

# Utjecaj sirtuina 3 na oksidativno i metaboličko stanje tkiva bubrega i mozga mužjaka i ženke miša

---

**Kaloper, Marta**

**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:217:931606>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marta Kaloper

**Utjecaj sirtuina 3 na oksidativno i  
metaboličko stanje tkiva bubrega i mozga  
mužjaka i ženke miša**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Marta Kaloper

**Impact of sirtuin 3 on the oxidative and  
metabolic state of kidney and brain tissue in  
male and female mouse**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za metabolizam i starenje na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Roberta Belužića, te komentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije (mag. biol. mol.).

# Zahvale i posvete

Zahvaljujem mentoru dr. sc. Belužiću na vodstvu i smirenosti koje su mi uljepšale izradu ovog diplomskog rada. Njegova podrška bila je neprocjenjiva u svim fazama izrade mog rada. Također, zahvaljujem i neslužbenim mentoricama: dr. sc. Pinterić čiji savjeti i nadzor prožimaju ovaj diplomski rad te dr. sc. Sobočanec koja me naučila statistički obraditi rezultate i otklonila strah od pogrešaka u labosu.

Zahvaljujem komentorici prof. dr. sc. Hranilović čiji su savjeti doprinjeli kvaliteti ovog rada i koja mi je otvorila vrata neurofiziologije toliko da se nikada neće zatvoriti.

Čitavom timu LAMBDA (i drugim pridošlicama) čije su prijateljske riječi i podrška olakšale ovaj proces. S njima sam naučila više od onoga što piše u narednim stranicama.

Mojim roditeljima i seki koji „*uvijek stoje iza mene*“, Dominiku koji nudi rješenja (i kada nisu potrebna) i Pauli koja me uvjerila da sam smiješna. Volim vas neizmjerljivo.

Dragim kolegama, sada pravim prijateljima. Vi ste divni ljudi i veselim se vašim budućim uspjesima (i popratnim feštama).

Udruzi BIUS i svim timovima s kojima sam imala priliku surađivati. S vama sam rasla/uživala (u najboljem mogućem omjeru).

Svim profesorima i asistentima čija su predavanja i praktikumi pomogli oblikovati znanstvenika u meni.

Sirtuinima, koji su nevjerojatni, nadam se da ćemo se opet susresti u labosu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj sirtuina 3 na oksidativno i metaboličko stanje tkiva bubrega i mozga mužjaka i ženke miša

Marta Kaloper

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sirtuin 3 (SIRT3) pripada obitelji proteina sirtuina i glavna je mitohondrijska  $\text{NAD}^+$  ovisna deacetilaza. Sudjeluje u regulaciji staničnog metabolizma, oksidativnog stresa i transkripcije. Njegova pojačana aktivacija, što suplementima, a što zbog polimorfizama prirodno prisutnih u populaciji, pokazala se efikasnom metodom produljenja životnog vijeka modelnih organizama i čovjeka. U ovom istraživanju analiziran je njegov utjecaj na oksidativno i metaboličko stanje u tkivu bubrega i mozga. Istraživanje je provedeno na osamnaest tjedana starim mužjacima i ženkama miševa divljeg tipa i miševa s nedostatkom proteina SIRT3, pri normalnoj prehrani. Analizirana je ekspresija proteina uključenih u antioksidativnu obranu i metabolizam metodom Western blot. Na uzorcima tkiva bubrega i mozga provedena je analiza oksidativnih oštećenja proteina analizom karbonilacije, odnosno oštećenja lipida lipidnom peroksidacijom. Dodatno je određena aktivnost antioksidativnih enzima katalaze i superoksid dismutaze. U analizi ekspresije uočen je utjecaj SIRT3 na količinu proteina SOD2 u bubregu i PPAR $\gamma$  u mozgu. Oksidativna oštećenja sugeriraju protektivno djelovanje na lipide u mozgu i proteine u bubregu, a aktivnost antioksidativnih enzima varira s obzirom na spol i tip organa.

**Ključne riječi:** Enzimatska aktivnost, Metabolizam, Oksidativni stres, Proteinska ekspresija, Spolno-ovisne promjene

(48 stranica, 15 slika, 4 tablice, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Dr. sc. Robert Belužić  
Komentor: Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji:  
Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović  
Prof. dr. sc. Maja Matulić  
Prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 11. travnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Impact of sirtuin 3 on the oxidative and metabolic state of kidney and brain tissue in male and female mouse

Marta Kaloper

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Sirtuin 3 (SIRT3) belongs to the sirtuin protein family and is a key mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase. It is involved in regulating cellular metabolism, oxidative stress, and transcription. Its increased activation, either through supplements or due to naturally occurring polymorphisms in the population, has proven to be an effective method for extending the lifespan of model organisms and humans. In this study, its impact on oxidative and metabolic states in kidney and brain tissues was analyzed. The research was conducted on 18-week-old male and female wild-type mice and mice lacking the SIRT3 protein, under normal dietary conditions. The expression of proteins involved in antioxidant defense and metabolism was analyzed using the Western blot method. Oxidative damage to proteins in kidney and brain tissue samples was determined by analyzing carbonylation, and lipid damage was assessed through lipid peroxidation. Additionally, the activity of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase was measured. The analysis of protein expression showed an influence of SIRT3 on the amount of SOD2 protein in the kidney and PPAR $\gamma$  in the brain. Oxidative damage suggests a protective effect on lipids in the brain and proteins in the kidney, while the activity of antioxidant enzymes varies depending on the sex and type of organ.

**Keywords:** Enzymatic activity, Metabolism, Oxidative stress, Protein expression, Sex-specific effects

(48 pages, 15 figures, 4 tables, 67 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

**Mentor:** Robert Belužić, PhD

**Co-mentor:** Prof. Dubravka Hranilović, PhD

**Reviewers:**

Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Prof. Maja Matulić, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Thesis accepted: April 11<sup>th</sup> 2024

# Sadržaj

<b>1. Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1. Sirtuini .....	2
1.2. Regulacija i uloge SIRT3 .....	4
1.3. Tkivno specifična uloga SIRT3 .....	6
<b>2. Cilj istraživanja .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Materijali i metode .....</b>	<b>8</b>
3.1. Uzorci tkiva .....	8
3.2. Priprema homogenata tkiva mozga i bubrega .....	9
3.2.1. Homogenizacija uzoraka .....	9
3.3. Određivanje oštećenja proteina .....	10
3.3.1. Priprema uzoraka .....	11
3.3.2. Određivanje oksidativnih oštećenja proteina metodom baziranoj na ELISA-i .....	11
3.4. Određivanje oštećenja lipida .....	12
3.4.1. Priprema uzoraka i standarda .....	13
3.4.2. Određivanje oksidativnog oštećenja lipida metodom TBARS .....	13
3.5. Određivanje ekspresije proteina metodom Western blot .....	13
3.5.1. Izolacija proteina .....	14
3.5.2. Razdvajanje proteina u uzorku temeljem veličine .....	14
3.5.3. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu .....	15
3.5.4. Vizualizacija ukupnih proteina i imunodetekcija proteina od interesa .....	16
3.6. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima .....	18
3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) .....	18
3.6.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	19
3.7. Statistička obrada rezultata .....	19
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>20</b>
4.1. Ekspresija SIRT3 i PGC1 $\alpha$ .....	20
4.2. Utjecaj SIRT3 na oksidativna oštećenja tkiva .....	22
4.3. Utjecaj SIRT3 na antioksidativne enzime i redoks regulaciju tkiva .....	24
4.3.1. Ekspresija antioksidativnih enzima .....	24
4.3.2. Aktivnost antioksidativnih enzima .....	29



4.4.	Utjecaj SIRT3 na metabolizam tkiva .....	31
<b>5.</b>	<b>Rasprava .....</b>	<b>37</b>
5.1.	Ekspresija SIRT3 i njegova regulatora ovisi o tipu organa, ali ne i o spolu .....	37
5.2.	SIRT3 sudjeluje u ekspresiji SOD2 i PPAR $\gamma$ .....	38
5.3.	SIRT3 regulira antioksidativne enzime .....	39
5.4.	Oksidativna oštećenja sugeriraju modularnu zaštitnu ulogu SIRT3 .....	39
5.5.	U fiziološkim uvjetima SIRT3 ima veći utjecaj na antioksidativnu obranu nego na metabolizam.....	40
<b>6.</b>	<b>Zaključak .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>42</b>

# Kratice

**AMPK** - AMP-aktivirana protein kinaza

**ATP** - adenzin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

**BCA** - bicinhoninska kiselina (engl. *Bicinchoninic Acid*)

**CAT** - katalaza (engl. *Catalase*)

**CuZnSOD** - bakar-cink superoksid dismutaza (engl. *Copper-Zinc Superoxide Dismutase*)

**ELISA** - enzimom povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**FOXO3a** - (engl. *Forkhead Box Class O3a*)

**FASN** - sintaza masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Synthase*)

**GCN2** - opća kontrola nonderepresibilna 2 (engl. *General Control Nonderepressible 2*)

**GABA** - gama-aminomaslačna kiselina (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid*)

**HEK293T** - ljudske embrionalne bubrežne stanice (engl. *Human Embryonic Kidney 293T*)

**HO1** - hem oksigenaza 1

**HSP** - proteini toplinskog šoka (engl. *Heat-Shock Proteins*)

**IIS** - signalizacija inzulina/insulin-sličnog faktora rasta (engl. *Insulin/Insulin-like Growth Factor Signaling*)

**KCN** - kalijev cijanid

**MDA** - malondialdehid

**MnSOD** - manganova superoksid dismutaza

**NAD<sup>+</sup>** - nikotinamid adenin dinukleotid

**NAM** - nikotinamid

**PBS** - fosfatni pufer (engl. *Phosphate-Buffered Saline*)

**PGC1 $\alpha$**  - peroksisomski proliferator aktivirani receptor gama koaktivator 1 alfa (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha*)

**PPAR $\gamma$**  - peroksisomskim proliferatorom aktivirani receptor gama

**ROS** - reaktivni kisikovi radikali (engl. *Reactive Oxygen Species*)

**SIRT1** - sirtuin 1

**SIRT2** - sirtuin 2

**SIRT3** - sirtuin 3

**SIRT4** - sirtuin 4

**SIRT5** - sirtuin 5

**SIRT6** - sirtuin 6

**SIRT7** - sirtuin 7

**SOD1** - superoksid dismutaza 1

**SOD2** - superoksid dismutaza 2

**STK11** - serin-treonin proteinska kinaza 11

**TBARS** -supstance koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

## 1. Uvod

Društvo se danas susreće s porastom očekivane prosječne duljine života od 66,8 godina 2000. godine na 73,1 tijekom 2019. godine (World Health Organization 2023b). Ovaj trend vodi sve većem udjelu starije populacije. U 2019. godini 1 milijarda ljudi bila je starija od 60 godina, a do 2050. godine procjenjuje se da će ta će brojka narasti na 2,1 milijardi (World Health Organization 2023a). Starenje je normalan fiziološki proces kroz koji prolaze sve stanice i tkiva pojedinog organizma. Karakterizira ga promjena i smanjenje efikasnosti osnovnih fizioloških funkcija, poput promjena u metabolizmu te nakupljanja oštećenja stanične mašinerije od pojedinih unutarstaničnih makromolekula do čitavih organela, ali i izvanstaničnog matriksa. Za normalan proces starenja definirane su ključne, uvijek prisutne promjene nazvane obilježja starenja (engl. *hallmarks of aging*). U prvom izdanju 2013. godine obuhvaćale su devet promjena: genomsku nestabilnost, skraćivanje telomera, epigenetske promjene, gubitak proteostaze, mitohondrijsku disfunkciju, staničnu senescenciju i gubitak matičnosti stanica, te promjenu u međustaničnoj komunikaciji i detekciji prisutnosti nutrijenata (López-Otín i sur. 2013). Koncept se kontinuirano nadograđuje s novim saznanjima tako da su 2023. godine dodane još tri promjene: smanjenje makroautofagije, kronična upala i disbioza (López-Otín i sur. 2023).

Unatoč produljenom životnom vijeku, trajanje perioda visoke kvalitete života bez ozbiljnih bolesti ostao je relativno nepromijenjen (Crimmins 2015), a stariju dob prate kronična zdravstvena stanja poput metaboličkih poremećaja, autoimunih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti koje predstavljaju i glavni uzrok smrtnosti u razvijenim dijelovima svijeta (World health statistics 2024). Ove bolesti predstavljaju veliki financijski i mentalni teret pojedincima, a utječu i na državnu i svjetsku ekonomiju, stoga su bazična istraživanja u ovom području od iznimne važnosti.

Kao osnovni postulat starenja 1956. godine postavljena je teorija slobodnih radikala. Za pokretača starenja predloženo je nakupljanje slobodnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i nastanak njima prouzročenih oštećenja na makromolekulama (Harman 1956). Danas smjernice zdravog starenja uključuju smanjenje svakodnevnog stresa, pravilnu prehranu i tjelovježbu. U 2019. godini 5 milijuna smrtnih ishoda uzrokovale su bolesti vezane uz pretilost kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, karcinomi, neurološki poremećaji te kronične

respiratorne i probavne bolesti (Murray i sur. 2020). Na staničnoj razini ovaj se podatak može svesti na jedan sveprisutni životni proces- metabolizam. Metaboličke reakcije osiguravaju optimalne količine energije i građevnih jedinica za sve komponente stanica i tkiva. Regulacija metaboličkih reakcija odvija se pomoću regulatornih proteina, često pleiotropnih enzima reguliranih količinom nutrijenata u stanicama. Iako normalno starenje nužno prate promjene u metabolizmu (Ren i sur. 2017), metabolizam se mijenja i svakodnevno u skladu s fiziološkim uvjetima u organizmu koji uvelike ovisi o prehrani i životnom stilu pojedinaca. U prilog tvrdnji da je metabolizam ključ određivanja biološke starosti pojedinog organizma govori i činjenica da kalorijska restrikcija bez pothranjenosti produljuje period zdravog života modelnih organizama (López-Otín i sur. 2013). Neki od glavnih regulatora metabolizma u stanici su IIS (engl. *Insulin/Insulin-like Growth Factor Signaling*), GCN2 (engl. *General Control Nonderepressible 2*), mTOR (engl. *Mechanistic Target of Rapamycin*), AMPK (engl. *AMP-activated Protein Kinase*) i sirtuini. Zajedno ovi proteini i njihovi stanični putevi reguliraju homeostazu glukoze, proteina i lipida time regulirajući rast i diobu stanica, a utječu i na podložnost tkiva oksidativnom stresu (Amorim i sur. 2022; Ji i sur. 2022). Modulacija rada ovih enzima s obzirom na trenutne fiziološke uvjete u stanici dovodi do kaskade nizvodnih reakcija koje mijenjaju staničnu homeostazu reprogramiranjem genske ekspresije, ali i proteinske aktivnosti posttranslacijskim modifikacijama (Ren i sur. 2017). Tako je supresija IIS, mTOR te aktivacija AMPK, GCN2 i sirtuina uspješno produžila životni vijek u raznih modelnih organizama (Baur i sur. 2012; Ferraz i sur. 2016; Fontana i sur. 2010; Su i sur. 2019).

U slučaju IIS, GCN2, mTOR i AMPK radi se o pojedinačnim proteinima ili proteinskim kompleksima koji djeluju na veći broj nizvodnih meta uključenih u regulaciju ukupnog metabolizma stanica. U slučaju sirtuina radi se o obitelji koja u sisavaca sadrži 7 članova s velikim brojem nizvodnih interaktora koji ukupno utječu na svih dvanaest obilježja starenja. Zbog toga im odgovara opis „*sedam sirtuina u sedam smrtonosnih bolesti starenja*“ (Ji i sur. 2022; Morris 2013).

### **1.1. Sirtuini**

Obitelj proteina sirtuina evolucijski je očuvana skupina lizin-deacetilaza i ADP-riboziltransferaza. Skupina je regulirana na transkripcijskoj, posttranskripcijskoj i posttranslacijskoj razini. Međuovisnost metabolizma i sirtuina uočljiva je već na transkripcijskoj razini s obzirom da prepisivanje gena *SIRT1* ovisi o aktivatorima i represorima reguliranim

količinom energije i nutrijenata, dok posttranskripcijska stabilizacija mRNA ovog sirtuina ovisi o redoks uvjetima u stanici (Morris 2013).

Aktivnost obitelji usko je vezana za metaboličko stanje stanica i tkiva s obzirom da im je glavni kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>). U ovih enzima NAD<sup>+</sup> se koristi u reakciji deacetilacije čime nastaje nikotinamid (NAM) i 2'-O-acetil-ADP riboza (Tao i ostali, 2023). NAM nastaje i riboziltransferaznom aktivnošću SIRT4 i SIRT6 (van de Ven i sur. 2017). SIRT1 nekompetitivno veže NAM i time prolazi samoregulaciju vlastite aktivnosti (Sharma i sur. 2023). U uvjetima velike količine nutrijenata stanice ulaze u kataboličke reakcije β-oksidacije masnih kiselina, Krebsovog ciklusa i glikolize koje produciraju energiju i visokoenergetske elektrone pritom reducirajući NAD<sup>+</sup> u NADH (Tao i sur. 2023). Time se smanjuje dostupnost kofaktora sirtuina, a posljedično i njihova aktivnost. Zajedničko obilježje svih sirtuina predstavljaju konzervirane NAD-vezne domene, a razlike u njihovoj lokaciji, djelovanju i interakcijskim partnerima pripisujemo intrinzično neorganiziranim terminalnim dijelovima proteina (Costantini i sur. 2013). Osim toga, terminalni su dijelovi mjesto posttranslacijskih modifikacija sirtuina (Costantini i sur. 2013) koje također doprinose promjenama u njihovoj aktivnosti i interakciji s nizvodnim metama (Morris 2013).

Za sirtuine je karakteristično različito djelovanje i stupanj aktivnosti ovisno o fiziološkom stanju. Aktivnost sirtuina opada i sa starenjem, a ponovna aktivacija dovodi do pomlađivanja i produljenja životnog vijeka modelnih organizama. Održavanje aktivnosti sirtuina u našim tkivima, bilo kalorijskom restrikcijom ili prehranbenim suplementima, vjerojatno ima ulogu u postizanju nepatološkog starenja (Baur i sur. 2012).

SIRT1, SIRT6 i SIRT7 su jezgri sirtuini koji modificiraju različite tipove histona i time utječu na ekspresiju jezgrenih gena, ali djeluju i na druge, nehistske mete (Tao i sur. 2023). SIRT1 vezan je uz eukromatinsko područje jezgre i citoplazmu. Sudjeluje u regulaciji antioksidativnih i metaboličkih puteva, transkripcije i stabilnosti DNA te ima zaštitnu ulogu u mnogih kroničnih bolesti starije dobi. SIRT6 pokazuje ADP-riboziltransferaznu aktivnost i u jezgri zauzima heterokromatinska područja. Ima zaštitno djelovanje od oksidativnih oštećenja u stanici i smanjuje upalne reakcije pa se pokazao bitnom karikom u zaštiti od apoptoze i senescencije te u reprogramiranju stanične sudbine. SIRT7 prisutan je u području jezgrice. Zaslužan je za održavanje

heterokromatina te povezan s mitohondrijskom biogenezom i popravkom DNA. Sudjeluje i u održavanju matičnosti i dugovječnosti, a u patološkom je smislu povezan s više vrsta karcinoma (Sharma i sur. 2023).

SIRT2 smješten je u citoplazmi stanica gdje sudjeluje u zaštiti od oksidativnog oštećenja, a ulogu ima i u metaboličkom reprogramiranju. Iako djeluje negativno na tumorsko preživljenje hipoksije dokazana je njegova povećana ekspresija u nekih tumora (Sharma i sur. 2023).

U mitohondriju osim produkcije ATP-a i regulacije staničnog metabolizma nastaje i otpušta se ROS. Mitohondrijska disfunkcija jedna je od osnovnih obilježja starenja, a pokazalo se kako je pozitivnom povratnom spregom povezana s drugim obilježjima poput genomske nestabilnosti, epigenetskih promjena, kronične upale, ali i senescencije. Osim toga, metaboličke intervencije koje utječu na produljenje životnog vijeka povezane su s povećanom mitohondrijskom biogenezom na koju utječu poglavito SIRT1 i SIRT3 (Amorim i sur. 2022). U mitohondriju su smještena tri sirtuina, SIRT3, 4 i 5. SIRT4 uz deacetilaznu posjeduje i ADP-riboziltransferaznu aktivnost. Sudjeluje u regulaciji metabolizma glukoze, staničnoj signalizaciji i mitotskom dijeljenju stanica. Njegovo djelovanje u tumorigenezi je kontradiktorno jer ga pojedina istraživanja navode kao tumor supresora, dok druga govore u prilog uloge u razvoju i metastaziranju tumora (Sharma i sur. 2023). SIRT5 je manje ovisan o dostupnosti NAD<sup>+</sup> od ostalih sirtuina, a od njih se razlikuje i u promijenjenom enzimatskom djelovanju s obzirom da provodi desukcinilaciju, demalonilaciju i deglutamaciju. Sudjeluje u metaboličkoj regulaciji, ali uloge ima i u proliferaciji i metastaziranju tumora te neurodegenerativnim bolestima (Sharma i sur. 2023; Wang i sur. 2022). Mitohondrijski sirtuini jedine su deacetilaze ovog organela, a najjaču katalitičku ulogu u tome ima SIRT3. Zbog utjecaja na rad mitohondrija te višestrukog efekta regulacije količine reaktivnih kisikovih vrsta izdvojio se kao važan regulator normalnog starenja (Morris 2013; Sidorova-Darmos i sur. 2018).

## **1.2. Regulacija i uloge SIRT3**

SIRT3 je najbolje istražen član mitohondrijskih sirtuina. Regulacija prepisivanja gena *SIRT3* povezana je s mitohondrijskom biogenezom, metabolizmom i regulacijom oksidativnog stresa preko uloga njegovih transkripcijskih faktora. Primjerice peroksisom-proliferator-aktivirani receptor gama koaktivator 1 alfa (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*, PGC1 $\alpha$ ) i receptor povezan s estrogenom (engl. *estrogen-related receptor*

*alfa*,  $ERR\alpha$ ) zajedno potiču ekspresiju *SIRT3* (Giralt i sur. 2011).  $PGC1\alpha$  kao transkripcijski aktivator uz pomoć  $ERR\alpha$  utječe na regulaciju metabolizma glukoze i lipida te djeluje na mitohondrijsku biogenezu i regulaciju oksidativnog stresa (Liang i Ward 2006; Villena i Kralli 2008). Nadalje, još jedan transkripcijski aktivator  $FOXO3a$  (engl. *Forkhead box class O3a*) sudjeluje u regulaciji redoks statusa stanica, njihovom metabolizmu, ali i usmjeravanju stanične sudbine (Fiorillo i sur. 2023; Jin i sur. 2022).

Protein *SIRT3* u stanici poprima dva oblika, duži neprocesirani (44 kDa) kojeg nalazimo u jezgri te kraći (28 kDa) koji se nalazi u matriksu mitohondrija (Marcus i Andrabi 2018; Scher i sur. 2007). Za lokalizaciju u mitohondriju odgovoran je N-terminalni slijed, a po ulasku u mitohondrij nastupa cijepanje peptidazom u matriksu (Sharma i sur. 2023).

Iako postoje sumnje da je jezgrena *SIRT3* neaktivna forma ovog proteina, Scher i suradnici (2007) dokazali su deacetilaciju histona H3 i H4 u promotorskoj regiji s funkcijom transkripcijske represije gena. U umjetno induciranim uvjetima stresa u stanici dolazi do gubitka jezgrenog *SIRT3*, a i aktivacije transkripcije gena uključenih u regulaciju metabolizma i oksidativnog stresa (Iwahara i sur. 2012; Scher i sur. 2007). U mitohondriju *SIRT3* ima veći broj meta. Dapače, mišji modeli s nedostatkom *SIRT3*, za razliku od drugih mitohondrijskih sirtuina, jedini pokazuju hiperacetilaciju mitohondrijskih proteina (Ji i sur. 2022). S obzirom da je deacetilacija važna posttranslacijska modifikacija koja u većine mitohondrijskih meta potiče aktivnost, *SIRT3* nizvodno regulira produkciju ATP-a mijenjajući metabolizam glukoze i lipida te oksidativnu fosforilaciju. Djelujući na biogenezu i stabilnost mitohondrija regulira apoptozu, a smanjenjem razine ROS-a i aktivacijom antioksidativnih enzima sudjeluje u zaštiti od oksidativnog stresa i oštećenja tkiva (Baur i sur. 2012; Hebert i sur. 2013; Morris 2013; Sidorova-Darmos i sur. 2018; Yang i sur. 2016).

Širok dijapazon aktivnosti *SIRT3* i njegova regulacija pripisuje se njegovoj unutarstaničnoj lokalizaciji i prisutnosti kointeraktora u jezgri i mitohondriju. Primjerice, *SIRT3* se transportira iz jezgre u mitohondrij pri stresnim uvjetima, ali i prilikom vlastite povećane ekspresije (Scher i sur. 2007). Iako se u početku činilo kako je ova translokacija bitnija za njegovu ulogu represije gena u jezgri (Scher i sur. 2007), s obzirom da nakon translokacije tamo više ne obavlja svoju funkciju, moguće je da ulaskom u mitohondrij također povećava inače malu populaciju slobodnog *SIRT3*. Naime, u normalnim uvjetima *SIRT3* asociira s ATP sintazom visokim afinitetom (Yang i sur.

2016). Ova ga lokalizacija veže uz membranu što znači da je manja količina SIRT3 slobodna za deacetilaciju njegovih meta u matriksu. Asocijacija se narušava promjenom pH matriksa čime se okida još jedna promjena mikrolokacije SIRT3 praćena globalnom deacetilacijom do povratka u homeostazu (Ahn i sur. 2008; Yang i sur. 2016). I drugi interakcijski partneri SIRT3, poput SIRT1, FOXO3a, Nrf2 pokazuju sklonost translokacijama između jezgre i mitohondrija u specifičnim staničnim uvjetima (Jacobs i sur. 2008; Luo i sur. 2022; Zhang i sur. 2023) što sugerira da upravo oni utječu na modulaciju aktivnosti SIRT3 i u kompleksnoj mreži promjena u stanicama i odgovora na te promjene definiraju staničnu sudbinu i povratak homeostaze.

Interesantno je da je aktivnost SIRT3 ovisna o spolu. Iako je poznato da je aktivnost SIRT3 regulirana prisutnošću estrogena, dokazane su i spolne razlike neovisne o hormonima (Belužić i sur. 2024). Kronične bolesti starije dobi imaju drugačiju stopu pojavnosti, progresiju i prognozu u muškaraca i žena (Westergaard i sur. 2019). Iz tog razloga, novija istraživanja posvećuju sve veću pažnju spolnim razlikama u funkciji SIRT3 (Pinterić i sur. 2020; Shen i sur. 2021).

Sve ovo govori u prilog iznimne prilagodljivosti SIRT3 različitim situacijama u stanicama i važnosti identifikacije tkivno specifičnih interaktora i uvjeta te nizvodnih puteva ovog enzima.

### **1.3. Tkivno specifična uloga SIRT3**

Postoji mogućnost da manje količine slobodnog SIRT3 sudjeluju u održavaju deacetiliranosti mitohondrijskih proteina budući da zbog specifičnog okoliša dolazi do njihove spontane acetilacije, a njegove povećane količine u dodatnoj interakciji s raznim faktorima vode specifične promjene u stresnim uvjetima (Weinert i sur. 2015).

Ove razlike ne ovise samo o stresnim uvjetima nego i o tipu tkiva u kojem SIRT3 djeluje (Lombard i sur. 2007), a značajan je i utjecaj drugih organa i regulacija na razini organizma. Primjerice Pillai i suradnici (2017) otkrili su postupno opadanje povećane ekspresije SIRT3 nakon dužeg izlaganja prehrani s visokim sadržajem masti isključivo kada je istraživanje rađeno na modelnom organizmu, a ne na staničnoj liniji. Također, predložena je i regulacija na sistematskoj razini preko osi hipotalamus-masno tkivo (Imai i Guarente 2016).

Zbog svega navedenog SIRT3 se pokazao kao važan regulator u stanicama, tkivima, organima i čitavom organizmu. U nizu eksperimenata s modulacijom razine aktivnosti SIRT3 utvrđeno je



njegovo protektivno djelovanje na integritet i pravilnu funkciju raznih staničnih tipova i organa (Morigi i sur. 2018; Pinterić i sur. 2021; Pinterić i sur. 2020; Shen i sur. 2021; Sidorova-Darmos i sur. 2018). Uloga SIRT3 u starenju implicirana je u gotovo svim istraživanjima njegove aktivnosti, ali s obzirom na toliko raznoliko djelovanje mehanizmi njegove protektivne naravi još čekaju biti otkriveni.

SIRT3 i njegovi interaktori protektivno djeluju na kronične bolesti bubrega (Wu i sur. 2020). Povećana ekspresija SIRT3 smanjuje upalu, oksidativni stres i apoptozu, a održava i normalnu funkciju mitohondrija u ovom organu (Wang i sur. 2019). Miševi s nedostatkom SIRT3 pokazuju endotelnu disfunkciju praćenu povišenim parametrima oksidativnog stresa i hipoksije koji vode kroničnim stanjima u bubregu (Pezzotta i sur. 2023).

U mozgu je pretpostavljena uloga SIRT3 u održavanju normalnog energetskeg stanja pri niskim razinama glukoze (Sidorova-Darmos i sur. 2018). Također, u astrocitima SIRT3 smanjuje efekt niske razine glukoze tako što prevenira fragmentaciju mitohondrija, promovira deacetilaciju MnSOD i time sprječava nakupljanje ROS-a, te smanjuje upalni fenotip astrocita (Gao i sur. 2022). Metabolomika u miševa s nedostatkom SIRT3 pokazala je opadanje količine glutamina, kreatinina i gama-aminomaslačne kiseline (GABA) u neuronima i glija stanicama u odnosu na divlji tip (Kristian i sur. 2021). S obzirom da je GABA jedan od klasičnih neurotransmitera s inhibicijskom ulogom, ova promjena mijenja i komunikaciju između neurona. Također, miševi bez ekspresije SIRT3 pokazuju smanjen broj neurona u području prednje cingulate kore praćen smanjenom sposobnošću formiranja dugoročnog pamćenja (Kim i sur. 2019). SIRT3 ima protektivno djelovanje na razvoj neurodegenerativnih poremećaja starije dobi poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (Lee i sur. 2018; Zhang i sur. 2016). U modelu Parkinsonove bolesti SIRT3 je povećao preživljavanje stanica, smanjio ukupnu količinu ROS-a, ali i nakupljanje  $\alpha$ -sinukleina (Zhang i sur. 2016). Upravo su oksidativna oštećenja, aktivacija upalnog fenotipa glija stanica, promjene u signalizaciji između neurona, mitohondrijska disfunkcija i nastanak proteinskih nakupina jedni od glavnih obilježja starenja mozga (Mattson i Arumugam 2018) zbog čega je uloga SIRT3 u ovom organu nesumnjivo velika.

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti utjecaj SIRT3 na metaboličko i oksidativno stanje tkiva bubrega i mozga miševa, te utvrditi postoje li spolne razlike u aktivnosti SIRT3.

U analizi metaboličkog utjecaja, fokus je na određivanju direktnog ili indirektnog učinka prisutnosti SIRT3 na ekspresiju specifičnih metaboličkih enzima i transkripcijskih faktora koji reguliraju njihovu ekspresiju. Za ovo istraživanje koristit će se analiza proteinske ekspresije metodom Western blot.

Što se tiče analize oksidativnog stanja, cilj je procijeniti utjecaj SIRT3 na ekspresiju odabranih antioksidativnih enzima i markera oksidativnog stresa, također primjenom metode Western blot. Dodatno, analizirat će se oksidativna oštećenja proteina (karbonilacija proteina) i lipida (lipidna peroksidacija) kako bi se procijenilo ukupno oksidativno stanje tkiva. Konačno, analizom aktivnosti ključnih antioksidativnih enzima, katalaze i superoksid dismutaze, utvrdit će se direktna uloga SIRT3 u antioksidativnoj obrani bubrega i mozga.

Očekuje se da će istraživanje pružiti dokaze o tkivno specifičnim aktivnostima SIRT3 te otkriti značajne spolne razlike u njegovim metaboličkim i oksidativnim funkcijama unutar pojedinih organa.

## **3. Materijali i metode**

### **3.1. Uzorci tkiva**

U ovom diplomskom radu korišteni su uzorci tkiva miševa soja 129S divljeg tipa (kataloški broj: 00664, Jackson Laboratory) i miševa s nedostatkom proteina SIRT3 (kataloški broj: 027975, Jackson Laboratory). Ovi miševi mogu biti korisni u proučavanju uloge oksidacije masnih kiselina u dijabetesu, kardiovaskularnim bolestima, steatozi, gladovanju, izloženosti hladnoći i dugom životnom vijeku. Životinje su uzgojene u Pogonu laboratorijskih životinja Instituta Ruđer Bošković, pri 22°C s 50-70%-tnom vlažnosti zraka. Po tri jedinke držane su u jednom kavezu s pravilnom izmjenom svjetlosti i mraka u trajanju od dvanaest sati. Mužjaci i ženke miševa su uzeti u pokus u dobi od 8 tjedana i do 18 tjedna su hranjeni standardnom prehranom koja se sastoji od 11,4% masti, 62,8% ugljikohidrata i 25,8% proteina (Mucedola).

Po završetku pokusa jedinke su anestezirane intraperitonealnom injekcijom ketamina i ksilazina (Ketamidol 10%, Richter pharma Ag; Xylazine 2%, Alfasan International). Izolirani su uzorci bubrega i mozga pohranjeni u tekućem dušiku do daljnjih analiza. Projekt je financirala Hrvatska zaklada za znanost (projektna identifikacija: IP-014-09-4533), a sve navedene procedure odobrilo je Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (UP/I-322-01/15-01/25 525-10/0255-15-2). Procedure su provedene u skladu s direktivom 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća.

Ovako pripremljene organe podijelila sam s obzirom na spol (mužjaci i ženke) i prisutnost proteina SIRT3 (divlji tip, engl. *wild-tipe*, WT; te s nedostatkom, engl. *knock-out*, KO) u četiri skupine: SIRT3 WT ženke, SIRT3 WT mužjaci, SIRT3 KO ženke te SIRT3 KO mužjaci. Svaka skupina predstavljena je sa po četiri jedinke, pa sam analizirala ukupno 16 uzoraka po organu.

## **3.2. Priprema homogenata tkiva mozga i bubrega**

### 3.2.1. Homogenizacija uzoraka

Uzorke organa prikupila sam iz tekućeg dušika u kojem su bili pohranjeni. Ovisno o eksperimentu, skalpelom sam odvojila komadić tkiva organa i pohranila ga u odgovarajući pufer. Ostatak organa pohranjen je u tekući dušik do daljnjeg korištenja. Tako dobivene uzorke homogenizirala sam pomoću homogenizatora (Potter S Homogenizer, B. Braun Biotech International) pri 1300 rpm tijekom tri minute za uzorke mozga, te tijekom jedne minute za uzorke bubrega. Homogenat sam prebacila u Eppendorf epruvetice od 1,5 mL i sonicirala 2 puta po 30 sekundi pri pripremi proteinskog ekstrakta, odnosno 3 puta po 30 sekundi pri pripremi ekstrakta lipida. Sonicirala sam pomoću ultrazvučne sonde veličine 1 mm uz amplitudu od 80% i ciklus 1 (Labsonic, Biotech International) na ledu. Sonicirane uzorke centrifugirala sam 20 min na 16000 g pri 4 °C i supernatant prebacila u novu Eppendorf epruveticu od 1,5 mL. Dio tako dobivenih uzoraka koristila sam za određivanje koncentracije proteina metodom BCA (engl. *bicinchonic acid protein assay*), a ostatak sam odmah koristila u eksperimentima.

Kod izolacije proteina za Western blot u uzorke mozga nakon centrifugiranja dodala sam Triton X-100 (Sigma-Aldrich) u konačnoj koncentraciji 1% te dobro resuspendirala. Uzorke sam inkubirala 45 minuta pri 4 °C i zatim centrifugirala 15 min na 12000 g pri 4 °C. Tako dobiveni

supernatant prebacila sam u novu Eppendorf epruveticu od 1,5 mL i pohranila na -20°C do korištenja.

### 3.2.2. Mjerenje koncentracije proteina metodom BCA

Analiza BCA koristi se za određivanje koncentracije proteina u uzorku kako bi se u nizvodnim eksperimentima svi uzorci mogli normalizirati s obzirom na nju. Uzorke pripremljenih supernatanta razrijedila sam u fosfatnom puferu (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; engl. *phosphate buffered saline, PBS*). Uzorke sam razrijedila ovisno o nizvodnom eksperimentu. Kao standard sam koristila rastuće koncentracije otopine albumina iz goveđeg seruma (koncentracije: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL i 0,06 mg/mL). Na mikrotitarsku pločicu od 96 jažica u duplikatu sam nanijela po 25 µL razrijeđenog uzorka, slijepe probe (PBS) i standarda. U svaku jažicu dodala sam po 200 µL BCA reagensa (reagens A i B u omjeru 50:1; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Uzorke sam inkubirala 30 minuta pri 37°C, nakon čega sam izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini  $\lambda=570$  nm na čitaču ELISA (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group). Korištenjem vrijednosti apsorbancije standarda konstruirala sam standardnu krivulju, a pomoću njene jednadžbe odredila koncentracije proteina u uzorku. Obradu sam provela u programu Excel.

### 3.3. Određivanje oštećenja proteina

Oksidativna oštećenja proteina odredila sam mjerenjem prisustva karbonilnih skupina na proteinima pomoću ELISA-e (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Ova metoda temelji se na reakciji proteina i otopine 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH). U reakciji DNPH reagira s karbonilnim skupinama na aminokiselinskim ostacima lizina, arginina, prolina i treonina (koji nastaju uslijed oksidativnog oštećenja proteina) tvoreći stabilne derivate dinitrofenilhidrazona (DNP). DNP spojevi mogu se odrediti pomoću specifičnog anti-DNP protutijela čime se oksidativno oštećenje proteina može kvantificirati.

### 3.3.1. Priprema uzoraka

Proteine sam izolirala prema protokolu opisanom u poglavlju 1.2. pri čemu sam 10%-tne homogenate bubrega i mozga pripremila u PBS-u s inhibitorima proteaza (cOmplete<sup>TM</sup> EDTA-free EASYpack, Roche). Za provedbu mjerenja koncentracije proteina metodom BCA homogenate sam razrijedila 25× u fosfatnom puferu, a zatim sam uzorke razrijedila do masene koncentracije od 10 µg/mL i nanijela po 100 µL uzoraka na pločicu za ELISA-u s 96 jažica (Maxisorp 96 wells, Sigma Aldrich). Pločicu sam ostavila preko noći pri 4°C kako bi se proteini vezali na dno jažice.

### 3.3.2. Određivanje oksidativnih oštećenja proteina metodom baziranoj na ELISA-i

Idućeg sam dana jažice isprala dva puta s 200 µL pufera za ispiranje I (sastav ovog pufera i drugih otopina prikazan je u Tablici 1) nakon čega sam dodala 200 µL derivacijske otopine (DNPH). Nakon inkubacije od 45 minuta pri sobnoj temperaturi, jažice sam isprala s tri puta po 200 µL pufera za ispiranje II te 3 puta s po 200 µL pufera za ispiranje I. Jažice sam inkubirala 1 sat u 250 µL pufera za blokiranje pri sobnoj temperaturi uz trešnju (300 rpm; Thermomixer, Eppendorf). Zatim sam inkubirala uzorke u 100 µL primarnog protutijela 2 sata pri sobnoj temperaturi uz trešnju (300 rpm; Thermomixer, Eppendorf). Nevezana primarna protutijela uklonila sam tijekom četiri ispiranja s 200 µL pufera za ispiranje III, a zatim dodala po 100 µL sekundarnog antitijela (inkubirano 1 sat pri sobnoj temperaturi uz trešnju na 300 rpm; Termomixer, Eppendorf). Ispiranje sekundarnog protutijela provela sam 4 puta s 200 µL pufera za ispiranje III.

Razvijanje obojenja u jažicama potaknula sam dodatkom 100 µL otopine supstrata peroksidaze, a reakciju sam zaustavila dodatkom 100 µL otopine STOP. Apsorbanciju sam očitala na čitaču pločica (LabSystem Multiskan MS, Artisan Technology group) pri valnoj duljini od 450 nm.

**Tablica 1.** Popis otopina korištenih prilikom određivanja oksidativnih oštećenja proteina.

Naziv otopine	Sadržaj otopine	Proizvođač
Pufer za ispiranje I	1 × PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	/
Pufer za ispiranje II	1 × PBS : 96% etanol (50 : 50)	Kemika
Pufer za ispiranje III	1 × PBS + 0,1% Tween 20	Sigma-Aldrich
Otopina DNPH	DNPH + 3-fluorocetna kiselina ( $\gamma = 20$ mg/mL)	Sigma-Aldrich
DNPH derivacijska otopina	DNPH otopina razrijeđena u 1 × PBS-u ( $\gamma = 0,5$ mg/mL, pH =6,0-6,5)	/
Pufer za blokiranje	I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent	Invitrogen
STOP otopina	0,3 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Primarno protutijelo na DNP (poliklonalno)	<i>rabbit anti-DNP primary antibody</i> , (D9656) : pufer za blokiranje (1:8000)	Sigma-Aldrich
Sekundarno protutijelo s konjugiranom peroksidazom	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate (1706515): Pufer za Blokiranje (1:4000)	Bio-Rad
Otopina supstrata peroksidaze (otopina TMB)	3,3',5,5-tetrametilbenzidina	Sigma-Aldrich

### 3.4. Određivanje oštećenja lipida

Oksidativna oštećenja lipida nastaju lipidnom peroksidacijom i njihov produkt su razni reaktivni spojevi. Najpoznatiji među njima, koji se često koristi za kvantifikaciju oksidativnog oštećenja lipida, je malondialdehid (MDA). Za detekciju prisutnosti i količine ovog spoja koristi se tiobarbiturna kiselina (TBA) koja u reakciji s MDA formira adukte MDA-TBA<sub>2</sub> crveno-ružičaste boje nazvane TBARS-i (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*). Razvijeno obojenje može se mjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 532 nm ili fluorimetrijski na valnim duljinama 532/553 nm. Detektirane razine oštećenja pojedinih uzoraka normaliziraju se pomoću standardne krivulje koncentracije proteina dobivene metodom BCA.

#### 3.4.1. Priprema uzoraka i standarda

Pripremila sam 5%-tne homogenate bubrega i mozga u 1,15%-tnom KCl-u (Kemika) prema protokolu navedenom u sklopu poglavlja 1.2. Pri određivanju koncentracije proteina metodom BCA uzorke sam dodatno razrijedila 10× u fosfatnom puferu. Kao standard koristila sam serijska razrjeđenja otopine TMP-a (100 mM otopina 1,1,3,3-tetrametoksi propanona u 96-postotnomnom etanolu) u destiliranoj vodi u rasponu od 10 do 0,06 μM.

#### 3.4.2. Određivanje oksidativnog oštećenja lipida metodom TBARS

U 200 μL uzoraka i 200 μL standarda dodala sam po 200 μL 2%-tnog natrijevog dodecil sulfata (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS). Nakon kratkog vorteksiranja uzorke sam inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Na sve uzorke dodala sam 500 μL TBA reagensa (TBA u 1:1 otopini octene kiseline u destiliranoj vodi; c = 28,5 mM, pH = 3,5). Nakon kratkog vorteksiranja uzorke sam inkubirala 1 sat pri 95°C na termobloku (Thermomixer, Eppendorf), ohladila pri sobnoj temperaturi pa centrifugirala 10 minuta na 4000 g pri sobnoj temperaturi. Supernatant i standard nanijela sam u duplikatu volumena 200 μL na pločicu s 96 jažica. Fluorescenciju sam očitala na čitaču pločica (Tecan Infinite M Nano+, Tecan) pri 532/553 nm. Korištenjem vrijednosti fluorescencije MDA standarda konstruirala sam standardnu krivulju, a njenu jednadžbu primijenila sam za izračun koncentracije adukta MDA-TBA (TBARS-a) u uzorku. Dobivene rezultate normalizirala sam na nmol TBARS/mg proteina koristeći koncentracije proteina u uzorku dobivene metodom BCA.

### 3.5. Određivanje ekspresije proteina metodom Western blot

Western blot je semikvantitativna metoda za određivanje udjela pojedinih proteina u uzorku, odnosno proteinske ekspresije. Metoda je pogodna za korištenje na uzorcima proteina staničnih kultura, organa, izvanstranične tekućine i drugih uzoraka koji sadrže proteine. Za provedbu metode proteini se denaturiraju dodatkom nabijenog deterdženta (SDS-a) koji proteinima nanosi jednoliki negativni naboj ovisno o veličini molekule. Zbog toga se proteini razdvajaju elektroforezom u električnom polju, pri čemu se manji proteini kreću prema anodi brže od proteina veće molekulske mase. Proteini se zatim prenose na membranu za vizualizaciju prvo ukupnih proteina u uzorku, a nakon vezanja specifičnih protutijela i proteina od interesa. Robusnost metode

povećava dezintrometrijska obrada fotografija membrana u kojoj se količina proteina svih uzoraka normalizira i time omogućuje jednolika i objektivna obrada podataka.

### 3.5.1. Izolacija proteina

Homogenaciju i izolaciju proteina provela sam prema protokolu priloženom u poglavlju 1.2. pri čemu su homogenati bubrega i mozga bili 10%-tni, odnosno 20%-tni. Homogenati su pripremljeni u puferu RIPA (50 mM Tris pufer, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 12 mM Na-deoksikolat, 1% Triton) s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche). Za određivanje koncentracije proteina metodom BCA uzorke sam dodatno razrijedila 50× u fosfatnom puferu.

### 3.5.2. Razdvajanje proteina u uzorku temeljem veličine

Razdvajanje izoliranih proteina na temelju mase provela sam denaturirajućom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE).

Složila sam sustav za izlivanje gelova (Mini-PROTEAN Tetra; BIO-RAD) za gel debljine 1,5 mm. Poliakrilamidni gel sastojao se od dva dijela: 4%-tnog gornjeg gela za sabijanje te 10%-tnog donjeg gela za razdvajanje. Nakon pripreme donjeg gela (Tablica 2.) otopinu sam pomoću pipete ulila u sustav za izlivanje. Na vrh nepolimeriziranog gela dodala sam 1 mL 2-izopropanola (Sigma-Aldrich) kako bih spriječila isušivanje tijekom 30-minutne polimerizacije gela. Nakon polimerizacije uklonila sam izopropanol te ulila smjesu gornjeg gela (Tablica 3.). Neposredno nakon toga između stakalaca sam umetnula češljic s 15 jažica te ostavila polimerizirati 30 minuta.

**Tablica 2.** Sastav smjese 10%-tnog poliakrilamidnog gela za razdvajanje za 1,5 mm široki gel za aparaturu za vertikalnu elektroforezu.

Sastojak	Volumen (mL)
4x Tris-HCl	3,75
H <sub>2</sub> O	6,25
akrilamid (Sigma Aldrich)	5
APS (Sigma Aldrich)	0,15
TEMED (Sigma Aldrich)	0,015



**Tablica 3.** Sastav smjese 4%-tnog poliakrilamidnog gela za sabijanje za 1,5 mm široki gel za aparaturu za vertikalnu elektroforezu.

Sastojak	Volumen (mL)
4x Tris-HCl	1,25
H <sub>2</sub> O	3
akrilamid (Sigma Aldrich)	0,75
APS (Sigma Aldrich)	0,025
TEMED (Sigma Aldrich)	0,005

Iz polimeriziranih gelova pažljivo sam uklonila češljic te složila aparaturu za vertikalnu elektroforezu (Mini-PROTEAN Tetra; BIO-RAD) uz dodatak pufera za elektroforezu (sastav 10× pufera: 30 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS, pH=8,5). Proteini su za nanošenje razrijeđeni u PBS-u do koncentracije od 1 µg/µL te je na 16 µL uzorka proteina dodano 4 µL plave boje za nanošenje (sastav 5× koncentrata boje: 312,5 mM gornji pufer za gel, 12% SDS, 30% glicerol, 0,2% bromfenol plava, 1,716 M merkaptioetanol). Prije nanošenja na gel proteine sam inkubirala 10 minuta na 95°C. U jažice sam nanijela proteinski marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BIO-RAD) u volumenu 3 µL te po 20 µL uzoraka proteina.

U prvih 30 minuta fronta proteina prolazi kroz gel za sabijanje pri čemu električni napon treba iznositi 80 V, a jačina struje između 0,03 i 0,06 ampera. Nakon toga, proteini ulaze u gel za razdvajanje gdje sam napon pojačala na 120 V do dolaska plave fronte do dna gela (oko 1 sat i 30 minuta).

### 3.5.3. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu PVDF

Po završetku SDS-PAGE elektroforeze s gela sam uklonila gel za sabijanje. Gel za razdvajanje sam isprala u puferu za prijenos (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol, pH=8,5) sa svrhom uklanjanja zaostalih komponenti pufera za elektroforezu. Pripremila sam membranu PVDF (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, BIO-RAD) dimenzija gela za razdvajanje te ju aktivirala kratkom inkubacijom u metanolu, nakon čega sam i nju prebacila u pufer za prijenos. Složila sam kazetu aparature za prijenos (Mini Trans-Blot Module; BIO-RAD)

prema navedenom redosljedu: spužvica, filter papir, membrana, gel, drugi filter papir i spužvica (gledano od crvene prema crnoj strani). Prilikom postavljanja gela na membranu valjkom sam istisnula zrak zaostao između membrane i gela koji inače sprječava prijenos na membranu. U aparaturu za prijenos složila sam po dvije kazete, ulila pufer za prijenos te pokrenula prijenos pri 100 mA tijekom 18 sati pri 4°C.

#### 3.5.4. Vizualizacija ukupnih proteina i imunodetekcija proteina od interesa

Po završetku prijenosa membranu sam isprala tijekom 10 minuta u PBS-u uz trešnju na klackalici (300 rpm, Rocker25, Labnet), a zatim je inkubirala 30 sekundi u otopini za bojenje (0,1% (m/V) Amido black 10B, 20% metanol, 2% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O). Odbojavanje sam provela u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) dva puta po 30 minuta. Time su postali vidljivi položaji i intenzitet ukupnih proteina prisutnih na membrani koje sam fotografirala na uređaju za vizualizaciju (Alliance Q9 mini Imaging System; UVITEC).

Zatim sam membranu isprala od octene kiseline 4 puta po 2 minute u ReH<sub>2</sub>O. Nakon toga sam onemogućila nespecifično vezanje proteina za membranu inkubacijom u otopini za blokiranje (I-Block™ Protein-Based Blocking Reagent; Invitrogen) 1 sat pri sobnoj temperaturi uz trešnju (300 rpm Rocker25, Labnet). Na membranu sam nanijela željeno primarno protutijelo (Tablica 4.) koje sam inkubirala preko noći uz trešnju (300 rpm Rocker25, Labnet) pri 4°C.

Nakon inkubacije u primarnom protutijelu membranu sam isprala tri puta po 10 minuta u puferu TNT (TN pufer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, dH<sub>2</sub>O; 0,1% Triton-X) i inkubirala je u sekundarnom protutijelu 1 sat na sobnoj temperaturi uz trešnju (300 rpm Rocker25, Labnet). Po završetku membranu sam ponovno isprala tri puta po 10 minuta u puferu TNT.

Razvijanje signala na mjestima vezanja sekundarnog protutijela potaknula sam nanošenjem kemiluminiscentnog supstrata ECL (PerkinElmer, SAD, Pierce). Nakon pripreme (otopina A: otopina B = 1:1), supstrat sam nanijela na membranu u volumenu 500 µL te inkubirala jednu minutu. Razvijanje kemiluminiscencije i fotografiranje provela sam pomoću uređaju za vizualizaciju (Alliance Q9 mini Imaging System; UVITEC). Dobivene fotografije obradila sam u programu Corel PainShop Pro2023, a jačinu signala proteina izmjerila sam u programu ImageLab 6.1 (BIO-RAD). Kako bi se različiti gelovi mogli međusobno uspoređivati na svaki gel nanijela

sam kontrolne uzorke za oba organa. Za kontrolne uzorke koristila sam mješavinu proteinskih izolata uzoraka WT mužjaka u jednakim udjelima.

**Tablica 4.** Popis primarnih i sekundarnih protutijela i njihovih svojstava korištenih pri određivanju ekspresije proteina metodom Western blot.

	<b>Protutijelo</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Razrjeđenje</b>
<b>Primarna protutijela</b>	SIRT3 (F-10)	Cell signaling	kunić	1:2000
	SOD1 (ab16831)	Abcam	kunić	1:4000
	SOD2 (ab13533)	Abcam	kunić	1:8000
	AcSOD(ab137037)	Abcam	kunić	1:2000
	CAT (ab1877)	Abcam	kunić	1:16000
	HO1 (ab52947)	Abcam	kunić	1:1000
	PGC1alfa (NBP1-04676)	Novus	kunić	1:1000
	HADHB (C-6)	Santa Cruz Biotechnology (sc-271496)	miš	1:1000
	FASN (G-11)	Santa Cruz Biotechnology (sc-48357)	miš	1:1000
	Total OXPHOS Blue Native WB Antibody Cocktail (ab110412)	Abcam	miš	1:6000
	LDH (H-160)	Santa Cruz Biotechnology (sc-33781)	kunić	1:4000
	PPAR $\gamma$ (H-100)	Santa Cruz Biotechnology (sc-7196)	kunić	1:1000
	<b>Sekundarna protutijela</b>	HRP konjugat, protutijela na miša (L005680 A)	BIO-RAD (L005680 A)	koza
HRP konjugat, protutijela na zeca (L005679 B)		BIO-RAD (L005679 B)	koza	1:5000

### 3.6. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Osim provjere ekspresije antioksidativnih enzima važno je napraviti i procjenu njihove aktivnosti kako bi se utvrdila podložnost tkiva oksidativnom stresu. U istraživanju sam provjerila aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD), najvažnijih antioksidativnih enzima u stanicama. Ovi enzimi svojom aktivnošću smanjuju količinu ROS-a konvertirajući kisikov superoksid preko vodikova peroksida u kisik i vodu. Time smanjuju utjecaj ROS-a, a posljedično i oštećenja tkiva.

#### 3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

10%-tne homogenate bubrega i mozga pripremila sam u PBS-u s inhibitorima proteaza (cOmplete™ EDTA-free EASYpack, Roche) prema protokolu priloženom u poglavlju 1.2. Nakon provedene BCA analize, za koju su uzorci razrijeđeni u fosfatnom puferu 25×, pripremila sam uzorke proteina u koncentraciji 0,15 μg/μL za detekciju ukupnog SOD te 7.5 μg/μL za detekciju MnSOD-a.

Aktivnost SOD-a u uzorku odredila sam korištenjem kompleta RANSOD (Randox Laboratories). U ovom kompletu se za generiranje superoksidnih radikala koristi reakcija ksantina i ksantin oksidaze. Superoksidni radikali reduciraju 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolijev klorid (I.N.T.) stvarajući ljubičasto obojeni formazan koji se može detektirati pri 505 nm. Ipak, SOD svojom aktivnošću uklanja superoksidne radikale i time onemogućava razvijanje obojenja.

Pripremila sam otopine ksantina i I.N.T-a (R1A + R1B), ksantin oksidaze (R2) i standarda (CAL) prema uputama proizvođača. Na pločicu s 96 jažica nanijela sam po 5 μL standarda u duplikatima te 5 μL uzoraka u triplikatima. Na sve uzorke dodala sam 170 μL otopine R1A + R1B i promiješala 1 minutu. Zatim sam dodala po 25 μL otopine R2 i pločicu stavila u uređaj za očitavanje pločica (Tecan Infinite M Nano+, Tecan) koji je pločicu lagano miješao 30 sekundi i očitao apsorbanciju pri 505 nm neposredno nakon miješanja te nakon tri minute. U uzorke za detekciju MnSOD-a dodala sam 8 mM KCN u omjeru 1:1 i inkubirala 30 minuta (KCN specifično inhibira CuZnSOD). Nakon toga ponovila sam postupak kao s prvom pločicom. U konačnici sam

tako dobila aktivnosti ukupnog i MnSOD-a, a razlika u tim vrijednostima predstavlja aktivnost CuZnSOD-a.

### 3.6.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Pripremila sam 10%-tne homogenate bubrega i mozga u PBS-u (43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7) prema protokolu priloženom u poglavlju 1.2, pritom su za provođenje metode BCA uzorci dodatno razrijeđeni u fosfatnom puferu 25×. Uzorke bubrega razrijedila sam 500 puta, a mozga 10 puta i po 500 μL razrijeđenog uzorka dodala u dvije kvarcne kivete volumena 1 mL. U prvu kivetu dodala sam 250 μL PBS-a što je bila slijepa proba za spektrofotometar. Zatim sam u drugi uzorak dodala 250 μL otopine supstrata katalaze (10 mM otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS-u) i odmah zapisala vrijednost apsorbancije pri 240 nm koju je očitao spektrofotometar. Nakon 30 sekundi zabilježila sam novu vrijednost apsorbancije pri 240 nm.

Izmjerila sam apsorbancije uzoraka vodikova peroksida (52.47 mM, 35 mM, 28 mM, 21 mM, 14 mM, 7 mM, 3.5 mM) i konstruirala baždarni pravac pomoću kojeg sam izračunala količinu preostalog vodikova peroksida nakon inkubacije u otopini proteina čime sam utvrdila aktivnost katalaze. Sve izračune provela sam u sklopu Excel-a.

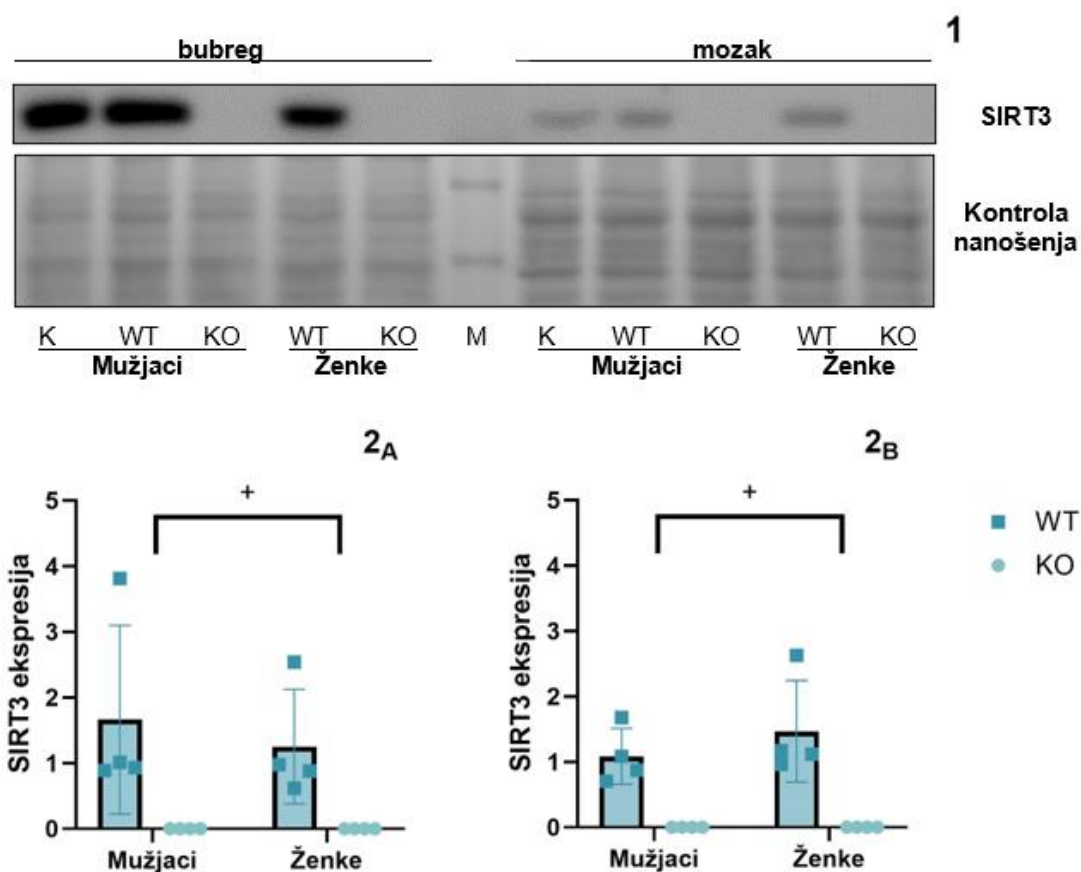
### 3.7. Statistička obrada rezultata

Dobivene podatke statistički sam obradila u programu *IBM SPSS Statistics for Windows* (20.0.2.0.) prema protokolu iz Laerd Statistic, 2017. Podatke sam analizirala dvosmjernom analizom varijanci na transformiranim vrijednostima, uz Bonferronijev post-hoc test za određivanje interakcije genotipa i spola, uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . U slučaju statističkog značaja jednostavnog glavnog efekta na ovisnu varijablu, napravila sam *post-hoc* analizu kako bih utvrdila gdje postoji razlika.

## 4. Rezultati

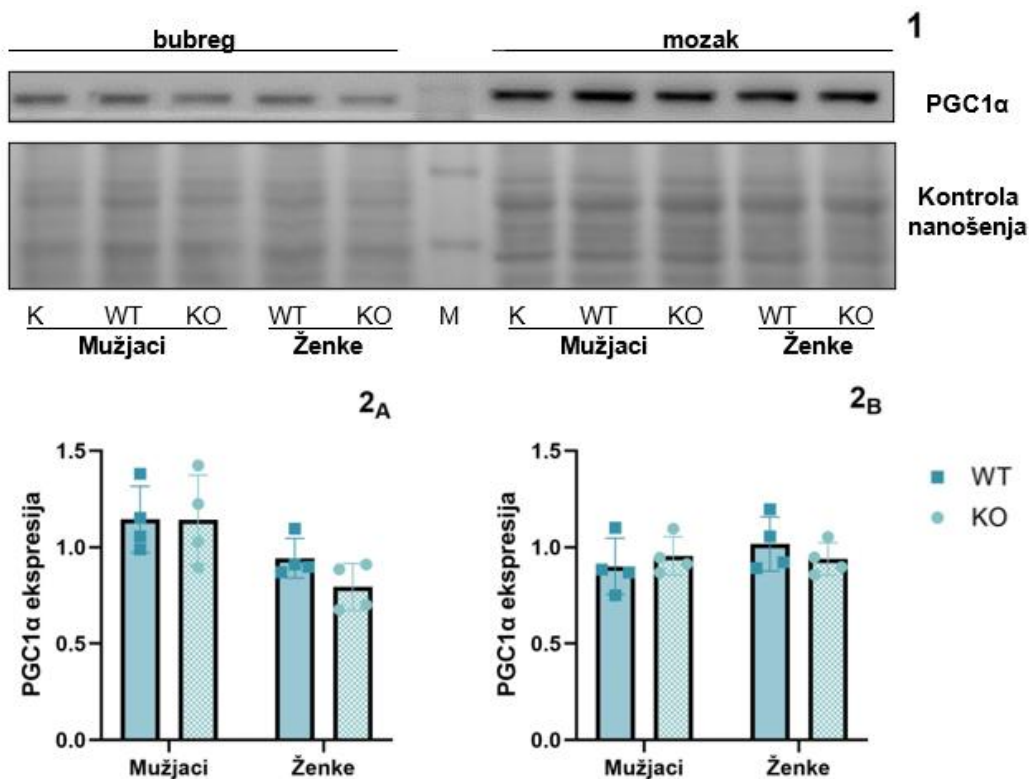
### 4.1. Ekspresija SIRT3 i PGC1 $\alpha$

Analizirana je ekspresija proteina SIRT3 u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. S obzirom da u uzorcima KO nema ekspresije SIRT3 razlika u odnosu na WT uzorke je statistički značajna u oba organa. Bubrege je pokazao znatnu veću ekspresiju proteina SIRT3 u odnosu na mozak. (Slika 1.)



**Slika 1.** Proteinska ekspresija SIRT3 u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije membrane PVDF s vizualiziranim proteinom SIRT3. 2) Grafički prikaz ekspresije SIRT3 u bubregu (A) i mozgu (B). + p < 0,05 (razlike WT i KO uzoraka). Two-way Anova s Bonferonni post-hoc testom provedena je kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

S obzirom da je SIRT3 pod kontrolom peroksisom-proliferator-aktiviranog receptora gama koaktivatora 1 alfa (PGC1 $\alpha$ ), glavnog regulatora mitohondrijske biogeneze, istražena je ekspresija PGC1 $\alpha$  u bubregu i mozgu. U bubregu ekspresija nije pokazala statistički značajne razlike. Ipak, uočen je trend prema kojem ekspresija PGC1 $\alpha$  opada u ženki KO, dok je u mužjaka neovisna o genotipu. U mozgu također nisu uočene statistički značajne razlike. Mozak pokazuje veću ekspresiju PGC1 $\alpha$  u odnosu na bubreg (Slika 2.)



**Slika 2.** Proteinska ekspresija PGC1 $\alpha$  u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije membrane PVDF s vizualiziranim proteinom PGC1 $\alpha$ . 2) Grafički prikaz ekspresije PGC1 $\alpha$  u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

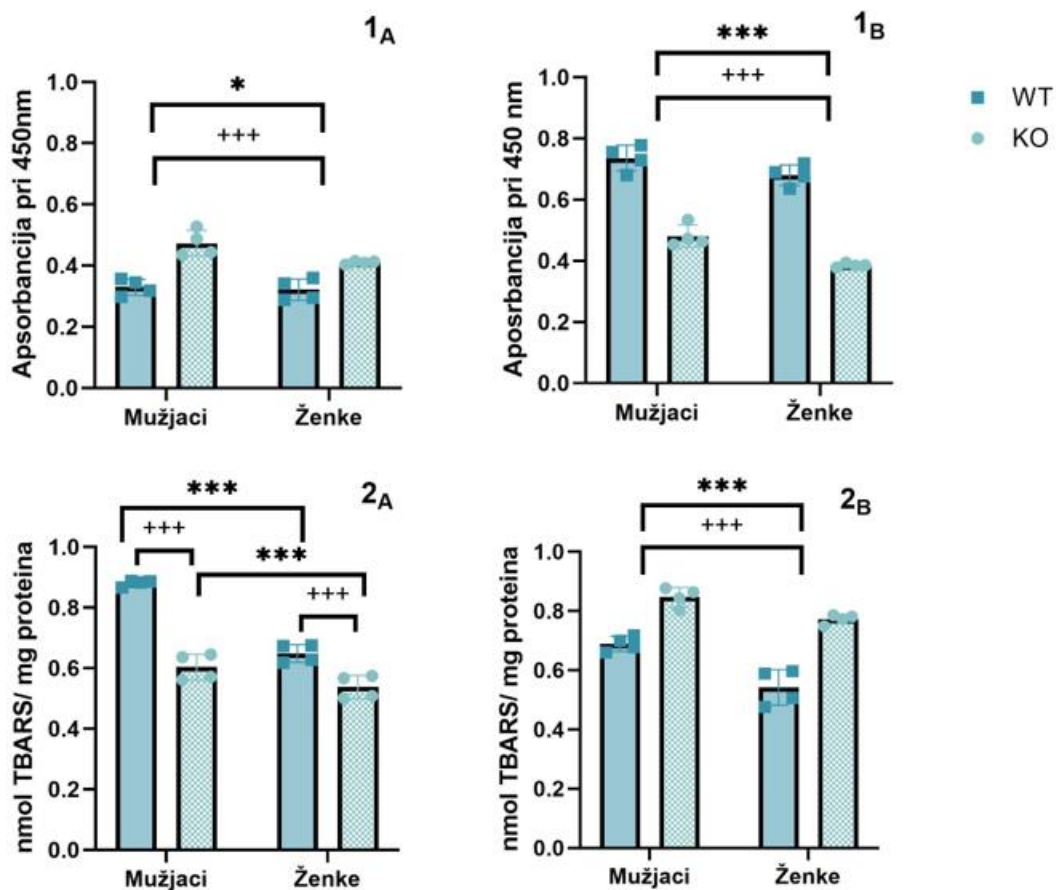
#### 4.2. Utjecaj SIRT3 na oksidativna oštećenja tkiva

U svrhu utvrđivanja utjecaja SIRT3 na podložnost oksidativnom stresu u tkivima bubrega i mozga provedena je analiza proteinskih karbonila (mjera oksidativnog oštećenja proteina) te lipidna peroksidacija (mjera oksidativnog oštećenja lipida).

U bubregu nedostatak SIRT3 uzrokuje značajan porast oštećenja proteina u oba spola. Ženke pokazuju manji stupanj oštećenja u odnosu na mužjake neovisno o genotipu. U mozgu WT uzorci pokazuju značajno veću razinu oštećenja u odnosu na KO uzorke. Ženke pokazuju značajno manji stupanj oštećenja u odnosu na mužjake neovisno o genotipu. (Slika 3. 1)

U bubregu oštećenja lipida ovise o kumulativnom djelovanju prisutnosti SIRT3 i spola jedinke. Nedostatak SIRT3 uzrokuje značajno smanjenje oštećenja lipida kako u mužjaka tako i u ženki. Mužjaci pokazuju značajno veća oštećenja lipida od ženki i u WT i u KO uzorcima. U mozgu mužjaci također pokazuju značajno veća oštećenja od ženki neovisno o genotipu, a odsutnost SIRT3 uzrokuje značajan porast u oštećenjima lipida bez obzira na spol jedinke. (Slika 3.2)





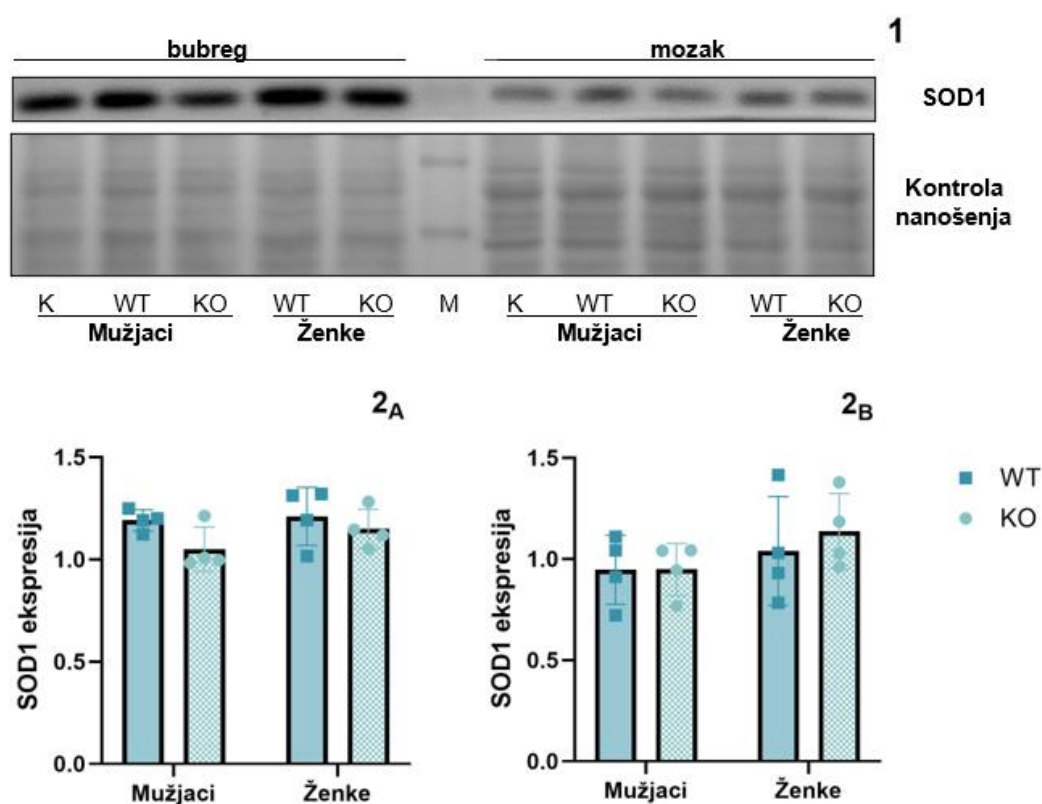
**Slika 3.** Oksidativna oštećenja proteina i lipida u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Grafički prikaz karbonilacije proteina mjereno pri 450 nm u bubregu (A) i mozgu (B). 2) Grafički prikaz količine produkata lipidne peroksidacije mjerene pri 532 nm u bubregu (A) i mozgu (B). \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  (razlike ženki i mužjaka); +++  $p < 0,001$  (razlike WT i KO uzoraka). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

### 4.3. Utjecaj SIRT3 na antioksidativne enzime i redoks regulaciju tkiva

U svrhu detaljnije analize utjecaja SIRT3 na oksidativno stanje u tkivima napravljena je analiza ekspresije antioksidativnih enzima popraćena analizom njihove aktivnosti.

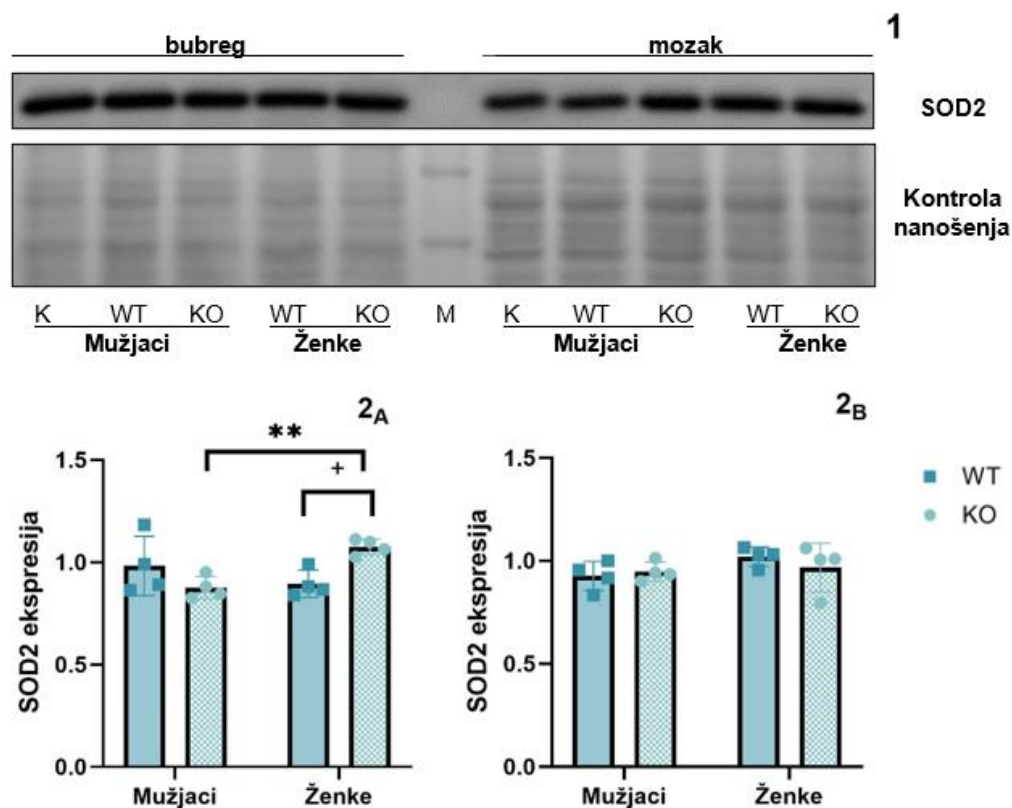
#### 4.3.1. Ekspresija antioksidativnih enzima

Nije dokazana statistički značajna razlika između WT i KO uzoraka u ekspresiji superoksid dismutaze 1 (SOD1), jednog od glavnih antioksidativnih enzima u stanci. Ipak je uočen uzorak u kojem bubreg pokazuje veću ekspresiju proteina SOD1 u odnosu na mozak. (Slika 4.)



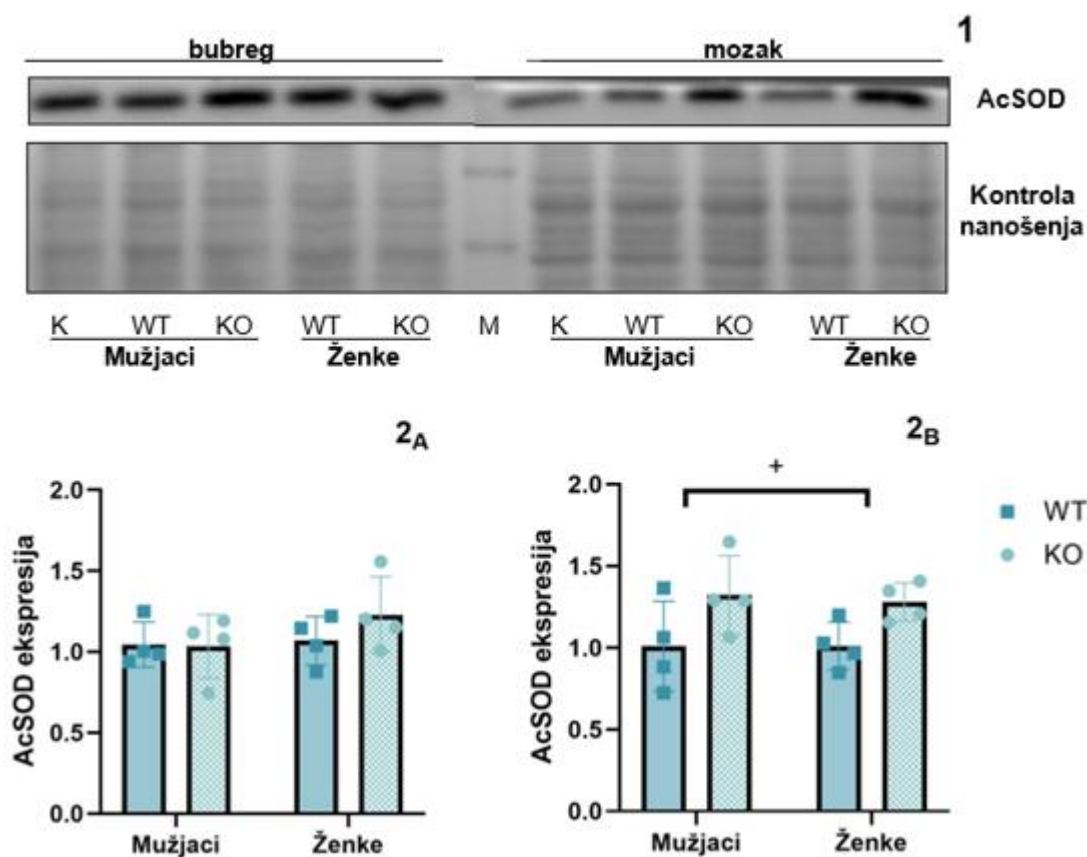
**Slika 4.** Proteinska ekspresija SOD1 u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom SOD1. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina SOD1 u bubregu (A) i mozgu (B). \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

U analizi ekspresije superoskid dismutaze 2 (SOD2) bubrega u ženki je uočena značajno viša ekspresija u uzoraka s gubitkom SIRT3 u odnosu na divlji tip. Također, KO ženke imaju značajno višu ekspresiju od KO mužjaka. U mozgu ekspresija SOD2 nije ovisna o spolu i prisutnosti SIRT3. (Slika 5.)



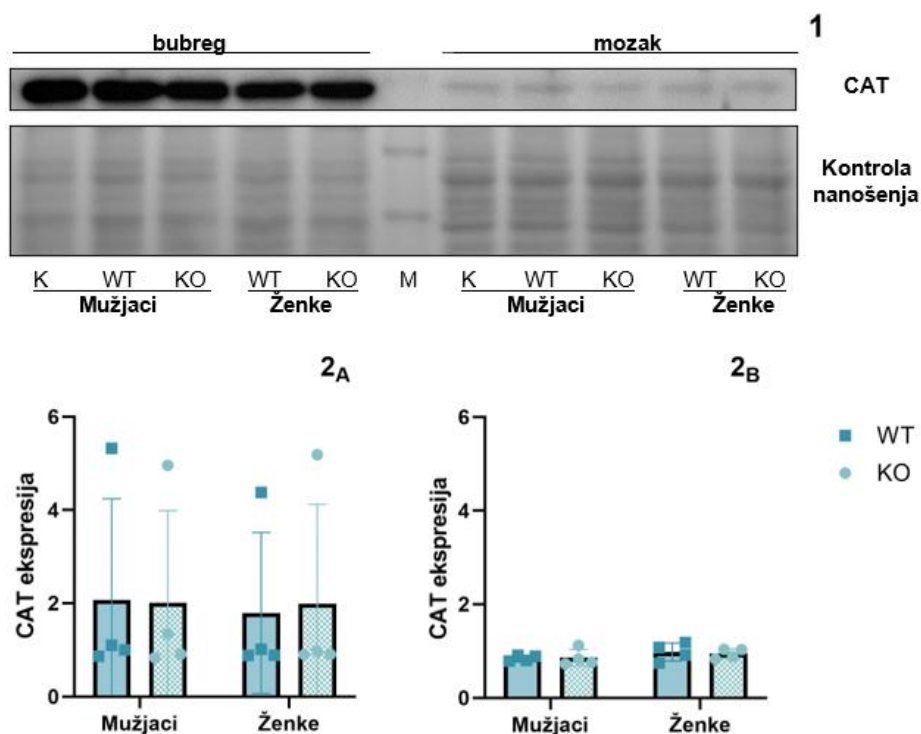
**Slika 5.** Proteinska ekspresija SOD2 u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom SOD2. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina SOD2 u bubregu (A) i mozgu (B). \*\*  $p < 0,01$  (razlika između mužjaka i ženki), +  $p < 0,05$  (razlika između WT i KO uzoraka). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

Analizirana je i količina acetiliranog, inaktiviranog SOD-a (AcSOD) u uzorcima. U bubregu niti spol niti prisutnost SIRT3 nisu utjecali na količinu acetiliranog SOD-a. S druge strane, u uzorcima mozga prisutnost SIRT3 igrala je značajnu ulogu u količini AcSOD-a pri čemu KO uzorci imaju značajno višu prisutnost od uzoraka WT neovisno o spolu. (Slika 6.)



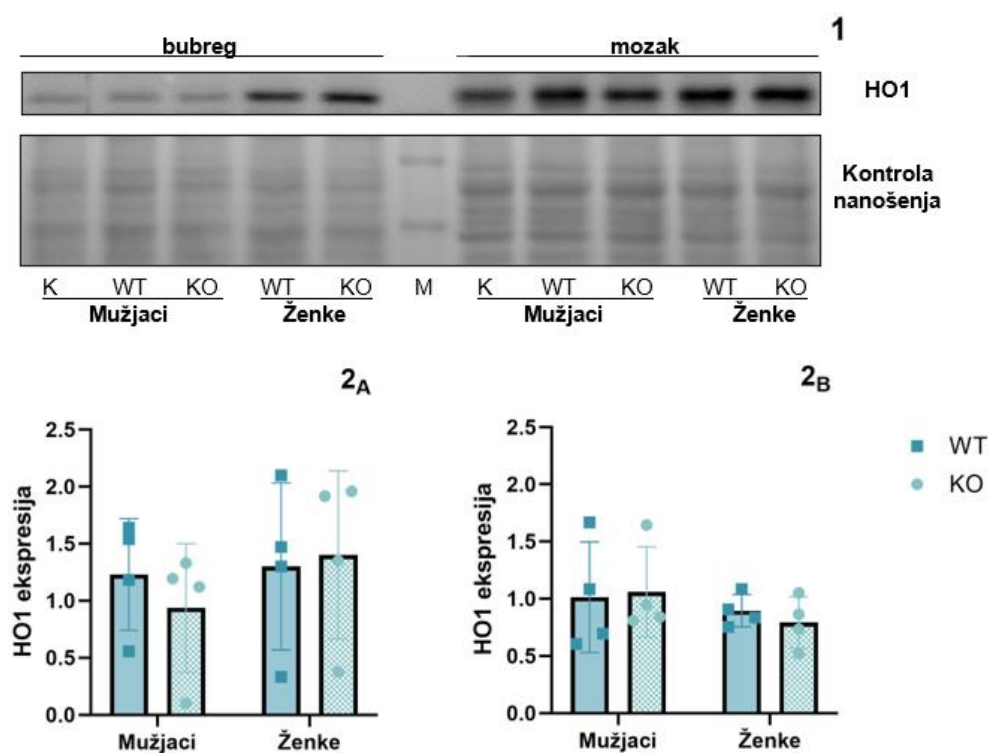
**Slika 6.** Proteinska ekspresija AcSOD u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom SOD1. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina AcSOD u bubregu (A) i mozgu (B). +  $p < 0,05$  (razlika između WT i KO uzroaka). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

U bubregu je zabilježena jednolika ekspresija katalaze (CAT) neovisna o spolu i prisutnosti SIRT3. U mozgu ekspresija proteina CAT također ne ovisi o analiziranim parametrima. Mozak ima manju ekspresiju proteina CAT u odnosu na bubreg. (Slika 7.)



**Slika 7.** Proteinska ekspresija CAT u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom CAT. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina CAT u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

Analizirana je i ekspresija hem oksigenaze 1 (HO1), markera oksidativnog stresa. Iako niti u jednom organu nije pokazana statistički značajna razlika u ekspresiji HO1 neovisno o analiziranim parametrima uočena su velika odstupanja količine ovog proteina unutar pojedine skupine zbog čega bi se analiza trebala provesti na većem broju uzoraka. Bubrež ima manju ekspresiju proteina HO1 u odnosu na mozak (Slika 8.).



**Slika 8.** Proteinska ekspresija HO1 u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom HO1. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina HO1 u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

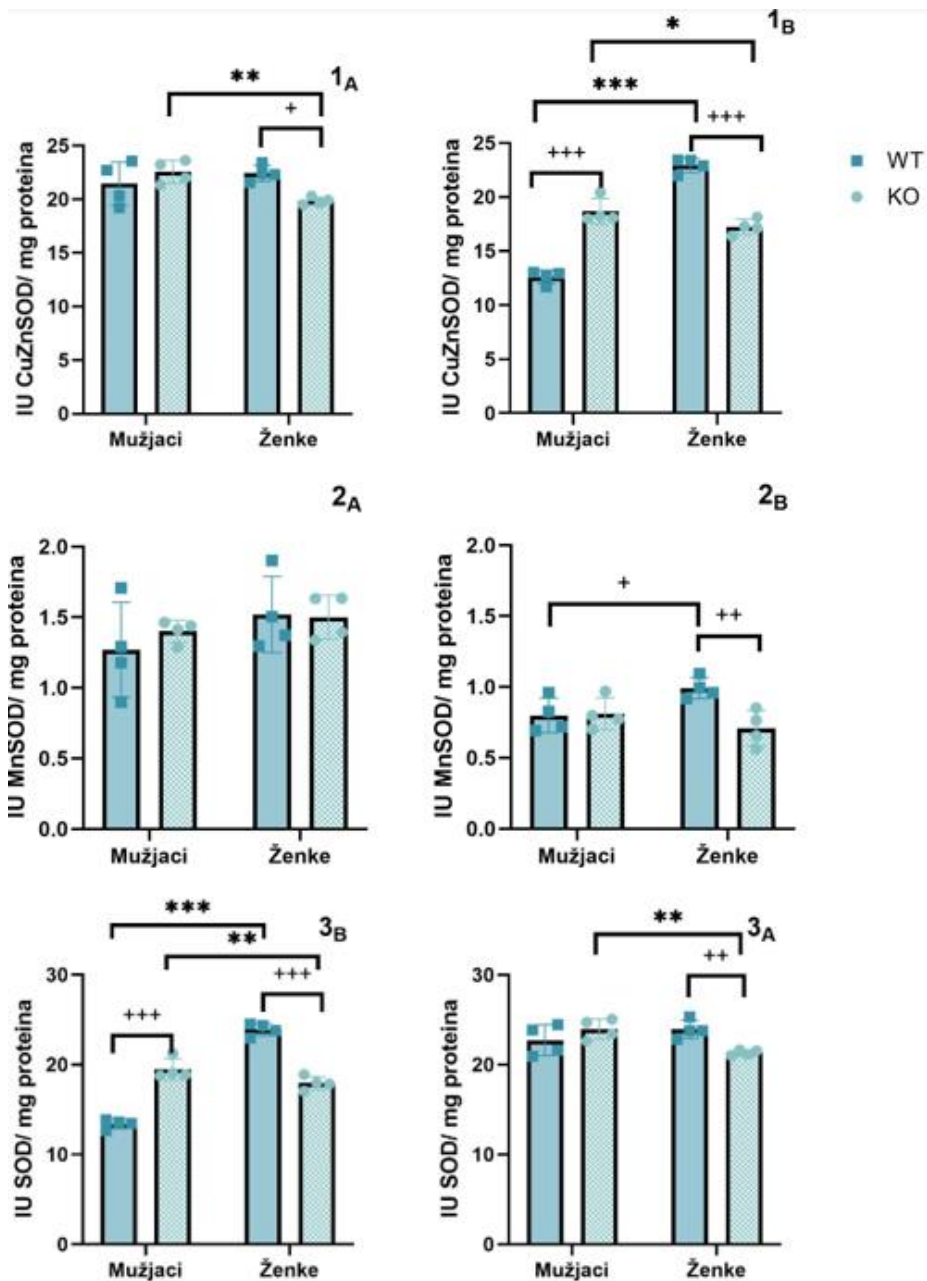
#### 4.3.2. Aktivnost antioksidativnih enzima

Aktivnost SOD-a analizirana je zasebno za CuZn i Mn skupinu, obje skupine pokazuju sličan obrasce aktivnosti s obzirom na tip organa.

Za uzorke bubrega aktivnost CuZnSOD-a značajno opada u KO uzoraka ženki u odnosu na WT. Također, u KO uzoraka signifikantno nižu aktivnost u odnosu na mužjake imaju ženke. U mozgu aktivnost CuZnSOD-a u mužjaka značajno je viša u KO uzoraka u odnosu na divlji tip, dok je efekt gubitka SIRT3 u ženki obrnut. U WT uzorcima mužjaci imaju značajno nižu aktivnost od ženki, dok u KO uzorcima značajno nižu aktivnost imaju ženke. (Slika 9.1)

MnSOD aktivnost u bubregu nema statistički značajnih razlika. S druge strane, aktivnost u mozgu ovisi o međuodnosu spola i prisutnosti SIRT3 pri čemu ženke WT imaju višu aktivnost od mužjaka WT, a u ženki nedostatak SIRT3 značajno smanjuje aktivnost u odnosu na divlji tip. (Slika 9.2)

Ukupna aktivnost SOD-a slična je onoj CuZnSOD pri čemu u mužjaka nedostatak SIRT3 uzrokuje povećanu aktivnost u odnosu na divlji tip, a u ženki je efekt obrnut. U uzoraka divljeg tipa ženke pokazuju značajno veću aktivnost ukupnog SOD-a, dok gubitak SIRT3 uzrokuje veću aktivnost u mužjaka. U uzorcima mozga ženki gubitak SIRT3 uzrokuje smanjenu aktivnost ukupnog SOD-a. Također, ovisnost ekspresije o spolu prisutna je samo u KO uzoraka gdje ženke imaju značajno nižu ekspresiju od mužjaka. (Slika 9.3)



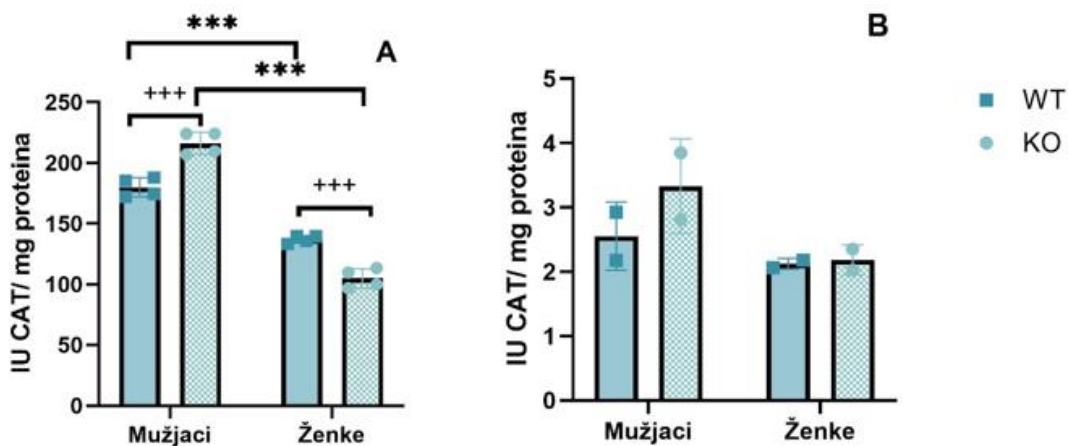
**Slika 9.** Aktivnost antioksidativnih enzima SOD u bubregu (A) i mozgu (B) WT i KO miševa oba spola. 1) Grafički prikaz aktivnosti CuZnSOD-a. 2) Grafički prikaz aktivnosti MnSOD-a. 3)

Grafički prikaz aktivnosti ukupnog SOD-a. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  (razlika između mužjaka i ženki); +++  $p < 0,001$ , ++  $p < 0,01$ , +  $p < 0,05$  (razlika između WT i KO uzoraka). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N

= 4 uzorka po grupi.



U bubregu aktivnost CAT-a ovisi o međuodnosu spola i prisutnosti SIRT3 pri čemu je viša u mužjaka u odnosu na ženke i u WT i u KO uzorcima. Nedostatak SIRT3 u mužjaka uzrokuje povećanje aktivnosti CAT-a u odnosu na divlji tip, dok se u tom slučaju aktivnost u ženki smanjuje. U mozgu je aktivnost enzima CAT bila iznimno niska pa se odabranom metodom detekcije trošila velika količina uzorka zbog čega je analiza provedena na dva uzorka po skupini. Obzirom na mali broj uzoraka po skupini, nije bilo statistički značajne razlike između pojedinih skupina. (Slika 10.)

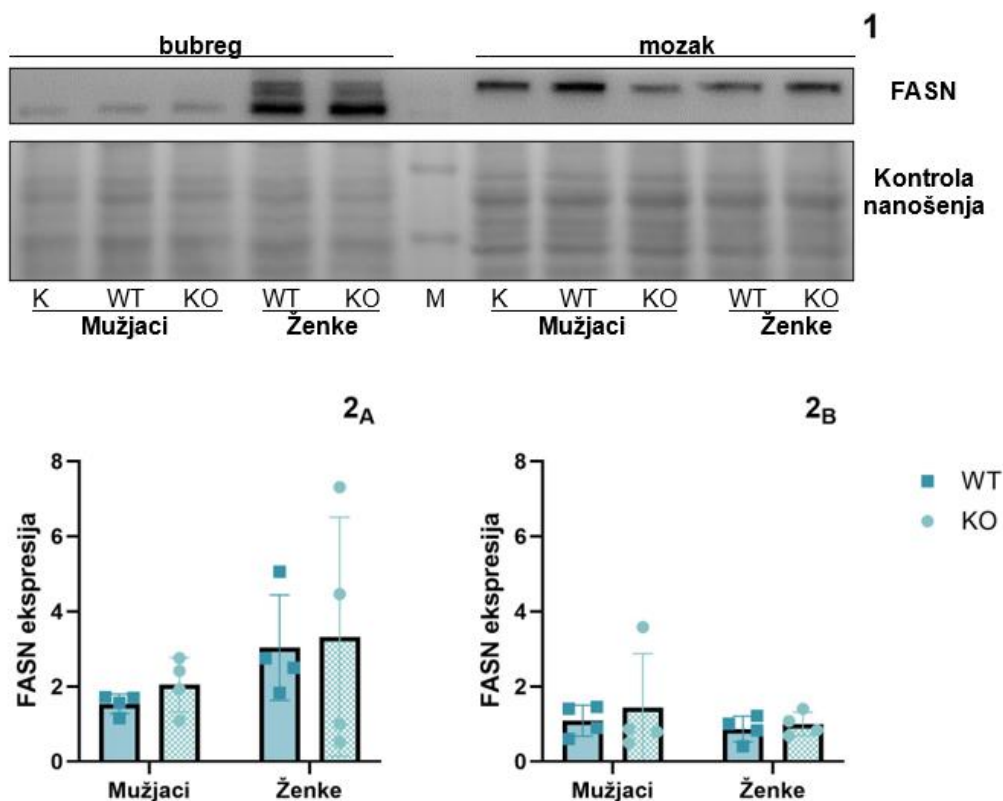


**Slika 10.** Aktivnost antioksidativnog enzima CAT u bubregu (A) i mozgu (B) WT i KO miševa oba spola. \*\*\*  $p < 0,001$  (razlika između mužjaka i ženki); +++  $p < 0,001$  (razlika između WT i KO uzoraka). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

#### 4.4. Utjecaj SIRT3 na metabolizam tkiva

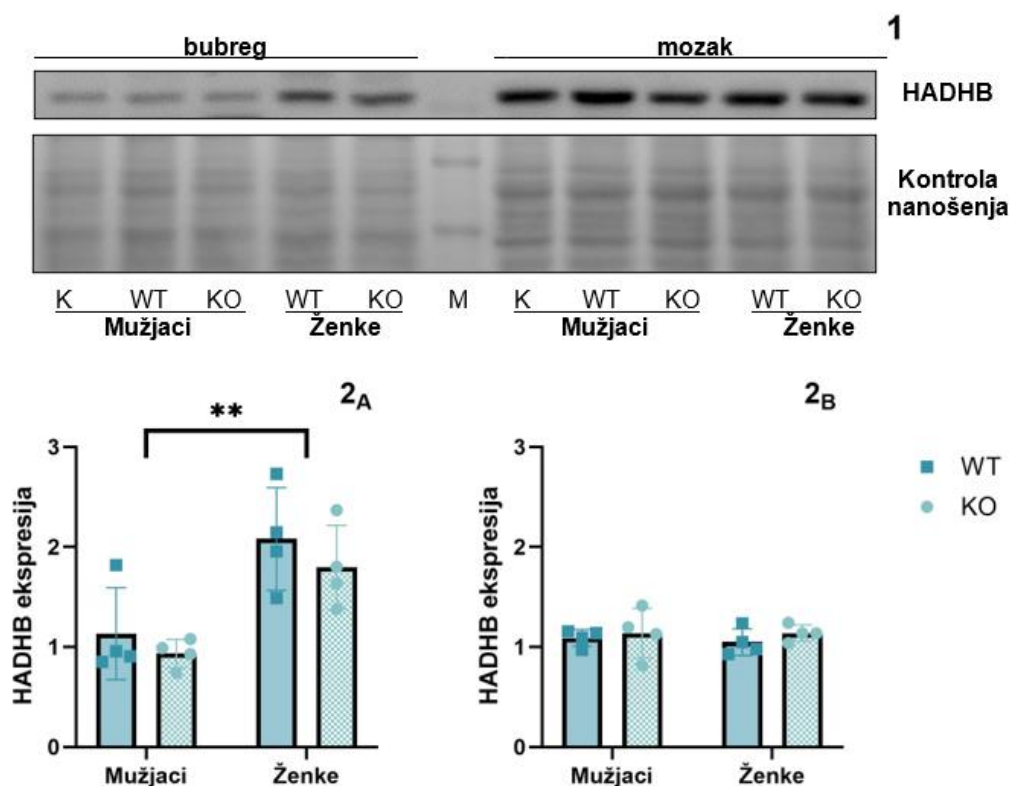
Kako bi se utvrdio utjecaj SIRT3 na metabolizam analizirana je ekspresija enzima uključenih u metabolizam lipida (sintaza masnih kiselina, engl. *Fatty Acid Synthase*, FASN; beta-podjedinica mitohondrijskog trifunkcionalnog proteina, engl. *Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Trifunctional Multienzyme Complex Subunit Beta*, HADHB) i glukoze (laktat dehidrogenaza, LDH), transkripcijskog regulatora gena uključenih u ove procese (PPAR $\gamma$ ) te kompleksa lanca prijenosa elektrona u oksidativnoj fosforilaciji.

U uzorcima bubrega nije dokazana statistički značajna razlika u ekspresiji promatranih proteina FASN s obzirom na prisutnost SIRT3 i spol, ni u jednom organu. Ipak, uočena je ekspresija nešto kraće varijante proteina u bubregu u odnosu na protein detektiran u uzorcima mozga. (Slika 11.)



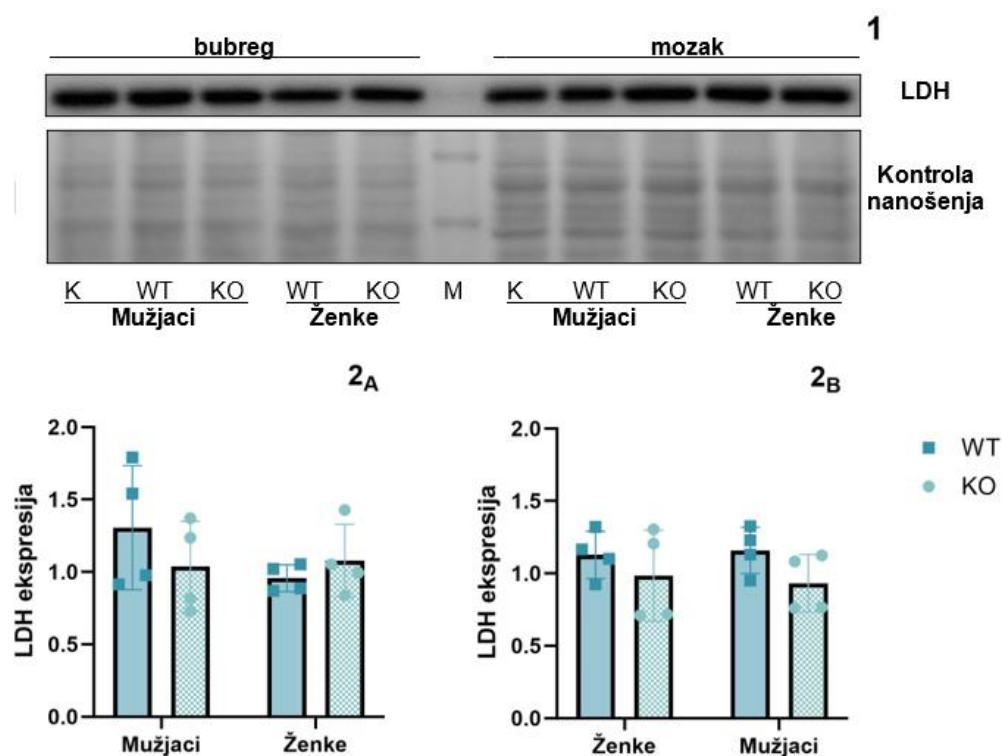
**Slika 11.** Proteinska ekspresija FASN u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom FASN. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina FASN u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

U bubregu je HADHB pokazao statistički značajnu razliku u ekspresiji s obzirom na spol, pri čemu ženke imaju značajno višu ekspresiju, dok prisutnost SIRT3 nije statistički značajna. U uzorcima mozga nema značajne razlike u ekspresiji. Uzorci mozga imaju veću ekspresiju HADHB u donosu na bubreg. (Slika 12.)



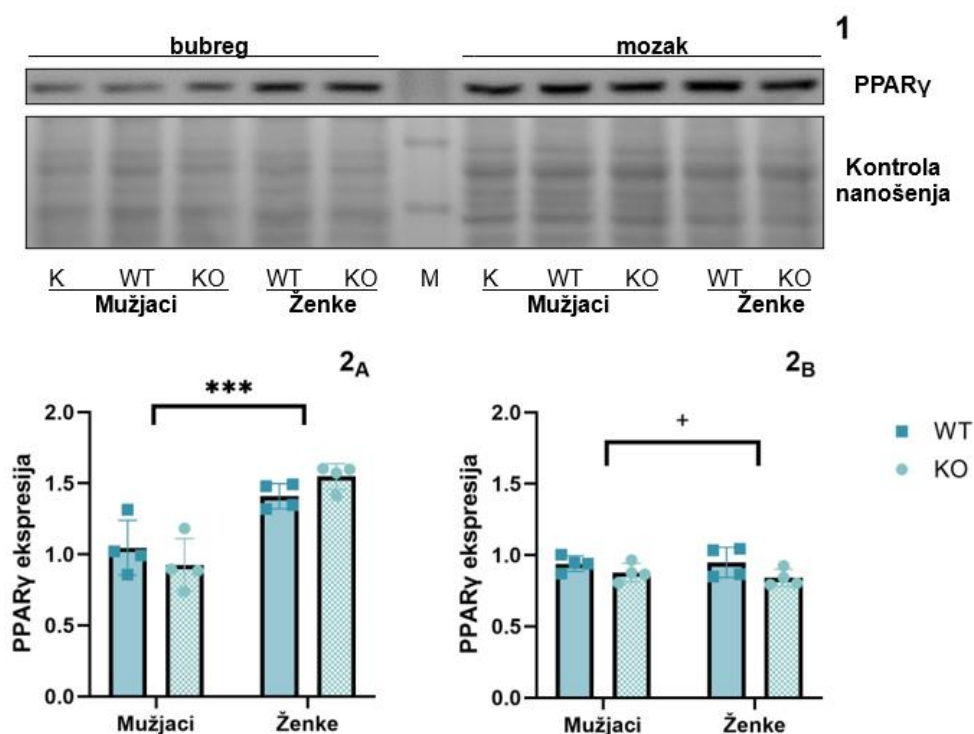
**Slika 12.** Proteinska ekspresija HADHB u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije membrane PVDF s vizualiziranim proteinom HADHB. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina HADHB u bubregu (A) i mozgu (B). \*\*  $p < 0,01$  (razlika između mužjaka i ženki). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

Niti u jednom organu nije bilo statistički značajnog utjecaja spola i genotipa na ekspresiju proteina LHD. (Slika 13.)



**Slika 13.** Proteinska ekspresija LDH u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom LDH. 2) Grafički prikaz ekspresije proteina LDH u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

U bubregu PPAR $\gamma$  pokazuje statistički značajnu razliku u ekspresiji s obzirom na spol gdje ženke imaju veću ekspresiju od mužjaka neovisno o prisutnosti SIRT3. U uzoraka mozga PPAR $\gamma$  ekspresija je ovisna o prisutnosti SIRT3 pri čemu WT uzorci imaju značajno višu ekspresiju od KO neovisno o spolu. (Slika 14.)



**Slika 14.** Proteinska ekspresija PPAR $\gamma$  u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije PVDF membrane s vizualiziranim proteinom PPAR $\gamma$ . 2) Grafički prikaz ekspresije proteina PPAR $\gamma$  u bubregu (A) i mozgu (B). \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

U sklopu analize ekspresije kompleksa lanca elektrona niti u jednom organu nije uočena statistički značajna razlika s obzirom na analizirane parametre. (Slika 15.)



**Slika 15.** Proteinska ekspresija kompleksa lanca elektrona u bubregu i mozgu WT i KO miševa oba spola. 1) Prikaz reprezentativne fotografije membrane PVDF s vizualiziranim kompleksima lanca elektrona. 2) Grafički prikaz ekspresije kompleksa I u bubregu (A) i mozgu (B). 3) Grafički prikaz ekspresije kompleksa II u bubregu (A) i mozgu (B). 4) Grafički prikaz ekspresije kompleksa III u bubregu (A) i mozgu (B). 5) Grafički prikaz ekspresije kompleksa V u bubregu (A) i mozgu (B). *Two-way Anova* s Bonferonni post-hoc testom je provedena kako bi se utvrdio efekt SIRT3 i spola u bubregu, odnosno mozgu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. N = 4 uzorka po grupi.

## 5. Rasprava

### 5.1. Ekspresija SIRT3 i njegova regulatora ovisi o tipu organa, ali ne i o spolu

Ekspresija proteina SIRT3 utvrđena Western blotom nije pokazala ovisnost o spolu niti u bubregu niti u mozgu. U drugih autora dokazana je ovisnost i ekspresije i aktivnosti SIRT3 o spolu (Pinterić i sur. 2020; Shen i sur. 2021). S obzirom da su i bubreg i mozak tkiva sa velikom metaboličkom aktivnošću očekivana je visoka ekspresija u oba organa. Ipak, uočena je manja ekspresija u mozgu u odnosu na bubreg, što se kosi s prethodnim istraživanjima u kojima se mozak navodi kao tkivo s velikom prisutnošću SIRT3 (Lombard i sur. 2007).

Ekspresija transkripcijskog regulatora *SIRT3*, *PGC1 $\alpha$*  također je pokazala jednoliku ekspresiju s obzirom na spol i genotip. *PGC1 $\alpha$*  djeluje kao transkripcijski aktivator *SIRT3*, a ekspresija ova dva proteina je proporcionalna u uvjetima metaboličkog stresa (Li i sur. 2016) tako da je interesantna činjenica da je u bubregu s većom količinom SIRT3 uočena smanjena količina *PGC1 $\alpha$* , a u mozgu je detektiran suprotan učinak u uvjetima bez metaboličkih stresora. Bilo bi zanimljivo utvrditi tkivno specifične regulatore transkripcije i translacije SIRT3 i *PGC1 $\alpha$*  koji uzrokuju koordiniranu ekspresiju i aktivnost u specifičnim staničnim uvjetima. U svakom slučaju, iz dobivenih podataka možemo zaključiti da koregulacija ekspresije SIRT3 i *PGC1 $\alpha$*  u tkivu bubrega i mozga izostaje na razini proteina. Kako u sklopu ovog istraživanja nije analiziran utjecaj na količinu mRNA to bi trebalo istražiti u budućim istraživanjima.

## 5.2. SIRT3 sudjeluje u ekspresiji SOD2 i PPAR $\gamma$

Osim deacetilacije mitohondrijskih proteina, duga jezgrena forma SIRT3 deacetilira histone (Lombard i sur. 2007) i utvrđeno je da time sudjeluje u represiji transkripcije gena (Iwahara i sur. 2012). Proteomska analiza visokospecifičnih interaktora SIRT3 u stanicama HEK293T pokazala je i značajne interakcije s više enzima uključenih u translaciju. Ipak, s obzirom da je 87% definiranih interaktora novi nalaz, autori ove podatke karakteriziraju kao podlogu za buduća istraživanja, a ne kao dokaz uključenosti u proces translacije (Yang i sur. 2016).

SOD1, SOD2 i CAT glavni su enzimi antioksidativne obrane u stanicama. Njihova je ekspresija slična kod jedinki koje su pripadale istoj skupini unutar pojedinog organa osim ekspresije SOD2. U bubregu je zabilježen porast njegove ekspresije u nedostatku SIRT3 u skladu s hipotezom represijske uloge SIRT3 na transkripciju jezgrenih gena metaboličkih enzima pri normalnim uvjetima (Iwahara i sur. 2012). U drugim radovima utvrđena je uloga SIRT3 kao transkripcijskog koaktivatora gena *MnSOD* (*SOD2*) (Jacobs i sur. 2008; Kim i sur. 2010; Lombard i sur. 2007) te 13 gena u mitohondriju (Peserico i sur. 2013). I kod transkripcije *MnSOD* i mitohondrijskih proteina kao kointeraktor je predložen FOXO3a (Jacobs i sur. 2008; Peserico i sur. 2013) čime bi SIRT3 mogao biti samo efektor prenošen na promotore gena pod specifičnim staničnim uvjetima. Time bi se mogao objasniti nedostatak pozitivne regulacije, uočen, ne samo u ovom, već i u drugim istraživanjima (Jing i sur. 2011; Sol i sur. 2012).

U analizi metaboličkih enzima nije dokazan utjecaj SIRT3 na njihovu ekspresiju izuzev proteina PPAR $\gamma$ . Njegova ekspresija u bubregu ovisi o spolu pri čemu je povišena u ženki, dok je u mozgu ovisna o prisutnosti SIRT3 i opada s njegovim gubitkom. Dakle, samo u mozgu SIRT3 indirektno ili direktno djeluje na povećanje ekspresije PPAR $\gamma$ . Ovaj protein je i sam transkripcijski faktor koji sudjeluje u regulaciji ekspresije gena uključenih u metabolizam glukoze i lipida. Od njegovih predloženih meta u ovom radu su analizirane ekspresije proteina PGC1 $\alpha$  i FASN (Jamwal i sur. 2021; Shi i sur. 2013) koji nisu pokazali promjenu u ekspresiji. U budućim istraživanjima trebalo bi provesti analizu većeg broja njegovih meta, na razini ekspresije mRNA i proteina, kako bi se utvrdio nizvodni efekt. Drugi metabolički proteini i kompleksi nisu pokazali razlike s obzirom na prisutnost SIRT3 nego na tip organa.



### **5.3. SIRT3 regulira antioksidativne enzime**

SIRT3 također sudjeluje u aktivaciji antioksidativnih enzima deacetilacijom. Njegova najpoznatija meta, SOD2, u KO uzorcima bubrega ne pokazuje povećanje acetilacije. U mozgu su rezultati u skladu s prethodnom studijom (Hirschey i sur. 2010) te KO ima povećanu acetilaciju.

Dodatno, izravno je određena aktivnost MnSOD-a (SOD2) i CuZnSOD-a (SOD1). Kao meta SIRT3 ističe se MnSOD kod kojeg ipak u bubregu nije dokazana promjena u aktivnosti, u skladu s nedostatkom acetilacije. Kod mozga u KO ženki MnSOD ima smanjenu aktivnost, a uočena je i ovisnost o spolu kod kojeg ženke imaju višu aktivnost. CuZnSOD koji inače nije glavna meta SIRT3 pokazuje opadanje aktivnosti u bubregu KO ženki, dok je u mozgu opadanje zapaženo u KO mužjaka, a u KO ženki porast. Ukupni SOD u oba organa u ženki KO pokazuje opadanje, a u bubregu porast u mužjaka KO. Aktivnost CAT u bubregu raste u KO mužjaka, a u ženki opada. U mozgu je aktivnost CAT bila iznimno niska, što je u skladu i s njegovom smanjenom prisutnošću u tkivu mozga pokazanoj metodom Western blot.

Analiza ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima pokazuje da je antioksidativno djelovanje SIRT3 spolno ovisno i da postoje posrednici vezani uz spol u njegovoj regulaciji.

### **5.4. Oksidativna oštećenja sugeriraju modularnu zaštitnu ulogu SIRT3**

Mozak pokazuje veću podložnost oksidativnom stresu s obzirom da je sadržaj hem oksigenaze 1 (HO1), markera oksidativnog stresa, povećan u odnosu na bubreg. U analizi oksidativnih oštećenja proteina dokazan je porast oštećenja u bubregu KO, a opadanje u mozgu KO. SIRT3 djeluje protektivno na integritet proteina u bubregu za što bi objašnjenje moglo ležati u njegovoj ulozi kontrole kvalitete mitohondrijskih proteina. Ovu aktivnost SIRT3 postiže regulacijom proteina toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins*, HSP) i šaperona (Hebert i sur. 2013).

Oksidativna oštećenja lipida pokazala su inverzni uzorak pri čemu SIRT3 ima protektivno djelovanje u mozgu, ali ne i u bubregu. Jing i suradnici (2011) u uzrocima mišića SIRT3 KO miševa također su zabilježili 75% postotni porast TBARS-a.

Ovi nalazi sugeriraju promjenjivu ulogu SIRT3 u zaštiti tkiva od oksidativnih oštećenja ovisno o potrebama organa. Također, oksidativna zaštita SIRT3 nije isključivo općeg karaktera preko aktivacije antioksidativnih enzima nego mora sadržavati i nizvodne mete koje obnavljaju komponente stanične mašinerije. U mozgu bi protektivno djelovanje na lipidna oštećenja moglo biti povezano s aktivacijom ceramid sintaze, s obzirom da su ceramidi esencijalne komponente mijelinskih ovojnica. Ipak, u moždanom udaru, kojeg prati hipoksija, aktivacija ceramid sintaze dovodi do većih oštećenja i većeg područja zahvaćenog udarom (Novgorodov i sur. 2016). S druge strane, u srčanom udaru SIRT3 ima protektivno djelovanje (J. Zhang i sur. 2023).

U oba organa ženke pokazuju manja oštećenja proteina, a mušjaci lipida što sugerira spolno ovisnu regulaciju protekcije od oksidativnih oštećenja. Ovakvo različito djelovanje na oštećenje različitih tkiva, a posebno u akutnim patološkim stanjima poput moždanog i srčanog udara, potiče daljnje istraživanje uloge SIRT3 u specifičnim organima s obzirom da se kao terapijska mjera predlaže njegova povećana aktivacija.

#### **5.5. U fiziološkim uvjetima SIRT3 ima veći utjecaj na antioksidativnu obranu nego na metabolizam**

U raznim proteomskim studijama utvrđen je širok spektar metaboličkih meta SIRT3 kao što su enzimi krebsovog ciklusa, metabolizma masnih kiselina, piruvata i aminokiselina (Sol i sur. 2012; Yang i sur. 2016). Također, deacetilacija vođena SIRT3 aktivira i kompleks I oksidativne fosforilacije i indirektno AMPK preko serin-treonin proteinske kinaze 11 (engl. *Serine/Threonine-protein kinase 11*, STK11) (Fu i sur. 2012; Hebert i sur. 2013).

Ahn i suradnici (2008) pokazali su različite bazalne količine ATP-a ovisno o tipu organa koje su proporcionalne količini proteina SIRT3. Oni organi koji u divljeg tipa pokazuju visok sadržaj ATP-a i SIRT3, između ostalog i bubreg, u KO imaju redukciju ATP-a od 50% pri čemu se količina proteina lanca prijenosa elektrona nije promijenila. Ova redukcija nije se pokazala toliko značajnom, poglavito zato što su detektirane razine ATP-a dovoljne za većinu enzima ovisnih o ATP-u, iako autori navode da to ne mora biti slučaj kada se tkiva podvrgnu nekom obliku staničnog stresa.

Iako dolazi do povećane hiperacetilacije, opadanja stanične respiracije i količine ATP-a te promjena u inzulinskoj signalizaciji (Ahn i sur. 2008; Hebert i sur. 2013; Jing i sur. 2011)

nepatološki metabolizam se može održati uz smanjenu aktivnost SIRT3 (Lombard i sur. 2007). Nadalje, SIRT3 KO miševi pokazuju i pojačan oksidativni stres u odnosu na divlji tip, što je dodatno naglašeno u starijih jedinki (Jacobs i sur. 2008; Kim i sur. 2010). Povećanje oksidativnog stresa povezano je s ubrzanim starenjem i podloga je razvoju drugih obilježja starenja poput pojačane apoptoze, nestabilnosti mitohondrijske DNA, abnormalne strukture mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma (Zeng i sur. 2014). Stoga gubitak ili smanjena aktivnost SIRT3 djeluje kao kronični stresor i doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja i neurodegeneracije u ostarjelih jedinki (Hirschey i sur. 2011; Zeng i sur. 2014).

## 6. Zaključak

SIRT3 je protein čija je uloga vezana uz aktivnosti u jezgri i mitohondriju. U ovom je radu analiziran njegov utjecaj na redoks status i metabolizam tkiva mozga i bubrega u miševa starih 18 tjedana.

U analizi metaboličkog utjecaja, dokazana je uloga SIRT3 na ekspresiju proteina PPAR $\gamma$  u mozgu. Zabilježena je povećana količina ovog transkripcijskog aktivatora gena metaboličkih proteina u prisutnosti SIRT3. Kako bi se utvrdio nizvodni efekt ove uloge u budućim istraživanjima trebalo bi analizirati promjene količine transkripata i proteina njegovih poznatih meta.

Analiza ekspresije antioksidativnih enzima potvrdila je utjecaj SIRT3 na količinu proteina SOD2 u bubregu. Zabilježena je i uloga SIRT3 u regulaciji aktivnost glavnih antioksidativnih enzima. Pritom regulacija nije jednolika u svim uzorcima već ovisi i o spolu i promatranom organu. Stoga, hipotezu o općoj ulozi SIRT3 u deacetilaciji acetilacije nastale neenzimatski u mitohondriju treba uzeti s rezervom i razmatrati u fiziološkom kontekstu promatranog uzorka. Ovisnost o tipu analiziranog tkiva uočena je i analizom oksidativnih oštećenja proteina i lipida. Pritom je SIRT3 djelovao protektivno na lipide u mozgu i proteine u bubregu. Njegov gubitak imao je suprotan učinak. Time je dokazana ciljana uloga u zaštiti integriteta pojedinih makromolekula, za koju je još potrebno utvrditi specifične regulatore i efektore.

U ovom radu nije dokazana uloga SIRT3 u ekspresiji metaboličkih enzima, već samo transkripcijskog aktivatora metaboličkih enzima. Stoga nije moguće zaključiti o specifičnim ulogama SIRT3 u metabolizmu u tkivu bubrega i mozga. U budućim istraživanjima potrebno je provesti dodatne analize aktivnosti metaboličkih proteina u oba organa i analizirati ekspresiju meta

PPAR $\gamma$  u mozgu. S druge strane, utjecaj SIRT3 na oksidativno stanje tkiva potvrđen je i na razini ekspresije antioksidativnih enzima, regulacije njihove aktivnosti, ali i analizom oksidativnih oštećenja makromolekula. Analize su pokazale tkivno specifične i spolne razlike u oksidativnim funkcijama SIRT3.

## 7. Literatura

Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I. H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X., Finkel, T. (2008): A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. **The Proceedings of the National Academy of Sciences** 105: 14447-14452.

Amorim, J. A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., Sinclair, D. A. (2022): Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology** 18: 243–258.

Baur, J. A., Ungvari, Z., Minor, R. K., Le Couteur, D. G., De Cabo, R. (2012): Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? **Nature Reviews Drug Discovery** 11: 443–461.

Belužić, R., Šimunić, E., Podgorski, I.I., Pinterić, M., Hadžija, M.P., Balog, T., Sobočanec, S. (2024): Gene Expression Profiling Reveals Fundamental Sex-Specific Differences in SIRT3-Mediated Redox and Metabolic Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences** 25: 3868.

Costantini, S., Sharma, A., Raucci, R., Costantini, M., Autiero, I., Colonna, G. (2013): Genealogy of an ancient protein family: the Sirtuins, a family of disordered members. **BMC evolutionary biology** 13: 60.

Crimmins, E. M. (2015): Lifespan and healthspan: Past, present, and promise. **Gerontologist** 55: 901–911.

Ferraz, R. C., Camara, H., De-Souza, E. A., Pinto, S., Pinca, A. P. F., Silva, R. C., Sato, V. N., Castilho, B. A., Mori, M. A. (2016): IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Biology** 14: 87.

Fiorillo, M., Ricci, E., Fava, M., Longobucco, C., Sotgia, F., Rizza, P., Lanzino, M., Bonofiglio, D., Conforti, F. L., Catalano, S., Barone, I., Morelli, C., Aquila, S., Lisanti, M. P., Sisci, D. (2023): FoxO3a Drives the Metabolic Reprogramming in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer Cells Restoring Tamoxifen Sensitivity. **Cells** 12: 2777.

Fontana, L., Partridge, L., Longo, V. D. (2010): Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. **Science** 328: 321–326.

Fu, J., Jin, J., Cichewicz, R. H., Hageman, S. A., Ellis, T. K., Xiang, L., Peng, Q., Jiang, M., Arbez, N., Hotaling, K., Ross, C. A., Duan, W. (2012): Trans-(-)- $\epsilon$ -viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated Protein Kinase (AMPK), and protects cells in models of huntington disease. **Journal of Biological Chemistry** 287: 24460–24472.

Gao, R., Chen, Z., Wu, Y., Chen, R., Zheng, W., Qi, L., Liu, X., Liu, X., Liu, L. (2022): SIRT3 alleviates mitochondrial dysfunction induced by recurrent low glucose and improves the supportive function of astrocytes to neurons. **Free Radical Biology and Medicine** 193: 405–420.

Giralt, A., Hondares, E., Villena, J. A., Ribas, F., Díaz-Delfín, J., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F. (2011): Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. **Journal of Biological Chemistry** 286: 16958–16966.

Harman, D. (1956): Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology** 11: 298–300.

Hebert, A. S., Dittenhafer-Reed, K. E., Yu, W., Bailey, D. J., Selen, E. S., Boersma, M. D., Carson, J. J., Tonelli, M., Balloon, A. J., Higbee, A. J., Westphall, M. S., Pagliarini, D. J., Prolla, T. A., Assadi-Porter, F., Roy, S., Denu, J. M., Coon, J. J. (2013): Calorie Restriction and SIRT3 Trigger Global Reprogramming of the Mitochondrial Protein Acetylome. **Molecular Cell** 49: 186–199.

Hirschey, M. D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D. B., Grueter, C. A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Li, Y., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Bain, J. R., Newgard, C. B., Farese, R. V., Alt, F. W., Kahn, C. R., Verdin, E. (2010): SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. **Nature** 464: 121–125.

Hirschey, M. D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C. A., Collins, A. M., Aouizerat, B., Stančáková, A., Goetzman, E., Lam, M. M., Schwer, B., Stevens, R. D., Muehlbauer, M. J., Kakar, S., Bass, N. M., Kuusisto, J., Laakso, M., Alt, F. W., Newgard, C. B., Farese, R. V., ... Verdin, E. (2011): SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. **Molecular Cell** 44: 177–190.

Imai, S.I., Guarente, L. (2016): It takes two to tango: Nad<sup>+</sup> and sirtuins in aging/longevity control. **NPJ Aging Mech Dis** 2: 16017.

Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V., Reinberg, D. (2012): SIRT3 Functions in the Nucleus in the Control of Stress-Related Gene Expression. **Molecular and Cellular Biology** 32: 5022–5034.

Jacobs, K. M., Pennington, J. D., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Kim, H. S., Mishra, M., Sun, L., Nguyen, P., Ahn, B. H., Leclerc, J., Deng, C.-X., Spitz, D. R., Gius, D. (2008): SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the Mitochondria, as well as increases FOXO3a Dependent Gene expression. **International Journal of Biological Science** 4: 291-299.

Jamwal, S., Blackburn, J. K., Elsworth, J. D. (2021): PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  signaling as a potential therapeutic target for mitochondrial biogenesis in neurodegenerative disorders. **Pharmacology & Therapeutics** 219: 107705.

Ji, Z., Liu, G. H., Qu, J. (2022): Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. **Journal of Genetics and Genomics** 49: 287–298.

Jin, H., Zhang, L., He, J., Wu, M., Jia, L., & Guo, J. (2022): Role of FOXO3a Transcription Factor in the Regulation of Liver Oxidative Injury. **Antioxidants** 11: 2478.

Jing, E., Emanuelli, B., Hirschey, M. D., Boucher, J., Lee, K. Y., Lombard, D., Verdin, E. M., Kahn, C. R. (2011): Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108: 14608–14613.

Kim, H., Kim, S., Choi, J. E., Han, D. H., Koh, S. M., Kim, H. S., Kaang, B. K. (2019): Decreased Neuron Number and Synaptic Plasticity in SIRT3-Knockout Mice with Poor Remote Memory. **Neurochemical Research** 44: 676–682.

Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K. M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S. H., Singh, K. K., Abdulkadir, S. A., Spitz, D. R., Deng, C. X., Gius, D. (2010): SIRT3 Is a Mitochondria-Localized Tumor Suppressor Required for Maintenance of Mitochondrial Integrity and Metabolism during Stress. **Cancer Cell** 17: 41–52.

Kristian, T., Karimi, A. J., Fearnow, A., Waddell, J., McKenna, M. C. (2021): Perturbed brain glucose metabolism caused by absent sirt3 activity. **Cells** 10: 2348.

Lee, J., Kim, Y., Liu, T., Hwang, Y. J., Hyeon, S. J., Im, H., Lee, K., Alvarez, V. E., McKee, A. C., Um, S. J., Hur, M., Mook-Jung, I., Kowall, N. W., Ryu, H. (2018): SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Aging Cell** 17: e12679.

- Li, L., Zhang, P., Bao, Z., Wang, T., Liu, S., Huang, F. (2016): PGC-1 $\alpha$  Promotes Ureagenesis in Mouse Periportal Hepatocytes through SIRT3 and SIRT5 in Response to Glucagon. **Scientific Reports** 6: 24156.
- Liang, H., Ward, W. F. (2006): PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. **Advances in Physiology Education** 30: 145–151.
- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschev, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E., Schwer, B. (2007): Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. **Molecular and Cellular Biology** 27: 8807–8814.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013): The hallmarks of aging. **Cell** 153: 1194.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2023): Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell** 186: 243–278.
- Luo, C., Ding, W., Yang, C., Zhang, W., Liu, X., Deng, H. (2022): Nicotinamide Mononucleotide Administration Restores Redox Homeostasis via the Sirt3-Nrf2 Axis and Protects Aged Mice from Oxidative Stress-Induced Liver Injury. **Journal Proteome Research** 21: 1759–1770.
- Marcus, J. M., Andrabi, S. A. (2018): Sirt3 regulation under cellular stress: Making sense of the ups and downs. **Frontiers in Neuroscience** 12: 799.
- Mattson, M. P., Arumugam, T. V. (2018): Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. **Cell Metabolism** 27: 1176–1199.
- Morigi, M., Perico, L., Benigni, A. (2018): Sirtuins in Renal Health and Disease. **Journal of the American Society of Nephrology** 29: 1799–1809.
- Morris, B. J. (2013): Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. **Free Radical Biology and Medicine** 56: 133–171.
- Murray, C. J. L., Aravkin, A. Y., Zheng, P., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abegaz, K. H., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., Abualhasan, A., Abu-Raddad, L. J., Abushouk, A. I., Adabi, M., ... Lim, S. S. (2020): Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet** 396: 1223–1249.

Novgorodov, S. A., Riley, C. L., Keffler, J. A., Yu, J., Kindy, M. S., Macklin, W. B., Lombard, D. B., Guduz, T. I. (2016): SIRT3 deacetylates ceramide synthases: Implications for mitochondrial dysfunction and brain injury. **Journal of Biological Chemistry**, 291: 1957–1973.

Peserico, A., Chiacchiera, F., Grossi, V., Matrone, A., Latorre, D., Simonatto, M., Fusella, A., Ryall, J. G., Finley, L. W. S., Haigis, M. C., Villani, G., Puri, P. L., Sartorelli, V., Simone, C. (2013): A novel AMPK-dependent FoxO3A-SIRT3 intramitochondrial complex sensing glucose levels. **Cellular and Molecular Life Sciences** 70: 2015–2029.

Pezzotta, A., Perico, L., Corna, D., Morigi, M., Remuzzi, G., Benigni, A., Imberti, B. (2023): Sirt3 deficiency promotes endothelial dysfunction and aggravates renal injury. **PLoS ONE** 18: e0291909.

Pillai, V.B., Kanwal, A., Fang, Y.H., Sharp, W.W., Samant, S., Arbiser, J., Gupta, M.P. (2017): Honokiol, an activator of Sirtuin-3 (SIRT3) preserves mitochondria and protects the heart from doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. 8: 34082-34098.

Pinterić, M., Podgorski, I. I., Hadžija, M. P., Bujak, I. T., Dekanić, A., Bagarić, R., Farkaš, V., Sobočanec, S., Balog, T. (2020): Role of sirt3 in differential sex-related responses to a high-fat diet in mice. **Antioxidants** 9: 174.

Pinterić, M., Podgorski, I. I., Popović Hadžija, M., Tartaro Bujak, I., Tadijan, A., Balog, T., Sobočanec, S. (2021): Chronic high fat diet intake impairs hepatic metabolic parameters in ovariectomized sirt3 ko mice. **International Journal of Molecular Sciences** 22: 4277.

Ren, R., Ocampo, A., Liu, G. H., Izpisua Belmonte, J. C. (2017): Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. **Cell Metabolism** 26: 460–474.

Scher, M. B., Vaquero, A., Reinberg, D. (2007): SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. **Genes and Development** 21: 920–928.

Sharma, A., Mahur, P., Muthukumaran, J., Singh, A. K., Jain, M. (2023): Shedding light on structure, function and regulation of human sirtuins: a comprehensive review. **3 Biotech** 13: 29.

Shen, H., Holliday, M., Sheikh-Hamad, D., Li, Q., Tong, Q., Hamad, C. D., Pan, J. S. (2021): Sirtuin-3 mediates sex differences in kidney ischemia-reperfusion injury. **Translational Research** 235: 15–31.

Shi, H., Luo, J., Zhu, J., Li, J., Sun, Y., Lin, X., Zhang, L., Yao, D., Shi, H. (2013): PPAR  $\gamma$  Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. **PPAR Research** 2013: 310948.



Sidorova-Darmos, E., Sommer, R., Eubanks, J. H. (2018): The role of SIRT3 in the brain under physiological and pathological conditions. **Frontiers in Cellular Neuroscience** 12: 196.

Sol, E. M., Wagner, S. A., Weinert, B. T., Kumar, A., Kim, H. S., Deng, C. X., Choudhary, C., Imhof, A. (2012): Proteomic Investigations of Lysine Acetylation Identify Diverse Substrates of Mitochondrial Deacetylase Sirt3. **PLoS ONE** 7: e50545..

Su, Y., Wang, T., Wu, N., Li, D., Fan, X., Xu, Z., Mishra, S. K., Yang, M. (2019): Alpha-ketoglutarate extends Drosophila lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK. **Aging** 11: 4183–4197.

Tao, Z., Jin, Z., Wu, J., Cai, G., Yu, X. (2023): Sirtuin family in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology** 14: 1186231.

van de Ven, R. A. H., Santos, D., Haigis, M. C. (2017): Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. **Trends in Molecular Medicine** 23: 320–331.

Villena, J. A., Kralli, A. (2008): ERR $\alpha$ : a metabolic function for the oldest orphan. **Trends in Endocrinology and Metabolism** 19: 269–276.

Wang, Q., Xu, J., Li, X., Liu, Z., Han, Y., Xu, X., Li, X., Tang, Y., Liu, Y., Yu, T., Li, X. (2019): Sirt3 modulate renal ischemia-reperfusion injury through enhancing mitochondrial fusion and activating the ERK-OPA1 signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology** 234: 23495–23506.

Wang, Y., Chen, H., Zha, X. (2022): Overview of SIRT5 as a potential therapeutic target: Structure, function and inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry** 236: 114363.

Weinert, B.T., Moustafa, T., Iesmantavicius, V., Zechner, R., Choudhary, C. (2015): Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT 3 repairs nonenzymatic acetylation lesions . **EMBO Journal** 34: 2620–2632.

Westergaard, D., Moseley, P., Sørup, F. K. H., Baldi, P., Brunak, S. (2019): Population-wide analysis of differences in disease progression patterns in men and women. **Nature Communications** 10: 666.

World Health Organization. (2023a). Aging. [https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1) (pristupljeno: 24. 07. 2024.)

World Health Organization. (2023b). Global Health Estimates. <https://www.who.int/data/global-health-estimates> (pristupljeno: 24. 07. 2024.)

World health statistics (2024): monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Wu, X., Liu, M., Wei, G., Guan, Y., Duan, J., Xi, M., Wang, J. (2020): Renal protection of rhein against 5/6 nephrectomied-induced chronic kidney disease: role of SIRT3-FOXO3 $\alpha$  signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 72: 699–708.

Yang, W., Nagasawa, K., Münch, C., Xu, Y., Satterstrom, K., Jeong, S., Hayes, S. D., Jedrychowski, M. P., Vyas, F. S., Zaganjor, E., Guarani, V., Ringel, A. E., Gygi, S. P., Harper, J. W., Haigis, M. C. (2016): Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. **Cell** 167: 985-1000.e21.

Zeng, L., Yang, Y., Hu, Y., Sun, Y., Du, Z., Xie, Z., Zhou, T., Kong, W. (2014): Age-related decrease in the mitochondrial sirtuin deacetylase sirt3 expression associated with ROS accumulation in the auditory cortex of the mimetic aging rat model. **PLoS ONE** 9: e88019.

Zhang, J. Y., Deng, Y. N., Zhang, M., Su, H., Qu, Q. M. (2016): SIRT3 Acts as a Neuroprotective Agent in Rotenone-Induced Parkinson Cell Model. **Neurochemical Research** 41: 1761–1773.

Zhang, J., Wang, H., Slotabec, L., Cheng, F., Tan, Y., Li, J. (2023): Alterations of SIRT1/SIRT3 subcellular distribution in aging undermine cardiometabolic homeostasis during ischemia and reperfusion. **Aging Cell** 22: e13930.

## 8. Životopis

Rođena sam 04. travnja 2000. godine u Rijeci, Primorsko-goranska županija. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla sam u Osnovnoj školi Ivana Gorana Kovačića u Delnicama. Pohađala sam prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Srednjoj školi Delnice i maturirala 2019. godine. Na natjecanju AZOO-a Opisujemo sustave (2017./2018.) s radom Pčele osvojila sam prvu državnu nagradu te posljedično i Oskara znanja Agencije za odgoj i obrazovanje, Ministarstva znanosti i obrazovanja te Hrvatske zajednice županija. 2019. godine upisala sam preddiplomski studij Biologije, a 2022. diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Od 2020. godine članica sam Udruge studenata biologije BIUS u kojoj aktivnom sudjelujem i danas. Tijekom fakultetskih dana obnašala sam ulogu glavne urednice časopisa studenata biologije In Vivo (2021.-2024.), voditeljice Sekcije za leptire pri Udruzi BIUS (tijekom 2022. godine), studentske predstavnice u Vijeću Biološkog odsjeka (2022./2023.), članice organizacijskog tima Simpozija studenata bioloških usmjerenja (SiSB; 2023./2024.) te članice Nadzornog odbora Udruge BIUS (2023./2024.). U akademskoj godini 2020./2021. sudjelovala sam u provođenju praktikumske nastave na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, 2021./2022. obavljala sam stručnu praksu u sklopu Udruge Hyla, a 2023./2024. u sklopu Laboratorija za metabolizam i starenje na Institutu Ruđer Bošković. Vlastita istraživanja provedena na Institutu Ruđer Bošković prezentirala sam u sklopu Studentskog kongresa neuroznanosti (NeuRi; 2024.).