

Učinak stresa endoplazmatskog retikula na ekspresiju gena TFF3, TNFalfa, MCP1 i CXCL1 u jetri miša

Burkuš, Tajana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:477821>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tajana Burkuš

Učinak stresa endoplazmatskog retikula na ekspresiju gena *TFF3*, *TNF α* , *MCPI* i *CXCL1* u
jetri miša

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

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

Zahvale

Od srca zahvaljujem mentorici dr.sc. Mireli Baus Lončar koja mi je u svom laboratoriju omogućila izradu eksperimentalnog dijela diplomskog rada, na stručnom vodstvu, pomoći i strpljenju oko izrade pismenog dijela rada a naročito se zahvaljujem na srdačnosti koju je iskazala. Iskreno se zahvaljujem i doktorandici Kati Šešelji na pristupačnosti i pomoći u labosu ali i kasnijoj potpori prilikom pisanja rada. Puno hvala suvoditeljici dr.sc. Juliji Erhardt koja je, nas studente, odvela u posjet upravo ovog labosa, i na iskazanoj susretljivosti, razumijevanju i podršci.

Hvala mojim roditeljima i bratu na potpori tijekom svih godina studija. Hvala svim prijateljima koji su uvijek bili tu, uz mene. Na kraju, veliko hvala mojoj najdražoj osobi, Bartolu i najdražem ljubimcu, Risu koji moj svijet čine ljepšim mjestom.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK STRESA ENDOPLAZMATSKOG RETIKULA NA EKSPRESIJU GENA
TFF3, *TNF α* , *MCP1* I *CXCL1* U JETRI MIŠA

Tajana Burkuš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stres endoplazmatskog retikula (ER) nastaje nakupljanjem krivo namotanih ili nenamotanih proteina u lumenu endoplazmatskog retikula, a ponajviše u sekretornim stanicama, koje su, zbog svojih funkcija, bogate ER-om. U odgovor na stres, eukariotska stanica razvila je adaptivne mehanizme poznate kao odgovor na nenamotane proteine (UPR) čije nastojanje je vratiti staničnu homeostazu. Homeostaza se vraća zaustavljanjem translacije proteina, aktivacijom molekularnih šaperona ili degradacijom krivo namotanih proteina, a produljeni stres dovodi do patoloških promjena i stanične smrti. Hepatociti su, kao stanice s velikim kapacitetom sinteze proteina, podložni aktivaciji UPR puteva koji igraju važnu ulogu u prevenciji i patogenezi bolesti jetre. Sve više istraživanja usmjerava se prema povezanosti ER stresa, upale, stanične ozljede i steatoze u nealkoholnoj bolesti masne jetre (NAFLD) gdje glavnu ulogu imaju upalni citokini i kemokini. U ovom istraživanju razvijena je qPCR metoda (optimalni reakcijski uvjeti i početnice) za mišje tkivo jetre soja C57Bl6Crl. ER stres je izazvan jednokratnom primjenom tunikamicina, te je ispitana relativna promjena ekspresije upalnih citokina, *TNF α* , *MCP1* i *CXCL1* te proteina *TFF3* čija je uloga u jetri još uvijek nedovoljno istražena. Rezultati su analizirani programom REST 2009 nakon čega je ustanovljena statistički značajna, povišena ekspresija kod *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1* gena te statistički neznačajna, smanjena ekspresija *Tff3* gena.

(53 stranica, 9 slika, 6 tablica, 72 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: stres endoplazmatskog retikula, jetra, *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1*, *Cxcl1*, qPCR

Voditelj: Dr. sc. Mirela Baus Lončar, v. znan. suradnica

Suvoditelj: Dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

Ocjenitelji: Dr. sc. Julija Erhardt, v. pred.

Dr. sc. Nenad Malenica, doc.

Dr. sc. Tvrtko Dražina, doc.

Rad prihvaćen: 16.9.2020.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

THE EFFECT OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS ON THE EXPRESSION OF
THE GENES: *TFF3*, *TNF α* , *MCP1* AND *CXCL1* IN MICE LIVER

Tajana Burkuš

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Endoplasmic reticulum stress (ER) is characterized by the accumulation of misfolded and unfolded proteins in the ER lumen, mostly in secretory cells, which, due to their functions, are rich in the ER. In response to stress, the eukaryotic cell has evolved adaptive mechanisms known as the unfolded protein response (UPR) whose main goal is to restore cellular homeostasis. Homeostasis is restored by stopping protein translation, activation of molecular chaperones, or degradation of misfolded proteins, and can lead to cell death. Unresolved chronic ER stress leads to pathological changes. Hepatocytes have large capacity for protein synthesis and they are highly exposed to possibilities of ER stress. Activation of UPR pathways has an important role in the prevention of liver pathogenesis. Growing body of evidence connects ER stress with inflammation, cell injury, and steatosis in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) where inflammatory cytokines and chemokines play a major role. The qPCR method (optimal reaction conditions and primers) was developed for C57Bl6Crl mouse strain liver tissue. ER stress was induced with single tunicamycin injection and expression of inflammatory cytokines, *TNF α* , *MCP1*, *CXCL1*, and the *TFF3* protein, whose role in the liver is still insufficiently investigated, was examined. The results were analyzed by the REST 2009 software. ER stress induced statistically significant increased expression of *Tnfa*, *Mcp1*, and *Cxcl1* genes while expression of the *Tff3* gene was not significantly changed.

(53 pages, 9 figures, 6 tables, 72 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: (ER stress, liver, *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1*, *Cxcl1*, qPCR)

Supervisor: Mirela Baus Lončar, PhD, Sr. Sci. Assoc.

Cosupervisor: Julija Erhardt, PhD, Sr. Lect.

Reviewers: Julija Erhardt, PhD, Sr. Lect.

Nenad Malenica, PhD, Asst. Prof.

Tvrtko Dražina, PhD, Asst. Prof.

Thesis accepted: 16th September 2020

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Endoplazmatski retikul.....	1
1.2. Stres endoplazmatskog retikula.....	1
1.3. Molekularni mehanizmi UPR-a	3
1.4. Uloga stresa ER-a u razvoju bolesti jetre	6
1.5. Uloga proteina TFF3, TNF α i kemokina MCP1 i CXCL1 u organizmu i njihova uloga u jetri	9
1.5.1. TFF3 protein.....	9
1.5.2. TNF α	11
1.5.3. Kemokini.....	13
1.5.3.1. MCP1	14
1.5.3.2. CXCL1	16
1.6. Metoda qPCR-a, teorija i razne vrste kemijskih reakcija, primjena i načini kvantifikacije.....	17
2. Cilj istraživanja	24
3. Materijali i metode	25
3.1. Optimizacija qPCR testa za gene <i>Tff3</i> , <i>Tnfa</i> , <i>Mcp1</i> i <i>Cxcl1</i>	25
3.1.1. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....	28
3.1.2. Efikasnost amplifikacije	29
3.2. Analiza relativne ekspresije gena <i>Tff3</i> , <i>Tnfa</i> , <i>Mcp1</i> i <i>Cxcl1</i>	29
3.2.1. Uzorci	29
3.2.2. Izolacija RNA.....	30
3.2.3. Određivanje koncentracije i prevođenje u cDNA	31
3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR).....	31
3.2.5. Računalna obrada podataka.....	32
4. Rezultati	33
4.1. Optimizacija qPCR testa za gene <i>Tff3</i> , <i>Tnfa</i> , <i>Mcp1</i> i <i>Cxcl1</i>	33
4.2. Relativna ekspresija gena <i>Tff3</i> , <i>Tnfa</i> , <i>Mcp1</i> i <i>Cxcl1</i> u jetri	37
5. Rasprava	40
6. Zaključak	46
7. Literatura	47
8. Životopis	52

Stranica s kraticama

A - adenin

Actβ - aktin β (engl. *actin β*)

Akt - proteinska kinaza B (engl. *protein kinase B/Akt*)

ALD - alkoholna bolest jetre (engl. *alcoholic liver disease*)

ALT - alanin transaminaza

AP-1 - protein aktivator 1 (engl. *activator protein 1*)

ASK1 - kinaza 1 koja regulira apoptotski signal (engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*)

ATF/CRE element - aktivirajući transkripcijski čimbenik /element koji odgovara na ciklički AMP (engl. *activating transcription factor/cyclic AMP response element*)

ATF4 - aktivirajući transkripcijski čimbenik 4 (*activating transcription factor 4*)

ATF6 - aktivirajući transkripcijski čimbenik 6 (engl. *activating transcription factor 6*)

B2m - beta 2 mikroglobulin (engl. *beta-2 microglobulin*)

Bcl2 - B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

Bim - protein 11 nalik na Bcl2 (engl. *Bcl-2-like protein 11*)

BiP/GRP78 - imunoglobulin vezajući protein / 78 kD protein reguliran glukozom (engl. *binding immunoglobulin protein / glucose-regulated protein 78 kD*)

bZIP domena - domena bazičnog leucinskog zatvarača (engl. *basic leucine zipper domain*)

C - citozin

C - γ kemokin (engl. *γ chemokine*)

C - koncentracija u ng/μl

C/EBPγ - CCAA/vezajući protein pojačivač γ (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein γ*)

C/EBPβ - CCAAT/vezajući protein pojačivač β (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein β*)

C/EBPα - CCAAT/vezajući protein pojačivač α (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein α*)

C57BL/6NCrl - visokosrodni (engl. *inbred*) soj miševa „C57 crni 6“ s mutacijama Cox7a2^{l^s}, Cyfip2^{M1N}, H2^b

CC - β kemokin (engl. *β chemokine*)

CCR2 - C-C kemokinski receptor tip 2 (engl. *C-C chemokine receptor type 2*)

CD68 - klaster diferencijacije 68 (engl. *cluster of differentiation 68*)

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

CHOP/GADD153 - C/EBP homologni protein / gen 153-induciranog zastoja rasta i DNA oštećenja (engl. *C/EBP*

homologous protein / growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153)

ConA - Konvalin A (engl. *Convaline A*)

COPII – proteinski kompleks koji oslojava vezikule koje prenose proteine s grubog ER-a do Golgijevog aparata

CRE - elementi ovisni o cAMP-u (engl. *cAMP-response elements*)

CREBH - protein H koji se veže na CRE (engl. *CRE-binding protein H*)

CRP - C reaktivni protein

C_t - ciklus prelaska praga (engl. *threshold cycle*)

CXC - α kemokin (engl. *α chemokine*)

CXC3 - δ kemokin (engl. *δ chemokine*)

CXCL1 - kemokinski (C-X-C motiv) ligand 1 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)

CXCL2 - kemokinski (C-X-C) ligand 2 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*)

CXCR2 - kemokinski (C-X-C motiv) receptor 2 (engl. *chemokine (C-X-C motif) receptor 2*)

DAF/CD55 - čimbenik ubrzanja raspada / klaster diferencijacije 55 (engl. *decay-accelerating factor / cluster of differentiation 55*)

DAMP - molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns*)

db/db - leptin-deficijentni, dijabetični (engl. *db-diabetes*)

DMI - medij za diferencijaciju I (engl. *differentiation medium I*)

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

dNTP - deoksinukleozid trifosfat (engl. *deoxynucleoside triphosphate*)

DR5/TRAIL2 - receptor smrti 5 / TRAIL receptor 2 (engl. *death receptor 5 / TRAIL receptor 2*)

dsDNA - dvolančana DNA (engl. *double stranded DNA*)

Đ - manualni dilucijski faktor

E - efikasnost

EDEM - protein nalik α-manidozi koji poboljšava degradaciju ER-a (engl. *ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein*)

eIF2α - eukariotski čimbenik inicijacije 2 α (engl. *eukaryotic initiation factor 2 α*)

ELR - glutaminska kiselina-leucin-arginin

ER - endoplazmatski retikul

ERAD - degradacija vezana uz ER (engl. *ER-associated degradation*)

Ero1 - ER oksidoreduktin

Stranica s kraticama

ERSE - element odgovora na ER stres (engl. *ER stress response element*)

F - uzvodna početnica (engl. *forward primer*)

FADD - protein povezan s Fas preko domene smrti (engl. *Fas-associated via death domain*)

G - guanin

G6pc - katalitička podjedinica glukoze-6-fosfataze (engl. *glucose-6-phosphatase catalytic subunit*)

GADD34 - gen 34-induciranog zastoja rasta i DNA oštećenja (engl. *growth arrest- and DNA damage-inducible gene 34*)

GADPH - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GAG - glikozaminoglikan

GALE - UDP-galaktoza 4-epimeraza (engl. *UDP-galactose 4-epimerase*)

GI - gastrointestinalni trakt

GLS - Golgijeve lokalizacijske sekvence

GOI - gen od interesa (engl. *gene of interest*)

GRP94 - 94 kD protein reguliran glukozom (engl. *glucose-regulated protein 94 kD*)

GSH - glutation

HBV - hepatitis B virus

HCC - hepatocelularni karcinom (engl. *hepatocellular carcinoma*)

HcPC - progenitorne stanice HCC-a (engl. *HCC progenitor cells*)

HCV - hepatitis C virus

Herp - protein ER-a induciran homocisteinom (engl. *homocysteine-induced ER protein*)

HFD - prehrana s visokim udjelom masti (engl. *high fat diet*)

HPRT - hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaza (engl. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)

HT29 - stanična linija ljudskog adenokarcinoma debelog crijeva

I/R - ishemija/reperfuzija

ICAM-1/CD54 - unutarstanična adhezijska molekula 1 / klaster diferencijacije 54 (engl. *intercellular adhesion molecule 1 / cluster of differentiation 54*)

IKK β - I κ B kinaza (engl. *I κ B kinase*)

IL-1 - interleukin 1

IL-1 β - interleukin 1 β

IL-2 - interleukin 2

IL-3 - interleukin 3

IL-4 - interleukin 4

IL-6 - interleukin 6

IL-8 - interleukin 8

INF- γ - interferon γ

IP₃R - receptor inozitol trifosfata (engl. *inositol trisphosphate receptor*)

IRE1 α - enzim 1 α koji zahtijeva inozitol (engl. *inositol requiring enzyme 1 α*)

I κ B - I kappa B

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

KO - utišani gen (engl. *gene knock out*)

L929 - stanice mišjeg fibrosarkoma

LPS - lipopolisaharid

MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MCPI/CCL2 - monocitni kemoatraktantni protein 1 / kemokinski (C-C motiv) ligand 2 (engl. *monocyte chemoattractant protein 1 / chemokine (C-C motif) ligand 2*)

MCP1KO - utišan MCP1 gen (engl. *MCP1 knockout*)

MCPIP - MCP inducirani protein (engl. *MCP-induced protein*)

MHC-II - glavni sustav tkivne podudarnosti II (engl. *major histocompatibility complex II*)

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

MUC2 - mucin 2

N - broj

NAFLD - nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*)

NASH - nealkoholni steatohepatitis

NF κ B - nuklearni čimbenik kappa B (engl. *nuclear factor kappa B*)

ob/ob - leptin-deficijentni, debeli (engl. *ob-obese*)

p38MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenom p38 (engl. *p38 mitogen-activated protein kinase*)

P58^{IPK} - inhibitor protein kinaze P58 (engl. *protein kinase inhibitor P58*)

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

PDGF - čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor*)

PEPCK - fosfoenolpiruvat karboksikinaza (engl. *phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PERK - RNA proteinska kinaza slična kinazi ER-a (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*)

Stranica s kraticama

PGC-1 α - koaktivator 1 α gama receptora aktiviranog proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*)

PP1C - proteinska fosfataza 1C (engl. *protein phosphatase 1C*)

PPAR - receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*)

PPAR γ - receptor γ aktiviran proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

PPAR α - receptor α aktiviran proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor α*)

PQT - PrimerQuest Tool

R - nizvodna počelnica (engl. *reverse primer*)

Rho - obitelj GTPaza

RIDD - regulirani raspad mRNA ovisan o IRE1 (engl. *regulated IRE1-dependent decay of mRNA*)

RIP - regulirana intramembranska proteoliza (engl. *regulated intramembrane proteolysis*)

RIP1 - proteinska kinaza 1 koja međudjeluje s receptorom (engl. *receptor-interacting protein kinase 1*)

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

RNS - reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

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

RT - reverzna transkripcija

RT-PCR / qPCR - PCR u stvarnom vremenu / kvantitativni PCR (engl. *real-time PCR / quantitative PCR*)

S1P - proteaza na mjestu 1 (engl. *site-1-protease*)

S2P - proteaza na mjestu 2 (engl. *site-2-protease*)

SEM - standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*)

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

SIRT1 - sirtuin 1 (engl. *sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1*)

SOD1 - superoksid dismutaza 1 (engl. *superoxide dismutase 1*)

SREBP1 - vrlo očuvani receptor eksprimiran u mozgu 1 (engl. *super conserved receptor expressed in brain 1*)

Mjerne jedinice:

% - postotak

° C - stupanj celzijus

g - gram

sTNF - otopljeni TNF (engl. *soluble TNF*)

sXBP1 - prekrajani XBP1 (engl. *spliced XBP1*)

T - timin

T_a - temperatura prijanjanja (engl. *annealing temperature*)

Taq - lat. *Thermus aquaticus*

TFF - trolisni čimbenik (engl. *trefoil factor*)

TFF1 - trolisni čimbenik 1 (engl. *trefoil factor 1*)

TFF2 - trolisni čimbenik 2 (engl. *trefoil factor 2*)

TFF3 - trolisni čimbenik 3 (engl. *trefoil factor 3*)

TG - triglicerid

TLR - receptor nalik na Toll (engl. *Toll-like receptor*)

TLR4 - receptor 4 nalik na Toll (engl. *Toll-like receptor 4*)

T_m - temperatura taljenja (engl. *melting temperature*)

TNFR1 - TNF receptor 1

TNFR2 - TNF receptor 2

TNF α - čimbenik tumorske nekroze α (engl. *tumor necrosis factor α*)

TRADD - protein koji se veže s TNFR1 preko domene smrti (engl. *TNFR1-associated death domain protein*)

TRAF2 - čimbenik 2 povezan s TNFR (engl. *TNF receptor associated factor 2*)

uORF - uzvodni otvoreni okvir čitanja (engl. *upstream open reading frame*)

UPR - odgovor na nesmotane proteine (engl. *unfolded protein response*)

VEGF - vaskularno endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

VLDL - lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. *very-low-density lipoprotein*)

WT - divlji tip (engl. *wild type*)

XBP1 - X-box vezajući protein 1 (engl. *X-box binding protein 1*)

ΔC_t - delta C_t

$\Delta\Delta C_t$ - delta delta C_t

ϵ_{nuc} - ekstincijski koeficijent / faktor nukleinske kiseline u ng \times cm/ μ l

kD - kilo Dalton

M - mol

mA - miliAmper

Stranica s kraticama

min - minuta

ml - mililitar

mm - milimetar

mM - milimolar

mm³ - milimetar kubni

ng - nanogram

nm - nanometar

rpm - okretaj po minuti (engl. *round per minute*)

s - sekunda

ug - mikrogram

V - volt

μl - mikrolitar

Kemikalije:

APS - amonij persulfat

BPB - bromofenol plava (engl. *bromophenol blue*)

dH₂O - destilirana voda

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

EtBr - etidij bromid

EtOH - etanol

MgCl₂ - magnezijev klorid

mQ H₂O - mili Q voda

p1 - početnica 1

p2 - početnica 2

PAGE - poliakrilamidni gel

RPE - pufer za ispiranje soli zaostalih od prethodnih pufera

RLT - pufer za lizu stanica i tkiva prije RNA izolacije

RW1 - pufer s guanidinskim solima i etanolom za ispiranje RNA vezane za membranu stupca

TBE - Tris / borna kiselina / EDTA

TEMED - tetrametiletildiamin

TRIS - tris(hidroksimetil)aminometan

βME - β-merkptoetanol

1. Uvod

1.1. Endoplazmatski retikul

Endoplazmatski retikul (ER) razgranati je membranski sustav cjevčica i plosnatih vrećica koje se protežu citosolom eukariotske stanice. Cjevčice i vrećice međusobno su povezane a njihova membrana je direktan produžetak jezgrine vanjske membrane. Prostor koji se nalazi između jezgrinih membrana i endoplazmatskog retikula naziva se lumenom i najčešće zauzima 10% ukupnog volumena stanice. Otprilike polovica površine svih membrana prosječne životinjske stanice pripada endoplazmatskom retikulu. ER ima centralnu ulogu u sintezi lipida i proteina te služi kao unutarstanična zaliha Ca^{2+} iona koji su bitni za staničnu signalizaciju. On je mjesto proizvodnje svih transmembranskih proteina i lipida Golgijevog aparata, lizosoma, endosoma, sekretornih vezikula i stanične membrane te se u njemu proizvodi većina lipida membrane mitohondrija i peroksisoma (Alberts i sur. 2014). Osim što su razne funkcije ER-a esencijalne svakoj stanici, njegova se struktura i količina u raznim stanicama razlikuje ovisno o funkcionalnim potrebama same stanice. Dio ER-a koji je zadužen za sintezu proteina te na sebi s citosolične strane ima priljubljene ribosome naziva se hrapavim endoplazmatskim retikulom. Hrapavi retikul je zastupljeniji u stanicama sa sekretornim funkcijama kao što su plazma stanice i β stanice gušterače. Dio ER-a bez ribosoma naziva se glatkim i on je obilan u stanicama koje su aktivne u lipidnom metabolizmu i detoksifikaciji lijekova koji se otapaju u lipidima. Glavni stanični tip u jetri, hepatocit, ima znatnu količinu glatkog ER-a koji proizvodi lipoproteinske čestice koje prenose lipide krvotokom do ostalih dijelova tijela (Cooper i Hausman, 2015).

