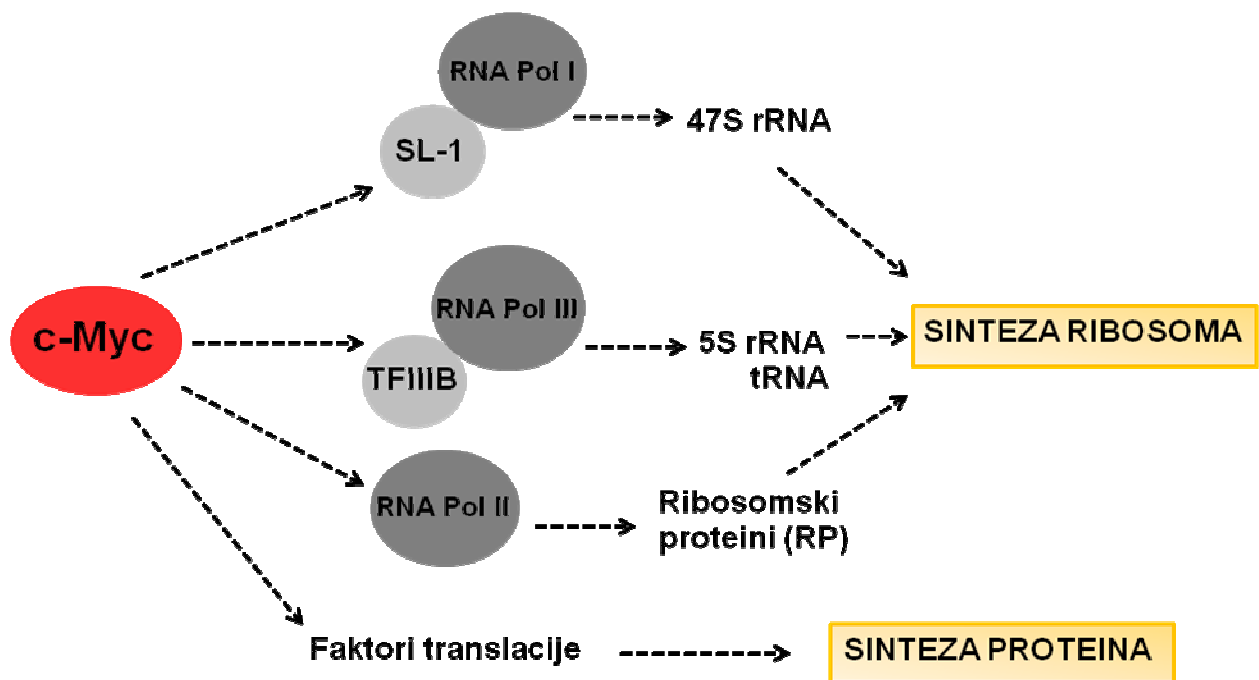
Brojni mitogeni i čimbenici rasta aktiviraju signalni put Ras-MAPK, koji putem regulacije prepisivanja ciljnih gena i regulacije drugih procesa potiče rast i diobu stanica. Vežanje GTP-a za Ras mijenja njegovu konformaciju, što omogućuje veživanje serin-treoninske kinaze Raf za Ras i njen smještaj u membrani gdje se aktivira. Aktivirana kinaza Raf fosforilira i aktivira kinazu MEK. MEK fosforilira i aktivira kinazu MAPK. Kinaza MAPK premješta se u jezgu gdje fosforilira **c-Myc** i druge transkripcijske faktore (**slika 4**) (37, 38).



Slika 4. Signalni put Ras-MAPK-c-Myc. Aktivirana kinaza Ras veže se na kinazu Raf, aktivirana kinaza Raf fosforilira i aktivira kinazu MEK. Kinaza MEK fosforilira i aktivira kinazu MAPK. MAPK se premješta se u jezgru gdje fosforilira transkripcijski faktor c-Myc.

Transkripcijski faktor c-Myc jedan je od ključnih regulatora sinteze ribosoma i sinteze proteina. c-Myc potiče sintezu komponenti ribosoma, faktora koji sudjeluju u sintezi ribosoma (B23, nukleolin, importini) te faktora koji potiču sintezu proteina na ribosomima (39). Transkripcijski faktor c-Myc veže se na promotore Pol I i Pol III. Potiče aktivnost Pol I vezanjem na transkripcijski faktor SL-1, a vezanjem na TFIIIB (engl. *transcription factor*) potiče aktivnost Pol III (40, 41). Osim toga, c-Myc veže se na promotore gena za sve RP i potiče njihovo prepisivanje. Nadalje, veže se na promotore gena koji kodiraju faktore translacije i na taj način omogućuje intenzivnu sintezu proteina na ribosomima (42, 43) (**slika 5**).

Signalni put Ras-MAPK-c-Myc aktiviran je u većini zloćudnih tumora, što omogućuje intenzivnu sintezu ribosoma koja im omogućuje brzi rast i diobu stanica (44).



Slika 5. Transkripcijski faktor c-Myc regulira sintezu proteina i ribosoma. c-Myc regulira prepisivanje gena Pol I, II i III, gena za RP i faktore translacije.

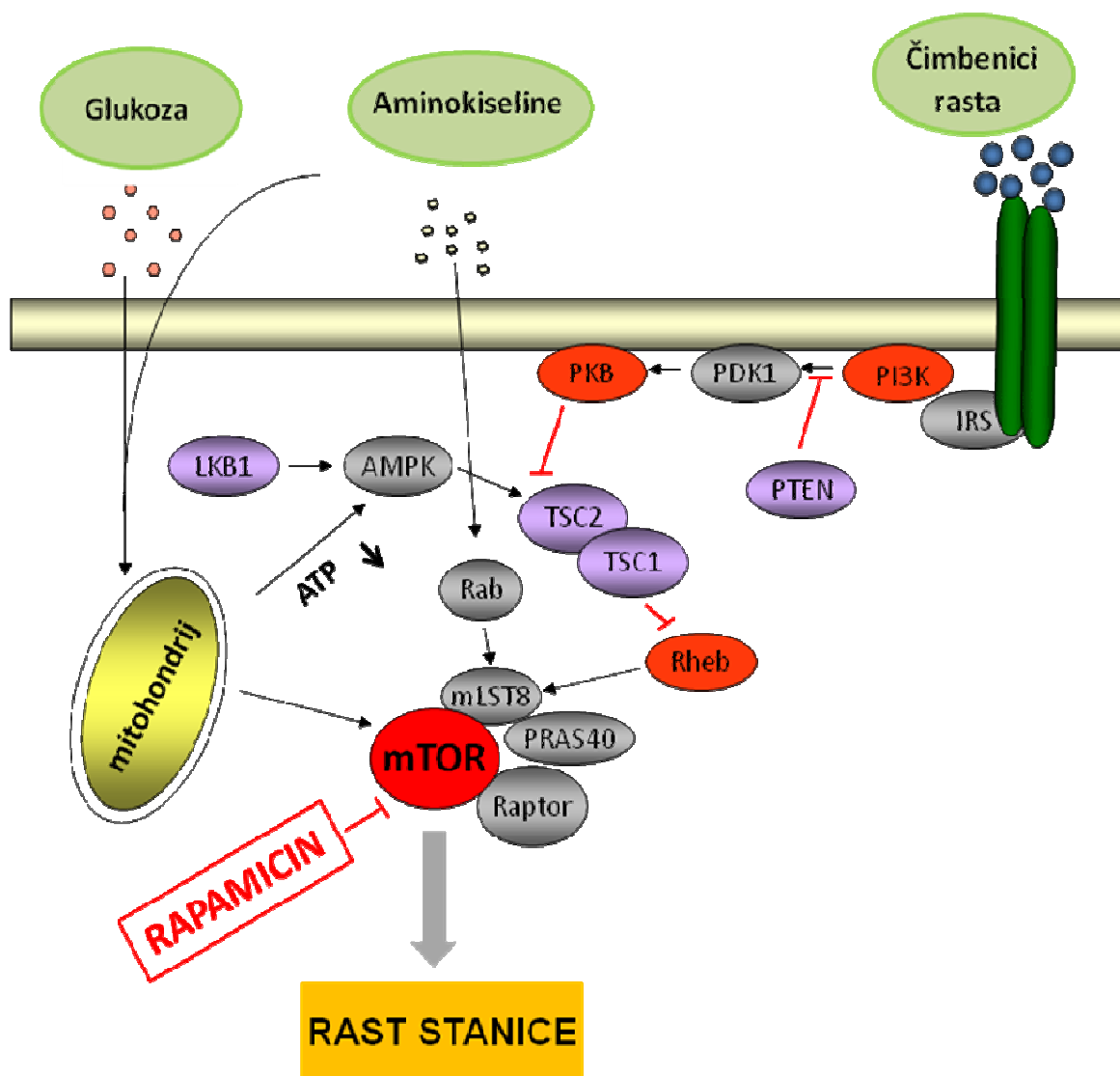
1.2.2. Signalni put PI3K-mTOR

mTOR je serin/treoninska kinaza koja integrira signale potaknute receptorima za faktore rasta, aminokiselinama, prisutnošću energije u stanici i regulira sintezu ribosoma i proteina te posljedično rast stanice (45, 46).

Vežanje čimbenika rasta inzulina na njegov receptor rezultira fosforilacijom supstrata inzulinskog receptora IRS (*engl. insulin receptor substrate*). Nakon vežanja fosfatidilinozitol-3-kinaze PI3K (*engl. phosphatidylinositol 3-kinase*) na fosforilirani

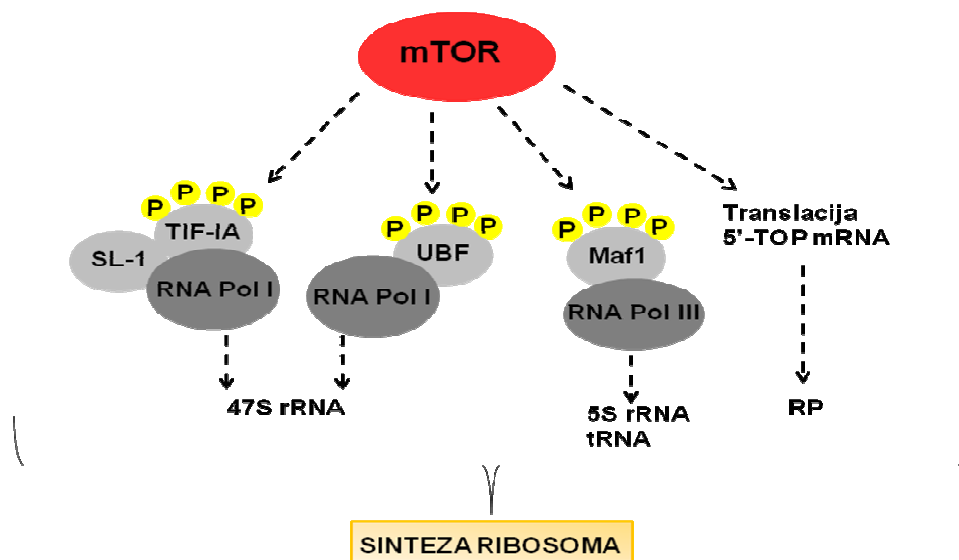
IRS, ona se aktivira i fosforilira fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (PIP₂) u fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP₃). Negativni regulator ovog signalnog puta, tumor supresor PTEN (*engl. phosphatase and tensin homolog*) defosforilira PIP₃ u PIP₂. Na PIP₃ molekule u membrani vežu se 3-fosfoinozimid-ovisna proteinska kinaza-1 PDK1 (*engl. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) i kinaza PKB/Akt (*engl. protein kinase B*), proteini koji imaju PH2 (*engl. pleckstrin homology*) domenu. Aktivirana PKB fosforilira negativni regulator mTOR puta, kompleks TSC1/TSC2 (*engl. tuberous sclerosis complex protein 1 and 2*). Fosforilirani TSC1/TSC2 postaje nestabilan i inaktivan. Inaktivacijom kompleksa TSC nestaje njegov inhibitorski učinak na protein Rheb (*engl. Ras homologue enriched in brain*) što rezultira aktivacijom mTOR-a (**slika 6**) (47-51).

Aminokiseline leucin i valin djeluju kao signalne molekule koje aktiviraju mTOR vezivanjem na Rab i Rheb. S druge strane, manjak ATP-a, odnosno povećana količina AMP-a aktivira negativni regulator mTOR-a, AMPK-ovisnu kinazu. Jedino u prisutnosti čimbenika rasta, hranjivih tvari i dostatne energije u stanici ovi signalni putevi združeno aktiviraju mTOR što rezultira rastom stanica.



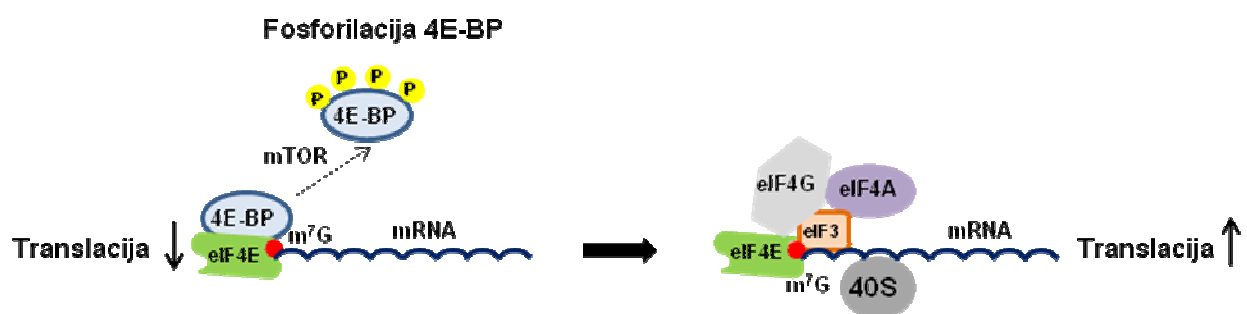
Slika 6. Signali put PI3K-mTOR. mTOR integrira signale posredovane receptorima za faktore rasta, aminokiselinama i dostatnošću energije u stanici. Vezanjem čimbenika rasta (npr. inzulina) za svoje receptore rezultira aktivacijom njihove tirozin/kinazne aktivnosti i fosforilacijom IRS. Na fosforilirani IRS veže se PI3K koja fosforilira PIP2 u PIP3, što omogućuje smještaj PKB/Akt i PDK1 u membranu. Aktivirani mTOR fosforilira svoje supstrate te na taj način regulira sintezu ribosoma i proteina te omogućuje rast stanice. Aktivnost mTOR kinaze inhibirana je vezivanjem rapamicina. Komponente ove signalne mreže često su mutirane u zloćudnim tumorima, što ukazuje na važnost ovog signalnog puta u nastanku i širenju zloćudnih tumora. Crvenom bojom na slici označeni su onkogeni, a ljubičastom supresori tumora.

mTOR potiče brojne korake u sintezi ribosoma i sintezi proteina (52). Aktivirani mTOR translocira se u jezgricu gdje potiče sintezu 47S rRNA direktnom fosforilacijom TIF-IA, koji se tada udružuje s SL-1 (53). Osim toga, mTOR indirektno putem S6K1 (engl. *ribosomal protein S6 kinase*) posredovane fosforilacije UBF-a povećava aktivnost Pol I (54). Ova dva mehanizma omogućuju prepisivanje 47S rRNA, jednog od ključnih koraka u sintezi ribosoma. Nadalje, mTOR potiče prepisivanje 5S rRNA i tRNA putem fosforilacije Maf1, negativnog regulatora Pol III (slika 7). S druge strane, substrat mTOR-a, S6K1, za sada nerazjašnjenim mehanizmom potiče prevođenje grupe mRNA koje sadrže 5'TOP mRNA (engl. *oligopirimidine tract*) u proteine (slika 7) (53, 54). U grupu 5'TOP mRNA uključeni su svi RP te brojni faktori koji sudjeluju u sintezi proteina kao što su faktori inicijacije i elongacije.



Slika 7. mTOR regulira sintezu ribosoma. mTOR potiče prepisivanje Pol I i Pol III gena te povećava učinkovitost prevođenja 5'TOP mRNA u proteine. U skupinu 5'TOP mRNA pripadaju svi RP te neki od faktora koji sudjeluju u sintezi ribosoma. P označava fosforilaciju.

mTOR regulira prevođenja mRNA koje na svom 5' kraju imaju m⁷G kapu u proteine. Eukarotski inicijacijski faktor 4E, eIF4E (*engl. eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*) veže se na m⁷G kapu, ali je njegova aktivnost inhibirana s 4E-BP. mTOR fosforilira 4E-BP, što rezultira njegovim odvajanjem od eIF4E. Tako slobodni eIF4E veže se na druge faktore inicijacije, što omogućuje vezanje podjedinice 40S ribosoma na mRNA (**slika 8**) (55, 56).



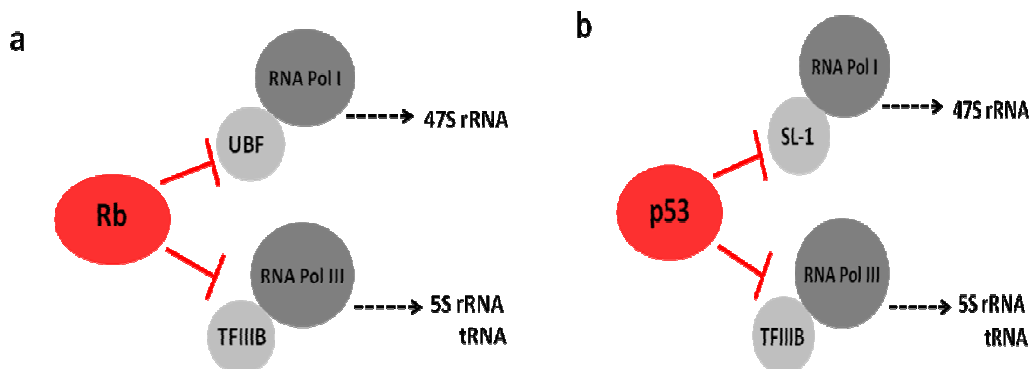
Slika 8. Regulacija aktivnosti eIF4E putem mTOR-a. eIF4E vezan je na m⁷G kapu, a njegova aktivnost inhibirana je s 4E-BP. Aktivirani mTOR fosforilira 4E-BP što rezultira oslobađanjem eIF4E. Slobodni eIF4E veže se na faktore inicijacije, što u konačnici rezultira vezanjem 40S podjedinice ribosoma na mRNA.

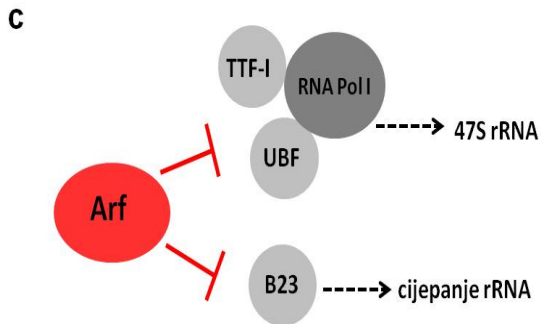
Komponente mTOR signalnog puta vrlo često su mutirane u zloćudnim tumorima u ljudi. Zanimljivo je da je negativni regulator mTOR-a, PTEN, mutiran u više od 50% svih zloćudnih tumora. Ta činjenica ukazuje na važnost aktivacije mTOR signalnog puta u nastanku i širenju zloćudnih tumora. Na temelju tih saznanja inhibitor mTOR-a, rapamicin, već se s uspjehom koristi u liječenju nekih zloćudnih tumora (57).

1.3. Supresori tumora p53, Rb i Arf inhibiraju sintezu ribosoma

Supresori tumora, Rb, p53 i Arf (engl. *alternative reading frame protein*) inhibiraju diobu stanica. Međutim, najnoviji rezultati ukazuju da oni inhibiraju sintezu ribosoma i rast stanice.

Rb sprječava sintezu 47S rRNA vežući i inhibirajući transkripcijski faktor Pol I, UBF. Osim toga, inhibira aktivnost Pol III vezivanjem na TFIIB (58). Supresor tumora p53 inhibira sintezu 47S rRNA direktnim vezanjem na Pol I transkripcijski faktor, SL-1. Slično kao i Rb, p53 inhibira aktivnost Pol III vezanjem za TFIIB (59-61). Supresor tumora Arf, osim što inhibira aktivnost Pol I putem inhibicije transkripcijskog faktora, TTF-I i fosforilacije transkripcijskog faktora, UBF-a, inhibira i cijepanje rRNA vežući se na B23 (**slika 9a, b i c**) (62-64). Inaktivirajuće mutacije ili delecije gena za supresore tumora Rb, p53 i Arf rezultiraju intenzivnom sintezom ribosoma i rastom koji su potrebni za brz rast i diobu tumorskih stanica (65).





Slika 9. Supresori tumora inhibiraju sintezu ribosoma (a-c). Supresori tumora Rb, p53 i ARF vežu se na promotore Pol I i Pol III i sprječavaju proizvodnju rRNA. Osim toga, supresor tumora Arf veže i destabilizira B23 te na taj način inhibira cijepanje rRNA.

1.4. Bolesti uzrokovane poremećajem u sintezi ribosoma

Poremećaj izražaja ili funkcije komponenti ribosoma i faktora koji reguliraju sintezu ribosoma mogu rezultirati smanjenim brojem ribosoma ili promjenom kakvoće ribosoma. Te promjene rezultiraju pogreškama u sintezi proteina i posljedičnim razvojem patoloških procesa u ljudi i životinja, koji se skupnim imenom nazivaju bolesti ribosoma ili „**ribosomopatije**“ (8, 67, 68).

1.4.1. Bolesti uzrokovane mutacijom RP

1.4.1.1. Anemija Diamond-Blackfan

Anemija Diamond-Blackfan nasljedna je bolest u ljudi uzrokovana heterozigotnim mutacijama RPS19, RPL5, RPS10, RPL11, RPL35A, RPS26, RPS24, RPS7 te RPS17 u 50% pacijenata. Te mutacije rezultiraju poremećajem

sinteze ribosoma na specifičnim koracima. U ostalih pacijenata uzrok je nerazjašnjen. Bolest je karakterizirana anemijom, nasljednim malformacijama, nižim tjelesnim rastom, poremećajem u razvoju kosti glave i lica, dužim palcem. Pacijenti s anemijom Diamond-Blackfan imaju povećanu predispoziciju za razvoj zloćudnih tumora (69-71).

1.4.1.2. Sindrom 5q⁻

Sindrom 5q⁻ oblik je stečenog sindroma mijelodisplazije (engl. *myelodysplastic syndrome*, MDS). Uzrok bolesti gubitak je jednog alela RPS14 zbog delecije duljeg kraka kromosoma 5 (5q) na kojem se nalazi taj gen. Zbog gubitka jednog alela RPS14 u hematopoetskim stanicama preteča eritrocita nastaje poremećaj u sazrijevanju 40S podjedinice ribosoma (72, 73). Bolest je karakterizirana makrocitnom anemijom, a ti pacijenti imaju predispoziciju za razvoj akutne mijeloične leukemije (AML).

1.4.2. Bolesti uzrokovane mutacijom drugih faktora koji reguliraju sintezu ribosoma

1.4.2.1. Nasljedna diskeratoza

Mutacija u genu DKC1, koji kodira protein diskerin uzrok je bolesti X-vezane nasljedne diskeratoze. Diskerin je smješten u jezgri gdje sudjeluje u pseudouridaciji rRNA. Zbog poremećaja pseudouridacije rRNA, ribosomi u stanicama pacijenata s nasljednom diskeratozom ne prepoznaju mRNA koje sadrže slijedove IRES. Nasljedna diskeratoza karakterizirana je poremećajem pigmentacije

kože, oralnom leukoplakijom, distrofijom noktiju te povećanom predispozicijom za razvoj zloćudnih tumora (74, 75). Budući da mRNA koje kodiraju supresore tumora p53 i p27 sadrže slijedove IRES, poremećaj njihove translacije mogao bi objasniti povećanu predispoziciju za nastanak zloćudnih tumora u pacijenata s nasljednom diskeratozom (76-78).

1.4.2.2. Sindrom Treacher-Collins

Sindrom Treacher-Collins nasljeđuje se autosomno dominantno. Uzrok je mutacija u genu TCOF1 koji kodira protein Treacle, nukleolarni fosfoprotein koji sudjeluje u prepisivanju rDNA i metilaciji 18S rRNA. Bolest je karakterizirana hipoplazijom kostiju lica, rascijepom nepca i poremećajem razvoja uha. Za razliku od ostalih bolesti iz ove skupine pacijenti s ovim sindromom nemaju rizik za razvoj zloćudnih tumora (79-83).

1.4.2.3. Sindrom Shwachman-Diamond

Sindrom Shwachman-Diamond je autosomna recesivna bolest. Nastaje kao posljedica mutacija u proteinu SBDS (engl. *Shwachman-Bodian syndrome protein*) koji s GTPaza elongacijskim faktorom (EFL1) direktno katalizira otpuštanje inicijacijskog faktora eIF6 s preteče 60S podjedinice ribosoma i tako omogućuje vezanje 60S i 40S podjedinica ribosoma u funkcionalni 80S ribosom (84, 85). Sindrom Shwachman-Diamond karakteriziran je neutropenijom, anemijom, trombocitopenijom, poremećajem razvoja skeleta, poremećajem razvoja limfocita B i T te poremećajem u funkciji gušterače (86, 87).

1.4.2.4. Displazija kose i hrskavice

Uzrok displazije kose i hrskavice nastaje kao posljedica mutacije u *RMNP* genu, koji kodira RNA komponentu MRP, (*engl. ribonuclease mitochondrial RNA processing*) koja je lokalizirana u jezgri i mitohondriju (88). RNaza RMP potrebna je u jezgri za odvajanje 5,8S rRNA od njene preteče rRNA. Mutacije u *RMNP* genu sprječavaju sintezu ribosoma na ovom specifičnom koraku. Klinička slika bolesti karakterizirana je neproporcionalno niskim rastom, rijetkom i tankom kosom, anemijom i povećanom predispozicijom za razvojem zloćudnih tumora (89, 90).

