

# Utjecaj nedostatka Tff3 proteina na ekspresiju jetrenih gena uključenih u apoptozu i metabolizam lipida i glukoze u mišjem modelu starenja

---

Štambuk, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:525018>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Jelena Štambuk

**Utjecaj nedostatka Tff3 proteina na  
ekspresiju jetrenih gena uključenih u  
apoptozu i metabolizam lipida i glukoze u  
mišjem modelu starenja**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Jelena Štambuk

**Effect of Tff3 protein deficiency on  
expression of apoptotic, lipid and glucose  
metabolism relevant genes in aging mouse  
model**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Mirele Baus Lončar. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Mireli Baus Lončar na vođenju kroz ovaj proces, stručnim savjetima i ispravicima te strpljenju. Također bi se htjela zahvaliti doktoranticama Kate Šešelji i Ivi Bazini na pomoći, savjetima, odgovaranju na brojna pitanja i podršci. Prijateljima i obitelji od srca hvala na moralnoj podršci.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek  
rad

Diplomski

## Utjecaj nedostatka Tff3 proteina na ekspresiju jetrenih gena uključenih u apoptozu i metabolizam lipida i glukoze u mišjem modelu starenja

Jelena Štambuk

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tff3 protein pripada skupini Tff proteina koje karakterizira domena s tri petlje nalik trolisnoj djetelini po kojoj su dobili ime. Ekspimiran je u raznim tkivima te ima višestruku funkciju, ovisno o mjestu ekspresije i uvjetima u stanici. Dosadašnja istraživanja su pokazala da Tff3 ima antiapoptotsko djelovanje te da utječe na metabolizam glukoze i lipida u jetri, no točni mehanizmi njegova djelovanja nisu još do kraja proučeni. Apoptoza i metabolizam jetre se mijenjaju starenjem zbog nakupljanja promjena u organizmu. Starenjem se u jetri povećava učestalost apoptoze, dolazi do nakupljanja lipida i smanjene  $\beta$ -oksidacije i ketogeneze što često rezultira razvojem bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je proučiti utjecaj nedostatka Tff3 na ekspresiju apoptotskih gena *Bax*, *Smac*, *Cyc* te gena vezanih uz metabolizam jetre *Hmgcs2*, *Cpt1a*, *Gk* u jetri miševa starih dvije godine. Ekspresiju gena pratili smo metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom, koju smo prethodno optimizirali podešavajući uvjete reakcije i isprobavanjem različitih početnica za relevantne gene. Usporedbom ekspresije gena miševa s nedostatkom proteina sa divljim tipom i statističkom analizom ustanovili smo da nije došlo do statistički značajne promjene, odnosno da nedostatak Tff3 proteina nije izazvao promjenu u ekspresiji ovih jetrenih gena u starim miševima.

(34 stranica, 9 slika, 6 tablica, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Tff3, jetra, starenje, apoptoza, metabolizam

Voditelj: dr. sc. Mirela Baus Lončar, viša znanstvena suradnica

Suvoditelj: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Prof. dr. sc. Božena Mitić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 15.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

# Effect of Tff3 protein deficiency on expression of apoptotic, lipid and glucose metabolism relevant genes in aging mouse model

Jelena Štambuk

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The Tff3 protein belongs to a group of *trefoil factor* family (Tff) peptides that are characterized by the three-loop clover-like domain. It is expressed in multiple tissues and has various functions including effects on apoptosis. The exact function depends on the site of expression and conditions in the cell. Tff3 affects glucose and lipid metabolism in the liver. The exact mechanisms of its action are still a mystery. Apoptosis and liver metabolism change during aging due to progressive changes in the organism. Pathological changes during aging are caused by increased frequency of apoptosis and lipid accumulation, decreases  $\beta$ -oxidation and ketogenesis. This research aimed to study the effect of Tff3 deficiency on the expression of apoptotic genes *Bax*, *Smac*, *Cyc*, and genes related to liver metabolism *Hmgcs2*, *Cpt1a*, *Gk* in the liver of two-year-old mice. We used the quantitative polymerase chain reaction method, but first, we optimized the method by adjusting the conditions and testing different primers for relevant genes. Comparison of gene expression of protein-deficient mice with wild-type and statistical analysis revealed no statistically significant changes. Tff3 protein deficiency did not cause a change in the expression of these liver genes in old mice.

(34 pages, 9 figures, 6 tables, 47 references, original in: Croatian language)

Thesis is deposited in the Central Biological Library.

Keywords: Tff3, liver, aging, apoptosis, metabolism

Supervisor: dr. sc. Mirela Baus Lončar

Co-supervisor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers:

Asst. Prof. Sofia Ana Blažević

Prof. Božena Mitić

Assoc. Prof. Jasna Lajtner

Thesis accepted: 15<sup>th</sup> September 2021

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1. Tff3 protein: struktura, mjesta ekspresije i funkcija .....              | 1  |
| 1.2. Apoptoza i antiapoptotski utjecaj Tff3 .....                             | 3  |
| 1.3. Metabolizam lipida i glukoze u jetri i promjene pod utjecajem Tff3 ..... | 6  |
| 1.4. Promjene u metabolizmu jetre i apoptozi tokom starenja .....             | 9  |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 13 |
| 3. MATERIJAL I METODE .....   | 14 |
| 3.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom .....     | 14 |
| 3.1.1. Poliakrilamidna gel elektroforeza.....                                 | 16 |
| 3.1.2. Analiza efikasnosti amplifikacije .....                                | 16 |
| 3.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena .....                           | 17 |
| 3.2.1. Pokusne životinje i uzorkovanje tkiva .....                            | 17 |
| 3.2.2. Izolacija RNA i provjera čistoće uzoraka .....                         | 17 |
| 3.2.3 Reverzna transkripcija – prebacivanje RNA u cDNA .....                  | 18 |
| 3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom .....                       | 18 |
| 3.2.5. Računalna obrada podataka.....   | 20 |
| 4. REZULTATI.....   | 21 |
| 4.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom .....     | 21 |
| 4.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena .....                           | 23 |
| 5. RASPRAVA .....   | 25 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 29 |
| 7. LITERATURA.....  | 30 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....  | 34 |



## POPIS KRATICA

Akt (PKB) – proteinske kinaza B, engl. *protein kinase B*

Bax (Bcl2l4) – Bcl-2 sličan protein 4, engl. *BCL2 associated X protein*

Bcl-2 – protein 2 B stanice limfoma, engl. *B-cell lymphoma protein 2*

Cpt1a – karnitin palmitoil transferaza-1 a, engl. *carnitine palmitoyltransferase-1*

Cyc – citokrom c, engl. *cytochrome c*

Gk – glicerol kinaza, engl. *glycerol kinase*

G6P – glukoza-6 fosfat, engl. *glucose-6-phosphate*

Hmgcs2 – 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sintaza 2, engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2*

NAFLD – bolest nealkoholne masne jetre, engl. *non-alcoholic fatty liver disease*

NEFA – neesterificirane masne kiseline, engl. *nonesterified fatty acids*

PEPCK – fosfoenolpiruvat karboksi-kinaza, engl. *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*

PGC-1 $\alpha$  – koaktivator 1 alfa receptora gamma za aktivaciju proliferacije peroksisoma, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K – fosfoinozitol-3 kinaza, engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*

PPAR $\alpha$  – receptor alfa za aktivaciju proliferacije peroksisoma, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

qPCR – metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom, engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*

Smac (Diablo) – sekundarni mitohondrijalni aktivator kaspaza, engl. *second mitochondrial activator of caspase (direct IAP-binding protein with low pI)*

STAT3 – transduktor signala i aktivator transkripcije 3, engl. *signal transducer and activator of transcription 3*

TFF – engl. *trefoil factor family*

# 1. UVOD

## 1.1. Tff3 protein: struktura, mjesta ekspresije i funkcija

Grupa malih proteina, koje nalazimo u sisavcima, nazvana *trefoil factor family* (TFF) sastoji se od tri peptida, a to su Tff1, Tff2 i Tff3 (Thim 1997). Prvo otkriveni Tff2 je izoliran iz gušterače svinje i karakteriziran prije otprilike 40 godina pod nazivom SP (engl. *spasmolytic polypeptide*) (Jørgensen i sur. 1981), a nakon njega Tff1, prije zvan pS2, čija je sekvenca zabilježena nakon kloniranja gena reguliranog estrogenom iz humanih tumorskih stanica (raka dojke) (Jakowlew i sur. 1984). Zadnji je otkriven ITF (engl. *intestinal trefoil factor*), to jest Tff3, 1991. godine (Suemori i sur. 1991). Glavna karakteristika ove obitelji proteina po kojoj je i dobila ime jest *trefoil* domena ili „P“ domena koja zbog svoje 3 petlje izgledom podsjeća na trolisnu djetelinu. Petlje se formiraju zbog disulfidnih veza cisteinskih ostataka, što omogućuje proteinu iznimnu stabilnost i rezistenciju na proteaze. Prihvaćena nomenklatura obilježavanja je za humane proteine TFF 1, 2, 3 i mišje Tff 1, 2, 3 dok se geni obilježavaju kao *TFF1*, 2, 3 tj. *Tff 1*, 2, 3. Tff1 i Tff3 imaju samo jednu domenu, ali mogu stvarati homo-dimere, a Tff2 molekula ima dvije domene. Tff3 protein sadrži 59 aminokiselina te posjeduje cisteinski ostatak van domene kojim se može kovalentno vezati za druge molekule disulfidnom vezom (Lubka i sur. 2008).

Svi *TFF* geni nalaze se unutar regije (klastera) od 50kb na dijelu 21q22.3 ljudskog kromosoma (Lubka i sur. 2008), a u miševima se nalaze na 17-tom kromosomu (Baus-Lončar i Giraud 2005). Dijele sličan cis-regulacijski motiv sekvence što upućuje na usklađenu kontrolu ekspresije gena, ali također imaju i specifične signalne sekvence za zasebnu regulaciju (Lubka i sur. 2008). U želučanim stanicama dodatak Tff proteina stimulira dodatno otpuštanje vlastitog, ali i ostalih proteina iz Tff obitelji (Taupin i Podolsky 2003, Baus-Lončar i Giraud 2005). Tff2 i 3 pojačavaju transkripciju Tff1 i 2 vezanjem cis-regulacijskih elemenata njihovih promotora signalnim putem (Baus-Lončar i Giraud 2005).

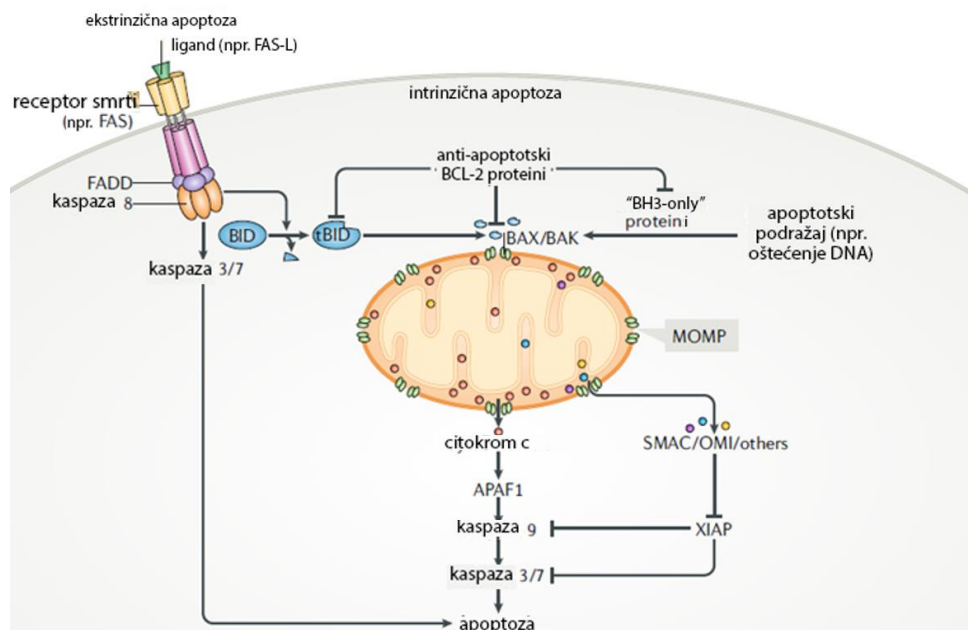
Geni ovih proteina eksprimirani su u raznim tkivima, a ovisno o mjestu ekspresije imaju i raznolike funkcije. Glavne uloge Tff proteina su zaštita epitela i popravak sluznice (Lubka i sur. 2008). Formiraju i stabiliziraju sluznu barijeru, sudjeluju u procesima diferencijacije i restitucije mukoze (Hoffman 2005). Pretežno ih nalazimo u gastrointestinalnoj sluzi, a stanice koje proizvode mucine, odnosno vrčaste stanice, glavno su mjesto Tff sinteze. Na mjestima ekspresije pojedinih Tff peptida uočena je ekspresija određenih mucina. Stanice koje izlučuju

Tff3 na površinu epitela izlučuju i mucin MUC2 (Longman i sur. 2000). Međudjelovanjem mucina i Tff peptida poboljšava se zaština sluznice (Kindon i sur. 1995). Tff2 ima najviše u želucu i crijevima, dok su Tff1 i Tff3 eksprimirani u većem broju tkiva. Mjesta ekspresije Tff3 su žlijezde slinovnice, gušterača, traheja, pluća, tanko i debelo crijevo, jednjak, štitna žlijezda, prostata, jetra, rektum, mliječna žlijezda, suzna vrećica i nazolakrimalni kanal, mozak, vagina, maternica (Madsen i sur. 2007, Lubka i sur. 2008) i dijelovi oka (mrežnica, rožnica i konjuktiva) (Busch i Dünker 2015). Pronađen je i u unutrašnjem uhu te limfnom tkivu štakora (Lubka i sur. 2008).

Regulacijom/modulacijom međustaničnog kontakta, migracije, apoptoze i angiogeneze Tff3 protein omogućava zacjeljivanje površnih rana epitela (Taupin i Podolsky 2003, Hoffman 2005). Omogućuje sigurnu migraciju stanica na oštećeno mjesto radi obnove epitela, točnije inhibira odvajanje stanica od izvanstaničnog matriksa, a time i apoptozu koja bi slijedila (Baus-Lončar i Giraud 2005, Lubka i sur. 2008). Migraciju stanica potiče narušavajući međustanične spojeve i adheziju stanice i substrata (Taupin i Podolsky 2003). Jedan od načina kako Tff3 utječe na regulaciju imunološkog odgovora (Taupin i Podolsky 2003, Lubka i sur. 2008) uključuje zaštitu od štetnog utjecaja sustava komplemenata na epitel crijeva potičući ekspresiju čimbenika ubrzanja raspada (engl. *decay-accelerating factor*, DAF) (Lubka i sur. 2008). U gušterači unutarstanična pojačana ekspresija *Tff3* uzrokuje proliferaciju beta stanica (Fueger i sur. 2008). Tff3 utječe i na energetske metabolizam (Wu i sur. 2019, Xue i sur. 2013). Osim protektivne uloge, pokazuje negativne aspekte svog djelovanja uslijed izmijenjene ekspresije kod nekih upalnih bolesti (Lubka i sur. 2008) kao što su upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD), ulceracija (npr. ulcerozni kolitis) te bolesti mrežnice i rožnice (npr. keratokonus i Fuchsova distrofija) (Busch i Dünker 2015). Brojna istraživanja su pokazala da je Tff3 protein uključen i u tumorogenezu (Taupin i sur. 2001) te je povećana ekspresija *Tff3* prisutna u mnogim tumorskim stanicama (Yamachika i sur. 2002, Okada i sur. 2005). Odvajanje spojeva stanica, antiapoptoza te poticanje angiogeneze su sve načini na koje Tff3 potpomaže opstanku tumorskih stanica. Iako su otkrivene mnogobrojne funkcije Tff3 proteina, njihovi načini djelovanja i signalni putevi nisu još do kraja objašnjeni. Višenamjenska priroda Tff3 te kompleksnost mreže signalnih puteva i brojni faktori koji reguliraju djelovanje ovog proteina predstavljaju veliki izazov za istraživanje i otkrivanje svih funkcija i točnog načina djelovanja.

## 1.2. Apoptoza i antiapoptotski utjecaj Tff3

Apoptoza stanice ili programirana stanična smrt je stanični samodestruktivni mehanizam obrane drugih stanica od neispravnih, oštećenih ili starih stanica i služi za održavanje homeostaze. Za razliku od drugih tipova stanične smrti, apoptoza zahtjeva utrošak energije i podložna je promijeni. Obuhvaća razne biološke događaje i kontrolirana je brojnim genima (Elmore 2007). Apoptoza hepatocita ima ključnu ulogu u zaštiti jer uklanja vanjske/štetne mikroorganizme samouništenjem. Negativna strana hepatocitne apoptoze je njen doprinos kroničnim i akutnim bolestima jetre, kao što su viralni hepatitis, alkoholna (engl. *alcoholic fatty liver disease*, AFLD) i nealkoholna masna jetra (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), poremećaj kolesterola te ishemijsko-reperfuzijska ozljeda. Za apoptozu hepatocita su zadužena dva osnovna puta (Cao i sur. 2016) (slika 1.).



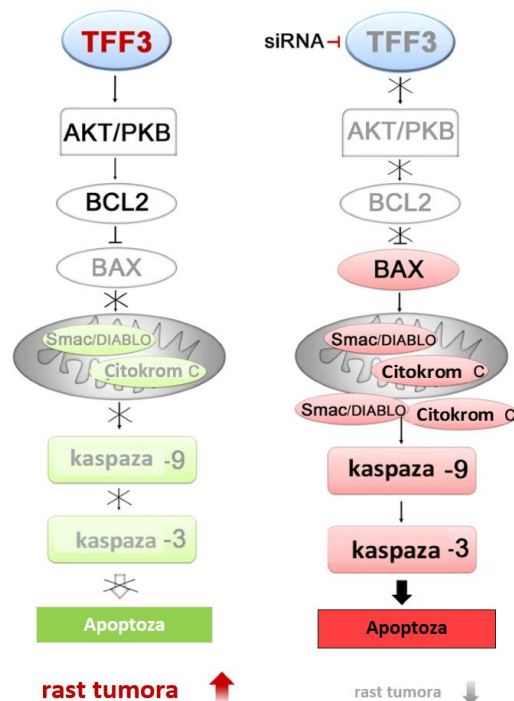
**Slika 1.** Pojednostavljen prikaz ekstrinzične i intrinzične apoptoze (preuzeto i prilagođeno/prevedeno iz Bock i Tait, 2020).

Razlikujemo ekstrinzični ili vanjski put koji se aktivira vezanjem izvanstaničnog liganda na receptor smrti (engl. *death receptor*, DR) na staničnoj membrani te intrinzični ili unutarnji put koji je potaknut unutar stanice većinom u mitohondrijima, a ponekad u endoplazmatskom retikulumu (Singh i Bose 2015) ili lizosomima (Malhi i Gores 2020). Glavne molekule vanjskog puta su ligandi smrti (engl. *death ligands*) FasL (Fas ligand, CD95L engl.

*cluster of differentiation 95*, CD95), TNF $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*), TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing*) i njihovi receptori Fas, TNF $\alpha$ -receptor 1 i TRAIL-R. Vežanjem liganda na receptor dolazi do trimerizacije i konformacijske promijene receptora. Ova promjena uzrokuje okupljanje određenih molekula u blizini DR te oni skupa s receptorom formiraju signalni kompleks koji izaziva smrt (engl. *death inducing signaling complex*, DISC) zadužen za aktivaciju efektor kaskade kaspaza (Cao i sur. 2016). Intrinzična apoptoza obično je potaknuta stresom (Malhi i Gores 2020), odnosno izlaganjem UV svjetlu, gama zračenju, toplini, onkoproteinima, virulentnim faktorima virusa, kemoterapijskim agensima te zbog izmijenjenog potencijala redoksa, mutacija DNA, promjena u stopi metabolizma i unutarstaničnih oštećenja (Singh i Bose 2015). Regulira ju Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma protein 2*) obitelj proteina koju dijelimo na proapoptotske i antiapoptotske. Proapoptotski proteini se još dijele prema broju BH (engl. *Bcl-2 homology*) domena koje su homologni dijelovi njihovih sekvenci. Bak (engl. *BCL2 antagonist killer 1*) i Bax (engl. *BCL2 associated X protein*) imaju tri homologne domene (BH1, BH2 i BH3) koje dijele, dok Bid (engl. *BCL2 antagonist of cell death*), Noxa (engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), Puma (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), Bim (engl. *BCL2 interacting protein*), Bmf (engl. *BCL-2-modifying factor*), Bik (engl. *BCL-2-interacting killer*), Hrk (*harakiri*), i Bad (engl. *BCL-2 antagonist of cell death*) posjeduju samo jednu homolognu BH3 domenu. Bcl-2, Bcl-xL (engl. *BCL2 related protein, long isoform*), Bcl-w (engl. *Bcl-2 like protein 2*), A1, Mcl-1 (engl. *myeloid leukemia cell differentiation protein*) su antiapoptotski proteini. Proapoptotski Bax i Bak nužni su za permeabilizaciju membrane mitohondrija. Bax aktivacijom prelazi iz citosola u mitohondrij, dok se Bak nalazi u vanjskoj membrani mitohondrija. Njihova aktivacija je regulirana ostalim proteinima Bcl-2 obitelji te omogućava izlazak proapoptotskih proteina citokroma c, Smac (SMAC/DIABLO (engl. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI*)), HtrA2/Omi (engl. *Omi stress regulated endoprotease*), AIF (engl. *apoptosis-inducing factor*) i endonukleaze G iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol (Malhi i Gores 2020). Smac inaktivira proteine inhibicije apoptoze (engl. *inhibitors of apoptosis proteins*, IAP) (Du i sur. 2000, Malhi i Gores 2020), a Cyc zajedno sa Apaf1 (engl. *apoptotic protease-activating factor 1*) i ATP formira kompleks zvan apoptosom što dovodi do aktivacije prokaspaze 9 i efektor kaspaze 3 i 7. Kaspaze cijepaju veliki broj substrata u stanici i uzrokuju raspad stanice (Malhi i Gores 2020).

Tff3 i VEGF regulator angiogeneze tumora skupa aktiviraju STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) signalizaciju *in vitro* (HCT8/S11) humanih stanica

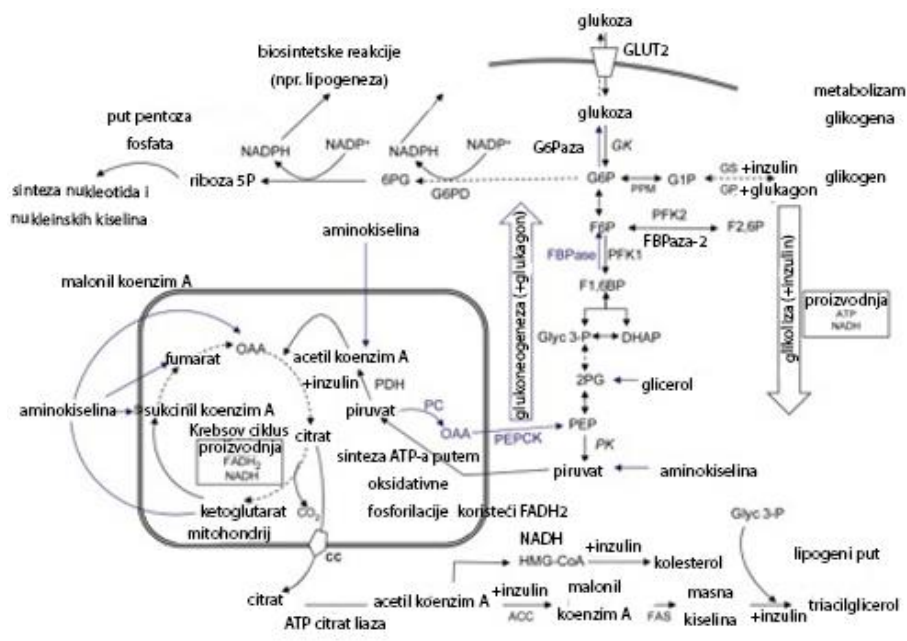
raka debelog crijeva, nakon fosforilacije STAT3 $\alpha$  i STAT3 $\beta$  tirozinom Tyr(705), dok inhibitori STAT3 zaustavljaju razvitak invazivnog fenotipa koji je potaknut djelovanjem Tff3 i VEGF (Rivat i sur. 2005). STAT3 aktivacija Tff3 proteinom rezultira antiapoptotskim i mitogeničnim učinkom (Lubka i sur. 2008), pojačavanjem ekspresije i fosforilacije gena supresora apoptoze Mcl-1 i Bcl-xl (Zhang i sur. 2019). Tff3 može aktivirati i signalni put ERK/MAPK (engl. *extracellular-signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase*) i Akt (proteinske kinaze B), ali i EGF receptora faktora rasta epiderme zajedno sa fosfoinozitol-3 kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) što također može dovesti do antiapoptotskog učinka. Antiapoptotsko djelovanje Tff3 preko aktivacije signalizacije PI3K/Akt puta dokazano je *in vitro* testiranjem humanih tumorskih stanica debelog crijeva (HCT116) te u normalnim epitelnim stanicama crijeva (IEC-6) štakora (Kinoshita i sur. 2000) i (normalnim epitelnim stanicama) ljudskog želudca (GES-1) (Sun i sur. 2014). Primijećen je i utjecaj na molekule donjeg dijela signalnog puta kao što su Bax, Smac i Cyc u tumorskim staničnim linijama (slika 2.). Pretpostavlja se da utišavanje *TFF3* gena rezultira povećanjem ekspresije proapoptotskih gena *Bax* (Gao i sur. 2015, Liu i sur. 2018), *Smac* i *Cyc* (Liu i sur. 2018). Još jedan od načina na koji Tff3 sprječava apoptozu je putem aktivacije nuklearnog faktora kappa B (NF $\kappa$ B) vjerojatno preko aktivacije Twist proteina (Lubka i sur. 2008).



**Slika 2.** Shematski prikaz predloženog mehanizma utjecaja TFF3 na proapoptotske gene Bax, Smac i Cyc u kancerogenezi (preuzeto i prilagođeno iz Liu i sur. 2016).

### 1.3. Metabolizam lipida i glukoze u jetri i promjene pod utjecajem Tff3

Jetra je metabolički organ koji ima ključnu ulogu u energetskom metabolizmu cijeloga tijela. U njoj se nutrijenti iz probavnog sustava, glukoza, masne kiseline i aminokiseline, raznim procesima pretvaraju u druge molekule za sigurnu upotrebu ili pohranjivanje u raznim tkivima radi skladištenja energije (Ozougwu, 2017). Glukoza ulazi i izlazi iz hepatocita kroz membranski transporter GLUT2. U hepatocitima glukokinaza fosfolira glukozu u glukozu-6 fosfat (G6P) koji ne može izaći kroz transportere te se tako zadržava u stanici. G6P se koristi za sintezu glikogena u stanju sitosti, a dok je potrebna energija dobiva se glikogenolizom te dalje metabolizira do piruvata. Piruvat se premješta u mitohondrij i oksidira u potpunosti za dobivanje energije, odnosno ATP-a. Piruvat se može iskoristiti i za nastanak masnih kiselina lipogenezom. Metabolizmom glukoze upravljaju dva hormona gušterače, inzulin i glukagon (slika 3).



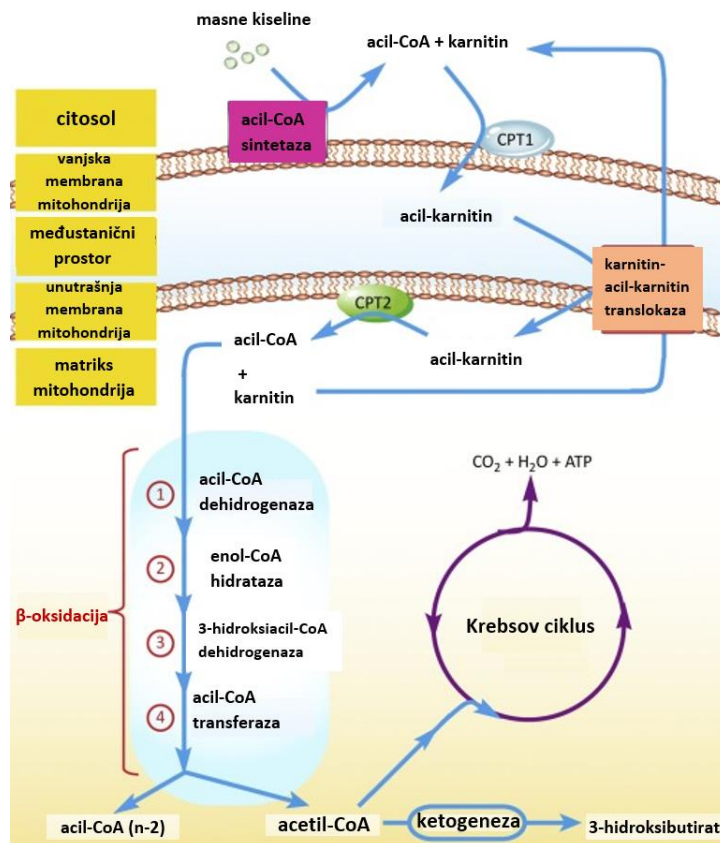
**Slika 3.** Prikaz metabolizma glukoze i lipida u jetri te utjecaja inzulina i glukagona (preuzeto i prilagođeno iz Gyamfi i Danquah 2016).

U stanju sitosti, dok su razine glukoze u krvi visoke, inzulin potiče sintezu glikogena i lipogenezu, a sprječava glikogenolizu, glukoneogenezu,  $\beta$ -oksidaciju i ketogenezu. Inzulin fosfolira koaktivator PGC-1 $\alpha$  (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) putem Akt i time sprječava njegovo djelovanje na receptor za aktivaciju proliferacije peroksisoma PPAR $\alpha$  (engl. *peroksisome proliferator-activated receptor alpha*) i

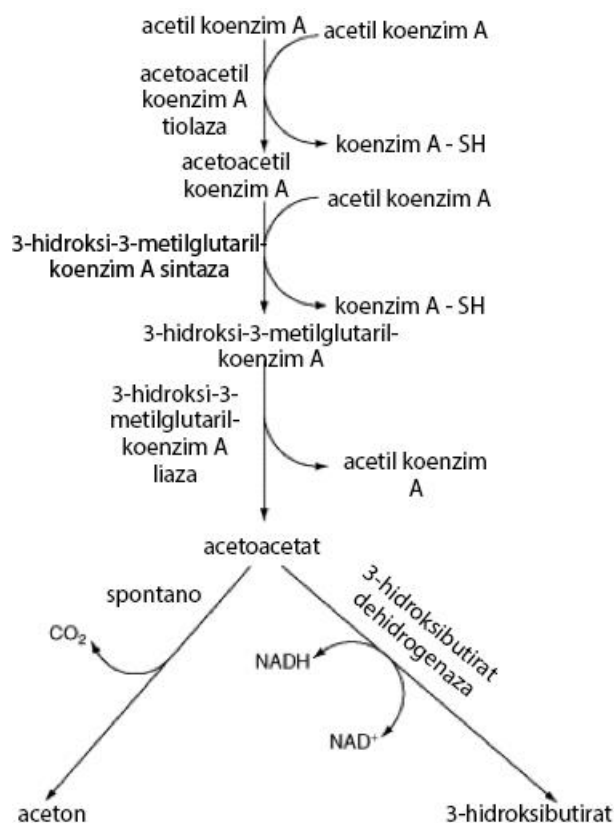
ciljne gene. Oslabljena reakcija organizma na inzulin naziva se inzulinska rezistencija. Inzulinska rezistencija prisutna je u razvitku dijabetesa tipa 2 te također doprinosi patogenezi NAFLD. U odnosu na inzulin, glukagon ima suprotno djelovanje na procese metabolizma u jetri i djeluje tokom gladovanja. Za vrijeme gladovanja, određeni procesi u jetri omogućavaju iskorištavanje pohranjene energije. Kratki period gladovanja uzrokuje glikogenolizu kojom se glikogen pretvara u glukozu, dok duže vrijeme gladovanja rezultira glukoneogenezom,  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina i ketogenezom (Rui 2014). Glukoneogeneza koristi substrate glukogene aminokiseline, laktat, proprionat i glicerol za sintezu glukoze pomoću enzima piruvat karboksilaza, fosfoenolpiruvat karboksikinaza (engl. *phosphoenolpyruvate carboxylase kinase*, PEPCCK), fruktoza 1,6-bifosfataza, glukoza 6-fosfataza i glicerol kinaza (Gk) (Engelking 2015). Dostupnost supstrata i ekspresija, odnosno aktivacija enzima glukoneogeneze utječe na njenu stopu. Glicerol, kao i neesterificirane masne kiseline (engl. *nonesterified fatty acids*, NEFA), ulazi u hepatocite nakon lipolize u adipocitima masnog tkiva. U jetri glicerol kinaza fosforilira glicerol te nastaje glicerat-3-fosfat koji procesom glukoneogeneze stvara glukozu (Rui 2014). Glicerat-3-fosfat također je bitan za formaciju triacilglicerola i pohranjivanje masti/lipida. Produkt djelovanja glicerol kinaze ovim dvjema ulogama potvrđuje važnost učinka ovog enzima za metabolizam glukoze, ali i masti (Rahib 2007). NEFA se oksidiraju u mitohondrijima hepatocita procesom  $\beta$ -oksidacije i stvaraju ketonska tijela koja se koriste za dobivanje energije. Beta-oksidacija masnih kiselina ne stvara supstrate za glukoneogenezu, ali generira ATP koji je potreban za metabolizam glukoze. Dva ključna enzima koja upravljaju metabolizmom slobodnih masnih kiselina su karnitin palmitoil transferaza-1 a (engl. *carnitine palmitoyltransferase-1*, Cpt1a) i 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A sintaza 2 (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2*, Hmgcs2). Cpt1a je zadužen za  $\beta$ -oksidaciju, a Hmgcs2 za ketogenezu (Geisler i Renquist 2017), ali također regulira i  $\beta$ -oksidaciju (Villà-Brau i sur. 2011). Cpt1a kodira za Cpt1 protein vanjske membrane mitohondrija koji prenosi dugolančane masne kiseline u mitohondrij u obliku acilkarnitina i omogućava proces  $\beta$ -oksidacije (Xiong 2018, slika 4.). Inhibira ga malonil-CoA. Molekule acetil-CoA nastale  $\beta$ -oksidacijom koriste se za ketogenezu (Geisler i Renquist 2017). Dvije molekule acetil-CoA se spajaju i nastaje acetoacetyl-CoA. Hmgcs2 enzim spaja acetoacetyl-CoA s još jednom molekulom acetyl-CoA (Barnett i Barnett, 2003, slika 5.) i time omogućava produkciju ketonskih tijela (Geisler i Renquist 2017). Ekspresija Cpt1a i Hmgcs2 ovisi o signalizaciji i ekspresiji peroksisom proliferator-aktiviranog receptora PPAR $\alpha$ . Ekspresija Hmgcs2 nužna je za i potiče  $\beta$ -oksidaciju preko aktivacije PPAR $\alpha$  te je u ovom slučaju PPAR $\alpha$  je aktiviran svojim ciljnim genom (Villà-Brau i sur. 2011). PPAR $\alpha$  pojačava i ekspresiju gena



glukoneogeneze PEPCCK i G6Paze (Geisler i Renquist 2017). Smatra se da PPAR $\alpha$  također potiče ekspresiju Gk te utječe na metabolizam glicerola (Mazzucotelli i sur. 2007, Patsouris 2007) i glukoze tokom gladovanja (Patsouris 2007). PGC-1 $\alpha$  je koaktivator PPAR $\alpha$  te pojačava njegovo djelovanje i ekspresiju njegovih ciljnih gena (Geisler i Renquist 2017). Mitohondrijski sirtuin 3 (SIRT3) također djeluje na ove procese, on potiče  $\beta$ -oksidaciju i ketogenezu tokom perioda gladovanja (Rui 2014).



**Slika 4.** Shematski prikaz oksidacije masnih kiselina (preuzeto i prilagođeno iz Xiong, 2018).



**Slika 5.** Ketogeneza (preuzeto i prilagođeno iz Barnett i Barnett, 2003)

Novije otkriće direktnog vezanja Tff3 proteina na promotor gena *PPARα* pojašnjava njegov utjecaj na metabolizam lipida i glukoze u jetri. Tff3 potiče ekspresiju *PPARα* i a time i ekspresiju njegovih ciljnih gena te time ubrzava oksidaciju masnih kiselina i ketogenezu (Wu i sur. 2019). Kod pretilih miševa, miševa s dijabetesom i miševa hranjenih masnom hranom, uočena je smanjena razina ekspresije *Tff3* u jetri (Xue i sur. 2013), a nakon tretmana povišena ekspresija *Tff3* kod takvih miševa poboljšava toleranciju glukoze i osjetljivost na inzulin te smanjuje ekspresiju *G6PC*, *PEPCK* i *PGCα* glukoneogenih gena (Xue i sur. 2013, Ge i sur. 2015).

#### 1.4. Promjene u metabolizmu jetre i apoptozi tokom starenja

Starenje je postepena akumulacija promjena koje nastupaju prolaskom vremena uz povećanu podložnost razvoja bolesti i smrti (Harman 1981). Starenjem se narušava homeostaza na razini genoma, stanice, tkiva te cijelog organizma (Hunt i sur. 2019). Glavne karakteristike starenja kod sisavaca su povećan mortalitet s dobi nakon sazrijevanja, promjene biokemijske

kompozicije u tkivu, progresivno smanjenje fizioloških mogućnosti, smanjena sposobnost adaptivnog odgovora na podražaje okoline, povećana osjetljivost i podložnost bolesti (Troen 2003). Na razini stanice tokom starenja dolazi do raznih epigenetskih izmjena koje dovode do nestabilnosti genoma, trošenja telomera, nepravilne regulacije homeostaze nutrijenata, gubitka proteostaze (proteinske homeostaze), izmijenjene međustanične komunikacije, senescencije stanice, disfunkcije mitohondrija, smanjenog broja i narušene funkcije matičnih stanica, upale i narušene adaptacije na stres (Hunt i sur. 2019). Tokom starenja dolazi do kvalitativnih promjena proteina što dovodi do izmijenjene funkcije istih. Smanjuje se specifičnost aktivnosti mnogih enzima, mijenja se njihova otpornost na toplinu te se povećava koncentracija proteinskih karbonila. Ove promjene mogu nastati direktnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka, oksidacijom koju katalizira metal, modifikacijom produkata oksidacije lipida ili glikacijom. Glikacija (reakcija karbohidrata sa amino grupama proteina) rezultira produktima AGE (engl. *advanced glycosylation end-products*) kojih je sve više tokom starenja, a povezuje ih se s dijabetesom, poremećajima oka i akumulacijom amiloida (Troen 2003).

Jetra je kompleksni metabolički organ koji održava homeostazu cijelog organizma regulirajući energetske metabolizam, biosintezu molekula te zbrinjavanje ksenobiotika i endobiotika. Promjene u funkcionalnosti jetre koje nastupaju tokom starenja doprinose razvoju bolesti, kao što su dijabetes (*diabetes mellitus*), NAFLD i rezistencija na inzulin. Senescentni hepatociti imaju izmijenjenu ekspresiju Glut2 i Glut4 te gena zaduženih za metabolizam glukoze, lipida i proteina signalnih puteva kao što su PI3K/Akt, MAPK, Jak (Janus kinaza)/STAT, NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$  (faktor rasta tumora), IGF1 (faktor rasta nalik inzulinu 1) i Ca<sup>2+</sup>/cAMP (ciklički adenzin monofosfat). Imaju povećanu akumulaciju lipidnih kapljica i produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) te smanjen kapacitet mitohondrijske oksidacije što odgovara stanju masne jetre kod raznih poremećaja te objašnjava višu pojavu NAFLD kod starijih ljudi (Hunt i sur. 2019). Odmakla dob utječe na proces oksidacije masnih kiselina što vidimo po smanjenoj ekspresiji gena Cpt1b, UCP3 (engl. *uncoupling protein 3*) te smanjenoj aktivnosti acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca u jetri miševa. Smanjuje se i esterifikacija karnitina na membrani mitohondrija što doprinosi oslabljenju procesa oksidacije masnih kiselina u starosti (Gong i sur. 2016). Također je smanjena razina ekspresije *PPAR $\alpha$*  i njegovih ciljnih gena, *Cpt1a* bitnog za  $\beta$ -oksidaciju (Wan i sur. 2020, Chung 2021) i *Hmgcs2* (Sengupta i sur. 2010) što se očituje i smanjenom ketogenezom u starosti (Sastre i sur. 1996, Sengupta i sur. 2010). Starenje vodi prema inzulin rezistenciji koja povećava razine cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina. Kod inzulin rezistencije očekivali bi pojačanje

glukoneogeneze, smanjenje glikogena i inhibiciju *de novo* lipogeneze (DNL) zbog visoke razine inzulina, no u bolesti masne jetre i dalje dolazi do DNL te postotak lipidne akumulacije nastale zbog *de novo* lipogeneze je povišen za 30% (Gong i sur. 2016).

Smanjena funkcionalnost jetre tokom starenja očituje se i povećanom apoptozom. Većina literature upućuje na povećanu stopu apoptoze i kod normalnog i patološkog starenja jetre. Kako starenjem opada funkcionalnost, nastaju sve češće oštećenja i nepravilnosti u stanicama te su mehanizmi popravka ili imunostne zaštite oslabljeni, neispravne stanice podvrgavaju se apoptozi (Zhong i sur. 2017, Hu i sur. 2019). Oksidacijski stres, nestabilnost genoma, lipotoksičnost, stres endoplazmatskog retikuluma te poremećena regulacija homeostaze nutrijenata glavni su uzroci apoptoze starih hepatocita. Oksidacijski stres, odnosno povećan broj reaktivnih kisikovih vrsta može dovesti do kolapsa potencijala membrane mitohondrija što uzrokuje premještanje Bax i Bad proteina i formaciju pora na membrani kroz koje prolaze proapoptotski faktori kao što je Cyt c koji potiču intrinzičnu apoptozu. Akumulacija reaktivnih kisikovih vrsta može izazvati aktivaciju signalnog puta c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) koji zatim aktivira ekstrinzični ili intrinzični put apoptoze. Promjene i oštećenja DNA, bilo da se radi o nuklearnoj ili mitohondrijskoj DNA ili disfunkciji telomera, uz slabljenje sposobnosti popravka DNA sa starenjem dovodi do proapoptotskog ili antiapoptotskog odgovora (različitih signalnih puteva) stanice ovisno o razini štete (Zhong i sur. 2017). Tokom starenja dolazi do nakupljanja lipida koji se zatim prenose u druga neadipozna tkiva, kao što je jetra te se pretvaraju u reaktivne lipide i uzrokuju lipotoksičnost. Lipotoksičnost vodi ka apoptozi stanica jetre koja doprinosi patogenezi NAFLD (Zhong i sur. 2017, Hu i sur. 2019). Apoptoza izazvana lipotoksičnim djelovanjem primarno se odvija putem ekstrinzične apoptoze, ali se u nekim istraživanjima navodi sinergističko djelovanje faktora vezanih uz oba tipa apoptoze. Glavni mehanizmi uključuju povišenu ekspresiju *death* receptora, aktivaciju p53 i aktivaciju NF- $\kappa$ B (Zhong i sur. 2017). Lipotoksičnosti je usko povezana sa stresom endoplazmatskog retikuluma (ER) koji također uzrokuje apoptozu (Hu i sur. 2019). Stres ER i smanjena aktivnost ATP-aze za transport kalcija sarkoendoplazmatskog retikuluma u stanicama stare jetre rezultira nakupljanjem  $Ca^{2+}$  u ER što potiče apoptotske proteine Bcl-2 obitelji i intrinzičnu apoptozu. Još jedan od uzroka pojačane apoptoze tokom starenja je poremećena regulacija homeostaze nutrijenta za koju su zaduženi inzulin i inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1) signalni put te sirtuin 1. Njihova učinkovitost opada starenjem, a inače reguliraju ekspresiju gena i izmjenu proteina nakon abnormalne koncentracije nutrijenata kako bi pomogli stanicama da se prilagodi na stres i izbjegne apoptozu. Njihovo djelovanje se očituje u izmjenama intrinzičnog puta

apoptoze. Tretman starih štakora kojim se povisila razina IGF-1 rezultirao je poboljšanjem nekih parametara disfunkcije mitohondrijske membrane, smanjena je aktivacija kaspaza te apoptoza u odnosu na kontrolnu skupinu (Puche i sur. 2008), dok je tretman s faktorom rasta koji aktivira isti signalni put rezultirao smanjenjem oksidativnog stresa, povećanom proizvodnjom ATP te sprječavanjem otpuštanja mitohondrijskog citokroma c i intrinzične apoptoze (Tresguerres i sur. 2008). Mnoge negativne promjene koje prate proces starenja većinom potiču apoptozu, no starost može rezultirati i smanjenom sposobnošću apoptoze. U nekim slučajevima sposobnost uništavanja neispravnih stanica apoptozom tokom starenja je narušena što pogoduje razvoju tumora. Starenjem je učestalost kancerogeneze znatno povećana. Agonisti PPAR $\alpha$  mogu potisnuti hepatocitnu apoptozu te se smatra da aktivacija PPAR $\alpha$  smanjuje ekspresiju mRNA Bax i Fas i razinu kaspaze-2, zaustavlja apoptozu i time potiče nastanak raka jetre. Suprotno tome, tumor supresorski gen p53 sprječava nastanak tumora aktivacijom intrinzične apoptoze (Hu i sur. 2019). Unatoč mnogobrojnim istraživanjima utjecaj starenja na promjene u apoptozu nije do kraja objašnjen i te su potrebna daljnja testiranja kako bi precizirali signalne puteve i promjene u ekspresiji (Zhong i sur. 2017, Hu i sur. 2019). Kompleksnost starenja te veliki broj unutrašnjih i vanjskih faktora koji utječu na preživljavanje ili odumiranje stanice otežava pronalazak točnog mehanizma regulacije apoptoze u staroj jetri (Zhong i sur. 2017). Na primjer, Higami i Shimokaza (2000) navode da su frekvencija i podložnost apoptozu u fiziološkim uvjetima *in vivo* povišeni u hepatocitima starih glodavaca i u svojem su istraživanju zamijetili povišenu ekspresiju p53, Fas receptora i Fas liganda kod starijih štakora u odnosu na mlađe, dok je ekspresija Bax i Bcl-xL ostala nepromijenjena. Drugo istraživanje pokazalo je povećano otpuštanje proapoptotskog proteina Cyc iz mitohondrija u citosol te povećani omjer Bax/Bcl-2 kod starijih u odnosu na mlađe životinje (Molpeceres i sur. 2007). Suprotno tome, Mach i sur. (2015) su zabilježili smanjene razine apoptotskih proteina Bax, Bak, Bid, Bcl-xL te neizmijenjene za Cyc, kaspazu-9, AIF, ali značajno povećanu aktivnost kaspaza -3, -6 i -7. Stoga, znamo za sigurno da pod određenim uvjetima tokom starosti dolazi do povećane intrinzične apoptoze, ali ne znamo sa sigurnošću kako se mijenja ekspresija proapoptotskih gena. Moguće je i da ne dolazi do promijene u ekspresiji već da je samo pojačano njihovo djelovanje uslijed povećane permeabilnosti mitohondrijske membrane.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi ulogu nedostatka Tff3 proteina na ekspresiju gena uključenih u apoptozu i metabolizam lipida i glukoze u jetri miševa starih dvije godine. Prvi cilj istraživanja bio je uspostaviti i validirati specifične alate tj. optimizirati metodu kvantitativne lančane reakcije polimeraze kako bi kasnije pravilno i specifično detektirali željene gene. Utjecaj nedostatka Tff3 ispitali smo uspoređujući ekspresiju gena *Bax*, *Cyc*, *Smac*, *Hmgcs2*, *Cpt1a* i *Gk* u jetri miševa *Tff3*<sup>-/-</sup>/C57BL6/N i C57BL6/N genotipa.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom

Eksperimentalnome dijelu moga diplomskog rada prethodio je metodološki dio koji je obuhvaćao optimizaciju i uspostavu uvjeta metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) za odabrane gene. Metodološki dio, odnosno optimizacija je nužna za dobivanje uspješne i specifične reakcije te utvrđivanje najpogodnijih početnica. Specifičnost reakcije sam morala provjeriti, odnosno postići optimizacijom jer sam za qPCR metodu koristila nespecifičnu SYBR green I boju koja interkalira u sve dobivene dvolančane produkte.

Optimizaciju sam provela tako što sam umnožila šest gena od interesa s dva para početnica za svaki te sam provjerila različite uvjete reakcije koristeći PCR uređaj termokružnik StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Početnice koje sam koristila bile su dizajnirane pomoću programa *Primer Quest Tool* i navedene su u tablici 1. Uvjeti reakcije koje sam mijenjala bili su koncentracija  $MgCl_2$  u reakcijskoj smjesi i različite temperature vezanja početnica. Svaki par početnica kombinirala sam s tri različite koncentracije  $MgCl_2$ , 2,5mM, 3mM i 3,5mM, dok su različite temperature vezanja početnica bile u rasponu od 57°C do 65°C.

Nakon qPCR reakcija provjeravala sam uspješnost i specifičnost za različite isprobane uvjete. Prvo sam napravila analizu krivulje taljenja produkata (engl. *melting curve*). Produkti sa jednim vrhuncem krivulje taljenja predstavljaju produkte sa identičnom temperaturom denaturiranja produkta. Moguće je da nastane više produkata sa istom temperaturom taljenja, stoga sam napravila dodatnu provjeru elektroforezom qPCR produkata na poliakrilamidnom gelu. Kao posljednji korak metodološkog dijela napravila sam analizu efikasnosti amplifikacije za određene početnice.

**Tablica 1.** Popis gena i njihovih početnica koje smo isprobavali tokom optimizacije metode qPCR

| <b>Gen</b>   | <b>Počelnica</b> | <b>Sekvenca (5'-3')</b> |
|--|------------------|-------------------------|
| <b><i>Hmgcs2</i></b><br><br><b>(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2)</b> | Hmgcs2 F         | CCAGGACATCCAAGGCTATAAA  |
|  | Hmgcs2 R         | AGGATTCTACTTCTGCGTCATC  |
|  | Hmgcs2 F1        | CCTGTGAAGAGGGAGATGAAAG  |
|  | Hmgcs2 R1        | GCCCAGAGTCTGAGAATAAGC   |
| <b><i>Cpt1a</i></b><br><br><b>(carnitine palmitoyltransferase 1a)</b>          | Cpt1a F          | TCGAAACCCAGTGCCTTAAC    |
|  | Cpt1a R          | AAGCAGCACCCCTCACATATC   |
|  | Cpt1a F1         | CCAACGGGCTCATCTTCTAATC  |
|  | Cpt1a R1         | TGGGTACAAAGCACCCATTAC   |
| <b><i>Gk</i></b><br><br><b>(glycerol kinase)</b>                               | Gk F             | GCACTAGAAGCTGTTTGTTC    |
|  | Gk R             | GCTGGTCATTCCATCTAC      |
|  | Gk F1            | GCCTTGGAAGGTGTACCAATA   |
|  | Gk R1            | TAAGAAGCACCCCTGTTCCATAC |
| <b><i>Smac</i></b><br><br><b>(diablo IAP-binding mitochondrial protein)</b>    | Smac F           | GCTCACACCCAAAGCATTC     |
|  | Smac R           | ACACTTGAACATCCGAGTAACA  |
|  | Smac F1          | GCCCTTCTCTAACACGTAATTC  |
|  | Smac R1          | TCACTCTCACTCTCAATCTCTCT |
| <b><i>Cyc</i></b><br><br><b>(cytochrome c)</b>                                 | Cyc F            | CACGCTTTACCCTTCGTTCT    |
|  | Cyc R            | ACTCATTTCCCTGCCATTCTC   |
|  | Cyc F1           | CCCAGTGATGGAGAAGGTAAAC  |
|  | Cyc R1           | GTCCCACTTCCTGACTTGTAAC  |
| <b><i>Bax</i></b>  | Bax F            | GTGGTTGCCCTCTTCTACTTT   |
|  | Bax R            | CAGCCCATGATGGTTCTGAT    |



### Nastavak tablice 1.

|   |        |                      |
|---|--------|----------------------|
| <i>(BCL2 associated X, apoptosis regulator)</i> | Bax F1 | AAGGCCTCCTCTCCTACTT  |
|   | Bax R1 | CAGCCCATCTTCTTCCAGAT |

#### 3.1.1. Poliakrilamidna gel elektroforeza

Elektroforezu sam provela na 12%-tnom poliakrilamidnom gelu (duljina gela 20 cm). Za izradu smjese dva gela pomiješala sam 11,7 ml akrilamida, 9,75 ml 10x Tris-borat-EDTA pufera (TBE), 17,55 ml vode, 390 µl 10%-tnog amonijevog persulfata (APS) i 39 µl tetrametiletilendiamina (TEMED). TBE pufer je napravljen otapanjem 108 g Tris baze [tris (hidroksimetil) aminometan], 55 g borne kiseline i 7,5 g EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol) u 800 ml deionizirane vode te zatim razrijeđen na 1 l deioniziranom vodom. Prije samog nanošenja u jažice gela, uzorcima koje sam odabrala za provjeru sam dodala po 5 µl pufera za nanošenje s bromfenol plavo bojom. Svakom gelu, u jednu od jažica stavila sam 7 µl markera, a u ostale po 15 µl svakog odabranog uzorka s bojom. Nakon 180 minuta elektroforeze pri 100 V i 400 mA, gelove sam tretirala etidijevim bromidom, a zatim stavila u UV transiluminator. Pod UV svjetlom vidjela sam produkte u obliku vrpce, odnosno debljih linija te sam rezultate poslikala.

#### 3.1.2. Analiza efikasnosti amplifikacije

Efikasnost amplifikacije sam određivala za one uzorke kod kojih je dobiven jedan specifični produkt u prethodnim postupcima. Od svakog uzorka cDNA napravila sam dodatna razrjeđenja od 10x i 100x kako bih imala tri različite koncentracije za određivanje efikasnosti. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1,5 µg cDNA, 5 µM parova početnica i matične otopine (engl. *master mix*, sastojci u tablici 4.). Uzorke u tri različite koncentracije umnožila sam u triplikatima koristeći qPCR metodu. Nakon amplifikacije uzoraka, program je izračunao efikasnost umnažanja svakog gena na temelju Ct vrijednosti (engl. *threshold cycle number*) svakog razrjeđenja, odnosno logaritma nagiba linije koja povezuje točke tih vrijednosti. Formula za efikasnost glasi :

$$E = 10^{(-1/\text{nagib})}$$

ili izražena u postocima

$$E = [-1 + 10^{(-1/\text{nagib})}] \times 100.$$

Idealna efikasnost je 100% i znači da se količina DNA svakim ciklusom udvostručuje te da su postavljeni uvjeti reakcije optimalni. U realnim uvjetima teško je postići 100%, odnosno maksimalnu efikasnost za svaku reakciju pa su prihvatljivi odmaci. Uzimala sam u obzir sve rezultate u rasponu od 95% do 110%. Određivanje efikasnosti bilo je ključno, ne samo da bih potvrdila jesam li postavila optimalne uvjete, već i kako bih kasnije mogla usporediti ekspresiju ciljnih i referentnih gena.

### **3.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena**

#### **3.2.1. Pokusne životinje i uzorkovanje tkiva**

Životinje čija tkiva sam koristila za eksperimentalni dio svoga rada bili su mužjaci miševa starosti dvije godine (n=5 po skupini). Jedna skupina sadržavala je miševе soja *Tff3*<sup>-/-</sup>//C57BL6/N, kod kojih se očituje nedostatak gena za Tff3 protein, a druga divlji tip C57BL6/N. Miševi su uzgojeni u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06-2717, držani u standardnim uvjetima te je rad na njima odobriло nadležno bioetičko povjerenstvo i Ministarstvo poljoprivrede (HR-POK-003). Tkiva jetre prikupljena su nakon žrtvovanja cervikalnom dislokacijom, smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena na -80°C za daljnju obradu.

#### **3.2.2. Izolacija RNA i provjera čistoće uzoraka**

Tkivo jetre homogenizirala sam koristeći keramički tučak i tarionik koji sam ohladila tekućim dušikom prije usitnjavanja, kako bi se održala niska temperatura i tkivo se ne bi odmrzlo. Usitnjenom tkivu sam dodala otopinu s puferom za lizu i β-merkaptetanolom, koji denaturira RNaze, u omjeru 100:1. Nakon svakog uzorka tkiva, tarionik, tučak i ostatak pribora čistila sam s destiliranom vodom i etanolom. Homogenizaciju tkiva, kao i daljnji proces izolacije i purifikacije RNA radila sam pomoću komercijalno dostupnog seta kemikalija NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL) prema njihovom protokolu za pročišćavanje totalne RNA iz kultiviranih stanica i tkiva.

Dobivenoj RNA mjerila sam koncentraciju i čistoću koristeći spektrofotometar NanoPhotometer® N60. Kalibrirala sam uređaj s mQ H<sub>2</sub>O, u kojoj je otopljena RNA, a zatim mjerila svaki uzorak 2 puta. Zabilježila sam koncentraciju i vrijednosti A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> i

A260/A230 koje ukazuju na čistoću uzorka. Prema dobivenim vrijednostima koncentracije napravila sam izračun razrjeđenja uzorka za daljnji korak, odnosno reverznu transkripciju. Svaki uzorak, nakon dodavanja mQ H<sub>2</sub>O, imao je jednaku količinu RNA, točnije 1,5 µg po reakciji, kako bi ih kasnije mogla usporediti.

### 3.2.3 Reverzna transkripcija – prebacivanje RNA u cDNA

Metodu reverzne transkripcije, odnosno prevođenje RNA u cDNA napravila sam pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) prema protokolu proizvođača. Matičnu otopinu sam pripremila prema receptu u protokolu koji uključuje korištenje inhibitora RNaze (tablica 2.). RNA i matičnu otopinu sam pomiješala u omjeru 1:1, stavila u PCR uređaj, to jest termokružnik Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) i pokrenula program: 10 minuta na 25°C, 120 minuta na 37°C, 5 minuta na 85°C, te 4°C po završetku reakcije.

**Tablica 2.** Sastav matične otopine za reverznu transkripciju (po reakciji)

| Sastojci reakcijske smjese            | Volumen (µL) |
|---------------------------------------|--------------|
| 10X pufer RT                          | 2            |
| 25X smjesa dNTP (100 mM)              | 0,8          |
| 10X nasumičnih početnica RT           | 2            |
| Reverzna transkriptaza<br>MultiScribe | 1            |
| Inhibitor RNaza                       | 1            |
| Voda bez nukleaza                     | 3,2          |
| Ukupni volumen reakcije               | 10           |

### 3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Dobivena cDNA, korištena je za analizu izričaja ciljnih gena (*Cyc*, *Smac*, *Bax*, *Cpt1a*, *Hmgcs2* i *Gk* te referentnih gena *Actβ* (aktin β) i *β2m* (β-2-mikroglobulin) koje sam umnožila qPCR metodom. Koristila sam odgovarajuće početnice ciljnih gena i uvjete reakcije koji su se pokazali najučinkovitijima kroz proces optimizacije, to jest koji su rezultirali specifičnim

produktom. Za referentne gene koristila sam standardne početnice i uvjete preporučene u literaturi (tablica 3.). U svaku reakcijsku smjesu stavila sam matičnu otopinu čiji je sastav naveden u tablici 4., 1  $\mu$ l parova početnica koncentracije 5  $\mu$ M i 1,5  $\mu$ g cDNA te sam uzorke u jažice qPCR ploče nanosila u triplikatima. Također sam koristila negativne kontrole za svaki gen, koje su sadržavale H<sub>2</sub>O umjesto cDNA. PCR uređaj termokružnik StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) umnožio je cDNA u 40 ciklusa. Tokom svakog ciklusa, nakon minute denaturacije na 95°C, temperatura se mijenjala na temperature vezivanja početnica raspoređene po zonama narednih 30 sekundi te nakon toga 30 sekundi na 72°C tokom faze elongacije za vrijeme koje se očitava fluorescencija. Početna faza je na 95°C i traje tri minute, dok po završetku se temperatura snižava na 4°C.

**Tablica 3.** Referentni geni i njihove početnice

| Gen                          | Početnica         | Sekvenca (5'→3')        | T <sub>m</sub> (°C) | Izvor             |
|------------------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|
| <i><math>\beta</math>2m</i>  | $\beta$ 2M For1   | CCTGCAGAGTTAAGCATGACAGT | 59                  | Ren i sur. (2010) |
|                              | $\beta$ 2M Rev1   | TCATGATGCTTGATCACATGTCT |                     |                   |
| <i>Act<math>\beta</math></i> | $\beta$ -act For1 | GCAAGCAGGAGTACGATGAG    | 58                  | Liu i sur. (2010) |
|                              | $\beta$ -act Rev1 | CCATGCCAATGTTGTCTCTT    |                     |                   |

**Tablica 4.** Sastav matične otopine za qPCR (volumen za jednu probu, izraženo u  $\mu$ l)

|              | <i>H<sub>2</sub>O</i> | <i>dNTP-ovi</i><br>(5mM<br>svaki) | <i>M-</i><br><i>puffer</i> | <i>MgCl<sub>2</sub></i><br>(25mM) | <i>Taq<sub>2</sub></i> | <i>Syber</i><br><i>green</i><br>(1000x) | <i>ROX 100x</i><br><i>referentna</i><br><i>boja</i> | <i>Ukupno</i><br><i>matične</i><br><i>smjese</i> |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|---|---|--|
| <b>2.5mM</b> | 15.75                 |                                   |                            | 2.5                               |                        |   |   |  |
| <b>3mM</b>   | 15.25                 | 1                                 | 2.5                        | 3                                 | 1                      | 0.0025                                  | 0.25  | 23   |
| <b>3.5mM</b> | 14.75                 |                                   |                            | 3.5                               |                        |   |   |  |

\*M-pufer: 800mM KCl, 100 mM Tris-HCl; pH=8,3

### 3.2.5. Računalna obrada podataka

Rezultate umnažanja ciljnih i referentnih gena qPCR-om analizirala sam u računalnom programu REST (engl. *Relative Expression Software Tool*). Program uspoređuje grupe uzoraka, u našem slučaju kontrolnu grupu, tj. uzorke iz miševa divljeg tipa s grupom uzoraka iz *Tff3*<sup>-/-</sup> miševa i računa njihov omjer relativne kvantifikacije na temelju Ct vrijednosti i efikasnosti. Matematički model programa također omogućuje izračun srednjih vrijednosti i standardne pogreške te određuje statističku značajnost rezultata ( $p \leq 0.05$ ) (Pfaffl i sur. 2002). Relativna ekspresija gena računa se jednadžbom:

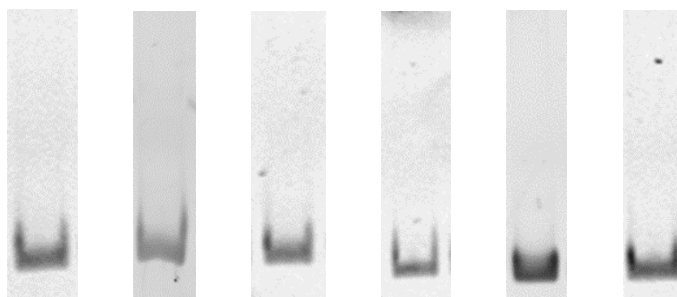
$$R = \frac{(E_{\text{ciljni gen}})^{\Delta C_t \text{ ciljni gen (A kontrola - A uzorak)}}}{(E_{\text{ref. gen}})^{\Delta C_t \text{ ref. gen (A kontrola - A uzorak)}}$$

Vizualni prikaz rezultata grafovima napravila sam pomoću komercijalnog znanstvenog 2D grafičkog i statističkog programa GraphPad Prism 9.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom

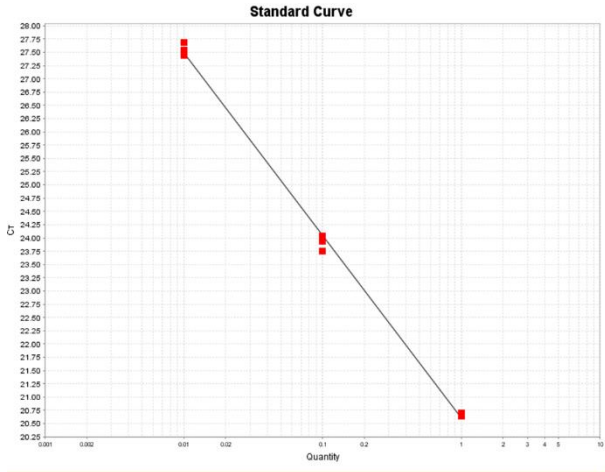
Određenim kombinacijama parova početnica za ciljne gene i uvjeta reakcija dokazala sam postojanje jednog specifičnog produkta na temelju analize krivulje taljenja produkata i poliakrilamidne gel elektroforeze (slika 6.). Optimalni uvjeti i efikasnost amplifikacije navedeni su u tablici 5. Krivulje analize efikasnosti odabranih početnica za ciljne gene prikazane su na slici 7.



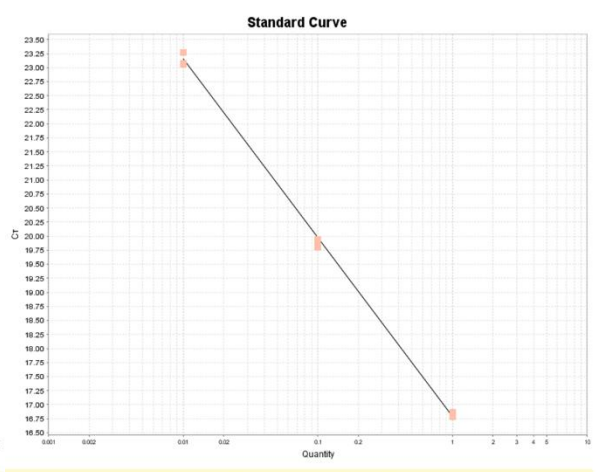
**Slika 6.:** 1.*Gk* 2.*Hmgcs2* 3.*Cpt1a* 4.*Cyc* 5.*Bax* 6.*Smac*, provjera specifičnosti reakcije qPCR odabranih parova početnica elektroforezom

**Tablica 5.** Odabrane početnice i optimalni uvjeti umnažanja

| <i>Slika gela ili krivulje</i> | <i>Gen</i>    | <i>Počelnica</i> | <i>Temperatura(°C)</i> | <i>Koncentracija MgCl<sub>2</sub> (mM)</i> | <i>Efikasnost (%)</i> |
|--------------------------------|---------------|------------------|------------------------|--|-----------------------|
| 1                              | <i>Gk</i>     | Gk F/R           | 58                     | 2,5  | 95                    |
| 2                              | <i>Hmgcs2</i> | Hmgcs2<br>F1/R1  | 64                     | 3  | 106,13                |
| 3                              | <i>Cpt1a</i>  | Cpt1a F/R        | 58                     | 2,5  | 105                   |
| 4                              | <i>Cyc</i>    | Cyc F/R          | 57                     | 3  | 107                   |
| 5                              | <i>Bax</i>    | Bax F/R          | 58                     | 3,5  | 105                   |
| 6                              | <i>Smac</i>   | Smac F/R         | 59                     | 3,5  | 108                   |



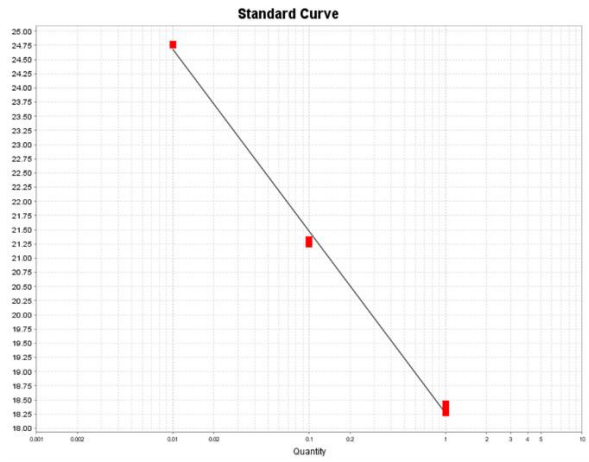
Target: Target 2 Slope: -3.445 Y\_inter: 20.598 R<sup>2</sup>: 0.998 Eff: 95.108



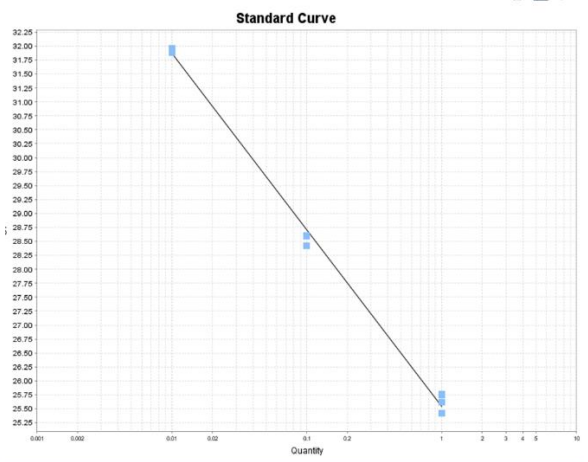
Target: Target 4 Slope: -3.183 Y\_inter: 16.783 R<sup>2</sup>: 0.998 Eff: 106.129

**Slika 7.1. Efikasnost Gk F/R**

**Slika 7.2. Efikasnost Hmgcs2 F1/R**



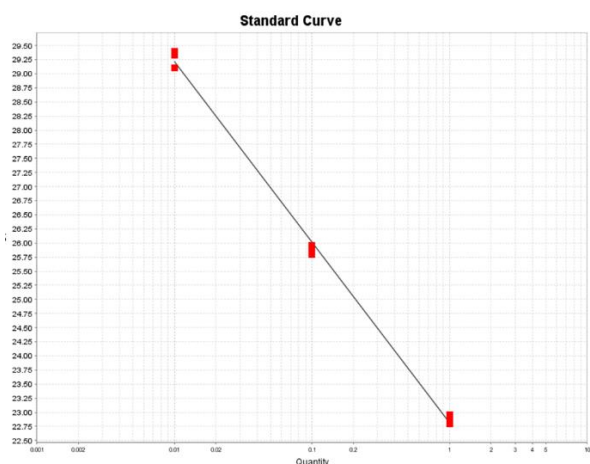
Target: Target 1 Slope: -3.208 Y\_inter: 18.257 R<sup>2</sup>: 0.997 Eff: 105.007



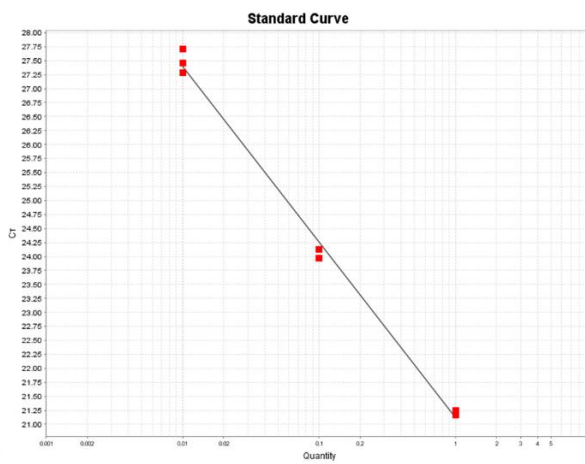
Target: Target 1 Slope: -3.165 Y\_inter: 25.533 R<sup>2</sup>: 0.997 Eff: 106.993

**Slika 7.3. Efikasnost Cpt1a F/R**

**Slika 7.4. Efikasnost Cyc F/R**



Target: Target 4 Slope: -3.2 Y-inter: 22.81 R<sup>2</sup>: 0.998 Eff: 105.371



Target: Target 5 Slope: -3.142 Y-inter: 21.11 R<sup>2</sup>: 0.996 Eff: 108.108

**Slika 7.5. Efikasnost Bax F/R**

**Slika 7.6. Efikasnost Smac F/R**

**Slika 7. (1-6)** Krivulje efikasnosti reakcije. Ct predstavlja broj ciklusa u kojem je dosegnuta razina fluorescencije, odnosno minimalna količina cDNA koju se može jasno detektirati. Pomoću nagiba određuje se efikasnost. Nagib od -3.32 odgovara 100%-tnoj efikasnosti.

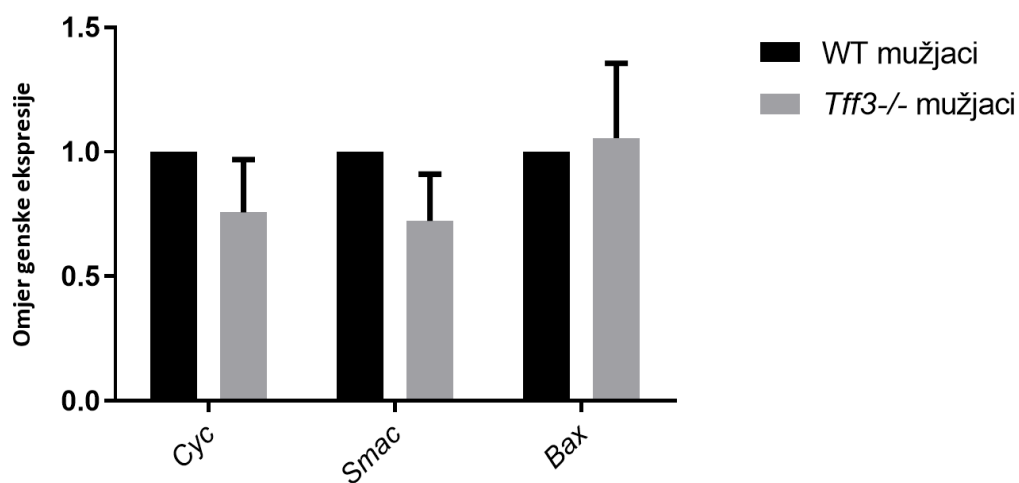
#### 4.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena

Nedostatak Tff3 gena u KO miševima blago je smanjio gensku ekspresiju *Cyc*, *Smac* i *Hmgcs2* (slika 8.) te blago povećao ekspresiju *Bax*, *Cpt1a* i *Gk* (slika 9.). Promjene u ekspresiji nisu dosegle statistički značaj. Rezultati su detaljno prikazani u tablici 6.

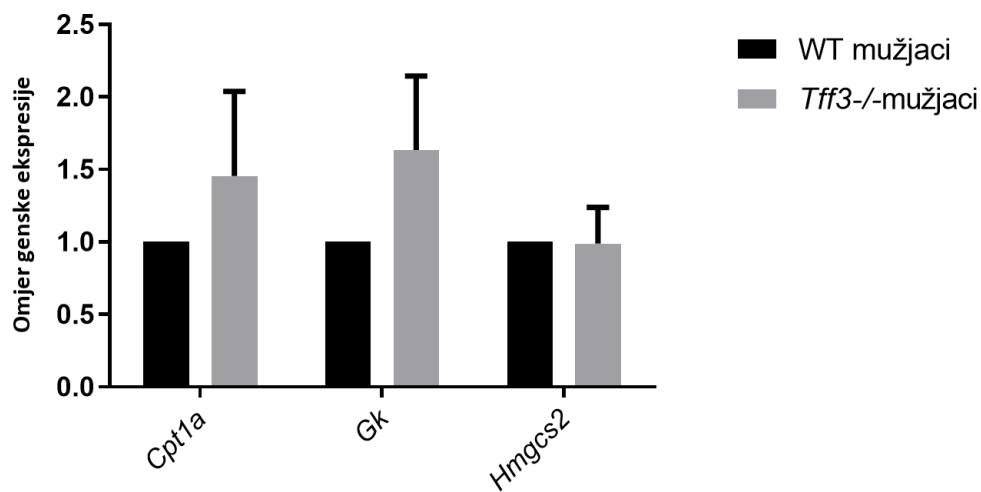
**Tablica 6.** Promjena genske ekspresije gena *Cyc*, *Smac*, *Bax*, *Cpt1a*, *Hmgcs2* i *Gk*

|                                     |               | Omjer genske ekspresije | Apsolutna genska regulacija | Standardna greška | Srednja vrijednost WT | Srednja vrijednost KO |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Apoptoza</i>                     | <i>Cyc</i>    | -1,321                  | 0,757                       | ±0,21194          | 23,267                | 23,195                |
|                                     | <i>Smac</i>   | -1,384                  | 0,723                       | ±0,18835          | 22,524                | 22,519                |
|                                     | <i>Bax</i>    | 1,056                   | 1,056                       | ±0,29959          | 21,614                | 21,062                |
| <i>Metabolizam lipida i glukoze</i> | <i>Cpt1a</i>  | 1,458                   | 1,458                       | ±0,51516          | 17,266                | 16,249                |
|                                     | <i>Hmgcs2</i> | -1,012                  | 0,989                       | ±0,2498           | 14,040                | 13,583                |
|                                     | <i>Gk</i>     | 1,634                   | 1,634                       | ±0,51081          | 21,498                | 20,316                |





**Slika 8.** Ekspresija gena apoptoze *Cyt*, *Smac* i *Bax* WT i KO miševa.



**Slika 9.** Ekspresija gena metabolizma lipida/glukoze *Cpt1a*, *Gk* i *Hmgcs2* WT i KO miševa.

## 5. RASPRAVA

Ovim radom htjeli smo utvrditi utječe li nedostatak Tff3 u dubokoj starosti na procese apoptoze,  $\beta$ -oksidacije, ketogeneze i glukoneogeneze. Na početku smo razvili optimalnu metodu za kvantificiranje. Svoj rad započela sam optimizacijom početnica koje sam koristila u daljnjem radu. Optimizacija je nužna kako bih bila sigurna da su reakcije umnažanja polimerazom specifične i da bi se umnožio samo gen od interesa. U našem istraživanju koncentrirali smo se na odabrane gene uključene u apoptozu (*Bax*, *Cyc*, *Smac*) i metabolizam u jetri (*Hmgcs2*, *Cpt1a*, *Gk*) uzrokovane nedostatkom Tff3 proteina kod *knock-out* miševa duboke starosti. Starosni model smo koristili kako bi pratili ulogu Tff3 prilikom degenerativnih promjena jetre izazvanih starenjem, kao što su veća učestalost i podložnost apoptozi te promjene u metabolizmu jetre.

Rezultati dosadašnjih istraživanja potvrdili su antiapoptotički učinak Tff3 proteina u raznim tkivima, uključujući i jetru. Tff3 aktivira PI3K-Akt (fosfatidilinozitol 3-kinaza-AKT) signalni put te na taj način promovira opstanak stanice (Sun i sur. 2014, You i sur. 2017, Kinoshita i sur. 2000, Liu i sur. 2018, Taupin i sur. 2000). Liu i suradnici (2018) su pokazali da utišani *TFF3* gen u stanicama raka prostate rezultira smanjenjem razine pAkt-1, odnosno sprječava fosforilaciju Akt-1. Također su istražili utjecaj utišavanja *TFF3* na signalne molekule intrinzične apoptoze, čije se djelovanje aktivira ili blokira nakon aktivacije Akt. Stanice s utišanim *TFF3* imale su smanjenu akumulaciju antiapoptotskih proteina Bcl-2, dok je proapoptotski Bax imao povećanu te su izmjerili povećan omjer *Bax/Bcl-2* na razini mRNA. Razine proapoptotskih mitohondrijskih proteina citokroma c i Smac također su bile povišene. Ispitani markeri ekstrinzične apoptoze (receptori TNFR1, Fas i DR4) nisu pokazali značajnu promjenu u ekspresiji između *Tff3*-utišanih i kontrolnih stanica, što potvrđuje da se učinak Tff3 proteina na preživljavanje stanice očituje signalnim putem intrinzične apoptoze. You i sur. (2017) su na tumorskim stanicama jetre utišali *Tff3* što je rezultiralo porastom ekspresije *Bax* gena te smanjenom ekspresijom *Bcl-2*. Njihovi rezultati podudaraju se s Gao i sur. (2015) koji su utišali *TFF3* na stanicama humanog adenoma hipofize te upućuju na pojačanu intrinzičnu apoptozu. Ova istraživanja provedena su na tumorskim stanicama kod kojih je dokazana pojačana ekspresija Tff3 proteina koji blokira njihovu apoptozu (Gao i sur. 2015, Liu i sur. 2018, You i sur. 2017). Ranije istraživanje na tkivu kolona kod miševa bez Tff3 pokazalo je povećanu intestinalnu apoptozu, ali uz normalnu ekspresiju Bcl-2 obitelji proteina, uključujući i *Bax* te smatraju da je za pokretanje antiapoptotičkog signala ključna aktivacija molekule EGFR sa Tff3 (Taupin i sur. 2000).

U našem istraživanju nedostatak *Tff3* također je uzrokovao porast ekspresije *Bax*, ali bez statističkog značaja. Ekspresija *Cyc* i *Smac* bila je blago smanjena, ali isto nije dosegla statistički značaj, stoga nije dokazan antiapoptotski utjecaj *Tff3* kod starih miševa.

*Tff3* protein utječe na metabolizam u jetri tako što se veže direktno na promotor *PPAR $\alpha$*  i povećava ekspresiju *PPAR $\alpha$* , a time i nekih njegovih ciljnih gena (Wu i sur. 2019). *PPAR $\alpha$*  signalizacija dovodi do pojačane transkripcije ciljnih gena uključenih u metabolizam glukoze kao što su *PEPCK*, *G6Paza* (Geisler i Renquist 2017) te *Gk* (i druge koji omogućuju da se glicerol iskoristi za glukoneogenezu, glicerol-3-fosfat dehidrogenaze +cGPDH i mGPDH te akvaporine 3 i 9) (Patsouris i sur. 2004), *Cpt1a* koji regulira  $\beta$ -oksidaciju i *Hmgcs2*, koji kodira ključan enzim ketogeneze i također potiče  $\beta$ -oksidaciju (Geisler i Renquist 2017, Villà-Brau i sur. 2011). *PPAR $\alpha$*  se pogotovo aktivira tijekom perioda gladovanja i kod poremećaja kao što je NAFLD i time sprječava nakupljanje lipida u jetri (Geisler i Renquist 2017). DIO (*diet induced obesity*), HFD (*high fat diet*), ob/ob i db/db miševi, smatraju se fenotipski NAFLD modelom te imaju smanjenu ekspresiju *Tff3* (Wu i sur. 2019, Xue i sur. 2013).

Wu i sur. (2019) su kod takvih miševa uočili značajno smanjenu ekspresiju gena vezanih za  $\beta$ -oksidaciju, uključujući *PPAR $\alpha$*  i *Cpt1a*. Nakon *in vitro* tretmana s *Tff3* proteinima smanjen je izlazak triglicerida i glukoze iz hepatocita te je značajno pojačana ekspresija gena *PPAR $\alpha$*  i *Cpt1a*. Uočili su i povećan sadržaj ketona u serumu što ukazuje na ubrzanje jetrene oksidacije masnih kiselina. Također, ako gledamo zajedno veće količine ketona i inače poznat aktivirajući utjecaj *PPAR $\alpha$*  signalizacije na transkripciju gena *Hmgcs2* (Geisler i Renquist 2017) te stimulirajući učinak *Hmgcs2* na ketogenezu, ali i na  $\beta$ -oksidaciju preko *PPAR $\alpha$*  (Villà-Brau i sur. 2011) onda možemo očekivati pojačanu ketogenezu, odnosno da je došlo do aktivacije *Hmgcs2*. Suprotno tome, u mojem istraživanju pri nedostatku *Tff3*, možemo očekivati smanjenje razine *Hmgcs2*. Uočena je tendencija ka smanjenju, međutim nije dosegnuta statistička značajnost. Omjer genske ekspresije *Cpt1* gena je blago porastao, bez statističkog značaja.

Glicerol kinaza sudjeluje u pretvaranju glicerola u glukozu i kao takvu je možemo gledati kao enzim vezan uz metabolizam lipida/glicerola ili glukoze, točnije glukoneogeneze (Patsouris i sur. 2004, Engelking 2015). Aktivacija *PPAR $\alpha$*  smanjuje razinu glicerola u plazmi te pojačava ekspresiju *Gk* (Patsouris i sur. 2004), a kod *Gk* knock-out miševa je primijećena smanjena razina *PPAR $\alpha$*  (Rahib i sur. 2007). U jetri *Tff3* *-/-* miševa blago je povišen omjer genske ekspresije u odnosu na WT miševe, što bi upućivalo na pojačanu glukoneogenezu, međutim ta vrijednost nije dosegla statističku značajnost. Konverzija glicerola u glukozu

trebala bi biti smanjena pri nedostatku Tff3, jer očekujemo smanjenu aktivaciju PPAR $\alpha$  a time i ciljnog gena *Gk*.

Shah i sur. (2011) su koristeći miRNA *microarray screening* uočili promjene u signalni put za glikolizu/glukoneogenezu u krvnim stanicama Tff3 KO miševa naspram odgovarajućih kontrola divljeg tipa. Time su pokazali da nedostatak Tff3 mijenja normalnu funkciju tog signalnog puta, odnosno ima utjecaj na glukoneogenezu. U jetri ob/ob, db/db i DIO miševa smanjena je razina ekspresije *Tff3*, dok geni glukoneogeneze, *PGC-1 $\alpha$* , *PEPCK* i *G6PC* imaju pojačanu ekspresiju. PGC1 $\alpha$  je koaktivator PPAR $\alpha$  za aktivaciju PEPCK ključnog enzima glukoneogeneze (*rate-limiting enzyme*) (Xue i sur. 2013) i G6PC koji omogućuje prijenos glukoze u krv (Engelking 2015). Razina glukoze u krvi ob/ob, db/db i DIO miševa je povišena naspram kontrolnih miševa divljeg tipa. Povećanjem ekspresije Tff3 *in vitro* u primarnim hepatocitima, posredovano adenovirusom, smanjuje se izlazak glukoze iz stanica te su smanjene razine mRNA glukoneogenih gena *PGC1*, *PEPCK* i *G6PC*. *In vivo*, u ob/ob, db/db i DIO miševima povećanje ekspresije inhibira te iste gene jetrene glukoneogeneze. Uočeno je značajno poboljšanje tolerancije na glukozu kod ob/ob i db/db miševa, nakon pojačane ekspresije Tff3 te veća osjetljivost na inzulin kod db/db (Xue i sur. 2013). Ge i sur. (2015) su zabilježili poboljšanje tolerancije glukoze na DIO modelu s prekomjernom ekspresijom *Tff3* te smanjenu ekspresiju *G6PC*, *PEPCK* i *PGC1 $\alpha$* . Kod Tff3 deficitarnih miševa starosti 12 tjedana na standardnoj prehrani Bujak i sur. (2018) uočili su da su Tff3 KO miševi imali bolju toleranciju na glukozu i inzulin. Također nisu primijetili značajnu razliku u ekspresiji PPAR $\alpha$  kod *Tff3* KO, već samo značajno smanjenu ekspresiju *SIRT1* i *PPAR $\gamma$* . Ove razlike ukazuju na važnost specifičnosti modela koji se koristi (starost, tip prehrane, dodatne genetičke mutacije specifične za pojedini soj miševa).

Dobiveni rezultati našeg istraživanja ukazuju na blage promjene genske ekspresije bez statističkog značaja, što bi značilo da nedostatak Tff3 proteina u Tff3<sup>-/-</sup>/C67B16N crl soju ne uzrokuje promjene u ekspresiji odabranih gena u jetri starijih miševa. Starenjem se smanjuje ekspresija gena vezanih uz metabolizam lipida kao što su *Hmgcs2* (Sengupta i sur. 2010) i *Cpt1a* (Chung 2021), a prethodna istraživanja pokazala su da smanjena ekspresija *Tff3* rezultira smanjenom ekspresijom istih gena, stoga je moguće da u našem istraživanju dob životinja već prestara da bi se uočio eventualni fini utjecaj na promatrane gene. Slično tome, u starosti je obično potaknuta prekomjerna intrinzična apoptoza u hepatocitima, a smatra se da nedostatak ekspresije *Tff3* rezultira povećanjem ekspresije proapoptotskih proteina intrinzičnog puta, kao što je Bax, i nakupljanjem proapoptotskih proteina. Kontrolna skupina (C57B16Ncr1) zbog stare

dobi iskazuje iste parametre kao i *Tff3*<sup>-/-</sup> životinje. Za bolji model istraživanja možda bi trebali provjeriti kako povećana/prekomjerna ekspresija *Tff3* djeluje na stare životinje. Također smatram da su potrebna detaljnija istraživanja intrinzične apoptoze u starosti, točnije proučavanje ekspresije gena intrinzične apoptoze kod WT životinja, kako bi mogli doći do konkretnijih zaključaka. Nakupljanje različitih fizioloških promjena u organizmu kroz dugi period vremena povećava varijabilnost među jedinkama. Poznato je da stariji miševi imaju veću varijabilnost od mladih (Edie 2020) što se pokazalo i u našem modelu. Geni koje smo analizirali sami po sebi su varijabilni zbog uključenosti u procese koji se mijenjaju u starijoj dobi. U istraživanjima utjecaja *Tff3* na apoptozu obično se koriste tumorske stanice u kojima je apoptoza blokirana, a pri praćenju promjena metabolizma WT miševi, miševi skloni dijabetesu ili pretilosti (db/db ili ob/ob), koriste se mladi ili zreli (srednja dob) miševi. Specifičnost navedenih sojeva su dodatne genetičke mutacije koje dovode do specifičnog fenotipa. Soj C57Bl6N Crl nema dodatnih metabolički relevantnih mutacija. Kako smo u našem pokusu koristili miševe starosti dvije godine, koje zbog starosti pokazuju veću varijabilnost među jedinkama, u sljedećim fazama istraživanje nužno je povećati broj jedinki.

## 6. ZAKLJUČAK

Tijekom istraživanja uspostavili smo optimalne reakcijske uvijete za specifičnu detekciju ciljanih gena. Optimizacijom smo odredili najpogodnije početnice te uspostavili reakcijske uvjete metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom za praćenje ekspresije *Bax*, *Cyc*, *Smac*, *Hmgcs2*, *Cpt1a* i *Gk* gena u tkivu jetre 2 godine starih miševa soja *Tff3*<sup>-/-</sup>/*C57BL6/N*, i odgovarajućeg divljeg tipa (*C57Bl6NCrl*).

Usporedbom metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom utvrdili smo da nedostatak *Tff3* proteina u 2 godine starim miševima nije doveo do statistički relevantnih promjena u ekspresiji apoptotskih gena (*Bax*, *Cyc*, *Smac*) i gena koji utječu na metabolizam lipida, odnosno glukoze (*Hmgcs2*, *Cpt1a*, *Gk*). Nedostatak gena za protein *Tff3* u našem modelu nije uzrokovao promijene u ekspresiji navedenih gena kod starih miševa.

## 7. LITERATURA

Barnett C R i Barnett Y A (2003) Ketone Bodies U: Cabarello B (ur.) Encyclopedia of food sciences and nutrition 2nd ed. Academic Pres. str. 3421–3425.

Baus-Lončar M i Giraud AS (2005) Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2921–2931.

Bock FJ i Tait SWG (2020) Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 85–100.

Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Ćosić A, Levak MT, Kopačin V, Mihaljević B, Balog T, Drenjančević I, Baus Lončar M (2018) Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell. Physiol. Biochem.* 47: 827–841.

Busch M i Dünker N (2015) Trefoil factor family peptides - Friends or foes? *Biomol. Concepts* 6: 343–359.

Ozougwu J (2017) Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* 4: 13-24.

Cao L, Quan XB, Zeng WJ, Yang XO, i Wang MJ (2016) Mechanism of hepatocyte apoptosis. *J. Cell Death* 9: 19–29.

Chung KW (2021) Advances in Understanding of the Role of Lipid Metabolism in Aging. *Cells* 10: 880

Mazzucotelli A, Viguierie N, Tiraby C, Annicotte J-S, Mairal A, Klimcakova E, Lepin E, Delmar P, Dejean S, Tavernier G, Lefort C, Hidalgo J, Pineau T, Fajas L, Clément K i Langin D (2007) The Transcriptional Coactivator Peroxisome Proliferator–Activated Receptor (PPAR  $\alpha$ Coactivator-1 $\alpha$  and the Nuclear Receptor PPAR $\alpha$  Control the Expression of Glycerol Kinase and Metabolism Genes Independently of PPAR $\gamma$  Activation in Human White Adipocytes. *Diabetes* 56: 2467–2475.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, i Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33–42.

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35: 495–516.

Engelking LR (2015) Gluconeogenesis. U: Engelking LR (ur.) Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. 3rd ed. Academic Press. San Diego, CA str. 225–230.

Fueger PT, Schisler JC, Lu D, Babu DA, Mirmira RG, Newgard CB i Hohmeier HE (2008) Trefoil factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet  $\beta$ -cell replication with retention of function. *Mol. Endocrinol.* 22: 1251–1259.

Gao F, Pan S, Liu B, i Zhang H (2015) TFF3 knockout in human pituitary adenoma cell HP75 facilitates cell apoptosis via mitochondrial pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 14568–14573.

Ge H, Gardner J, Wu X, Rulifson I, Wang J, Xiong Y, Ye J, Belouski E, Cao P, Tang J, Lee KJ, Coberly S, Wu X, Gupte J, Miao L, Yang L, Nguyen N, Shan B, Yeh WC, Véniant

MM, Li Y i Baribault H (2015) Trefoil factor 3 (TFF3) is regulated by food intake, improves glucose tolerance and induces mucinous metaplasia. *PLoS One* 10: e0126924.

Geisler CE i Renquist BJ (2017) Hepatic lipid accumulation: Cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J. Endocrinol.* 234: R1–R21.

Gyamfi D i Danquah KO (2016) *Nutrients and Liver Metabolism*. U: Patel VB (ur.) *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition*. Academic Press. str. 3-15.

Hoffmann W (2005) TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2932–2938.

Hu SJ, Jiang SS, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang LY, Zhong HH, Yang MW, Liu LY, Hong FF i Yang SL (2019) Effects of apoptosis on liver aging. *World J. Clin. Cases* 7: 691–704.

Hunt NJ, Kang SW (Sophie), Lockwood GP, Le Couteur DG, i Cogger VC (2019) Hallmarks of Aging in the Liver. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17: 1151–1161.

Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P i Chambon P (1984) Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.* 12: 2861–2878.

Jørgensen KH, Thim L i Jacobsen HE (1981) Preparation and characterization of PSP, a new polypeptide from porcine pancreas. *Diabetologia* 21: 288.

Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, i Podolsky DK (1995) Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: Cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 109: 516–523.

Liu J, Kim SY, Shin S, Jung SH, Yim SH, Lee JY, Lee SH i Chung YJ (2018) Overexpression of TFF3 is involved in prostate carcinogenesis via blocking mitochondria-mediated apoptosis. *Exp. Mol. Med.* 50:110.

Liu Z, Miner JJ, Yago T, Yao L, Lupu F, Xia L, i McEver RP (2010) Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo. *J. Exp. Med.* 207: 2975–2987.

Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, i ostali (2000) Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 47: 792–800.

Lubka M, Blin N, i Faculty M (2008) Trefoil factor family proteins in gastrointestinal defense U: Markotic, A, Glavaš-Obrovac L, Varljen i Žanic-Grubišić T. (ur.) *Biochemistry and Immunology Intersections*. Kerala, India, Research Signpost str. 1–28.

Molpeceres V, Mauriz JL, García-Mediavilla M V., González P, Barrio JP, i González-Gallego J (2007) Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62: 687–695.

Okada H, Kimura MT, Tan D, Fujiwara K, Igarashi J, Makuuchi M, Hui AM, Tsurumaru M i and Nagase H (2005) Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and



promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* 26: 369–377.

Ozougwu J (2017) Physiology of the liver. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences* 4: 13-24.

Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, März W, Tafuri S, Wahli W, Müller M i Kersten S (2004) PPAR $\alpha$  governs glycerol metabolism. *J. Clin. Invest.* 114: 94–103.

Puche JE, García-Fernández M, Muntané J, Rioja J, González-Barón S, i Cortazar IC (2008) Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology* 149: 2620–2627.

Rahib L, MacLennan NK, Horvath S, Liao JC, i Dipple KM (2007) Glycerol kinase deficiency alters expression of genes involved in lipid metabolism, carbohydrate metabolism, and insulin signaling. *Eur. J. Hum. Genet.* 15: 646–657.

Ren S, Zhang F, Li C, Jia C, Li S, Xi H, Zhang H, Yang L i Shandong YW (2010) Selection of housekeeping genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays on the murine cornea. *Mol. Vis.* 16: 1076–1086.

Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Piétu G, Robert A, Redeuilh G, Bracke M, Gespach C i Attoub S (2005) Erratum: Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3)- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res.* 65: 195-202.

Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S i Sabatini DM (2010) mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 468: 1100–1106.

Shah AA, Leidinger P, Keller A, Wendschlag A, Backes C, Baus-Loncar M, Meese E i Blin N (2011) The intestinal factor Tff3 and a miRNA network regulate murine caloric metabolism. *RNA Biol.* 8: 77–81.

Singh N i Bose K (2015) Apoptosis: Pathways, Molecules and Beyond. U: Bose K. (ur.) *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances.* Springer, Cham. str. 1–30.

Suemori S, Lynch-Devaney K i Podolsky DK (1991) Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11017–11021.

Tresguerres JAF, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, i Ariznavarreta C (2008) Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108: 318–326.

Vilà-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Mayordomo C, Haro D, i Marrero PF (2011) Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *J. Biol. Chem.* 286: 20423–20430.

Wan J, Wu X, Chen H, Xia X, Song X, Chen S, i ostali (2020) Aging-induced aberrant RAGE/PPAR $\alpha$  axis promotes hepatic steatosis via dysfunctional mitochondrial  $\beta$  oxidation. *Aging Cell* 19: 1–14.

Xiong J (2018) Fatty Acid Oxidation in Cell Fate Determination. *Trends Biochem. Sci.* 43: 854–857.

Xue Y, Shen L, Cui Y, Zhang H, Chen Q, Cui A, Fang F i Chang Y (2013) Tff3, as a Novel Peptide, Regulates Hepatic Glucose Metabolism. *PLoS One* 8: 1–8.

Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A i Itzkowitz S (2002) Intestinal trefoil factor: A marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 8: 1092–1099.

You ML, Chen YJ, Chong QY, Wu MM, Pandey V, Chen RM, Liu L, Ma L, Wu ZS, Zhu, T i Lobie PE (2017) Trefoil factor 3 mediation of oncogenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma is AKT-BCL-2 dependent. *Oncotarget* 8: 39323–39344.

#### INTERNETSKA STRANICA:

Edie S (2020, ožujak 12) Know Thy Mouse: Variability in Aged Mice. The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2020/march/variability-in-aged-mice>

## 8. ŽIVOTOPIS

Završila sam III. gimnaziju općeg smjera u Zagrebu 2015. i iste godine upisala preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu na Sveučilištu u Zagrebu. Tokom studija bila sam član BIUS-a 2017. i 2018. godine u sekciji za gljive. Sudjelovala sam u organizaciji SiSB-a (Treći simpozij studenta bioloških usmjerenja) 2017. godine te osvojila Rektorovu nagradu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici. Odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju. Nakon završetka preddiplomskog studija 2018. i stjecanja zvanja prvostupnice, upisala sam diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija. Položila sam tečaj za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama, LabAnim A kategorije, 2019. godine.