1.2. Stres endoplazmatskog retikula

U eukariotskoj stanici ER je prvi odjeljak u sekretornom putu u kojem se sintetizira otprilike trećina staničnog proteoma. Osim sinteze odgovoran je za modifikaciju i prijenos proteina na odgovarajuća ciljna mjesta unutar sekretornog puta i izvanstaničnog prostora (Hetz i sur. 2013). U ER-u se proteini namataju u nativne konformacije i prolaze kroz niz posttranslacijskih modifikacija, uključujući N-vezanu glikolizaciju, stvaranje intra- i intermolekulskih disulfidnih veza, lipidaciju, hidroksilaciju i oligomerizaciju. U procesu

kontrola kvalitete samo pravilno namotani proteini odlaze do Golgijevog kompleksa dok se nepravilno namotani proteini zadržavaju u ER-u kako bi završili proces namatanja ili bili označeni za degradaciju. Mašinerija za pravilno namatanje proteina sastoji se od 3 klase proteina: foldaza, molekulskih šaperona, lektina kalneksina i kalretikulina te proteina EDEM-a (engl. *ER-degradation-enhancing- α -mannidose-like protein*). Foldaze su enzimi koji kataliziraju korake u namatanju proteina kako bi ubrzali stopu namatanja. Molekulski šaperoni olakšavaju namatanje tako što štite nenamotane regije od okolnih proteina (Schröder i Kauffman 2005). Lektini su šaperoni koji se vežu na oligosaharidne nastavke nepotpuno namotanih proteina i zadržavaju ih u ER-u. Usprkos pomoći molekulskih šaperona, mnogi proteini koji se translociraju u ER ne uspiju postići svoju pravu trodimenzionalnu konformaciju te su naposljetku izbačeni u citosol gdje su podvrgnuti degradaciji proteosomima (Alberts i sur. 2014).

Razni fiziološki stresori poput povećane potrebe za sintezom proteina ili patološki stresori kao što su mutirani proteini koji se ne mogu pravilno namotati u ER-u mogu dovesti do neravnoteže između potrebe i kapaciteta namatanja proteina u ER-u. Takva neravnoteža dovodi do stresa endoplazmatskog retikula odnosno pretjeranog nakupljanja krivo namotanih i nenamotanih proteina (Lin i sur. 2008). Stres mogu dodatno pogoršati perturbacije okoliša ER-a kao što su promjene redoks stanja, kalcija ili neuspješna posttranslacijska modifikacija sekretornih proteina (Lai i sur. 2007). Niz adaptivnih mehanizama pod kolektivnim nazivom „odgovor stanice na nenamotane proteine“ (UPR - engl. *unfolded protein response*) pomaže stanicama održati homeostazu pravilno namotanih, funkcionalnih proteina. UPR stanica uključuje smanjenje sinteze proteina što sprječava daljnju akumulaciju nenamotanih proteina, povećanu ekspresiju gena šaperona ER-a kako bi se povećao kapacitet namatanja te povećanu ekspresiju gena za degradaciju vezanu uz ER (ERAD - engl. *ER-associated degradation*) što omogućuje razgradnju krivo namotanih proteina u proteosomima. Ukoliko stanica ne dostigne stanje ravnoteže navedenim mehanizmima, dolazi do posljednjeg mehanizma odnosno indukcije programirane stanične smrti ili apoptoze kako bi se osigurala stanična homeostaza a time i integritet organizma (Yoshida 2007).

1.3. Molekularni mehanizmi UPR-a

Tri su glavna senzora stresa koji kontroliraju UPR-ovisne odgovore: IRE1 α (engl. *inositol requiring enzyme 1 α*), PERK (engl. *protein kinase RNA-like ER kinase*) i ATF6 (engl. *activating transcription factor 6*). Ovi rezidentni transmembranski proteini ER-a prenose informaciju o statusu namatanja proteina u lumenu ER-a do citoplazme i jezgre kako bi stanica mogla reagirati na promijenjene uvjete u lumenu ER-a (Hetz i sur. 2013). U stanju bez stresa, na sve tri luminalne domene senzora stresa, vezan je BiP (engl. *binding immunoglobulin protein*), molekularni šaperon koji prepoznaje nepravilno namotane proteine i zadržava ih u lumenu ER-a. Prilikom stresa ER-a BiP se odvaja sa senzora što dovodi do aktivacije IRE1 α i PERK putem transautofosforilacije i ATF6 putem proteolize (Malhi i Kaufman 2011).

IRE1 α je transmembranski protein tipa I s dvojakom funkcijom, Ser/Thr protein kinaznom i endoribonukleaznom aktivnošću. To je ujedno i evolucijski najstarija grana UPR-a, prisutna u svih eukariota. U sisavaca postoje dva oblika gena, *Irel α* koji je široko eksprimiran te *Irel β* čija je ekspresija ograničena na epitel crijeva (Schröder i Kaufman 2005). IRE1 α protein sastoji se od luminalne domene na N-kraju, transmembranske regije, i citosolne kinazne i endoribonukleazne domene na C-kraju. Prilikom disocijacije BiP-a IRE1 α dimerizira, transautofosforilira i aktivira endoribonukleazu (RNazu). Endoribonukleazna domena potom katalizira nekonvencionalno prekrajanje *Xbp1* (engl. *X-box binding protein 1*) mRNA u citoplazmi (Slika 1.a). Translacijom takve mRNA nastaje moćan transkripcijski faktor s domenom leucinskog zatvarača (bZIP domena) koji se u jezgri veže za ERSE promotor te potiče ekspresiju gena uključenih u biogenezu ER-a i degradaciju vezanu uz ER. Dodatno, u stanju stresa ER-a, ATF6 α pojačava ekspresiju *Xbp1* mRNA što doprinosi većoj količini supstrata za IRE1 α a time i većoj količini transkripcijskog faktora. RNazna aktivnost IRE1 α sudjeluje i u degradaciji ostalih mRNA molekula koje se nađu u ER-u, kao i 28S ribosomalnih jedinica što dovodi do translacijskog i transkripcijskog utišavanja (Lai i sur. 2007). Također, IRE1 α aktivira TRAF2 i ASK1 koji posreduju u aktivaciji c-jun N-terminalne kinaze (JNK) i aktivaciji nuklearnog čimbenika nekroze kappa B (NF κ B) koji regulira niz gena uključenih u apoptozu i imunološki odgovor (Malhi i Kaufman 2011).

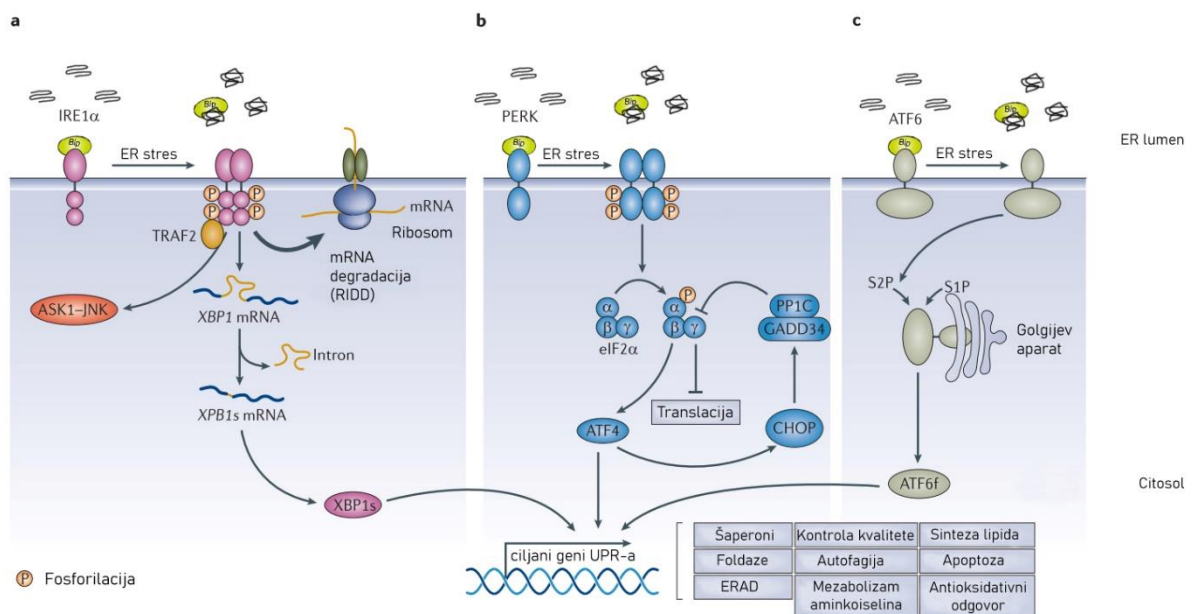
PERK je transmembranski protein tipa I s kinaznom domenom na citosolnoj strani. Ekspresija PERK-a je sveprisutna a najizraženija je u gušterači (Malhi i Kaufman 2011). Aktivacija PERK puta slična je IRE1 α putu. Prilikom nakupljanja nepravilno namotanih

proteina u lumenu ER-a BiP disocira što uzrokuje dimerizaciju i transautofosforilaciju. Aktivirani PERK dalje fosforilira serinski ostatak 51 na alfa podjedinici eukariotskog faktora inicijacije 2 (eIF2 α). eIF2 α je sveprisutan kofaktor potreban za sastavljanje 80S ribosoma na inicijacijskom kodonu mRNA za početak sinteze proteina (Lin i sur. 2008). Fosforilirani oblik eIF2 α ne može efikasno započeti translaciju što uzrokuje globalnu inhibiciju sinteze proteina (Slika 1.b). Tijekom inhibicije kratko živeći proteini se razgrade. Jedan od takvih proteina je i ciklin D1 čijom razgradnjom dolazi do zaustavljanje stanice u G1 fazi staničnog ciklusa (Schröder i Kaufman, 2005). S druge strane, fosforilirani oblik eIF2 α inicira translaciju mRNA koja sadrži kratke uzvodne otvorene okvire čitanja (uORF) kakvi se nalaze na *ATF4* mRNA. ATF4 je transkripcijski faktor koji pojačava ekspresiju gena vezanih uz antioksidativni odgovor, metabolizam aminokiselina i apoptoze preko C/EBP homolognog proteina (CHOP). CHOP pojačava ekspresiju GADD34 proteina koji stvara kompleks s proteinskom fosfatazom 1C (PP1C) što uzrokuje defosforilaciju eIF2 α i nastavak translacije proteina. Dodatno, kao posljedica fosforiliranog eIF2 α i translacijskog utišavanja smanjuje se sinteza I κ B koji ima inhibicijski efekt na NF κ B transkripcijski faktor (Lai i sur. 2007).

ATF6 α je transmembranski protein tipa II, s citoplazmatskim N-krajem koji sadrži bZIP motiv koji funkcionira kao transkripcijski faktor nakon regulirane intramembranske proteolize (RIP) u stanicama pogođenim stresom ER-a. Rezidentni oblik ATF6 α je 90 kDa te ima dvije Golgijeve lokalizacijske sekvence (GLS) koje u stanju bez stresa prekriva BiP. Prilikom stresa ER-a dolazi do disocijacije BiP-a radi čega ATF6 α ulazi u COPII vezikule i translocira se do Golgijeva kompleksa (Lai i sur.) U Golgijevu kompleksu dio proteina na C-kraju presijeca S1P (engl. *site - 1 protease*) dok membranski N-kraj presijeca S2P (engl. *site - 2 protease*) (Slika 1.c). Ovim proteolizama nastaje 50 kDa proteinski produkt koji se ispušta u citosol te dalje odlazi u jezgru gdje djeluje kao moćan transkripcijski faktor koji se veže na ATF/CRE elemente i elemente odgovora na stres ER-a (ERSE). Uz to, ATF6 α aktivira transkripciju komponentu ERAD-a nakon heterodimerizacije s prekrajenim XBP1 (Malhi i Kaufman, 2011). Ostale mete ATF6 α su BiP, XBP1, CHOP, P58^{IPK} i membranski protein Herp. U sisavaca postoji i drugi oblik ATF6 proteina, ATF6 β . Obje izoforme su pozitivni regulatori transkripcije rezidentnih molekularnih šaperona i foldaza u ER-u (Schröder i Kaufman 2005).

U stanju produljenog stresa ER-a, cilj UPR-a mijenja se iz onog koji potiče stanično preživljavanje u onaj koji vodi k apoptozi. U sva tri puta UPR-a identificirani su nizvodni proteini s proapoptotskim učincima. Aktivacija IRE1 α regrutira adaptorski protein TRAF2 koji

aktivira ASK1 čije su nizvodne mete JNK i p38 mitogenom aktivirana proteinska kinaza (MAPK) koji pokreću apoptozu. JNK ima nekoliko proapoptotskih učinaka, uključujući fosforilacijom induciranu aktivaciju proapoptotskog Bim-a, te inaktivaciju antiapoptotskih Bcl2 proteina. p38 MAPK fosforilira i aktivira transkripcijski faktor CHOP koji uzrokuje promjene u ekspresiji gena koji potpomažu apoptozu poput povećane ekspresije Bim-a i TRAF2-a dok smanjuje ekspresiju Bcl2 proteina. Dokazano je kako i regulirani IRE1-ovisni raspad mRNA (RIDD) smanjuje mRNA u ER-u stanica sisavaca. RIDD selektivno cilja i razgrađuje mRNA koje kodiraju za proteine koji sudjeluju u namatanju. Pretjerana aktivacija signalnog puta RIDD-a može uzrokovati staničnu smrt. CHOP je također meta PERK/eIF2 α i ATF6 puta. CHOP uzrokuje defosforilaciju eIF2 α te se translacija nastavlja i nativni proteini mogu ući u ER kako bi prošli kroz oksidativno namatanje proteina. Ulazak novih proteina u ER prerano, kada uvjeti stresa ER-a još uvijek nisu razriješeni, može uzrokovati stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) sa štetnim posljedicama. Ostale mete CHOP-a su kaspazom aktivirani stanični površinski receptori smrti iz TNFR porodice i ER oksidoreduktaza-1 (Ero1). Ero1 hiperoksidira ER i potiče staničnu smrt a može i aktivirati inozitol trifosfat receptor (IP₃R) što stimulira pretjeran transport Ca²⁺ iz ER-a u mitohondrij a time i staničnu smrt (Malhi i Kaufman 2011; Sano i Reed 2013).



Slika 1. Tri glavna signalna puta stresa ER-a koji kontroliraju UPR: a) IRE1 α put, b) PERK put c) ATF6 put (prema Hetz i sur. 2013)

1.4. Uloga stresa ER-a u razvoju bolesti jetre

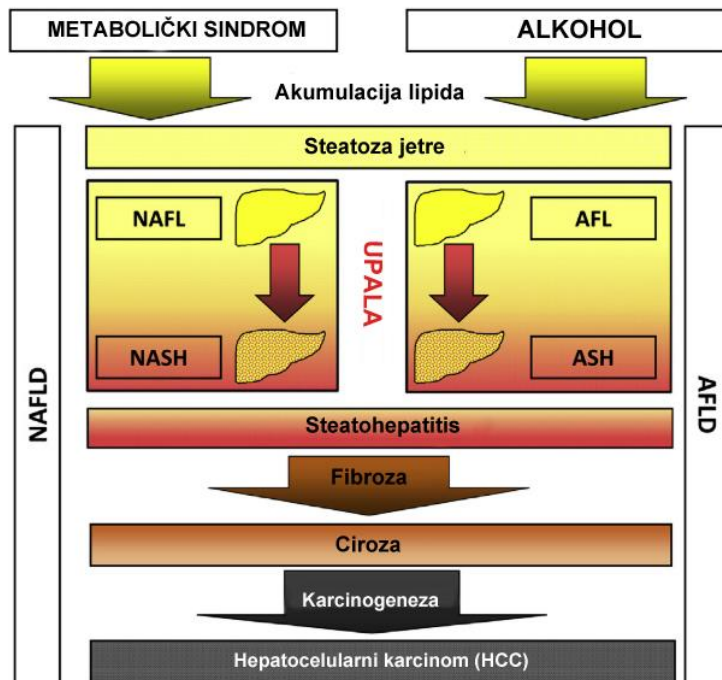
Razne bolesti mogu nastati kao posljedica neprepoznavanja i pretjeranog nakupljanja krivo namotanih proteina te neprikladnog odgovora i nemogućnosti stanice da pravilno namota proteine. Neprikladna aktivacija UPR puteva također može biti štetna jer može uzrokovati smrt stanica ili preživljenje stanica u patološkim stanjima poput neoplastične transformacije i virusne infekcije (Lin i sur. 2008). Za stres ER-a smatra se, a u nekim slučajevima je i dokazano, da igra ključnu ulogu u neurodegenerativnim bolestima kao što su Alzheimerova, Parkinsonova i prionske bolesti, poliglutaminskim bolestima, amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi, srčanim i moždanim ishemijama, aterosklerozi, bipolarnom poremećaju, tumorima, dijabetesu, autoimunim bolestima, retinopatijama i kardiovaskularnim bolestima (Chaudhari i sur. 2014)

Odgovor na stres ER-a i njegovo međusobno djelovanje s drugim staničnim organelima igra važnu ulogu u patogenezi bolesti u sekretornim stanicama bogatim ER-om (Dara i sur. 2011). Jetra predstavlja najveću žlijezdu u ljudskom tijelu, ima centralnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida i ugljikohidrata i odgovorna je za produkciju većine proteina plazme. Velika metabolička aktivnost hepatocita zahtijeva efikasan proces namatanja sintetiziranih poliproteina i brzo odstranjivanje nepravilnih i oštećenih (Kuscuoglu i sur. 2018). Hepatociti su bogati hrapavim i glatkim ER-om te se u njima odvija sinteza i sekrecija proteina plazme, sastavljanje i sekrecija lipoproteina i lipoproteina jako niske gustoće (VLDL), biosinteza kolesterola te metabolizam ksenobiotika (Malhi i Kaufman 2011). U posljednja dva desetljeća istražen je doprinos stresa ER-a u raznim oblicima bolesti jetre. Jetra ima centralnu ulogu u progresiji tzv. metaboličkog sindroma koji se odnosi na stanja što nastaju kao posljedica pretilosti (povišena razina šećera, triglicerida i kolesterola u krvi) te su često povezana s ektopičnim skladištenjem triglicerida u jetri, poznatim kao nealkoholna bolest masne jetre (NAFLD - engl. *nonalcoholic fatty liver disease*) (Rutkowski 2019). NAFLD je najčešći oblik jetrene bolesti u zapadnim zemljama a čine ga dva oblika: nealkoholna masna jetra (NAFL – engl. *nonalcoholic fatty liver*) i nealkoholni steatohepatitis (NASH – engl. *nonalcoholic steatohepatitis*). NAFL definira masna jetra (steatoza) dok je NASH definiran steatozom, hepatocelularnom ozljedom, bubrenjem hepatocita i upalom. Neki pacijenti s NAFLD-om razviju NASH koji potencijalno dovodi do fibroze, ciroze i hepatocelularnog karcinoma (Slika 2). Steatoza jetre, steatohepatitis, fibroza i ciroza su karakteristični i za alkoholnu bolest jetre (ALD - engl. *alcohol liver disease*) a stres ER-a je danas prihvaćen kao jedan od glavnih

mehanizama u njenoj patogenezi (Ji 2008). Miševi hranjeni alkoholom pokazuju steatozu, apoptozu i upalu kao i povećanje ekspresije gena UPR-a. Alkohol inhibira enzime sumpornog aminokiselinskog metabolizma što uzrokuje nakupljanje homocisteina koji inducira krivo namatanje proteina što dovodi do aktivacije stresa ER-a i indukcije steatoze (Dara i sur. 2011; Zeeshan i sur. 2016). Nekoliko studija je pokazalo povećanu ekspresiju markera stresa ER-a u jetrama NASH-a u usporedbi s normalnim tkivima. Na primjer, ATF6 je povećan u jetrama NASH-a u usporedbi s normalnom jetrom, i razina Bip (GRP78) i GRP94, šaperona ER-a uključenih u stanično preživljenje tijekom UPR-a, je značajno smanjena u pacijenata s NASH-om. Povećana produkcija ROS-a i smanjena antioksidativna aktivnost su primijećeni u ljudskom NAFLD-u kao i u životinjskom modelu steatohepatitisa (Akazawa i Nakao 2018).

Različiti metabolički uvjeti kao što su akumulacija lipida, povišena glukoza ili previsoke razine citokina neki su od čimbenika koji mogu izazvati UPR s povišenom upalom. Signalni putevi povezani s otpuštanjem upalnih citokina mogu izazvati stres ER-a i započeti ciklus koji dovodi do disfunkcije tkiva i upalne patologije kao što je primijećeno u dijabetesu tipa 2 i pretilosti. Fizičko vezanje senzora ER stresa s IRE1 i TRAF može uzrokovati ekspresiju pro upalnih citokina (Reverendo i sur. 2018). Tijekom stresa ER-a, IRE1 α -XBP grana aktivira TNF α . Istovremeno, PERK grana inicira staničnu upalnu kaskadu preko aktivacije JNK puta. I aktivirani ATF6 povećava ekspresiju TNF α i signalizaciju NF κ B. Pojačana JNK aktivacija aktivira proupalne citokine i kemokine. Oni su glavni aktivatori makrofaga u blizini upale kao i u cirkulaciji. Aktivirani makrofazi proždiru adipocite i stvaraju strukture nalik krunama koje su obilježje pretilosti. Kao rezultat, slobodne masne kiseline (FFA - engl. *free fatty acid*) su povišene a FFA koje su nataložene u jetri i mišićima induciraju staničnu disfunkciju. Tijekom stresa ER-a, PERK inducira IKK β aktivaciju i posljedično smanjuje produkciju adiponektina, koji je glavni protuupalni citokin kojeg proizvode adipociti (Mohan i sur. 2019). Novi dokazi pretpostavljaju kako je povećana apoptoza hepatocita (lipoapoptoza) ključni mehanizam koji pridonosi upali jetre i fibrogenezi tijekom NASH-a (Akazawa i Nakao 2018). Mrtve hepatocite fagocitiraju makrofazi što dovodi do otpuštanja proupalnih signala koji aktiviraju zvjezdaste stanice i dolazi do fibroze. Dugolančane masne kiseline glavni su uzroci hepatocitne lipoapoptoze. Pretilost i inzulinska rezistencija uzrokuju otpuštanje povećane razine cirkulirajućih masnih kiselina iz adipocita u krvotok koje zatim završe u hepatocitima. Za hepatocite su toksične zasićene masne kiseline koje smanjuju fluidnost membrane i slabe pretvorbu u kapljice obogaćene trigliceridima ali i slobodni kolesterol te bakterijski toksini iz crijeva poput lipopolisaharida (LPS). Kao odgovor na lipotoksičnost, hepatociti skladište

povećane količine masnih kiselina kao netoksične trigliceride i javlja se steatoza (Akazawa i Nakao 2018). Toksični lipidi izazivaju tzv. lipotoksični stres ER-a ili stres lipidnog dvosloja koji dovodi do disfunkcije ER-a te posljedične hepatocelularne ozljede, upale i apoptoze (Song i Malhi 2019).



Slika 2. Shematski prikaz patofiziološke progresije nealkoholne masne bolesti jetre (NAFLD) i alkoholne masne bolesti jetre (AFLD).

1.5. Uloga proteina TFF3, TNF α i kemokina MCP1 i CXCL1 u organizmu i njihova uloga u jetri

1.5.1. TFF3 protein

Razni proteini imaju ulogu u homeostatskom odgovoru u stanicama jetre poput raznih kemokina i malih molekula među kojima je interesantan TFF3. O njegovoj ulozi u jetri se još uvijek malo zna iako je gubitak ekspresije *Tff3* gena u jetri jedan od najistaknutijih događaja u ranoj fazi dijabetesa u multigenom modelu dijabetesa kod TallyHo soja miša (Brown i sur. 2005). TFF3 pripada porodici malih peptida s domenom oblika trolista „trefoil“ otkuda i potječe njihov naziv (TFF - engl. *trefoil family factor*). TFF peptidi su grupa topivih proteina male molekularne mase (7-12 kDa) s dominantnom ekspresijom u gastrointestinalnom (GI) traktu. U sisavaca, osim TFF3, postoje još TFF1 i TFF2 peptidi. Geni su evolucijski vrlo dobro očuvani i nalaze se grupirani na istoj kromosomskoj regiji na kromosomu 17 u miša i kromosomu 21 u čovjeka (Okada i sur. 2004). TFF peptidi su izuzetno otporni na hidrolizu i proteolizu zbog jako stabilne trolisne domene (Regalo i sur. 2005). Ona se sastoji od 42-43 aminokiselinska ostatka i sadrži 6 cisteinskih ostataka koji tvore disulfidne veze na mjestima 1-5, 2-4 i 3-6. Tercijarna struktura koja proizlazi iz ovih veza čini 3 petlje koje su međusobno okomite jedna na drugu. TFF3 ima jednu trolisnu domenu i dodatni cisteinski ostatak s kojim može formirati homodimer (Thim i May 2005). Ključna uloga TFF peptida je obrana i održavanje integriteta mukoze putem protektivnih i popravnih mehanizama. Inducirani su ozljedom epitela i olakšavaju kratkoročnu restituciju i dugoročne procese popravka, inhibiraju apoptozu i povećanjem mukozne barijere smanjuju pristup antigenima u epitelu koji je u procesu popravka (Baus Lončar i sur. 2005).

TFF3 je najraširenije eksprimiran od sva tri TFF peptida. Nalazi se u debelom i tankom crijevu, želucu, gušterači, traheji, plućima, slezeni i jetri (Xue 2013). Nalazi se, u velikim količinama, u teći zrelih vrčastih stanica i luči se na površinu mukoze duž tankog i debelog crijeva zajedno s mucinom 2 (MUC2) koji je odgovoran za reološka svojstva mukoznog sloja (Taupin 2003). TFF3 je esencijalan za restituciju što uključuje brzo prekidanje međustaničnih spojeva i veza stanica s izvanstaničnim matriksom, dediferencijaciju i širenje okolnih stanica kako bi pokrile ogoljelu mukozu. Pretpostavlja se kako TFF3 poboljšava staničnu migraciju kroz modulaciju funkcije E-kadherin/katenin kompleksa (Baus Lončar i Giraud 2005). TFF3 sprječava apoptozu nakon raznih ozljeda u nizu staničnih linija što je primjećeno i u *Tff3*

deficitarnim (KO) životinjama koje pokazuju osjetljivost na oštećenje crijeva i povećanu apoptozu. TFF3 preko NF κ B puta inducira ekspresiju DAF/CD55 čime možda ima ulogu u zaštiti stanice od aktivacije komplementa u crijevnim epitelnim stanicama (Hoffman 2005; Baus Lončar i Giraud 2005). Normalna ekspresija TFF3 ima protektivne i reparativne učinke dok je deregulacija TFF3 peptida uključena u patogenezu, proliferaciju, diferencijaciju, invaziju, migraciju i apoptozu u različitim tumorima. Pokazano je kako TFF3 smanjuje adheziju između stanica u staničnoj liniji tumora kolona HT29 što može doprinijeti malignitetu zbog diseminacije tumorskih stanica (Regalo i sur. 2005). Prekomjerna TFF3 ekspresija je često primijećena u ljudskim tumorima poput raka želuca, kože, gušterače, dojki i hepatocelularnom karcinomu (HCC). TFF3 ekspresija je povišena u spontanom, onkogeno-transgenom i kemijski induciranom HCC-u u miša kao i u ljudskim HCC-ima s visoko rizičnim faktorima (hepatitis virus, ciroza, alkoholizam). Hipometilacija *TFF3* promotorske regije i njegoja pretjerana ekspresija je često zamijećena u HCC-u (Okada i sur. 2004). Značajna prisutnost TFF3 peptida je i u slezeni, timusu, limfnim čvorovima i koštanoj srži što implicira utjecaj TFF3 u modulaciji upalnog odgovora. Upalni citokini IL-1 β , IL-6 i TNF α su važni regulatori ekspresije TFF peptida te mogu inhibirati ekspresiju *TFF3* (Baus Lončar i Giraud 2005). U staničnoj liniji humanog tumora kolona HT29 dokazano je da TNF α aktivira transkripcijski faktor NF κ B što dovodi do transkripcijske represije *TFF3* (Baus Lončar i sur. 2003). S druge strane, pokazano je kako protuupalni citokini IL-4 i IL-13 povećavaju ekspresiju *TFF3* u staničnoj liniji raka debelog crijeva (Baus Lončar i Giraud 2005). TFF3 je uključen u homeostazu glukoze i inzulinsku osjetljivost te pretili (ob/ob) miševi i miševi hranjeni masnom hranom pokazuju smanjenu ekspresiju *Tff3* u jetri. *Tff3* unešen adenovirusom u primarnu kulturu hepatocita i pretile miševe inhibira ekspresiju glukoneogenih gena poput G6pc, PEPCK i PGC-1a što smanjuje razinu glukoze u krvi (Xue i sur. 2013). Da je ekspresija *Tff3* u jetri bitna za homeostazu glukoze pokazali su i Zhao i sur. (2017) koji su istraživali kako GALE enzim u jetri utječe na *Tff3* ekspresiju. Prekomjerna ekspresija *Gale* povećava glukoneogenezu i smanjuje toleranciju na glukozu dok gensko utišavanje *Gale* poboljšava toleranciju na glukozu. Produkti galaktoze nastali GALE enzimskom reakcijom dovode do inhibicije TFF3. Povećana ekspresija *Tff3* u jetri vraća toleranciju na glukozu u transgeničnih miševa s prekomjernom ekspresijom *Gale* u jetri.

Sistemske nedostatke TFF3 utječe na sintezu i akumulaciju masnih kiselina u jetri. Većina enzima koji su ključni u metabolizmu lipida su regulirani preko SIRT1 i nuklearnih PPAR receptora čija je ekspresija u miševa s utišanim *Tff3* smanjena (Bujak i sur. 2018). Wu i

sur. (2019) otkrili su kako TFF3 može djelovati kao aktivator oksidacije masnih kiselina u jetri. Prekomjerna ekspresija *Tff3* štiti miševu od jetrene steatoze kod dijabetičnih (db/db) i ob/ob miševa povećanjem oksidacije masnih kiselina u jetri. Suprotno tome, sadržaj triglicerida u jetri normalnih miševa s utišanim *Tff3* genom je povećan, uslijed smanjene oksidacije masnih kiselina, što rezultira fenotipom masne jetre. Dodatno, TFF3 se može vezati na promotorsku regiju PPAR α te pojačati njegovu ekspresiju a time i pojačati put oksidacije masnih kiselina.

1.5.2. TNF α

TNF α je multifunkcionalni citokin koji pripada superporodici čimbenika tumorske nekroze, TNF. Članovi te porodice podijeljeni su prema primarnoj sekvenci, funkciji i strukturi. TNF α djeluje na endotelne stanice i leukocite na kojima povećava izražaj adhezijskih molekula. Djeluje kemotaktično na neutrofile i monocite što u konačnici dovodi do prijanjanja upalnih stanica i njihov prolazak u upaljeno područje. U odgovoru na LPS i ostale bakterijske produkte stvaraju se velike količine TNF α . Osim proupalnog djelovanja, TNF α ima i protutumorski učinak te mnogo imunomodulacijski učinaka kao što su povećavanje izražaja MHC-II molekula i receptora za IL-2 na limfocitima, indukcija citotoksičnih limfocita i sekrecija drugih citokina (Andreis i sur. 2009). TNF α proizvode uglavnom makrofazi ali i razne druge stanice kao što su limfoidne stanice, mastociti, fibroblasti, neuroni i endotelne stanice (Schwabe i Brenner 2006). Biološke funkcije TNF α provode se putem 2 membranska receptora, TNFR1 i TNFR2. TNFR1 se aktivira otopljenim TNF α (sTNF) dok je TNFR2 aktiviran vezanjem membranskog TNF α (mTNF α). Nakon spajanja liganda, TNF receptori mijenjaju svoju konformaciju što uzrokuje regrutaciju adapterskih molekula koje započinju aktivaciju unutarstaničnih signalnih puteva. Unutarstanična domena TNFR1 sadrži očuvani protein-protein interakcijski motiv od 80-ak aminokiselina (tzv. domena smrti) koji međudjeluje s adapterskom molekulom TRADD. Aktivacija TNFR1 dovodi do aktivacije NF- κ B, JNK i p38 MAPK preko RIP1 i TRAF2, dok je aktivacija kaspaza i apoptoze posredovana preko FADD-a (Bradham i sur. 1998).

U jetri je TNF α uključen u patofiziologiju viralnog hepatitisa, alkoholne bolesti jetre, nealkoholne bolesti masne jetre i ishemijsko-reperfuzijske (I/R) ozljede jetre. TNF α igra dvojaku ulogu u jetri jer osim što djeluje kao posrednik stanične smrti, potiče proliferaciju hepatocita i regeneraciju jetre. TNF α snažno aktivira JNK koji fosforilira i aktivira transkripcijske faktore, članove AP-1 porodice i inducira transkripciju AP-1 ovisnih gena od

kojih su mnogi uključeni u regulaciju upale, proliferaciju i staničnu smrt. S druge strane, TNF α aktivira transkripcijski faktor NF κ B koji inducira ekspresiju gena čiji produkti mogu suzbiti apoptozu. Putem regulacije ekspresije ciljnih gena, NF κ B modulira apoptotske puteve mitohondrija i receptora smrti. Ukoliko su antiapoptotski signali poput TRAF2 i NF κ B blokirani, TNF-inducirana aktivacija kaspaze 8 dovodi do aktivacije proapoptotskih članova Bcl2 homologne domene proteina, mitohondrijske depolarizacije, otpuštanja citokroma c i aktivacije izvršnih kaspaza (Schwabe i Brenner 2006).

Brojni antiapoptotski ali i nekoliko bitnih proapoptotskih gena poput TNF α su inducirani NF κ B-om. U odgovoru na stres ER-a u stanicama tretiranim tunikamicinom, IRE1 α putem TRAF2 formira kompleks s inhibitorom κ B kinaze (IKK) što dovodi do aktivacije NF κ B. Stres ER-a dovodi do snažne ekspresije TNF α preko IRE1 α i NF κ B te TNF α potiče staničnu smrt aktivacijom kaspaze 8 (Hu i sur. 2006).

U stanicama mišjeg fibrosarkoma (L929) u kojima TNF α izaziva akumulaciju ROS-a i staničnu smrt dokazano je kako TNF α inducira UPR na način ovisan o ROS-u. TNF α , kao i tunikamicin, inducira fosforilaciju eIF2 α te ekspresiju *GADD34* i *XBPI* mRNA u L929 stanicama (Xue i sur. 2005). U nedostatku NF κ B aktivnosti moguća je prolongirana TNF-inducirana aktivacija JNK (Schwabe i Brenner 2006). Aktivnost NF κ B pojačava antioksidativni odgovor i sprječava stvaranje ROS-a i JNK aktivacije. Kod I/R ozljede, blokiranje jetrene produkcije ROS-a putem povećane ekspresije SOD1 skoro u potpunosti sprječava jetrenu aktivaciju JNK i ozljedu. TNF α ne uzrokuje jetrenu ozljedu u normalnim hepatocitima u organizmu zbog snažne aktivacije citoprotektivnih puteva kao što je NF κ B. Administracija Konvalina A (ConA) uzrokuje hepatitis posredovan T stanicama s velikom hepatocelularnom smrću bez potrebe blokiranja NF κ B transkripcije. T limfociti koji infiltriraju u jetru eksprimiraju velike količine TNF α na svojoj membrani što uzrokuje jaču i prolongiranu aktivaciju JNK zbog simultane aktivacije oba TNF receptora (Schwabe i Brenner 2006).

Povećani stres ER-a uočen je u prekancerogenim stanjima koji prethode razvoju HCC-a, uključujući HBV i HCV infekcije te NASH. Hepatocitno bubrenje, ispuštanje ALT-a, jetreni trigliceridi i kolesterol, kao i SREBP1 i JNK aktivacija, smanjeni su u miševa bez TNFR1. TNF i ostali medijatori nastali zbog aktiviranih upalnih makrofaga, stimuliraju kompenzacijsku hepatocitnu proliferaciju i proširuju HCC progenitore (HcPC). Nadalje, TNF pogoršava upalni mikrookoliš te inducira ekspresiju kemokina i faktora rasta/citokina kao i samog TNF α . Zajednička akcija ovih faktora pridonosi razvoju NASH-nalik patologiji a NASH pridonosi

progresiji HCC-a. TNF direktno stimulira rast HCC-a putem NF κ B aktivacije ali dodatni nizvodni TNFR1 efektori kao što je JNK mogu pridonijeti rastu HCC-a ali i smrti hepatocita (Nakagawa i sur. 2014).

1.5.3. Kemokini

Kemokini su mali heparin-vezajući proteini koji čine veliku porodicu peptida (60-100 aminokiselina). Strukturno su slični citokinima a glavna im je funkcija regulacija stanične migracije. Prema položaju i broju cisteinskih ostataka na N-kraju molekule može ih se podijeliti u četiri potporodice: CXC, CC, CX3C i C. Sastoje se od 3 različite domene: jako fleksibilne N-terminalne domene koja je ograničena disulfidnim vezama između N-terminalnih cisteina, dugačke petlje koja se sastoji od 3 antiparalelnih β -petlji i α -heliksa koji prekriva β -petlje. Većina kemokina je molekularne mase između 8 i 12 kDa s 1 do 3 disulfidne veze a homologija sekvenci je varijabilna (20-90 %). Kemokini pokreću kemotaksiju vezivanjem na specifične površinske transmembranske receptore koji su povezani s heteromernim G proteinima čija aktivacija dovodi do stvaranja inozitol trifosfata, ispuštanja unutarstaničnog kalcija i aktivacije proteinske kinaze C. Vezanje kemokina također aktivira porodicu Rho proteina, guanozin trifosfat-vezanih proteina, koji utječu na staničnu pokretljivost putem regulacije aktinskih vezanih procesa kao što su stvaranje pseudopodija i membranskog nabiranja. Kemokini su grupirani i prema dvjema glavnim funkcijskim potporodicama: upalni i homeostatski kemokini. Upalni kemokini kontroliraju regrutaciju leukocita u upalnim i tkivnim ozljedama dok homeostatski kemokini izvršavaju svoje funkcije održavanja homeostaze poput navigacije leukocita prema i unutar sekundarnih limfoidnih organa te u koštanoj srži i timusu tijekom hematopoeze (Deshman i sur. 2009; Melgarejo i sur. 2009).

1.5.3.1. MCP1

MCP1 je član C-C klase B porodice kemokina i jedan je od glavnih čimbenika uključenih u inicijaciju upale. Kodiran je *CCL2* genom koji se kod čovjeka nalazi na kromosomu 17 a u miša na kromosomu 11. Njegova ekspresija regulirana je na transkripcijskoj razini putem stimulatornih faktora kao što su PDGF, IL-1, IL-4, TNF α , VEGF, bakterijski LPS i INF- γ (Yadav i sur. 2010). MCP1 potiče kemotaksiju i transendotelnu migraciju monocita prema upalnim lezijama tako što međudjeluje s membranskim CC kemokinskim receptorom 2 (CCR2) u monocitima. MCP1 povećava ekspresiju β 2 integrina na monocitnoj staničnoj površini radi čega dolazi do adhezije monocita na proteine izvanstaničnog matriksa (Melgarejo i sur. 2009). MCP1 se proizvodi konstitutivno ili nakon selektivne indukcije putem oksidativnog stresa, citokina ili faktora rasta, u mnogim tipovima stanica poput fibroblasta, astrocita, mikroglia, monocita, endotelnih, epitelnih, glatko-mišićnih i mezangijskih stanica (Rull i sur. 2010). Osim uloge u kemotaksiji MCP1 regulira produkciju proupalnih citokina i adhezijskih molekula na monocitima/makrofazima zbog čega se sve više istražuje u raznim kroničnim upalnim bolestima (Mandrekar i sur. 2011). Povećana ekspresija uočena je kod pacijenata s različitim tipovima jetrene ozljede ali i u eksperimentalnim modelima akutne i kronične ozljede jetre što ga čini potencijalnom metom za razvoj novih lijekova (Dagouassat i sur. 2010).

Metabolički poremećaji, viralni hepatitis ili konzumacija alkohola uzrokuju kroničnu ozljedu jetre čije su posljedice remodeliranje organa koje je obilježeno fibrozom i steatozom. Jetrena steatoza je također često zapažana u sistemskim metaboličkim poremećajima poput dijabetesa, pretilosti i dislipidemiji. MCP1 koji je primarni ligand CCR2 receptora povećan je u jetrama pacijenata s NASH-om i mišjim modelima steatohepatitisa i fibroze. Inhibicija MCP1 smanjuje jetrene makrofage što rezultira u smanjenim razinama proupalnih citokina u ozljeđenoj jetri (Baeck i sur. 2012).

U db/db miševa i u WT miševa koji su hranjeni masnom hranom uočena je povećana ekspresija *MCP1* u masnom tkivu i plazmi. MCP1 povećava infiltraciju makrofaga u masno tkivo, rezistenciju na inzulin i steatozu jetre povezanu s pretilošću u miševa. Inhibicija funkcije MCP1 umanjuje rezistenciju na inzulin i steatozu kao i infiltraciju makrofaga u masno tkivo pretilih miševa (Kanda i sur. 2006).

MCP1 je povećan u Kupfferovim stanicama kao i u hepatocitima miševa hranjenih alkoholom. Kronična konzumacija alkohola inducira oštećenje jetre u miševa divljeg tipa dok su MCP1KO miševi zaštićeni od alkoholne ozljede jetre bez obzira na visoke razine alkohola i endotoksina u krvi (Mandrekar i sur. 2011). Proupalni citokini TNF α , IL-1 β i IL-6 kao i aktivacijski biljezi makrofaga, ICAM-1 i CD68, su značajno povišeni u WT miševa tretiranih alkoholom u usporedbi s kontrolama, dok su MCP1KO miševi tretirani alkoholom u nemogućnosti inducirati proupalne citokine u jetri. Nadalje, alkoholom inducirani oksidativni stres i osjetljivost na LPS koji rezultiraju pojačanom ekspresijom proupalnih citokina inhibirani su u MCP1KO miševa tretiranih alkoholom. PPAR α i PPAR γ , bitni transkripcijski faktori u metabolizmu i u upalnim odgovorima, povišeni su u alkoholom tretiranih MCP1KO miševa. Kronična ozljeda jetre karakterizirana je steatozom a MCP1 inhibira indukciju i aktivaciju PPAR α čime se otežava oksidacija masnih kiselina u jetri (Mandrekar i sur. 2011).

Mnoga istraživanja pokazuju kako su stres ER-a i autofagija uključene u indukciju upalnog odgovora i kako pridonose patogenezi kroničnih upalnih bolesti. Nedavno otkriveni „zink finger“ protein, MCP1 inducirani protein (MCPIP), inicira seriju signalnih događaja koji uzrokuju oksidativni stres i stres ER-a koji dovode do autofagije koja može rezultirati staničnom smrću ili diferencijacijom stanica (Kolattukudy i Niu 2012). Prisilna ekspresija MCPIP rezultira značajnim povećanjem transkripta i razine biljega stresa ER-a, GRP78 i IRE1 te autofagnog biljega beclina (Roy i Kolattukudy, 2012). MCPIP inducira adipogenezu što rezultira povećanjem broja adipocita koji pridonose pretilosti. MCPIP dovodi do stvaranja ROS/RNS koji induciraju rane adipogenske transkripcijske čimbenike C/EBP β i C/EBP γ koji uzrokuju stres ER-a što dovodi do autofagije i indukcije C/EBP α i PPAR γ koji su uključeni u adipogenezu. Utišavanje MCPIP-a smanjuje stres ER-a koji je uključen u DMI-induciranu adipogenezu dok utišavanje IRE1 sa siRNA smanjuje razinu transkripta C/EBP α i PPAR γ što pokazuje važnost UPR signalizacije u adipogenezi (Younce i Kolattukudy 2012) Dodatno, MCPIP može kontrolirati upalni odgovor inhibicijom NF κ B aktivnosti putem svoje deubikvitinazne domene ili degradacijom mRNA upalnih citokina putem svoje RNazne domene (Kolattukudy i Niu 2012).

1.5.3.2. CXCL1

CXCL1 ili kemokin deriviran iz keratinocita pripada podklasi CXC kemokina čiji aminokiselinski slijed: glutaminska kiselina-leucin-arginin (ELR) prethodi prvom cisteinskom ostatku CXC motiva (Vieira i sur. 2009). U organizmu CXCL1 ima dvostruku ulogu u imunom odgovoru te je zaslužan za regrutaciju i aktivaciju neutrofila u borbi protiv infekcije. Prvo usmjerava periferne neutrofile na mjesto infekcije a zatim aktivira otpuštanje proteaza i ROS-a koji ubijaju mikrobe u tkivu (Sawant i sur. 2016). CXCL1 provodi svoju funkciju vezanjem na CXCR2 receptore na neutrofilima i vezanjem na glikozaminoglikane (GAG) na endotelnim, epitelnim stanicama i izvanstaničnom matriksu (Sawant i sur. 2016). Migracija neutrofila iz krvnih žila prema tkivu bitna je u udaljenoj ozljedi organa nakon početne septične ili traumatske ozljede u ljudi. Istraživanja upala na animalnim modelima pokazala su kako neutrofile prolaze bazalnu membranu krvnih žila i migriraju u tkiva kako bi inducirali tkivnu ozljedu i posljedičnu disfunkciju organa preko otpuštanja ROS/RNS te proteaza. Dodatno, CXCL1 i njegovi blisko povezani kemokini implicirani su kao kemotaktični ili aktivirajući čimbenici za bazofile, eozinofile, monocite, glatke mišićne stanice i limfocite. U epidermi, CXCL1 igra ulogu u regrutaciji upalnih stanica u zacjeljivanju rane nakon ozljede te igra ulogu u angiogenezi i reepitelizaciji rana (Faleiros i sur. 2009).

Prepoznavanje mikroorganizama koji napadaju organizam i njihovih produkata su veliki poticaj za aktivaciju urođenog imunološkog odgovora putem receptora nalik na Toll (TLR). Neutrofile igraju važnu inicijalnu ulogu u kontroli infekcije, prvo putem fagocitoze mikroorganizama a zatim otpuštanjem medijatora koji privlače druge leukocite prema ozlijeđenom tkivu. TLR4-eksprimirajući tkivni makrofazi otpuštaju CXCL1 i CXCL2 nakon stimulacije lipopolisaharidima koji su glavni sastojak membrana Gram-negativnih bakterija. Mastociti također ispuštaju ove kemokine putem granula ili kao nosivih molekula nakon stimulacije lipopolisaharidima te su odgovorni za inicijalno privlačenje neutrofila iz cirkulacije. Jednom kada dođu do stimuliranog tkiva, neutrofile penetriraju na makrofag-ovisan način (De Filippo i sur. 2013).

Infiltracija neutrofila je uključena u promicanje jetrene ozljede i razne tipove jetrenih bolesti, uključujući lijekovima ili alkoholom izazvanu ozljedu jetre.. Podaci mehanističkih studija pokazuju kako alkohol u kombinaciji s masnom prehranom sinergistički inducira nitrozoaktivni, mitohondrijski i stres ER-a te povećanje ekspresije hepatičkog TLR4 što sve skupa

potpomaže razvoju steatohepatitisa. Palmitinska, oleična i linoleična kiselina povećavaju ekspresiju *Cxcl1* mRNA u mišjim hepatocitima a masna hrana u kombinaciji s etanolom rezultira u povećanim jetrenim i serumskim slobodnim masnim kiselinama. Blokada CXCL1 s CXCL1 neutralizirajućim antitijelom ili genskom delecijom *Cxcl1* smanjuje neutrofilnu infiltraciju i ozljedu jetre kod miševa hranjenih masnom hranom i alkoholom. Nadalje, ekspresija *Cxcl1* mRNA je povećana u hepatocita, hepatičnim stelatnim stanicama i endotelnim stanicama izoliranim iz miševa hranjenim masnom hranom i alkoholom u usporedbi s miševima koji su samo hranjeni masnom hranom što dodatno potvrđuje sinergistički učinak masne i alkoholne ishrane na upalu i ozljedu jetre (Chang i sur. 2015).

CXCL1 je bitan u procesu čišćenja nekrotičnih stanica u organizmu. Molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (DAMP) koje ispuštaju nekrotične stanice izazivaju upalni odgovor koji olakšava čišćenje mrtvih stanica pri kojem je mobilizacija neutrofila jedan od ključnih koraka. Jetra je glavni izvor produkcije CXCL1 prilikom izazova s nekrotičnim stanicama. Za produkciju CXCL1 bitna je interakcija između hepatocita i Kupfferovih stanica koji povisuju produkciju TNF α i aktiviraju NF κ B u hepatocitima što potiče produkciju CXCL1 i mobilizaciju neutrofila prilikom stimulacije nekrotičnim stanicama (Su i sur. 2018).

Više studija pokazalo je važnost CXCL1 u bolestima jetre. Kod modela glodavaca gdje su miševi inokulirani adenovirusom modificiranim za izazivanje prekomjerne ekspresije *CXCL1*, pretjerana ekspresija upalnih gena, uključujući IL- β i kalprotektina, u jetri odgovorna je za upalnu ozljedu jetre i u konačnici nekrozu jetre (Faleiros i sur. 2009). Ekspresija *CXCL1* je povišena i korelira s infiltracijom neutrofila i ozbiljnosti bolesti u pacijenata s alkoholnim hepatitisom dok je ekspresija *CXCL1* i njegovih receptora također povišena u jetrama pretilih pacijenata s nealkoholnim steatohepatitisom (Chang i sur. 2015).

1.6. Metoda qPCR-a, teorija i razne vrste kemijskih reakcija, primjena i načini kvantifikacije

Lančana reakcija polimeraze (PCR - engl. *polymerase chain reaction*) je molekularna tehnologija koja omogućuje brzo i jeftino umnažanje DNA fragmenata *in vitro* a razvio ju je Nobelovac Kary Mullis 1980-ih godina. Od tada je postala jedna od osnovnih alata u genetičkom i molekularnom istraživanju gdje su potrebne velike količine DNA za provedbu

eksperimenata. PCR se temelji na seriji od 20 - 40 ciklusa grijanja i hlađenja u svrhu ubrzanja replikacije DNA putem enzimskih reakcija i stvaranja amplikona. Količina ciljnih sekvenci se udvostručava svakim ciklusom što vodi do eksponencijalne amplifikacije. Za reakciju su potrebni: jednolančani ili dvolančani DNA kalup, par oligonukleotidnih početnica, sva četiri deoksiribonukleotidna trifosfata (dNTP), termostabilna DNA polimeraza i pufer s magnezijevim ionima. Svaki PCR ciklus sastoji se od nekoliko temeljnih koraka: inicijacije, denaturacije, vezanja početnica i elongacije. U reakciji inicijacije dostiže se temperatura između 94 - 96 °C na 2 - 10 minuta. Ovaj korak aktivira DNA polimeraze i reagense u reakciji ali i denaturaciju kontaminanata ukoliko su prisutni u uzorku. Drugi korak je denaturacija u trajanju od 20 - 30 sekundi gdje se na temperaturi od 94 - 98 °C denaturira dvolančana DNA zbog kidanja vodikovih veza između lanaca. U sljedećem koraku temperatura se snizuje na 50 - 65 °C na 20 - 40 sekundi kako bi došlo do vezanja komplementarnih početnica. Optimalna temperatura za ovaj korak ovisi o temperaturi taljenja (T_m - engl. *melting temperature*) početnica. T_m je temperatura pri kojoj se polovica DNA nalazi u dvolančanom a polovica u jednolančanom obliku. Početnice se ne mogu vezati ukoliko je temperatura vezanja previsoka. S druge strane, ako je temperatura preniska može doći do ne specifičnog vezanja početnica i amplifikacije. Najidealnija temperatura vezanja je obično 3 - 5 °C ispod T_m početnica. U koraku elongacije DNA polimeraza se veže na kompleks početnice i kalupa. DNA polimeraza vrši sintezu DNA dodavajući dNTP-ove u 5' - 3' smjeru što stvara novosintetizirani lanac komplementaran lancu kalupu. Temperatura ovog koraka ovisi o DNA polimerazi koja se koristi. Uobičajena *Taq* DNA polimeraza koja je otporna na toplinu idealno funkcionira na temperaturama između 72 - 78 °C. Vremensko trajanje ovisi o duljini originalnog kalupa i brzini DNA polimeraze. Posljednja elongacija je korak gdje se u 5 - 15 minuta dovršava sinteza preostalih jednolančanih DNA nakon zadnjeg PCR ciklusa. (https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php)

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR - engl. *real time PCR*) ili kvantitativni PCR (qPCR - engl. *quantitative PCR*) je metoda zasnovana na uobičajenom PCR-u gdje se prilikom svakog ciklusa detektiraju promjene u koncentraciji amplikona. qPCR prikuplja podatke za vrijeme PCR umnažanja preko fluorescentnog signala kojeg emitira specijalna proba ili boja koja se veže na DNA. Fluorescentni signal proporcionalan je količini dobivenog PCR produkta tijekom svakog ciklusa. (https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php).

qPCR se često koristi u dijagnostičke svrhe ili u bazičnim istraživanjima. Kao istraživačko sredstvo, glavna primjena je u područjima fiziologije, patofiziologije i razvojne biologije zbog mogućnosti brzog i točnog određivanja ekspresije gena. qPCR se često primjenjuje u modelnim organizmima gdje se promatra odgovor na vanjske stimulanse i stječe uvid o potencijalnim promjenama u nivou proteina i funkciji. U kliničkoj molekularnoj dijagnostici, qPCR se može koristiti za mjerenje bakterijskog i virusnog opterećenja kao i za određivanje i genotipizaciju patogenih virusa. U kliničkoj onkologiji koristi se za određivanje statusa tumora. Koristi se i u industriji za kvantifikaciju mikrobiološkog opterećenja u hrani, detekciji fitopatogena te u određivanju genetički modificiranih organizama (Valasek i Repa, 2005).

U pravilnom funkcioniranju qPCR-a bitna je mogućnost detektiranja fluorescentnih signala. Potrebna je odgovarajuća instrumentacija koja može ekscitirati fluorescentne boje (fluorofore) i detektirati valne duljine koje se pritom emitiraju. Instrument može potaknuti ekscitaciju na tri načina: lampama, LED-icama, i laserima. Podaci se prikupljaju pomoću fotodetektora koji dopuštaju prolaz samo željenim valnim duljinama (vrh emisijskog spektra fluorofora) u jednoj reakcijskoj smjesi. Drugi dio instrumenta sastoji se od uobičajenog PCR termalnog bloka za umnažanje. Za qPCR je potreban i prikladan računalni software za pravilno prikupljanje i analizu podataka. Kako se podaci prilikom umnažanja prikupljaju, software za analizu ilustrira graf umnažanja ili amplifikacije (https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php).

Postoji mnogo metoda za fluorescencijsko praćenje umnažanja DNA kod qPCR-a. Dvije uobičajene metode za detekciju PCR produkata u qPCR-u su specifične DNA probe s fluoroforom poput *TaqMan*-a i nespecifične interkalirajuće boje koja se veže na dvolančanu DNA (dsDNA - engl. *double stranded DNA*) poput *SYBR Green I*.

TaqMan probe su dizajnirane da se vežu na ciljne sekvence na ampliconu. One sadrže fluorescentnu reporter boju na 5' kraju i utišivača fluorescencije koji se nalazi na 3' kraju probe. Blizina fluorofora i utišivača inhibira fluorofor od emitiranja fluorescencije. *Taq* DNA polimeraza koja se koristi u *TaqMan* metodi ima 5' - 3' egzonukleaznu aktivnost koja se prilikom polimerizacije lanca iz početnica susreće s fluoroforom na 5' kraju probe i zamjenjuje ga nukleotidima. Fluorofor koji se odvoji od utišivača emitira fluorescenciju koju detektira instrument. Prednosti *TaqMan* metode su vezanje proba na ciljne sekvence na DNA molekuli što pridonosi specifičnosti metode. Dodatno, korištenjem raznih fluorofora na probama, mogu

se detektirati i pratiti različiti amplikoni u jednoj reakcijskoj smjesi simultano. Nedostatak metode je taj što je 5' - 3' egzozonukleazna aktivnost presudna za pravilno funkcioniranje metode te ne postoje alternative kojima bi se mogao kompenzirati gubitak signala u slučaju kada uzorci sadrže inhibitore DNA polimeraza (https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php).

SYBR Green metoda ovisi o interkalirajućoj *SYBR Green I* boji. Kada *SYBR Green I* nije vezana na dsDNA emitira se jako malo fluorescencije a kada DNA polimeraza sintetizira komplementarni lanac uzorka *SYBR Green I* se inkorporira u dsDNA i emitira jak fluorescentni signal. Na početku svakog sljedećeg PCR umnažanja, fluorescentni signal se smanjuje jer se dsDNA denaturira. Fluorescentni signal uzoraka prikuplja se na kraju elongacijskog koraka svakog PCR umnažanja kako bi se odredila relativna promjena u amplificiranim produktima. S obzirom da *SYBR Green I* nije specifična dsDNA vezujuća boja, ona se veže na sve dvolančane fragmente što onemogućuje razlikovanje željenih od nespecifičnih produkata koji nastaju PCR-om. Uključivanje analize krivulje taljenja omogućuje razlikovanje amplificiranih produkata. Krivulja taljenja je graf koji prikazuje fluorescenciju u ovisnosti o temperaturi. Kada je DNA ugrijana, vodikove veze između dva lanca slabe i pucaju što se naziva DNA taljenje ili denaturacija. Različiti DNA produkti imaju različite temperature taljenja, a metoda je dovoljno osjetljiva da razlikuje amplikone čija se T_m razlikuje u samo 2 °C. Denaturacijom DNA uzorka inkorporirana *SYBR Green I* boja otpušta se u otopinu zbog čega fluorescencija opada. Za razliku od gel elektroforeze gdje se mogu razlikovati različiti produkti ovisno o njihovoj veličini, u analizi krivulje taljenja čak i umnoženi produkti sličnih veličina se mogu razlikovati. To se može postići zato što različiti qPCR produkti imaju različit omjer GC/AT nukleotida. Čak i kada je GC/AT sadržaj sličan između dva amplikona, različita distribucija GC i AT imat će različitu temperaturu taljenja. Prednost *SYBR Green* metode je u tome što je ona lako dostupna i jeftinija. Dodatno, *SYBR Green* metoda je fleksibilna kod DNA polimeraza koje se mogu koristiti u reakciji. U slučaju da je jedna DNA polimeraza inhibirana, mogu se upotrijebiti mnoge alternative kako bi se zaobišla inhibicija. Nedostaci su već spomenuta nespecifičnost metode radi čega je potrebno koristiti analizu krivulje taljenja, provjeriti produkte na gelu i efikasnost svake PCR reakcije.

