

Promjena ekspresije metionin sulfoksid reduktaze B3 u uzorcima bubrega štakora u ovisnosti o dobi i spolu

Sever, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:209045>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Sever

Promjena ekspresije metionin sulfoksid
reduktaze B3 u uzorcima bubrega štakora u
ovisnosti o dobi i spolu

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Sever

Change in the expression of methionine
sulfoxide reductase B3 in rat kidney samples
depending on age and sex

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za toksikologiju (ZT) na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI). Navedeno istraživanje koristilo je uzorke i saznanja prikupljena u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) AGEMETAR, IP-11-2013-1481. Nadalje, proizašlo je iz rada na projektu „Procjena učinkovitosti i toksičnosti biološki aktivnih tvari (BioMolTox)“ te u objektu i na opremi nabavljenoj u sklopu projekta KK.01.1.1.02.0007 „Istraživačko-edukacijski centar za zdravstvenu i medicinsku ekologiju i zaštitu od zračenja – rekonstrukcija i dogradnja Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada“, pod mentorstvom dr. sc. Marije Ljubojević, znanstvene savjetnice, te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja sveučilišnog magistra eksperimentalne biologije.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji, koji su mi pružili nevjerojatnu potporu tokom čitavog studija i koji su mi omogućili da realiziram sve što sam naumila.

Hvala svim kolegama i kolegicama s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, koji su mi svojim savjetima i preporukama olakšali rad i pomogli ga dići na višu razinu.

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Mariji Ljubojević, koja me vodila kroz čitav proces s iznimnim strpljenjem i stručnošću, i koja mi je omogućila što kvalitetniju izradu ovog diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Promjena ekspresije metionin sulfoksid reduktaze B3 u uzorcima bubrega štakora u ovisnosti o dobi i spolu

Ana Sever

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Oksidativni stres predstavlja stanje narušene oksido-redukcijske ravnoteže unutar stanice uzrokovano neravnotežom nastajanja i uklanjanja reaktivnih vrsta kisika (ROS). U fiziološkim uvjetima ROS predstavlja važnu kariku u održavanju života stanice, dok su povišene koncentracije ROS jedan od preduvjeta starenja jer se narušava integritet svih makromolekula. Senescencija ili starenje nastupa nakon oštećenja kao stanje postupnog neuravnoteženja staničnih fizioloških i metaboličkih funkcija. Stanica ulazi u senescenciju poglavito zbog oštećenja molekule DNA koja se, ako nisu pretjerana, popravljaju. Inače, pokreću se mehanizmi stanične smrti. Djelovanjem ROS dolazi do oksidacije aminokiseline metionina (Met, M), koja sadrži sumpor, unutar proteina. Oksidacijom Met nastaje spoj metionin sulfoksid (MetO) u dva epimera – S i R, koje reduciraju enzimi članovi obitelji metionin sulfoksid reduktaze (Msr), MsrA i MsrB. Stereospecifičnost uzrokuje da MsrA reducira S-epimer, a MsrB R-epimer MetO. Cilj ovog rada bio je utvrditi postoje li dobne i spolne razlike analogne promjenama ekspresije metalotioneina koji dominira u ženama, raste starenjem i koji je potencijalno uključen u regeneraciju MsrB3. Na nivou ekspresije enzima MsrB3 u bubrezima štakora odredili smo ciljanu mRNA RT-PCR tehnikom, prisutnost proteina u tkivnim homogenatima western blot analizom te raspodjelu proteina u tkivnim naresecima metodom imunofluorescencije. Granične pozitivne spolne razlike u korist ženki na razini nukleinskih kiselina potvrđene su i western blot analizom. Izrazito snažan intenzitet vakuoliziranog imunofluorescencijskog obojenja u mužjaka unio je nedosljednost u rezultate te zahtjeva provjeru samog protutijela do konačne interpretacije dobivenih rezultata, koji su suprotni od očekivanih i za sada ne potvrđuju povezanost promjena ekspresije metalotioneina sa MsrB3 enzimom u bubrezima.

Ključne riječi: MsrB3, metalotionein, oksidativni stres, bubreg, senescencija
(68 stranica, 28 slika, 1 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr. sc. Marija Ljubojević

Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc.

Izv. prof. dr. sc.

Prof. dr. sc.

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomske radove na kojoj je rad prihvaćen)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Change in the expression of methionine sulfoxide reductase B3 in rat kidney samples depending on age and sex

Ana Sever

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Oxidative stress is a state of an altered redox balance caused by unequal production and depletion of reactive molecular species. In physiological conditions, reactive oxygen species (ROS) serve as important signaling molecules and are involved in cell viability. When their concentration is heightened, they are considered to be the main drivers of the aging process due to their ability to disrupt the integrity of all macromolecules. Senescence or aging is a state in which a cell progressively falls into metabolic and physiological disbalance caused by extensive damage to its components. A cell usually enters senescence due to irreparable DNA damage. If the damage is not extensive, the cell is subjected to repair. Otherwise, the damage will lead to the activation of mechanisms involved in cell death. The effect of ROS molecules on proteins is observed through the sulfur-containing amino acid methionine (Met, M), which is readily oxidized in said conditions. Methionine sulfoxide (MetO) is present in two epimers - S and R. The two epimers are reduced by enzymes, part of the methionine sulfoxide reductase (Msr) family, Msr A and Msr B. Because of stereospecificity, MsrA reduces the S-epimer while MsrB reduces the R-epimer of MetO. The main goal of this master's thesis was to elucidate the existence of possible sex and age differences consistent with the changes found in metallothionein expression. Metallothionein expression is dominant in females, heightens with age and is potentially involved in MsrB3 regeneration. On the basis of MsrB3 expression in rat kidneys, we produced the target mRNA using the RT-PCR method, established the presence of proteins in tissue homogenates with western blot analysis and the overall distribution of proteins in tissue samples via immunofluorescent staining. Borderline positive differences were confirmed in females following the nucleic acid analysis and western blot analysis, but the immunofluorescent staining produced inconsistent results with intense vacuolar staining in males, so antibody specificity has to be reviewed. The final results were contrary to the ones expected and at present do not confirm the correlation between metallothionein and MsrB3 expression in the kidneys.

Keywords: MsrB3, metallothionein, oxidative stress, kidney, senescence
(68 pages, 28 figures, 1 tables, 46 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Marija Ljubojević, PhD

Co-mentor: prof. Domagoj Đikić, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. , PhD

Assoc. Prof. , PhD

Prof. , PhD

Thesis accepted:

Sadržaj

Kratice	
1. Uvod	1
1.1. Fiziologija oksidativnog stresa.....	1
1.1.1. Enzimatski i neenzimatski procesi nastanka slobodnih radikala.....	4
1.2. Fiziološka svojstva i metabolizam metionina.....	6
1.2.1. Ciklus metionina (<i>eng. Methionine cycle</i>).....	7
1.2.2. Metionin u mitohondrijima	10
1.3. Metionin sulfoksid i enzimi obitelji metionin sulfoksid reduktaza	11
1.3.1. Mehanizam redukcije MetO u Met.....	12
1.3.2. Metionin sulfoksid reduktaza B3.....	14
1.5. Anatomija i fiziologija bubrega.....	15
1.6. Metalotioneini	19
1.7. Starenje ili senescencija.....	21
1.7.1. Metioninska restrikcija.....	23
2. Cilj istraživanja	25
3. Materijali i metode	26
3.1. Kemijski pribor, uređaji, otopine i puferi.....	26
3.1.1. Sastavi pufera i otopina	28
3.2. Laboratorijske životinje.....	29
3.2.1. Pokusi utvrđivanja dobnih i spolnih razlika	29
3.3. Protutijela	30
3.3.1. Primarna protutijela.....	30
3.3.2. Sekundarna protutijela.....	30
3.4. Početnice (<i>eng. primers</i>).....	31
3.5. Metode.....	32
3.5.1. Priprema homogenata bubrega	32
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima homogenata bubrega.....	32
3.5.3. Priprema tkivnih narezaka i fiksacija tkiva	33
3.5.4. Raskrivanje antigena i imunofluorescencija.....	34
3.5.5. Izolacija RNA i reverzna transkripcija (RT-PCR)	36
3.5.6. PCR i elektroforeza na agaroznom gelu.....	37

3.5.7. SDS – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western blot analiza.....	40
3.5.8. Računalna i statistička obrada podataka.....	42
4. Rezultati	43
4.1. Utvrđivanje prisutnosti i raspodjele enzima MsrB3 u bubrežnim kanalčićima štakora te dobno- spolnih razlika metodom imunofluorescencije.....	43
4.2. Identifikacija enzima MsrB3 u homogenatima bubrega štakora i utvrđivanje dobno-spolnih razlika u razini ekspresije MsrB3 western blot analizom.....	51
4.3. Utvrđivanje razine ekspresije enzima MsrB3 na razini nukleinskih kiselina RT- PCR metodom...	55
5. Rasprava	58
6. Zaključak	64
7. Literatura.....	65
7.1. Znanstveni radovi.....	65
7.2. Internetske stranice.....	68
Životopis.....

Kratice

MetO - Metionin sulfoksid = organski spoj koji nastaje kao produkt oksidacije metioninskih ostataka unutar proteina djelovanjem ROS

Msr - Metionin sulfoksid reduktaza = termin koji se rabi kao naziv obitelji enzima, kao i naziv za enzime pripadnike navedene obitelji. Predstavljaju visokospecijalizirane enzime antioksidanse koji u stanici dolaze u više formi, i od kojih sve forme sudjeluju u redukciji metionin sulfoksida u metionin. U obitelj enzima Msr spada i MsrB3

MT - Metalotioneini = neesencijalni unutarstanični proteini male molekulske mase ovisni o cinku koji sudjeluju u održavanju homeostaze esencijalnih metala u stanici. Mogu sakupljati i teške metale

ROS - Reaktivne vrste kisika = pojam koji obuhvaća sve reaktivne spojeve koji sadržavaju kisik, a koji mogu biti neradikalni ili radikalni, s jednim ili više nesparenih elektrona.

SAM - S-adenozil metionin = derivat aminokiseline metionina koji nastaje unutar metioninskog ciklusa, i koji čini glavnog donora metilne skupine u stanici, a time i važnog epigenetskog čimbenika.

T – Tionein = reducirani apoprotein metalotioneina koji u svojoj strukturi ne sadrži cink. Učinkovit je reducens s mogućom ulogom u regeneraciji funkcije enzima MsrB3

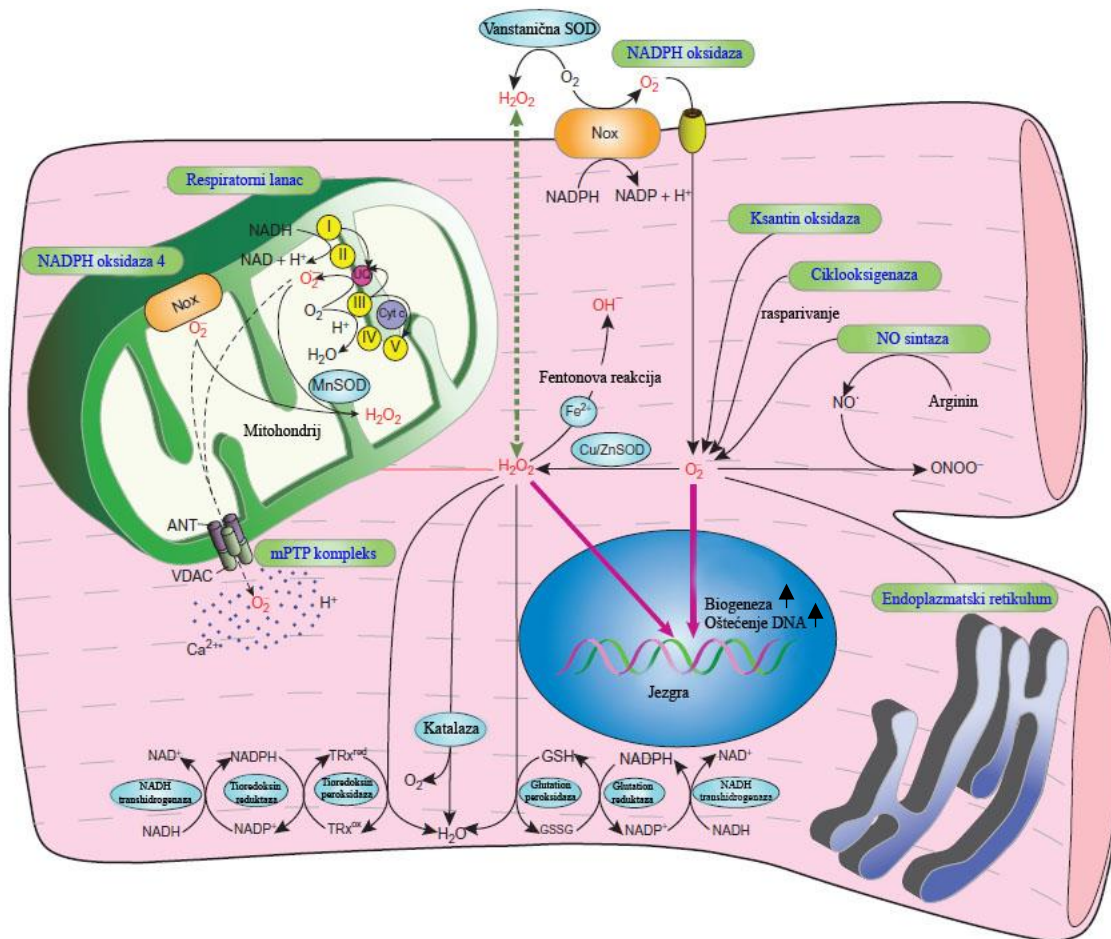
Trx - Tioredoksin = protein koji sudjeluje u održavanju redoks ravnoteže u stanici redukcijom oksidiranih cisteinskih ostataka u proteinima unutar reakcije ovisne o NADPH

1. Uvod

1.1. Fiziologija oksidativnog stresa

Pojam oksidativnog stresa podrazumijeva narušenu ravnotežu između oksidacijskog i antioksidacijskog sustava u organizmu čija je posljedica poremećaj homeostaze. U današnje vrijeme prisustvo oksidativnog stresa sve se češće ustanovljava u patologiji kao uzrok ili promotor mnogih bolesti. Oksidativni stres se odnosi na poremećaj u fiziologiji i metabolizmu stanice uslijed djelovanja reaktivnih molekulskih vrsta (slobodnih radikala), poglavito reaktivnih vrsta kisika (*eng. reactive oxygen species, ROS*), ali i reaktivnih vrsta dušika i sumpora. Pri fiziološkim koncentracijama, ROS sudjeluje u regulaciji staničnih procesa, kao i u staničnoj signalizaciji. Sudjeluje ne samo u rastu i diferencijaciji stanice, već ulogu ima i u staničnoj smrti (Zhang *i sur.*, 2016).

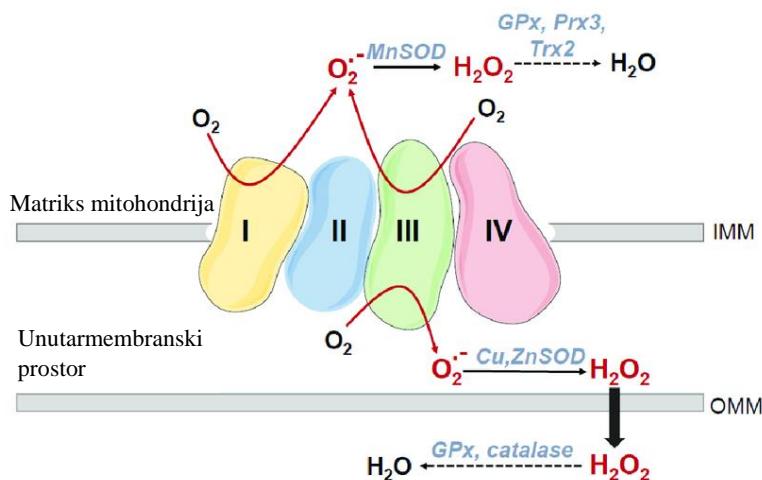
Slobodni radikali predstavljaju molekulske vrste koje posjeduju jedan ili više nesparenih elektrona, a koji mogu biti neutralno nabijeni ili ioni (prema www.enciklopedija.hr). Slobodni radikali zbog navedenog ispoljavaju određena svojstva, a to su visoka kemijska nestabilnost i reaktivnost. S druge strane, neradikali (*eng. nonradicals*) su molekule koje nisu radikali, ali mogu pridonositi oksidativnom oštećenju (Preiser, 2012). Molekularni kisik (O_2) je sam po sebi slabo reaktivan te se prvo prevodi u svoju reaktivnu formu. Jedno-elektronskom redukcijom molekularnog kisika nastaje radikal superoksidni anion ($\cdot O_2^-$). Dismutacijom superoksida nastaje vodikov peroksid (H_2O_2) koji je relativno stabilan i lako prodire u susjedne organele pa i tkiva (Slika 1.). Vodikov peroksid se može neutralizirati enzimom katalazom pri čemu nastaje voda. Nadalje, u prisustvu prijelaznih metala može formirati hidroksilni radikal ($HO\cdot$), a u daljnjim enzimskim reakcijama može prijeći u hipoklorastu kiselinu ($HClO$) (Zhang *i sur.*, 2016).



Slika 1. Sveobuhvatni prikaz izvora reaktivnih vrsta u mišićnoj stanici srca. Crvenim slovima označene su reaktivne vrste: superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni anion (OH^\cdot). Plavim slovima prikazani su izvori reaktivnih vrsta: mitohondrijski tranzicijski kompleks (eng. *mitochondrial permeability transition pore*, mPTP), mitohondrijska nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza 4 i stanična membranska oksidaza (NADPH oksidaza 4 i NADPH oksidaza, NOX), dušik oksid sintaza (NO sintaza). Crnim slovima u plavim oblacima, uz slobodno željezo koje daje elektrone u Fentonovoj reakciji, označeni su enzimi i pomoćni čimbenici antioksidativnog djelovanja: vanstanična superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation (GSH/GSSG) te glutation peroksidaza i reduktaza, superoksid dismutaza ovisna o bakru ili cinku (Cu/ZnSOD), tioredoksin (Trx) te tioredoksin peroksidaza i reduktaza, kao i NADH transhidrogenaza (Preuzeto i prilagođeno iz Maejima *i sur.*, 2012)

Mnogi procesi u stanici produciraju ROS, najpoznatiji među njima jest proces staničnog disanja, odnosno lanac prijenosa elektrona koji se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Za razliku od upalnog procesa tijekom kojeg ROS nastaje direktno i ima ulogu u eliminaciji i neutralizaciji patogene tvari, u mitohondrijima on nastaje popratno tijekom fiziološkog procesa aerobnog disanja ili oksidativne fosforilacije. Lanac prijenosa elektrona sastoji se od četiriju kompleksa, kompleksi I, II, III i IV, koji transportiraju elektrone dobivene od nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin dinukleotida (FADH₂) do krajnjeg akceptora elektrona, molekularnog kisika (Cogliati *i sur.*, 2021).

Prijenosom elektrona, odnosno kroz samu funkciju pojedinih kompleksa, stvara se elektrokemijski gradijent protona koji spreže ATP sintazu i omogućuje sintezu ATP molekula. Za vrijeme staničnog disanja proizvodi se $\cdot\text{O}_2^-$ prvenstveno djelovanjem kompleksa I i III. Pošto je nakupljanje $\cdot\text{O}_2^-$ vrlo štetno, on se ubrzo dismutira u H₂O₂ djelovanjem enzima superoksid dismutaze, a novonastali H₂O₂ se neutralizira u vodu uz pomoć katalaze (Cat) ili glutacion peroksidaze (GPx) što je prikazano Slikom 2. (Cogliati *i sur.*, 2021).



Slika 2. Izvori reaktivnih vrsta iz lanca prijenosa elektrona u mitohondriju. Kratice: unutrašnja membrana mitohondrija - IMM, vanjska membrana mitohondrija - OMM, glutacion peroksidaza - GPx, peroksiredoksin 3 - Prx3 (preuzeto i prilagođeno iz Marí *i sur.*, 2020)

1.1.1. Enzimatski i neenzimatski procesi nastanka slobodnih radikala

Općenito, radikali nastaju u pojedinim enzimatskim i neenzimatskim procesima. Ksantin oksidaza (XO) citosolni je enzim koji sudjeluje u metabolizmu purina i koji iskorištava O_2 kako bi producirao mokraćnu kiselinu, uz nusprodukt $\cdot O_2^-$. Enzim XO predstavlja samo jednu od izoformi u kojoj se može naći enzim ksantin oksidoreduktaza (XOR) pod određenim uvjetima. Njezina druga forma, ksantin dehidrogenaza (XDH), regenerira NAD^+ u $NADH$ u normalnim uvjetima koristeći pritom ksantin kao supstrat, dok XO koristi molekularni kisik u uvjetima niske koncentracije O_2 , odnosno hipoksiji (Preiser, 2012). To stvara tzv. paradoks kisika, odnosno pojavu da O_2 , koji je prijeko potreban svim aerobnim organizmima, može biti od velike koristi, ali i štete. Termin paradoks kisika rabi se kod ishemijsko-reperfuzijskih oštećenja. Naime, kada nastupi ishemija tkivo ostane bez kisika te se XDH konvertira u XO. Kada se ponovno uspostavi normalan protok krvi, i prethodno se ishemično tkivo oksigenira, XO „troši“ novopristigli O_2 pri čemu nastaju slobodni radikali koji potencijalno mogu uzrokovati oksidativna oštećenja (Sanders *i sur.*, 1997).

Dodatno, enzime obitelji NADPH oksidaza (NOX), primarno NOX2, obično nalazimo u stanicama koje posjeduju sposobnost fagocitoze, makrofazima i fagocitima, no mogu se pronaći i u srcu, u kardiomiocitima (Maejima *i sur.*, 2012). U svrhu obrane organizma, NOX radikale producira kao glavne produkte. Prilikom fagocitoze, ingestijom stranih čestica formira se vezikul, fagosom, u kojem NOX djeluje kao glavni producent $\cdot O_2^-$. On se dismutira u H_2O_2 koji podliježe djelovanju mijeloperoksidaze (MPO). Mijeloperoksidaza katalizira reakciju sinteze HOCl koristeći novonastali H_2O_2 i kloridni ion (Cl^-). Novonastala hipokloritna kiselina služi uništenju unesenih čestica, a navedeni proces naziva se oksidativni prasak (Kuksal *i sur.*, 2017).

Kako je već navedeno, osim enzimatskim putevima, radikali mogu nastati i neenzimatski. Radikali neenzimatski nastaju redoks reakcijama u prisustvu prijelaznih metala, poglavito željeza, bakra i aluminijsa. Prva od takvih reakcija je Fentonova reakcija, koju je 1894. godine prvi opisao britanski kemičar Henry John Horstman Fenton (prema www.intechopen.com). Vodikov peroksid u prisustvu željezova(II) kationa (Fe^{2+}) producira radikale, točnije $HO\cdot$, pri čemu dolazi do oksidacije željezova iona u željezo(III) kation (Fe^{3+}) (Das *i sur.*, 2015).

Bitno žarište produkcije HO· Fentonovom reakcijom je upravo u mitohondriju, točnije u njegovu matriksu. Pošto se u mitohondrijskom matriksu nalaze veće količine željeza, čak i više nego u citosolu, ono je najčešće pohranjeno, sekvestrirano unutar proteina koji ih vežu. Željezo se, nakon dospijeća u matriks, može vezati unutar proteina, može sudjelovati u sintezi klastera sa sumporom (*eng. iron-sulfur clusters, ISC*) kao i u sintezi kompleksa prostetičke skupine hema. Najpoznatiji citosolni protein koji učinkovito pohranjuje željezove ione je feritin, dok je u mitohondrijskom matriksu za to zaslužan mitohondrijski feritin (Dietz *i sur.*, 2021).

Iako je H. J. H. Fenton prvi opisao reakciju redukcije H₂O₂ uz pomoć Fe²⁺, nije dodatno proučavao njezin mehanizam, već ju je koristio isključivo kao pogodno „oruđe“ kemijske sinteze organskih tvari. Fritz Haber i njegov učenik Joseph Joshua Weiss prvi su službeno predložili da redukcijom H₂O₂ nastaje HO· (Koppenol, 2001). Temelj Haber-Weissove reakcije čini regeneracija Fe³⁺ u Fe²⁺ koristeći O₂^{•-} kao supstrat. Haber-Weissova reakcija usporedna je Fentonovoj reakciji te zajedno sudjeluju u redoks kruženju željeza i iterativnom nastanku HO· reakcijom prikazanom Slikom 3. (Ayala *i sur.*, 2014).

