

Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina SH2D3C na regulaciju signalnog puta NRF2 - KEAP1

Marinović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:583502>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Marinović

**Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina
SH2D3C na regulaciju signalnog puta NRF2 -
KEAP1**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje na Institutu Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Mihaele Matovina te komentorstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Mihaeli Matovina na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada te na velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na pomoći i susretljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Ani Tomašić Paić koja je odvojila svoje vrijeme i zbog koje danas imam rezultate prema kojima je ovaj diplomski izrađen.

Zahvaljujem se mag. chem. Antonii Matić na pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Najviše zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama na neizmjerljivoj podršci i strpljenju tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina SH2D3C na regulaciju signalnog puta NRF2 - KEAP1

Ivana Marinović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Analizom interaktoma humane dipeptidil-peptidaze III (DPP III) otkriven je protein 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C) kao jedan od potencijalnih interaktora DPP III, proteina koji je uključen u regulaciju oksidacijskog stresa preko signalnog puta NRF2-KEAP1. Potencijalna uloga interakcije DPP III-SH2D3C još uvijek je nepoznata, ali poznato je da protein SH2D3C sudjeluje u regulaciji stanične migracije i adhezije, organizacije tkiva i regulaciji imunog odgovora te bi interakcija DPP III-SH2D3C mogla predstavljati vezu između regulacije tih procesa i oksidacijskog stresa. Cilj ovog rada bio je prekomjerno eksprimirati izoforme 2 i 3 proteina SH2D3C u stanicama HEK293T te utvrditi kako povećana ekspresija ovih izoformi djeluje na regulaciju signalnog puta NRF2-KEAP1, odnosno na ekspresiju mRNA gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u bazalnim i u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog vodikovim peroksidom. Prema dobivenim rezultatima prekomjerna ekspresija izoforme 2 u bazalnim uvjetima ne utječe na ekspresiju gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*, dok prekomjerna ekspresija izoforme 3 uzrokuje statistički značajno smanjenje ekspresije gena *NQO1* i *NRF2*. U uvjetima oksidacijskog stresa nakon tretmana vodikovim peroksidom prekomjerna ekspresija obiju izoformi ne utječe na ekspresiju gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*.

Ključne riječi: DPP III, SH2D3C, NRF-KEAP1, kvantitativni PCR

(40 stranica, 15 slika, 16 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Mihaela Matovina

Komentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Nada Oršolić

prof. dr. sc. Zorana Grubić

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 10.11.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

The impact of overexpression of SH2D3C protein on the regulation of NRF2 - KEAP1 signaling pathway

Ivana Marinović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Analysis of the human dipeptidyl peptidase III (DPP III) interactome revealed SH2 domain-containing protein 3C (SH2D3C) as one of the potential interactors of DPP III, a protein involved in the regulation of oxidative stress via the NRF2-KEAP1 signaling pathway. The potential role of the DPP III-SH2D3C interaction is still unknown, but it is known that the SH2D3C protein participates in the regulation of cell migration and adhesion, tissue organization and the regulation of the immune response, and DPP III-SH2D3C interaction could represent a link between the regulation of these processes and oxidative stress. The aim of this thesis was to overexpress isoforms 2 and 3 of the SH2D3C protein in HEK293T cells and to determine how the increased expression of these isoforms affects the regulation of the NRF2-KEAP1 signaling pathway, i.e. the mRNA expression of the *NQO1*, *HMOX1* and *NRF2* genes in basal and in conditions of oxidative stress caused by hydrogen peroxide. According to the obtained results, the overexpression of isoform 2 in basal conditions does not affect the expression of *NQO1*, *HMOX1* and *NRF2* genes, while the overexpression of isoform 3 causes a statistically significant decrease in the expression of the *NQO1* and *NRF2* genes. In conditions of oxidative stress after treatment with hydrogen peroxide, overexpression of both isoforms does not affect the expression of *NQO1*, *HMOX1* and *NRF2* genes.

Keywords: DPP III, SH2D3C, NRF-KEAP1, qPCR

(40 pages, 15 figures, 16 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Mihaela Matovina, PhD

Co-mentor: Prof. Nada Oršolić, PhD

Reviewers:

Prof. Nada Oršolić, PhD

Prof. Zorana Grubić, PhD

Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: 10.11.2022.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Proteini	1
1.2. Regulacija transkripcije.....	2
1.3. Prijenos signala u stanici	5
1.4. Dipeptidil–peptidaza III	6
1.4.1. Struktura dipeptidil-peptidaze III.....	6
1.4.2. Uloga dipeptidil–peptidaze III	7
1.5. SH2D3C	8
1.5.1. Struktura proteina SH2D3C.....	8
1.5.2. Uloga proteina SH2D3C.....	9
1.6. Signalni put NRF2–KEAP1	9
2. Cilj istraživanja	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Rad sa stanicama.....	12
3.1.1. Tretman s 400 μ M H ₂ O ₂	12
3.2. Provjera na prisustvo mikoplazmi	12
3.2.1. Izolacija DNA iz stanica u kulturi.....	12
3.2.2. PCR test na prisutnost mikoplazmi	13
3.2.3. Gel elektroforeza.....	14
3.3. Transfekcija plazmidnim vektorima	15
3.4. Izolacija proteina i Western analiza	17
3.5. Izolacija RNA.....	20
3.5.1. Uklanjanje genomske DNA prije reverzne transkripcije.....	21
3.6. Analiza ekspresije gena pomoću kvantitativnog PCR–a.....	21
3.6.1. Reverzna transkripcija.....	21
3.6.2. Kvantitativni PCR.....	22
3.7. Statistička analiza	24
4. Rezultati.....	25
4.1. Provjera humane DNA na prisutnost mikoplazmi nakon PCR umnažanja	25
4.2. Analiza prekomjerne ekspresije proteina	26
4.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	26

4.2.2. Western blot analiza proteina	28
4.3. Mjerenje koncentracije i provjera čistoće izolirane RNA	30
4.4. Analiza ekspresije gena.....	31
5. Rasprava.....	34
6. Zaključak	36
7. Literatura.....	37
8. Životopis	1

Kratice

ABL - engl. *Abelson Murine Leukemia*

BCAR3 - engl. *breast cancer antiestrogen resistance protein 3*

cAMP - ciklički AMP (engl. *cyclic AMP*)

CAS - engl. *cellular apoptosis susceptibility*

cDNA - komplementarna DNA (engl. *Complementary DNA*)

CDC25 - engl. *cell division control 25*

cGMP - ciklički GMP (engl. *cyclic GMP*)

DAG - diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*)

DEPC - mq voda tretirana dietil pirokarbonatom (engl. *diethyl pyrocarbonate*)

DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DPP III - dipeptidil-peptidaza III (engl. *dipeptidyl-peptidase III*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EPH - engl. *erythropoietin-producing human hepatocellular receptors*

ERBB - engl. *epidermal growth factor receptor*

ERK - engl. *extracellular signal-regulated kinase*

EtBr - etidijev bromid (engl. *ethidium bromide*)

GCSm - engl. *glutamate-cysteine ligase modifier*

GST - glutation-S-transferaza (engl. *glutathione S-transferase*)

GTP - aza-gvanozin trifosfataza

hdDNA - humana DNA

HEK293T - humane embrionalne bubrežne stanice (engl. *human embryonic kidney cells*)

HMOX1 - engl. *Heme Oxygenase 1*

IP₃ - inozitol-1,4,5-trifosfat (engl. *inositol-1,4,5-trisphosphate*)

KEAP1 - engl. *Kelch like ECH-associated protein 1*

M - marker

mRNA - glasnička RNA (engl. *Messenger RNA*)

NK - negativna kontrola

NQO1-engl. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*

NRF2- engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

NSP - engl. *novel SH2-containing protein*

NSP1 - engl. *novel SH2-containing protein 1*

NSP3 - engl. *novel SH2-containing protein 3*

NT - netretirani

PBS - engl. *phosphate-buffered saline*

PCR-lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PK - pozitivna kontrola

P/S - prolin/serin

PTB - engl. *phosphotyrosine binding*

qPCR - kvantitativni PCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

RasGEF - engl. *Ras guanine nucleotide exchange factor*

RIPA - engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

ROS - reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

rRNA - ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

RT - reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription*)

S - serin (Ser)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - SDS–poliakrilamidna gel – elektroforeza proteina (SDS – PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*)

SH2 - engl. *Src Homology 2*

SH3 - engl. *Src Homology 3*

SH2D3C-engl. *SH2 domain–containing 3C*

SILAC - obilježavanje aminokiselina u staničnoj kulturi stabilnim izotopima (SILAC, engl. *stable isotope labeling of amino acids in cell culture*)

siRNA - mala interferirajuća RNA (eng. *small interfering RNA*)

SP - standardna pogreška

SRC - engl. *Sarcoma*

SV-rednja vrijednost

TAE - engl. *Tris-acetate-EDTA buffer*

TB - engl. *treatment buffer*

TBE - engl. *Tris/Borate/EDTA buffer*

TBS - engl. *Tris-Buffered Saline*

TBS-T - engl. *Tris-Buffered Saline with 0.1 % Tween 20 detergent*

TE - pufer-Tris-EDTA (engl. *Tris-EDTA buffer*)

TUBG1 - engl. *Tubulin Gamma 1*

Y - tirozin (Tyr)

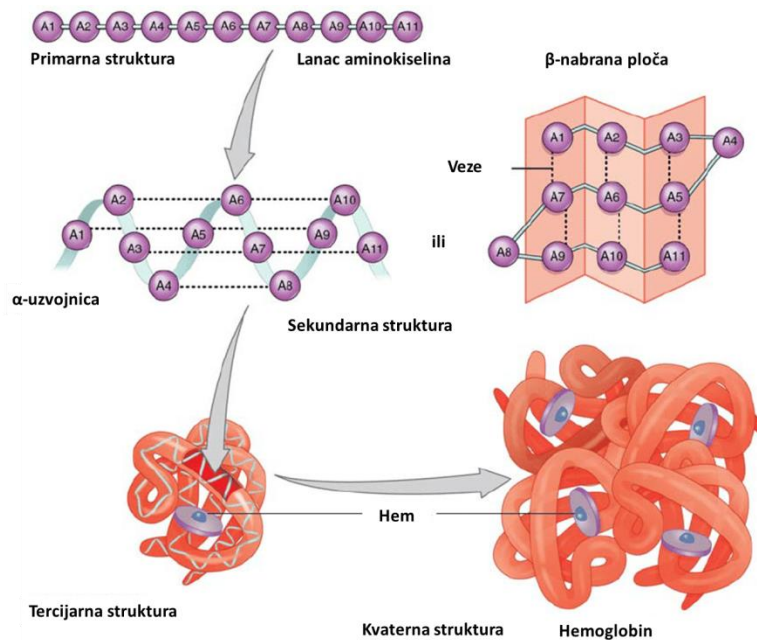
1. Uvod

Proteini su građeni od dugačkih lanaca aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama. Specifične karakteristike proteina ovise o vrsti i rasporedu aminokiselina u molekuli proteina (Guyton i Hall 2017). Protein–protein interakcije imaju ključnu ulogu u temeljnim procesima u živim stanicama (Peng i sur. 2017). Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je aminopeptidaza ovisna o cinku i predstavnik porodice M49 metalopeptidaza. DPP III (Prajapati i Chauhan 2011) prvi put je opisana u goveđoj hipofizi (Abramić i sur 1988), a kasnije je otkriveno da se nalazi i u gotovo svim tkivima čovjeka (Uhlén i sur. 2015). Analizom interaktoma humane DPP III otkriven je protein 3C koji sadrži domenu SH2 (SH2D3C), potencijalni interaktor proteina DPP III. Protein DPP III uključen je u regulaciju oksidacijskog stresa preko signalnog puta NRF2–KEAP1 (Motohashi i Yamamoto 2004), dok SH2D3C djeluje kao adaptorski protein koji posreduje u signalnim putovima koji su uključeni u adheziju i migraciju stanica, organizaciju tkiva i regulaciju imunskog odgovora (Bateman i sur. 2021). Potencijalna uloga DPP III–SH2D3C interakcije još uvijek je nepoznata, ali moguće je da ona predstavlja vezu između regulacije tih procesa i oksidacijskog stresa.

1.1. Proteini

Proteini su polimeri sastavljeni od dvadeset različitih aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama (Berg i sur. 2013). Specifičnim slijedom aminokiselina određena su karakteristična svojstva proteina. Aminokiselinski slijed jedinstven je za svaki protein i određen je redoslijedom nukleotida u genu. Međusobne interakcije sastavnih aminokiselina u proteinu čine trodimenzionalnu konformaciju proteina. Razlikuju se četiri razine proteinske strukture. Primarna je struktura slijed aminokiselina u lancu proteina. Sekundarna je struktura pravilni lokalni raspored aminokiselina unutar određene regije polipeptida, a dva najčešća tipa su α -uzvojnica i β -nabrana ploča (Cooper i Hausman 2004). Cjelokupni prostorni oblik polipeptidnog lanca, koji nastaje kao posljedica međusobnih interakcija aminokiselina iz različitih regija u primarnom slijedu, naziva se tercijskom strukturom (Berg i sur. 2013). Osnovne jedinice tercijske strukture proteina su kompaktne globularne strukture nazvane domenama. Mali proteini sadrže jednu dok veći proteini sadrže više različitih domena. Kvaterna struktura se sastoji od interakcija između različitih polipeptidnih lanaca u proteinima koji sadržavaju više od

jednog polipeptida (Cooper i Hausman 2004). Četiri razine strukture proteina hemoglobina prikazane su na Slici 1.