(https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php).

Za praćenje ekspresije gena, odnosno mRNA, qPCR se može provesti u jednom koraku ili u dva koraka. Kod qPCR-a u jednom koraku u tubici se odvijaju komplementarna DNA

(cDNA - engl. *complementary DNA*) sinteza i PCR amplifikacija dok se kod qPCR-a u dva koraka reverzna transkripcija (RT) i PCR amplifikacija odvijaju u 2 različite tubice. Prednost qPCR-a u jednom koraku je ta što se obje enzimske reakcije odvijaju u jednoj tubici čime se minimaliziraju eksperimentalne varijacije. Nedostatak metode je taj što se početna RNA vrlo brzo razgradi ukoliko nije pravilno rukovana radi čega metoda nije baš prikladna kada se isti uzorak ispituje nekoliko puta u određenom vremenskom periodu. qPCR u dva koraka razdvaja RT od PCR-a što omogućuje nekoliko različitih qPCR analiza na razrjeđenjima jedne cDNA. S obzirom da je proces reverzne transkripcije poznat po svojoj vrlo varijabilnoj reakcijskoj efikasnosti, korištenje razrjeđenja iste cDNA osigurava da reakcije iz slijedećih analiza imaju istu količinu kalupa kao i oni koji su analizirani ranije. Prednost je i ta što su podaci u qPCR- u dva koraka poprilično reproducibilni. Protokol qPCR-a u dva koraka je preferiran kada se koristi DNA vezujuća boja poput *SYBR Green I* jer je lakše eliminirati dimere početnica manipulacijom temperatura taljenja. S druge strane, protokoli u dva koraka imaju veću mogućnost kontaminacije u qPCR-u (Wong i Medrano 2005).

Kako bi računanje ekspresije gena bilo što točnije, odnosno što manja varijacija između uzoraka, potrebno je upotrijebiti različite strategije normalizacije. One uključuju normalizaciju preko identične količine RNA koja se prevodi u cDNA te mjerenje razine ekspresije referentnog gena. Idealni referentni gen bi trebao biti ekspimiran bez promjena u različitim eksperimentalnim uvjetima, različitim tkivima ili tipovima stanica, razvojnim stadijima. S obzirom da ne postoji gen koji zadovoljava navedene kriterije, potrebno je utvrditi stabilnost ekspresije kontrolnog gena za specifične potrebe eksperimenta prije njegovog korištenja za normalizaciju. Kao referentni geni koriste se tzv. „housekeeping geni“ koji su potrebni za održavanje osnovnih staničnih funkcija te stoga imaju stabilnu i konstitutivnu ekspresiju. Često korišteni su β -aktin, GAPDH, HPRT, tubulini, ciklofilin, albumin i 18S ribosomalna RNA (Wong i Medrano 2005; Huggett i sur. 2005).

qPCR se sastoji od 4 faze: linearna faza, rana eksponencijalna faza, log-linearna ili eksponencijalna faza i plato faza. Tijekom linearne faze (prvih 10 - 15 ciklusa) fluorescencijska emisija još nije prešla preko praga bazne fluorescencije. U ranoj eksponencijalnoj fazi, količina fluorescencije dostiže graničnu vrijednost fluorescencije gdje je ona znatno veća od bazne fluorescencije. Ciklus u kojem se taj prelazak dogodi naziva se C_t (engl. *threshold cycle*). C_t vrijednost predstavlja početni broj kopija originalnog kalupa te se koristi pri računanju rezultata. Tijekom log-linearne faze PCR dostiže svoju optimalnu amplifikaciju gdje se, u

idealnim uvjetima, PCR produkti udvostruče nakon svakog ciklusa. Na kraju, plato faza je dostignuta kada reagensi postanu ograničeni i intenzitet fluorescencije više nije koristan za računanje podataka (Wong i Medrano 2005).

U qPCR-u postoje dvije vrste kvantifikacija: apsolutna i relativna. Apsolutna kvantifikacija pruža točniju i vjerodostojniju metodu za određivanje količine nukleinskih kiselina, ali i mnogo zahtjevniju. C_t vrijednosti, dobivene iz nepoznatog uzorka, uspoređuju se s vrijednostima C_t iz baždarnih krivulja dobivenim preko serijskih razrjeđenja uzoraka poznatih koncentracija. Podaci se najčešće izražavaju kao broj kopija po stanici. Kod relativne kvantifikacije, promjene u ekspresiji gena u uzorku mjere se u odnosu na ekspresiju referentnog gena i rezultat je zapravo omjer ciljnog i referentnog gena (Bustin i Nolan 2004).

Kod relativne kvantifikacije najčešće korištena metoda za analizu podataka je Livakova, komparativna C_t ili $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda. Ona pretpostavlja da se gen od interesa (GOI) i referentni gen umnožavaju s efikasnošću blizu 1 ili 100% te da su im međusobne efikasnosti u rangu od 5% (Livak i Schmittgen 2001). Za ovu metodu potrebno je odraditi slijedeće korake:

1. Normalizirati C_t (gena od interesa) s C_t (referentnog gena)
 - ΔC_t (kontrola) = C_t (gen od interesa, kontrola) - C_t (referentni gen, kontrola)
 - ΔC_t (uzorak) = C_t (gen od interesa, uzorak) - C_t (referentni gen, uzorak)
2. Normalizirati ΔC_t ispitivanog uzorka s ΔC_t kontrole ili kalibratora
 - $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (uzorak) - ΔC_t (kontrola)
3. Izračunati omjer ekspresije ili razliku u ekspresiji
 - $2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{omjer normalizirane ekspresije}$

gdje 2 predstavlja efikasnost umnažanja (E) jer se pretpostavlja kako se svakim PCR ciklusom iz jedne molekule kalupa dobiju dvije molekule.

Onda kada efikasnosti reakcija gena od interesa i referentnog gena nisu slične koristi se Pfafflova metoda koja se koristi slijedećom jednačinom:

$$\text{Omjer ekspresije} = \frac{(E_{\text{gen od interesa}})^{[\Delta C_t, \text{ gen od interesa (kontrola-uzorak)}]}}{(E_{\text{referentni gen}})^{[\Delta C_t, \text{ referentni gen (kontrola-uzorak)}]}}$$

Pfafflova i Livakova metoda su usko povezane. Livakova metoda je zapravo posebni slučaj Pfafflove metode. Uvrštavanjem 100% efikasnosti, odnosno 2, u Pfafflovu jednadžbu dobiva se:

$$\begin{aligned}\text{Omjer ekspresije} &= \frac{2^{[\Delta C_t, \text{ gen od interesa (kontrola-uzorak)]}}}{2^{[\Delta C_t, \text{ referentni gen (kontrola-uzorak)]}}} \\ &= 2^{-[(C_t, \text{ gen od interesa (uzorak)} - C_t, \text{ gen od interesa (kontrola)}) - [(C_t, \text{ referentni gen (uzorak)} - C_t, \text{ referentni gen (kontrola)})]} \\ &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

(<https://www.bio-rad.com/en-br/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>)

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada bila je uspostava istraživačkih alata za praćenje relativne ekspresije gena: *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1* u tkivu jetre miševa divljeg tipa soja C57BL6NCrl.

Sljedeći cilj bio je praćenje njihove razine ekspresije u uvjetima stresa endoplazmatskog retikula izazvanog tunikamicinom.

3. Materijali i metode

3.1. Optimizacija qPCR testa za gene *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*

Jedan od ciljeva ovoga rada bila je optimizacija gena od interesa i referentnih gena za qPCR zasnovan na *SYBR Green I* kemiji. Kako se *SYBR Green I* boja veže na sve nastale dvolančane produkte nužna je pomna kontrola reakcijskih uvjeta koji osiguravaju nastanak samo jednog specifičnog ciljnog produkta. U tu sam svrhu etablirala, odnosno optimizirala reakcije s obzirom na temperature vezanja početnica (T_a) te koncentraciju $MgCl_2$ u reakcijskoj smjesi. Nastale produkte sam analizirala programom Krivulja taljenja (engl. *Melting curve*) koji detektira temperaturu taljenja nastalih produkata. Produkti reakcija koji su pokazali jednu temperaturu taljenja vjerojatno imaju jednu vrstu produkta ili više njih s istom temperaturom taljenja. Da bih to razlučila, uzorke sam dodatno razdvojila na 12% poliakrilamidnom gelu visoke razlučivosti te sam nakon toga odabrala reakcijske uvjete koji daju samo jedan specifični produkt. Kako se daljnja relativna kvantifikacija produkata zasniva na usporedbi ekspresije ciljanog gena u dvije ili više grupa uzoraka u odnosu na referentne gene nužno je osigurati da je efikasnost reakcija umnažanja promatranih ciljanih produkata ciljnih i referentnih gena (engl. *house keeping genes*) u rasponu od 95 - 110% efikasnosti. U tu svrhu sam provjerila efikasnosti qPCR reakcija za odabrane uvjete te sam odabrala optimalne uvjete za svaki od ciljanih gena. Ukratko, odabrani reakcijski uvjeti zadovoljavaju zahtjev da daju samo jedan specifični produkt qPCR reakcije te da je efikasnost reakcija identična, odnosno u rasponu od 95 - 110%.

Početnice sam dizajnirala PrimerQuest Tool-om ili sam ih odabrala prema izvorima iz literature (Tablica 1.) te sam za njih morala odrediti optimalne uvjete PCR reakcije. Mijenjala sam temperature vezanja početnica i koncentracije magnezija u reakcijskoj smjesi. Cilj je bio dobiti barem jednu kombinaciju početnica za svaki gen od interesa. Nakon što sam odredila početnice i uvjete reakcija koji daju specifičan produkt na istima sam odredila i efikasnosti qPCR reakcija.

Tablica 1 Ukupna lista naručenih početnica za gene od interesa i referentne gene

Gen	Ime početnice	F' sekvenca	R' sekvenca	Tm (°C)	Produkt (pb)	Izvor
<i>Tnfa</i>	TNF α For1/Rev1	CTGAGTCTGCAAAGGGAGAG	CCTCAGGGAAGAATCTGGAAAG	62	107	*1
	TNF α For2/Rev2	GTCTCAGAATGAGGCTGGATAAG	CATTGCACCTCAGGGAAGAA	62	77	*1
	TNF α For3/Rev3	TGGCCCAGACCCTCACACTCAG	ACCCATCGGCTGGCACCCT	59	180	*2
<i>Cxcl1</i>	CXCL1 For1/Rev1	GTGTCAACCACTGTGCTAGT	CACACATGTCCTCACCTAATAC	62	102	*1
	CXCL1 For2/Rev2	ATGGTAGTTTCAGTTCTGCTTGT	TAAGTGTC AACCACTGTGCTAG	62	105	*1
	CXCL1 For3/Rev3	ATCCAGAGCTTGAAGGTGTTG	GTCTGTCTTCTTTCTCCGTTACTT	60	171	*3
<i>Mcp1</i>	MCPI For1/Rev1	CCTGGATCGGAACCAAATGA	CGGGTCAACTTCACATTCAAAAG	62	96	*1
	MCPI For2/Rev2	CTCGGACTGTGATGCCTTAAT	TGGATCCACACCTTGCATTTA	62	106	*1
	MCPI For3/Rev3	GAAGGAATGGGTCCAGACAT	ACGGGTCAACTTCACATTC	58	127	*4
<i>Tff3</i>	TFF3 For1/Rev1	CCTGTCTCCAAGCCAATGTAT	CAGGGCACATTTGGGATACT	62	105	*1
	TFF3 For2/Rev2	GTCACATCGGAGCAGTGTA	GTCTCCTGCAGAGGTTTGA	62	111	*1
<i>Actβ</i>	Act β For/Rev	GCAAGCAGGAGTACGATGAG	CCATGCCAATGTTGTCTCTT	58	147	*5
	Act β For1/Rev1	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC	63	349	*6
<i>B2m</i>	B2M For/Rev	CCTGCAGAGTTAAGCATGACAGT	TCATGATGCTTGATCACATGTCT	59	78	*7
	B2M For1/Rev1	CTGACCGCCTGTATGCTAT	CCGTTCTCAGCATTGGAT	58	146	*8

Imena početnica:

For1/Rev1 - prva kombinacija iz PQT

For2/Rev2 - druga kombinacija iz PQT

For3/Rev3 - kombinacije iz literature

*1 PrimerQuest Tool (PQT) <https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>

*2 Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice

*3 CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis

*4 <http://www.cell.com/cms/attachment/2027288862/2045723604/mmc3.pdf>

*5 Selection of housekeeping genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays on the murine cornea

*6 Quantification of murine IFN-gamma mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR green I dye

*7 DOI: 10.1084/jem.20101545 / Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo

*8 Identification of Sox3 downstream target genes using real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Za koncentraciju MgCl₂ pripremila sam 3 glavne smjese, 2.5 mM, 3 mM i 3.5 mM koncentraciju MgCl₂ a potom i novu glavnu smjesu za gen *Tff3* prema receptu iz tablice 2.

Tablica 2. Sastojci i njihovi volumeni za pripremu koncentracija glavne smjese

	2.5 mM	3 mM	3.5 mM		DreamTaq smjesa
komponenta	volumen za 1 probu	volumen za 1 probu	volumen za 1 probu	komponenta	volumen za 1 probu
H₂O	15,75 µl	15,25 µl	14,75 µl	mQ H ₂ O	16,1225 µl
dNTP-ovi (5 mM svaka)	1 µl	1 µl	1 µl	dNTP-ovi	2,5 µl
M-pufer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	Taq pufer	2,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	2,5 µl	3 µl	3,5 µl	p1/p2	2 µl
Taq₂	1 µl	1 µl	1 µl	Taq	0,625 µl
SYBR Green (1000×)	0,0025 µl	0,0025 µl	0,0025 µl	SYBR Green (1000×)	0,0025 µl
ROX 100× referentna boja	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	ROX× 100× referentna boja	0,25 µl
Ukupni volumen glavne smjese	23 µl	23 µl	23 µl	Ukupni volumen glavne smjese	24 µl

Za svaku PCR reakcijsku smjesu čiji su uvjeti bili ispitivani koristila sam 23 µl glavne smjese (s finalnim koncentracijama MgCl₂ od 2.5, 3 i 3.5 mM), 1 µl F/R smjese početnica i 1 µl cDNA (10× razrjeđenje) prethodno dobivenu RT-om. Za vrijeme pripremanja glavne smjese, smrznute početnice i cDNA su se lagano topili na ledu. Sve reagense sam prije miješanja lagano vorteksirala. Mikrotitarska pločica (96 jažica) je za vrijeme pripremanja reakcijskih smjesa bila na ledu. Prvo sam otpipetirala glavnu smjesu, zatim početnice i cDNA koju sam pažljivo otpipetirala u centar jažice. Prije stavljanja u PCR mašinu pločicu sam prekrila adhezivnom folijom koju sam dobro zapečatila i osigurala sa svih strana kako ne bi došlo do gubitka reakcijskih smjesa tijekom PCR-a. Za raspored pipetiranja reakcijskih smjesa u pločici koristila sam predložak tablice na kojem sam prethodno smisljeno organizirala raspored početnica za gene od interesa, raspon temperatura vezanja početnica i koncentracije MgCl₂.

Pločicu s reakcijskim smjesama stavila sam u PCR mašinu (Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems) sa sljedećim postavkama: početna denaturacija 95 °C kroz 3 min; 40 ciklusa: denaturacija 95 °C kroz 1 min; vezivanje početnica u rasponu temp. Od 54 - 66 °C kroz 30 s; elongacija 75 °C kroz 30 s i završna faza čuvanja 4 °C (∞).

Nakon umnažanja, provjeravala sam Krivolju taljenja dobivenih produkata u PCR mašini (7300 Real Time PCR System Applied Biosystems) putem programa 7300 System SDS Software. Ispitivane reakcijske smjese koje su na krivulji taljenja pokazale dvije temperature taljenja (dva vrha na krivulji) eliminirala sam jer su, osim umnažanja željenog produkta, umnožile i dimere početnica (engl. *primer dimer*).

3.1.1. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Reakcijske smjese koje su pokazale jednu temperaturu taljenja (jedan vrh na krivulji) odabrala sam za daljnju analizu u 12 % poliakrilamidnom gelu (PAGE). Elektroforezom u gelu razdvajaju se produkti reakcijske smjese te se preko gela može vizualno provjeriti da li na jednoj temperaturi taljenja nastaje samo jedan specifičan produkt ili ih nastaje više. 12% PAGE pomiješan je u falcon epruveti prema receptu iz tablice 3.

Tablica 3. Sastojci i njihovi volumeni za 12% PAGE

Reagensi	Volumen za 2 gela	Volumen za 2 gela (preporučljivo ako curi)
dH₂O	13,5 ml	17,55 ml
10× TBE *	7,5 ml	9,75 ml
40% akrilamid	9 ml	11,7 ml
Polimerizacija:		
10% APS	300 µl	390 µl
TEMED	30 µl	39 µl
*10× TBE (pH 8.3)		1 L
TRIS (121.14 g/mol) 1 M		121 g
Borna kiselina (61.83 g/mol) 0.68 M		53,4 g
EDTA (292.25) 20 mM		7,4 g

Nakon miješanja, tekući gel sam izlila u prethodno postavljenu vertikalnu komoricu za lijevanje. Polimerizirani gel stavila sam u aparat za vertikalnu elektroforezu (BioRad) napunjenu 1× TBE puferom. U reakcijske smjese na pločici koje su putem krivulje taljenja odabrane za daljnju analizu, otpipetirala sam 7 µl BFB boje. U prvu jažicu na gelu otpipetirala sam 5 µl DNA standarda (engl. *DNA ladder*) a u ostale 20 µl uzorka. Postavke za elektroforezu bile su sljedeće: napon 100 V, struja 400 mA, vrijeme 180 min. Nakon elektroforeze, gel sam uronila u 5% EtBr na 1 min. Gel je slikan u Syngene GBox i obrađen u programu GeneSnap. Slike gela pokazale su koji uzorci stvaraju samo jedan specifičan produkt u PCR umnažanju.

3.1.2. Efikasnost amplifikacije

Nakon provjere na gelu i odabira uvjeta trebalo je provjeriti efikasnosti odabranih reakcijskih uvjeta. Budući da se PCR reakcija temelji na eksponencijalnom umnažanju, efikasnost PCR reakcije od 1 ili 100% znači da se željeni produkt udvostručuje svakim ciklusom. PCR efikasnost je iznimno važna kada se istražuju koncentracije mRNA gena od interesa u usporedbi s referentnim genima. Kako bi se geni mogli uspoređivati, moraju biti amplificirani s efikasnostima koje se mogu uspoređivati kako bi rezultati bili što točniji. Male promjene u efikasnostima između ciljanih i referentnih gena stvaraju krivi omjer ekspresija što u konačnici dovodi do precjenjivanja ili podcjenjivanja stvarne početne količine mRNA. Za određivanje standardne krivulje preko čijeg nagiba se izračunava efikasnost, koristila sam razrjeđenja od 1:1 (1,5 µg cDNA) 1:10 (0,15 µg cDNA) 1:100 (0,015 µg cDNA) u tehničkim triplikatima. Efikasnost je određena u PCR mašini (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) u programu StepOnePlus™ Software v2.3 prema sljedećim postavkama: početna denaturacija 95 °C kroz 3 min; 40 ciklusa: denaturacija 95 °C kroz 1 min; vezivanje početnica u rasponu temp. od 54 – 66 °C kroz 30 s; elongacija 75 °C kroz 30 s. Nakon obrade rezultata odabrani su reakcijski uvjeti koji zadovoljavaju zahtjev da daju samo jedan specifični produkt qPCR reakcije te da je efikasnost reakcija u rasponu od $100 \pm 5\%$.