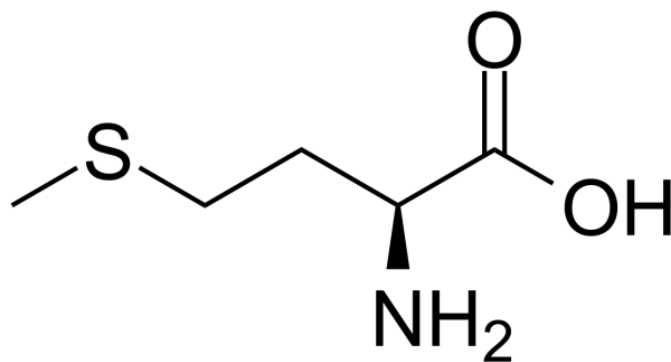


Slika 3. Shematski prikaz Fentonove i Haber-Weissove reakcije. Kratice: oksidirana forma prijelaznog metala – M⁽ⁿ⁺¹⁾, reducirana forma prijelaznog metala - Mⁿ, hidroperoksilni radikal - HO·₂ (preuzeto i prilagođeno iz Ayala *i sur.*, 2014)

1.2. Fiziološka svojstva i metabolizam metionina

Peptidni lanci izgrađeni od ukupno dvadeset aminokiselina (deset esencijalnih i deset neesencijalnih), uz dodatnu aminokiselinu selenocistein (Sec), u različitim kombinacijama predstavljaju temeljni konstituent svih proteina u organizmu. Prema tome, aminokiseline direktno i indirektno sudjeluju u svim metaboličkim i imunološkim procesima u stanici (Lim *i sur.*, 2019).

Aminokiselina metionin (Met, M) alifatska je esencijalna aminokiselina u čijoj se strukturi nalazi sumpor. Molekulska formula metionina je $C_5H_{11}NO_2S$ (prema bazi podataka PubChem), a strukturna formula prikazana je Slikom 4. Nalazi se na prekretnici mnogih metaboličkih puteva i, zbog činjenice da se u procesu prevođenja ili translacije početni kodon prevodi upravo u Met, često čini limitirajući čimbenik u sintezi proteina (Lee i Gladyshev, 2011). Prekursor je spojeva od fiziološke važnosti, poput cisteina (Cys, C), taurina, S-adenozil metionina (SAM) i glutationa (GSH) (Martínez *i sur.*, 2017).



Slika 4. Kemijska struktura aminokiseline metionina (preuzeto s <https://www.medchemexpress.com/>)

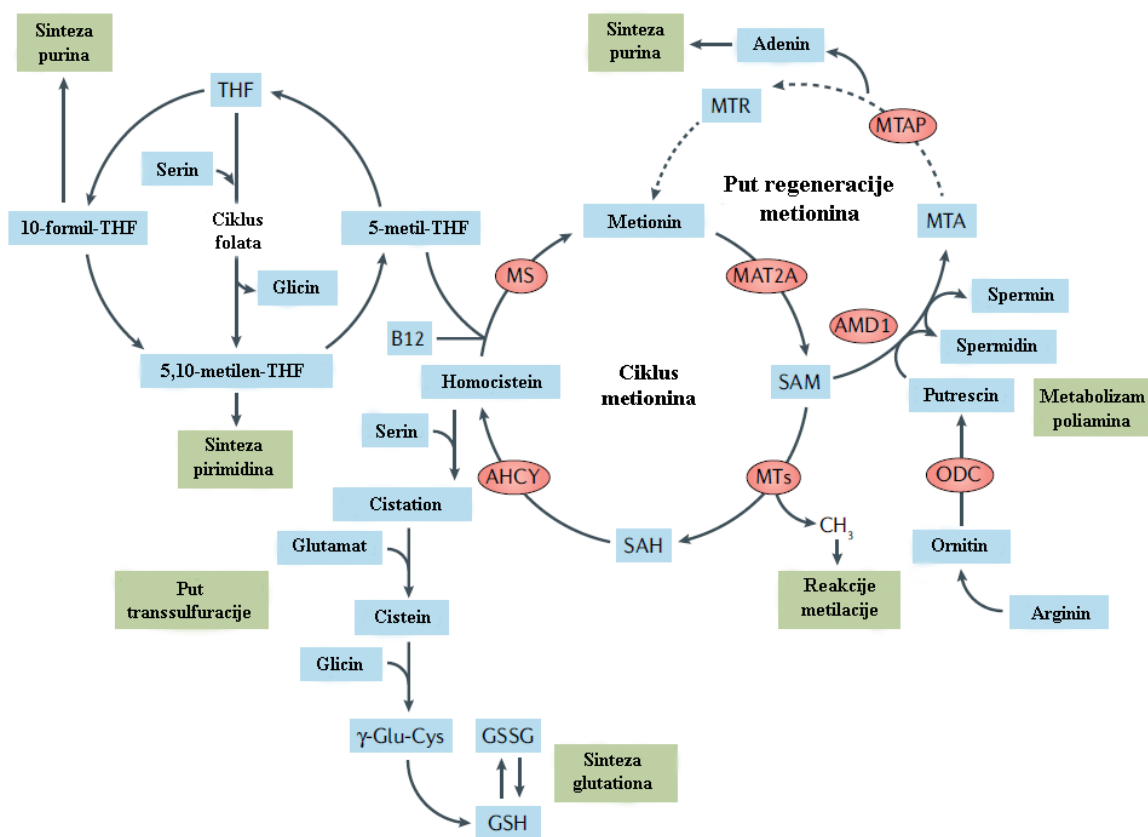
Stanici su potrebni esencijalni nutrijenti u strogo reguliranim količinama. Kako bi održavanje homeostaze nutrijenata u svakom trenutku bilo moguće, nužno je posjedovati efikasan sustav detekcije razine nutrijenata u organizmu (Lauinger i Kaiser, 2021). U sisavaca, dostupnost metionina uvelike ovisi o količini unesenog metionina putem hrane, kao i o metabolizmu sumpora kojeg provodi mikroflora debelog crijeva (Parkhitko *i sur.*, 2019).

Detekcija dostupnosti metionina u organizmu ne vrši se direktno preko metionina, već preko njegova derivata S-adenozil metionina (*eng. S-adenosylmethionine, SAM*). O dostupnosti navedenog derivata ovise mnogi biološki procesi, poput epigenetske modifikacije DNA (metilacija DNA) i biosinteze nukleotida, pošto je SAM glavni donator metilnih skupina u stanici što je neophodno u procesima rasta i razvoja (Lauinger i Kaiser, 2021). Međutim, u odraslom organizmu dugoročno povećana dostupnost metionina se posljedično odražava na progresiju bolesti, prvenstveno kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Lim *i sur.*, 2019). Pošto mnogi fiziološki procesi ovise o dostupnosti metionina i njegovih derivata, njegov metabolizam doprinosi starenju i kancerogenezi (Sanderson *i sur.*, 2019).

Kao prekursor, metionin ima važnu ulogu u obrani stanice od oksidativnog stresa te se često i sam smatra antioksidansom. Primjerice, dostupnost cisteina, a time i metionina u stanici, važan je faktor stanične obrane od oksidacijskog stresa zbog svoje uloge u sintetskom putu glutaciona (Martínez *i sur.*, 2017). No, njegova je uloga dvojaka s obzirom na činjenicu da aminokiselinski ostaci metionina koji se nalaze pri površini nativnih proteina vrlo lako oksidiraju kada je prisutan ROS. Produkt oksidacije često je odraz redoks stanja u stanici, jer nastaje reverzibilan spoj, metionin sulfoksid (MetO), kojem će se u nastavku teksta objasniti funkcija (Parkhitko *i sur.*, 2019).

1.2.1. Ciklus metionina (*eng. Methionine cycle*)

Metioninski ciklus predstavlja niz reakcija kojima je ishodište aminokiselina metionin, a krajnji produkt homocistein. Iako je metionin prekursor mnogim spojevima, većina ih ne nastaje unutar ciklusa metionina samog po sebi, već u ciklusima s kojima je on usko povezan. Prema tome, uz ciklus metionina i sintezu SAM povezani su ciklus folata, put transulfuracije i put same regeneracije metionina (*eng. methionine salvage pathway*), uz koji su vezani i sinteza purina te nastanak poliamina i ciklus nastanka kolina. Ciklus metionina i ciklus folata čine okosnicu mreže metaboličkih reakcija kojima se ugljik dobiven iz prehrane integrira u biološke spojeve – *one-carbon metabolism*, odnosno metilacijom homocisteina natrag u metionin (Lionaki *i sur.*, 2021).



Slika 5. Metioninski ciklus i njemu pridruženi metabolički procesi s prikazom svih enzima i međuprodukata. Kratice: tetrahidrofolat – THF; metiltioriboza – MTR; metiltioadenozin – MTA; γ – glutail – L – cistein – γ -Glu-Cys; metionin sintaza – MS; adenozilhomocisteinaza - AHCY; metiltransferaza – MT; ornitin dekarboksilaza – ODC; metionin adenoziltransferaza 2A – MAT2A; metiltioadenozin forofilaza – MTAP; adenozilmetionin dekarboksilaza 1 – AMD1 (preuzeto iz Sanderson *i sur.*, 2019)

Metionin u prvome koraku ciklusa prelazi u SAM. Nadalje, SAM u procesu metilacije donira svoju metilnu skupinu drugim biološkim spojevima, poput DNA ili proteina, prilikom čega se sam konvertira u S-adenozil homocistein (eng. *S-adenosylehomocysteine*, SAH) (Sanderson *i sur.*, 2019). Pošto je SAH negativni regulator metilacije koju vrši SAM, njegova se koncentracija održava niskom (Parkhitko *i sur.*, 2019).

Hidrolizom SAH prelazi u homocistein koji se može u sklopu puta transulfuracije konvertirati do cisteina ili, primajući metilnu skupinu iz ciklusa folata, konvertirati nazad u metionin. Konverzija homocisteina u metionin uz pomoć metionin sintaze (*eng. methionine synthase*, MS) zatvara ciklus (Parkhitko *i sur.*, 2019, Kitada *i sur.*, 2021).

Primarna uloga puta transulfuracije jest uklanjanje toksičnog metabolita homocisteina van metioninskog ciklusa. Nizom reakcija dolazi do pretvorbe homocisteina iz ciklusa metionina do krajnjeg produkta cisteina. U prvom koraku dolazi do pretvorbe homocisteina u cistation koju katalizira enzim cistation- β -sintaza (*eng. cystathionine- β -synthase*, CBS), koja ujedno čini i glavnog regulatora puta transulfuracije. Za ovaj korak vrlo je važna prisutnost aminokiseline serina. Nadalje, hidrolizom cistationa nastaje cistein koji dalje sudjeluje primarno u sintezi važnog zaštitnog spoja, glutathiona (Kitada *i sur.*, 2021).

Folat (folna kiselina ili vitamin B9) spada u skupinu B vitamina, a u organizam najvećim dijelom dopijeva putem prehrane. Njegov derivat 5-metiltetrahidrofolat (*eng. 5-methyltetrahydrofolate*, 5-MTHF) predstavlja jednog od donora metilne skupine unutar reakcije pretvorbe homocisteina u metionin. Metionin može iz homocisteina nastati i uz pomoć betain-homocistein metiltransferaze (*eng. betaine homocysteine methyltransferase*, BHMT). Ona prenosi metilnu grupu s betaina na homocistein tvoreći metionin. Betain nastaje iz kolina u mitohondrijima primarno stanica bubrega, gdje se i skladišti (Obeid, 2013).

Putem ciklusa metionina sintetiziraju se i poliamini. Okosnicu puta čini dekarboksilacija SAM pri čemu nastaje dekarboksilirani S-adenozil metionin (dcSAM) kao donor aminopropilne skupine u daljnjim koracima puta. Istovremeno dolazi do sinteze ornitina iz arginina djelovanjem enzima arginaze. Ornitin se dekarboksilira ornitin dekarboksilazom (ODC) pri čemu nastaje putrescin. Donirajući aminopropilnu skupinu putrescinu nastaje organizmu koristan spermidin, a dcSAM se konvertira u 5'-metiltioadenozin (MTA) iz kojeg u više različitih enzimskih koraka ponovno nastaje metionin. Ponovnim ciklusom donacije aminopropilne skupine nastaje poliaminski spoj spermin. Oba poliamina imaju svoju fiziološku ulogu poglavito u proliferaciji i razvoju. Suvišak spermina negativno utječe na razvijeni organizam, a nastaje prema afinitetu enzima iz metionina preko dekarboksiliranog SAM kada su isti prekomjerno prisutni (Kitada *i sur.*, 2021, Sanderson *i sur.*, 2019).

1.2.2. Metionin u mitohondrijima

Mitohondriji posjeduju vrlo reduciran genom od svega 37 gena od kojih 22 kodiraju za reducirani set prijenosne RNA (*eng. transport RNA*, tRNA) koje prepoznaju i više od jednog kodona za pojedinu aminokiselinu (Lim *i sur.*, 2019). Dok citosolna tRNA prepoznaje samo jedan kodon koji kodira za metionin, a to je početni kodon AUG koji se uklanja ako protein ostaje u citosolu, mitohondrijska tRNA prepoznaje dva kodona, AUG i AUA. Drugospomenuti AUA uobičajeno u citosolnoj glasničkoj RNA (*eng. messenger RNA*, mRNA) kodira za izoleucin (Ile, I). Posjedovanje dva kodona koji kodiraju za istu aminokiselinu predstavlja evolucijsku prednost, posebno ako je ta aminokiselina metionin, što potkrjepljuje činjenicu da metionin u proteinima djeluje kao antioksidans. Prema Lim *i sur.*, 2019, vrste koje nemaju modificiran mitohondrijski kod u mitohondrijskim proteinima sadrže svega 2% metionina u ukupnom sadržaju aminokiselina, dok vrste s modificiranim kodom sadrže 6%. Isto tako, metioninski ostaci su uobičajeno pozicionirani pri površini proteina što omogućuje njihovu lakšu oksidaciju.

		Prvo slovo					
		U	C	A	G		
Drugo slovo	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Trp	A	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U		
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U		
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C		
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA Stop	A		
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG Stop	G		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U		
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G		

		Prvo slovo					
		U	C	A	G		
Drugo slovo	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	A	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G	
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U		
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C		
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A		
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G		
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U		
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C		
	AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA Stop	A		
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG Stop	G		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U		
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C		
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A		
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G		

Slika 6. Usporedba tribaznog kodona citosolnih (desno) i mitohondrijskih (lijevo) mRNA s osvrtom na razlike u kodonu za metionin (označeno crvenom elipsom) (preuzeto i prilagođeno s www.khanacademy.org (desno) i www.mun.ca (lijevo))

1.3. Metionin sulfoksid i enzimi obitelji metionin sulfoksid reduktaza

Oksidacija metioninskih aminokiselinskih ostataka unutar proteina, kao i slobodnog metionina, najčešće je katalizirana produktima Fentonove reakcije, odnosno posredstvom metalnih iona (Sreekumar *i sur.*, 2011). Uslijed oksidacije, atom sumpora unutar strukture metionina postaje tzv. kiralno središte, odnosno središte izmjene dvaju kemijskih skupina koja rezultira stereoizomerima. Produkt oksidacije metionina je metionin sulfoksid (MetO) koji se pojavljuje u dva epimera: Met-S-O i Met-R-O. Oba nastaju u sličnim omjerima, odnosno ne postoji sklonost prema stvaranju određenog epimera MetO. Oksidacija metioninskih ostataka u proteinima može uzrokovati promjenu, odnosno gubitak funkcije pa i denaturaciju, zbog prelaska metionina iz hidrofobnog u hidrofilno stanje. Dok se cisteinski ostaci unutar proteina teško oksidiraju pri uvjetima fiziološkog pH ako ne posjeduju neposrednu mogućnost stvaranja disulfidne veze, oksidacija metioninskih ostataka nije ovisna o pH (Lim *i sur.*, 2019).

Oksidacija metioninskih ostataka u proteinima karakterizirana je kao reverzibilna kovalentna modifikacija te, slično fosforilaciji, sudjeluje u regulaciji staničnih procesa, a time i signalizaciji. Oksidacija metionina može poslužiti kao aktivator ili okidač (*eng. trigger*) pojedinih puteva. Lim *i sur.*, 2019, navode primjer inaktivacije kalijevih kanala dušikovim oksidom, do koje dolazi zbog oksidacije ključnog metioninskog ostatka u kanalu. Nadalje, naveli su i primjer specifične aktivacije procesa translokacije citokroma c iz matriksa mitohondrija u citoplazmu oksidacijom Met80 u strukturi citokroma. Kako bi stanica reagirala na redoks status te se mogla obraniti, evoluirala je skupina visokospecijaliziranih enzima obitelji metionin sulfoksid reduktaza (Msr) sposobnih reducirati MetO do metionina *in vivo* čineći reakciju oksidacije reverzibilnom i moguće signalnom (Sreekumar *i sur.*, 2011).

Enzimi obitelji Msr predstavljaju vrlo važne enzime antioksidanse pošto reduciraju upravo metionin koji se nalazi u strukturi većine proteina u stanici, kao i slobodni metionin, čime posredno čine sakupljače slobodnih radikala. Enzimom katalizirana redukcija MetO u metionin prvi puta je opisana 1930. godine u štakorima (Peng *i sur.*, 2021). Identifikacija samog enzima odgovornog za katalizu navedene reakcije dogodila se mnogo kasnije, 1980. godine kada je enzim uspješno izoliran iz *E. coli*. Njihova je uloga opisana u mnoštvu različitih skupina životinja, poglavito u sisavaca (Kwak *i sur.*, 2017).

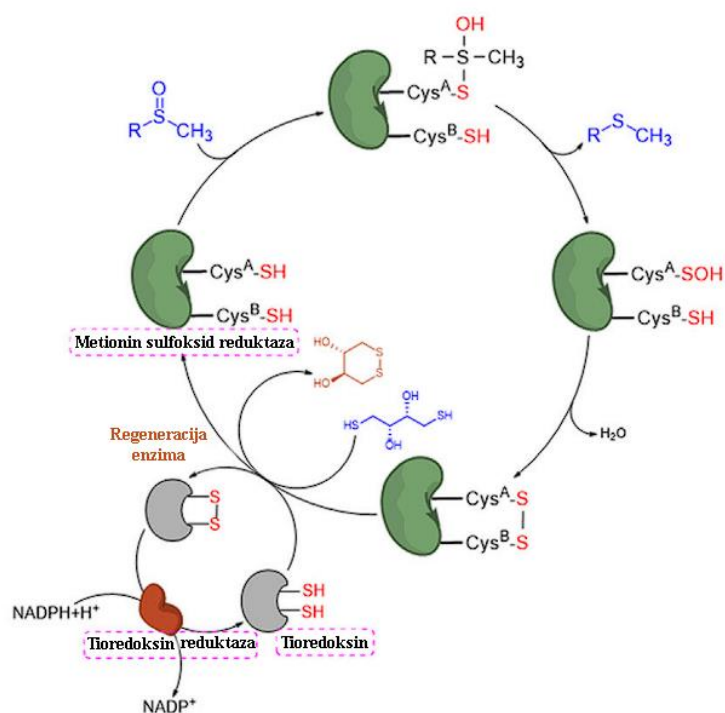
Enzimi obitelji Msr postoje u dvije različite forme, MsrA i MsrB. Iako obje reduciraju metionin do MetO, razlikuju se po specifičnosti prema supstratu. MsrA reducira S epimer MetO dok MsrB reducira R epimer (Sreekumar *i sur.*, 2011). U sisavaca, enzim MsrA kodiran je samo jednim genom, a njegova je ekspresija visoka gotovo u svim tkivima. Lokaliziran je prvenstveno u citosolu i jezgri stanice, te u mitohondriju. Za razliku od MsrA, postoje tri različita gena od kojih svaki kodira po jednu varijantu enzima MsrB: MsrB1, MsrB2 i MsrB3. Lokalizacija im varira, pa je tako MsrB1 prisutan u citosolu i jezgri stanice, MsrB2 u mitohondriju, a MsrB3 u endoplazmatskom retikulumu i u mitohondriju. Najučinkovitiji su upravo MsrA i MsrB1 zbog svoje građe, odnosno strukture aktivnog mjesta. MsrA i sve forme enzima MsrB posjeduju jedan do tri cisteinska ostatka u svome aktivnom mjestu. Nadalje, svi enzimi obitelji Msr ovisni su o tioredoksinu (Trx) koji im služi kao kofaktor, odnosno kao donor elektrona. (Sreekumar *i sur.*, 2011).

Prvi otkriveni enzim iz skupine MsrB je MsrB1 koji se još naziva i selenoprotein R. On, za razliku od MsrB2 i MsrB3 posjeduje selenocistein umjesto cisteina u svome aktivnom mjestu što mu omogućava veću stereospecifičnost prema supstratu i povećanu katalitičku aktivnost. S obzirom na koncentraciju supstrata potrebnu za njihovu aktivaciju, MsrB2 se razlikuje od MsrB1 i B3 po svojoj velikoj osjetljivosti, odnosno aktivira se pri mnogo nižim koncentracijama supstrata. Povećana ekspresija MsrB3 dovodi do povećanja rezistencije tkiva na oksidativna oštećenja, dok smanjena ekspresija ima suprotan učinak. Ujedno, MsrB3 jedan je od regulatora ekspresije hemoksigenaze-1 (HO-1), enzima koji posreduje raspadu hemske skupine na ugljični monoksid, biliverdin i Fe^{2+} . Kako bi se umanjio posljedičan prooksidativni učinak Fe^{2+} , povećava se ekspresija i feritina koji pohranjuje željezo u Fe^{3+} formi (Kwak *i sur.*, 2017).

1.3.1. Mehanizam redukcije MetO u Met

Iako strukturno različiti, enzimi MsrA i MsrB ispoljavaju svoju katalitičku aktivnost kroz mehanizam sastavljen od tri koraka. Kao primjer uzima se mehanizam djelovanja MsrA. U aktivnom mjestu MsrA nalaze se 2 cisteinska ostatka: Cys 72 i Cys 218. U prvom koraku Cys 72 vrši nukleofilni napad na atom sumpora u strukturi MetO. Zatim Cys 218 djeluje na Cys 72, čija interakcija dovodi do nastajanja sulfenične kiseline i otpuštanja metionina (Lim *i sur.*, 2019).

Nakon otpuštanja produkta nastaju disulfidni mostovi između dva cisteinska ostatka, katalitičkog i regeneracijskog. U završnom koraku disulfidni mostovi se reduciraju uz pomoć nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) ovisnog tioredoksin/tioredoxin reduktaznog (Trx/TR) sustava koji djeluje kao donor elektrona. Redukcijom disulfidnih mostova aktivno mjesto se regenerira što omogućuje ponovno vezanje supstrata (Lim *i sur.*, 2019). Iako je regeneracija sustavom Trx/TR opće prihvaćena, Sagher *i sur.*, 2006. iznose dokaze da je on često zamijenjen reduciranim tioneinom koji je neovisan o Trx te učinkovitije regenerira MsrB2 i B3 u životinjskim stanicama zbog svojeg visokog udjela cisteinskih ostataka. Najveće su razlike unutar obitelji Msr prisutne u broju regeneracijskih cisteinskih ostataka unutar aktivnog mjesta. Smatra se da MsrB1 koristi sasvim različit regeneracijski cisteinski ostatak koji se ne nalazi na istome mjestu kao i kod MsrA, MsrB2 i MsrB3, već na zasebnom mjestu u proteinu (Sreekumar *i sur.*, 2011). Redukcija MetO nazad u metionin omogućava metioninskim ostacima ponovnu oksidaciju reaktivnim vrstama što doprinosi njihovom vrlo učinkovitom sakupljanju (Lim *i sur.*, 2019).

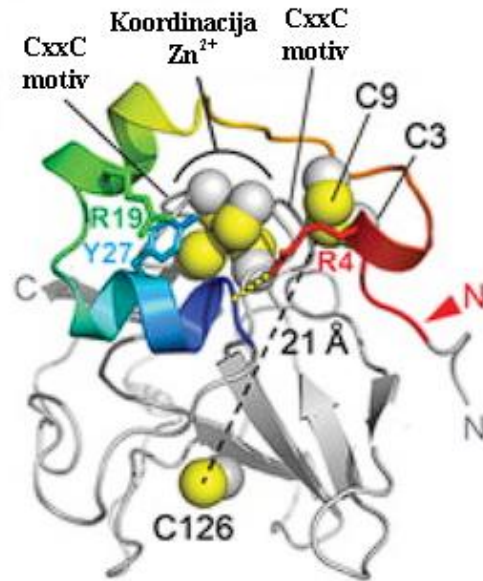


Slika 7. Katalitički mehanizam djelovanja enzima obitelji Msr s prikazom cisteinskih ostataka u aktivnom mjestu (Cys^A-SH i Cys^B-SH), kao i mehanizam regeneracije sustavom Trx/TR (preuzeto i prilagođeno iz Peng *i sur.*, 2021)

1.3.2. Metionin sulfoksid reduktaza B3

Metionin sulfoksid reduktaza B3 (MsrB3) enzim je male molekulske mase, oko 20 kDa (Cabreiro *i sur.*, 2006). Za razliku od ostalih članova obitelji Msr, MsrB3 nije visokokonzerviran i nije prisutan u bakterija i arheja. U stanicama čovjeka postoje dvije proteinske izoforme MsrB3 nastale alternativnim izrezivanjem prvog eksona (*eng. alternative first-exon splicing*), MsrB3A i MsrB3B, od kojih je forma A lokalizirana u endoplazmatskom retikulumu, a B u mitohondriju. Precizna lokalizacija je moguća zbog posjedovanja jedinstvene sekvence na N-terminalnom kraju koja čini tzv. signalni peptid. Svi MsrB enzimi, tako i MsrB3, ovisni su o cinku koji je unutar strukture enzima koordiniran s četiri cisteinska ostatka organizirana u CxxC motiv. Smatra se da cink igra prvenstveno strukturnu ulogu (Kim i Gladyshev, 2004).