Zajedničko obilježje svih navedenih bolesti je poremećaj u sintezi ribosoma, što može rezultirati smanjenim brojem ribosoma ili promjenom njihove kakvoće. Te promjene mogu rezultirati pogreškama u regulaciji izražaja gena na razini translacije, što najvjerojatnije uzrokuje patološke promjene u tih pacijenata. Osim toga, proizvodi gena koji su mutirani u ovim bolestima mogu sudjelovati u procesima izvan ribosoma. Nadalje, noviji rezultati ukazuju da pogreške u sintezi ribosoma aktiviraju p53-ovisni kontrolni mehanizam te da njegova aktivacija ima važnu ulogu u patogenezi ribosomopatija. Molekularni mehanizmi aktivacije p53-ovisnog kontrolnog mehanizma koji se aktivira pogreškama u sintezi ribosoma i njegova uloga u patogenezi ribosomopatija bit će raspravljani u slijedećim poglavljima. Uzroci spomenutih ribosomopatija i njihove kliničke slike sažeto su opisani u **tablicama 3 i 4**.

Dakle, u budućnosti će biti potrebno odrediti relativni doprinos navedenih molekularnih mehanizama u patogenezi ribosomopatija.

Tablica 3. Bolesti uzrokovane poremećajem u sintezi ribosoma.

| Bolest | Gen | Posljedica poremećaja funkcije gena |
|--------------------------------|--|--|
| Anemija Diamond Blackfan | RPS19, RPS24, RPL35a, RPS17 RPL5, RPL11, RPS7, RPS10, RPS26 | poremećaj u sazrijevanju 40S podjedinice i 60S podjedinice ribosoma |
| Sindrom 5q- | RPS14 | poremećaj u sazrijevanju 40S podjedinice ribosoma |
| Sindrom Shwachman-Diamond | SBDS | poremećaj u sklapanju 40S podjedinice i 60S podjedinice ribosoma |
| Nasljedna diskeratoza | DKC1 | poremećaj u pseudouridinaciji |
| Displazija kose i hrskavice | RMRP | poremećaj u sazrijevanju 5.8S rRNA |
| Sindrom Treacher Collins | TCOF1 | poremećaj u prepisivanju rDNA i metilaciji 18S rRNA |

Tablica 4. Prikaz kliničkih slika ribosomopatija.

| Bolest | Klinička slika | Rizik od tumora | Nasljedna ili stečena |
|--------------------------------|---|---|-----------------------|
| Anemija Diamond Blackfan | makrocitna anemija, poremećaj u rastu i razvoju, duži palac, poremećaj u razvoju kosti glave i lica | sindrom mijelodisplazije, akutna mijeloična leukemija, sarkomi | nasljedna |
| Sindrom 5q- | makrocitna anemija | akutna mijeloična leukemija | stečena |
| Sindrom Shwachman-Diamond | neutropenija, poremećaj u razvoju, niži rast, poremećaj rada gušterače | sindrom mijelodisplazije, akutna mijeloična leukemija | nasljedna |
| Nasljedna diskeratoza | distrofija noktiju, poremećaj u pigmentaciji kože, oralna leukoplakija | povećan rizik za razvoj tumora | nasljedna |
| Displazija kose i hrskavice | rijetka i tanka kosa, nizak tjelesni rast, anemija | povećan rizik za razvoj tumora | nasljedna |
| Sindrom Treacher Collins | hipoplazija kostiju lica rascjepljeno nepce | ne postoji | nasljedna |

1.5. Inhibicija sinteze ribosoma *in vivo* rezultira aktivacijom p53-ovisnog kontrolnog mehanizma

Budući da pogreške u sintezi ribosoma uzrokuju brojne bolesti, pretpostavljeno je postojanje kontrolnog mehanizma koji prepoznaje te pogreške i sprječava njihov nastanak. Taj kontrolni mehanizam otkriven je 2000. godine u jetri odraslog miša nakon uvjetne inaktivacije (engl. *conditional inactivation*) gena RPS6. Unatoč potpunoj inhibiciji sinteze novih ribosoma, rast stanica jetre bio je normalan. Međutim, te stanice nisu se dijelile nakon djelomične hepatektomije, što je ukazalo na postojanje kontrolnog mehanizma koji prepoznaje pogreške u sintezi ribosoma i zaustavlja diobu stanica, ali ne i njihov rast (18).

Pokusi u staničnoj kulturi identificirali su p53 kao ključnu komponentu ovog kontrolnog mehanizma. Pestov i suradnici 2001. godine dokazali su da dominantno negativna mutanta Bop1 sprječava cijepanje rRNA te zaustavlja diobu stanica uslijed aktivacije supresora tumora p53 (91). Nakon toga, dokazano je da inhibicija sinteze 47S rRNA s AktD, inhibicija cijepanja rRNA na različitim koracima s 5-FU, genetička inaktivacija različitih komponenti ribosoma, genetička inaktivacija importina ili eksportina aktiviraju p53 ovisni kontrolni mehanizam (33-36, 39). Dakle, inhibicija različitih koraka sinteze ribosoma rezultira aktivacijom p53. Međutim, nepoznato je kako ovaj kontrolni mehanizam prepoznaje tako različite pogreške u sintezi ribosoma i prenosi taj signal do p53.

Nakon otkrića kontrolnog mehanizma koji se aktivira pogreškom u sintezi ribosoma daljnja istraživanja u našem laboratoriju dokazala su da je p53 njegova

ključna komponenta *in vivo*. Najprije smo inaktivirali jedan alel RPS6 u timusu (92). S6 hetreozigotni limfociti T normalno su povećavali svoju masu nakon stimulacije receptora za antigen, ali se nisu dijelili. Genetička inaktivacija p53 u tom mišu omogućila je njihovu normalnu diobu što je dokazalo da je p53 ključna komponenta ovog kontrolnog mehanizma *in vivo*. U svrhu istraživanja posljedica pogrešaka u sintezi ribosoma na razvoj cijelog organizma inaktivirali smo jedan alel RPS6 u jajnim stanicama i odgovarajućim križanjem proizveli S6 hetreozigotne embrije (93). Njihov razvoj bio je normalan do embrionalnog dana 5.5. Međutim, S6 heterozigotni embriji uginuli su tijekom gastrulacije, na embrionalnom danu 6.5-7.5. Genetička inaktivacija p53 omogućila je preživljavanje S6 hetreozigotnih miševa do embrionalnog dana 12.5 kada su najvjerojatnije uginuli zbog pogrešaka u sintezi proteina. Ti rezultati nedvojbeno ukazuju na važnost aktivacije ovog kontrolnog mehanizma u nadzoru točnosti sinteze ribosoma tijekom specifičnog stadija razvoja embrija.

Nedavno smo analizirali ulogu p53 u fenotipu RPL24 hetreozigotni miševa koji se očituje poremećajem u pigmentaciji, manjim tjelesnim rastom, kongenitalnim malformacijama i slijepoćom (94). Suprotno prethodnoj pretpostavci da je fenotip posljedica poremećaja u sintezi proteina (95), naša grupa dokazala je da su sva fenotipska obilježja uzrokovana aktivacijom p53 tijekom embrionalnog razvoja. Međutim, zanimljivo je da u odsutnosti p53 većina L24 heterozigotnih miševa ugiba neposredno nakon okota, što je ukazalo na do sada neopoznatu ulogu p53 u preživljavanju miševa koji imaju mutacije RP.

Heterozigotne mutacije RPS19 i RPS20 u miša rezultiraju poremećajem pigmentacije, smanjenom tjelesnom masom i poremećajem hematopoeze (96). Slično kao i kod RPS6 i RPL24 heterozigotnih miševa patološki fenotip ovih miševa rezultat je aktivacije supresora tumora p53. Nadalje, nedavno su identificirani miševi

s heterozigotnom mutacijom RPS7 (97). Karakterističan fenotip RPS7 heterozigotnih miševa je manja tjelesna masa, bijela pjega, poremećaj razvoja skeleta, sljepoća, a uzrokovan je aktivacijom p53. Osim RPL24, RPS6, RPS19, RPS20 i RPS7 analiziran je fenotip još pet miševa s mutacijama RP. U **tablici 5.** opisani su fenotipovi svih do sada karakteriziranih miševa s mutacijama RP te njihova ovisnost o p53 (97).

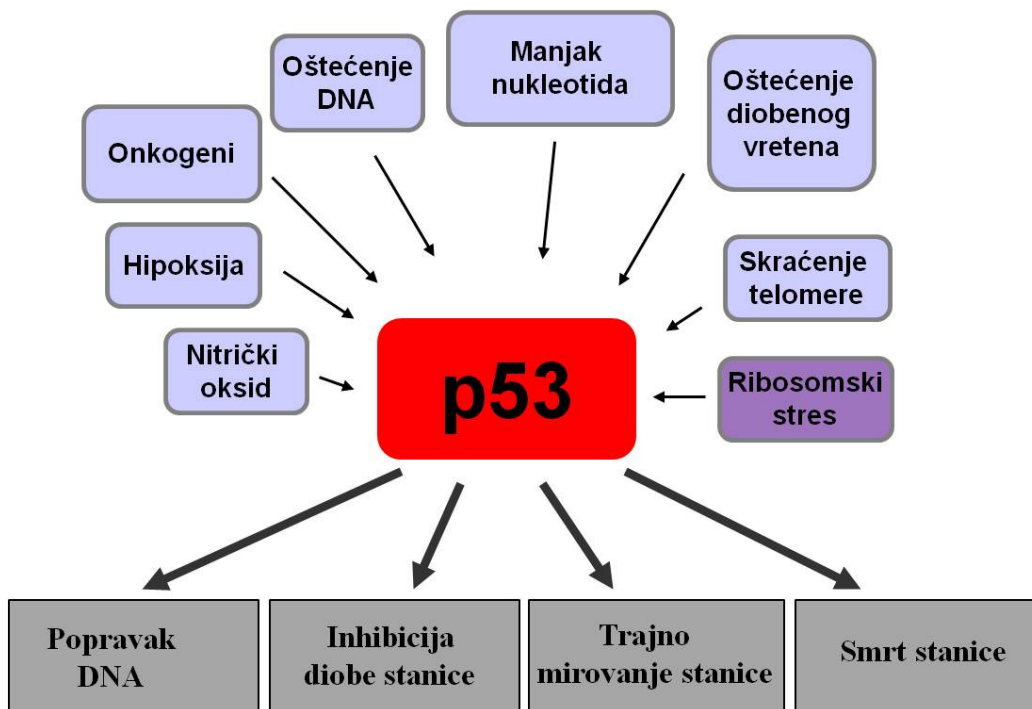
Tablica 5. Miševi s mutacijama RP.

| Gen | Poremećaj u sintezi proteina | Fenotip | Ovisnost o p53 |
|--------|-------------------------------|--|--|
| RPL24 | smanjena sinteza proteina | L24 ^{Bst/+} ; manja masa, bijela pjega na trbuhu sljepoća, zavijen rep L24 ^{Bst/Bst} ; ugibaju | da nije analizirana |
| RPS6 | nije analiziran | S6 ^{+/-} ; ugibaju | djelomična |
| RPL22 | nije analiziran | L22 ^{+/-} ; normalan fenotip L22 ^{+/-} ; preživjavaju, poremećaj u razvoju alfa i beta limfocita | da da |
| RPL29 | smanjena sinteza proteina | L29 ^{+/-} ; normalan fenotip L29 ^{+/-} ; preživjavaju, blagi poremećaj u razvoju | da da |
| RPS19 | nije analiziran | S19 ^{Dsk3/+} ; manja tjelesna masa, poremećaj u pigmentaciji, anemija S19 ^{Dsk3/Dsk3} ; ugibaju S19 ^{+/-} ; normalan fenotip S19 ^{-/-} ; ugibaju | da nije analizirana nije analizirana nije analizirana |
| RPS20 | nije analiziran | S20 ^{Dsk4/+} ; manja tjelesna masa, poremećaj u pigmentaciji, anemija S20 ^{Dsk4/Dsk4} ; ugibaju | da nije analizirana |
| RPS14 | | S14 ^{CD74-Nid67+/-} ; makrocitna anemija S14 ^{CD74-Nid67-/-} ; fenotip nije analiziran | da |
| RPL27a | nije analiziran | L27a ^{SFA+} ; manja tjelesna masa, pancitopenija hipermelanocitoza, cerebralna ataksija L27a ^{SFA/SFA} ; ugibaju | da |
| RPL38 | kontrola translacije Hox mRNA | L38 ^{Ts/+} ; poremećaj razvoja skeleta L38 ^{Ts/Ts} ; ugibaju | ne ne |
| RPS7 | nije analiziran | S7 ^{Zma/+} ; manja tjelesna masa, bijela pjega na trbuhu, poremećaj skeleta, sljepoća S7 ^{Zma/Zma} ; ugibaju S7 ^{Mtu/+} ; manja tjelesna masa, bijela pjega na trbuhu, poremećaj skeleta, sljepoća S7 ^{Mtu/Mtu} ; ugibaju | da nije analizirana nije analizirana nije analizirana |

Nedavno je otkriveno da je p53 identificiran u stanicama pacijenata koji boluju od različitih ribosomopatija, što otvara mogućnost da je odgovoran za neke od patoloških manifestacija tih bolesti (8). Stoga je od izuzetne važnosti razjasniti molekularne mehanizme kojima se p53 aktivira nakon poremećaja u sintezi ribosoma te otkriti koje biološke procese p53 regulira u tim uvjetima te identificirati potencijalne ciljeve za liječenje tih bolesti.

1.6. Supresor tumora p53

Tumor supresor p53 mutiran je u 50-60% zloćudnih tumora u ljudi, dok je u preostalim tumorima njegova funkcija kompromitirana promjenama u uzvodnim regulatorima ili nizvodnim signalnim komponentama te virusnim proteinima (98, 99). p53 je transkripcijski faktor koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, popravaku oštećene DNA, apoptozi, autofagiji i metabolizmu (6). Većina stresova u stanici koja aktivira p53 oštećuje DNA (ionizirajuće i UV zračenje, kemijski mutageni, slobodni oksidativni radikali, pogreške u udvajanju DNA tijekom onkogene stimulacije) (**slika 10**) (100).

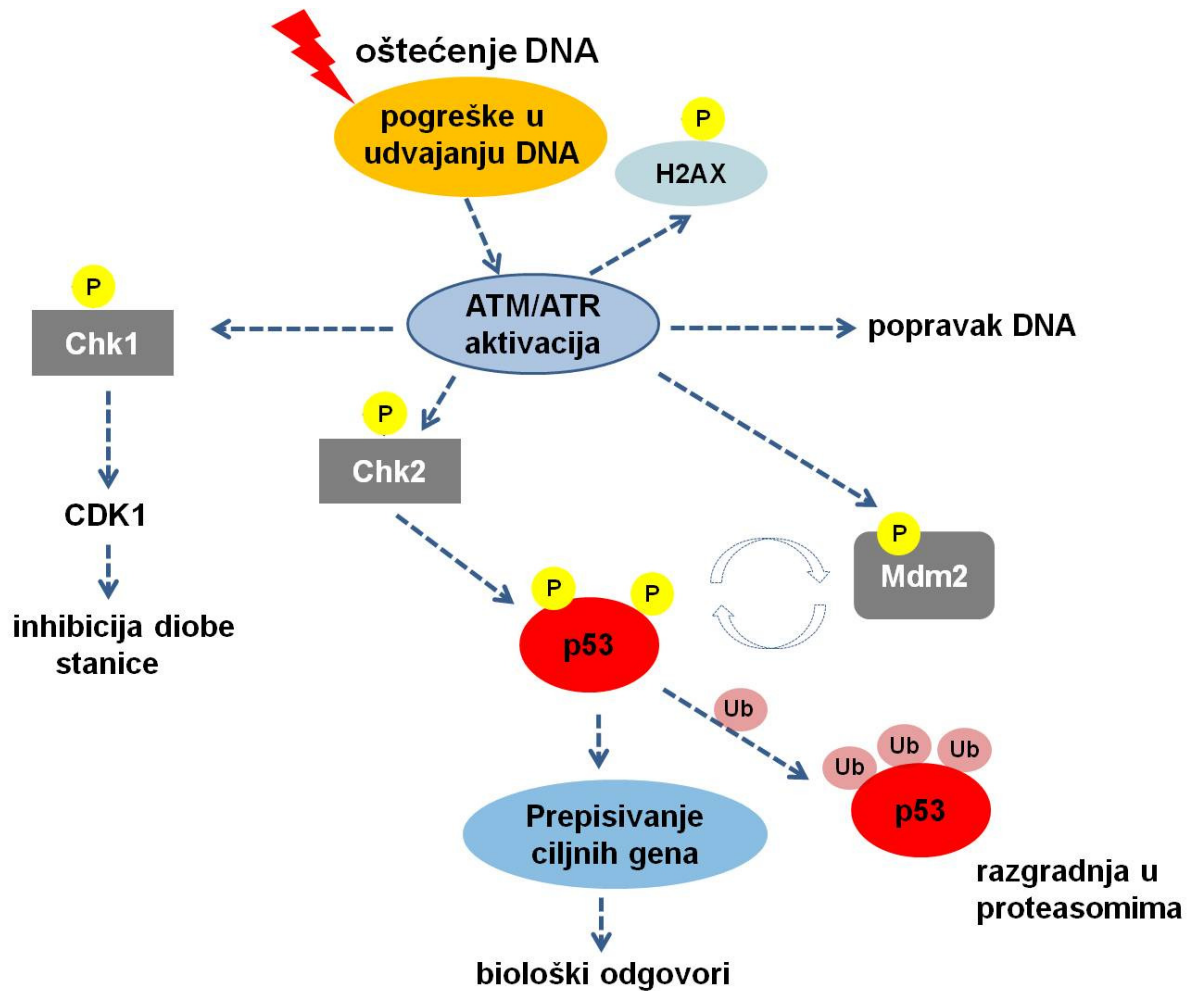


Slika 10. Aktivacija supresora tumora p53. Brojni stresovi u stanici aktiviraju p53. Aktivirani p53 aktivira specifične biološke odgovore u stanici i omogućuje prilagodbu stanice na stres te sprječava nastanak zloćudnih tumora.

U normalnim uvjetima u stanici razina p53 niska je uslijed stalne razgradnje posredovane s Mdm2. Mdm2 je E3 ubikvitinska ligaza koja ubikvitinira p53 i usmjerava ga u proteasome na razgradnju (101). Signalni putevi koji aktiviraju stresove u stanici fosforiliraju, nediliraju, acetiliraju i sumoiliraju p53 i Mdm2 (102). Te posttranslacijske modifikacije onemogućuju Mdm2 posredovanu razgradnju p53 ili aktiviraju transkripcijsku aktivnost p53 u uvjetima stresa u stanici (103). Osim posttranslacijskim modifikacijama, transkripcijska aktivnost supresora tumora p53 regulirana je i njegovim vezanjem za MDMX (Mdm2 homolog, poznat još i kao MDM4) zbog toga većina stresova koji aktiviraju p53 posttranslacijski modificiraju MDMX, što rezultira njegovom razgradnjom (6).

1.6.1. Mehanizam aktivacije p53 nakon oštećenja DNA

Molekularni mehanizmi aktivacije p53 nakon oštećenja DNA relativno su dobro razjašnjeni. Oštećenja DNA aktiviraju kinaze ATM (engl. *ataxia telangiectasia-mutated*) i ATR (engl. *ATM and Rad3-related*). Kinaza ATM aktivira se nakon oštećenja DNA ionizirajućim zračenjem, a ATR u odgovoru stanice na oštećenje DNA UV zračenjem ili pogreškama u udvajanju DNA. Kinaze ATM/ATR fosforiliraju histon H2AX, koji obilježava mjesto oštećenja DNA. Na mjestu oštećenja nakuplja se proteinski kompleks, koji uz ATM i ATR kinaze i druge signalne komponente koje sudjeluju u aktivaciji p53 aktivira p53-ovisne i p53-neovisne biološke odgovore stanice nakon oštećenje DNA (**slika 11**) (104, 105). Aktivirana ATM kinaza indirektno fosforilira p53 putem kinaze Chk2 (engl. *checkpoint kinase*) i time sprječava njegovu vezu s negativnim regulatorom p53, Mdm2. Kinaza ATM fosforilira kinazu Chk1 (engl. *checkpoint kinase*) i time indirektno putem CDK1 (engl. *cyclin-dependent kinase 1*) inhibira diobu stanica s oštećenom DNA. Osim toga, aktivirana ATM kinaza direktno fosforilira Mdm2 što sprječava Mdm2-posredovanu razgradnju p53. Brojne posttranslacijske modifikacije reguliraju transkripcijsku aktivnosti p53. p53 inducira gene koji inhibiraju diobu stanica s oštećenom DNA, pomaže popravak DNA te aktivira programiranu smrt stanice ukoliko je oštećenje preveliko (106). Ti biološki procesi sprječavaju nastanak genomske nestabilnosti i posljedičnu zloćudnu preobrazbu stanice kojoj je oštećena DNA (107, 108).

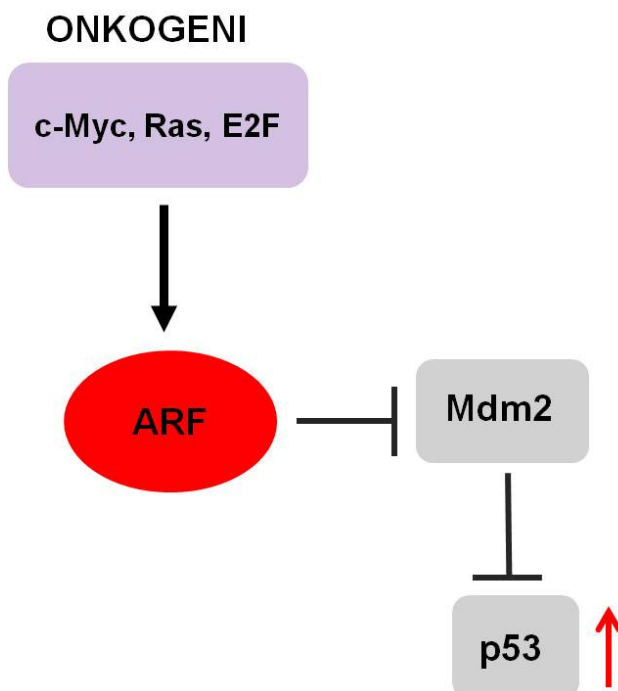


Slika 11. Aktivacija p53 nakon oštećenja DNA. Na mjestu oštećenja kinaze ATM/ATR fosforiliraju histon H2AX, koji obilježava to mjesto oštećenja. Aktivirane kinaze ATM i ATR reguliraju p53-ovisne i p53-neovisne biološke odgovore stanice nakon oštećenje DNA.

1.6.2. Mehanizam aktivacije p53 onkogenima

Aktivirani onkogeni u stanici (c-Myc, Ras, E2F) potiču prepisivanje Arf gena (37, 62, 64). Aktivirani Arf veže Mdm2 i inhibira njegovu ubikvitin ligaznu aktivnost prema p53, što rezultira povećanjem njegovog izražaja. Ovaj mehanizam ima važnu ulogu u zaštiti stanica od zloćudne preobrazbe onkogenima. Uslijed inaktivacije Arf-a

gubi se p53 posredovana zaštita od zloćudne preobrazbe onkogenima (**slika 12**) (65).



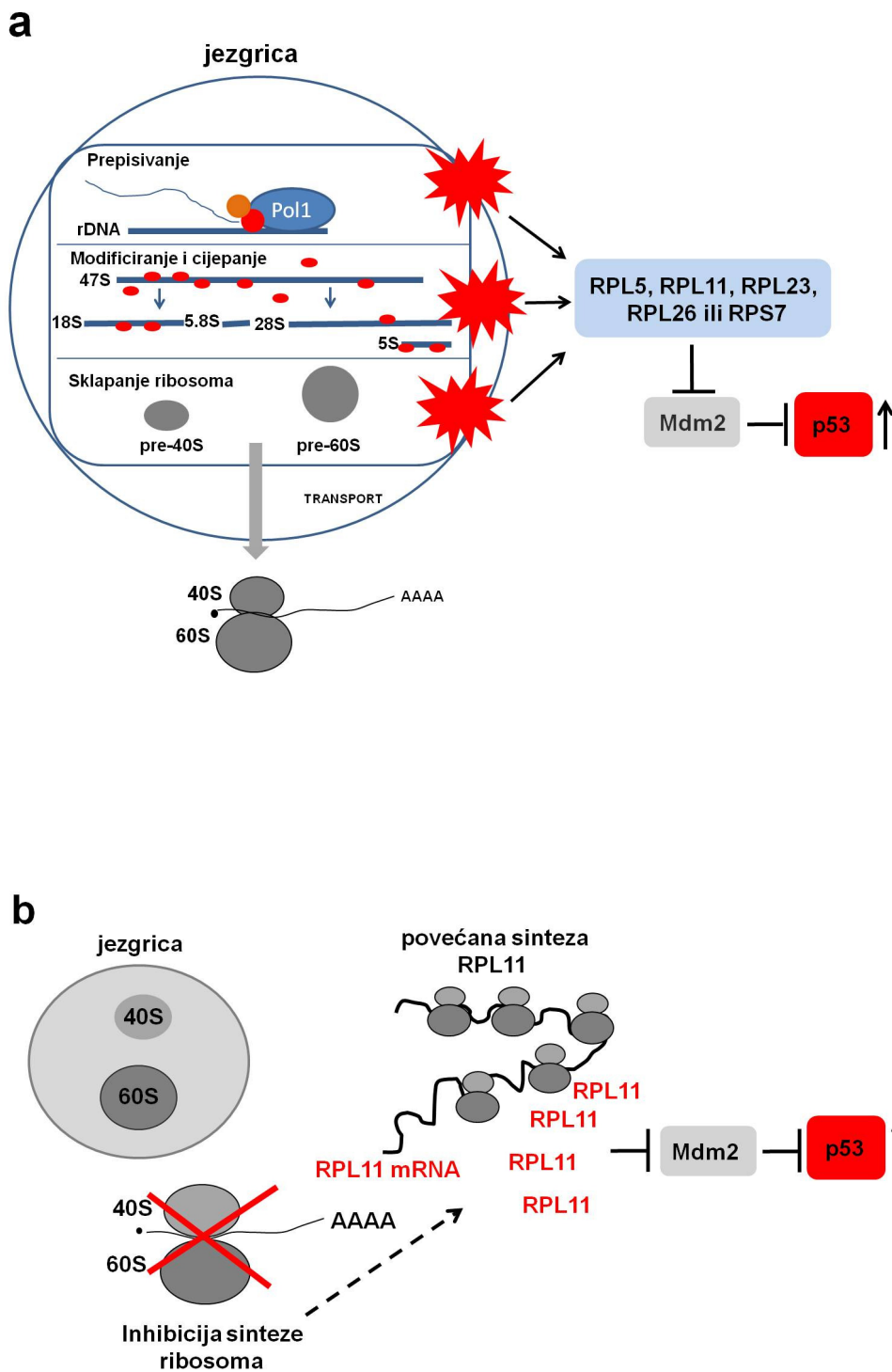
Slika 12. Aktivacija supresora tumora p53 putem onkogeni. Onkogeni Ras, c-Myc, E2F potiču prepisivanje Arf gena. Aktivirani Arf veže se na središnji dio Mdm2 i sprječava Mdm2 posredovanu razgradnju p53. Nakon inaktivacije Arf-a gubi se p53 posredovana zaštita od zloćudne preobrazbe okogenima.