3.2. Analiza relativne ekspresije gena *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*

3.2.1. Uzorci

Za izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada koristila sam uzorke tkiva jetre 10 miševa divljeg tipa soja C57BL6NCrl (mužjaci starosti devet mjeseci) koji su uzgojeni u okviru aktivnosti HRZZ projekta IP-2016-06. Miševi su tretirani tunikamicinom (3 ug/g tjelesne težine) i žrtvovani 12 h nakon intraperitonealnog injiciranja tunikamicina ili njegova otapala bez tunikamicina (kontrolna grupa). Tunikamicin je antibiotik koji sadrži glukozamin kojeg proizvodi *Streptomyces lysosuperficus* i djeluje protiv različitih mikroorganizama poput Gram-pozitivnih bakterija, gljivica, kvasaca i virusa. On inhibira sintezu N-glikoproteina u ER-u eukariotske stanice što dovodi do poremećene glikozilacije novosintetiziranih proteina a samim time i do poremećaja u namatanju u ER-u.

3.2.2. Izolacija RNA

Za izolaciju RNA iz tkiva jetre korišten je set kemikalija Rneasy Mini Kit (QIAGEN). Uzorke veličine 3 mm³ homogenizirala sam i usitnila do praha pomoću tarionika i tučka uz zalijevanje tekućim dušikom na koji sam dodala RLT pufer za izolaciju RNA. RLT pufer pomaže u spajanju RNA na silikonsku membranu a dodani β-merkaptoetanol (10 μl βME-a na 1 ml pufera) inaktivira RNAze. Epruvetice sam uskladištila na -80 °C do daljnje izolacije RNA.

Daljnja analiza uključivala je otapanje uzoraka te nanošenje na kolonicu za homogeniziranje (QIAshredder spin column) uz centrifugiranje 14000 × g kroz 3 min. Supernatante sam otpipetirala u nove epruvetice i u svaku dodala 1 volumen 50 % etanola (700 μl EtOH). Uzorke sam prebacila u RNeasy spin kolonice smještene u 2 ml tubicama i centrifugirala (30 s na 8000 × g) uz obavezno uklanjanje propuštene tekućine ispod kolonica. U svaku RNeasy spin column-u stavila sam 350 μl RW1 pufera (ispire RNA sa silikonske membrane) i centrifugirala 30 s na 8000 × g te odlila ostatak. Da bi se uklonilo nespecifično vezanje, u svaku RNeasy spin column-u, u samo središte membrane, otpipetirala sam 80 μl DNase I inkubacijskog miksa i ostavila na sobnoj temperaturi 15 min. Nakon toga sam u RNeasy spin column-u dodala 350 μl RW1 pufera i centrifugirala 30 s na 8000 × g i odlila ostatak. Za daljnu proceduru pripremila sam RPE pufer kojeg sam dobila miješajući 44 ml 96% EtOH na 44 ml RPE (55 ml koncentrat). U svaki RNeasy spin column dodala sam po 500 μl RPE pufera i centrifugirala 30 s na 8000 × g te odlila ostatak. Postupak ispiranja s 500 μl RPE pufera ponovila sam centrifugirajući 2 min na 8000 × g kako bi se membrana dobro isprala. RNeasy spin columnu prebacila sam u nove 2 ml epruvetice te centrifugirala 1 min na punoj brzini (10 000 g). Da bih eluirala RNA s kolone, RNeasy spin kolonice prebacila sam u nove 1.5 ml epruvetice te dodala mQ vodu bez RNaza (50-100 ul), ostavila da odstoji 5 min na sobnoj temperaturi te centrifugirala 90 s na 8000 × g. Izoliranoj RNA odredila sam koncentraciju i pohranila na -80C.

3.2.3. Određivanje koncentracije i prevođenje u cDNA

Koncentraciju i čistoću izolirane RNA odredila sam pomoću spektrofotometra Implen NanoPhotometer® NP80. Spektrofotometar koncentraciju računa preko modificirane Beer-Lambertove jednačbe: $C = A_{260} \times \epsilon_{nuc} \times D$ gdje je C koncentracija u ng/μl, A₂₆₀ absorbancija pri 260 nm (10 mm put), D manualni dilucijski faktor, ϵ_{nuc} ekstincijski koeficijent/faktor nukleinske kiseline u ng×cm/μl koji za RNA iznosi 40 ng×cm/μl. Prilikom računanja koncentracije izračunata je i čistoća svakog uzorka. Za računanje čistoće koriste se omjeri 260/280 i 260/230. Kod RNA za omjer 260/280 prihvatljiva je vrijednost ≥ 2.0 dok za omjer 260/230 > 2.0 . Sve vrijednosti manje od toga upućuju na kontaminaciju RNA npr. proteinima i raznim organskim molekulama.

Izolirana RNA je prevedena u cDNA pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription seta kemikalija (Applied Biosystems-kataloški broj: 4374967) prema uputama proizvođača. Ukratko, napravila sam reakcijsku smjesu koja sadrži odgovarajući pufer, nasumične početnice, smjesu dNTPa, MultiScribe™ reverznu transkriptazu i vodu. Reakcijske smjese su u PCR mašini (Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems) izložene sljedećim uvjetima: inkubacija na 25 °C kroz 10 min kako bi se nasumične početnice nakon dodavanja enzima produljile; DNA polimerizacija na 37 °C, što je optimalna reakcijska temperatura enzima, kroz 120 min; deaktivacija enzima na 85 °C kroz 5 min i skladištenje na 4 °C (∞). Nakon završenog RT-a, uzorci su pohranjeni na -20 °C.

3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

Kada sam istražila i odredila optimalne uvjete PCR reakcije za svaki od ciljanih gena i referentnih gena, pripremila sam 3 mikrotitarske pločice za qPCR analizu. Na svakoj su pločici u triplikatima analizirani po 5 tretiranih i 5 kontrolnih uzoraka za 2 gena (geni od interesa: *Tnfa* i *Mcp1*, *Tff3* i *Cxcl1*; referentni geni: *Actβ* i *B2m*) te po 2 negativne kontrole za svaki gen. U jažicu sam prvo ispipetirala glavnu smjesu (23 μl) s optimiziranom koncentracijom MgCl₂ te za *Tff3* glavnu smjesu koja je u sebi već sadržavala početnice (24 μl). Zatim sam u svaku jažicu ispipetirala najoptimalnije početnice (1 μl) za svaki od gena a potom i vrlo pažljivo u sredinu jažice cDNA (1 μl) koju sam prethodno razrijedila 10×. Reakcijski volumen svake ježice bio je 25 μl. Za negativne kontrole korištena je glavna smjesa s optimalnim koncentracijama MgCl₂

za svaki od gena (25 µl). Pločice sam zatim stavila u PCR mašinu (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) te u programu StepOnePlus™ Software v2.3 podesila voženje qPCR reakcije prema sljedećim postavkama: inicijacija 95 °C kroz 3 min; 40 ciklusa: denaturacija 95 °C kroz 1 min; temperatura za vezivanje početnica 63 i 62°C za *Tnfa* i *Mcp1*; 60 i 61°C za *Tff3* i *Cxcl1* te *Actβ* i *B2m* kroz 30 s te elongacija 72 °C kroz 30 s.

3.2.5. Računalna obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu REST 2009 te su vizualizirani pomoću programa GraphPad Prism.

REST 2009 je programski alat kojeg su razvili M. Pfalff i QIAGEN za analizu podataka genske ekspresije u qPCR pokusima. REST 2009 koristi matematičke modele koji u obzir uzimaju različite PCR efikasnosti gena od interesa i referentnih gena. Tradicionalna relativna kvantifikacija omogućuje procjenu ekspresije gena ali ne daje statističke podatke koji su prikladni za robusnu usporedbu ekspresije u grupama tretiranih i kontrolnih uzoraka. Metode integrirane randomizacije i bootstrap-a korištene u programu REST 2009 testiraju statističku značajnost izračunatih omjera ekspresija i mogu se koristiti čak i kada podaci uključuju stršeće podatke (engl. *outlier*) (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>)

GraphPad Prism je komercijalni znanstveni 2D grafički i statistički program koji omogućuje jednostavno provođenje osnovnih statističkih testova i vizualizaciju podataka (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

4. Rezultati

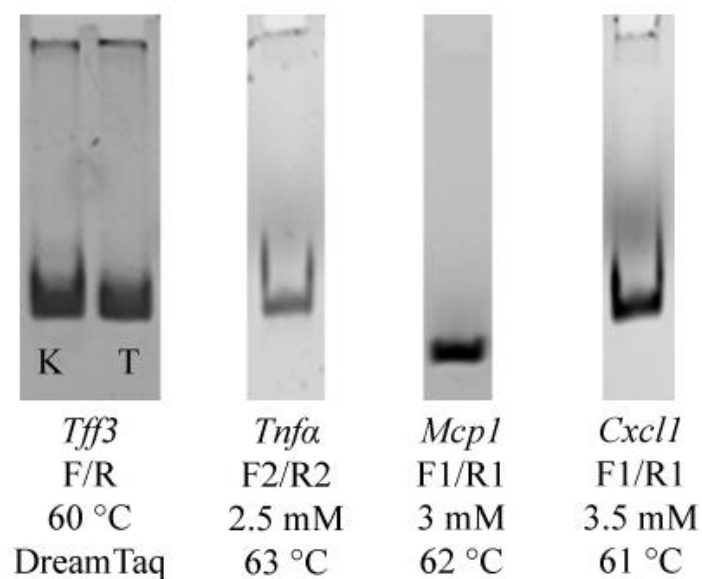
4.1. Optimizacija qPCR testa za gene *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*

Za svaki od praćenih gena (*Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*) dizajnirala sam 3-4 para početnica koji su ispitani na odgovarajućim temperaturama ovisno o temperaturi taljenja početnica. Reakcijske smjese istih su razdvojene na poliakrilamidnom gelu kako bi se vidjelo radi li se o produktima iste duljine.

Početnice i reakcijski uvjeti koji su i na 12% PAGE-u pokazali stvaranje samo jednog specifičnog produkta, odabrani su za daljnju analizu efikasnosti umnažanja PCR reakcije (Tablica 4). One početnice i uvjeti koji su na 12% PAGE-u pokazali stvaranje jednog produkta (Slika 3) i efikasnost između 95 - 110% (Tablica 5 i slike 4, 5, 6 i 7) odabrani su kao najpogodniji za daljnju relativnu kvantifikaciju gena.

Tablica 4. Uvjeti reakcija i početnica koje su na 12% PAGE-u pokazale stvaranje jednog produkta te su odabrane za provjeru efikasnosti

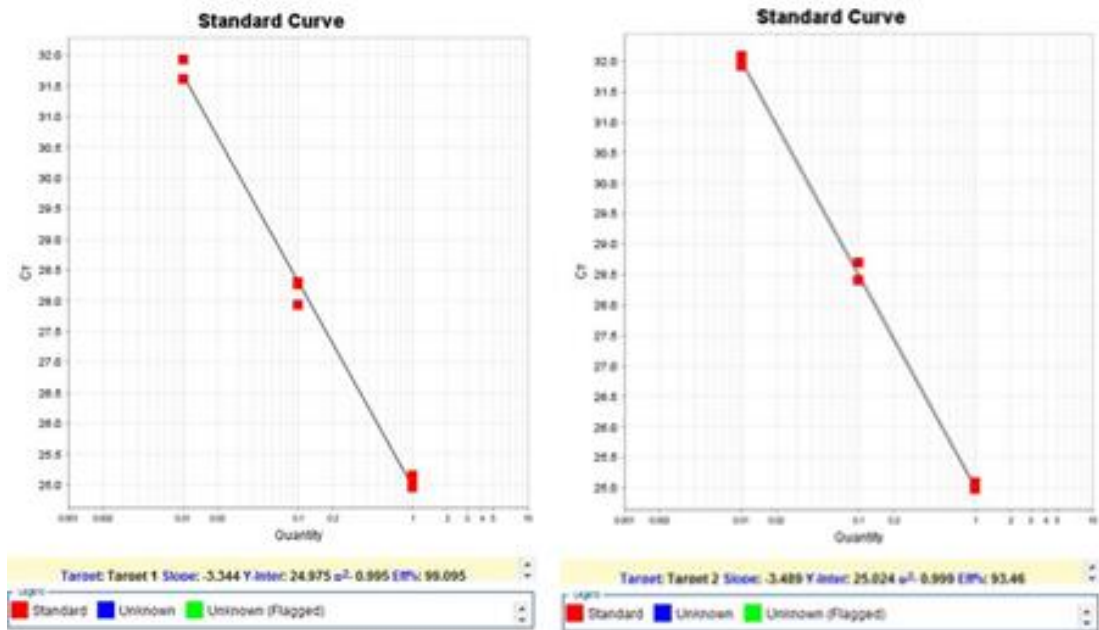
Gen	Ime početnice	Uvjeti koji daju specifičan produkt
<i>Tff3</i>	F3/R3	60 °C (3 mM MgCl ₂) 61 °C (3 mM MgCl ₂)
	F/R	65 °C (2.5 i 3 Mm MgCl ₂) 58 - 62 °C (DreamTaq)
<i>Tnfa</i>	F2/R2	63°C (3 mM MgCl ₂) 66 °C (2.5 mM MgCl ₂)
<i>Mcp1</i>	F1/R1	60 °C (2.5 i 3 mM MgCl ₂) 62 °C (3 i 3.5 mM MgCl ₂)
<i>Cxcl1</i>	F1/R1	61 °C (3.5 mM MgCl ₂)
	F2/R2	62 °C (2.5 mM MgCl ₂) 63 °C (3 mM MgCl ₂) 66 °C (3 mM MgCl ₂)



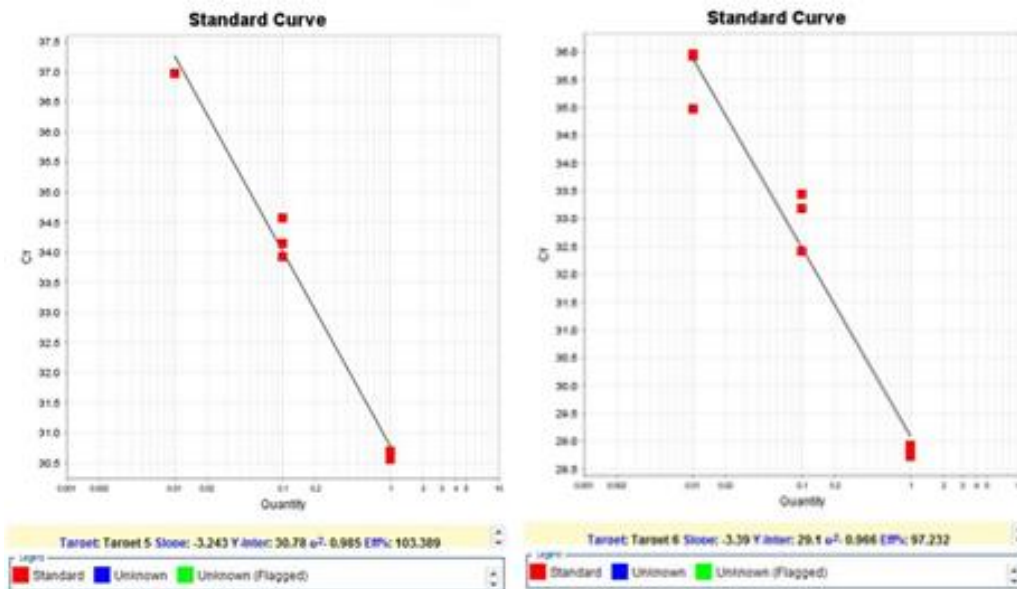
Slika 3. Prikaz odabranih uvjeta reakcija i početnica na 12% PAGE-u (K-kontrola, T-tunikamicin)

Tablica 5. Uvjeti reakcija i početnica koje su nakon ispitivanja efikasnosti umnažanja odabrane za qPCR analizu

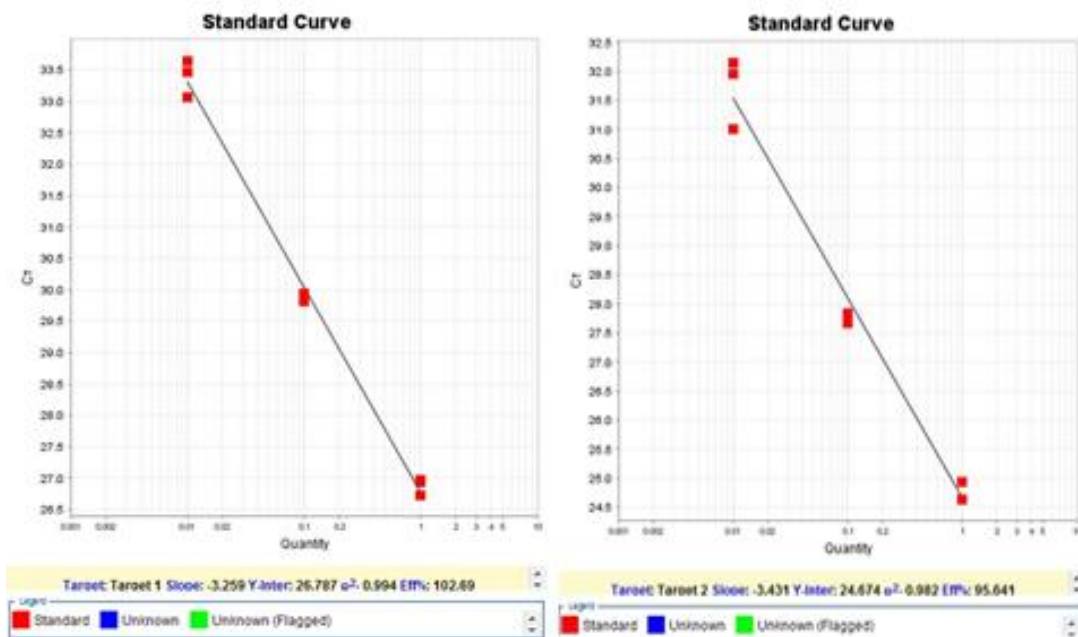
Gen	Ime početnice	Uvjeti reakcije	K/T (jetra)	Efikasnost %	CT	Broj slike
<i>Tff3</i>	F/R	60 °C (DreamTaq)	K	99,095	25	4. a
			T	93,46	24,2	4. b
<i>Tnfa</i>	F2/R2	63 °C (2.5 mM MgCl ₂)	K	103,389	30,5	5 .a
			T	97,232	28,7	5. b
<i>Mcp1</i>	F1/R1	62 °C (3 mM MgCl ₂)	K	102,69	26	6. a
			T	95,641	24	6. b
<i>Cxcl1</i>	F1/R1	61 °C (3.5 mM MgCl ₂)	K	97,932	24	7. a
			T	98,379	19	7. b



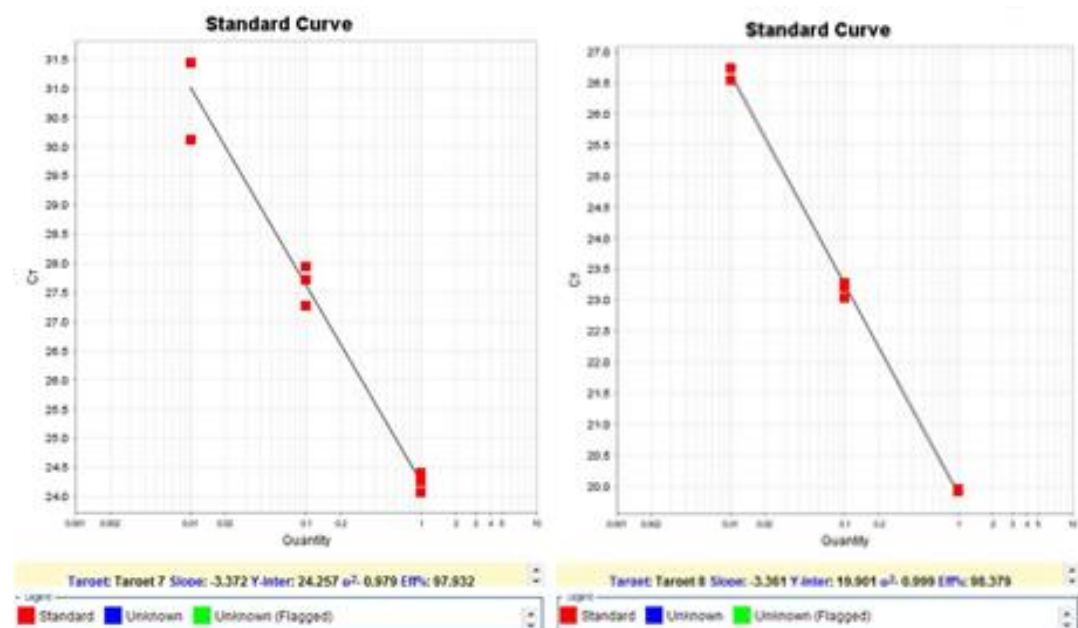
Slika 4. Efikasnost reakcije za *Tff3* (F/R, 60 °C, DreamTaq) kod kontrole (lijevo) i tretmana (desno)