Kim i Gladyshev, 2004, proveli su eksperiment na transformiranim kvascima vrste *Saccharomyces cerevisiae* u kojima nisu bili prisutni geni za MsrA i MsrB. Kvasci koji ne mogu sintetizirati MsrA i MsrB, nisu mogli rasti u prisutnosti Met-S-O. No, njihov rast u prisutnosti Met-R-O nije bio inhibiran. Unošenje MsrB1, B2 i B3 gena iz sisavaca u mutante kvasca uzrokovalo je pojačan rast linije s eksprimiranim MsrB3 u prisutnosti Met-R-O za razliku od ostalih linija. Točnije, linija koja je povećano eksprimirala MsrB3B koji je lokaliziran u mitohondriju pokazivala je najveći rast u prisutnosti Met-R-O. Pošto su mitohondriji odgovorni za glavninu nastalog ROS u stanici, njihovi su proteini konstantno izloženi rizičnim koncentracijama oksidansa. Zbog navedene činjenice MsrB3 je enzim od velikog značaja za umanjivanje posljedica oksidativnog stresa zbog svoje prisutnosti u mitohondriju.

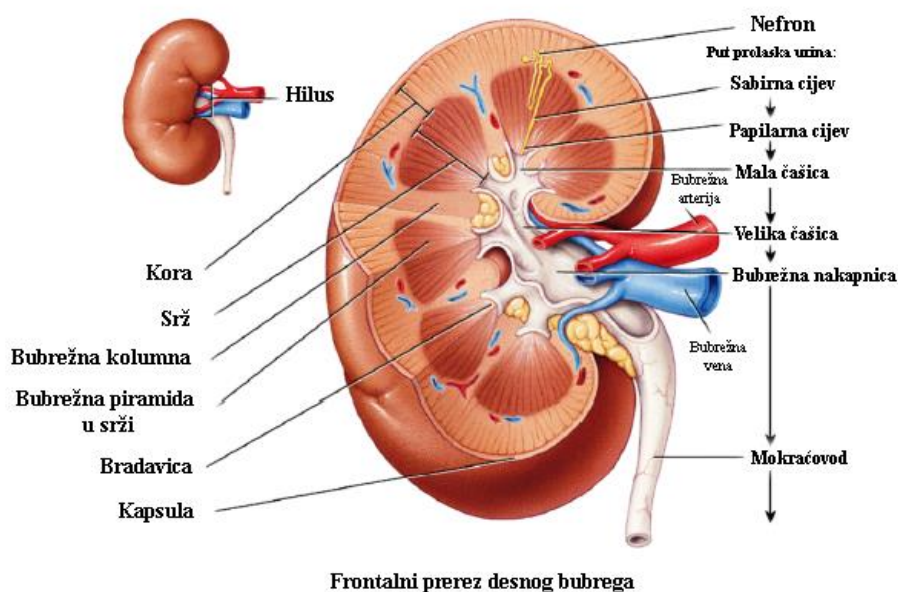


Slika 8. Struktura proteina MsrB3 s prikazom cisteinskih ostataka (kuglice s oznakama C9, C3 i C126) te CxxC motiva. N- i C-terminusi označeni su sivom bojom i sivim slovima. Oznaka C126 predstavlja cisteinski ostatak u aktivnom mjestu enzima, dok C3 i C9 predstavljaju regeneracijske cisteinske ostatke. Cisteinski ostaci su koordinirani ionom cinka (preuzeto iz Javitt *i sur.*, 2020)

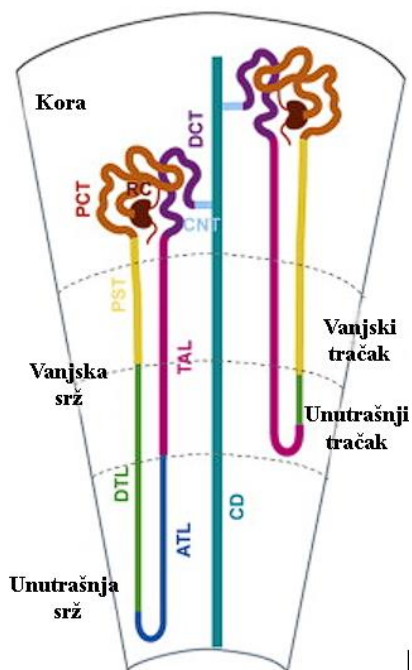
1.5. Anatomija i fiziologija bubrega

Bubreg (*lat. ren*) paran je organ u kralježnjaka čija je primarna uloga filtracija krvne plazme. Iz organizma se tim putem zadržavaju potrebne, a uklanjaju štetne tvari, među njima i određeni produkti metabolizma koji se zatim izlučuju mokraćom. Najbolji primjer otpadnog produkta metabolizma je ureja koja nastaje kao nusprodukt metabolizma aminokiselina. Isto tako bubreg je važni regulator krvnog tlaka, acidobazne ravnoteže, kao i volumena i sastava tjelesnih tekućina (Guyton i Hall, 2017). Bubrezi su kod čovjeka smješteni retroperitonealno u trbušnoj šupljini, približno u ravnini dvanaestog rebra (www.enciklopedija.hr). U štakora su smješteni slično čovjeku, no desni je bubreg pomaknut kranijalno za razliku od lijevog (Maurya *i sur.*, 2018).

Graholikog su oblika i teže otprilike 150 g (prema Guyton i Hall, 2017) u odraslog čovjeka, dok kod štakora iznose 0.50% do 0.60% tjelesne mase u trinaestom tjednu života (prema Seely *i sur.*, 2018). Medijalno se na bubregu nalazi *hilus*, odnosno udubljeno područje kroz koje prolaze bubrežne arterije i vene, limfne žile kao i živčelje i mokraćovod. Bubrežni je preko mokraćovoda spojen s mokraćnim mjehurom u kojeg izlučuje mokraću. Tijelo bubrega obavijeno je masnom fibroznom čahuricom koja ga štiti od vanjskih utjecaja i mehaničkog oštećenja. Prereže li se bubrežni frontalno razlikuju se pojedine regije od kojih su najistaknutije kora (*lat. cortex*) te vanjska i unutrašnja srž (*lat. medulla*) (Slika 9.). Srž je prožeta tvorbama piramidalnog oblika, bubrežnim piramidama, koje završavaju bradavicom (*lat. papilla*). Bradavica ulazi u područje nakapnice (*lat. pelvis renalis*), odnosno ljevkastog produljenja mokraćovoda (*lat. ureter*). U srži se mogu razlikovati tri različite zone: vanjski tračak vanjske srži (*eng. outer stripe of outer medulla*), unutrašnji tračak vanjske srži (*eng. inner stripe of outer medulla*) i unutrašnja srž (*eng. inner medulla*) (Slika 10.) (Guyton i Hall, 2017).



Slika 9. Prikaz frontalnog prereza humanog bubrega s označenim regijama, kao i protok mokraćé od sabirne cijevi do mokraćnog mjehura (preuzeto i prilagođeno iz Maurya *i sur.*, 2018)



Slika 10. Prikaz pojedinih regija bubrega s osvrtom na zone unutar srži. Kratice: bubrežno tjelešće - RC, proksimalni zavijeni kanalić - PCT, distalni zavijeni kanalić - DCT, proksimalni ravni kanalić - PST, tanki silazni odsječak Henleove petlje - DTL, tanki uzlazni odsječak Henleove petlje - ATL, debeli uzlazni odsječak Henleove petlje - TAL, povezujući kanalić - CNT, sabirna cijev – CD (preuzeto i prilagođeno iz Yu, 2016)

Ljudski bubreg sadržava približno osamsto tisuća nefrona, koji čine njegove funkcionalne jedinice. Osnovni dio nefrona čini splet kapilara sastavljenih u glomerul, sferičnu strukturu koja se nalazi u bubrežnoj kori. Uloga mu je filtracija krvi kojom nastaje glomerularni filtrat sastavljen primarno od vode i elektrolita. Glomerul je obavijen epitelnim stanicama ili podocitima enkapsuliranim u *Bowmanovu čahuru*. Bowmanova čahura se nastavlja na dugački kanalić (*lat. tubul*) u kojem se filtrirana tekućina na putu prema nakapnici pretvara u mokraću. Dugački kanalić podijeljen je na proksimalni zavijeni S1 i S2 odsječak te ravni S3 odsječak kanalića, silazni i uzlazni krak koji čine *Henleovu petlju* te distalni zavijeni i ravni dio kanalića koji se spaja na sabirni kanalić (Guyton i Hall, 2017, Maurya *i sur.*, 2018). Proksimalni kanalić se nastavlja na Bowmanovu čahuru, a zajedno s glomerulom smješten je u kori (Slika 10.). Iz proksimalnog kanalića nastavlja se silazni krak Henleove petlje koji zalazi duboko u srž bubrega (Guyton i Hall, 2017).

Henleova petlja građena je od silaznog i uzlaznog kraka, s time da silazni i početni dio uzlaznog kraka posjeduju stanjen epitel, odnosno jednim se terminom nazivaju tanki odsječak Henleove petlje. Ostatak uzlaznog kraka, odnosno odsječak koji se ponovno penje prema kori mnogo je debljeg epitela pa se prema tome naziva debeli odsječak Henleove petlje, na čijem se dijelu koji dotiče glomerul nalazi kratak zadebljali odsječak – gusta pjega (*lat. macula densa*). Dugački kanalić se nastavlja kao distalni zavijeni te ravni kanalić, nadalje kao kortikalni vezni kanalić koji se sapaja na sabirnu cijev (Guyton i Hall, 2017).

Iako su nefroni pretežito ujednačene građe, postoje razlike među njima ovisno o njihovoj poziciji u bubrežnom tkivu. Ako im je glomerul u cijelosti sadržan unutar kore, točnije u vanjskom dijelu kore, tada se nazivaju kortikalni nefroni. Njihove su Henleove petlje uobičajeno kraće i ne sežu duboko u srž. Pored njih postoje i jukstamedularni nefroni čiji se glomeruli nalaze na granici kore i srži te čije su Henleove petlje dulje i sežu duboko u srž. Otprilike dvadeset do trideset posto sveukupnih nefrona je upravo jukstamedularnog tipa (prema Guyton i Hall, 2017). Ljudski glomeruli su podjednake veličine, no u štakora mogu varirati u veličini iz čega proizlazi činjenica da su im glomeruli jukstamedularnih nefrona generalno veći od kortikalnih (Maurya *i sur.*, 2018).

Iako se na dugački kanalić nefrona gleda kao na jedinstvenu cijelinu, on nije cjelokupnom dužinom uniformne građe. Svaki odsječak građen je sukladno ulozi koju obavlja. Proksimalni zavijeni kanalić građen je od kubičnog epitela na čijim se apikalnim stranama nalaze mikrovili. Epitel skoro u potpunosti ispunjava lumen kanalića, a mikrovili povećavaju njegovu apsorpcijsku površinu. Tanki i debeli odsječci Henleove petlje posjeduju skvamozni epitel, dok je distalni zavijeni kanalić građen od kubičnog epitela kao i proksimalni, no ima vrlo malo mikrovila ili oni pak izostaju (Maurya *i sur.*, 2018).

Otprilike dvadeset posto ukupnog volumena krvi se u bubrežima filtrira svake minute (Maurya *i sur.*, 2018). Kasnije se, prolaskom tekućine kroz dugački kanalić, određene tvari reasorbiraju nazad u krv, a pojedine izlučuju iz krvi u filtriranu tekućinu. Najveću sposobnost reapsorpcije imaju proksimalni kanalići zbog svoje jedinstvene stanične građe (Slika 10., PCT). Uz mikrovile, epitelne stanice proksimalnih kanalića sadrže mnogo mitohondrija što ih čini izuzetno metabolički aktivnima. Za vodu je najpropusniji odsječak tanki silazni krak Henleove petlje, dok su tanki i debeli uzlazni krakovi gotovo vodonepropusni što, pomoću stvorenog ionskog gradijenta kora-srž, omogućava koncentriranje mokraće (Guyton i Hall, 2017).

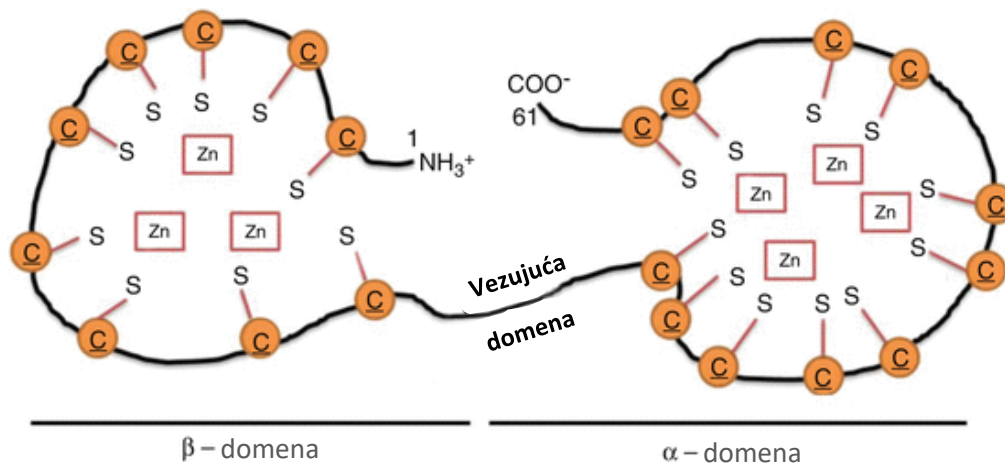
1.6. Metalotioneini

Bubreg sisavaca, radi svoje gore opisane funkcije filtracije, izlučivanja i reapsorpcije, izrazito je podložan oštećenju pri izlaganju te nakupljanju teških metala u organizmu. Teški metali su elementi čiji je atomski broj viši od 20, a gustoća atomske jezgre viša od 5 g/cm^3 (Raychaudhuri *i sur.*, 2021). U teške metale spadaju neesencijalni toksični prijelazni metali poput kadmija (Cd) i žive (Hg) te metaloidi poput arsena (As). No, i pojedini esencijalni prijelazni metali spadaju u navedenu kategoriju, poput željeza (Fe), bakra (Cu), cinka (Zn), kobalta (Co) i mangana (Mn) (Coyle *i sur.*, 2002). Neesencijalni te ionizirani esencijalni teški metali mogu pridonositi oksidativnom stresu u stanicama bubrega, ali i ostalih tkiva. Zbog navedene činjenice potrebno je regulirati dostupnost prijelaznih metala u stanici u čemu, među ostalim funkcijama, uspješno sudjeluju i metalotioneini (Coyle *i sur.*, 2002).

Metalotioneini (MT) su unutarstanični proteini male molekulske mase (<7 kDa) koji su uključeni u stanični odgovor na oksidativni stres. Nisu esencijalni proteini, što znači da njihovim izostankom jedinka normalno preživljava (Achard-Joris *i sur.*, 2007). Prvi su put izolirani 1957. iz bubrega konja te su opisani kao iznimni sakupljači kadmija, odgovorni za njegovo nakupljanje u organima, efikasnim skladištenjem (Swindell, 2011). Primarna uloga MT jest održavanje homeostaze esencijalnih metala, no njihova ekspresija može biti potaknuta i unosom teških metala poput Hg i Cd (Achard-Joris *i sur.*, 2007).

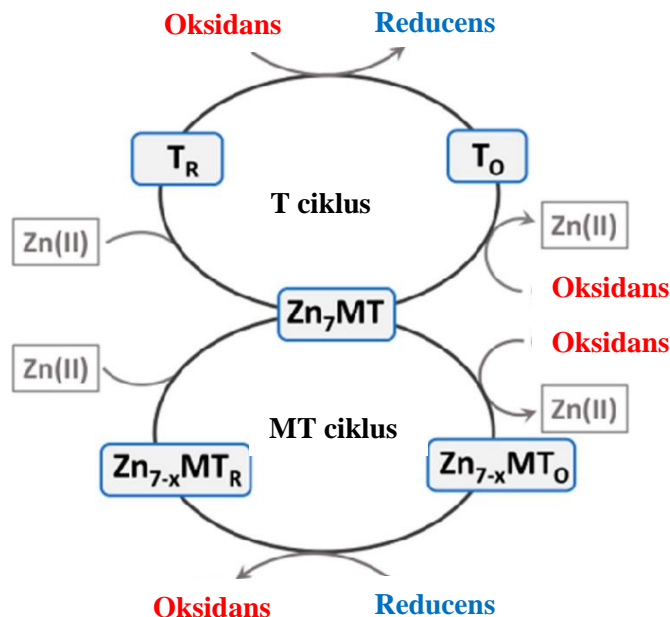
Struktura MT karakterizirana je posjedovanjem jednog polipeptidnog lanca s 61 aminokiselinskim ostatkom, od kojih prosječno 20 ostataka čine cisteinski ostaci visokokonzervirani unutar skupine. Cisteinski ostaci unutar strukture MT sisavaca sadržani su unutar dvije vezne domene, α i β , od kojih se devet nalazi unutar β domene, a 11 unutar α domene. Domene su raspoređene u tzv. bimodularnu strukturu prikazanu Slikom 11. Domene se razlikuju po kapacitetu vezanja, pa je tako α domena sposobna vezati četiri bivalentna metalna iona, a β domena tri (Achard-Joris *i sur.*, 2007). U proteinskoj strukturi ne posjeduju aromatske aminokiselinske ostatke, kao ni aminokiselinu histidin. Iako su sami po sebi male molekulske mase, mogu sadržavati velike količine vezanih metala, prvenstveno Cu i Zn (Coyle *i sur.*, 2002). Za antioksidativna svojstva MT uvelike je zaslužna nukleofilnost sulfhidrilne skupine cisteina kao i sposobnost stvaranja koordinativnih veza s metalnim ionima (Achard-Joris *i sur.*, 2007).

Ako u strukturi MT nije vezan Zn, apoproteini se nazivaju tioneini (T) i, osim što su prisutni u velikom postotku, vrlo su učinkoviti reducenski sposobni regenerirati MsrB3 enzime (Slika 12.). Pošto trećinu ukupnog sadržaja aminokiselina u tioneinu čini cistein, on predstavlja bogat izvor sulfhidrilnih grupa u stanici, odnosno učinkovitih donora vodikovih iona (Sagher *i sur.*, 2006).



Slika 11. Struktura proteina metalotioneina s osvrtom na pozicije α i β domena. Cisteinski ostaci označeni su slovom C, a sumpor unutar sulfhidrilne skupine slovom S. N- i C-terminalni krajevi označeni su redom s NH₃⁺ te COO⁻ (preuzeto i prilagođeno iz Dyiegel *i sur.*, 2016)

Citotoksične tvari, kao i stresni uvjeti poput manjka nutrijenata ili infekcije, mogu povećati ekspresiju MT. U uvjetima oksidativnog stresa djeluju kao vrlo efektivni sakupljači ·OH. Swindell, 2011. u preglednom članku iznosi opsežne dokaze da prekomjerna ekspresija MT (*eng. overexpression*) ima pozitivnu ulogu u smanjenju ukupnog efekta starenja kod miša kao modelnog organizma.



Slika 12. Redoks ciklus metalotioneina (MT) i tioneina (T) u oksidativnom i reduktivnom okruženju. Kratice: reducirani tionein - T_R , oksidirani tionein - T_O , reducirani metalotionein - MT_R , oksidirani metalotionein - MT_O (preuzeto i prilagođeno iz Krezel i Maret, 2021)

1.7. Starenje ili senescencija

Prema zakonu entropije, svaka tvar ili jedinka sposobna je održavati svoju egzistenciju određeno vrijeme nakon kojeg neminovno propada i umire. Kada homeostaza u organizmu naruši, dolazi do pada u funkciji organa i organskih sustava te jedinka stari. Pojam starenje najčešće se rabi u opisu fizičke dobi određene jedinke, no podmaklost dobi samo je jedna od mnogih aspekata starenja (Gilbert, 2000). Starenje ili senescencija može se definirati kao pad u fiziološkoj funkciji neophodnoj za preživljavanje, razvoj i plodnost koja ovisi o proteklom vremenu. Starenje predstavlja prirodni proces koji zahvaća sve jedinke, no postoje pojedine vrsne razlike s obzirom na karakteristike starenja. Vrsne razlike se najčešće ispoljavaju kroz maksimalni očekivani životni vijek. Primjerice, čovjek stari brže od većine vrsta kopnenih kornjača, dok naspram pasa stari sporije, odnosno postoje razlike u maksimalnoj dobi koju određena jedinka može postići. Procjena maksimalnog životnog vijeka čovjeka iznosi 121 godinu (prema Gilbert, 2000).

Prema podacima Instituta Max Planck za demografska istraživanja te Robine i Allard, 1999, najstarija živa osoba ikad zabilježena je Francuskinja Jeanne Calment koja je doživjela 122. godinu života. Maksimalni životni vijek razlikuje se od očekivanog životnog vijeka, koji je odlika populacije. Očekivani životni vijek predstavlja dob pri kojoj preživljava polovica ukupne populacije, pokazuje spolne razlike i pokazuje veliki porast u odnosu na dalju prošlost. Nadalje, ovisan je o uvjetima života, povijesnom razdoblju, trenutnom socio-političkom stanju (Gilbert, 2000).

Iako se pojam senescencije može rabiti u opisivanju svih aspekata starenja, njegova je primjena najčešće u opisivanju starenja stanica. Fenomen stanične senescencije prvi je puta opisan šezdesetih godina prošlog stoljeća u tjelesnim stanicama čovjeka koje su iskoristile čitav replikacijski potencijal. Takve stanice zastaju, odnosno „zamrznute su“ u G₁ fazi staničnog ciklusa kako bi se spriječila daljnja proliferacija defektnih stanica. Stanična senescencija normalno se javlja tokom embrionalnog razvoja kao važan proces u izgradnji tkiva i organa. Stanice koje su nepotrebne ili su izvršile svoju zadaću ulaze u staničnu smrt ili apoptozu te bivaju uklonjene aktivnošću makrofaga što doprinosi pravilnom formiranju tkiva. Taj proces često se naziva akutna senescencija. Stanice ulaze u senescenciju i zbog raznih oštećenja, prvenstveno oštećenja molekule DNA, ali i zbog disfunkcije telomera te aktivacije onkogeni ili inaktivacije tumor supresora (Huang *i sur.*, 2022). Ako se oštećene stanice održe unutar tkiva, može doći do nastanka bolesti. Tada se govori o kroničnoj senescenciji (Docherty *i sur.*, 2019). Odlika svih stanica u senescenciji je posjedovanje tzv. sekretornog fenotipa povezanog sa senescencijom (*eng. senescence-associated secretory phenotype, SASP*) kojeg karakterizira izlučivanje mnogih signalnih spojeva (citokina, kemokina i faktora rasta) u vanstanični matriks. Mnoge stanice ispuštaju i vezikule ispunjene degradiranim staničnim sadržajem, poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Ispuštanjem signalnih spojeva stanice u senescenciji mogu regulirati metaboličke puteve i susjednih stanica i udaljenih stanica i tkiva (Huang *i sur.*, 2022). Oksidativni stres uzrokovan prekomjernom proizvodnjom reaktivnih vrsta kisika, kao i izostanak antioksidativne obrane, stalan su uzrok staničnoj senescenciji, odnosno uobičajena funkcija metabolizma doprinosi starenju. Mitohondrijska je DNA podložnija oštećenjima od jezgrine DNA što rezultira povećanom stopom mutacija. Mutacije mogu dovesti do defekata poput prekomjerne produkcije reaktivnih vrsta kisika koje se ne mogu učinkovito neutralizirati, kao i do pojačane replikacije defektnih mitohondrija zbog mutacija u ciljnim mjestima povezanim sa starenjem (Huang *i sur.*, 2022, Gilbert, 2000).

Bubreg se smatra organom najpodložnijim oštećenjima povezanim sa starenjem. Njegova ukupna masa se s vremenom smanjuje, a najveće promjene zamjećuju se upravo u kori. Bubrežna kora prožeta je mnoštvom kanalića čiji je epitel podložan senescenciji. Tako se u određenim patološkim stanjima zamjećuje porast u senescentnim stanicama epitela dugačkog kanalića naspram zdravoj kontroli (Docherty *i sur.*, 2019). Starenjem dolazi do pada u veličini i ukupnom broju nefrona, kao i do nakupljanja masti i kolesterola koji povećavaju stopu lipidne peroksidacije, a time i produkciju reaktivnih vrsta kisika (Pradas *i sur.*, 2019).

1.7.1. Metioninska restrikcija

Svi organizmi su prilagođeni promjenama nutrijenata u svome okolišu. Dostupnost nutrijenata, kao i njihovo iskorištavanje i skladištenje važni su čimbenici u regulaciji stanične aktivnosti u vidu starenja. Već dugi niz godina uočava se da uvođenje određenih dijetalnih restrikcija poboljšava općenito stanje organizma. Najpoznatija metoda među njima je svakako kalorijska restrikcija koja se pokazala učinkovitom u smanjenju posljedica starenja preko više različitih puteva, među kojima je i smanjenje oksidativnog stresa kojem je stanica podložna. Prema Pradas *i sur.*, 2019, proteinska restrikcija gotovo je zamijenila kalorijsku restrikciju u istraživanjima starenja i bolesti povezanih s njome. Posebno je važna restrikcija metionina (*eng. methionine restriction*, MetR). Metionin je kao esencijalna aminokiselina od velikog značaja za pravilan rast i razvoj. Nalazi se u većim količinama u hrani bogatoj proteinima, poput janječeg i goveđeg mesa, jaja te ribi. Dijeta bazirana na metioninskoj restrikciji efektivna je u rasponu od 0.17% do 0.25% ukupnog sadržaja metionina u prehrani (Kitada *i sur.*, 2021). Ogura *i sur.*, 2021 navode kako dijetalna restrikcija metionina može produljiti očekivani životni vijek u kvasaca, ali i u kralježnjaka poput miševa i štakora. Isto tako navode da manjak ekspresije gena (*eng. gene knockout*, KO) koji kodira za metionin sintazu doprinosi sveukupnom poboljšanju rezistencije na oksidativni stres *in vitro*. Nadalje, miševi podvrgnuti MetR tretmanu sporije ispoljavaju simptome staračkog sljepila nego li to čine kontrolne jedinke. Metioninska restrikcija u glodavaca smanjuje prekomjerno nakupljanje masnog tkiva te povećava osjetljivost tkiva na inzulin. Masno tkivo poznato je žarište upalnih procesa u organizmu, a upalni procesi produciraju mnoštvo reaktivnih vrsta koje doprinose oksidativnom stresu, a time i starenju (Kitada *i sur.*, 2021).

Dobrobiti dijete bazirane na MetR su mnoge i uključuju više čimbenika iz metaboličkog ciklusa u kojem sudjeluje metionin. Najčešće na organizam utječe indukcijom autofagije preko drugačijeg epigenetskog zapisa metilacijom upravljanom metabolitom SAM, smanjenja produkcije reaktivnih vrsta kisika i njihova „curenja“ iz mitohondrija te smanjenjem razine homocisteina pojačanom sintezom sumporovodika transsulfuracijskim putem. Proces autofagije očituje se u lizosomalnoj degradaciji nakupljenog staničnog sadržaja, poput oštećenih organela i dugovječnih disfunkcionalnih proteina. Autofagiji mogu biti podvrgnuti i mitohondriji ako su nepovratno oštećeni oksidativnim stresom. Takav specifičan oblik autofagije naziva se mitofagija. U uvjetima onemogućene autofagije oštećeni se mitohondriji nakupljaju u stanici što narušava redoks ravnotežu i čini stanicu manje otpornom na učinke starenja (Pradas *i sur.*, 2019).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi postoje li dobne i spolne razlike u ekspresiji enzima MsrB3 koje prate prethodno ustanovljene promjene u ekspresiji (metalo)tioneina u bubregu potencijalno uključenog u regeneraciju njegove funkcije. Metalo/apotionein protein je male molekulske mase bogat cisteinom koji vrlo učinkovito veže esencijalne i sakuplja teške metale te ih u stanici regulira, odnosno teške metale čini manje dostupnima. U oksidirajućim uvjetima, odnosno u uvjetima oksidativnog stresa, iz strukture gubi najčešće vezan cink čime prelazi u tionein koji je vrlo učinkovit reducens, pri čemu se sam oksidira, odnosno stvara disulfidne veze između cisteinskih ostataka te donira vodikove ione. Ekspresija (metalo)tioneina pokazuje spolne razlike u korist ženki te raste sa starenjem prema rezultatima dobivenim tijekom projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) AGEMETAR, IP-11-2013-1481. U ovom radu pratit će se promjena razine ekspresije enzima MsrB3 prema razini ekspresije (metalo)tioneina, proteina koji ga je sposoban regenerirati, te će se ustanoviti njihova moguća povezanost nakon ispitivanja količine i prisutnosti MsrB3 molekularnim metodama: nukleinskih kiselina (mRNA) - metodom RT-PCR, proteina - western blot analizom uz distribuciju MsrB3 u bubrezima - imunofluorescencijom na tkivnim kriosekcijama.

3. Materijali i metode

Istraživanje je provedeno na arhivskim uzorcima projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) AGEMETAR, IP-11-2013-1481 s odobrenjem Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Za potrebe izvođenja pokusa korišteni su arhivski uzorci tkivnih homogenata i tkivnih narezaka bubrega štakora soja Wistar uzgojenih u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

3.1. Kemijski pribor, uređaji, otopine i pufferi

Za pripremu tkivnih narezaka korišteni su: paraformaldehid (PFA) tvrtke EMS (Los Almitos, CA, SAD); natrijev azid (NaN_3) tvrtke Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD); pumpa za perfuziju Masterflex tvrtke Cole-Parmer (Chicago, IL, SAD); medij za uklapanje O.C.T. Compound 4583 Tissue-Tek tvrtke Sakura Finetek (Torrance, CA, SAD); kriostat Leica CM 1850 tvrtke Leica instruments GmbH (Nussloch, Njemačka)

Za provedbu imunohistokemije/imunofluorescencije korišteni su: albumin iz seruma goveda (*eng. bovine serum albumin*, BSA) i Triton-X-100 tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD); ksilol, izopropanol, etanol i natrijev citrat tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska); otopina za očuvanje fluorescencije s bojom za jezgre DAPI (Vectashield) tvrtke Vector Labs (Burlingame, CA, SAD) te predmetna stakalca (Superfrost/Plus Microscope slides) tvrtke Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD).

Za izolaciju ukupne RNA, homogenizaciju tkiva i RT-PCR korišteni su: RNAlater tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD); električni homogenizator Powergen 125 tvrtke Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD); autoklav tvrtke Bari (Zagreb, Hrvatska); spektrofotometar CECIL 9000 tvrtke Cambridge (Engleska, UK); UltraPURE RNaza/DNaza čista voda i TRIzol tvrtke Gibco-BRL (Grand Island, NY, SAD); komplet za sintezu cDNA First Strand cDNA Synthesis tvrtke Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD); komplet za pročišćavanje RNA RNeasy Mini Kit tvrtke Qiagen (Hilden, Njemačka).

Za pripremu uzoraka za PCR reakciju korišteni su: PCR komplet (PCR Master Mix) i uređaj za PCR termocikler 2720 tvrtke Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD); početnice gena od interesa (kreirane uz pomoć programa <http://www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> *online*, nabavljenje *online* od tvrtke MetaBion Int. Germany, dobavljač: http://www.gorea-plus.hr/custom_primer/)

Za određivanje koncentracije proteina, SDS-PAGE i western blot analizu korišteni su: narketan i ksilapan tvrtke Chassot (Bern, Švicarska); β -merkaptotanol (β ME), aparatura za vertikalnu elektroforezu Mini Protean III Cell i MiniTrans-Blot Cell za SDS-PAGE, TGX Stain-Free FastCast komplet za izlijevanje 10%-tnog akrilamidnog gela tvrtke BioRad (Hercules, CA, SAD); tetrametiletildiamin (TEMED) i fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD); amonijev persulfat (APS) tvrtke ThermoFisher Scientific (Pittsburgh, PA, SAD); hidrofobna najlonska membrana Immobilon (Poliviniliden fluorid, PVDF) tvrtke Millipore (Bedford, MA, SAD); uzorak standarda molekulskih masa proteina i RNaza čista voda tvrtke Gibco-BRL (Grand Island, NY, SAD); SDS (natrijev-dodecilsulfat) i Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie plavilo) tvrtke Serva (Heidelberg, Njemačka); centrifuga s hlađenjem Sorvall RC2B, ultracentrifuga OTD-Combi te stakleni homogenizator Omnimixer tvrtke Sorvall Instruments (Newtown, CT, SAD).

Za elektroforezu na agaroznom gelu korišteni su: agarozna i EDTA (etilendiamin N,N,N',N'-tetraoctena kiselina) tvrtke Sigma (St. Luis, MO, SAD), TRIS tvrtke Boehringer (Mannheim, Njemačka); fluorescentna boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar tvrtke Lonza (Basel, Švicarska), pufer za nanošenje uzorka (loading buffer 6x) BlueJuice i standard molekulskih masa (DNA ladder) tvrtke Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) te PowerPac Basic uređaj za napajanje i horizontalni sustav za elektroforezu tvrtke BioRad (Hercules, CA, SAD).

Za vizualizaciju rezultata korišteni su: za imunofluorescenciju, fluorescencijski mikroskop Axio Imager.Z2 tvrtke CarlZeiss (Oberkochen, Njemačka) s njemu pripadajućom digitalnom kamerom i programom za snimanje slika Zen; za western blot analizu, GelDoc Go sustav za vizualizaciju gelova tvrtke BioRad (Hercules, CA, SAD).

3.1.1. Sastavi pufera i otopina

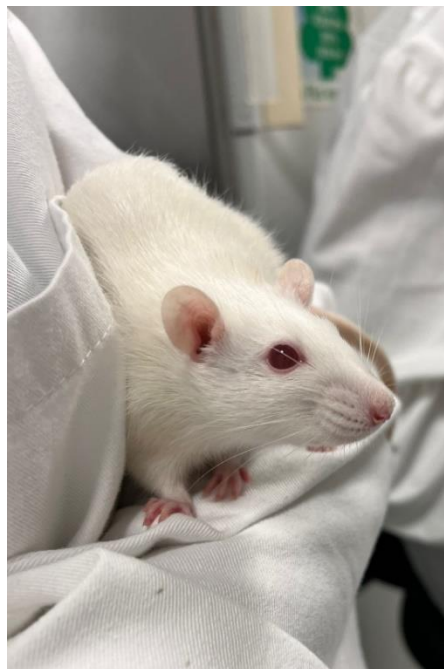
1. Fosfatni pufer (1x PBS, pH7.4): 2 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄)
2. Citratni pufer (pH3): 2.1 g limunske kiseline u 800 ml H₂O podešeno na pH3 dodatkom klorovodične kiseline (HCl)
3. Citratni pufer (pH6): 10 mM natrijev citrat (2.94 g/l) otopljen u dvostrukom volumenu H₂O i 2.1 g/l limunske kiseline u omjeru 1:1 (pH 6)
4. Citratni pufer (pH8): 10 mM natrijev citrat (2.94 g/l) otopljen u dvostrukom volumenu H₂O podešeno na pH 8 dodatkom natrijeve lužine (NaOH)
5. T-X-100 u PBS-u (v/v; 0.1%): 25 ml pripremljenog T-X-100 u PBS-u (0.5%), 100 ml 1x PBS
6. T-X-100 u PBS-u (v/v; 0.5%): 25 ml pripremljenog T-X-100 u PBS-u (2%), 75 ml 1x PBS
7. T-X-100 u PBS-u (m/v; 2%): 20 g triton-X-100, 900 ml H₂O, 100 ml 10x PBS (do 1l otopine)
8. Pufer za denaturaciju proteina (Laemmli-pufer): 0.5 M Tris/HCl pH 6.8 (v/v; 22 %), 80% glicerol (v/v; 54 %), 30% natrij-dodecil sulfat (natrijev-dodecil sulfat, SDS, v/v; 12 %), zasićena otopina plavila bromfenola (bromfenol plavo, BPB, v/v; 12 %).
9. Pufer za blokiranje (blotto-pufer): 5 % nemasno mlijeko u prahu, 1% Triton-X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4.
10. Pufer za poliakrilamidnu gel elektroforezu (PAGE-pufer): 25 mM Tris baza, 1 % SDS, 0.2 M glicin
11. Pufer za prijenos proteina na membranu (transfer-pufer): 15.6 mM Tris, 20 % metanol, 120 mM glicin
12. Pufer za agaroznu gel elektroforezu (TAE-pufer): 0.4 M Tris, 10 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) i 11.44 ml ledene octene kiseline na 1l H₂O (pH 8-8.5).

3.2. Laboratorijske životinje

Istraživanje je provedeno na mužjacima i ženkaama štakora soja Wistar u dobi od tri mjeseca, jednu i dvije godine uzgojenih unutar Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, Hrvatska. Štakori su uzgojeni u kontroliranim uvjetima u skladu s etičkim načelima, pri stalnoj sobnoj temperaturi (24 °C) i kontroliranim dnevnim ritmom. Životinje su prije žrtvovanja imale stalan i slobodan pristup hrani i vodi.

3.2.1. Pokusi utvrđivanja dobnih i spolnih razlika

U svrhu utvrđivanja dobnih i spolnih razlika korišteni su tkivni nareseci, cDNA izolirana iz bubrega te homogenati bubrega mužjaka i ženki štakora soja Wistar u dobi od tri mjeseca, jednu i dvije godine.



Slika 13. Štakor soja Wistar uzgojen unutar Jedinice za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu

3.3. Protutijela

3.3.1. Primarna protutijela

Primarna protutijela korištena u svrhu izrade ovog diplomskog rada su rekombinantna kuničja monoklonska protutijela anti-MSRB3 (EPR13664) i anti-HO-1 (ab179800) tvrtke Abcam (Cambridge, UK) te mišja monoklonska protutijela anti-MT (E9) tvrtke DAKO (sadašnji Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD) i protutijelo na alfa podjedinicu α 1-NaK ATPaze (sc-48345, H-3) tvrtke Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA. Protutijela su skladištena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u otopini sastavljenoj 49% od PBS-a, 50% od glicerola i 0.05% od BSA. Protutijelo anti-MsrB3 specifično je za ljudsku izoformu MsrB3, ali prepoznaje i mišji i štakorski protein zbog visokog stupnja sigurnosti. Kod rekombinantnih protutijela, konstantna regija protutijela (F_c regija) modificirana je kako bi odgovarala konstantnoj regiji IgG kunića (za Rabbit Anti-MSRB3 i anti-HO-1). Protutijelo anti-MsrB3 koristila sam u western blot analizi u razrjeđenju 1:500, a obilježavalo je pruge na $\sim 19\text{ kDa}$. U svrhu imunofluorescencijske detekcije MsrB3 u bubrežnim kanalčićima koristila sam protutijelo anti-MsrB3 u razrjeđenju 1:50, dok sam za dvostruko obojenje koristila protutijelo anti-MT u razrjeđenju 1:200, a protutijelo na alfa podjedinicu α 1-NaK ATPaze u razrjeđenju 1:100. Za sekvencijalne nereske protutijelo anti-HO-1 koristila sam u razrjeđenju od 1:100.

3.3.2. Sekundarna protutijela

Sekundarna protutijela korištena u imunofluorescenciji su kozje protutijelo koje cilja IgG kunića (eng. *Goat Anti-rabbit CY3*, GAR CY3) obilježeno molekulom CY3 (eng. *cyanine dye*) i kozje protutijelo koje cilja IgG miša (eng. *Goat Anti-Mouse*, GAMF) obilježeno molekulom FITC (eng. *fluorescein isothiocyanate*, fluorescein izotiocijanat) tvrtke Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, SAD). Vezanjem GAR CY3 za primarno protutijelo dobiva se fluorescentno crveno obojenje s ekscitacijskim maksimumom (E_x) od 555 nm i emisijskim maksimumom (E_m) od 567 nm.

Vežanjem GAMF za primarno protutijelo dobiva se fluorescentno zeleno obojenje s Ex od 495 nm i Em od 519 nm. Protutijelo GAR CY3 koristila sam u koncentraciji od 3.2 µg/mL, a protutijelo GAMF u visokoj koncentraciji od 20 µg/mL. Sekundarno protutijelo korišteno u western blot analizi je kozje protutijelo za zečji IgG s vezanim enzimom alkalnom fosfatazom (*eng. Goat Anti-rabbit alkaline phosphatase, GARAP*) tvrtke Kirkegaard & Perry (Gaithersburg, MD, SAD). Protutijelo sam koristila u koncentraciji 0.4 µg/mL, odnosno u razrjeđenju 1:500.

3.4. Početnice (*eng. primers*)

Početnice korištene u PCR reakcijskoj smjesi specifične su za kratke oligonukleotidne slijedove DNA unutar gena koji kodiraju za MsrA, MsrB1, MsrB2 i MsrB3 vrste *Rattus norvegicus*. Kreirane su *online* prema kalupu, odnosno sekvenci dobivenoj pretraživanjem baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*eng. National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

Tablica 1. Nukleotidni slijedovi početnica korištenih u PCR reakciji

Geni	Nukleotidni slijed <i>forward</i> (F) i <i>reverse</i> (R) početnica (5'-3')	Registracijski broj u bazi podataka	Položaj	Veličina PCR produkta (pb)
rMsrB3	F: GTGTGTTGCTGAGGATACCA R: GAACTGATCACATCGTGGAA	NM_001398959.1	165-185 512-492	348
rMsrB2	F: ATCCCTTGCTTTAGTTGCTG R: ACTCATCCATCCCTGAATGT	NM_001031660.1	607-627 972-952	366
rMsrB1	F: CTAGGAGATGGACTGCGAAT R: TTAAGAGGGACATGCTGGAT	NM_001044285.3	429-449 743-723	315
rMsrA	F: AATTTCTCTCCACGAAGCTG R: TTTCAGAACCCCTTAGCATCC	NM_053307.2	711-731 1020-1000	310
rGAPDH	F: GGTGATGCTGGTGCTGAGTA R: GGATGCAGGGATGATGTTCT	NM_017008.2	1105-1125 1453-1473	369

3.5. Metode

3.5.1. Priprema homogenata bubrega

Homogenati, odnosno uzorci bubrega štakora pripremljeni su metodom diferencijalnog centrifugiranja, određena im je koncentracija proteina te su korišteni u western blot analizi. Žrtvovanje pokusnih životinja učinjeno je iskrvarenjem u anesteziji sukladno Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013). Nakon žrtvovanja izolirani su bubrezi i uronjeni u posudu s hladnim PBS. Kako bi se tkivo lakše homogeniziralo, ono se najprije usitnilo. Za pripremu ispravnog masenog udjela tkiva u homogenatu (10%), tkivo je izvagano na analitičkoj vagi. Nakon usitnjavanja tkivo je stavljeno u hladni homo-pufer s inhibitorima proteaza, odnosno s 0.1 mM benzamidinom, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ antipainom i 1 mM fenilmetilsulfonil fluoridom (PMSF). Uzorak je homogeniziran pri niskoj temperaturi električnim homogenizatorom. Homogenizacija se najprije vršila 1 minutu na najvišoj brzini, nakon čega je slijedila pauza od 2 min. Nakon pauze uzorak je ponovno homogeniziran 1 minutu na najvišoj brzini. Po završetku homogenizacije uzorak je centrifugiran na 6500 rpm ili 5000 g u trajanju od 15 min. Talog dobiven centrifugiranjem sadrži debri staničnog matriksa, jezgre i veće mitohondrije zbog čega se odbacuje, dok se nadtalog koristi kao uzorak homogenata tkiva u narednim pokusima.

3.5.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima homogenata bubrega

Koncentracija proteina određena je u uzorcima homogenata tkiva bubrega spektrofotometrijski metodom po Bradfordu (1976.). Načelno, metoda se temelji na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za protein, prilikom čega prelazi iz jednog ionskog stanja u drugo apsorbirajući svjetlost valne duljine 595 nm. Priređena je otopina BSA u rasponu koncentracija od 0.2 do 1.2 mg/ml pomoću koje je zatim spektrofotometrijskom analizom dobivena standardna krivulja koncentracije proteina. Osjetljivost metode je 0.1 mg/ml. Nakon postavljanja standardne krivulje, pripremljena je slijepa proba (40 μl reH₂O, 40 μl mravlje kiseline (CH₂O₂) i 2 ml Coomassie plavila). Radna smjesa proteina za analizu pripremljena je u razrjeđenju od 80x što znači da je u 10 μl nativnog uzorka dodano 790 μl reH₂O.

Razrjeđivanje se vršilo kako bi se optička gustoća (*eng. optical density*, OD) uzorka dovela u raspon standardne krivulje. Iz radne smjese pripremljeni su duplikati koji čine uzorke za analizu. Iz radne smjese se otpipetiralo 40 µl uzorka i prenijelo u kivetu s 40 µl mravlje kiseline i 2 ml bojila. Mjerenja su izvedena na spektrofotometru bilježenjem koncentracija OD i očitanjem koncentracija proteina prema podacima iz standardne krivulje. Koncentracija proteina izračunata je prema formuli:

$$\frac{\text{mg (proteina)}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g (očitanje proteina)} \times \text{razrjeđenje}}{1000}$$

3.5.3. Priprema tkivnih narezaka i fiksacija tkiva

Životinje čiji su se bubrezi koristili u pripremi tkivnih narezaka žrtvovane su u anesteziji (80 mg/kg t.m. Narketana i.p., 12 mg/kg t.m. ksilapana i.p.) uz potpuno iskrvarenje (krv se iz jugularne vene uzima za daljnje analize) ili uklanjanje krvi iz sistemske cirkulacije iz životinja na kojima se vršila perfuzija *in vivo*. Perfuzija je vršena kroz srce, prvo aeriranim PBS (95% O₂ i 5% CO₂, 37 °C) otprilike 2 min kako bi se odstranila krv iz cirkulacije, a zatim fiksativom (4% paraformaldehid u PBS) otprilike 5 min. U oba slučaja, bubrezi su izolirani iz životinja te im je uklonjena vanjska kapsula. Od izoliranih bubrega napravljeni su transverzalni prerezi debljine ~ 3-5 mm koji su zatim 24 sata proveli u otopini fiksativa (4 °C). Bitna razlika između perfundiranih i neperfundiranih uzoraka je viša količina autofluorescirajućih eritrocita u neperfundiranim uzorcima, dok na samo imunohistokemijsko obojenje nema utjecaja prema dugogodišnjem iskustvu. Prerezi su isprani PBS i pohranjeni u PBS s dodanim 0.02% NaN₃ (4 °C). Od debljih transverzalnih prereza učinjene su kriosekcije uporabom kriostata. Kako bi to bilo moguće, prerezi su najprije uronjeni u otopinu 30% saharoze u PBS koji osigurava postojanost staničnih struktura pri niskim temperaturama. U njemu su proveli 12 sati, nakon čega je slijedilo uklapanje u medij O.C.T. Uklopljeno tkivo smrznuto je u kriostatu na temperaturi od -25 °C, a zatim je i narezano na narezke debljine 4 µm te prenijeto na predmetno stakalce. Uzorci kriosekcija na predmetnim stakalcima pohranjeni su na 4°C do daljnje upotrebe.

3.5.4. Raskrivanje antigena i imunofluorescencija

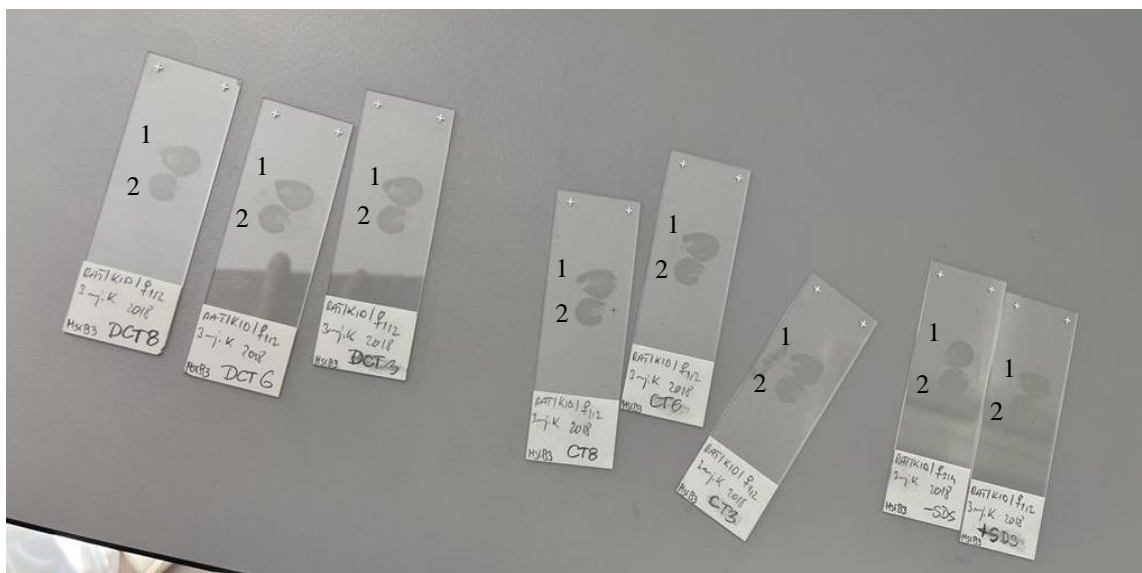
Raskrivanje antigena (*eng. antigen retrieval*) predstavlja prvi, ujedno i najvažniji, korak u provedbi metode imuofluorescencije. Njime antigeni, točnije epitopi, nakon fiksacije postaju dostupni protutijelima koja su za njih specifična. Kako bismo ustanovili koji uvjeti su najpogodniji za maksimalnu vizualizaciju danog antigena, provela sam metodu raskrivanja antigena na histološkim prerezima bubrega tromjesečnih mužjaka štakora pod ukupno osam različitih uvjeta u tri skupine. Zbog postojanja dobno-spolnih razlika u štakora uvjete za raskrivanje antigena isprva sam odredila na prerezima bubrega tromjesečnih mužjaka, a kasnije sam isti pokus ponovila na prerezima bubrega tromjesečnih ženki.

Prva skupina uvjeta zahtijevala je provođenje koraka lažne deparafinacije i obradu neionskim deterdžentima te kuhanje u citratnim puferima pH 3, 8 i 6 (DCT). Kod druge skupine uvjeta preskačem početnu deparafinaciju te uzorke isključivo obrađujem neionskim deterdžentima i samo kuham u citratnim puferima pH 3, 6 i 8 (CT). Trećom skupinom uvjeta ispitujem efikasnost raskrivanja epitopa s ionskim deterdžentom, natrijevim-dodecilsulfatom (SDS), kao poznatim sredstvom za denaturaciju membrana i proteina, prilikom čega jednu skupinu uzoraka obrađujem njime (+SDS), dok je druga skupina uzoraka izložena, umjesto SDS, fosfatnom puferu (PBS) (-SDS) (Slika 14.) (Brzica *i sur*, 2009).

Za određivanje optimalnih uvjeta iskoristila sam osam arhivskih uzoraka jedne životinje skladištenih na + 4 °C koje sam najprije rehidrirala 10 min u 1x PBS. Lažnu deparafinaciju uzoraka započela sam u ksilolu (30 min) nakon čega sam prezeze provela kroz niz padajućih udjela alkohola, svaki po 5 min, krećući s 98% pa sve do 60%. Deparafinirane i nedeparafinirane uzorke kuhala sam četiri puta po 5 min u mikrovalnoj pećnici jačine 800W u citratnim puferima pH 3 ili 6, odnosno 8, nakon čega sam ih pasivno hladila na sobnoj temperaturi 20 min. Ohlađene uzorke sam prenijela iz spremnika s puferom u čistu staklenu posudu te ih isprala tri puta po 5 min u 1x PBS. Zatim sam dodala 0.5% T-X-100 u PBS (10 min) pa 2% T-X-100 u PBS (30 min) te ih ponovno isprala u 1x PBS. Uzorke sam inkubirala 30 min u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u otopini 1% BSA kako bih spriječila nespecifično vezanje protutijela. Nakon inkubacije u 1% BSA uzorke sam inkubirala preko noći (otprilike 18 sati) u vlažnoj komori na + 4 °C u primarnom protutijelu.

Nakon prekononoćne inkubacije uzorke sam isprala u 0.1% T-X-100 u 1x PBS (10 min) pa dva puta u 1x PBS (5 min). Zatim sam uzorke inkubirala u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u sekundarnom protutijelu (1 sat). Uzorke sam nakon inkubacije ponovno isprala. Kako bih očuvala fluorescenciju na uzorke sam prije pokrivanja pokrovnim staklom dodala 40 µl medija za očuvanje fluorescencije (Vectashield) koji sadrži i DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Boja DAPI veže se na mjesta unutar molekule DNA bogata adeninom i timinom te služi vizualizaciji jezgara. Kako bi se spriječio prodor zraka ispod pokrovnog stakla ono je pričvršćeno lakom za nokte.

Uzorke za SDS tretman pripremila sam na sljedeći način. Na prvi uzorak nakapala sam otopinu 1% SDS, a na drugi 1x PBS (5 min). Isprala sam uzorke dva puta u 1x PBS (5 min) te ih zatim inkubirala u vlažnoj komori u otopini 1% BSA (30 min). Daljnji koraci identični su prethodnima, odnosno onima u obradi deparafiniranih i nedeparafiniranih uzoraka s jednom razlikom. Umjesto otopina T-X-100 u PBS za sva ispiranja koristila sam 2x HS PBS.



Slika 14. Prikaz kriosekcija uzoraka istih transverzalnih prereza bubrega štakora dvije tromjesečne ženke (1,2) na predmetnim stakalcima na kojima su određeni optimalni uvjeti za raskrivanje antigena

Postupak sam ponovila pri utvrđenom optimalnom uvjetu na tri pokusne skupine uzoraka sastavljene od po dva uzorka mužjaka i ženki štakora u starosti od tri mjeseca, jednu i dvije godine s odgovarajućim negativnim kontrolnim uzorkom (isti uzorak jedne od životinja, ali bez primarnog protutijela). Na uzorak koji je poslužio kao negativna kontrola dodala sam, umjesto primarnog protutijela, 1x PBS.

3.5.5. Izolacija RNA i reverzna transkripcija (RT-PCR)

Metoda izolacije RNA provedena je u skladu s preporukama rada s nukleinskim kiselinama kako bi se uzorak zaštitio od aktivnosti ribonukleaza (RNaza). Svo korišteno suđe je autoklavirano, a sav pribor tretiran je UV svjetlošću. Iste mjere sigurnosti provedene su i prije PCR reakcije. Ukupna RNA izolirana je iz stošca, odnosno komada nareška s bazom u kori i vrhom u bradavici kako bi zahvatili sve dijelove bubrega. Uzorak koji se rabio u te svrhe je jedan od središnjih tkivnih narezaka bubrega debljine ~ 1 mm koji je približno 24 sata bio uronjen u otopinu RNAlater (4 °C), a zatim pohranjen na - 20 °C da bi se kasnije izolirala RNA. Za uklanjanje nečistoća iz uzorka, poput proteina, rabio se komplet za pročišćavanje RNA prema uputama proizvođača. Kvaliteta pročišćene RNA ispitana je gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu. U gel je dodana fluorescentna boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar koja interkalira u lanac molekule RNA. Rezultat je vizualiziran sustavom za vizualizaciju gelova. Čistoća pročišćene RNA određena je spektrofotometrijski. Mjerenja su vršena pri apsorbciji od 260 nm za nukleinske kiseline, 230 nm za soli te 280 nm za proteine (prema BioSpec-nano, Shimadzu, Japan). Koncentracija RNA izračunata je na temelju Lambert-Beerovog zakona, pri čemu apsorbciju izmjerenu na 260 nm množimo s ekstinkcijskim koeficijentom (za RNA iznosi 44.19) i faktorom razrjeđenja.

Za sintezu prvog lanaca cDNA korišten je odgovarajući komplet (First Strand cDNA Synthesis Kit) prema uputama proizvođača. Ukupna stanična RNA (3 µg) denaturirana je pri 70 °C tijekom 5 min u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 0.5 µg početnica oligo (dT)18, a reverzna transkripcija pokrenuta je u ukupnom volumenu od 20 µL u reakcijskoj smjesi s konačnim odnosima: 1x pufer za reverznu transkripciju (RT), 20 jedinica inhibitora ribonukleaza, 1 mM mješavine dNTP i 40 jedinica reverzne transkriptaze M-MuLV (*eng. Moloney murine leukemia virus*).

Reakcijska smjesa inkubirana je pri 37 °C tijekom 1 sata, nakon čega je uslijedila inaktivacija enzima pri 72 °C tijekom 10 min kako je preporučeno od strane proizvođača. Dobivena cDNA je razrijeđena 5x u UltraPURE vodi (bez DNaza/RNaza) i pohranjena pri – 20 °C do daljnje uporabe. Uz svaku reakciju RT provedena je i kontrolna reakcija bez RNA uz isti volumen UltraPURE vode, da bi se provjerilo moguće onečišćenje genomskom DNA.

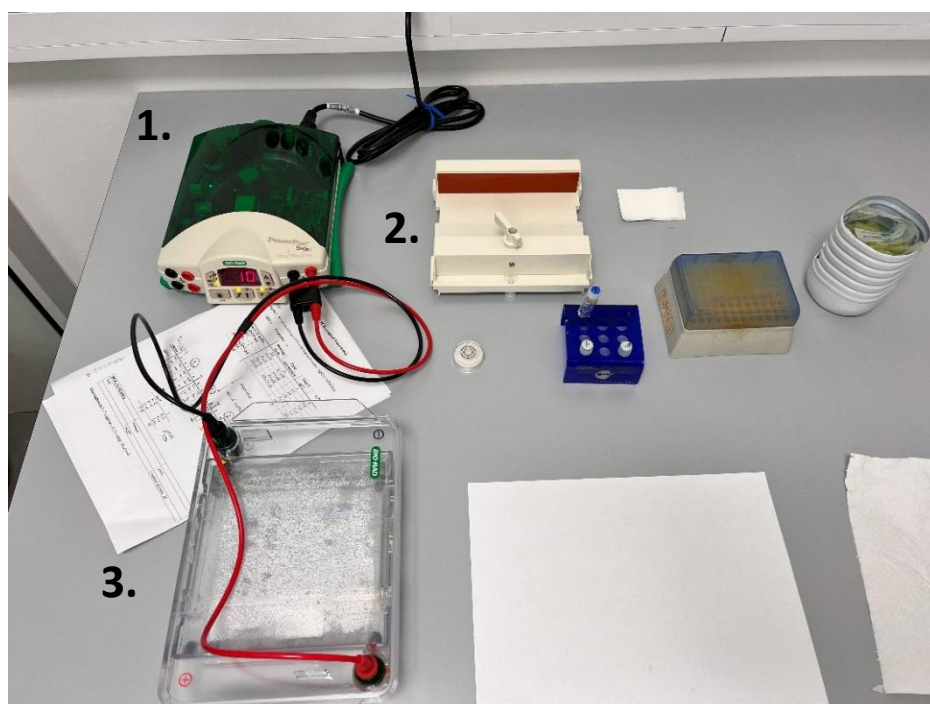
3.5.6. PCR i elektroforeza na agaroznom gelu

Optimalne uvjete, odnosno optimalan broj ciklusa lančane reakcije polimeraza (PCR) za amplifikaciju regija od interesa, kao i njihovu amplifikaciju pri tim uvjetima, odredila sam uz pomoć metode pod nazivom end-point PCR. Navedena metoda koristi se konvencionalnom PCR reakcijom provodeći ju do zasićenja. Optimalan broj ciklusa za end-point PCR odredila sam na uzorcima cDNA jednogodišnjih ženki štakora. Umnožila sam regije od interesa koje pripadaju sekvencama mRNA koje kodiraju za sve članove obitelji Msr, a to su proteini MsrA, MsrB1, MsrB2 i MsrB3. Pojedinačne regije od interesa amplificirala sam iz uzoraka cDNA tromjesečnih te jedno- i dvogodišnjih mužjaka i ženki za MsrB3 prema ustanovljenom optimalnom broju ciklusa.

Radne smjese *forward* (F) i *reverse* (R) početnica (*eng. primer working solution*) pripremila sam prema uputama proizvođača u koncentraciji od 10 µM. Za pripremu glavne PCR reakcijske smjese (*eng. PCR master mix*) ukupnog volumena 114 µl (za 6 uzoraka) otpipetirala sam 12 µl pufera za PCR, 4.8 µl smjese F početnice, 4.8 µl smjese R početnice, 2.4 µl smjese nukleotida (dNTP), 0.6 µl smjese DNA polimeraze (AmpliTaQ) i 89.4 µl H₂O. Iz glavne reakcijske smjese alikvotirala sam 19 µl kojem sam dodala 1 µl cDNA. Pripravila sam i negativni kontrolni uzorak koji je sadržavao glavnu PCR reakcijsku smjesu bez dodane cDNA. Umjesto cDNA dodala sam 1 µl H₂O. Sveukupno sam priredila 20 reakcijskih smjesa uz negativni kontrolni uzorak kako bih ispitala svaki par početnica (Slika 16.).

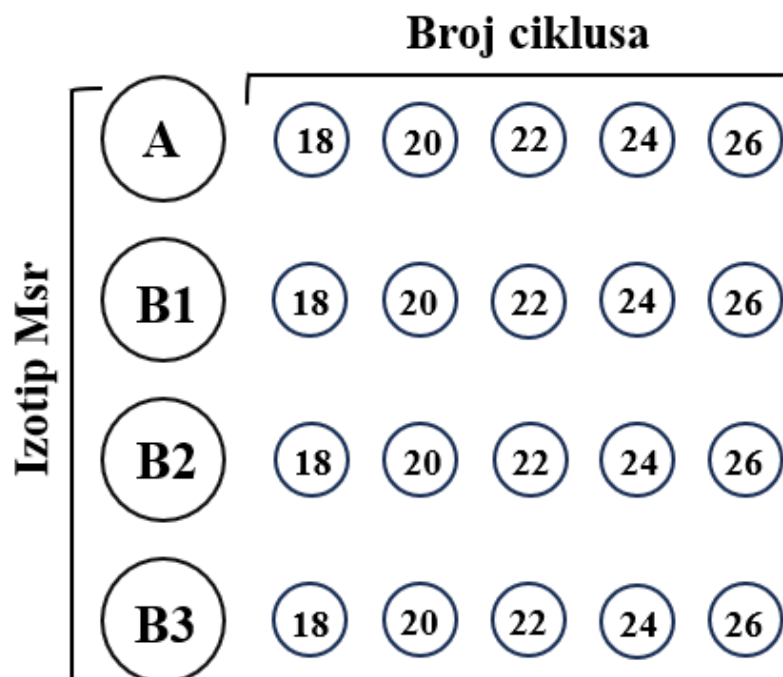
Kako bih utvrdila koliki je broj ciklusa PCR reakcije potreban za optimalnu amplifikaciju, reakciju sam prekidala na 18., 20., 22., 24. i 26. ciklusu. Optimalan broj ciklusa za amplifikaciju pojedinog fragmenta iznosio je 24 ciklusa za MsrA, 20 ciklusa za MsrB1, 24 ciklusa za MsrB2, 26 ciklusa za MsrB3.

Koristila sam i *housekeeping* enzim GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) s amplifikacijskim optimumom od 24 ciklusa u svrhu kontrole ekspresije. Nakon što su uvjeti, odnosno broj ciklusa, određeni, pripremila sam uzorke za amplifikaciju pojedinačnih grupa životinja. Termocikler sam za sve reakcije namjestila prema koracima PCR reakcije, redom, inicijalna denaturacija pri 94 °C (3 min), denaturacija pri 95 °C (30 s), vezanje početnica pri 57 °C (30 s), elongacija pri 72 °C (45 s). Negativni kontrolni uzorak za svaki enzim amplificiran je u 26 ciklusa kod određivanja optimalnog broja ciklusa te na istom broju ciklusa kao sekvenca od interesa u uzorcima dobnih i spolnih razlika. Rezultate amplificirane DNA ispitala sam metodom gel elektroforeze na agaroznom gelu. Pritom sam koristila aparaturu sa Slike 15. Koristila sam 1.5 % agarozni gel, za čiju sam pripremu izvagala 1.875 g agaroze na analitičkoj vagi i dodala ju u tikvicu sa 125 ml TAE pufera.



Slika 15. Aparatura za elektroforezu na agaroznom gelu. Brojem 1. označen je sustav za napajanje, brojem 2. držač kadice koji pruža ravnu podlogu za ravnomjernu polimerizaciju gela i brojem 3. posuda s puferom koja sadrži priključke anode (+) i katode (-).

Zagrijavala sam smjesu, odnosno otopinu agaroze, u mikrovalnoj pećnici jačine 800 W. U ohlađeni tekući gel dodala sam 4 μ l fluorescentne boje GelStar kako bih mogla vizualizirati amplificirane fragmente. Iz svakog pojedinačnog PCR uzorka otpipetirala sam točan volumen (10 μ l) koji sam pomiješala s 6x puferom za nanošenje (~ 2 μ l). Nakon nanošenja uzorka i standarda molekulskih masa (~ 3 μ l) na gel, pokrenula sam elektroforezu pod naponom od 110 V u trajanju od 30 min. Po završetku sam pruge vizualizirala uz pomoć sustava za vizualizaciju gelova.



Slika 16. Shematski prikaz postavljene reakcije za određivanje optimalnih uvjeta, odnosno broja ciklusa za pojedinog člana obitelji Msr (ciklus 18 nije prikazan u rezultatima)

3.5.7. SDS – elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i western blot analiza

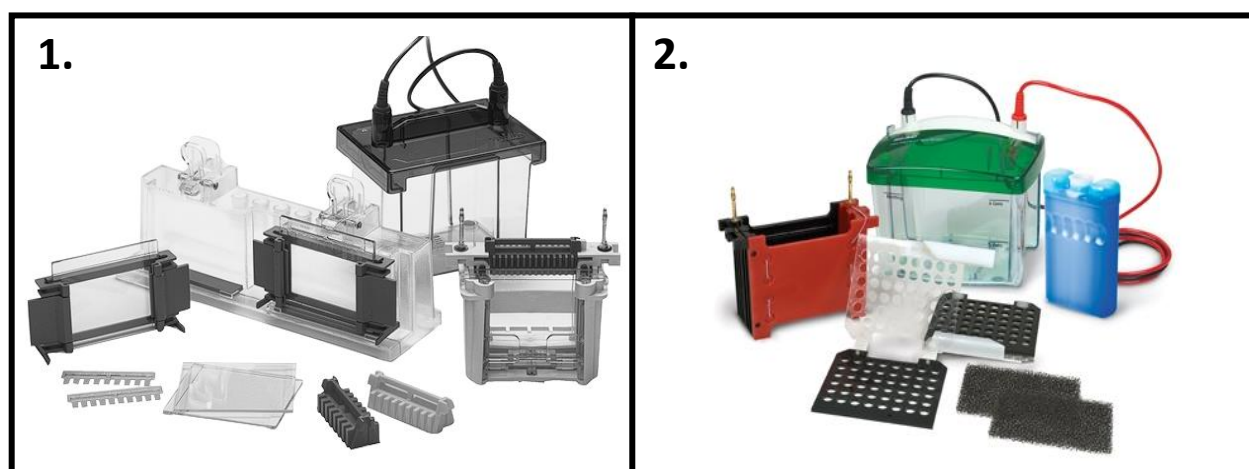
Uzorke koje sam koristila u SDS-PAGE i u western blot analizi su homogenati bubrega ženki i mužjaka štakora. SDS-PAGE predstavlja pogodnu metodu za razdvajanje proteina isključivo na osnovi molekulske mase. Podrazumijeva uporabu poliakrilamidnog gela u dvije faze: sabijajućom (*eng. stacking*) i razdjeljujućom (*eng. separating*). Glavni sastojci poliakrilamidnih gelova su akrilamid i bisakrilamid, amonijev persulfat (APS) te tetrametiletilendiamid (TEMED). Akrilamid je monomer koji izgrađuje gel, a bisakrilamid ga umrežuje tvoreći poliakrilamid, dok APS služi kao inicijator polimerizacije kada se u smjesu doda TEMED. Deterdžent SDS negativno oblaže te nabija površinu proteina što ih čini nabojem uniformnima u električnom polju. Zbog navedene činjenice, prijeđeni put na gelu obrnuto je proporcionalan logaritmu molekulske mase proteina. Western blot analizu i SDS-PAGE provela sam u prisustvu β -merkaptoetanolu (β ME) i bez pri različitim temperaturama (37 °C, 65 °C i 95 °C), odnosno u denaturirajućim (+ β ME) i nedenaturirajućim (- β ME) uvjetima. Western blot analiza metoda je koja, uz pomoć reakcije protutijelo-antigen, može s velikom sigurnošću utvrditi prisutnost određenog proteina u uzorku. Provedbom SDS-PAGE elektroforeze proteini se razdvajaju na osnovu molekulske mase, a s gela se tada prenesu na PVDF membranu koja se izlaže specifičnom primarnom protutijelu. Enzimski obilježeno sekundarno protutijelo vezanjem na primarno daje obojenje.

Koncentraciju proteina u smjesi homogenata podesila sam na 3 mg/ml. Uzorke za SDS-PAGE pripremila sam miješanjem s Laemmli puferom za denaturaciju proteina. Konačna koncentracija proteina u smjesi iznosila je 2 mg/ml. Pored proteina, smjesa je sadržavala i 12% volumnog udjela glicerola, 1% volumnog udjela SDS-a, 30 mM pufera Tris/HCl (pH 6.8) i 5% volumnog udjela β ME, ako se radilo o denaturirajućim uvjetima. Uzorke sa ili bez β ME zagrijavala sam na termobloku u trajanju od 30 min za 37 °C, 15 min za 65 °C i 5 min za 95 °C.

Gelovi koje sam pripremila za SDS-PAGE elektroforezu su gel za sabijanje kiselog pH (pH ~ 6.8, 4%) i gel za razdvajanje lužnatog pH (pH ~ 9, 10%). U svrhu pripreme koristila sam komercijalno dostupan TGX Stain-Free FastCast komplet prema uputama proizvođača.

Bojanje se bazira na pojačavanju signala određenih aromatskih aminokiselinskih ostataka trihalogenim komponentama (eng. *trihalo/trichloroethanol like compounds*) pomoću kojih je moguće na gelu i membrani vizualizirati ukupne proteine u sustavu za vizualizaciju gelova pod UV osvjetljenjem (Kazmin *i sur.*, 2002). Na površinu gelova za vrijeme polimerizacije dodala sam tanak sloj alkohola propanola kako bih spriječila prodor zraka što bi, inače, vodilo isušivanju.

Za SDS-PAGE elektroforzu koristila sam aparaturu Mini Protean III Cell (Slika 17.1.) koja je održavala stalne uvjete napona od 100 V tijekom 85 min. Na gel sam dodala i standard molekulskih masa koji boja pruge u rasponu od 10 do 200 kDa. Po završetku elektroforeze proteine s poliakrilamidnog gela prenijela sam na hidrofobnu PVDF membranu uz pomoć aparature MiniTrans-Blot Cell (Slika 17.2.) uz konstantni napon od 100 V tijekom 2 sata transferom u puferu (*eng. wet transfer*).



Slika 17. Prikaz aparature Mini Protean III Cell za SDS-PAGE elektroforezu (1.) i MiniTrans-Blot Cell aparature za prijenos gela na membranu elektroforezom (2.) (preuzeto iz priručnika o korištenju Mini Protean III Cell aparature tvrtke BioRad (Hercules, CA, SAD) (1.) i s <https://www.bio-rad.com/> (2.))

Kako bi se membrana mogla procesirati u western blot analizi, potrebno je ukloniti standard molekulskih masa te membranu uroniti u tzv. pufer za blokiranje (blotto-pufer) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje. Blokiranje membrane sam namakala u otopini blotto-pufera s primarnim protutijelom preko noći (4 °C). Nakon primarnog protutijela membrane sam temeljito isprala čistim blotto-puferom. Isprane membrane namakala sam u otopini sa sekundarnim protutijelom (1 sat, sobna temperatura).

Membrane sam zatim isprala prvo u blotto-puferu 2 puta po 15 min pa u PBS 2 puta po 10 min, nakon čega sam ih izložila djelovanju konjugiranog enzima alkalne fosfataze sa supstratom 5-bromo-4-kloro-3-indolila/nitromodri tetrazolium klorid (BCIP/NBT). Reakcija se odvijala u alkalnom puferu (20 mM Tris, pH 9) u kojem se Pi odvojio od BCIP, a oksidacijom je nastao indigo koji je reducirao NBT u diformazan. Na mjestima gdje je došlo do vezanja primarnog protutijela za antigen te sekundarnog za primarno protutijelo nastao je precipitirajući smeđe-ljubičasti talog čije je obojenje proporcionalno prisutnosti antigena. Smeđe-ljubičasto obojenje omogućilo je provedbu denzitometrijskih mjerenja.

3.5.8. Računalna i statistička obrada podataka

Sve dobivene podatke i slike obradila sam na računaru Compaq E.V.O. (Pentium 4PC) unutar programa Adobe Photoshop v 24.7.2 (*online* licenca Adobe Creative Cloud). Za denzitometrijska mjerenja koristila sam program tvrtke BioRad. Denzitometriju sam obavila na način da sam membranu prikazala u *grayscale* načinu rada te sam unutar svake pruge na membrani mjerila gustoću obojenja naspram najjačoj u kontrolnoj skupini (prvoj u nizu). Rezultate western blot analize i imunohistokemije prikazala sam fotografijama. Podatke dobivene denzitometrijom statistički sam obradila i prikazala u obliku srednje vrijednosti uz standardnu pogrešku srednje vrijednosti. Upotrijebila sam Studentov t-test između dvije grupe podataka i metodu jednostrane analize varijance (*eng. one-way analysis of variance*, ANOVA), kada je grupa više, kako bih utvrdila vjerodostojnu razliku, na razini značajnosti od 5%, između grupa podataka. Za statističku obradu podataka koristila sam Microsoft Excel (MS Office) program za provedbu Studentovog t-testa i *online* izdanje programa Statistica 11 (StatSoft, Tulsa, OK) za provedbu metode ANOVA.