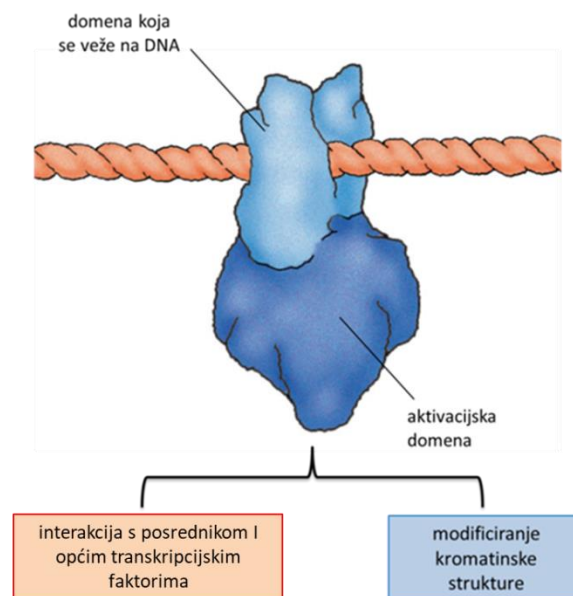
Slika 1. Primarna, sekundarna, tercijska i kvaternarna struktura proteina hemoglobina (preuzeto i prilagođeno prema Alhalmi i sur. 2020).

Proteini čine složenu i raznoliku skupinu makromolekula koja je prikladna za obavljanje mnoštva različitih funkcija (Cooper i Hausman 2004). Djeluju kao katalizatori, prenose i pohranjuju ostale molekule, osiguravaju mehaničku potporu i imunosnu zaštitu, provode gibanje, prenose živčane impulse te kontroliraju rast i diferencijaciju (Berg i sur. 2013).

1.2. Regulacija transkripcije

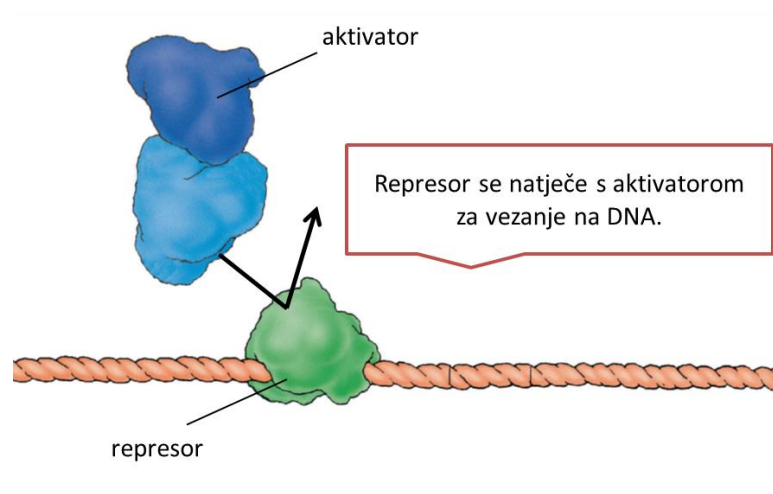
Transkripcija je proces sinteze RNA na DNA kao kalupu. Katalizira ju enzim RNA-polimeraza (Berg i sur. 2013). Ekspresija gena primarno je regulirana na razini inicijacije transkripcije, ali i tijekom elongacije. Transkripcija je u stanicama regulirana proteinima koji se specifično vežu za regulatorne sljedove te moduliraju aktivnost RNA-polimeraze. Također modifikacija kromatinske strukture ima ulogu u regulaciji transkripcije tako što ograničava raspoloživost DNA kao kalupa za transkripciju. U regulaciji transkripcije sudjeluju i cis-djelujući regulatorni sljedovi. Regulatorni sljedovi smješteni vrlo daleko od početnog transkripcijskog mjesta nazivaju

se pojačivači (engl. *enhancers*). Oni vežu transkripcijske faktore te im omogućuju regulaciju RNA-polimeraze. Kada se transkripcijski regulatorni proteini vežu na pojačivače dolazi do kontrole ekspresije gena tijekom rasta i diferencijacije stanica. Transkripcijski faktori imaju središnju ulogu u regulaciji transkripcije. Transkripcijski su faktori modularni proteini. Razlikuju se transkripcijski aktivatori i transkripcijski represori. Transkripcijski se aktivatori vežu na regulatorne sljedove DNA te potiču transkripciju. Sastoje se od dviju domena. Jedna domena specifično vezuje DNA dok druga interakcijom protein-protein potiče transkripciju. Transkripcijski aktivatori potiču transkripciju pomoću dva mehanizma (Slika 2). U prvom mehanizmu transkripcijski aktivatori reagiraju s posredničkim proteinima te općim transkripcijskim faktorima kako bi pridružili RNA-polimerazu i time omogućili spajanje transkripcijskog kompleksa na promotoru (Cooper i Hausman 2004). Promotor je slijed nukleotida koji se nalazi odmah ispred inicijalnog gena, a prepoznaje ga enzim RNA-polimeraza (Guyton i Hall 2017). Osim navedenog postoji i drugi mehanizam djelovanja transkripcijskih aktivatora koji uključuje djelovanje koaktivatora. U tom mehanizmu dolazi do interakcije transkripcijskih aktivatora s koaktivatorima pri čemu se olakšava transkripcija zbog promjena u strukturi kromatina (Cooper i Hausman 2004).



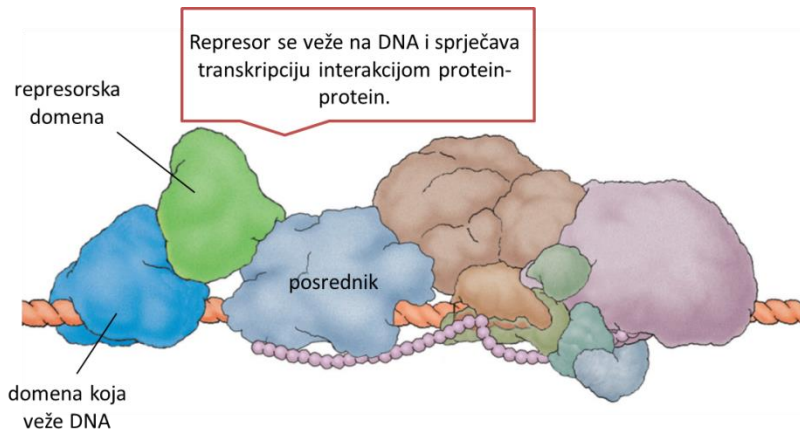
Slika 2. Mehanizmi djelovanja transkripcijskih aktivatora (preuzeto i prilagođeno prema Cooper i Hausman 2004).

Ekspresija gena u stanicama regulirana je kako aktivatorima tako i represorima transkripcije. Transkripcijski se represori vežu na specifični slijed DNA te time sprječavaju transkripciju. Postoji nekoliko mehanizama djelovanja transkripcijskih represora. Transkripcijski represori u pojedinim slučajevima interferiraju vezanje drugih transkripcijskih faktora na DNA i time sprječavaju transkripciju. U drugom se mehanizmu transkripcijski represori natječu za vezno mjesto na regulatornom slijedu s transkripcijskim aktivatorima (Slika 3). Njihovo vezanje na promotor ili pojačivač sprječava vezanje aktivatora te time dolazi do inhibicije transkripcije (Cooper i Hausman 2004).



Slika 3. Mehanizam djelovanja transkripcijskog represora. Transkripcijski represor sprječava vezanje transkripcijskog aktivatora i time sprječava transkripciju (preuzeto i prilagođeno prema Cooper i Hausman 2004).

Osim navedenih tipova transkripcijskih represora postoje i aktivni represori (Slika 4). Oni sadrže karakteristične funkcionalne domene koje sprječavaju transkripciju interakcijama protein-protein.



Slika 4. Mehanizam djelovanja aktivnog represora (preuzeto i prilagođeno prema Cooper i Hausman 2004).

Također, oni su ključni regulatori staničnog rasta i diferencijacije. Transkripcijski represori mogu posredovati inhibiciju transkripcije u suradnji s korepresorima. Transkripcijski korepresori sprječavaju transkripciju tako što mijenjaju strukturu kromatina. Modifikacije histona također utječu na regulaciju transkripcije. Acetiliranje histona olakšava vezivanje transkripcijskih faktora, a time i transkripciju. S druge strane mnogi transkripcijski korepresori djeluju kao histonske deacetilaze. Nekodirajuće RNA također imaju ulogu u represiji transkripcije preko promjena u strukturi kromatina. Naposljetku, transkripcija može biti regulirana i metiliranjem DNA. Citozinski ostaci DNA mogu se modificirati dodatkom metilne skupine čime dolazi do smanjenja transkripcije. Do smanjenja transkripcije dolazi zbog interferencije s vezanjem transkripcijskih aktivatora te pridruživanja transkripcijskih represora koji specifično vežu metilacijom modificiranu DNA (Cooper i Hausman 2004).

1.3. Prijenos signala u stanici

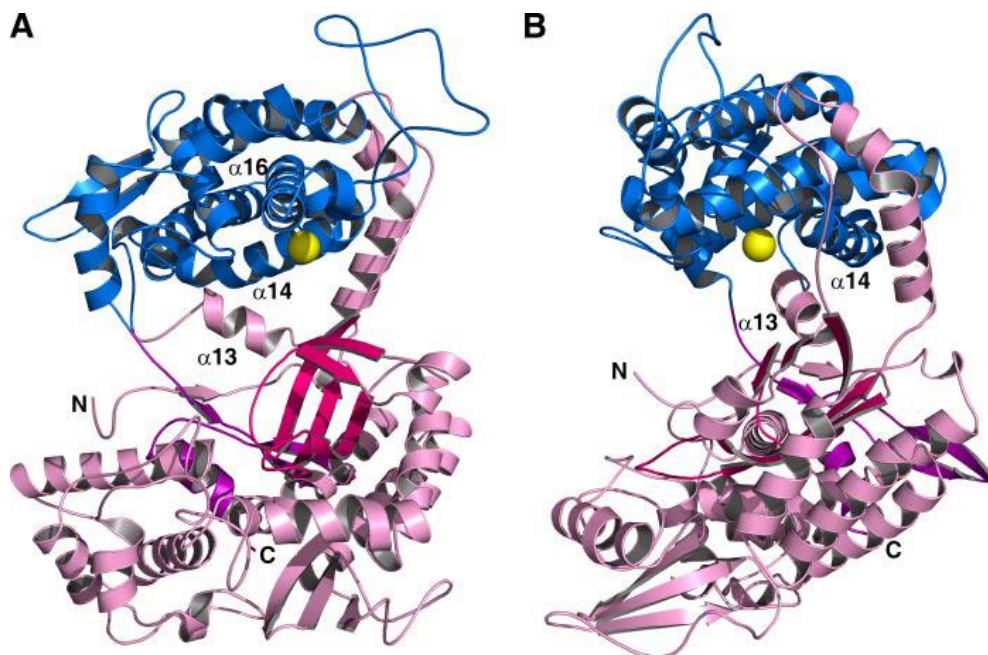
Stanice moraju biti u stanju primati i obrađivati signale izvan njihovih granica kako bi odgovorile na promjene u svom neposrednom okruženju. Stanice obično primaju signale u kemijskom obliku putem različitih signalnih molekula (Scitable 2014). Postoji nekoliko koraka prijenosa signala u stanicama. Prvi korak u prijenosu signala je otpuštanje prvog glasnika. Različiti tipovi podražaja potiču otpuštanje signalnih molekula tj. prvih glasnika. Sljedeći je korak u prijenosu signala prihvatanje prvog glasnika. Signalne molekule većinom ne ulaze u stanice. Specifični proteini smješteni u staničnoj membrani djeluju kao receptori te vežu signalne molekule. Na taj se način informacije prenose iz okoliša u stanicu. Receptori mogu proći kroz

staničnu membranu, a sastoje se od izvanstaničnih i unutarstaničnih dijelova. Izvanstanični dijelovi receptora sadrže vezno mjesto koje specifično veže signalne molekule (ligande, agoniste). Vežanjem signalne molekule dolazi do promjene konformacije receptorskog proteina. Korak koji slijedi je unutarstanični prijenos poruke drugim glasnicima (Berg i sur. 2013). Nakon što se signalna molekula veže na protein dolazi do nastanka niza biokemijskih reakcija unutar stanice. Potiče se sinteza drugih glasnika koji započinju i koordiniraju signalne putove unutar stanice (Scitable 2014). Neki od važnijih drugih glasnika su ciklički AMP (cAMP), ciklički GMP (cGMP), kalcijevi ioni, inozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃) te diacilglicerol (DAG). Sljedeći je korak aktivacija izvršitelja koji izravno mijenjaju stanični odgovor. Signalni putovi aktiviraju ili inhibiraju crpke, enzime ili transkripcijske faktore, a oni neposredno nadziru metaboličke putove, aktivaciju gena i brojne druge procese. Završni je korak prijenosa signala u stanici završetak signala. Kako bi stanica mogla odgovoriti na nove signale iz okoliša, prethodni se signalni proces mora završiti. Brojna su patološka stanja posljedica nepravilno završenog signalnog procesa. Nastanak raka često je povezan s nepravilno završenim procesima prijenosa signala, osobito ako se radi o procesima koji reguliraju rast stanica (Berg i sur. 2013).