Slika 5. Efikasnost reakcije za *Tnfa* (F2/R2, 63 °C, 2.5 mM MgCl₂) kod kontrole (lijevo) i tretmana (desno)



Slika 6. Efikasnost reakcije za *McpI* (F1/R1, 62 °C, 3 mM MgCl₂) kod kontrole (lijevo) i tretmana (desno)



Slika 7. Efikasnost reakcije za *Cxcl1* (F1/R1, 61 °C, 3.5 mM MgCl₂) kod kontrole (lijevo) i tretmana (desno)

4.2. Relativna ekspresija gena *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1* u jetri

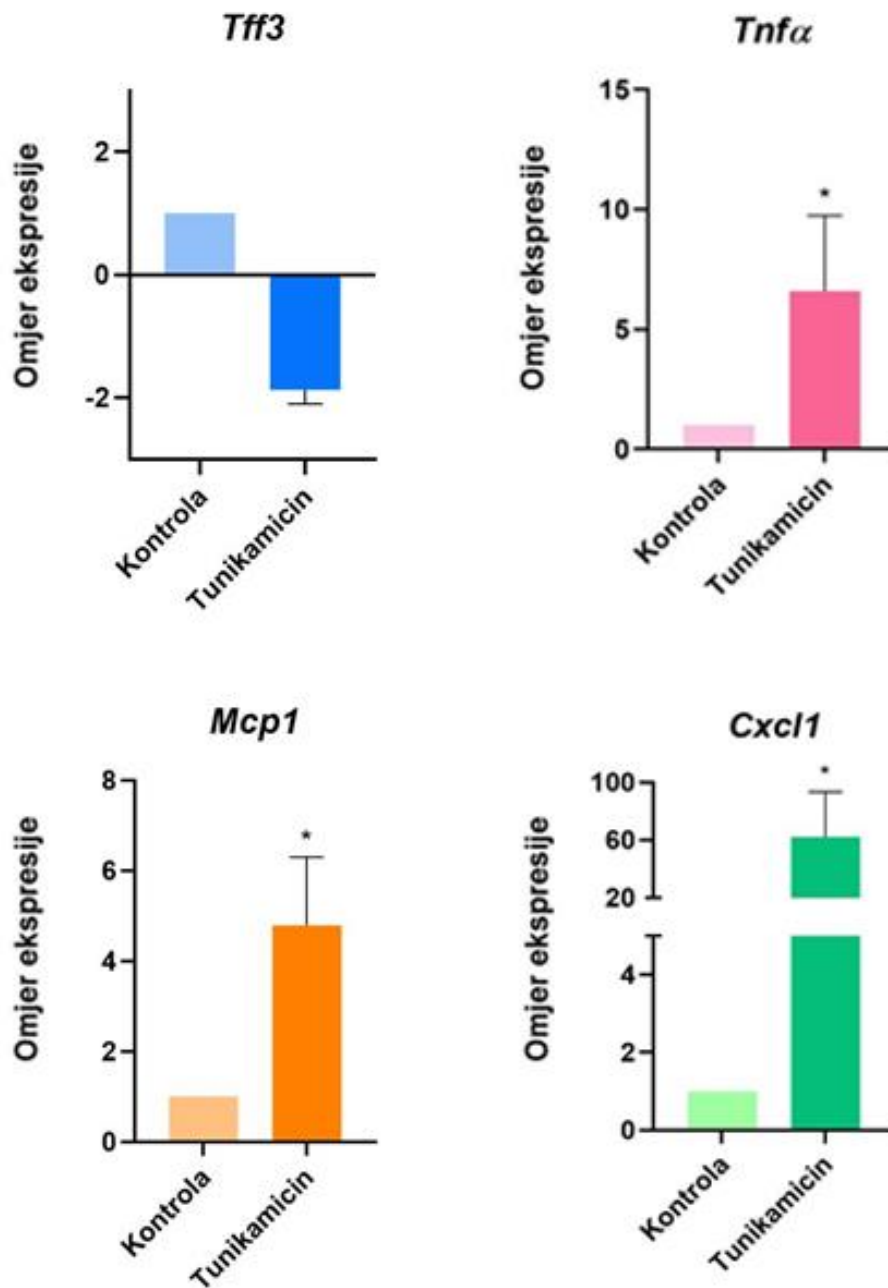
Metodom qPCR-a određena je relativna ekspresija gena u jetri miševa kojima je jednokratno apliciran tunikamicin (12 h prije žrtvovanja) te netretiranih miševa. Geni od interesa (*Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*) normalizirani su preko referentnih gena *Actβ* i *B2m*. Omjer relativne ekspresije izračunat je prema Pffalfovoj metodi koja se koristi jednadžbom:

$$\text{Omjer ekspresije} = \frac{(E_{\text{gen od interesa}})^{[\Delta C_t, \text{ gen od interesa (kontrola-uzorak)]}}}{(E_{\text{referentni gen}})^{[\Delta C_t, \text{ referentni gen (kontrola-uzorak)]}}}$$

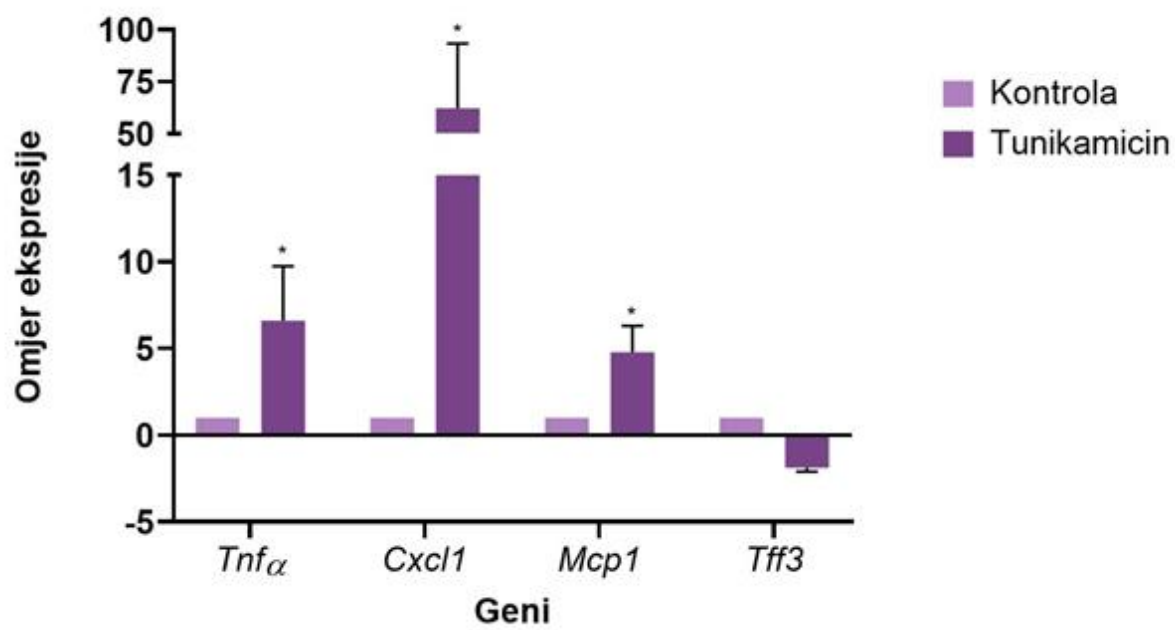
U programu REST 2009 obrađeni su rezultati dobiveni qPCR-om (Tablica 6) koji su zatim u GraphPad Prism programu vizualizirani kao histogrami koji prikazuju omjer ekspresije gena u kontrolnoj grupi i miševa tretiranih tunikamicinom (Slike 8 i 9). Tretman tunikamicinom je u tkivu jetre doveo do statistički značajnog povećanja gena *Tnfa* (6,6 puta), *Mcp1* (4,8 puta) i *Cxcl1* (62,1 puta) dok je razina *Tff3* proteina smanjena ali bez statističkog značaja.

Tablica 6. Promjena ekspresije gena *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*

	<i>Tff3</i>	<i>Tnfa</i>	<i>Mcp1</i>	<i>Cxcl1</i>
Ekspresija	smanjenja	povećana	povećana	povećana
Relativni omjer ekspresije gena	-1,857	6,598	4,790	62,164
Apsolutna genska regulacija (Standardna greška)	0,538	6,598 ±3,14253	4,790 ±1,50865	62,164 ±31,11255



Slika 8. Prikaz omjera ekspresije gena *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1* između kontrolne i tretirane skupine miševa. Statistička značajnost: * $p < 0,05$



Slika 9. Prikaz omjera ekspresije svih gena

5. Rasprava

Sve je više dokaza o utjecaju stresa ER-a na metabolička tkiva poput gušterače, hipotalamusa, masnog tkiva i jetre te njegovom utjecaju na inicijaciju i/ili progresiju bolesti jetre. Ovim istraživanjem želio se utvrditi učinak kemijski inducirano stresa na razinu ekspresije relevantnih kemokina u WT soju miševa C57Bl6NCrl.

Stres ER-a uzrokovan primjenom tunikamicina može uzrokovati steatozu i upalu jetre miševa tj. brzi oblik NASH-a kod miševa (Lee i sur. 2012). Stres ER-a uzrokuje pojačanu ekspresiju transaktivatora i enzima *de novo* lipogeneze te smanjenje enzima oksidacije masnih kiselina i lipolize. Po izazivanju stresa ER-a u hepatocitima se stvaraju masne kapljice, te se direktno pojačava *de novo* lipogeneza. Na osnovu tih rezultata brojni autori potvrdili su da stres ER-a može inicirati patološke promjene ili pojačati progresiju steatoze (Malhi i Kaufman, 2011). Drugi aspekt djelovanja tunikamicinom izazvanog stresa ER-a je aktivacija upalnih procesa. Npr. stres ER-a igra važnu ulogu u indukciji upale dišnih puteva u neutrofil-dominirajućoj astmi. Guo i sur. (2017) su u epitelnim stanicama bronhija miša tretiranih tunikamicinom, osim stresa ER-a, pronašli i povišenu razinu upalnih citokina poput IL-6, IL-8 i TNF α koji uzrokuju kroničnu upalu preko PERK-ATF4-CHOP puta.

Ovim istraživanjem pokazano je kako tunikamicin u jetri povećava ekspresiju *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1*, dok je razina *Tff3* genske ekspresije ostala nepromijenjena. Navedeni kemokini su upalni kemokini te kontroliraju regrutaciju leukocita u upalnim i tkivnim ozljedama. Tretman tunikamicinom izaziva stres ER-a te aktivira puteve UPR-a koji mogu dovesti do upale preko aktivacije NF κ B i CREBH-a, transkripcijskog faktora specifičnog za jetru. Aktivirani CREBH izaziva ekspresiju proteina akutne faze kao što su serumska amiloidna komponenta P i C reaktivni protein koji u jetri mogu izazvati sistemska upalu (Hasnain i sur. 2012; Kuscuglu 2018). TFF3 je pronađen u mnogim tkivima imunološkog sustava te se pretpostavlja kako je uključen u modulaciju imunološkog odgovora, a njegova ekspresija može biti smanjena djelovanjem upalnih citokina poput TNF α (Baus Lončar i Giraud 2005).

U odgovoru na bakterijski LPS stvaraju se velike količine TNF α koji ima kemotaktično djelovanje te usmjerava stanice prema upalnom području. TNF α aktivira NF κ B čijim djelovanjem se može spriječiti apoptoza, što u slučaju kada dolazi do pretjeranog nakupljanja nenamotanih proteina može imati negativne posljedice. S druge strane, TNF α može izazvati nakupljanje ROS-a što može dovesti do prerane smrti stanice (Xue i sur. 2005). MCP1 i CXCL1

djeluju kemotaktično na monocite i neutrofile koje usmjeravaju u upaljena područja. MCPIP, protein kojeg aktivira MCP1, uzrokuje oksidativni i stres ER-a koji mogu dovesti do smrti stanice te kontrole upalnog odgovora inhibicijom NF κ B (Kolattukudy i Niu 2012). CXCL1 djeluje na neutrofile, bitne stanice urođenog imunološkog odgovora koje sudjeluju u akutnoj fazi upale za što su i poželjne, no u slučaju njihove pretjerane brojnosti i aktivnosti može doći do ozbiljnih oštećenja tkiva. Dodatno, u odgovoru na nekrotične stanice, hepatociti i Kupfferove stanice povećavaju produkciju TNF α a time i aktivaciju NF κ B što potiče hepatocite na produkciju CXCL1 čime dolazi do još veće mobilizacije neutrofila (Su i sur. 2018).

Stres ER-a dovodi do jake ekspresije TNF α a njegovo blokiranje značajno smanjuje staničnu smrt izazvanu stresom ER-a (Hu i sur. 2006). TNF α u L929 staničnoj liniji povećava ekspresiju *Xbp1*, jednog od glavnih transkripcijskih čimbenika UPR-a (Xue i sur. 2005). TNF α pogoršava upalni mikrookoliš te inducira ekspresiju kemokina i citokina koji pridonose razvoju NASH patologiji (Nakagawa i sur. 2014). Kod kemokina MCP1, prisilna ekspresija MCPIP dovodi do značajnog povećanja biljega stresa ER-a, BiP-a i IRE1. Dodatno, MCPIP inducira adipogenezu što rezultira pretiulošću. Utišavanje MCPIP dovodi do smanjenja stresa ER-a koji je uključen u DMI-induciranu adipogenezu (Younce i Kolattukudy 2012). Masna ishrana i alkohol sinergistički induciraju stres ER-a. Povećana razina masnih kiselina povećava CXCL1 ekspresiju u hepatocitima a time i neutrofilnu infiltraciju i ozljedu jetre (Chang i sur. 2015). Štoviše, aktivirani neutrofilni ispuštaju ROS/RNS te aktiviraju proteaze koje induciraju tkivnu ozljedu i dodatno pogoršavaju stres ER-a (Faleiros i sur. 2009).

Uloga TNF α u jetri istražena je na mnogim životinjskim modelima te pacijentima s alkoholnom bolesti jetre i virusnim hepatitisom gdje je dokazano njegovo hepatotoksično i patogeno djelovanje. U raznim modelima ozljede jetre, TNF α igra ključnu ili aditivnu ulogu u patogenezi akutne ozljede jetre. TNF α potiče apoptozu i/ili nekrozu hepatocita *in vivo* (Bradham i sur. 1998). TNF α aktivira transkripcijski faktor NF κ B koji inducira ekspresiju mnogih gena čiji produkti mogu spriječiti apoptozu ali i nekoliko bitnih proapoptotskih gena među kojima je i sam TNF α . TNF α jako aktivira JNK koji fosforilira transkripcijske faktore AP-1 obitelji čija aktivacija sudjeluje u regulaciji upale, proliferaciji i staničnoj smrti. ROS pomažu prolongiranoj JNK aktivaciji kada je inhibiran odgovor NF κ B čije je djelovanje antioksidativno. TNF α ne izaziva ozljedu jetre u normalnim hepatocitima *in vivo* zbog snažne aktivacije i citoprotektivne uloge NF κ B (Schwabe i Brenner 2006). TNF α djeluje na endotelne stanice i leukocite na kojima povećava izražaj adhezijskih molekula. Djeluje kemotaktično na

neutrofile i monocite što u konačnici dovodi do prijanjanja upalnih stanica i njihov prolazak u upaljeno područje. U ovom istraživanju miševi trenirani tunikamicinom pokazali su povećanje *Tnfa* ekspresije za $6,598 \times$ u odnosu na kontrolu. Takva povećana ekspresija u skladu je s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da stres ER-a inducira jaku ekspresiju *TNF α* . Kako je dosad pokazano da stres ER-a inducira ranu ekspresiju *TNF α* u nekoliko staničnih linija porijeklom iz epitela i embrionskih fibroblasta porijeklom iz mezenhima daje se naslutiti kako je *TNF α* generalni stanični odgovor na stres ER-a. *TNF α* proizvode mnoge stanice te on ima višestruke uloge u staničnim odgovorima na što upućuje konstitutivna ekspresiranost *TNFR1* na mnogim stanicama. Stres ER-a smanjuje ekspresiju *TRAF2* koji umanjuje aktivaciju *NF κ B* i *JNK* što pretvara *TNF α* iz slabog u jakog inducira apoptoze (Hu i sur. 2006). Dokazano je kako *TNF α* može izazvati UPR preko *PERK*-posredne *eIf2 α* fosforilacije te *ATF6*- i *IRE1*-posredne indukcije *XBP1* na ROS-ovisan način. Predtretman tunikamicinom značajno smanjuje *TNF α* -induciranu ROS akumulaciju i staničnu smrt u više staničnih linija što ukazuje na to da u UPR-u sudjeluju geni koji sprječavaju akumulaciju ROS-a izazvanih s *TNF α* (Xue i sur. 2005).

Ekspresija *Mcp1* u jetri C57Bl6Cr1 miševa tretiranih tunikamicinom je povećana $4,8 \times$ u usporedbi s životinjama bez potaknutog stresa ER-a. *MCP1* je glavni čimbenik u inicijaciji upale, potiče kemotaksiju i transendotelnu migraciju te regulira produkciju proupalnih citokina i adhezijskih molekula na mnocitima/makrofazima zbog čega se sve više istražuje u raznim kroničnim upalnim bolestima (Mandrekar i sur. 2011)

Povećana ekspresija *MCP1* primijećena je u pacijenata s različitim tipovima bolesti jetre te u eksperimentalnim modelima akutne i kronične ozljede jetre. Uloga *MCP1* je regrutiranje i aktiviranje monocita/makrofaga te memorijskih T stanica i dendritičkih stanica na mjesto ozljede te regulacija njihove adhezije i proupalnih citokina. Pacijenti s jednostavnom steatozom i pacijenti s NASH-om imaju povećanu razinu *MCP1* u serumu u usporedbi s kontrolom (Haukeland i sur. 2006). Ljudske studije i animalni modeli alkoholnog hepatitisa pokazuju kako je *MCP1* povećan u Kupfferovim stanicama i hepatocitima. *Mcp1KO* miševi pokazuju manju razinu steatoznih promjena i oksidativnog stresa nakon izlaganja alkoholu i trigliceridima. Dodatno, u *Mcp1KO* miševa inhibirana je ekspresija proupalnih citokina, uključujući *TNF α* , koji pridonose ozljedi jetre. Uz to, jetreni TG su značajno povećani u alkoholom hranjenih WT miševa u usporedbi s jednako hranjenom kontrolom i *Mcp1KO* miševima. Uz povećanu ekspresiju *Mcp1* u jetri alkoholom hranjenih miševa povećana je i razina *Cxcl1* mRNA.

Značajka alkoholne ozljede jetre je alkoholom inducirani oksidativni stres i povećana senzitivizacija na LPS što rezultira u proupalnoj citokinskoj ekspresiji u jetri. LPS, citokini i homocistein su jaki aktivatori ekspresije *Mcp1* u alkoholnoj ozljedi jetre (Mandrekar i sur. 2011). U genetski dijabetičnih (db/db) pretilih miševa i miševa hranjenih masnom hranom povećana je razina *Mcp1* i *Tnfa* mRNA što pridonosi infiltraciji makrofaga u masno tkivo, inzulinskoj rezistenciji i steatozi jetre (Kanda i sur. 2006). MCP1 aktivira MCP1 inducirani protein (MCPIP), transkripcijski faktor koji može izazvati produkciju reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta te uzrokovati stres ER-a. Stres ER-a potom dovodi do autofagije koja može rezultirati u staničnoj smrti ili diferencijaciji ovisno o staničnom kontekstu (Rull i sur. 2010). Proupalni citokini, među kojima MCP1 i TNF α , induciraju MCPIP koji posreduje u angiogenezi. Prisilna ekspresija MCPIP rezultira u značajnom povećanju transkripta i proteinske razine markera stresa ER-a, BiP i IRE1. Nadalje, cijepanje markera stresa ER-a, ATF6 dovodi do transkripcijske aktivacije seta proteina akutne faze kao što je CRP, već dobro poznat marker sistemskog upalnog odgovora. CRP može izazvati povećanu ekspresiju MCP1 receptora i tako pridonijeti upali (Roy i Kolattukudy 2012; Kolattukudy i Niu 2012). Uz sve navedene činjenice poklapa se i rezultat ovog istraživanja gdje je stres ER-a povećao ekspresiju *Mcp1* mRNA u jetri miševa tretiranih tunikamicinom za $4,79 \times$ u odnosu na kontrolu.