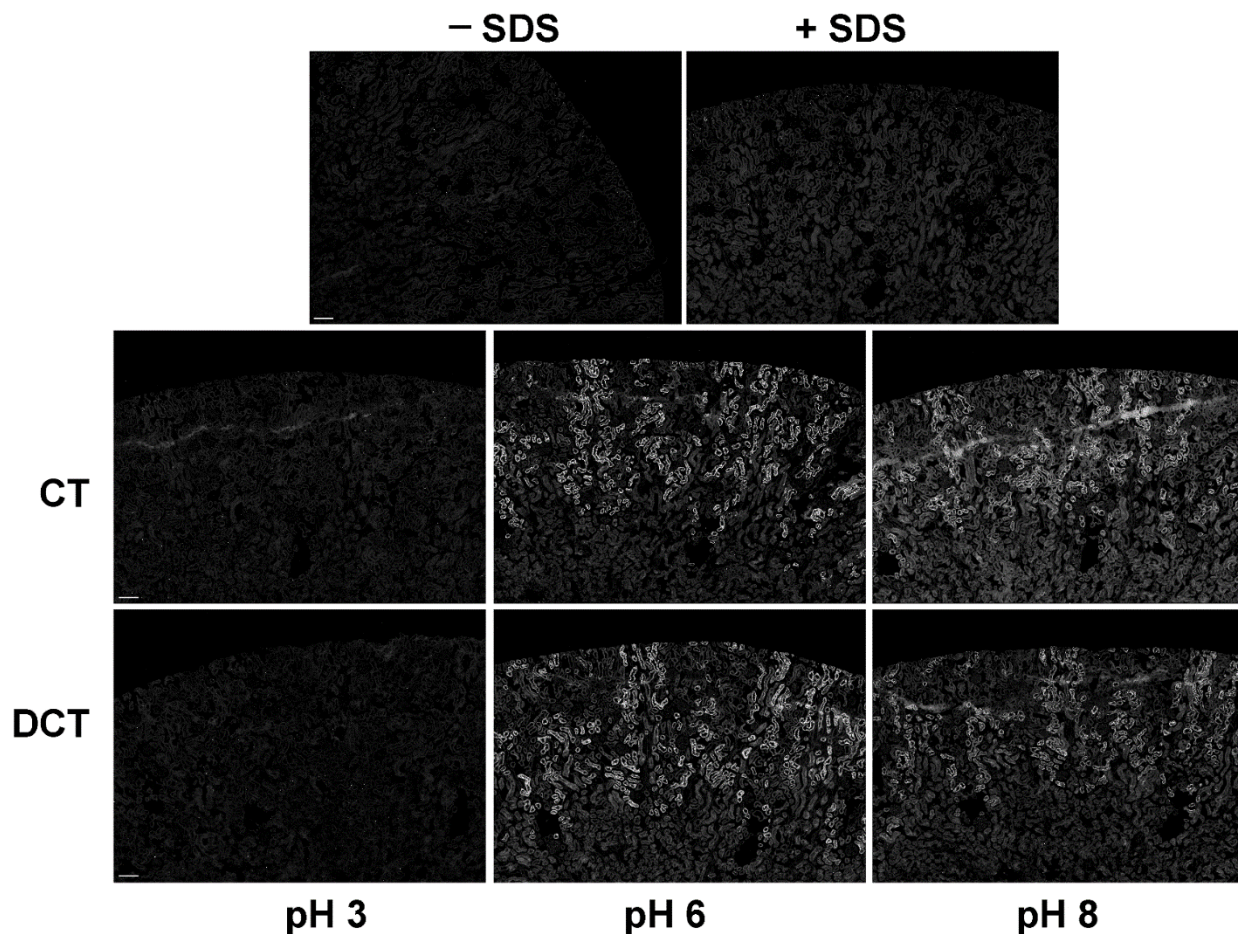
4. Rezultati

U nastavku slijedi pregled dobivenih rezultata koji, trenutno, ne pružaju uvjerljive dokaze o postojanju dobnih i spolnih razlika u vidu povezanosti razina ekspresije MsrB3 i metalotioneina u bubregu štakora. Rezultati su skoro suprotni očekivanjima pošto MsrB3 ne prati ekspresiju metalotioneina, no možda je i to i uvjerljiv pokazatelj jednog od uzroka starenja. Podaci dobiveni western blot analizom ne pokazuju spolne razlike, a starenjem ekspresija u ženki pada što je suprotno metalotioneinu kod kojeg su i spolne i dobne razlike u korist ženki (neobjavljeni rezultati mentora). Rezultati o distribuciji proteina dobiveni imunofluorescencijom nisu u skladu s očekivanjima. Osim što jačina obojenja ide u korist mužjaka, i raspodjela se razlikuje u mužjaka i ženki. Dakle, suprotno očekivanom, mužjaci su obojani jačim intenzitetom unutar vezikularnih staničnih struktura u S2 odsječcima proksimalnih kanalića gdje je kod ženki, iako prisutno, obojenje slabo te je u većoj mjeri nađeno u disperznoj citosolnoj distribuciji u S3 odsječcima proksimalnih kanalića. Konačno, RT-PCR metodom dobivene su spolne razlike među mladim životinjama u korist ženki, no starenje porast pokazuje samo u mužjacima što nije u skladu s očekivanjima, premda je oboje donekle dosljedno western blot analizi.

4.1. Utvrđivanje prisutnosti i raspodjele enzima MsrB3 u bubrežnim kanalićima štakora te dobnospolnih razlika metodom imunofluorescencije

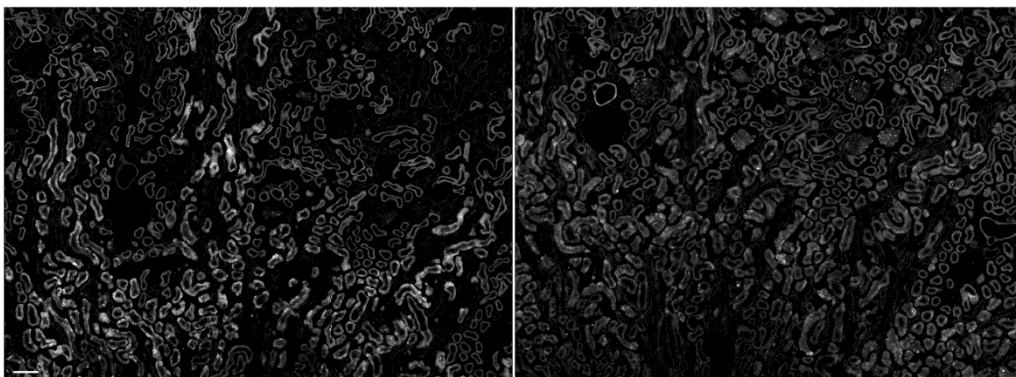
Metodom imunofluorescencije ispitana je razina ekspresije enzima MsrB3 u vidu lokalizacije, odnosno distribucije pozitivnog signala dobivenog obilježavanjem primarnim monoklonskim zečjim protutijelom anti-MsrB3 u kori bubrega štakora u ovisnosti o dobi i spolu. Bojanje je vršeno na arhivskim kriosekcijama bubrega štakora. Kako bi se protutijelo učinkovito vezalo za epitop, odnosno vezno mjesto na ciljnom proteinu, proveden je korak raskrivanja antigena (*eng. antigen retrieval*) unutar kojeg je određena optimalna skupina uvjeta koja pruža željenu jačinu pozitivnog obojenja (Slika 18. i Slika 19.). Ispitana je razina ekspresije MsrB3 (Slika 20.), kao i njegova kolokalizacija s metalotioneinom (Slika 21.) koristeći primarno mišje monoklonsko protutijelo anti-MT.

U nastavku slijede prikazi rezultata imunofluorescencije učinjene na kriosekcijama bubrega štakora koji pokazuju optimalne uvjete za mužjake i ženke (Slika 18. i Slika 19.), rezultati dobno-spolnih razlika (Slika 20.), rezultati kolokalizacije MsrB3 s metalotioneinom u mužjaka i ženki (Slika 21.), kolokalizacije s membranskim proteinom ciljanog mišjim monoklonskim protutijelom protiv NaK-ATPaze u mužjaka (Slika 22.), kao i usporedbu sukcesivnih sekcija negativnog obojenja i rezultati prisutnosti hemoksigenaze-1 (HO-1) s MsrB3 u mužjaka (Slika 23.). Navedenim rezultatima pokušala su se objasniti odstupanja od očekivane pretpostavke, no ona su značajna i iziskuju daljnja istraživanja izvan okvira ovog diplomskog rada.



Slika 18. Prikaz rezultata inicijalnog pokusa imunofluorescencije provedenog u svrhu određivanja optimalnih uvjeta na kriosekcijama bubrega tromjesečnog mužjaka štakora. Analizirana područja zahvaćaju koru bubrega te vanjsku prugu srži. Pozitivan signal koji predstavlja lokaliziranu ekspresiju MsrB3 karakteriziran je unutarstaničnim vezikulama moguće lizosomalnog porijekla u epitelnim stanicama S2 odsječka proksimalnih, uz homogeno obojenje unutar distalnih kanalića kortikalnih i jukstamedularnih nefrona. Optimalnu jačinu obojenja pruža skupina uvjeta CT6, odnosno kuhanje u citratnom puferu (CT) pH 6 i obrada Triton-X-100 deterdžentom bez lažne deparafinacije (DCT). Zadovoljavajuću jačinu obojenja pružali su i uvjeti DCT pri pH 6 (DCT6), CT pri pH 8 (CT8) i DCT pri pH 8 (DCT8). U ovom crno-bijelom prikazu nije vidljiv pad u intenzitetu DAPI obojenja s padom pH što čini jezgre nevidljivima pri pH 3 (nije prikazano). Oznaka +SDS predstavlja tretman s 1% SDS, a oznaka -SDS tretman bez upotrebe SDS, odnosno s 1x PBS. Mjera = 100 μ m, povećanje = 20x

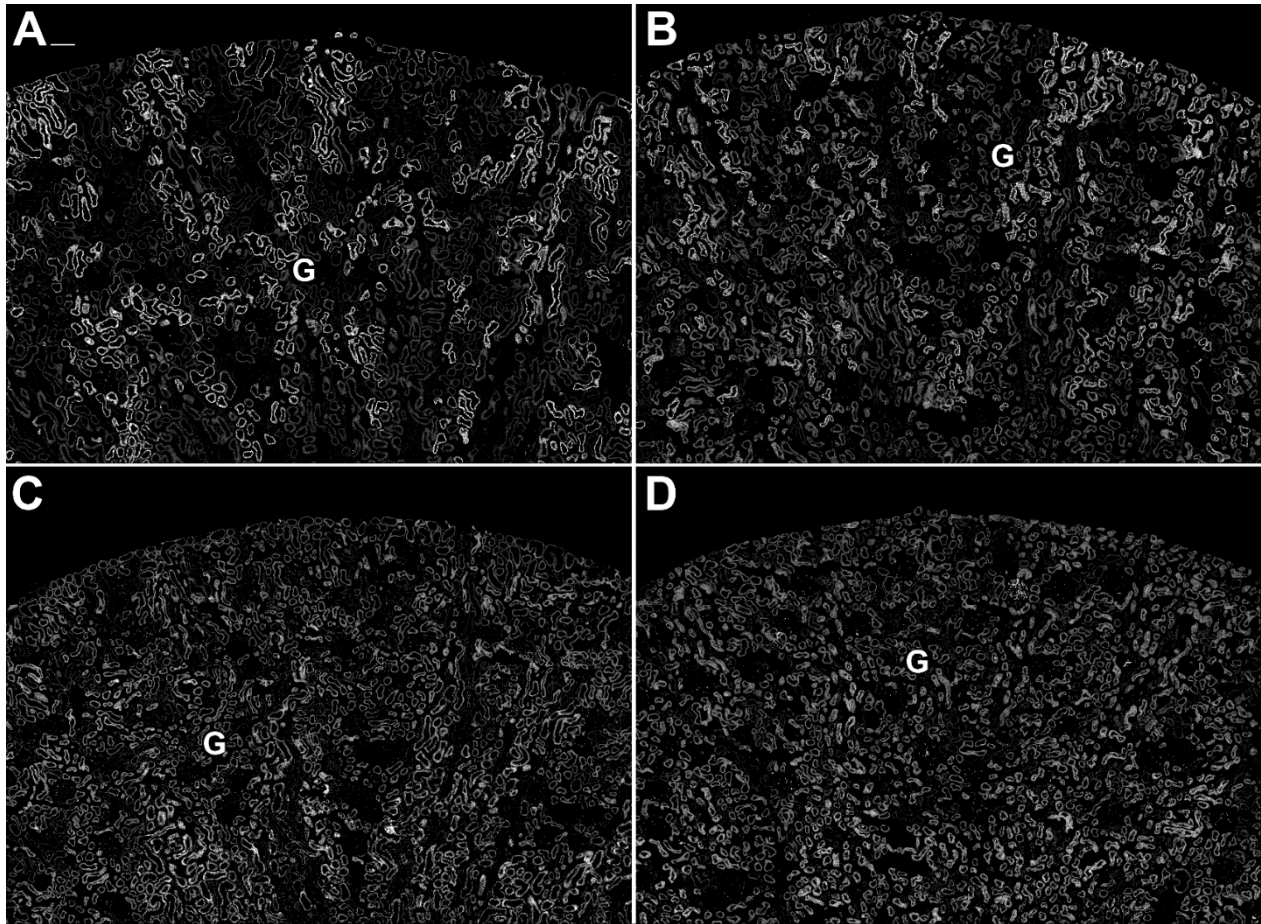
CT 6/8



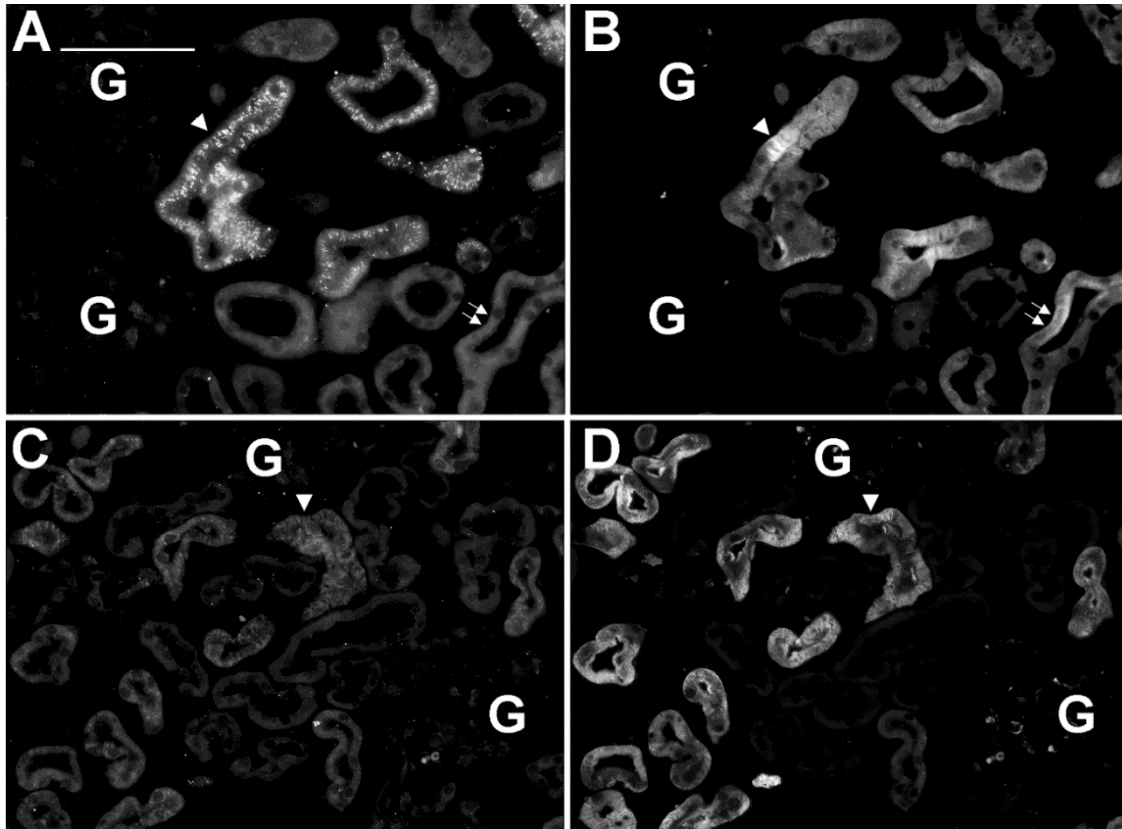
DCT 6/8



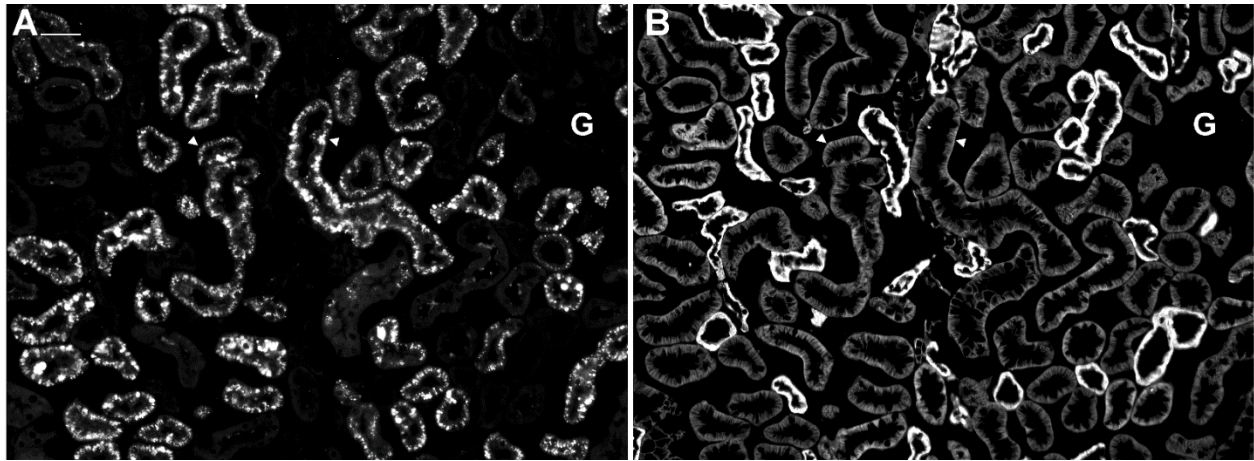
Slika 19. Usporedni prikaz rezultata imunofluorescencije provedene na kriosekcijama bubrega tromjesečnih ženki štakora pri skupinama uvjeta CT6 i DCT6 (lijevo) te CT8 i DCT8 (desno) gdje 6 i 8 predstavljaju pH citratnog pufera (CT), sa ili bez lažne deparafinacije (DCT). Uvjet CT6 izabran je u daljnjim pokusima jer pruža uvjerljive i reproducibilne rezultate, premda različite prema lokalizaciji, i kod mužjaka i kod ženki s obzirom na korišteno protutijelo. Mjera = 100 μm , povećanje = 20x



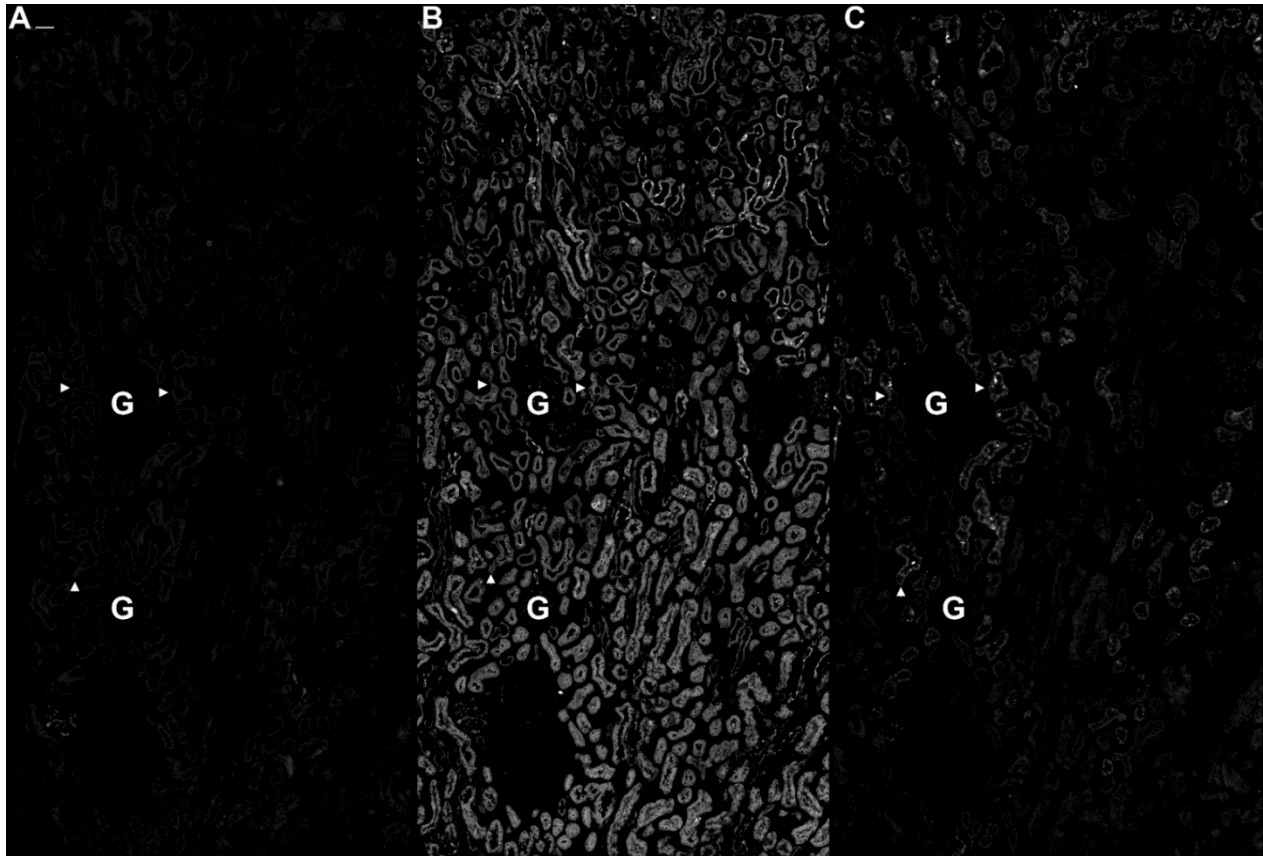
Slika 20. Prikaz rezultata imunofluorescencije provedene na kriosekcijama bubrega tromjesečnih (A) i jednogodišnjih (B) mužjaka te tromjesečnih (C) i jednogodišnjih (D) ženki. Oznaka G predstavlja glomerul. Kod mužjaka je pozitivan signal vidljiv u dugačkim stošcima koji se protežu od vanjske kore prema vanjskoj prugi srži u kojoj im se nalazi vrh, a znato su obojeni naizgled samo S2 odsječci proksimalnih kanalića. Kod ženki pozitivan signal pokazuje manje izraženu vezikularnu lokalizaciju u vanjskoj prugi srži koju čine S3, ravni, odsječci proksimalnih kanalića u tračcima poznatim kao medularne zrake (*eng. medullary rays*), šire se stožasto, ali s vrhom okrenutim prema vanjskoj kori (obrnuta distribucija). Odnosi su isti i u dvogodišnjih mužjaka i ženki (nije prikazano). Mjera = 100 μ m, povećanje = 20x



Slika 21. Usporedni prikaz rezultata imunofluorescencije s dvostrukim obojenjem na istom naresku dvogodišnjeg mužjaka (A i B) i ženke (C i D) štakora za MsrB3 (A i C) i metalotionein (B i D). Imunofluorescencija omogućuje obojenje primarnim protutijelima iz različitih donora, za koje posjedujemo pojedinačno specifično, međusobno nereaktivno sekundarno protutijelo obilježeno crvenom (za MsrB3) ili zelenom (za metalotionein) bojom što je na navedenom prikazu prevedeno u usporedne crno-bijele slike (obojeni metalotionein se na prikazima po distribuciji značajno razlikuje od obojenog MsrB3). Oznaka G predstavlja glomerul. Obojenje MsrB3 kod mužjaka je uobičajeno, prisutno u obliku intenzivno obojenih vezikularnih tvorbi u obilježenim pojedinačnim kanalićima S2 odsječka (glava strelice, A), dok je kod ženke obojenje znatno niže po intenzitetu (glava strelice, C). Unutar oba označena kanalića i kod mužjaka i kod ženke metalotionein je pozitivno obojan bez neposrednog preklapanja obojenja s MsrB3 (glava strelice, B i D). Dvostrukim strelicama u mužjaka (A i B) označen je S2 odsječak proksimalnog kanalića homogeno unutarstanično pozitivan na MsrB3 i metalotionein, također bez neposrednog preklapanja obojenja. Metalotionein je, za razliku od MsrB3, podjednako intenzivno obojan, možda čak i jače, kod dvogodišnjih ženki (B i D). Mjera = 50 μ m, povećanje = 40x