1.6.3. Mehanizam aktivacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma

Pretpostavljalo se da svi stresovi koji dovode do aktivacije p53 oštećuju DNA. Međutim, novija istraživanja dokazala su da pogreške u različitim koracima sinteze ribosoma aktiviraju tumor supresor p53 neovisno o oštećenju DNA (35). Ti rezultati ukazali su na postojanje novog signalnog puta aktivacije p53.

Na temelju brojnih istraživanja ovog kontrolnog mehanizma predložen je model u kojem inhibicija različitih koraka sinteze ribosoma rezultira razaranjem jezgrice i oslobađanjem RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 iz jezgrice u jezgru, gdje se vežu na centralni dio Mdm2 te inhibiraju Mdm2-posredovanu razgradnju p53 (**slika 13a**) (109-117).

Važno je naglasiti da je u tim pokusima analizirana funkcija egzogenih RP. Međutim, funkcija egzogenih RP ne mora biti identična funkciji endogenih RP. Osim toga, međudjelovnja spomenutih RP s Mdm2 analizirana su u ukupnom staničnom lizatu u uvjetima u kojima nije sprječena razgradnja ribosoma i oslobađanje svih RP u izvanribosomske odjeljke stanice. RP su pozitivno nabijeni i među najzastupljenijim su proteinima u stanicama sisavaca. Ukoliko su prisutni u velikim količinama mogu stupati u specifične i nespecifične interakcije s različitim makromolekulama, uključujući i negativno nabijeni Mdm2. Slijedeći problem s ovim modelom je da inhibicija nekih koraka u sintezi ribosoma ne rezultira razaranjem jezgrice, unatoč aktivaciji p53 u tim uvjetima, što ukazuje da razaranje jezgrice nije neophodno za aktivaciju p53.



Slika 13. Predloženi modeli aktivacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. a) Inhibicija sinteze ribosoma rezultira razaranjem jezgrice i oslobađanjem RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 u jezgru gdje se vežu na centralni dio Mdm2 i rezultiraju njegovom inhibicijom i posljedičnom stabilizacijom p53. b) Inhibicija sinteze ribosoma ne rezultira razaranjem jezgrice, već se povećava sinteza RPL11 koji inhibira Mdm2 i stabilizira p53.

Nedavno je predloženo da jezgrica nije izvor RP koji aktiviraju p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. Taj model predlaže da se nakon inhibicije sinteze ribosoma selektivno potiče translacija mRNA koje kodiraju RPL11 i druge RP. Taj novosintetizirani RPL11 inhibira Mdm2 i stabilizira p53 u tim uvjetima (**slika 13b**) (118).

Osim RP, za aktivaciju p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma potrebna je i izvanribosomska 5S rRNA. U tim uvjetima RPL5 i RPL11 vežu Mdm2 u sklopu s 5S rRNA. Međutim, precizni molekularni mehanizmi regulacije 5S rRNA i njena uloga u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma još su nerazjašnjeni (6, 119).

Osim regulacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma, RPL11 regulira i neke druge signalne puteve. Tako se npr. RPL11 veže na Myc mRNA i Myc protein te sprječava njegov izražaj. Uloga ovog kontrolnog mehanizma nerazjašnjena je, iako se može pretpostaviti da RPL11 u uvjetima poremećene sinteze ribosoma sprječava Myc posredovanu sintezu ribosoma i proteina te rast stanice (120).

U svrhu boljeg razumijevanja ovog važnog signalnog puta u budućnosti bit će potrebno identificirati nove komponente koje sudjeluju u tom signalnom putu te razjasniti molekularne mehanizme njihove aktivacije p53.

2. Cilj istraživanja

Unatoč važnosti ovog signalnog puta u patogenezi bolesti u ljudi, postignut je relativno slab napredak u razumijevanju mehanizama aktivacije supresora tumora p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. U dosadašnjim istraživanjima predloženo je da RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 inhibiraju Mdm2 i stabiliziraju p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. U tim istraživanjima analizirane su funkcije egzogenih RP u aktivaciji p53, koje nužno ne moraju biti identične funkciji endogenih RP. Osim toga, nepoznat je pojedinačni doprinos RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 ili RPS7 aktivaciji p53 te su nerazjašnjeni molekularni mehanizmi putem kojih inhibicija sinteze ribosoma potiče signalnu funkciju tih RP. Stoga sam u pripremi za ovo istraživanje proizvela nove reagense (monoklonska i poliklonska protutijela) protiv velikog broja RP u svrhu dobivanja jasnijeg uvida u funkciju endogenih RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 u ovom novom signalnom putu.

Na temelju dosadašnjih spoznaja u ovoj doktorskoj disertaciji postavila sam hipotezu da RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 imaju specifične uloge u aktivaciji p53 nakon inhibicije različitih koraka u sintezi ribosoma.

U svrhu testiranja te hipoteze u svom istraživanju postavila sam sljedeće ciljeve:

- 1. Odrediti specifičnu ulogu RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 u aktivaciji p53 nakon inhibicije različitih koraka u sintezi ribosoma.**
- 2. Razjasniti precizne molekularne mehanizme putem kojih ti RP aktiviraju p53.**

3. Materijali i metode

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Actinomicyn D, Sigma

Agaroz, Sigma

Akrlamid/bisakrlamid (29:1), 30%-tna otopina, Biorad laboratories GmbH

Albumin goveđeg seruma (BSA, *engl. bovine serum albumin*), Sigma

Amonijev klorid (NH_4Cl), Kemika

Amonijev persulfat ($\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$), Sigma

Aprotinin, Fluka

Biorad protein assay, Biorad laboratories GmbH

Blotto, nemasno mlijeko u prahu, Santa Cruz Biotechnology

Bromfenol modriilo (*engl. bromphenol blue*), Merck

Cikloheksamid (CHX), Sigma

DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), Sigma

Dietil pirokarbonat (DEPC), Sigma

Dimetilsulfoksid (DMSO), Kemika

DTT, Sigma

ECL Prime Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences

Etidij bromid, Gibco BRL

Etilendiamintetraacetat- Na_2 (EDTA; Kompleksal III), Kemika

Etanol (CH_3OH), Kemika

Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF; $C_7H_7FO_2S$), Sigma
Fenol (C_6H_6O), Kemika
Fetalni teleći serum (FCS, *engl. fetal calf serum*), Gibco BRL
Formaldehid (36%), Kemika
Formamid, deionizirani (CH_3NO), Sigma
5-fluorouracil, Sigma
L-Glutamin, Gibco BRL
Glicerol, Sigma
Glicin ($C_2H_5NO_2$), Sigma
Gvanidin tiocijanat, Sigma
Hepes, Sigma
8-hidroksikinolin (C_9H_7NO), Sigma
Izoamilni alkohol ($C_5H_{12}O$), Sigma
Kalcijev klorid ($CaCl_2$), Kemika
Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika
Kalijev hidrogenkarbonat ($KHCO_3$), Kemika
Kalijev klorid (KCl), Kemika
Kloridna kiselina (HCl), Kemika
Kloroform ($CHCl_3$), Kemika
Leupeptin, Sigma
Lipofectamine 2000, Invitrogen
Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen
Magnezijev klorid heksahidrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$), Kemika
Metanol (CH_3OH), Kemika

Metilensko plavilo, Merck

MG132, Tocris

Mineralno ulje, Sigma

Natrijev acetat (CH_3COONa), Kemika

Natrijev azid (NaN_3), Kemika

Natrijev deoksikolat (NaDOC), Sigma

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

di-Natrij-hidrogenfosfat-12-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), Kemika

Natrijev hidroksid (NaOH), Kemika

Natrijev fluorid (NaF), Sigma

Natrijev klorid (NaCl), Kemika

Natrijev ortovanadat (Na_3VO_4), Sigma

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

3-(N-morfolino-propansulfonska kiselina), MOPS, Sigma

Octena kiselina (ledena) (CH_3COOH), Kemika

Paraformaldehid, Fluka

Otopina penicilina i streptomocina, Gibco

PMSF, Sigma

Ponceau S, Sigma

Power Sybr Green, Applied Biosystems

2-propanol (izopropanol), Kemika

Propidij jodid (PI), Sigma

ProLong Gold antifade reagent, Invitrogen

Protein A Sepharose, Sigma

Proteinski markeri, obojeni, Biorad laboratories GmbH
Rapamycin, Sigma
Reverse transcription-PCR (RT-PCR) kit, Applied Biosystems
RNase inhibitor, Ambion
Saharoza, Sigma
SDS (natrij dodecil sulfat), Sigma
TEMED (C₆H₁₆N₂), Sigma
Tergitol (Nonidet P-40), Sigma
Triklorooktana kiselina, Kemika
Tripansko modriilo (trypan blue), Sigma
Trizma-baza, Sigma
Trizma-hidroklorid, Sigma
Trizol reagens, Invitrogen
Triton X-100, Pharmacia Biotech
Tween 20 (polioksietilen-sorbitan monolaureat), Sigma

3.1.2. Mediji i puferi za kulturu stanica

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

Natrij klorid (NaCl) 137 mM, kalij klorid (KCl) 2,7 mM, natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat (NaH₂PO₄ x 2H₂O) 4,3 mM, kalij-dihidrogenfosfat (KH₂PO₄) 1,4 mM

3.1.2.2. Mediji za uzgoj stanica

Medij RPMI 1640, L-glutamin 2mM, 2-merkaptetanol 50 μ M, penicilin 105 U/L, streptomycin 0,1 g/L, gentamicin 0,035 g/L, FCS 10% (v/v)

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

3.1.2.3. Medij za transfekciju stanica

Optimem, Gibco

3.1.3. Otopine korištene za izolaciju RNA

3.1.3.1. Organska otapala u izolaciji RNA

Smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola 49:1 (v/v); izopropanol 100%; etanol 75% u destiliranoj vodi tretiranoj DEPC-om

3.1.3.2. Denaturirajući pufer za pripremu uzoraka RNA za elektroforezu

MOPS (pH 7,0) 40 mM, formaldehid 6,54% (v/v), deionizirani formamid 50% (v/v)

3.1.3.3. Pufer za nanošenje uzoraka RNA na gel

EDTA (pH 8,0) 1 mM, bromfenol modriilo 0,25% (w/v), ksilen cijanol 0,25% (w/v), glicerol 50% (v/v)

3.1.3.4. Voda tretirana s DEPC-om

DEPC 1% (v/v) u dH₂O

3.1.3.5. Pufer za elektroforezu RNA (10x)

3-(N-morfolino) propansulfonska kiselina (MOPS) (pH 7,0) 0,4 M, natrij acetat (CH₃COONa) 0,1 M, EDTA 0,01 M

3.1.4. Otopine korištene za imunofluorescenciju

3.1.4.1. Otopina za fiksaciju stanica

Paraformaldehid, 0,4 g/l, otopljen u PBS-u, pH 7.4

3.1.4.2. Otopina za permeabilizaciju stanica

Triton X-100, 0,5%-tna otopina u PBS-u

3.1.4.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela

3% BSA-0,2% Triton X-100 u PBS-u

3.1.5. Puferi i otopine korištene za izolaciju, elektroforezu proteina i Western blot analizu

3.1.5.1. Pufer za izolaciju proteina (RIPA, engl. *radiation immunoprecipitation assay*)

Tris Cl (pH 8,0) 50mM, NP-40 1% (v/v), SDS 0,1% (w/v), natrij deoksikolat 0,5% (v/v), natrij klorid (NaCl) 150mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, aprotinin 1μg/mL, leupeptin 1μg/mL, natrij ortovanadat (Na₃VO₄) 1mM, natrij fluorid (NaF) 1mM

3.1.5.2. Otopina za ispiranje membrana

1XTBS Tween 20 0,05% (Tris-baza 50mM, natrij klorid 150 mM), pH 7,6

3.1.5.3. Otopina za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela

Nemasno mlijeko 5% (w/v) u TBS-Tween 20

Albumin goveđeg seruma (BSA) 5% (w/v) u TBS-Tween 20

3.1.5.4. Otopina za vizualizaciju proteina vezanih na membranu

Ponceau S 0,5% (w/v) u 1%-tnoj (v/v) octenoj kiselini (CH₃COOH)

3.1.5.5. Pufer za nanošenje uzoraka proteina na gel (5x)

Tris-Cl 300 mM (pH 6,8), glicerol 50% (v/v), SDS 10% (w/v), bromfenol modriilo (*engl. bromphenol blue*) 0,05% (w/v), 2-merkaptoetanol 10% (v/v)

3.1.5.6. Pufer za elektroforezu proteina (Laemmli pufer) (5x)

Tris-baza 12,5 mM, glicin 100 mM, SDS 0,5 % (w/v), pH 8,5

3.1.5.7. Pufer za prijenos proteina s gela na membranu

Tris-baza 48 mM, glicin 390 mM, SDS 0,1% (w/v), metanol 20% (v/v)

3.1.6. Otopine za imunotaloženje proteina

3.1.6.1. Pufer za imunotaloženje proteina

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0,8% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA

i inhibitori proteaza i fosfataza (1 µg of leupeptin/ml, 1 µg of aprotinin/ml, 50 µg of PMSF/ml, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF)

3.1.7. Otopine za razdvajanje staničnih odjeljaka

3.1.7.1. Pufer za izolaciju ukupnog ribosomskog i izvanribosomskog odjeljka stanice

20 mM Tris (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 300 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 100 jedinica/ml inhibitora RNaze, 0.5% NP-40 and 100 µg/ml cikloheksamida.

3.1.7.2. Otopina saharoze za razdvajanje ribosomskih i izvanribosomskih odjeljaka

20% (w/v) saharoza, 20 mM Tris (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 300 mM KCl, 0,5 % NP-40
Prije upotrebe dodati 10 mM DTT i 100 jedinica/ml inhibitora RNaze.

3.1.7.3. Pufer s niskom koncentracijom soli (engl. *low-salt buffer*)

10 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 10 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1 mM EDTA

3.1.7.4. Pufer s visokom koncentracijom soli (engl. *high-salt buffer*)

10 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,5 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂

3.1.7.5. Pufer za izolaciju jezgrica

10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT

3.1.8. Protutijela za Western blot analizu, imunotaloženje i imunofluorescenciju

3.1.8.1. Komercijalna protutijela za Western blot analizu

Protutijelo protiv aktina proizvedeno u mišu, Chemicon

Protutijelo protiv p21 proizvedeno u mišu, Santa Cruz

Protutijelo protiv p53 proizvedeno u mišu, DO-1 Santa Cruz

Protutijelo protiv Mdm2 proizvedeno u mišu, SMP14 Santa Cruz

Protutijelo protiv UBF-a proizvedeno u mišu, Santa Cruz

Protutijelo protiv tubulina proizvedeno u mišu, Santa Cruz

Protutijelo protiv B23 proizvedeno u mišu, Sigma

Protutijelo protiv PML-a proizvedeno u zecu, Abcam,

Protutijelo protiv fibrilarina proizvedeno u zecu, Abcam

Protutijelo protiv PARP-a proizvedeno u zecu, Cell Signaling

Protutijelo protiv p53 proizvedeno u zecu, FL-393, Santa Cruz

Protutijelo protiv Lamina B proizvedeno u kozi, Santa Cruz

Protutijelo na mišje IgG konjugirano s peroksidazom iz hrena (HRP, *engl. horse radish peroxidase*) i proizvedeno u kozi, Santa Cruz

Protutijelo na zečji IgG konjugirano s HRP i proizvedeno u mišu, Santa Cruz

3.1.8.2. Protutijela za Western blot analizu proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Protutijelo protiv RPS3 proizvedeno u mišu

Protutijelo protiv RPS6 proizvedeno u mišu

Protutijelo protiv RPS12 proizvedeno u mišu

Protutijelo protiv RPL5 proizvedeno u mišu

Protutijelo protiv RPS7 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPS20 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPL11 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPL12 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPL23 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPL26 proizvedeno u zecu

3.1.8.3. Komercijalna protutijela korištena za imunotaloženje

Protutijelo protiv Mdm2 proizvedeno u mišu, SMP14 Santa Cruz

Protutijelo protiv Mdm2 proizvedeno u zecu, H221 Santa Cruz

3.1.8.4. Protutijela za imunotaloženje proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Protutijelo protiv RPL5 proizvedeno u zecu

Protutijelo protiv RPL11 proizvedeno u zecu

3.1.8.5. Komercijalna protutijela za imunofluorescenciju

Protutijelo protiv fibrilarina proizvedeno u zecu, Abcam

Protutijelo protiv p53 proizvedeno u zecu, FL393, Santa Cruz

Protutijelo protiv Mdm2 proizvedeno u zecu, H221 Santa Cruz

Protutijelo protiv PML-a proizvedeno u mišu, Abcam

Protutijelo protiv HA proizvedeno u mišu, Cell Signaling

Protutijelo protiv UBF-a proizvedeno u mišu, Santa Cruz

Protutijelo protiv B23 proizvedeno u mišu, Sigma

Protutijelo na zečje IgG konjugirano s fluorescentnom bojom Alexa 488 i proizvedeno u kozi, Molecular Probes

Protutijelo na mišje IgG konjugirano s fluorescentnom bojom Alexa 594 i proizvedeno u kozi, Molecular Probes

3.1.8.6. Protutijela za imunofluorescenciju proizvedena na Zavodu za Molekularnu medicinu i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Protutijelo protiv RPS6 proizvedeno u mišu

Protutijelo protiv RPS12 proizvedeno u mišu

3.1.9. Enzimi

3.1.9.1. Nukleaze

DNaza, Ambion

Ribonukleaza A, Sigma

3.1.10. Uređaji i pribor

Biomax filmovi, Kodak

Bürker-Türk hemicitometar

Centrifuge, rashladne: Eppendorf , Chillspin, Sorvall

Igla za nanašanje uzoraka proteina na gel, Hamilton

Hibridizacijska pećnica

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

Homogenizator

Horizontalna tresilica, Ika

Immobilon P (PVDF membrana za transfer proteina), Millipore

Inkubator, Jouan

Konfokalni mikroskop Zeiss LSM700 CLSM (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Magneti i magnetska mješalica, Ika

pH metar, Mettler Toledo

Pipete, Eppendorf i Gilson

Pipetori, Gilson

Polaroid kamera, Hoefer

Protočni citometar, FACScan Becton Dickinson

Razvijač i fiksir (otopine) za razvijanje filmova, Kodak

Sustav za elektroforezu RNA i proteina, Biorad laboratories

Sonikator, Misonix

Termomikser, Eppendorf

Ultracentrifuga, Beckman

Uređaj za lančanu reakciju polimerazom, Applied Biosystems

Uređaj za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom ABI Prism 7300, Applied Biosystems

Transluminator, Hoefer

Vodena kupelj

Vibracijska mješalica

3 mm filter papir, Whatman

3.1.11. Laboratorijsko posuđe

Bakterijske petrijevke, Greiner

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

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

Epruvete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, Greiner

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

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

Odmjerne menzure, tikvice i čaše

Plastični lijevci i kadice

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

Pasterove pipete

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

Predmetna i pokrovna stakalca

3.1.12. Linije stanica i uzgoj stanica

Ulogu specifičnih RP u aktivaciji p53 istražila sam u staničnim linijama A549 (porijeklom iz alveolarnog adenokarcinoma, ATCC) i U-2 OS (porijeklom iz osteosarkoma, ATCC). Stanice sam uzgajala u DMEM mediju uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma. Embrionalne fibroblaste miša (engl. *mouse embryonic fibroblast*, MEF) izolirala sam iz 13,5 dana starih embrija. Za pokuse sam koristila samo rane pasaže (3-6) embrionalnih fibroblasta miša. Stanične linije H1299 (porijeklom iz metastaza limfnih čvorova) koje izražavaju endogene RPL4, RPL11 i RPS6 obilježene žutim fluorescentnim proteinom (engl. *yellow fluorescence protein*, YFP) koristila sam za praćenje lokalizacije RP u stanici, a uzgajala sam ih u potpunom RPMI-u s dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma. YFP je integriran u prvi intron RPL4, RPL11 i RPS6 gena i spojen u protein kao novi ekson. YFP-L4, YFP-L11 i YFP-S6 pretežno su smješteni u jezgri i citoplazmi, što je slično smještaju endogenih RP.

3.2. METODE

3.2.1. Unos nukleinskih kiselina u stanice

U svrhu testiranja uloge specifičnih RP u aktivaciji p53 putem ribosomskih stresova (AktD i 5-FU), utišala sam njihov izražaj (engl. *silencing*) pomoću siRNA (Applied Biosystems) u stanicama A549 i U-2 OS. siRNA dizajnirala sam upotrebom kompjutorskog programa (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>). U stanice siRNA molekule unijela sam u koncentraciji 20 nM pomoću reagensa Lipofectamine RNAiMAX uz dodatak medija Optimem-a u skladu s preporukama proizvođača. Stanice su inkubirane siRNA molekulama u trajanju od 48 sati. U **Tablici 6.** navedeni su ciljni slijedovi nukleotida svih korištenih siRNA molekula.

Tablica 6. Ciljne slijedovi nukleotida siRNA molekula korištenih u metodi utišavanja.

| Naziv siRNA | Ciljni slijed nukleotida |
|-------------|---------------------------|
| RPL5 #1 | 5-AAGGTTGGCCTGACAAATTAT-3 |
| RPL5 #2 | 5-AACTACCACTGGCAATAAAGT-3 |
| RPL11 #1 | 5-AAGGTGCGGGAGTATGAGTTA-3 |
| RPL11 #2 | 5-TACGGCCTGGACTTCTATGTG-3 |
| RPS7 #1 | 5-GCAAGGATGTTAATTTTGA-3 |
| RPS7 #2 | 5-GGAAGCATGTCGTCTTTAT-3 |
| RPL23 #1 | 5-AAGGCGAGATGAAAGGTTCTG-3 |
| RPL23 #2 | 5-AAAGATGGCGTGTTTCTTTAT-3 |
| RPL26 #1 | 5-AAGAGCTGAGACAGAAGTACA-3 |
| RPL26 #2 | 5-AACCGAAAGGATGATGAAGTT-3 |
| RPS6 #1 | 5-AAGAAAGCCCTTAAATAAAGA-3 |
| RPL24 #1 | 5-AAAGGGACAGTCGGAAGAAAT-3 |
| p53 #1 | 5-CAGCATCTTATCCGAGTGGAA-3 |

3.2.2. Izolacija ukupne RNA i dokazivanje mRNA specifičnih RP

Izražaja mRNA za specifične RP analizirala sam metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction*, RT PCR) pomoću uređaja ABI Prism 7300.

| Program reakcije: | | | |
|-------------------|------|--------|-----|
| 1. | 94°C | 10 min | |
| 2. | 94°C | 15 s | |
| | 60°C | 60 s | 40x |

U tu svrhu izolirala sam ukupnu RNA iz stanica korištenjem TriReagenta prema uputama proizvođača te nakon kratkog miješanja dodala kloroform. Nakon centrifugiranja, vodenu fazu koja sadrži RNA sam prenijela u čistu tubicu te na nju dodala jednaki volumen izopropanola, centrifugirala te tako precipitirala ukupnu RNA. Talog RNA isprala sam u 75% etanolu (pripremljenim u vodi tretiranoj DEPC-om) i otopila u vodi bez nukleaza. Na taj način izoliranu ukupnu RNA iz stanica prevela sam u cDNA pomoću kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. cDNA sam koristila kao kalup za RT PCR uz upotrebu specifičnih početnica. U **Tablici 7.** navela sam sve početnice koje sam koristila za određivanje izražaja specifičnih gena u stanicama.

Za detekciju PCR produkta tijekom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korištena je fluorescentna boja SYBR Green. Prvi ciklus na kojem je bilo moguće odrediti nastajanje PCR fragmenta nazvan je prag, C_t (engl. *cycle treshold*). Analizu podataka napravila sam usporedbom vrijednosti C_t uz normalizaciju prema *GAPDH* (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), koji ima isti izražaj u svim stanicama organizma (engl. *housekeeping gene*), koristeći program Excel (Microsoft).

