

# UTJECAJ GLUKOKORTIKOIDA NA MITOHONDRIJSKI PUT APOPTOZE TIMOCITA

---

**Pleša, Matija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2012**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:435466>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



**ODJEL ZA  
BIOLOGIJU**  
Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Matija Pleša

UTJECAJ GLUKOKORTIKOIDA NA MITOHONDRIJSKI  
PUT APOPTOZE TIMOCITA

Diplomski rad  
OSIJEK, 2012.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za biologiju  
Diplomski znanstveni studij biologije  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

Diplomski rad

## UTJECAJ GLUKOKORTIKOIDA NA MITOHONDRIJSKI PUT APOPTOZE TIMOCITA

Matija Pleša

**Rad je izrađen:** u Laboratoriju za signalni put apoptoze, Sveučilišta u Debrecenu, Mađarska

**Mentor:** dr.sc. Elizabeta Has-Schön, izv.prof

**Komentor:** dr.sc., dr.med. Zsuzsa Szondy

### Kratak sažetak rada:

Glukokortikoidi predstavljaju grupu steroidnih hormona koja se upotrebljava u liječenju raznih autoimunih i upalnih bolesti te njihova klinička upotreba proizlazi iz njihove sposobnosti indukcije apoptoze timocitnih i leukemijskih stanica. Iako se glukokortikoidi koriste pri liječenju dugi niz godina, mehanizmi njihovog djelovanja slabo su poznati. Glukokortikoidi mogu djelovati na apoptozu na više načina ali i na više staničnih odjeljaka kao što su stanična jezgra, mitohondriji i stanična ovojnica. Mitohondrijski put aktivacije apoptoze bitan je zbog toga što ovim putem glukokortikoidi mogu regulirati smrt leukemijskih i limfatičkih stanica puno prije nego što to omogućava aktivacija genskom regulacijom u staničnoj jezgri.

Ciljevi ovog rada su dokazati translokaciju glukokortikoidnih receptora u mitohondrije, istražiti da li glukokortikoidi imaju utjecaja na regulaciju ekspresije mitohondrijskih gena i mogu li glukokortikoidi aktivirati Bcl-2 obitelj proteina u timocitima.

**Broj stranica:** 34

**Broj slika:** 8

**Broj tablica:** 1

**Broj literaturnih navoda:** 12

**Broj priloga:** 1

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** Apoptoza, glukokortikoidi, retinoidi, mitohondriji, prsna žlijezda.

**Datum obrane:** 20.09.2012.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr.sc. Ljiljana Krstin, docent.
2. dr.sc. Elizabeta Has – Schön, izv.prof.
3. dr.sc. Janja Horvatić, izv.prof.

**Rad je pohranjen u:**

U knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University Josipa Jurja Strossmayera in Osijeku**  
**Department of Biology**  
**Graduate study of Biology**

**MS Thesis**

**Scientific Area: Natural Science**  
**Scientific Field: Biology**

### **GLUCOCORTICOID INDUCED APOPTOSIS IN MOUSE THYMOCYTES**

**Matija Pleša**

**Thesis performed at:** Laboratory for Apoptosis signaling, University in Debrecen, Hungary

**Supervisor:** dr.sc. Elizabeta Has-Schön, izv.prof

**Cosupervisor:** dr.sc., dr.med. Zsuzsa Szondy

#### **Short abstract:**

Glucocorticoids form a group of steroid hormones which are commonly used for treatment of vast majority autoimmune and inflammatory diseases. Their clinical application is a result of their ability to induce apoptosis in thymocytes and leucemic cells. Although glucocorticoids are already used for many years, exact mechanism of their biological activity is not well-known. Glucocorticoids can influence apoptosis in different ways and their action is possible in nucleus, mitochondria and cell membrane. Mitochondrial pathway of apoptosis is important because the effect of glucocorticoids can be noticed earlier than their effect on gene regulation in nucleus.

Aims of this thesis is to prove translocation of glucocorticoid receptor to the mitochondria, show that glucocorticoids can regulate transcription of mitochondrial genes as well as to confirm activation of Bcl-2 family of proteins in thymocytes by glucocorticoids.

**Number of pages: 34**

**Number of figures: 8**

**Number of tables: 1**

**Number of references: 12**

**Number of appendixes: 1**

**Original in: Croatian**

**Key words:** Apoptosis, glucocorticoids, retinoids, mitochondria, thymus.

**Date of thesis defense: 20.09.2012.**

**Reviewers:**

**1. dr.sc. Ljiljana Krstin, docent.**

**2. dr.sc. Elizabeta Has – Schön, izv.prof.**

**3. dr.sc. Janja Horvatić, izv.prof.**

**Thesis deposited in:**

Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer in Osijek

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Apoptoza .....	1
1.1.1	Aktivacija apoptoze pomoću površinskih receptora .....	2
1.1.2	Mitohondrijski put aktivacije apoptoze.....	4
1.2	Uloga programirane stanične smrti u sazrijevanju T – limfocita.....	6
1.3	Glukokortikoidi i aktivacija glukokortikoidnih receptora.....	7
1.4	Apoptoza timocita inducirana glukokortikoidima .....	9
2	CILJ RADA .....	10
3	MATERIJALI I METODE .....	11
3.1	Izolacija prsne žlijezde.....	11
3.2	Izolacija mitohondrijske frakcije .....	11
3.3	Western blot analiza .....	12
3.4	RNA izolacija i kvantitativna analiza mRNA ekspresije CO1 i ND1 gena ....	13
3.5	Protočna citometrija i Bcl-2 označavanje proteina .....	14
4	REZULTATI.....	16
4.1	Western blot analiza .....	16
4.2	Kvantitativna analiza ekspresije mitohondrijskih CO1 i ND1 gena .....	17
4.3	Protočna citometrija i označavanje Bcl-2 BH3 domene proteina .....	21
5	RASPRAVA.....	23
6	GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK .....	25
6.1	Glavni rezultati.....	25
6.2	Zaključak .....	25
7	LITERATURA .....	26
8	WEB ADRESE .....	28
9	TABLICA SKRAĆENICA .....	29

# 1 UVOD

## 1.1 Apoptoza

Apoptoza je fiziološki proces koji je također poznat pod nazivom programirana stanična smrt (PCD) te je uvijek prisutan pri razvoju stanica i postoji kao normalni mehanizam u životnom ciklusu svakog višestaničnog organizma.

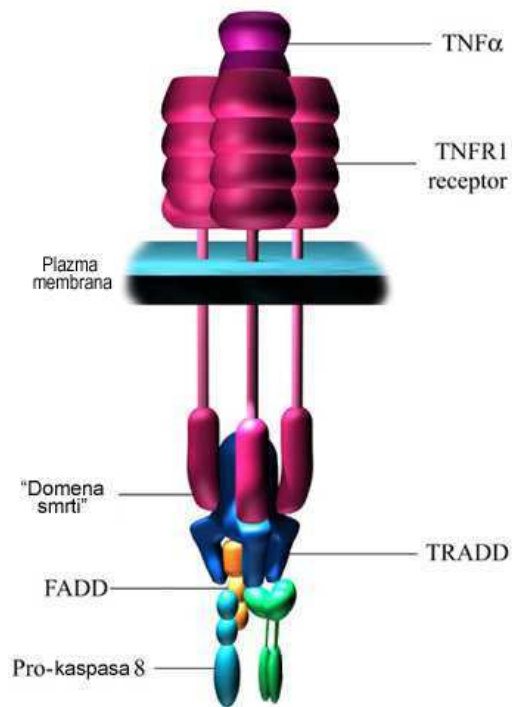
Apoptoza je potrebna ako stanice u bilo kojem trenutku životnog ciklusa ne mogu obaviti svoju normalnu funkciju, ako je nastao suvišak stanica određenog tipa (koje predstavljaju opasnost za preživljavanje organizma) te ako je u određenom stupnju razvoja došlo do nepravilnog ponašanja stanica. Za vrijeme apoptoze stanice prolaze kroz razne strukturalne ali i biokemijske promjene kao što su bubrenje, skupljanje cijele stanice, rascjepljivanje jezgre, kondenzacija kromatina i rascjepljivanje kromosomske DNA. Sve te promijene se uglavnom događaju u određenoj stanici i to tako da ne dolazi do oštećenja okolnih stanica koje ne prolaze kroz proces apoptoze. Makrofagi recikliraju apoptotične stanice procesom fagocitoze uz precizno ophođenje sa sadržajem stanica jer u protivnom može doći do velikih oštećenja okolnih stanica i tkiva. Apoptoza je genetički kontroliran proces koji ima jednu od najvažnijih uloga u embriogenezi, metamorfozi stanica i prirodnoj staničnoj ravnoteži (Srivastava R. i sur. 2007). Molekule koje sudjeluju u signalnim putovima stanične smrti su najčešće potencijalne mete za kliničku primjenu lijekova pri liječenju imunoloških, neuroloških, infekcijskih, upalnih i tumorskih oboljenja.

Zbog navedenih osobina proces apoptoze je u posljednjih nekoliko desetljeća postao veliko područje intenzivnog istraživanja. Iako različiti vanjski podražaji mogu utjecati na aktivaciju apoptoze, regulacija ovog procesa se odvija kroz dva glavna puta aktivacije i to pomoću „površinskih receptora smrti“ (1.1.1) (eng. cell surface death receptors) te pomoću mitohondrijskog puta aktivacije (1.1.2).

### 1.1.1 Aktivacija apoptoze pomoću površinskih receptora

Receptori na površini stanica aktiviraju apoptozu prijenosom signala u stanicu nakon vezanja nekog od liganada kao što su Fas-ligand, tumor nekrotski faktor alfa (TNF-alfa) i TNF vezani aktivator apoptoze (TRAIL, Zhang i sur. 2005). Ova tri liganda su proteini koji su članovi TNF superobitelji proteina. Takvi ligandi imaju važnu ulogu pri aktivaciji kaskade raznih kaspaza koje mogu aktivirati u vremenskom razdoblju od samo nekoliko sekundi (Dash Phil. 2007).

Nakon vezanja liganda dolazi do konformacijskih promjena na unutarstaničnim domenama receptora. Ove promijene uzrokuju otkrivanje „domene smrti“ (eng. death domain) koja je važna za aktivaciju i vezanje kompleksa različitih apoptotičnih proteina koji će prenijeti signal dalje unutar stanice. Nastali kompleks proteina se još naziva i signalni kompleks smrti (DISC). Posljednji korak u aktivaciji inicijalnog stupnja apoptoze je vezanje jedne od inicijacijskih pro-kaspaza, uglavnom je to kaspaza 8, za DISC kompleks (Zhang i sur. 2005). TNF je pripadnik citokina koji nastaju u timocitima i aktiviranim makrofazima kao odgovor na infekciju. Ovaj citokin može djelovati na različite načine ovisno o stanicama koje aktivira, ali svim mehanizmima njegovog djelovanja je zajedničko da se prvo mora aktivirati TNF receptor 1 (TNFR1, *Slika 1*). Kod nekih vrsta stanica aktivacija TNFR1 uzrokuje aktivaciju transkripcijskih faktora kao što su NF- $\kappa$ B i AP-1 što dalje dovodi do indukcije širokog spektra gena (Sionov i sur. 2006). Iako TNF, kod nekih tipova stanica može inducirati apoptozu, često vezanje liganada za receptor nije samo po sebi dovoljno za takvu reakciju. Za razliku od vezanja TNF-a, Fas-ligand može samostalno pokrenuti apoptozu određenih tipova stanica.



*Slika 1. Prikaz TNF receptora 1 (TNFR 1) i pripadajućih sastavnih domena koje čine ovaj transmembranski kompleks. (Web 1.)*

Vežanje liganda, u ovom slučaju TNF-alfa, za receptor uzrokuje trimerizaciju i približavanje unutarstaničnih domena smrti. Takva konformacijska promjena na receptorskim domenama smrti dalje omogućuje vežanje unutarstanične adaptorne molekule TRADD (protein povezan sa domenom smrti TNF receptora 1). Uloga TRADD-a je omogućiti vežanje različitih proteina za aktivirani receptor. Jedna od takvih molekula je transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B ali i aktivacija JNK signalnog puta. JNK signalni put ima važnu ulogu u diferencijaciji T-limfocita i apoptozi stanica, a ovakav signalni put je aktiviran pomoću grupe kinaza koje se aktiviraju pomoću mitogenika. TRADD također može reagirati sa Fas proteinom povezanim sa domenom smrti (FADD) koji onda inducira apoptozu tako što autokatalitički veže pro-kaspazu 8. Kaspaze kao grupa molekula imaju veoma važnu ulogu u inicijacijskoj ali i u izvršnoj fazi apoptoze. Ova grupa proteina spada u obitelj cisteinskih proteaza koje unutar stanice uobičajeno postoje kao neaktivni oblici ili zimogeni (G.Melino i D. Vaux, 2010). Zimogeni se po aktivaciji prevode u aktivne enzime koji onda mogu dovesti do aktivacije apoptoze.



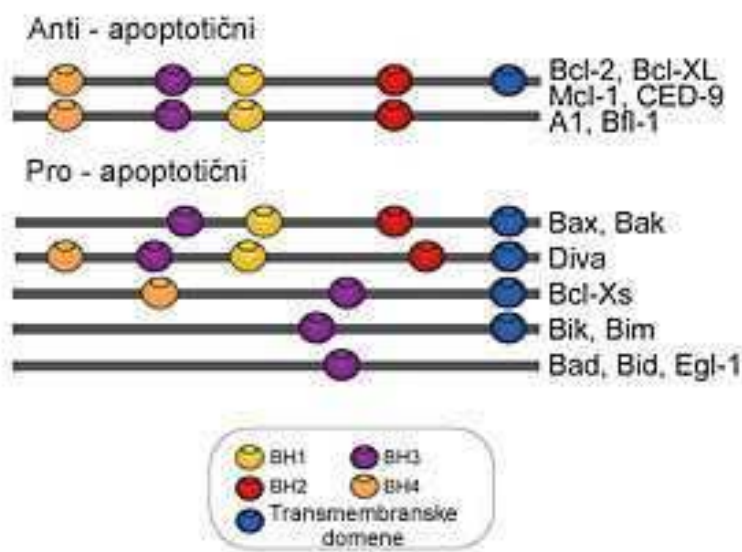
Indukcija apoptoze preko površinskih receptora uglavnom rezultira aktivacijom nekih od inicijacijskih kaspaza, kao što su kaspaza 8 ili kaspaza 10. Ove inicijacijske kaspaze zatim pokreću kaskadnu aktivaciju izvršnih kaspaza npr. kaspaza 3 ili kaspaza 7.

### **1.1.2 Mitohondrijski put aktivacije apoptoze**

Mitohondriji, također igraju važnu ulogu u regulaciji stanične smrti. Ovi organeli sadržavaju veliki broj pro-apoptotičnih proteina kao što su inducirajući faktor apoptoze (AIF), Smac/Diablo i citokrom c (Zhang i sur. 2005). Ovakvi faktori se po aktivaciji otpuštaju iz mitohondrija nakon čega slijedi formiranje propusne transmembranske (PT) pore u mitohondrijskoj membrani. Takve pore se formiraju pomoću pro-apoptotičnih proteina koji pripadaju Bcl-2 obitelji proteina, a također mogu biti aktivirani apoptotičnim signalima kao što su stres stanice, nedostatak hormona rasta i oštećenja stanice slobodnim radikalima.

Mitohondriji imaju važnu ulogu u pojačavanju signala koji je nastao aktivacijom receptora smrti i to tako što nakon aktivacije kaspaze 8 dolazi do povećanja aktivnosti pro-apoptotičnog Bcl-2 proteina Bid. Bcl-2 proteini predstavljaju obitelj proteina koja je zadužena za odgovor stanice na aktivaciju apoptoze. Neki od članova ove obitelji kao što su Bcl-2 i bcl-XL su anti-apoptotični dok su drugi, kao što su Bad, Bax i Bid, pro-apoptotični (Gross i sur. 1999). Bcl-2 članovi su građeni od četiri konzervirane homologne domene (BH domene) koje su organizirane i nazvane BH1, BH2, BH3 i BH4 te predstavljaju alfa-helikalne segmente ovih proteina. Mnogi od anti-apoptotičnih proteina pokazuju strogu konzerviranost u aminokiselinskom slijedu sve četiri BH domene dok pro-apoptotični proteini pokazuju slabu konzerviranost prve alfa-helikalne domene, BH4 (Slika 2). Kod pro-apoptotičnih proteina glavnu ulogu ima BH3 domena. Kod Bcl-2 proteina postoji i jedna hidrofobna domena na karboksilnom završetku proteina koja služi kako bi se ovi proteini mogli ugraditi u membranu raznih organela pa tako i mitohondrija (Gross i sur. 1999). U odsutnosti signala za aktivaciju stanične smrti anti-apoptotični proteini se uglavnom nalaze u membrani mitohondrija, endoplazmatskoj mrežici (ER) i jezgrinoj membrani dok su pro-apoptotični proteini uglavnom lokalizirani u citoplazmi ili citoskeletu.

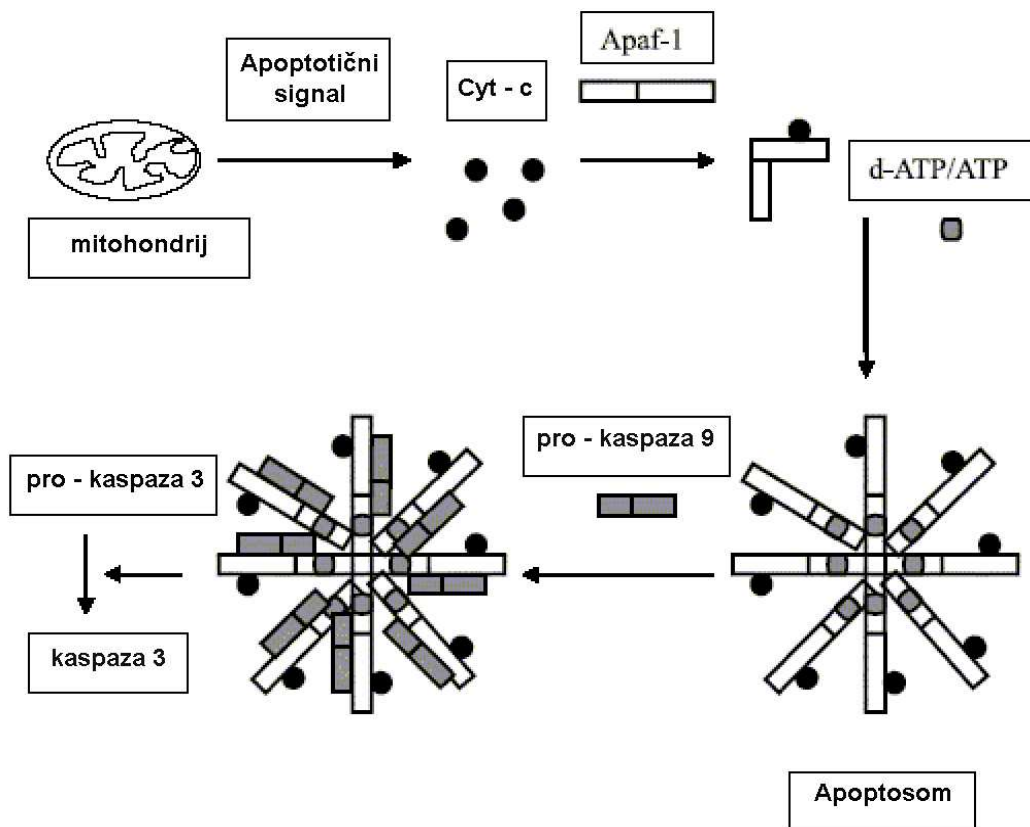
## Bcl-2 Proteini



Slika 2. Bcl-2 obitelj proteina sa pripadajućim pro i anti – apoptotičnim članovima i njihovim BH domenama (Web 2.).

Bcl-2 proteini imaju konzervirane karboksilne krajeve transmembranskih regija koje su zadužene za smještaj proteina i njihovu aktivnost u citosolnom dijelu jezgre, vanjske mitohondrijske ovojnice i endoplazmatske mrežice. Takva struktura je dovela do spoznaje i razvoja ideje da su ovi proteini transmembranski kanali koji mogu poticati ili usporiti protok molekula koje uzrokuju aktivaciju kaspaza (Strasser i sur. 2000). Nadalje, nakon što dođe do signala smrti pro-apoptotični proteini koji sadrže samo BH3 domenu, kao što su Bim i Bid, mogu se premjestiti na mitohondrijsku vanjsku membranu gdje se nalaze uglavnom samo anti-apoptotični članovi Bcl-2 obitelji. Takvo premještanje BH3 proteina narušava ravnotežu pro i anti-apoptotičnih proteina na membrani mitohondrija što najčešće dovodi stvaranja PT pore i ispuštanja pro-apoptotičnih molekula iz unutarmembranskog prostora mitohondrija.

Otpuštanje citokroma c, dATP, apoptotičnog faktora aktivacije kaspaza 1 (Apaf-1) i pro-kaspaze 9 može dovesti do nastajanja kompleksa molekula kojeg nazivamo apoptosomom (Slika 3). Ovaj kompleks služi kako bi se pokrenula kaskada kaspaza i inducirala apoptoza (Gross i sur. 1999).



Slika 3. Mitohondrijski put pokretanja kaskadne reakcije kaspaza pomoću formiranja apoptosoma. (Web 3.)

## 1.2 Uloga programirane stanične smrti u sazrijevanju T – limfocita

Apoptoza ima važnu ulogu u svim biološkim procesima koji se odvijaju unutar timocita. U slučaju da tokom razvoja tj. sazrijevanja T – limfocita dođe do nastajanja klonova koji imaju nerazvijeni ili autoreaktivni receptor (TCR), takvi klonovi se uklanjaju apoptozom jer su nefunkcionalni i ne mogu obavljati svoje zadaće. Također apoptoza ima zadaću uklanjati efektorske limfocite T nakon imunološkog odgovora na infekcije.

Sam razvoj timocita počinje seobom multipotentne matične stanice iz koštane srži u timus. Ovakve stanice periodično ulaze u timus te se tamo dalje diferenciraju u tri razvojna stadija:  $CD4^-CD8^-$  dvostruko – negativni (DN) stadij,  $CD4^+CD8^+$  dvostruko – pozitivni (DP) stadij,  $CD4^+CD8^-$  i  $CD4^-CD8^+$  jednostruko pozitivni (SP) stadij (Zhang i sur. 2005). Većina DP timocita ne izražavaju pravilne TCR tj. takvi receptori ne

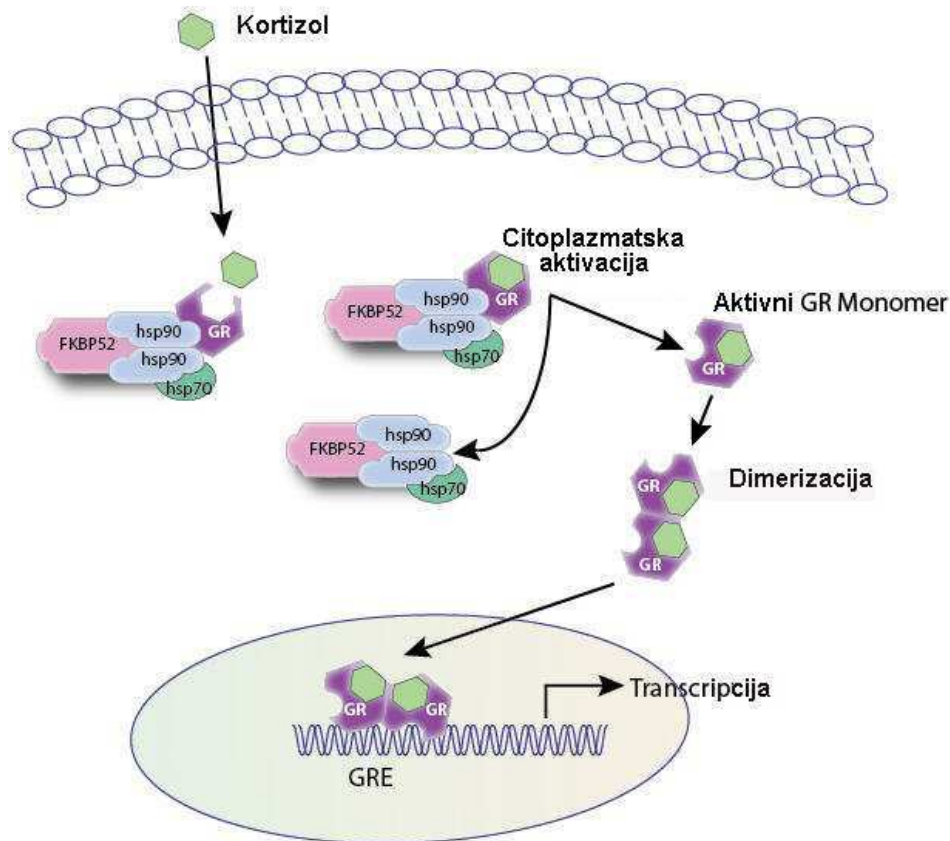
moгу prepoznati kompleks vlastitih antigena i proteina glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC) te zbog takve pogreške moraju biti podvrgnuti apoptozi. Takva apoptoza se pokreće pomoću endogenih glukokortikoida koji nastaju u epitelnim stanicama timusa (Ashwell i sur. 2000). Timociti koji izražavaju receptore sa slabim afinitetom također su podložni apoptozi kako bi se osigurao funkcionalni repertoar TCR na površini stanice. Većina timocita prolazi proces pozitivne selekcije koja kasnije onda dovodi do povećane ekspresije Bcl-2 proteina na površini stanica. Kako bi se spriječilo nastajanje autoreaktivnih timocita, stanice moraju proći kroz proces negativne selekcije.

### **1.3 Glukokortikoidi i aktivacija glukokortikoidnih receptora**

Glukokortikoidi (GC) su grupa steroidnih hormona koji mogu biti iznimno korisni u liječenju različitih tipova hematoloških, autoimunih i upalnih bolesti. Njihova klinička upotreba proizlazi iz sposobnosti GC-a da induciraju apoptozu timocita i leukemijskih stanica (Sionov i sur. 2006). Kako bi ispunili ovu zadaću, glukokortikoidi se moraju prvo vezati za glukokortikoidni receptor (GR). Receptori se nalaze u citosolu vezani za veliki kompleks proteina toplinskog stresa (HSP) i imunofilina.

GC receptori pripadaju velikoj superobitelji proteina u koju spadaju i drugi receptori raznih hormona poput steroidnog, tiroidnog hormona, vitamina D3, retinoične kiseline i receptora za Nur77 (Ashwell i sur. 2000.). Strukturalno GR se sastoji od dvije transaktivacijske domene, jedne na karboksilnom i jedne na amino završetku, cink – prsti DNA vezujuće domene (DBD) i karboksi terminalne ligand vezujuće domene (LBD). Po vezanju liganda za GR, dolazi do odvajanja receptora iz kompleksa sa HSP i imunofilinima, što omogućuje premještanje receptora prema jezgri ili mitohondriju. Nakon premještanja GR može mijenjati gensku ekspresiju obaju organela ili pak krenuti nekim negenskim putem. Transaktivacija ili transrepresija više različitih gena se može odvijati tek nakon vezanja DBD domene za element osjetljiv na utjecaj glukokortikoida (GRE) (Slika 4). Takvim signalom glukokortikoidi mogu mijenjati ravnotežu između pro – apoptotičnih i anti – apoptotičnih gena. Iako je najčešće slučaj da GR izravno dovodi do transaktivacije gena, postoji i određena komunikacija između GR i drugih transkripcijskih faktora koji onda međusobno mogu promijeniti biološku aktivnost. Tako je opisana interakcija

između GR i aktivatorskog proteina 1 (AP - 1). Uglavnom ovi faktori međusobno antagoniziraju transkripcijsku aktivnost.



Slika 4. Aktivacijski put apoptoze putem glukokortikoidnih receptora. (Web 4.)

Drugi nuklearni faktori koji se vežu za GR i mijenjaju njegovu aktivnost su NF- $\kappa$ B i CREB te signalni i transkripcijski faktori STAT3 i STAT5.

Bez obzira na mehanizam odgovoran za aktivnost GR-a, komunikacija između GR i drugih transkripcijskih faktora pruža bogato okruženje za zajedničku (pozitivnu ili negativnu) regulaciju glukokortikoidnih ili nekih drugih signalnih putova (Ashwell i sur. 2000).

## **1.4 Apoptoza timocita inducirana glukokortikoidima**

Glukokortikoidi imaju važnu ulogu u razvoju timocita i selekciji njihovih prekursora. Ne samo da glukokortikoidi imaju utjecaja na razvoj timocita nego epitelne stanice timusa same proizvode glukokortikoide ovisno o starosti stanica, što pokazuje da se timociti nalaze u okolišu koji je jako bogat glukokortikoidima. DP stanice su najosjetljivija subpopulacija timocita, na utjecaj glukokortikoida, no ipak one izražavaju najmanju ekspresiju GR na proteinskoj razini ali i na razini mRNA (Talaber i sur. 2009), što se bitno razlikuje ako ih usporedimo sa drugim razvojnim stadijima timocita.

Postoje mnogobrojni dokazi koji nam govore kako su DP stanice jedno od glavnih mjesta djelovanja glukokortikoida na razvoj timocita. U ovoj fazi stanice reagiraju sa kompleksom vlastitog peptida i MHC proteina te ovisno o jačini takvog signala stanice mogu biti pozitivno ili negativno odabrane. Odluku o ovakvom odabiru stanica pruža međusobna interakcija glukokortikoida i TCR receptora. Oni timociti koji vežu ovaj kompleks sa velikim afinitetom prolaze kroz proces negativne selekcije tj. prolaze kroz apoptozu jer je TCR signal snažniji od GC signala. U određenim slučajevima afinitet za kompleks je jako nizak i tada je GC signal snažniji i stanice se također podvrgavaju negativnom odabiru. Ako stanice izražavaju umjeren afinitet prema kompleksu peptida i MHC proteina tada su TCR i GC signal podjednako snažni i stanice su tada pozitivno odabrane te se dalje razvijaju prema zrelim timocitima (Harold i sur. 2006).

Ovakav model aktivacije apoptoze tj. diferencijacije timocita se naziva zajedničkim antagonizmom i predložili su ga Vaccio i Ashwell, 2000. godine. Također ovaj mehanizam, od trenutka predlaganja pa do danas, nailazi na argumente koji ga potvrđuju ali i one koji ga opovrgavaju.

## **2 CILJ RADA**

Cilj ovoga rada je dokazati premještanje glukokortikoidnog receptora u mitohondrije inducirano glukokortikoidima, istražiti utjecaj glukokortikoida na ekspresiju mitohondrijskih gena te utvrditi mogu li glukokortikoidi inducirati BH3 prodometu Bcl-2 obitelji proteina.

## **3 MATERIJALI I METODE**

### ***3.1 Izolacija prsne žlijezde***

U svrhu ovoga diplomskog rada žrtvovani su četiri tjedna stari C57BL/6 crni miševi. Odabrana je ova vrsta miša jer je to jedna od najraširenijih vrsta koja služi za istraživanje te ima pogodne karakteristike i za ovu vrstu eksperimenta. Sekcijom miša je izolirana prsna žlijezda te je isprana u fiziološkoj otopini (TEVA, Debrecen) i nakon toga mehanički usitnjena kroz metalnu mrežicu. Timociti su zatim otopljeni u RPMI 1640 mediju (Sigma-Aldrich, USA) i centrifugirani na 1000 okretaja po minuti. RPMI medij sadrži: 1% piruvata, 1% streptomicina i penicilina (antibiotici), 1% glutamina i 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS).

### ***3.2 Izolacija mitohondrijske frakcije***

Za potrebe western blot analize potrebno je izolirati mitohondrijsku frakciju iz otopine stanica. Broj stanica koje su korištene za tretmane je iznosio između  $10^7$  i  $2 \times 10^7$  stanica po uzorku te su uzorci od 1ml raspoređeni na pločicama sa dvanaest bunarčića i tretirane sa 1 $\mu$ l: Dimetil – sulfoksida (DMSO, Sigma- Aldrich), 0.1  $\mu$ M deksametazona (Dex, Sigma – Aldrich, USA), 0.3  $\mu$ M 9 – cis retinoidnom kiselinom (9cisRA, Sigma – Aldrich), te kombinacijom 0.1  $\mu$ M Dex i 0.3  $\mu$ M 9cisRA. Nakon dodavanja glukokortikoida i retinoida uzorci su inkubirani trideset minuta u inkubatoru na 37°C, 5%CO<sub>2</sub> i 95% zraka. Po završetku inkubacije uzorci su sakupljeni u Eppendorf tubice od 1.5 ml te su podvrgnute izolaciji mitohondrijske frakcije pomoću kita za izolaciju (Thermo Scientific, num. 89874). Završetkom rada sa kitom dobivene su citosolna, nuklearna i mitohondrijska frakcija koje su se dalje koristile za western blot analizu.



### **3.3 Western blot analiza**

Western blotting je analitička metoda te je također poznat pod nazivom imunoblotting ili protein blotting. Ova metoda je jedna od najraširenijih metoda u molekularnoj biologiji i u znanstvenim istraživanjima, a ima tri faze. Prva faza je elektroforeza pomoću koje se proteini razdvajaju na osnovu njihovih fizikalnih osobina (Claire Moore, 2009). Za ovaj diplomski rad korištena je denaturirajuća elektroforeza te su proteini razdvojeni samo na osnovu svoje molekularne mase. Takvo razdvajanje je omogućio natrijev – dodecil sulfat koji proteinima daje negativni naboj. Sljedeća faza je prijenos proteina iz gela na čvrstu podlogu što je u ovom slučaju predstavljala nitrocelulozna membrana. Takav prijenos proteina omogućuje lakše rukovanje sa proteinima, a nakon prijenosa membrana se blokira sa otopinom mlijeka u prahu. Treći korak je nanošenje primarnih i sekundarnih antitijela koja nam omogućuju detektiranje određenog proteina na membrani uz pomoć supstrata pomoću kojeg možemo vidjeti položaj željenog proteina u odnosu na standardni marker.

U svrhu ovoga eksperimenta korištena je mitohondrijska frakcija za pripremu uzoraka koji se nanose na gel kako bi se mogla obaviti elektroforeza. Natrijev – dodecil sulfat (SDS) poliakrilamidni gel je korišten za denaturirajuću elektroforezu koja predstavlja prvi korak u western blot analizi te je takav korak napravljen na Bio – Rad sustavu za elektroforezu. Na 12% SDS – poli-akrilamidni gel su nanošeni uzorci tretirani sa glukokortikoidima i retinoidima i to tako da je u svaki odjeljak na gelu nanoseno 30 µl uzorka sa 5 µl proteinskog markera (Pageruler plus – prestained protein ladder, Thermo Scientific). Elektroforeza je zatim napravljena u puferu za elektroforezu pH vrijednosti 8.3, nakon čega je gel bio spreman za prijenos proteina na membranu koji je također napravljen na Bio-Rad sustavu u vremenu od jednog sata.

Nakon prijenosa proteina, membrana je blokirana sa 5% otopine nemasnog mlijeka u prahu, u vremenu od jednog sata. Poslije blokiranja membrane dodaju se primarna antitijela sa 1% otopinom nemasnog mlijeka u prahu u omjeru 1:2000. U tu svrhu korištena su primarna protutijela: zečja poliklonska IgG protutijela glukokortikoidnog receptora (GR) (Santa Cruz Biotechnology, USA), zečja poliklonska protutijela IgG Hsp 60 (Santa Cruz Biotechnology, USA) i kozja poliklonska IgG protutijela za Lamin B (Santa Cruz Biotechnology, USA). Membrana je zatim isprana nekoliko puta u Tris

otopini pufera (TBS, Sigma-Aldrich, USA) u koji je dodan TWEEN (Sigma – Aldrich, USA). Nakon koraka ispiranja na membranu su dodana sekundarna protutijela konjugirana sa peroksidazama. Korištena su protu – kozja IgG (Sigma – Aldrich, UK) i protu – zečja IgG (Sigma – Aldrich, USA) protutijela u omjeru 1:2000 sa 1% otopine nemasnog mlijeka u prahu. Kompleks antigen – protutijelo je dokazan sa kemoluminiscentnim supstratom (Milipore, USA) te su zatim rendgenske snimke snimljene u tamnoj komori pomoću KODAK Medical X ray processor 102 uređaja.

### **3.4 RNA izolacija i kvantitativna analiza mRNA ekspresije CO1 i ND1 gena**

Lančana reakcija polimerazom (PCR) u stvarnom vremenu je metoda koja se temelji na mjerenju fluorescencije koja je izravno proporcionalna količini umnoženog produkta u reakciji. Ova metoda se bitno razlikuje od obične PCR metode jer se detekcije i mjerenje umnažanja produkta odvijaju u stvarnom vremenu tijekom reakcije. Takvim mjerenjem se smanjila mogućnost kontaminacije uzoraka jer više nema koraka detekcije gdje se ponovno mora otvarati tubica sa uzorkom.

Prvi korak kod ove metode je izolacija DNA ili RNA koja se obavlja pomoću Trizol reagensa ili nekim od komercijalnih kitova. Ovaj prvi korak je ujedno i najvažniji korak jer kvaliteta izolacije RNA ili DNA izravno utječu na točnost detekcije i kvantifikaciju umnoženog produkta. Kako je RNA predstavljala početni materijal kod izrade ovoga testa potrebno je napraviti korak reverzne transkripcije (RT) kako bi dobili cDNA koja se zatim koristi za treći korak, tj. za kvantitativnu analizu ekspresije mitohondrijskih gena. U ovom trećem koraku testa uređaj prati reakciju umnažanja te kada ona dosegne svoju eksponencijalnu fazu, uređaj zabilježi vrijednost ciklusa ili CT vrijednost. CT vrijednost nam govori koliko vremena je potrebno da reakcija dođe u eksponencijalnu fazu. Povrh toga možemo zaključiti da je ekspresija određenog gena veća kada reakcija ranije dosegne eksponencijalnu fazu. CT vrijednost se zatim koristi kako bi se kvantificirala ekspresija ispitivanih gena.

Za test je prvo potrebno izolirati prsnu žlijezdu te tretirati uzorke sa glukokortikoidima i retinoidima. Nakon inkubacije uzoraka u trajanju od 1 i 2 sata, izdvojena je ukupna RNA stanica pomoću trizol reagensa (MRC, Biotech). Sljedeći korak je reverzna transkripcija kod koje je korišteno 200ng ukupne RNA po uzorku kako bi se sintetizirala cDNA. Reverzna transkripcija je obavljena tako da je prvi

ciklus podešen za 30 minuta na 42°C, a zatim 5 minuta na 72°C koristeći cDNA reverznu transkripciju visokog kapaciteta (ABI). Nakon toga količina transkripata je određena pomoću Taqman proba. Test je proveden na ABI Prism 7900 uređaju te je korišten sljedeći program od 40 ciklusa: 94°C u trajanju od 12 sekundi i zatim se temperatura smanjuje na 60°C i na toj temperaturi se odvija test jednu minutu. Svi uzorci su bili standardizirani u odnosu na ciklofilin A (Sigma – Aldrich, USA).

### **3.5 Protočna citometrija i Bcl-2 označavanje proteina**

Protočna citometrija predstavlja metodu koja omogućava analizu velikog broja stanica u nekoj populaciji stanica i to tako da se stanice analiziraju zasebno. Analiza se temelji na mjerenju raspršenja svjetlosti, fluorescencije i mjerenja absorbance. Ova zanimljiva metoda pruža mogućnost praćenja velikog broja parametara ali i rasporeda tih parametara u populaciji stanica. Testom je moguće mjeriti osobine stanica poput njihove veličine, membranskog potencijala i unutarstanične pH vrijednosti te je također moguće pratiti i neke parametre na razini DNA, proteina, površinskih receptora pa čak i mjerenje koncentracije kalcija u stanici. Najveća primjena ove metode odnosi se na mjerenje fluorescencije pa je tako i postavljen eksperiment u svrhu izrade ovog diplomskog rada. Kod ispitivanja karakteristika određenih komponenti stanica, u ovom slučaju Bcl-2 proteina, potrebno je pripremiti uzorke prije samog testiranja na citometru. Priprema zahtjeva određene korake: fiksacija, označavanje proteina i nekoliko koraka ispiranja (Rieseberg i sur. 2001.).

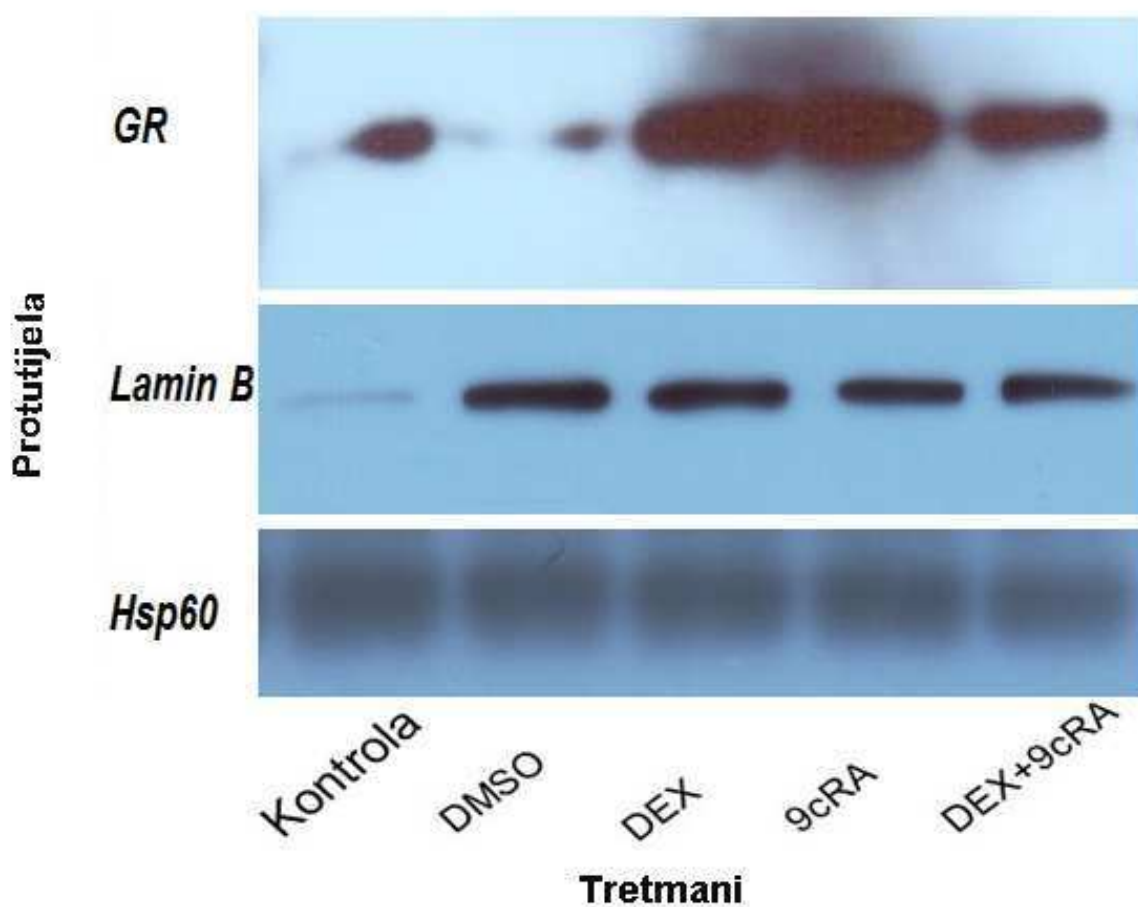
Ponovno je potrebno obaviti izolaciju prsne žlijezde te su obavljani tretmani sa glukokortikoidima i retinoidima u trajanju od 2, 4 i 6 sati. Nakon tretmana uzorci su isprani ledeno hladnom otopinom fosfatnog pufera (PBS) (Sigma – Aldrich, USA) i centrifugirani 5 minuta na 4000 o/min uz temperaturu od 4°C. Potom je talog otopljen u puferu za fiksaciju i permeabilizaciju (BD biosciences, USA), te su uzorci spremljeni na ledu oko pola sata. Po završetku mirovanja stanice su isprane nekoliko puta sa puferom za ispiranje i ponovno centrifugirane 5 minuta na 4000 o/min i 4°C. Nakon toga je uslijedilo ispiranje sa otopinom pufera i primarnog protutijela za Bcl-2 BH3 domenu proteina (Abgent, USA) te su uzorci podvrgnuti centrifugiranju od jednog sata na 1500 o/min na 4°C. Po završetku centrifugiranja uzorcima je dodano sekundarno antitijelo (Anti – rabbit – FITE. Sigma – Aldrich, USA) te je obavljeno

centrifugiranje u trajanju od 2 sata pod istim uvjetima kao centrifugiranje u prethodnom koraku. Uzorci se zatim isperu u puferu za ispiranje te se također talog otopi u PBS-u kako bi se mogao koristiti za analizu na protočnom citometru (FACS Calibur, BD biosciences). Podaci su očitani iz protočnog citometra pomoću software-a WinMDI 2.9.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Western blot analiza

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada je bio dokazati premještanje glukokortikoidnog receptora u mitohondrije pod utjecajem glukokortikoida i retinoida. U tu svrhu upotrijebljena je denaturirajuća elektroforeza i western blot analiza te su uzorci bili inkubirani 30 minuta sa 1 $\mu$ M Dex, 1.3 1 $\mu$ M 9cisRA i kombinacijom Dex i 9cisRA.



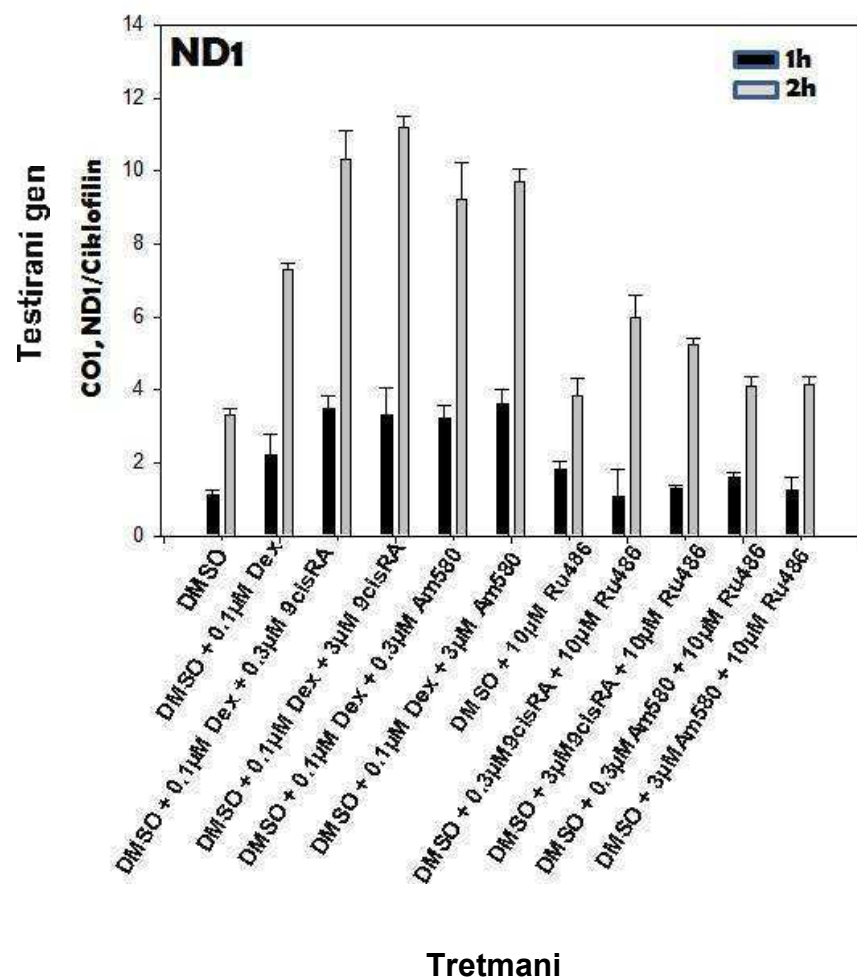
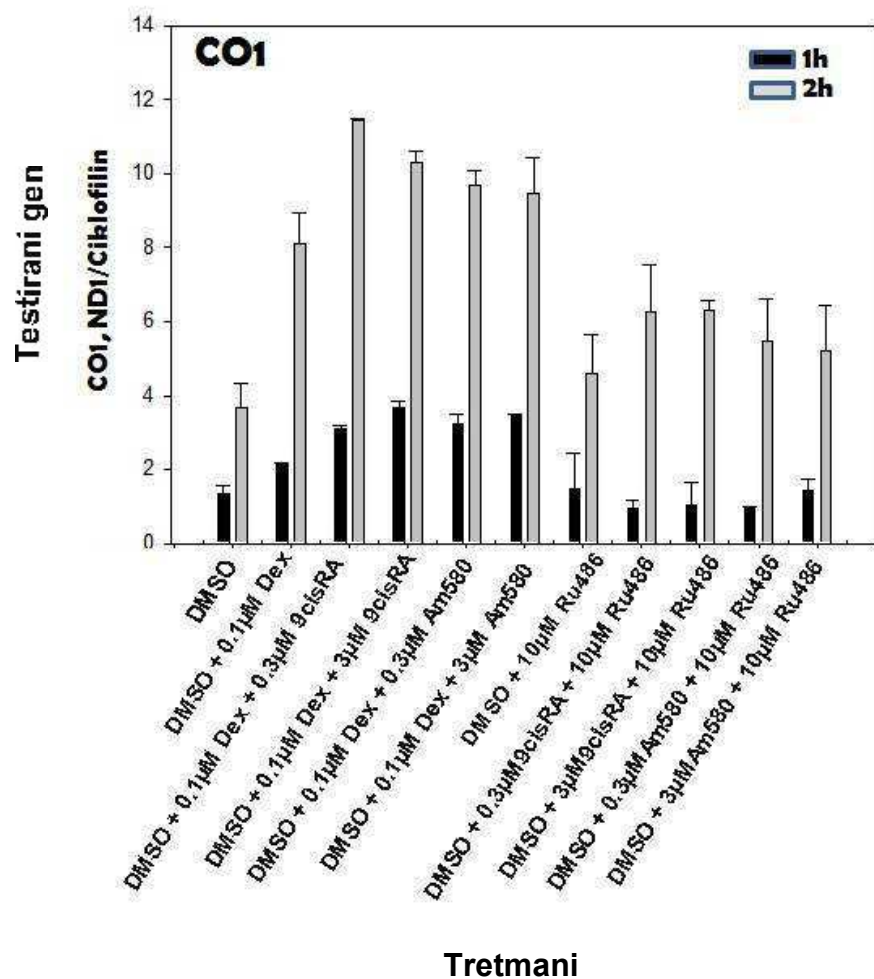
Slika 5. Rendgenska snimka na kojoj su prikazani uzorci tretirani sa dimetil – sulfoksidom (DMSO), deksametazonom (Dex), 9 – cis retinoidnom kiselinom (9cisRA) i kombinacijom Dex i 9cisRA. Uzorci su testirani sa Lamin-om B i Hsp60.

Ovi tretmani pokazuju premještanje glukokortikoidnog receptora u mitohondrije pod utjecajem glukokortikoida i retinoida (Slika 5). Ovakvo premještanje se dogodilo u veoma kratkom vremenskom roku od samo 30 minuta. Lamin B je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka te kako bi se pokazala čistoća nanesenih uzoraka dok je Hsp60 poslužio kao kontrola za količinu nanesenih uzoraka na gel.

#### **4.2 Kvantitativna analiza ekspresije mitohondrijskih CO1 i ND1 gena**

Ova metoda je poslužila kako bi se odredio utjecaj glukokortikoida i retinoida na ekspresiju mitohondrijskih gena u timocitima miša. U tu svrhu testirani su geni za citokrom c - oksidazu I i NADH-dehidrogenazu I jer su ova dva enzima veoma važna za proces oksidativne fosforilacije a samim time i preživljavanje timocita.

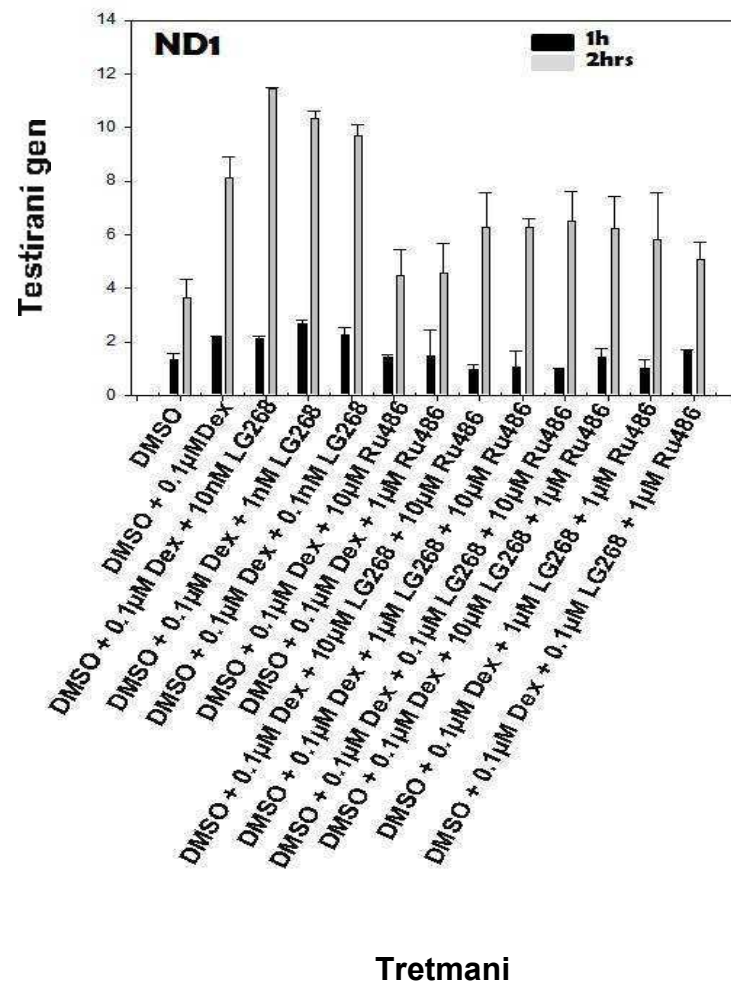
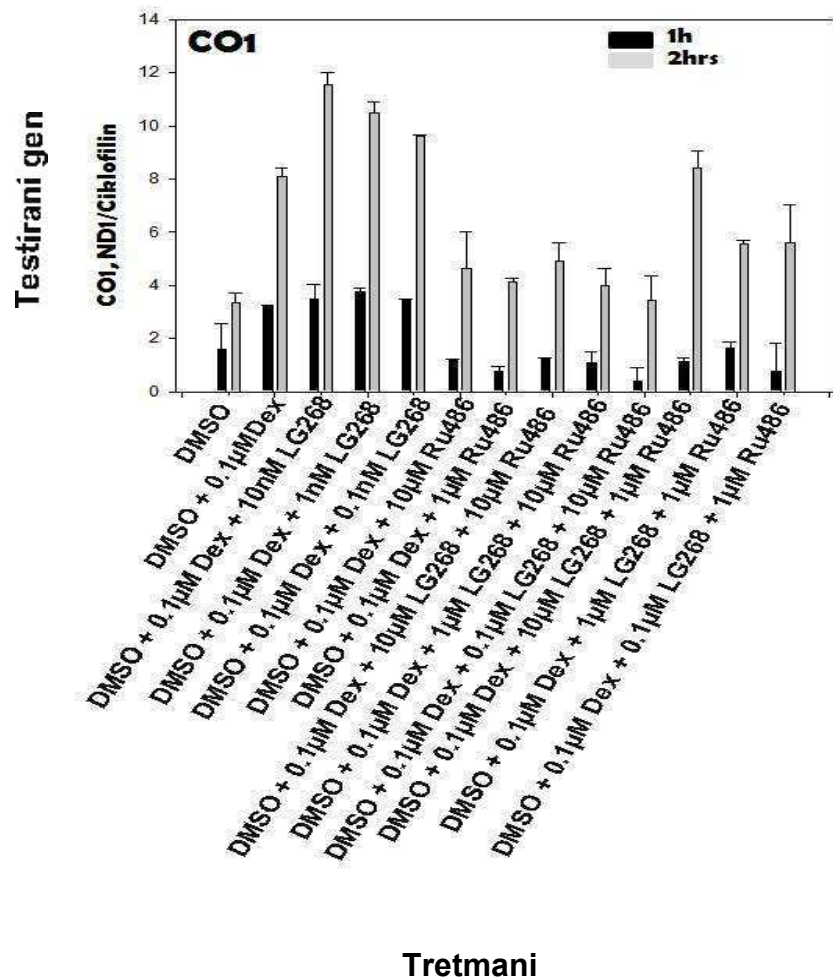
Rezultati ovakve analize pokazali su da uzorci tretirani sa 0.1  $\mu$ M Dex u vremenu od jednog sata, imaju povećanu ekspresiju za CO1 i ND1 gene i to za 1.6 puta veću od ekspresije koju pokazuje kontrola. Za razliku od uzoraka tretiranih samo jedan sat, uzorci sa tretmanom od dva sata pokazuju povećanje ekspresije za 2.7 puta (Slika 6). Kombinacija tretmana sa 0.1  $\mu$ M Dex i 0.3 $\mu$ M, 3 $\mu$ M 9cisRA ili Am580 također pokazuje povećanje ekspresije ovih gena za 2.5 puta za tretmane od jednog sata dok tretmani od dva sata pokazuju povećanje za 3.5 puta. (Slika 6).



Slika 6. Prikaz ekspresije gena za citokrom c - oksidazu I (CO1) i NADH-dehidrogenazu I (ND1) nakon tretmana sa deksametazonom (Dex) i kombinacijom Dex sa 9 – cis retinoidne kiseline (9cisRA) i Am580 u vremenu od jednog i dva sata. Svi uzorci su zatim testirani pomoću inhibitora GR receptora.

Uzorci tretirani sa 10 $\mu$ M Ru486 pokazuju smanjenje ekspresije gena u odnosu na uzorke koji nisu bili dodatno tretirani sa Ru486. Kombinacija tretmana sa 0.3/3 $\mu$ M 9cisRA, 0.1 $\mu$ M Dex i 10 $\mu$ M Ru486 u trajanju od jednog sata pokazuje smanjenje od 2.7 puta dok isti tretmani u vremenu od dva sata pokazuju smanjenje od 1.8 puta (Slika 6). Ekspresija CO1 gena se povećava u uzorcima koji su tretirani sa kombinacijom od 10, 1, 0.1 $\mu$ M LG268 i 0.1 $\mu$ M Dex i to za 2.1 puta u uzorcima od jednog sata te oko 3.2 puta u uzorcima tretiranim dva sata. To povećanje je prikazano u odnosu na kontrolne uzorke. Također se očituje povećanje ekspresije za ND1 gene kod istih tretmana i to za 1.5 puta u jednosatnim tretmanima i 3 puta u dvosatnim tretmanima (Slika 7).



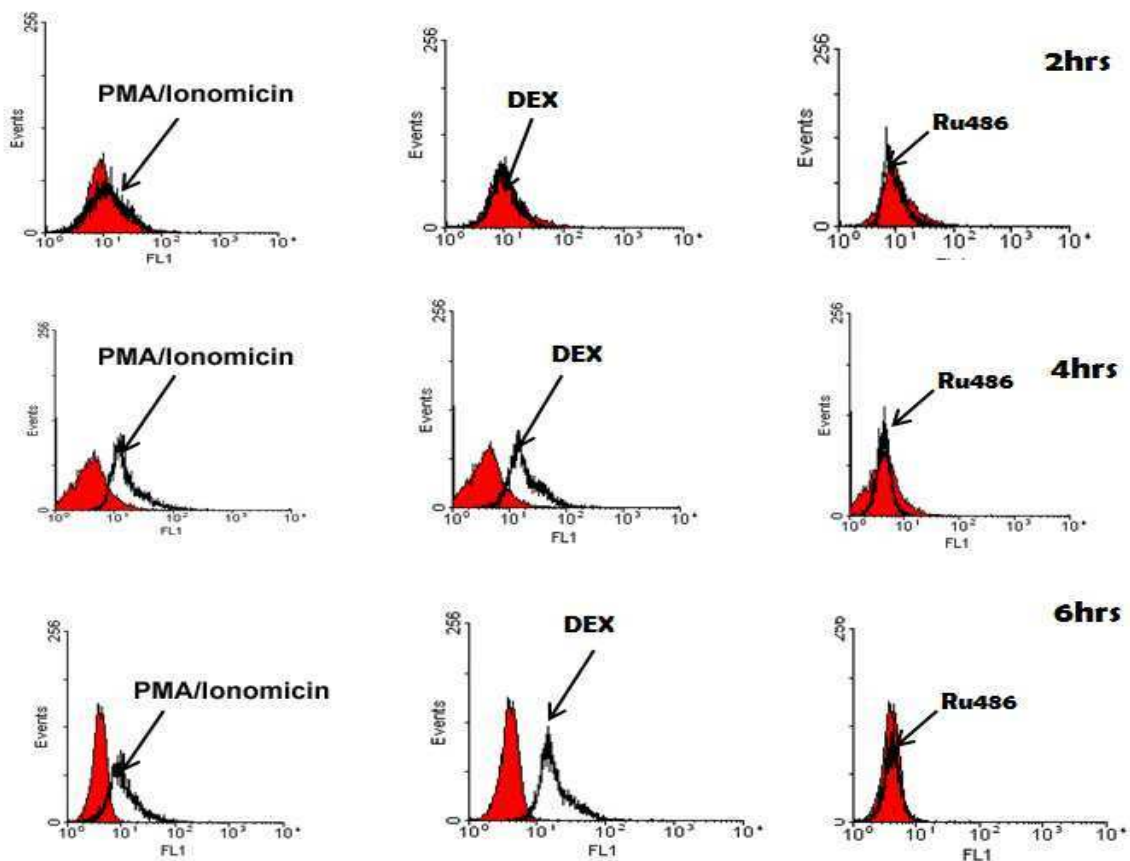


Slika 7. Prikaz ekspresije gena za citokrom c - oksidazu I (CO1) i NADH-dehidrogenazu I (ND1) u uzorcima tretiranim sa deksametazonom (Dex), LG268 i Ru486 u vremenskom razdoblju od jednog i dva sata.

Ista kombinacija tretmana je zatim bila testirana dodatno sa 10 $\mu$ M i 1 $\mu$ M Ru486. Takvi tretmani sa 10 $\mu$ M Ru486 su pokazali smanjenje ekspresije CO1 gena za čak 3.2 puta u vremenu od jednog sata dok su dvosatni tretmani pokazali smanjenje od 2.6 puta, u odnosu na tretmane bez Ru486. Uzorci sa 1 $\mu$ M koncentracijom Ru486 u vremenu od jednog sata pokazuju smanjenje od 2.2 puta dok u vremenu od dva sata to smanjenje je iznosilo 2.5 puta (Slika 7). Iste osobine pokazuju uzorci na kojima je testirana ekspresija ND1 gena. Tako 2.5 puta smanjenje ekspresije pokazuju uzorci tretirani sa koncentracijom od 10 $\mu$ M Ru486 i to u jednosatnom tretmanu dok je u dvosatnom tretmanu ta ekspresija bila 1.6 puta smanjena u odnosu na uzorak bez Ru486. Koncentracija od 1 $\mu$ M Ru486 uspjela je smanjiti ekspresiju ND1 gena za 1.4 puta u vremenu od jednog sata dok je u vremenu od dva sata to smanjenje iznosilo 1.7 puta (Slika 7).

### ***4.3 Protočna citometrija i označavanje Bcl-2 BH3 domene proteina***

Mogu li glukokortikoidi aktivirati BH3 domenu Bcl-2 obitelji proteina te samim time i inducirati apoptozu, bilo je pitanje koje predstavlja jedan od ciljeva ovog diplomskog rada. Kako bi ta hipoteza bila dokazana korištena je metoda protočne citometrije na uzorcima koji su tretirani sa kombinacijom 2.5 ng/ml PMA i 0.5  $\mu$ M/ml ionomicina, tretman 0.1  $\mu$ M deksametazona i tretman sa kombinacijom 0.1  $\mu$ M/ml Dex i 0.1  $\mu$ M/ml Ru486 u inkubacijskim razdobljima od 2, 4 i 6 sati (Slika 8).



Slika 8. Protočna citometrija koja prikazuje utjecaj PMA i ionomicina, deksametazona (Dex) te kombinacije deksametazona (Dex) i Ru486 na označene BH3 domene Bcl-2 proteina. Vidi se utjecaj deksametazona (Dex) u vremenskim razdobljima od 2, 4 i 6 sati.

Kod dvosatnog tretmana niti jedan uzorak nije pokazao promjenu u fluorescenciji u odnosu na kontrolu (crveni graf), te time niti jedan tretman nije uspio aktivirati BH3 domenu. Tretmani deksametazonom i kombinacijom PMA/Ionomicina u vremenu od četiri sata pokazuju povećanje fluorescencije u odnosu na kontrolu dok u istom vremenu uzorak sa kombinacijom deksametazona i Ru486 ne pokazuje takav pomak u fluorescenciji (Slika 8). Takav pomak u fluorescenciji pokazuje povećanu uspješnost označavanja BH3 domene. Također uzorci tretirani šest sati pokazuju isti pomak u fluorescenciji kao i uzorci tretirani četiri sata. Takvi rezultati nam pokazuju da glukokortikoidi mogu aktivirati BH3 domenu i da je takva aktivacija ovisna o dužini izloženosti stanica tretmanu.

## 5 RASPRAVA

Posljednja tri desetljeća napravljen je veliki broj znanstvenih radova na temu molekularnih mehanizama apoptoze (Zhang i sur. 2005). Iako je jako puno radova pokušalo razjasniti ovu pojavu, puno više je nepoznanica koje trebaju dodatno istraživanje. Stoga je i u ovom radu glavni cilj bio pokazati kako glukokortikoidi mogu utjecati na mitohondrijski put aktivacije apoptoze.

Talaber i suradnici (2009.) su pokazali da pod utjecajem glukokortikoida dolazi do premještanja GC receptora u mitohondrije po vezanju liganda. Identičan rezultat je pokazala western blot analiza na timocitima miša, učinjena u svrhu izrade ovog diplomskog rada (Slika 5). Pokazali smo da su mitohondriji, uz jezgru, glavni organeli pomoću kojih glukokortikoidi mogu kontrolirati apoptozu. Također naši su pokusi pokazali da se premještanje događa u vrlo kratkom vremenskom razdoblju te iz toga možemo zaključiti da je aktivacija ovim putem regulirana drugačije od nuklearne aktivacije. I ove spoznaje potvrđuju rezultati Talabera i suradnika (2009.). Također Sionov i suradnici (2006.) pokazuju da premještanje GC receptora u mitohondrije ali ne i u jezgru predstavlja jedan od glavnih mehanizama aktivacije apoptoze kod krvotvornih stanica. Ovakva saznanja imaju veliku važnost kod primjene glukokortikoida u liječenju raznih autoimunih i leukemijskih oboljenja. Retinoidi kao što su 9cisRA također mogu pospješiti premještanje GC receptora u mitohondrije što je također potvrđeno western blot analizom u ovom radu (Slika 5).

Sljedeći cilj istraživanja u ovom diplomskom radu bio je pokazati kako glukokortikoidi i retinoidi utječu na ekspresiju nekih mitohondrijskih gena. Kako bi testirali ovu hipotezu, analiziran je utjecaj glukokortikoida i retinoida na ekspresiju CO1 i ND1 mitohondrijskih gena. Ovi geni kodiraju enzime citokrom c oksidazu I i NADH - dehidrogenazu I, koji imaju važnu ulogu u oksidativnoj fosforilaciji te samim time su važni za normalnu funkciju mitohondrija i sintezu ATP molekula. Koristeći QPCR ili PCR u stvarnom vremenu, ekspresija ovih gena je testirana sa deksametazonom, 9cisRA, Am580, LG268 i Ru486 koji je antagonist za GC u odnosu na njihov receptor (Slike 6 i 7). Dex kao i retinoidi povećavaju ekspresiju testiranih mitohondrijskih gena i to tako da je ekspresija veća što je tretman trajao duže kao što je slučaj kod dvosatnog tretmana uzoraka (Slike 6 i 7). Ovakvi rezultati su potvrdili da se GC receptor može premjestiti u mitohondrije ali da to premještanje može utjecati na aktivaciju apoptoze, preko mitohondrija, na razini gena. Kako bi

dokazali da je do povećanja ekspresije zaista došlo zbog utjecaja glukokortikoida uzorci su testirani i sa Ru486 ili mifepristone koji djeluje kao antagonist glukokortikoidnog receptora. Kako su uzorci tretirani sa Ru486 pokazali smanjenje ekspresije za ova dva testirana gena, možemo zaključiti da se zaista i radi o utjecaju glukokortikoida na ekspresiju mitohondrijskih gena i aktivaciju apoptoze.

Nadalje, da bi dokazali aktivaciju BH3 domene glukokortikoidima upotrijebljena je metoda protočne citometrije i Bcl – 2 BH3 označavanje proteina (Slika 8). Bcl-2 BH3 proteini su pro-apoptotični proteini koji kad su aktivirani prolaze kroz razne konformacijske promijene te na taj način se otkriva BH3 domena ovih proteina (Gross i sur. 1999). Ovakvo izlaganje BH3 domene može se detektirati pomoću specifičnog označavanja ove domene te povećanja u fluorescenciji. Povećanje je dokazano kod uzoraka tretiranih sa Dex i kombinacijom PMA/Ionomicina i to za uzorke tretirane 4 ili 6 sati (Slika 8). Primijenjena kombinacija PMA/Ionomicina se uglavnom koristi za aktivaciju citokina kao što su perforin i IL-2 koji također mogu pospješiti apoptozu. Uzorci tretirani sa Ru486 ne pokazuju povećanje fluorescencije jer je Ru486 inhibirao utjecaj glukokortikoida. Dobiveni rezultati su pokazali da glukokortikoidi mogu aktivirati pro-apoptotične proteine i inducirati apoptozu timocita.

## **6 GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK**

### **6.1 Glavni rezultati**

Ovim radom je dokazano premještanje glukokortikoidnog receptora u mitohondrije, u prisutnosti liganda, a također je dokazano da tome procesu mogu pomoći i retinoidi. Premještanje se dešava u vrlo kratkom vremenu izlaganja što dalje pokazuje da se opisana aktivacija odvija negenskom regulacijom.

Glukokortikoidi povećavaju ekspresiju mitohondrijskih gena, čemu također pridonose retinoidi. Reakcija je ovisna o vremenu izlaganja stanica glukokortikoidima: dulje izlaganje rezultira većom ekspresijom.

Pro-apoptični proteini kao što su proteini koji posjeduju samo BH3 domenu mogu biti aktivirani glukokortikoidima. Aktivacija je također ovisna o vremenu izlaganja stanica.

### **6.2 Zaključak**

Iz ovoga eksperimenta možemo zaključiti da postoji univerzalni mehanizam aktivacije apoptoze kao odgovor stanice na različite aktivatore. Također možemo zaključiti da aktivacija apoptoze osim na razini gena može teći i nekim negenskim putovima. Premještanje GC receptora u mitohondrije je pokazalo da je mitohondrijski put aktivacije drugačije reguliran nego aktivacija koja se odvija preko jezgre.

## 7 LITERATURA

Ashwell JD. i sur. 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. Annual review of Immunology, 18:309 – 345.

Dash Phil. 2007. Apoptosis. Basic Medical Sciences, St.George's, University of London.

Du Jing i sur. 2009. Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function. Communicative & Integrative Biology 2, 350-352. Landes Bioscience.

Gross Atan i sur. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. GENES & DEVELOPMENT 13:1899–1911. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/99.

Marco Rieseberg i sur. 2001. Flow cytometry in biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol, 56:350-360.

Melino Gerry and Vaux David, 2010. Cell death. John Wiley and Sons Ltd. UK. pp. 303.

Sionov Ronit Vogt i sur. 2006. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. JEM © The Rockefeller University Press, 189–201.

Srivastava Rakesh, 2007. Apoptosis, Cell signaling and Human diseases. Volume Molecular Mechanisms. Human Press Totowa, New Jersey. 402 pp.

Strasser Andreas i sur. 2000. Apoptosis signaling. Annu. Rev. Biochem. 69:217–45.

Talaber Gergely i sur. 2009. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. International Immunology 21, pp. 1269–1276.

Toth K. i sur. 2010. Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T-cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Cell death and differentiation*. 1350-9047/10.

Zhang Nu i sur. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Research*, 15:749-769.



## 8 WEB ADRESE

Link 1. <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/receptor.htm>  
- pristup 11.9.2012.

Link 2. <http://it.wikipedia.org/wiki/Bcl-2> - pristup 11.09.2012.

Link 3. <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0327-95452005000200001> – pristup 11.09.2012.

Link 4. [http://www.panomics.com/index.php?id=product\\_94](http://www.panomics.com/index.php?id=product_94) – pristup 11.09.2012.

## 9 TABLICA SKRAĆENICA

PCD	Programmed cell death – programirana stanična smrt
TNF – alfa	Tumor necrosis factor alpha – Tumor nekrotski faktor alfa
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand – TNF vezani aktivator apoptoze
DISC	Death inducing signaling complex – Signalni kompleks smrti
TRADD	TNFR associated protein with death domain – protein povezan sa domenom smrti TNF receptora
FADD	Fas associated protein with death domain – Fas protein povezan sa domenom smrti
AIF	Apoptosis inducing factor – Faktor indukcije apoptoze
PT pora	Permeability transition pore – Propusna transmembranska pora
Apaf 1	Apoptotic protease activating factor 1 – Apoptotični faktor aktivacije kaspaza 1
TCR	T – cell receptor – receptor limfocita T
MHC	Glavni kompleks tkivne podudarnosti
GC	Glukokortikidi
GR	Glukokortikoidni receptor
HSP	Heat shock protein – Proteini toplinskog stresa
DBD	DNA biding domain – DNA vezujuća domena
LBD	Ligand biding domain – Ligand vezujuća domena
GRE	Glucocorticoid responsive element – Element osjetljiv na glukokortikoide
AP – 1	Activator protein 1 – Aktivatorski protein 1