Infiltracija neutrofila u tkiva smatra se važnim procesom u patofiziologiji nekoliko akutnih i kroničnih upalnih bolesti, uključujući ozljedu jetre u raznim tipovima bolesti jetre. CXCL1 i njegov receptor, CXCR2, ključni su u migraciji neutrofila. U jetri je *Cxcl1* mRNA povećana više od $100 \times$ u tretmanu s nekrotičnim stanicama u usporedbi s kontrolom. Kupfferove stanice povećavaju produkciju TNF α koji aktivira NF κ B u hepatocitima i potiče ih na proizvodnju CXCL1 prilikom stimulacije nekrotičnim stanicama. CXCL1 stimulira i TNF α produkciju u stanicama tkiva koje eksprimiraju CXCR2, uključujući makrofage i mastocite. (Vieira i sur. 2009; De Filippo i sur. 2013; Su i sur. 2018). Osim regrutacije i aktivacije neutrofila, CXCL1 imaju ulogu i u aktivaciji otpuštanja proteaza i ROS-a (Sawant i sur. 2016). Masna prehrana (HFD - engl. *high fat diet*) i alkohol pojačavaju ekspresiju *Cxcl1* u jetri dok blokada CXCL1 s neutralizirajućim antitijelom ili delecijom gena umanjuje HFD-etanol induciranu hepatičnu infiltraciju neutrofila i ozljedu. Pretjerana ekspresija *Cxcl1* pojačava steatohepatitis u HFD miševa. Za alkohol i HFD se zna da sinergistički induciraju nitrozativni, stres ER-a, mitohondrijski stres i povećanje TLR4 u jetri. Masna prehrana u kombinaciji s konzumacijom alkohola inducira akutnu upalu i ozljedu jetre preko povećanja jetrenih i serumskih slobodnih masnih kiselina. Nekoliko tipova slobodnih masnih kiselina direktno

stimuliraju *Cxcl1* ekspresiju u hepatocitima. Ekspresija *Cxcl1* i CXCR2 je povećana u jetrama pretilih pacijenata s NASH-om (Chang i sur. 2015). Rezultati prethodnih istraživanja poklapaju se s rezultatom ovog istraživanja gdje je CXCL1 u jetri miševa tretiranih tunikamicinom povećan čak $62,164 \times$ u usporedbi s kontrolom. Ova ekspresija je višestruko veća od ekspresije TNF α u tunikamicinom-induciranom stresu ER-a što bi se moglo povezati s činjenicom da TNF α povećava ekspresiju *Cxcl1* dok *Tnfa* ekspresiju može umanjiti antioksidativno djelovanje NF κ B.

Dok je uloga gore navedenih kemokina uvelike poznata, o ulozi TFF3 u jetri još se uvijek jako malo zna. Ekspresija *Tff3* u jetri bitna je za homeostazu glukoze što su pokazali Xue i sur. (2013) u ob/ob miševa kod kojih je ekspresija *Tff3* u jetri bila smanjena te Zhao i sur. (2017) koji su otkrili kako GALE enzim u jetri, koji smanjuje toleranciju na glukozu, utječe na smanjenje *Tff3* ekspresije u miševa. Nadalje, nedostatak TFF3 u organizmu utječe na sintezu i akumulaciju masnih kiselina u jetri (Bujak i sur. 2018) a Wu i sur. (2019) pokazali su kako TFF3 djeluje kao aktivator oksidacije masnih kiselina u jetri te da njegova prekomjerna ekspresija štiti db/db i ob/ob miševе od jetrene steatoze.

Tunikamicinom inducirani stres ER-a u vrčastim stanicama crijeva koje sadrže velike količine TFF33 dovodi do poremećene sinteze mucina i značajno smanjenjena *Tff3* ekspresije (Ren i sur. 2018). TFF3 je eksprimiran i u žučnim kanalima normalne ljudske jetre te mu je ekspresija povećana u bolesnim jetrama (Brown i sur. 2005). Ekspresija *Tff3* smanjenja je u jetrama ob/ob miševa i HFD miševa, odnosno miševa s inzulinskom rezistencijom. Pojačana ekspresija *Tff3* u jetrama db/db ili pretilih miševa inhibira ekspresiju glukoneogenih gena čime se smanjuje razina glukoze u krvi i poboljšava tolerancija na glukozu što umanjuje hiperglikemiju (Xue i sur. 2013). Rezistencija na inzulin i dijabetes povećavaju stres ER-a u jetri a stres ER-a mijenja se fiziološki ovisno o dostupnosti nutrijenata. Transkripcijsko profiliranje identificiralo je TFF3 kao jednog od nizvodnih meta GALE za koji se smatra kako je reguliran efektorom stresa ER-a, sXBP1. TFF3 je smanjen u jetri miševa s pojačanom *Gale* ekspresijom a povećan u *Gale*KO jetri miševa. Povećana ekspresija *Gale* u jetri pojačava glukoneogenezu i smanjuje toleranciju na glukozu dok povećana ekspresija *Tff3* u jetri vraća toleranciju na glukozu u miševa s prekomjernom *Gale* ekspresijom (Zhu i sur. 2017). TFF3 može funkcionirati kao aktivator oksidacije masnih kiselina u jetri jer se može vezati na promotorsku regiju PPAR α te povećati ekspresiju gena koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina. Povećana ekspresija *Tff3* pojačava oksidaciju masnih kiselina u jetri i štiti db/db i

ob/ob miševe od steatoze jetre. Suprotno, u jetrama miševa s utišanim *Tff3* povećani su TG koji rezultiraju u fenotipu masne jetre. Ekspresija *Tff3* je značajno smanjena u mnogim mišjim modelima NAFLD-a a povratak *Tff3* ekspresije ublažava fenotip masne jetre (Wu i sur. 2019). U odgovoru na ishemiju miokarda ekspresija *Tff3* povećava se u hepatocitima i serumu. Njegova supresija utišavanjem gena preko siRNA pojačava infarkt miokarda a naknadna administracija TFF3 ga umanjuje (Liu i sur. 2012). Nadalje, TFF3 djeluje protektivno i na moždanu ishemiju koja u miševa uzrokuje povećanu sekreciju TFF3 u hepatocitima i serumu. Parcijalna hepatektomija (~60% resekcija jetre) netom nakon moždane I/R ozljede značajno smanjuje serumsku razinu TFF3 što ukazuje na doprinos jetre u povećanju serumskog TFF3. U usporedbi s WT mišem, *Tff3*^{-/-} miševi pokazuju značajno višu aktivnost kaspaze 3 i razinu stanične smrti u ishemijskoj moždanoj ozljedi. S druge strane, intravenozna administracija rekombinantnog TFF3 uzrokuje preokret moždanih promjena izazvanih TFF3 deficijencijom (Liu i sur. 2013). U ovom eksperimentu tunikamicinom tretirani WT miševi pokazali su manju ekspresiju ali statistički neznačajnu. Šešelja i sur. (2019) s novim modelom *Tff3*^{-/-} C57BL&NCrl miševa pokazali su kako TFF3 deficijencija nije presudna za stres ER-a koji je akutno izazvan tunikamicinom.

6. Zaključak

1. Metode detekcije specifičnih citokina su uspješno uspostavljene te su utvrđeni optimalni reakcijski uvjeti za detekciju gena *Tff3*, *Tnfa*, *Mcp1* i *Cxcl1* pomoću *SYBR Green I* kemije.
2. Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze utvrđeno je kako se u jetri C57BL6NCrl miševa mijenja ekspresija kemokina pod utjecajem tunikamicina.
3. Statistički značajno povećala se ekspresija *Tnfa* (6,6 puta), *Mcp1* (4,8 puta) i *Cxcl1* (62,1 puta) dok je razina Tff3 proteina smanjena ali bez statističkog značaja.
4. Dobiveni rezultati su u skladu s objavljenom literaturom.

7. Literatura

- 1 Akazawa Y, Nakao K (2018). To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* **53**: 893–906.
- 2 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, i sur. (2014). *Molecular Biology of The Cell*, Sixth edition. W. W. Norton & Company.
- 3 Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, i sur. (2010). Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. *Medicinska naklada*.
- 4 Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, i sur. (2012). Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* **61**: 416–426.
- 5 Baus-Loncar M, Al-Azzeh ED, Sommer PSM, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, i sur. (2003). Tumour necrosis factor α and nuclear factor κ B inhibit transcription of human *TFF3* encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* **52**: 1297–1303
- 6 Baus-Loncar M, Giraud AS (2005). Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2921–2931.
- 7 Baus-Lončar M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T (2005). Trefoil factor family 2 deficiency and immune response. *Best Pract Res Clin Haematol* **16**: 419–432.
- 8 Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C (1998). Mechanisms of Hepatic Toxicity: I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **275**: 387–392.
- 9 Brown AC, Olver WI, Donnelly CJ, May ME, Naggert JK, Shaffer DJ, i sur. (2005). Searching QTL by gene expression: Analysis of diabetes. *BMC Genet* **6**: 1–9.
- 10 Bujak M, Bujak IT, Sobočanec S, Mihalj M, Novak S, Cosić A, i sur. (2018). Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell Physiol Biochem* **47**: 827–841.
- 11 Bustin SA, Nolan T (2004). Chapter 7: Analysis of mRNA Expression by Real-time PCR. U: Edwards K, Logan J, Saunders N (ur.) *Real-time PCR: An essential guide*. Horizon Bioscience.
- 12 Chang B, Xu MJ, Zhou Z, Cai Y, Li M, Wang W, i sur. (2015). Short- or Long-Term High-Fat Diet Feeding Plus Acute Ethanol Binge Synergistically Induce Acute Liver Injury in Mice: An Important Role for CXCL1. *Hepatology* **62**: 1070–1085.
- 13 Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d’Hellencourt C, Ravanan P (2014). A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci* **8**: 1–15.
- 14 Cooper GM, Hausman RE (2015). *The Cell: A Molecular Approach*, Seventh Edition. Sinauer Associates.
- 15 Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, Haddad O, Charni F, Laguillier C, i sur. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic

- myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer* **126**: 1095–1108.
- 16 Dara L, Ji C, Kaplowitz N (2011). The Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Liver Diseases. *Hepatology* **53**: 1752–1763.
 - 17 De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, i sur. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**: 4930–7.
 - 18 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res* **29**: 313–326.
 - 19 Dietrich P, Hellerbrand C (2014). Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **28**: 637–653.
 - 20 Faleiros RR, Leise BB, Westerman T, Yin C, Nuovo GJ, Belknap JK (2009). In Vivo and In Vitro Evidence of the Involvement of CXCL1, a Keratinocyte-Derived Chemokine, in Equine Laminitis. **1**: 1086–1096.
 - 21 Guo Q, Li H, Liu J, Xu L, Yang L, Sun Z, i sur. (2017). Tunicamycin aggravates endoplasmic reticulum stress and airway inflammation via PERK-ATF4-CHOP signaling in a murine model of neutrophilic asthma. *J Asthma* **54**: 125–133.
 - 22 Hasnain SZ, Lourie R, Das I, Chen ACH, McGuckin MA (2012). The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunol Cell Biol* **90**: 260–270.
 - 23 Haukeland JW, Damås JK, Konopski Z, Løberg EM, Haaland T, Goverud I, i sur. (2006). Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* **44**: 1167–1174.
 - 24 Hetz C, Chevet E, Harding HP (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* **12**: 703–719.
 - 25 Hoffmann W (2005). TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2932–2938.
 - 26 Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH (2006). Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 α -Mediated NF-B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Society* **26**: 3071–3084.
 - 27 Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**: 279–284.
 - 28 Ji C (2008). Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* **23**: S16–S24.
 - 29 Kanda H, Egashira K, Kasuga M, Kanda H, Tateya S, Tamori Y, i sur. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**: 1494–1505.
 - 30 Kolattukudy PE, Niu J (2012). Inflammation, Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and the Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res* **110**: 174–189.

- 31 Kuscuglu D, Janciauskiene S, Hamesch K, Haybaeck J, Trautwein C, Strnad P (2018). Liver – master and servant of serum proteome. *J Hepatol* **69**: 512–524.
- 32 Lai EI, Teodoro T, Volchuk A (2007). Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *PHYSIOLOGY* **22**: 193–201.
- 33 Lee JS, Zheng Z, Mendez R, Ha SW, Xie Y, Zhang K (2012). Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett* **211**: 29–38.
- 34 Lin JH, Walter P, Yen TSB (2008). Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **3**: 399–425.
- 35 Liu SQ, Tefft BJ, Roberts DT, Zhang LQ, Ren Y, Li YC, i sur. (2012). Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* **303**: 1446–1458.
- 36 Liu SQ, Roberts D, Zhang B, Ren Y, Zhang LQ, Wu YH (2013). Trefoil Factor 3 as an Endocrine Neuroprotective Factor from the Liver in Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *PLoS One* **8**: 1–15.
- 37 Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402–408.
- 38 Malhi H, Kaufman RJ (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* **54**: 795–809.
- 39 Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D (2011). An Essential Role for Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Alcoholic Liver Injury: Regulation of Proinflammatory Cytokines and Hepatic Steatosis in Mice. *Hepatology* **54**: 2185–2197.
- 40 Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL (2009). Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 998–1001.
- 41 Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, i sur. (2014). ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* **26**: 331–343.
- 42 Okada H, Kimura MT, Tan D, Fujiwara K, Igarashi J, Makuuchi M, i sur. (2004). Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* **26**: 369–377.
- 43 Regalo G, Wright NA, Machado JC (2005). Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2910–2915.
- 44 Ren C, Dokter-Fokkens J, Figueroa Lozano S, Zhang Q, Haan BJ de, Zhang H, i sur. (2018). Lactic Acid Bacteria May Impact Intestinal Barrier Function by Modulating Goblet Cells. *Mol Nutr Food Res* **62**: 1–14.
- 45 Roy A, Kolattukudy PE (2012). Monocyte chemotactic protein-induced protein (MCP-1) promotes inflammatory angiogenesis via sequential induction of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Signal* **24**: 2123–2131.
- 46 Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J (2010). Insulin Resistance, Inflammation, and Obesity: Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (or CCL2) in the Regulation of Metabolism. *Mediators Inflamm* **2010**: 1–11.

- 47 Rutkowski DT (2019). Liver function and dysfunction – a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response. *FEBS J* **286**: 356–378.
- 48 Sano R, Reed JC (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1833**: 3460–3470.
- 49 Sawant KV, Poluri KM, Dutta AK, Sepuru KM, Troshkina A, Garofalo RP, i sur. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* **6**: 1–8.
- 50 Schröder M, Kaufman RJ (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **569**: 29–63.
- 51 Schwabe RF, Brenner DA (2006). Mechanisms of Liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **290**: 583–589.
- 52 Song MJ, Malhi H (2019). The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacol Ther* **203**: 1–10.
- 53 Su L, Li N, Tang H, Lou Z, Chong X, Zhang C, i sur. (2018). Kupffer cell-derived TNF- α promotes hepatocytes to produce CXCL1 and mobilize neutrophils in response to necrotic cells. *Cell Death Dis* **9**: 1–12.
- 54 Šešelja K, Bazina I, Welss J, Schicht M, Paulsen F, Bijelić N, i sur. (2019). Effect of Tff3 deficiency and ER stress in the liver. *Int J Mol Sci* **20**: 1–19.
- 55 Taupin D, Podolsky DK (2003). TREFOIL FACTORS: INITIATORS OF MUCOSAL HEALING. *Mol CELL Biol* **4**: 721–734.
- 56 Thim L, May FEB (2005). Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2956–2973.
- 57 Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer* **2**: 252–262.
- 58 Valasek MA, Repa JJ (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **29**: 151–159.
- 59 Vieira S, Lemos H, Grespan R, Napimoga M, Dal-Secco D, Freitas A, i sur. (2009). A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br J Pharmacol* **158**: 779–789.
- 60 Wong, Marisa L, Medrano, Juan F (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**: 1–11.
- 61 Wu X, Zheng H, Yang R, Luan X, Zhang L, Jin Q, i sur. (2019). Mouse Trefoil Factor 3 (Tff3) Ameliorated HFD-induced hepatic steatosis via increasing Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α (PPAR α) mediated fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **317**: 436–445.
- 62 Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, i sur. (2005). Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Induces the Unfolded Protein Response (UPR) in a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent Fashion, and the UPR Counteracts ROS Accumulation by TNF α . *J Biol Chem* **280**: 33917–33925.

- 63 Xue Y, Shen L, Cui Y, Zhang H, Chen Q, Cui A, i sur. (2013). Tff3, as a Novel Peptide, Regulates Hepatic Glucose Metabolism. *PLoS One* **8**: e75240.
- 64 Yadav A, Saini V, Arora S (2010). MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clin Chim Acta* **411**: 1570–1579.
- 65 Yoshida H (2007). ER stress and diseases. *FEBS J* **274**: 630–658.
- 66 Younce C, Kolattukudy P (2012). MCP-1 Induced Protein Promotes Adipogenesis via Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. *Cell Physiol Biochem* **30**: 307–20.
- 67 Zeeshan HMA, Lee GH, Kim HR, Chae HJ (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci* **17**: 1–20.
- 68 Zhu Y, Zhao S, Deng Y, Gordillo R, Ghaben AL, Shao M, i sur. (2017). Hepatic GALE Regulates Whole-Body Glucose Homeostasis by Modulating *Tff3* Expression. *Diabetes* **66**: 2789–2799.
- 69 https://old.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php (23.7.2020.)
- 70 <https://www.bio-rad.com/en-br/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU> (23.7.2020)
- 71 <https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html> (23.7.2020.)
- 72 <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/> (23.7.2020.)

8. Životopis

OSNOVNI PODACI

Ime i prezime: Tajana Burkuš

Datum i mjesto rođenja: 31.5.1993. Bjelovar

ŠKOLOVANJE

2000. – 2008. Osnovna škola Marije i Line, Umag

2008. – 2012. Srednja škola Vladimira Gortana, smjer opća gimnazija, Buje

2012. – 2016. Preddiplomski studij znanosti o okolišu, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; Tema završnog rada: Princip holobionta

2016. – 2019. Diplomski studij eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

listopad 2015. – veljača 2016. Studentski demonstrator

Kolegij Invertebrata, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultete, Sveučilište u Zagrebu

travanj 2017. – lipanj 2017. Laboratorijska stručna praksa

Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković

- PCR, qPCR, elektroforeza nukleinskih kiselina, ELISA, spektrofotometrijske metode za determinaciju koncentracije serotonina i aktivnosti MAOB enzima

lipanj 2018. – kolovoz 2018. Erasmus+ stručna praksa

Institut za imunologiju i istraživanje infekcije, Škola bioloških znanosti, Sveučilište u

Edinburghu

- qPCR, rad na epi-fluorescentnom i konfokalnom mikroskopu, protočna citometrija, kultura bakterija, uzrokovanje infekcija i analiza stope preživljavanja na modelnom organizmu *Drosophila melanogaster*

ZNANJA I VJEŠTINE

Strani jezici: Engleski – C1

Talijanski – B2

Rad na računalu: osnovno znanje korištenja Microsoft Office programa

Vozačka dozvola: B kategorija

SUDJELOVANJA

travanj 2016. organizacija Simpozija studenata bioloških usmjerenja – SISB2

travanj 2016. radionica „Ekofiziologija životinja“ na manifestaciji „Noć biologije“

travanj 2017. radionica „Kognicija u životinja“ na manifestaciji „Noć biologije“