Rezultate sam izrazila kao omjer između vrijednosti tretiranih u odnosu na kontrolne (netretirane) stanice za pojedini gen (n, engl. *fold change*).

Tablica 7. Slijedovi nukleotida u početnicama za qRT-PCR.

| Naziv početnice | | Slijed nukleotida |
|-----------------|---|----------------------------------|
| Cdkn1A | F | 5'-GGACAGCAGAGGAAGACCATGT-3' |
| Cdkn1A | R | 5'-TGGAGTGGTAGAAATCTGTCATGC-3' |
| p53 | F | 5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3' |
| p53 | R | 5'-TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT-3' |
| RPL5 | F | 5'-GCACACGAACTGCCAAAATA-3' |
| RPL5 | R | 5'-TTCATCAACCAGTCACCTCCA-3' |
| RPL11 | F | 5'-GAAAAGGAGAACCCCATGC-3' |
| RPL11 | R | 5'-CATTTCTCCGGATGCCAA-3' |
| RPL23 | F | 5'-CTGACAACACAGGAGCCAAA-3' |
| RPL23 | R | 5'-ACACGCCATCTTTTCTACGG-3' |
| RPL24 | F | 5'-CAAATTCCAGAGGGCCATTA-3' |
| RPL24 | R | 5'-TTTGCTTAGGTGCTGCCTTT-3' |
| RPL26 | F | 5'-GGAAAAGGCTAATGGCACAA-3' |
| RPL26 | R | 5'-TCCTTTCCTACTTGGCGAGA-3' |
| RPS6 | F | 5'-TGCTCTGAAGAAGCAGCGTA-3' |
| RPS6 | R | 5'-GGAAAGTCTGCGTCTTTCG-3' |
| RPS7 | F | 5'-GTGGGAAGCATGTGCTCTTT-3' |
| RPS7 | R | 5'-TGTTCTGCTGTGCTTTGTCC-3' |
| pre-rRNA | F | 5'-CCTGTCTGTTCTCTCGCGCGTCCGAA-3' |
| pre-rRNA | R | 5'-AACGCCTGACACGCACGGCACGGA-3' |
| GAPDH | F | 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3' |
| GAPDH | R | 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' |
| PML | F | 5'-CCTCCCCTTCAGCTTCTCTT-3' |
| PML | R | 5'-CGCAGAAACTGGAACCTCCTC-3' |
| B23 | F | 5'-AAAAAGCGCCAGTGAAGAAA-3' |
| B23 | R | 5'-CCACTTTGGGAAGAGAACCA-3' |

3.2.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina i određivanje izražaja p53, p21 i Mdm2

Nakon tretmana stanica A549 i U-2 OS sa siRNA i farmakološkim inhibitorima sinteze ribosoma (ActD 5nM, 5-FU 385 μ M) stanice sam lizirala na ledu u trajanju od 30 minuta u pufera za lizu stanica, RIPA. Nakon centrifugiranja brzinom 13000 rpm, supernatante koji sadrže proteine sam prebacila u čistu tubicu, zamrznula u tekućem dušiku i pohranila na -80°C do analize. Koncentraciju proteina u lizatu odredila sam upotrebom otopine Biorad Protein Assay prema uputama proizvođača. Proteine iz lizata razdvojila sam u 12% poliakrilamidnom gelu te prenijela s gela na PVDF membranu. Izražaj proteina p53, p21, Mdm2 testiran je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela.

3.2.4. Izolacija ribosomskih i izvanribosomskih odjeljaka stanice

Pretpostavlja se da su RP koji sudjeluju u aktivaciji p53 prisutni izvan ribosoma. U svrhu dokazivanja RP prisutnih u izvanribosomskim odjeljcima, lizirala sam stanice A549 (3×10^7) 10 minuta na ledu u puferu s niskom koncentracijom soli te radvojila citoplazmu od jezgre centrifugiranjem 10 minuta na 2500 rpm. Talog jezgre lizirala sam u puferu s visokom koncentracijom soli 10 minuta na sobnoj temperaturi te potom centrifugirala 10 minuta na 12000 rpm i izdvojila nukleoplazmu. Lizate citoplazme i nukleoplazme položila sam na 20% saharozu i razdvojila na ribosomske i izvanribosomske odjeljke ultracentrifugiranjem u trajanju od 2 sata brzinom 40000 rpm. Osim toga, u stanicama sam u prisustvu inhibitora sinteze proteina 20 μ M cikloheksimida (CHX) odredila jesu li RP koji se nakupljaju izvan ribosoma novosintetizirani. Izražaj RP u tim odjeljcima odredila sam metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Protutijela protiv

tubulina i PARP-a koristila sam kao biljege citoplazme i nukleoplazme. Budući da je od ranije poznato da se RP razgrađuju u proteasomima u stanicama sam u prisutnosti proteasomalnog inhibitora MG132 (25 μ M) odredila dolazi li do nakupljanja RP nakon inhibicije proteasoma.

3.2.5. Izolacija jezgrica

Stanice A549 (5×10^6) lizirala sam u puferu za izolaciju jezgrica 5 minuta na ledu. Suspenziju stanica sam zatim homogenizirala pomoću Dounce homogenizatora i centrifugirala 5 minuta pri brzini od 1500 rpm. Nakon razdvajanja citoplazme i jezgre, talog staničnih jezgri resuspendirala sam u 0,25 M otopini saharoze i 10 mM $MgCl_2$ te položila na 0,35 M otopinu saharoze. Takvu suspenziju staničnih jezgri centrifugirala sam 5 minuta na 2500 rpm kako bih dobila još čišće jezgre. Talog vrlo čistih jezgri resuspendirala sam u 0,35 M otopini saharoze i 0,5 mM $MgCl_2$ te tako pripremljenu suspenziju staničnih jezgri sonicirala sam 6 puta po 10 sekundi. Soniciranu suspenziju položila sam na 0,88 M otopinu saharoze i razdvojila jezgricu i nukleoplazmatsku frakciju centrifugiranjem pri brzini 3500 rpm. Izražaj specifičnih proteina u jezgri odredila sam metodom Western blot.

3.2.6. Imunotaloženje specifičnih proteina iz ukupnih lizata i izvanribosomskih odjeljaka stanice

RPL5, RPL11 i Mdm2 istaloženi su iz 1,5 mg ukupnog lizata stanica ili iz izvanribosomskih odjeljaka stanice upotrebom specifičnih protutijela. Kompleks lizata i specifičnog protutijela vezala sam na zrnca sefaroze s konjugiranim proteinom A (engl. *Protein A sepharose beads*). Nakon pranja kuglica s puferom za imunotaloženje,

kuglice sam denaturirala 10 minuta na 95°C u Laemmli puferu. Prisutnost proteina u tim imunotalozima analizirala sam metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela.

3.2.7. Imunofluorescencija

Iz literature je poznato da brojni stanični stresovi dovode do promjena u strukturi jezgrice (34, 35), a pretpostavlja se da promjene u strukturi jezgrice za posljedicu imaju oslobađanje RP u nukleoplazmu. Iz tog razloga analizirala sam učinke različitih staničnih stresova na strukturu jezgrice. Tretirane i netretirane stanice fiksirala sam 4%-tnim paraformaldehidom ili apsolutnim metanolom. Za permeabilizaciju stanica koristila sam 0,5% Triton X-100 u PBS-u 7 minuta te sam potom stakalca isprala 2 puta u PBS-u i blokirala 30 minuta u otopini za sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela na sobnoj temperaturi. Integritet jezgrice odredila sam protutijelima protiv tri biljega (UBF, fibrilarin i B23) koji su specifični za različite odjeljke jezgrice. Osim toga koristila sam i slijedeća primarna protutijela za određivanje smještaja pojedinih proteina u stanici: protutijelo protiv p53 (FL393), protutijelo protiv Mdm2 (H221), protutijelo protiv PML-a, protutijelo protiv HA, protutijelo protiv RPS6 i protutijelo protiv RPS12. Sekundarno protu-kuniće protutijelo bilo je obilježeno s bojom Alexa 594 dok je sekundarno protu-mišje protutijelo bilo konjugirano s bojom Alexa 488. Inkubacija sekundarnim protutijelima, u razrijeđenju 1:1000, trajala je 45 minuta na temperaturi od 37°C. Prije uklapanja, dodala sam fluorescentnu boju koja boji DNA, DAPI u trajanju od 5 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Fluorescentni signal sam analizirala upotrebom konfokalnog mikroskopa.

3.2.8. Analiza dinamike kretanja i smještaja endogenih „p53 aktivirajućih RP“ u živim stanicama upotrebom konfokalnog mikroskopa

Da bih odredila dinamiku kretanja i promjene smještaja „p53 aktivirajućih RP“ nakon inhibicije sinteze ribosoma, analizirala sam endogene RP obilježene sa žutim fluorescentnim proteinom YFP u staničnim linijama H1299 upotrebom konfokalnog mikroskopa. S obzirom da postoji mogućnost da se „p53 aktivirajući RP“ oslobađaju iz jezgrice, ribosoma ili da su novosintetizirani nakon izlaganja stanica različitim stresovima, fluorescentni signal žutog fluorescentnog proteina u jezgri izbljedila sam upotrebom lasera valne duljine 488 nm u stanicama H1299, te pratila ponovno pojavljivanje signala u jezgricu u prisutnosti i odsutnosti inhibitora sinteze proteina CHX. Povratak fluorescentnog signala u jezgricu pratila sam u vremenskim razmacima od 30 minuta do 3 sata.

3.2.9. Analiza staničnog diobenog ciklusa

Stanice A549 fiksirala sam u etanolu (100%) 10 minuta, a potom sam staničnu suspenziju centrifugirala pri temperaturi od +4°C u trajanju 5 minuta. Na talog stanica dodala sam RNazu (100 ug/mL) i inkubirala 15 minuta na 37 °C te sam zatim dodala boju propidij jodid (0,036 mg/ml) i inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi. Propidij jodid je fluorescentna boja koja se izravno u stehiometrijskom odnosu veže na DNA. Protočnim citometrom može se mjeriti sadržaj jezgrine DNA, odnosno distribucija stanica u različitim fazama staničnog diobenog ciklusa. U svakom uzorku analizirano je 10 000 stanica protočnim citometrom, a podaci su obrađeni upotrebom kompjutorskog programa FlowJo softwera.

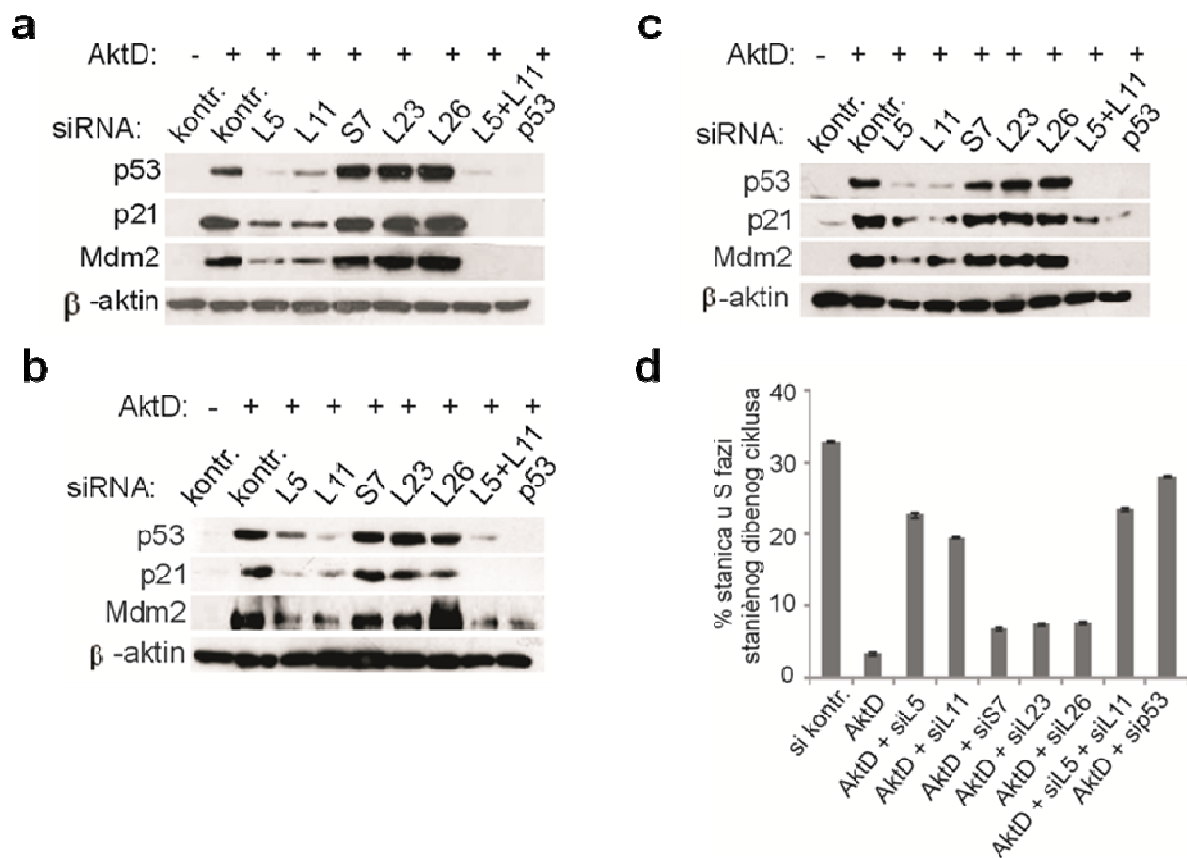
4. Rezultati

4.1. RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 i RPL26, aktiviraju supresor tumora p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma

Objavljeni rezultati ukazali su na potencijalnu važnost RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 u aktivaciji supresora tumora p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. U svrhu sveobuhvatnog razumijevanja njihove uloge u aktivaciji p53 u stanicama A549 i U-2 OS smanjen je njihov izražaj upotrebom specifičnih siRNA te je nakon toga farmakološki ili genetički inhibirana sinteza ribosoma i testiran izražaj p53 i njegovih ciljnih gena (p21 i Mdm2) metodom Western blot i metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (engl. *real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR).

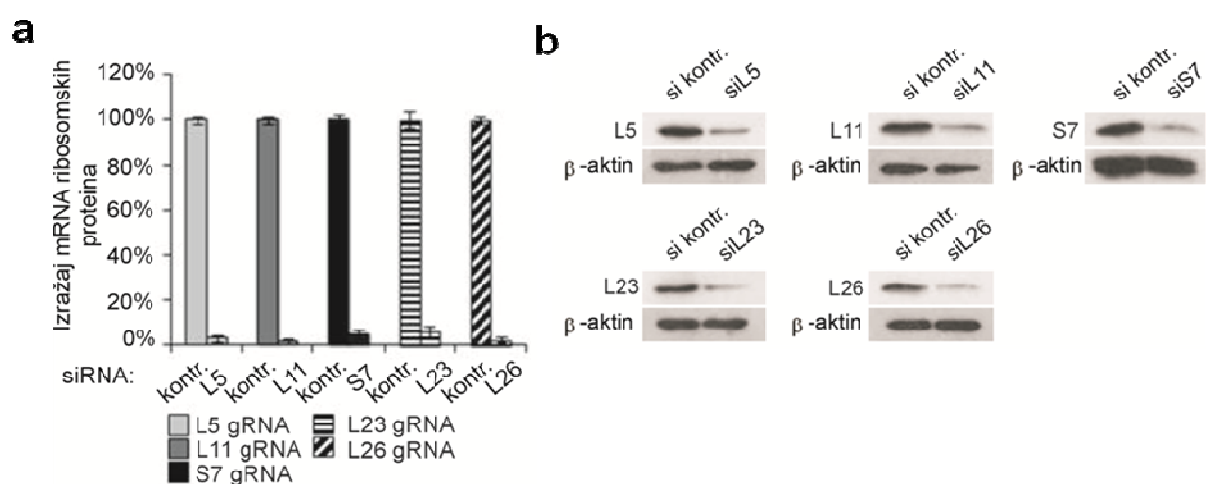
Tretman stanica s AktD sprječava ključni korak u sintezi ribosoma, prepisivanje preteče rRNA 47S te rezultira aktivacijom p53 i inhibicijom diobe (33, 34). Smanjen izražaj RPL5 i RPL11 spriječio je nakupljanje proteina p53, p21 i Mdm2 u prisutnosti AktD u stanicama A549 i U-2 OS (**slika 14a i c**) i omogućio je diobu tih stanica (**slika 14d**). Suprotno objavljenim rezultatima smanjenje izražaja RPS7, RPL23 ili RPL26 nije spriječilo nakupljanje p53 u tim stanicama, niti je omogućilo njihovu diobu. Slični rezultati dobiveni su upotrebom molekula siRNA koje prepoznaju druge dijelove mRNA za RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 (**slika 14b**) u stanicama A549 što ukazuje na opću važnost RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma AktD.

U zaključku, ovi rezultati ukazuju na činjenicu da su RPL5 i RPL11 ključni pozitivni regulatori p53 i p53-posredovane inhibicije diobe stanica.



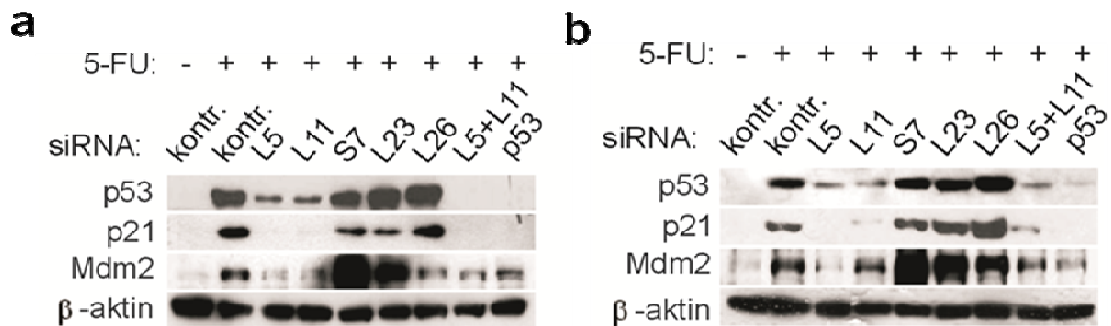
Slika 14. RPL5 i RPL11, ali ne i RPS7, RPL23 i RPL26 ključni su aktivatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma s AktD. (a) U stanice A549 unesena je kontrolna siRNA (kontr.) i specifične siRNA molekule protiv navedenih RP. Nakon 48 sati stanice su tretirane 5 nM AktD u trajanju od 16 sati te je izražaj proteina p53, p21 i Mdm2 određen metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina. (b) Stanice A549 tretirane su kao u (a), osim što su unesene siRNA molekule koje prepoznaju druge dijelove mRNA za naznačene RP. (c) Stanice U-2 OS tretirane su isto kao u (a) i izražaj proteina p53, p21 i Mdm2 određen metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. (d) Stanice A549 tretirane su kao u (a) te su fiksirane i obilježene s propidij jodidom, a udio stanica u S fazi staničnog diobenog ciklusa određen je protočnim citometrom. Oznake pogreške označavaju standardnu devijaciju.

Učinkovitost utišavanja RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 ili RPS7 s specifičnim molekulama siRNA testirana je metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (engl. *real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) i metodom Western blot (**slika 15a i b**).



Slika 15. Inhibicija izražaja specifičnih RP siRNA molekulama. U stanice A549 unesene su siRNA molekule protiv specifičnih RP, a nakon 48 sati testiran je njihov izražaj: a) metodom kvantitativne reakcije lančanom polimerazom (qRT-PCR). Izražaj mRNA normaliziran je prema količini mRNA za GAPDH (engl. *glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase*). Oznake pogreške označavaju standardnu devijaciju. (b) metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina koristio se kao kontrola nanosa ukupnih proteina.

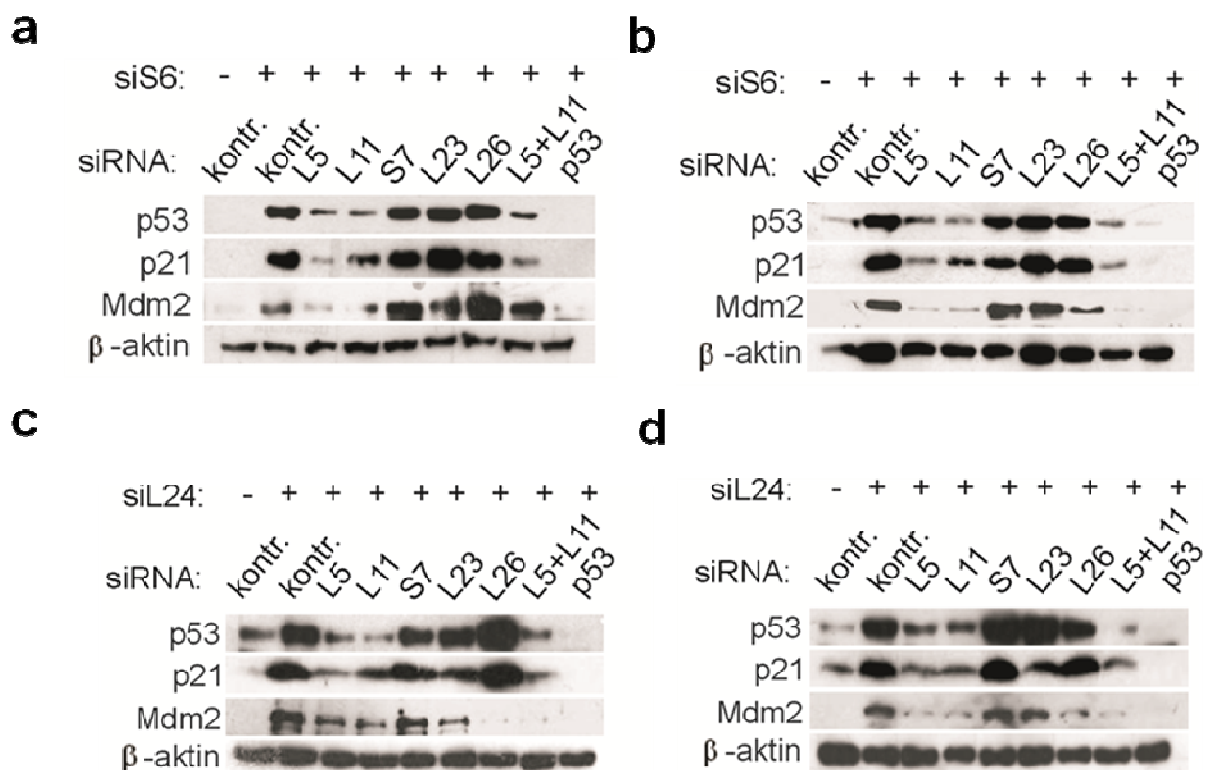
Tretman stanica s 5-FU, osim što rezultira inhibicijom prepisivanja 47S rRNA, inhibira cijepanja rRNA i posljedično aktivira p53 (35, 36). Slično kao i kod AktD, smanjen izražaj RPL5 ili RPL11, ali ne RPL23, RPL26 ili RPS7 spriječili su povećanje izražaja p53, p21 i Mdm2 u stanicama A549 (**slika 16a**) i U-2 OS (**slika 16b**) nakon tretmana s 5-FU.



Slika 16. RPL5 i RPL11 ključni su aktivatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma s 5-FU.

U stanice A549 (a) i stanice U-2 OS (b) unesena je kontrolna siRNA (kontr.) i specifične siRNA molekule protiv naznačenih RP. Nakon 48 sati stanice su tretirane s 385 μ M 5-FU 16 sati i izražaj proteina p53, p21 i Mdm2 određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina.

Zna se da pojedinačni RP iz velike i male podjedinice sudjeluju u različitim koracima sinteze ribosoma te da njihova genetička inaktivacija ili mutacije rezultiraju inhibicijom specifičnih koraka u tom procesu (109-117). Inhibicija sinteze ribosoma nakon smanjenja izražaja RPS6 i RPL24 rezultirala je povećanjem izražaja p53 i p21 u stanicama A549 i U-2 OS, a smanjenje izražaja RPL5 i RPL11 u tim uvjetima, ali ne RPS7, RPL23 ili RPL26 spriječilo je povećanje količine p53, p21 i Mdm2 (**slika 17a, b, c i d**). Ti rezultati ukazuju da su RPL5 i RPL11 ključni aktivatori p53 nakon smanjenog izražaja RP iz velike i male podjedinice ribosoma.

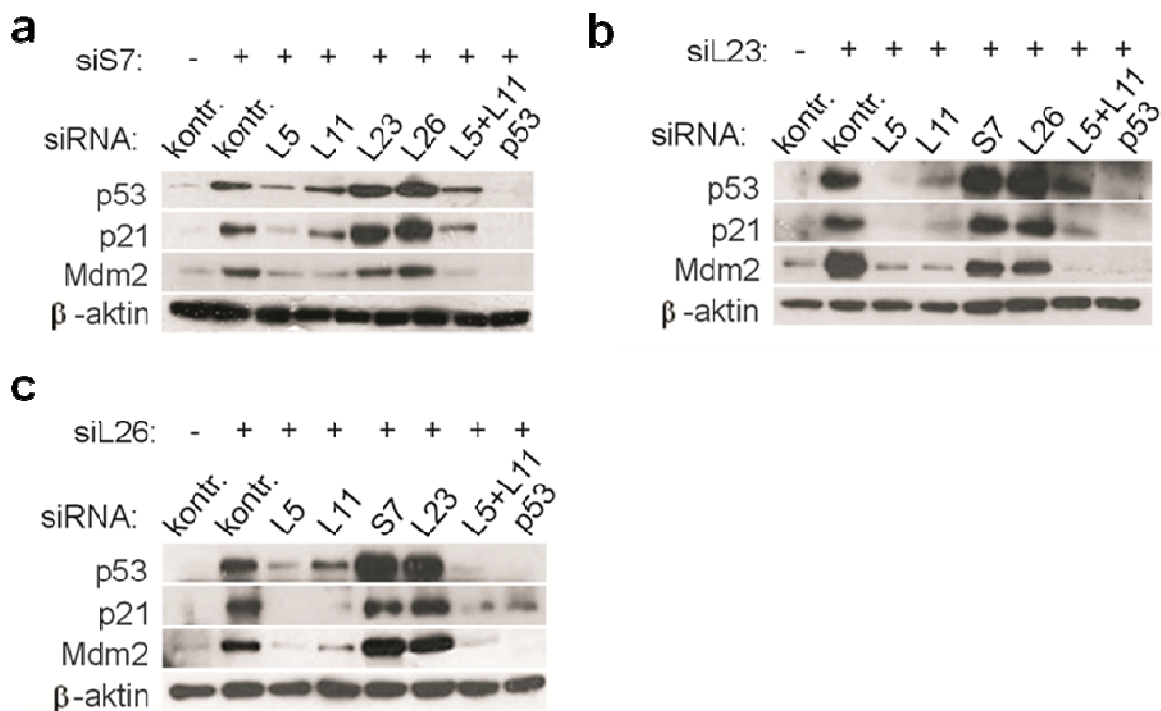


Slika 17. RPL5 i RPL11 neophodni su za aktivaciju p53 nakon inaktivacije RPS6 i RPL24.