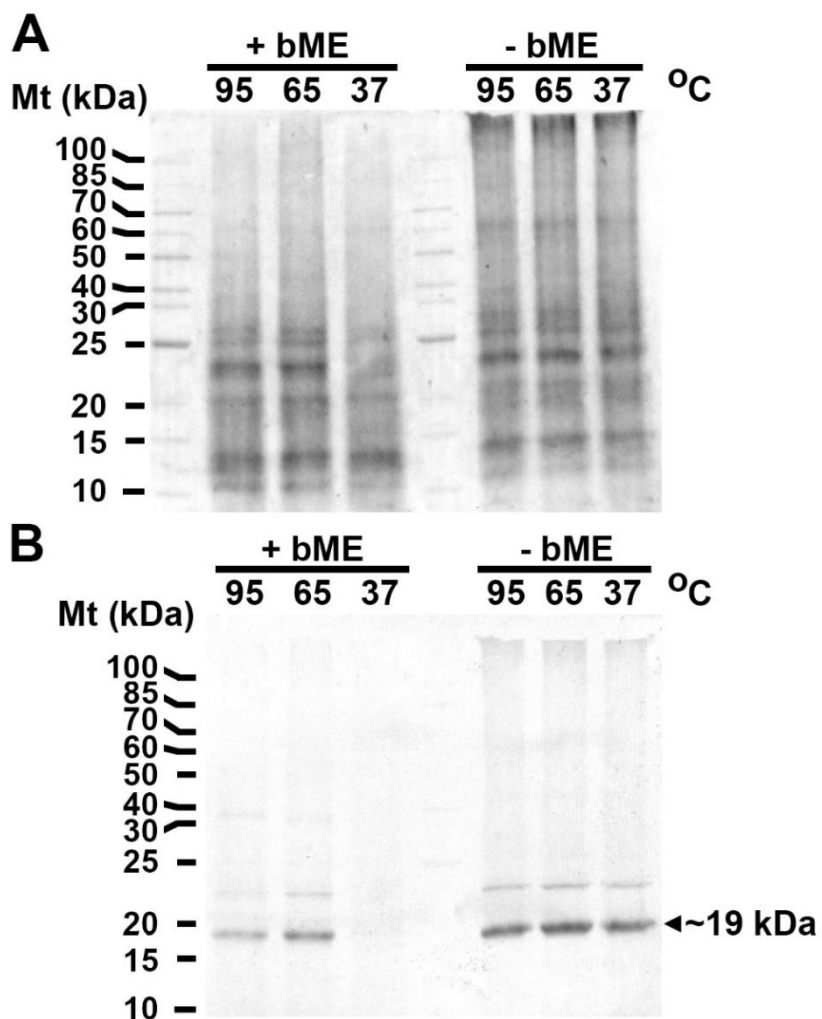
Slika 22. Usporedni prikaz rezultata imunofluorescencije s dvostrukim obojenjem na istom naretku tromjesečnog mužjaka štakora za MsrB3 (A) i NaK-ATPazu (B). Ponovno su korištena primarna protutijela iz različitih donora, od kojih za svako posjedujemo specifično, međusobno nereaktivno sekundarno protutijelo obilježeno crvenom (za MsrB3) ili zelenom (za NaK-ATPazu) bojom što je na navedenom prikazu prevedeno u usporedne crno-bijele slike. Oznaka G predstavlja glomerul. Obojenje MsrB3 kod mužjaka je uobičajeno, prisutno u obliku intenzivno obojanih vezikularnih tvorbi u obilježenim pojedinačnim kanalićima S2 odsječka (glava strelice, A), dok je obojenje NaK-ATPaze u bazolateralnim membranama S2 odsječka proksimalnih kanalića također intenzivno (glava strelice, B). Problem tehničke prirode je izbor pogodnog fluorofora za imunofluorescenciju i rad na mikroskopu. Iako FITC predstavlja jednog od najčešće korištenih fluorofora u znanstvenim istraživanjima, ima i svoje nedostatke, prvenstveno u osjetljivosti na pH. Uvjeti pri pH 6 nisu optimalni u tom slučaju (učinkovitost FITC najbolja u alkalnim uvjetima). Zbog relativne prigušenosti i samogašenja (*eng. self-quenching*), najbolje ga je koristiti u pokusima s jako eksprimiranim proteinima što djelomično objašnjava razliku između obojenja unutarstaničnog MsrB3 (nije očuvano u ženjkama, nije prikazano), metalotioneina (Slika 21., B i D) i membranske NaK-ATPaze (B) s MsrB3, koje s fluoroforom FITC nije dobiveno u ženjkama niti u mužjacima, vjerojatno zbog tehničkih razloga pripreme narezaka (CT6) i/ili kod mužjaka zbog niskog pH u lizosomima (nije prikazano). Mjera = 50 μm , povećanje = 20x.



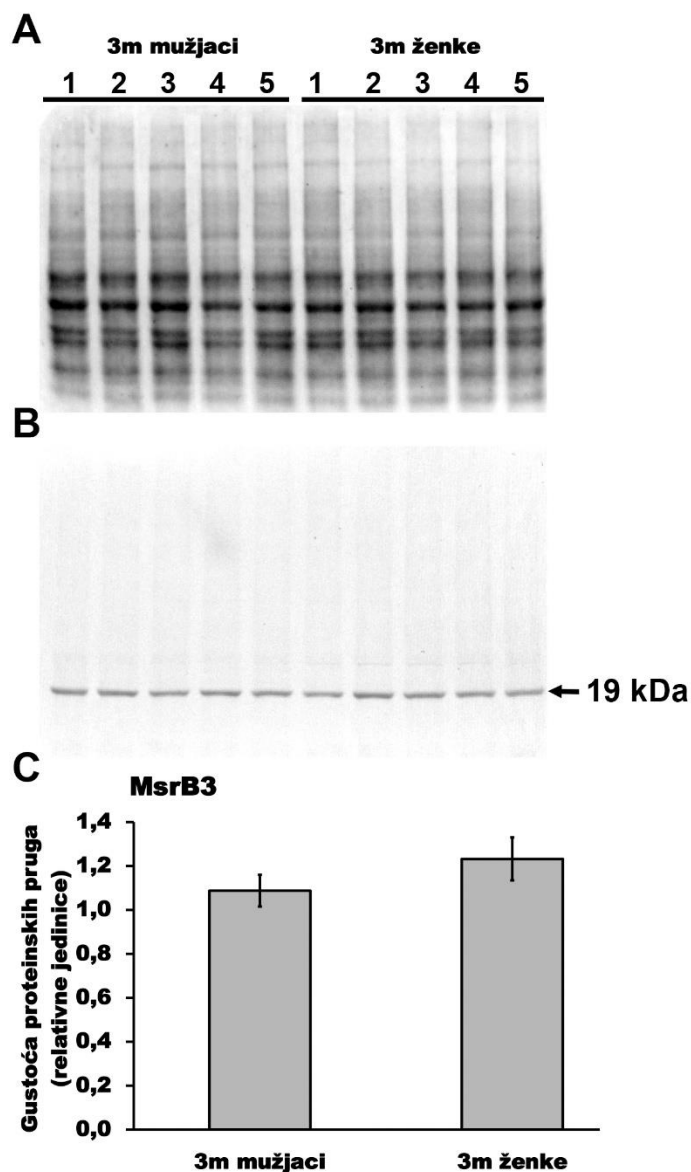
Slika 23. Usporedni prikaz rezultata imunofluorescencije na narescima tromjesečnog mušjaka štakora negativnog obojenja (A), obojenja HO-1 (B) i MsrB3 (C). Oznaka G predstavlja isti glomerul kao i glave strelica oko njega koje pokazuju iste kanaliće na sva tri nareska). Bojanje je provedeno na sukcesivnim tkivnim narescima bez primarnog protutijela što daje očekivan negativan nalaz (A) s prisutnim konturama kanalića nefrona (glave strelica, A). Bojanje je provedeno i s primarnim protutijelom protiv hemoksigenaze-1 (HO-1) (B) čija ekspresija odgovara razini oksidativnog stresa u bubregu mušjaka štakora. Ekspresija HO-1 je homogena u citosolu epitelnih stanica kanalića nefrona bez posebnog pojačanja u intenzitetu unutar pojedinačnih kanalića (glave strelica, B). Obojenje koje predstavlja razinu ekspresije MsrB3 (C) uobičajeno je intenzivno i vezikularno u obilježenim pojedinačnim kanalićima S2 odsječka (glave strelica, C). Rezultati ukazuju na činjenicu da sam oksidativni stres nije neposredno odgovoran za jače vezikularno obojenje MsrB3 u pojedinim S2 odsječcima proksimalnih kanalića u mušjaka. Mjera = 50 μm , povećanje = 20x

4.2. Identifikacija enzima MsrB3 u homogenatima bubrega štakora i utvrđivanje dobno-spolnih razlika u razini ekspresije MsrB3 western blot analizom

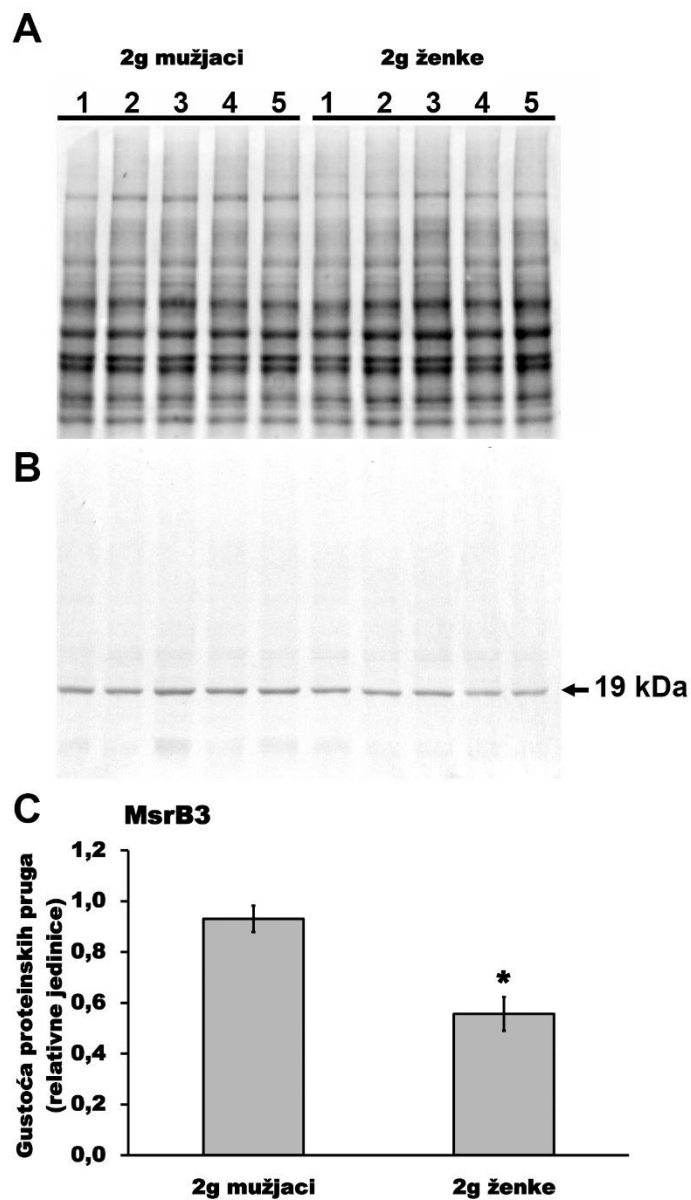
Rabeći metodu SDS-PAGE, proteini prisutni u homogenatu razdvojeni su na temelju molekulske mase. Proteini su denaturirani i obloženi negativnim nabojem deterdženta SDS što im omogućuje da oni manje molekulske mase brže prolaze kroz gel za razliku od onih veće molekulske mase. Razdvajanjem pojedinih proteina iz homogenata pri različitim uvjetima, dobiveni su optimalni uvjeti za pripremu uzoraka bubrega tromjesečnih i dvogodišnjih mužjaka i ženki štakora (Slika 24.). Inkubacijom u primarnom protutijelu anti-MsrB3 dobivena je proteinska pruga koja odgovara molekulskoj masi od 19 kDa u svim uvjetima, osim pri uvjetu u kojem dolazi do denaturacije disulfidnih veza β -merkaptanolom (β ME) bez povišene temperature (37 °C, 30 minuta), što ukazuje na mogućnost da protein nativno polimerizira i da je ovisan o disulfidnim vezama (Slika 24.). U spolnim i dobnim razlikama (Slika 25. i Slika 26.) ukupna količina proteina na membrani korištena je za normiranje obojenja dobivenog primarnim protutijelom anti-MsrB3 u uzorcima homogenata bubrega u svrhu određivanja relativne količine enzima MsrB3 u uzorku. Podatke dobivene western blot analizom za tromjesečne i dvogodišnje jedinke (Slika 25. i Slika 26.) statistički sam obradila koristeći Studentov t-test na sirovim podacima dobivenim denzitometrijskim mjerenjima proteinskih pruga na razini značajnosti od 5% ($\alpha = 0.05$) i s 4 stupnja slobode, pri čemu je dobivena vjerojatnost kod dvogodišnjih jedinki bila statistički značajna ($p = 0.001586$), a kod tromjesečnih jedinki nema statističke značajnosti ($p = 0.086195$).



Slika 24. Prikaz rezultata elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) (A) i western blot analize (B). Standard molekularnih masa na 10% gelu daje proteinske pruge u rasponu od 10 do 100 kDa. Primarno protutijelo obilježilo je proteinsku prugu molekularne mase ~ 19 kDa. Proteinske pruge su veće gustoće, odnosno sadrže veću koncentraciju proteina MsrB3 pri temperaturi od 65 °C i u nenedenurirajućim uvjetima. Oznaka Mt predstavlja molekularnu masu u kDa, a bME predstavlja β-merkaptotanol.



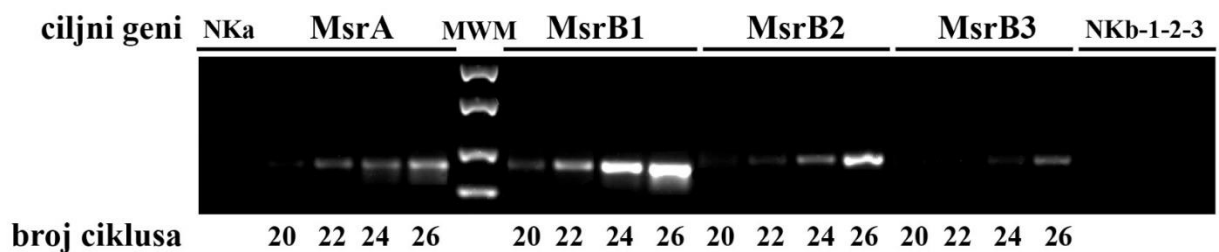
Slika 25. Prikaz rezultata SDS-PAGE (A), western blot analize (B) i denzitometrijskih mjerenja (C) vršenih na uzorcima homogenata bubrega tromjesečnih (3m) mužjaka i ženki štakora. Primarno protutijelo obilježilo je proteinsku prugu molekulske mase ~ 19 kDa. Za obradu navedenih podataka korišten je Studentov t-test na razini značajnosti od 5% uz prikazanu standardnu pogrešku za četiri uzorka. Razlika u relativnoj gustoći proteinskih pruga iznosi ~ 11% u korist ženki i nema statističku značajnost ($p = 0.086195$, $p > 0.05$).



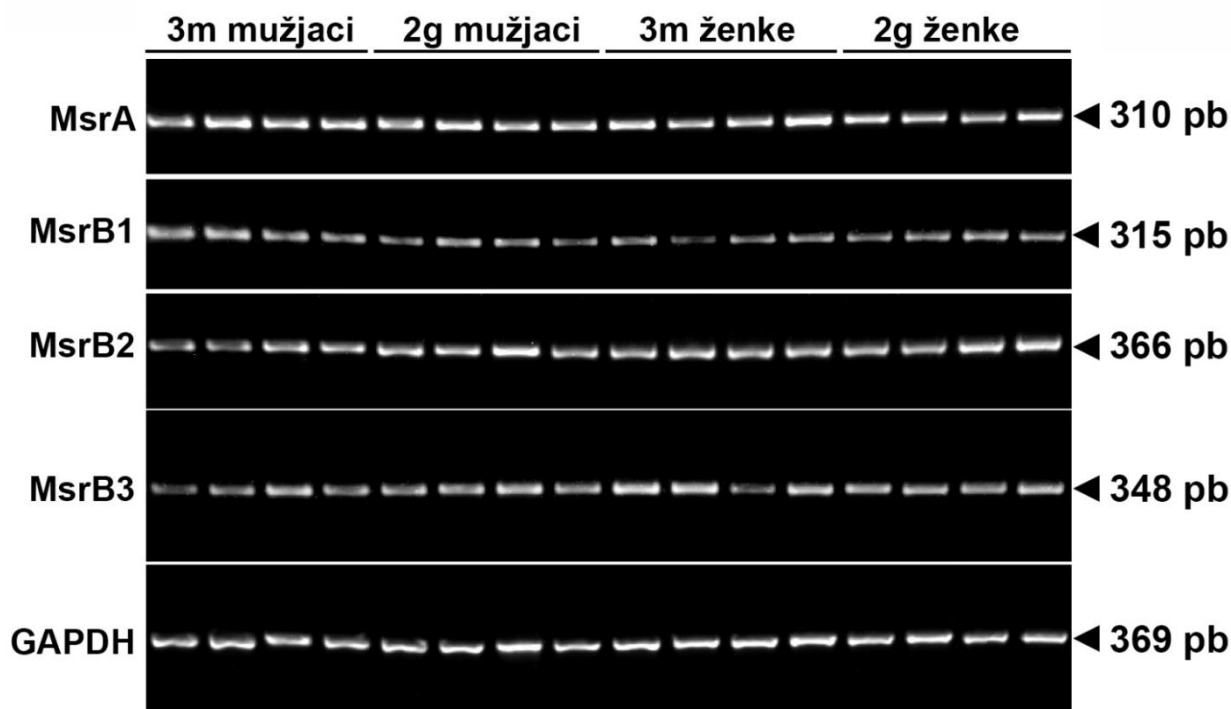
Slika 26. Prikaz rezultata SDS-PAGE (A), western blot analize (B) i denzitometrijskih mjerenja (C) vršenih na uzorcima homogenata bubrega dvogodišnjih (2g) mužjaka i ženki štakora. Primarno protutijelo obilježilo je proteinsku prugu molekulske mase ~ 19 kDa. Za obradu navedenih podataka korišten je Studentov t-test na razini značajnosti od 5% uz prikazanu standardnu pogrešku za četiri uzorka. Razlika u relativnoj gustoći proteinskih pruga iznosi ~ 40% u korist mužjaka te je statistički značajna (* $p = 0.001586$, $p < 0.05$).

4.3. Utvrđivanje razine ekspresije enzima MsrB3 na razini nukleinskih kiselina RT-PCR metodom

Pošto enzimi obitelji MsrA i B dijele podjednaku ulogu, a određene forme lokalizirane su u istim staničnim odjeljcima, ispitana je razina ekspresije enzima MsrB3 naspram članova obitelji MsrA, MsrB1 i MsrB2 u uzorcima cDNA tromjesečnih i dvogodišnjih mužjaka i ženki štakora (Slika 28.). Za kontrolu ekspresije korišten je *housekeeping* enzim GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) za kojeg se smatra da je konstitutivno eksprimiran u svim stanicama. Elektroforezom na agaroznom gelu amplificirani fragmenti kroz gel prolaze brzinom ovisnom o veličini fragmenta zbog negativnog naboja samih amplikona, odnosno manji fragmenti (manji broj parova baza) prolaze brže od većih fragmenata (veći broj parova baza) čime se ispituje kvaliteta i kvantitet amplificiranog produkta. Najprije sam ustanovila broj ciklusa pri kojem je svaki član obitelji MsrA i B optimalno eksprimiran, čime je dobivena informacija o najmanjoj zastupljenosti MsrB3 u bubregu u usporedbi s ostalim formama (Slika 27.). Daljnji rezultati ukazuju na povišenu ekspresiju enzima MsrB3 kod tromjesečnih ženki, dok je kod ostalih jedinki razina ekspresije uniformna (Slika 28.). Sirove podatke dobivene denzitometrijskim mjerenjima prugi u kojima su sadržani amplificirani produkti PCR reakcije (Slika 28.) statistički sam obradila metodom jednostrane ANOVA na razini značajnosti od 5% kako bih usporedila iznose srednjih vrijednosti za svaku grupu uzoraka. Za sve članove obitelji Msr nije bilo statističke značajnosti (rezultat nije prikazan), a za MsrB3, zbog velikog rasapa unutar grupe, odnosno zbog manjka uniformnosti unutar grupe, metoda kojoj je osnova nestatistička značajnost pri analizi varijance, jednostrana ANOVA, nije se mogla provesti u potpunosti. Navedeno je onemogućilo popratno provođenje testa višestrukog uspoređivanja (Duncanov test). Iako, kad se bez obzira na gore navedeno provjeri razlika među grupama Duncanovim testom, on ne pruža statistički značajnu razliku (navedeni rezultat nije relevantan, time nije ni prikazan). Kako bi se utvrdile stvarne dobno-spolne razlike u ekspresiji MsrB3, bilo bi potrebno uključiti više od četiri uzorka po grupi što je trenutno neostvarivo i van je okvira ove diplomske radnje.



Slika 27. Prikaz rezultata elektroforeze na agaroznom gelu pri određivanju optimalnog broja ciklusa. U prugama su sadržani amplificirani produkti PCR reakcije istog uzorka na različitom broju ciklusa koji odgovaraju mRNA sekvencama koje kodiraju za enzime MsrA, B1, B2 i B3. Rezultati ukazuju na najvišu ekspresiju izoforme MsrB1, koju slijede MsrB2, MsrA pa MsrB3 prema zastupljenosti u bubregu. Pruge označene s NKa i NKb-1-2-3 predstavljaju negativne kontrole za navedene enzime. Pruge pod oznakom MWM predstavljaju standard parova baza koji ocrtavaju pruge od 300, 350, 400 i 420 pb.



Slika 28. Prikaz rezultata elektroforeze na agaroznom gelu. U prugama su sadržani amplificirani produkti PCR reakcije koji odgovaraju mRNA sekvencama umnoženim pri optimalnom broju ciklusa, koje kodiraju za enzime MsrA, B1, B2 i B3 te za enzim GAPDH. Parovi baza (pb, desno) predstavljaju veličinu amplificiranih fragmenta. Ekspresija izoformi MsrA, B1 i B2 je uniformna i kod mužjaka i kod ženki te se ne mijenja s dobi. Za razliku od ostalih članova obitelji Msr, razina ekspresije MsrB3 nije uniformna, viša je kod tromjesečnih (3m) ženki, kod dvogodišnjih (2g) mužjaka se povećava, a kod dvogodišnjih ženki smanjuje (nije statistički značajno nakon jednostrane ANOVA analize za sve članove obitelji Msr koji su uniformno ekspimirani, kao i za MsrB3 koji ima veliki rasap unutar grupe, nije prikazano) što je donekle u skladu s western blot analizom.

5. Rasprava

Metabolički put metionina od velikog je značaja za mnoštvo staničnih procesa, zbog čega je naizgled usko povezan s procesom starenja. Metionin je aminokiselina koja u svojoj strukturi sadrži sumpor i koja se može pronaći u strukturi gotovo svih proteina. Vrlo je važna aminokiselina u strukturi α -2-makroglobulina, odnosno inhibitora proteaza koji često djeluje lokalno na mjestu upale i na čijem su primjeru Lim *i sur.*, 2019. pokušali iznijeti dokaze o antioksidacijskim svojstvima metionina unutar strukture proteina. Upalni proces karakteriziran je povećanom proizvodnjom reaktivnih vrsta koje su sposobne narušiti proteinsku strukturu do njegovog potpunog gubitka funkcije. Smatralo se da je α -2-makroglobulin rezistentan na modifikacije prouzročene reaktivnim vrstama što nije posve točno. Protein α -2-makroglobulin nije u potpunosti rezistentan, već „konzumira“ reaktivne vrste bez gubitka inhibicijske funkcije reverzibilno oksidirajući određene metioninske ostatke koji se nalaze u blizini aktivnog mjesta. Slična se logika može primijeniti na protein metalotionein u čijoj se strukturi nalazi velik broj cisteinskih ostataka koji oksidacijom čine više disulfidnih veza. Cistein, kao i metionin, u svojoj strukturi posjeduje sulfhidrilnu skupinu koja je podložna oksidaciji. Ako dođe do oksidacije metalotioneina, on otpušta cink i prelazi u formu djelomično reduciranog tioneina koji je sposoban vrlo učinkovito reducirati enzim MsrB3 reverzibilno oksidirajući svoje cisteinske ostatke u cistine (disulfidno vezane cisteine).

Metionin sulfoksid reductaze spadaju u obitelj enzima čija je uloga prvenstveno u zaštiti proteina od oksidativnog stresa. U prooksidativnim uvjetima, odnosno u uvjetima povećane proizvodnje reaktivnih vrsta, metioninski ostaci unutar strukture proteina se oksidiraju dajući produkt metionin sulfoksid. Enzimi obitelji Msr sposobni su reducirati metionin sulfoksid nazad u metionin pri čemu dolazi do reverzibilne oksidacije cisteinskih ostataka u njihovom aktivnom mjestu. Za njegovu regeneraciju odgovoran je prvenstveno sustav tioredoksin/tioredoksin reductaza koji reducira oksidirane cisteinske ostatke omogućujući im ponovno antioksidativno djelovanje. Navedeni sustav, prema opsežnim dokazima iznijetim u znanstvenom članku Sagher *i sur.*, 2006., s visokom djelotvornošću regenerira enzime MsrA, MsrB1 i MsrB2, dok bi za regeneraciju enzima MsrB3 mogao biti zaslužan isključivo metalotionein u formi tioneina, odnosno bez vezanih metala.

Kako živi organizam stari, dolazi do narušavanja homeostaze i postupnog pada u fiziološkoj i metaboličkoj funkciji što se odražava i na redoks ravnotežu u pojedinim tkivima i organima. Tkivo bubrega se starenjem mijenja, a tim promjenama ponajviše je zahvaćeno tkivo kore bubrega. Posebno su zahvaćeni sami nefroni čiji broj i veličina opadaju sa starenjem. Pošto su enzimi obitelji Msr prisutni u svim stanicama, prisutni su i u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića. Razina ekspresije im je moguće ovisna o dobi i spolu zbog čega čine pogodan model za ispitivanje razine oksidativnog stresa, a time i učinaka starenja, na tkivo bubrega, odnosno za ispitivanje mogućih dobno-spolnih razlika.

Unutar projekta AGEMETAR dobiveni su rezultati o postojanju dobno-spolnih razlika u razini ekspresije metalotioneina (Ljubojević *i sur.*, 2019; djelomično neobjavljeno). Razina ekspresije metalotioneina raste sa starošću jedinke i viša je u jedinkama ženskog spola. Pošto ujedno postoje i rezultati u literaturi (Sagher *i sur.*, 2006.) da je metalotionein sposoban regenerirati enzim MsrB3, moguće je da su njihove razine ekspresije i unutarstanična prisutnost u određenoj mjeri povezane. Iz navedenih rezultata proizašla je pretpostavka da bi enzim MsrB3 mogao pratiti promjene ekspresije metalotioneina u bubrezima. Povećana ekspresija enzima MsrB3 u bubregu štakora očekivala se u jedinkama starije dobi zbog pretpostavke da je u njihovim tkivima razina oksidativnog stresa od koje se stanice moraju obraniti viša (zbog veće količine pohranjenog željeza), te da je viša razina ekspresije metalotioneina, i MsrB3, u starijih životinja barem djelomično odgovorna za njihovo uklanjanje u usporedbi s mlađim, tromjesečnim jedinkama. Također, zbog navedenog se u tkivu bubrega životinja ženskog spola očekivala viša razina ekspresije MsrB3 negoli u jedinkama muškog spola. Dobiveni podaci nisu u potpunosti u skladu s očekivanjima čime se javlja potreba za ponovnom interpretacijom hipoteze te daljnjim istraživanjima. Dobiveni rezultati u okviru ovog diplomskog rada kreću se u smjeru potvrde značajnosti enzima MsrB3 (i ostalih članova obitelji Msr) u procesu starenja jer se njihovim potvrđenim smanjenjem može objasniti njegova neophodnost, zbog činjenice da njegovim nedostatkom povećanja slabi kapacitet obrane organizma od djelovanja reaktivnih vrsta kisika.

Uvjeti prema kojima se vršio korak raskrivanja antigena izabrani su zbog svoje učinkovitosti u prethodnim istraživanjima (Brzica *i sur*, 2009). Blago kiseli uvjeti pri pH6 pospješuju antigeničnost proteina MsrB3 što ga čini dostupnijim primarnom protutijelu te pruža zadovoljavajuću razinu obojenja. Blago lužnati uvjeti pri pH8 razmotreni su, no odbačeni jer uništavaju tkivo te pružaju pretjerano pozadinsko obojenje koje remeti detekciju pozitivnog signala. Koristila sam i perfundirane i nativne uzorke zbog mogućnosti da perfuzija, tijekom dugotrajne anestezije i potencijalnog izlaganja životinja hipoksiji, pokaže neočekivane niže opisane rezultate raspodjele MsrB3 obojenja između mužjaka i ženki. Navedeno se nije dogodilo, odnosno i perfundirane i neperfundirane životinje pokazivale su sličnu raspodjelu, iako je heterogenost bila nešto viša u perfundiranih životinja (nije prikazano slikom).

Istraživanjem unutar okvira ovog diplomskog rada potvrđena je prisutnost enzima MsrB3, ponajviše u bubrežnim proksimalnim kanalčićima kortikalnih i jukstamedularnih nefrona bubrega mužjaka i ženki štakora što je u skladu s očekivanjima. Prema rezultatima imunofluorescencije, bez ikakvih prethodnih saznanja, moglo bi se tvrditi da je enzim MsrB3 najviše eksprimiran u tkivu bubrega tromjesečnih mužjaka štakora. Ako se uzme u obzir činjenica da razina ekspresije metalotioneina raste sa starošću jedinke, i da bi ekspresija MsrB3 trebala pratiti isti trend, rezultati su suprotni očekivanim. Navedena činjenica ukazuje da je nedostatak, odnosno smanjenje ekspresije enzima MsrB3, potencijalno ključan čimbenik u neminovnom procesu samog starenja. Nađena razina ekspresije jest zadovoljavajuća, no distribucija enzima MsrB3 u tkivu bubrega iznenađujuća je zbog naglašene razlike među spolovima. Već pri određivanju optimalnih uvjeta primijećene su razlike u lokalizaciji enzima MsrB3 s obzirom na tip pozitivno obojenog proksimalnog kanalčića (Slika 18. i Slika 19.). Lokalizacija obojenja kod ženki dominira u S3, a kod mužjaka u S2 odsječcima proksimalnih kanalčića (Slika 18. i Slika 19.).

Na transverzalnim prerezima bubrega, kod mužjaka, osim što je obojenje intenzivno i vezikularno, stožastog je oblika i prisutno je od kore (baza stošca) sve do vanjske pruge srži (vrh stošca). Obrnuto mužjacima, kod ženki se baza stošca nalazi u vanjskoj prugi srži te se sužava prema kori gdje se nalazi njegov vrh. Primijećene razlike u lokalizaciji enzima MsrB3 s obzirom na tip pozitivno obojenog proksimalnog kanalčića (Slika 20.), odnosno lokalizacija obojenja kod ženki prisutna u S3, a kod mužjaka u S2 odsječcima proksimalnih kanalčića, nije isključiva. Prema pokusu kolokalizacije s metalotioneinom može se potvrditi da su metalotionein i MsrB3 prisutni u istim kanalčićima kod mužjaka. Međutim, ne nalaze se u istim staničnim strukturama.

To potvrđuje činjenica da se metalotionein ne može pronaći vezikularno što je ustanovljeno u prethodnim istraživanjima proteina. Također, slabo obojeni S2 odsječci pozitivni na MsrB3 uočavaju se tek pri većem povećanju i također imaju prisutan drugačije distribuiran metalotionein.

Vezikularno obojenje nije nađeno bojanjem sekundarnim protutijelom obilježenim FITC fluoroforom (nije prikazano). Na tragu navedenog nalaza uzela se u obzir njegova osjetljivost na kiseli pH, kao i mogućnost prisutnosti većih spolnih razlika u degradaciji samog enzima MsrB3, kao i proteina ovisnih o njemu, koja se potencijalno odvija u izuzetno kiselom mediju lizosoma. Mogućnost pH osjetljivosti unutarstaničnih struktura koje posjeduju vezan MsrB3 potvrdilo je intenzivno obojenje NaK-ATPaze koja je, u velikoj mjeri, prisutna na bazolateralnim membranama svih epitelnih stanica bubrežnih kanalića (u navedenim uvjetima pogodno korištenje sekundarnog protutijela obilježenog FITC fluoroforom) (Slika 22.). Pri istim uvjetima moguće je dobiti jasno i oštro obojenje koristeći se manjom koncentracijom sekundarnog protutijela, dok se, primjerice, difuzna distribucija MsrB3 u ženki nije ni mogla detektirati koristeći protutijelo obilježeno FITC fluoroforom (Wiederschain, G. Y., 2011). Nadalje, objavljeni radovi o specifičnoj unutarstaničnoj funkciji MsrB3 navode uključenost mitohondrija s izoformom MsrB3B i endoplazmatskog retikuluma (ER) s MsrB3A. Time bi intenzivno obojene vakuole mogle biti posljednji korak u procesu mitofagije oksidativno oštećenih proteina mitohondrija vezanih za MsrB3B i moguća slika intenzivnog popravka oksidativnog oštećenja unutar ER enzimom MsrB3A.

Naravno, kako bi se objasnilo vezikularno obojenje u mužjaka, postoji mogućnost nespecifičnog vezanja primarnog protutijela za strukturu lizosomalnog porijekla koja pokazuje određenu homologiju sekvence s enzimom MsrB3. Naime, svaki epitop formira se *in situ* kao trodimenzionalna struktura o kojoj ovisi navedena učinkovitost i specifičnost vezanja na tkivnim naescima. Također, postoji mogućnost osobnog propusta u interpretaciji opaženih pojava koju bi, kao i nedoumice oko učinkovitosti i specifičnosti protutijela, razriješila nabava novog primarnog protutijela što je van okvira ovog rada. Nadalje, moguće je i da je u vezikulama došlo do svojevrsnog okupljanja fluorofora na molekularnoj razini koje omogućuje samoaktivaciju (*eng. self-activation*), na što se može nadovezati aromatska priroda steroidnih hormona jer je efekt spolno specifičan, ali i prisutnost ugljikohidratnih/šećernih modifikacija od kojih neke posjeduju sposobnost autofluorescencije (*eng. advanced end glycosylation products, AGE*). Iako su navedene pretpostavke zanimljive, izlaze van okvira ovog rada.

U zadnjem koraku pokusa imunofluorescencije sekvencijalni su naresci obojani uporabom zečjeg monoklonskog protutijela protiv HO-1 kako bi se pokušali objasniti prethodno opisani rezultati obojenja u mužjaka (Slika 23.). Bojanjem protutijelom anti-HO-1 dobilo se homogeno obojenje duž čitavog nefrona, isključujući prisutnost akutnog oksidativnog stresa uzrokovanog ishemijom i reperfuzijom kao potencijalnog uročnika intenzivnog vakuolarnog obojenja nastalog pri žrtvovanju i perfuziji životinja fiksativom. Ipak, zbog navedene činjenice, postoji mogućnost da je zbog koraka perfuzije neizravno povećana razina oksidativnog stresa u tkivima određenih jedinki što tkiva čini heterogenim. Međutim, navedeno nije bilo moguće provjeriti unutar okvira ovog diplomskog rada.

Inkubacijom u primarnom protutijelu anti-MsrB3 detektirana je proteinska pruga na ~19 kDa koja, prema navodima u literaturi, odgovara molekulskoj masi enzima MsrB3 u bubregu štakora. Intenzitet, odnosno gustoća proteinske pruge ovisila je o temperaturi i uvjetima denaturacije. Gustoća proteinske pruge bila je najviša pri 65 °C i nedenaturirajućim uvjetima, a najniža pri temperaturi 37 °C što ukazuje na činjenicu da enzim MsrB3 potencijalno čini polimere koji se razdvajaju pri povišenoj temperaturi, dok je kao monomer termički stabilan pri visokim temperaturama i donekle osjetljiv na razdvajanje disulfidnih veza (Slika 24.).

Denzitometrijskim mjerenjima određena je relativna gustoća proteinskih pruga koja izravno odgovara relativnoj koncentraciji proteina MsrB3 u bubregu štakora. Statistički značajna razlika u prisutnosti proteina MsrB3 u bubregu štakora opažena je kod dvogodišnjih jedinki i iznosi 40% u korist mužjaka (Slika 26.), dok kod tromjesečnih jedinki ta razlika iznosi ~ 11% u korist ženki i nije statistički značajna. Prisutnost proteinske pruge je uniformna i ne odgovara rezultatima imunofluorescencije (Slika 25.). Moguće objašnjenje leži u činjenici da je pri pripremi homogenata diferencijalnim centrifugiranjem korišten prevelik broj okretaja (*eng. rotation per minute, rpm*), odnosno sila od 5000g. Sila od 1000g dovoljna je da se iz grubog homogenata uklone veće stanične strukture, odnosno jezgre i veliki mitohondriji te moguće autofagocitozne vezikule odgovorne za mitofagocitozu. Uporabom veće sile iz konačnog uzorka su potencijalno oboreni i veći mitohondriji koji čine bogat izvor enzima MsrB3.

Kao i kod tumačenja rezultata imunofluorescencije, nije isključena moguća slabija učinkovitost i specifičnost primarnog protutijela, premda jedna po masi odgovarajuća proteinska pruga predstavlja izvrstan rezultat. Međutim, kako bi western blot analiza bila uspješna, epitop mora biti u obliku linearne sekvence koju protutijelo prepoznaje što se potencijalno razlikuje od trodimenzionalne konformacije u nativnom proteinu na tkivnim naresecima. Zbog navedene činjenice protutijelo može drukčije djelovati, ili se drukčije ponašati, ovisno o metodi za koju se rabi.

Metodom RT-PCR potvrđena je prisutnost svih formi enzima obitelji Msr u bubregu tromjesečnih i dvogodišnjih mužjaka i ženki štakora. Kreirali smo oligonukleotidne početnice (programi *online*) tako da duljina amplificiranih fragmenata iznosi je 310 pb za MsrA, 315 pb za MsrB1, 366 pb za MsrB2, 348 pb za MsrB3 i 369 pb za GAPDH. Imale su i sličnu temperaturu taljenja (T_m) zbog GC udjela, sve kako bismo početnice mogli umnažati pod istim uvjetima. Prema navodima u literaturi, najvišu razinu ekspresije posjeduje MsrA što je pokusom i potvrđeno. Razina ekspresije MsrB3 najniža je u bubregu s obzirom na ekspresiju ispitanih formi (Slika 27.). Rezultati western blot analize donekle su u skladu s rezultatima dobivenim RT-PCR metodom koja ukazuje na blago povišenu razinu ekspresije enzima MsrB3 u bubregu tromjesečnih ženki naspram mužjaka, premda razlika nije statistički značajna. Navedeni rezultati ne odgovaraju rezultatima imunofluorescencije koja ukazuje na povišenu ekspresiju MsrB3 kod mužjaka kod kojih je obojenje jače po intenzitetu (Slika 28.). Tome uzrok može biti gore objašnjen način pripreme uzoraka homogenata bubrežnog tkiva kojim su oborene veće stanične strukture, odnosno pozitivno obojane vezikule i/ili organeli intenzivno prisutni i vidljivi, u više ili manje kanalića kod svih mužjaka. Kako bi se ustanovila točna i provjerena specifičnost raspodjele enzima MsrB3 u bubregu, za provjeru bi bilo poželjno imati životinje bez ekspresije MsrB3 (*knockout* životinje) i/ili trebalo bi se primijeniti novo protutijelo protiv MsrB3 što je van okvira ovog diplomskog rada.

6. Zaključak

Unutar okvira ovog diplomskog rada istraživanje je provedeno kao bi se objasnila moguća povezanost ekspresije enzima MsrB3 s ekspresijom metalotioneina u bubregu, kao i njihova potencijalna povezanost s učincima starenja. Dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjima spolnih i dobnih razlika koje prate povišenje ekspresije metalotioneina što mijenja zaključke o navedenoj povezanosti. Iako rezultati nisu u skladu s očekivanim, pružaju nova saznanja potencijalno iskoristiva u budućim istraživanjima koja bi mogla razjasniti ulogu enzima MsrB3 kao ključnog čimbenika starenja, a o kojem je i danas vrlo malo podataka dostupno u literaturi. Starenje je pojam koji u kontekstu bioloških istraživanja predstavlja „novoprocvalu“ granu znanosti u kojoj svako novo saznanje predstavlja svojevrstan „korak naprijed“. Ujedno, ovaj rad otvorio je vrata mogućem poboljšanju metodologije, odnosno boljim tehničkim razradama, što svakako doprinosi sveukupnom razumijevanju obrađene teme.

7. Literatura

7.1. Znanstveni radovi

Achard-Joris, M., Moreau, J. L., Lucas, M., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Boudou, A., Bourdineaud, J. P. (2007). Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie*, 89(12), 1474-1488.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.

Brzica, H., Breljak, D., Ljubojević, M., Balen, D., Micek, V., Anzai, N., Sabolić, I. (2009). Optimal methods of antigen retrieval for organic anion transporters in cryosections of the rat kidney. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 60(1), 7-17.

Cabreiro, F., Picot, C. R., Friguet, B., Petropoulos, I. (2006). Methionine sulfoxide reductases: relevance to aging and protection against oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 37-44.

Cogliati, S., Cabrera-Alarcón, J. L., Enriquez, J. A. (2021). Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), 2655-2668.

Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 627-647.

Das, T. K., Wati, M. R., Fatima-Shad, K. (2015). Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. *Archives of Neuroscience*, 2(2).

Dietz, J. V., Fox, J. L., Khalimonchuk, O. (2021). Down the iron path: Mitochondrial iron homeostasis and beyond. *Cells*, 10(9), 2198.

Docherty, M. H., O'Sullivan, E. D., Bonventre, J. V., Ferenbach, D. A. (2019). Cellular senescence in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 30(5), 726.

Gilbert, S. F. (2000). Aging: The Biology of Senescence. *Developmental Biology Sunderland (MA): Sinauer Associates*. 6th edition.

Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*, 18(10), 611-627.

Javitt, G., Cao, Z., Resnick, E., Gabizon, R., Bulleid, N. J., Fass, D. (2020). Structure and electron-transfer pathway of the human methionine sulfoxide reductase MsrB3. *Antioxidants & Redox Signaling*, 33(10), 665-678.

- Kazmin, D., Edwards, R. A., Turner, R. J., Larson, E., Starkey, J. (2002). Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination. *Analytical biochemistry*, 301(1), 91-96.
- Kim, H. Y. i Gladyshev, V. N. (2004). Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Molecular biology of the cell*, 15(3), 1055-1064.
- Kitada, M., Ogura, Y., Monno, I., Xu, J., Koya, D. (2021). Effect of methionine restriction on aging: its relationship to oxidative stress. *Biomedicines*, 9(2), 130.
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229-234.
- Krezel, A., Maret, W. (2021). The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. *Chemical Reviews*, 121(23), 14594-14648.
- Kuksal, N., Chalker, J., Mailloux, R. J. (2017). Progress in understanding the molecular oxygen paradox—function of mitochondrial reactive oxygen species in cell signaling. *Biological chemistry*, 398(11), 1209-1227.
- Kwak, G. H., Kim, T. H., Kim, H. Y. (2017). Down-regulation of MsrB3 induces cancer cell apoptosis through reactive oxygen species production and intrinsic mitochondrial pathway activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), 468-474.
- Lauinger, L. i Kaiser, P. (2021). Sensing and Signaling of Methionine Metabolism. *Metabolites*, 2021, 11, 83.
- Lee, B. C. i Gladyshev, V. N. (2011). The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(2), 221-227.
- Lim, J. M., Kim, G., Levine, R. L. (2019). Methionine in proteins: it's not just for protein initiation anymore. *Neurochemical research*, 44, 247-257.
- Lionaki, E., Ploumi, C., Tavernarakis, N. (2022). One-carbon metabolism: pulling the strings behind aging and neurodegeneration. *Cells*, 11(2), 214.
- Ljubojević, M., Orct, T., Micek, V., Karaica, D., Jurasović, J., Breljak, D., Madunić, I. V., Rašić, D., Jovanović, I. N., Peraica, M., Gerić, M., Gajski, G., Oguić, S. K., Rogić, D., Nanić, L., Rubelj, I., Sabolić, I. (2019). Sex-dependent expression of metallothioneins MT1 and MT2 and concentrations of trace elements in rat liver and kidney tissues: Effect of gonadectomy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 53, 98-108.
- Maejima, Y., Zablocki, D., Sadoshima, J. (2012). Oxidative stress and cardiac muscle. *Muscle*, 309-322.
- Marí, M., de Gregorio, E., de Dios, C., Roca-Agujetas, V., Cucarull, B., Tutusaus, A., Morales, A., Colell, A. (2020). Mitochondrial glutathione: Recent insights and role in disease. *Antioxidants*, 9(10), 909.
- Maurya, H., Kumar, T., Kumar, S. (2018). Anatomical and physiological similarities of kidney in different experimental animals used for basic studies. *J Clin Exp Nephrol*, 3(09).

- Obeid, R. (2013). The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients*, 5(9), 3481-3495.
- Parkhitko, A. A., Jouandin, P., Mohr, S. E., Perrimon, N. (2019). Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging cell*, 18(6), e13034.
- Peng, T., Cheng, X., Chen, Y., Yang, J. (2021). Sulfoxide reductases and applications in biocatalytic preparation of chiral sulfoxides: a mini-review. *Frontiers in Chemistry*, 9, 714899.
- Pradas, I., Jové, M., Cabré, R., Ayala, V., Mota-Martorell, N., & Pamplona, R. (2019). Effects of aging and methionine restriction on rat kidney metabolome. *Metabolites*, 9(11), 280.
- Preiser, J. C. (2012). Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147-154.
- Sagher, D., Brunell, D., Hejtmancik, J. F., Kantorow, M., Brot, N., Weissbach, H. (2006). Thionein can serve as a reducing agent for the methionine sulfoxide reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8656-8661.
- Sanders, S. A., Eisenthal, R., Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase: generation of superoxide anion. *European Journal of Biochemistry*, 245(3), 541-548.
- Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z., Locasale, J. W. (2019). Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nature Reviews Cancer*, 19(11), 625-637.
- Sreekumar, P. G., Hinton, D. R., Kannan, R. (2011). Methionine sulfoxide reductase A: Structure, function and role in ocular pathology. *World journal of biological chemistry*, 2(8), 184.
- Swindell, W. R. (2011). Metallothionein and the biology of aging. *Ageing research reviews*, 10(1), 132-145.
- Wiederschain, G. Y. (2011). The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies. *Biochemistry (Moscow)*, 76(11), 15-96, 885-902.
- Yu, J. (2016). Maturation and Roles of Collecting Ducts and Loops of Henle in Renal Medulla Development. In *Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration*, Academic Press, 121-131.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

7.2. Internetske stranice

Ovalle, R. (2022). A history of the Fenton reactions (Fenton chemistry for beginners). *Reactive Oxygen Species*, 1. <https://www.intechopen.com/chapters/80183> (pristupljeno 22.10.2023.)

bubreg. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013 – 2024. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=9912> (pristupljeno 22.10.2023.)

L-Methionine (stranica proizvoda, MedChemExpress) <https://www.medchemexpress.com/L-Methionin.html> (pristupljeno 23.11.2023.)

RNA and protein synthesis review sheet (Khan Academy)
<https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-rna-and-protein-synthesis/a/hs-rna-and-protein-synthesis-review> (pristupljeno 2.12.2023.)

The vertebrate mitochondrial DNA (mtDNA) genetic code
https://www.mun.ca/biology/scarr/MtDNA_code.html (pristupljeno 2.12.2023.)

Mini Trans-Blot Cell (stranica proizvoda, BioRad) <https://www.bio-rad.com/en-hr/product/mini-trans-blot-cell?ID=589ca8f7-5751-487a-a453-571ee8cc8b7e> (pristupljeno 10.12.2023.)

Životopis

Ime i prezime: Ana Sever

Akademski naziv: sveučilišni prvostupnik biologije, univ. bacc. biol.

Datum i mjesto rođenja: 5. prosinca 1998. u Puli, 52100, Hrvatska

Obrazovanje:

Osnovnoškolsko obrazovanje započinjem 2005. godine u Osnovnoj školi Šijana u Puli te osmi razred završavam 2013. godine. Završila sam srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji Pula po općem programu 2017. godine, nakon čega upisujem sveučilišni integrirani nastavnički smjer biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Po završetku prve godine mijenjam studijski program te 2018. započinjem obrazovanje na preddiplomskom studiju biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu kojeg završavam 2021. godine seminarskim radom na temu „Neurobiološka podloga opsesivno-kompulzivnog poremećaja“ pod mentorstvom prof.dr.sc. Dubravke Hranilović, čime stječem titulu prvostupnika biologije. Po završetku preddiplomskog studija upisujem diplomski studij eksperimentalne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, modul: fiziologija i imunobiologija.

Radno iskustvo i volontiranje:

2015.-2016. – sezonski rad – regulacija prometa u sklopu prometne policije u Puli

2015.-2017. – volontiranje na utrci IronMan 70.3

2018. – sezonski rad – recepcija kampa „Indije“

2018. – demonstratura – Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, kolegij: Biologija stanice

Stručne prakse:

2019. – stručna praksa – Botanički zavod, rad na modernizaciji herbarijske zbirke *Herbarium Croaticum*

1.10.2022. - 1.12.2022. – Erasmus+ program stručne prakse (SMP) - KA103 (127), IRCCS Institut za neurologiju "Carlo Besta", Zavod za neuroznanosti, praksa u području neuralgije i neuropatije

Članstva i sudjelovanja:

2019-2020. – članstvo u BIUS-u, Sekcija biologije mora

2019. – sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“, radionica u sklopu Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Vještine:

Poznavanje jezika: Engleski – C1, Talijanski – B1

Služenje računalom: Izvrsno. Dostatne vještine u korištenju MS Office programa

Vozačka dozvola: B kategorija