1.4. Dipeptidil-peptidaza III

1.4.1. Struktura dipeptidil-peptidaze III

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) pročišćena iz tkiva sisavaca je monomerni protein čija je molekularna masa između 82 i 84 kDa (Barrett i Chen 2013). DPP III pripada klanu MA metalopeptidaza. Klan MA je najbrojnija skupina metalopeptidaza koja je karakterizirana katalitičkim motivom HEXXH. DPP III pripada porodici M49 metalopeptidaza te, za razliku od drugih metalopeptidaza, ima katalitički motiv HEXXGH. Aminokiselinski ostaci histidina iz motiva HEXXGH zajedno s aminokiselinskim ostatkom glutamata iz motiva EEXRAE/D koordiniraju vezanje cinkova iona (Barrett i Chen, 2013). DPP III (Slika 5) se sastoji od dvije domene. Gornja je domena bogata α -uzvojnica dok donju domenu čine α -uzvojnice te β -nabrane ploče. Dvije su domene odvojene širokim rascjepom koji čini vezno mjesto za supstrat. Povezane su petljom koja se proteže od donje domene. Katalitički motivi HEXXGH i EEXRAE/D nalaze se na α -16 i α -18 uzvojnica gornje domene (Prajapati i Chauhan 2011). Vezno mjesto katalitičkog iona cinka čine aminokiselinski ostaci His-460 i His-465 iz motiva HEXXGH te aminokiselinski ostatak Glu-508 iz motiva EEXRAE/D (Baral i sur. 2008).



Slika 5. Shematski prikaz strukture DPP III. Plavom je bojom prikazana gornja domena, donja domena je obojena svijetlo ljubičastom bojom dok je petlja koja povezuje dvije domene obojena ružičastom. Cinkov ion prikazan je kao žuta kuglica (preuzeto i prilagođeno prema Baral i sur. 2008).

1.4.2. Uloga dipeptidil–peptidaze III

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) predstavnik je porodice M49 metalopeptidaza. DPP III je aminopeptidaza ovisna o cinku. Sekvencijalno cijepa dipeptide s N-kraja oligopeptida koji se sastoje od 3 do 10 aminokiselina. DPP III je metalopeptidaza sa širokim spektrom supstrata (Prajapati i Chauhan 2011). DPP III je pronađena u gotovo svim tkivima čovjeka te se smatra da ima ulogu u završnoj fazi katabolizma proteina. Njene biološke uloge još nisu do kraja razjašnjene, ali smatra se da bi mogla biti uključena u regulaciju krvnog tlaka i boli jer cijepa neke bioaktivne peptide *in vitro*. Jedan od bioaktivnih peptida koji su supstrati DPP III je angiotenzin. Angiotenzini su ključni peptidi u renin-angiotenzin sustavu i imaju jaka vazoaktivna svojstva. Visoka aktivnost DPP III u krvnoj plazmi uklanja angiotenzine što vjerojatno uzrokuje snižavanje krvnog tlaka. Također moguće je da DPP III djeluje inhibirajuće na angiotenzin-konvertirajući enzim čime se smanjuje razina angiotenzina te se dodatno snižava krvni tlak. S druge strane djelovanje DPP III na hemopresin možda uzrokuje povišenje krvnog tlaka (Prajapati i Chauhan 2011). Osim utjecaja na modulaciju krvnog tlaka, smatra se da DPP III djeluje i na modulaciju boli. Enkefalini su prirodne morfiju nalik tvari. Vezivanjem na opioidne receptore

inhibiraju osjet boli. Zbog svoje sposobnosti da pri fiziološkoj vrijednosti pH hidrolizira enkefaline, smatra se da DPP III sudjeluje u modulaciji boli (Prajapati i Chauhan 2011). DPP III sudjeluje i u razvoju patoloških stanja poput raka. Povećana aktivnost DPP III primijećena je u malignim tkivima endometrija i jajnika. Usporedbom aktivnosti DPP III u normalnim i malignim tkivima endometrija i jajnika, dokazano je znatno povećanje razine DPP III u malignim tkivima (Šimaga i sur. 1998). Transformacija tkiva jajnika iz benignog u maligno također je praćena povećanom aktivnošću DPP III (Šimaga i sur. 2003). DPP III je uključen i u regulaciju oksidacijskog stresa preko signalnog puta NRF2–KEAP1 (Hast i sur. 2013; Lu i sur. 2017).

1.5. SH2D3C

1.5.1. Struktura proteina SH2D3C

Protein SH2D3C, kao i proteini NSP1 i BCAR3, pripada porodici proteina NSP. Sva tri proteina imaju zajedničku strukturu. Prikaz rasporeda domena u proteinu SH2D3C nalazi se na Slici 6. N-kraj sva tri proteina promjenjive je duljine. Domena koja slijedi nakon N-kraja je SH2 domena (engl. *Src Homology 2*) (Wallez i sur. 2012). SH2 domena veže aktivirane receptorske tirozinske kinaze poput proteina iz porodica ERBB i EPH (Vervoort i sur. 2007). Nakon SH2 domene slijedi prolin/serin-bogata domena. Ova domena sadrži vezna mjesta za proteine koji sadrže SH3 domenu. Razlikuje se za sve članove NSP porodice proteina pa se pretpostavlja da svaki član ima različite partnere za vezanje. Slijedi velika domena na C-kraju koja je ključna za interakciju članova porodice NSP proteina s članovima porodice CAS. Sekvenca ove domene slična je CDC25 homolognoj domeni, odnosno domeni sličnoj RasGEF domeni iz proteina koji aktiviraju Ras GTP-aze. Strukturnom analizom te domene utvrđeno je da se, za razliku od domena u aktivnim RasGEF proteinima, ova domena u proteinima iz porodice NSP nalazi u zatvorenoj konformaciji te je zbog toga katalitički inaktivna (Mace i sur. 2011). Također su pronađena mnoga fosforilacijska mjesta, većinom na N-kraju sva tri proteina u normalnim, ali i stanicama raka. Pretpostavlja se da su tirozin-fosforilirani motivi posljedica aktivnosti SRC, ABL i receptorskih tirozin kinaza. Moguće je da ti motivi služe kao vezna mjesta za proteine koji sadrže SH2 ili PTB domene. ABL kinaza moguće veže SH2 domenu proteina SH2D3C. N-kraj i prolin/serin bogata domena proteina iz NSP porodice sadrže mnoge serin/treonin-prolin motive koji mogu biti fosforilirani kinazama koje ciljaju prolin poput ERK kinaze. U početku su

identificirane tri izoforme proteina SH2D3C, dvije kraće koje sadrže 702 i 703 aminokiseline te duža izoforma koja sadrži 860 aminokiselina (Wallez i sur. 2012).



Slika 6. Raspored domena u proteinu SH2D3C (NSP3). Prikazane su domene u dužoj (860) i dvije kraće izoforme (703,702). Prikazane su SH2, prolin/serin-bogata domena (P/S) i CDC25 homologna domena. Y i S su foforilacijska mjesta na tirozinu, odnosno serinu (preuzeto i prilagođeno prema Wallez i sur. 2012).

Danas je poznato da je u stanicama eksprimirano 6 različitih izoformi proteina SH2D3C (Bateman i sur. 2021) koje se razlikuju u N-kraju. Sve, osim najkraće izoforme 3, sadrže SH2 i CDC25-h, odnosno RasGEF-sličnu domenu te prolin/serin bogatu regiju između njih, dok izoforma 3 sadrži samo RasGEF-sličnu domenu i dio prolin/serin bogate regije, ali ne sadrži SH2 domenu (Bateman i sur. 2021).

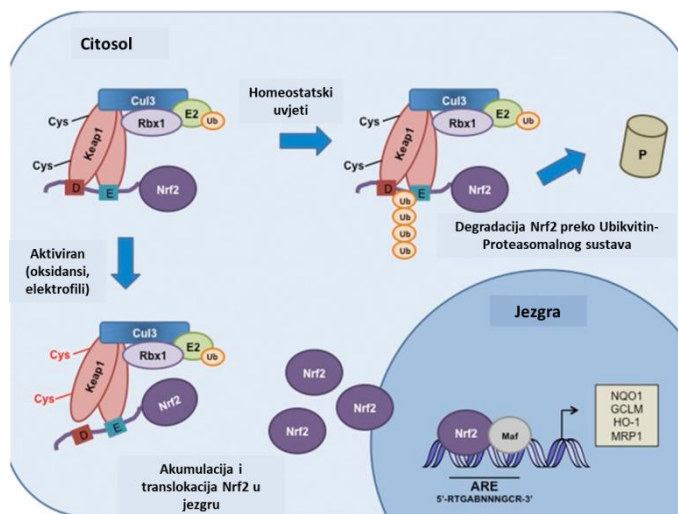
1.5.2. Uloga proteina SH2D3C

SH2D3C (NSP3), BCAR3 i NSP1 članovi su porodice citoplazmatskih proteina. Uključeni su u regulaciju stanične morfologije, adhezije i migracije, dok je BCAR3 uključen i u razvoj antiestrogenske rezistencije u estrogen-ovisnim stanicama raka dojke (Vervoort i sur. 2007). Kraće izoforme proteina SH2D3C široko su eksprimirane, dok se duža izoforma pretežno nalazi u hematopoetskim stanicama. mRNA SH2D3C najviše je eksprimirana u mozgu, plućima, krvnim žilama i imunskim stanicama. Prisutnost ovog proteina utvrđena je u mnogim malignim tvorevinama poput raka želuca, leukemije, limfoma te raka pluća (Wallez i sur. 2012). Visoka ekspresija ovog proteina otkrivena je u krvnim žilama raka pa je moguće da ovaj protein potiče angiogenezu (Vervoort i sur. 2007), ali i migraciju i invazivnost stanica (Wallez i sur. 2012).

1.6. Signalni put NRF2–KEAP1

NRF2–KEAP1 glavni je regulator odgovora stanice na oksidacijski stres. Proteini koji su uključeni u ovaj signalni put su NRF2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) te KEAP1 (engl. *Kelch like ECH-associated protein 1*). NRF2 je transkripcijski faktor koji služi kao glavni regulator ekspresije mnogih gena uključenih u stanični odgovor na oksidacijski i

elektrofilni stres. U bazalnim uvjetima održava se niska razina NRF2 putem vezanja na KEAP1, njegove ubikvitinacije i degradacije u proteasomu, dok u uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do stabilizacije NRF2 (Motohashi i Yamamoto 2004). KEAP1 je senzor protein koji sadrži aminokiselinske ostatke cisteina koji mogu biti modificirani reaktivnim vrstama kisika (ROS) (Emanuele i sur. 2021). NRF2 veže KEAP1 putem dva motiva, ETGE motiv veže KEAP1 visokim afinitetom dok DLG motiv veže KEAP1 niskim afinitetom (Tong i sur. 2006). U uvjetima oksidacijskog stresa, KEAP1 prolazi konformacijske promjene koje smanjuju njegov afinitet prema NRF2. NRF2 se otpušta s DLG motiva KEAP1 te se onemogućuje njegova ubikvitinacija, a nosivnik NRF2 se translocira u jezgru stanice (Emanuele i sur. 2021) (Slika 7).



Slika 7. Regulacija NRF2-KEAP1 signalnog puta (preuzeto i prilagođeno prema Jaramillo i Zhang 2013).

U jezgri stanice NRF2 potiče ekspresiju brojnih gena s antioksidativnim i citoprotektivnim funkcijama (Emanuele i sur. 2021). Jedan od načina aktivacije NRF2 je vezanje kompetitivnih interaktora na KEAP1. Jedan od njih je i protein DPP III koji se veže na Kelch domenu te time sprječava vezanje NRF2 putem DLG motiva i njegovu ubikvitinaciju. Zbog toga dolazi do povećanja razine slobodnog NRF2 te se potiče ekspresija citoprotektivnih gena (Lu i sur. 2017).

2. Cilj istraživanja

Ciljevi istraživanja bili su:

1. Prekomjerno eksprimirati izoforme 2, odnosno 3 proteina SH2D3C s FLAG-privjeskom u embrionalnim bubrežnim stanicama HEK293T.
2. Utvrditi kako povećana ekspresija izoformi 2 i 3 proteina SH2D3C u stanicama HEK293T djeluje na regulaciju signalnog puta NRF2-KEAP1, odnosno na ekspresiju mRNA gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u bazalnim uvjetima.
3. Utvrditi kako povećana ekspresija izoformi 2 i 3 proteina SH2D3C u stanicama HEK293T djeluje na regulaciju signalnog puta NRF2-KEAP1, odnosno na ekspresiju mRNA gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog vodikovim peroksidom.

3. Materijali i metode

3.1. Rad sa stanicama

Tijekom istraživanja koristila sam humane embrionalne bubrežne stanice HEK293T. Navedenu staničnu liniju uzgajala sam kao adherentnu staničnu kulturu u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) s 10 % fetalnog goveđeg seruma, 1 % nesencijalnih aminokiselina i pripadnim antibiotikom/antimikotikom (gentamicinom) u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95 % zraka i 5 % CO₂ pri temperaturi od 37 °C u petrijevkama za kultivaciju humanih stanica, pri sterilnim uvjetima.

3.1.1. Tretman s 400 μM H₂O₂

Stanice HEK293T prolazno transfecirane plazmidima pFLAGCMV2 (prazni vektor), pFLAG CMV2–SH2D3C–iso2 te pFLAGCMV2–SH2D3C–iso3 tretirala sam s 400 μM H₂O₂ 30 minuta na 37 °C u inkubatoru za stanice.

3.2. Provjera na prisustvo mikoplazmi

3.2.1. Izolacija DNA iz stanica u kulturi

Za izolaciju DNA iz stanica HEK293T koristila sam jednu pločicu sa šest jažica. Za detekciju mikoplazmi dovoljno je oko 200.000 stanica pa jažice nisu bile potpuno ispunjene (70 – 80 % konfluentne). Stanice sam najprije tripsinizirala, a zatim sam tripsin inaktivirala dodatkom DMEM medija te sam sadržaj prebacila u epruvetu od 1,5 mL i centrifugirala 5 min na 100 × g u centrifugi *5415R* (Eppendorf). Supernatant sam uklonila, a talog resuspendirala u puferu za digestiju sa SDS-om (600 μL). Sadržaj sam zatim prebacila u tubicu od 2 mL. U tubicu sam dodala 25 μL proteinaze K i kratko vorteksirala na uređaju *Electric vortex EV-100* (Tehtnica). Proteinaza K je visoko aktivna serinska proteaza koja ima najbolji učinak na temperaturi 56 – 60 °C. Koristi se za digestiju proteaza tijekom izolacije DNA ili RNA. Proteinaza K koju sam koristila za ovu izolaciju DNA je pripremljena kao 20 mg/mL štok otopina u sterilnoj vodi te je stabilna godinu dana na –20 °C. Zatim sam tubicu inkubirala na 37 °C na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf) preko noći. Sljedeći dan u tubicu sam dodala 200 μL 5M NaCl otopine te je kratko vorteksirala i centrifugirala 5 minuta na 16.000 × g na sobnoj temperaturi. Supernatant sam prebacila u novu tubicu, uzorak sam ponovo centrifugirala 5 minuta na 16.000 × g kako bi se što više smanjio talog. U ovoj fazi smjesa se čisti od proteina na koji su se vezale soli te u

supernatantu ostaje samo čista DNA. Na supernatant sam dodala 200 μL izopropanola, koji se skladišti u hladnjaku na $-20\text{ }^\circ\text{C}$, i nakon miješanja mogla sam uočiti taloženje DNA u obliku bijelog končića. Uzorak sam ponovo centrifugirala 5 minuta na $16.000 \times g$. Nakon centrifugiranja pažljivo sam uklonila supernatant, pomoću mikropipete s nastavkom, a preostali talog isprala s 500 μL etanola. Talog sam kratko sušila u sterilnom laminaru *Aura Mini* (BioAir). Talog se ne smije predugo sušiti jer se u tom slučaju teže otapa. Na koncu sam talog otopila u 500 μL pufera 1XTE te uzorak inkubirala na $37\text{ }^\circ\text{C}$ na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf) 1 – 2 h da bi se DNA u potpunosti otopila. Koncentracija DNA koju sam dobila bila je 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ te sam DNA dodatno razrijedila do 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ i otopila na termobloku na $37\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2. PCR test na prisutnost mikoplazmi

Onečišćenje mikoplazmama može se utvrditi pomoću metode lančane reakcije polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). PCR je jednostavan, specifičan, brz, pouzdan i učinkovit način detekcije mikoplazmi. PCR test na prisutnost mikoplazmi temelji se na detekciji molekula 16S rRNA najčešćih vrsta mikoplazmi koje onečišćuje stanične kulture (Nikfarjam i Farzaneh 2012). U tu svrhu korištene su oligonukleotidne početnice koje amplificiraju vanjske razdvojne regije (engl. *outer spacer regions*) iz 13 vrsta mikoplazmi (Sung i sur. 2006). Sekvence početnica koje sam koristila su: F1 (ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT) i R1 (CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT); te MGSO (5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3') i GPO-3 (5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3').

Koncentracija DNA koju sam izolirala bila je otprilike 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Izoliranu DNA razrijedila sam na 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ i 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ dodatkom odgovarajućeg volumena pufera TE (Tris – EDTA). Nakon toga sam pripremila *Master Mix* koji se sastojao od sljedećih komponenti: 2X Dream Taq PCR Master Mix, početnica F1 (engl. *forward primer*) i R1 (engl. *reverse primer*) te miliporirane vode (mq). U svaku tubicu dodala sam 9 μL *Master Mix*a (Tablica 1), te sam zatim u jednu tubicu dodala 1 μL uzorka izolirane DNA koncentracije 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, a u drugu 1 μL uzorka izolirane DNA koncentracije 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Na isti način sam pripremila pozitivnu kontrolu (uzorak koji je pozitivan na DNA mikoplazmi) dok sam u negativnu kontrolu dodala 1 μL mq vode.

Tablica 1. Priprema *Master Mix* za početnice F1 i R1. Prikazani volumeni se odnose na svaku tubicu pojedinačno.

<i>Master Mix</i>	Početnice (F1, R1)
2X Dream Taq PCR MM	5 µL
F1 - početnica	0,5 µL
R1 - početnica	0,5 µL
Miliporirana voda (mq)	3 µL

PCR sam postavila u PCR uređaju *Mastercycler Personal* (Eppendorf). Prvi korak programa je inicijalna denaturacija. U ovom se koraku zagrijavanjem reakcije na 95 °C razdvajaju sparni lanci roditeljske molekule DNA koji služe kao kalupi za amplifikaciju (Berg i sur. 2013). Zatim slijedi 40 ciklusa denaturacije, hibridizacije (sljepljivanja) početnica i sinteze DNA (elongacije). Na kraju se reakcija još 10 min držala na temperaturi od 72 °C, da bi se završila sinteza svih lanaca DNA. DNA polimeraza Taq je temperaturno otporna polimeraza koja potječe iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Polimeraza produžuje obje početnice u smjeru 5' → 3' ciljne sekvence (Berg i sur. 2013). Parametri programa PCR-a za detekciju mikoplazmi prikazani su u Tablici 2. Uslijedilo je hlađenje uzoraka na 16 °C.

Tablica 2. PCR program za detekciju mikoplazmi.

Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
95	3 min	1
95	30 s	40
55	30 s	
72	30 s	
72	10 min	1

Primjenom drugog para početnica (MGSO; GPO-3) dodatno sam provjerila prisutnost mikoplazmi u uzorcima na dva različita uređaja (*Techno Prime PCR* i *Eppendorf PCR*).

3.2.3. Gel elektroforeza

Uzorci umnožene DNA provjereni su na agaroznom gelu primjenom gel elektroforeze. Gel elektroforeza je laboratorijska metoda koja se koristi za odvajanje smjesa DNA, RNA ili proteina

prema veličini molekula. U gel elektroforezi, molekule koje se trebaju odvojiti, putuju u električnom polju kroz gel koji sadrži male pore. Brzina kojom molekule putuju kroz gel, obrnuto je proporcionalna njihovoj duljini, odnosno male molekule DNA putuju brže od većih (Scitable 2014).

Za potrebe provjere DNA na gelu priredila sam 1 % agarozni gel. Odvagala sam 1 g agaroze (Roth) te otopila u 100 mL pufera 1XTAE i zagrijala u mikrovalnoj pećnici. Gel elektroforezu sam izvela u sistemu za horizontalnu *multiSUB System* (Clever Scientific) u puferu 1XTE. Uzorke sam pomiješala s odgovarajućom količinom *DNA Gel Loading Dye (6X)* (Thermo Fisher Scientific) i nanijela na gel. Miješanje uzoraka s bojom pomaže u praćenju udaljenosti koju je prešao uzorak DNA, a također omogućuje uzorku da potone u gel (Lee i sur. 2012). Elektroforezu sam izvela pri naponu od 90V u trajanju od oko 40 min. Gel sam obojila u 0,5 µg/mL otopini etidijevog bromid (EtBr) u puferu 1XTAE u trajanju od 10 min. EtBr je fluorescentna boja koja se koristi za vizualizaciju DNA u gelovima. EtBr se interkalira između parova baza u DNA (ScienceDirect 2022). DNA sam vizualizirala osvjetljavanjem gela s UV zračenjem koje uzrokuje fluorescenciju interkaliranog EtBr-a. Za vizualizaciju signala koristila sam uređaj za detekciju fluorescencije *Syngene G:BOX* (Syngene).

3.3. Transfekcija plazmidnim vektorima

Transfekcija je proces unosa strane DNA ili RNA u stanicu. Razlikujemo prolaznu (proučavamo učinak kroz 1 – 4 dana) i stabilnu transfekciju (ugradnja u genom). Ova tehnologija prijenosa gena omogućuje proučavanje funkcije gena i ekspresije proteina u staničnom okruženju (Promega 2022).

Stanice HEK293T nacijepila sam u dvije pločice sa šest jažica (tzv. *6-well*). Stanice su pri transfekciji bile 70 – 90 % konfluentne. Za prolaznu transfekciju koristila sam vektor pFLAGCMV2 te pripadne konstrukte pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2 i pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3. Koncentracije korištenih plazmidnih vektora nalaze se u Tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije plazmidnih vektora.

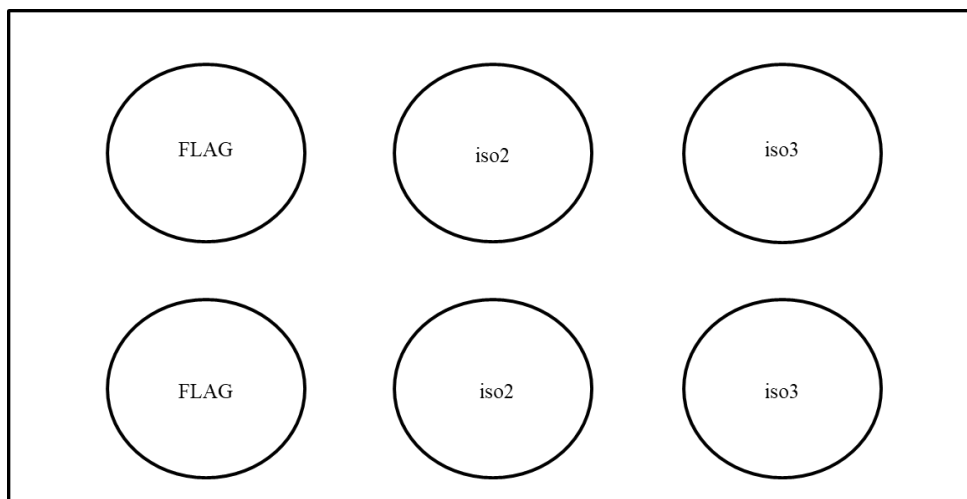
Plazmidni vektori	Koncentracija (ng/ μ L)
pFLAGCMV2	480
pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2	550
pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3	264

U Tablici 4 prikazan je sastav transfekcijske smjese te omjeri DNA i lipofektamina. Zasebno sam priredila otopine Lipofektamina 2.000 (Thermo Fisher Scientific), odnosno plazmidne DNA u Opti-MEM mediju te sam otopine nakon toga spojila i inkubirala 10 – 15 minuta prije nanošenja na stanice.

Tablica 4. Sastav transfekcijske smjese i omjeri DNA i lipofektamina za plazmidne vektore pFLAGCMV2, pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2 i pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3.

Plazmid	Omjer DNA: lipofektamin	DNA	Opti – MEM (μ L)	Lipofektamin 2.000 (μ L)	Opti – MEM (μ L)
pFLAGCMV2	1:2,5	2,1	248	2,5	248
pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2	2:5	3,6	246,4	5,0	245
pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3	1:5	3,8	246,2	5,0	245

Transfekcijsku smjesu sam zatim nakapala na stanice HEK293T u pločicama sa šest jažica, prema rasporedu prikazanom na Slici 8.



Slika 8. Prikaz rasporeda kojim je transfekcijska smjesa nakapana na stanice.

Stanice sam inkubirala u CO₂ inkubatoru modela *HERACELL VIOS 160i* (Thermo Fisher Scientific), na 37 °C. Nakon 24 sata od transfekcije, stanice sam analizirala pod invertnim mikroskopom *Olympus IX50*.

3.4. Izolacija proteina i Western analiza

Proteine sam izolirala iz kulture stanica primjenom pufera RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*). Stanice HEK293T sam nacijepila u pločicu sa šest jažica i transfecirala praznim vektorom pFLAGCMV2 te pripadnim konstruktima pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2 i pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3. Transfecirane stanice sam isprala s 1 mL rashlađenog PBS-a (engl. *phosphate-buffered saline*). Nakon toga na stanice sam dodala 400 µL pufera RIPA. Sastav korištenog pufera RIPA bio je 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*), 12 mM Na-deoksikolat, 1 % Triton X-100. Stanice sam inkubirala oko 10 minuta na ledu i zatim sam suspenziju prebacila u tubice od 2 mL. Nakon toga stanice sam centrifugirala 30 minuta na 16.000 × g na 4 °C u uređaju *5415R* (Eppendorf). Supernatant sam prebacila u nove tubice od 1,5 mL. Uzela sam 80 µL svakog uzorka i u njega dodala 20 µL pufera 5XTB (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,14 M SDS, 20 % glicerol, 2 % β-merkaptoetanol, 0,03 M bromfenol plavo). Uzorke sam zatim zagrijala 7 minuta na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Pohranila sam ih na –20 °C. Nakon toga sam odredila koncentraciju proteina u uzorcima pomoću metode po Bradfordu. Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na vezanju boje *Comassie Brilliant Blue G–250*

na aminokiselinske ostatke arginina, triptofana, tirozina, histidina i fenilalanina na proteinima, što dovodi do pomaka maksimuma apsorbanije boje, od 470 nm do 595 nm (Olson i Markwell 2007). Svaki pripremljeni uzorak sam prebacila u staklenu kivetu te izmjerila njegovu apsorbaniju na *BioDrop* spektrofotometru (Biochrom). Izolirane proteine sam zatim razdijelila na 10 % poliakrilamidnom gelu. SDS–poliakrilamidna gel – elektroforeza proteina (SDS – PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) odjeljuje polipeptidne lance proteina pri denaturirajućim uvjetima uglavnom po masi (Berg i sur. 2013). Prije nanošenja uzoraka na gel, za svaki sam set uzoraka, napravila po dva gela, gel za razdvajanje (Tablica 5) i gel za sabijanje (Tablica 6).

Tablica 5. Komponente 10 % gela za razdvajanje.

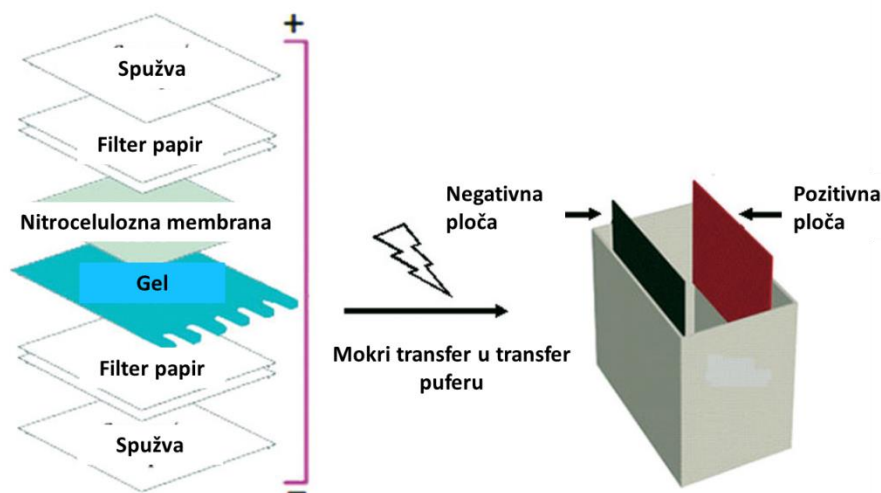
Komponenta	Volumen
mq H ₂ O	4 mL
1,5 M Tris - HCl, pH = 8,8	2,5 mL
30 % akrilamid/bisakrilamid (AA)	3,3 mL
10 % SDS	100 µL
10 % APS (eng. <i>amonium persulfate</i>)	100 µL
TEMED (eng <i>tetramethylethylenediamine</i>)	8 µL

Tablica 6. Komponente 5 % gela za sabijanje.

Komponenta	Volumen
mq H ₂ O	4,05 mL
0,5 M Tris - HCl, pH = 6,8	0,75 mL
30 % akrilamid/bisakrilamid (AA)	1,005 mL
10 % SDS	60 µL
10 % APS (eng. <i>amonium persulfate</i>)	60 µL
TEMED (eng <i>tetramethylethylenediamine</i>)	12 µL

SDS–poliakrilamidnu gel–elektroforezu sam provela u sistemu za vertikalnu elektroforezu u puferu 25 mM Tris, 0,192 M glicin, 1 % SDS. Na jedan gel nanijela sam uzorke iz netretiranih stanica, a na drugi uzorke koji su tretirani s H₂O₂. Elektroforezu sam pokrenula 15 minuta na 120 V, a potom oko 1 sat 180 V dok fronta boje nije došla do kraja gela. Denaturirane proteine

razdvojene elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata prenijela sam na nitroceluloznu membranu *Amersham Protran Premium* 0,45 μm NC (GE Healthcare) u puferu za prijenos. Western blot metodom mogu se identificirati specifični proteini iz složene mješavine proteina ekstrahiranih iz stanica primjenom protutijela. Metoda se temelji na tri elementa: odvajanju prema veličini, prenošenju na čvrstu podlogu te označavanju ciljnih proteina odgovarajućim primarnim i sekundarnim protutijelima radi vizualizacije (Mahmood i Yang 2012). Složila sam „sendvič“ od spužvica, filter papira, membrane i poliakrilamidnog gela koje sam prethodno namočila u puferu za prijenos te sam tako pripremljen „sendvič“ stavila u kadu pritom pazeći na ispravnu orijentaciju membrane koja mora biti okrenuta prema anodi (Slika 9).



Slika 9. Sastavljanje kazete za Western analizu (preuzeto i prilagođeno prema Mahmood i Yang 2012).

Prijenos je trajao 90 minuta pri 250 mA. Nakon transfera membrane sam obojila bojom *Ponceau S* oko 5 minuta, a zatim dva puta isprala u mq vodi kako bi se odbojale. Membrane sam zatim blokirala u 5 % otopini „*non-fat*“ mlijeka u prahu (0,5 g mlijeka u prahu u 10 ml TBS-T) u puferu TBS-T (engl. *tris buffered saline and Tween20*) 1 sat na 37 °C u vodenoj kupelji. Membrane sam zatim inkubirala u 1:1.000 razrjeđenju primarnog anti-FLAG antitijela iz kunića (Sigma) u puferu TBS-T preko noći na +4 °C. Membrane sam zatim isprala tri puta po 10 minuta u puferu TBS-T te zatim inkubirala sa 1:10.000 razrjeđenjem sekundarnog anti-kunić antitijela iz koze (engl. *goat anti-rabbit*) na koje je vezana peroksidaza iz hrena (Sigma) 1 sat na sobnoj temperaturi. Membrane sam zatim isprala dva puta po 10 minuta u puferu TBS-T, te dva puta po

10 minuta u puferu TBS. Nakon ispiranja, uslijedila je vizualizacija membrana. Na membrane sam nanijela 1 mL reagensa za detekciju neposredno prije detekcije. Reagens za detekciju dobila sam miješanjem po 500 μ L otopine 1 i 2 iz kompleta *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare). Membrane sam zatim vizualizirala na uređaju za detekciju kemiluminiscencije *Alliance Q9 mini* (Uvitec).

3.5. Izolacija RNA

Za izolaciju RNA nacijepila sam oko 120.000 stanica HEK293T po jažici u pločice sa šest jažica. Nakon transfekcije i tretmana s H_2O_2 sa stanica sam uklonila medij DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Stanice sam isprala s 1 mL pufera 1XPBS po jažici te sam nakon toga na stanice dodala 500 μ L Trizola (Sigma-Aldrich) po jažici koji je izazivao lizu stanica. Nakon inkubacije od nekoliko minuta, lizate stanica sam prebacila u sterilne tubice volumena 1,5 mL. Stanice sam inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na lizate sam dodala 200 μ L kloroforma (Sigma-Aldrich). Tubice sam vorteksirala 15 s na uređaju *Electric vortex EV-100* (Tehtnica) te ponovo inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim sam suspenzije centrifugirala u centrifugi *5415R* (Eppendorf) 15 min na $12.000 \times g$ na $+4$ °C. Centrifugiranjem stanica dobila sam tri faze: gornji bistri, vodeni sloj koji je sadržavao RNA potom međufazni sloj koji je sadržavao DNA te organski sloj koji je sadržavao proteine. Vodenu fazu sam oprezno prebacila u nove tubice te sam zabilježila volumen odvojene faze. Na vodenu fazu sam dodala isti volumen 100 % izopropanola. Uzroke sam pomiješala okretanjem tubice 3 do 4 puta te sam ih inkubirala deset minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga centrifugirala u centrifugi *5415R* (Eppendorf) 10 min na $12.000 \times g$ na $+4$ °C. Supernatant sam uklonila te sam na talog dodala 500 μ L 75 % etanola. Uzorke sam kratko vorteksirala te na talog dodala 500 μ L 75 % etanola, vorteksirala i ponovo centrifugirala. Pipetom sam pažljivo uklonila supernatant, a pelet (talog) sam osušila u sterilnom laminaru *Aura mini* (BioAir). Talog se ne smije presušiti jer se time znatno smanjuje topljivost taloga. Osušeni talog sam otopila u 20 μ L mq vode tretirane dietil pirokarbonatom (DEPC, engl. *diethyl pyrocarbonate*). Koncentraciju i čistoću dobivenih RNA izmjerila sam na *BioDrop DUO* mikrovolumnom spektrofotometru (Biochrom) te sam uzorke RNA provjerila na 1 % agaroznom gelu u puferu 1XTE. Osim koncentracije na uređaju sam dobila podatke i o A_{260}/A_{280} te A_{260}/A_{230} omjerima. A_{260}/A_{280} je omjer apsorbancije na 260 i 280 nm. Koristi se za procjenu čistoće uzoraka DNA i RNA. Prihvaćeno je da je omjer čiste RNA oko 2,0. Omjer koji je znatno niži ili viši može ukazivati na prisutnost proteina, fenola ili pak

nekim drugih onečišćivača koji apsorbiraju na valnoj duljini blizu 280 nm. Omjer A_{260}/A_{230} , koristi se kao sekundarno mjerilo za čistoću nukleinskih kiselina. Vrijednosti A_{260}/A_{230} omjera za čistu nukleinsku kiselinu često mogu biti veće u odnosu na omjer A_{260}/A_{280} . Očekivane vrijednosti omjera A_{260}/A_{230} za čiste nukleinske kiseline su između 2,0 i 2,2. Ukoliko je omjer znatno manji to može ukazivati na prisutnost onečišćivača koji se apsorbiraju na valnoj duljini od 230 nm (Thermo Fisher 2010). Pripremljene uzorke RNA razdvojila sam na 1,2 % agaroznom gelu u puferu 1XTBE. Kada se radi gel elektroforeza radi provjere RNA, ne smije se koristiti visoki napon kako se RNA ne bi dodatno razgradila tijekom elektroforeze. U tu svrhu koristila sam napon od 55 V. Izolaciju RNA sam napravila u 3 biološka replikata.

3.5.1. Uklanjanje genomske DNA prije reverzne transkripcije

Nakon izolacije RNA uslijedilo je prevođenje RNA u pripadne komplementarne DNA (cDNA), no prije toga bilo je potrebno ukloniti genomsku DNA u svim uzorcima. Genomsku DNA uklonila sam primjenom kita *Thermo Fisher Scientific DNaseI*. Za svaki od uzoraka primijenila sam sljedeći protokol. U *RNase-free* tubicu sam za svaki uzorak dodala 1 µg uzorka RNA, 1 µL 10X reakcijskog pufera s $MgCl_2$, 1 µL *DNaseI*, *RNase-free* (Thermo Fisher Scientific) i do 10 µL DEPC tretirane vode. *DNase*, *RNase-free* je endonukleaza koja razgrađuje jednolančanu i dvolančanu DNA (Thermo Fisher Scientific 2022). Uzorke sam inkubirala 30 minuta na 37 °C na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Nakon inkubacije u uzorke sam dodala 1 µL 50 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) te sam ih inkubirala 10 min na 65 °C na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Pripremljene RNA koristila sam kao kalupe za reverznu transkripciju.

3.6. Analiza ekspresije gena pomoću kvantitativnog PCR-a

3.6.1. Reverzna transkripcija

U reakciju reverzne transkripcije (RT) dodala sam 1 µg RNA i ostale komponente prema Tablici 7.

Tablica 7. Komponente korištene u reakciji reverzne transkripcije.

Komponenta	Volumen (μL)
<i>Oligo(dT)18</i> (#SO131) (Thermo Fisher Scientific)	1
DEPC tretirana voda (#R0601) (Thermo Fisher Scientific)	do 12,5
<i>5XReaction buffer</i> (Thermo Fisher Scientific)	4
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> (#EO0381) (Thermo Fisher Scientific)	0,5
<i>dNTP Mix</i> (Thermo Fisher Scientific)	2
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i> (Thermo Fisher Scientific)	1

Ukupan volumen reakcije bio je 20 μL . Sadržaj tubice lagano sam promiješala te kratko centrifugirala na uređaju *Mini centrifuge* (FastGene). Reakcije sam inkubirala na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf) 60 minuta na 42 °C. Reakcije sam zaustavila zagrijavanjem uzoraka 10 min na 70 °C na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Dobivenu komplementarnu DNA (cDNA) sam koristila za kvantitativni PCR (qPCR, engl. *quantitative polymerase chain reaction*).

3.6.2. Kvantitativni PCR

Ekspresiju gena ispitala sam pomoću kvantitativnog PCR-a (qPCR, engl. *quantitative PCR*) primjenom SYBR Green metode. Kvantitativni PCR je metoda pomoću koje se može odrediti količina PCR produkta u stvarnom vremenu. Korisna je za ispitivanje ekspresije gena (Maddocks i Jenkins 2017). SYBR Green metoda se temelji na vezanju SYBR Green boje za manji utor dvolančane DNA. Vezanjem SYBR Green boje na dvolančanu DNA, povećava se intenzitet fluorescencije (Applied Biosystems 2010). Utvrdila sam ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima cDNA koje sam dobila reverznom transkripcijom. Ekspresiju sam utvrdila da bih ustanovila utječe li pojačana ekspresija izoforme 2, odnosno 3 proteina SH2D3C na ekspresiju gena reguliranih transkripcijskim faktorom NRF2. Referentni gen koji sam koristila za normalizaciju ekspresije bio je *TUBG1*. Prije postavljanja qPCR-a cDNA sam razrijedila u omjeru 1:5. Početnu koncentraciju cDNA, koja je iznosila 50 ng/ μL , razrijedila sam na 10 ng/ μL . 20 μL svakog uzorka razrijedila sam s 80 μL mq vode. Nakon toga sam napravila *Master Mix*-eve prema Tablici 8.

Tablica 8. Komponente *Master Mix*a za *TUBG1*, *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*.

<i>Master Mix</i>	<i>TUBG1</i> (100 nM primer)	<i>NQO1</i> (200 nM primer)	<i>HMOX1</i> (100 nM primer)	<i>NRF2</i> (200 nM primer)
<i>2X SYBRTM Green PCR Master Mix</i>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Primer – F</i>	0,1 µL	0,2 µL	0,1 µL	0,2 µL
<i>Primer – R</i>	0,1 µL	0,2 µL	0,1 µL	0,2 µL
H ₂ O	3,8 µL	3,6 µL	3,8 µL	3,6 µL

Master Mix-eve sam pripremila u laminaru *Aura Mini* (BioAir) kako bi uvjeti bili što sterilniji. Uzorke i *Master Mix*-eve sam zatim razdijelila u pločicu od 96 jažica. U svaku sam jažicu dodala 9 µL odgovarajućeg *Master Mix*-a i 1 µL uzorka cDNA. Tako pripremljenu pločicu kratko sam centrifugirala te zatim postavila na qPCR uređaj modela *CFX96* (Bio-Rad). Na uređaju sam namjestila da je volumen uzorka 10 µL. Od fluorofora u opcijama sam odabrala samo SYBR Green. Nakon toga pokrenula sam program. Parametri qPCR programa prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Parametri qPCR programa.

Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Završni dio programa qPCR uređaja je tzv. krivulja taljenja. U ovom dijelu programa temperatura raste od 65 °C do 95 °C, svakih 5 sekundi temperatura se povećava za 0,5 °C.

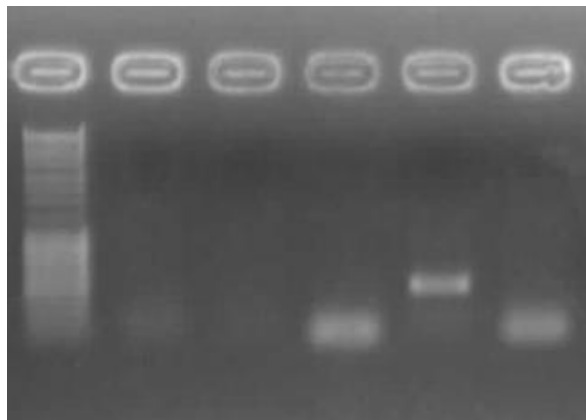
3.7. Statistička analiza

Ekspresiju gena analizirala sam metodom po Pfafflu (Pfaffl 2001). Rezultate sam obradila pomoću dvostranog, neuparenog t -testa i grafički prikazala pomoću računalnog programa GraphPad Prism 5.

4. Rezultati

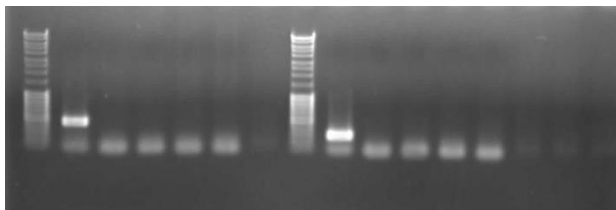
4.1. Provjera humane DNA na prisutnost mikoplazmi nakon PCR umnažanja

Provjera na prisutnost rRNA gena mikoplazmi provedena je pomoću metode PCR, pri čemu su uzorci umnožene DNA provjereni elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu te su nakon bojanja etidij bromidom analizirani na uređaju za detekciju fluorescencije *GeneSnap* (Syngene) (Slika 10).



Slika 10. Raspored uzoraka na gelu: M (marker), hDNA1, hDNA2, NK1 (mq voda), DNA PK (pozitivna kontrola, myco+), NK2 (negativna kontrola, myco-).

PCR testom je utvrđena prisutnost mikoplazmi samo u uzorku pozitivne kontrole, što je bilo i očekivano. U uzorcima hDNA1 (DNA iz stanica HEK293T, 50 ng/ μ L), hDNA2 (DNA iz stanica HEK293T, 100 ng/ μ L), NK1 (mq voda) i NK2 (myco-) mikoplazme nisu utvrđene (Slika 10). Naknadno je provjerena prisutnost mikoplazmi i primjenom dodatnog para početnica (MGSO; GPO-3) te je utvrđeno kako humana DNA izolirana iz HEK293T stanica nije zagađena prisutnošću mikoplazmi (Slika 11).



Slika 11. Raspored uzoraka na gelu, M (marker), PK, NK1 (myco-), NK2 (mq voda), hDNA1 (početnice F1, R1), hDNA2 (F1, R1); x, M, PK (myco+), NK1 (myco-), NK2 (mq voda), hDNA1 (MGSO, GPO-3), hDNA2 (MGSO, GPO-3).

4.2. Analiza prekomjerne ekspresije proteina

Proteini su izolirani iz netretiranih HEK293T stanica koje su bile transfecirane pFLAGCMV2 praznim vektorom te plazmidima pFLAGCMV2-SH2D3C-iso2 i pFLAGCMV2-SH2D3C-iso3 te iz HEK293T stanica koje su nakon transfekcije navedenim vektorima bile tretirane 400 μM H_2O_2 .

4.2.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Metodom po Bradfordu određena je koncentracija izoliranih proteina u uzorcima proteina iz netretiranih stanica (Tablice 10 i 11) i stanica tretiranih s 400 μM H_2O_2 (Tablice 12 i 13). *BioDrop DUO* mikrovolumnim spektrofotometrom izmjerene su apsorbancije uzoraka na 595 nm (A_{595}). Iz podataka o apsorbanciji utvrđene su koncentracije. Izmjerena je apsorbancija slijepe probe u tri replikata te je izračunata srednja vrijednost apsorbancije slijepe probe (Tablica 10). Zatim su izmjerene apsorbancije proteinskih uzoraka u dva replikata, od njih je oduzeta srednja vrijednost apsorbancije slijepe probe te je iz tih vrijednosti dobivena masena koncentracija (γ), na način da se srednja vrijednost apsorbancije proteinskih uzoraka množi s faktorom baždarne krivulje ($\Phi = 14,184$) te se taj rezultat podijeli s volumenom uzorka (2 μL) (Tablica 11).

Tablica 10. Apsorbancije uzoraka slijepe probe na 595 nm.

Slijepa proba	A_{595}	A_{595} - srednji
SP1	0,505	0,535
SP2	0,523	
SP3	0,576	

Tablica 11. Apsorbancija uzoraka FLAG, iso2 i iso3 na 595 nm.

Uzorak*	A_{595}	ΔA_{595}	ΔA_{595} - srednja	γ /mg mL ⁻¹
FLAG	0,737	0,202	0,238	1,69
	0,809	0,274		
iso2	0,806	0,271	0,264	1,87
	0,792	0,257		
iso3	0,79	0,255	0,294	2,09
	0,868	0,333		

* U tablici su prikazane srednje vrijednosti ΔA_{595} svakog pojedinog uzorka, srednja vrijednost za oba replikata (ΔA_{595} -srednja) te izračunata masena koncentracija (γ) za svaki uzorak.

Na isti način je određena koncentracija proteina u uzorcima izoliranim iz stanica tretiranih s 400 μ M H_2O_2 .

Tablica 12. Apsorbancije uzoraka slijepe probe na 595 nm.

Slijepa proba	A_{595}	A_{595} - srednji
SP1	0,536	0,548
SP2	0,556	
SP3	0,551	

Tablica 13. Apsorbancija uzoraka FLAG+H₂O₂, iso2+H₂O₂ i iso3+H₂O₂ na 595 nm.

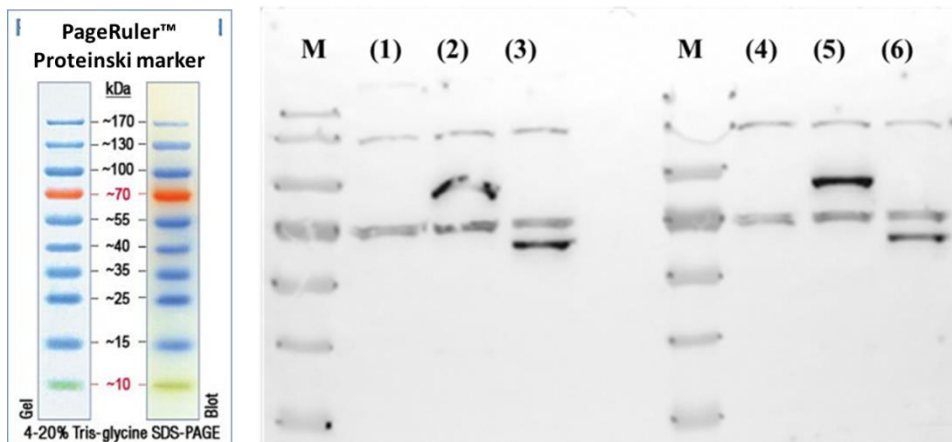
Uzorak*	A_{595}	ΔA_{595}	ΔA_{595} - srednja	γ /mg mL ⁻¹
FLAG+H ₂ O ₂	0,724	0,176	0,171	1,21
	0,714	0,166		
iso2+H ₂ O ₂	0,706	0,158	0,140	0,99
	0,670	0,122		
iso3+H ₂ O ₂	0,738	0,190	0,141	1,00
	0,639	0,091		

* U tablici su prikazane srednje vrijednosti ΔA_{595} svakog pojedinog uzorka, srednja vrijednost za oba replikata (ΔA_{595} -srednja) te izračunata masena koncentracija (γ) za svaki uzorak.

4.2.2. Western blot analiza proteina

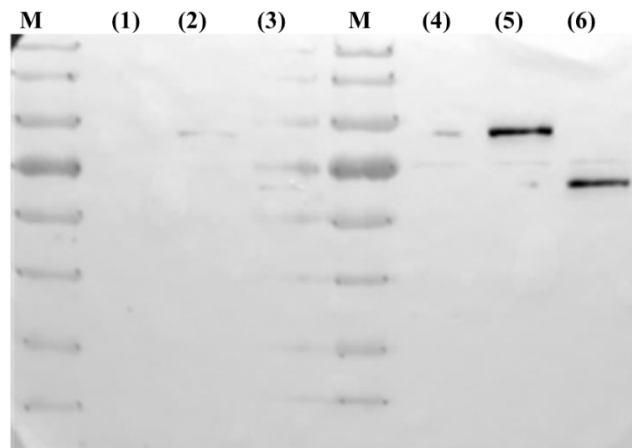
Nakon testa po Bradfordu izolirani proteini nanoseni su na poliakriamidni gel uz dodatak SDS-a, a potom su preneseni s gela na nitroceluloznu membranu metodom Western blot. Analiza prijenosa proteina na membranu provedena je u svrhu provjere ekspresije izoformi proteina SH2D3C: iso2 i iso3 koje imaju FLAG privjesak. Nitrocelulozna membrana na koju su preneseni izolirani proteini je inkubirana s primarnim anti-FLAG antitijelom iz kunića (Sigma) te

sekundarnim anti-kunić antitijelom iz kože (Sigma) na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon dodatka kemiluminiscencijskih reagensa (GE Healthcare) signali su vizualizirani na uređaju za detekciju kemiluminiscencije *Alliance Q9* (Uvitec). Membrana na koju su preneseni proteini iz netretiranih stanica prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Prikaz nitrocelulozne membrane s uzorcima koji su netretirani. Redoslijed nanošenja uzoraka: marker proteinskih masa M (*PageRuler* marker), FLAG (1), iso2 (2), iso3 (3), M, FLAG (4), iso2 (5) i iso3 (6); uzorci staničnih lizata nanoseni su na membranu u količini od 10 μg (2,3) te 20 μg (5,6).

Na membrani su na poziciji 2 i 3 vidljive proteinske vrpce iso2 (79 kDa) odnosno iso3 (58,9 kDa) proteina prisutnih u staničnom lizatu. Proteini su također utvrđeni i na poziciji 5 (79 kDa) i 6 (58,9 kDa), čime je potvrđeno da su proteini uspješno eksprimirani u stanicama. Na membrani se također vide nespecifične vrpce pri 70 i 130 kDa. Na isti način su analizirani proteini iz stanica tretiranih s 400 μM H_2O_2 (Slika 13).



Slika 13. Prikaz nitrocelulozne membrane s uzorcima koji su tretirani s H_2O_2 . Proteini su nanieseni na membranu sljedećim redoslijedom: M (*PageRuler* marker), FLAG+ H_2O_2 (1), iso2+ H_2O_2 (2), iso3+ H_2O_2 (3), M (*PageRuler* marker), FLAG+ H_2O_2 (4), iso2+ H_2O_2 (5) i iso3+ H_2O_2 (6); količine uzoraka staničnih lizata, koji su nanieseni na membranu, bile su 10 μ g (2,3) i 20 μ g (5,6).

Ekspresija proteina SH2D3C izoformi 2 i 3 dokazana je u uzorcima koji su tretirani s H_2O_2 u proteinskim vrpama 5 (iso2) i 6 (iso3). U uzorcima 2 i 3 nanieseno je premalo uzoraka pa su vrpce preslabe. U jažicu 3 se prelio uzorak iz jažice s markerom.

4.3. Mjerenje koncentracije i provjera čistoće izolirane RNA

Koncentracija izolirane RNA izmjerena je na *BioDrop DUO* spektrofotometru. Također su provjereni omjeri A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} koji ukazuju na čistoću izolirane RNA. Izmjereni podatci o koncentraciji i omjerima A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} za dvije skupine uzoraka prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. Koncentracija i čistoća izolirane RNA.

	NT*			+H ₂ O ₂ *		
RNA	<i>BioDrop</i> ng/μL	A260/A280	A260/A230	<i>BioDrop</i> ng/μL	A260/A280	A260/A230
EV-1	1504,7	1,977	2,18	2023,9	1,961	1,832
EV-2	1234	1,994	2,253	2379,1	1,95	2,207
EV-3	1249,9	1,997	2,31	1567,5	1,953	1,963
iso2-1	1971	1,953	2,234	1496,9	1,932	2,262
iso2-2	1396,9	1,988	2,267	1943,5	1,948	2,038
iso2-3	1977,9	1,96	2,159	1115,5	1,723	1,932
iso3-1	1501	1,991	2,241	1676,8	1,941	2,242
iso3-2	1531,6	2,061	2,025	1873,1	1,947	2,27
iso3-3	1351	1,99	2,138	1643,5	1,948	2,155

* Prikazane su koncentracije uzoraka izolirane RNA i vrijednosti omjera A₂₆₀/A₂₈₀ i A₂₆₀/A₂₃₀ za dvije skupine uzoraka. Uzorci RNA iz prve skupine su izolirani iz netretiranih stanica (NT), dok su uzorci RNA iz druge skupine izolirani iz stanica tretiranih s 400 μM H₂O₂.

Vrijednosti omjera A₂₆₀/A₂₈₀ za uzorke izolirane RNA iz obje skupine otprilike su jednake onim vrijednostima koje se očekuju za uzorke čiste RNA. Vrijednosti omjera A₂₆₀/A₂₃₀ za uzorke iz obje skupine su unutar raspona ili ne odstupaju značajno od vrijednosti koje se očekuje za uzorke čiste RNA.

4.4. Analiza ekspresije gena

Genska ekspresija ispitana je pomoću kvantitativnog PCR-a. Utvrđena je ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* da bi se ustanovilo utječe li pojačana ekspresija izoformi 2 i 3 proteina SH2D3C na ekspresiju gena reguliranih transkripcijskim faktorom NRF2. Napravljena su četiri biološka replikata kvantitativnog PCR-a za netretirane uzorke i tri biološka replikata za uzorke tretirane s H₂O₂. Analiza ekspresije gena napravljena je pomoću metode po Pfafflu s *TUBG1* kao referentnim genom. Rezultati kvantitativnog PCR-a obrađeni su pomoću dvostranog, neuparenog *t*-testa, a grafički je prikaz napravljen u programu GraphPad Prism 5.

Iz vrijednosti relativnih ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima iz svih replikata, izračunate su prosječne vrijednosti relativnih ekspresija i standardne greške. Prosječne vrijednosti relativnih ekspresija za gene *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima FLAG, iso2 i iso3 iz

netretiranih stanica nalaze se u Tablici 15, a prosječne vrijednosti i standardna greška u uzorcima iz stanica tretiranih s H₂O₂ nalaze se u Tablici 16.

Tablica 15. Srednja vrijednost relativnih ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima FLAG, iso2 i iso3 iz netretiranih stanica.

Uzorak	Relativna ekspresija gena*		
	<i>NQO1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NRF2</i>
FLAG	1,033 ± 0,150	1,162 ± 0,372	1,049 ± 0,168
iso2	0,694 ± 0,125	1,602 ± 0,523	1,017 ± 0,223
iso3	0,394 ± 0,038	0,412 ± 0,168	0,356 ± 0,099

*Rezultati su prikazani kao SV ± SP (n=4)

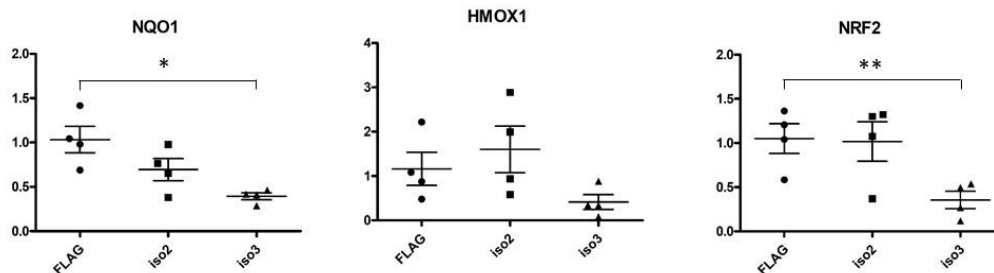
Tablica 16. Srednja vrijednost relativnih ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima FLAG, iso2 i iso3 koji su tretirani s H₂O₂.

Uzorak	Relativna ekspresija gena*		
	<i>NQO1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NRF2</i>
FLAG	1,053 ± 0,220	1,041 ± 0,220	1,009 ± 0,093
iso2	0,985 ± 0,070	0,996 ± 0,073	0,872 ± 0,077
iso3	0,781 ± 0,067	0,736 ± 0,090	0,924 ± 0,261

*Rezultati su prikazani kao SV ± SP (n=3)

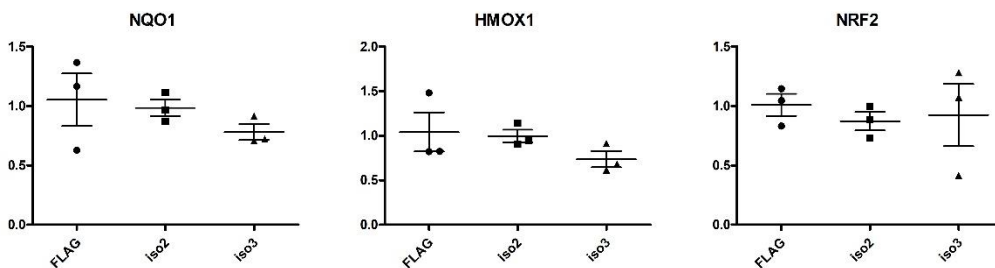
Grafički prikaz rezultata kvantitativnog PCR-a napravljen je u računalnom programu GraphPad Prism 5. Grafički prikaz rezultata za uzorke iz netretiranih stanica nalazi se na Slici 14.

Analizom rezultata ekspresije utvrđeno je statistički značajno smanjenje ekspresije gena *NQO1* i *NRF2* u stanicama koje prekomjerno ekspimiraju izoformu 3 proteina SH2D3C u odnosu na stanice transfecirane praznim pFLAGCMV2 vektorom dok nema razlike u ekspresiji gena u uzorcima stanica koje prekomjerno ekspimiraju izoformu 2 proteina SH2D3C.



Slika 14. Prikaz analize rezultata kvantitativnog PCR-a za uzorke iz netretiranih stanica. Prikazane su vrijednosti svih replikata (FLAG – točke, iso2 – kvadrati, iso3 – trokuti), i srednje vrijednosti relativne ekspresije sa standardnom greškom. Zvezdicama su označene statistički značajne razlike u ekspresiji određene pomoću neuparenog *t*-testa (*NQO1*, FLAG vs. iso3 ** $p = 0,0060$; *NRF2*, FLAG vs. iso3 * $p = 0,0121$). Grafovi i statistička analiza su napravljeni u programu GraphPad Prism 5.

Grafički prikaz rezultata kvantitativnog PCR-a za uzorke koji su tretirani s H_2O_2 nalazi se na Slici 15.



Slika 15. Prikaz analize rezultata kvantitativnog PCR-a za uzorke iz stanica tretiranih s 400 μM H_2O_2 . Prikazane su vrijednosti svih replikata (FLAG – točke, iso2 – kvadrati, iso3 – trokuti), i srednje vrijednosti relativne ekspresije sa standardnom greškom. Nema statistički značajnih razlika u ekspresiji. Grafovi i statistička analiza su napravljeni u programu GraphPad Prism 5.

Utvrđeno je da u stanicama transfeciranim s praznim vektorima i stanicama koje ekspresiraju izoformu 2, odnosno 3 proteina SH2D3C nakon tretmana s H_2O_2 nema statistički značajnih razlika u ekspresiji gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*.

5. Rasprava

Prema nekim procjenama u stanicama se događa oko 650.000 različitih protein-protein interakcija i velika većina još uvijek nije identificirana (Stumpf i sur. 2008). Postoje mnogi proteini čiji interaktori nisu identificirani i mnogi proteini za koje je identificirano manje od 5 interaktora. Jedan od takvih proteina je i dipeptidil-peptidaza III (DPP III). Postoji samo jedan dokazani interaktor DPP III, protein KEAP1 (engl. *kelch like ECH associated protein 1*), a DPP III je putem te interakcije uključen u regulaciju signalnog puta NRF2-KEAP1, jednog od glavnih puteva regulacije odgovora na oksidacijski stres u stanicama (Hast i sur. 2013). Analizom interaktoma DPP III u stanicama TRex HEK293T metodom obilježavanja aminokiselina u staničnoj kulturi stabilnim izotopima (SILAC, engl. *stable isotope labeling of amino acids in cell culture*) u kombinaciji s masenom spektrometrijom identificiran je protein SH2D3C kao potencijalni interaktor proteina DPP III (neobjavljeni rezultati). Pokazano je da je protein SH2D3C uključen u regulaciju niza staničnih procesa, uključujući staničnu migraciju i adheziju, međutim njegova fiziološka uloga je još uvijek uglavnom nerazjašnjena. Interakcija DPP III i SH2D3C mogla bi predstavljati vezu između odgovora na oksidacijski stres putem NRF2-KEAP1 signalnog puta i regulacije procesa u koje je uključen SH2D3C, uključujući staničnu migraciju. U sklopu ovog istraživanja utvrđen je utjecaj prekomjerne ekspresije dviju izoformi proteina SH2D3C na razinu ekspresije gena koji su pod kontrolom transkripcijskog faktora *NRF2*, *NQO1*, *HMOX1* i samog *NRF2*, s obzirom da regulira i vlastitu transkripciju, da bi se utvrdilo ima li povećana ekspresija SH2D3C utjecaj na regulaciju NRF2-KEAP1 signalnog puta. U HEK293T stanicama su prekomjerno eksprimirane izoforme 2 i 3 proteina SH2D3C te je utvrđeno da u stanicama u kojima je eksprimirana izoforma 3 proteina SH2D3C dolazi do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *NQO1* i *NRF2*, dok je razina ekspresije *HMOX1* također smanjena, ali ne statistički značajno (Tablica 15, Slika 14). Naša hipoteza je da se prekomjerno eksprimirani SH2D3C veže na DPP III i time sprječava njegovo vezanje na KEAP1, čime se smanjuje razina slobodnog NRF2 u stanicama, njegova translokacija u jezgru i razina ekspresije NRF2-kontroliranih gena. Naši rezultati (Tablica 15, Slika 14) su djelomično u skladu s rezultatima istraživanje Hast i sur. (2013) koji su utvrdili da utišavanje DPP III pomoću malih interferirajućih RNA (siRNA, engl. *small interfering RNA*) utišava ekspresiju dvaju gena kontroliranih s *NRF2*, *HMOX1* i *GCSm* (Hast i sur. 2013) jer je vezanje DPP III na SH2D3C imalo sličan učinak kao i utišavanje samog DPP III. Iznenađujući rezultat je da samo izoforma 3

proteina SH2D3C pokazuje taj učinak jer je u stanicama koje eksprimiraju izoformu 2 ekspresija NRF2-kontroliranih gena na istoj razini kao i u stanicama transfeciranim praznim pFLAGCMV2 vektorom (Tablica 16, Slika 15). Vezanje obiju izoformi SH2D3C na DPP III utvrđeno je pomoću koimunoprecipitacije i GST-izvlačenja (engl. *GST-pulldown*) (neobjavljeni rezultati) te smo očekivali da će prekomjerna ekspresija obiju izoformi uzrokovati smanjenje ekspresije NRF2-kontroliranih gena. Izoforme 2 i 3 se razlikuju u N-kraju, obje izoforme sadrže RasGEF-sličnu domenu dok samo izoforma 2 sadrži i SH2 domenu. Moguće je da je različito djelovanje ovih izoformi na ekspresiju NRF2-kontroliranih gena vezano uz SH2 domenu jer je poznato da se proteini iz porodica NSP putem SH2 domene vežu na aktivirane receptorske kinaze iz porodica EPH i ERBB, međutim provjera te mogućnosti je van obuhvata ovog rada te će zahtijevati dodatna istraživanja. Razina ekspresije gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u stanicama koje prekomjerno eksprimiraju izoforme 2 i 3 proteina SH2D3C mjerena je i u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog tretmanom s vodikovim peroksidom. Tretman stanica peroksidom poništava utjecaj prekomjerne ekspresije izoforme 3 SH2D3C na ekspresiju NRF2-kontroliranih gena, odnosno razina ekspresije *NQO1* i *NRF2* u stanicama koje prekomjerno eksprimiraju izoformu 3 SH2D3C se ne razlikuje od ekspresije u stanicama transfeciranim praznim vektorom (Tablica 16, Slika 15). Taj rezultat je u skladu s rezultatom Lu i sur. (2017) koji su pokazali da tretman stanica vodikovim peroksidom pojačava vezanje DPP III na KEAP1 i da utišavanje ekspresije DPP III ne utječe na bazalnu razinu NRF2, ali utječe na odgodu translokacije NRF2 u jezgru nakon tretmana stanica peroksidom te su stanice koje ne eksprimiraju DPP III osjetljivije na oksidacijski stres (Lu i sur. 2017). Rezultati ovog istraživanja prema kojima ekspresija izoforme 3 SH2D3C izaziva smanjenje ekspresije dvaju gena kontroliranih s NRF2 govore u prilog našoj tezi da bi interakcija SH2D3C i DPP III mogla predstavljati vezu između odgovora na oksidacijski stres putem NRF2-KEAP1 signalnog puta i procesa u koje je uključen protein SH2D3C. Najzanimljivija je mogućnost veze između regulacije migracije i NRF2-KEAP1 signalnog puta pošto je poznato da je taj put često prekomjerno aktiviran u raku, a stanična migracija je izuzetno važna za proces nastanka udaljenih metastaza.

6. Zaključak

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti slijedeće zaključke:

1. Izoforme 2 i 3 proteina SH2D3C su uspješno prekomjerno eksprimirane u stanicama HEK293T.
2. U bazalnim uvjetima prekomjerna ekspresija izoforme 2 proteina SH2D3C ne utječe na ekspresiju NRF2-kontroliranih gena, *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*.
3. U bazalnim uvjetima prekomjerna ekspresija izoforme 3 proteina SH2D3C uzrokuje statistički značajno smanjenje ekspresije NRF2-kontroliranih gena, *NQO1* i *NRF2* u odnosu na stanice transfecirane praznim vektorom.
4. U uvjetima oksidacijskog stresa nakon tretmana s vodikovim peroksidom prekomjerna ekspresija obiju izoformi proteina SH2D3C ne utječe na ekspresiju NRF2-kontroliranih gena, *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2*.
5. Smanjenje ekspresije NRF2-kontroliranih gena, *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* nakon prekomjerne ekspresije izoforme 3 proteina SH2D3C ide u prilog našoj hipotezi da bi interakcija SH2D3C i DPP III mogla predstavljati vezu između odgovora na oksidacijski stres putem NRF2-KEAP1 signalnog puta i procesa u koje je uključen protein SH2D3C, međutim potvrda te hipoteze kao i određivanje mehanizma djelovanja SH2D3C na signalni put NRF2-KEAP1 zahtjeva daljnja istraživanja.

7. Literatura

Abramić, M., Zubanović, M., Vitale, Lj. (1988): Dipeptidyl Peptidase III from Human Erythrocytes. *Biological Chemistry* 369: 29-38.

Alhalmi, A., Alzobaidi, N., Abdulrahman, A. (2020): Intracellular Protein Biosynthesis: A Review. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* 5: 10-18.

Applied Biosystems (2010): <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4407003.pdf> (pristupljeno 03.09.2022.).

Baral, P. K., Jajčanin-Jozić, N., Deller, S., Macheroux, P., Abramić, M., Gruber, K. (2008): The First Structure of Dipeptidyl-peptidase III Provides Insight into the Catalytic Mechanism and Mode of Substrate Binding. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 22316-22324.

Barrett, A. J., Chen J. M. (2013): Dipeptidyl-Peptidase III. U: Rawlings, N. D., Salvesen, G. (ur.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, str. 1285-1289.

Bateman, A., Martin M. J., Orchard, S., Magrane, M., Agivetova, R., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bursteinas, B., Bye-A-Jee, H., Coetzee, R., Cukura, A., Da Silva, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T., Fan, J., Garcia Castro, L., Garmiri, P., Georghiou, G., Gonzales, L., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Jokinen, P., Joshi, V., Jyothi, D., Lock, A., Lopez, R., Luciani, A., Luo, J., Lussi, Y., MacDougall, A., Madeira, F., Mahmoudy, M., Manchi, M., Mishra, A., Moulang, K., Nightingale, A., Oliveira, C. S., Pundir, S., Qi, G., Raj, S., Rice, D., Rodriguez Lopez, M., Saidi, R., Sampson, J., Sawford, T., Speretta, E., Turner, E., Tyagi, N., Vasudev, P., Volynkin, V., Warner, K., Watkins, X., Zaru, R., Zellner, H., Bridge, A., Poux, S., Redaschi, N., Aimo, L., Argoud-Puy, G., Auchincloss, A., Axelsen, K., Bansal, P., Baratin, D., Blatter, M. C., Bolleman, J., Boutet, E., Breuza, L., Casals-Casas, C., de Castro, E., Chikh Echioukh, K., Coudert, E., Cuhe, B., Doche, M., Dornevil, D., Estreicher, A., Famiglietti, M. L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Hyka-Nouspikel, N., Jungo, F., Keller, G., Kerhornou, A., Lara, V., Le Mercier, P., Lieberherr, D., Lombardot, T., Martin, X., Masson, P., Morgat, A., Batista Neto, T., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pourcel, L., Pozzato, M., Pruess, M., Rivoire, C., Sigrist, C., Sonesson, K., Stutz, A., Sundaram, S., Tognolli, M., Verbregue, L., Wu, C. H., Arighi, C. N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Garavelli, J. S.,

- Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D. A., Ross, K., Vinayaka, C. R., Wang, Q., Wang, Y., Yeh, L. S., Zhang, J., Ruch, P., Teodoro, D. (2021): UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49: D480- D489.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2013): *Biokemija. Školska knjiga*, Zagreb.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2004): *Stanica. Medicinska naklada*, Zagreb.
- Emanuele, S., Celesia, A., D'Anneo, A., Lauricella, M., Carlisi, D., De Blasio, A., Giuliano, M. (2021): The Good and Bad of Nrf2: An Update in Cancer and New Perspectives in COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 1-22.
- Guyton, A. C., Hall, J. H. (2017): *Medicinska fiziologija. Medicinska naklada*, Zagreb.
- Hast, B. E., Goldfarb, D., Mulvaney, K. M., Hast, M. A., Siesser, P. F., Yan, F., Hayes, D. N., Major, M. B. (2013): Proteomic Analysis of Ubiquitin Ligase KEAP1 Reveals Associated Proteins That Inhibit NRF2 Ubiquitination. *Cancer Research* 73: 2199-2210.
- Jaramillo, M., Zhang, D. (2013): The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & Development* 27: 2179-2191.
- Lee, Y. L., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012): Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62: 1 – 5.
- Lu, K., Alcivar, A. L., Ma, J., Foo, T. K., Zywea, S., Mahdi, A., Huo, Y., Kensler, T. W., Gatz, M. L., Xia, B. (2017): NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress–Induced DPP3–KEAP1 Interaction. *Cancer Research* 77: 2881-2892.
- Mace, P. D., Wallez, Y., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Robinson, H., Pasquale, E. B., Riedl, S. J. (2011): NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling. *Nature Structural & Molecular Biology* 18: 1381-1387.
- Maddocks, S., Jenkins, R. (2017): *Quantitative PCR: Things to Consider*. U: Maddocks, S., Jenkins, R. (ur.) *Understanding PCR*. Academic Press, str. 45-52.
- Mahmood, T., Yang, P. C. (2012): *Western blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. *North American Journal of Medical Sciences* 4: 429 – 434.

Motohashi, H., Yamamoto, M. (2004): Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine* 10: 549-557.

Nikfarjam, L., Farzaneh, P. (2012): Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell Journal* 13: 203 – 212.

Olson, B. J. S. C., Markwell, J. (2007): Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* 48: 3.4.1 – 3.4.29.

Peng, X., Wang, J., Peng, W., Wu, F. X., Pan, Y. (2017): Protein-protein interactions: detection, reliability assessment and applications. *Briefings in Bioinformatics* 18: 798-819.

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002 – 2007.

Prajapati, S. C., Chauhan, S. S. (2011): Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS Journal* 278: 3256-3276.

Promega (2022): <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/transfection/#an-introduction-to-transfection-1c1a2832-8651-45f8-a50b-f86e67160c53> (pristupljeno 06.08.2022.).

ScienceDirect (2022): <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ethidium-bromide> (pristupljeno 02.08.2022.).

Scitable (2014): <https://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286/#:~:text=Gel%20electrophoresis%20is%20a%20laboratory,gel%20that%20contains%20small%20pores.> (pristupljeno 31.07.2022.).

Scitable (2014): <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-signaling-14047077/> (pristupljeno 5.10.2022.).

Stumpf, M. P. H., Thorne, T., de Silva, E., Stewart, R., An, H. J., Lappe, M., Wiuf, C. (2008): Estimating the Size of the Human Interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6959-6964.

Sung, H., Kang, S.H., Bae, Y. J., Hong, J. T., Chung, Y. B., Chong – Kil, L., Song, S. (2006): PCR – Based Detection of Mycoplasma Species. *Journal of Microbiology* 44: 42 – 49.

Šimaga, Š., Babić, D., Osmak, M., Ilić-Forko, J., Vitale, Lj., Miličić, D., Abramić, M. (1998): Dipeptidyl Peptidase III in Malignant and Non-malignant Gynaecological Tissue. *European Journal of Cancer* 34: 399-405.

Šimaga, Š., Babić, D., Osmak, M., Šprem, M., Abramić, M. (2003): Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas. *Gynecologic Oncology* 91: 194-200.

Thermo Fisher (2010): <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf> (pristupljeno 17.08.2022.).

Thermo Fisher Scientific (2022): <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0521> (pristupljeno 17.07.2022.).

Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., Yamamoto, M. (2006): Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Molecular and Cellular Biology* 26: 2887-2900.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Al-Khalili Szigartyo, C., Odeberg, J., Djuerinovic, D., Ottosson Takanen, J., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, F., von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F. (2015): Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347: 1260419-1-1260419-9.

Vervoort, V. S., Roselli, S., Oshima, R. G., Pasquale E. B. (2007): Splice variants and expression patterns of SHEP1, BCAR3 and NSP1, a gene family involved in integrin and receptor tyrosine kinase signaling. *Gene* 391: 161-170.

Wallez, Y., Mace, P. D., Pasquale, E. B., Riedl, S. J. (2012): NSP-CAS Protein Complexes: Emerging Signaling Modules in Cancer. *Genes & Cancer* 3: 382-393.

8. Životopis

Rođena sam 24.10.1996. godine u Zadru. Osnovnu školu sam završila u OŠ Smiljevac u Zadru. Nakon završene osnovne škole, 2011. godine sam upisala gimnaziju Jurja Barakovića u Zadru koju sam završila 2015. godine. Godine 2016. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Odjelu za biologiju na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Nakon završenog preddiplomskog studija 2020. godine upisala sam diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