U stanice A549 (a) i stanice U2-OS (b) unesena je RPS6 siRNA u kombinaciji s kontrolnom siRNA (kontr.) ili sa RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 ili RPS7 siRNA. U stanice A549 (c) i stanice U-2 OS (d) unesena je RPL24 siRNA u kombinaciji s kontrolnom siRNA i naznačenim siRNA molekulama. Izražaj p53, p21 i Mdm2 u lizatima (a), (b), (c) i (d) određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina.

Kao što je spomenuto, ranije objavljeni rezultati ukazali su da su RPS7, RPL23 i RPL26 pozitivni regulatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma (107, 110, 116, 117). Međutim, naši rezultati nisu potvrdili te funkcije kao što je prikazano na **slikama 14, 16 i 17**. Stoga smo odlučili testirati mogućnost da inaktivacija RPS7, RPL23 ili RPL26 aktivira p53 slično kao i inaktivacija RPS6 i RPL24.

Smanjen izražaj RPL23, RPL26 ili RPS7 rezultirao je aktivacijom p53 i njegovih ciljeva (p21, Mdm2), koja je bila ovisna o izražaju RPL5 i RPL11 (**slika 18a, b i c**).



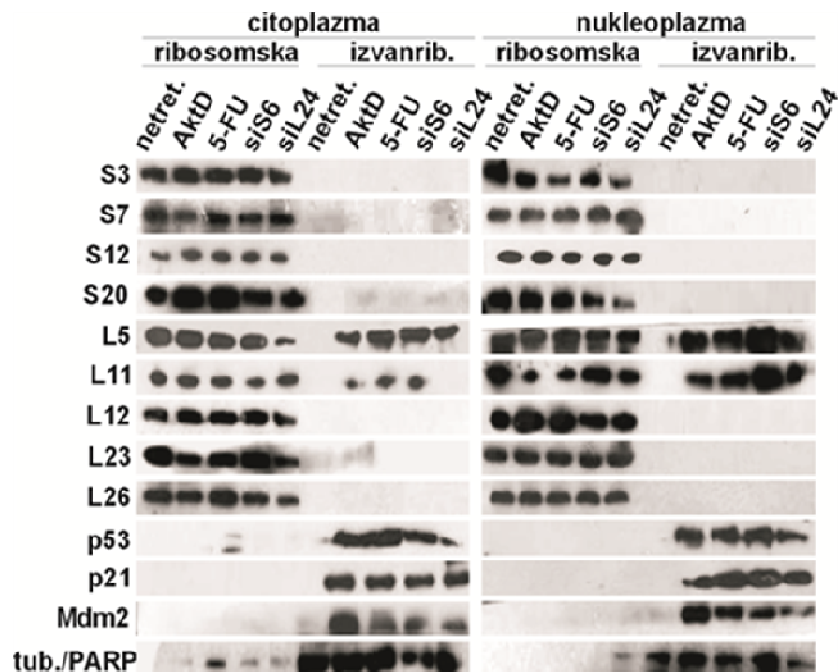
Slika 18. Inaktivacija RPS7, RPL23 ili RPL26 aktivira p53 putem RPL5 i RPL11. (a-c) U stanice A549 unesene su s RPS7, RPL23 ili RPL26 siRNA u kombinaciji s naznačenim siRNA. Nakon 48 sati analiziran je izražaj p53, p21 i Mdm2 metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj aktina korišten je kao kontrola nanosa ukupnih proteina.

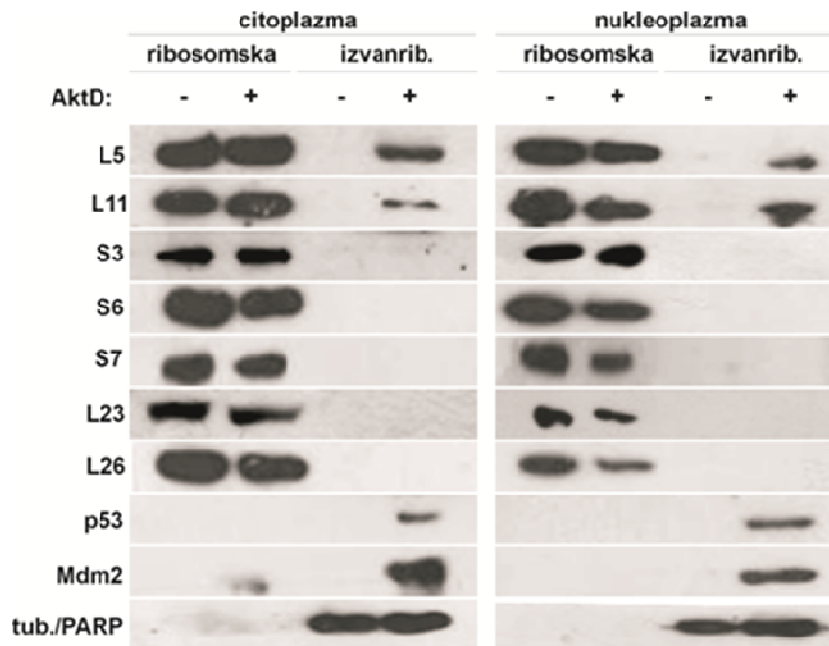
Dakle, rezultati prikazani na **slikama 14, 16, 17 i 18** ukazuju na ključnu ulogu RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 ili RPL26, u aktivaciji p53 nakon tretmana stanica specifičnim farmakološkim inhibitorima sinteze ribosoma ili smanjenim izražajem specifičnih RP.

4.2. RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma

Prepostavila sam da se RP koji sudjeluju u aktivaciji p53 nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima stanice nakon inhibicije sinteze ribosoma jer se u tim odjeljcima nalaze p53 i njegov negativni regulator, Mdm2. Stoga sam sintezu ribosoma u stanicama A549 inhibirala s AktD, 5-FU i siRNA molekulama protiv RPS6 ili RPL24. Stanice su lizirane u uvjetima u kojima je sprječena razgradnja ribosoma te su ribosomski i izvanribosomski odjeljci razdvojeni ultracentrifugiranjem. U tim odjeljcima testirala sam izražaj specifičnih RP upotrebom monoklonskih i poliklonskih protutijela koja smo u tu svrhu proizveli u našem laboratoriju (**slika 19a**). U stanicama embrionalnih fibroblasta miša inhibirala sam sintezu ribosoma s AktD te testirala izražaj specifičnih RP u ribosomskim i izvanribosomskim odjeljcima stanice (**slika 19b**).

a



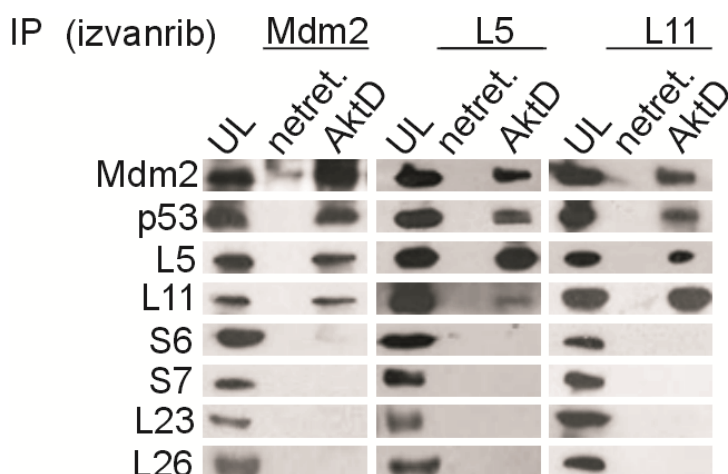
b

Slika 19. RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima nakon farmakološke i genetičke inhibicije sinteze ribosoma. (a) Stanice A549 tretirane su sa siRNA protiv RPS6 (48 sati), siRNA protiv RPL24 (48 sati), AktD (16 sati) i 5-FU (16 sati). Nakon toga su lizirane te su ribosomski i izvanribosomski odjeljci (izvanrib.) u citoplazmi i jezgri odvojeni ultracentrifugiranjem. Izražaj naznačenih proteina u tim odjeljcima analiziran je metodom Western blot upotrebom protutijela protiv specifičnih proteina. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre. (b) Nakupljanje slobodnih RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima embrionalnih fibroblasta miša (E13,5). Embrionalni fibroblasti miša tretirani su 5 nM AktD 16 sati te su stanice lizirane i izolirani su ribosomski i izvanribosomski odjeljci stanice. Izražaj proteina u tim odjeljcima analiziran je kao u (a).

Nakon inhibicije sinteze ribosoma u stanicama A549 i embrionalnim fibroblastima miša značajno se povećao izražaj RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima, ali ne i RPS3, RPS7, RPS12, RPL12, RPL23 i RPL26. Taj rezultat, skupa s rezultatima

prikazanim na **slikama 14, 15, 17 i 18** ukazuje na specifičnu ulogu RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 nakon inhibicije različitih koraka sinteze ribosoma.

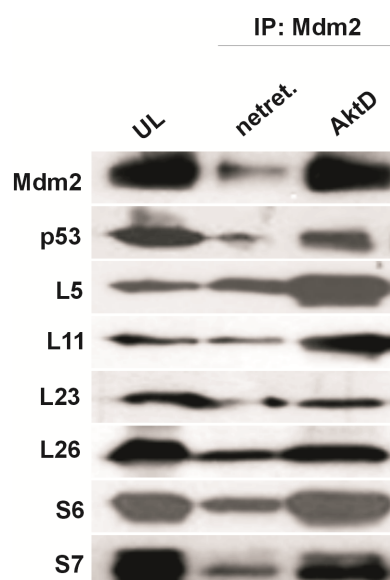
Protutijelima protiv Mdm2 iz izvanribosomskih odjeljaka istaložili smo RPL5, RPL11 i p53, ali ne RPS6, RPS7, RPL23 i RPL26. Slično tome, protutijela protiv RPL5 i RPL11 istaložila su isti sklop, što dodatno ukazuje na ključnu ulogu RPL5 i RPL11 u inhibiciji Mdm2 i aktivaciji p53 (**slika 20**).



Slika 20. Specifične interakcije Mdm2, RPL5 i RPL11 u ukupnom izvanribosomskom odjeljku nakon inhibicije sinteze ribosoma. Ukupni izvanribosomski odjeljak (izvanrib.) netretiranih i AktD (16 sati) tretiranih stanica A549 istaložen je protutijelima protiv Mdm2, RPL5 ili RPL11. Izražaj njihovih udruženih proteina analiziran je naznačenim protutijelima metodom Western blot. UL označava ukupni lizat stanica tretiranih s AktD.

Budući da naši rezultati (**slike 14, 16, 17, 18 i 19**) ukazuju na specifične uloge RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma, odlučili smo rasvijetliti razlike između naših rezultata i ranije objavljenih rezultata koji su ukazali na važnost

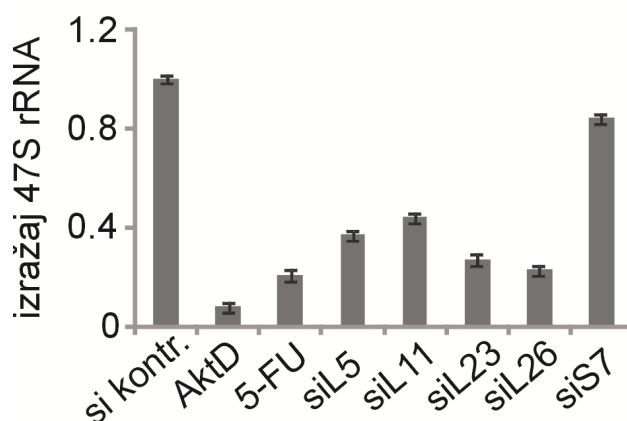
RPS7, RPL23 i RPL26 u aktivaciji p53 (109, 110, 116, 117). Slično kao i u tim ranije objavljenim istraživanjima, tretirali smo stanice A549 s AktD te ih lizirali u klasičnom puferu u kojem ribosomi nisu zaštićeni od razgradnje te analizirali proteine udružene s Mdm2 metodom Western blot. U tim uvjetima svi testirani RP (RPL5, RPL11, RPL23, RPL26, RPS7) uključujući i RPS6 bili su u sklopu s Mdm2, što je ukazalo na nespecifično međudjelovanje pozitivno nabijenih RP koji se oslobađaju iz ribosoma u tim uvjetima i negativno nabijenog Mdm2 (**slika 21**). Stoga, rezultati prethodnih istraživanja moraju se interpretirati u tom kontekstu.



Slika 21. Mdm2 nespecifično veže sve RP u ukupnom staničnom lizatu. Ukupni lizat netretiranih i AktD (16 sati) tretiranih stanica A549 koristio se za imunotaloženje s Mdm2 protutijelom. Udruženost navedenih RP s Mdm2 određena je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. UL označava ukupni lizat stanica tretiranih s AktD.

4.3. Jezgrica nije izvor slobodnih RPL5 i RPL11 nakon inhibicije sinteze ribosoma

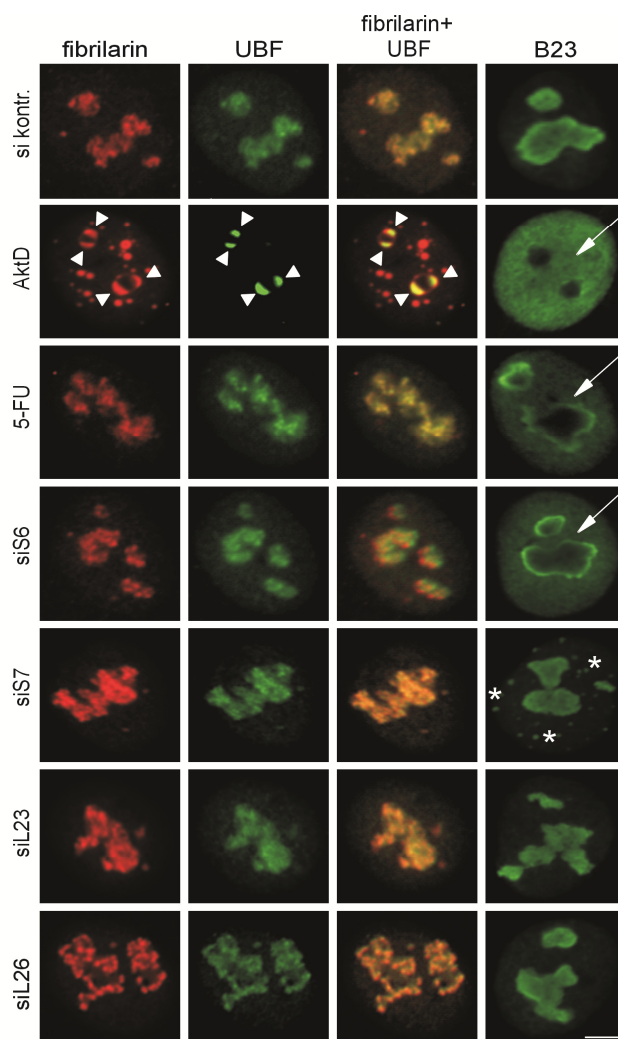
U svrhu dobivanja boljeg uvida u molekularne mehanizme aktivacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma, najprije sam odlučila odrediti podrijetlo RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima stanica A549 nakon tretmana s AktD. Postojeći model sugerira da se nakon inhibicije sinteze ribosoma RP oslobađaju iz razorene jezgrice u jezgru gdje vežu i inhibiraju Mdm2 i posljedično aktiviraju p53. Inhibicija sinteze ribosoma sa AktD, 5-FU i siRNA protiv RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 inhibira sintezu preteče rRNA 47S (**slika 22**), što ukazuje da ti tretmani dovode do funkcijskih promjena u jezgrici.



Slika 22. Farmakološka i genetička inhibicija sinteze ribosoma inhibiraju prepisivanje 47S preteče rRNA. Stanice A549 tretirane su AktD (5 sati), 5-FU (5 sati), siRNA protiv RPS7, RPL5, RPL11, RPL23 ili RPL26 u trajanju od 48 sati. Izražaj 47S preteče rRNA određen je metodom qRT-PCR te je normaliziran prema količini mRNA za GAPDH. Oznake pogreške označavaju standardnu devijaciju.

Iako svi ti tretmani aktiviraju p53, jedino AktD dovodi do značajnih morfoloških promjena jezgrice koje se očituju u formiranju nakupina fibrilarina i UBF-a na rubovima

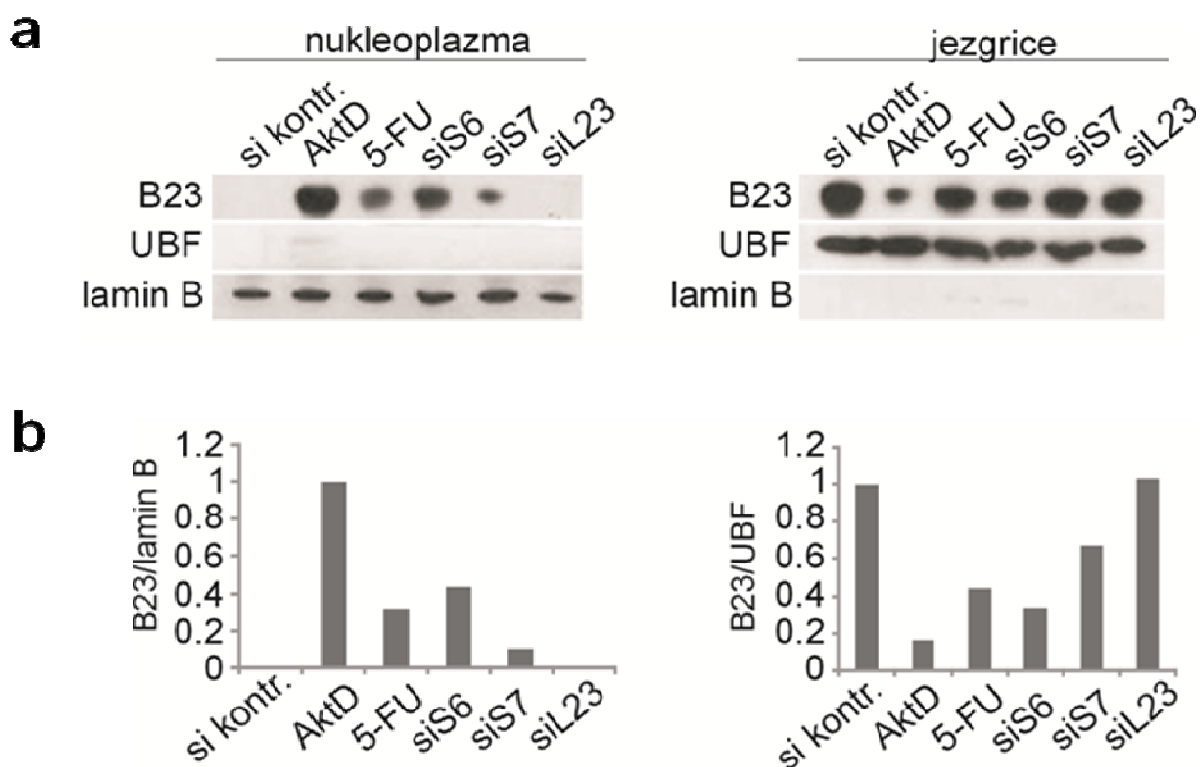
oštećene jezgrice i oslobađanjem B23 iz jezgrice u jezgru što je određeno metodom imunofluorescencije (**slika 23**).



Slika 23. Različiti inhibitori sinteze ribosoma rezultiraju specifičnim morfološkim promjenama jezgrice. Stanice A549 tretirane su AktD (5 sati), 5-FU (5 sati), kontrolnom siRNA, siRNA protiv RPS6, RPS7, RPL23 ili RPL26. Stanice su fiksirane, inkubirane protutijelima protiv tri biljega jezgrice (UBF, B23, fibrilarin) i analizirane metodom imunofluorescencije upotrebom konfokalnog mikroskopa. Difuzni smještaj B23 u nukleoplazmi označeno je strelicom (\rightarrow), točkice B23 u jezgri označene su zvijezdicom (*), a nakupine fibrilarina i UBF-a na rubovima oštećenih jezgrica označeni su trokutom (\blacktriangleright). Kolokalizacija između crvenog i zelenog signala prikazana je žutom bojom. Mjerna crtica označava 5 μ m.

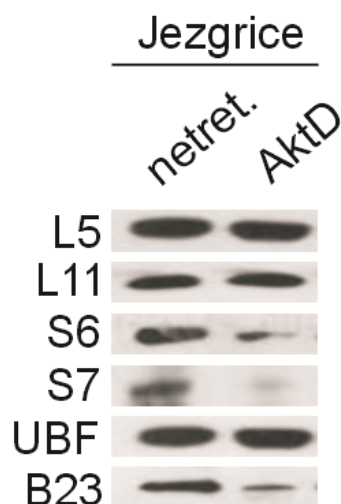
S druge strane, smanjen izražaj RPS6, RPS7 i tretman stanica s 5-FU rezultiraju djelomičnim oslobađanjem B23 iz jezgrice u jezgru, dok ne mijenjaju smještaj UBF-a i fibrilarina. Iznenadjuće, iako smanjenje izražaja RPL23 i RPL26 dovodi do aktivacije p53, ne uzrokuju nikakve morfološke promjene jezgrice. Dakle, razaranje jezgrice nakon inhibicije sinteze ribosoma ne korelira s nakupljanjem RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima stanice i aktivacijom p53.

Razdioba biljega B23 između jezgrice i jezgre nakon inhibicije sinteze ribosoma s AktD, 5-Fu, siRNA protiv RPS6, RPS7 ili RPL23 analizirana je metodom Western blot (slika 24a i b). Ovi rezultati odgovaraju rezultatima dobivenim metodom imunofluorescencije (slika 23).



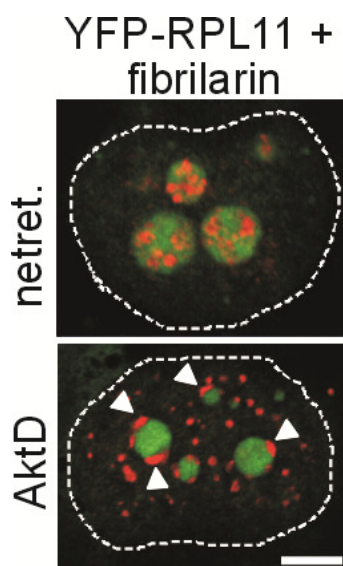
Slika 24. Promjene smještaja B23 u jezgrici i jezgri nakon inhibicije različitih koraka sinteze ribosoma. (a) Stanice A549 tretirane su AktD (5 sati), 5-FU (5 sati), kontrolnom siRNA, siRNA protiv RPS6, RPS7 i RPL23. Nakon toga izolirane su jezgre i jezgrice te je izražaj B23, UBF-a i lamina B testiran metodom Western blot u tim uvjetima. UBF je služio kao biljeg jezgrice, a lamin B kao biljeg jezgre. (b) Rezultati prikazani na slici (a) kvantificirani su upotrebom softvera ImageJ. Izražaj B23 u jezgri normaliziran je u odnosu na lamin B, a izražaj B23 u jezgri normaliziran je u odnosu na UBF.

Međutim, odsustvo morfoloških promjena u jezgri nužno ne znači da se slobodni RPL5 i RPL11 koji se nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima selektivno ne oslobađaju iz jezgrice u jezgru kao što je ranije objavljeno (118). Stoga sam testirala izražaj RPL5 i RPL11 metodom Western blot u izoliranim jezgricama prije i poslije tretmana sa AktD (**slika 25**). Iznenadujuće, količina RPL5 i RPL11 nije se promijenila nakon tretmana stanica s AktD.



Slika 25. Količina RPL5 i RPL11 se ne mijenja u jezgri nakon tretmana sa AktD. Iz netretiranih i AktD tretiranih (5 sati) stanica A549 izolirane su jezgrice te je izražaj naznačenih proteina u jezgri analiziran metodom Western blot. Izražaj UBF-a služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina u jezgri.

Sukladno tom rezultatu, intenzitet fluorescencije YFP-RPL11 u jezgricama stanica H1299 nije se značajno promijenio nakon 5 sati tretmana s AktD (**slika 26**). Međutim za razliku od difuznog smještaja YFP-RPL11 u jezgricama netretiranih stanica H1299, YFP-RPL11 je bio smješten u nenormalnoj jezgri okružen nakupinama fibrilarina u stanicama tretiranim s AktD (**slika 26**). Rezultati prikazani na **slikama 25 i 26** ukazuju na mogućnost da jezgrica nije izvor RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma.



Slika 26. YFP-RPL11 nakuplja se u oštećenim jezgricama nakon tretmana sa AktD. Stanice H1299 koje izražavaju YFP-RPL11 (zeleni) tretirane su 5 sati s AktD, te potom fiksirane i inkubirane protutijelom protiv fibrilarina (crveno). Intenzitet fluorescentnog signala analiziran je konfokalnim mikroskopom. Nakupine fibrilarina na rubovima oštećenih jezgrica označeni su trokutom (▶), a rub jezgre označen je isprekidanim crticama. Mjerna crtica označava 5 μ m.

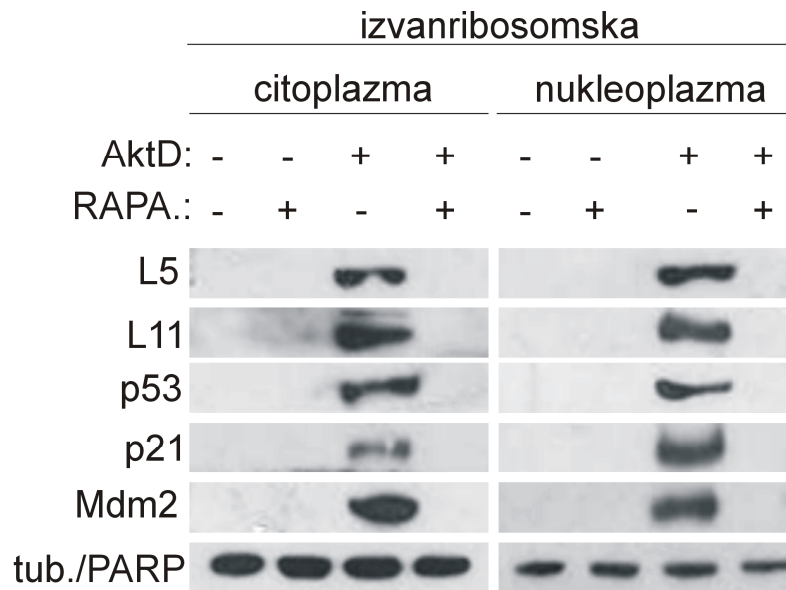
4.4. Slobodni RPL5 i RPL11 sintetizirani su nakon inhibicije sinteze ribosoma

Istraživanja u 70-im godinama prošlog stoljeća dokazala su da se većina RP sintetizira nakon inhibicije sinteze ribosoma u jezgri, ali da se u tim uvjetima razgrađuju nakon nekoliko minuta (121). Stoga smo odlučili testirati mogućnost je li se RPL5 i RPL11 sintetiziraju tijekom inhibicije sinteze ribosoma, ali da se ne razgrađuju kao ostali RP. Stanice A549 tretirane su s AktD ili AktD u prisutnosti inhibitora sinteze proteina CHX (**slika 27**). CHX u potpunosti je spriječio nakupljanje RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima stanica tretiranih s AktD.



Slika 27. Inhibitor sinteze proteina CHX spriječava nakupljanje slobodnih RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima. Stanice A549 tretirane su s AktD 5 sati i 25 μ M CHX te su nakon 1, 2 i 5 sati lizirane. Izražaj naznačenih proteina u izvanribosomskim odjeljcima određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

Identični rezultati dobiveni su u stanicama A549 koje su tretirane s AktD u prisutnosti rapamicina, inhibitora prevođenja 5' TOP mRNA u proteine, a među koje pripadaju i mRNA za RP (**slika 28**).

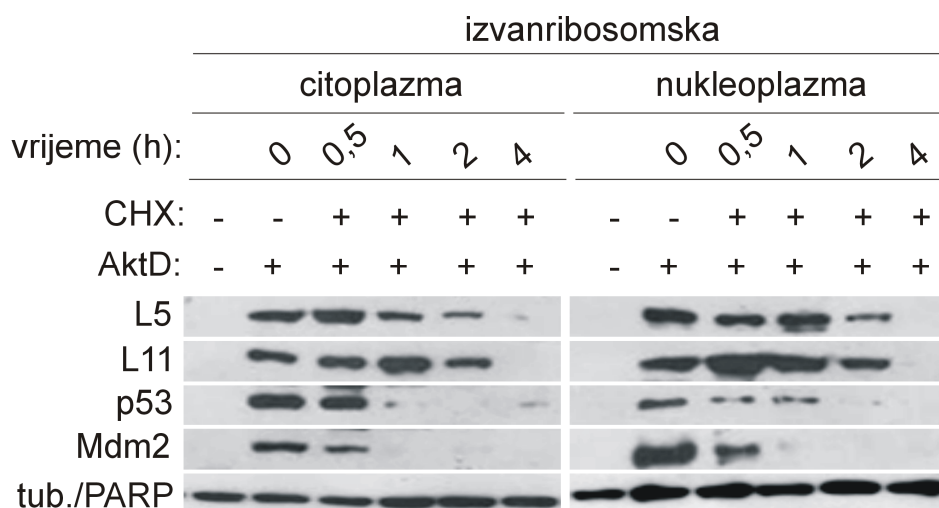


Slika 28. Rapamicin, inhibitor 5'TOP mRNA translacije, sprječava nakupljanje slobodnih RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima. Stanice A549 tretirane su s AktD 5 sati u prisutnosti i odsutnosti 20 nM rapamicina, lizirane su i analizirane kao na slici 14.

Zaključno, ovi rezultati dokazuju da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma.

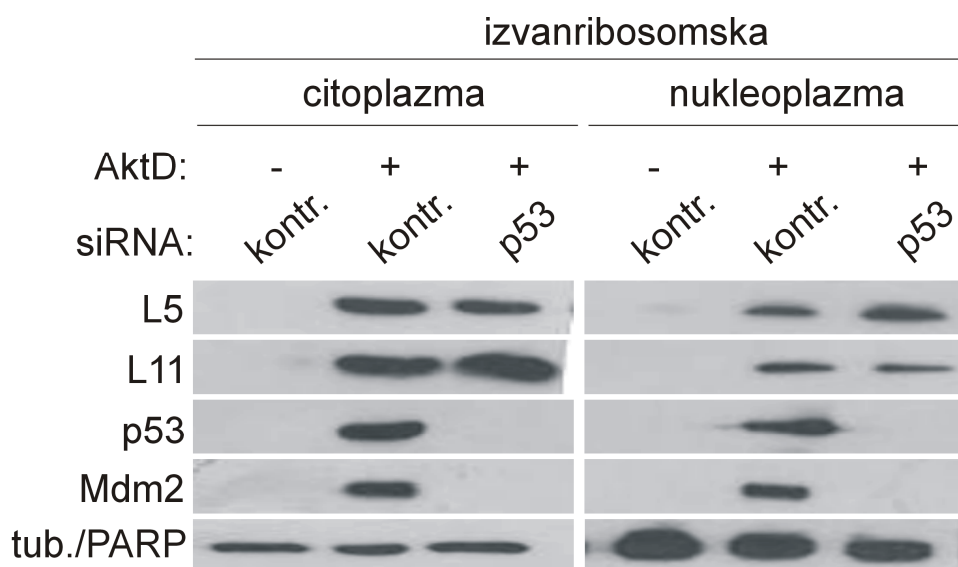
U svrhu testiranja mogućnosti da su novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakon inhibicije sinteze ribosoma selektivno zaštićeni od razgradnje, testirala sam njihovu stabilnost. Nakon 5 sati tretmana stanica A549 sa AktD dodan je CHX te je izražaj RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima testiran metodom Western blot tijekom slijedeća

4 sata (**slika 29**). Poluživot RPL5 i RPL11 bio je oko 2 sata, što je ukazalo na značajno veću stabilnost RPL5 i RPL11 u odnosu na ostale RP tijekom inhibicije sinteze ribosoma.



Slika 29. Slobodni RPL5 i RPL11 stabilni su nakon tretmana s AktD. Stanice A549 tretirane su s AktD 5 sati. Nakon toga dodan je 25 μ M CHX, a stanice su lizirane nakon 30 minuta, 1 sat, 2 sata ili 4 sata. Izražaj naznačenih proteina u izvanribosomskim odjeljcima citoplazme i nukleoplazme testiran je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

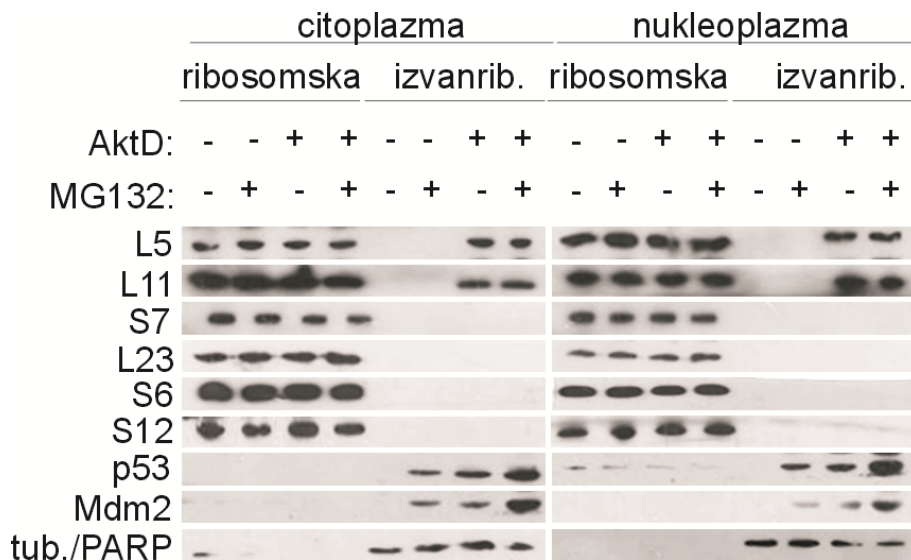
Postoji mogućnost da su RPL5 i RPL11 zaštićeni od razgradnje vezanjem na MDM2 i p53 u izvanribosomskim odjeljcima (98). Da bi testirala tu mogućnost spriječen je izražaj Mdm2 i p53 putem specifičnih siRNA protiv p53 (**slika 30**). Slobodni RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma normalno pri tim uvjetima, što ukazuje na činjenicu da Mdm2 i p53 ne reguliraju njihovu stabilnost.



Slika 30. Slobodni RPL5 i RPL11 nakupljaju se neovisno o Mdm2 i p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. U stanice A549 unesena je kontrolna siRNA (kontr.) ili siRNA protiv p53. Nakon 48 sati stanice su tretirane s AktD 5 sati. Izražaj RPL5, RPL11, p53 i Mdm2 u izvanribosomskim odjeljcima određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

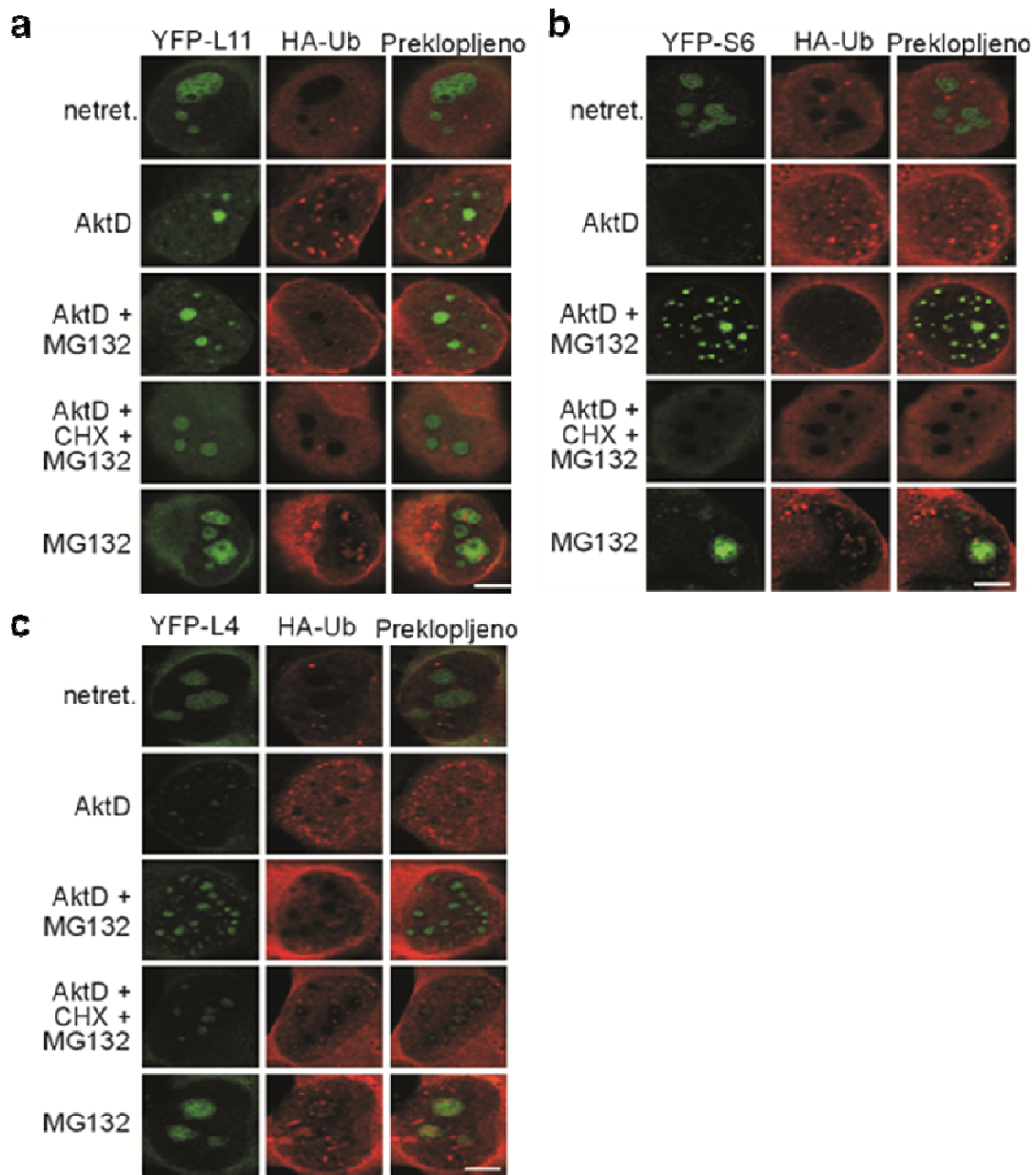
Budući da su novosintetizirani RPL5 i RPL11 tijekom inhibicije sinteze ribosoma stabilni, pretpostavila sam da se ne razgrađuju u proteasomima kao i drugi RP u tim uvjetima. Kako bi testirala tu pretpostavku stanice A549 tretirala sam s AktD u prisutnosti i odsutnosti inhibitora proteasoma MG132 te je izražaj RP u izvanribosomskim odjeljcima analiziran metodom Western blot (**slika 31**). MG132 uzrokovao je značajno povećanje količine Mdm2 i p53 u istim uvjetima, ali nije rezultirao povećanjem količine slobodnih RPL5 i RPL11, što potvrđuje pretpostavku da se ne razgrađuju u proteasomima. Opažanje da tretman stanica s AktD i inhibitorom proteasoma MG132 nije rezultirao nakupljanjem drugih RP ukazuje na mogućnost da se oni ne razgrađuju u proteasomima ili da formiraju netopive agregate koji se istalože

tijekom centrifugiranja te se ne mogu otkriti metodom Western blot u izvanribosomskim odjeljcima.



Slika 31. Slobodni RPL5 i RPL11 ne razgrađuju se u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma. Stanice A549 tretirane su 5 sati s AktD u prisutnosti i odsutnosti inhibitora proteasoma MG132 (20 μ M), lizirane su i izolirani su citoplazmatski i jezgri izvanribosomski odjeljci. Izražaj naznačenih proteina u tim odjeljcima određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

Da bi dobila bolji uvid u razlike u razgradnji slobodnih RPL5 i RPL11 u odnosu na ostale RP nakon inhibicije sinteze ribosoma, koristila sam stanice H1299 koje izražavaju RPL11, RPS6 ili RPL4 obilježene s YFP. Tretman stanica s AktD nije imao nikakav utjecaj na izražaj i raspodjelu YFP-RPL11 u stanicama, ali je rezultirao značajnim smanjenjem količine YFP-RPS6 i YFP-RPL4 (**slika 32a, b i c**). Tretman stanica s AktD u prisutnosti inhibitora proteasoma MG132 nije promijenio količinu i smještaj YFP-RPL11, međutim doveo je do nakupljanja agregata YFP-RPS6 i YFP-RPL4.

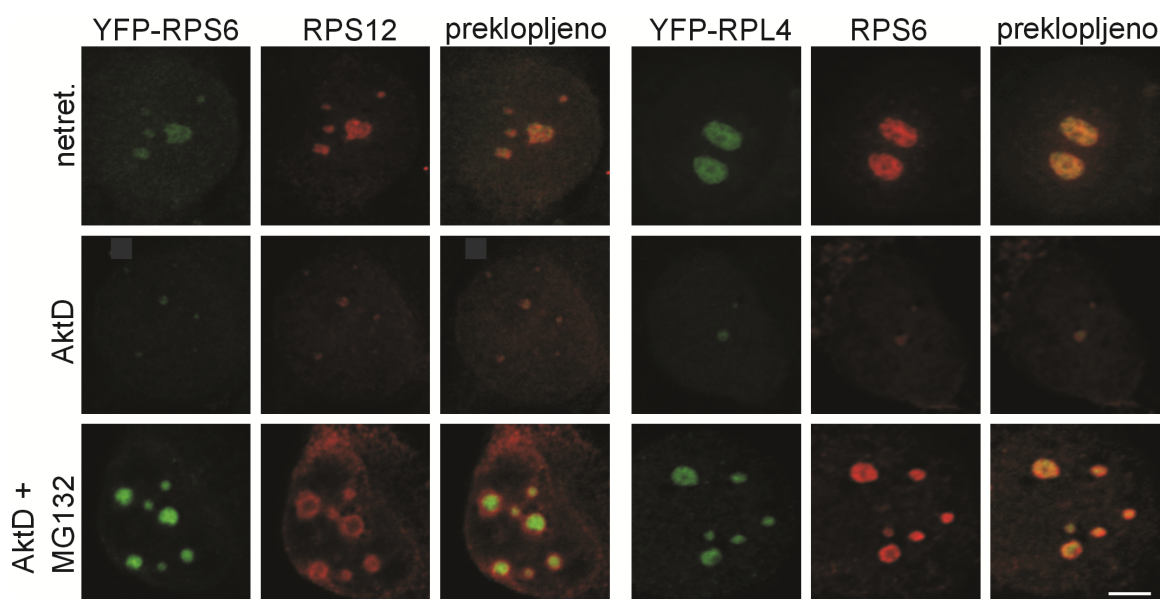


Slika 32. YFP-RPL11 ne razgrađuju se u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma.

U stanice H1299 koje izražavaju YFP-RPL11, YFP-RPS6 ili YFP-RPL4 (zeleni) unesen je plasmid koji kodira HA-Ub. Nakon 24 sata tretirane su s AktD, AktD i MG132 ili AktD u prisutnosti Mg132 i CHX tijekom 6 sati. Stanice su zatim fiksirane, inkubirane s protu-HA protutijelom (crveno) i analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crtica označava 5 μ m.

Nakupljanje tih agregata spriječeno je sa CHX. Ti rezultati ukazuju da su YFP-RPS6 i YFP-RPL4 u agregatima bili sintetizirani nakon inhibicije sinteze ribosoma. Dakle, YFP-RPL11 se ne razgrađuje u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma, a YFP-RPS6 i YFP-RPL4 se razgrađuju u tim uvjetima te formiraju agregate u jezgri kada se spriječi njihova razgradnja u proteasomima.

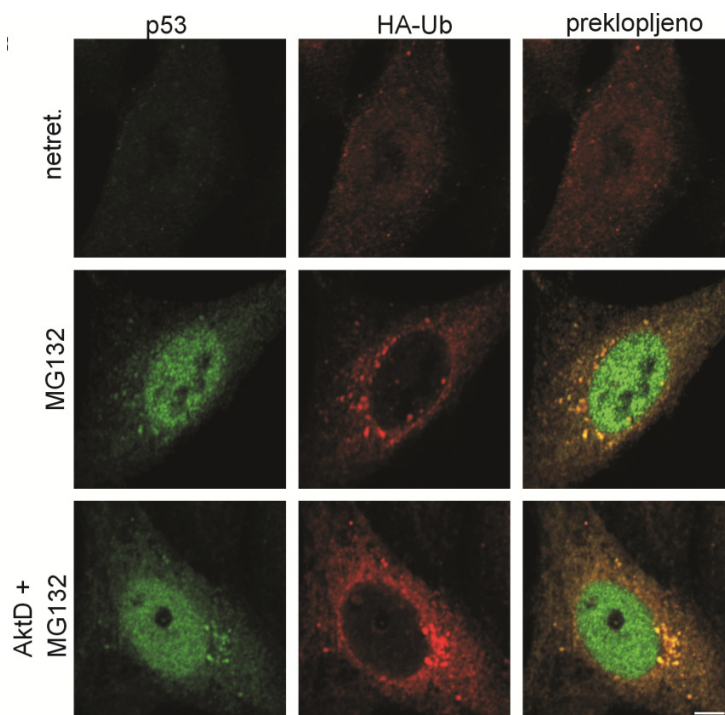
Osim toga, imunofluorescentna analiza dokazala je da se endogeni RPS6 i RPS12 u stanicama H1299 koje su tretirane AktD u prisutnosti MG132 nakupljaju u agregatima kao i YFP-RPS6 i YFP-RPL4, što potvrđuje vjerodostojnost rezultata dobivenih upotrebom H1299 koje izražavaju različite RP obilježene s žutim fluorescentnim proteinom (**slika 33**).



Slika 33. Endogeni RPS6 i RPS12 razgrađuju se u proteasomima u prisutnosti AktD.

Stanice H1299 koje izražavaju YFP-RPS6 i YFP-RPL4 (zeleni) tretirane su Akt D i AktD u prisutnosti MG132. Nakon fiksacije s metanolom stanice su inkubirane s monoklonskim protutijelima protiv RPS6 i RPS12 (crveni), fluorescentni signal analiziran je konfokalnim mikroskopom. Žuta boja predstavlja kolokalizaciju crvenog RPS12 i zelenog YFP-RPS6 te crvenog RPS6 i zelenog YFP-RPL4. Mjerna crtica označava 5 μ m.

Zanimljivo je da se agregati YFP-RPS6 i YFP-RPL4 u stanicama tretiranim s AktD i MG132 ne kolokaliziraju s ubikvitinom (Ub) (**slika 32**), za razliku od p53, koji se ubikvitinira u tim uvjetima (**slika 34**).

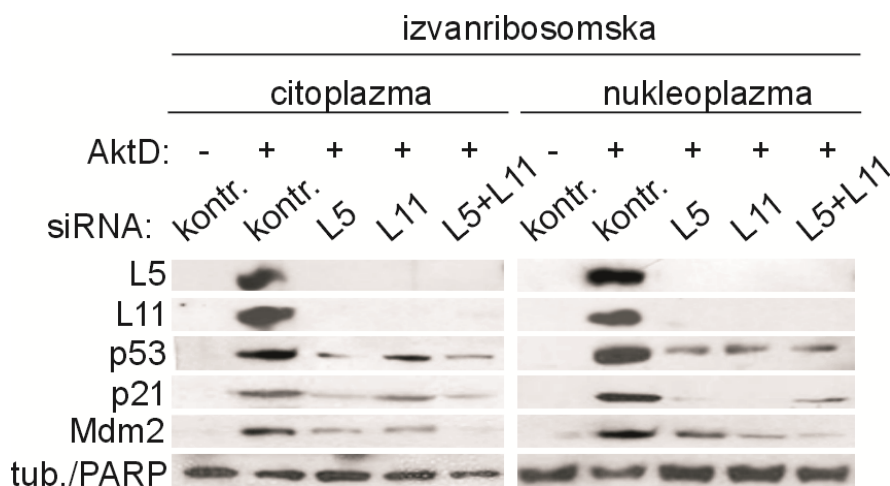


Slika 34. Protein p53 ubikvitinira se i razgrađuje u proteasomima nakon tretmana s AktD i MG132. U stanice A549 unesen je plasmid koji kodira HA-Ub. Nakon 24 sata stanice su tretirane s AktD i AktD u prisutnosti MG132 6 sati. Nakon toga stanice su fiksirane, inkubirane s protu-HA protutijelom (crveno) i protu-p53 protutijelom (zeleno) i fluorescentni signal analiziran je konfokalnim mikroskopom. Žuta boja predstavlja kolokalizaciju p53 i ubikvitina. Mjerna crtica označava 5 μm .

Zaključno, rezultati prikazani na **slikama 32, 33 i 34** potvrđuju model u kojem se novosintetizirani RPL5 i RPL11 ne razgrađuju nakon inhibicije sinteze ribosoma, dok se ostali RP razgrađuju u proteasomima neovisno o ubikvitinaciji.

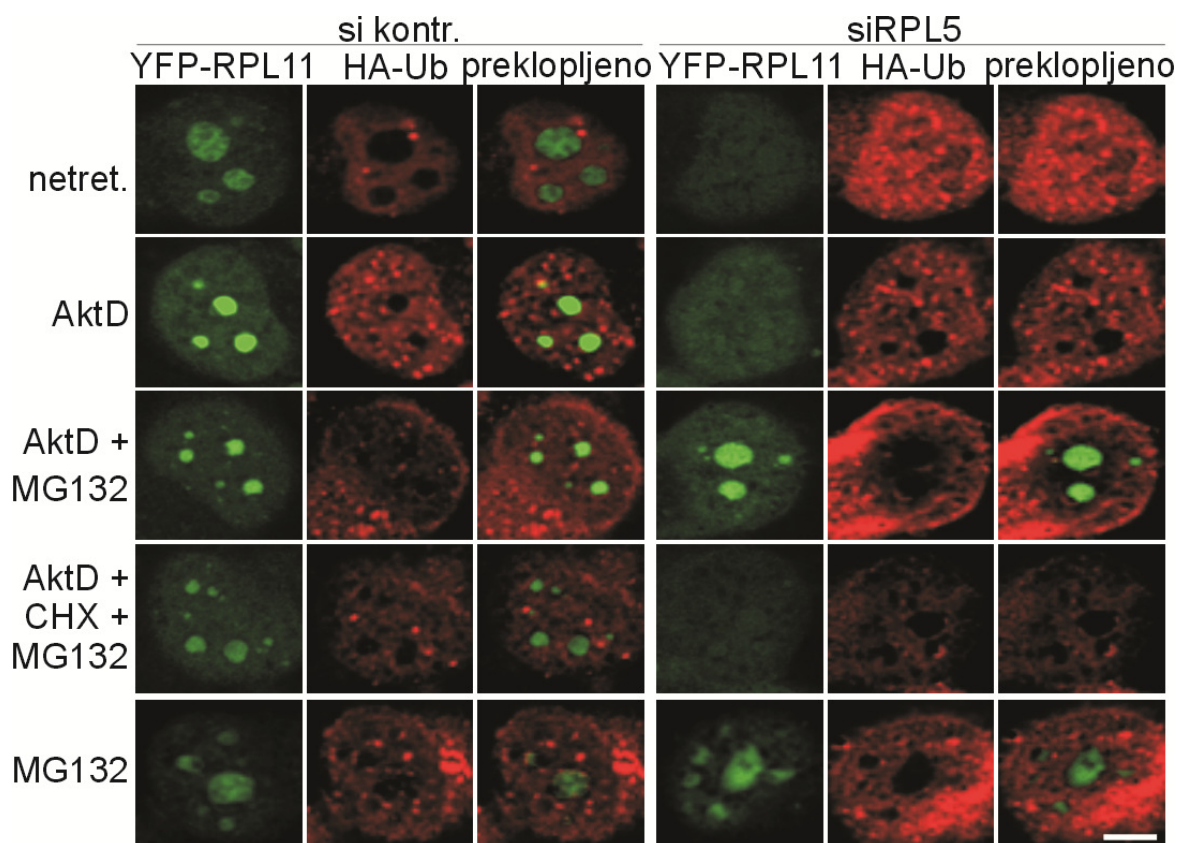
4.5. Slobodni RPL5 i RPL11 međusobno se štite od razgradnje u proteasomima

Pojedinačna inaktivacija RPL5 ili RPL11 sprječava aktivaciju p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma, što ukazuje na njihovu međuovisnost u tom procesu. U svrhu razumijevanja molekularnih mehanizama međuovisnosti RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma izražaj RPL5 ili RPL11 smanjen je upotrebom specifičnih siRNA molekula te je analiziran njihov izražaj u izvanribosomskim odjeljcima metodom Western blot (**slika 35**). Iznenadujuće, smanjen izražaj RPL5 rezultirao je i smanjenim izražajem RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima stanica A549 tretiranih s AktD i obrnuto. Ti rezultati ukazali su na mogućnost da se slobodni RPL5 i RPL11 međusobno štite od razgradnje nakon inhibicije sinteze ribosoma.



Slika 35. Međuovisnost izražaja RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima. U stanice A549 unesene su kontrolna siRNA, siRNA protiv RPL5, siRNA protiv RPL11 ili istovremeno siRNA protiv RPL5 i RPL11. Nakon 48 sati stanice su tretirane s AktD 5 sati te su lizirane. Izražaj naznačenih proteina u izvanribosomskim odjeljcima određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

U svrhu dobivanja boljeg uvida u molekularne mehanizme međuovisnosti izražaja slobodnih RPL5 i RPL11 nakon inhibicije sinteze ribosoma, analizirali smo posljedice smanjenog izražaja RPL5 na izražaj i smještaj YFP-RPL11 u stanicama H1299 nakon tretmana stanica s AktD ili AktD u prisutnosti MG132 (**slika 36**).

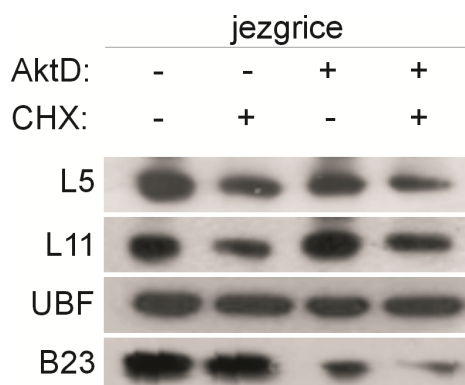


Slika 36. U odsutnosti RPL5, RPL11 se razgrađuje u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma. U stanice H1299 koje izražavaju YFP-RPL11 (zeleno) unesene su kontrolna siRNA (kontr.) ili RPL5 siRNA. Nakon 24 sata unesen je plazmid koji kodira HA-Ub te su stanice nakon 24 sata tretirane su AktD, AktD u prisutnosti MG132 ili AktD u prisutnosti Mg132 i CHX. Stanice su zatim fiksirane, inkubirane s protu-HA protutijelom (crveno) i analizirane konfokalnim mikroskopom. Mjerna crtica označava 5 μ m.

Kao što je ranije prikazano na **slici 36** ti tretmani nisu imali nikakav utjecaj na količinu i smještaj YFP-RPL11. Međutim, nakon smanjenog izražaja RPL5 količina YFP-RPL11 smanjila se značajno u stanicama tretiranim s AktD, ali je inhibicija proteasoma u tim uvjetima rezultirala povećanjem količine YFP-RPL11. Ovi rezultati dokazuju da RPL5 štiti YFP-RPL11 od razgradnje u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma i objašnjavaju molekularni mehanizam međuovisnosti RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 u tim uvjetima.

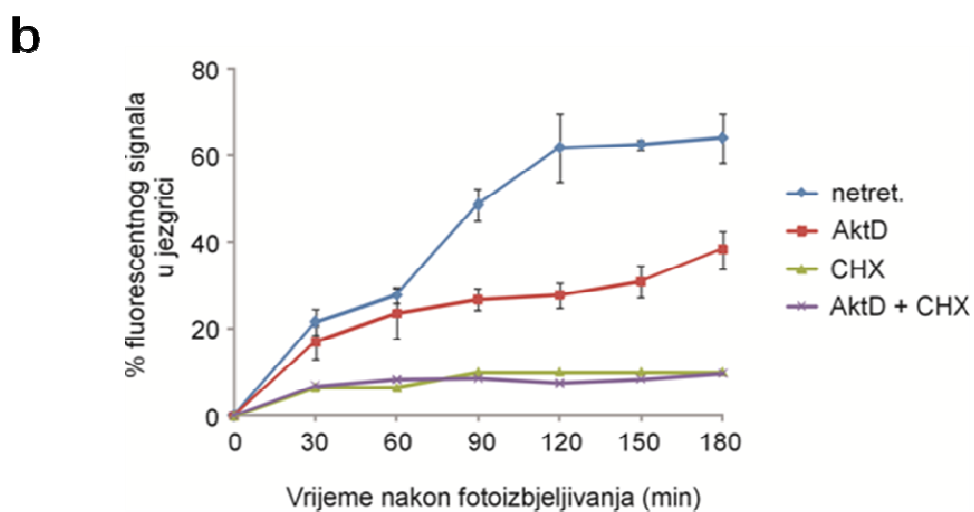
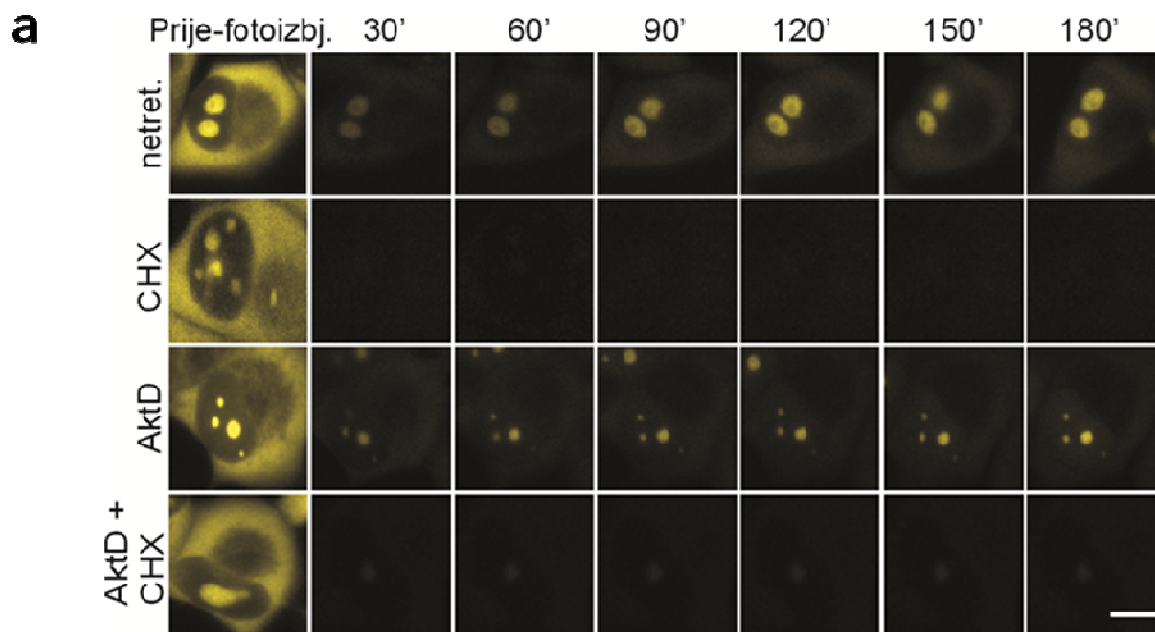
4.6. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 transportiraju se u jezgricu nakon inhibicije sinteze ribosoma

Rezultati prikazani na **slici 19** dokazuju da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima citoplazme i jezgre nakon inhibicije sinteze ribosoma. Međutim, naše opažanje da se izražaj RPL5 i RPL11 značajno smanjio u jezgricama stanica A549 tretiranih s AktD u prisutnosti inhibitora sinteze proteina CHX (**slika 37**) ukazuje na mogućnost da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakon inhibicije sinteze ribosoma iz izvanribosomskih odjeljaka u citoplazmi i jezgri transportiraju u jezgricu (**slika 37**).

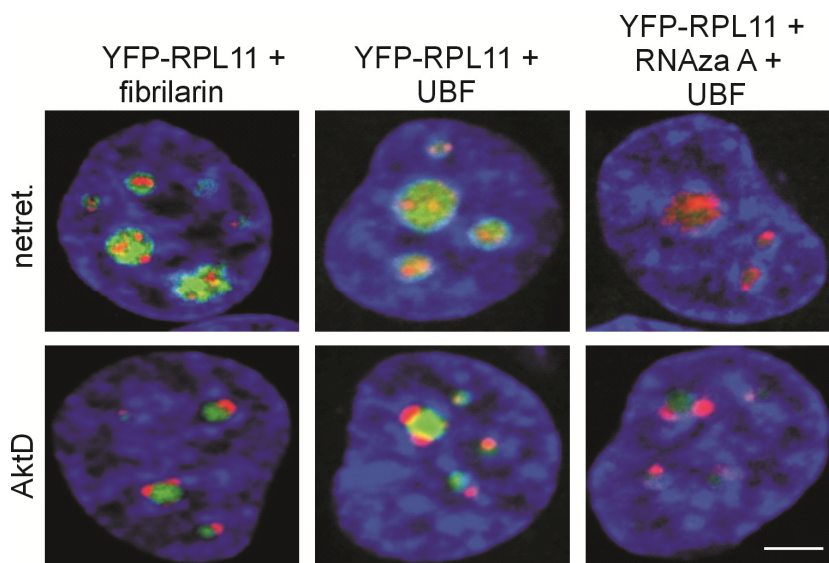


Slika 37. CHX smanjuje razinu izražaja RPL5 i RPL11 u jezgri. Stanice A549 tretirane su s AktD 5 sati u prisutnosti i odsutnosti CHX (5 sati), a nakon toga izolirane su jezgre. Izražaj naznačenih proteina u jezgricama određen je metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Izražaj UBF-a služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina u jezgri.

Da bi testirali tu mogućnost, analizirali smo dinamiku ulaska novosintetiziranog YFP-RPL11 u jezgre stanica H1299 koje su tretirane s AktD. Stanice H1299 bile su netretirane ili tretirane s AktD 5 sati. Nakon toga fluorescentni signal YFP-RPL11 izbijeljen je pomoću lasera i ulazak novosintetiziranog YFP-RPL11 u jezgru slijedeća 3 sata analiziran je metodom FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) upotrebom konfokalnog mikroskopa (**slika 38a i b**). Novosintetizirani YFP-RPL11 nastavio se nakupljati u jezgricama netretiranih, ali i AktD tretiranih stanica. U netretiranim stanicama difuzno se nakupljao u jezgricama, dok je u stanicama tretiranim s AktD kolokaliziran u ostacima jezgre u tzv. centralnom tijelu i okružen je nakupinama fibrilarina i UBF-a (**slika 39**). Inhibitor sinteze proteina CHX u potpunosti je spriječio ulazak YFP-RPL11 u jezgre stanica tretiranih s AktD (**slika 38a i b**), što dodatno potvrđuje činjenicu da se novosintetizirani YFP-RPL11 transportira u jezgru nakon inhibicije sinteze ribosoma.



Slika 38. Novosintetizirani YFP-RPL11 nakuplja se u jezgri nakon inhibicije sinteze ribosoma. (a) Stanice YFP-RPL11 netretirane su ili su tretirane s AktD u prisutnosti i odsutnosti CHX. Nakon 5 sati fluorescentni signal u netretiranim i AktD tretiranim stanicama H1299 koje izražavaju YFP-RPL11 izbijeljen je upotrebom lasera valne duljine 488 nm te je dinamika ulaska YFP-RPL11 u jezgri analizirana metodom FRAP, a praćena je u naznačenim vremenskim periodima. Mjerna crtica označava 5 μ m. (b) Fluorescentni signal iz pokusa prikazanog na slici (a) kvantificiran je upotrebom Zen softvera. Oznake pogreške označavaju standardnu devijaciju.



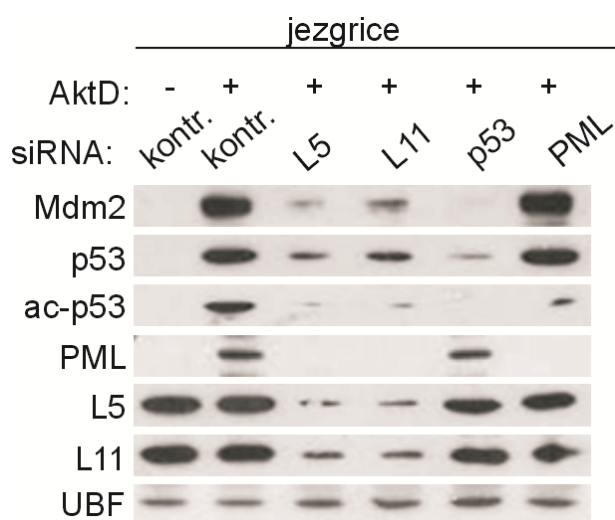
Slika 39. Novosintetizirani YFP-RPL11 lokalizira se u ostacima jezgrice nakon inhibicije sinteze ribosoma. Stanice H1299 koje izražavaju YFP-RPL11 tretirane su s AktD 5 sati te je zatim fluorescentni signal fotoizbijeljen upotrebom lasera 488 nm, te nakon 3 sata stanice YFP-RPL11 (zelene) fiksirane su i inkubirane su protutijelima protiv UBF-a (crveno) i fibrilarina (crveno) u prisutnosti i odsutnosti RNaze. Fluorescentni signali analizirani su konfokalnim mikroskopom. Mjerna crtica označava 5 μ m.

Rezultati prikazani na **slikama 37, 38 i 39** dokazuju da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nastavljaju nakupljati u jezgricama nakon inhibicije sinteze ribosoma.

4.7. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 reguliraju smještaj p53 i njegovih regulatora u jezgri nakon inhibicije sinteze ribosoma

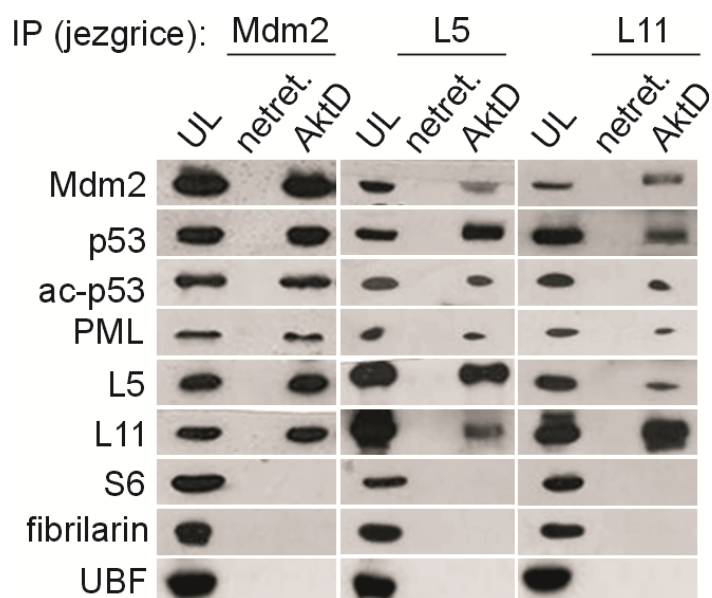
Činjenica da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju u jezgricama nakon inhibicija sinteze ribosoma ukazuje na njihovu moguću funkciju u oštećenoj jezgri. Budući da su RPL5 i RPL11 ključni regulatori supresora tumora p53, testirala sam

mogućnost da se oni kolokaliziraju s p53, njegovim negativnim regulatorom, Mdm2 i pozitivnim regulatorom PML-om u jezgri nakon inhibicije sinteze ribosoma. Jezgri netretiranih stanica A549 nisu izražavale p53, Mdm2 i PML (**slika 40**). Međutim, tretman stanica sa AktD rezultirao je povećanjem izražaja p53, acetiliranog p53 (ac-p53), Mdm2 i PML-a u jezgricama. Kako bi testirala je li njihovo nakupljanje u jezgricama ovisno o RPL5 i RPL11 spriječila sam izražaj RPL5 ili RPL11 korištenjem specifičnih siRNA molekula. Smanjen izražaj RPL5 ili RPL11 dovodi do smanjenog izražaja p53, ac-p53, Mdm2 i PML-a u jezgri. Međutim, inhibicija p53 nije spriječila nakupljanje RPL5, RPL11 i PML-a, dok se u odsutnosti PML-a u jezgricama normalno nakupljaju RPL5, RPL11, p53 i Mdm2, ali ne i ac-p53.



Slika 40. Smještaj p53, Mdm2 i PML-a u jezgri nakon inhibicije sinteze ribosoma ovisan je o RPL5 i RPL11. U stanice A549 unesene su siRNA protiv RPL5, RPL11, p53 ili PML-a. Nakon 48 sati stanice su tretirane s AktD 5 sati, izolirane su jezgri te je izražaj navedenih proteina analiziran metodom Western blot pomoću specifičnih protutijela. Izražaj UBF-a služio je kao kontrola nanosa ukupnih proteina u jezgri.

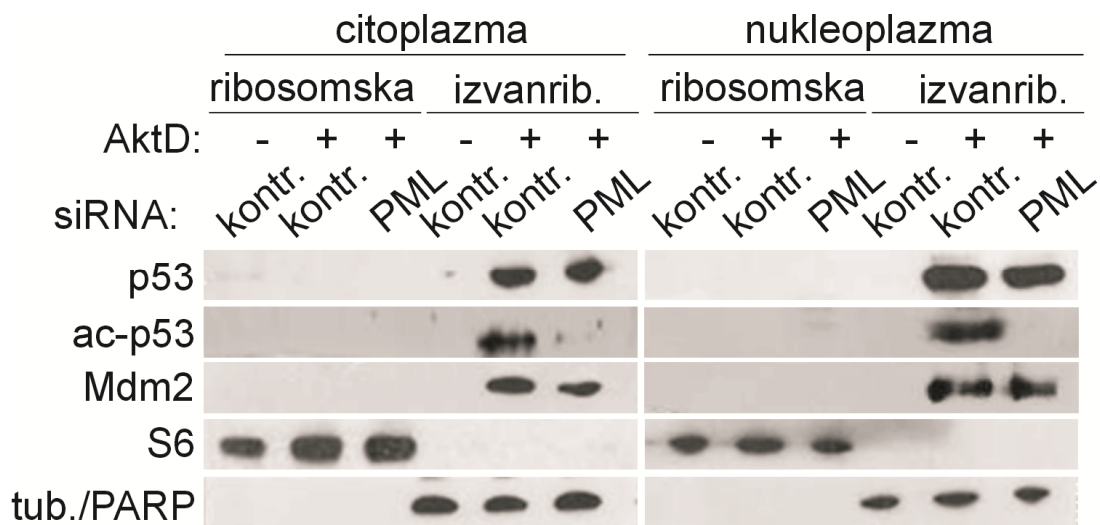
Protutijela protiv Mdm2, RPL5 i RPL11 istaložila su p53, ac-p53, PML, RPL5, RPL11, ali ne RPS6, fibrilarin i UBF iz jezgrica stanica A549 tretiranih s AktD (**slika 41**), što ukazuje da su ti proteini dio istog proteinskog sklopa. Dakle, rezultati prikazani na **slikama 40 i 41** dokazuju da su RPL5, RPL11 p53, Mdm2 i PML udruženi u jezgrici, gdje se najvjerojatnije p53 stabilizira i aktivira njegova transkripcijska aktivnost putem PML posredovane acetilacije na lizinu 382 (122).



Slika 41. RPL5 i RP L11 udruženi su s p53, Mdm2 i PML u jezgrici nakon inhibicije sinteze ribosoma. Stanice A549 bile su netretirane i tretirane s AktD, nakon 5 sati lizirane su, izolirane su jezgrice te se stanični lizat jezgrica koristio za imunotaloženje. Mdm2, RPL5 ili RPL11 istaloženi su iz lizata jezgrica upotrebom specifičnih protutijela te je izražaj njihovih udruženih proteina analiziran metodom Western blot. Izražaj navedenih proteina u ukupnom lizatu (UL) stanica tretiranih s AktD analiziran je metodom Western blot.

Od ranije je poznato da aktivirani p53 ima određene funkcije u jezgri (6). Stoga smo odlučili testirati translocira li se acetilirani odnosno aktivirani p53 iz jezgrice u jezgru

ili citoplazmu. U tu svrhu u netretiranim i AktD tretiranim stanicama A549 razdvojili smo izvanribosomske odjeljke citoplazme i jezgre. Metodom Western blot dokazala sam da je ac-p53 osim u jezgri prisutan u citoplazmi i jezgri u stanicama A549 nakon tretmana s AktD. Smanjen izražaj PML-a sprječava izražaj ac-p53 u izvanribosomskim odjeljcima citoplazme i jezgre, ali ne i izražaj neacetiliranog p53 (slika 42).



Slika 42. Acetilirani p53 nakuplja se u izvanribosomskim odjeljcima nakon inhibicije sinteze ribosoma. U stanice A549 unesena je kontrolna siRNA (kontr.) ili PML siRNA. Nakon 48 sati stanice su tretirane s AktD 5 sati, lizirane te je izražaj naznačenih proteina u izvanribosomskim odjeljcima testiran metodom Western blot upotrebom specifičnih protutijela. Tubulin se koristio kao biljeg citoplazme, a PARP kao biljeg jezgre.

Ti rezultati ukazuju na mogućnost da se p53 nakon PML ovisne acetilacije translocira u jezgru gdje regulira izražaj gena ili u citoplazmu gdje možda sudjeluje u do sad nerazjašnjenim procesima.

Činjenica da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nastavljaju nakupljati u jezgri stanica A549 zajedno s Mdm2, p53 i PML-om nakon tretmana s AktD, ukazuje na do sada nepoznatu ulogu jezgri u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma.

5. Rasprava

U ovom istraživanju dokazala sam da su RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 i RPL26, ključni aktivatori supresora tumora p53 nakon inhibicije različitih koraka sinteze ribosoma. Nakon inhibicije sinteze ribosoma, novosintetizirani RPL5 i RPL11 selektivno se nakupljaju u izvanribosomskim odjeljcima u citoplazmi i jezgri, gdje vežu negativni regulator p53, Mdm2. Sklop RPL5, RPL11, p53, Mdm2 i PML transportira se u jezgricu gdje se p53 u potpunosti aktivira.

Ranija istraživanja drugih grupa ukazala su na mogućnost da nakon inhibicije sinteze ribosoma RPL5, RPL11, RPL23, RPL26 i RPS7 vežu Mdm2 i posljedično aktiviraju p53 (109-117). Naši rezultati u stanicama A549 i U-2 OS te u stanicama embrionalnih fibroblasta miša dokazali su važnost RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 i RPL26, u aktivaciji p53 nakon inhibicije različitih koraka u sintezi ribosoma. Sukladno našim rezultatima, još je jedna grupa u 2012. godini ukazala na specifičnu ulogu RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53 (123). Kako objasniti razlike između naših rezultata i ranije objavljenih istraživanja drugih grupa? Važno je naglasiti da je u tim ranijim istraživanjima analizirana funkcija egzogenih RP. Međutim, funkcija egzogenih RP ne mora biti identična funkciji endogenih RP. Osim toga, međudjelovnja spomenutih RP s Mdm2 bila su analizirana u ukupnom staničnom lizatu u uvjetima u kojima nije sprječena razgradnja ribosoma i oslobađanje svih RP u izvanribosomske odjeljke stanice. RP su pozitivno nabijeni i među najzastupljenijim su proteinima u stanicama sisavaca. Ukoliko su prisutni u velikim količinama mogu stupati u specifične i nespecifične interakcije s različitim makromolekulama. Mi smo reproducirali ranije objavljene rezultate, dokazali smo

interakcije RPS7, RPL23 i RPL26, ali i svih testiranih RP s Mdm2 u ukupnom lizatu stanica nakon tretmana s AktD, što ukazuje na nespecifičnost tih interakcija. Međutim, u izvanribosomskim odjeljcima stanica jedino su se RPL5 i RPL11 nakupljali nakon inhibicije sinteze ribosoma i vezali na Mdm2.

Budući da je u tim prethodnim istraživanjima nedvojbeno dokazano da RPS7, RPL23 i RPL26 vežu Mdm2 i inhibiraju njegovu ubikvitin ligaznu aktivnost (109, 110, 116, 117), ne možemo sa sigurnošću isključiti mogućnost da i oni sudjeluju u aktivaciji p53 nakon inhibicije specifičnih koraka sinteze ribosoma, u specifičnim stanicama ili da aktiviraju p53 drugačijom kinetikom nego RPL5 i RPL11.

Iako je ranije sugerirano da se RPL5, RPL11, RPS7, RPL23 i RPL26 oslobađaju iz jezgrice u jezgru (34), naša istraživanja jasno dokazuju da se slobodni RPL5 i RPL11 sintetiziraju u prisutnosti pogrešaka u sintezi ribosoma. Poznato je više od 30 godina da se većina RP sintetizira nakon inhibicije sinteze ribosoma, ali se vrlo brzo razgrađuju (121). Sukladno tim rezultatima, dokazala sam da se YFP-RPS6, YFP-RPL4, endogeni RPS6 i RPS12 razgrađuju u proteasomima nakon inhibicije sinteze ribosoma. Ta razgradnja u proteasomima bila je neovisna o ubikvitinaciji tih RP. Postoji nekoliko primjera razgradnje nenormalno oblikovanih i oksidiranih proteina koji se razgrađuju u 20S proteasomima neovisno o ubikvitinu (124). Stoga možemo pretpostaviti da novosintetizirani RP, kad nisu vezani za rRNA, poprimaju nenormalne oblike koje prepoznaju 20S proteasomi. Takav mehanizam sprječava potencijalno štetno nakupljanje slobodnih, toksičnih RP u stanici nakon inhibicije sinteze ribosoma. Za razliku od spomenutih RP, u ovom istraživanju dokazala sam da se slobodni RPL5 i RPL11 međusobno štite od razgradnje u proteasomima. Nakon inaktivacije RPL5,

RPL11 se razgrađuje u 20S proteasomima slično ostalim RP (**slika 43, model; str.90**). Pojedinačna inaktivacija RPL5 ili RPL11 u potpunosti sprječava aktivaciju p53 što ukazuje na međuovisnost RPL5 i RPL11 u aktivaciji p53. Međusobna zaštita RPL5 i RPL11 od razgradnje mogla bi objasniti njihovu funkcionalnu ovisnost u aktivaciji p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma.

Suprotno prethodnim istraživanjima, dokazali smo da se novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju u oštećenoj jezgri i kolokaliziraju s PML-om, Mdm2 i p53 (**slika 43, model; str.90**). Na temelju tih rezultata možemo pretpostaviti da je jezgra mjesto gdje se p53 stabilizira i aktivira. Osim toga, acetilirani i potpuno aktivirani p53 transportira se u jezgu i citoplazmu gdje obavlja svoje biološke odgovore.

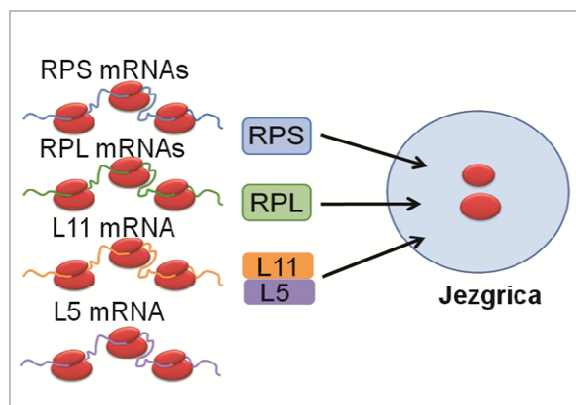
Postoji mogućnost da RPL5 i RPL11, osim u regulaciji p53 sudjeluju i u regulaciji p53 neovisnih bioloških odgovora nakon inhibicije sinteze ribosoma. Do sada je otkriveno da se slobodni RPL11 veže na c-Myc-mRNA i c-Myc protein te sprječava njegov izražaj (120). RPL11 u uvjetima poremećene sinteze ribosoma sprječava Myc-om posredovanu sintezu ribosoma i proteina te rast stanice. Bit će potrebna daljnja istraživanja da bi se otkrili novi potencijalni ciljevi slobodnih RPL5 i RPL11 i procesi koje oni reguliraju nakon inhibicije sinteze ribosoma.

Zaključno, dokazala sam da su RPL5 i RPL11 ključni aktivatori p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma. Većina RP sintetizira se i razgrađuje nakon inhibicije sinteze ribosoma. Međutim, novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima gdje se vežu na negativni regulator p53, Mdm2. Važno je naglasiti da je nakupljanje RPL5 i RPL11 u izvanribosomskim odjeljcima rezultat njihove međusobne

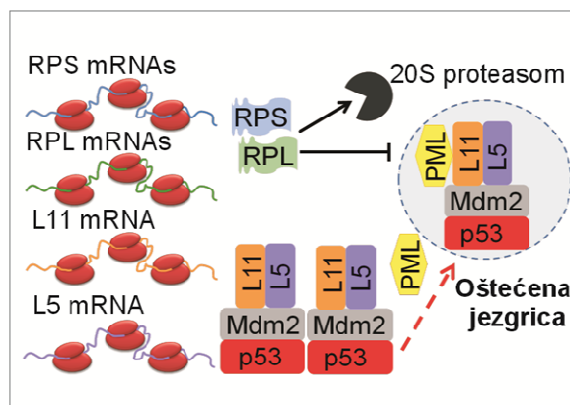
zaštite od razgradnje u 20S proteasomima. Novosintetizirani, slobodni RPL5 i RPL11 neophodni su za transport PML-a, p53 i Mdm2 u jezgricu gdje se p53 stabilizira i aktivira. Rezultati ovog istraživanja otkrili su do sada nepoznate molekularne mehanizme putem kojih RP aktiviraju p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma i ukazali na ulogu jezgrice u aktivaciji p53.

p53 je ključni zaštitnik od zloćudne preobrazbe, ali i uzročnik patoloških promjena u ribosomopatijama. Stoga će biti od izuzetne važnosti razumijeti ulogu RPL5 i RPL11 u patogenezi tih bolesti.

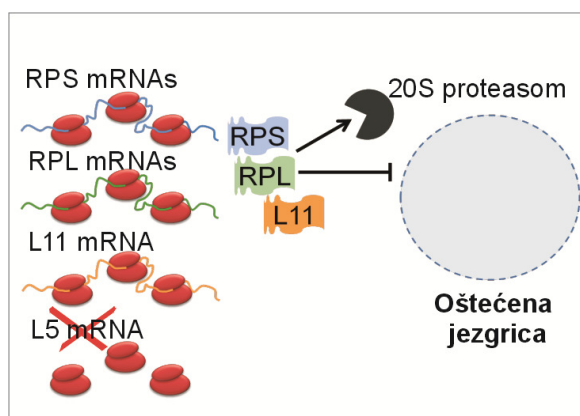
Normalna sinteza ribosoma



Pogreške u sintezi ribosoma



RPL5 štiti RPL11 od razgradnje nakon poremećaja u sintezi ribosoma



Slika 43. Predloženi model aktivacije p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma

Model: Gore lijevo prikazana je sinteza ribosoma u normalnim uvjetima. Novosintetizirani RP iz ribosomskih podjedinica 40S (RPS) i 60S (RPL) ulaze u jezgricu gdje sudjeluju u sklapanju i formiranju funkcionalnog 80S ribosoma.

Gore desno prikazuje da se kod poremećaja u sintezi ribosoma svi RP iz 40S i 60S podjedinice sintetiziraju, ali se vrlo brzo razgrađuju u 20S proteasomima. Međutim, RPL5 i RPL11 se ne razgrađuju i nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima gdje vežu Mdm2. RPL5 i RPL11 kolokaliziraju se s Mdm2, p53 i PML-om u jezgrici nakon poremećaja u sintezi ribosoma, gdje dolazi do potpune aktivacije p53. **Sredina dolje** prikazuje da se kod nedostatka RPL5 slobodni RPL11 razgrađuje u proteasomima kao i ostali RP što ukazuje da RPL5 i RPL11 štite jedan drugoga od razgradnje nakon inhibicije sinteze ribosoma.

6. Zaključci

1. RPL5 i RPL11, ali ne RPS7, RPL23 i RPL26, ključni su aktivatori supresora tumora p53 nakon inhibicije različitih koraka sinteze ribosoma.
2. Nakon inhibicije sinteze ribosoma, sintetiziraju se svi RP, uključujući RPL5 i RPL11.
3. Novosintetizirani RPL5 i RPL11 nakupljaju se u izvanribosomskim odjeljcima jer se međusobno štite od razgradnje, dok se svi ostali novosintetizirani RP razgrađuju u 20S proteasomima neovisno o ubikvitinu.
4. U izvanribosomskim odjeljcima sklop RPL5 i RPL11 veže negativni regulator p53, Mdm2, što rezultira povećanjem količine p53.
5. Sklop RPL5, RPL11, Mdm2, p53 i PML se translocira u oštećenu jezgricu nakon inhibicije sinteze ribosoma. U jezgrici se p53 u potpunosti aktivira. Ovi rezultati ukazuju na novu ulogu jezgrice u aktivaciji ključnog supresora tumora p53 nakon inhibicije sinteze ribosoma.
6. Rezultati ovog istraživanja omogućit će bolje razumijevanje patogeneze ribosomopatija te bi u budućnosti mogli dovesti do otkrića ciljnih molekula za liječenje tih bolesti.

7. Literatura

1. Conlon I., Raff M. Size control in animal development. *Cell* 1999. 96:235-244.
2. Conlon I, Dunn GA, Mudge AW, Raff M. Extracellular control of cell size. *Nat. Cell Biol.* 2001. 3:918-921.
3. Volarevic S, Thomas G. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog.Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 2001. 65:101-127.
4. Warner JR. Nascent ribosomes. *Cell* 2001;107:133-6.
5. Lewis JD, Tollervey D. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science.* 2000 ;288(5470):1385-9.
6. Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Guarding the “translation apparatus”: defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2011(4):507-228.8.
7. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054-72.
8. Teng T, Thomas G, Mercer C. Growth control and ribosomopathies. *Current Opinion in Genetics and Development.* 2013, 23:1-9.
9. Fatica A and Tollervey D. Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology* 2002;14:313–318.
10. Robledo S, Idol RA, Crimmins DL, Ladenson JH, Mason PJ, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 2008;14(9):1918-29.

11. Framont-Racine M, Senger B, Saveanu C, Fasiolo F. Ribosome assembly in eucaryotes. 2003; 313:17-42.
12. Nazar RN. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. IUBMB Life. 2004 ;56(8):457-65.
13. Grabbeman S, Baserga SJ. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. Exp Cell Res. 2004;296(1):43-50.
14. Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. FEBS Lett. 2001;509(2):145-50.
15. Moss T. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. Curr Opin Genet Dev. 2004 ;14(2):210-7.
16. Hannan KM, Sanij E, Rothblum LI, Hannan RD, Pearson RB. Dysregulation of RNA polymerase I transcription during disease. Biochim Biophys Acta. 2013 ;1829(3-4):342-60.
17. Ferreira-Cerca S, Pöll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. Mol Cell. 2005;20(2):263-75.
18. Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B i sur. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. Science 2000;288:2045-7.
19. Mason PJ, Wilson DB, Bessler M. Dyskeratosis congenit- a disease of dysfunctional telomere maintenance. Curr Mol Med. 2005;5(2):159-70
20. Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. Science. 2006;312(5775):902-6.

21. Spriggs KA, Mitchell SA, Willis AE. Investigation of interactions of polypyrimidine tract-binding protein with artificial internal ribosome entry segments. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 6):1483-6.
22. Karbstein K. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol.* 2013;23(5):242-50.
23. Panse VG, Johnson AW. Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(5):260-6.
24. Finch AJ, Hilcenko C, Basse N *il sur.* Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* 2011;25(9):917-29.
25. Shaw P, Brown J. Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.* 2012;158(1):44-51.
26. Pederson T. The nucleus introduced. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 ;3(5).
27. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):574-85.
28. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell.* 2010;40;216-27.
29. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH *i sur.* Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol.* 2002;12(1):1-11.
30. Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol.* 2007 ;17(9):749-60.
31. Andersen JS, Lam YW, Leung AK *i sur.* Nucleolar proteome dynamics. *Nature.* 2005;433(7021):77-83.

32. Nemeth A, Langst G. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet.* 2011;27(4):149-56.
33. Mayer C, Grummt I. Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle.* 2005;4(8):1036-8.
34. Rubbi CP, Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 2003;22:6068-77.
35. Burger K, Mühl B, Harasim T *i sur.* Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem.* 2010;285(16):12416-25
36. Sun XX, Dai MS, Lu H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J Biol Chem.* 2007;282(11):8052-9.
37. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev.* 2008;22(20):2755.
38. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
39. Golomb L, Bublik DR, Wilder S *i sur.* Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis. *Mol Cell.* 2012;45(2):222-32.
40. Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 2003;421:290-4.
41. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA *i sur.* c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 2005;7:311-8.

42. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA i sur. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 2005;7:311-8.
43. Boon K, Caron HN, van Asperen R i sur. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J* 2001;20:1383-93.
44. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM i sur. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-75.
45. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.
46. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A i sur. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004;6:1122-8.
47. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991;253:905-9.
48. Hara K, Maruki Y, Long X i sur. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-89.
49. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM i sur. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-41.
50. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.

51. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577-90.
52. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253-62.
53. Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 2006;25:6384-91
54. Ruvinsky I, Sharon N, Lerer T i sur. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* 2005;19:2199-211.
55. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:827-35.
56. Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:49-54.
57. Montanaro L, Trere D, Derenzini M. Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulation the cell tumor suppressor potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1825; 101-110.
58. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
59. K.H. Vousden and C. Prives, Blinded by the light: the growing complexity of p53, *Cell* 2009;137:413–431.

60. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001107.
61. Robles AI, Harris CC. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a001016.
62. Matheu A, Maraver A, Serrano M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res* 2008;68:6031-4.
63. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF i sur. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997;91:649-59.
64. Lessard F, Morin F, Ivanchuk S i sur. The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell* 2010 38:539-50.
65. Montanaro L, Trere D, Derenzini M. Nucleolus, Ribosomes and Cancer. *Am J Pathol*. 2008;173(2):301-10.
67. Montanaro L, Trere D, Derenzini M. Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulation the cell tumor suppressor potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1825; 101-110.
68. Freed EF, Bleichert F, Dutca LM, Baserga SJ. When ribosome go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Mol Biosyst*. 2010;6(3):481-93.
69. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2007;28:1178-82.

70. Doherty L, Sheen MR, Vlachos A i sur. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2010;86:222-8.
71. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B i sur. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999;21:169-75.
72. Ebert BL, Pretz J, Bosco J i sur. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008;451:335-9.
73. Barlow JL, Drynan LF, Hewett DR i sur. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 2010;16:59-66.
74. Mason PJ, Wilson DB, Bessler M. Dyskeratosis congenit- a disease of dysfunctional telomere maintenance. *Curr Mol Med.* 2005;5(2):159-70.
75. Yoon A, Peng G, Brandenburger Y i sur. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 2006;312:902-6.
76. Montanaro L, Calienni M, Bertoni S i sur. Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation. *Cancer Res* 2010;70:4767-77.
77. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ i sur. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998;19:32-8.
78. Ruggero D, Grisendi S, Piazza F i sur. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* 2003;299:259-62.

79. Valdez BC, Henning D, So RB, Dixon J, Dixon MJ. The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10709-14.
80. Lin CI, Yeh NH. Treacle recruits RNA polymerase I complex to the nucleolus that is independent of UBF. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:396-401.
81. Gonzales B, Henning D, So RB, Dixon J, Dixon MJ, Valdez BC. The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation. *Hum Mol Genet* 2005;14:2035-43.
82. Jones N, Lynn N, Gaudenz K i sur. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 2008;2:125-133.
83. Jones NC, Lynn ML, Gaudenz K i sur. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 2008;14:125-
84. Johnson AW, Ellis SR. Of blood, bones, and ribosomes: is Swachman-Diamond syndrome a ribosomopathy? *Genes Dev.* 2011;1;25(9):898-900.
85. Boocock GR, Morrison JA, Popovic M i sur. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003;33:97-101.
86. Menne TF, Goyenechea B, Sanchez-Puig N i sur. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* 2007;39:486-95.

87. Orelia C, Verkuijlen P, Geissler J, van den Berg TK, Kuijpers TW. SBDS expression and localization at the mitotic spindle in human myeloid progenitors. *PLoS One* 2009;4:e7084.
88. Hermanns P, Tran A, Munivez E i sur. RMRP mutations in cartilage-hair hypoplasia. *Am J Med Genet A* 2006;140:2121-30.
89. Thiel CT, Horn D, Zabel B i sur. Severely incapacitating mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endoribonuclease RMRP as an essential cell growth regulator. *Am J Hum Genet* 2005;77:795-806.
90. Gill T, Cai T, Aulds J, Wierzbicki S, Schmitt ME. RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 2004;24:945-53.
91. Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 2001;21:4246-55.
92. Šulić S, Panić L, Barkić M, Merćep M, Uzelac M, Volarević S. Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes Dev* 2005;19:3070-82.
93. Panić L, Tamarut S, Sticker-Jantscheff M i sur. Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. *Mol Cell Biol* 2006;26:8880-91.

94. Barkić M, Crnomarković S, Grabušić K i sur. The p53 Tumor Suppressor Causes Congenital Malformations in *Rpl24*-Deficient Mice and Promotes Their Survival. *Mol Cell Biol* 2009;10:2489-2504.
95. Oliver ER, Saunders TL, Tarlé SA, Glaser T. Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development*. 2004;131(16):3907-20
96. McGowan KA, Li JZ, Park CY i sur. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 2008;40:963-70.
97. Terzian T, Box N. Genetics of ribosomal proteins: "Curiouser and Curiouser". *PLoS Genet*. 2013;9(1).
98. Holmberg Olausson K, Nister M, Lindstrom MS. p53-Dependent and Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells* 2012, 1, 774-798.
99. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
100. Karim Bensaad and Karen H. Vousden p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Bio*. 2007;6:286-91.
101. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 1997;420:25-7.
102. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S i sur. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J*. 2001;20(6):1331-40.

103. Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 2009;16:369-77.
104. Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* 2007;6:414-7.
105. Stokes MP, Rush J, Macneill J i sur. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:19855-60.
106. Hurley PJ, Bunz F. ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* 2007;6:414-7.
107. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;4:275-83.
108. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat.Rev.Cancer* 2009;2:95-107.
109. Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 2004;24:7654-68
110. Jin A, Itahana K, O'Keefe K, Zhang Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7669-80
111. Lohrum MA, Ludwig RL, Kubbutat MH, Hanlon M, Vousden KH. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 2003;3:577-87.

112. Zhang Y, Wolf GW, Bhat K. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23):8902-12.
113. Bhat KP, Itahana K, Jin A, Zhang Y. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J.* 2004 ;23(12):2402-12.
114. Horn HF, Vousden KH. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene.* 2008;27(44):5774-84
115. Dai MS, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 2004;279:44475-82.
116. Chen D, Zhang Z, Li M i sur. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 2007;26:5029-37.
117. Zhang Y, Wang J, Yuan Y i sur. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res* 2010;38:6544-54.
118. Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A i sur. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):501-8.
119. Li M, Gu W. A critical role for noncoding 5S rRNA in regulating Mdmx stability. *Mol Cell.* 2011;43(6):1023-32

120. Dai MS, Arnold H, Sun XX, Sears R, Lu H. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J.* 2007;26(14):3332-45.
121. Warner JR. In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. *J Mol Biol.* 1977 25;115(3):315-33.
122. Condemine W, Takahashi Y, Le Bras M, de Thé H. A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 18):3219-27.
123. Fumagalli S, Ivanekov VV, Teng T, Thomas G. Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev.* 2012;26(10):1028-40.
124. Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 2001;83(3-4):301-10.

Popis skraćenica

RP – ribosomski protein/ribosomski proteini

AktD – Aktinomicin D

5-FU – 5-fluorouracil

YFP (engl. yellow fluorescence protein)

CHX – cikloheksamid

MG132 – inhibitor proteasoma

Mdm2 (engl. mouse double minute 2 homolog)

siRNA (engl. silencing)

Pol I – RNA-polimeraza I

Pol III – RNA-polimeraza III

rRNA – ribosomska RNA

mRNA – glasnička RNA

IRES (*engl. internal ribosome entry site*)

snoRNA (engl. small nucleolar RNA)

snoRNP (engl. small nucleolar ribonucleoprotein particles)

PML (engl. promyelocytic leukemia protein)

ac-p53 – acetilirani p53

Ras (engl. *rat sarcoma*)

PI3K (engl. *phosphatidylinositide 3-kinase*)

MAPK (*engl. mitogen-activated protein kinase*)

Rb (engl. *retinoblastoma protein*)

Arf (engl. *alternative reading frame protein*)

Životopis

Opći podaci:

Ime i prezime: Slađana Bursać (rođ. Crnomarković)

Ime oca i majke: Milan, Nada

Datum rođenja: 23.01.1982.

Mjesto rođenja: Rijeka, Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Bračno stanje/djeca: udana, majka Kiare

Adresa: Tizianova 9

Školovanje:

2007. – 2013. Poslijediplomski studij Biomedicina na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci

2000. – 2004. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (smjer diplomirani sanitarni inženjer)

1996. - 2000. Medicinska škola u Rijeci (smjer farmaceutski tehničar)

Zaposlenja:

2006. – danas. Zavod za Molekularnu medicinu i biotehnologiju, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Rijeci, znanstveni novak

Objavljeni radovi:

1. Martina Barkić, Sladana Crnomarković, Kristina Grabušić, Ivana Bogetić, Linda Panić, Sanda Tamarut, Maja Cokarić, Ines Jerić, Sandra Vidak i Siniša Volarević. ***The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24-deficient mice and promotes their survival.*** *Mol Cell Biol* 2009. 29(10):2489-2504
2. Sladana Bursać, Maja Cokarić Brdovčak, Martin Phannkuchen, Ines Oršolić, Lior Golomb, Yan Zhu, Chen Katz, Lilyn Daftuar, Kristina Grabušić, Iva Vukelić, Vedrana Filić, Moshe Oren, Carol Prives i Siniša Volarević. ***Mutal protection of ribosomal protein L5 i L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress.*** *Proc Natl Acad Sci USA* 2012. 109(50):20467-72
3. Georgia Velimezi, Michalis Liontos¹, Konstantinos Vougas, Theodoros Roumeliotis, Jirina Bartkova, Maria Sideridou, Ayguel Dereli-Oz, Maciej Kocylowski, Ioannis S Pateras, Kostas Evangelou, Athanassios Kotsinas, Ines Oršolić, Sladana Bursać, Maja Cokarić Brdovčak, Vassilis Zoumpourlis, Dimitris Kletsas, George Papafotiou, Apostolos Klinakis, Siniša Volarević, Wei Gu, Jiri Bartek, Thanos D. Halazonetis, Vassilis Gorgoulis. ***Functional interplay between the DNA damage response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer.*** *Nat Cell Biol.* u tisku 2013.

Kongresna priopćenja (usmena izlaganja i poster):

1. Barkić M, **Crnomarković S**, Panić L, Grabušić K, Cokarić M, Tamarut S, Bogetić I, Volarević S. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in RPL24-deficient mice and promotes their survival. // *HDBMB 2008 Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology (with international participation)* / Strelec, Ivica ; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.). Zagreb: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008. 75-75.

2. Barkić M, **Crnomarković S**, Volarević S. The p53 tumor suppressor permits survival of ribosomal protein L24-deficient mice at the expense of malformations.

EMBO Practical Course: Anatomy and Embryology of the Mouse.
Zagreb, 2008. 67-67.

Sudjelovanje na kongresima, ljetnim školama i radionicama:

Kongresi

1. 4th INFLA-CARE Annual Meeting , Crete, Greece, 2012.

2. 2nd Inflammation, Cancer and Novel Therapeutics Conference, Malia, Crete, Greece, 2012.

3. INFLA CARE Annual meeting, Crete, Greece, 2010.

4. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and molecular Biology ,Osijek, 2008.

Ljetne škole:

1. 2nd Inflammation, Cancer and Novel Therapeutics Summer School, Malia, Crete, Greece, 2012.
2. 1st Inflammation & Cancer Summer School, Crete, Greece, 2010.

Radionice:

1. Workshop „Live Cell Imaging Microscopy“, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Croatia, 2013.
2. Workshop „Cell Proliferation in Cancer“, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Croatia, 2012
3. Workshop „Translation Cancer Research“, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Croatia, 2011.

Nagrade:

1. Nacionalna stipendija "Za žene u znanosti" koju dodjeljuju L'Oreal ADRIA i Ministarstvo kulture (Hrvatsko povjerenstvo za UNESCO) za 2013.godinu
2. Nagrada "Željko Trgovčević" za najboljeg mladog istraživača u području molekularne biologije za 2012. godinu

Član stručnih / znanstvenih društava :

1. Hrvatsko genetičko društvo
2. Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu medicinu

Nastavna djelatnost:

2008. godine sudjelujem u izvođenju nastave iz slijedećih kolegija:

1. Molekularna medicina i biotehnologija I, preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva

2. Molekularna medicina i biotehnologija II, preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva