

# Uloga transkripcijskog faktora NRF2 u ekspresiji akvaporina 3 i akvaporina 5

---

**Jerončić, Ana Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:248846>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Josipa Jerončić

**Uloga transkripcijskog faktora NRF2 na  
ekspresiju akvaporina 3 i akvaporina 5**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ana Josipa Jerončić

**The role of NRF2 transcription factor on the  
expression of aquaporin 3 and aquaporin 5**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za membranski transport i signalizaciju na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Ane Čipak Gašparović i neposrednim voditeljstvom Monike Mlinarić, mag. biol. exp. te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta IP-2020-02-3617 (AquaBCaRe) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.).

## ZAHVALE

*Veliku zahvalnost dugujem mentorici dr. sc. Ani Čipak Gašparović na povjerenju, strpljenju i pomoći tokom izrade ovog rada.*

*Izrazito sam zahvalna prof. dr.sc. Nadi Oršolić, na odličnim predavanjima iz mnogih predmeta, kao i pomoći i savjetima prilikom pisanja ovog diplomskoga rada.*

*Veliko hvala i mag.biol.exp. Moniki Mlinarić i svima iz Laboratorija za membranski transport i signalizaciju na njihovoj pomoći i savjetima.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem i cijeloj svojoj obitelji, koja me podržavala tijekom dodiplomskog i diplomskog studija.*

*Zahvaljujem se prijateljicama, Katarini, Karmen i Sari koje su bile uz mene od početka do kraja studiranja, kao i Doris i Nikoli, koji uljepšali svaki dan ovog studija.*

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Dipomski rad

## Uloga transkripcijskog faktora NRF2 na ekspresiju akvaporina 3 i akvaporina 5

Ana Josipa Jerončić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Akvaporin 3 (AQP3) i akvaporin 5 (AQP5) membranski su kanali čija je uloga transport vode i drugih molekula u i van stanice. Često su prekomjerno ekspimirani u brojnim tumorima, uključujući i tumor dojke. Unošenjem molekula poput  $H_2O_2$  utječu na redoks status unutar stanice, rezultirajući u oksidacijskom stresu i posljedično aktivaciji transkripcijskog faktora NRF2. Aktivirani NRF2 ima citoprotektivnu ulogu u zdravim stanicama, dok kod tumorskih stanica dolazi do njegove prekomjerne aktivacije čime stanice postaju otporne na različite vrste terapija. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj NRF2 na ekspresiju AQP3 i AQP5. Korištenjem aktivatora NRF2, sulforafana, i inhibitora NRF2, ML385, praćen je učinak NRF2 na ekspresiju AQP3 i AQP5 na staničnim linijama raka dojke (pozitivne na receptore za estrogen i progesteron - MCF7, pozitivne na receptor HER2 - SkBr3 i trostruko negativnu, bez receptora za HER2, estrogen i progesteron - SUM159) te na ne-tumorskoj liniji epitela dojke (MCF10A). Promjene su zapažene samo kod staničnih linija MCF7, gdje dolazi do povećane ekspresije hem oksigenaze-1 nakon tretmana sulforafanom, sugerirajući aktivaciju NRF2. Kod stanica SkBr3, zapažava se porast ekspresije AQP3 nakon tretmana s ML385. Kod ostalih staničnih linija nije bilo značajnih promjena nakon modulacije NRF2.

**Ključne riječi:** rak dojke, akvaporin, AQP3, AQP5, NRF2, oksidacijski stres

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Mentor:** naslovna doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viša znanstvena suradnica

**Komentor:** redoviti prof. u trajnom zvanju Nada Oršolić

**Ocjenitelji:**

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 05.09.2024.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

### The role of NRF2 transcription factor on the expression of aquaporin 3 and aquaporin 5

Ana Josipa Jerončić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Aquaporin 3 (AQP3) and aquaporin 5 (AQP5) are membrane channels whose role is to facilitate transport of water and other molecules in and out of the cell. They are often overexpressed in numerous cancers, including breast cancer. By transporting molecules like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, they affect the redox status in the cell, resulting in oxidative stress and consequently the activation of the transcription factor NRF2. Activated NRF2 has a cytoprotective role in healthy cells, while in tumor cells its excessive activation occurs, which makes the cells resistant to various types of therapy. The aim of this work was to investigate the relation between NRF2 and AQP3 and AQP5 expression. Using the NRF2 activator - sulforaphane and the NRF2 inhibitor - ML385, the effect of NRF2 on the expression of AQP3 and AQP5 was monitored in breast cancer cell lines (positive for estrogen and progesterone receptors - MCF7, positive for HER2 receptor – SkBr3 and triple negative; negative for HER2, estrogen and progesterone receptors - SUM159) and on a non-tumorigenous epithelial breast line (MCF10A). Changes were observed only in MCF7 cell line, where increased expression of hem oxygenase-1 occurred after treatment with sulforaphane. In SkBr3 cells, changes were observed in AQP3 expression after treatment with ML385. In other cell lines, there were no significant changes after NRF2 modulation.

**Keywords:** breast cancer, aquaporin, AQP3, AQP5, NRF2, oxidative stress

Thesis is deposited in Central Biological Library.

**Mentor:** Ana Čipak Gašparović, PhD, Senior Research Associate

**Co-mentor:** Prof. Nada Oršolić, PhD

**Reviewers:**

Prof. Nada Oršolić, PhD

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted: 05.09.2024.

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Uvod.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Reaktivne kisikove vrste.....                                      | 2         |
| 1.1.1. Izvori ROS-a.....  | 4         |
| 1.2. Prirodni mehanizmi obrane od ROS-a.....                            | 5         |
| 1.2.1. Antioksidansi.....   | 5         |
| 1.2.2. Antioksidacijski enzimi.....                                     | 6         |
| 1.3. Transkripcijski faktor NRF2.....                                   | 7         |
| 1.3.1. Struktura NRF2 i KEAP1 kompleksa.....                            | 7         |
| 1.3.2. Degradacija NRF2 pomoću ubikvitin ligaze.....                    | 10        |
| 1.3.3. Uloga NRF2.....  | 13        |
| 1.3.3.1. NRF2 i rak: dvosjekli mač.....                                 | 17        |
| 1.4. Akvaporini.....  | <b>19</b> |
| 1.4.1. Struktura i ekspresija akvaporina.....                           | 20        |
| 1.4.2. Funkcija akvaporina.....   | 22        |
| 1.4.3. Funkcija akvaporina kod tumorskih stanica.....                   | 23        |
| 1.4.4. Peroksidporini.....  | 25        |
| <b>2. Cilj istraživanja.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>3. Materijali i metode.....</b>                                      | <b>29</b> |
| 3.1. Stanične kulture.....  | 29        |
| 3.2. Test stanične vijabilnosti.....                                    | 30        |
| 3.3. Ekstrakcija nuklearnih i citoplazmatskih proteinskih frakcija..... | 30        |
| 3.4. Izolacija proteina.....  | 31        |
| 3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....       | 32        |
| 3.6. Gel elektroforeza.....   | 32        |
| 3.7. Mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu.....            | 33        |
| 3.8. Izolacija RNA.....   | 34        |
| 3.9. Reverzna transkripcija.....  | 35        |
| 3.10. Lančana reakcija polimerazom.....                                 | 35        |
| 3.11. Gel elektroforeza produkata PCR.....                              | 36        |
| 3.12. Statistička obrada podataka.....                                  | 37        |
| <b>4. Rezultati.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1. Test stanične vijabilnosti.....                                    | 38        |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.      | Analiza ekspresije proteina kod staničnih linija tumora dojke nakon inhibicije i aktivacije                                |           |
| NRF2      | .....  | 40        |
| 4.2.1.    | Utvrđivanje koncentracija sulforafana i ML385 potrebnih za aktivaciju/inhibiciju   |           |
| NRF2      | .....  | 40        |
| 4.2.2.    | Utjecaj tretmana sulforafana i ML385 na staničnim linijama tumora dojke  | 42        |
| 4.2.3.    | Analiza ekspresije gena NRF2, KEAP1, AQP3 i AQP5 u staničnim linijama dojke, nakon tretmana inhibitorom i aktivatorom NRF2 | 51        |
| <b>5.</b> | <b>Rasprava</b>  | <b>58</b> |
| <b>6.</b> | <b>Zaključak</b>   | <b>64</b> |
| <b>7.</b> | <b>Literatura</b>  | <b>65</b> |
| <b>8.</b> | <b>Životopis</b>   | <b>71</b> |

## 1. Uvod

Rak dojke je čest maligni tumor koji pogađa žene sa sve većom stopom učestalosti. Otprilike, 1 od 8 žena će tijekom života dobiti dijagnozu raka dojke. Ova maligna bolest također je i jedna od najčešće dijagnosticiranih tumora na svijetu. U 2020., zabilježeno je otprilike 2,26 milijuna slučajeva i bio je odgovoran za gotovo 685.000 smrtnih slučajeva žena u cijelom svijetu (Wilkinson i Gathani, 2022). Postoje mnoge klasifikacije raka dojke, no najčešća i široko prihvaćena klasifikacija raka dojke je po imunohistokemijskoj analizi određenih biljega. Po navedenoj klasifikaciji, podtipovi obično grupiraju u četiri kategorije: pozitivni na estrogenski receptor (ER+), pozitivni na progesteronski receptor (PR+), pozitivni na receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER2+) i trostruko negativni (engl. *triple negative breast cancer*, TNBC), kojeg karakterizira nedostatak ekspresije bilo kojeg od gore navedenih biljega. TNBC je posebno agresivan, s većom sklonošću metastazama i regionalnim recidivima u usporedbi s drugim podtipovima. Iako je već nekoliko prognostičkih kriterija uvedeno kao pomoć pri liječenju, potreba za molekularnim biljezima omogućuje bolje predviđanje razvoja bolesti, određivanja terapije i sl. (Shaath i sur., 2021).

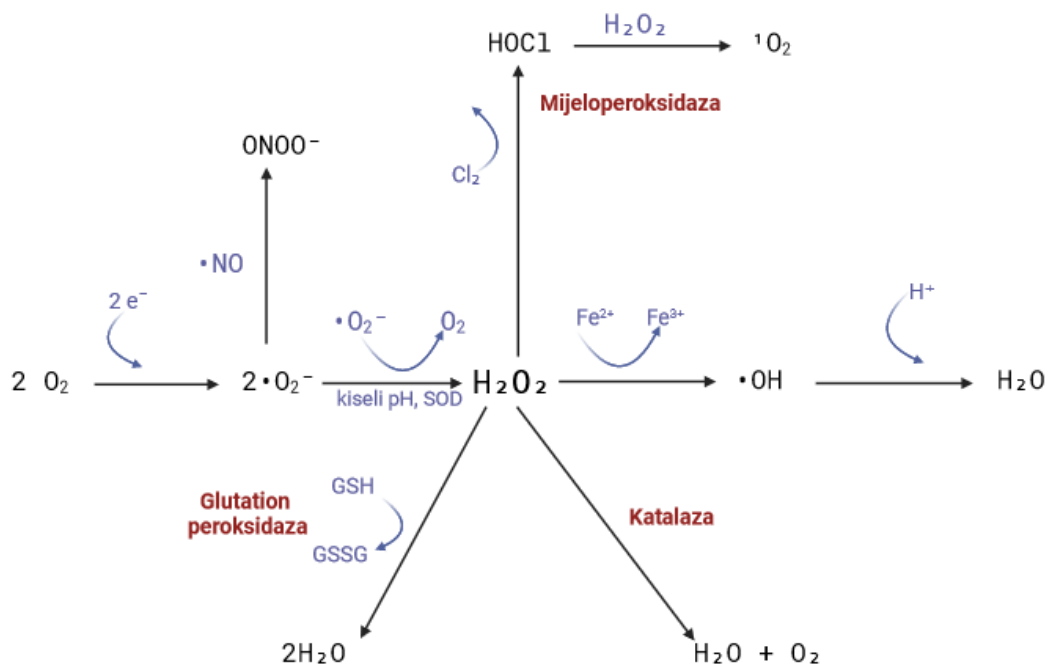
Akvaporini (engl. *aquaporins*, AQP), su proteinska obitelj transmembranskih vodenih pora koji su široko raspoređeni u različitim tkivima u cijelom tijelu. Igraju ključnu ulogu u reguliranju staničnog prijenosa vode, ali i glicerola, uree i drugih molekula. Nastavno na ove funkcije oni posreduju u prijenosu signalnih molekula unutar stanice, indirektno utječući na unutarstaničnu signalizaciju. Osim navedenog, akvaporini mogu omogućiti prolaz nizu različitih malih polarnih molekula, između ostalog i vodikom peroksidu ( $H_2O_2$ ). Obzirom na ulogu, dijelimo ih u tri različite skupine: ortodoksni akvaporini (prenose vodu), S-akvaporini (nalaze se unutar stanice; membrane organela) i akvagliceroporini (prenose glicerol). Važnost provođenja  $H_2O_2$  izražava se u grupiranju AQP u posebnu skupinu: peroksidoporini. Pripadnici ove skupine uključuje akvaporine iz svih inicijalnih skupina (AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11). Zanimljivo je da je ekspresija eroksidoporina povišena u tumorima i povezuju se s malignijim oblicima (Zhu i sur., 2018). Zbog njihove uključenosti u karcinogenezu, progresiju i invaziju tumora, postavljaju se kao potencijalne nove mete antitumorske terapije. Među tim podtipovima se nalaze se AQP3 i AQP5, koji su prekomjerno eksprimirani kod raka želuca, jezika, jetre, debelog crijeva, vrata maternice i kod raka dojke. Visoka ekspresija AQP3 i AQP5 kod raka želuca igra bitnu ulogu i u migraciji i proliferaciji stanica, dok je kod raka pluća prekomjerna ekspresija AQP3 povezana s patološkim stupnjem tumora i kliničkim stadijem. Kod raka dojke također se zamjećuje prekomjerna ekspresija AQP3 i AQP5, čime se postavlja potreba za istraživanjem ove promjene i njihove potencijalne uloge u razvoju bolesti (Zhu i sur., 2018). AQP5 se inače nalazi u raznim epitelnim tkivima, npr. u plućcima, gušterači, žlijezdeama slinovnicama, dok u normalnom epitelu dojke nije eksprimiran. U tkivu raka dojke, prekomjerna ekspresija ovog akvaporina povezuje se s

gubitkom polariteta duktalnih epitelnih stanica i povezana je s naprednim rakom dojke i lošim preživljavanjem oboljelih (Lee i sur., 2014).

Kao što je prethodno opisano, AQP5 sudjeluje u prijenosu  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$ , u optimalnim razinama, u stanici služi kao signalna molekula koja regulira redoks homeostazu stanice. Za održavanje redoks ravnoteže, stanica koristi antioksidacijske molekule koje stupaju u reakciju s  $H_2O_2$  i drugim reaktivnim kisikovim vrstama (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i elektrofilima. U prekomjernim razinama  $H_2O_2$  dolazi do aktivacije oksidacijskog odgovora, točnije do aktivacije transkripcijskog faktora nuklearnog faktora srodnom eritroidnom faktoru 2 (engl. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*, NRF2) koji se nalazi u citoplazmi vezan za svoj negativni regulator. Unutar stanice, protein nalik *Kelchu* povezan s ECH (eng. *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*, KEAP1) vezan je uz NRF2 te potiče njegovu degradaciju. Oksidacijom KEAP1 s  $H_2O_2$  (ili drugim reaktivnim elektrofilom) dolazi do aktivacije transkripcijskog faktora NRF2, njegove translokacije u jezgru i vezanja na specifične sekvence promotora, čime započinje transkripciju antioksidacijskih gena (Rodrigues i sur., 2019). NRF2 sudjeluje u zaštiti stanice od različitih toksičnih utjecaja. Ako je neuravnoteženi redoks status izvan pragova stanične podnošljivosti, može doći do patoloških disfunkcija, kao što je tumorigeneza. Osiguravanjem brze enzimske aktivacije, izlučivanjem kemijskih karcinogena i izvučivanjem ROS-a ili popravkom oksidacijskog oštećenja kroz ekspresiju njegovih ciljnih gena, NRF2 štiti stanicu od karcinogeneze (Rojo De La Vega i sur., 2018). No, stanice raka posjeduju poremećenu redoks homeostazu, zbog raznih mehanizama prilagođavanja uvjetima u kojima se razvijaju, mogu preživjeti visoke razine ROS. Hiperproliferacija tumorskih stanica popraćena je visokom proizvodnjom ROS-a, ali one su prilagođene; povećanjem svog antioksidacijskog statusa optimiziraju proliferaciju potaknutu ROS-om, dok u isto vrijeme izbjegavaju razine ROS-a koji bi potaknuli starenje, apoptozu ili ferroptozu (Hayes i sur., 2020).

### 1.1. Reaktivne kisikove vrste

ROS je skupni pojam koji opisuje kemijske vrste nastale nakon nepotpune redukcije kisika koje su vrlo reaktivne. Ovoj skupini spadaju neutralne molekule ( $H_2O_2$ ), ioni ( $O_2^{\bullet-}$ ) i radikali ( $OH^{\bullet}$ ). Sve navedene kemijske vrste posjeduju slobodni valentni elektron ili nestabilnu kemijsku vezu, čineći ih reaktivnima. Zbog visoke reaktivnosti, lako prelaze iz jednog oblika u drugi spontano ili uz pomoć enzima. Inicijalno, nastaje  $O_2^{\bullet-}$ , koji reakcijom dismutacije prelazi u  $H_2O_2$ , ili reagira s dušikom ( $N$ ) oksidom (NO) stvarajući visoko reaktivni peroksinitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ). Novonastali  $H_2O_2$  se uz pomoć peroksidaze može stvoriti (ili pretvoriti) hipoklornu kiselinu ( $HOCl$ ) ili singletni kisik ( $O_2$ ). Haber-Weiss reakcijom, koristeći metalni ion kao katalizator te nastaju hidroksilni radikali iz  $O_2^{\bullet-}$  ili  $H_2O_2$  (Slika 1., Brieger i sur., 2012).



**Slika 1.** Prikaz visoke reaktivnosti ROS i kemijskih reakcija u kojima sudjeluje. Superoksidni anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) je nestabilan i djelovanjem superoksid dismutaze (SOD) nastaje vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Superoksidni anion reagira s dušikovim oksidom ( $\text{NO}$ ) i tada nastaje peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Singletni kisik ( ${}^1\text{O}_2$ ) nastaje reakcijom hipoklorne kiseline ( $\text{HOCl}$ ) s vodikovim peroksidom. Prilagođeno i preuzeto iz Brieger i sur., 2012. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

Kao što je prethodno navedeno, ROS se ciljano stvaraju za regulaciju raznih fizioloških funkcija u zdravim stanicama. Na staničnoj razini reguliraju rast, apoptozu i druge funkcije. Na razini organizma pridonose regulaciji krvnog tlaka, kognitivnoj funkciji i imunskog odgovora (Vera-Ramirez i sur., 2011). Stoga, primarne funkcije ROS možemo svrstati u 3 dijela: obrana domaćina, stanična signalizacija i biosintetski procesi. ROS omogućuju imunski odgovor te direktno ili indirektno uklanjaju patogene. Također, ROS reguliraju proteine putem redoks osjetljivih aminokiselinskih ostataka kod proteina poput fosfataza, ionskih kanala i transkripcijskih faktora. Oksidacija i redukcija tiolnih proteina smatra se glavnim mehanizmom kojim reaktivni oksidansi integriraju stanične signalne puteve. Proteini s tiolnim aminokiselinama pogodni su kao mete jer su cisteinski ostaci osjetljivi na oksidaciju. Kako bi se zadovoljili kriteriji signalizacije potrebna je preferencijalna oksidacija specifičnih proteina, a proces bi trebao biti brz i reverzibilan (Brieger i sur., 2012).

Zbog svoje visoke reaktivnosti, ROS stupaju u reakciju s različitim molekulama, što predstavlja veliki problem kada u stanici se stvaraju u prekomjernim količinama. Tada reagiraju s lipidima, proteinima i DNA, ostavljajući ireverzibilna oštećenja. Oksidiranjem proteina nastaju netopivi proteinski agregati, koji su osnova neurodegenerativnih bolesti, dok oksidacijom DNA molekule stvaraju se mutacije i promjene u

ekspresiji gena. ROS su također uključeni u stvaranje "krajnjih proizvoda napredne glikozilacije" što je ireverzibilna molekularna promjena (Brieger i sur., 2012).

### 1.1.1. Izvori ROS-a

Određeni ROS-ovi nastaju kao produkti staničnog metabolizma, endogeno. Proizvode se u peroksisomima, tijekom upalnih procesa, a najznačajnija količina proizvodi se u mitohondrijima. Mehanizme proizvodnje ROS dijelimo na dvije skupine: enzimatski i neenzimatski mehanizmi. Enzimatski katalizirane reakcije uključuje enzime poput NADPH oksidaze (NOX). Enzime NOX nalazimo u različitim vrstama stanica, poput endotelnih stanica, adipocita, makrofaga, i sl. (Brieger i sur., 2012). U upalnom stanju neutrofil i makrofagi dolaze kao prva linija obrane domaćina. Tijekom upale, oni povećavaju svoju potrošnju kisika generirajući  $O_2^{\bullet-}$  i  $H_2O_2$ , što nazivamo "oksidativni prasak" čime ostvaruju antimikrobno i tumoricidno djelovanje. Jedan od članova obitelji NADPH oksidaza je enzim NOX2, kojeg nalazimo u fagocitnim stanicama imunog sustava te je zaslužan za omogućavanje navedenih mehanizama. U upalnom procesu sudjeluju i limfociti, koji produciraju ROS koristeći enzime lipooksigenaze i ciklooksigenaze. Citokrom p450, ksantin oksidaza (XO), lipooksigenaze, ciklooksigenaze te metalni ioni kao što su  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  također mogu sudjelovati u katalitičkom stvaranju ROS-a (Brieger i sur., 2012; Sies and Jones, 2020).

Jedan od glavnih izvora ROS-a je stanično disanje. U respiratornom lancu u membranama mitohondrija većina kisika je reducirana citokrom C oksidazom do molekule vode, no mala količina kisika se samo djelomično reducira. Prijenos elektrona na molekularni kisik događa se na respiratornom lancu, na unutarnjoj membrani mitohondrija. Smatra se da 1-2% otpuštenih elektrona sudjeluje u stvaranju superoksidnog aniona, te da su mitohondrijski kompleksi CI i CIII najviše uključeni u stvaranju unutarstaničnog ROS-a (Finkel, 2012; Handy i Loscalzo, 2012). Hrapavi dio endoplazmatskog retikuluma također je odgovoran za proizvodnju ovih reaktivnih metabolita. Uzmimo za primjer flavoenzim ERO1, koji koristi  $O_2$  kao akceptor dva elektrona za generiranje jednog ekvivalenta  $H_2O_2$  (Hecht i sur., 2016).

Superoksidni anion ne prelazi staničnu membranu te ima lokalni i kratkotrajni učinak na stanicu. Zatim, spontano ili katalizirano superoksid dismutazom, prelazi u  $H_2O_2$ . Novonastala molekula je stabilna i lako difundira kroz staničnu membranu (Hecht i sur., 2016). U stanici postoji još nizvodnih reakcija kojima se stvaraju različite vrste ROS-a: u reakciji između dušikovog oksida i superoksida nastaje peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), peroksidaze stvaraju nove vrste korištenjem  $H_2O_2$  kao supstrata, a u Haber-Weissovoj reakciji dolazi do stvaranja hidroksilnih radikala korištenjem  $O_2^-$  kao reagensa (Brieger i sur., 2012; Sies and Jones, 2020).

Egzogeni izvori ROS-a uključuju metabolite koji se unose u stanicu iz vanjskog okoliša. U navedenu skupinu spadaju razni zagađivači; duhan, dim, lijekovi, ksenobiotici, zračenje i sl. Na primjer, djelovanjem ionizacijskog zračenja na stanicu dolazi do radiolize vode, koja čini 70% cjelokupne mase stanice. Navedeni proces dovodi do stvaranja ROS-a, koji zatim oštećuju komponente stanice i dovode do raznih patoloških stanja. Oksidacijski stres također možemo zamijetiti u stanicama nakon izlaganja različitim kancerogenim ksenobioticima, farmaceutskim kemikalijama, i sl. Klorirani spojevi, metalni ioni, zračenje, i određeni spojevi induciraju oksidacijski stres i time oštećenje stanica (Prasad i Dhar, 2014).

## 1.2. Prirodni mehanizmi obrane od ROS-a

Zbog održavanja redoks homeostaze, sprječavanja oksidacijskog stresa te popravka u slučaju istog, stanice su razvile antioksidacijske mehanizme obrane od ROS-a. Antioksidans je molekula koja je sposobna inhibirati oksidaciju drugih molekula, a definiraju se kao tvari koja izravno hvataju ROS ili neizravno djeluju na pojačanu antioksidacijsku obranu ili inhibiciju proizvodnje ROS-a. Ova obrana unutar stanice igra ključnu ulogu u održavanju staničnih funkcija, što se preslikava i na razini organizma (Gulcin, 2020).

Antioksidansi djeluju na više različitih načina: kao blokatori proizvodnje slobodnih radikala, čistači radikala, pretvaranje toksičnih slobodnih radikala u manje toksične tvari, itd.. Na primjer, neki antioksidansi imaju aromatske prstenaste strukture te time mogu delokalizirati nesparene elektrone. Kad je riječ o polifenolnim antioksidansima, oni djeluju na način da doniraju vodik i keliraju metalne ione. Svi ovi obrambeni mehanizmi djeluju zajedno za zaštitu tijela od oksidacijskog stresa. U principu, antioksidacijsku obranu čine antioksidansi i antioksidacijski enzimi (Chahal i sur., 2018).

### 1.2.1. Antioksidansi

Neenzimatski antioksidansi su niskomolekularni spojevi poput vitamina, karotenoida, polifenola i mokraćne kiseline. Vitamin C, tj. L-askorbinska kiselina, je mikronutrijent topiv u vodi. Potreban je za razne biološke funkcije, poput rasta i razvoja, esencijalan je kofaktor za različite enzime, biosintezu karnitina i sl. Također je bitan antioksidans koji štiti stanicu od oksidacijskog stresa i apsorpcije željeza. Djeluje kao „čistač“ ROS-a. Osigurava unutarstanični i izvanstanični antioksidacijski kapacitet vodene faze. Također pretvara slobodne radikale vitamina E natrag u vitamin E. Pokazalo se da se njegove razine u plazmi smanjuju s sa starenjem organizma (Pehlivan, 2017).

Vitamin E je, za razliku od vitamina C, topiv u lipidima. Nalazi se u unutarnjem dijelu stanične membrane gdje služi kao glavna obrana od oštećenja membrane oksidansima.  $\alpha$ -tokoferol je najaktivniji

oblik vitamina E i glavni membranski antioksidans u stanici. Djeluje na način da donira elektron peroksilnom radikalu koji nastaje tijekom peroksidacije lipida. Također pokreće apoptozu stanica raka i inhibira stvaranje slobodnih radikala (Ames, 2018; Birben i sur., 2012).

Glutation (GSH) je vrlo zastupljen u svim staničnim odjeljcima i glavni je topljivi antioksidans. GSH je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Za njegovu sintezu potrebno je uzastopno sudjelovanje dvaju enzima: glutamat cistein ligaze (GCL) i glutation sintetaze (GSS). U prvom koraku, GCL konjugira glutaminsku kiselinu i cistein, proizvodeći  $\gamma$ -glutamil cistein. Ovaj spoj sa sulfhidrilnom skupinom (-SH) odgovoran je za antioksidacijsko djelovanje GSH. Drugi korak je vezanje  $\gamma$ -glutamil cisteina na glicin, čime nastaje GSH. Omjer GSH i njegovog reduciranog oblika (GSSG) je glavna determinanta oksidacijskog stresa. GSH pokazuje svoje antioksidacijske učinke na nekoliko načina: detoksifikacijom  $H_2O_2$ , štiti staničnu membranu od peroksidacije lipida i djeluje kao kofaktor za nekoliko enzima za detoksifikaciju (GPx i transferaza). Također igra bitnu ulogu u pretvaranju vitamina C i vitamina E u njihove aktivne oblike. GSH štiti stanicu od apoptoze interakcijom s proapoptotskim i antiapoptotskim signalnim putovima i regulira i aktivira nekoliko faktora transkripcije, kao što su AP-1, NF-kB i Sp-1 (Birben i sur., 2012).

Karotenoidi su pigmenti koji se nalaze u biljkama te reagiraju s peroksilnim ( $ROO\bullet^-$ ), hidroksilnim ( $OH\bullet^-$ ) i superoksidnim ( $O_2\bullet^-$ ) radikalima. Njihovi prooksidacijski učinci su učinkovitiji pri višim koncentracijama kisika. Karotenoidi, skupa s retinoičnom kiselinom (RA) sposobni su regulirati transkripcijske faktore čime utječu na apoptozu. Ovaj učinak RA uglavnom je posredovan receptorima retinoične kiseline i razlikuje se među vrstama stanica. U stanicama karcinoma dojke, pokazalo se da receptor retinoične kiseline pokreće inhibiciju rasta inducirajući zaustavljanje staničnog ciklusa, apoptozu ili oboje.  $\beta$ -karoten inhibira aktivaciju NF-kB izazvanu oksidansima i proizvodnju interleukina 6 (IL-6) i faktora nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ames, 2018; Birben i sur., 2012).

### 1.2.2. Antioksidacijski enzimi

Superoksid dismutaze (SOD) su enzimi koji kataliziraju reakciju dismutacije  $O_2\bullet^-$  do  $H_2O_2$ . U stanici razlikujemo četiri različita izoenzima koje se razlikuju u svojoj substancijskoj lokaciji i strukturi: SOD1, SOD2, SOD3, SOD4. SOD1 zahtijeva bakar (Cu) i cink (Zn) za svoju aktivnost, SOD2 koristi mangan kao kofaktor i nalazi se u mitohondrijima, dok SOD4 koristi nikel (Ni) za funkciju. SOD3 posjeduje različite fiziološke učinke (Chahal i sur., 2018).

Sljedeći bitni enzim je glutation peroksidaza (GPx). GPx je na prvoj liniji obrane protiv oksidacijskog stresa; prvi je enzim koji se aktivira pod utjecajem visokih razina ROS. Nalazi se u dva oblika: ovisnom o Se i neovisnom o Se. Enzimi se razlikuju u podjedinicama i različitim mjestima aktivnosti. Kod



ljudi postoje četiri izoforme: citosolni i mitohondrijski (GPx1), citosolni (GPx2), izvanstanični (GPx3) i fosfolipidni peroksid (GPx4) (Chahal i sur., 2018). Enzim sadrži selen (Se) na katalitičkom mjestu, a kao donor elektrona koristi glutation (GSH). Enzim katalizira reakciju redukcije  $H_2O_2$  u  $H_2O$ , gdje GSH pretvara u svoj oksidirani oblik, glutation disulfid (GSSG). GPx i GSH smatraju se jednim od najvažnijih spojeva antioksidacijskog obrambenog sustava stanice te imaju poseban značaj u zaštiti višestruko nezasićenih masnih kiselina (Jardim i sur., 2013).

Katalaza (CAT) je enzim s najvećim obrtajnim brojem, a u strukturi sadrži hem. Uglavnom se nalazi u peroksisomima. Katalizira razgradnju  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$ , razgrađuje i peroksinitrit, oksidira dušikov oksid (NO) u dušikov dioksid ( $NO_2$ ) te pokazuje aktivnost peroksidaze kao i oksidaze (Brieger i sur., 2012).

### 1.3. Transkripcijski faktor NRF2

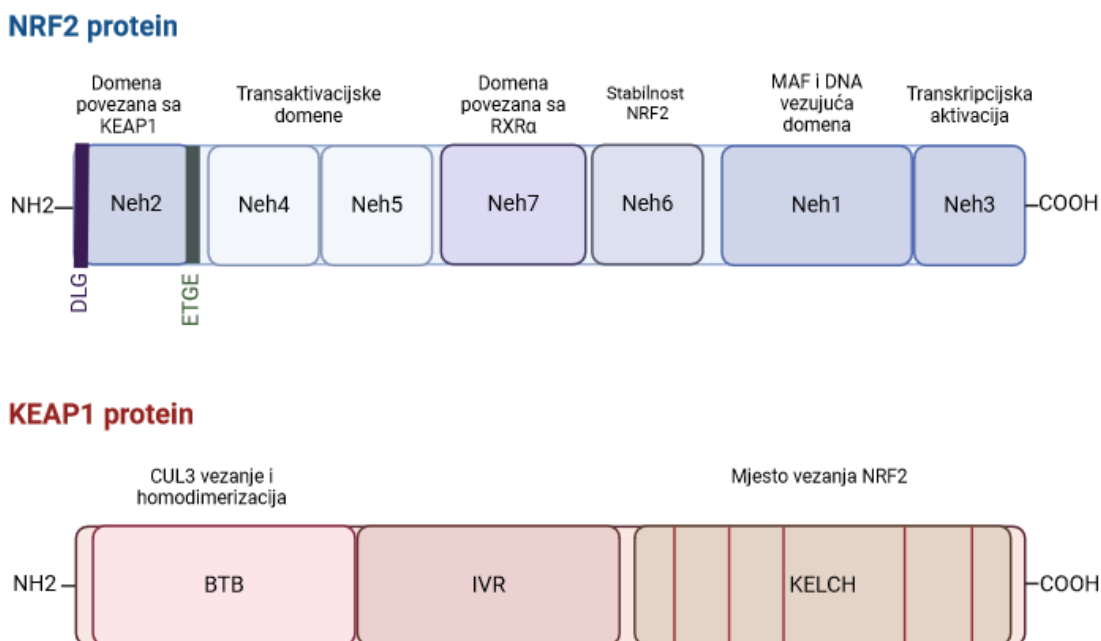
#### 1.3.1. Struktura NRF2 i KEAP1 kompleksa

Kao što je prethodno spomenuto, nuklearni transkripcijski faktor NRF2 najbitniji je regulator genske ekspresije kad je riječ o antioksidacijskoj obrani. NRF2 kontrolira bazalnu i inducibilnu ekspresiju od preko 200 gena heterodimerizacijom s malim proteinima MAF. Ovaj transkripcijski faktor pripada obitelji proteina CNC („*cap and collar*“), koji se ističu zbog homologne domene koja je locirana na N-terminalnom kraju osnovnog leucinskog zatvarača (engl. *basic leucine zipper*, bZIP). NRF2 se veže za  $\beta$ -globinski klaster gena (poput transkripcijskog faktora NF-E2, po kojem je dobio ime). Protein sadrži sedam visoko konzerviranih regija poznatih kao NRF2–ECH homologne (Neh) domene. Domena Neh1 je osnovna domena motiva leucin-zatvarača, bitna za vezanje za DNA i dimerizaciju s drugim transkripcijskim faktorima poput sMAF. Neh2 je domena pomoću koje se veže za KEAP1 i sadrži 7 lizinskih ostataka bitnih za ubikvitinizaciju proteina, a na njoj se razlikuju dva vezujuća motiva: DLG i ETGE. Prvi, DLG, posjeduje tri alfa helične strukture i ima mali afinitet vezanja za KEAP1. Motiv ETGE motiv sadrži jednu  $\beta$ -ukosnicu i ima veći afinitet vezanja za KEAP1, a veže se u principu „šarke i zasuna“. Poremećaj vezanja ova dva proteina, koji se može pojaviti zbog mutacija u motivima DLG i ETGE, dovodi do akumulacije NRF2 i malignog rasta stanica raka (Horie i sur., 2021). Model vezanja kompleksa NRF2 i KEAP1 je dugo proučavan, a danas je prihvaćen i eksperimentalno dokazan model „šarke i zasuna“ (engl. *Hinge-Latch model*). U ovom modelu, konformacijska promjena KEAP1 uzrokuje otpuštanje slabije vezujućeg motiva DLG od kompleksa (engl. *latch*), dok se drugi motiv ETGE još drži za KEAP1 (engl. *hinge*) neovisno o prisutnosti stimulansa koji aktiviraju NRF2 (Baird i Yamamoto, 2020). U stresnim uvjetima u kojima elektrofili i oksidansi aktiviraju staničnu obranu ovisnu o mehanizmima NRF2, novosintetizirani NRF2 nije u mogućnosti vezati se na KEAP1, na kojem je djelomično vezan NRF2, te se translocira u jezgru gdje se



veže na konzerviranu sekvencu elementa antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response element*, ARE). KEAP1, kao protein bogat tiolima, posjeduje najmanje 27 reaktivnih cisteina koji se mogu modificirati pomoću elektrofila što dovodi do njegove inaktivacije. S tim, dolazi do stabilizacije NRF2 i povećanja njegovog životnog vijeka čak do 200 min, omogućujući translokaciju u jezgru i aktivaciju transkripcije citoprotektivnih gena (Loboda i sur., 2008). Domena Neh6 bogata je serinom i također sadrži vezujuće motive za drugi adapterski protein, što će biti opisano u sljedećim poglavljima. Neh3, Neh4 i Neh5 su neovisne transaktivacijske domene, a Neh7 je mjesto vezanja retinoid X receptora  $\alpha$  (Baird i Yamamoto, 2020). Shematski prikaz nalazi se na Slika 2.

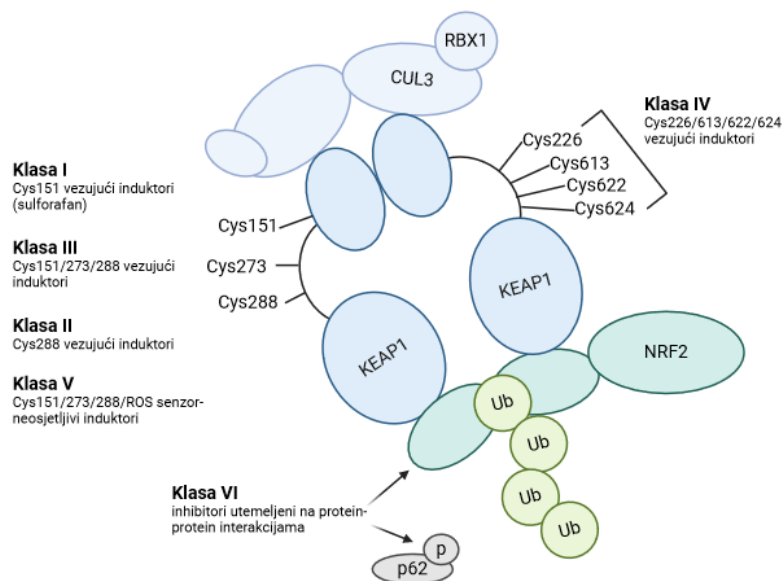
U stanici se NRF2 nalazi u citoplazmi, vezan za negativni regulator njegove aktivnosti, KEAP1. Navedeni protein pripada BTB-*Kelch* obitelji proteina koja se sastoji od otprilike 50 članova. Svi ovi proteini vežu se s *Cullin 3* (CUL3) i *ring-box* proteinom 1 (RBX1) kako bi formirali podjedinice *Cullin-RING* ligaze (CRL) za ubikvitinaciju proteina. KEAP1 ima četiri proteinske domene: N-terminalna domena (engl. *N-terminal region*, NTR), domena BTB (od engl. *Tramtrack* i *Bric-à-Brac*) domena, koja posreduje u homodimerizaciji i vezanju sa CUL3, intervenirajuća regija (engl. *interventing region*, IVR) i šest domena *Kelch* koje se, u spoju s C-terminalnom regijom vežu za NRF2. Shematski prikaz nalazi se na Slika 2.



**Slika 2.** Prikaz domena NRF2 (gore) i KEAP1 (dolje). NRF2 sadrži čak 7 domena bitnih za njegovu funkciju; bilo vezanje za KEAP1 (Neh2) ili transkripcijsku aktivnost (Neh6, Neh1). Kod KEAP1 bitno je istaknuti BTB i IVR domene; mjesta vezanja CUL3 (dio E3 ubikvitin ligaza koompleksa) i domenu Kelch (mjesto vezanja NRF2). Prilagođeno i preuzeto iz Baird i Yamamoto, 2020. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

KEAP1 služi kao senzor za stres unutar stanice. Ovakva funkcija mu je omogućena zbog njegove strukture u kojoj sadrži više od 20 cisteinskih aminokiselinskih ostataka. Sulfhidrilne skupine (SH-) cisteinskih ostataka su jako reaktivne i stupaju u reakciju sa ROS i RNS. Međusobnim vezanjem elektrofilna i SH skupina KEAP1 mijenja svoju konfirmaciju, proteosomska degradacija NRF2 se ne odvija te novosintetizirani protein postaje transkripcijski aktivan (Baird i Yamamoto, 2020; Horie i sur., 2021).

Uz ovaj model, postoji još cijela mreža staničnih senzora ovisnim o tiolima koji kontroliraju bitne aspekte stanične fiziologije. Jedan od bitnijih primjera su tirozin fosfataze koje reguliraju staničnu diferencijaciju i proliferaciju. Na ovaj način omogućena je povezanost redoks statusa stanice i bitnih staničnih fizioloških procesa. Modul NRF2-KEAP1 djeluje kompleksno; drugačiji senzori mogu različito reagirati s različitim cisteinskim ostacima. Individualno, ili u kombinaciji, cisteinski ostaci doprinose cjelokupnoj aktivnosti KEAP1. Ovaj model zovemo „cisteinski kod“, koji reagira drugačije na različite stresore. Na primjer, za prepoznavanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potrebna su čak četiri cisteinska ostatka: Cys226, Cys613, Cys622 i Cys624 i koordinacija navedenih ostataka; pojedinačni cistein ne može inaktivirati KEAP1. Istraživanja otkrivaju da razni induktori oksidacijskog stresa kovalentno modificiraju određene cisteinske ostatke KEAP1: Cys151, Cys 273, Cys288, Cys613 i Cys 226. Navedeni ostaci su lokalizirani blizu bazičnih aminokiselinskih ostataka. S time se stabilizira tiolski anion, što smanjuje pKa cisteinskih ostataka, povećavajući reaktivnost cisteina. Cys 151 je jedan od bitnijih cisteinskih ostataka unutar KEAP1. Nalazi se unutar BTB domene KEAP1, gdje služi kao senzor za razne aktivatore NRF2 poput imidazola, i sulforafana. Cys288 se nalazi unutar IR i osjetljiv je na lipidne medijatore arhadioične kiseline (15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2) (Horie i sur., 2021). Relativna važnost svakog cisteinskog senzora za različite faktore primarno je bila proučavana na zebricama, pa zatim na sisavcima. Proučavanjem cisteinskih senzora otkriveno je da se induktori NRF2 mogu podijeliti na spojeve ovisne o Cys151 i spojeve neovisne o Cys151. S tim, možemo zaključiti da različiti senzori unutar KEAP1 imaju različite fiziološke funkcije kao odgovor na različite induktore oksidacijskog stresa. Danas induktore KEAP1 klasificiramo u šest različitih skupina, od kojih se prvih pet dijele obzirom na cisteinske ostatke s kojima reagiraju, dok je posljednja klasa spojeva uključuje neelektrofilne inhibitore (Baird i Yamamoto, 2020). Shematski prikaz cisteinskih senzora nalazi se na Slika 3.



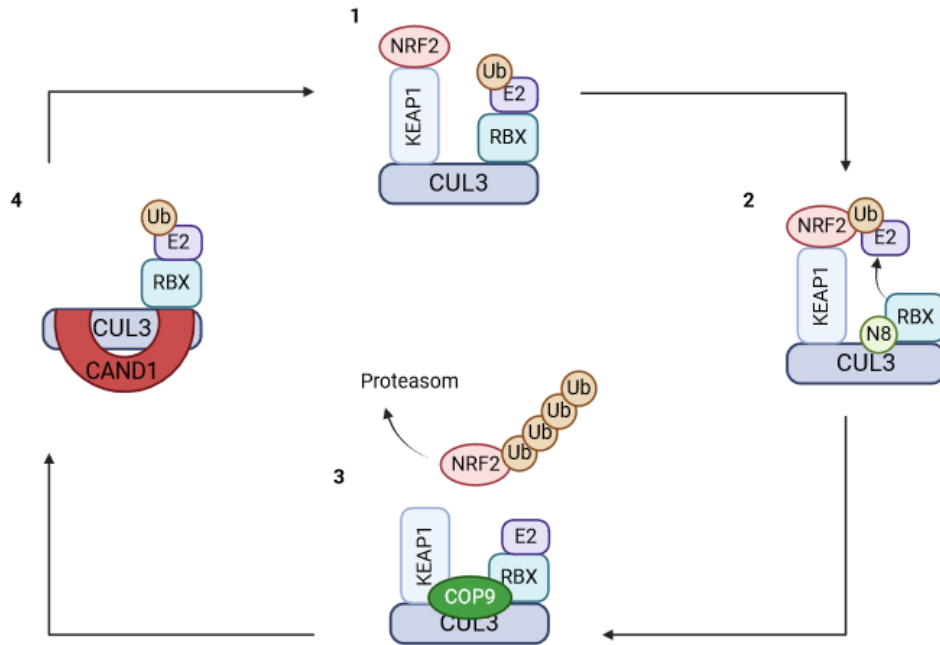
*Slika 3. Klasifikacija induktora NRF2 na temelju njihove specifičnosti za različite unutarnje senzore stresa KEAP1. Induktori aktivnosti NRF2 mogu se podijeliti u pet kategorija na temelju njihovog afiniteta prema senzoru unutar KEAP1. Šesti razred induktora djeluje neovisno o sensorima stresa izravno inhibirajući vezanje NRF2 na KEAP1. Prilagođeno i preuzeto iz Baird i Yamamoto, 2020. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.*

### 1.3.2. Degradacija NRF2 pomoću ubikvitin ligaze

E3 ubikvitin ligaze djeluju kao posljednji korak procesa ubikvitinacije proteina. U prvom koraku, E1 ubikvitin aktivacijski protein formira tioesterske kovalentne veze između svojih cisteinskih ostataka i diglicinskih ostataka ubikvitina. E1 zatim prenosi ubikvitin do katalitički aktivnog cisteina unutar enzima E2 koji veže ubikvitin, formirajući E2 tioesterski kompleks, koji se posljedično veže za E3 ubikvitin ligazu. E3 ubikvitin ligaza vezana za ciljni protein, ima ulogu točnog usmjeravanja ubikvitina na protein. Na taj način, omogućuje se formiranje izopeptidne veze između ubikvitina i amino-skupine unutar lizinskog aminokiselinskog ostatka proteina. Supstrat se dalje dodatno ubikvitinira, stvarajući Lys48-poliubikvitinirani lanac. Jednom kad lanac dosegne određenu dužinu, protein postaje supstrat za degradaciju 26S proteasoma.

U navedenom kompleksu E3 ubikvitin ligaza, KEAP1 funkcionira kao adaptor supstrata, RBX1 se veže za E2 ubikvitin konjugirajući enzim, a CUL3 spaja KEAP1 i RBX1. Posttranslacijska modifikacija proteina CUL3 pomoću proteina NEDD8, što se naziva i nedilacija, stimulira aktivnost kompleksa. Nedilacija izaziva konformacijsku promjenu u kompleksu kulin-RBX1, sprječavajući inhibitorni učinak kulina na RBX1. Ova promjena omogućuje E2 ubikvitinu da premosti udaljenost između njegovog katalitičkog mjesta i ciljnih

lizinskih ostataka unutar supstratnog proteina, ubikvitinizirajući ciljni protein. Kada se iscrpi razina ciljnjog proteina, ligaza bez supstrata se denedilira i inaktivira COP9 signalosomskim kompleksom. Vezanjem CAND1 za CUL3 promovira se stvaranje novih CRL kompleksa za ciljni supstrat. Novi kompleksi tada postaju mete za nedilaciju, ponavljajući ciklus aktivacije CRL-a (Slika 4., Baird i Yamamoto, 2020).



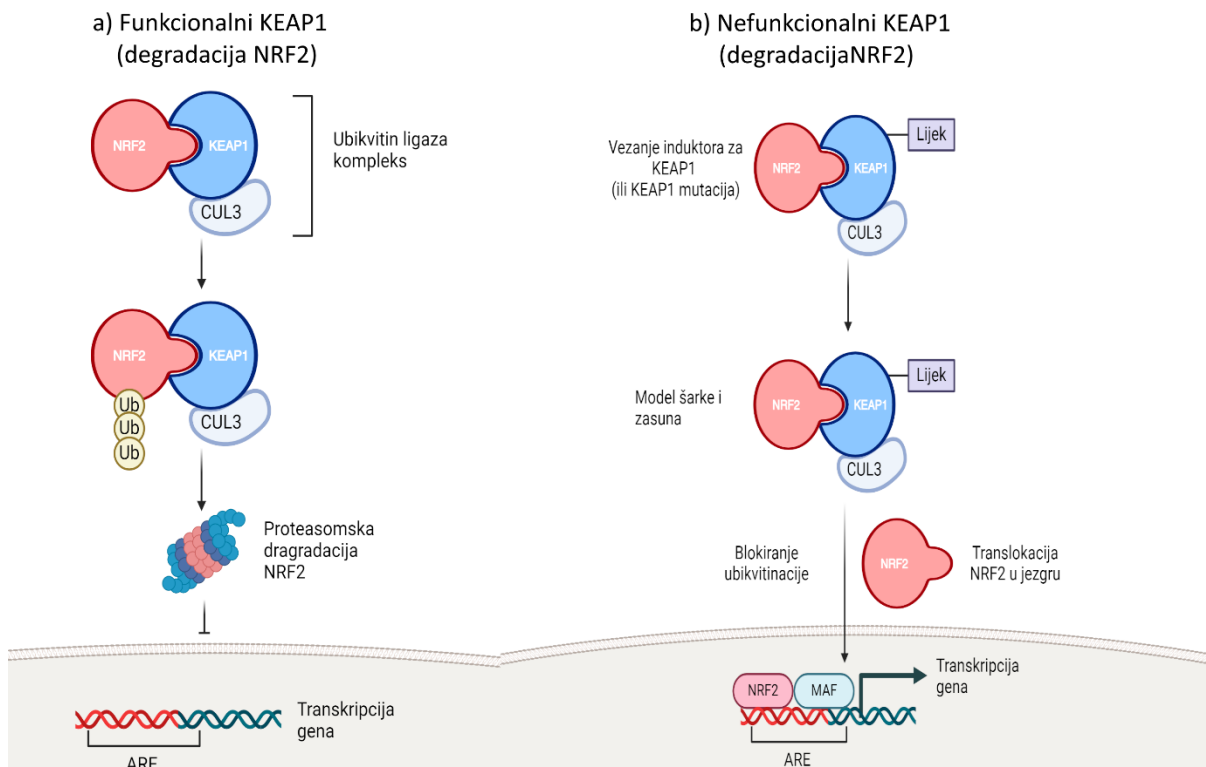
**Slika 4.** Ciklus aktivacije E3 ubikvitin ligaze ili kulin-prsten ligaze. 1) E3 ubikvitin ligaza se sastoji KEAP1, CUL3 i RBX1 veže se i za supstrat, NRF2, i za enzim koji konjugira E2 ubikvitin. 2) Nedilacija CUL3 inducira konformacijsku promjenu u kompleksu, tako da E2 vezan za ubikvitin može prenijeti ubikvitin na akceptorski lizin unutar NRF2. 3) Nakon višestrukih ciklusa ubikvitinacije, poliubikvitinirani NRF2 postaje supstrat za razgradnju u proteasomu. U nedostatku NRF2, E3 ubikvitin ligaza postaje meta za denedilaciju, a time i inaktivaciju, pomoću COP9. 4) Denedilirani CUL3 je tada vezan za CAND1, koji potiče stvaranje novih kompleksa E3 ubikvitin ligaze, a ciklus ubikvitinacije može početi iznova. Prilagođeno i preuzeto iz Baird i Yamamoto, 2020. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

Pod posljednju klasu induktora KEAP1 spadaju protein-protein interakcije (engl. *protein-protein interaction*, PPI) koje imaju sposobnost izravno inhibirati interakciju između KEAP1 i NRF2, a funkcioniraju neovisno o sensorima stresa KEAP1. Jedan od proteina koji reguliraju aktivaciju NRF2 neovisno o oksidacijskom stresu je p62, autofagijski adaptorski protein. Kako p62 posjeduje motiv koji je sličan motivu ETGE u NRF2, u kompeticiji je s NRF2 za vezanje na KEAP1. Prekomjerna ekspresija p62 rezultira značajnim smanjenjem ubikvitinacije NRF2 i pojačanom ekspresijom gena s motivom ARE u promotorskoj regiji.

Uz domenu Neh2 NRF2 (opisanoj gore) postoji još jedna domena za koju je otkriveno da služi kao regulator navedenog proteina: Neh6. Navedena domena je bogata serinom, sadrži dva vezujuća motiva, DSGIS i DSAPGS. Neovisno jedan o drugom, prepoznaju protein s ponavljanjem  $\beta$ -transducina (engl.  *$\beta$ -transducin repeat-containing protein*,  $\beta$ -TrCP). Preko svog motiva *F box*,  $\beta$ -TrCP se veže za kompleks ubikvitin ligaze SKP1-CUL1-RBX1 E3 i provodi ubikvitinaciju NRF2. Fosforilacijom serinskih ostataka Neh6 pomoću kinaze glikogen sintaze-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) olakšava se prepoznavanje domene Neh6 i  $\beta$ -TrCP.

Protein sinoviolin, ili 3-hidroksi-3-metilglutaril reduktaza (SYVN1, HRD1) još je jedna E3 ubikvitin ligaza koja negativno regulira aktivnost NRF2. Povezana s membranom endoplazmatskog retikuluma (ER), a nedavno je identificirana kao negativni regulator tijekom ciroze jetre. Naime, tijekom ciroze jetre dolazi do povećane proizvodnje ROS-a, stresa ER-a, čime dolazi do aktivacije odgovora nesmotanih proteina (engl. *Unfolded Protein Response*, UPR). UPR se aktivira kada se nesmotani proteini akumuliraju u ER, a broj šaperona je nedovoljan za smotavanje svih proteina, pa stoga UPR djeluje na način da smanjuje broj nesmotanih proteina prisutnih u stanici. Signalizacijom preko inozitol-ovisnog proteina IRE1a, dolazi do aktivacije transkripcijskog faktora XBP, koji inducira ekspresiju gena uključenih u degradaciju povezanu s ER. Jedan od produkata ekspresije tih gena je HRD1, koja stupa u interakciju s domenama Neh4-5 NRF2 i posreduje u njegovoj degradaciji pod ER stresom (Rojo De La Vega i sur., 2018).

Brojna istraživanja ukazuju da NRF2 može biti fosforiliran nizom staničnih kinaza. Analizom masene spektrometrije identificirane su česte fosforilacije Ser215, Ser408 i Ser577 unutar NRF2. Međutim, mutacija ovih fosforiliranih ostataka nema gotovo nikakvog utjecaja na stabilnost NRF2 ili transkripcijsku aktivnost, pa je stoga njihov fiziološki značaj trenutačno nejasan. Stoga, ovaj kompleks može biti u interakciji s raznim staničnim signalnim putevima (Rojo De La Vega i sur., 2018). Grafički prikaz inaktiviranog i aktiviranog NRF2 nalazi se na Slika 5.



**Slika 5.** Supresija aktivnosti NRF2 od strane KEAP1 i inhibicija supresije zbog djelovanja lijekova ili mutacija. Regulacija NRF2 ključni je proces u staničnom odgovoru na lijekove ili oksidacijski i elektrofilni stres. a) U osnovnom stanju, u odsutnosti lijekova ili oksidacijskog stresa, NRF2 je poliubikvitiniran sa KEAP1-(CUL3) kompleksom. CUL3 je ubikvitin ligaza, a KEAP1 je adaptor supstrata. Ova poliubikvitilacija rezultira razgradnjom NRF2 pomoću proteasoma. b) Razgradnja NRF2 je blokirana kada KEAP1 postane nefunkcionalan konformacijskom promjenom koja je posljedica vezanja lijeka ili ROS na jedan od reaktivnih cisteinskih ostataka KEAP1, ali i mutacijom KEAP1. Predložena su dva mehanizma za ovu deaktivaciju, naime: proces 'spajanja i pričvršćivanja', što oslabi vezu između NRF2 i KEAP1, ili disocijacija CUL3 od KEAP1. Nakon oksidacijskog/elektrofilno poražaja slobodni NRF2 se translocira u jezgru, gdje postaje transkripcijski aktivan. Ova slika uvelike je pojednostavljen prikaz složenog procesa. Prilagođeno i preuzeto iz Rojo De La Vega i sur., 2018. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

### 1.3.3. Uloga NRF2

NRF2 regulira ekspresiju gena koji sadrže sekvencu 5'-TGACNNNGC-3', koja je poznata kao element antioksidacijskog odgovora (ARE) ili element odgovora elektrofila (engl. *element of electrophilic response*, EpRE). Ciljni geni NRF2 su razni, a tri glavne skupine NRF2 ciljnih gena su geni koji reguliraju metabolizam lijekova i njihovu uklanjanje, geni antioksidacijske zaštite i geni oksidacijskog signaliziranja.

Osim toga, NRF2 regulira proteosomsku razgradnju proteina, staničnu proliferaciju, metaboličko reprogramiranje, metabolizam željeza, metabolizam aminokiselina, autofagiju, popravak DNA i mitohondrijsku fiziologiju (Baird i Yamamoto, 2020).

Na temelju funkcija ovih gena, može se zaključiti da aktivacija NRF2 štiti stanice od raznih stresnih događaja uzrokovanih izlaganjem toksičnim spojevima. Kada je riječ o regulaciji redoks homeostaze unutar stanice, ona se odvija na više načina i različitim mehanizmima. Jedan od tih mehanizama je inhibicija ili indukcija enzima koji utječu na formiranje ROS-a. Na primjer, inhibiranjem inducibilne dušik oksid sintetaze sprječava enzimatsku sintezu NO (Dinkova-Kostova i sur., 2005). NRF2 također kontrolira preko 20 enzima faze I/II/III detoksikacije. Enzimi ovih faza detoksikacije metaboliziraju ksenobiotike u netoksične oblike ili kataliziraju reakcije konjugacije za povećanje topljivosti ksenobiotika, čime se olakšava njihova eliminacija. Primjeri ovakvih enzima su glutation-S-transferaza, NAD(P)H kvinon oksidoreduktaza, UDP-glukuroniltransferaza (Menegon i sur., 2016). Postoji više od 20 citoprotektora enzima 'faze 2' koji su regulirani pomoću NRF2. Također, može utjecati na prijenos lijeka kroz indukciju obitelji gena povezanih s otpornošću na više lijekova (engl. *multidrug resistance genes*, MDR) (Hayes i sur., 2010). Stoga, NRF2 utječe na transkripciju gena čiji su krajnji produkti proteini koji smanjuju razine ROS, ali na gene koji održavaju stanične razine glutationa i tireodoksina poput GPx, tireodoksinreduktaza, glutamatcistein ligaza i sl. (Sporn i Liby, 2012).

Osim uloge u regulaciji ekspresije gena koji smanjuju citotoksičnost kemijskih toksina, NRF2 utječe i na gene vezane uz diferencijaciju i proliferaciju stanica. Naime, mnoga istraživanja ukazuju da stope proliferacije staničnih linija variraju prema statusu *NRF2*, to jest da stanice *NRF2*<sup>-/-</sup> proliferiraju sporije, dok stanice *KEAP1*<sup>-/-</sup> proliferiraju brže. Ovo postiže vezući se za promotore gena poput *NOTCH1*, *VEGFC*, čime regulira proliferaciju stanice (Malhotra i sur., 2010).

Novija istraživanja pronalaze poveznice između NRF2 i signalnih puteva nuklearnog faktora κB (NF-κB), p53, receptora arilnih ugljikovodika (AhR), signalnog puta mTOR te proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*), aktivator proteina 1 (AP1) i dr.. NRF2 također modulira aktivaciju apoptoze. Induciranjem ekspresije BCL-2 I BCL-x1, NRF2 inhibira aktivaciju apoptoze intrizičnim (mitohondrijskim) putem. Aktivacijom ovog puta dolazi do smanjenog oslobađanja citokroma c iz mitohondrija i smanjene aktivacije kaspaze 3/7. S druge strane, apoptoza posredovana receptorima smrti (ekstrinzični put) ovisi o stvaranju ROS-a. Fas receptor je jedan od receptora smrti na površini stanica koji dovodi do apoptoze te se veže za svoj ligand, Fas ligand (FasL) (Rojo De La Vega i sur., 2018).

Također je bitno istaknuti utjecaj p53 na NRF2. Tumorski protein P53, stanični tumorski antigen p53 (TP53) je regulatorni protein čija je uloga očuvanje stabilnosti genoma. Zbog svoje uloge sprječavanja mutacija genoma, često se naziva i „čuvarom genoma“. Osim proteina pune duljine, ljudski gen *TP53* kodira najmanje 12 izoformi proteina koji su ključni u sprječavanju nastanka karcinoma. Kada su razine ROS niske,

p53 aktivira NRF2. Naime, p53 regulira p21, koji se veže na motiv DLG NRF2 inhibirajući razgradnju NRF2. Sukladno tome, NRF2 neizravno aktivira ekspresiju p21 gena, koji se nalazi nizvodno od NOTCH1, ukazujući na pozitivnu povratnu spregu između NRF2 i p21. Kada su razine ROS previsoke, p53 inhibira signaliziranje NRF2 i potiče apoptozu (Rojo De La Vega i sur., 2018).

Hem oksigenaza-1 (HO-1) je jedan od tri izoforme enzima hem oksigenaze. U stanici služi kao protein uključen u antioksidacijske i protuupalne reakcije, ali prisutan je u niskim razinama u većini tkiva sisavaca. Za regulaciju HO-1 su odgovorni: supstrat hema, teški metali, UV zračenje, ROS, modificirani lipidi, faktori rasta i upalni citokini. Uloga navedenog enzima je ograničavanje brzine razgradnje hema u željezo, ugljični monoksid (CO) i biliverdin (Nitti i sur., 2017). Navedeni metaboliti su zaslužni za njegovo citoprotektivno djelovanje. Naime, otpuštanje slobodnog željeza pogoduje sintezi teškog lanca feritina, globularnog proteina koji je važan za unutarstanično pohranjivanje željeza, a vezivanjem željeza održava željezo u topljivom i netoksičnom stanju. Slobodno željezo također sudjeluje u aktivaciji membranskog prijenosnika, Fe-ATPaze, koja omogućava citosolni efluks željeza i tako smanjujući unutarstanični sadržaj Fe<sup>2+</sup>. S tim, sprječava stvaranje ROS Fentonovom reakcijom (opisano gore) (Baker i sur., 2003).

S druge strane, ugljični monoksid ima antiapoptotske i protuupalne učinke. Sudjeluje u angiogenezi, iduciranjem sinteze VEGF i pogoduje proliferaciji endotelnih stanica uključenih u zacjeljivanje rana (Dulak i sur., 2002; Józkowicz i sur., 2003; Loboda i sur., 2008). Ovo omogućava indukcijom enzima poput topive gvanilil ciklaze, enzima koji katalizira sintezu cikličkog gvanozin 3',5'-monofosfata (cGMP) iz gvanozin 5' trifosfata (GTP). cGMP je sekundarni glasnik koji modulira različite nizvodne učinke, uključujući vazodilataciju, fototransdukciju mrežnice, homeostazu kalcija i neurotransmisiju (Hofmann, 2020). CO također modulira put protein kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen activated protein kinase*, MAPK), koji koordinirano regulira ekspresiju gena, mitozu, metabolizam, pokretljivost, preživljavanje, apoptozu i diferencijaciju (Loboda i sur., 2015).

Bilirubin (BR) se sintetizira iz biliverdina (BV) pomoću biliverdin reduktaze (BVR) i ima snažno antioksidacijsko, antiapoptotsko i protuupalno djelovanje. BR omogućava uklanjanje hidroksilnog radikala, singletnog kisika i superoksidnog aniona i sprječava peroksidaciju proteina i lipida. Štoviše, bilirubin ima protuupalne učinke smanjujući ekspresiju P-selektina i E-selektina, sprječavajući migraciju leukocita inhibirajući aktivaciju komponenti komplementa (Nitti i sur., 2017).

Feroptoza je novoopisani oblik stanične smrti koja ovisi o prekomjernom nakupljanju željeza, a uključuje peroksidaciju lipida. Kao što je prethodno opisano, NRF2 regulira gene vezane uz metabolizam željeza i metabolizam lipida. Kontroliranjem ekspresije metalotioneina 1G, feritina i feroportina sprječava se nakupljanje željeza u stanicama. Uz navedne gene, NRF2 regulira i ekspresiju enzima poput, GPX4, enzima uključenih u sintezu glutationa i AKR1C1, koji su uključeni u redukciju lipidnih peroksida koji induciraju feroptozu (Menegon i sur., 2016; Rojo De La Vega i sur., 2018).



NRF2 također ima ulogu u zaštiti stanica od starenja. Kapeta i sur. (2010), u svom istraživanju su uočili da stari fibroblasti imaju nižu ekspresiju NRF2 od „mladih“ fibroblasta. Također otkrivaju da smanjenje aktivacije NRF2 inhibira proliferaciju fibroblasta, skraćuje životni vijek i izaziva prerano starenje. Ovaj utjecaj može se prepisati transkripciji ovisnoj o NRF2, NOTCH1 i MDM2 (mišjeg homologa dvostruke minute 3 engl. *murine double minute 2*, MDM2) (Wakabayashi i sur., 2010; You i sur., 2011). Replikacijom inducirano starenje također je karakterizirano smanjenom aktivnosti proteasoma i smanjenom ekspresijom gena podjedinice proteasoma, koje prati nakupljanje oksidiranih i ubikvitiliranih proteina. Aktivacijom NRF2 povećava se ekspresija nekoliko podjedinica proteasoma, povećavajući njihovu aktivnost, što zauzvrat produljuje životni vijek staničnih kultura ljudskih fibroblasta (Rojo De La Vega i sur., 2018).

NRF2 također regulira ekspresiju gena vezanih za metabolizam aminokiselina. NRF2 kontrolira ekspresiju gena vezanih za metabolizam glutamina: gen za enzim glutaminaze, *ME1*, gena za glutamat-cistein ligazu i gena za glutation sintetazu. Glutaminaza je enzim bitan za razgradnju glutamina u glutamat, omogućavajući stanicama opskrbu za dušikom kojeg koriste za sintezu nukleotida i neesencijalnih aminokiselina. Glutamat se također može razgraditi do  $\alpha$ -ketoglutarata, pomoću krajnjeg produkta *ME1* gena, ili se pak koristi za sintezu glutationa pomoću glutamat-cistein ligaze i glutation sintetaze. NRF2 također kontrolira ekspresija gena biosintetskog puta serina i glicina kroz aktivaciju *ATF4*, koji je i nizvodni gen i vezni gen partner NRF2 (Mitsuishi i sur., 2012).

NRF2 također može i negativno regulirati određene metaboličke procese unutar stanice. Na primjer, NRF2 negativno regulira sintezu masnih kiselina, neizravnim sprječavanjem ekspresije gena za lipogenezu ovisnu o jetrenom X receptoru (engl. *liver X receptor*, LXR). NRF2 također regulira ekspresiju transkripcijskog faktora AhR koji, između ostalog, negativno regulira ekspresiju gena vezanih za diferencijaciju adipocita i inhibira sintezu triglicerida. Promjene lipida uzrokuju učinke koji variraju od promijenjenog metabolizma, signalizacije, promjena u okolišu koje utječu na migraciju, angiogenezu, komunikaciju sa stromalnim stanicama, pa čak i na arhitekturu tkiva. S druge strane, NRF2 stimulira mitohondrijsku oksidaciju masnih kiselina. Iako točan mehanizam još nije poznat, smatra se da NRF2 regulira transkripciju gena za karnitin palmitoiltransferaze, translokazu masnih kiselina, receptor retionoida  $X\alpha$  te peroksismalnog proliferator-aktiviranog receptora gama (PPAR $\gamma$ ) (Popineau i sur., 2016; Rojo De La Vega i sur., 2018).

Uz navedene pozitivne zaštitne učinke NRF2 na stanicu, bitno je spomenuti i supresiju karcinogeneze. Brojna istraživanja *in vivo* i *in vitro* pokazala da aktivacija NRF2 štiti od kemijske karcinogeneze, dok se delecija NRF2 kod miševa povećava tumorigenezu (Ramos-Gomez i sur., 2001). S druge strane, Wang i sur., (2008) su u svom istraživanju otkrili „tamnu stranu NRF2“. Naime, aktivacija NRF2 je loša za pacijente s rakom tijekom kemoterapije jer povećava preživljavanje stanica raka (kao odgovor na kemoterapijske

agense). Uzevši u obzir ova istraživanja postavlja se pitanje kakav utjecaj ovaj transkripcijski faktor ima na stanice raka; ponaša li se kao tumor supresor ili onkogen (Menegon i sur., 2016)?

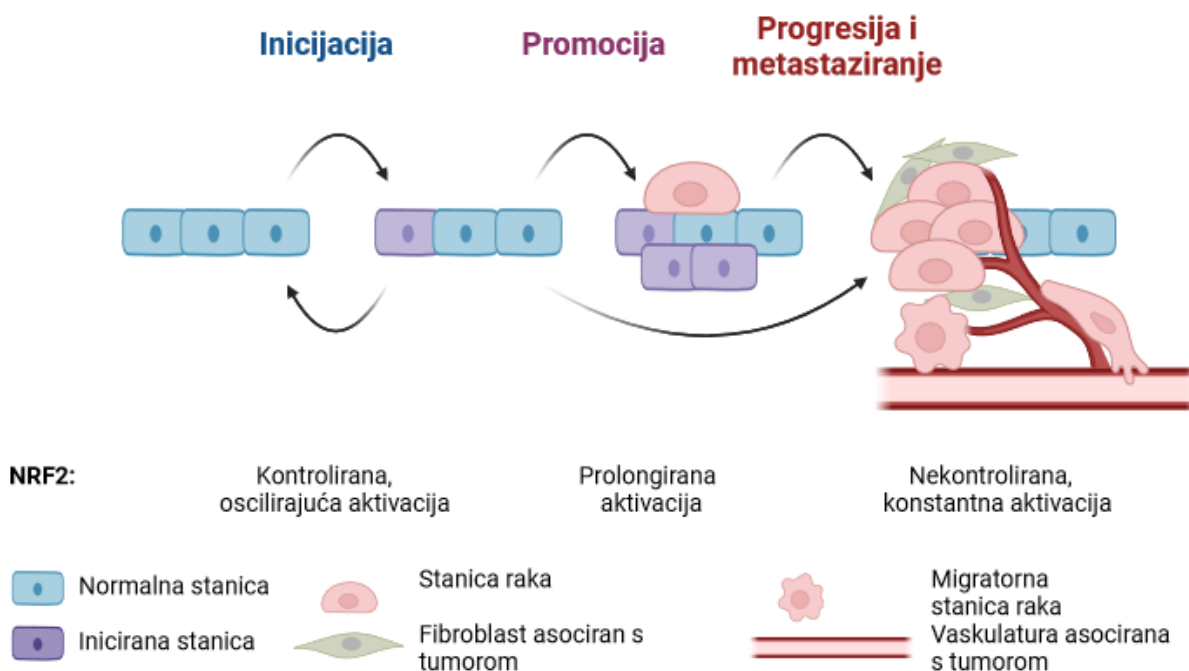
#### 1.3.3.1. NRF2 i rak: dvosjekli mač

Kao što je već prethodno opisano, NRF2 potiče preživljavanje stanica pod stresom, što je poželjno kada je riječ o zdravim stanicama. No, kada je riječ o stanicama raka, povećana aktivnost NRF2 ima negativan učinak jer potiče tumorigenezu. Stanice raka aktiviraju NRF2 kao odgovor na kemoterapiju ili radioterapiju, koje uzrokuju stvaranje ROS-a, opirući se time programiranoj staničnoj smrt (apoptozi). Naime, uloga NRF2 može ovisiti o stadiju tumorigeneze. Maligne stanice karakterizira njihova autonomija i mnogo se razlikuju od displastičnih, ali još ne potpuno neoplastičnih, stanica. Premaligne stanice su pod puno većom kontrolom upalnih stanica i drugih stromalnih stanica u svom mikrokolišu te još nisu dosegle razinu oštećenja DNA potrebnom za autonomnost. Stoga je vremenski kontekst važan kada je riječ o aktivnosti NRF2: aktivnost je poželjna u ranim fazama tumorigeneze, zbog kontrole premalignih stanica, ali je nepoželjna u kasnijim fazama tumorigeneze. Tada, NRF2 djeluje „protiv domaćina“, a pomaže malignim stanicama i čini ih otpornim na liječenje (Sporn i Liby, 2012).

Kao što je prethodno opisano, funkcije NRF2 su razne i sudjeluje u mnogim staničnim fiziološkim procesima, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, popravak oštećenja, upalom i sl. Stoga bi unos molekula koje sudjeluju u signalnim putevima mogao doprinijeti modulaciji ovih procesa. S prekomjernim unosom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO i drugih elektrofila u tumorske stanice dolazi do oksidacijskog stresa, što posljedično utječe na razvoj i progresiju tumora. Sudbina tumora ovisi o aktivaciji čimbenika koji reguliraju oksidacijski stres i o NRF2. Uloga NRF2 u tumorima je vrlo kompleksna i ovisi o progresiji i stadiju tumora; kada je riječ tumorima nižeg gradusa, stanice su osjetljive na oksidacijski stres i pri visokim razinama ROS dolazi do apoptoze (Papadopoulos i Saadoun, 2015; Rojo De La Vega i sur., 2018). Progresijom tumora, on se adaptira na konstantne visoke razine ROS, prekomjerno aktivira NRF2 i NF- $\kappa$ B, omogućujući tumoru preživljavanje i otpornost na razne vrste terapija. ROS također nastaju iz povećanog oksidacijskog metabolizma i hipoksije kod tumora koji se brzo šire. Dodatno, put NRF2 potiče tumorigenezu i neizravno preko fibroblasta povezanih s rakom (engl. *cancer associated fibroblasts*, CAF). Tumorske stanice mijenjaju svoje fibroblaste u CAF da si omoguće stupanje u interakciju s normalnim stanicama u svojem okruženju; podržavanjem rasta tumora. Aktivacijom p62 dolazi do razgradnje KEAP1 i aktivacije NRF2, čime se pojačano transkribira ATF6. Ovo omogućava stanici odgovor na ER stres (opisano gore). U sklopu aktivacije NRF2, stanice raka također imaju povišene razine staničnih antioksidansa poput SOD i GSH, štiteći ih od toksičnih utjecaja ROS-a (Milković i Čipak Gašparović, 2021).

Mutacije koje rezultiraju povećanjem funkcije *NRF2* i mutacije gubitka funkcije *KEAP1* pronađene su u nekoliko ljudskih karcinoma: raku pluća, rak jetre, jajnika i sl. Ove mutacije su uglavnom somatske te dovode do konstitutivne aktivacije puta, povećanja antioksidacijske obrane omogućavajući stanicama raka opstanak (Menegon i sur., 2016). Aktivacijske mutacije *NRF2* povezane su s rakom, iako one nisu tako česte kao druge mutacije. Razlikujemo mutacije koje povećavaju funkcije *NRF2* i mutacije kojima se gubi funkcija *KEAP1*. Navedene mutacije, uglavnom somatske, dovode do prekomjerne ekspresije ili konstitutivne aktivacije signalnog puta *NRF2*, a s tim i do povećanja antioksidacijske obrane stanica raka omogućavajući njihov opstanak. Stanice raka mogu steći otpornost konstitutivnom aktivacijom *NRF2* kroz različite mehanizme: somatskom mutacijom *NRF2*, *KEAP1* ili *CUL3*, epigenetskim utišavanjem *KEAP1*, *CUL3* i *RBX1*, amplifikacijom *NRF2*, delecijom *KEAP1*, *CUL3* ili *RBX1*, onkogenom indukcijom *NRF2*, elektrofilnom adukcijom *KEAP1* i putem kompetitivne interakcije *NRF2* s drugim proteinima ( Zhang i sur., 2010; Kansanen i sur., 2013; Rojo De La Vega i sur., 2018 ).

Onkogeni proteini koji reguliraju proliferaciju, poput *KRAS*, *G12D* ili *MYC*, povećavaju transkripciju *NRF2*. Naime, gen za *NRF2* sadrži element odgovora na 12-*O*-tetradecanoilphorbol-13-acetat, TPA (engl. *TPA response element*, TRE) u svom promotoru. TRE je mjesto vezivanja transkripcijskog faktora AP-1, važnog modulatora stanične proliferacije. Signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K)-AKT također je često dereguliran kod stanica raka, bilo aktivacijom receptorskih tirozin kinaza ili inaktivacijom njegovog represora PTEN. Protein kinaza B, također poznata kao Akt, poveznica je navedenog signalnog puta i *NRF2*. Aktivacijom PI3K-Akt dolazi do inhibicije GSK3 $\beta$ , enzima bitnog za fosforilaciju domene Neh6 *NRF2* (opisano gore) (Rojo De La Vega i sur., 2018).



**Slika 6.** Načini regulacije NRF2 tijekom razvoja raka određuju njegov funkcionalni ishod i utječu na mogućnost terapije. Kontrolirana aktivacija NRF2 u normalnim stanicama sprečava inicijaciju raka i prikladna je za kemoprevenciju raka. Produljena (nekanonska) ili konstitutivna (gubitak regulatornih mehanizama) aktivacija NRF2 sudjeluje u promicanju, progresiji i metastaza jednom kad je došlo do maligne transformacije stanica. Ta tamna strana može se antagonizirati inhibicijom NRF2. Prilagođeno i preuzeto iz Rojo De La Vega i sur., 2018. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

## 1.4. Akvaporini

Kretanje vode u i iz stanice jedan je od najvažnijih bioloških procesa zbog toga jer regulira viskoznost citoplazme, osnova je kretanja stanice i utječe na kinetiku prijenosa signala. Voda prolazi kroz staničnu membranu difuzijom, no zbog spore kinetike procesa i brze promjene volumena stanice, potrebna je regulacija. Ovo omogućuju akvaporini (AQP), membranske pore koje reguliraju protok vode. Broj izoformi akvaporina varira od vrste do vrste, a kod ljudi razlikujemo 13 različitih membranskih kanala (AQP0-AQP12), od kojih svaki posjeduje jedinstvenu strukturu, substaničnu lokaciju i ulogu. AQP mogu uz prijenos vode olakšavati prolaz kroz membranu i drugim supstratima. Obzirom na selektivnost za supstrate, primarnoj strukturi i staničnoj lokalizaciji, dijelimo ih u tri podskupine: ortodoksni AQP, akvaliceroporini i S-akvaporini. Ortodoksni AQP (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8) prenose primarno

vodu, dok su S-akvaporini (AQP11 i AQP12) lokalizirani isključivo unutar stanice, na membranama organela. Akvagliceroporini (AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10) prenose primarno glicerol. Iako je glavno grupiranje razlikuje vodene i gliceroleske kanale, navedeni AQP posjeduju mogućnost prijenosa i drugih malih molekula poput iona, drugih polarnih molekula, plinova, a između ostalog i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zbog važnosti kanaliziranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> razlikujemo i skupinu peroksiporina: AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11. Navedeni peroksiporini povišeni su u tumorima, posebice AQP3, koji je uglavnom povezan s progresijom raka i metastazama (Mlinarić i sur., 2023).

#### 1.4.1. Struktura i ekspresija akvaporina

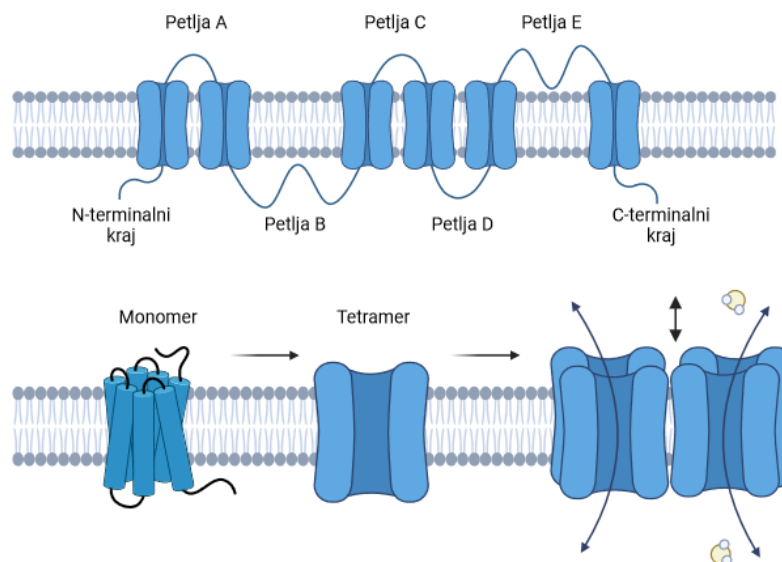
Akvaporini su transmembranski kanali građeni kao tetrameri, u kojem svaki od navedenih monomera ima šest transmembranskih domena povezanih s pet petlji (petlje A-F). Petlja E na izvastaničnoj strani, zajednička je za ortodoksne i akvagliceroporine, bitna je za održavanje strukture te sadrži motiv asparagin-prolin-alanin (NPA). Ovaj motiv, prisutan je i na petlji B sa citoplazmatske strane, također služi kao motiv za održavanje strukture svakog monomera. Svaka od njih tvori pseudo-transmembranski segment. Petlja D regulira prolaz tvari kroz poru. Svaki od AQP monomera je vlastiti kanal, neovisan o drugim monomerima. Centar tetramera čini kanal i bitan je za prijenos plinova i iona. Određene petlje posjeduju svoje regulacijske sekvence, npr. petlja E, koju inhibiraju Hg<sup>+</sup> i tetraetilamonij, dok je petlja D osjetljiva na protonaciju (Slika 7., Milković i Čipak Gašparović, 2021).

Akvaporini se reguliraju na više razina, od transkripcije i translacije do posttranslacijskih modifikacija i regrutacija iz unutarstaničnih zaliha. Dokazano je da je većina AQP regulirana post-translacijski, ili putem regulacije aktivnosti pojedinih AQP-ove, ili promjenom količine AQP prisutnih u plazma membrani. Oba regulatorna procesa upravljana su fosforilacijom, a temelje se na fosforilaciji pojedinačnih monomera. Procesom fosforilacije upravljaju enzimi kinaze i fosfataze i često su tkivno specifični (regulacija na temelju potreba određenog tkiva). Bitno svojstvo ovog regulacijskog mehanizma je sposobnost da bude potpuno reverzibilna, zahvaljujući defosforilirajućoj aktivnosti fosfataza. Fosforilacija funkcionira kao signal, modulirajući afinitet prema regulatornom proteinu, koji izravno utječe na prijenos vode, usmjeravajući tako protein na specifičnu lokalizaciju unutar stanice (Nesverova i Törnroth-Horsefield, 2019; Milković i Čipak Gašparović, 2021 ).

Protein kinaze su ključni regulacijski enzimi koji reverzibilno vežu fosfatnu skupinu na serinske, treoninske i tirozinske aminokiselinske ostatke proteina. Za aktivaciju istih, i one same moraju biti fosforilirane. Kada je riječ o AQP, većinu proteina ove skupine fosforilira član potporodice AGC kinaza, čiji je član i protein kinaza B, također poznata kao Akt. Supstrati potporodice AGC kinaza sadrže bazične

aminokiselinske ostatke poput arginina ili lizina, a nalaze se uzvodno od ostatka koji se fosforilira. Substancična lokalizacija kinaza je ključni faktor koji odlučuje koji će supstrati biti fosforilirani određenom kinazom. Dodavanje fosfatne skupine na protein također utječe i na njegovu strukturu: uzrokuje povećanje volumena i dodavanje negativnog naboja. Ako se fosforilacijsko mjesto nalazi unutar interaktivne površine proteina, izravno onemogućava protein-protein interakcije između AQP i drugih proteina. Dodavanje fosfatne skupine također može pomoći u stvaranju veznog mjesta, čime se povećava afinitet prema regulatornom proteinu, što se uočava kod fosforilacije AQP4. Fosforilacijom se povećava afinitet AQP4 prema AP2 adaptorskom kompleksu, koji zatim veže klatrin, protein koji inicira stvaranje vezikula tijekom endocitoze i igra ključnu ulogu u unutarstaničnom prometu mnogih membranskih proteina. S druge strane, AQP2 zahtijeva fosforilaciju najmanje tri monomera za pozicioniranje na plazma membrani. Regulacija protoka kroz kanal također ovisi i o pH, temperaturi, napetosti membrane, gradijentu otapala i tlaku. AQP5 je visoko izražen u slinovnicama, znojnim, suznim žlijezdama, kao i plućima i dišnim putovima i igra ključnu ulogu u lučenju izotoničnih tekućina. Regulacija AQP5 ovisi u cAMP i protein kinazi A (PKA). Kada je riječ o utjecaju cAMP na AQP5, mora se istaknuti da je bifazan te ovisi o duljini učinka i djelovanju PKA. Razna istraživanja dokazuju da kratkoročni učinak cAMP uzrokuje smanjenje količine membranskog AQP5, dok dugoročni učinak i fosforilacija dvije domene AQP5 od strane PKA rezultira u povećanju razina membranskih AQP5 Ratko Karabasil i sur., 2009; (Kitchen i sur., 2015). Dokazano je da je jedna od navedenih ciljnih domena PKA, S156, povećano fosforilirana u tumorskim stanicama (Nesverova i Törnroth-Horsefield, 2019).

Transkripcijska regulacija je najbolje istražena za AQP3. AQP3 ima nekoliko elemenata odgovora i veznih mjesta za transkripcijske faktore u svojoj promotorskoj regiji: element odgovora na estrogen, element ROR/REV-ERB-odgovor, SP1 mjesto, mjesto FOXO1 (Milković i Čipak Gašparović, 2021; Yde i sur., 2021). U svom istraživanju, Lee i sur., (2021) eksperimentalno su dokazali da FOXO1 može regulirati ekspresiju AQP5 u stanicama žlijezda slinovnica, gdje funkcionira kao transkripcijski faktor i veže se na regiju promotora *AQP5*. U submandibularnim žlijezdama dijabetičkih štakora inzulin pojačava ekspresiju AQP1, AQP5 i AQP8 (Milković i Čipak Gašparović, 2021).



*Slika 7. Prikaz strukture akvaporina. Svaki monomer sastoji se od šest transmembranskih spirala povezanih petljama A do E. Petlje B i E obično nose prepoznatljive motive NPA (asparagin-prolin-alanin) koji se savijaju unutar svake podjedinice kako bi formirali vodenu poru. Četiri monomera tvore tetramer (funkcionalni kanal). Dio AQP-a koristi središnju poru kao zatvoreni ionski kanal. Prilagođeno i preuzeto iz Wang i sur., 2023. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.*

#### 1.4.2. Funkcija akvaporina

AQP su široko rasprostranjeni u ljudskim tkivima; nalazimo ih u stanicama bubrega, mozga, kože, itd. Ovi proteini reguliraju unutarstanične koncentracije glicerola, a posljedično kontroliraju i osmotski tlak. Kontrola unutarstaničnih razina vode i osmotskog tlaka povezuje se s njihovom ulogom u kontroli migracije, proliferacije i adhezije (Papadopoulos i Saadoun, 2015). U stanicama bubrega ekspirira se nekoliko AQP-ova te igraju važnu ulogu u normalnoj funkciji organa. AQP2 se ekspirira na plazma staničnoj membrani epitelnih stanica sabirnog kanala kao odgovor na vazopresin, antidiuretski hormon te se time povećava resorpcija urina u bubrežima. Ljudi s mutacijama AQP2 imaju nefrogeni dijabetes insipidus (Sasaki, 2012; Jung i Kwon, 2016). Nadalje, u koži važnu ulogu igra AQP3 koji se nalazi u rožnatom sloju jednom od slojeva kože. Istraživanja na miševima s delecijom AQP3 otkriven je nedostatak glicerola u koži. Ovo uzrokuje smanjenu hidrataciju kože, elastičnost, sporiji oporavak barijere i zacjeljivanje rana (Bollag i sur., 2020). Kad je riječ o povezanosti AQP i stanične proliferacije, AQP3 pospješuje proliferacijsku stopu bazalnih keratinocita. Miševi AQP3-null miševi imaju lošije zacjeljivanje rana zbog smanjenog sadržaja glicerola i ATP-a (potrebnih za biosintezu) u keratinocitima (Hara-Chikuma i Verkman, 2008). Drugi

akvagliceroporin, AQP7, ima bitnu ulogu u prijenosu vode u adipocitima (Madeira i sur., 2015). Za razliku od nabrojanih uloga akvaporina u fiziološkim procesima, u mozgu su uloga AQP najbolje očitava u patološkim stanjima. Na primjer, u cerebralnoj ishemiji, tumorima mozga, bakterijskom meningitisu i drugim stanjima AQP4 postaje pojačano reguliran u astrocitima i olakšava stvaranje i uklanjanje edema mozga (Mamtilahun i sur., 2019; Behnam i sur., 2022). Kada je riječ o želucu, nisu pronađene bitne uloge AQP niti za normalne funkcije niti u patološkim stanjima (Papadopoulos i Saadoun, 2015). Uloga AQP, specifično AQP4, u međustaničnoj adheziji dobro je utvrđena. Naime, AQP4 sadrži kratku spiralnu vanstaničnu petlju, koja posreduje u slabim interakcijama između molekula AQP4 susjednih membranskih plazma stanica, tako vezujući susjedne stanice. Ekspresija AQP4 u L-stanicama (s nedostatkom endogenih adhezijske molekule) rezultiralo je grupiranju stanica, podupirući hipotezu da AQP4 sudjeluje u staničnoj adheziji (Papadopoulos i Saadoun, 2015). AQP0 je izražen u stanicama leće oka, gdje čini oko 50% proteina stanične membrane vlakana i bitan je za održavanje struktura ključnih za cjelovitost i prozirnost objektiva. U svom istraživanju, Shiels i sur. (2001.) otkrivaju da AQP0 čini ~80% propusnosti za vodu staničnih plazma membrana mišjih leća i da promjene u ekspresiji AQP0 ugrožavaju prozirnost leće. Gubitak AQP0 funkcije dodatno je povezan sa značajnim smanjenjem snage fokusiranja leće u usporedbi s divljim tipom (Shiels i sur., 2001).

### 1.4.3. Funkcija akvaporina kod tumorskih stanica

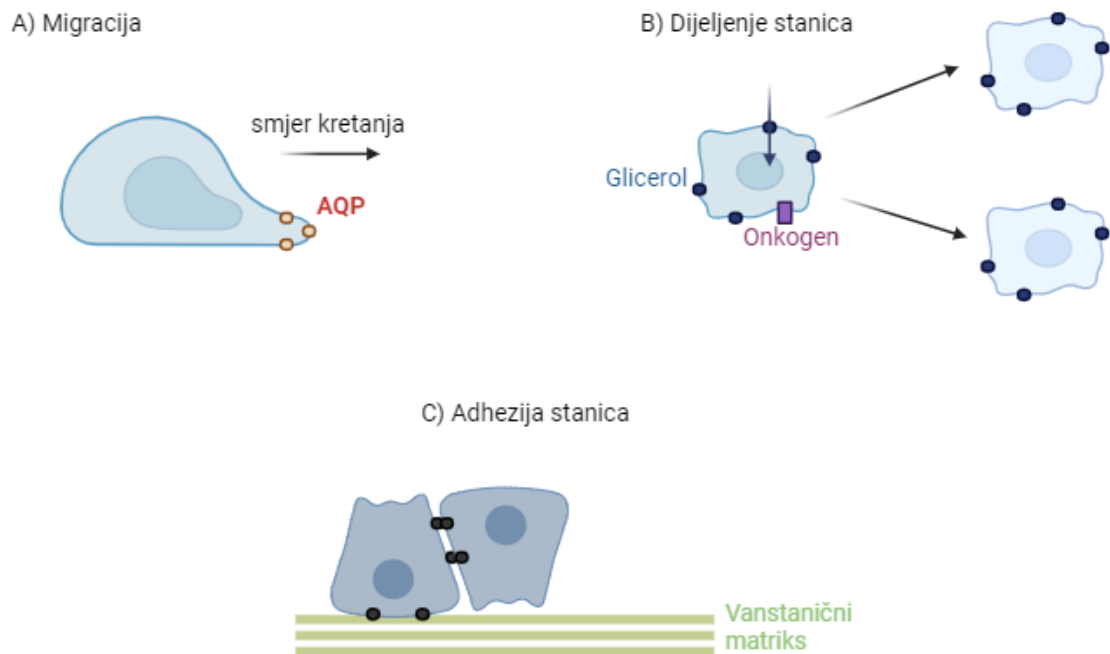
Nekoliko istraživanja ukazuje na ulogu AQP kod tumora. Naime, tumorske stanice prekomjerno ekspimiraju AQP, uključujući one koji se inače nalaze u zdravim stanicama, ali i novoprisućne. Često postoji korelacija između razine ekspresije AQP i gradusa tumora, kao kod difuznog astrocitoma, infiltrirajućeg tumora mozga i tumora epitelnih stanica jajnika (Papadopoulos i Saadoun, 2015).

Danas se zna da ekspresija AQP-a pojačava migraciju stanica prema kemotaktičkim podražajima. Na vodećem dijelu stanice dolazi do gomilanja veće kolićine AQP koji omogućavaju veći protok vode na ovom dijelu stanice, a s time se stvaraju lamelipodiji (spljoštene izboćenja na vodećem kraju migrirajuće stanice). Još jedan mehanizam kojim AQP-ovi mogu olakšati migraciju stanica uključuje polarizaciju AQP. Ova hipoteza se temelji na povećanju citoplazmatske osmolalnosti na prednjem kraju migrirajuće stanice, koja je omogućena zbog de-polimerizacije aktina i ulaska iona (posredovan ionskim prijenosnicima  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  i  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^{3-}$ ). Ionski prijenosnici posreduju u promjenama volumena stanice tijekom migracija lokalnim promjenama razina iona, što povlaći za sobom ulaz vode kroz plazmu membrana na vodećem kraju, stvarajući lokaliziranu „oteklinu“, dok na stražnjem dijelu plazma membrane unutar stanice voda izlazi, uzrokujući lokalizirano skupljanje stanica. Nakon toga slijedi brza ponovna polimerizacija aktina za stabilizaciju izboćine stanićne membrane (**Slika 8.**) (Hu i sur., 2006). Navedenu hipotezu podržava više



istraživanja. Kada je riječ o AQP1, otkriveno je da može biti vrlo brzo mobilan u cijeloj plazma membrani stanice, omogućujući njezinu brzu polarizaciju na vodeći rub migrirajućih stanica (Crane i Verkman, 2008).

Postoje izravni i neizravni dokazi da AQP3 i AQP5 igraju ulogu u proliferaciji tumorskih stanica. AQP5 je također povezan sa proliferacijom stanica raka debelog crijeva, vjerojatno preko interakcije sa signalnim putem Ras (Kang i sur., 2008). Aktivacija Ras uključuje druge proteine koji u konačnici utječu na gene čiji su krajnji produkti uključeni u rast, diferencijaciju i preživljavanje stanica. U svom istraživanju, Zhang i sur. (2010.) dokazali su ulogu AQP5 u proliferaciji i metastaziranju raka pluća, omogućenu preko interakcije između AQP5 i signalnog puta EGFR/ERK/p38 MAPK. Dokazano je da inhibicija AQP1 inhibira proliferaciju i migraciju HT29 stanica, koje inače imaju visoku ekspresiju AQP1. Navedena inhibicija nema utjecaja na HCT116 stanice, s niskom razinom AQP1. Također, pronađena je korelacija visoke ekspresije AQP3 i proliferacije stanica kod stanica raka želuca SGC7901 i MGC803. Kod ovih stanica dolazi do povećane ekspresije AQP3 i AQP1 zbog aktivacije ERK i onkogeno Ras, kao i signalnog puta PI3K/AKT/Snail. S druge strane, u matičnim stanicama raka pluća utišavanje AQP3 uzrokuje regulaciju puta Wnt glikogen sintaze kinaze-3 (GSK-3 $\beta$ )/-katenina, čime dolazi do inhibicije apoptoze i smanjenju diferencijacije stanica raka pluća. Stoga, AQP3 inhibicijom apoptoze i smanjenjem diferencijacije održava malignost stanica raka pluća (**Slika 8.**) (Milković i Čipak Gašparović, 2021).



**Slika 8.** Uloge AQP-a. A) Migracija stanica. AQP se polarizira na vodećem kraju stanice i olakšava stvaranje lamelipodija. B) Proliferacija stanica. AQP može direktno stupiti u interakciju s onkogenima. Također, bitan je za unos glicerola u stanicu, koji je esencijalan za biosintezu lipida. C) Stanična adhezija. Vezanje dva proteina AQP0 ili dva proteina AQP4 na susjednim stanicama povećava adheziju između stanica. Prilagođeno i preuzeto iz Papadopoulos i Saadoun, 2015. Napravljeno pomoću alata BioRender.com.

#### 1.4.4. Peroksidporini

Kao što je prethodno opisano, određeni AQP su propusni i za  $H_2O_2$ . Trenutno zabilježeni akvaporini koji su propusni za navedene reaktivne metabolite su AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11. Elektrokemijska svojstva supstrata, kao što su dipolni moment i raspodjela površinskog naboja, od velike su važnosti za učinkovit prolaz kroz AQP. Nadalje,  $H_2O$  i  $H_2O_2$  imaju gotovo isti dipolni moment, dielektričnu konstantu, molekulski promjer i sposobnost stvaranja vodikovih veza slično vodi. U fiziološkim rasponima pH  $H_2O_2$  posjeduje pKa vrijednosti oko 11 i 16, čineći ga nenabijenim i protoniranim, što je još jedan od preduvjeta za - prijenos posredovan akvaporinima. Ove značajne strukturne sličnosti  $H_2O$  i  $H_2O_2$  predstavljaju fizikalno-kemijsku osnovu za prijenos posredovan AQP (Bienert i Chaumont, 2014). Nadalje,

Henzler i Steudle (2000.) otkrivaju da tretman stanica s  $\text{HgCl}_2$  značajno smanjuje unos obje molekule unutar stanice.

Istraživanje Rodrigues i sur. (2019.) pokazalo je da AQP5 je peroksinorin, ističući ulogu AQP5 u regulaciji unutarstaničnih razina  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Utvrdili su da humani AQP5 olakšava unos  $\text{H}_2\text{O}_2$  u stanice kvasca transformirane humanim AQP5. Ova ekspresija AQP5 povećava osjetljivost kvasca na oksidacijski stres nakon dugotrajnog izlaganja, ali čini stanice otpornijima na kratkotrajni oksidacijski stres, što dokazuje pozitivan doprinos difuzije  $\text{H}_2\text{O}_2$  posredovane AQP5 staničnom rastu i preživljavanju. Ovaj mehanizam se temelji na podešavanju stanične otpornosti na vanjske oksidacijske uvjete, gdje se NOX proizveden  $\text{H}_2\text{O}_2$  preuzima preko AQP-a. Unos  $\text{H}_2\text{O}_2$  rezultira u aktivaciji signalnih puteva koji u konačnici induciraju staničnu proliferaciju i migraciju. Nadalje, i AQP5 i AQP3 pokazali su mjerljivu aktivnost peroksinorina u stanicama raka gušterače (Rodrigues i sur., 2019).

Kao što je prethodno opisano, neke tumorske stanice prekomjerno ekspimiraju AQP. U svom istraživanju Zhu i sur. (2018) otkrivaju da je povećana ko-ekspresija AQP3 i AQP5 povezana s kliničko-patološkim karakteristikama u pacijenata s trostruko negativnim rakom dojke. Osim toga, prekomjerna ekspresija AQP3 povezana je s uznapredovalim stadijem, veličinom tumora, limfnim širenjem i vaskularnoj invazivnosti što ukazuje da bi AQP3 mogao igrati ulogu u tumorskoj angiogenezi, progresiji, invaziji i metastaziranju (Chen i sur., 2014). Druga istraživanja ukazuju da AQP3 i/ili AQP5 potiče epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) putem signalnog puta PI3K/AKT/Snail (Chen i sur., 2014). Zaključno, korelacija pojačane ekspresije AQP s progresijom tumora, upućuje da bi navedeni proteini mogli služiti kao prognostički biljezi (Papadopoulos i Saadoun, 2015).

U genu za AQP3 nedavno je otkriven estrogenski promotor. S ovim, postavlja se poveznica između AQP3 i estrogen pozitivnog raka dojke (Huang i sur., 2015) Funkcija peroksinorina povezana je s regulacijom volumena stanice i eliminacijom ROS-a. Regulacija prolaza  $\text{H}_2\text{O}_2$  u i van stanice od velikog je značaja zbog prethodno spomenutih funkcija navedenog ROS-a, gdje pri višim koncentracijama ima negativan utjecaj na stanicu uzokujući oksidacijski stres. Dolazi do aktivacije NRF2 ili NF- $\kappa$ B kao odgovor, a pri još visokim koncentracijama (>100 nM) dolazi do oštećenja biomolekula (Prata i sur., 2019). Osim toga, nedavni dokazi upućuju na njihovu ključnu ulogu u kanaliziranju  $\text{H}_2\text{O}_2$  proizvedenog putem NOX, kao što je pokazano na modelu stanične linije ljudske akutne mijeloične leukemije. Potvrđena je uska povezanost između AQP3 i  $\text{H}_2\text{O}_2$  sintetiziranog pomoću NOX2. U svom istraživanju, Satooka i Hara-Chikuma (2016) otkrivaju da nakon tretmana s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dolazi do povećanog unosa  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod kontrolnih stanica, u usporedbi s unosom  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod stanica s utišanim AQP3. NOX su izvor  $\text{H}_2\text{O}_2$  u više vrsta tumora pa tako i kod tumora dojke. Stoga, izvanstanični  $\text{H}_2\text{O}_2$  proizveden enzimom NOX2 brzo se prenosi u stanice raka dojke putem AQP3. Potvrđeno je da su NOX usko povezani s razvojem raka, napredovanjem,

proliferacijom i metastaziranjem putem redoks regulacije pozitivne povratne sprege signalizacije PI3K/Akt. Također, unos izvanstaničnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generiranog kao odgovor na kemokine, uključujući CXC motiv kemokin ligand 12 (engl. *CXC motif chemokine ligand 12*, CXCL12), ovisi o prijenosu preko AQP3. Kemokini poput CXCL12 i CXCR4 omogućuju aktivaciju signalnih putova PI3K/Aki ili MAPK, utječući tako na migraciju stanica raka dojke prema plućima (Milković i Čipak Gašparović, 2021).

Iako je prijevise AQP5 minimalno izražen u normalnom tkivu ljudske dojke, uočena je ekspresija AQP5 proteina u benignim tumorima dojke, gdje je AQP5 lokaliziran na apikalnoj membrani duktalnih luminalnih epitelnih stanica. U drugom istraživanju uzoraka tkiva pacijenata s rakom dojke, nađena je povećana ekspresija AQP5 kod pacijenata s metastazama u limfnim čvorovima u usporedbi s pacijentima bez metastaza (Shi i sur., 2012). Također, nađena je povećana ekspresija navedenog proteina kod tumora III gradusa u usporebi s tumorima I i II gradusa. Ova opažanja podupiru hipotezu da AQP5 kod raka dojke korelira sa širenjem u limfne čvorove i lošijom prognozom (Bystrup i sur., 2022). U svom istraživanju, Jung i sur. (2011.) otkrivaju utišavanje AQP5 rezultira značajnim smanjenjem proliferacije stanica raka dojke kod ljudske stanične linije MCF7, a također je utvrđeno da hiperosmotski stres smanjuje ekspresiju AQP5, s čim dolazi do smanjenja proliferacije MCF7 stanica. Nadalje, kod pacijenata s trostruko negativnim rakom dojke primjećuje se da je prekomjerna ekspresija AQP5 u korelaciji s povećanom ekspresijom antigena Kiel 67, također poznatog kao Ki67, biljega proliferacije (Milković i Čipak Gašparović, 2021). Nadalje, AQP5 se veže na domene SH3 c-Src, nerekceptorske citoplazmatske tirozin kinaze povezane s invazivnim i metastatskim fenotipom kod raznih tumora (Jung i sur., 2011).

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je istražiti ulogu NRF2 u moduliranju ekspresije akvaporina AQP3 i AQP5 na staničnim linijama raka dojke pozitivnim na receptore za estrogen i progesteron (MCF7), pozitivnim na receptor HER2 (SkBr3) i trostruko negativnim (SUM159) te na ne-tumorskoj liniji epitela dojke (MCF10A). Koristeći aktivatore i inhibitore NRF2 u različitim koncentracijama, utvrdit će se njihov učinak na vijabilnost stanica raka dojke, ekspresiju proteina i gena *NRF2*, *AQP3* i *AQP5* koristeći tehnike lančane reakcije polimerazom i westernskom metodom otiska (engl. *Western blotting*). Ove spoznaje bi trebale doprinijeti otkrivanju novih molekularnih uvida u napredovanje raka i potencijalnih terapijskih meta u liječenju raka dojke.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Stanične kulture

U radu sam koristila tri humane stanične linije tumora dojke: SUM159 (model trostruko negativnog tumora dojke), MCF-7 (model hormonski pozitivnog tumora dojke), SkBr-3 (model HER2 pozitivnog tumora dojke) i MCF10A, humanu netumorsku liniju epitelnih stanica dojke. Stanice se čuvaju u kriopruvetama na  $-196^{\circ}\text{C}$  u tekućem dušku. Pokuse sa staničnim kulturama radila sam u laminaru u posebnoj prostoriji za rad u sterilnim uvjetima. Za potrebe pokusa, stanice sam izvadila iz tekućeg dušika te ih lagano odmrzavala. Kriopruvete sam otvarala u laminaru. Pri otapanju, suspenziju stanica pomiješala sam s 5 mL medija za uzgoj stanica (DMEM s 10% fetalnim telećim serumom, FCS od engl. *Foetal Calf Serum*, Sigma Aldrich, SAD; dalje u tekstu: medij) za stanične linije SkBr3, MCF7 i SUM159. Za staničnu liniju MCF10A koristila sam poseban medij (DMEM:F12 (Sigma Aldrich) = 1:1, 10% FCS, 20 ng/mL EGF (Peprotech, Velika Britanija), 10  $\mu\text{g/mL}$  Inzulin (Actrapid, Novo Nordisk, Danska), 100 ng/mL Cholera toxin (Sigma Aldrich)). Suspenziju stanica s medijem prebacila sam u staklenu epruvetu te centrifugirala pet minuta na 1300 okretaja u minuti (engl. *rotations per minute*, rpm) u centrifugi Heraeus Function Line Labofuge 400 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Nakon centrifugiranja, supernatant sam izlila te stanicama dodala 1 mL novog, svježeg medija i resuspendirala ih. U bocu za uzgoj staničnih linija dodala sam 9 mL odgovarajućeg medija te prebacila suspenziju u bocu (TC Flask T75, Cell+, Vented Cap, Sarstedt, Njemačka). Stanice su uzgajane u inkubatoru za uzgoj stanica Heraeus Hera Cell (Thermo Fisher Scientific) na  $37^{\circ}\text{C}$  i 5%  $\text{CO}_2$  u vlažnoj atmosferi. Stanice sam ostavila da rastu do eksponencijalne faze rasta (otprilike 48 h) te prije konfluentnosti (faze usporenog rasta) sam ih tripsinizirala (proces odvajanja stanica od podloge). Pri tripsinizaciji, prvo sam izvadila cijeli medij iz boce, dio sam zadržala u sterilnoj staklenoj epruveti kako bi FCS inaktivirao tripsin, a ostatak bacila. Zatim bih stanice isprala s 2 mL pufera PBS-a (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl i 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sve Grammol, Hrvatska), uklonila ga te zatim dodala 2-3 mL tripsina (Sigma Aldrich) s 1% EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Kemika, Hrvatska) i ostavila da djeluje najviše 15 min. Pod mikroskopom sam potvrdila da su se stanice odvojile od površine boce i zaokružile, što označava uspješnu tripsinizaciju. Nakon toga, u bocu sam dodala medij iz epruvete. Suspenziju stanica sam zatim skupila u staklenu epruvetu te centrifugirala pet min na 1300 rpm. Poslije centrifugiranja, supernatant sam bacila te stanicama dodala 1 mL svježeg medija te ih resuspendirala. U svrhu prebrojavanja stanica, uzimala sam 20  $\mu\text{L}$  suspenzije, promiješala ju sa 180  $\mu\text{L}$  tripanskog modrila (ulazi u sve stanice koje izbacuju boju, a mrtve ne te su one plave). Zatim bih dio te suspenzije nanijela na Bürker-Türk-ovoj komoricu, stavila pod invertni mikroskop Axiovert 25 (ZEISS, Njemačka) te izbrojala žive, neobojene stanice. Broj stanica sam računala po sljedećoj formuli:

$$Ukupan\ broj\ stanica = \frac{izbrojane\ stanice}{broj\ polja} \times razrjeđenje \times 250 \text{ (konstanta\ komorice)} \times$$

1000 (da se dobije broj stanica u mL)

Prebrojane stanice sam dalje nasadila u bocu ili upotrijebila za pokus. Višak stanica zamrzнула sam na način da sam talog od 1,5 – 3 milijuna stanica pomiješala s 1 mL medija za zamrzavanje (DMEM:FCS: dimetil sulfoksid (DMSO) = 5:4:1)) (DMSO - Sigma Aldrich) u krioeprevetama. Stanice sam prvo ostavila na parama tekućeg dušika (2- 24 sata), a zatim slijedeći dan spustila u tekući dušik na -196 °C.

### 3.2. Test stanične vijabilnosti

Test stanične vijabilnosti koristila sam da ispitam utjecaj tretmana na preživljavanje stanica. Za mjerenje stanične vijabilnosti koristila sam komercijalni komplet EZ4U (MTT test, Biomedica, Austrija) prema uputama proizvođača. MTT test koristi se kako bismo ustanovili količinu živih stanica nakon tretmana. Test se temelji na redukciji boje 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid, koja lako prolazi kroz staničnu membranu te je žive stanice oksidiraju u mitohondrijima, pri čemu nastaju topivi i žuto obojani derivati formazana koji se izlučuju u medij. Budući da ovu reakciju mogu obavljati samo žive stanice, razvijena boja proporcionalna je njihovom broju. Intenzitet obojenja sam zatim očitavala na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini 450 nm, uz referentnu valnu duljinu 620 nm.

Za navedeni test koristila sam prozirnu mikrotitarsku pločicu od 96 jažica (TPP, Švicarska) te sam nasadivala 10.000 stanica u 100 µL odgovarajućeg medija po jažici. Nakon 24 h od nasadivanja, tretirala sam ih sulforafanom (aktivatorom NRF2), ML385 (inhibitorom NRF2) i dimetil sulfoksidom (DMSO; otapalo u kojem su otopljeni sulforafan i ML385), u rasponu koncentracija 0,1 mM-20 mM. Tretmani sam nanijela u tehničkim tetraplikatima. Učinak tretmana očitavala sam nakon 24 h. Tada bih uklonila sav medij s pločica te u jažice nanijela 200 µL bezbojnog medija čime se sprječava utjecaj fenolnog crvenila na mjerenje apsorbancije te 20 µL reagensa za MTT test, pripremljenog otapanjem tetrazolijeve soli u 2,5 mL pufera. Apsorbanciju sam očitavala na čitaču mikrotitarskih pločica EZRead 2000 (Biochrom Ltd, Velika Britanija) pri valnoj duljini 450 nm, uz referentnu valnu duljinu 620 nm, u vremenskim intervalima od 30 min tijekom dva sata. Intenzitet obojenja je proporcionalan broju živih stanica.

### 3.3. Ekstrakcija nuklearnih i citoplazmatskih proteinskih frakcija

Da bih ispitala utjecaj tretmana sulforafana i ML385 na tri stanične linije tumora dojke, SUM159, SkBr3 i MCF7 i ne-tumorsku staničnu liniju epitela dojke, MCF10A, te odredila potrebnu koncentraciju za aktivaciju tj. inhibiciju NRF2, izolirala sam citoplazmatske i nuklearne proteinske frakcije nakon tretmana

različitih koncentracija sulforafana i ML385. Stanične frakcije sam zatim analizirala metodom westernskog otiska (engl. *Western blotting*), imunohistokemijskom metodom pomoću koje detektiramo i kvantificiramo proteine razdvojene po molekularnoj masi korištenjem antitijela za specifične ciljne proteine.

Nasadila sam 500.000 stanica u 3 mL odgovarajućeg medija po jažici. Stanice sam ostavila u inkubatoru da se prilijepe za podlogu, a nakon 24 h ih tretirala s DMSO, 5 $\mu$ M sulforafanom, 10  $\mu$ M sulforafanom te 5 $\mu$ M i 10  $\mu$ M ML385. Nakon inkubacije od 2 h, stanice bih odvojila od podloge tripsinizacijom, suspenziju premjestila u mikroeprevetu i centrifugirala pet min na 2000 rpm. Sve uzorke držala sam na ledu. Nakon centrifugiranja odvojila sam supernatant od taloga i odstranila ga. Za izdvajanje nuklearnih i citoplazmatskih proteinskih frakcija koristila sam komercijalni komplet NE-PER™ (*Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Fisher Scientific). Stanični talog sam resuspendirala u 100  $\mu$ L hladnog reagensa za ekstrakciju citoplazmatskih frakcija, CER I (engl. *cytoplasmic extraction reagent*). Suspenzije sam snažno vorteksirala 15 sekundi i zatim ih inkubirala na ledu 10 minuta. Nakon toga dodala sam 5,5  $\mu$ L CER II reagensu u suspenziju stanica i vorteksirala 5 sekundi. Uzorak je inkubiran na ledu 1 minutu, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 13.400 rpm, 5 minuta. Supernatant, koji sadrži citoplazmatski ekstrakt, sam prebacila u čistu prethodno ohlađenu eprevetu te je pohranjen na -80 °C.

Netopljivi talog, koji sadrži jezgrine ekstrakte, prvo sam isprala s pola volumena CER I, kako bih uklonila zaostatke citoplazmatskih proteina, ponovno centrifugirala na 13.400 rpm 5 min, a supernatant uklonila i bacila. Talog sam zatim resuspendirala u hladnom reagensu za ekstrakciju nuklearnih frakcija, NER (engl. *nuclear extraction reagent*). Suspenziju sam vorteksirala 15 sekundi, a zatim inkubirala na ledu minuta; postupak sam ponovila četiri puta. Nakon posljednjeg vorteksiranja, uzorke ponovno centrifugiram na 13.400 rpm, 10 min. Supernatant, koji sadrži ekstrakt jezgre, prebacila sam u čistu mikroeprevetu i pohranila na -80 °C.

### 3.4. Izolacija proteina

Kako bih dokazala prisutnost ciljnih proteina, prvo sam izolirala proteine nakon čega sam ih analizirala westernskom metodom otiska, imunohistokemijskom metodom pomoću koje detektiramo i kvantificiramo proteine razdvojene po molekularnoj masi korištenjem antitijela za specifične ciljne proteine. Za izolaciju proteina nasadila sam sve četiri stanične linije u gustoći od 150.000 stanica po 1 mL odgovarajućeg medija na prozirne mikrotitarske pločice s 12 jažica (TPP). Stanica sam ostavila da se prihvate na podlogu te nakon 24 h tretirala sa sulforafanom i ML385, DMSO, u prethodno određenim koncentracijama (5 mM i 10 mM ML385; 1 mM i 2,5 mM sulforafan). DMSO, sulforafan i ML385 sam ostavila da djeluju 24 h, nakon čega sam s pločice uklonila medij, a jažice isprala s 1-2 mL hladnog pufera PBS i uklonila ga. Zatim sam dodala 30  $\mu$ L pufera RIPA (50 mM TRIS-Cl pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% natrijev dodecil sulfat) s 10%-tnim inhibitorom proteaza i fosfataza (Sigma Aldrich) po jažici.



Volumen pufera RIPA podesila sam ovisno o broju stanica. Nakon 10 minuta inkubacije na ledu, jažice sam postrugala sa strugačem, prebacila u mikroepruvete i centrifugirala 134000 rpm u u centrifugi MiniSpin (Eppendorf, Njemačka). Supernatant, u kojem su se nalazili ukupni stanični proteini, izvadila sam iz mikroepruvete i premjestila u novu, označenu mikroepruvetu te pospremila na -80 °C.

### 3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Nakon izolacije proteina, metodom po Bradfordu odredila sam koncentracije proteina u uzorcima. Metoda se temelji na promjeni boje Coomassie brilliant blue iz smeđe u plavu nakon vezanja za amino-skupine proteina. Intenzitet boje ovisi o koncentraciji proteina; što je koncentracija veća, boja je intenzivnija. Kao standard, koristila sam protein goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA, Sigma Aldrich) u rasponu koncentracija (0; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 µg/mL) otopljen u 20% pufera RIPA u puferu PBS-u. Uzorke proteina sam također razrijedila u puferu RIPA u omjeru 1:5. Na prozirnoj mikrotitarskoj pločici s 96 jažica pipetirala sam duplikate svakog standarda i uzorka u volumenu od pet µL. Zatim sam u svaku jažicu sa standardom ili uzorkom ispipetirala 200 µL reagensa za bojanje proteina (BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD) te nakon 5 minuta izmjerila apsorbanciju na čitaču mikrotitarskih pločica (EZRead 2000, Biochrom Ltd.) na valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju proteina u uzorcima izračunala sam metodom linearne regresije koristeći baždarnu krivulju apsorbancije ranije navedenih standarda uz korekciju razrjeđenja. Koncentraciju proteina izrazila sam kao µg proteina po mL otopine.

### 3.6. Gel elektroforeza

Poslije određivanja koncentracija proteina, podesila sam koncentracije tako da sam u svaku jažicu za elektroforezu nanijela jednaku količinu proteina. U mikroepruvetu sam otpipetirala određenu količinu uzorka, 4 µL Laemmli pufera za nanošenje uzoraka (0,01% boje bromfenol plavo (Mochrome, Velika Britanija), 4% SDS (Sigma Aldrich), 125 mM TRIS-HCl (Sigma Aldrich), 150 mM ditiotreitola (engl. *Dithiothreitol*, DTT; Sigma Aldrich), 20% glicerol (Kemika)) te nadopunila do 20 µL puferom PBS. Koristila sam volumen od 20 µL jer je prikladan za nanošenje u gel s češljicom od 12 jažica. Prije nanošenja na gel, uzorke sam zagrijala na 95 °C u uređaju *Mastercycler gradient* (Eppendorf) u trajanju od 5 minuta kako bi se proteini denaturirali.

Nakon što sam pripremila uzorke, pripremila sam aparaturu za elektroforezu. Prislonila sam stakalca jedno uz drugo, s razmaknicom od 1 mm te sam taj par pričvrstila na stalak za izlijevanje gela za elektroforezu. Između njih otpipetirala sam gel za razdvajanje, kojeg sam prethodno pripremila (5,4 mL

reH<sub>2</sub>O, 3,6 mL 30% akrilamid/bisakrilamid (Acryl/Bis) (Carl Roth, Njemačka), 3 mL pufer 1 (1,5 M TRIS (Sigma Aldrich), pH 8,8), 100 µL 10% amonijevog persulfata (engl. *Ammonium persulfate*, APS), (Bio-Rad Laboratories, SAD), 10 µL tetrametiletilendiamin (engl. *Tetramethylethylenediamine*, TEMED) (Carl Roth). Na pripremljeni gel otpipetirala sam etanol (do vrha stakalca) kako kisik ne bi spriječio polimerizaciju i pričekala otprilike 20 min do polimerizacije istog. Nakon polimerizacije, odlila sam etanol s aparature, a stakalca sam posušila filter papirom. Na gel sam zatim otpipetirala gel za sabijanje, pripremljen od 4,35 mL reH<sub>2</sub>O, 1,27 mL 30% Acryl/Bis, 1,87 mL pufer 2 (0,5 M TRIS, pH 6,8), 100 µL 10% APS te na njega odmah stavila češljice, čija je uloga formiranje jažica (za nanos uzoraka). Nakon što se gel polimerizirao, stakla s gelom maknula sam s postolja, stavila u kadicu za elektroforezu te u istu ulila pufer za elektroforezu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 0,1% SDS) tako da je prekrio gela češljice sam pažljivo izvadila. Jažice sam zatim isprala s manjim volumenom pufera za elektroforezu (iz kadice) u svrhu uklanjanja ostataka nepolimeriziranog gela. U prvu jažicu odpipetirala sam 4 µL biljega (Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range (10-250 kDa); Cell Signaling Technology (CST), SAD), a u ostale prethodno pripravljene uzorke (20 µL). U slučaju da je broj uzoraka bio manji od broja slobodnih jažica, u ostale nepopunjene jažice ispipetirala sam 20 µL "blank" uzorka, smjese pufera PBS i Laemmli pufera u omjeru 5:1. Kad sam završila s pipetiranjem, sustav za elektroforezu sam poklopila i priključila na uređaj za električno napajanje (Cleaver Scientific, Velika Britanija), u postavkama uređaja namjestila konstantnu voltažu, 90 V, na vrijeme od 65 minuta. Nakon što bi proteini prešli u gel za razdvajanje, voltažu bih podigla na 105 V do završetka elektroforeze.

### 3.7. Mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Westernska metoda otiska je imunohistokemijska metoda koja služi za dokazivanje specifičnih proteina u uzorku, tj. smjesi proteina, korištenjem specifičnih protutijela za ciljni protein.

Nakon što su se uzorci razvukli na gelu, pripremila sam aparaturu za westernsku metodu otiska, tj. prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Nitroceluloznu membranu Roti®-NC (Carl Roth) stavila sam u kadicu s destiliranom vodom kako bih aktivirala membranu, a zatim ju prenijela u kadicu s puferom za prijenos proteina (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20 % metanol). U veću sam kadicu ulila isti pufer, u kojoj sam složila „sendvič” za prijenos proteina. Navedeni „sendvič” sastoji se od: plastične potporne rešetke, spužvice i filter papira prethodno namočenih u puferu između kojih se stavlja gel i membrana. Kako bi stavila gel u „sendvič“, stakalca sam razdvojila špatulicom polako, odvojila gel za suzbijanje od gela za razdvajanje (na kojem su proteini) te gel za razdvajanje prenijela na filter papir, a na njega sam oprezno stavila nitroceluloznu membranu. Valjkom sam uklonila mjehuriće zraka između gela i membrane, stavila još jedan filter papir, lagano izvaljala, a zatim dodala spužvicu i drugu rešetku. Tako složeni sustav stavila

sam u stalak za prijenos proteina, uložila u kadicu za prijenos proteina te ulila pufer za prijenos proteina (do vrha kadice). Kadicu sam zatim poklopila, prenijela u kutiju od stiropora te je okružila s ledenicama i ledom u svrhu prijenosa proteina na hladnom. Sustav kao takav sam priključila na uređaj za električno napajanje (prethodno opisan) te namjestila konstantnu jačinu struje na 300 mA, na vrijeme od 90 minuta.

Nakon završetka prijenosa proteina na nitroceluloznu membranu, iz kadice sam izlila pufer, otvorila “sendvič” te oprezno izvadila membranu, prenijela je u kadicu s reagensom Ponceau S (Sigma Aldrich) i ostavila tako 5 min (dok se proteini ne obojaju). Membranu sam zatim prenijela na plastičnu foliju te slikala skenerom radi kvantifikacije proteina. Membranu sam zatim stavila u kadicu s 5 % nemasnog mlijeka u prahu (Carl Roth) u TBST-u (50 mM TRIS-Cl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) i inkubirala je sat vremena. Membranu sam zatim isprala s TBST-om, tri puta po 5 min, a nakon toga sam ulila otopinu ciljnog primarnog antitijela (1:200 anti-AQP3 (sc-518001), 1:200 anti-AQP5 (sc-514022) oboje Santa Cruz Biotechnology, SAD; 1:1000 anti-NRF2 (D1Z9C), CST, SAD) ili anti- $\beta$ -aktin (D6A8, CST-8457S, CST) u 5%-tnom nemasnom mlijeku u prahu ili u BSA u TBST-u) te inkubirala preko noći na 4 °C. Sljedeći dan membranu sam isprala TBST-om, tri puta po 5 min, a zatim dodala sekundarno antitijelo (1:2000 anti-zečji IgG-HRP (7074, CST) ili 1:4000 anti-miš IgG-HRP (96714, CST)) i inkubirala 1 sat. Po završetku inkubacije, membrane sam opet isprala TBST-om tri puta po 5 min. Zatim je slijedila inkubacija membrana u luminolu, kemiluminiscencijskom reagensu sa supstratom za hrenovu peroksidazu (engl. *horse radish peroxidase*, HRP), 5 min u mraku. Membrane sam zatim posušila, stavila između dvije plastične folije i slikala na uređaju za oslikavanje Alliance Q9 mini (UVITEC, UK). Dobivene slike sam analizirala pomoću Nine Alliance softvera za analizu. Rezultate analize sam normalizirala koristeći kontrolni, održavateljski tj. *housekeeping* protein,  $\beta$ -aktin i intenzitet obojenja Ponceau S reagensom.

### 3.8. Izolacija RNA

Ukupnu RNA sam izolirala iz uzgojenih stanica pomoću reagensa Trizol. Prvo bih iz jažice uklonila medij, a zatim dodala 300  $\mu$ L reagensa Trizol po jažici. Ostavila bih da djeluje 5 min, a potom pipetrala suspenziju stanica dok se ne homogenizira i premjestila u eppendorf tubicu koju sam držala na ledu. Zatim bih u sadržaj mikroeprevete dodala 60  $\mu$ L kloroforma, promiješala i inkubirala na ledu 10 min. Nakon toga, mikroeprevete sam centrifugirala na 13.400 rpm 15 min, nakon čega bi sadržaj mikroeprevete bio podijeljen u 3 faze: gornji, vodeni dio koji sadrži RNA, srednji dio, interfazni, bijeli; sadržavao je DNA, dok je najdonja, organska faza sadržavala proteine. Iz mikroepreveta sam gornji sloj koji sadrži RNA premjestila u novu, rashlađenu mikroeprevetu. U nove mikroeprevete sam dodala 150  $\mu$ L izopropanola, promiješala i zatim inkubirala na ledu 10 min. Nakon inkubacije centrifugirala sam mikro eppendorf tubice, 13.400 rpm na 10 min. a Na talog sam dodala 300  $\mu$ L 75%-tnog etanola i resuspendirala. Mikroeprevete sam zatim

vorteksirala i centrifugirala na 10.500 rpm 5 min. U sljedećem sam koraku uklonila etanol, a mikroeprovete ostavila otvorene da se talog posuši 5-10 min dok ne postane staklast. Preostali talog sadrži ciljnu RNA koju sam koristila za nadolazeće eksperimente. Nakon sušenja, u mikroeprovetu sam dodala 200  $\mu$ L mqH<sub>2</sub>O, resuspendirala i ostavila u vodenoj kupelji 15 min na 55 °C. Uzorke sam pohranila na -80 °C.

### 3.9. Reverzna transkripcija

Izmjerala sam koncentraciju i čistoću RNA koristeći mikrovolumni spektrofotometar BioDrop DUO (Montreal BioTech, Kanada). Za reverznu transkripciju koristila sam s 1  $\mu$ g ukupne RNAi komplet *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. Reakcijsku smjesu, koja je sadržavala od 10  $\mu$ L RNA, 2  $\mu$ L 10x RT pufera, 2  $\mu$ L 10x RT nasumičnih primera, 0,8  $\mu$ L mješavine 25x dNTP (100 mM), 1  $\mu$ L MultiScribe reverzne transkriptaze i 4,2  $\mu$ L vode bez nukleaze. Nakon pipetiranja, epruvetice sam premjestila u PCR uređaj i povrgnula sljedećim uvjetima: 25 °C na 10 minuta, 37 °C na 120 minuta i 85 °C na 5 minuta; nakon čega su cDNA ohlađene na temperaturu od 4 °C. Krajnji produkt, cDNA, je zatim pohranjena na -20 °C do daljnje upotrebe u daljnjim primjenama kao što je kvantitativna PCR (qPCR) i RNA sekvencioniranje.

### 3.10. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) tehnika je eksponencijalnog umnožavanja fragmenta DNA. Količina amplificirane DNA proporcionalna je početnom broju ciljnih mRNA molekula. Za amplifikaciju DNA koristila sam polimerazu *Taq*, izoliranu iz *Thermus aquaticus*, zbog stabilnosti molekule pri visokim i niskim temperaturama, oligonukleotidne početnice koje su komplementarne slijedu ciljnog gena kojeg želimo umnožiti i slobodne nukleotide (za sintezu novih lanaca). Eksponencijalno umnožavanje DNA kalupa postiže se korištenjem navedene polimeraze, počevši od denaturiranja DNA u dva zasebna lanca zagrijavanjem do temperature 90-95 °C. Hlađenjem reakcije slijedi druga faza PCR-a gdje dolazi do vezanja početnice na molekulu DNA. Treća faza uključuje sintezu DNA pomoću polimeraze na mjestima gdje su se početnice vezale u smjeru 5'-3' (J.M. Wages Jr., 2005.).

MasterMix sam pripremila na sljedeći način: 7,75  $\mu$ L nukleotida, 15,5  $\mu$ L „forward“ početnice, 15,5  $\mu$ L početnice „reverse“, 1,55  $\mu$ L DNA polimeraze, 292,2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O i 38,75  $\mu$ L pufera. Početnice su se razlikovale ovisno o genima koje smo htjeli umnožiti, stoga koristila sam odgovarajuće početnice za: *NRF2*, *AQP3*, *AQP5*, *KEAP1*, *HPRT* (kontrola, održavateljski gen) (Tablica 1). Termalni ciklus programiran je na 90 s na 95 °C za početnu denaturaciju, nakon čega slijedi 27 ciklusa na 95 °C za denaturaciju, 30 s na 60 °C za prekaljivanje, 90s na 72 °C za produženje i 2 min na 72 °C za konačno produljenje. Programi su se razlikovali ovisno o genima koje smo umnažali; opisani su u tablici ispod.

*Tablica 1. Programi korišteni za umožavanje fragmenata cDNA tehnikom PCR.*

| Početnice     | Program   |
|---------------|---|
| <i>NRF2</i>   | 27 ciklusa denaturacije, prekaljivanje 60 °C, 2min elongacija |
| <i>AQP3</i>   | 20 ciklusa denaturacije, prekaljivanje 60 °C, 2min elongacija |
| <i>AQP5</i>   | 20 ciklusa denaturacije, prekaljivanje 60 °C, 2min elongacija |
| <i>HPRT-1</i> | 20 ciklusa denaturacije, prekaljivanje 60 °C, 2min elongacija |
| <i>KEAPI</i>  | 27 ciklusa denaturacije, prekaljivanje 60 °C, 2min elongacija |

### 3.11. Gel elektroforeza produkata PCR

Produkte PCR analizirala sam elektroforezom. Napravila sam 1,5%-tni agarozni gel na način da sam pomiješala 0,525 g agaroze, 35 mL TBE pufera te zagrijala navedenu smjesu do vrenja. Miješanjem sam hladila otopinu te kada se temperatura malo snizila otpipetirala sam 175 µL *GelGreen DNA gel stain* reagens za bojanje DNA (200 x razrjeđenje) i 3,5 µL otopine NaClOH (1000 x razrjeđenje). Gel sam izlila u kalup za formiranje gela te stavila češljice za formiranje jažica. Nakon otprilike 20 min gel se polimerizirao te sam ga zatim izvadila iz kalupa i premjestila u kadicu za elektroforezu. Kadicu sam napunila puferom za elektroforezu. Polako sam izvukla sam češljic i u prvu jažicu stavila 2 µL DNA biljega, a 8 µL uzoraka, koje sam pripremila tako da sam pomiješala 2 µL reagensa za bojanje i 6 µL uzorka, resuspendirala stavila u ostale slobodne jažice za elektroforezu. priključila na uređaj za električno napajanje (Clever Scientific), u postavkama uređaja namjestila konstantnu voltažu, 105 V, na vrijeme od 30 minuta. Gelove sam zatim vizualizirala u uređaju *Alliance XD-79LS-26MX*. Dobivene slike sam analizirala pomoću softvera *Nine Alliance* za analizu. Rezultate analize sam normalizirala koristeći održavateljski, tj. „housekeeping“ gen, hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferazu (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, HPRT). Relativna kvantifikacija ekspresija gena određena je normalizacijom prema kontroli.

### 3.12. Statistička obrada podataka

Eksperimenti su izvođeni u biološkim i tehničkim triplikatima. Statističku obradu podataka i grafičke prikaze napravila sam koristeći program GraphPad Prism 10.0. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata sa standardnom devijacijom, u odnosu na kontrolu. Za statističku obradu rezultata koristila sam dvosmjernu analizu varijance (engl. *Two-way ANOVA*), a vrijednost  $P < 0,05$  označava statistički značajne vrijednosti.

## 4. Rezultati

### 4.1. Test stanične vijabilnosti

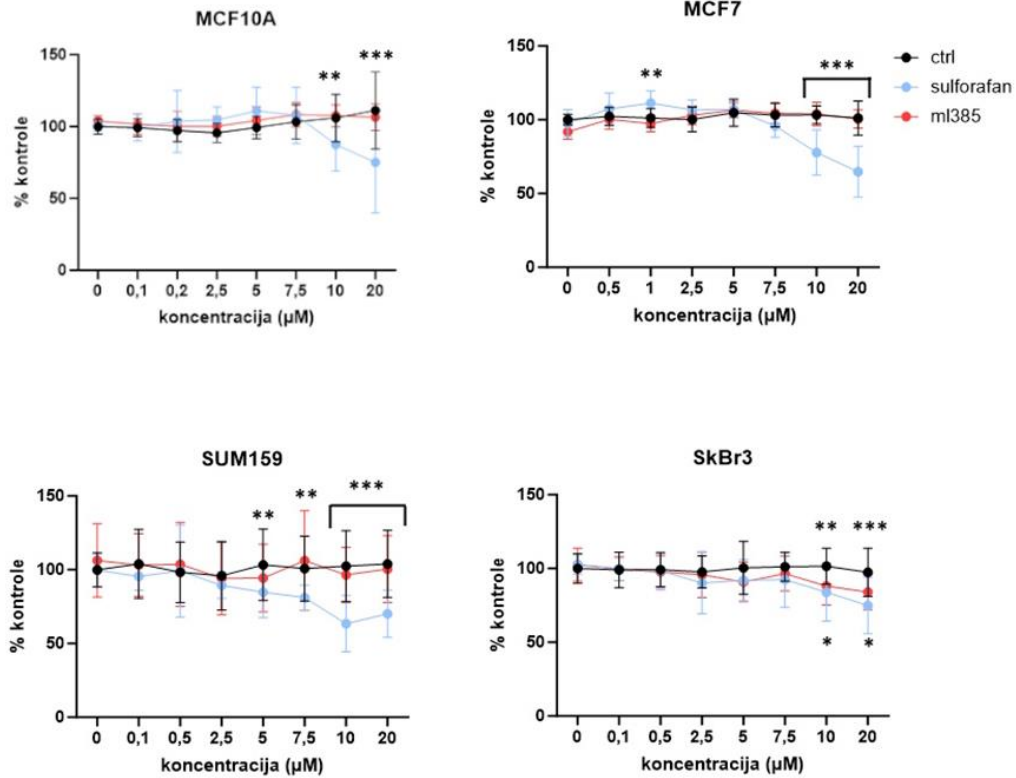
Kako bih istražila utjecaj NRF2 na ekspresiju AQP3 i AQP5, pratili smo vijabilnost stanica nakon tretmana sulforafanom (aktivatorom NRF2) i ML385 (inhibitorom NRF2), a rezultati su prikazani na Slika 9. Stanice su tretirane različitim koncentracijama sulforafana (0  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 20  $\mu\text{M}$ ) i ML385 (0  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 20  $\mu\text{M}$ ).

Kod stanične linije MCF10A (ne-tumorigena epitelna stanična linija) postoji statistički značajan pad vijabilnosti stanica nakon tretmana sulforafanom pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0018$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ). Tretman ML385 nije statistički značajno utjecao na vijabilnost MCF10A.

Kod stanične linije MCF7 (pozitivna na estrogenski i progesteronski receptor) postoji statistički značajan pad vijabilnosti kod tretmana sulforafanom pri tri različite koncentracije: 1  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0060$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ). Slično kao i kod prethodne stanične linije, tretman ML385 nije statistički značajno promjenio vijabilnost MCF7.

Kada je riječ o staničnoj liniji SUM159 (trostruko negativna stanična linija tumora dojke), kao i kod MCF10A i MCF7, nema statistički značajne promjene vijabilnosti nakon tretmana ML385, kao ni kod tretmana sulforafanom pri nižim koncentracijama. Pri višim koncentracijama sulforafana primjećuje se statistički značajan pad stanične vijabilnosti: 5  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0082$ ), 7,5  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0037$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ).

Jedino kod stanične linije SkBr3 (pozitivna na HER2) postoje statistički značajne razlike nakon tretmana i sulforafanom i ML385. Kod tretmana sulforafanom, primjećuje se statistički značajan pad vijabilnosti pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0005$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P<0,0001$ ), isto kao i kod tretmana ML385 pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0102$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0104$ ).



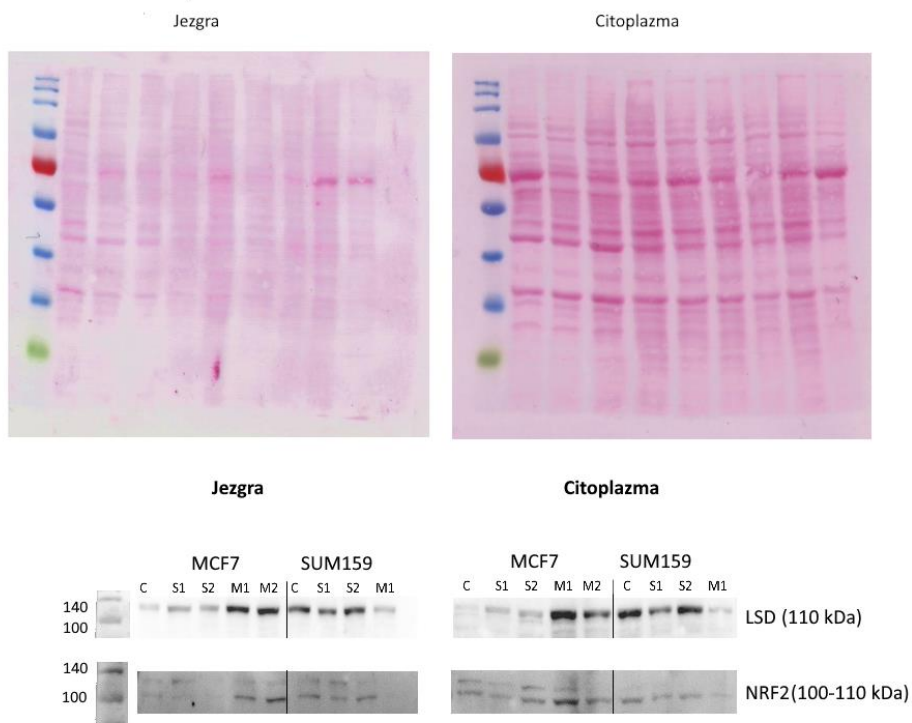
*Slika 9.* Vijabilnosti stanica dobivene metodom MTT u staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A nakon tretmana sulforafanom i ML385 pri različitim koncentracijama. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana prema netretiranoj kontroli (ctrl) i izraženi su kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajne razlike ( $P$ ) označene su \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .



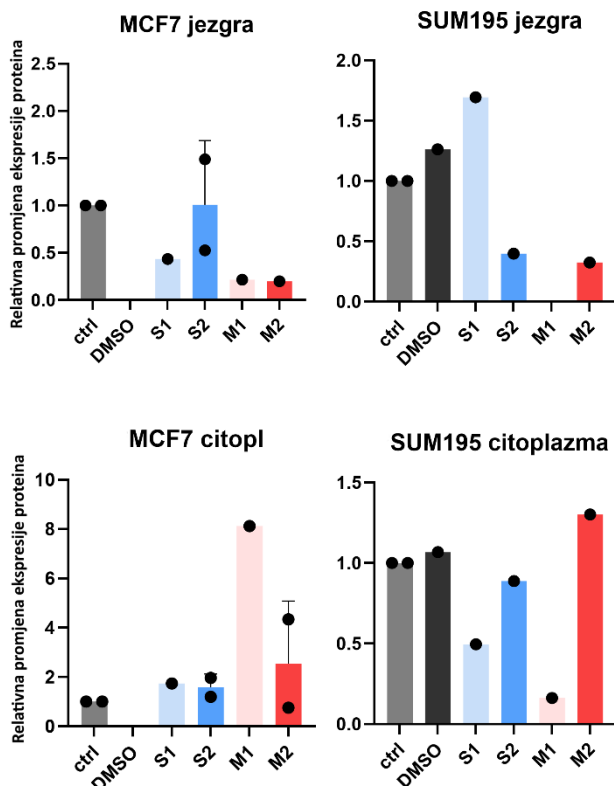
## 4.2. Analiza ekspresije proteina kod staničnih linija tumora dojke nakon inhibicije i aktivacije NRF2

### 4.2.1. Utvrđivanje koncentracija sulforafana i ML385 potrebnih za aktivaciju/inhibiciju NRF2

Da bih utvrdila učinkovitu koncentraciju sulforafana i ML385 potrebnih za aktivaciju tj. inhibiciju NRF2, izolirala sam proteine jezgrinih i citoplazmatskih frakcija i analizirala westernskom metodom otiska. Jednom kad je aktiviran, NRF2 se premješta u jezgri gdje djeluje kao transkripcijski faktor. Nakon Westernske metode otiska promatrala sam vrpce koji odgovaraju proteinu NRF2 na približno 110 kDa (dolazi do pomaka u migraciji, iako NRF2 ima masu 66 kDa, migrira kao da ima 110 kDa (Kopacz, 2022), dok se  $\beta$ -aktin (korišten kao kontrola) pojavljuje na 42 kDa. Za navedeni eksperiment, koristila sam uzorke nuklearnih i citoplazmatskih frakcija staničnih linija MCF7 i SUM159. Uzorci staničnih linija SkBr3 i MCF10A imali su prenisku koncentraciju proteina za analizu merodom *Western blott*-a. Intenziteti vrpce kvantificirani su pomoću softvera *Nine Alliance* i normalizirani na lizin-specifičnu demetilazu 1 (engl. *lysine specific demethylase*, LSD1), homologa nuklearne amin oksidaze koja djeluje kao histon demetilaza i kofaktor transkripcije. Podaci su zatim uneseni u *GraphPad Prism* i izveden je test za usporedbu razina proteina između tretirane i kontrolne skupine. Reprezentativne membrane prikazane su na Slika 10. Normalizirane vrijednosti su iscrtane kao stupčasti dijagrami sa standardnom devijacijom (Slika 11.). Kao što se može vidjeti iz grafičkih prikaza, nakon tretmana sulforafanom, zbog aktivacije i translokacije NRF2, dolazi do povećane razine NRF2 u jezgri, a smanjenje u citoplazmi. Nakon tretmana s inhibitorom ML385, primjećuje se povećanje razine NRF2 u citoplazmi, a smanjenje u jezgri, dokazujući učinkovitost tretmana na stanice.



**Slika 10.** Ekspresija proteina NRF2 u staničnim linijama MCF7 i SUM159. Gornje slike prikazuju ukupne proteine na membrani obojene Ponceau S (lijevo slika za jezgrine frakcije, a desno za citoplazmatske). Slika ispod prikazuje antitijelima označen protein NRF2 na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1  $\mu$ M sulforafan, S2 – 2,5  $\mu$ M sulforafan, M1 – 5  $\mu$ M ML385, M2 – 10  $\mu$ M ML385.

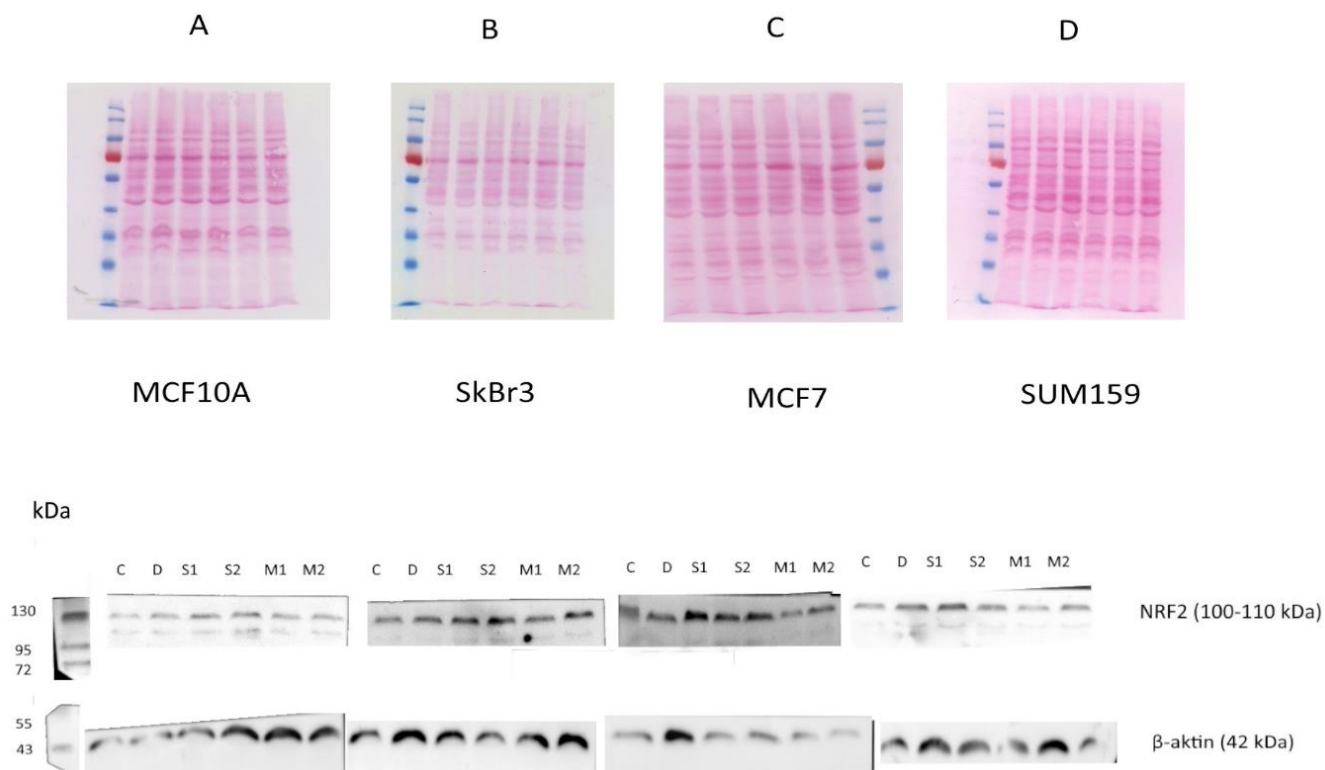


**Slika 11.** Ekspresija proteina NRF2 nakon tretmana otopinom sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama u jezgri i citoplazmi na staničnim linijama MCF7 i SUM195. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupnu količinu proteina i u odnosu na održavateljski protein, LSD1. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija.

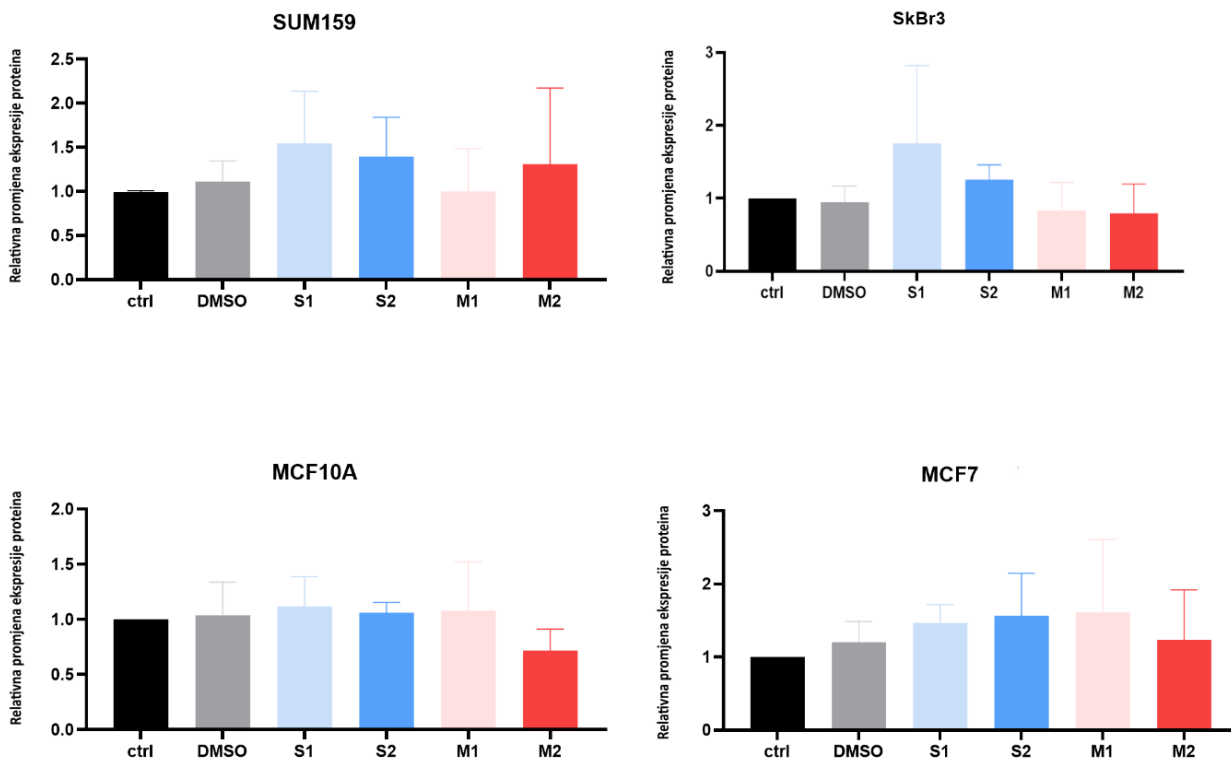
#### 4.2.2. Utjecaj tretmana sulforafana i ML385 na staničnim linijama tumora dojke

Kako bismo istražili utjecaj 24-satnog tretmana sulforafana, aktivatora NRF2, i ML385, inhibitora NRF2, na tri stanične linije tumora dojke i ne-tumorskoj staničnoj liniji epitela dojke, izolirala sam proteine i ispitala sam ekspresiju proteina NRF2 westernskom analizom ostiska. Promatrala sam vrpce koji odgovaraju proteinu NRF2 na približno 110 kDa, dok se  $\beta$ -aktin (korišten kao kontrola) pojavljuje na 42 kDa (reprezentativne membrane prikazane su na Slika 12). Intenziteti vrpce su kvantificirani pomoću softvera *Nine Alliance* i normalizirani prema količini  $\beta$ -aktina. Podaci su zatim uneseni u program *GraphPad Prism* i napravljen je test ....izveden je *ordinary one-way Anova* test za usporedbu razina proteina između tretirane i kontrolne skupine. Normalizirane vrijednosti su iscrtane kao stupčasti dijagrami sa standardnom devijacijom (Slika 13.). Kod niti jedne stanične linije ne primjećuje se razlika u ekspresiji

NRF2 na ukupnim staničnim proteinima te također nema statistički značajnih promjena ekspresije ciljnog proteina.

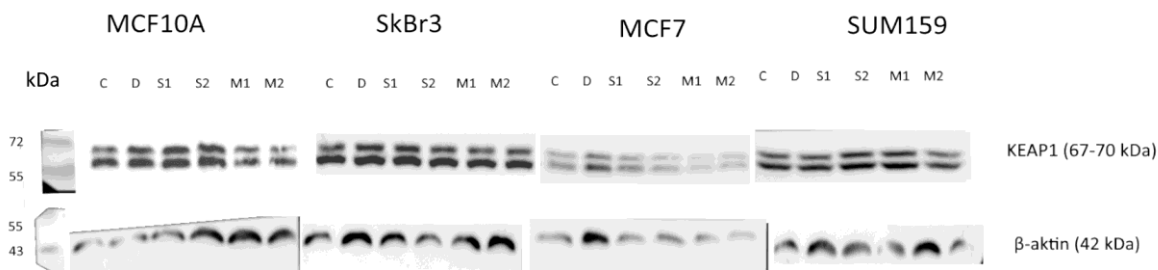


**Slika 12.** Ekspresija proteina NRF2 u staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A nakon tretmana stanica sa DMSO, sulforafanom i ML385. Slike A, B, C i D prikazuju ukupne proteine na membrani obojene Ponceau S (A: stanična linija MCF10A, B: Skbr3, C: MCF7, D: SUM159). Slika ispod prikazuje antitijelima označene protein NRF2 na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1 μM sulforaran, S2 – 2,5 μM sulforafan, M1 – 5 μM ML385, M2 – 10 μM ML385.

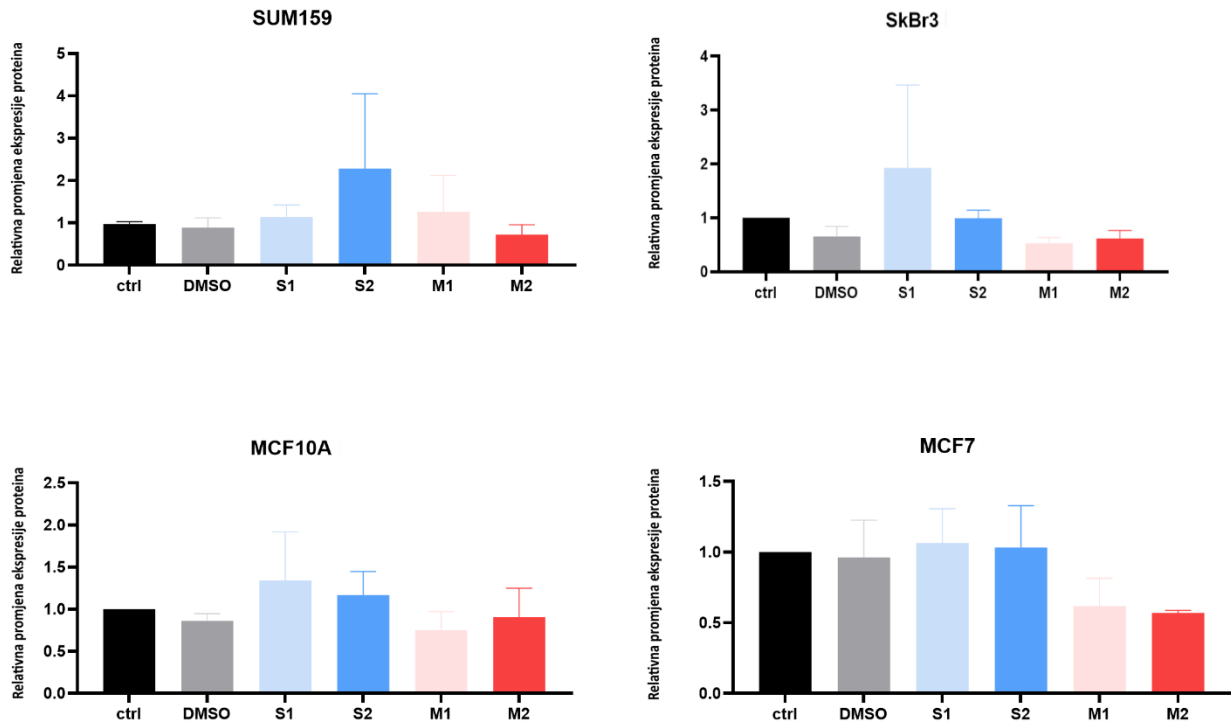


*Slika 13. Ekspresija proteina NRF2 nakon tretmana otopinom sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama na staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A analizirana westernskom metodom ostiska. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupnu količinu proteina i u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija.*

Aktivaciju NRF2 inhibira njegov negativni regulator KEAP1. Kako bih ispitala ulogu KEAP1 u promjeni ekspresije NRF2 nakon tretmana aktivatorom i inhibitorom kroz 24 sata, u četiri stanične linije, ispitala sam njegovu ekspresiju westernskom metodom otiska. Također, kao ni kod NRF2, nije bilo statistički značajnih promjena ekspresije proteina (reprezentativne membrane prikazane su na Slika 14, a grafički prikazi su prikazani na Slika 15).

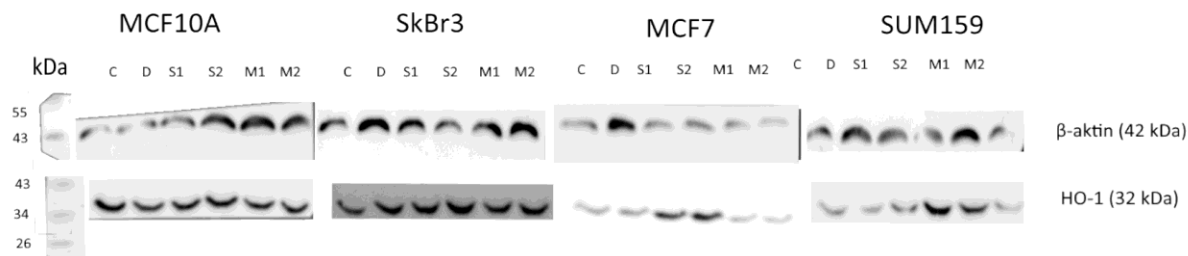


**Slika 14.** Ekspresija proteina KEAP1 u staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A. Slika prikazuje antitijelima označen protein od interesa na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1 μM sulforafan, S2 – 2,5 μM sulforafan, M1 – 5 μM ML385, M2 – 10 μM ML385.

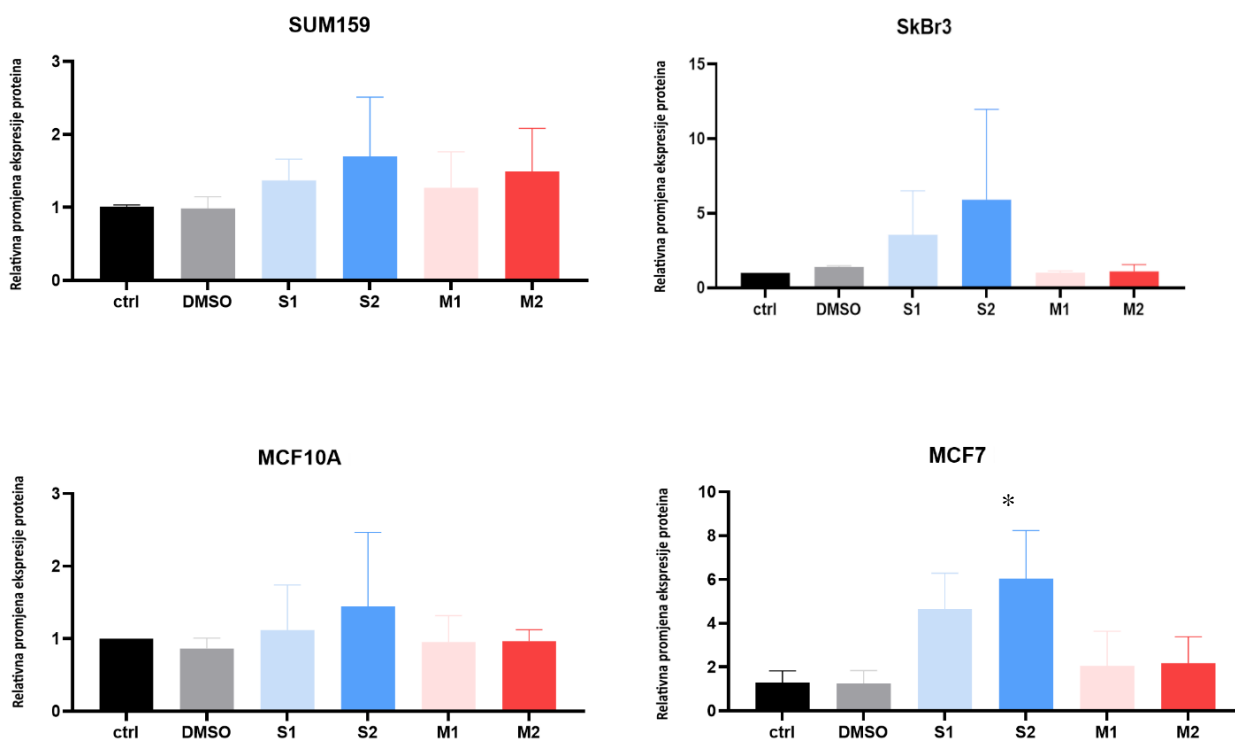


*Slika 15. Ekspresija proteina KEAP1 nakon tretmana sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama na SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A staničnim linijama. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan  $1\mu\text{M}$ , S2-sulforafan  $2,5\mu\text{M}$ , M1-ML385  $5\mu\text{M}$ , M2-ML385  $10\mu\text{M}$ ) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija.*

NRF2 regulira ekspresiju mnogo gena čiji produkti su uključeni u citoprotektivne odgovore. Jedan od tih produkata je HO-1, enzim, opisan u poglavlju Uvod. Da bih ispitala djelovanje tretmana sulforafana i ML385, analizirala sam ekspresiju HO-1 u lizatima stanicama wsternskom metodom otiska. Primjećuju se statistički značajne promjene u ekspresiji HO-1 pri nižim koncentracijama sulforafana kod stanične linije MCF7 ( $P=0,0067$ ). Reprezentativne membrane prikazane su na Slika 16, a grafički prikazi nalaze se na Slika 17.



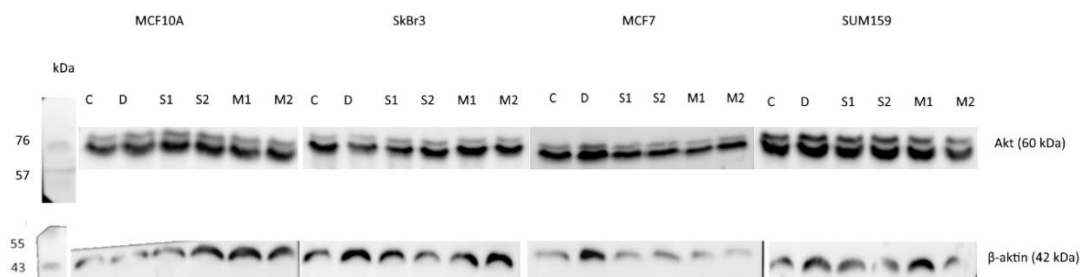
**Slika 16.** Ekspresija proteina *HO-1* u staničnim linijama *SUM159*, *SkBr3*, *MCF7* i *MCF10A*. Slika prikazuje antitijelima označen protein od interesa na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: *C* – kontrola, *D* – *DMSO*, *S1* – 1  $\mu\text{M}$  sulforafan, *S2* – 2,5  $\mu\text{M}$  sulforafan, *M1* – 5  $\mu\text{M}$  *ML385*, *M2* – 10  $\mu\text{M}$  *ML385*.



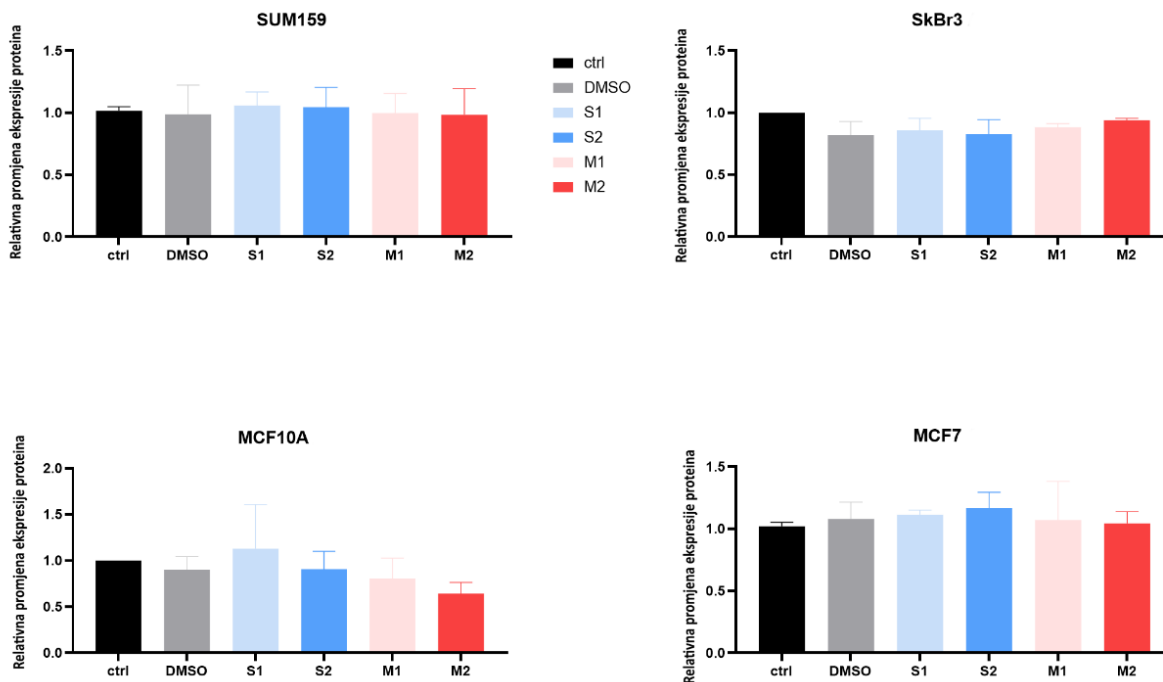
**Slika 17.** Ekspresija proteina *HO-1* nakon tretmana otopinom sulforafanom i *ML385* u različitim koncentracijama na četiri stanične linije *SUM159*, *SkBr3*, *MCF7* i *MCF10A*. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (*DMSO*, *S1*-sulforafan 1  $\mu\text{M}$ , *S2*-sulforafan 2,5  $\mu\text{M}$ , *M1*-*ML385* 5  $\mu\text{M}$ , *m2*-*ML385* 10  $\mu\text{M}$ ) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Statistički značajne razlike (*P*) u odnosu na kontrolu označene su: \*  $P < 0,05$ .



Ekspresija proteina Akt korištena je kao procjena aktivacije signalnog puta PI3K/Akt, za kojeg se smatra da je odgovoran za ekspresiju akvaporina. Nije dobivena statistički značajna razlika ru ekspresiji proteina Akt neovisno o tretmanu, u niti jednoj staničnoj liniji. Reprezentativne membrane prikazane su na Slika 18, a grafički prikazi nalaze se na Slika 19.

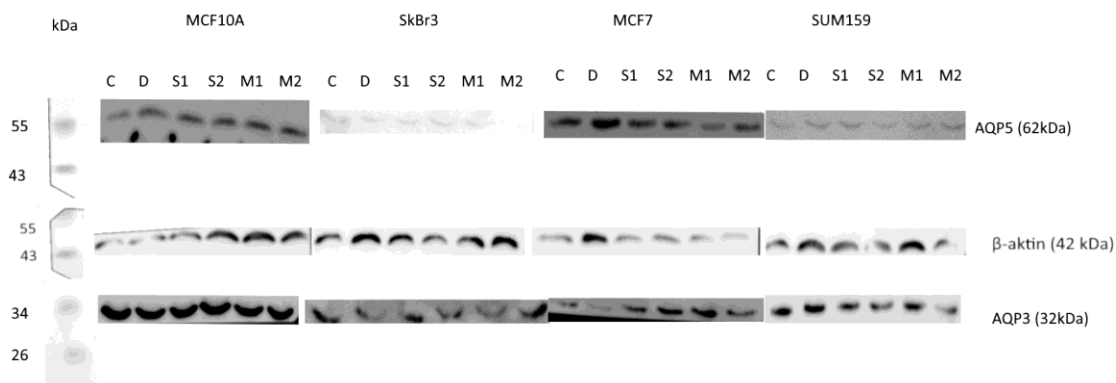


**Slika 18.** Ekspresija proteina Akt u staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A. Slika prikazuje antitijelima označen protein od interesa (Akt) na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: C - kontrola, D - DMSO, S1 – 1 μM sulforafan, S2 – 2,5 μM sulforafan, M1 – 5 μM ML385, M2 – 10 μM ML385.

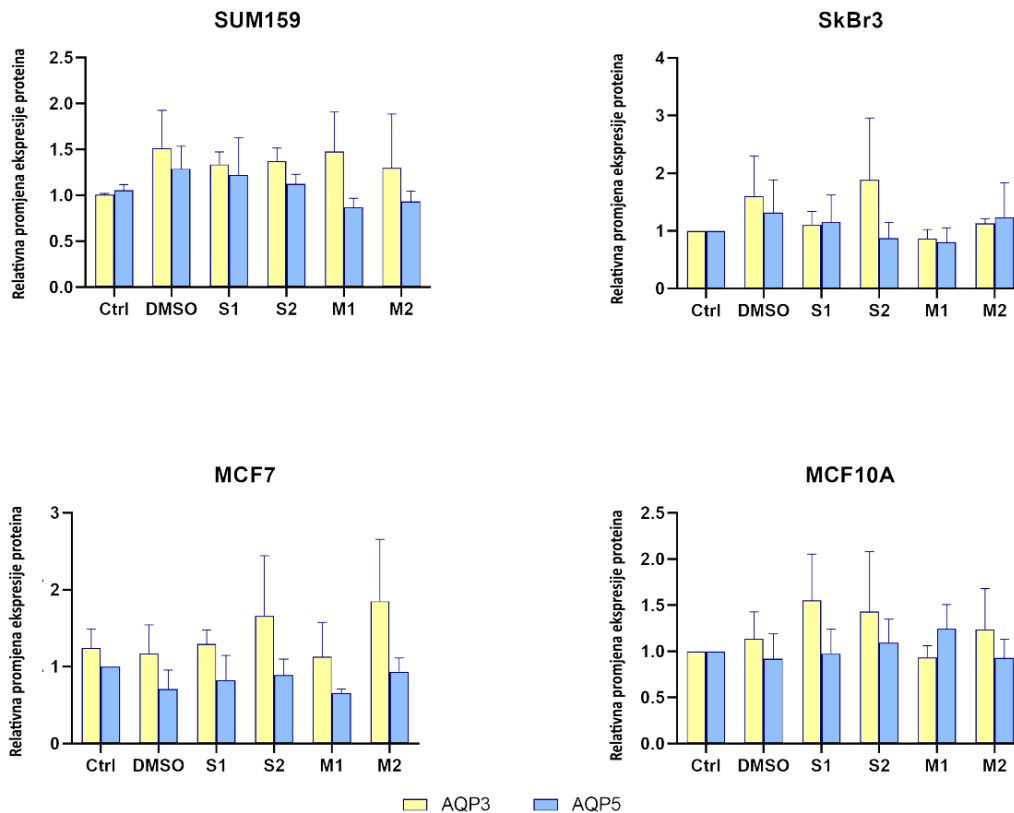


**Slika 19.** Ekspresija proteina Akt nakon tretmana otopinom sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama na SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A staničnim linijama. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan  $1\mu\text{M}$ , S2-sulforafan  $2,5\mu\text{M}$ , M1-ML385  $5\mu\text{M}$ , M2-ML385  $10\mu\text{M}$ ) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija.

Da bih utvrdila povezanost između NRF2 i akvaporina, ispitala sam ekspresiju AQP3 i AQP5 nakon tretmana sulforafanom i ML385 kroz 24 sata. Kod sve četiri stanične linije i tretmana, nije bilo značajnih promjena u ekspresiji akvaporina, nakon tretmana staničnih linija dojke inhibitorom i aktivatorom proteina NRF. Reprezentativne membrane prikazane su na Slika 20, a grafički prikazi nalaze se na Slika 21.



**Slika 20.** Ekspresija proteina AQP3 i AQP5 u staničnim linijama MCF10A, SkBr3, MCF7 i SUM159. Slika prikazuje antitijelima označene proteine AQP3 i AQP5, na reprezentativnoj nitroceluloznoj membrani. Molekulska masa je naznačena pokraj proteina i proteinskog biljega. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1  $\mu$ M sulforafan, S2 – 2,5  $\mu$ M sulforafan, M1 – 5  $\mu$ M ML385, M2 – 10  $\mu$ M ML385.



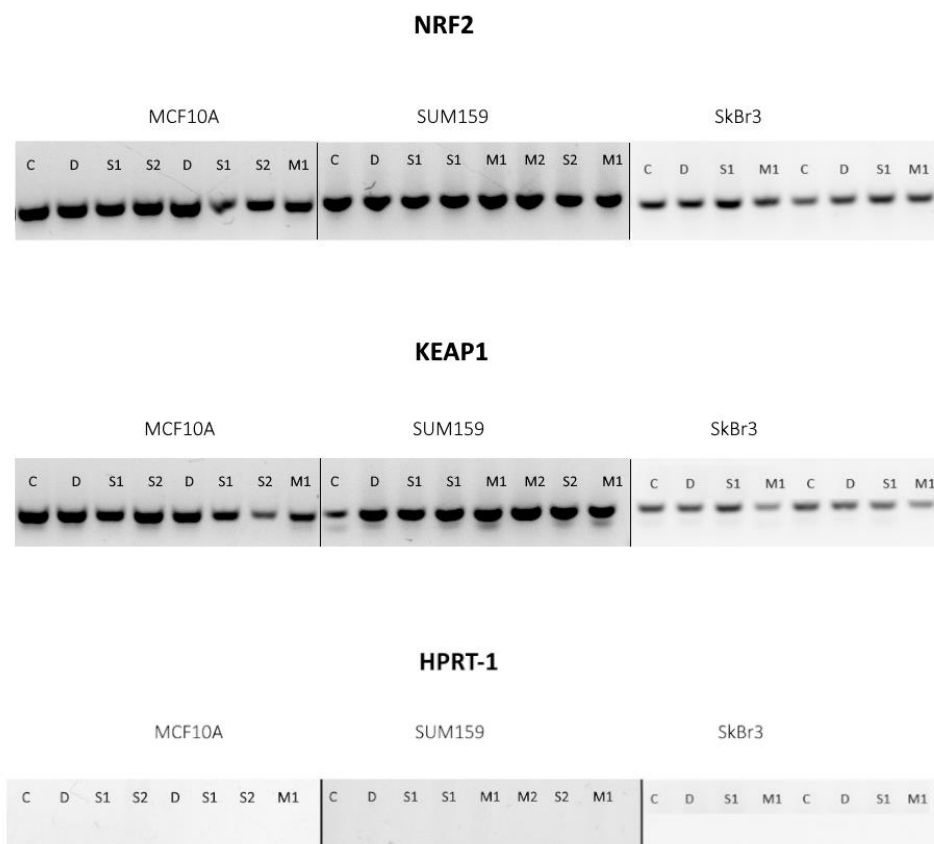
**Slika 21.** Ekspresija proteina AQP3 i AQP5 nakon tretmana sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama, u staničnim linijama SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na ukupni nanos proteina i u odnosu na  $\beta$ -aktin. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.2.3. Analiza ekspresije gena NRF2, KEAP1, AQP3 i AQP5 u staničnim linijama dojke, nakon tretmana inhibitorom i aktivatorom NRF2

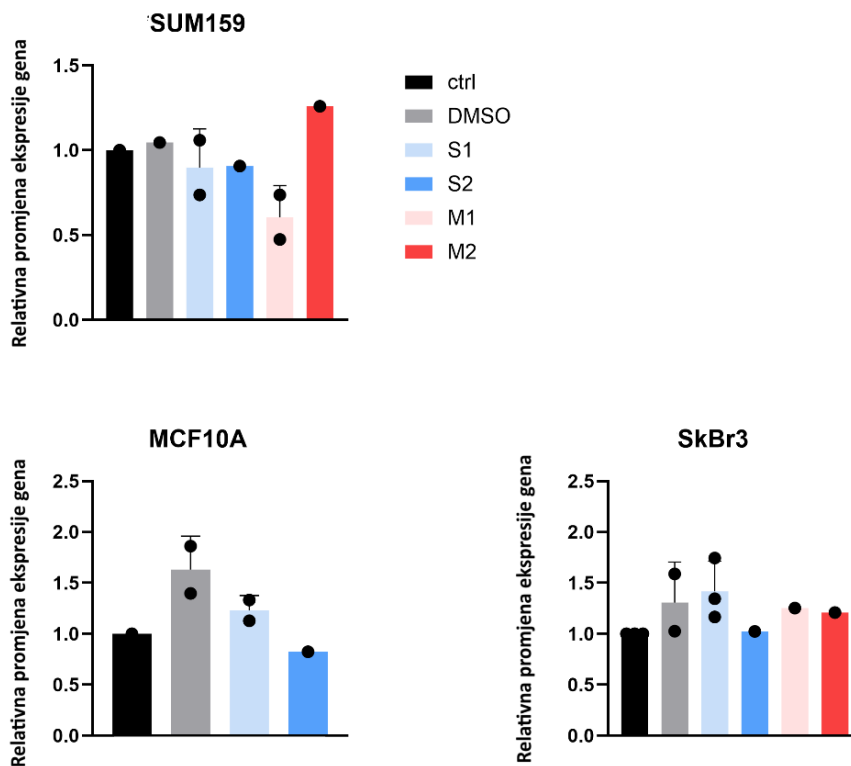
Da bih utvrdila utjecaj sulforafana i ML385 na stanične linije SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A, analizirala sam ekspresiju gena *NRF2*, *KEAP1*, *AQP3* i *AQP5*. Kako bi se procijenile razine ekspresije gena, izolirala sam RNA iz SUM159, SkBr3, MCF7 i MCF10A te sam je prepisala u cDNA reverznom transkripcijom i umnožila ciljne gene metodom PCR. Rezultati pružaju uvid u transkripcijsku aktivnost i relativne razine ekspresije ciljnih gena pod različitim uvjetima. Uzorci RNA namijenjeni analizi RT-PCR

procijenjeni su na koncentraciju i čistoću. Za staničnu liniju MCF7 izmjerene koncentracije su bile preniske za daljnju analizu.

Za utvrđivanje utjecaja tretmana 1  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$  sulforafana, 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  ML385 na staničnim linijama, uzorci cDNA su analizirani metodom PCR, da bi se istražila ekspresija gena *NRF2*. Također sam ispitala ekspresiju gena *HPRT-1*, kao održavateljskog gena za normalizaciju razine ekspresije, kao interna kontrola. Intenziteti vrpce kvantificirani su pomoću softvera *Nine Alliance* i normalizirani prema ekspresiji *HPRT-1*. Podaci su zatim uneseni u *GraphPad Prism* i izveden je *ordinary one-way Anova* test za usporedbu ekspresije RNA između kontrolne skupine i skupine tretirane sulforafanom i ML385. Normalizirane vrijednosti su iscrtane kao stupčasti dijagrami sa standardnom devijacijom. Nije bilo statistički značajnih promjena kod oba tretmana, kod niti jedne stanične linije. Slike gelova prikazane su na Slika 22, a grafički su prikazani na Slika 23.

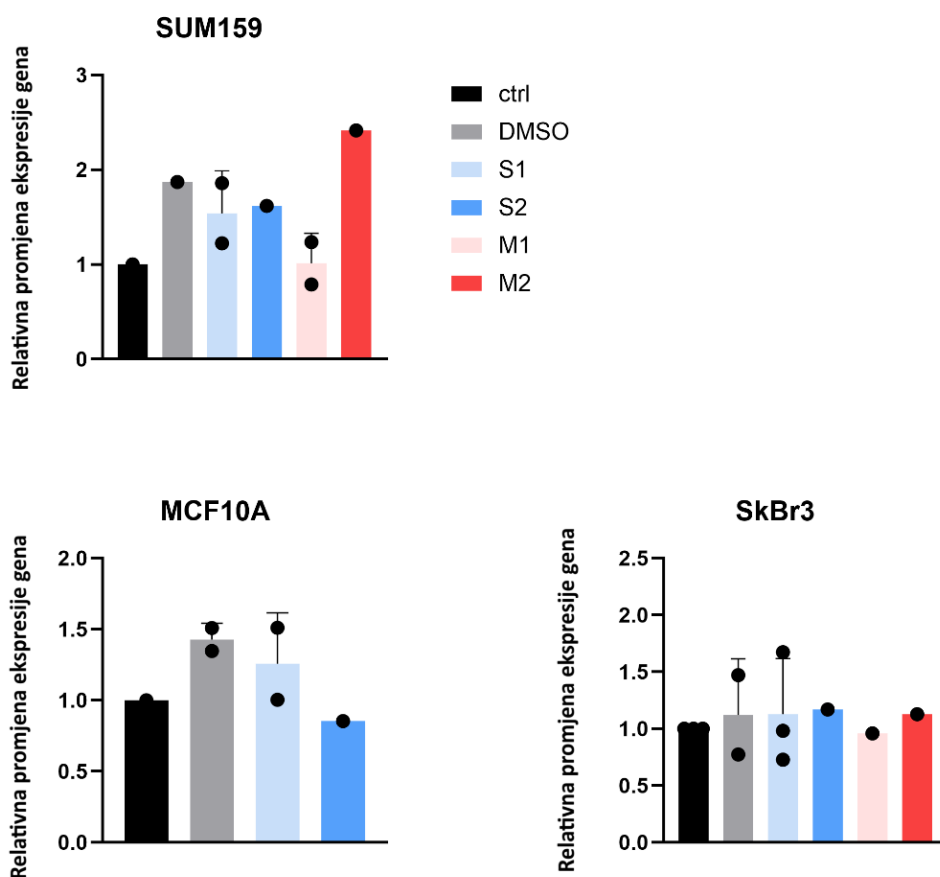


**Slika 22.** Ekspresija gena za proteine *NRF2* i *KEAP1* u staničnim linijama *MCF10A*, *SkBr3* i *SUM159*. Slika prikazuje označene umnožene cDNA od interesa na agaroznom gelu. Pripremljene cDNA su pomiješane s *GelSafe* bojom koja omogućuje prikaz vrpce pod UV svjetlom. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1  $\mu\text{M}$  sulforafan, S2 – 2,5  $\mu\text{M}$  sulforafan, M1 – 5  $\mu\text{M}$  ML385, M2 – 10  $\mu\text{M}$  ML385.



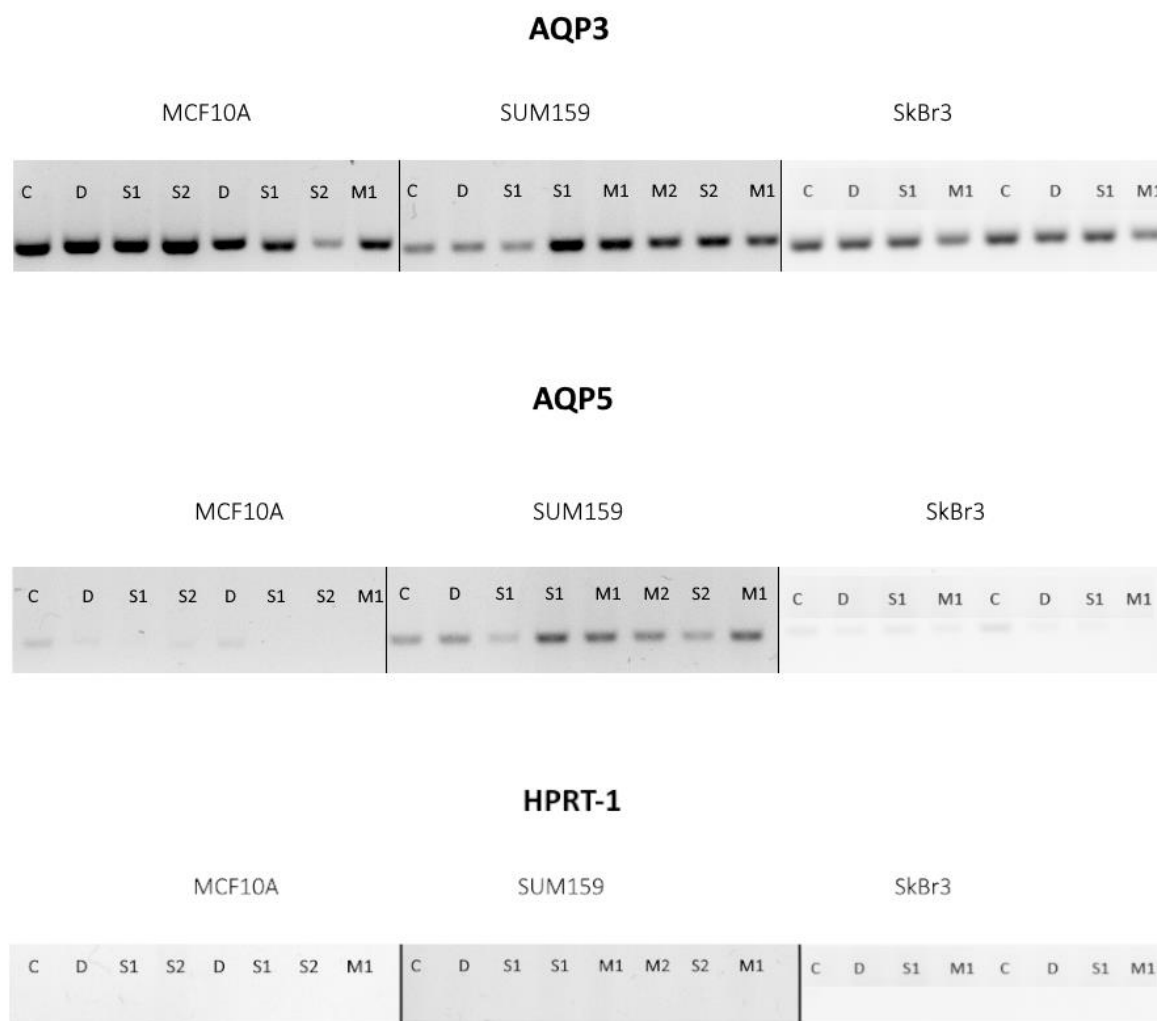
*Slika 23. Ekspresija gena NRF2 nakon tretmana otopinom sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama, u tri stanične linije. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na HPRT-1. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Relativna promjena ekspresije gena izračunata je prema kontroli.*

Nadalje, ispitala sam ekspresiju gena *KEAP1*, negativnog regulatora *NRF2*, nakon tretmana sulforafanom i ML 385. Rezultati su normalizirani obzirom na kontrolu, *HPRT-1*. Ponovno, kod svih staničnih linija i tretmana nije bilo statistički značajnih vrijednosti. Slike gelova prikazane su na Slika 22, a grafički su prikazani na Slika 24.



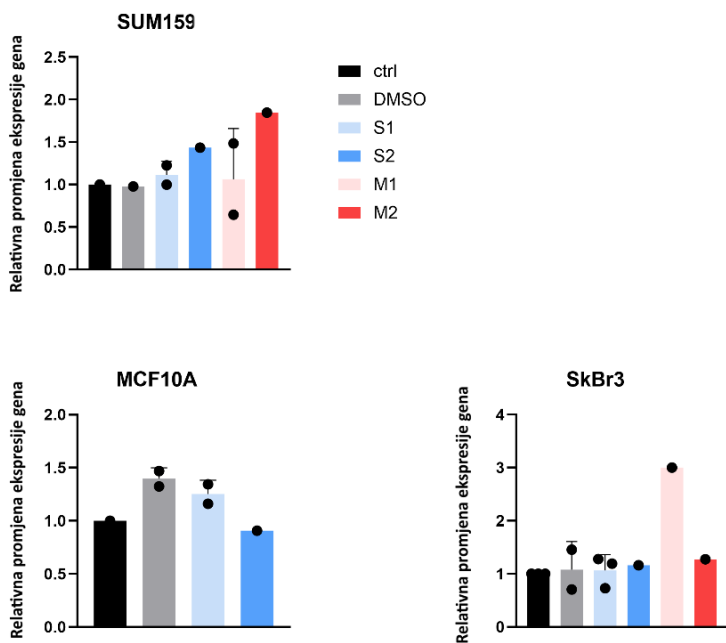
*Slika 24. Ekspresija gena KEAP1 nakon tretmana otopinom sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama, u tri stanične linije. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na HPRT-1. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Relativna promjena ekspresije gena izračunata je prema kontroli.*

Ispitala sam ekspresiju gena za *AQP3* i *AQP5* nakon tretmana sulforafanom i *ML385*. Kod stanične linije SkBr3 primjećuje se povećana ekspresija *AQP3* nakon tretmana s *ML385* pri koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ . Rezultati su normalizirani obzirom na ekspresiju *HPRT-1*, a normalizirane vrijednosti su iscrtane kao stupčasti dijagrami sa standardnom devijacijom. Slike gelova prikazane su na Slika 25, a grafički su prikazani na Slika 26.

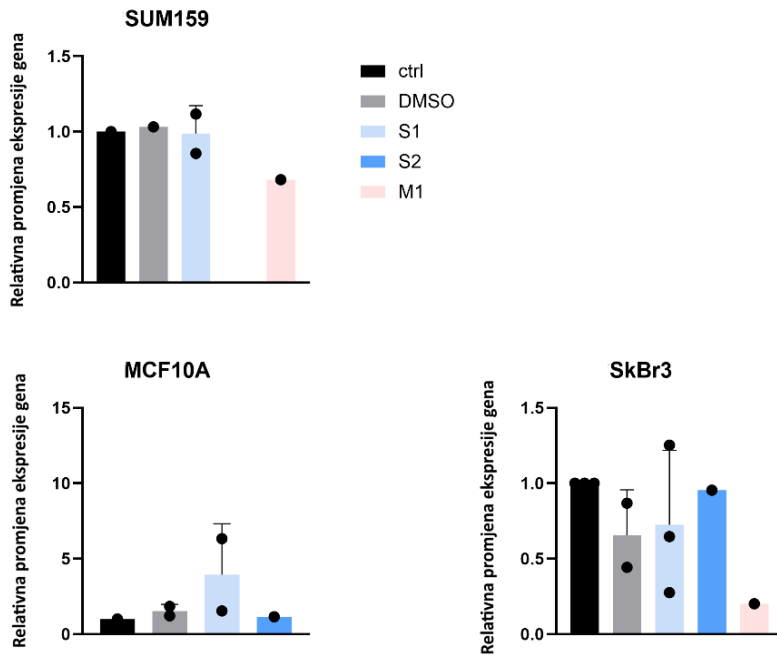


**Slika 25.** Ekspresija gena *AQP3* i *AQP5* u staničnim linijama MCF10A, SkBr3 i SUM159. Slika prikazuje označene umnožene cDNA od interesa na agaroznom gelu. Pripremljene cDNA su pomiješane s GelSafe bojom koja omogućuje prikaz bendova pod UV svijetlom. Kratice: C – kontrola, D – DMSO, S1 – 1  $\mu\text{M}$  sulforafan, S2 – 2,5  $\mu\text{M}$  sulforafan, M1 – 5  $\mu\text{M}$  ML385, M2 – 10  $\mu\text{M}$  ML385.





*Slika 26. Ekspresija gena AQP3 nakon tretmana sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama, u tri stanične linije. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na HPRT-1. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1 $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5 $\mu$ M, M2-ML385 10 $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Relativna promjena ekspresije gena izračunata je prema kontroli.*



*Slika 27. Ekspresija gena AQP5 nakon tretmana sulforafanom i ML385 u različitim koncentracijama, u tri stanične linije. Ekspresija proteina normalizirana je u odnosu na HPRT-1. Rezultati su prikazani kao odnos pojedinih tretmana (DMSO, S1-sulforafan 1  $\mu$ M, S2-sulforafan 2,5  $\mu$ M, M1-ML385 5  $\mu$ M, M2-ML385 10  $\mu$ M) prema kontroli te su izraženi kao srednja vrijednost bioloških i tehničkih triplikata  $\pm$  standardna devijacija. Relativna promjena ekspresije gena izračunata je prema kontroli.*

## 5. Rasprava

Rak dojke je čest maligni tumor koji pogađa žene, a jedna od osam žena će tijekom života dobiti dijagnozu raka dojke (Wilkinson i Gathani, 2022). Ova maligna bolest je jedan od najčešće dijagnosticiranih tumora na svijetu. Najčešća klasifikacija raka dojke temelji se na imunohistokemijskoj analizi određenih biljega. Podtipovi obično grupiraju u četiri kategorije: ER+, PR+, HER2+ i TNBC, koji karakterizira nedostatak ekspresije bilo kojeg od gore navedenih biljega i posebno je agresivan. Prateći ovu podjelu, u svom istraživanju koristila sam ljudske stanične linije tumora dojke: s izraženim receptorima za estrogen i progesteron, MCF7, linija s pretjerano ekspimiranim HER2, SkBr3 i trostruko negativna stanična linija, SUM159. Kao kontrola korištena je ne-tumorska ljudska stanična linija dojke, MCF10A (Shaath i sur., 2021).

Iako je već nekoliko prognostičkih kriterija uvedeno kao pomoć pri liječenju, potreba za molekularnim biljezima uvijek se snažno potiče zbog boljeg predviđanja razvoja bolesti, određivanja terapije i sl. (Shaath i sur., 2021). Jedan od potencijalnih biljega su akvaporini, proteinska obitelj transmembranskih vodenih pora koji igraju ključnu ulogu u reguliranju staničnog prijenosa vode i drugih molekula. Niz različitih malih polarnih molekula može proći kroz kanale akvaporina, između ostalog i  $H_2O_2$ , a navedenu funkciju posjeduje posebna skupina zvana peroksioporini (AQP1, AQP3, AQP5, AQP8, AQP9 i AQP11). Prijenosom signalnih molekula unutar stanice utječu na unutarstaničnu signalizaciju, kao i kontrolom kretanja vode i osmotskog tlaka, dodatno povezujući sudjelovanje AQP u staničnim funkcijama kao što su migracija, proliferacija i adhezija (Milković i Čipak Gašparović, 2021.). Kao što je već opisano, akvaporini reguliraju prijenos malih molekula kao što su  $H_2O_2$ , NO, koji reguliraju i moduliraju redoks signalne putove. S tim, mijenja se redoks status unutar stanice, dolazi do oksidacijskog stresa čime se regulira proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Kao posljedica oksidacijskog stresa dolazi do razvoja i progresije tumora. Čimbenici koji reguliraju oksidacijski stres, poput NRF2, uvelike utječu na razvoj tumora kao i na njegovu sudbinu. U normalnim, zdravim stanicama, aktivacija NRF2 ima pozitivan utjecaj na stanicu, štiteći ju od maligne transformacije, dok u tumorskim stanicama NRF2 omogućava preživljavanje stanica u stanjima velikog oksidacijskog stresa i omogućava rezistenciju na terapije (Hayes i sur., 2010; Milkovic i sur., 2017). Zbog dvostruke uloge NRF2 kod raka, akvaporini se predstavljaju kao nova meta regulacije razina ROS unutar stanice. Kao što je već opisano, AQP su povećano ekspimirani kod više vrsta tumora (Chen i sur., 2014; Cui i sur., 2021; Bystrup i sur., 2022), a kada je riječ o tumoru dojke, AQP3 i AQP5 su najčešći prekomjerno izraženi peroksioporini (Milković i Čipak Gašparović, 2021). Stoga sam se u ovom istraživanju fokusirala na navedena dva AQP i kontrolu njihove ekspresije. Točnije, utječe li prekomjerno aktivirani NRF2 u stanicama raka dojke na ekspresiju AQP3 i AQP5.

U prvom dijelu eksperimenta bilo je potrebno utvrditi koncentraciju aktivatora i inhibitora koje ću koristiti u nadolazećim eksperimentima; koncentracija bi trebala biti dovoljno visoka za učinkovitost (aktivacija/inhibicija), ali bez negativnih utjecaja na stanice. Ispitala sam vijabilnost stanica nakon tretmana rastućim koncentracijama sulforafana i ML385. Test vijabilnosti nakon navedenih tretmana ukazuje na njihov negativan utjecaj na proliferaciju stanica raka dojke pri visokim koncentracijama (Slika 9). Kod svih staničnih linija primjećuje se značajan pad vijabilnosti nakon tretmana višim koncentracijama sulforafana, ponajviše pri koncentracijama od 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$ . Kada je riječ o tretmanu s ML385, isključivo kod stanične linije SkBr3 primjećuje se pad vijabilnosti pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0102$ ) i 20  $\mu\text{M}$  ( $P=0,0104$ ), ukazujući na manju toksičnost u usporedbi sa sulforafanom (Slika 9). Zbog navedenih rezultata, odlučila sam koristiti niže koncentracije sulforafana u nadolazećim eksperimentima, koje nisu utjecale na vijabilnost stanica: 1  $\mu\text{M}$  i 2,5  $\mu\text{M}$ . Zbog malih i neznčajnih promjena vijabilnosti nakon tretmana s ML385, za eksperimente sam koristila više koncentracije, koje i dalje nisu utjecale na vijabilnost stanica: 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ .

U prvom dijelu istraživanja ispitala sam uspješnost aktivacije ili inhibicije NRF2 nakon tretmana stanicavednim koncentracijama sulforafanom i ML385. Inhibitor ML385 se veže za NRF2 i inhibira ekspresiju nizvodnog ciljnog gena, vezujući se na domenu CNC-bZIP čime sprječava proteinski kompleks MAF-NRF2 da se veže na regulatorne sekvence DNA (Xian i sur., 2019). Sulforafan, izotiociant koji se nalazi u povrću (porodica krstašica), aktivira odgovor stanica KEAP1-NRF2. Ova molekula aktivira NRF2 vezujući se za KEAP1. Kemijska modifikacija senzorskih cisteina KEAP1 pomoću induktora (sulforafan) blokira ciklus razgradnje NRF2, omogućujući NRF2, sintetiziranom *de novo*, da se akumulira, translocira u jezgru i započne transkripciju svojih nizvodnih ciljnih gena (Dinkova-Kostova i sur., 2017). Kao što se može primjetiti na grafičkim prikazima, nakon tretmana sulforafanom (aktivatorom) primjećuje se povećana koncentracija NRF2 u jezgri dvije stanične linije, MCF7 pozitivnoj na estrogen i agresivnoj, trostruko negativnoj SUM159 (Slika 11). Povećana aktivacija NRF2 i njegova translokacija u jezgru omogućava njegovo djelovanje kao transkripcijskog faktora. Inhibicijom NRF2 s ML385 primjećuje se veća koncentracija NRF2 u citoplazmi kod obje stanične linije (Slika 11.), ukazujući na to da se NRF2 nalazi u citoplazmi u svom neaktivnom stanju inhibiran pomoću inhibitora ML385 i KEAP1. Na temelju navedenih rezultata, iako su bileispitane samo dvije stanične linije, odlučila sam se za korištenje navedenih tretmana u svrhu provođenja daljnjih eksperimenata.

Nakon utvrđivanja učinkovitosti tretmana sulforafanom i ML385 kroz 24 sata na sve četiri stanične linije, analizirala sam ekspresiju proteina vezanih za aktivaciju NRF2, kao i ekspresiju AQP nakon djelovanja tretmana. Analiza ekspresije proteina NRF2 i KEAP1 većinom nisu pokazale statistički značajne promjene (Slika 13, Slika 15). Zbog kompleksne aktivacije NRF2 i njegovog kratkog poluživota, ispitana

je i ekspresija HO-1, jednog od krajnjih produkata ciljnih gena NRF2 (Tonelli i sur., 2018). Kod stanične linije MCF7 (ER+) primjećuje se povećana ekspresija HO-1 nakon tretmana sulforafanom (Slika 17), ukazujući na uspješnu aktivaciju proteina i njegovu transkripcijsku aktivnost. kod svih staničnih linija primjećuje se blago povećanje ekspresije HO-1 pri obje koncentracije sulforafana. Kada je riječ o ekspresiji AQP3 i AQP5 kod staničnih linija, nema značajne promjene u ekspresiji proteina nakon tretmana i aktivacije/inhibicije NRF2.

Na transkripcijskoj razini također nije došlo do statistički značajnih promjena ekspresije gena vezanih za aktivaciju NRF2. Kod stanične linije SUM159 primjećuje se povećanje ekspresije KEAP1 pri tretmanu od 10  $\mu$ M ML385 (Slika 24), što potencijalno ukazuje na uspješnu inhibiciju NRF2, iako ne mehanizmom opisanim za ML358. Naime, isti tretman pokazuje i uvećanu ekspresiju NRF2, ukazujući na dvojni učinak ovog tretmana (Slika 23). Ekspresija gena *AQP3* i *AQP5* također se nije promijenila kod većine staničnih linija niti kod aktivacije niti kod inhibicije NRF2. Jedina promjena primjećuje se kod stanične linije SkBr3 (HER2+), gdje nakon tretmana inhibitorom NRF2, ML385, dolazi do povećane ekspresije gena *AQP3* (Slika 26). Zbog tehničkih poteškoća, točnije degradacije izoliranih uzoraka RNA tokom vremena, dosta uzoraka je bilo odbačeno. Nakon analize na nanodrop uređaju, koncentracija RNA je bila preniska za korištenje u nadolazećim eksperimentima i usprkos točnom načinu pohranjivanja na -80 °C, određeni uzorci su bili neiskoristivi. Nije napravljena analiza ekspresije RNA svih staničnih linija zbog niske koncentracije izolirane RNA. Stoga, za analizu RNA uzoraka je potrebno izvođenje planiranih metoda nedugo nakon izolacije.

U svom istraživanju, Ji i sur., (2023.) uspješno inhibiraju molekulu NRF2 i signalni put PI3K/Akt/mTOR (kojeg aktivira NRF2; opisano gore) na stanicama planocelularnog karcinoma pluća koristeći ML385 kao inhibitor. U svojim eksperimentima također su koristili 2D stanične kulture stanica, ali i organoid istih stanica. Dokazali su da ML385 inhibira proliferaciju organoida *in vitro*, kao i kod 2D staničnih kultura, ukazujući na mogućnost da NRF2 potiče rast navedenog karcinoma *in vivo*. Provođeci eksperimente na staničnim kulturama, koristila sam ML385 u sličnim koncentracijama kao i Ji i sur., dok se vrijeme inkubacije znatno razlikuje: moja inkubacija je trajala 24h, a njihova 48h. Istraživanje provedeno na humanim stanicama raka glave i vrata potvrđuje potencijal inhibitora NRF2 ML385 kao terapijskog sredstva. Liječenje s ML385 rezultiralo je smanjenjem ekspresije NRF2, kao i razine HO-1 (Jeong i sur., 2024). Nadalje, učinak ML385 je također testiran na stanicama raka dojke. U svom istraživanju, Qin i sur., (2021.) otkrivaju da tretiranje stanica SUM159 povećava njihovu osjetljivost na apoptozu induciranu ionizirajućim zračenjem. Točnije, ML385 utječe na subpopulaciju stanica zvane tumorske matične stanice ili tumor-inicirajuće stanice, učinkovito senzibilizirajući ove stanice otporne na terapiju. U svom istraživanju, Qin i sur. također koriste 5  $\mu$ M ML385; stanice tretiraju 2 h prije izlaganja zračenju, a

analiziraju 24 h nakon izlaganja, ukazujući na učinkovitost tretmana i nakon samo 24 h inkubacije. U prethodna dva istraživanja vrijeme inkubacije je bilo znatno duže: 48 h i 72 h. Stoga, može se pretpostaviti da za uspješno djelovanje tretmana ML385-om je potrebno duže vrijeme inkubacije od 24 h, što potencijalno objašnjava rezultate dobivene provedenim eksperimentima.

Kada je riječ o tretmanu sulforafanom, Licznarska i sur. (2021.) također uspješno aktiviraju NRF2 tretmanom sulforafanom. Ekspresija NRF2 je povećana kao rezultat tretmana sulforafanom u svim testiranim staničnim linijama raka dojke, s najvišim porastom u stanicama MCF7. U drugom istraživanju provedenom na staničnoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma (HCT116), tretman sulforafanom je aktivirao NRF2 ovisano o koncentraciji (Gwon i sur., 2020). Indukcijom NRF2, tretman je stimulirao rast tumorskih stanica pri nižim koncentracijama od 5  $\mu\text{M}$ , dok je pri koncentracijama 10  $\mu\text{M}$  suprimirao rast stanica (Gwon i sur., 2020). U oba istraživanja stanice su još inkubirane 24 h nakon tretmana, no koristili su veće koncentracije sulforafana: od 5  $\mu\text{M}$  do 20  $\mu\text{M}$ . Iako su se više koncentracije pokazale uspješnijima za aktivaciju NRF2, previsoke koncentracije (10-20  $\mu\text{M}$ ) ukazuju na toksični učinak tretmana na stanice te smanjenje vijabilnosti stanica. Stoga, vjerojatno je za učinkovitost tretmana potrebna veća koncentracija za djelovanje istog, no ne previsoka poput 10 ili 20  $\mu\text{M}$ , zbog održavanja vijabilnosti stanica.

Prema našim istraživanjima, tretmani sulforafanom i ML385 nisu imali značajan učinak na stanične linije raka dojke te nije došlo do promjene ekspresije AQP. Jedina statistički značajna promjena primjećuje se kod stanične linije MCF7, gdje dolazi do porasta ekspresije HO-1 nakon aktivacije NRF2 sulforafanom. Moguće je da je bilo potrebno duže vrijeme inkubacije kod tretmana ML385, kao što su koristili drugi autori u svojim istraživanjima (Qin i sur., 2021; Ji i sur., 2023; Jeong i sur., 2024), ili više koncentracije sulforafana (Gwon i sur., 2020; Licznarska i sur., 2021). Kada je riječ o analizi RNA uzoraka, također je bila potrebno duže vrijeme inkubacije. Zbog nemogućnosti aktivacije/inhibicije NRF2, nije moguće napraviti poveznicu s akvaporinima i donijeti zaključak o utjecaju ovog transkripcijskog faktora na ekspresiju AQP. Dodatna istraživanja *in vitro* utemeljena na istraživanju regulacije ekspresije AQP3 i AQP5 potrebna su za donošenje konkretnijih zaključaka, a kasnije i povezivanja NRF2 s njihovom ekspresijom. Tretmani za aktivaciju i inhibiciju NRF2 su se dokazali uspješnima u prethodnim eksperimentima (opisano gore), tako da se pri provođenju budućih eksperimenata treba fokusirati na optimizaciju eksperimenata, poput dužeg vremena inkubacije ili korištenjem većeg broja stanica pri izolaciji proteina/RNA, ili pak korištenje drugih metoda analize.

Iako još nije u potpunosti poznata transkripcijska regulacija proteina AQP, u žlijezdama slinovnicama pokazalo se da FOXO1 može biti izravni regulator ekspresije AQP5 (Lee i sur., 2021) te da inzulin može utjecati na njegovu ekspresiju, isto kao i kod AQP1 i AQP8 (Cui i sur., 2021). U svom istraživanju, Mlinarić i sur. (2023.) otkrivaju da AQP3 može modulirati PI3K/Akt aktivaciju i oksidacijski odgovor u staničnim

linijama raka dojke. U staničnoj liniji MCF7 (ER+), EGF je stimulirao povećanu fosforilaciju Akt, a u kombinaciji s poremećajem lipidnih splavi, povećao ekspresiju AQP3. S druge strane, utišavanje AQP3 dovelo je do smanjenja ekspresije PI3K. Promotor *AQP3* ima nekoliko elemenata odgovora i veznih mjesta faktora transkripcije u promotorskoj regiji: element odgovora na estrogen, element odgovora na ROR/REVERB, mjesto za SP1 te FOXO1 (Yde i sur., 2021). Signalni put PI3K/Akt/mTOR je također usko povezan s NRF2, koji djeluje kao aktivator ovog signalnog puta. Put PI3K povratno povećava razine proteina NRF2 kroz nekoliko mehanizama: putem fosforilacije posredovane s Akt, pri čemu se inhibira GSK3 $\beta$  (Rada i sur., 2012), dok fosforilacija p21 i p62 posredovana Akt i mTORC1 ometa KEAP1 ovisnu degradaciju NRF2 (Ichimura i sur., 2013). Stoga, određena poveznica između dva proteina vjerojatno i postoji zbog zajedničkih signalnih molekula, čime NRF2 indirektno utječe na ekspresiju AQP3.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da nije došlo do statističkih značajnih promjena u ekspresiji NRF2 nakon njegove aktivacije ili inhibicije, osim u staničnoj liniji MCF7 (ER+). Uspješna aktivacija NRF2 se ogledava u povećanoj ekspresiji HO-1, no usprkos uspješnosti tretmana, ne dolazi do promjene u ekspresiji gena *AQP3* i *AQP5* ni njihovih proteina. S druge strane, kod stanične linije SkBr3 (HER+), dolazi do povećanja transkripcije *AQP3* nakon tretmana s ML385. U staničnoj liniji MCF7, odsutnost promjena u ekspresiji *AQP* unatoč uspješnoj aktivaciji NRF2 ukazuje na to da regulacija ovih proteina može biti neovisna o putevima NRF2 u kontekstu raka dojke. Međutim, povećana transkripcija *AQP3* opažena u staničnoj liniji SkBr3 nakon tretmana s ML385, poznatim inhibitorom NRF2, sugerira da se ekspresija AQP3 može modulirati putem alternativnih signalnih putova, obašnjavajući dobivene rezultate. Odgovori opaženi u staničnim linijama MCF7 i SkBr3 ukazuju na to da je odnos između ekspresije NRF2 i AQP složen i da je pod utjecajem drugih faktora specifičnih za stanicu ili signalnih molekula.

Jedno ograničenje ovog istraživanja je manjak prikupljenih uzoraka za metode *Western blott* i *PCR*. Kada je riječ o analizi citoplazmatskih i jezgrinih frakcija, tj. istraživanju uspješnosti aktivacije/inhibicije tretmana, bilo je potrebno više različitih koncentracija tretmana i više različitih duljina inkubacije, izvedeno na više staničnih linija. S time, izabrala bih optimalne uvjete, čime bi se uspješnije aktivirao/inhibirao NRF2 i posljedično uspješnije interpretirala rezultate vezane s promjenama ekspresije AQP3 i AQP5. Kada je riječ o analizi ekspresije RNA, nedostatak uzoraka također ograničava ovo istraživanje. Iako su uzorci bili pohranjeni po uputama proizvođača, došlo je do degradacije RNA uzoraka koji se nisu mogli upotrijebiti za daljnje eksperimente. Nažalost, svi uzorci RNA stanične linije MCF7 su bili neiskoristivi za daljnju analizu. Sljedeće, ovo istraživanje se primarno fokusiralo na promjene razine transkripcije i ekspresije AQP kao odgovora na modulaciju NRF2. Daljnja istraživanja *in vitro* bi bila potrebna kako bi se razjasnili potencijalni mehanizmi i potvrdili rezultati u drugim staničnim linijama. Buduća bi istraživanja mogla istražiti mehanizme vezane za regulaciju NRF2 na drugim staničnim modelima, uključujući one s različitim

statusima eksprimiranosti AQP, kako bi se utvrdilo jesu li uočeni slični obrasci. Dodatno, istraživanje specifičnih signalnih putova koji se križaju s NRF2, poput PI3K/Akt/mTOR, i njihove uloge u regulaciji ekspresije AQP-a moglo bi pružiti dublje uvide. Proteomske analize i istraživanja koja uključuju upotrebu inhibitora ili aktivatora za povezane signalne putove mogle bi pomoći u identificiranju temeljnih mehanizama koji posreduju u interakciji između NRF2 i AQP-a, potencijalno otkrivajući nove terapijske ciljeve za bolesti u kojima oksidacijski stres i regulacija akvaporina igraju ulogu.



## 6. Zaključak

Cilj ovog istraživanja je bio istražiti učinak NRF2 na ekspresiju AQP3 i AQP5, s razumijevanjem potencijalne uključenosti signalnog puta PI3K/Akt/mTOR.

Rezultati su pokazali da:

1. U staničnoj linije MCF7 dolazi do porasta ekspresije HO-1 nakon aktivacije NRF2 sulforafanom što potvrđuje djelovanje tretmana i uspješnost aktivacije NRF2.
2. Nakon tretmana inhibitorom ML385 dolazi do povećanja ekspresije *AQP3* kod stanične linije SkBr3.
3. Ekspresija AQP5 nije pokazala značajan odgovor na djelovanje inhibitorom i aktivatorom NRF2 pod testiranim eksperimentalnim uvjetima.

## 7. Literatura

- Ames, B.N., 2018. Prolonging healthy aging: Longevity vitamins and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 10836–10844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809045115>
- Baird, L., Yamamoto, M., 2020. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 40, e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
- Baker, H.M., Anderson, B.F., Baker, E.N., 2003. Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3579–3583. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637295100>
- Bienert, G.P., Chaumont, F., 2014. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, Jr., Krause, K., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Bystrup, M., Login, F.H., Edamana, S., Borgquist, S., Tramm, T., Kwon, T., Nejsum, L.N., 2022. Aquaporin-5 in breast cancer. *APMIS* 130, 253–260. <https://doi.org/10.1111/apm.13212>
- Chahal, A., Saini, A.K., Chhillar, A.K., Saini, R.V., 2018. Natural antioxidants as defense system against cancer. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 11, 38. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.24119>
- Chen, J., Wang, T., Zhou, Y.-C., Gao, F., Zhang, Z.-H., Xu, H., Wang, S.-L., Shen, L.-Z., 2014. Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33, 38. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-38>
- Chen, R., Shi, Y., Amiduo, R., Tuokan, T., Suzuk, L., 2014. Expression and Prognostic Value of Aquaporin 1, 3 in Cervical Carcinoma in Women of Uygur Ethnicity from Xinjiang, China. *PLoS ONE* 9, e98576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098576>
- Crane, J.M., Verkman, A.S., 2008. Long-Range Nonanomalous Diffusion of Quantum Dot-Labeled Aquaporin-1 Water Channels in the Cell Plasma Membrane. *Biophys. J.* 94, 702–713. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115121>
- Cui, F., Hu, M., Li, R., Huang, D., Ma, W., Jia, X., Lv, Z., 2021. Insulin on changes in expressions of aquaporin-1, aquaporin-5, and aquaporin-8 in submandibular salivary glands of rats with Streptozotocin-induced diabetes. *Int J Clin Exp Pathol.* 14(2), 221-229.
- Dinkova-Kostova, A.T., Fahey, J.W., Kostov, R.V., Kensler, T.W., 2017. KEAP1 and NRF2: Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.002>
- Dinkova-Kostova, A.T., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Holtzclaw, W.D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G.W., Sporn, M.B., Talalay, P., 2005. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4584–4589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500815102>
- Dulak, J., Józkwicz, A., Foresti, R., Kasza, A., Frick, M., Huk, I., Green, C.J., Pachinger, O., Weidinger, F., Motterlini, R., 2002. Heme Oxygenase Activity Modulates Vascular Endothelial Growth Factor

Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 229–240. <https://doi.org/10.1089/152308602753666280>

Finkel, T., 2012. Signal Transduction by Mitochondrial Oxidants. *J. Biol. Chem.* 287, 4434–4440. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.271999>

Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch. Toxicol.* 94, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Gwon, Y., Oh, J., Kim, J.-S., 2020. Sulforaphane induces colorectal cancer cell proliferation through Nrf2 activation in a p53-dependent manner. *Appl. Biol. Chem.* 63, 86. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00578-y>

Handy, D.E., Loscalzo, J., 2012. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1323–1367. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4123>

Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2008. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J. Mol. Med.* 86, 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0272-4>

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., Tew, K.D., 2020. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* 38, 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

Hayes, J.D., McMahon, M., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A.T., 2010. Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1–Nrf2 Pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1713–1748. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3221>

Hecht, F., Pessoa, C.F., Gentile, L.B., Rosenthal, D., Carvalho, D.P., Fortunato, R.S., 2016. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.* 37, 4281–4291. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4873-9>

Henzler, T., Steudle, E., 2000. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J. Exp. Bot.* 51, 2053–2066. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.353.2053>

Hofmann, F., 2020. The cGMP system: components and function. *Biol. Chem.* 401, 447–469. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0386>

Horie, Y., Suzuki, T., Inoue, J., Iso, T., Wells, G., Moore, T.W., Mizushima, T., Dinkova-Kostova, A.T., Kasai, T., Kamei, T., Koshiha, S., Yamamoto, M., 2021. Molecular basis for the disruption of Keap1–Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism. *Commun. Biol.* 4, 576. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02100-6>

Hu, J., Verkman, A.S., Hu, J., Verkman, A.S., 2006. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J.* 20, 1892–1894. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5930fje>

Huang, Y.-T., Zhou, J., Shi, S., Xu, H.-Y., Qu, F., Zhang, D., Chen, Y.-D., Yang, J., Huang, H.-F., Sheng, J.-Z., 2015. Identification of Estrogen Response Element in Aquaporin-3 Gene that Mediates Estrogen-induced Cell Migration and Invasion in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *Sci. Rep.* 5, 12484. <https://doi.org/10.1038/srep12484>

Jardim, B.V., Moschetta, M.G., Leonel, C., Gelaleti, G.B., Regiani, V.R., Ferreira, L.C., Lopes, J.R., De Campos Zuccari, D.Ap.P., 2013. Glutathione and glutathione peroxidase expression in breast cancer: An

immunohistochemical and molecular study. *Oncol. Rep.* 30, 1119–1128. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2540>

Jeong, E.-J., Choi, J.J., Lee, S.Y., Kim, Y.S., 2024. The Effects of ML385 on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Implications for NRF2 Inhibition as a Therapeutic Strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 7011. <https://doi.org/10.3390/ijms25137011>

Ji, L., Moghal, N., Zou, X., Fang, Y., Hu, S., Wang, Y., Tsao, M.S., 2023. The NRF2 antagonist ML385 inhibits PI3K-MTOR signaling and growth of lung squamous cell carcinoma cells. *Cancer Med.* 12, 5688–5702. <https://doi.org/10.1002/cam4.5311>

Józkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Dietrich, W., Motterlini, R., Dulak, J., 2003. Heme Oxygenase and Angiogenic Activity of Endothelial Cells: Stimulation by Carbon Monoxide and Inhibition by Tin Protoporphyrin-IX. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 155–162. <https://doi.org/10.1089/152308603764816514>

Jung, H.J., Park, J.-Y., Jeon, H.-S., Kwon, T.-H., 2011. Aquaporin-5: A Marker Protein for Proliferation and Migration of Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 6, e28492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028492>

Kang, S.K., Chae, Y.K., Woo, J., Kim, M.S., Park, J.C., Lee, J., Soria, J.C., Jang, S.J., Sidransky, D., Moon, C., 2008. Role of Human Aquaporin 5 In Colorectal Carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 173, 518–525. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071198>

Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A.-L., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>

Kapeta, S., Chondrogianni, N., Gonos, E.S., 2010. Nuclear Erythroid Factor 2-mediated Proteasome Activation Delays Senescence in Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 285, 8171–8184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031575>

Kitchen, P., Öberg, F., Sjöhamn, J., Hedfalk, K., Bill, R.M., Conner, A.C., Conner, M.T., Törnroth-Horsefield, S., 2015. Plasma Membrane Abundance of Human Aquaporin 5 Is Dynamically Regulated by Multiple Pathways. *PLOS ONE* 10, e0143027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143027>

Kopacz, A., 2022. Overlooked and valuable facts to know in the NRF2/KEAP1 field. *Free Radic. Biol. Med.*

Lee, S.J., Chae, Y.S., Kim, J.G., Kim, W.W., Jung, J.H., Park, H.Y., Jeong, J.Y., Park, J.-Y., Jung, H.J., Kwon, T.-H., 2014. AQP5 Expression Predicts Survival in Patients with Early Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 375–383. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3317-7>

Lee, S.M., Lee, S.W., Kang, M., Choi, J.K., Park, K., Byun, J.S., Kim, D.Y., 2021. FoxO1 as a Regulator of Aquaporin 5 Expression in the Salivary Gland. *J. Dent. Res.* 100, 1281–1288. <https://doi.org/10.1177/00220345211003490>

Licznarska, B., Szaefer, H., Krajka-Kuźniak, V., 2021. R-sulforaphane modulates the expression profile of AhR, ER $\alpha$ , Nrf2, NQO1, and GSTP in human breast cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* 476, 525–533. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03913-5>

Loboda, A., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Rutkowski, A.J., Cisowski, J., Agarwal, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2008. Heme Oxygenase-1 and the Vascular Bed: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1767–1812. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2043>

- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2015. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism — Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascul. Pharmacol.* 74, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.09.004>
- Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T.W., Wasserman, W.W., Biswal, S., 2010. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 38, 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>
- Menegon, S., Columbano, A., Giordano, S., 2016. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* 22, 578–593. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.002>
- Milković, L., Čipak Gašparović, A., 2021. AQP3 and AQP5—Potential Regulators of Redox Status in Breast Cancer. *Molecules* 26, 2613. <https://doi.org/10.3390/molecules26092613>
- Milkovic, L., Zarkovic, N., Saso, L., 2017. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* 12, 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.013>
- Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., Motohashi, H., 2012. Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.016>
- Mlinarić, M., Lučić, I., Milković, L., Da Silva, I.V., Tartaro Bujak, I., Musani, V., Soveral, G., Čipak Gašparović, A., 2023. AQP3-Dependent PI3K/Akt Modulation in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 8133. <https://doi.org/10.3390/ijms24098133>
- Nesverova, V., Törnroth-Horsefield, S., 2019. Phosphorylation-Dependent Regulation of Mammalian Aquaporins. *Cells* 8, 82. <https://doi.org/10.3390/cells8020082>
- Nitti, M., Piras, S., Marinari, U., Moretta, L., Pronzato, M., Furfaro, A., 2017. HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants* 6, 29. <https://doi.org/10.3390/antiox6020029>
- Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., 2015. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848, 2576–2583. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.001>
- Pehlivan, F.E., 2017. Vitamin C: An Antioxidant Agent, in: Hamza, A.H. (Ed.), *Vitamin C*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69660>
- Popineau, L., Morzyglod, L., Carré, N., Caüzac, M., Bossard, P., Prip-Buus, C., Lenoir, V., Ragazzon, B., Fauveau, V., Robert, L., Guilmeau, S., Postic, C., Komatsu, M., Canonne-Hergaux, F., Guillou, H., Burnol, A.-F., 2016. Novel Grb14-Mediated Cross Talk between Insulin and p62/Nrf2 Pathways Regulates Liver Lipogenesis and Selective Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2168–2181. <https://doi.org/10.1128/MCB.00170-16>
- Prasad, K., Dhar, I., 2014. Oxidative Stress as a Mechanism of Added Sugar-Induced Cardiovascular Disease. *Int. J. Angiol.* 23, 217–226. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387169>
- Prata, C., Hrelia, S., Fiorentini, D., 2019. Peroxiporins in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1371. <https://doi.org/10.3390/ijms20061371>
- Qin, S., He, X., Lin, H., Schulte, B.A., Zhao, M., Tew, K.D., Wang, G.Y., 2021. Nrf2 inhibition sensitizes breast cancer stem cells to ionizing radiation via suppressing DNA repair. *Free Radic. Biol. Med.* 169, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.006>

- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.-K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T.W., 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3410–3415. <https://doi.org/10.1073/pnas.051618798>
- Ratko Karabasil, M., Hasegawa, T., Azlina, A., Purwanti, N., Purevjav, J., Yao, C., Akamatsu, T., Hosoi, K., 2009. Trafficking of GFP-AQP5 chimeric proteins conferred with unphosphorylated amino acids at their PKA-target motif (152SRRTS) in MDCK-II cells. *J. Med. Invest.* 56, 55–63. <https://doi.org/10.2152/jmi.56.55>
- Rodrigues, C., Milkovic, L., Bujak, I.T., Tomljanovic, M., Soveral, G., Cipak Gasparovic, A., 2019. Lipid Profile and Aquaporin Expression under Oxidative Stress in Breast Cancer Cells of Different Malignancies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/2061830>
- Rojo De La Vega, M., Chapman, E., Zhang, D.D., 2018. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* 34, 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>
- Satooka, H., Hara-Chikuma, M., 2016. Aquaporin-3 Controls Breast Cancer Cell Migration by Regulating Hydrogen Peroxide Transport and Its Downstream Cell Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1206–1218. <https://doi.org/10.1128/MCB.00971-15>
- Shaath, H., Elango, R., Alajez, N.M., 2021. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers* 13, 5350. <https://doi.org/10.3390/cancers13215350>
- Shi, Z., Zhang, T., Luo, L., Zhao, H., Cheng, J., Xiang, J., Zhao, C., 2012. Aquaporins in human breast cancer: Identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 106, 267–272. <https://doi.org/10.1002/jso.22155>
- Shiels, A., Bassnett, S., Varadaraj, K., Mathias, R., Al-Ghoul, K., Kuszak, J., Donoviel, D., Lilleberg, S., Friedrich, G., Zambrowicz, B., 2001. Optical dysfunction of the crystalline lens in aquaporin-0-deficient mice. *Physiol. Genomics* 7, 179–186. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00078.2001>
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sporn, M.B., Liby, K.T., 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* 12, 564–571. <https://doi.org/10.1038/nrc3278>
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Vera-Ramirez, L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., Ramirez-Tortosa, C.L., Granados-Principal, S., Lorente, J.A., Quiles, J.L., 2011. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80, 347–368. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.01.004>
- Wakabayashi, N., Shin, S., Slocum, S.L., Agoston, E.S., Wakabayashi, J., Kwak, M.-K., Misra, V., Biswal, S., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2010. Regulation of Notch1 Signaling by Nrf2: Implications for Tissue Regeneration. *Sci. Signal.* 3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000762>
- Wang, F., Xu, W., Xu, C., Li, J., Lin, J., 2023. Aquaporins and Neuropathic Pain. *Front. Biosci.-Landmark* 28, 35. <https://doi.org/10.31083/j.fb12802035>

- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D., 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235–1243. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>
- Wilkinson, L., Gathani, T., 2022. Understanding breast cancer as a global health concern. *Br. J. Radiol.* 95, 20211033. <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>
- Xian, P., Hei, Y., Wang, R., Wang, T., Yang, J., Li, J., Di, Z., Liu, Z., Baskys, A., Liu, W., Wu, S., Long, Q., 2019. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a nanotherapeutic agent for amelioration of inflammation-induced astrocyte alterations in mice. *Theranostics* 9, 5956–5975. <https://doi.org/10.7150/thno.33872>
- Yde, J., Keely, S.J., Moeller, H.B., 2021. Expression, regulation and function of Aquaporin-3 in colonic epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1863, 183619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183619>
- You, A., Nam, C., Wakabayashi, N., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Kwak, M.-K., 2011. Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Arch. Biochem. Biophys.* 507, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.034>
- Zhang, P., Singh, A., Yegnasubramanian, S., Esopi, D., Kombairaju, P., Bodas, M., Wu, H., Bova, S.G., Biswal, S., 2010. Loss of Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Function in Prostate Cancer Cells Causes Chemoresistance and Radioresistance and Promotes Tumor Growth. *Mol. Cancer Ther.* 9, 336–346. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0589>
- Zhang, Z., Chen, Z., Song, Y., Zhang, P., Hu, J., Bai, C., 2010. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. *J. Pathol.* 221, 210–220. <https://doi.org/10.1002/path.2702>
- Zhu, Z., Jiao, L., Li, T., Wang, H., Wei, W., Qian, H., 2018. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8955>

## 8. Životopis

Ime i prezime: Ana Josipa Jerončić

Datum rođenja: 16.07.1999.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

### OBRAZOVANJE:

---

2021. - 2024. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek, sveučilišni diplomski studij Eksperimentalna biologija, modul: Fiziologija i imunobiologija

2018. - 2021. Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu, sveučilišni preddiplomski studij Biologija i Kemija

2014. - 2018. Srednja škola za dizajn, grafiku i održivu gradnju, Split, gimnazija održivog razvoja

2006. - 2014. Osnovna škola Trstenik, Split

### LABORATORIJSKA STRUČNA PRAKSA:

---

2023. - 2024. Medicinsko sveučilište u Beču, Centar za moždana istraživanja, Odjel patobiologije živčanog sustava (pod vodstvom ap. prof. dr. Isabelle Weinhofer)

2022. Institut Ruđer Bošković, Zavodu za molekularnu medicinu, Laboratoriju za membranski transport i signalizaciju (pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Čipak Gašparović)

### TEČAJEVI:

---

2022. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka (kategorija A)

### PROJEKTI:

---

2023. Institut za moždana istraživanja Zagreb, manifestacija „Tjedan mozga“

2022. Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, manifestacija „Women in Science“

2022. Udruga Profesor Baltazar, Mobilni ZEZ Centar

### VOLONTIRANJE:

---

2021. - 2022. eSTUDENT, tim popularizacija znanosti, Zagreb

### STIPENDIJE:

---

2023. - 2024. Stipendija programa Erasmus+ za stručnu praksu

2022. - 2023. Grad Split, Stipendija za darovite studente

### POČASTI I NAGRADE:

---

2022. Dekanova nagrada, Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu