

UČINAK NEDOSTATKA TREFOIL FAKTOR 3 PROTEINA NA JETRU I HIPOKAMPUS MIŠEVA IZLOŽENIH KRATKOTRAJNOM TRETMANU VISOKOMASNOM HRANOM

Šešelja, Kate

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:885505>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Kate Šešelja

**UČINAK NEDOSTATKA TREFOIL
FAKTOR 3 PROTEINA NA JETRU I
HIPOKAMPUS MIŠEVA IZLOŽENIH
KRATKOTRAJNOM TRETMANU
VISOKOMASNOM HRANOM**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Kate Šešelja

**UČINAK NEDOSTATKA TREFOIL
FAKTOR 3 PROTEINA NA JETRU I
HIPOKAMPUS MIŠEVA IZLOŽENIH
KRATKOTRAJNOM TRETMANU
VISOKOMASNOM HRANOM**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr.sc. Mirela Baus Lončar

Rijeka, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Kate Šešelja

**EFFECT OF TREFOIL FACTOR 3
PROTEIN DEFICIENCY ON
LIVER AND HIPPOCAMPUS OF
MICE ON SHORT TERM HIGH
FAT DIET TREATMENT**

DOCTORAL THESIS

Mentor: dr.sc. Mirela Baus Lončar

Rijeka, 2023.

Mentor rada: dr.sc. Mirela Baus Lončar, Institut Ruđer Bošković

Doktorski rad obranjen je dana 20.6.2023. na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, Hrvatska
2. izv. prof. dr. sc. Igor Jurak, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, Hrvatska
3. izv. prof. dr. sc. Bojan Polić, Medicinski fakultet, Rijeka Hrvatska

Prvo bih htjela zahvaliti mentorici dr. sc. Mireli Baus Lončar na ukazanoj prilici i uvođenju u znanstveni svijet. Hvala Vam na pruženoj pomoći tijekom ove važne faze u mojoj znanstvenoj karijeri i nadam se da će mi stečeno znanje prilikom brojnih izazova ovih godina pomoći da i dalje rastem u znanstvenika kakav želim biti.

Najiskrenije hvala kolegama iz Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, izv. prof. dr. sc. Silvi Katušić Hećimović, dr. sc. Martini Deželjin i Lei Vidatić na dijeljenju znanja, korisnim savjetima i ugodnim druženjima. Moram posebno izdvojiti friške doktorice Ivu Bazina i Anu Rastija koje su u ovom vremenu od kolega postale prave prijateljice. Naša poznata "živote robijo" je bila neizmerno lakša uz vas! Kada ću se sjećati ovog perioda, sjetiti ću se prvo vas dvije, jedna desno od mene koja pokušava uništiti youtube algoritam sa svojim zbunjajućim videima, a druga lijevo kako pokušava smisliti kako točno izmjeriti određene objekte. U sjećanja će navirati i milozvučna pjevanja ja i moj kolega, džempera za vinograd, male izmisla san, padanja po Splitskoj rivi i još milijun stvari koji me automatski razvesele. Hvala Vam i reka bi Oliver, vridilo je!

Hvala i ostalim kolegama doktorandima koji su mi uljepšali ovaj period, nadam se da ćemo se i dalje kao stari istraživači vidati po feštama mladih istraživača!

Veliko hvala tehničarkama Snježani Juler i Marini Marš na pristupačnosti i uvijek dostupnoj pomoći. Posebno hvala djelatnicima Pogona laboratorijskih životinja IRB-a, izv. prof. dr. sc. Ranku Stojkoviću, Višnji Novalić, Maji Boranić i Goranu Golešu na srdačnosti i pomoći oko pokusa. Zahvaljujem se i svim vanjskim suradnicima koji su doprinijeli u izradi ove doktorske disertacije: dr. sc. Aniti Horvatić na analizi rezultata proteomike, izv. prof. dr. sc. Tatjani Pirman na analizi rezultata sastava masnih kiselina u jetri, izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku te Vjekoslav Kopačinu iz Medicinsko-biokemijskog laboratorija za biokemijsku analizu krvi.

Na kraju bih htjela zahvaliti svim mojim ljudima, mojim prijateljima koji su uvijek tu za mene, pa tako i u ovoj fazi mojeg života (čak i oni koji bježe u Kongo <3). Znae koji ste pa Vas neću nabrajati posebno iz razloga što se ne bih mogla suzdržati od previše glupih internih fora, a možda bi morala zadržati malo profesionalnosti i u zahvalama. Mojim Šoljićima hvala na svim riječima ohrabrenja, što ste me prihvatili kao svoju i nahranili brojnim nedjeljama!

Mojoj obitelji, mama, tata i Luce, sad ću malo na čakavski; iako vam ni skroz jasno ča ja to činim zadnjih par godin, i kako bi nana znala reći: Tolike škole, a ubija miši! – fala Vam na ljubavi i podršci i ča ste me u životu naučili ča je najbitnije, a to ni nijedna titula nego ovaj osjećaj dok u glavi vrtim sve ljude na kojima sam zahvalna i koji će se sa mnom iskreno veseliti kad/ako uspijem ovo obraniti. Naučili ste me ča je familja, ča je u životu vridno i svojim primjerun pokazali da se trud i pošten rad isplate! Luce, fala ti ča si iako mlađa sestra često inspiracija svojoj starijoj sestri, ponosna sam na tebe!

Filipe, tebi najviše hvala jer si ti jadan i najviše sluša o raznoraznim doktorat zavrslamama. Hvala ti na najboljem primjeru prave podrške kojoj svjedočim svaki dan. Sve znaš.. (uz ovakve ljude kraj sebe, nema straha za dalje...)

SAŽETAK

Trefoil faktor protein 3 (Tff3) je mali peptid primarno eksprimiran u vrčastim stanicama probavila gdje sudjeluje u zaštiti epitela od raznolikih štetnih utjecaja. Tff3 je prisutan i u jetri i u mozgu te novija istraživanja ukazuju na potencijalno važnu ulogu u metaboličkim i neurodegenerativnim poremećajima. Metaboličke bolesti kao što je Tip 2 dijabetes, i neurodegenerativne bolesti uključujući Alzheimerovu bolest, dijele brojne patofiziološke poveznice. Proučavanje poveznica u ranim fazama bolesti, prije uznapredovalih simptoma, bi moglo pridonijeti boljem razumijevanju patogeneze ovih kompleksnih poremećaja i uspješnijem razvoju djelotvornih terapija. Stoga je cilj ovog doktorskog rada bio istražiti ulogu Tff3 u jetri i hipokampusu u počecima aktivacije patoloških procesa navedenih poremećaja uslijed kratkotrajnog tretmana visokomasnom hranom. U tu svrhu je razvijen novi kongenični *Tff3*^{-/-} mišji soj na C57BL/6N genskoj podlozi bez dodatnih relevantnih metaboličkih mutacija. Zatim su novo-razvijeni *Tff3*^{-/-} miševi oba spola te odgovarajuće divlji tip kontrole hranjene visokomasnom hranom kroz 9 tjedana. Ispitan je generalni metabolički status životinja, analizirana je ekspresija markera relevantnih patofizioloških puteva u jetri te markera neurogeneze i neuroinflamacije u hipokampusu. *Tff3*^{-/-} životinje su imale statistički značajno manje mase i uočeno je smanjeno nakupljanje masti u jetri u odnosu na WT kontrole što ukazuje na zaštitni učinak nedostatka Tff3. U jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka je uočena značajno snižena razina gena *Il1α* i *Cxcr7*, dok je u jetri *Tff3*^{-/-} ženki povećana razina *Irs2*, *Atf4* gena te Ybx1 i Anp32a proteina. U hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka snižena je razina markera nezrelih neurona (Dcx) te markera mikroglija (Iba1), dok *Tff3*^{-/-} ženke imaju povećanu razinu Dcx te povećanu razinu markera zrelih neurona (NeuN). Analiza genske ekspresije markera neurogeneze ukazuje na izraženije razlike u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki. U jetri i hipokampusu životinja izloženih standardnoj hrani nisu detektirane statistički značajne razlike navedenih promijenjenih markera što ukazuje kako se uočene promjene javljaju uslijed stresa izazvanog visokomasnom hranom. Ovo istraživanje pruža novi uvid u uloge Tff3 proteina u jetri i hipokampusu te pruža smjer za daljnja ispitivanja sa ciljem otkrivanja točnih mehanizama djelovanja te potencijalno identifikacije novih terapijskih meta metaboličkih/neurodegenerativnih poremećaja. Dodatno, ukazuje na potrebu za uključivanjem oba spola u buduća istraživanja s obzirom da se uočen fenotip *Tff3*^{-/-} mužjaka i *Tff3*^{-/-} ženki bitno razlikuje.

Ključne riječi: Trefoil faktor 3, tretman visokomasnom hranom, metabolizam, neurogeneza, neuroinflamacija

SUMMARY

Trefoil factor protein 3 (Tff3) is a small peptide expressed mainly in goblet cells with a role in healing and protection of epithelium. Recent research suggests that the Tff3 protein also plays an important role in metabolic and neurodegenerative diseases. Metabolic diseases, such as Type 2 diabetes and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, share many pathophysiological links. Studying these links in the early stages, before the onset of advanced symptoms, could contribute to a better understanding of the pathogenesis of these complex disorders and to the successful development of effective therapies. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to investigate the role of Tff3 in the liver and the hippocampus in the early stages of pathological processes activation due to short-term treatment with a high-fat diet. First, a new congenic *Tff3*^{-/-} mouse strain was developed on the C57BL/6N genetic background without additional relevant metabolic mutations. Subsequently, the newly developed *Tff3*^{-/-} mice of both sexes and corresponding wild-type controls were fed a high-fat diet for 9 weeks. We examined the general metabolic status of the animals and analyzed the expression of markers of relevant pathophysiological pathways in the liver and in the hippocampus. *Tff3*^{-/-} animals had significantly lower weight and reduced fat accumulation in the liver compared with WT controls, suggesting a protective effect of Tff3 deficiency. The results of molecular analysis showed decreased levels of the *Il1α* and *Cxcr7* genes in the liver of *Tff3*^{-/-} males, whereas the levels of the *Irs2* and *Atf4* and *Ybx1* and *Anp32a* were increased in *Tff3*^{-/-} females. In the hippocampus of *Tff3*^{-/-} males, the protein level of the marker of immature neurons (*Dcx*) and the marker of microglia (*Iba1*) were decreased, whereas levels of *Dcx* and the marker of mature neurons (*NeuN*) were increased in *Tff3*^{-/-} females. Analysis of neurogenesis markers shows more pronounced effect in the hippocampus of *Tff3*^{-/-} females. No statistically significant differences in the aforementioned altered markers were detected in both liver and hippocampus of the animals exposed to a standard diet, suggesting that the observed changes are a consequence of stress induced by high-fat diet. This research provides new insights into the role of Tff3 protein in the liver and the hippocampus and provides direction for further investigations aimed at uncovering the precise molecular mechanisms. In addition, it highlights the need to include both sexes in future research, as the observed phenotype differs significantly by sex.

Key words: Trefoil factor 3, high fat diet, metabolism, neurogenesis, neuroinflammation

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Obitelj trefoil faktor proteina – Trefoil faktor 3.....	1
1.1.1. Trefoil faktor 3 u gastrointestinalnom sustavu.....	3
1.1.2. Trefoil faktor 3 u razvoju raka	8
1.2. Trefoil faktor 3 u metaboličkim procesima.....	10
1.3. Trefoil faktor 3 u središnjem živčanom sustavu	13
1.4. <i>Tff3 knock out</i> mišji model.....	16
1.5. Modeliranje patoloških procesa visokomasnom hranom	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Razvoj novog <i>Tff3 knock out</i> kongeničnog miša na C57BL/6N genskoj podlozi.....	23
3.1.1. Uzgoj životinja.....	23
3.1.2. Genotipizacija miševa	25
3.2. Model kratkotrajne visokomasne prehrane	27
3.3. Metabolički testovi.....	27
3.3.1. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT)	28
3.3.2. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT)	28
3.4. Prikupljanje uzoraka	28
3.5. Analiza biokemijskih parametara u serumu.....	30
3.6. Analiza genske ekspresije metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom	30
3.6.1. Optimizacija početnica.....	30
3.6.2. Izolacija RNA i sinteza cDNA.....	35
3.6.3. Amplifikacija cDNA upotrebom qPCR metode	36
3.7. Detekcija proteina Western blot metodom.....	38
3.7.1. Izolacija proteina.....	38
3.7.2. Mjerenje koncentracije proteina.....	38
3.7.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i prijenos proteina na membranu.....	38
3.7.4. Vežanje antitijela na membranu.....	40
3.7.5. Detekcija proteina Western blot metodom.....	40
3.8. Proteomska analiza- LC MS/MS analiza visoke rezolucije	41
3.9. Analiza sastava masnih kiselina.....	41
3.10. Histološka analiza jetre i imunohistokemija analiza mozga	42
3.10.1. Priprema tkiva.....	42
3.10.2. Oil Red O bojanje lipida u tkivu jetre	42

3.10.3. Vizualizacija proteina u hipokampusu metodom imunofluorescencije	43
3.11. Statističke analize.....	43
4. REZULTATI.....	45
4.1. Razvoj novog kongeničnog <i>Tff3 knock out</i> mišjeg modela na C57BL/6N genskoj podlozi	45
4.2. Utjecaj nedostatka <i>Tff3</i> na metaboličku homeostazu miševa izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani	48
4.2.1. Usporedba tjelesne mase.....	48
4.2.2. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT)	49
4.2.3. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT)	51
4.3. Učinak nedostatka <i>Tff3</i> na različite biokemijske parametre u serumu miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom	53
4.4. Utjecaj unosa visokomasne hrane i spola na ekspresiju <i>Tff3</i> gena u jetri C57BL/6N miševa.....	55
4.5. Utjecaj nedostatka <i>Tff3</i> proteina na jetru miševa izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani ..	57
4.5.1. Oil Red O bojanje	57
4.5.2. Analiza sastava masnih kiselina u jetri	58
4.5.3. Ekspresija gena uključenih u različite patofiziološke puteve u jetri	60
4.5.4. Analiza ukupnog proteoma jetre WT i <i>Tff3</i> ^{-/-} miševa oba spola izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom	67
4.7. Utjecaj nedostatka <i>Tff3</i> na hipokampus životinja izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani .	71
4.7.1. Razina i vizualizacija markera zrelih (NeuN) i nezrelih neurona (Dcx) u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani	71
4.7.2. Razina i vizualizacija markera astrocita (Gfap) i mikroglia (Iba1) u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani	80
4.7.3. Razina proteinske ekspresije Dcx, NeuN, Snap-25, Gfap i Iba1 u hipokampusu miševa izloženih standardnoj prehrani	87
5.RASPRAVA	90
5.1. Učinak nedostatka <i>Tff3</i> na metaboličko stanje miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom	91
5.1.2. Analiza mase i metabolički testovi (IPGTT, IPITT).....	91
5.1.3. Biokemijska analiza seruma.....	94
5.1.4. Utjecaj tretmana visokomasne hrane i spola na ekspresiju <i>Tff3</i> gena u jetri C57BL/6N miševa	94
5.1.5. Oil Red O bojanje i analiza sastava masnih kiselina u jetri	95
5.1.6. Analiza genske ekspresije relevantnih patofizioloških puteva metaboličkih poremećaja.....	98
5.1.7. Analiza proteoma jetre miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom	101

5.2. Učinak nedostatka Tff3 na hipokampus miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom	103
5.2.1. Učinak nedostatka Tff3 na markere neurogeneze u hipokampusu	103
5.2.2. Učinak nedostatka Tff3 na markere neuroinflamacije u hipokampusu.....	110
6. ZAKLJUČAK	113
7. LITERATURA	115
8. ILUSTRACIJE.....	137
8.1. Popis tablica.....	137
8.2. Popis slika	138
9. ŽIVOTOPIS	144
10. POPIS PUBLIKACIJA	147
11. POPIS KRATICA	148
12. PRIVITAK.....	151

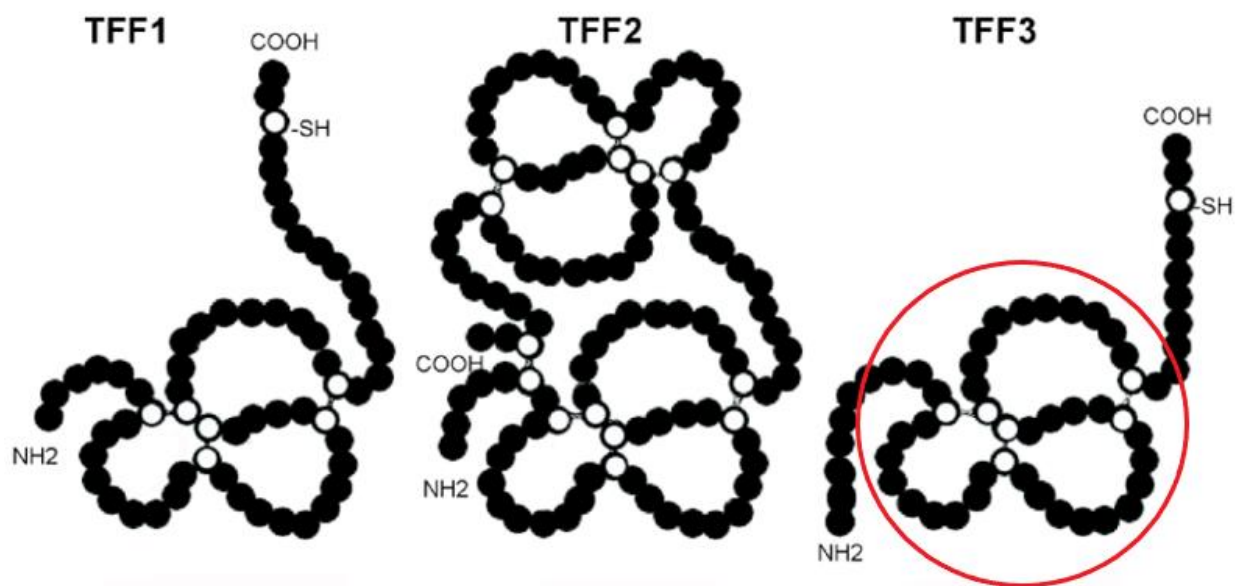
1. UVOD

1.1. Obitelj trefoil faktor proteina– Trefoil faktor 3

Obitelj Trefoil factor (TFF) proteina kod sisavaca obuhvaća tri člana: Trefoil faktor 1 (TFF1), Trefoil faktor 2 (TFF2) i Trefoil faktor 3 (TFF3). Istraživanja TFF proteina su započela otkrićem TFF2 proteina koji je originalno nazvan engl. *pancreatic spasmolytic polypeptide* (PSP), a detektiran je tijekom purifikacije inzulina [1,2]. TFF1 je otkriven kao tada nepoznat protein induciran estrogenom u staničnoj liniji humanog raka dojke i nazvan je engl. *human breast cancer-associated ps2* [3,4], a zadnji poznati član TFF obitelji kod sisavaca je TFF3 (prethodno nazvan engl. *intestinal trefoil factor*, ITF) koji je otkriven u crijevima štakora 1991. godine [5].

1997. godine je usvojena trenutna standardizirana nomenklatura (TFF1-3) koja je zamijenila njihova originalna imena i dogovoreno je da su velika slova (npr. TFF3) oznaka za humane proteine, a mala slova (npr. Tff3) za proteine glodavaca dok se geni korespondirajućih vrsta pišu u kurzivu (npr. *TFF3* i *Tff3*) [6].

Ime su dobili po karakterističnoj zajedničkoj strukturnoj domeni koja je formirana od šest cisteinskih ostataka koji disulfidnim vezama (u konfiguraciji C1–C5, C2–C4, C3–C6) formiraju tri petlje u polipeptidnom lancu pa tako izgledom podsjećaju na trolist djeteline (engl. *trefoil*) (Slika 1) [7,8]. Takva specifična i kompaktna struktura čini TFF proteine stabilnima u okolišu gastrointestinalnog (GI) sustava i smatra se razlogom otpornosti na proteolitičku razgradnju [1,8–12]. TFF2 sadrži dvije takve trefoil domene, dok TFF1 i TFF3 sadržavaju samo jednu, ali posjeduju sedmi slobodni cisteinski ostatak na poziciji 57 koji je ključan za formiranje dimera (homodimeri TFF1-TFF1, TFF3-TFF3; heterodimeri TFF1 i TFF3 s partner proteinima) [13–16].



Slika 1. Shema sekundarne strukture TFF proteina. Crvenim krugom označen primjer engl. *trefoil* domene kod TFF3 proteina. Karakterističnu domenu koja sadržava cisteinske ostatke koji formiraju tri disulfidne veze u konfiguraciji CysI–V, CysII–IV, and CysIII–V ima i TFF1, a dvije takve domene TFF2 protein, kako je prikazano na slici. Preuzeto i prilagođeno prema [17].

Kod ljudi su TFF geni mapirani unutar regije od 54.5kb na 21q22.3 kromosomu [18,19], a kod miševa se nalaze na 17q kromosomu [20]. Filogenetske analize ukazuju na visoku evolucijsku očuvanost između vrsta što ukazuje na važnu ulogu TFF peptida u organizmu [21,22].

Prvenstveno su eksprimirani u mukoznim epitelnim stanicama GI sustava gdje se egzokrinno izlučuju sa velikim glikoproteinima iz porodice mucina [23,24]. Iako dijele brojna zajednička obilježja, diferencira ih jedinstveni obrazac distribucije duž GI trakt te karakteristične kombinacije sa specifičnim mucinima [25]. Primjerice, TFF1 kolokalizira s mucinom 5AC (Muc5ac) predominantno u površinskom epitelu želuca, TFF2 s mucinom 6 (Muc6) u mukoznim stanicama vrata žlijezde, dok se TFF3 izlučuje skupa s mucinom 2 (Muc2) iz vrčastih stanica tankog crijeva i kolona [5,25–28]. Smatra se kako interakcije s polisaharidnim lancima mucina povećaju viskoznost sluznica te time pružaju bazu za zaštitu epitela što je primarna funkcija TFF peptida u organizmu [29–31].

Među TFF peptidima, TFF3 je najšire rasprostranjen, te je osim u GI sustavu pronađen i u raznim drugim epitelnim tkivima gdje se egzokrino izlučuje, primjerice u konjunktivi oka [32], u žlijezdama slinovnicama [33], u epitelu respiratornog [34] i urogenitalnog trakta [24,35]. Nadalje, otkrivena je i njegova prisutnost u koštanom tkivu [36–38], limfnim organima [39] te u gušterači [40]. Detektiran je i u različitim tjelesnim tekućinama (serum, cerebrospinalna tekućina, urin, suze, majčino mlijeko) [35,41–44]. Prikaz ekspresije TFF3 u zdravim humanim uzorcima je naveden u preglednom istraživanju [45] te takva široka distribucija upućuje na njegovu opću važnost u organizmu. Promijenjena ekspresija TFF3 je zabilježena u različitim patološkim stanjima, primjerice upalne crijevne bolesti, razne vrste tumora, te metaboličke i neurodegenerativne bolesti. Ono što je važno napomenuti u kontekstu ovog doktorskog rada i ekspresije TFF3 je da je prisutan i u jetri i u središnjem živčanom sustavu (SŽS) što je detaljnije opisano u poglavljima 1.2. i 1.3.

1.1.1. Trefoil faktor 3 u gastrointestinalnom sustavu

Brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja pokazuju da TFF3 ima važnu ulogu u zaštiti sluznica od raznolikih štetnih utjecaja. Istraživanje u kojemu je prvi put opisano generiranje *Tff3*^{-/-} mišjeg modela je pokazalo da eksperimentalno izazivanje ozljede kolona vodi do smrtnosti čak 50% *Tff3*^{-/-} životinja, dok su kontrolne životinje nakon nekog vremena skroz zacijelile [46]. Nadalje, tretman s TFF3 nakon ozljede crijeva kod *Tff3*^{-/-} miševa rezultira povećanom epitelnom migracijom i re-epitelizacijom oštećene mukozne barijere i time normalnim zacijeljivanjem epitela kod tretiranih miševa u usporedbi s ne-tretiranim životinjama. Dakle, otkriveno je kako *Tff3* ima važnu ulogu u epitelnoj restituciji, procesu koji se pokreće u slučaju manjih površinskih ozljeda kako bi se što prije ponovno uspostavio epitelni kontinuum [47]. Epitelna restitucija je ključna za održavanje homeostaze površinskog sloja stanica GI sustava. Obuhvaća sekvencu događaja koja uključuje staničnu dediferencijaciju, reorganizaciju citoskeleta, blokiranje posebne vrste apoptoze (*anoikis*) koja se pokreće kada se stanice odvajaju od substrata, ponovnu migraciju i rediferencijaciju stanica na mjestu ozljede [47,48]. Brojne studije ukazuju na uloge TFF3 u nabrojanim procesima (Slika 2).

Primjerice, *in vitro* je pokazano kako *Tff3* blokira apoptozu uzrokovanu različitim tretmanima, što je posredovano aktivacijom signalnog puta engl. *phosphatidylinositol 3-kinases* (p-I3K) i aktivacijom engl. *epidermal growth factor receptor* (Egfr), a *Tff3*^{-/-} miševi imaju povećanu razinu apoptoze u kriptama kolona u usporedbi s kontrolnim miševima s funkcionalnim *Tff3* proteinom

[49]. Nadalje, u štakorskim epitelnim stanicama crijeva tretman s TFF3 vodi do rezistencije stanica na *anoikis* što je posredovano signalnom kaskadom povezanom s transkripcijskim faktorom engl. *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) [50].

Osim djelovanja na samo preživljenje stanica, pokazano je da TFF3 djeluje i kao motogen, odnosno potiče migraciju stanica u epitelnim stanicama crijeva i taj učinak je ovisan o engl. *mitogen activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase* (Mapk/Erk) signalnim putevima [11]. Otkriveno je kako u kombinaciji s engl. *epidermal growth factor* (Egf), TFF3 pospješuje oporavak u modelima GI ozljeda *in vivo* i *in vitro* [51] i kako je taj sinergistički efekt rezultat aktivacije stanične migracije čime se ubrzava cijeljenje epitela jer stanice brzo migiriraju i time ponovno uspostavljaju epitelni kontinuum [52]. U stanicama raka kolona, TFF3 narušava engl. *E-cadherin/β-catenin* komplekse i posljedica je destabilizacija međustaničnih spojeva čime se narušava stanična adhezija [53]. Degradacija E-cadherina koju izaziva tretman s TFF3 je blokirana inhibicijom Erk i engl. *janus kinase (JAK) / signal transducer and activator of transcription 3* (Stat3) signalnih puteva [54]. Također, pokazano je da TFF3 može voditi do smanjenja permeabilnosti intestinalne barijere tako što regulira ekspresiju engl. *claudin-1* i engl. *claudin-2* proteina unutar nepropusnih međustaničnih spojeva (engl. *tight junctions*) [55].

Pored uloge u preživljenju i migraciji stanica, Tff3 sudjeluje i u regulaciji imunskog odgovora u GI sustavu. Pokazano je da engl. *toll-like receptor 2* (Tlr2) ligandi, primjerice sintetički lipopolipeptid Pam3CysSK4 (Pcsk) koji oponaša bakterijske lipopolipeptide koji uzrokuju snažan protuupalni odgovor, mogu stimulirati vrčaste stanice kolona da sintetiziraju veće količine Tff3 [56]. Također, intraperitonealna primjena rekombinantnog TFF3 značajno smanjuje razinu upale u mišjem modelu kolitisa što je popraćeno sa smanjenom ekspresijom engl. *toll-like receptora 4* (Tlr4) i NF κ B [57]. Nadalje, *Tff3*^{-/-} miševi pokazuju različiti imunski odgovor u ileumu u usporedbi s divlji tip kontrolama nakon eksperimentalno inducirane upale infekcijom s *Toxoplasma gondii* bakterijom [58]. Miševi s nedostatkom Tff3 pokazuju snižene razine proupalnih citokina te smanjene upalne promjene u ileumu, uključujući nekrozu, površinu mukozne sluznice i broj CD4⁺ leukocita što ukazuje na to da su ti miševi djelomično zaštićeni od oralne infekcije *T. gondii* kada ih usporedimo s miševima divljeg tipa (engl. *wild type*, WT).

Sažetak navedenog pokazuje da TFF3 sudjeluje u više različitih staničnih procesa (apoptoza, migracija, imunski odgovor) i djeluje kroz više različitih signalnih kaskada (aktivacija

izvanstaničnih regulatornih kinaza Mapk/Erk, p-I3K; regulacija ekspresije β -catenina, aktivacija Egfr; regulacija NFkB/Stat3 signalnog puta). Točni mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni, a kako je TFF3 sekretorni protein koji se otpušta iz vrčastih stanica kolona, pretpostavka je da se veže za specifične receptore i na taj način aktivira signalne puteve i vrši različite funkcije. Međutim dugo vremena se nije mogla identificirati molekula s karakteristikama klasičnog receptora koja veže TFF3.

Prvo su otkriveni njegovi interaktivni partneri engl. *IgG Fc binding protein (Fcgbp)* [59] i engl. *deleted In Malignant Brain Tumors 1 (Dmbt1)* [60] s kojima TFF3 formira heterodimere. Kako je napomenuto u uvodnom dijelu, TFF3 posjeduje dodatni C-terminalni cisteinski ostatak (Cys^{VII}) lociran izvan engl. *trefoil* domene koji omogućuje stvaranje kovalentnih dimera. U uzorcima kolona pronađeno je kako je TFF3 uglavnom prisutan u formi heterodimera koje formira s Fcgbp te u manjim količinama u formi monomera i homodimera [59]. Fcgbp je kao i TFF3 prisutan u sluznici crijeva i otpušta se iz vrčastih stanica. Dodatno je pokazano kako tretman s vodikovim sulfidom vodi do otpuštanja monomera iz (TFF3-Fcgbp) heterodimera. Smatra se da je (TFF3-Fcgbp) heterodimer biološki spremnik koji u slučaju potrebe za zacjeljivanjem sluznica otpušta TFF3 u formi monomera čime započinje njegovo sudjelovanje u procesu oporavka. Osim u kolonu, isti heterodimer je pronađen i u uzorcima sline [61]. Osim Fcgbp, i Dmbt1 se može vezati za TFF3, a točna uloga njihove interakcije također nije razjašnjena [60]. Budući da Dmbt1 kao i TFF peptidi ima ulogu u rastu i diferencijaciji epitelnih stanica, pojačano je eksprimiran u upalnim crijevnim bolestima, a mišji modeli kojima nedostaje Dmbt1 su podložniji razvoju istih, hipoteza je kako njihova interakcija igra ulogu u održavanju homeostaze GI trakta i sprječavanju razvoja upalno-crijevnih bolesti.

Osim formiranja heterodimera, uočena je i interakcija TFF3 s engl. *C-X-C chemokine receptor type 4 (Cxcr4)* i engl. *atypical Chemokine Receptor 3 (Cxcr7)* koja je potrebna za induciranje stanične migracije u epitelnim stanicama konjunktive oka [62]. Također, TFF3 izoliran iz majčinog mlijeka u epitelnim crijevnim stanicama aktivira engl. *protease activated receptors 2 (Par2)* i vodi do smanjenja razina proupalnih citokina i povećane ekspresije defenzina [63].

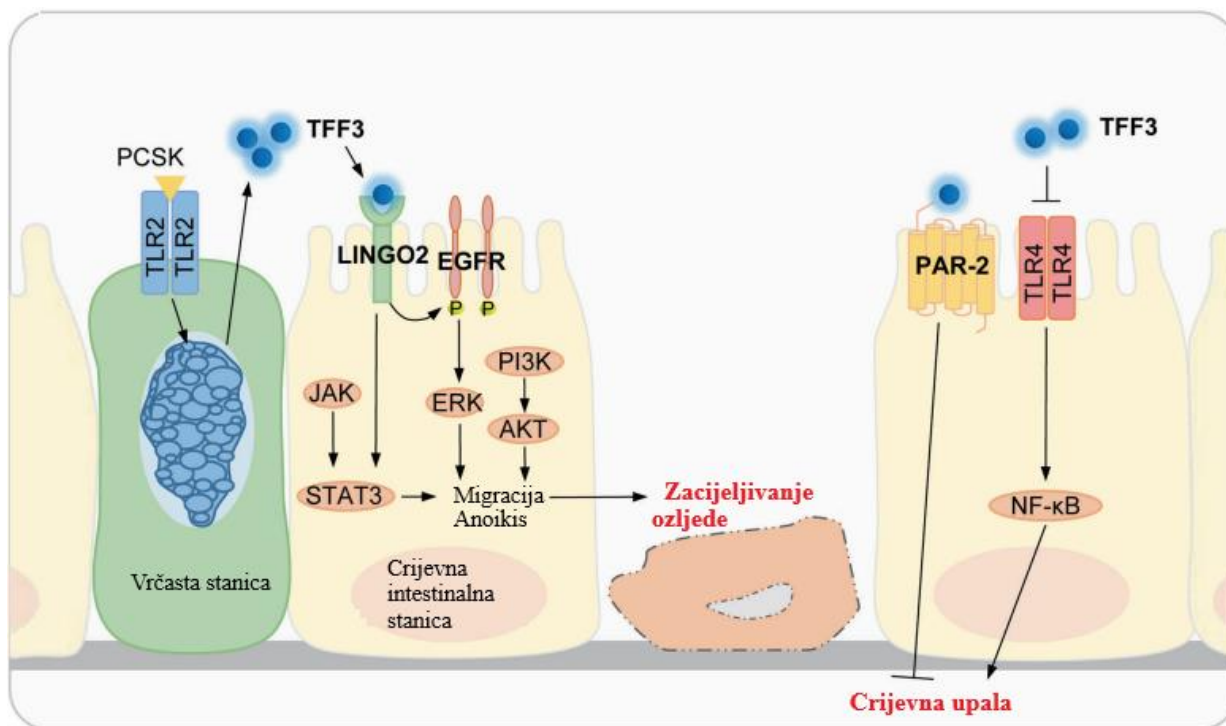
Nedavno je otkriven prvi klasični receptor TFF3 proteina, engl. *leucine-rich repeat receptor and nogo-interacting protein 2 (Lingo2)* čime je razjašnjen dio molekularnog mehanizma TFF3 uloge u crijevima [64]. Naime, TFF3 koji se izlučuje iz vrčastih stanica kolona se veže za Lingo2 i ta

interakcija uzrokuje narušavanje Egfr-Lingo2 kompleksa čime dolazi do aktivacije Egfr. Na taj način TFF3 vrši svoje funkcije u kontekstu zaštite epitela crijeva od ozljeda i parazitskih infekcija GI sustava. Najnoviji rad iz 2021. godine je identificirao novi receptor TFF3 proteina u stanicama kolorektalnog karcinoma o čemu će više biti pojašnjeno u poglavlju 1.1.2 [65].

Važno je naglasiti da funkcija TFF3 proteina ovisi i o njegovoj formi. U epitelnim stanicama kolona, TFF3 monomer, ali i dimer vode do povećane migracije stanica nakon ozljede, međutim dimerizacija je potrebna za njegovu anti-apoptotsku ulogu [11]. Osim same forme, dodatan faktor koji utječe na funkciju TFF3 proteina je i način primjene. Luminalna primjena TFF3 dimera uzrokuje značajno poboljšanje kolitisa kod štakora, dok TFF3 monomer nema utjecaj na ishod bolesti. Međutim, kod subkutane primjene TFF3, i monomer i dimer su imali pozitivan efekt na tijek kolitisa u štakorskom modelu, s time da je monomer u ovom slučaju pokazivao čak i veći učinak od samog dimera [66].

Brojna pretklinička istraživanja pokazuju terapijski potencijal TFF3 za liječenje bolesti GI sustava koje uključuju procese regeneracije epitela i sukladno tome postoji i nekoliko kliničkih istraživanja koji ispituju njegov učinak u tim procesima. Pacijentima oboljelim od ulcerativnog kolitisa su kroz 14 dana putem klistira davali TFF3 monomer, a doza koju su koristili je izračunata iz studije u kojoj je takva doza luminalnim putem pokazala protektivan učinak na mišje modele kolitisa [67]. Uz TFF3, pacijenti su oralno primali i mesazalin, već odobren lijek za ulcerativni kolitis. TFF3 nije pokazao dodatan pozitivan učinak i time istraživanje nije išlo u daljnje faze razvoja. Međutim, moguće je kako bi ishod studije bio različit da su korištene druge forme TFF3 proteina ili analizirani drukčiji puteve primjene. S obzirom na uočeni potencijal u pretklinici, dizajniranje daljnjih kliničkih studija koje ispituju TFF3 u ovome kontekstu bi moglo biti od značajne koristi za terapiju upalnih crijevnih bolesti.

Osim utjecaja na ulcerativni kolitis, ispitana je i primjena oralnog spreja s rekombinantnim TFF3 proteinom koja se pokazala sigurna i rezultirala značajnim smanjenjem incidencije i stupnja upale oralnih sluznica [68]. Ispitanici su pacijenti oboljeli od kolorektalnog karcinoma koji su primali kemoterapije čije su neželjene nuspojave upale oralnih sluznica koje narušavaju kvalitetu života, a mogu imati i negativan ishod na samo liječenje protiv raka budući da se mora limitirati doza terapije ako je stanje upale ozbiljnije.



Slika 2. Molekularni mehanizam djelovanja TFF3 u GI sustavu. Ligandi Tlr2, kao što je Pam3CysSK4, stimuliraju sekreciju TFF3 iz vrčastih stanica i TFF3 se može vezati na receptor Lingo2 čime povećava signalizaciju Egfr i posljedično pospješuje epitelnu migraciju i blokira *anoikis* (vrsta apoptoze koja se pokreće kada se stanica odvajaju od substrata) s ciljem zacjeljivanja ozljede. Nadalje, TFF3 suprimira crijevnu upalu preko Par-2 i Tlr4/NFκB signalnog puta. Prilagođeno i preuzeto prema [45].

Nazivi proteina na engleskom: Erk- extracellular signal-related kinase; PI3K -phosphatidylinositol 3-kinase; PCSK- Pam3CysSK4; Tlr- toll-like receptors; Lingo2- leucine-rich repeat receptor and nogo interacting protein 2; Egfr- epidermal growth factor receptor; Stat- signal transducer and activator of transcription; Par- protease-activated receptor; NF-κB- nuclear factor κB.

1.1.2. Trefoil faktor 3 u razvoju raka

Osim uloge u zaštiti epitela GI sustava i ispitivanja potencijalne terapijske primjene TFF3 u kontekstu patologija kao što su upalne crijevne bolesti, velik broj studija ukazuje i na važnost TFF3 u progresiji malignih bolesti. Ekspresija TFF3 je značajno povećana u raznim vrstama tumora u usporedbi s pripadajućim zdravim, nekancerogenim tkivima, primjerice rak želuca [69], rak debelog crijeva [70], rak pluća [71], hepatocelularni karcinom [72], rak endometrija [72], rak dojke [73], rak prostate [74] itd.

Kako je ranije navedeno, u zdravim epitelnim stanicama GI sustava, TFF3 potiče migraciju stanica i blokira apoptozu – funkcije koje su potrebne za popravak mjesta ozljede epitela. Međutim, kod malignih stanica, očuvanje tih svojstava može doprinositi 'agresivnijem' metastatskom fenotipu stanica i bržem rastu tumora. Zaista, klinički podaci ukazuju da povećana ekspresija TFF3 u različitim tumorima korelira s povećanim metastatskim potencijalom, slabijim preživljenjem i lošijom prognozom pacijenata [70,73,75–77]. Brojna istraživanja ukazuju kako uloga TFF3 proteina u procesu onkogeneze obuhvaća iste stanične procese (apoptoza, proliferacija, angiogeneza, migracija) kao i u kontekstu zaštite epitela [78], te istraživanja ukazuju kako TFF3 djeluje na ove procese tako što aktivira različite signalne puteve uključujući Mapk/Erk, p-13K, Stat3 i engl. *hypoxia inducible transcription factor -1 α* (Hif-1 α).

Primjerice, utišavanje TFF3 u stanicama raka prostate rezultira suprimiranim rastom tumora te vodi do povećane ekspresije mitohondrijskih proapoptoskih proteina, njihovog otpuštanje u citosol i aktivacije kaskade apoptoze ovisne o kaspazama [79]. Također, utišavanje TFF3 u stanicama papilarnog karcinoma štitnjače vodi do inhibicije Mapk/Erk signalnog puta i do značajnog smanjenja staničnog preživljenja [80], dok egzogeni tretman oralnih stanica s TFF3 značajno aktivira Erk put te pospješuje invaziju tumorskih stanica [81].

Tumorski rast i metastaziranje su ovisni o angiogenezi, kompleksnom procesu stvaranja novih krvnih žila [82]. Regulacija angiogeneze uključuje razne faktore među kojima je i engl. *vascular endothelial growth factor* (Vegf) koji potiče grananje i stvaranje novih ogranaka krvnih žila [83]. Nedostatak kisika (hipoksija) je rani signal za pokretanje procesa angiogeneze u tumorogenezi koji se aktivira stabilizacijom transkripcijskih čimbenika uključujući Hif-1 α [84]. Promotorska regija TFF3 sadrži vezno mjesto za Hif-1 α , a o njegovoj ekspresiji je ovisna pojačana ekspresija TFF3 do koje dolazi u uvjetima hipoksije [85,86]. Osim toga, pokazano je kako u stanicama raka želuca

TFF3 regulira ekspresiju Vegf induciranu hipoksijom te rezultati ukazuju na TFF3 kao potencijalnu metu terapija koje blokiraju angiogenezu i time rast tumora [87].

Osim što promotorska regija TFF3 sadrži vezno mjesto za Hif-1 α , sadrži i vezno mjesto za Stat3 [88]. Već je u različitim studijama otkriveno da inhibicija Stat3 sprječava proliferaciju, preživljenje i invaziju induciranu s TFF3 u staničnim linijama raka [75,89,90], ali nije bio poznat točan mehanizam. Novo istraživanje iz 2021. godine je identificiralo novi receptor TFF3 u epitelu tkiva kolorektalnog tumora i time je otkriven dio mehanizma kako TFF3 utječe na progresiju kolorektalnog karcinoma [65]. Nakon što se Tff3 veže za engl. *extracellular MMP inducer* (CD147), pospješuje se interakcija CD147 s engl. CD44 *antigen* (CD44) što rezultira aktivacijom Stat3 i povećanom ekspresijom engl. *prostaglandin G/H synthase 2* (Ptgs2). Pokazano je kako je ova signalizacija potrebna za staničnu pokretljivost, invaziju i proliferaciju koju pokreće TFF3 i time doprinosi progresiji kolorektalnog tumora. Tretmani s protutijelima koja specifično inhibiraju izvanstaničnu domenu CD147 koja veže TFF3 te inhibitori Ptgs2 vode do značajnog smanjenja plućnih metastaza *in vivo* čime su otkrivene potencijalne nove mete za prevenciju progresije kolorektalnog karcinoma [65].

Osim signalizacije TFF3-CD147 koja se javila kao potencijalna terapijska meta patentirana je i molekula AMPC [91], koja sprječava dimerizaciju TFF3 proteina, a kako je već napomenuto ustanovljeno je da je dimerizacija potrebna za njegovu proliferativnu i antiapoptotsku funkciju [11]. Mišje modele za proučavanje plućnog adenokarcinoma su tretirali s AMPC molekulom što je rezultiralo smanjenjem rasta tumora [92]. *In vitro* je potvrđeno kako farmakološka inhibicija dimerizacije TFF3 vodi do smanjenja u preživljenju stanica, proliferaciji i 3D rastu stanica plućnog adenokarcinoma. Mehanistički, TFF3 je u uočenim procesima aktivirao Mapk/Erk signalni put i povećao razinu engl. *serine/threonine-protein kinase A-Raf* (Araf) proteina. Isti učinak tretmana s AMPC molekulom koja inhibira dimerizaciju TFF3, je uočen i kod kororektalnog karcinoma i raka dojke [93,94].

1.2. Trefoil faktor 3 u metaboličkim procesima

Prva poveznica Tff3 s metabolizmom dolazi iz istraživanja poligenetskog mišjeg modela dijabetesa/pretilosti nazvanog TallyHo [95]. Uspoređivali su TallyHo model sa zdravim kontrolama i otkrili kako je ekspresija Tff3 gena u jetri drastično smanjena. Odnosno Tff3 je transkripcijski aktivan u jetrama zdravih C57BL/6J mišjih kontrola, dok kod modela dijabetesa/pretilosti praktički nestaje. Smanjenje ekspresije Tff3 je uočeno i kod drugih genskih mišjih modela debljine i dijabetesa (ob/ob, db/db) [96,97], u modelu jetrene steatoze [98] i kod mišjih modela dijabetesa uzrokovanog visokomasnom prehranom (engl. *diet induced obesity*, DIO) [96,97].

Različiti faktori mogu utjecati na ekspresiju TFF3. Primjerice, u epitelnim stanicama kolona, tretman inzulinom i glukozom vodi do njegove pojačane ekspresije [43]. Nadalje, unos hrane utječe na ekspresiju Tff3 u različitim dijelovima tankog crijeva. Preciznije, smanjena je ekspresije Tff3 kod miševa nakon hranjenja u usporedbi s miševima koji poste što je najvidljivije u tkivu jejunuma i ileuma [99]. Pokazano je kako galaktoza, ali i drugi ugljikohidrati (glukoza, sukroza), vode do brzog smanjenja ekspresije Tff3 u jetri, međutim lipidi ne pokazuju isti učinak [100].

Osim smanjenja ekspresije Tff3 u jetri mišjih modela dijabetesa i debljine (ob/ob, db/db, DIO) uočen je i njegov zaštitni učinak na simptome metaboličkog sindroma [96,97,99]. Preciznije, kada eksperimentalno vrate ekspresiju Tff3 pomoću adenovirusnih vektora dolazi do poboljšanja tolerancije na glukozu i inzulin u metaboličkim testovima i do smanjenja ekspresije gena uključenih u proces glukoneogeneze [96]. Osim miševa tretiranih adenovirusom (ob/ob, db/db, C57BL/6J-DIO), poboljšanje tolerancije na glukozu i smanjenje navedenih gena je uočeno i kod miševa (B6D2F1-DIO) kojima su intraperitonealno aplicirali rekombinantni TFF3 [99]. Međutim tretman s TFF3 nije vodio do razlika u tjelesnoj masi te u razini inzulina, triglicerida, kolesterola i leptina u serumu navedenih miševa. Primijećena je povećana pojava metaplazija tkiva želuca kod miševa tretiranih s TFF3 u usporedbi s netretiranim kontrolama, dok isto nije uočeno kod miševa s intraperitonealnom primjenom TFF3 proteina. U drugom istraživanju na istim mišjim modelima (ob/ob, db/db, C57BL/6J-DIO) otkriveno je da se Tff3 može vezati na engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (Ppara) i time povećati njegovu ekspresiju [97]. Ppara je transkripcijski faktor ključan za proces β oksidacije masnih kiselina u jetri [101]. Tretman s Tff3

rezultira povećanjem markera β oksidacije masnih kiselina u primarnim hepatocitima izoliranim iz spomenutih mišjih modela. *In vivo* je uočen isti učinak. Odnosno, kada se pomoću adenovirusa vrati ekspresija Tff3 u jetri, histološke analize jetre pokazuju smanjenje degeneracije stanica i manje lipidnih kapljica u usporedbi s kontrolnim miševima. Osim poboljšanja fenotipa masne jetre kod Tff3-tretiranih miševa, smanjeni su trigliceridi u serumu, povećan sadržaj ketona i povećana ekspresija markera β oksidacije masnih kiselina [97].

Nadalje, pokazano je kako engl. *UDP-glucose 4-epimerase* (Gale), ključni enzim u metabolizmu galaktoze koordinira ekspresiju Tff3 u jetri [100]. Odnosno miševi koji povećano ekspimiraju Gale u jetri pokazuju pogoršanu glukoznu homeostazu i osjetljivost na inzulin, a ekspresija Tff3 u jetri je smanjena. Miševi s utišanim Gale enzimom pokazuju suprotan učinak. Povratak ekspresije Tff3 pomoću adenovirusa u jetri *knockdown* Gale miševa je rezultirao poboljšanjem u homeostazi glukoze i osjetljivosti na inzulin, dok trigliceridi i jetreni enzimi u serumu nisu značajno promijenjeni.

Navedena istraživanja pokazuju smanjenje ekspresije Tff3 u jetri kod mišjih modela dijabetesa i pretilosti, a eksperimentalni povratak njegove ekspresije vodi do zaštitnog učinka na dio metaboličkih parametara. Stoga bi hipoteza bila da će miševi s nedostatkom Tff3 proteina ukazivati na znakove pogoršanog metaboličkog stanja organizma. Međutim, *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) miševi na standardnoj hrani, pokazuju bolju toleranciju na glukozu i inzulin u odnosu na odgovarajuće divlji tip kontrole [102]. Nadalje, u jetri im je povećana formacija malih lipidnih vezikula, koja na molekularnoj razini nije praćena povećanim oksidativnim stresom, a smanjena je razina proteina uključenih u metabolizam lipida (engl. *sirtuin 1*, Sirt-1 i engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, Ppar γ). Premda nije bilo značajnih promjena u razini triglicerida ni kolesterola u serumu, analiza masnih kiselina u jetri otkriva razlike između grupa. Preciznije, *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) miševi u usporedbi s divlji tip kontrolama pokazuju značajno povećanu razinu zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina, dok su jednostruko nezasićene masne kiseline u jetri značajno smanjene. Analiza masnih kiselina u adipoznom tkivu nije pokazala razlike između navedenih miševa. Nadalje, identificirane su promjene u 21 miRNA koje sudjeluju u regulaciji gena uključenih u put glikolize/glukoneogeneze u krvnim stanicama *Tff3*^{-/-} (Sv129/C57BL/6J) miševa [103]. Također, zabilježena je statistički smanjena masa ovih

miševa u usporedbi sa zdravim kontrolama. Nije naveden točan spol životinja, a za mjerenja su korištene 4 životinje stare 5 mjeseci i hranjene standardnom hranom.

Nedavni rezultate naše istraživačke grupe su pokazali kako novi kongenični *Tff3*^{-/-} (C57BL/6N) mišji model nakon dugotrajnog izlaganja visokomasnoj prehrani (8 mjeseci) pokazuje poboljšani fenotip masne jetre, odnosno smanjeno nakupljanje lipida, što je potvrđeno pomoću histoloških, ultrastrukturnih i engl. *high-performance liquid chromatography* (HPLC) analiza. Smanjena akumulacija masti je uočena kod *Tff3*^{-/-} životinja oba spola, iako kod mužjaka je učinak bio izraženiji, s time da su i mužjaci i ženke imali smanjenu ekspresiju Ppar γ u jetri [104].

Zadnjih godina sve više je prepoznata važnost utjecaja mikrobioma crijeva na različite bolesti, uključujući metaboličke bolesti te bolesti SŽS [105]. Ispitan je sastav mikrobioma duž GI trakta *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) miševa u usporedbi s divlji tip kontrolama, te je utvrđeno kako nedostatak Tff3 nema značajan utjecaj na relativnu raznolikost i broj bakterija [106].

Osim ekspresije u jetri, Tff3 je eksprimiran i u gušterači gdje je lokaliziran većinom u β stanicama Langerhansovih otočića koje luče inzulin, a manjim dijelom i u α stanicama koje luče glukagon i u stanicama koje luče pankreatični polipeptid [40]. Tretman s TFF3 je pospješio migraciju i adheziju neonatalnih štakorskih stanica otočića, dok na proliferaciju, apoptozu i sekreciju inzulina nije bilo učinka. Međutim, u drugom istraživanju na adultnim štakorskim i humanim stanicama otočića uočen je pozitivan učinak TFF3 na proliferaciju β stanica koji je posredovan signalizacijom Egfr [107]. Diskrepancija u rezultatima je moguće posljedica korištenja drukčijeg modela (neonatalne ili adultne stanice otočića) i/ili drukčijeg načina tretmana (unutarstanična ekspresija TFF3 pomoću adenovirusa ili egzogeni tretman s TFF3). Nadalje, uočen je utjecaj TFF3 na sazrijevanje β stanica (proces adhezije i migracije) tijekom perinatalnog perioda, a ekspresija Tff3 proteina je značajno smanjena u slučaju tretmana štakora s prehranom s niskim udjelom proteina tijekom gestacije, odnosno u slučaju stresa uzrokovanog malnutricijom [108]. Dakle, rezultati ukazuju kako bi TFF3 mogao imati ulogu u razvoju β stanica gušterače, iako točna uloga i mehanizmi nisu dovoljno istraženi.

Pokazano je kako oboljeli od Tip 1 dijabetesa imaju smanjenu razinu TFF3 u serumu za razliku od zdravih kontrola i kako se ta razina povećava nakon tretmana inzulinom [43]. Nadalje, kod pacijenata oboljelih od Tip 2 dijabetesa s komplikacijama kroničnog oštećenja bubrega, pronađena je značajno povećana razina TFF3 u serumu [109] i urinu [110].

1.3. Trefoil faktor 3 u središnjem živčanom sustavu

Prva detekcija Tff3 transkripta u mozgu sisavaca dolazi iz istraživanja neurona štakora gdje je pronađen predominantno u regijama hipotalamusa, ali slabiji signali su zabilježeni i u regijama amigdale i hipokampusa [111]. Nakon toga otkrivena je i njegova ekspresija u humanim neuronima hipotalamusa i endokrinim stanicama adenohipofize [112].

Još se nekoliko istraživanje detaljnije bavilo ekspresijom Tff3 u hipotalamus-hipofiza osi gdje je otkriveno da se najvećim dijelom nalazi u neuronima paraventrikularnih i supraoptičkih jezgri hipotalamusa gdje lokalizira s oksitocinom, ali ne i vazopresinom [113–115]. Pronađena je njegova prisutnost u posteriornom režnju hipofize odakle se prepostavlja da se vjerojatno otpušta u krvotok, a detektiran je i u cerebrospinalnoj tekućini postmortalnih uzoraka [114]. Od sistematičnijih istraživanja njegove ekspresije u mozgu izdvaja se [116] gdje je imunohistokemijskom detekcijom zabilježena prisutnost TFF3 u neuronima gotovo svih ispitanih regija ljudskog mozga (cerebralni korteks, hipokampus, amigdala, bazalni ganglij, talamus, mali mozak, moždano deblo i međumozak). Osim u odraslom mozgu, pronađen je i u prenatalnom moždanom tkivu kod ljudi [116], te u malom mozgu i cerebralnom korteksu mišjih embrija i mladunaca na postnatalni dan 25, što ukazuje i na moguću ulogu Tff3 u razvoju SŽS [117]. U ljudskom mozgu u astrocitima i mikroglijama nije zabilježena njegova prisutnost [116], međutim u štakorskim primarnim kortikalnim i hipokampalnim kulturama je pokazano kako kolokalizira sa specifičnim markerom mikroglija engl. *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1). Takav rezultat ukazuje na mogućnost da se Tff3 eksprimira u mikroglijama samo kada su one aktivirane kao što je slučaj u primarnim kulturama [118]. Pronađen je i unutar vezikula u primarnim kulturama astrocita gdje je pokazano da dolazi do njegove smanjene ekspresije u slučaju izazivanja upale s lipopolisaharidom. Također, tretman s Tff3 je rezultirao smanjenjem razinama proupalnih citokina u mikroglijama tretiranim lipopolisaharidom [119].

Nekoliko istraživanja je zabilježilo promijenjenu ekspresiju TFF3 kod različitih bolesti SŽS [41,44,120,121]. Preciznije, pronađena je pojačana genska ekspresija TFF3 u perifernim krvnim mononuklearnim stanicama kod pacijenata sa shizofrenijom u usporedbi sa zdravim kontrolama [120]. U krvi mišjeg soja koji se koristi kao model za proučavanje alkoholizma pronađena je

pojačana ekspresija Tff3 gena u usporedbi s divlji tip kontrolama [121]. U serumu pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti i vaskularnog parkinsonizma uočena je značajno smanjena razina TFF3 u serumu u usporedbi sa zdravim kontrolama koja korelira sa stupnjem progresije bolesti i povezanim simptomima kao što su motorička disfunkcija, smanjene kognitivnih funkcija, regulacija raspoloženja i poteškoće s GI simptomima [44]. U istom istraživanju su još ispitivali dva druga markera (engl. *cholinesterase activity*, ChE i engl. *homocysteine*, Hcy) i kombinacija mjerenja tih markera s TFF3 pokazuje potencijal da se koriste kao dijagnostički alat ovih bolesti.

Poveznica s Alzheimerovom bolesti dolazi iz istraživanja u kojem je analizirana cerebrospinalna tekućina 287 uzoraka (Alzheimer pacijenata i zdravih kontrola) i panel relevantnih upalnih i metaboličkih markera je koreliran s pacijentovim nalazima magnetne rezonance [41]. Rezultati su pokazali smanjenu razinu TFF3 proteina u cerebrospinalnoj tekućini Alzheimer pacijenata koja je korelirala s povećanjem atrofije cijelog mozga, hipokampusa i proširenja ventrikula. TFF3 se u toj analizi pokazao kao najsnažniji marker u predviđanju atrofije mozga (neurodegeneracije). Osim te poveznice, zanimljivo je da postoji i patent koji mjeri razine TFF3 u periferiji (krv/urin/feces) i koristi se kao mjera za praćenje engl. *neurogenic locus notch homolog* (Notch) povezanih nuspojava u kliničkim ispitivanjima inhibitora gamma-sekretaze u liječenju Alzheimerove bolesti [122].

Pokazan je i njegov farmakološki učinak na različite procese u SŽS-u; učenje i pamćenje, depresiju, strah i ovisnost [123–128]. Na štakorima kojima je bilateralno injiciran TFF3 monomer u bazolateralne jezgre amigdale su provedeni testovi ponašanja te je u slučaju niske doze TFF3 uočen anksiolitički učinak, dok je kod visokih doza pokazan anksiogeni učinak u odnosu na kontrolne životinje [124]. U drugom istraživanju je miševima intraperitonealno injiciran rekombinantni TFF3 protein pola sata prije izvođenja testova za ispitivanje učenja i pamćenja [123]. Miševi tretirani TFF3 proteinom su imali statistički značajno bolje rezultate od ne-tretiranih kontrola u navedenim testovima što ukazuje da intraperitonealna aplikacija TFF3 proteina može voditi do poboljšanja sposobnosti učenja i pamćenja kod miševa.

Nadalje, intraperitonealna primjena TFF3 je rezultirala antidepresivnim učinkom kod miševa i štakora koji su podvrgnuti testovima ponašanja koji ispituju relevantne simptome depresije [126]. Učinak TFF3 je bio ovisan o dozi, odnosno raspon doze od 0.1 mg/kg do 1.0 mg/kg je pospješio simptome depresije, dok doze niže od 0.01 mg/kg i više od 2.0 mg/kg nisu imale statistički

značajan utjecaj. Molekularne analize su utvrdile povećanje razine Tff3 u bazolateralnoj amigdali 30 minuta nakon intraperitonealne primjene što ukazuje na mogućnost da Tff3 prelazi krvno-moždanu barijeru. Bazolateralna amigdala je regija koja se često proučava u neuropsihijatrijskim poremećajima jer je između ostalog relevantna za regulaciju raspoloženja [129]. Štakori izloženi kroničnim blagim stresorima (engl. *chronic mild stressor model*, CMS) imaju smanjene razine Tff3 u bazolateralnoj amigdali, a akutna aplikacija TFF3 vodi do smanjenja depresivnih ponašanja uzrokovanih CMS tretmanom. Inhibicija aktivnosti pi3K blokira antidepresivni efekt induciran tretmanom s TFF3. Antidepresivni učinak Tff3 je uočen i na drukčijem modelu; štakori kojima je uklonjen olfaktorni bulbus se koriste kao model za proučavanje depresivnih stanja budući da uklanjanje olfaktornog bulbosa uzrokuje čitav niz bihevioralnih, psiholoških i biokemijskih promjena koje su usporedive sa simptomima depresije kod ljudi [125]. Takvi štakori su primali intraperitonealno TFF3 kroz period od 7 dana što je rezultiralo značajnim poboljšanjem simptoma depresije. Također, uklanjanje olfaktornog bulbosa vodi do smanjenja razine engl. *brain-derived neurotrophic factor* (Bdnf), engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (Erk1/2) i engl. *phosphorylated cAMP response element-binding protein* (pCreb) u CA3 regiji hipokampusa, a tretman s TFF3 normalizira razine istih. Korištenjem specifičnih inhibitora, pokazano je kako je uočeni antidepresivni učinak kod štakora tretiranih s TFF3, ovisan o Bdnf. Nadalje, antidepresivni učinak TFF3 proteina kod životinjskih modela depresije je ponovno zabiježen u istraživanju u kojem su koristili novi pristup negativno nabijenih nanočestica liposoma koje služe kao vektor za uspješniju distribuciju lijeka u SZS [128].

Osim depresije, uočen je i njegov učinak na simptome odvikavanja [127]. Korišten je mišji model ovisan o morfiju kojima se injicira antagonist opioidnih receptora i time se eksperimentalno induciraju fizička obilježja prekida uzimanja droga kao što je tremor, gubitak na težini, proljev itd. Sistemska, odnosno interperitonealna primjena TFF3 proteina je značajno olakšala simptome odvikavanja kod ovog modela te je vodila do smanjene aktivacije osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde, koja je inače hiperaktivna u tim stanjima.

Kada je prvi put opisan *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) mišji model, navedeno je da ne pokazuje nikakve očite neurološke smetnje ili probleme u razvoju i kako se morfološki ne razlikuje od odgovarajućih divlji tip kontrola [46]. Kasnije je otkriveno da pokazuju znakove ubrzanog gubitka sluha pri starenju iako morfološki nisu primijećene razlike između srednjeg uha *Tff3*^{-/-} miševa i

divlji tip kontrola [130], a zabilježen je i nalaz da imaju manje morfološke promjene u malom mozgu koje utječu na motoričke funkcije [131]. Tff3 je prisutan u neuronima pužnice, a potraga za specifičnim interaktivnim partnerom je ukazala na protein engl. *Y2H-HLA-B-associated transcript 3* (Bat3) koji ima ulogu u regulaciji apoptoze inducirane stresom endoplazmatskog retikuluma [132].

Osim što se sintetizira u mozgu, pokazano je kako Tff3 iz jetre može cirkulacijom doći do ozlijeđenog tkiva mozga gdje ima zaštitnu ulogu [133]. Par dana nakon eksperimentalnog izazivanja moždanog udara u mišjem modelu, ekspresija Tff3 proteina u jetri je povećana. Pokazano je kako se iz jetre otpušta u cirkulaciju, može proći krvno-moždanu barijeru i nakupljati se u točno u ozlijeđenom dijelu mozga. Nakon ozljede moždanog tkiva povećana je smrtnost neurona kod *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) miševa u usporedbi s divlji tip kontrolama, a unos rekombinantnog TFF3 proteina rezultira smanjenjem apoptoze i aktivnosti kaspaze 3 u mozgu. Značajno veći stupanj ozljede mozga u usporedbi s divlji tip kontrolama je pokazan i kod novo-razvijenog kongeničnog *Tff3*^{-/-} (C57BL/6N) mišjeg soja nakon eksperimentalnog induciranja moždanog udara u usporedbi s divlji tip kontrolama [134].

1.4. *Tff3* knock out mišji model

Prvi *Tff3* knock-out mišji model je generiran 1996. godine na miješanoj genskoj podlozi (*Tff3*^{-/-} C57BL/6J/Sv129) [46]. Genetičkom manipulacijom inaktiviran je egzon 2 koji kodira većinu *trefoil* domene Tff3 proteina i time je razvijen mišji model s nefunkcionalnim Tff3 proteinom. Povijesno gledano, većina *knock-out* modela se razvijala na miješanim genskim pozadinama zbog lakše tehničke izvedbe [135]. Primjerice, korištene su embrionalne stanice Sv129 soja koje su robusne i time lakše za genetičku manipulaciju, a potom su se injicirale u blastociste C57BL/6 miševa jer takve hibridne jedinice imaju veću reproduktivnu moć i time je olakšan uzgoj i provođenje eksperimenata.

Problematika korištenja životinja s miješanim genskim pozadinama je veća genska heterogenost, veća mogućnost nastanka i fiksiranja neželjenih mutacija te je kompleksnije osigurati odgovarajuće kontrolne životinje [135–137]. Sve navedeno smanjuje preciznost razlučivanja točnog uzroka uočenog fenotipa u eksperimentima. Zbog toga je u sklopu ovog doktorskog

istraživanja razvijen novi kongenični *Tff3 knock out* mišji model na C57BL/6N podlozi kako je opisano u poglavljima 3.1. i 4.1. Novi kogenični soj je homozigot na svim lokusima i od C57BL/6N divlji tip kontrola se razlikuje samo u inaktivaciji Tff3 proteina i u malom okolnom fragmentu naslijeđenom iz embrionalnih stanica Sv129 soja.

Osim toga, C57BL/6 miševi koji se najčešće koriste u biomedicinskim istraživanjima uključuju više od 20 podtipova miševa, svaki sa svojim specifičnim mutacijama koje onda mogu utjecati na ishod studije [138]. C57BL/6J podtip na kojem je zasnovan *Tff3*^{-/-} *knock out* miješane genske podloge ima veći broj poznatih mutacija od C57BL/6N podtipa na kojemu je zasnovan novi kongenični soj, među kojima su i metabolički relevantne mutacije kao što je delecija engl. *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt)* gena [139]. *Nnt* kodira za enzim koji se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija, ima funkciju protonske pumpe, katalizira reakciju engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*⁺ (NADH⁺) u engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) koja osigurava redukcijsku energiju za detoksifikaciju reaktivnih kisikovih vrsta što je nužno za efikasnu sintezu adenozin trifosfata [140]. Smatra se kako je nefunkcionalni *Nnt* razlog zašto C57BL/6J miševi pokazuju pogoršanu toleranciju na glukozu i sekreciju inzulina u usporedbi s C57BL/6N miševima na standardnoj hrani [140,141]. Nekoliko istraživanja je uspoređivalo različite metaboličke parametre navedena dva podtipa i nakon tretmana visokomasnom hranom [142–146]. Studije pokazuju različite rezultate, a međusobne usporedbe su otežane zbog drukčijeg dizajna eksperimenata i parametara koji mogu utjecati na ishod metaboličkih studija. Generalni zaključak ovih istraživanja je da su oba podtipa podložna pretilosti i razvijanju znakova metaboličkog sindroma uslijed tretmana visokomasnom hranom i kako mutacija *Nnt* gena nije jedini razlog drukčijeg metaboličkog odgovora kod ovih mišjih modela. Međutim, smatra se kako je podtip C57BL/6N koji ima funkcionalni *Nnt* reprezentativniji model za studije metaboličkih procesa i metaboličkih bolesti s ciljem translacije u humane modele budući da ljudi također ekspimiraju funkcionalan *Nnt* [144].

1.5. Modeliranje patoloških procesa visokomasnom hranom

Tretman visokomasnom hranom se standardno koristi za izazivanje simptoma metaboličkog sindroma kod životinjskih modela, uključujući debljinu, fenotip masne jetre, pogoršanu homeostaze glukoze, inzulina i metabolizma lipida [147]. Također, takav nutritivan stres aktivira i niz promjena u SŽS među kojima su i inhibicija adultne neurogeneze, neuroinflamacija, oštećenja neurona i pogoršanje kognitivnih funkcija [148–150]. Navedene promjene su poznate značajke metaboličkih poremećaja kao što je primjerice Tip 2 dijabetes, kao i neurodegenerativnih poremećaja, uključujući Alzheimerovu bolest. Ove kompleksne bolesti su rastući globalni javnozdravstveni problem, a posljednjih godina se sve više akumuliraju nalazi kako dijele brojna zajednička obilježja [151,152]. Primjerice, epidemiološke studije pokazuju jasnu vezu između dijabetesa i demencija [153], a oslikavanje mozga pacijenata oboljelih od Tip 2 dijabetesa pokazuje atrofiju mozga u regijama koje su također najpodložnije oštećenjima u ranim fazama Alzheimerove bolesti [154]. Nadalje, u mozgu pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti narušena je energetska homeostaza, metabolizam glukoze i inzulinsko signaliziranje [155], te obje bolesti povezuju patofiziološki procesi kao što su stres endoplazmatskog retikuluma, oksidativni stres i kronična upala [156]. Pokazano je kako je dugotrajno izlaganje visokomasnoj hrani dovoljno za pojavu uznapredovalih obilježja Alzheimerove bolesti kod mišjeg modela divljeg tipa, kao što su amiloidni plakovi u mozgu [148]. Međutim, pokazano je kako je već i kratkotrajna izloženost takvom obliku nutritivnog stresa dovoljna za aktivaciju patoloških mehanizama obje bolesti (pogoršano metaboličko stanje, pogoršane kognitivne funkcije, smanjena neurogeneza) [149,157–160]. Visokokalorijska prehrana s visokim udjelom zasićenih masti vodi do različitih neurofizioloških promjena koje direktno ili indirektno utječu na integritet regije hipokampus [161]. Hipokampus je regija ključna za regulaciju procesa učenja i pamćenja te je među regijama mozga najpodložnijim oštećenjima u ranim fazama Alzheimerove bolesti [162]. Osim toga, pokazano je kako se u subgranularnoj zoni dentatnog girusa u hipokampusu odraslih sisavaca odvija proces adultne neurogeneze [163]. Dugo vremena se smatralo kako su svi neuroni u mozgu sisavaca generirani tijekom perinatalne i rane postnatalne faze te kako ne postoji mogućnost stvaranja novih neurona u adultnom periodu, odnosno kako odrasli mozak nema sposobnost stvaranja novih neurona. Međutim, 1962. je prvi put zabilježena pojava neurogeneze i u mozgu odraslih štakora čime se otvorilo novo područje istraživanja u neuroznanosti [164,165]. Nakon

prvotnog otkrića dugi niz godina postojale su kontroverze i debate oko postojanja adultne neurogeneze. Ipak napretkom tehnologije i metodologije za praćenje tog procesa, danas je prihvaćeno znanje da u mozgu odraslih sisavaca postoje neurogene niše u kojima se kontinuirano generiraju novi neuroni koji se zatim integriraju u postojeće neuralne mreže gdje imaju ulogu u različitim fiziološkim procesima, uključujući pamćenje i regulaciju raspoloženja [166]. Osim dentatnog girusa hipokampusa, adultna neurogeneza je najviše opisana i proučavana u subventrikalnoj zoni lateralnog ventrikula, međutim novija istraživanja ukazuju i na mogućnost postojanja drugih neurogenih niša u mozgu [167]. Proces adultne neurogeneze može biti moduliran različitim intrinzičnim i ekstrinzičnim čimbenicima. Primjerice, pokazan je negativan utjecaj aktivacije osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde uslijed kroničnog stresa i negativan utjecaj proupalnih faktora i starenja, dok kalorijska restrikcija i fizička aktivnost pospješuju neurogene procese [168]. Važan faktor u regulaciji adultne neurogeneze je i utjecaj prehrane. Naime, brojne studije ukazuju na štetan učinak visokokalorijske masne hrane na proces stvaranja novih neurona, a pokazano je kako već kratkotrajni tretman visokomasnom hranom rezultira značajnim smanjenjem razine adultne neurogeneze u odnosu na kontrole hranjene standardnom hranom [149,158,169]. Disfunkcije u procesima adultne neurogeneze u subgranularnoj zoni dentatnog girusa su uočene u brojnim istraživanjima na životinjskim modelima Alzheimerove bolesti [170]. Također, utvrđeno je kako je u hipokampusu oboljelih od Alzheimerove bolesti značajno niža razina markera nezrelih neurona (engl. *Doublecortin*, *Dcx*) u usporedbi s neurološki zdravim pojedincima [171]. Iako razina *Dcx*⁺ stanica značajno opada starenjem i kod neurološki zdravih osoba, pokazalo se kako je konzistentno značajno veća nego kod pacijenata s Alzheimerovom bolešću, neovisno o njihovoj dobi. U istom istraživanju su uočili smanjenje *Dcx*⁺ stanica već u ranim fazama bolesti prije formiranja amiloidnih plakova u mozgu, što je u skladu s istraživanjem na životinjskim modelima Alzheimerove bolesti gdje je uočena narušena neurogeneza već u presimptomatskom stadiju bolesti [172]. Čini se kako je uz gubitak i oštećenja postojećih neurona, u neurodegenerativnim bolestima narušen i endogeni kapacitet za stvaranje novih neurona. Osim utjecaja visokomasne hrane na procese adultne neurogeneze, također je pokazano kako tretman s visokomasnom hranom rezultira povećanom upalom u hipokampusu koja posljedično vodi do disfunkcije različitih procesa [160]. Narušena sposobnost stvaranja novih neurona te neuroinflamacija su relevantne značajke patologije neurodegenerativnih bolesti uključujući Alzheimerovu bolest koje se istražuju kao potencijalne mete za pronalaz učinkovitijih

terapijskih rješenja [173]. S obzirom na navedeno, tretman visokomasnom hranom je dragocjen eksperimentalni alat za aktivaciju i proučavanje patoloških procesa metaboličkih i neurodegenerativnih bolesti s ciljem boljeg razumijevanja njihovih poveznica i patogeneze.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Tff3 protein je najviše proučavan u kontekstu zaštite epitela probavnog sustava i u razvoju raka, no novija istraživanja ukazuju i na potencijalno relevantnu ulogu u metabolizmu te u neurodegenerativnim bolestima. Međutim to je još uvijek novo i nedovoljno istraženo područje te se ukazuje potreba za sistematičnim istraživanjima u svrhu otkrivanja njegove funkcije u ovim kompleksnim poremećajima. Stoga je glavni cilj ovog doktorskog rada ispitati učinak nedostatka Tff3 proteina na jetru i hipokampus mišjih modela u metabolički relevantnim uvjetima (visokomasna prehrana). Tretman visokokalorijskom masnom hranom se standardno koristi za izazivanje debljine i fenotipa Tip 2 dijabetesa kod životinjskih modela, međutim uzrokuje i niz neurofizioloških promjena koje direktno ili indirektno utječu na integritet hipokampusa. Već je kratkotrajno izlaganje visokomasnoj hrani dovoljno za aktivaciju patoloških procesa metaboličkih bolesti kao što je Tip 2 dijabetes i neurodegenerativnih poremećaja kao što je Alzheimerova bolest. Ove kompleksne bolesti su među najvažnijim javno-zdravstvenim problemima današnjice i smatra se kako bi rana intervencija, odnosno potraga za terapijskim metama u ranim fazama bolesti prije pojave uznapredovalih simptoma bolesti mogla biti ključna za uspješni pronalazak djelotvornih lijekova. S obzirom na navedeno, odabran je tretman kratkotrajne visokomasne hrane jer je cilj ispitati postoje li promjene u fenotipu uzrokovane nedostatkom Tff3 proteina već u ranim fazama aktivacije značajki metaboličkih/neurodegenerativnih poremećaja.

Dakle, za ostvarenje glavnog cilja usmjeriti ćemo se na sljedeće pojedinačne ciljeve:

- Razvoj novog kongeničnog soja iz već postojećeg *Tff3*^{-/-} soja miješanog genskog porijekla na novoj genskoj podlozi (C57BL/6N) bez dodatnih metabolički relevantnih mutacija.

Razlog razvoja novog kongeničnog soja je smanjenje genske heterogenosti miševa što podrazumijeva veću sigurnost da je uočeni fenotip posljedica nedostatka Tff3 proteina. Generiranje takvog novog soja će predstavljati važan model za proučavanje uloge Tff3 proteina, posebice u istraživanjima u području metaboličkih procesa.

- Izlaganje novih kongeničnih *Tff3*^{-/-} C57BL/6N miševa i odgovarajućih divlji tip kontrola kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom te ispitivanje učinka nedostatka Tff3 na

metabolički status životinja te na relevantne patofiziološke puteve u tkivu jetre i tkivu hipokampusa.

Izlaganje miševa visokomasnoj hrani aktivirati će neke od značajki metaboličkih/neurodegenerativnih poremećaja kao što je narušena metabolička homeostaza, nakupljanje masti u jetri, narušen integritet hipokampusa i istraživanja će se usmjeriti na ispitivanje učinka nedostatka Tff3 u tim procesima. Dakle, cilj je ispitati postoje li razlike u fenotipu uzrokovane nedostatkom Tff3 proteina, a analize će se fokusirati na jetru kao glavni metabolički organ, te hipokampus, regiju podložnu oštećenjima u ranim stadijima Alzheimerove bolesti i poznatu neurogenerativnu nišu u kojoj se tijekom odraslog života stvaraju novi neuroni.

- Cilj je ispitati fenotip oba spola novo razvijenog *Tff3*^{-/-} mišjeg modela budući da je poznato kako je metabolička homeostaza različito regulirana s obzirom na spol te je sve veća svjesnost o važnosti uključivanja oba spola u biomedicinskim istraživanjima.

Budući da je u literaturi naveden zaštićen utjecaj Tff3 na metaboličke značajke, pretpostavka je da će *Tff3*^{-/-} miševi nakon izlaganja visokomasnoj hrani imati pogoršani metabolički fenotip. Međutim, postoje i istraživanja koja ukazuju na mogući štetan učinak na metaboličke značajke pa postoji mogućnost kako će nedostatak Tff3 proteina utjecati povoljno na metabolički fenotip. S obzirom da je pokazano kako u epitelnim stanicama crijeva Tff3 može pospješiti migraciju, a migracija je jedan od ključnih procesa kod sazrijevanja novih neurona, pretpostavka je kako će *Tff3*^{-/-} miševi nakon izlaganja visokomasnoj hrani imati narušen integritet hipokampusa u vidu smanjenja razina adultne neurogeneze.

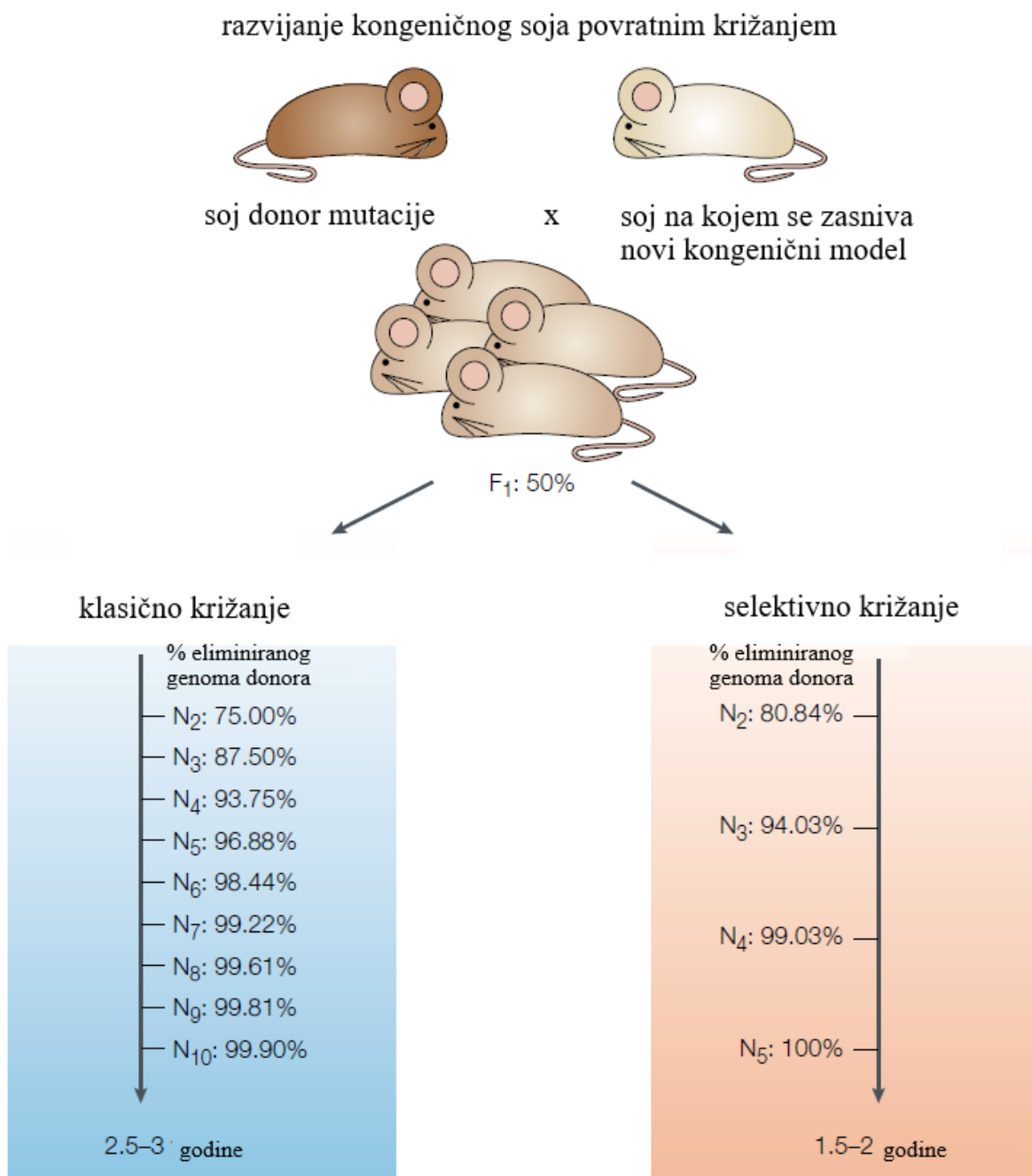
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Razvoj novog *Tff3 knock out* kongeničnog miša na C57BL/6N genskoj podlozi

U sklopu ovog doktorskog rada razvijen je novi srođeni kongenični *Tff3*^{-/-} mišji soj iz već postojećeg *Tff3*^{-/-} soja miješanog porijekla (C57BL/6J/Sv129). Problematika sojeva miješanog porijekla i korištenja različitih podtipova je objašnjena u poglavlju 1.4. Postupak uspostave novog *Tff3*^{-/-} kongeničnog soja na C57BL/6N podlozi je započeo prvim križanjima mužjaka *Tff3*^{-/-} C57BL/6J/Sv129 (donor *knock out* mutacije) sa ženkama C57BL/6N soja. Na taj način dobiveni su početni heterozigoti (F0) generacija. U sljedećoj (F1) generaciji križani su sa ženkama C57BL/6N jer je to željena genetička podloga za novi kongenični *Tff3*^{-/-} model. Klasičnim pristupom je potrebno minimalno 10 generacija križanja kako bi prenijeli specifičnu mutaciju na željenu genetičku podlogu. Međutim, korišten je pristup brze kongenike (engl. *Speed congenics*) gdje je uz praćenje soj specifičnih genetičkih markera to isto postignuto dvostruko brže (Slika 3). Ukratko, uzorci repića su poslani na analizu u tvrtku Envigo gdje je takva usluga komercijalno dostupna [174] i analizom jednonukleotidnih polimorfizama na ~500 genetičkih lokusa odabrani su mužjaci heterozigoti s najvećom genetičkom sličnosti s C57BL/6N sojem. Nakon 5 generacija, zadnja križanja su postavljena po principu brat x sestra heterozigoti iz čijih okota su genetopizacijom identificirani homozigoti, odnosno novo-razvijeni *Tff3*^{-/-} soj na C57BL/6N podlozi.

3.1.1. Uzgoj životinja

Uzgoj miševa se odvijao u Pogonu za laboratorijske životinje Instituta Ruđer Bošković, te su se svi postupci provodili u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17, 32/19) i Pravilnikom o zaštiti životinja koji se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13, 39/17, 116/19). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Instituta Ruđer Bošković te od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa: UP/I-322-01 /19-01 /14 RN: 525-10/0255-19-3 Zagreb, 5. 7. 2019 i klasa: UP/I-322-01/16-01/81, RN: 525-10/0543-21-6 Zagreb, 18.2. 2021). Miševi su uzgajani u ciklusima dan/noć u trajanju od 12 sati, uz prisutnost standardne ili visokomasne prehrane ovisno o tretmanu, te vode *ad libitum*.



Slika 3. Prikaz i usporedba klasičnog i selektivnog križanja kao dva pristupa razvijanja novog kongeničnog mišjeg soja. Statistički izračuni ukazuju kako je u prosjeku klasičnim pristupom potrebno oko 10 generacija križanja da se eliminiira genomski materijal soja donora mutacije, dok je selektivnim križanjem gdje se odabiru ‘genski najsličniji’ životinje u svakoj generaciji potrebno oko 5. Preuzeto i prilagođeno prema [137].

3.1.2. Genotipizacija miševa

3.1.2.1. Izolacija DNA iz tkiva

Životinje su označene bušenjem uški i uzet im je uzorak tkiva repa za izolaciju DNA. Uzorak je liziran u 400 μ L pufera za lizu (0,1M Tris –pH 8,0, 0,2M NaCl, 5mM EDTA, 0,4% SDS) i proteinaze K u konačnoj koncentraciji 0,2mg/mL. Zatim su uzorci inkubirani preko noći u termobloku (Eppendorf ThermoMixer® C) pri 55 °C, pa je nakon centrifugiranja supernatant prebačen u novu tubicu. Dodano je 400 μ L propan-2-ola i uzorak je inkubiran 5 minuta kako bi DNA precipitirala. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani, supernatant je uklonjen i dodano je 1ml 70% etanola. Ponovno su centrifugirani uzorci te je uklonjen supernatant, nakon čega je talog sušen na zraku kako bi isparili ostaci etanola. Na svaki talog dodano je 100 μ L 1xTE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, deH₂O- pH 7,6). Vorteksiranjem i pipetiranjem odlijepljen je talog od stijenki tubica te je zagrijan u termobloku na 55°C kako bi se sva DNA ravnomjerno otopila u 1xTE puferu. Koncentracije su izmjerene spektrofotometrom (NanoPhotometer, Implemen GmbH, Njemačka) i DNA je razrijeđena u 1xTE puferu do konačne koncentracije 50ng/ μ L koja je korištena za daljnju analizu.

3.1.2.2. Umnažanje DNA - Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za detekciju genotipa korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Postavljene su dvije reakcijske smjese čiji je sastav prikazan u Tablici 1. Jedna reakcijska smjesa je sadržavala početnice za detekciju alela divljeg tipa, a druga za alel *knock-out* Tff3 mišjeg modela (Tablica 2). Početnice za identifikaciju *Tff3 knock out* miševa su dizajnirane tako da detektiraju jedan produkt (500pb) prisutan samo kod miševa s delecijom Tff3 gena, dok početnice za detekciju divlji tip miševa obuhvaćaju produkt od 300pb prisutan kod miševa s funkcionalnim Tff3 genom. Kod heterozigotnih miševa na gelu će biti vidljiva oba produkta (300pb i 500pb) jer oni posjeduju oba alela (za divlji tip i za Tff3 *knock out* mišji model). PCR se odvijao u uređaju Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema programu navedenom u Tablici 3.

Tablica 1. Sastav PCR reakcijskih smjesa za jedan uzorak

Reakcijska PCR smjesa za divlji tip <i>Tff3</i> alel		Reakcijska PCR smjesa za <i>knock-out</i> <i>Tff3</i> alel	
Volumen μL		Volumen μL	
1.5mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich, SAD)	1,5	3mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich, SAD)	2,5
10xM PCR pufer (800mM KCl, 100mM Tris-HCL, pH 8.3)	2,5	10xM PCR pufer (800mM KCl, 100mM Tris-HCL, pH 8.3)	3
2,5mM dNTP (Carl Roth, GmbH, Njemačka)	1	2,5mM dNTP (Carl Roth, GmbH, Njemačka)	1
Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, SAD)	1	Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich, SAD)	1
5 μM početnice divlji tip	1	5 μM početnice <i>knock-out</i>	1
mQH ₂ O	17	mQH ₂ O	15,5
50ng/ μL DNA	1	50ng/ μL DNA	1
Konačni volumen	25	Konačni volumen	25

Tablica 2. Početnice korištene za genotipizaciju *Tff3*^{-/-} miševa

Početnica (oznaka)	Sekvenca 5' → 3'
Divlji tip (WT F)	GCAGTGTAAACAACCGTGG
Divlji tip (WT R)	TGACCCTGTGTCATCACCCCTGGC
<i>Tff3 knock out</i> (KO F)	CGGCTGCTCTGATGCCGCC
<i>Tff3 knock out</i> (KO R)	GCCGGCCACAGTCGATGAATCC

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije

Faza	Temperatura	Trajanje
Početna denaturacija	95°C	15 min
Denaturacija	94°C	1 min*
Lijepljenje početnica	57°C /66°C ×	45 sec*
Produljivanje lanaca	72°C	1 min*
Završna polimerizacija	72°C	5 min

× Temperatura lijepljenja početnica je 57°C za reakcijsku smjesu divlji tip, a 66°C za reakcijsku smjesu *Tff3 knock out* * Broj ciklusa denaturacije, lijepljenja početnica i produljivanja lanaca je 30

3.1.1.3. Vizualizacija umnoženih PCR produkata na gelu

Za razdvajanje PCR produkata i njihovu vizualizaciju korišten je agarozni gel i elektroforeza. Pripremljen je 1,5 % agarozni gel : otopljena je agarozna (Sigma Aldrich, SAD) u 1xTAE puferu (40mM Tris baza, 20mM octena kiselina). U PCR produkte je dodana boja za vizualizaciju (*Bromphenol Blue*, Sigma Aldrich, SAD). Elektroforeza se odvijala u puferu 1xTAE, pod stalnim naponom od 100V tijekom 30 minuta u uređaju za horizontalnu elektroforezu (BioRad, SAD). Gel je obojan u otopini Etidij Bromid boje (10mg/ml, Promega, UK) (u omjeru: 20 μ L *stock* Etidij bromid u 1L 1xTAE pufera). Razdvojeni PCR produkti vizualizirani su u Gbox EF Gel (Syngene, UK) uređaju pomoću programskog softvera *GeneSnap from SynGene*. Za određivanje veličine PCR produkta korišten je marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Scientific, SAD).

3.2. Model kratkotrajne visokomasne prehrane

Novi kongenični *Tff3*^{-/-} C57BL/6N soj i odgovarajuće divlji tip C57BL/6N kontrole oba spola su s 11 tjedana starosti podvrgnute tretmanu visokomasne hrane (58% masti - izvor: svinjska mast, hidrogenizirano palmino i sojino ulje, 24% ugljikohidrati, 18% proteini, Mucedola, Italija) kroz vremenski period od 9 tjedana. Dodatno, kontrolne grupe životinja su hranjene standardnom hranom (11.4% masti, 62,8% ugljikohidrati, 25,8% proteini, 4RF21, Mucedola, Italija) kroz period od 20 tjedana prije žrtvovanja. Svaka grupa se sastojala od 10 životinja.

3.3. Metabolički testovi

Provođeni su metabolički testovi (testovi tolerancije na glukozu i inzulin) po standardiziranim protokolima. Prvi testovi su provedeni prije tretmana visokomasne prehrane, dakle na životinjama hranjenim standardnom prehranom s 9 tjedana starosti. Nakon toga intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) je rađen na životinjama starim 17 tjedana, nakon 6 tjedana tretmana visokomasnom hranom, a intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) je rađen na životinjama starim 18 tjedana, nakon 7 tjedana tretmana. Životinje su vagane neposredno prije testova kako bi se primjenila odgovarajuća doza glukoze ili inzulina.

3.3.1. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT)

IPGTT je provođen prema protokolu *International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens* [175] na životinjama starim 9 tjedana (kontrola: standardna hrana) i 17 tjedana (tretman: 6 tjedana visokomasne hrane). Prije testa, miševi su postili 16 sati u vremenskom periodu od 18h do 10h. Intraperitonealno je injicirano 2g/kg glukoze (*D(+)-Glucose*, CELLPURE®, Carl Roth GmbH, Njemačka) koja je prethodno otopljena u sterilnom 1xPBS-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Nakon injiciranja, glukometrom (Accu-Chek® Performa, Roche, Švicarska) je mjerena glukozu u krvi iz vrška repa u zadanim vremenskim intervalima (15, 30, 60 i 120 minuta nakon aplikacije glukoze), s time da je prvo mjerenje obavljeno netom prije injiciranja glukoze.

3.3.2. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT)

IPITT je provođen prema protokolu *National Mouse Metabolic Phenotyping Centra* [176] na životinjama starim 9 tjedana (kontrola: standardna hrana) i 18 tjedana (tretman: 7 tjedana visokomasne hrane). Post prije testa je trajao 4 sata u vremenskom periodu od 8h do 12h. Doza inzulina (Humulin® R, Eli Lilly, Kanada) koja je injicirana intraperitonealno je bila 0,75IU/kg tjelesne mase, a otopljena je u sterilnom 1xPBS puferu. Neposredno prije injiciranja inzulina, izmjerena je glukozu u krvi pomoću glukometra (Accu-Chek® Performa, Roche, Švicarska) iz vrška repa, a nakon injiciranja ponovno je mjerena u zadanim vremenskim intervalima (15, 30, 60, 45 i 120 minuta nakon aplikacije inzulina).

3.4. Prikupljanje uzoraka

Miševi su žrtvovani s 20 tjedana starosti, nakon 9 tjedana tretmana visokomasnom hranom. Također, žrtvovana je i kontrolna skupina životinja hranjenih standardnom hranom odgovarajuće dobi. Polovica miševa (n=5 po grupi, WT i *Tff3*^{-/-} miševi oba spola) je žrtvovana za molekularne analize gdje je potrebno tkivo odmah smrznuto na -80°C do daljnje obrade. Miševi su anestetizirani pomoću izoflورانa (Isofluran-Piramal, Piramal Healthcare, UK). Prikupljena je krv iz jugularne vene za analizu biokemijskih parametara u serumu, nakon čega je životinja žrtvovana cervikalnom dislokacijom. Razrezana je koža na glavi kako bi se izložila lubanja. Po sredini lubanje je pažljivo napravljen rez, maknute su kosti lubanje i izloženi mozak je pažljivo premješten u petrijevu

zdjelicu na ledu. Podijeljen je na dvije hemisfere iz kojih su izolirani hipokampusi koji su isprani u 1xPBS-u te brzo smrznuti u tekućem dušiku. Otvoren je abdomen životinje i izolirana je jetra koje je pažljivo odvojena od ostatka organa. Također je isprana u 1xPBS-u i smrznuta u tekućem dušiku. Tkiva su pohranjena na -80°C do daljnjih analiza.

Na drugoj polovici miševa ($n=5$ po grupi, WT i *Tff3*^{-/-} miševi oba spola) obavljena je transkardijalna perfuzija kao priprema za daljnje histološke i imunohistokemijske analize. Prije perfuzije, 1xPBS pufer i 4% otopina paraformaldehida (4%PFA, Carl Roth GmbH, Njemačka otopljena u 1xPBS) su zagrijani na 37°C u vodenoj kupelji. Sistem za perfuziju je postavljen na sljedeći način: Jedna cijevčica (Original Perfusor® Line PVC, B. Braun, Njemačka) je postavljena u bocu s 1xPBS puferom, a druga cijevčica (Discofix®C 3-way stopcock, B. Braun, Njemačka) je postavljena u bocu s 4% PFA puferom. Pomoću ventila se kontrolira koja tekućina ulazi u pumpu budući da se cijevčice spajaju u isti protok. Dalje je na cijevčice spojen infuzijski set sa zamkom za mjehuriće (Medicina Trgovina, Hrvatska), a na kraju se nalazi kanula sa savitljivim vrhom (Braun, Njemačka). Prije perfuzije namiješten je protok pumpe (5mL/min) i kroz sustav je pušten zagrijan 1xPBS pufer. Životinja je anestetizirana pomoću izofluorana i nakon ulaska u stanje duboke anestezije, razrezan joj je abdomen i jetra je pažljivo razdvojena od dijafragme. Kako bi se izložilo srce i time olakšao operativni dio, prerezana je dijafragma skupa s rebrima. Nakon toga je napravljen mali rez na posteriornom kraju lijevog ventrikula i umetnuta je kanula kroz taj rez do aorte. Kako bi protok bio moguć, razrezana je desna pretkljetka u trenutku uspješnog postavljanja kanule. Time je pokrenuto perfundiranje životinje, prvo sa sterilnim 1xPBS puferom kroz ~10 minuta kako bi se uklonila krv iz organa, nakon čega kreće fiksacija tkiva s 4% otopinom PFA. Uspješna fiksacija je prepoznata po fiksacijskim tremorima, te karakterističnoj boji i tvrdoći tkiva. Nakon uspješne fiksacije, jetra i mozak su pažljivo izolirani i pohranjeni u svježi 4% PFA do daljnje obrade.

3.5. Analiza biokemijskih parametara u serumu

Pri žrtvovanju su prikupljeni uzorci krvi iz jugularne vene koji su sakupljeni u tubice bez antikoagulansa i ostavljeni minimalno sat vremena na sobnoj temperaturi da se krv zgruša. Nakon toga su centrifugirani na 4 °C, 1000x g kroz 10 min i prikupljen je supernatant (serum) koji je pohranjen u nove čiste tubice na -80 °C do daljnje analize.

Analiza seruma za nekoliko biokemijskih parametara (engl. *low-density lipoprotein*, LDL, engl. *high-density lipoprotein* HDL, ukupni kolesterol, trigliceridi, urati, urea, ukupni proteini, aspartat transaminaza (AST), alanin transaminaza (ALT), alkalna fosfataza, (ALP)) je obavljena pomoću *Architect c8000* uređaja (Abbot, SAD) u suradnji sa kolegama s Medicinskog fakulteta u Osijeku.

3.6. Analiza genske ekspresije metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom

Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) zasnovanoj na Sybrgreen detekciji praćena je ekspresija gena koji sudjeluju u različitim patofiziološkim putevima u jetri i hipokampusu miševa (n=5 po grupi, WT i *Tff3*^{-/-} miševi oba spola).

3.6.1. Optimizacija početnica

Sybr Green (Thermo Fischer Scientific, SAD) detekcijska boja koja je korištena u qPCR metodi je nespecifična i interkalira u sve dobivene dvolančane produkte. Zbog toga je potrebno optimizirati uvjete za sve korištene početnice kako bi bili sigurni u specifičnost i uspješnost qPCR reakcija. Početnice (Macrogen, Južna Koreja) su dizajnirane koristeći *PrimerQuest™ Tool software* (Integrated DNA Technologies, SAD). Optimizacija je podrazumijevala isprobavanje qPCR reakcija na različitim temperaturama vezanja početnica i različitim koncentracijama MgCl₂ u reakcijskoj smjesi. Analiza krivulje taljenja produkata je pokazala koje su reakcije uspješne i daju jedan vidljivi vrh produkata s identičnom temperaturom taljenja. Zatim su umnoženi PCR produkti razdvojeni na 12% poliakrilamidnom gelu pomoću vertikalne elektroforeze (engl.

polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) te je na taj način dokazano da početnice umnažaju isključivo produkt od interesa i mogu se koristiti za daljnje qPCR analize (Privitak 1). Osim specifičnosti, provjerena je i efikasnost amplifikacije pomoću standardne krivulje koristeći serijska razrjeđenja cDNA. Prihvaćeni raspon efikasnosti reakcije je iznosio od 90 do 110%. Na isti način je proveden opisani optimizacijski protokol za svaki par korištenih početnica (n=51) te su u Tablici 4. naznačeni optimizirani uvjeti za qPCR reakciju istih.

Tablica 4. Početnice korištene za qPCR analize s optimiziranim uvjetima

Ime gena (engl)	Oznaka gena	Pristupni broj NCBI baze	Sekvenca početnica (5'-3')	Optimizirani qPCR uvjeti ×
Markeri metabolizma lipida				
abhydrolase domain containing 5	<i>Cgl58</i>	NM_026179.2	ATGCTGTGGAATGAGGACATAG CATAGTGAGTGGCTGGTGA	59°C; 2,5mM
carbohydrate response element binding protein	<i>Chrebp</i>	NM_021455.5	CAGCTGCGGGATGAAATAGA CAAAGCGCTGATGTGTGATG	61°C; 2,5mM
carnitine palmitoyltransferase I	<i>Cpt1a</i>	NM_013495.2	TCGAAACCCAGTGCCTTAAC AAGCAGCACCCCTCACATATC	58°C 2,5 mM
cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide	<i>Cyp21</i>	NM_009995.2	CTGGGTCGGAGCTTCATTT GTCTTGACTCTCTTCCCTTGAC	59°C; 3,5mM
diacylglycerol O-acyltransferase 1	<i>Dgat1</i>	NM_010046.3	CCAACCATCTGATCTGGCTTAT GACTCAGCATTCCACCAATCT	65°C; 3mM
elongation of long-chain fatty acids family member 6	<i>Elov6</i>	NM_130450.2	CCGAAGTAGGTGACACGATATT GTAGGAGTACCAGGAGTACAG	65°C; 3mM
fumarylacetoacetate hydrolase	<i>Fah</i>	NM_010176.4	TAACTCAAAGCCTCCTGTGTATG GATTGGCTCTCCGAATCTGTT	62°C; 2,5mM
fatty acid synthase	<i>Fasn</i>	NM_007988.3	CCTGACCAAGGTGCTGTTAT CATCAAGAAGTGTGGGATCT	65°C; 2,5mM
fat storage-inducing transmembrane protein 2	<i>Fitm2</i>	NM_173397.4	GACAGGAGGACAATGGCTAAT CCACACCAAAGGTACCTAGTAAG	56°C; 2,5mM
glycerol kinase	<i>Glyk</i>	BC003767.1	GCACTAGAAGCTGTTTGTTC	58°C; 2,5 mM

			GCTGGTCATTCCCTCCATCTAC	
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Hmgcs2</i>	NM_008256.4	CCTGTGAAGAGGGAGATGAAAG GCCACAGTCTGAGAATAAGC	64°C; 3 mM
insulin receptor substrate 1	<i>Irs1</i>	NM_010570.4	GTCAGGGACACTCTTGACTAAC TGCCAAGGAAAGACAGGATAAA	61°C; 2,5mM
insulin receptor substrate 2	<i>Irs2</i>	NM_001081212.2	CTGCTGCTCACTTTCCTATCA CCTGCCCTTGGTTCCCTTATC	61°C; 2,5mM
nuclear receptor subfamily 1	<i>Lxra</i>	NM_013839.4	GGGCCTAATGAAGCTAAGAGTC GCAGGGAGAAGCAGTAATGTAG	65°C; 2,5mM
peroxisome proliferator activated receptor alpha VI	<i>Ppara</i>	NM_011144.6	GCTCGTACAGGTCATCAAGAAG CTGCCATCTCAGGAAAGATCAG	59°C 2,5 mM
peroxisome proliferator activated receptor gamma	<i>Pparγ</i>	NM_001127330.2	GCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG GCGGTCTCCACTGAGAATAATG	59°C 2,5 mM
stearoyl-CoA desaturase 1	<i>Scd1</i>	NM_009127.4	GGCAGTTCTGAGGTGATTAGAG GTCTCTGGGAAGAGCAATGTAG	60°C; 2,5mM
sterol regulatory element binding transcription factor 1	<i>Srebp1</i>	NM_011480.4	AGCCCTCCACCAGGTAATAA GGGTTCCCAGTCTACTACTAA	61°C; 2,5mM
Markeri upale				
chemokine (C-C motif) receptor 2	<i>Ccr2</i>	NM_009915.2	GGTCTGGTTGGGTTGTAAA GTCTTTGAGGCTTGTTGCTATG	59°C; 3 mM
mouse CD68 antigen	<i>Cd68</i>	NM_001291058.1	CTCTTGCTGCCTCTCATCATT CTGGTAGGTTGATTGTCGTCTG	58 °C; 2,5 mM
C-X-C motif chemokine ligand 1	<i>Cxcl1</i>	NM_008176.3	GTGTCAACCACTGTGCTAGT CACACATGTCCTCACCTAATAC	61 °C; 3,5 mM
C-X-C motif chemokine ligand 12	<i>Cxcl12</i>	NM_021704.3	TGTCAGCCACGGTGTATTT CCACATACGGTAGGAGGTTTAC	61°C; 2,5mM
atypical chemokine receptor 3	<i>Cxcr7</i>	NM_001271607.1	GACCATGTAGGCCTCAGATTAG CAGCCGAGACTGGCATAAA	63 °C; 3,5 mM
interleukin 1 alpha	<i>Il-1α</i>	NM_010554.4	CCTTACACCTACCAGAGTGATTT CCTTACACCTACCAGAGTGATTT	65 °C; 3 mM
interleukin 1 beta	<i>Il-1β</i>	NM_008361.4	ATGGGCAACCACTTACCTATTT GTTCTAGAGAGTGCTGCCTAATG	64 °C; 3 mM
interleukin 2	<i>Il-2</i>	NM_008366.3	GCGGCATGTTCTGGATTTG	61°C; 3 mM

			TGTGTTGTCAGAGCCCTTTAG	
interleukin 6	<i>Il-6</i>	NM_031168.2	GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG TTGCCGAGTAGATCTCAAAGTG	59 °C; 3.5 mM
interleukin 14	<i>Il-14</i>	NM_001005506. 3	CCTCACTTCAGCTACCTCTTAAA CTACAAGTGGATGGAGGGAAAG	61 °C; 3.5 mM
monocyte chemoattractant protein-1	<i>Mcp1</i>	NM_011333.3	CCTGGATCGGAACCAAATGA CGGGTCAACTTCACATTCAAAG	62 °C; 3 mM
tumor growth factor beta	<i>Tgfβ</i>	NM_031199.4	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG GTGTGTCCAGGCTCCAAATA	66 °C; 3 mM
tumor necrosis factor alpha	<i>Tnfa</i>	NM_013693.3	GTCTCAGAATGAGGCTGGATAAG CATTGCACCTCAGGGAAGAA	63 °C; 2.5 mM
Markeri stresa endoplazmatskog retikuluma i oksidativnog stresa				
activating transcription factor 4	<i>Atf4</i>	NM_009716.3	CCACTCCAGAGCATTCCCTTTAG CTCCTTTACACATGGAGGGATTA G	59 °C; 3.5 mM
binding immunoglobulin protein	<i>Bip</i>	NM_001163434. 1	GAGACTGCTGAGGCGTATTT CAGCATCTTTGGTTGCTTGTC	58 °C; 3.5 mM
C/EBP-homologous protein	<i>Chop</i>	NM_007837.4	TTGAGCCTAACACGTCGATTAT CACTTCCTTCTGGAACACTCTC	58 °C; 3 mM
ER degradation- enhancing alpha- mannosidase-like protein	<i>Edem</i>	NM_138677.2	TGAAAGCATGTGAGGGTAGTG GAGAGAAGGGAAGACAGGATAG A	61 °C; 3.5 mM
glucose-regulated protein 94	<i>Grp94</i>	NM_011631.1	AAGAATGAAGGAAAAACAGGAC AAAA CAAATGGAGAAGATTCCGCC	58 °C; 3 mM
spliced X-box binding protein 1	<i>sXbp1</i>	NM_008934.4	GAGTCCGCAGCAGGTG GTGTCAGAGTCCATGGGA	56 °C; 3 mM
glutathione peroxidase 1	<i>Gpx1</i>	NM_008160.6	GGTTCGAGCCCAATTTTACA CATTCCGCAGGAAGGTAAAG	58 °C ;2.5 mM
NADPH oxidase 2	<i>Nox2</i>	NM_007807.5	ACTCCTTGGGTCAGCACTGG GTTCTGTCCAGTTGTCTTCG	62 °C; 3 mM
superoxide dismutase 1	<i>Sod1</i>	NM_011434.2	GCCTTCTGCTCGAAGTGGAT GGAAGCATGGCGATGAAAGC	59 °C; 3.5 mM

superoxide dismutase 3	<i>Sod3</i>	NM_011435.3	TGGCTGATGGTTGTACCCTG TGAGAAGATAGGCGACACGC	60 °C; 2,5 mM
Markeri neurogeneze				
apoptosis regulator Bcl-2	<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	TCCAGCCACCTTCTTTCTATG GTTTCACCATGTTGCCTCTTAC	61 °C; 3 mM
brain derived neurotrophic factor	<i>Bdnf</i>	NM_007540.4	CAAGAGTCCCGTCTGTACTTTAC GACTAGGGAAATGGGCTTAACA	59 °C; 2,5 mM
epidermal growth factor receptor	<i>Egfr</i>	NM_207655.2	ACAGCGCTACCTTGTTATCC CATCCTCCATGTCCTCTTCATC	59 °C; 3,5 mM
rap guanine nucleotide exchange factor (GEF)	<i>Epac2</i>	NM_001204165. 1	TGTCTCCAGTCCACAATCTTTC GGATGTGTCTCTTGCTCATTCT	58 °C; 3,5 mM
insulin-like growth factor I receptor	<i>Igflr</i>	NM_010513.2	CCAAGTTACCAGAAGGGCTAAT GGTAGGGACAATACAGGCTAAAT	59 °C; 3 mM
L1 cell adhesion molecule	<i>L1cam</i>	NM_008478.3	AGCACAGCAAGAGGCATATC CCACATGGTAAGAGCTGTAAGG	65 °C; 3,5 mM
neurofilament light polypeptide	<i>Nfl</i>	NM_010910.2	GCTCTTTCCCAGCCTACTATAC TTCTCCTTCTCCTCCTCTTCT	59 °C; 3,5 mM
toll-like receptor 4	<i>Tlr4</i>	NM_021297.3	TGGTCAGTGTGATTGTGGTATC GCTTTCTCCTCTGCTGTAATT	58 °C; 3 mM
Referentni geni				
actin beta	<i>Actβ</i>	NM_007393.5	GCAAGCAGGAGTACGATGAG CCATGCCAATGTTGTCTCTT	61 °C; 3,5mM
beta 2 microglobulin	<i>β2m</i>	NM_009735.3	CCTGCAGAGTTAAGCATGACAGT TCATGATGCTTGATCACATGTCT	60 °C; 3 mM

× prvo je oznaka temperature vezanja početnice, a drugo koncentracija MgCl₂ u reakcijskoj qPCR smjesi

3.6.2. Izolacija RNA i sinteza cDNA

Za izolaciju RNA iz tkiva jetre i hipokampusa korišten je komercijalno dostupan kit *NucleoSpin*®RNA (MACHEREY-NAGEL, Njemačka). U keramički tarionik je dodano smrznuto tkivo (otprilike 30 mg) i pomoću tučka i tekućeg dušika se smrvilo u konzistenciju praha. U tarionik je dodan pufer RA1 (dostupan u navedenom kitu) uz dodatak β-merkaptetanola (Sigma-Aldrich, SAD) u omjeru 350 μL : 3,5 μL za jedan uzorak. Nakon homogenizacije tkiva, daljnji koraci koji su slijedili su uključivali filtraciju lizata, vezanje RNA za kolonu, digestiju DNA, ispiranja i na kraju otapanje purificirane totalne RNA s 40 μL sterilne mQH₂O. Koncentracija i čistoća izolirane RNA je izmjerena pomoću spektrofotometra (NanoPhotometer® N60, Implen GmbH, Njemačka).

RNA je prebačena u cDNA koristeći komercijalno dostupan *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Reakcijska smjesa za jedan uzorak se sastojala od 10 μL RNA (1,5 μg) i 10 μl skupne otopine sastava prikazanog u Tablici 5, a odvijala se u uređaju *Veriti*™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Njemačka) po programu prikazanim u Tablici 6.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju za jedan uzorak - prema *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit* uz dodatak RNAznih inhibitora

Sastojak	Volumen (μL)
10X RT pufer	2.0
25X dNTP miks (100mM)	0.8
10X RT Random Primeri	2.0
Enzim MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
RNazni inhibitor (Applied Biosystems, Njemačka)	1.0
mQH ₂ O	3.2
Konačan volumen	10

Tablica 6. Uvjeti reakcije reverzne transkriptaze

Temperatura	Trajanje
25°C	10 min
37°C	120 min
85 °C	5 min

3.6.3. Amplifikacija cDNA upotrebom qPCR metode

Kako je navedeno u poglavlju 3.6.1, početnice su optimizirane i uvjeti qPCR reakcije za svaku početnicu koja je korištena su prikazani u Tablici 4. Sastav reakcijske smjese za jednu reakciju je prikazan u Tablici 7. Reakcija se odvijala u uređaju *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Njemačka) uređaju po programu navedenom u Tablici 8, a analiza qPCR reakcija je provedena pomoću *StepOneSoftware* (v 2.3) (Applied Biosystems, Njemačka).

Vrijednost koja je potrebna za određivanje relativne ekspresije gena se naziva granični ciklus ili C_T vrijednost (engl. *cycle threshold*). Označava broj ciklusa potrebnih da se fluorescentni signal umnožene DNA zabilježi, odnosno točku na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava nekoliko standardnih devijacija iznad bazne linije. C_T vrijednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne DNA u uzorku pa se podrazumijeva da što je veća količina ciljne DNA, to je niža C_T vrijednost.

Tablica 7. Sastav qPCR reakcijske smjese za jednu reakciju

Sastav	Volumen (µl)		
10X M-pufer (800mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3)	15.25		
dNTPs (5mM) (Carl Roth GmbH, Njemačka)	1		
MgCl ₂ (25 mM) (Sigma-Aldrich, SAD) ×	2.5	3	3.5
Taq DNA polimeraza (Sigma-Aldrich, SAD)	1		
SYBR Green I (1000X) (Sigma-Aldrich, SAD)	0.0025		
Referentna boja za qPCR (100X) (Sigma-Aldrich, SAD)	0.25		
mQH ₂ O×	15.75	14.75	15.25
Početnice (5µM Forward i 5µM Reverse)	1		
cDNA (37.5ng)	1		
Ukupni volumen	25		

× Ovisno o vrsti početnica koje su korištene – prikazano u Tablici 4

Tablica 8. Uvjeti QPCR reakcije

Faza	Temperatura	Trajanje
Početna denaturacija	95°C	3 min
Denaturacija	95°C	1 min*
Lijepljenje početnica	×	30 sec*
Produljivanje lanaca	72°C	30 min*
Završna polimerizacija	72°C	10 min

× Ovisno o vrsti početnica koje su korištene – prikazano u Tablici 4

* Broj ciklusa denaturacije, lijepljenja početnica i produljivanja lanaca je 40

3.7. Detekcija proteina Western blot metodom

3.7.1. Izolacija proteina

Ukupni proteini iz tkiva jetre i hipokampusa izolirani su pomoću RIPA pufera (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) uz inhibitore proteaza (*PhosSTOP*, Roche, Švicarska) i fosfataza (*cOmplete™*, *Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Švicarska) u omjeru RIPA : inhibitori - 10:1. Tkivo je homogenizirano pomoću keramičkog tarionika, tučka i tekućeg dušika. Nakon toga uzorci su sonificirani 3 x 30 sekundi na amplitudi 50 koristeći 1mm probe (bbs-8535 620) i centrifugirani pri maksimalnoj brzini na 4 °C kroz 20 minuta. Prikupljen je supernatant koji je pohranjen na -80°C do daljnje analize.

3.7.2. Mjerenje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina korišten je *Pierce BCA protein assay kit* (Thermo Fischer Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Kit se temelji na dvije reakcije: biuretska reakcija i detekcija iona bakra bicinhoninske kiseline (BCA). U mikrotitrarske pločice s 96 jažica ispipetirani su uzorci u različitim razrjeđenjima skupa sa standardom *Albumin* (Thermo Fischer Scientific, SAD) u konačnom volumenu od 25 µL. U uzorke i standard je zatim pomoću višekanalne pipete dodano 200 µL A+B reagensa iz kita (u omjeru 50:1). Pločica je inkubirana na termobloku pri 37°C kroz 30 minuta, nakon čega je spektrofotometrom (*ThermoLab systems Multiskan EX*, SAD) određena apsorbancija na 570nm. Koristeći standardne krivulje dobivene iz standarda poznatih koncentracija iz očitanih vrijednosti apsorbancije uzoraka izračunate su koncentracije proteina u pojedinačnim uzorcima.

3.7.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i prijenos proteina na membranu

Proteini su pomiješani s *5x Laemlli sample* puferom za nanošenje (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,1% bromophenol blue) u omjeru 1:5, DTT-om (*dithiothreitol* otopljen u natrijevom acetatu, Sigma Aldrich, SAD) u omjeru 1:10 i mQH₂O. Zatim su denaturirani na termobloku 5 minuta na 92°C nakon čega je po jažici nanoseno 10 µg proteina. Tris-Glycine SDS poliakrilamidni gel je prethodno pripremljen po sastavu opisanom u Tablici 9. Proteini su razdvojeni poliakrilamid gel elektroforezom na konstantnoj voltaži od 100V na sobnoj temperaturi

u puferu za vožnju (25 mM Tris base, pH 8,3, 192 mM glicin, 0.1% SDS) koristeći *Mini-PROTEAN Tetra vertical electrophoresis system* (Bio-Rad Laboratories, SAD). Za određivanje molekularne mase proteina korišten je marker *ROTI®Mark BI-PINK* (Carl Roth GmbH, Njemačka). Nakon razdvajanja, proteini su preneseni na polivinilnu membranu (Bio-Rad Laboratories, SAD) pomoću sustava Mini-PROTEAN u puferu za prijenos (25 mM Tris base, pH 8,3, 192 mM glicin, 20% metanol). Prijenos se odvijalo preko noći (16h) pri 4°C i konstantnoj jakosti struje od 100mA. Uspješnost prijenosa je provjerena bojanjem gela Amido Black bojom: Nakon 10 minuta ispiranja u 1xPBS puferu membrana je 2 minute bojana Amido Black otopinom (0,1% amido black (Sigma-Aldrich, SAD), 20% metanol, 2% octena kiselina, deH₂O). Membrana je isprana (2x30min) u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, deH₂O) te u re H₂O i TBS-T puferu (engl. *Tris-Buffered Saline*, TBS, 150 mM NaCl, 20 mM Tris Base, pH 8,0) s 0,1% TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, SAD).

Tablica 9. Sastav Tris-Glicin SDS poliakrilamidnog gela

Sastojak	5% gel za sabijanje Volumen (ml)	12% gel za razdvajanje Volumen (ml)
40% <i>acrylamide/bis-acrylamide</i> otopina (29:1) (Acros Organics, SAD)	0.38	3
Tris Base (Fisher Scientific, SAD)	0,38 ×	2.5 ×
reH ₂ O	2.18	4.3
10% SDS (Acros Organics, SAD)	0.03	0.1
10% <i>ammonium persulfate</i> (Carl Roth GmbH, Njemačka)	0.03	0.1
TEMED (Carl Roth GmbH, Njemačka)	0.003	0.004

× 1.5M Tris Base (pH 8.8) pufer je korišten za gel za sabijanje, a 1.0 M Tris Base (pH 6.8) pufer je korišten za gel za razdvajanje

3.7.4. Vežanje protutijela na membranu

Membrana je prije inkubacije blokirana 1h s 5% *I-Block* otopinom (Tropix, Thermo Fisher Scientific, SAD) u 1x PBS puferu kako bi se spriječilo nespecifično vežanje. Nakon blokiranja slijedila je inkubacija s primarnim protutijelom preko noći na tresilici (UltraRocker Rocking Platform, BioRad, SAD) pri 4°C. Primarna protutijela koja su korištena za detekciju odgovarajućih proteina, te njihova razrjeđenja (u otopini za blokiranje) su prikazana u Tablici 10. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom membrane su isprane 3 x 10 minuta u 1xTBS-T puferu. Slijedila je inkubacija s odgovarajućim sekundarnim protutijelom (Goat anti-rabbit IgG-HRP #170-6515, Bio-Rad Laboratories, SAD) kroz 90 min uz njihanje na sobnoj temperaturi. Zatim se membrana ponovno ispirala na isti način kao i nakon inkubacije s primarnim protutijelom.

Tablica 10. Popis korištenih antitijela i razrjeđenja

Protutijela (oznaka proteina)	WB/IF	Razrjeđenja (WB/IF)	Proizvođač (kataloški broj)
Anti-Ybx1	+/-	1:1000/-	Abcam, UK (ab76149)
Anti-Anp32a	+/-	1:1000/-	Proteintech,UK (15810-1-AP)
Anti-NeuN	+/+	1:1000/1:500	Abcam, UK (ab177487)
Anti-Dcx	+/+	1:1000/1:1000	Abcam, UK (ab18723)
Anti-Snap25	+/-	1:1000/-	Abcam, UK (ab109105)
Anti-Gfap	+/+	1:1000/1:500	Abcam, UK (ab7260)
Anti-Iba1	+/+	1:500/1:300	Abcam, UK (ab178846)

3.7.5. Detekcija proteina Western blot metodom

Proteini obilježeni specifičnim protutijelima su detektirani pomoću kemiluminiscencije, a korišten je komercijalno dostupan kit *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, SAD). Reagens za detekciju je pripremljen prema uputama proizvođača. Signali su analizirani na uređaju *Uvitec Alliance 4.7* (Uvitec Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), a kvantitativno su analizirani u računalnom programu ImageJ (NIH, SAD).

3.8. Proteomska analiza- LC MS/MS analiza visoke rezolucije

Ukupni proteini iz tkiva jetre miševa hranjenih visokomasnom hranom su izolirani pomoću kita *Minute TM Total Protein Extraction Kit for Animal Cultured Cells/Tissues* (Invent Biotechnologies, SAD) po protokolu proizvođača. Koncentracije proteina su određene na isti način kako je opisano u poglavlju 3.7.2. Daljnji protokol je obuhvaćao obilježavanje uzoraka *Tandem Mass Tags* pristupom (TMT tenplex reagents; Thermo Scientific, SAD) te pripremu internog standarda. Nakon toga je slijedila identifikacija proteina iz uzoraka pomoću tekućinske kromatografije s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometry*, LC MS/MS) koristeći *Q-Exactive-Plus* maseni spektrometar. Za analizu proteomskih podataka i identifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam implementiran u u *Proteome Discoverer software* v 2.3 (Thermo Fisher Scientific, SAD) i pretraga baze podataka za *Mus musculus* FASTA datoteke (NCBI database). Barem dva jedinstvena peptida i granica od 5% engl. *False discovery rate* (FDR) je postavljena kako bi se dobila pouzdana identifikacija proteina. FDR za cijeli set podataka izračunat je na temelju rezultata pretrage baze podataka pomoću *Percolator* algoritma unutar *Proteome Discoverer* programa. Unutarnji standard korišten je kao referentni uzorak. Napravljena je normalizacija pojavnosti temeljena na ukupnoj količini proteina i izračunu omjera proteina. Primijenjena je studija bioloških replikata, koristeći tzv. *non-nested* dizajn bez unosa vrijednosti koje nedostaju. Neupareni t-test korišten je za računanje p-vrijednosti, potom je primijenjena Benjamini–Hochberg korekcija, koristeći p-vrijednost 0,05. LC MS/MS analiza visoke rezolucije i analiza dobivenih podataka je napravljena u suradnji sa kolegama s Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

3.9. Analiza sastava masnih kiselina

U suradnji sa kolegama s Biotehničkog fakulteta u Ljubljani, pomoću plinske kromatografije analiziran je sastav masnih kiselina u jetri. Prvi korak protokola obuhvaća metodu opisanu u [177]. Ukratko, provedena je *in situ* transmetilacija 0,25 g homogeniziranog uzorka upotrebom 0,5M NaOH u metanolu, a zatim koristeći otopinu 14% Bor trifluorid u metanolu. Metilni esteri masnih kiselina ekstrahirani su heksanom. Za njihovo odvajanje korišten je uređaj *Agilent 6890 GC* opremljen *DB-Fatwax UI* kromatografskom kolonom (30 m duljine i 0,25 m debljine filma, Agilent Technologies, SAD) i FID detektorom.

3.10. Histološka analiza jetre i imunohistokemija analiza mozga

3.10.1. Priprema tkiva

Nakon perfuzije životinja postupkom opisanim u poglavlju 3.4, uzorci jetre i lijeve polovice mozga pohranjeni u 4%PFA su prvo inkubirani u 15% otopini saharoze (Carl Roth, GmbH, Njemačka) u 1xPBS puferu preko noći, a zatim u 30% saharozi. Ovaj korak je osigurao sprječavanje formacije ledenih kristala u tkivu tijekom smrzavanja. Kako bi smrzavanje bilo postupno, tkiva su smrzavana u kalupima s matriksom za uklapanje (*OCT Embedding Matrix*, Carl Roth, GmbH, Njemačka) pomoću tekućeg 2-metilbutana (VWR, SAD) prethodno ohlađenog na -80 °C. Uklopljena tkiva su pohranjena na -80 °C do daljnje obrade. Uzorci su rezani su na kriotomu (Leica CM 3050S cryotome) s time da su sagitalni rezovi polutke mozga rezani na debljinu 16 µm, a tkivo jetre na debljinu 8 µm. Kriorezovi su zalijepljeni na predmetna stakalca (SuperFrost®, VWR, SAD) i pohranjeni pri -80 °C do daljnjih analiza.

3.10.2. Oil Red O bojanje lipida u tkivu jetre

Oil Red O boja je liposolubilna boja koja se koristi za vizualizaciju lipida i neutralnih triglicerida u jetri. Pripremljena je radna otopina Oil Red O iz 0,5% otopine Oil Red O boje (Sigma Aldrich, SAD) u 2-propanolu na način da je *stock* otopina razrijeđena s deH₂O u omjeru 3:2 nakon čega je uslijedila filtracija. U staklenu posudu za stakalca je postavljen papir namočen s 10% formalinom i stakalca s kriosekcijama jetre su postavljena unutar posude na 5 min pri 4°C. Nakon toga su kratko umočena u 60% 2-propanol nakon čega slijedi inkubacija u Oil Red O radnoj otopini 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Stakalca su dvaputa kratko isprana u 60% 2-propanolu te su nakon toga isprana u deH₂O. Jezgre su obojane hematoksilin bojom (Hematoxylin, Mayer's, DakoCytomation, Danska) 1 minutu nakon čega su stakalca ponovno ispirana u deH₂O. Kriosekcije su uklopljene pomoću medija za uklapanje (ROTI®Mount Aqua, Carl Roth, Njemačka) i analizirane koristeći *Olympus BX51TF* mikroskop i programski alat *Olympus Stream Essentials software* (Olympus, Japan).

3.10.3. Vizualizacija proteina u hipokampusu metodom imunofluorescencije

Kriorezovi na stakalcima su čuvani na -80°C te su nakon odmrzavanja sušeni u laminaru 1h, nakon čega su prebačeni u mračnu i vlažnu kutiju te je oko tkiva nanesen hidrofobni marker (DakoPen, Danska). Tkivo je permeabilizirano u 0.5% Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, SAD) u 1xTBS puferu u periodu od 30 minuta. Ovo vrijedi za sva protutijela, osim za *Anti-Dcx* čiji je protokol zahtijevao inkubaciju u prethodno zagrijanom Natrij citrat puferu (10 mM natrij citrat, 0.05% TWEEN® 20, pH 6.0) u kupelji na 95°C u trajanju od 20 minuta. Nakon permeabilizacije stakalca su isprana 3 puta po 10 minuta u 1xTBS-T puferu. Nespecifično vezane protutijela je spriječeno tzv. blokiranjem u 10% otopini kozjeg seruma (Sigma-Aldrich, USA) u 1xTBS-T kroz 1h. Inkubacija s primarnim protutijelima (Tablica 10) se odvijala preko noći pri 4°C . Zatim je slijedilo ispiranje u TBS-T puferu (4x10min). Odgovarajuće sekundarno protutijelo (Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488), ab150113, Abcam, UK) je razrijeđeno u otopini za blokiranje i inkubirano 4h na sobnoj temperaturi. Stakalca su zatim ponovno ispirana s 1x TBS-T puferom (4x10min). Jezgre su obilježene DAPI bojom (Carl Roth GmbH, Njemačka), otopljenom u TBST-u koncentraciji $2\mu\text{g}/\text{mL}$. Nakon 10 minuta inkubacije s DAPI otopinom, stakalca su ponovno kratko ispirana u 1xTBS-T puferu. Zadnje ispiranje se odvijalo u reH₂O kako bi se uklonili tragovi soli iz TBS pufera. Nakon zadnjeg ispiranja, stakalca su osušena u laminaru i uklopljena u mediju za uklapanje (ROTI®Mount FluorCare, Carl Roth GmbH, Njemačka). Sekcije su analizirane koristeći *Olympus BX51TF* mikroskop i *Olympus Stream Essentials software* (Olympus, Japan).

3.11. Statističke analize

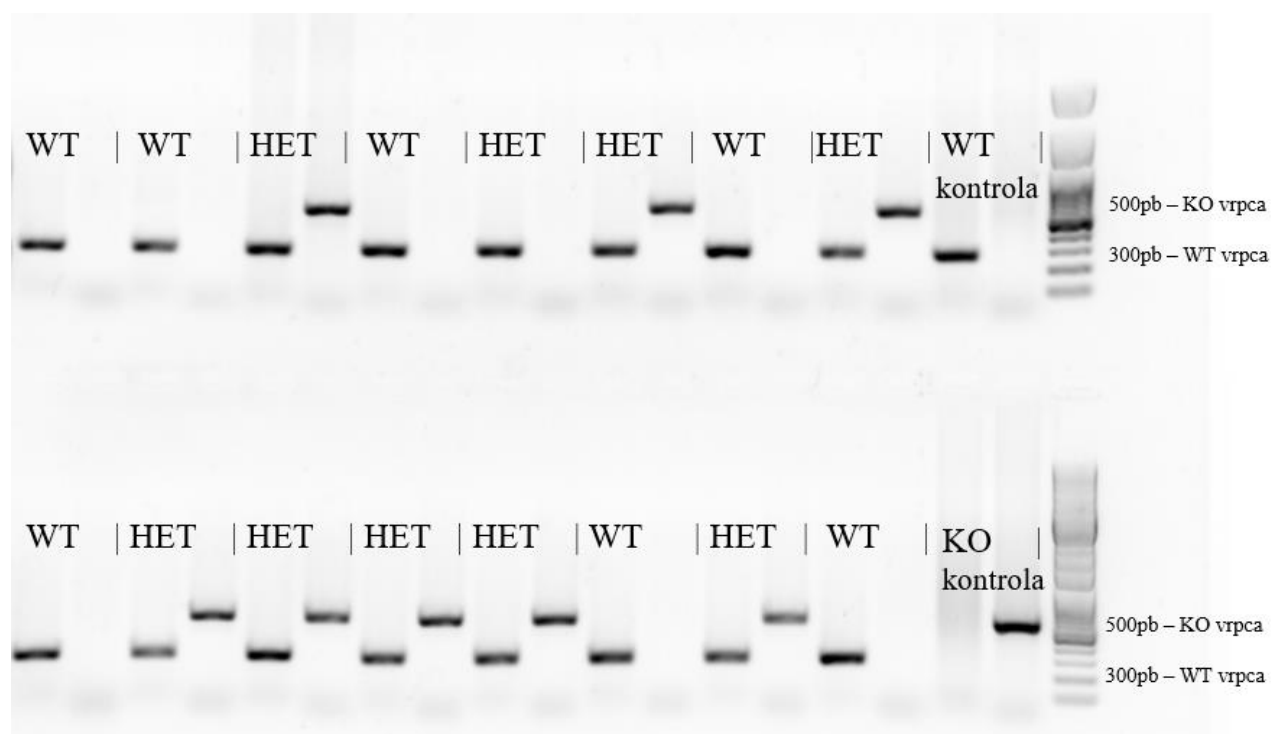
Rezultati mjerenja mase miševa i IPGTT i IPITT testova su analizirani koristeći dvosmjerni ANOVA test, nakon kojeg je slijedila *Tukey multiple comparison post hoc* analiza. Rezultati biokemijske analize seruma su također analizirani s dvosmjernim ANOVA statističkim testom, a u ovom slučaju je korišten *Bonferroni post hoc* test. Relativna genska ekspresije je određena koristeći softver REST © ($\Delta\Delta\text{Ct}$ metoda), a vrijednosti su normalizirane preko referentnih gena. Testirano ih je nekoliko, a engl. *actin β* (*Act β*) i engl. *β 2-microglobulin* (*β 2m*) su se pokazali najstabilnijima pa su oni korišteni za normalizaciju. Analiza sastava masnih kiselina je ispitana koristeći generalni linearni model (GLM) SAS/STAT modela (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD)

s razlikama određenima *Tukey-Kramer post hoc* testom. Rezultati Western blot metode su prvo kvantificirani u programu ImageJ, a za obradu podataka je korišten Studentov t-test kako bi odredili razlike između srednjih vrijednosti dviju nezavisnih grupa. Statistička značajnost testova postavljena je na $p \leq 0,05$. Statistički podaci za proteomsku analizu su detaljnije opisani u poglavlju 3.8. Za sve grafičke prikaze korišten je softver *GraphPad Prism version 8.0.0* (GraphPad Software, SAD).

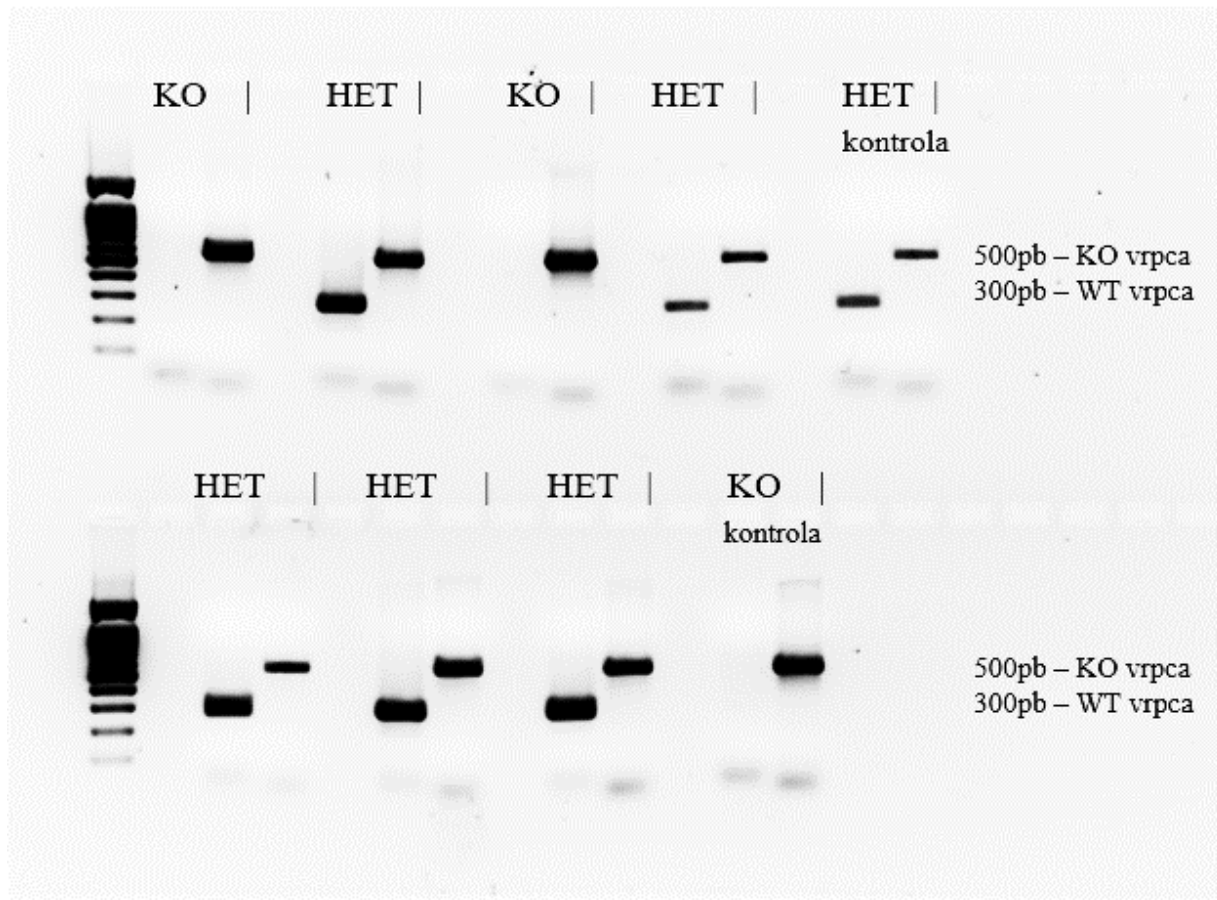
4. REZULTATI

4.1. Razvoj novog kongeničnog *Tff3 knock out* mišjeg modela na C57BL/6N genskoj podlozi

Razlog generiranja novog *Tff3*^{-/-} kongeničnog mišjeg soja na C57BL/6N podlozi je naveden u poglavlju 1.4, a metodologija je opisana u poglavlju 3.1. Ukratko, prva križanja su uključivala *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) mužjake miješane genske podloge i ženke C57BL/6N soja. *Tff3*^{-/-} (C57BL/6J/Sv129) mužjaci su korišteni kao donori *knock out* mutacije. Dakle, cilj je prenijeti *knock out* mutaciju na novu gensku podlogu i time razviti novi kongenični *Tff3 knock out* soj. Genotipizacijom su identificirani početni heterozigoti (F0 generacija) i uslijedila su daljnja križanja heterozigotnih mužjaka sa ženkama C57BL/6N soja. Nakon 4 tjedna mladunčad je odvojena po spolu i mužjaci su ponovno genotipizirani kako bi identificirali heterozigote za daljnji rasplod (Slika 4). Korišten je pristup brze kongenike (engl. *Speed congenics*) te su nakon pet uzastopnih generacija, heterozigotni mužjaci postigli zadovoljavajuću gensku sličnost s C57BL/6N sojem. Zadnja generacija je podrazumijevala križanje po principu brat x sestra heterozigoti iz čijih okota su genotipizacijom detektirani homozigoti, odnosno novi *Tff3*^{-/-} soj na C57BL/6N podlozi i time je uspostavljen daljnji uzgoj (Slika 5). Zbog jednostavnosti prikazana je vizualizacija samo dvije generacije genotipizacije (Slika 4 i 5) s ciljem da predstave cjelokupni proces.



Slika 4. Generiranje heterozigota (*Tff3*^{+/-}) F1 generacije. Genotip miševa određen je metodom PCR i umnažanjem gena *Tff3*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane u agaroznom gelu kako je prikazano na slici. Miševi koji posjeduju funkcionalni *Tff3* gen su divlji tip životinje i na gelu su vizualizirani jednom DNA vrpcom od 300pb (oznaka WT – engl. wild-type). Heterozigotni miševi su vizualizirani s dvije DNA vrpce od 300pb i od 500pb (oznaka HET). *Tff3*^{-/-} miševi su označeni s oznakom KO. Za provjeru veličine PCR produkata korišten je DNA marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.



Slika 5. Generiranje homozigota (*Tff3*^{-/-}) na C57BL/6N genskoj podlozi. Genotip miševa određen je metodom PCR i umnažanjem gena *Tff3*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane u agaroznom gelu kako je prikazano na slici. Heterozigotni miševi su vizualizirani s dvije DNA vrpce od 300pb i od 500pb (oznaka HET). *Tff3*^{-/-} miševi s delecijom *Tff3* gena su označeni oznakom KO (engl. *knock out*) i vizualizirani jednom DNA vrpcom od 500pb. Za provjeru veličine PCR produkata korišten je DNA marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

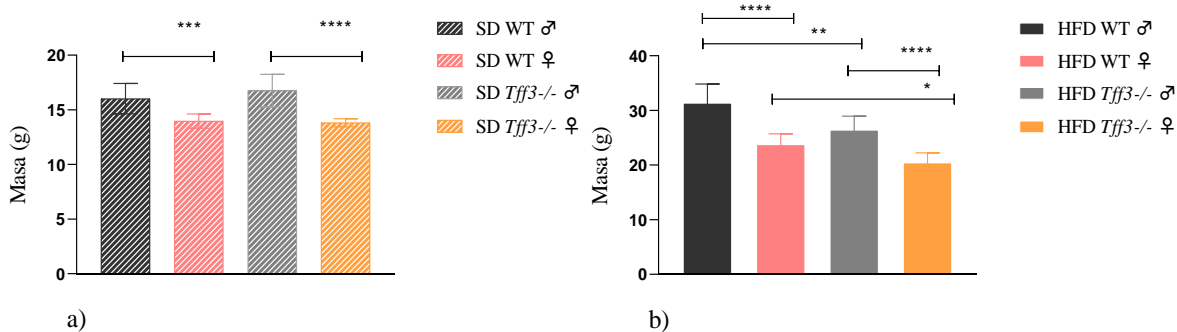
4.2. Utjecaj nedostatka Tff3 na metaboličku homeostazu miševa izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani

4.2.1. Usporedba tjelesne mase

Mužjaci i ženke *Tff3*^{-/-} C57BL/6N i odgovarajuće divlji tip (WT) kontrole C57BL/6N su s 11 tjedana starosti izloženi visokomasnoj prehrani (engl. *high-fat diet*, HFD) kroz 9 tjedana. Prije izlaganja izmjerena je masa svih grupa životinja na standardnoj hrani (engl. *standard diet*, SD) kako bi vidjeli da li postoje razlike između grupa neovisno o tretmanu s visokomasnom hranom (Slika 6a).

Poznato je da su ženke značajno lakše od mužjaka što je uočeno i ovim mjerenjima i kod WT ženki u odnosu na WT mužjake, kao i kod *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na *Tff3*^{-/-} mužjake na standardnoj hrani (Slika 6a) te nakon izlaganja tretmanu visokomasnom hranom (Slika 6b).

WT i *Tff3*^{-/-} životinje nisu pokazivale statistički značajne razlike u tjelesnoj masi prije izlaganja visokomasnoj prehrani. Međutim, nakon 9 tjedana visokomasne hrane, *Tff3*^{-/-} životinje oba spola imaju statistički značajno manje mase u odnosu na WT kontrole (Slika 6b).

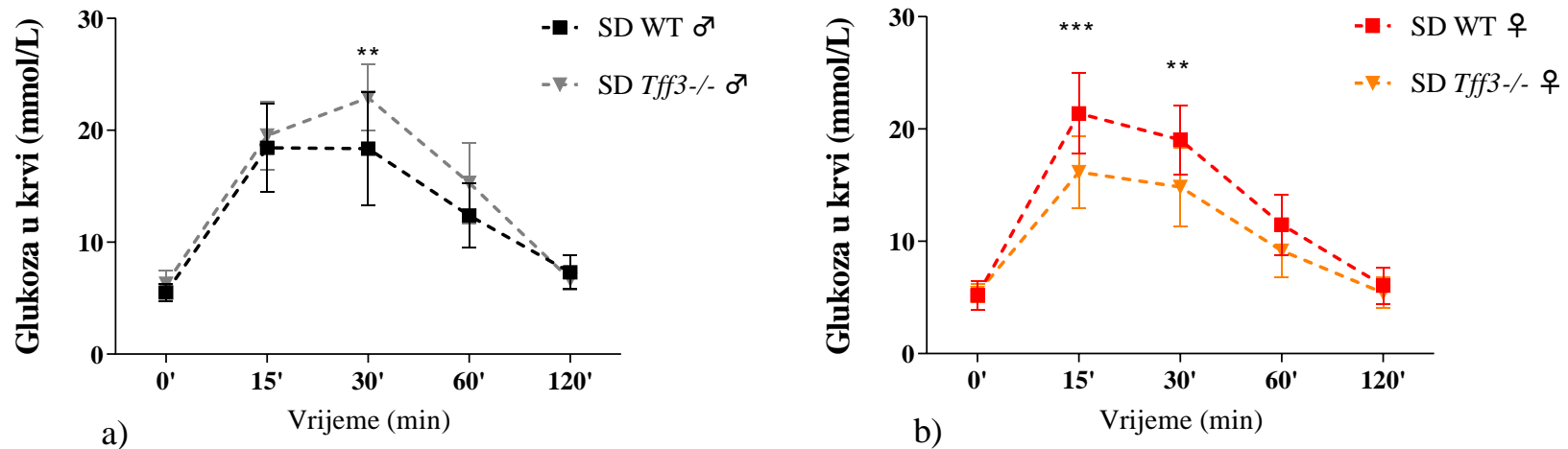


Slika 6. *Tff3*^{-/-} miševi imaju značajno manje mase u odnosu na WT kontrole nakon izlaganja visokomasnoj hrani

a) masa miševa starosti 9 tjedana hranjenih standardnom hranom (SD) b) masa miševa starosti 20 tjedana nakon 9 tjedana visokomasne hrane (HFD). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$.

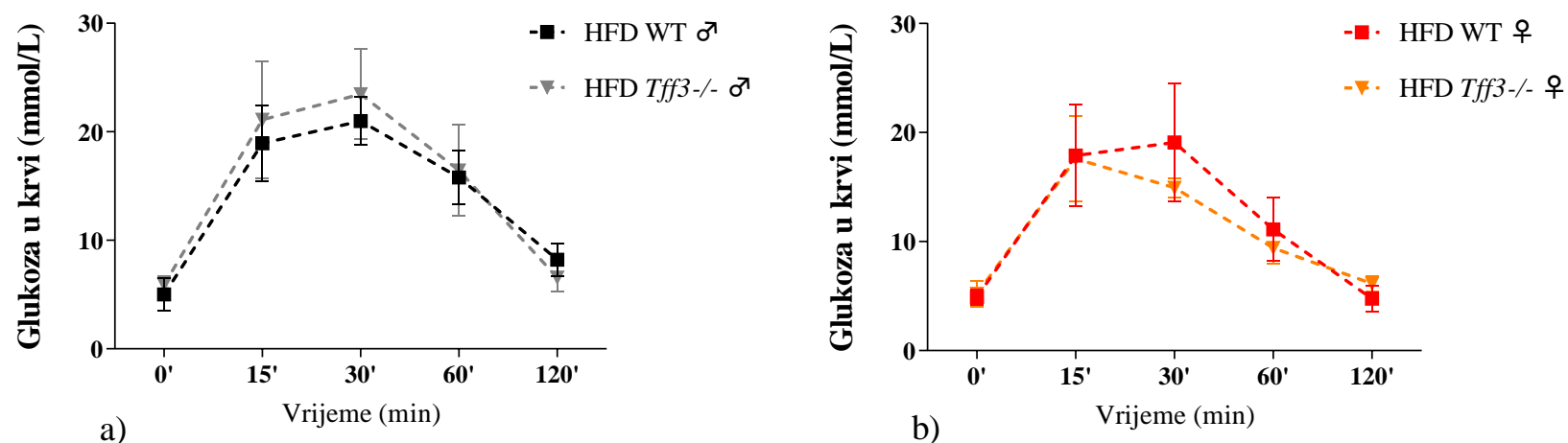
4.2.2. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT)

Za ispitivanje potencijalnih razlika u homeostazi glukoze uslijed nedostatka Tff3 proveden je metabolički test tolerancije na glukozu (IPGTT) na miševima starosti 9 tjedana, prije izlaganja visokomasnoj prehrani (Slika 7 i Prिवitak 2). Pokazano je kako *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju veću koncentraciju glukoze u krvi, ali samo u jednoj vremenskoj točki, odnosno 30 minuta nakon injiciranja glukoze u odnosu na WT mužjake (Slika 7a). *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke, imaju manju koncentraciju glukoze u krvi 15 i 30 minuta nakon početnog injiciranja (Slika 7b).



Slika 7. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na 9 tjedana starim miševima izloženim standardnoj prehrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

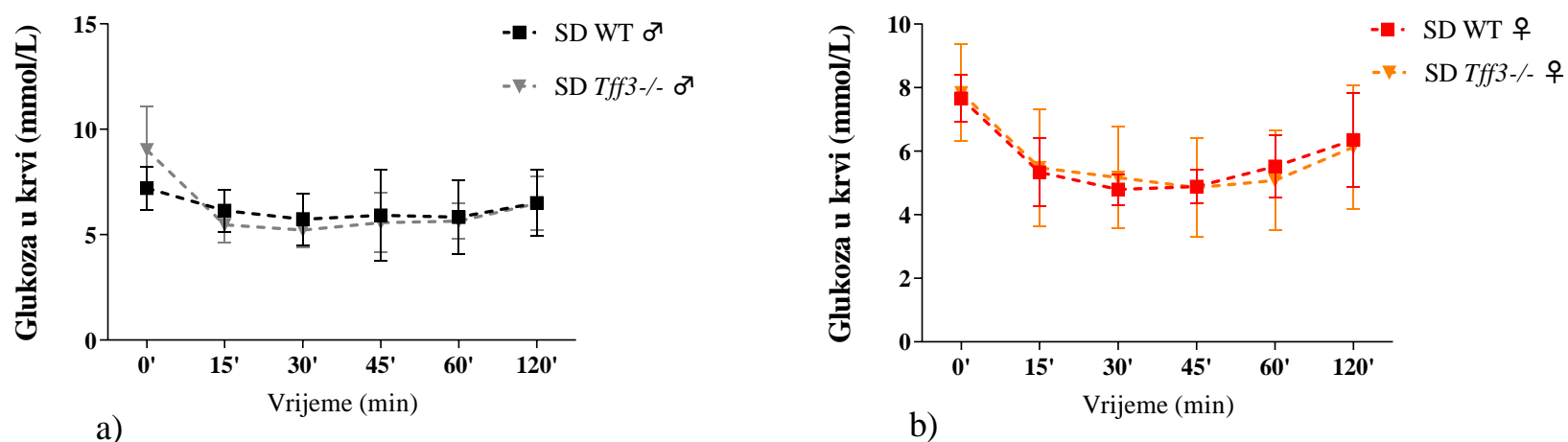
Miševima je nakon 6 tjedana visokomasne prehrane ponovo praćena tolerancija na glukozu (Slika 8 i Privitak 3). Razlike primijećene kod životinja na standardnoj hrani se gube nakon 6 tjedana visokomasne prehrane, te *Tff3*^{-/-} mužjaci i *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT kontrole, ne pokazuju statistički značajne razlike u niti jednoj vremenskoj točki u odnosu na WT životinje (Slika 8).



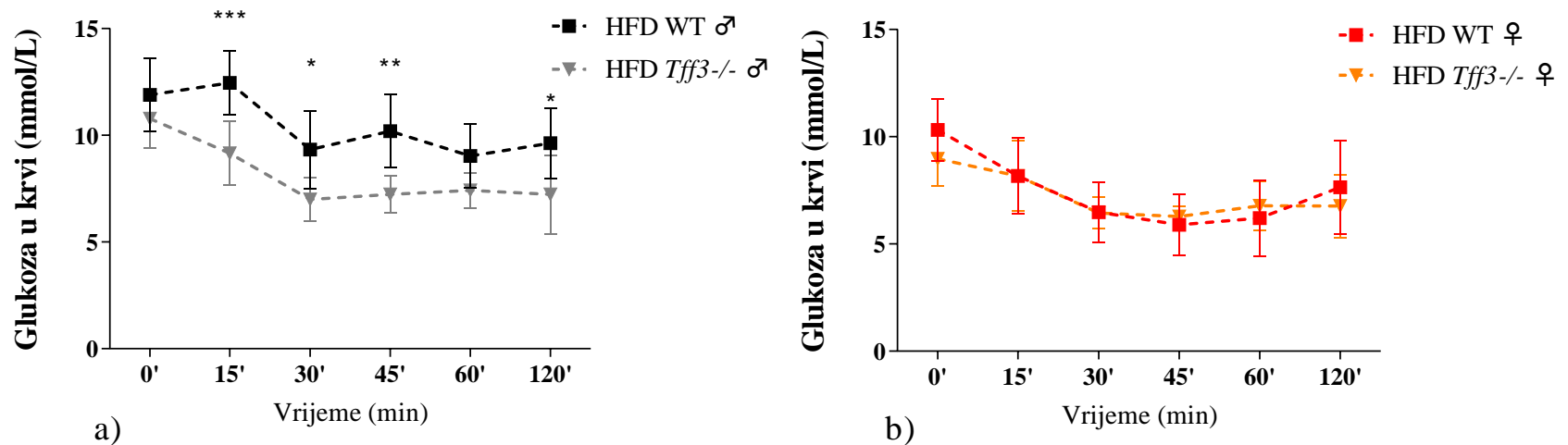
Slika 8. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na 17 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 6 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n=10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*.

4.2.3. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT)

Za ispitivanje potencijalnih razlika u osjetljivosti na inzulin uslijed nedostatka *Tff3* proveden je metabolički test tolerancije na inzulin (IPITT) na životinjama starosti 9 tjedana, prije izlaganja visokomasnoj prehrani (Slika 9 i Prिवitak 4), te nakon 7 tjedana visokomasne prehrane (Slika 10, Prिवitak 5). Životinje na standardnoj prehrani ne pokazuju statistički značajne razlike u koncentraciji glukoze u krvi nakon iniciranja inzulina (Slika 9 i Prिवitak 4). Međutim, nakon 7 tjedana visokomasne prehrane *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju značajno nižu razinu glukoze u odnosu na WT mužjake koja ukazuje na bolju toleranciju na inzulin u skoro svim vremenskim točkama (Slika 10a), dok nema statistički značajnih razlika u razini glukoze u krvi *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (Slika 10b).



Slika 9. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 9 tjedana starim miševima izloženim standardnoj hrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*.



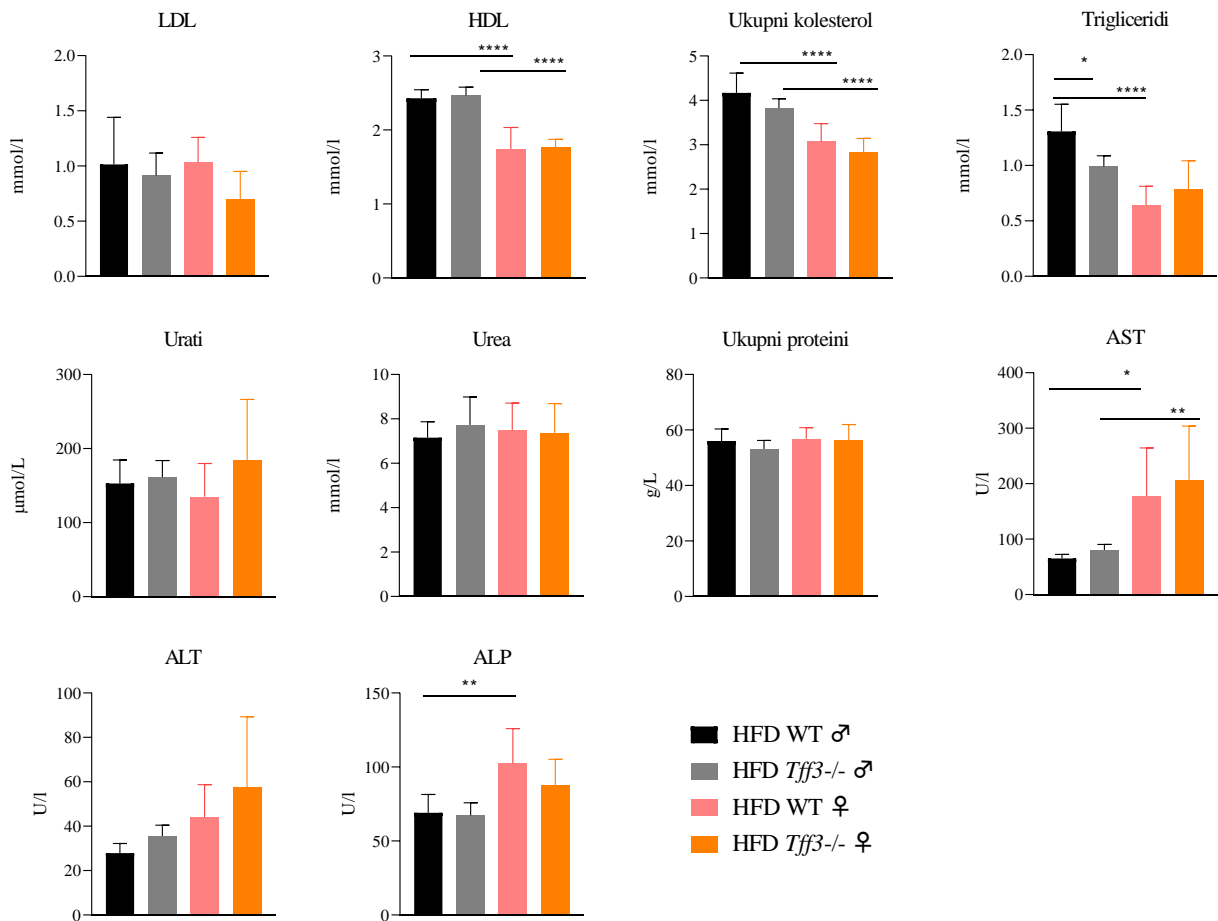
Slika 10. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 18 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 7 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Budući da je primarni cilj u okviru ovog istraživanja bio ispitati nedostatak *Tff3* proteina u provedenim eksperimentima, dodatne analize rezultata IPGTT i IPITT testova vezane za spol, odnosno usporedbe WT mužjaka u odnosu na WT ženke te *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke, su prikazane u Pravitku 2-5.

4.3. Učinak nedostatka Tff3 na različite biokemijske parametre u serumu miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom

U serumu miševa analizirani su različiti biokemijski parametri (ukupni kolesterol, HDL, LDL, trigliceridi, jetreni enzimi ASP, ALT i AST, ukupni proteini, urea i urati) koji mogu ukazati na deregulacije metabolizma lipida i disfunkcije u radu jetre i bubrega. Jedina statistički značajna razlika vezana za genotip je razina triglicerida, koja je statistički značajno niža u serumu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake (Slika 11).

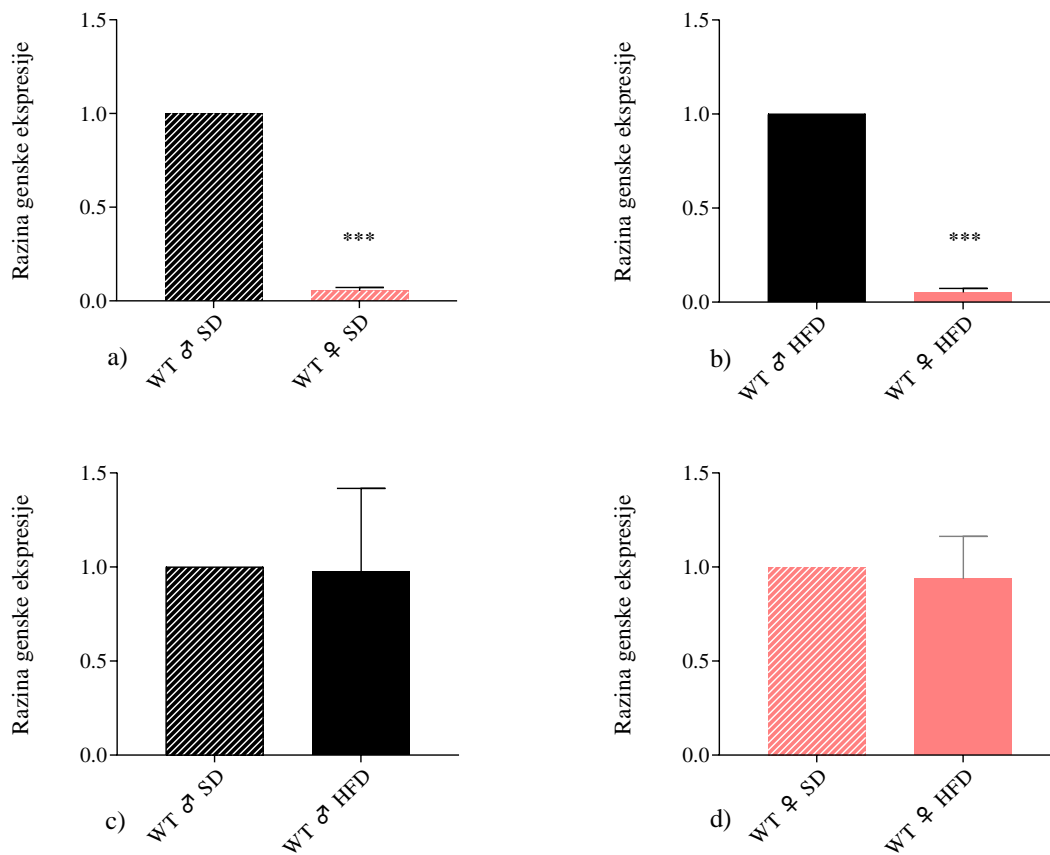
Vezano za spolne razlike, WT mužjaci i *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju značajno povišene razine HDL kolesterola te ukupnog kolesterola u odnosu na WT i *Tff3*^{-/-} ženke, dok LDL kolesterol nije statistički značajno promijenjen između grupa. Nema statistički značajnih razlika ni u razinama ukupnog proteina, uree, urata i ALT enzima. Međutim, razine enzima AST i ALP su povećane u serumu WT ženki u odnosu na WT mužjake, s time da je AST povećan i kod *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na *Tff3*^{-/-} mužjake (Slika 11).



Slika 11. Nakon 9 tjedana visokomasne hrane *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju sniženu razinu triglicerida u serumu u usporedbi sa WT mužjacima. Izmjerene su razine LDL (engl. *low density lipoprotein*) kolesterola, HDL kolesterola (engl. *high density lipoprotein*), ukupnog kolesterola, triglicerida, urata, uree, ukupnih proteina, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) za sve grupe životinje te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (n=5 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Bonferoni post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

4.4. Utjecaj unosa visokomasne hrane i spola na ekspresiju Tff3 gena u jetri C57BL/6N miševa

Ispitana je genska ekspresija *Tff3* u jetri divlji tip C57BL/6N miševa starih 20 tjedana (Slika 12). Usporedba je provedena s obzirom na spol i s obzirom na tretman zbog detekcije potencijalnih razlika u ekspresiji *Tff3* u jetri mužjaka i ženki te mogućih promjena uslijed visokomasne prehrane. Rezultati pokazuju kako je ekspresija *Tff3* gena u jetri ženki izrazito niža u odnosu na mužjake (Slika 12 a i b). Usporedba *Tff3* ekspresije s obzirom na tretman visokomasnom prehranom pokazuje kako nema statistički značajnih razlika ni kod mužjaka, ni kod ženki (Slika 12 c i d). Odnosno, ekspresija *Tff3* gena u jetri se ne mijenja značajno uslijed izlaganja tretmanu visokomasnom hranom.

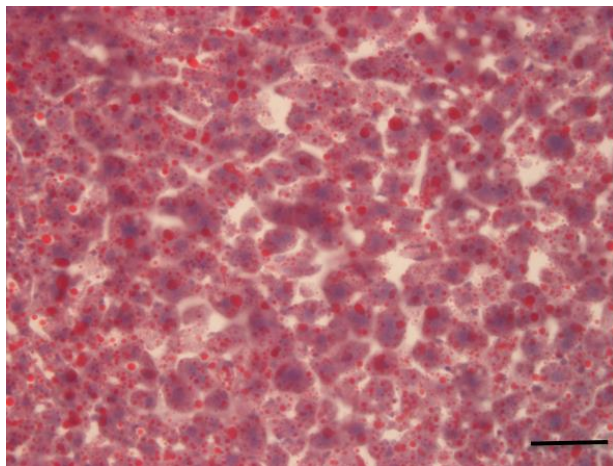


Slika 12. Genska ekspresija Tff3 u jetri C57BL/6N miševa hranjenih standardnom i visokomasnom prehranom. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) WT ženke na standardnoj prehrani (SD) u odnosu na WT mužjake na standardnoj prehrani (SD) (WT mužjak SD=1) b) WT ženke na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT mužjake na visokomasnoj prehrani (HFD) (WT mužjak HFD=1) c) WT mužjaci na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT mužjake na standardnoj prehrani (SD) (WT mužjak SD=1) d) WT ženke na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT ženke na standardnoj prehrani (SD) (WT ženke SD=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću *** $p \leq 0.001$.

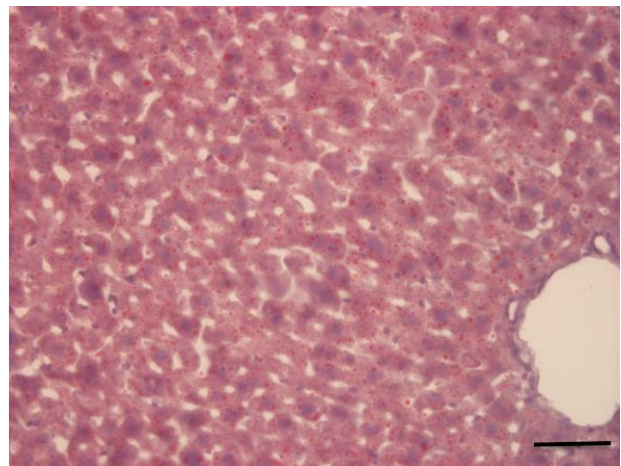
4.5. Utjecaj nedostatka Tff3 proteina na jetru miševa izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani

4.5.1. Oil Red O bojanje

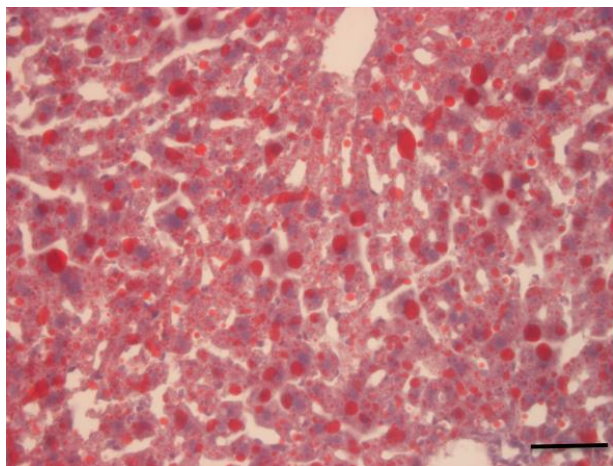
Za ispitivanje mogućih razlika u nakupljanju lipida u tkivu jetre WT i *Tff3*^{-/-} životinja izloženih tretmanu visokomasne hrane, korištena je metoda Oil Red O bojanja koja boja neutralne lipide u tkivu. U jetri *Tff3*^{-/-} životinja oba spola uočena je smanjena veličina lipidnih kapljica u odnosu na WT životinje što ukazuje na smanjeno nakupljanje lipida u jetri (Slika 13).



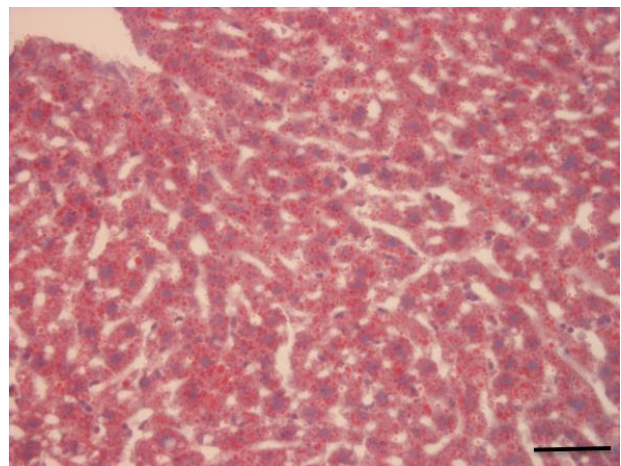
(a) WT mužjak



(b) *Tff3*^{-/-} mužjak



(c) WT ženka



(d) *Tff3*^{-/-} ženka

Slika 13. Vizualizacija lipida pomoću Oil Red O bojanja u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom. Kriorezovi jetre su bojani Oil Red O za vizualizaciju lipida (crveno), a jezgre su obojane hematoksilin bojom (ljubičasto). Mjerilo: 200 μ m.

4.5.2. Analiza sastava masnih kiselina u jetri

S obzirom na važnost masnih kiselina u patogenezi metaboličkih poremećaja pomoću plinske kromatografije je analiziran sastav specifičnih masnih kiselina u jetri životinja hranjenih visokomasnom hranom kroz 9 tjedana. Rezultati analize su prikazani u Tablici 11.

Arahidinska kiselina (C 20:0) je značajno smanjena u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake. U jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke uočeno je više statistički značajnih razlika u sastavu masnih kiselina. Preciznije, linolna (C 18:2, n-6), linolenska (C 18:3, n-6), eikozapentaenoinska (C 20:5, n-3) i dokosapentaenoična (C 22:5, n-3) masna kiselina su značajno smanjene, a gadoleinska kiselina (C 20:1, n-9) je značajno povećana u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Također, ukupan udio omega-3 polinezasićenih masnih kiselina je statistički značajno povećan, dok je omjer omega-6 i omega-3 polinezasićenih masnih kiselina značajno smanjen u jetrama *Tff3*^{-/-} ženki. Ukupan udio masti ukazuje na smanjene razine u jetri *Tff3*^{-/-} miševa oba spola u usporedbi s WT životinjama, iako smanjenje nije statistički značajno.

Vezano za spolne razlike; WT ženke imaju smanjene razine arahidinske (C20:0), dihomo- γ -linolne (C20:3, n-6), eikozapentaeninske (C20:5, n-3) i dokosapentaenoične (C22:5, n-3) masne kiseline u jetri u odnosu na WT mužjake. Uočene su razlike i kod *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na *Tff3*^{-/-} mužjake: snižena razina arahidinske (C 20:0), gadoleinske (C 20:1, n-9), dihomo- γ -linolne (C 20:3, n-6) i omjer omega-6 i omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, a povećana razina dokosapentaenoične (C 22:5, n-6) masne kiseline.

Tablica 11. Analiza sastava masnih kiselina u jetri životinja hranjenih visokomasnom prehranom 9 tjedana

Masne kiseline (g masnih kiselina/100 g jetre)	HFD WT ♂	HFD <i>Tff3</i> ^{-/-} ♂	HFD WT ♀	HFD <i>Tff3</i> ^{-/-} ♀
C 14:0	0.43	0.41	0.42	0.44
C 16:0	25.38	24.58	24.76	25.20
C 16:1	4.06	3.85	3.07	2.88
C 18:0	8.41	9.45	8.76	10.21
C 18:1	32.76	30.45	37.40	31.80
C 18:2, n-6	10.19	11.27	9.27 •	10.47
C 18:3, n-6	0.33	0.37	0.32	0.49
C 18:3, n-3	0.14	0.17	0.12	0.16
C 20:0	0.34 °*	0.27 †	0.03	0.04
C 20:1, n-9	0.56	0.46 †	0.42 •	0.25
C 20:3, n-6	0.91 *	0.97 †	0.60	0.62
C 20:4, n-6	10.00	10.73	8.69	9.81
C 20:5, n-3	0.12 *	0.14	0.07 •	0.13
C 22:4, n-6	0.33	0.32	0.32	0.37
C 22:5, n-6	0.49	0.49 †	0.57	0.62
C 22:5, n-3	0.31 *	0.33	0.16 •	0.28
C 22:6, n-3	4.39	4.78	4.25	5.37
∑ SFA ¹	35.00	35.19	34.35	36.34
∑ MUFA ²	37.47	34.81	40.90	34.96
∑ PUFA ³	27.19	29.68	24.44	28.33
n-6 PUFA	22.14	24.08	19.73	22.13
n-3 PUFA	4.98	5.46	4.63 •	5.99
n-6/n-3 PUFA ⁴	4.59 : 1	4.42 : 1 †	4.29 : 1 •	3.71 : 1
Udio masti (g/100g jetre)	6.50 ± 2.36	5.22 ± 0.24	7.41 ± 1.11	5.96 ± 1.58

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (za udio masti) i analizirani su pomoću protokola *general linear models* (GLM) SAS/STAT modula (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Za statističku analizu korišten je *Tukey–Kramer multiple comparison test*, a značajnost je prikazana na način

- spolne razlike = * - WT♂ u odnosu na WT♀, † - *Tff3*^{-/-} ♂ u odnosu na *Tff3*^{-/-} ♀,
- genotipske razlike = ° WT♂ u odnosu na *Tff3*^{-/-} ♂, • WT♀ u odnosu na *Tff3*^{-/-} ♀

1 zasićene masne kiseline engl. *saturated fatty acids* (SFA); 2 mononezasićene masne kiseline engl. *monounsaturated fatty acids* (MUFA); 3 polinezasićene masne kiseline engl. *polyunsaturated fatty acids* (PUFA); 4 omjer omega -6 and omega -3 polinezasićenih masnih kiselina, engl. *ratio of omega -6 and omega -3 polyunsaturated fatty acids* (n-6/n-3 PUFA)

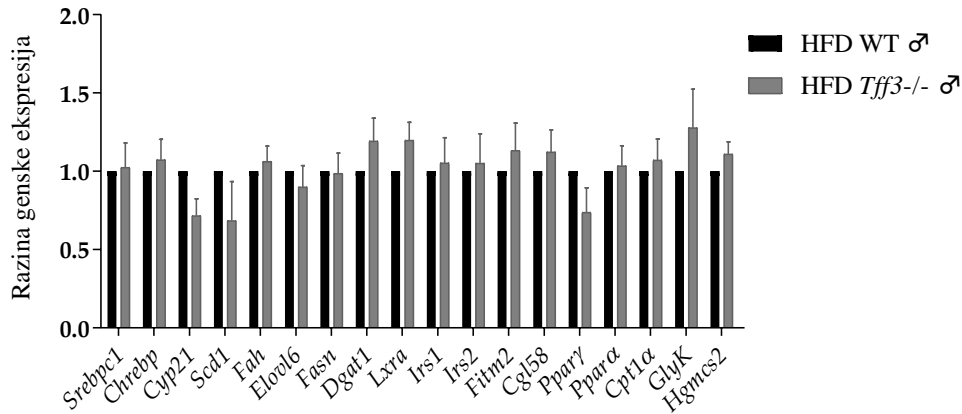
4.5.3. Ekspresija gena uključenih u različite patofiziološke puteve u jetri

Za analiziranje molekularnih mehanizama uočenog fenotipa (razlika u razini i sastavu masnih kiselina u jetri uslijed nedostatka Tff3) na uzorcima jetre WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola provedena je qPCR analiza ekspresije gena uključenih u relevantne patofiziološke procese metaboličkih poremećaja koji su također povezani i s djelovanjem Tff peptida. Dakle, praćeni su markeri metabolizma lipida (Slika 14), upale (Slika 15), stresa endoplazmatskog retikuluma i oksidativnog stresa (Slika 16). Uspoređivane su genske ekspresije između grupa (WT i *Tff3*^{-/-} oba spola) u tkivu jetre životinja izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom. Usporedba genskih ekspresija WT mužjaka u odnosu na WT ženke, te *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke je prikazana u Priritku 6-8.

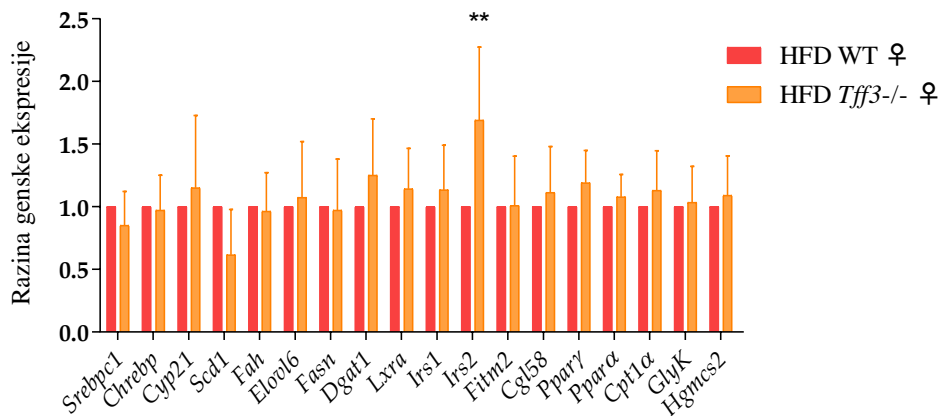
4.5.3.1. Ekspresija gena uključenih u metabolizam lipida

Za ispitivanje potencijalnih razlika u metabolizmu lipida uslijed nedostatka Tff3 u tkivu jetre WT i *Tff3*^{-/-} životinja određena je ekspresija sljedećih gena: engl. *sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (Srebp1)*, engl. *carbohydrate response element-binding protein (Chrebp)*, engl. *cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp21)*, engl. *stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1)*, engl. *fumarylacetoacetate hydrolase (Fah)*, engl. *elongation of long-chain fatty acids family member 6 (Elov6)*, engl. *fatty acid synthase (Fasn)*, engl. *diacylglycerol O-acyltransferase (Dgat1)*; engl. *nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (Lxra)*, engl. *insulin receptor substrate 1 (Irs1)*, engl. *insulin receptor substrate 2 (Irs2)*, engl. *fat storage-inducing transmembrane protein 2 (Fitm2) alpha/beta-hydrolase domain containing 5 (Cgl58)*, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara)*, engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg)*, engl. *glycerol kinase (GlyK)*, engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (Hmgcs2)* i engl. *fatty acid-binding protein 1 (Fabp1)* (Slika 14). Analizirani geni su markeri različitih metaboličkih procesa u jetri koji uključuju β oksidaciju masnih kiselina, proces stvaranja novih masnih kiselina (*de novo* lipogeneza), formaciju lipidnih kapljica, lipolizu, glukoneogenezu i inzulinsko signaliziranje. Deregulacije tih procesa vode do prekomjernog nakupljanja masti u jetri i njihov disbalans može pospješiti razvoj metaboličkih poremećaja. U jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka u usporedbi s WT mužjacima nije bilo statistički relevantnih

razlika (Slika 14a), dok *Tff3*^{-/-} ženke imaju statistički značajno povećanu razinu *Irs2* gena u odnosu na WT ženke (Slika 14b).



a)



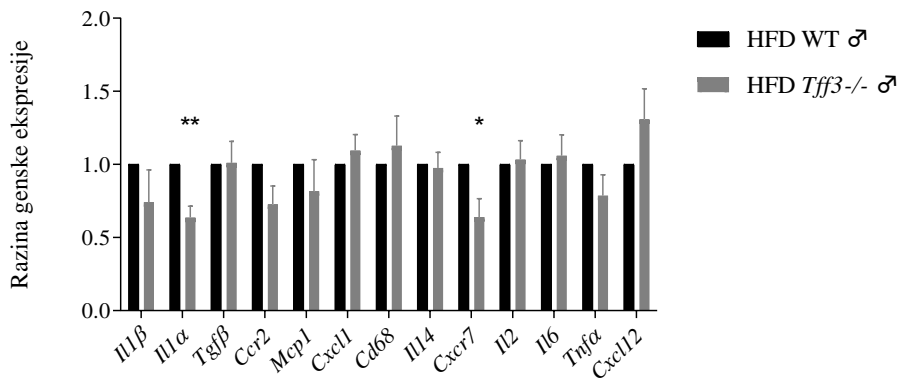
b)

Slika 14. Genska ekspresija markera uključenih u metabolizam lipida u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću ** $p \leq 0.01$.

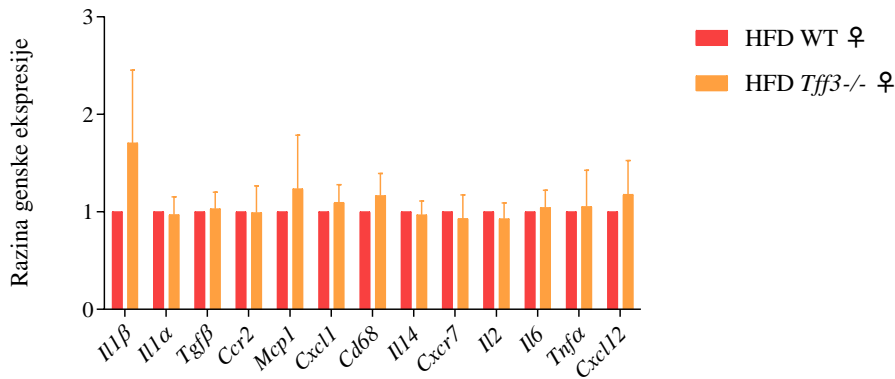
Nazivi gena na engleskom jeziku: *Srebp1*—sterol regulatory element-binding transcription factor 1; *Chrebp*—carbohydrate response element-binding protein; *Cyp21*—cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1; *Scd1*- stearoyl-CoA desaturase 1, *Fah*- fumarylacetoacetate hydrolase, *Elovl6*- elongation of long-chain fatty acids family member 6; *Fasn*- fatty acid synthase; *Dgat1*—diacylglycerol O-acyltransferase; *Lxra*- nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; *Irs1*—insulin receptor substrate 1; *Irs2*—insulin receptor substrate 2;; *Fitm2*—fat storage-inducing transmembrane protein 2; *Cgl58*—alpha/beta-hydrolase domain containing 5; *Ppara*—peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *Pparγ*—peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Glyk*—glycerol kinase; *Hgmcs2*—3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase *Fabp1*—fatty acid-binding protein 1

4.5.3.2 Ekspresija gena uključenih u upalne procese

Budući da je poznato da je povećano upalno stanje patofiziološka značajka metaboličkih poremećaja, a Tff3 je prethodno povezan sa imunološkim sustavom, u tkivu jetre WT i *Tff3*^{-/-} životinja oba spola određena je ekspresija sljedećih gena uključenih u upalu: engl. *interleukin 1 beta (Il-1β)*, engl. *interleukin 1 alpha (Il-1α)*, engl. *tumor growth factor beta (Tgfb)*, engl. *chemokine (C-C motif) receptor 2 (Ccr2)*, engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2 (Mcp1)*, engl. *C-X-C motif chemokine ligand 1 (Cxcl1)*, engl. *mouse CD68 antigen (Cd68)*, engl. *interleukin 14 (Il-14)*, engl. *atypical chemokine receptor 3 (Cxcr7)*, engl. *interleukin 2 (Il-2)*, engl. *interleukin 6 (Il-6)*, engl. *tumour necrosis factor alpha (Tnfa)* i engl. *C-X-C motif chemokine ligand 12 (Cxcl12)* (Slika 15). Analizirani citokini i kemokini su povezani s patogenezom metaboličkih poremećaja. *Tff3*^{-/-} mužjaci pokazuju sniženu razinu *Il1α* i *Cxcr7* u odnosu na WT mužjake (Slika 15a), dok kod *Tff3*^{-/-} ženki nema uočenih statistički značajnih razlika (Slika 15b).



a)

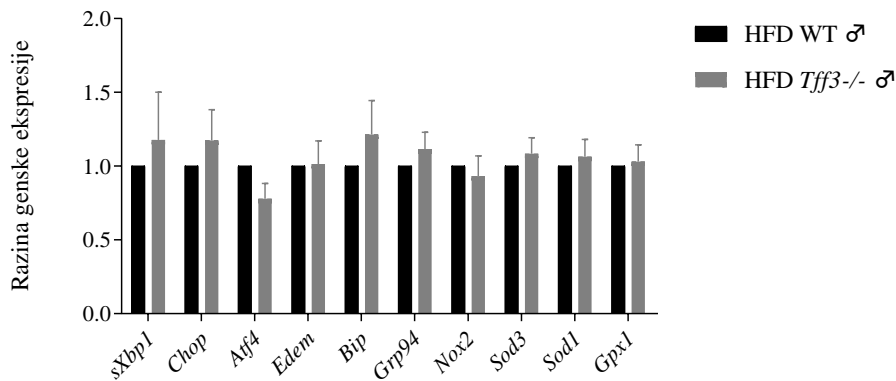


b)

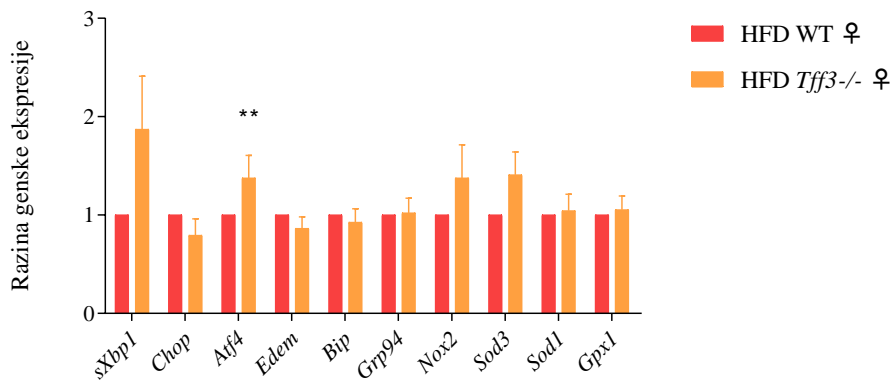
Slika 15. Genska ekspresija markera upale u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1) (n=5 miševa po grupi). Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Nazivi gena na engleskom jeziku: *Il-1β*—interleukin 1 beta ; *Il-1α*—interleukin 1 alpha; *Tgfb*—tumor growth factor beta; *Ccr2*—chemokine (C-C motif) receptor 2; *Mcp1*- chemokine (C-C motif) ligand 2; *Cxcl1*— C-X-C motif chemokine ligand 1; *Cd68*—mouse CD68 antigen; *Il-14*—interleukin 14; *Cxcr7*—atypical chemokine receptor 3; *Il-2*- interleukin 2; *Il-6*—interleukin 6, *Tnfa*—tumour necrosis factor alpha; *Cxcl12*— C-X-C motif chemokine ligand 12

4.5.3.3. Ekspresija gena uključenih u stres endoplazmatskog retikuluma i oksidativni stres

Osim upale, važne značajke patofiziologije metaboličkih procesa su i stres endoplazmatskog retikuluma i oksidativni stres. Stoga je u tkivu jetre WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola uspoređena ekspresija niza gena uključenih u stres endoplazmatskog retikuluma (engl. *spliced X-box binding protein 1 (Sxbp1)*, engl. *C/EBP-homologous protein (Chop)*, engl. *activating transcription factor 4 (Atf4)*, engl. *ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein (Edem)*, engl. *binding immunoglobulin protein (Bip)*, engl. *glucose-regulated protein 94 (Grp94)*) i oksidativni stres (engl. *NADPH oxidase 2 (Nox2)*, engl. *superoxide dismutase 3 (Sod3)*, engl. *superoxide dismutase 1 (Sod1)* i engl. *glutathione peroxidase 1 (Gpx1)*) (Slika 16). *Tff3*^{-/-} mužjaci ne pokazuju statistički značajne razlike u genskoj ekspresiji ovih markera u odnosu na WT mužjake (Slika 16a). U jetri *Tff3*^{-/-} ženki povećana je razina *Atf4* gena u odnosu na WT ženke (Slika 16b).



a)



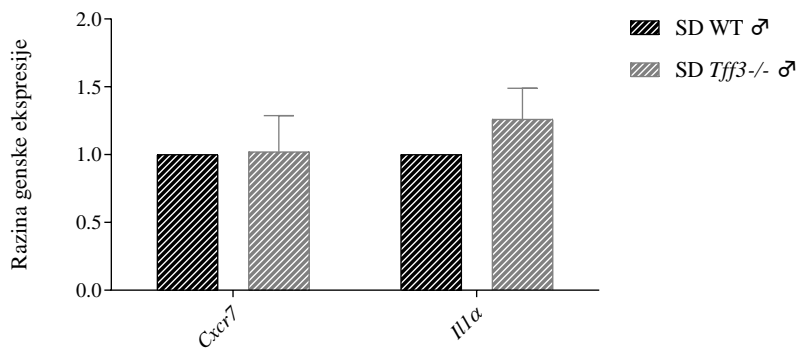
b)

Slika 16. Genska ekspresija markera stresa endoplazmatkog retikuluma i oksidativnog stresa u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću ** p ≤ 0.01.

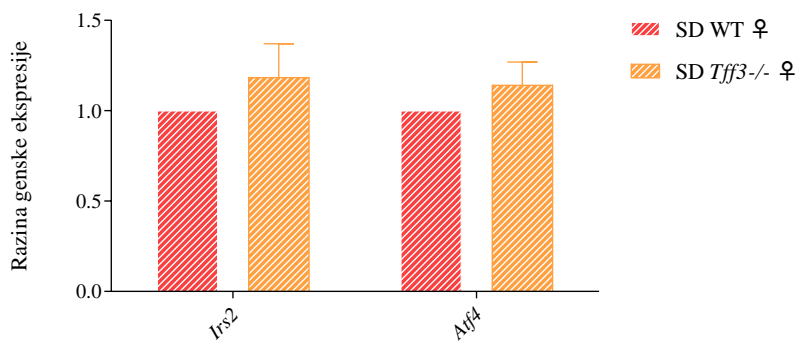
Nazivi gena na engleskom jeziku: *sXbp1* – spliced X-box binding protein 1; *Chop* - C/EBP-homologous protein, *Atf4* - activating transcription factor 4; *Edem* - ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein; *Bip* - binding immunoglobulin protein ; *Grp94* - glucose-regulated protein 94; *Nox2*—NADPH oxidase 2 ;*Sod3*— superoxide dismutase 3; *Sod1*— superoxide dismutase 1; *Gpx1*- glutathione peroxidase 1

4.5.3.4. Analiza genske ekspresije u jetri životinja na standardnoj hrani

Geni čija je ekspresija statistički značajno promijenjena u jetri *Tff3*^{-/-} životinja izloženih visoko masnoj prehrani (*Cxcr7*, *Il1* kod mužjaka i *Irs2* i *Atf4* kod ženki), analizirani su i u jetri kontrolnih životinja hranjenih standardnom hranom. Analiza je provedena kako bi ispitali je li promijenjena ekspresija posljedica genotipskih razlika već u standardnim uvjetima, ili se promjene javljaju uslijed izlaganja visokomasnoj hrani. U tkivu jetre kontrolnih životinja izloženih standardnoj prehrani nema statistički značajnih promjena u ekspresiji analiziranih markera što ukazuje kako do promjene u ekspresiji dolazi uslijed tretmana visokomasnom hranom (Slika 17).



a)



b)

Slika 17. Genska ekspresija *Cxcr7*, *Il1a*, *Irs2* i *Atf4* u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola, starosti 20 tjedana izloženih standardnoj prehrani (engl. SD). Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženka=1).

Nazivi gena na engleskom jeziku: *Cxcr7*—atypical chemokine receptor 3 *Il-1a*—interleukin 1 alpha; *Irs2*—insulin receptor substrate 2; *Atf4* - activating transcription factor 4.

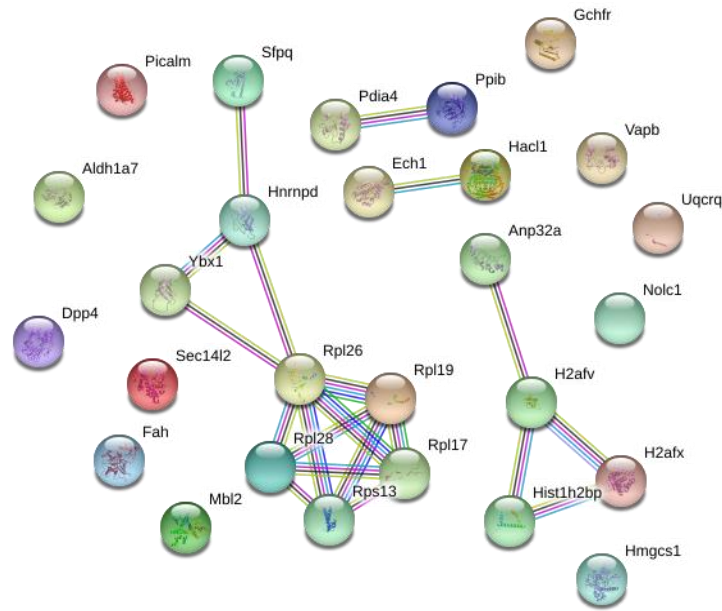
4.5.4. Analiza ukupnog proteoma jetre WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom

Koristeći LC MS/MS analizu ispitan je utjecaj nedostatka *Tff3* na ukupni proteom jetre miševa oba spola izloženih tretmanu visokomasnom hranom kroz 9 tjedana. Nakon korištenja statističkog alata FDR s granicom od 5% nije bilo značajnih promjena u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake. U jetri *Tff3*^{-/-} ženki je identificirano ukupno 28 proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u odnosu na WT kontrole (Tablica 12). Upotrebom engl. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) programskog alata analizirane su interakcije promijenjenih proteina i izrađen je njihov slikovni prikaz (Slika 18) [178]. STRING analizom su identificirane četiri proteinske mreže od kojih jedna uključuje ribosomalne proteine (engl. *60s ribosomal protein L17* (Rpl17), engl. *60s ribosomal protein L19* (Rpl19), engl. *60s ribosomal protein L26* (Rpl26), engl. *60s ribosomal protein L28* (Rpl28) i engl. *small ribosomal subunit protein S13* (Rsp13)) u interakciji s engl. *Y-box binding proteinom* (Ybx1), engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0* (Hnrnpd) i engl. *splicing factor, proline and glutamine rich protein* (Sfpq) koji su pojačano eksprimirani u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Druga mreža obuhvaća proteine iz porodice histona (engl. *histone h2b type 1-P* (Hist1h2bp), *histone h2a.v* (H2afv), *histone h2ax* (H2afx)) te engl. *acidic nuclear phosphoprotein pp32* (Anp32a) koji su također pojačano eksprimirani u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Osim navedenih proteina, ostatak proteina identificiran kao značajno promijenjen je naveden u Tablici 12 te prikazan na Slici 18.

Tablica 12. Rezultati LC MS/MS analize – proteini sa značajno promijenjenom ekspresijom u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke izložene visokomasnoj prehrani kroz 9 tjedana

p vrijednost	FDR	engl. naziv proteina (kratica korištena u STRING programskom alatu)	stopa promjene
0,002	0,046	ribosomal protein L19 (Rpl19)	1,491
0,002	0,046	histone H2B type 1-P isoform 1 (Hist1h2bp)	1,341
0,002	0,046	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Nolc1)	1,334
0,002	0,046	histone H2afv (H2afv)	1,331
0,002	0,046	60S ribosomal protein L28 isoform X1 (Rpl28)	1,327
0,002	0,046	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) (Sfpq)	1,314
0,002	0,046	nuclease-sensitive element-binding protein 1 isoform X1 (Ybx1)	1,305
0,002	0,046	signal recognition particle subunit (Srp27)	1,264
0,002	0,046	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII (Uqcrc)	1,264
0,002	0,046	ribosomal proteinL26 (Rpl26)	1,261
0,002	0,046	mannose-binding protein C precursor (Mbl2)	1,247
0,002	0,046	histone H2A.X (H2afx)	1,215
0,002	0,046	ribosomal protein (Rpl17)	1,186
0,002	0,046	acidic nuclear phosphoprotein pp32 (Anp32a)	1,182
0,002	0,046	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AU-rich element RNA-binding protein 1 (Hnrnpd)	1,151
0,002	0,046	ribosomal protein S13 (Rsp13)	1,117
0,002	0,046	vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C (Vapb)	1,107
0,002	0,046	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal (Ech1)	1,082
0,002	0,046	protein disulfide-isomerase A4 isoform 1 precursor (Pdia4)	1,073
0,002	0,046	peptidylprolyl isomerase B (Ppib)	1,073
0,002	0,046	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (Picalm)	1,055
0,002	0,046	sec14-like protein 2 (Sec14l2)	0,920
0,002	0,046	dipeptidyl peptidase 4 isoform 1 (Dpp4)	0,914
0,002	0,046	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 (Hac11)	0,911
0,002	0,046	fumarylacetoacetase hydrolase (Fah)	0,895
0,002	0,046	gtp cyclohydrolase I feedback regulator (Gchfr)	0,820
0,002	0,046	aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1 (Aldh1a7)	0,808
0,002	0,046	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (Hmgcs1)	0,792

Analiza je izvršena pomoću SEQUEST algoritma i Proteome Discoverer softverskog programa. Za statističku analizu korištena je granica od 5% FDR, izračunata pomoću Percolator algoritma, a neupareni t-test je korišten za računanje p-vrijednosti, te je potom primijenjena Benjamini-Hochber korekcija.

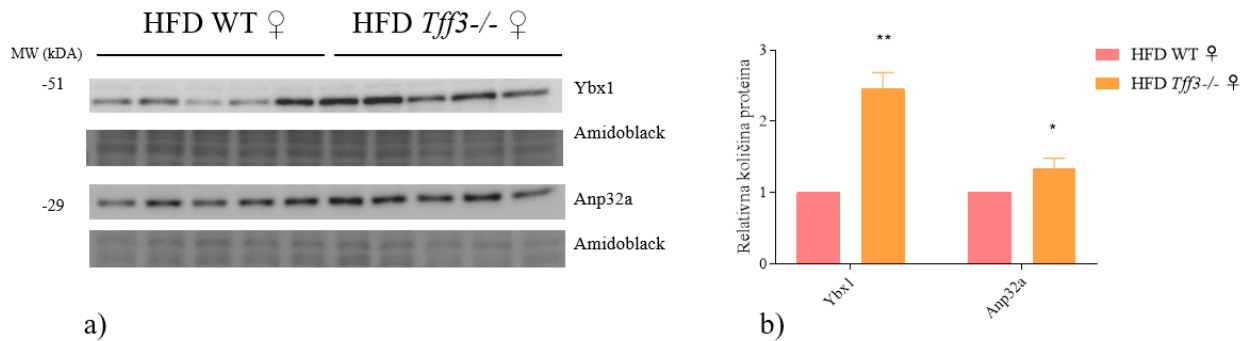


Slika 18. Shematski prikaz interakcija proteina koji su statistički značajno promijenjeni u jetri *Tff3*-/- ženki u usporedbi s WT ženkama na visokomasnoj prehrani. Interakcije su vizualizirane koristeći programski alat STRING [178], a proteini su označeni imenima iz STRING baze:

Nazivi proteina na engleskom jeziku (abecednim redom): Aldh1a7-aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1; Anp32a-acidic nuclear phosphoprotein pp32; Dpp4-dipeptidyl peptidase 4 isoform 1; Ech1-Enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal; Fah-Fumarylacetoacetase hydrolase; Gchfr-GTP cyclohydrolase I feedback regulator; H2afv-Histone H2afv; H2afx-Histone H2A.X; Hac1-2-hydroxyacyl-CoA lyase 1; Hist1h2bp-histone H2B type 1-P isoform 1; Hmgcs1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1;Hnrnpd -Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein AU-rich element RNA-binding protein 1;Mbl2-mannose-binding protein C precursor; Nolc1 -Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1; Pdia4-protein disulfide-isomerase A4 isoform 1 precursor; Picalm-phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; Ppib-peptidylprolyl isomerase B;Rpl17-ribosomal protein;Rpl19-ribosomal protein L19; Rpl26-60S ribosomal protein L26;Rpl28-60S ribosomal protein L28 isoform X1; Rsp13-Ribosomal protein S13 ;Sec14l2-SEC14-like protein 2;Sfpq-Splicing factor proline/glutamine rich polypyrimidine tract binding protein associated; Srp27-signal recognition particle subunit; Uqcrc-ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII; Vapb-Vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C; Ybx1- Y-box binding protein

4.5.4.1. Analiza proteinske ekspresije Ybx1 i Anp32a

Proteomska analiza je ukazala na pojačanu ekspresiju proteina Ybx1 i Anp32a u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Za provjeru i validaciju rezultata proteomike korištena je Western blot metoda te je potvrđena povećana ekspresija navedenih markera u jetri *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnom hranom u odnosu na WT ženke (Slika 19).

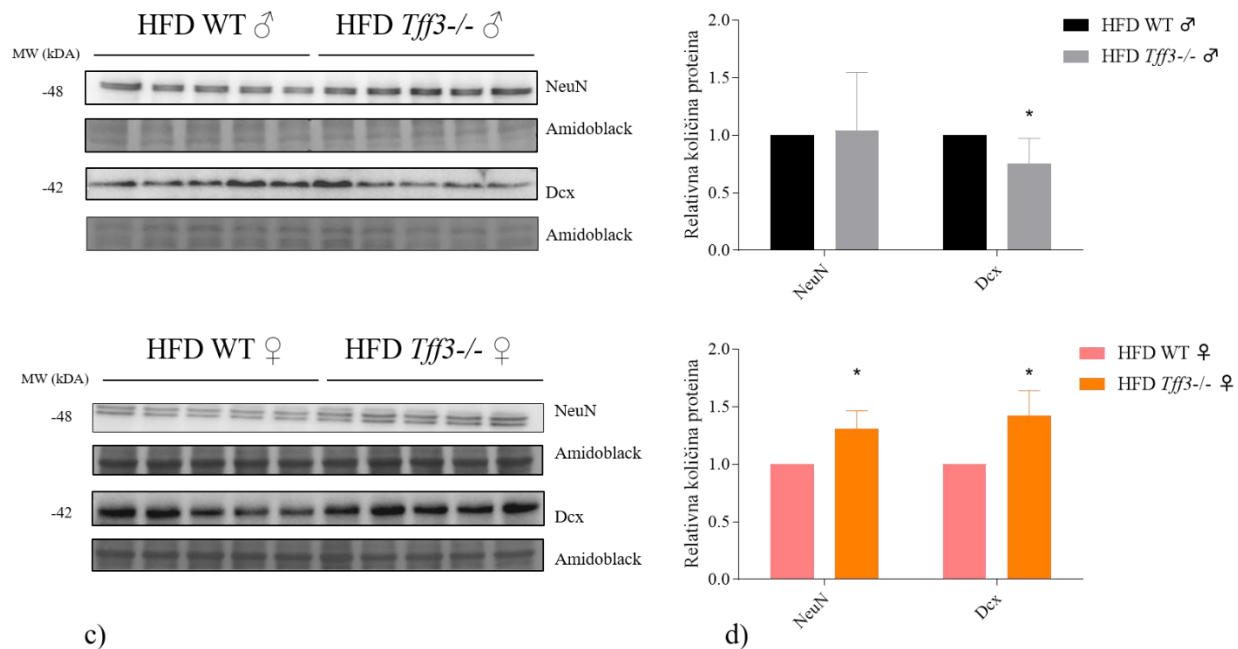


Slika 19. Razina Ybx1 i Anp32a proteina je značajno povećana u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Izolirani su proteini iz tkiva jetre miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina jetre iz 1 životinje). a) razina proteina Ybx1 i Anp32a u jetri WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

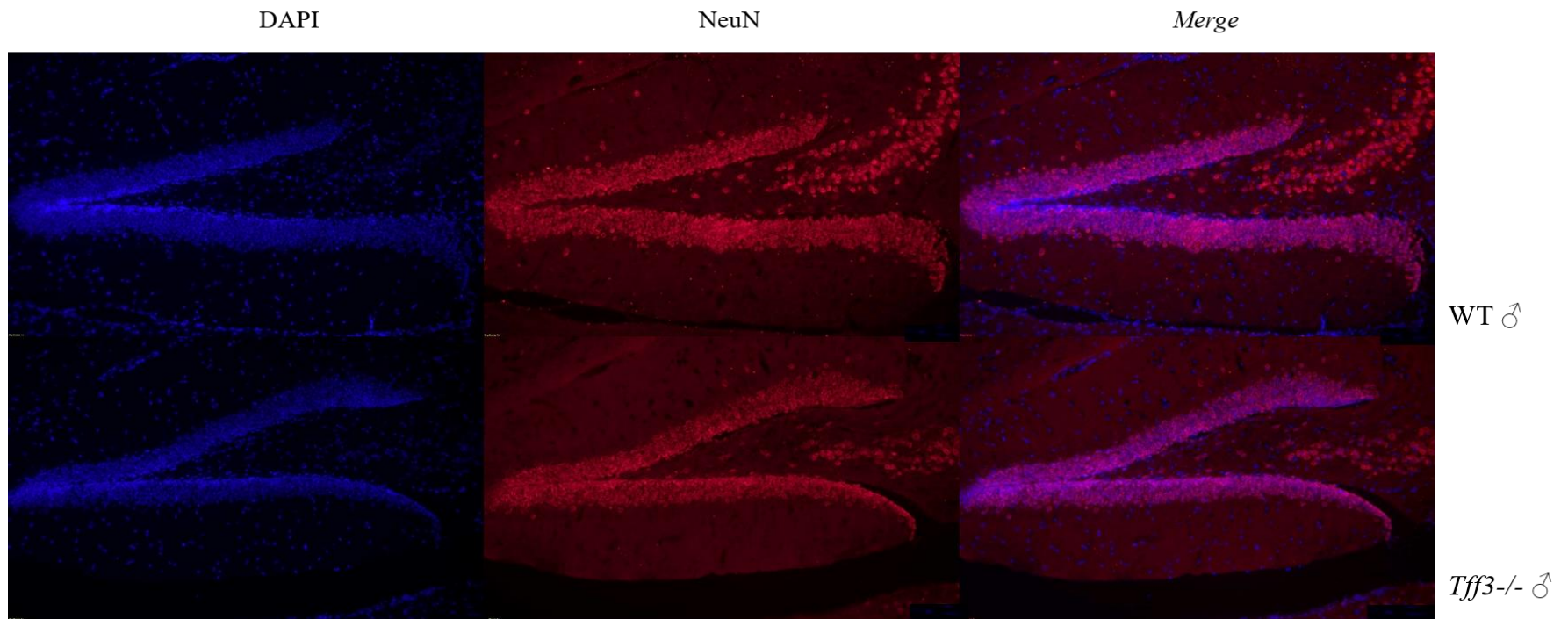
4.7. Utjecaj nedostatka Tff3 na hipokampus životinja izloženih kratkotrajnoj visokomasnoj prehrani

4.7.1. Razina i vizualizacija markera zrelih (NeuN) i nezrelih neurona (Dcx) u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani

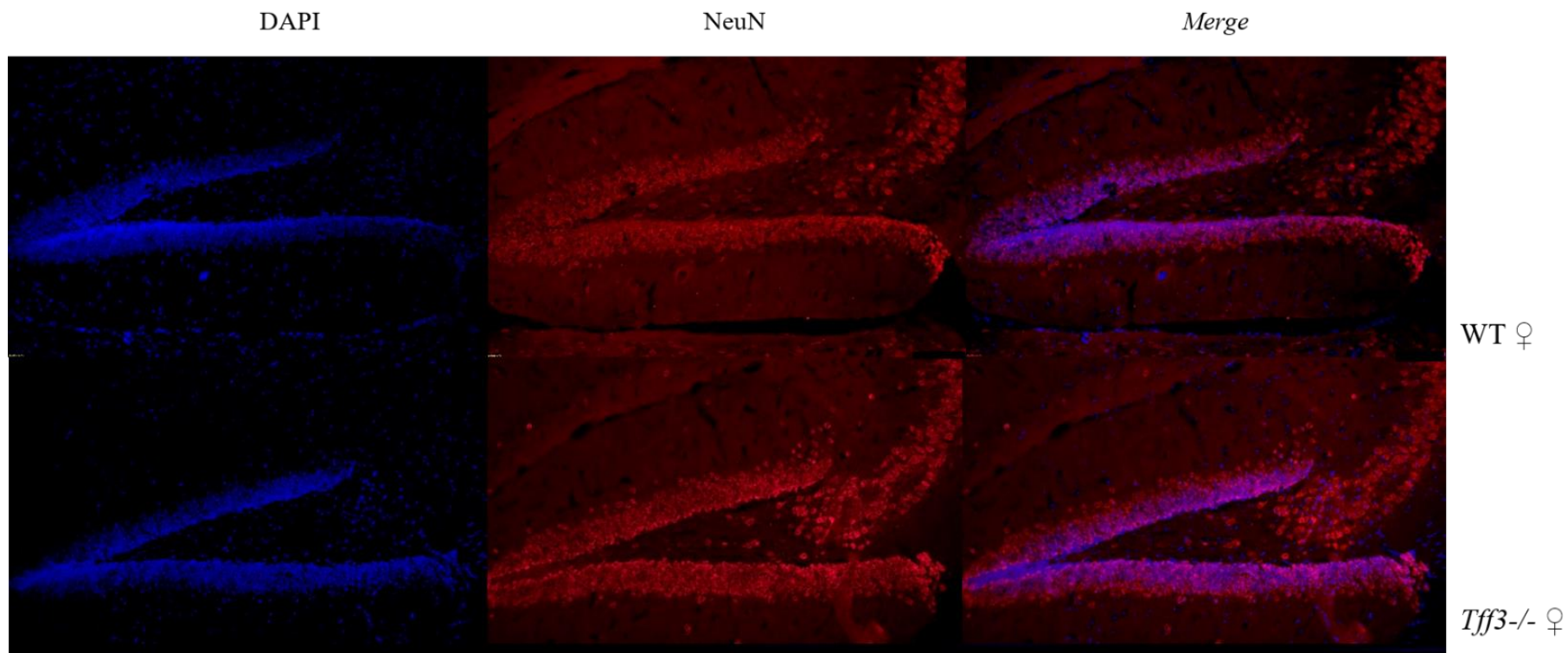
Tff3 je eksprimiran u embrionalnom živčanom tkivu što ukazuje na moguću funkciju u razvoju živčanog sustava te je poznata njegova uloga u pokretanju migracije u epitelnim stanicama. S obzirom da je proces migracije od vitalne važnosti za razvoj novih neurona pretpostavljena je moguća uloga Tff3 i u adultnoj neurogenezi u hipokampusu. Stoga su ispitane razine markera neurogeneze u hipokampusu *Tff3*^{-/-} i WT životinja oba spola izloženih visokomasnoj prehrani. Dcx eksprimiraju nezreli neuroni i koristi se kao marker adultne neurogeneze, dok se engl. *Neuronal nuclear protein* (NeuN) koristi kao marker zrelih neurona. Ispitana je razina Dcx i NeuN proteina u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj hrani pomoću Western blot metode (Slika 20). *Tff3*^{-/-} mužjaci pokazuju značajno sniženu ekspresiju Dcx proteina u odnosu na WT mužjake, dok nema značajne razlike u NeuN markeru (Slika 20 a i b). Međutim, *Tff3*^{-/-} ženke u hipokampusu imaju povećanu ekspresiju oba markera (NeuN i Dcx) u odnosu na WT ženke (Slika 20 c i d). Dodatno, kako bi ispitali postoje li razlike u distribuciji i morfologiji analiziranih staničnih tipova provedena je imunohistokemijska analiza i pomoću imunofluorescencije su vizualizirani navedeni markeri u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa. Nisu primijećene očite razlike u distribuciji i morfologiji neurona (NeuN) i nezrelih neurona (Dcx), a čini se kako intenzitet signala prati rezultate dobivene Western blot metodom (Slika 21, Slika 22, Slika 23 i Slika 24).



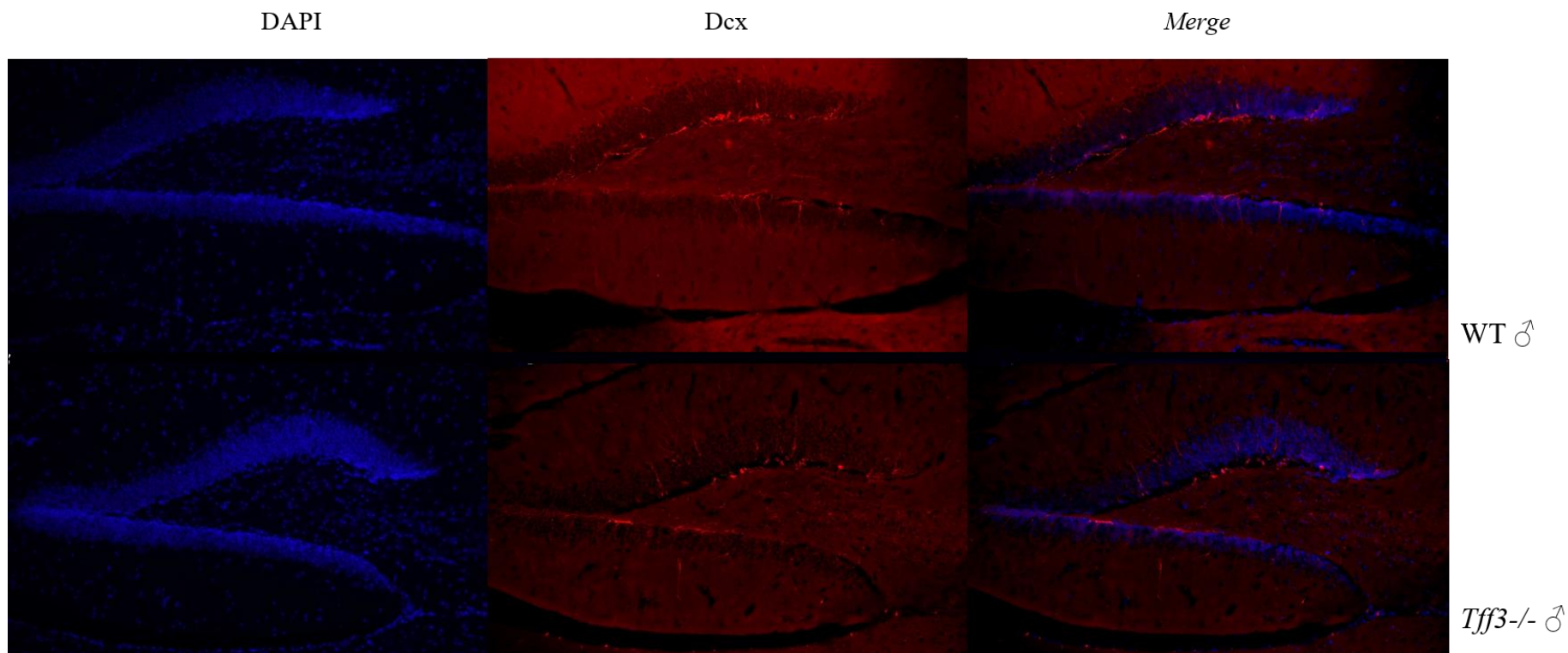
Slika 20. Razina NeuN i Dcx proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} miševa oba spola u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak hipokampusa iz 1 životinje). a) razina proteina NeuN i Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. c) razina proteina NeuN i Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$.



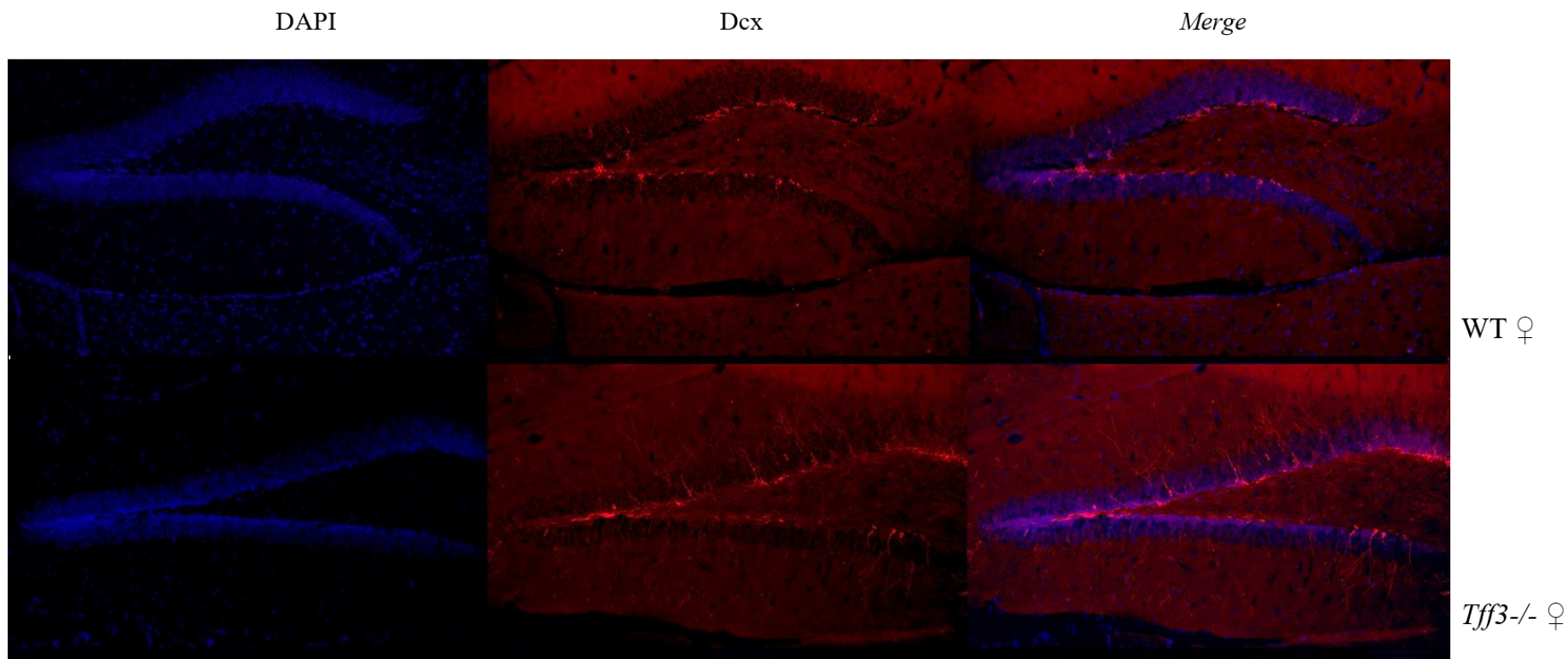
Slika 21. Imunohistokemijska analiza markera NeuN u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgova su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera zrelih neurona (NeuN) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali NeuN (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



Slika 22. Imunohistokemijska analiza markera NeuN u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera zrelih neurona (NeuN) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali NeuN (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



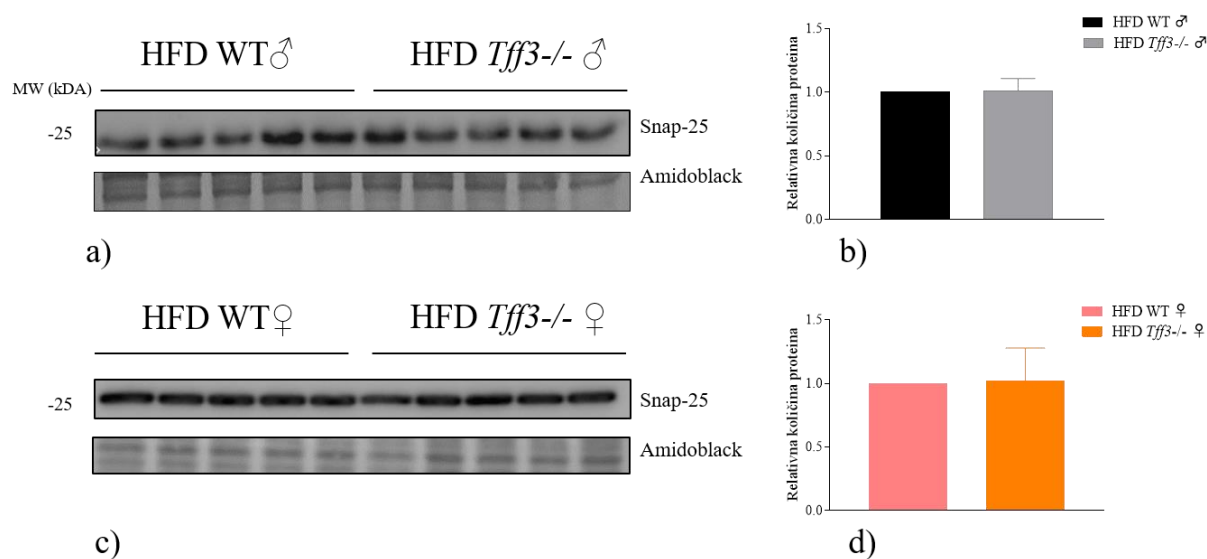
Slika 23. Imunohistokemijska analiza markera Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera nezrelih neurona (Dcx) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Dcx (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



Slika 24. Imunohistokemijska analiza markera Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera nezrelih neurona (Dcx) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Dcx (crveno) su preklapljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

4.7.1.2. Razina proteinske ekspresije Snap-25 u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani

Analizirana je proteinska razina markera sinaptičke funkcije engl. *Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa* (Snap-25) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa izloženih visokomasnoj prehrani koristeći Western blot metodu (Slika 25). Protein Snap-25 se koristi kao marker sinaptičke funkcije te ima ulogu i u procesima adultne neurogeneze. U hipokampusu analiziranih grupa miševa (WT i *Tff3*^{-/-} miševi oba spola) nema značajnih razlika u razinama Snap25 proteina između WT i *Tff3*^{-/-} životinja (Slika 25).

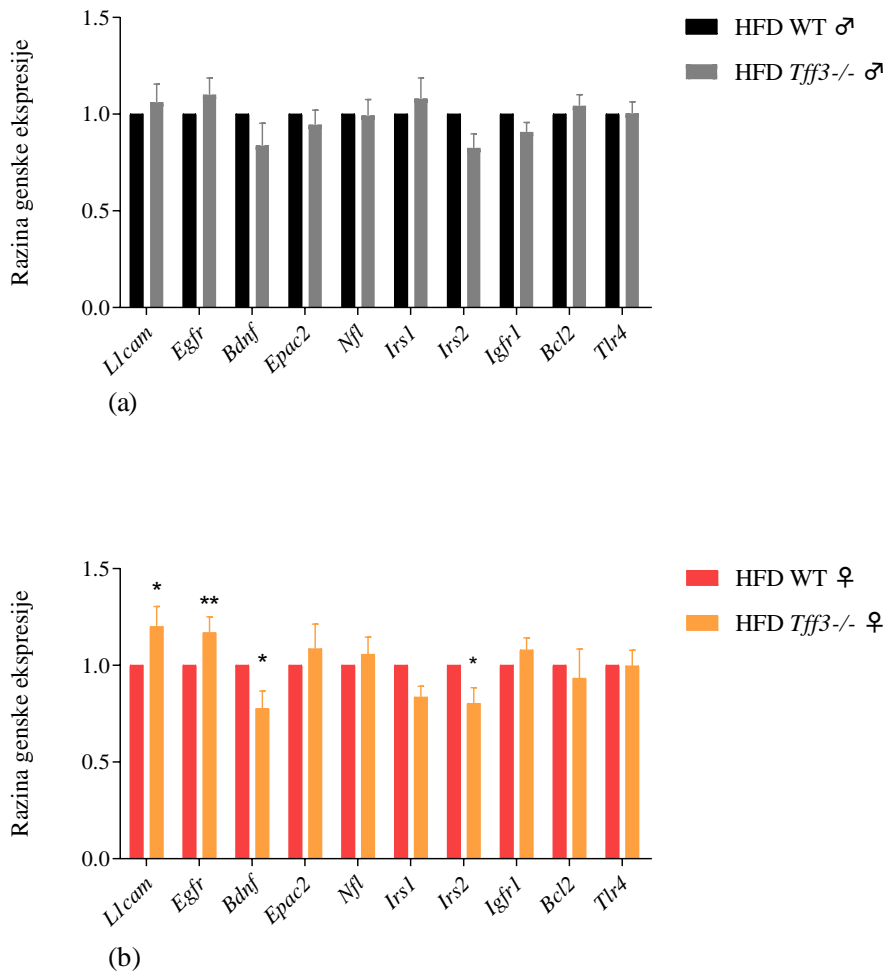


Slika 25. Razina Snap-25 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusu iz 1 životinje). a) razina proteina Snap-25 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja c) razina proteina Snap-25 hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

4.7.1.3. Ekspresija gena uključenih u neurogenezu u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani

Nadalje, zbog uočene razlike u razini markera nezrelih neurona (Dcx) i zrelih neurona (NeuN) kod *Tff3*^{-/-} životinja u odnosu na WT životinje analizirana je ekspresija sljedećih gena uključenih u procese neurogeneze u hipokampusu: engl. *L1 cell adhesion molecule (L1cam)*, engl. *epidermal growth factor receptor (Egfr)*, engl. *brain derived neurotrophic factor (Bdnf)*, engl. *rap guanine nucleotide exchange factor (Epac2)*, engl. *neurofilament light polypeptide (Nfl)*, engl. *insulin receptor substrate 1 (Irs1)*, engl. *insulin receptor substrate 2 (Irs2)*, engl. *insulin growth factor I receptor (igfr1)*, engl. *chemokine (C-C motif) receptor 2 (Ccr2)*, engl. *apoptosis regulator Bcl-2 (Bcl2)* i engl. *toll-like receptor 4 (Tlr4)* (Slika 26 i Privitak 9).

Tff3^{-/-} mužjaci nisu imali značajnih razlika u genskoj ekspresiji analiziranih markera u hipokampusu u odnosu na WT mužjake (Slika 26a), dok je kod *Tff3*^{-/-} ženki uočena značajna promjena u nekoliko analiziranih markera (Slika 26b). Preciznije, povećana je ekspresija *L1cam* i *Egfr*, dok je smanjena ekspresija *Bdnf* i *Irs2* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke izložene kratkotrajnom tretmanu visokomasnoj prehrani (Slika 26b).

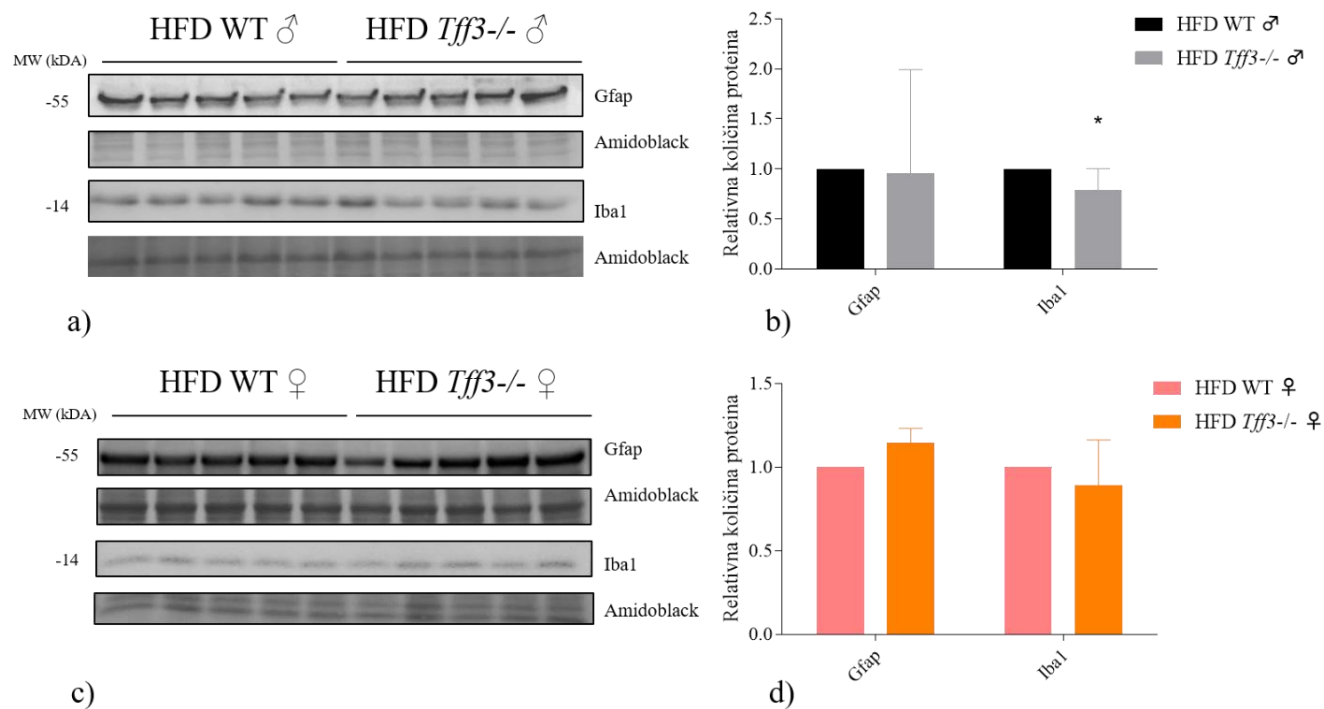


Slika 26. Genska ekspresija markera adultne neurogeneze u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo hipokampusu iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

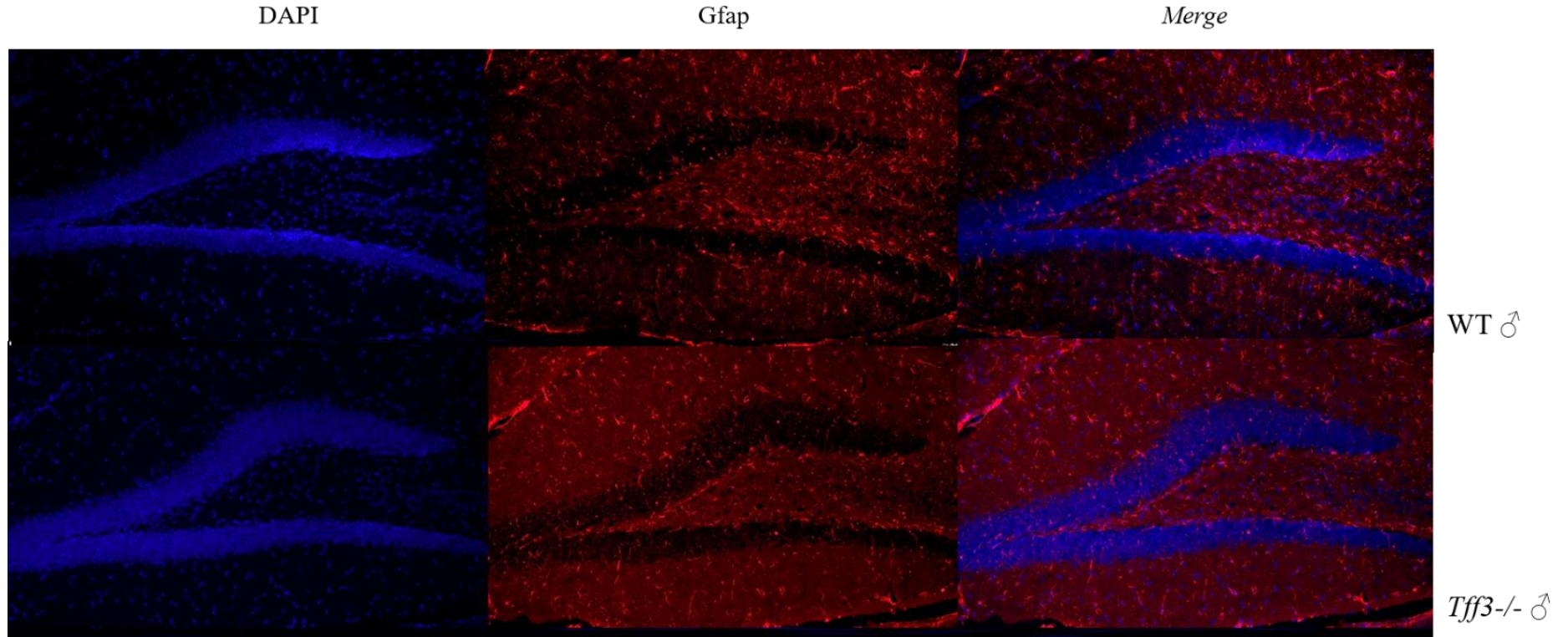
Nazivi gena na engleskom: *L1cam*– L1 cell adhesion molecule; *Egfr* – epidermal growth factor receptor; *Bdnf* - brain derived neurotrophic factor; *Epac2* - rap guanine nucleotide exchange factor (GEF); *Nfl* - neurofilament light polypeptide; *Irs1*- insulin receptor substrate 1; *Irs2*—insulin receptor substrate 2; *Igfr1*—insulin growth factor I receptor; *Ccr2* - chemokine (C-C motif) receptor 2; *Bcl2*— apoptosis regulator Bcl-2; *Tlr4*— toll-like receptor 4

4.7.2. Razina i vizualizacija markera astrocita (Gfap) i mikroglia (Iba1) u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani

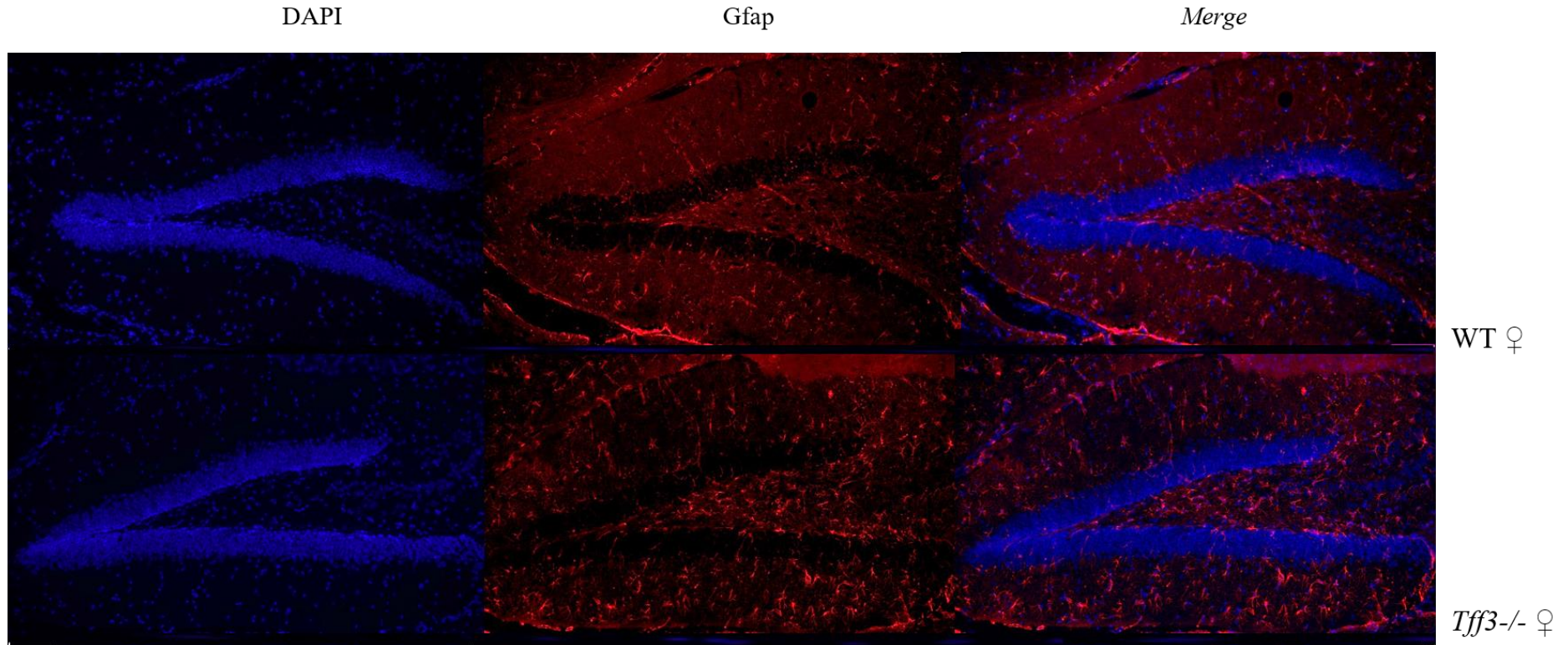
Osim neurona, analizirana je i proteinska ekspresija drugih glavnih tipova stanica živčanog sustava (astrocita i mikroglia). Kao marker astrocita koristi se protein engl. *glial fibrillary acidic protein* (Gfap), dok je marker mikroglia Iba1. Oba tipa stanica su od vitalne važnosti za homeostazu imunskog sustava SŽS, a njihova disfunkcija je povezana s patofiziologijom različitih neurodegenerativnih poremećaja. *Tff3*^{-/-} mužjaci nisu pokazali razlike u razini Gfap (Slika 27 a i b), međutim značajno je snižena razina Iba1 proteina u odnosu na WT mužjake (Slika 27 a i b). U hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki nema značajnih razlika u proteinskoj ekspresiji Gfap i Iba1 u odnosu na WT ženke (Slika 27 c i d). Dodatno, astrociti (Gfap) i mikroglia (Iba1) su vizualizirani pomoću imunofluorescencije kako bi ispitali postoje li uočljive razlike u njihovoj morfologiji i lokalizaciji između WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola te analiza nije ukazala na očite razlike (Slika 28, Slika 28, Slika 30 i Slika 31).



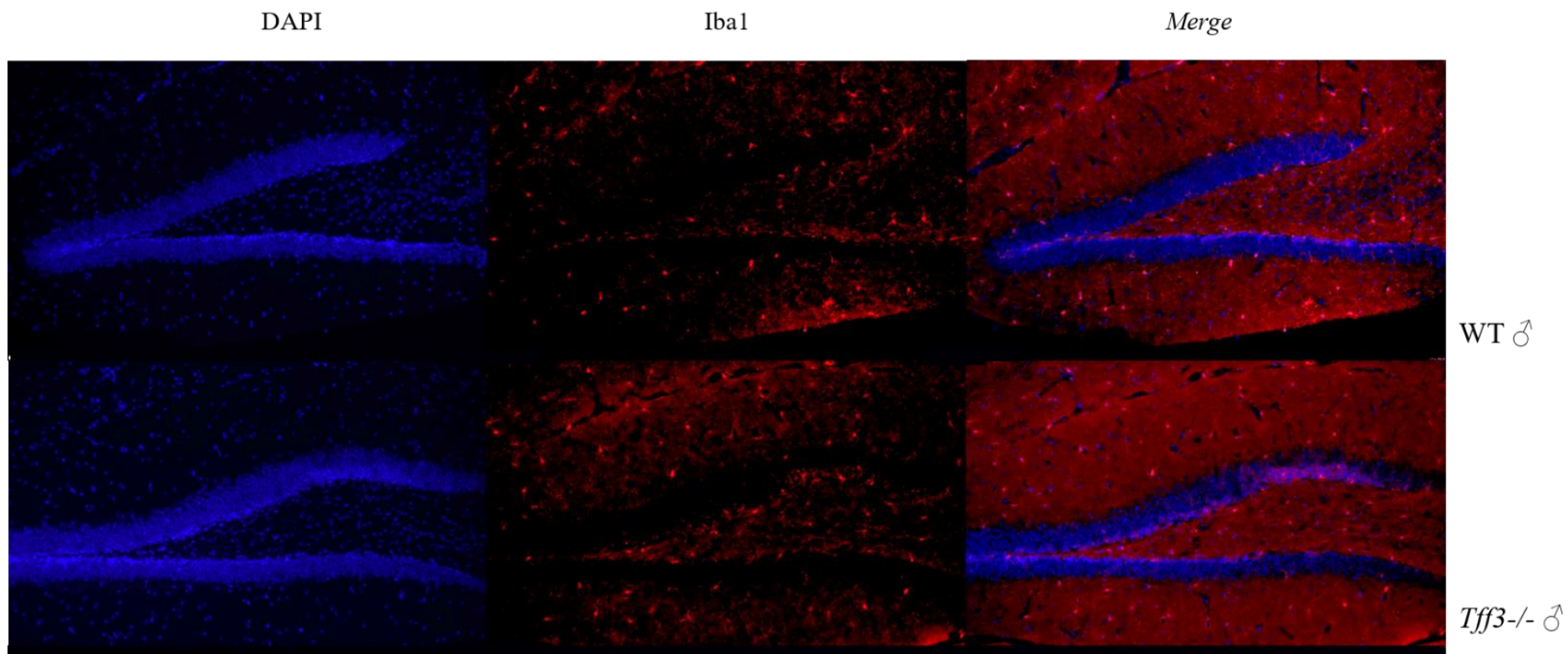
Slika 27. Razina Gfap i Iba1 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusu iz 1 životinje). a) razina proteina Gfap i Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja c) razina proteina Gfap i Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * p < 0.05.



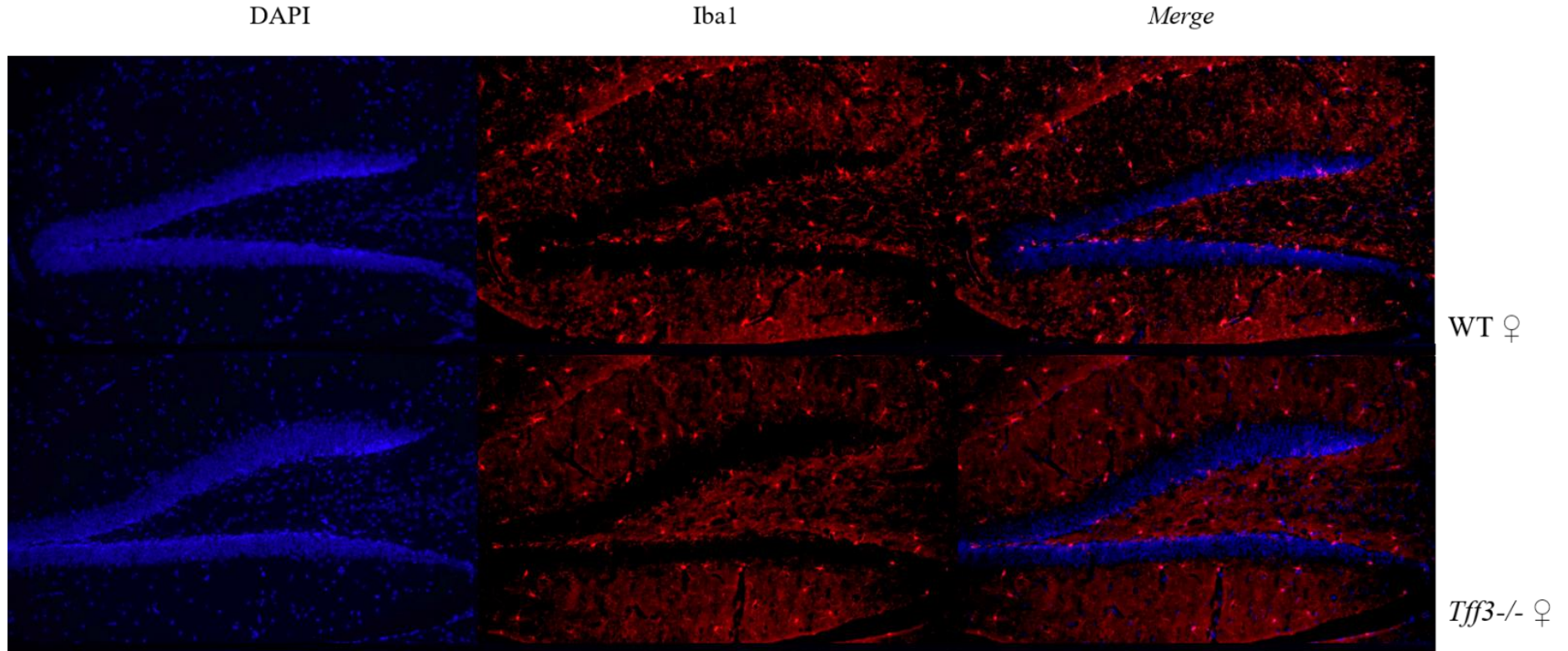
Slika 28. Imunohistokemijska analiza markera Gfap u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera astrocita (Gfap) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Gfap (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



Slika 29. Imunohistokemijska analiza markera Gfap u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera astrocita (Gfap) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Gfap (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



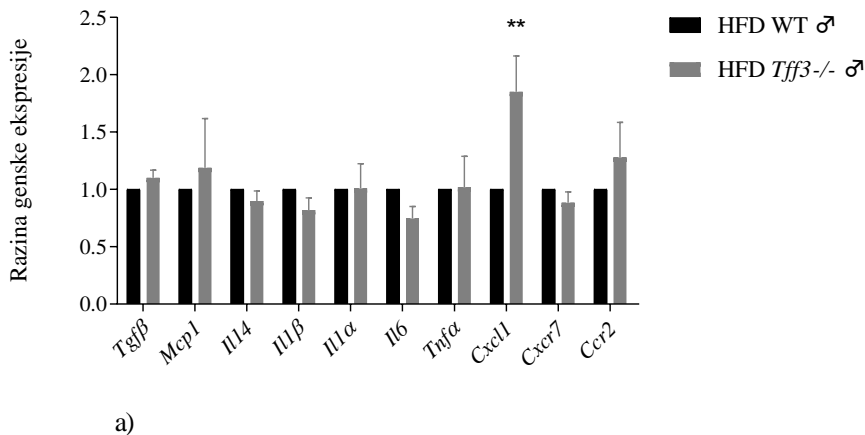
Slika 30. Imunohistokemijska analiza markera Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera mikroglia (Iba1) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Iba1 (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.



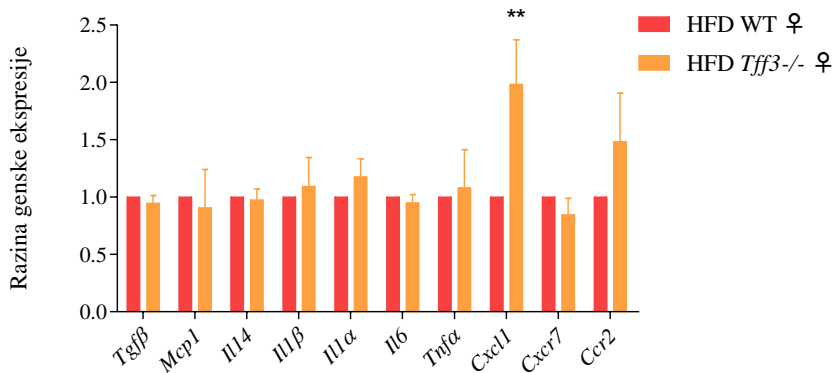
Slika 31. Imunohistokemijska analiza markera Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera mikroglija (Iba1) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Iba1 (crveno) su preklapljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

4.7.2.1. Ekspresija gena uključenih u upalu u hipokampusu miševa izloženih visokomasnoj prehrani

S obzirom na uočenu razliku u ekspresiji Iba1 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake izložene visokomasnoj hrani kao i poveznicu *Tff3* s imunološkim sustavom ispitana je genska ekspresija markera upale relevantnih u patofiziologiji neurodegenerativnih poremećaja: engl. *tumor growth factor beta* (*Tgfb*), engl. *chemokine (C-C motif) ligand 2* (*Mcp1*), engl. *interleukin 14* (*Il14*), engl. *interleukin 1 beta* (*Il-1β*), engl. *interleukin 6* (*Il-6*), engl. *tumour necrosis factor alpha* (*Tnfa*), engl. *C-X-C motif chemokine ligand 1* (*Cxcl1*) i engl. *atypical chemokine receptor 3* (*Cxcr7*) (Slika 32 i Privatik 10). Jedina značajna razlika je povećana razina *Cxcl1* gena u hipokampusu *Tff3*^{-/-} životinja u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Povećana ekspresija je uočena kod oba spola (Slika 32 a i b).



a)



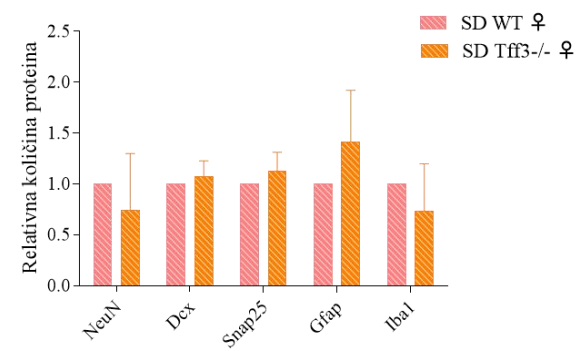
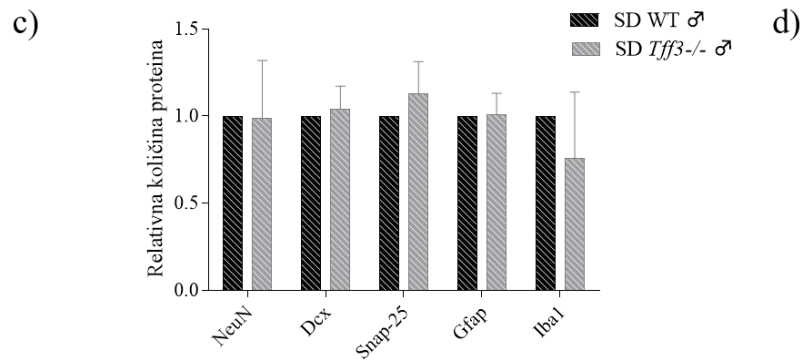
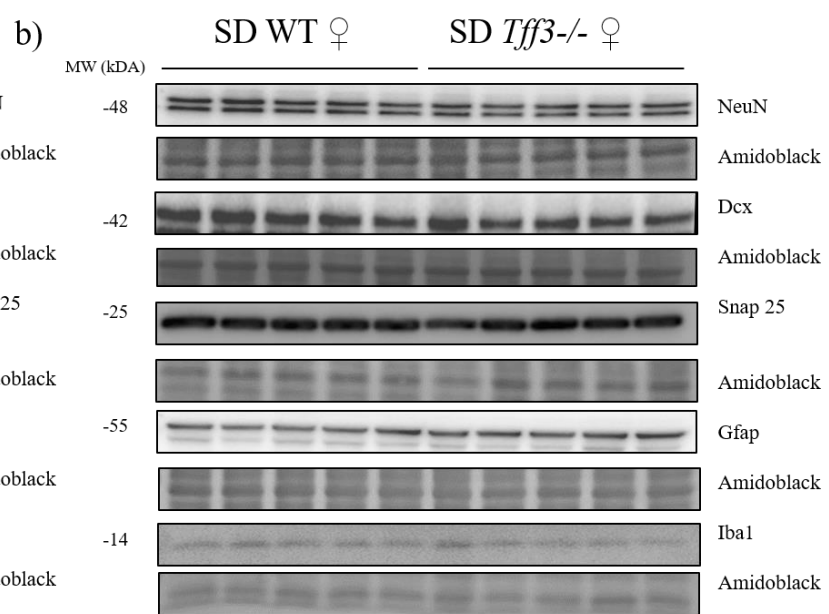
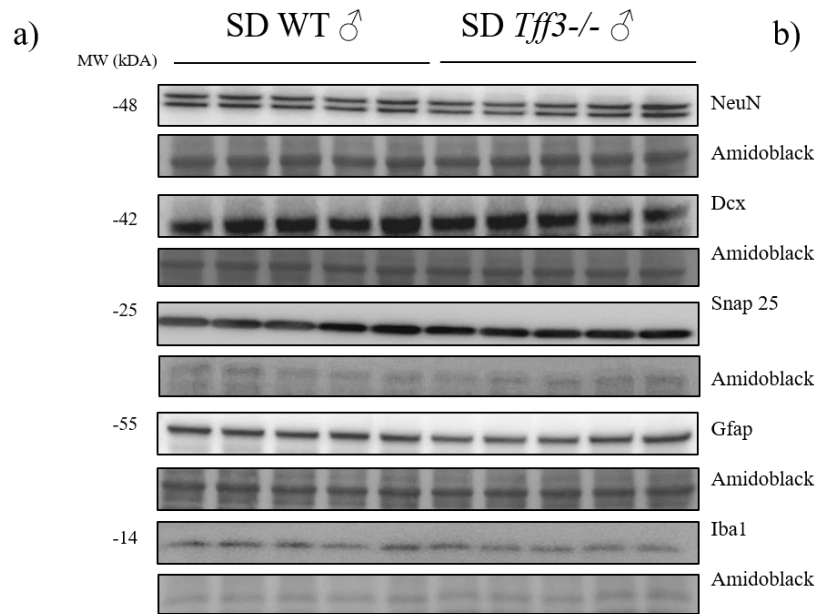
b)

Slika 32. Genska ekspresija upalnih markera u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću. ** $p \leq 0.01$.

Nazivi gena na engleskom: *Tgfb*^β—tumor growth factor beta; *Mcp1*- chemokine (C-C motif) ligand 2; *Il-14*—interleukin 14; *Il-1β*—interleukin 1 beta ; *Il-1α*—interleukin 1 alpha; *Il-6*—interleukin 6; *Tnfα*—tumour necrosis factor alpha; *Cxcl1*— C-X-C motif chemokine ligand 1; *Cxcr7*—atypical chemokine receptor 3

4.7.3. Razina proteinske ekspresije Dcx, NeuN, Snap-25, Gfap i Iba1 u hipokampusu miševa izloženih standardnoj prehrani

Zbog analize da li do uočenih razlika u hipokampusu dolazi uslijed tretmana visokomasnom hranom ili postoje i bez dodatnog stresa nutritivnog viška, praćena je proteinska ekspresija markera nezrelih neurona (Dcx), markera zrelih neurona (NeuN), markera sinaptičke funkcije (Snap-25), marker astrocita (Gfap) te marker mikroglia (Iba1) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih standardnoj hrani (Slika 33). Nije bilo značajnih razlika u proteinskoj ekspresiji navedenih markera u hipokampusu *Tff3*^{-/-} životinja u odnosu na WT kontrole (Slika 33) što ukazuje kako se uočene promjene (snižena razina Dcx i Iba1 u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka (Slika 20 a i b i Slika 27 a i b) i povećana razina Dcx i Neun u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki (Slika 20 c i d) javljaju uslijed tretmana visokomasnom hranom.



Slika 33. Razine NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene standardnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih standardnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusa iz 1 životinje). a) razina proteina NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih standardnoj prehrani (SD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela c) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. b) razina proteina NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih standardnoj prehrani (SD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

5.RASPRAVA

Tff3 je mali peptid predominantno eksprimiran u sluznicama probavnog sustava i najveći broj znanja o njegovoj ulozi dolazi upravo iz istraživanja rađenih u kontekstu zaštite epitela te u tumorogenezi. Novija istraživanja ukazuju da Tff3 ima važnu funkciju u metaboličkim procesima u jetri [95–100] te u bolestima SŽS [41,44,120,125,126,129]. Analiza cerebrosposinalne tekućine Alzheimer pacijenata je ukazala na TFF3 kao najsnažniji marker neurodegeneracije koji korelira s povećanjem atrofije mozga, hipokampusa i proširenjem ventrikula [41]. Točna uloga TFF3 proteina u patofiziološkim procesima metaboličkih i neurodegenerativnih bolesti je još uvijek novo i neistraženo područje. Ove kompleksne bolesti dijele brojne patofiziološke poveznice i proučavanje tih poveznica važno je za razumijevanje mehanizama nastanka ovih složenih bolesti i time pronalasku efektivnijih terapijskih rješenja [151,152]. Jedan od potencijalno značajnih faktora u toj interakciji metabolizma/neurodegeneracije je i Tff3. Stoga je cilj ovog doktorskog rada bio ispitati ulogu Tff3 proteina istovremeno u jetri i hipokampusu koristeći novo-razvijeni *Tff3*^{-/-} kongenični soj na C57BL/6N genskoj podlozi i model kratkotrajne visokomasne prehrane. Visokomasna prehrana se koristi za eksperimentalno izazivanje metaboličkog sindroma kod životinjskih modela, a osim toga pokazano je kako izaziva patološke promjene u SŽS, uključujući neuroinflamaciju, smanjenje kapaciteta stvaranja novih neurona, neurodegeneraciju i gubitak kognitivnih funkcija [147,149,150,179]. Pokazano je kako je već kratkotrajna izloženost takvom obliku stresa dovoljna za aktivaciju patoloških obilježja obje bolesti (prekomjerno nakupljanje lipida u jetri, pogoršana tolerancija na glukozu i inzulin, neuroinflamacija, smanjenje neurogeneze) [149,157–160]. S obzirom na važnost potrage za terapijskim rješenjima u ranim fazama patogeneze ovih kompleksnih poremećaja prije pojave uznapredovalih simptoma, odabran je tretman kratkotrajne visokomasne prehrane. Namjera istraživanja je bila ispitati postoje li razlike u fenotipu uzrokovane nedostatkom Tff3 proteina već u počecima nastajanja kompleksnih poremećaja kao što su Tip 2 dijabetes i Alzheimerova bolest. Odnosno izlaganjem WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom izazvana je aktivacija različitih značajki ovih poremećaja, primjerice narušena metabolička homeostaza, nakupljanje lipida u jetri, narušen integritet hipokampusa te su istraživanja fokusirana na ispitivanje učinka nedostatka Tff3 u tim procesima.

Važno je naglasiti kako je korišten novo-razvijeni kongenični *Tff3*^{-/-} mišji soj na C57BL/6N podlozi bez *Nnt* mutacije koja utječe na metabolički fenotip te su istraživanja obuhvatila životinje oba spola. Uključivanje oba spola je bilo potrebno s obzirom da je poznato kako postoje jasne razlike mužjaka i ženki u regulaciji metabolizma i utjecaju na SŽS koje onda mogu utjecati na razvoj metaboličkih poremećaja i drukčiji odgovor na farmakološke intervencije [180]. Zadnjih godina raste svjesnost o ovoj problematici što je povijesno u pretkliničkim biomedicinskim istraživanjima često bilo nepravedno zanemarivano.

5.1. Učinak nedostatka Tff3 na metaboličko stanje miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom

Kako bi utvrdili uzrokuje li nedostatak Tff3 razlike u odgovoru na stres uzrokovan unosom prehrane s visokim udjelom zasićenih masti izmjerena je masa miševa, provedeni su metabolički testove tolerancije na glukozu i inzulin, analiziran je serum životinja, ispitane su razine masti i masnih kiselina te su provedene molekularne analize genskih i proteinskih ekspresija relevantnih markera u tkivu jetre.

Kako je i očekivano postoje razlike između WT mužjaka u odnosu na WT ženke kao i *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke budući da je poznato kako postoje temeljne razlike u regulaciji metaboličke homeostaze ovisno o spolu. S obzirom da je primarni cilj ispitati utjecaj nedostatka Tff3 na metaboličku homeostazu, rasprava je fokusirana na analizu genotipskih razlika u ispitanim parametrima, te su dodatne analize vezane za razlike između WT mužjaka u odnosu na WT ženke te *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke prikazane u privitku (Privitak 2-10).

5.1.2. Analiza mase i metabolički testovi (IPGTT, IPITT)

Izmjerena je masa miševa prije izlaganja tretmanu visokomasne prehrane da se ispita postoje li razlike u masi uzrokovane samo nedostatkom Tff3, a ne i metaboličkim stresom i rezultati su pokazali kako nema značajnih razlika između WT i *Tff3*^{-/-} životinja oba spola (Slika 6a). Međutim, nakon 9 tjedana visokomasne prehrane, *Tff3*^{-/-} miševi su statistički značajno lakši od WT miševa (Slika 6b). Slični rezultati su pokazani i u drugome modelu naše istraživačke grupe gdje su miševi izloženi dugotrajnom stresu visokomasne prehrane [104]. Nije bilo razlika u masi WT i *Tff3*^{-/-} miševa na standardnoj prehrani u vremenskim točkama 21 i 36 tjedana starosti, međutim nakon

izlaganja visokomasnoj hrani *Tff3*^{-/-} mužjaci su statistički značajno lakši u odnosu na WT mužjake, dok ženke pokazuju isti trend, ali bez statističke značajnosti. Ipak, u zadnjim mjerenjima, nakon čak 32 tjedna visokomasne hrane ta razlika se gubi [104]. Prethodno je zabilježeno kako nema razlika u masi *Tff3*^{-/-} miševa miješanog genskog porijekla i odgovarajućih divlji tip kontrola [102], no u drugom istraživanju zabilježena je značajno smanjena masa istog mišjeg modela (*Tff3*^{-/-} C57BL/6J/Sv129) u odnosu na kontrole [103]. U istraživanju gdje nije bilo razlika u masi, mjerenja su provedena na mužjacima starim 12 tjedana i hranjenim standardnom hranom, dok su u istraživanju u kojemu je uočena razlika, za mjerenja korištene samo 4 životinje stare 22 tjedna, kojima nije naveden spol. Različiti faktori uključujući soj, dob, spol i vrstu prehrane značajno utječu na masu životinje, tako da te kompleksne interakcije mogu objasniti diskrepancije u rezultatima. Međutim, možemo reći kako u većini slučajeva nedostatak Tff3 proteina nije imao utjecaja na masu životinja na standardnoj hrani, a ukoliko se javi faktor stresa uzrokovanog visokomasnom prehranom, čini se kako su životinje s nedostatkom Tff3 proteina djelomično zaštićene od debljanja.

Testovi tolerancije na glukozu i inzulin su također provedeni prije izlaganja visokomasnoj hrani te ponovno nakon 6 (IPGTT) i 7 (IPITT) tjedana tretmana. IPGTT i IPITT se koriste za ispitivanje toleranciju na glukozu/inzulin tako što mjere razinu glukoze u krvi nakon početnog injiciranja glukoze/inzulina. Rezultati mjerenja pružaju uvid u metaboličko stanje organizma i ukazuju na potencijalne nepravilnosti u homeostazi glukoze i osjetljivosti na inzulin. *Tff3*^{-/-} mužjaci na standardnoj hrani u 30 minuti pokazuju statistički značajno pogoršanu toleranciju na glukozu u usporedbi s WT mužjacima (Slika 7a), dok *Tff3*^{-/-} ženke pokazuju statistički značajno bolju toleranciju na glukozu u odnosu na WT ženke u 15 i 30 minuti od injiciranja početne doze glukoze (Slika 7b). Nakon 6 tjedana visokomasne prehrane te razlike nestaju (Slika 8 a i b). Rezultati ukazuju na razlike u odgovoru na glukozu kod *Tff3*^{-/-} životinja u odnosu na WT životinje i bez dodatnog stresa visokomasne prehrane, s time da 6 tjedana visokomasne prehrane vodi do smanjenja spomenutih razlika što ukazuje na mogući adaptivni mehanizam u počecima nutritivnog stresa. Također, ishod testova je ovisan o faktoru spola, odnosno rezultati su oprečni za *Tff3*^{-/-} mužjake i *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na odgovarajuću WT kontrolu. Usporedba s rezultatima metaboličkih testova provedenih na modelu dugotrajne masne prehrane ukazuje da faktori kao što su duljina tretmana i dob životinje značajno utječu na ishod testova. Primjerice, *Tff3*^{-/-} mužjaci nakon 6 tjedana visokomasne hrane ne pokazuju razlike u toleranciji na glukozu u odnosu na WT

mužjake (Slika 7a), dok nakon 17 tjedana visokomasne hrane *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju bolju toleranciju na glukozu, a nakon 36 tjedana ta razlika se ponovno gubi [104].

Vezano za rezultate ispitivanja osjetljivosti na inzulin, ni kod mužjaka ni kod ženki nema razlika prije izlaganja visokomasnoj prehrani (Slika 9 a i b), no nakon 7 tjedana visokomasne prehrane, *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju značajno bolju toleranciju na inzulin u gotovo svim vremenskim točkama u usporedbi s WT mužjacima (Slika 10a). Rezultat ukazuje na moguću zaštitnu ulogu nedostatka *Tff3* u kontekstu inzulinske osjetljivosti nakon 7 tjedana visokomasne prehrane. *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke ne pokazuju razlike u osjetljivosti na inzulin ni na standardnoj ni na visokomasnoj prehrani (Slika 9b i 10b). Usporedba rezultata testova tolerancije na inzulin s modelom dugotrajne masne prehrane ponovno ukazuje na drukčiji učinak ovisno o duljini tretmana i dobi životinja [104].

Ranije su provedeni metabolički testovi na *Tff3*^{-/-} miševima miješanog porijekla koji su pokazali kako miševi s nedostatkom *Tff3* imaju bolju toleranciju na glukozu i inzulin u usporedbi s odgovarajućim divlji tip kontrolama [102]. U ovom slučaju rezultati ukazuju na zaštitni učinak nedostatka *Tff3* proteina, a korištene životinje su mužjaci stari 12 tjedana i hranjeni standardnom hranom. U našem istraživanju, *Tff3*^{-/-} C57BL6/N mužjaci na standardnoj hrani starosti 9 tjedana imaju pogoršanu toleranciju na glukozu u usporedbi s divlji tip životinjama, iako samo u 30 minuti (Slika 7a), dok razlika u osjetljivosti na inzulin nema (Slika 9a). Drukčiji ishod u rezultatima metaboličkih testova je moguće posljedica starosti životinja ili različite genske pozadine soja. Naime, *Tff3*^{-/-} miševi miješanog genskog porijekla su razvijeni na C57BL/6J pozadini za koju znamo da posjeduje mutacije relevantne u metaboličkim procesima kako je i opisano u poglavlju 1.4. Dodatno, osim dobi životinja i vrste soja, različiti faktori uključujući spol, vrstu i duljinu tretmana, protokol samog testa (doza/duljina posta prije prve doze) mogu drastično utjecati na ishod metaboličkih testova. Zbog toga je teško međusobno uspoređivati istraživanja i naglašena je potreba za standardiziranjem eksperimenata te jasnim navođenjem protokola i životinjskog modela koji se koristi u istraživanju. Ono što je jasno iz dobivenih rezultata je da *Tff3* ima ulogu u homeostazi glukoze i osjetljivosti na inzulin te 6 tjedana visokomasne prehrane rezultira smanjenjem razlika u toleranciji na glukozu, a nakon 7 tjedana *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju bolju osjetljivost na inzulin u usporedbi s WT kontrolama. Dakle, čini se kako nedostatak *Tff3* proteina

ima djelomični zaštitni učinak na homeostazu glukoze/inzulina nakon izloženosti kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom.

5.1.3. Biokemijska analiza seruma

Analizirani su biokemijski parametri u serumu (kolesterol, trigliceridi, jetreni enzimi (ASP, ALT, AST), ukupni proteini, urea i urati) životinja na visokomasnoj prehrani. Promjene u navedenim parametrima mogu ukazivati na poremećaje u metabolizmu lipida i na patološke promjene u funkciji jetre i bubrega. Jedina statistički značajna razlika vezana za genotip je smanjena razina triglicerida u serumu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake (Slika 11). Dakle, nedostatak Tff3 proteina u slučaju kratkotrajnog izlaganja visokomasnoj prehrani rezultira smanjenjem triglicerida u serumu što ukazuje na mogući zaštitni učinak nedostatka Tff3 proteina uslijed nutritivnog stresa, budući da je poznato kako povišene razine triglicerida u serumu mogu upućivati na razvoj metaboličkih poremećaja, primjerice Tip 2 dijabetesa. Jetreni enzimi (ASP, ALT, AST) koji ukazuju na oštećenja jetre nisu značajno promijenjeni u serumu *Tff3*^{-/-} miševa u odnosu na WT miševe nakon kratkotrajnog tretmana masnom hranom (Slika 11). Međutim značajno su promijenjeni u drugom modelu naše istraživačke grupe (dugotrajni model visokomasne hrane) gdje su *Tff3*^{-/-} mužjaci imali značajno niže razine ALP i ALT u odnosu na WT mužjake što ukazuje na zaštitni utjecaj nedostatka Tff3 u vidu oštećenja jetre nakon tretmana masnom hranom (podaci nisu prikazani), ali taj učinak se nije detektirao nakon samo 9 tjedana masne hrane.

5.1.4. Utjecaj tretmana visokomasne hrane i spola na ekspresiju Tff3 gena u jetri C57BL/6N miševa

Ekspresija Tff3 u jetri je smanjena u različitim mišjim modelima debljine i dijabetesa (genskim i onih uzrokovanih prehranom) [95–97] u usporedbi sa zdravim kontrolama. Također, u našem istraživanju uočena je statistički značajno smanjena ekspresija Tff3 gena u jetri C57BL/6N mužjaka izloženih dugotrajnom tretman visokomasnom prehranom (36 tjedana) u odnosu na kontrole na standardnoj hrani [104]. U ovom modelu, 9 tjedana visokomasne hrane nije rezultiralo statistički značajno smanjenom Tff3 ekspresijom (Slika 12 c i d). Moguće kako period od 9 tjedana visokomasne hrane nije bio dovoljan za statistički značajnu razliku u ekspresiji Tff3 gena u jetri C57BL/6N miševa, već je potreban duži tretman kako bi uočili smanjenje koje je zabilježeno u literaturi.

Vezano za utjecaj spola na ekspresiju Tff3 gena u jetri C57BL/6N miševa, potvrđeno je kako je ekspresija Tff3 u jetri ženki iznimno niska u odnosu na mužjake (Slika 12 a i b). Isto je uočeno i kod životinja hranjenih standardnom hranom (Slika 12a), kao i kod životinja izloženih visokomasnoj prehrani (Slika 12b). Ranije je uočena ista pojava u jetrama C57BL/6JOIaHsd ženki [181], a naše istraživanje je potvrdilo isto i u jetrama C57BL/6N miševa starosti 9 mjeseci [104].

5.1.5. Oil Red O bojanje i analiza sastava masnih kiselina u jetri

Jedna od manifestacija metaboličkog sindroma je nealkoholna masna bolest jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) koju karakterizira prekomjerna akumulacija lipida, posebice triglicerida koji uzrokuju formaciju lipidnih kapljica u hepatocitima. Nedavno je skupina stručnjaka postigla konsenzus oko mijenjanja nomenklature u MAFLD (engl. *metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease*) budući da takav termin bolje oslikava činjenicu da to nije samo bolest jetre nego je sistemski metabolički poremećaj blisko povezan sa stanjima kao što su primjerice inzulinska rezistencija, pretilost, Tip 2 dijabetes i kardiovaskularne bolesti [182].

Prethodno je uočena uloga Tff3 u životinjskim modelima MAFLD. Naime, kod mišjih modela debljine i dijabetesa (ob/ob, db/db, DIO-C57BL/6J) jedna od značajki je fenotip masne jetre karakteriziran povećanom akumulacijom lipidnih kapljica i oštećenjem hepatocita te je kod tih modela uočena smanjena ekspresija Tff3 u jetri [95–97]. Povratak ekspresije Tff3 u navedenim modelima rezultira poboljšanjem fenotipa masne jetre, odnosno smanjenjem razine lipidnih kapljica i oštećenja hepatocita, dok utišavanje Tff3 ekspresije u jetri ima suprotan učinak, odnosno vodi do povećane akumulacije lipida [97]. S obzirom na rezultate ovog istraživanja, pretpostavljeno je kako će *Tff3*^{-/-} miševi imati povećanu akumulaciju lipida u jetri, međutim nakon Oil Red O bojanja lipida uočena je smanjena razina (smanjena veličina lipidnih kapljica) u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom u odnosu na WT kontrole (Slika 13). Ista pojava je uočena i u modelu dugotrajne visokomasne prehrane, gdje je pomoću histoloških, ultrastrukturnih i HPLC analiza utvrđeno kako miševi s nedostatkom Tff3 pokazuju smanjeno nakupljanje masti u jetri u odnosu na WT kontrole [104]. Dakle, naša istraživanja pokazuju kako *Tff3*^{-/-} kongenični soj na C57BL/6N podlozi izložen tretmanu (kratkotrajnom i dugotrajnom) visokomasnom hranom pokazuje smanjenje nakupljanje lipida u jetri u odnosu na kontrolne miševe. Drugim riječima, nedostatak Tff3 proteina u ovom slučaju povoljno utječe na fenotip masne jetre.

Diskrepancija s nalazima prijašnjih istraživanja može biti posljedica različitih faktora koji su već spomenuti, primjerice genska pozadina soja, duljina i vrsta tretmana, starost i spol životinja koji utječu na metaboličke značajke i time naglašavaju kompleksnost regulacije metabolizma lipida. Međutim, ono što se ističe kao glavna razlika između navedenih istraživanja gdje Tff3 ima povoljan učinak na metabolički fenotip (u ovom slučaju riječ je o smanjenju akumulacije masti u jetri), te rezultata naše istraživačke grupe gdje nedostatak Tff3 ima zaštitni učinak, je korišteni model. Naime, čini se da ciljana regulacija ekspresije Tff3 u jetri (njeno povećanje) ima pozitivan utjecaj na metabolički fenotip i štiti od nakupljanja masti u jetri uzrokovano visokomasnom hranom [96,97,99], dok nedostatak Tff3 u cijelom organizmu (*whole body knock out* model) ukazuje na isto. Poznata je široka pojavnost Tff3 u različitim tkivima, kao i u krvi i mogućnost djelovanja na udaljenim mjestima, primjerice Tff3 iz jetre može cirkulacijom doći do ozlijeđenog tkiva mozga gdje djeluje protektivno [133]. S obzirom na navedeno, ne možemo isključiti mogućnost utjecaja nedostatka Tff3 u drugim organima, ili interakcijama između različitih organskih sustava, kao dio uzroka uočenog zaštitnog fenotipa. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se ispitaio mogući utjecaj tih kompleksnih interakcija.

Nakon uočene razlike u razini akumulacije masti u jetri između *Tff3*^{-/-} i WT životinja, uslijedila je analiza sastava masnih kiselina pomoću HPLC metode. Budući da do prekomjerne akumulacije lipida može doći zbog neravnoteže u metabolizmu masnih kiselina te masne kiseline imaju važnu ulogu u patogenezi MAFLD [183], utvrđen je sastav specifičnih masnih kiselina u jetri miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Generalno, istraživanja ukazuju kako određene vrste masnih kiselina, primjerice zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*, SFA) doprinose razvoju i pospješuju progresiju u ozbiljnije oblike bolesti, primjerice steatohepatitis i ciroza jetre, dok omega-3 polinezasićene masti (engl. *omega-3 polyunsaturated fatty acids*, n-3/ PUFA) imaju protuupalne značajke i mogu pomoći u smanjenju akumulacije masti u jetri, dakle imaju zaštitni učinak [184–187]. Rezultati analize masnih kiselina pokazuju kako *Tff3*^{-/-} mužjaci nakon 9 tjedana visokomasne prehrane imaju statistički značajno smanjenu razinu arahidinske masne kiseline (C 20:0) u jetri u usporedbi s WT mužjacima (Tablica 11). Arahidinska masna kiselina pripada skupini SFA, a istraživanja ukazuju na toksično djelovanje prekomjernog unosa SFA na homeostazu jetre [187]. Mehanizmi djelovanja nisu do kraja razjašnjeni, međutim uključuju aktivaciju stresa endoplazmatskog retikuluma, mitohondrijsku disfunkciju te akumulaciju reaktivnih kisikovih vrsta što rezultira oštećenjima jetre [187–189]. Osim arahidinske

kiseline, rezultati ne pokazuju druge razlike u razinama masnih kiselina u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake. Ukupan udio masti je smanjen kod *Tff3*^{-/-} mužjaka, što prati opažanje rezultata Oil Red O bojanja (Slika 13), međutim razlika nije statistički značajna. Veće razlike u razinama masnih kiselina su pronađene kod *Tff3*^{-/-} ženki: statistički značajno je smanjena razina linolne (C 18:2, n-6), linolenske (C 18:3, n-6), eikozapentaenoinske (C 20:5, n-3) i dokosapentaenoične (C 22:5, n-3) masne kiseline u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Navedene masne kiseline pripadaju skupini PUFA. Dodatno, statistički je značajno povećana ukupna razina omega-3 PUFA u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Istraživanja na životinjskim modelima kao i neka klinička istraživanja pokazuju potencijal suplementacije s omega-3 PUFA u tretiranju MAFLD [190–192]. Povećan unos omega-3 PUFA vodi do smanjenja jetrene steatoze, poboljšanja osjetljivosti na inzulin i smanjenja markera upale [193,194]. Dakle, povećana razina omega-3 PUFA u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT kontrole ukazuje na mogući zaštitni učinak nedostatka Tff3 uslijed kratkotrajne izloženosti visokomasnoj prehrani u kontekstu sastava masnih kiselina u jetri. Najčešće se istraživanja zaštitne uloge temelje na kombinaciji unosa eikozapentaenoinske (EPA) i dokosaheksaenske (DHA) masne kiseline. EPA je također statistički značajno povećana u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT kontrole (Tablica 11), dok je kod pacijenata s dijagnozama MAFLD te težih oblika bolesti poput nealkoholnog steatohepatitisa zabilježena značajno snižena razina u odnosu na zdrave kontrole [195–197]. Još jedan pokazatelj koji se koristi u proučavanju MAFLD je i omjer omega-6 i omega-3 polinezasićenih masnih kiselina (n-6/n-3 PUFA). Tipičnu zapadnjačku prehranu karakterizira povećani unos omega-6 masnih kiselina, a smanjen unos omega-3 masnih kiselina te je pokazano kako taj disbalans doprinosi fenotipu MAFLD [198–200]. Povećan n-6/n-3 PUFA korelira s povećanom upalom i akumulacijom masti u jetri, a prehrana koja cilja na smanjenje tog omjera je prepoznata kao potencijalni alat u prevenciji i/ili tretmanu stanja kao što je MAFLD. *Tff3*^{-/-} ženke imaju statistički značajno manji omjer n-6/n-3 PUFA masnih kiselina u jetri u odnosu na WT ženke (Tablica 11). Ukupan udio masti u jetri *Tff3*^{-/-} ženki je kao i kod *Tff3*^{-/-} mužjaka smanjen u odnosu na WT kontrole što je u skladu s opažanjima Oil Red O bojanja (Slika 13), iako razlike nisu statistički značajne (Tablica 11). Naši rezultati ukazuju da nedostatak Tff3 proteina ukazuje na zaštitni fenotip u kontekstu sastava masnih kiselina.

5.1.6. Analiza genske ekspresije relevantnih patofizioloških puteva metaboličkih poremećaja

S obzirom na uočene razlike u akumulaciji masti u jetri *Tff3*^{-/-} i WT životinja izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom ispitan je učinak nedostatka *Tff3* na molekularne markere gena važnih u patogenezi metaboličkih poremećaja s naglaskom na MAFLD. Deregulacija u lipidnom metabolizmu u jetri koja vodi do steatoze može biti posljedica različitih mehanizama uključujući β oksidaciju masnih kiselina, povećan proces *de novo* lipogeneze te smanjenje sekrecije triglicerida [183]. Disbalans navedenih procesa pospješuje razvoj metaboličkih poremećaja. Pomoću qPCR analize određena je genska ekspresija različitih markera metabolizma lipida u jetri WT i *Tff3*^{-/-} životinja oba spola (Slika 14). Kako je prethodno uočeno da se *Tff3* može vezati za transkripcijski faktor *Ppara* te time povećati markere β oksidacije masnih kiselina u jetri [97] analizirana je genska ekspresija markera *Ppara*, *Cpt1a* i *Hgmcs2*. Međutim u jetri *Tff3*^{-/-} miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnoj hrani u odnosu na WT kontrole nije bilo razlika u navedenim genima (Slika 14). Rezultati naše istraživačke grupe su pokazali kako *Tff3*^{-/-} mužjaci izloženi dugotrajnom tretmanu masnom hranom, također ne pokazuju razlike u razini *Ppara* i markera β oksidacije, ali imaju snižene razinu *Ppar γ* transkripcijskog faktora u odnosu na WT mužjake [104]. Ranije je snižena razina *Ppar γ* proteina uočena i u jetri *Tff3*^{-/-} miševa miješanog genetičkog porijekla na standardnoj hrani [102], međutim qPCR analiza ne pokazuje statistički značajne razlike u razini gena *Ppar γ* (kao ni na proteinskoj razini – podaci nisu prikazani) i njegovih nizvodnih meta *Cyp21* i *Scd1* u modelu kratkotrajne prehrane (Slika 14). Zatim je analizom markera (*Srebpc1*, *Chrebp*, *Fasn*, *Lxr*, *Elov*) ispitana hipoteza da je uočena smanjena akumulacija masti u jetri *Tff3*^{-/-} životinja posljedica povećane stope *de novo* lipogeneze. Međutim nije bilo statistički značajnih razlika u njihovoj genskoj ekspresiji. Razlike nismo uočili ni u markerima formiranja lipidnih kapljica (*Dgat1*, *Fitm2*), markeru lipolize (*Cgl58*) te markeru glukoneogeneze (*GyK*) (Slika 14). Moguće je da *Tff3* svejedno ima ulogu u navedenim procesima, međutim kratkotrajni tretman visokomasnom hranom nije bio dovoljan za detekciju značajnosti u navedenim markerima, a mogućnost je i da je uočeno smanjenje akumulacije masti uzrokovano promjenama u nekim drugim procesima.

Jedina otkrivena statistički značajna razlika je povećana razina *Irs2* gena u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (Slika 14b). *Irs2* je jedan od ključnih medijatora inzulinske signalizacije koja regulira ekspresiju različitih procesa koji mogu voditi do povećane akumulacije lipida u jetri [201].

Inzulin se veže za inzulinski receptor čime pospješuje fosforilaciju substrata Irs1 i Irs2 u hepatocitima. Pokazano je kako *Irs2*^{-/-} miševi imaju narušenu funkciju β stanica gušterače te posljedično razvijaju sistemsku inzulinsku rezistenciju i hiperglikemiju [202]. Međutim, i miševi kojima je utišan *Irs2* specifično u jetri ukazuju na selektivnu inzulinsku rezistenciju, stanje u kojem inzulin više ne suprimira proces glukoneogeneze, ali nastavlja aktivirati lipogenezu [203]. Osim toga pokazuju znakove jetrene steatoze i imaju pogoršanu toleranciju na glukozu. Također, pronađeno je kako je razina ekspresije *Irs2* značajno snižena u jetrama pacijenata koji boluju od Tip 2 dijabetesa [204]. Genska ekspresija *Irs2* je povećana u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT (Slika 14b) kod kojih je uočena i smanjena razina lipida u jetri (Slika 13) što je u skladu s otkrivenim štetnim učinkom utišavanja *Irs2* gena na fenotip masne jetre. Pokazano je da je taj učinak dijelom posljedica povećane lipogeneze [203], međutim analiza markera *de novo* lipogeneze ne pokazuje promjene u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (slika 14b). Osim toga, ne postoje razlike ni u osjetljivosti na inzulin u metaboličkim testovima (Slika 10b) stoga je moguće da je uočena povećana razina *Irs2* posljedica regulacije nekog drugog mehanizma budući da *Irs2* ima ulogu u širokom spektru procesa uključujući stanični rast, razvoj i preživljenje.

Patogeneza MAFLD je kompleksan i multifaktorijalan proces, a povećano upalno stanje se smatra jednim od pokretača progresije u teže oblike bolesti kao što je nealkoholni steatohepatitis sa sve većim jetrenim oštećenjima [183]. S obzirom da *Tff3* protein sudjeluje u regulaciji imunskog odgovor GI trakta [57,58], praćena je genska ekspresija relevantnih upalnih markera u jetri *Tff3*^{-/-} i WT miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom uz hipotezu kako su možda razlike u imunskom odgovoru između *Tff3*^{-/-} i WT životinja uzrok uočenog zaštitnog fenotipa masne jetre uslijed nedostatka *Tff3*. U jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka snižena je razina citokina *Il1α* i *Cxcr7* u odnosu na WT mužjake, dok kod *Tff3*^{-/-} ženki nema statistički značajnih razlika u analiziranim genima u odnosu na WT ženke (Slika 15). *Il1α* pripada porodici interleukina 1 zajedno s *Il1β*, koji je puno više istražen u kontekstu metaboličkih bolesti te je njegova inhibicija jedna od farmakoloških strategija koja se ispituje kao tretman za Tip 2 dijabetes [205]. Međutim, novija otkrića ukazuju i na potencijalnu ulogu *Il1α* u istim procesima. Naime, otkriveno je da *Il1α*^{-/-} miševi nakon tretmana visokomasnom prehranom imaju smanjene razine triglicerida i kolesterola u serumu te potpunu inhibiciju nakupljanja triglicerida u jetri [206]. Pokazano je da je to posljedica inhibicije ključnih enzima *de novo* lipogeneze u jetri. Budući da je u jetri miševa s nedostatkom *Tff3*, *Il1α* snižen (Slika 15a), a također pokazuju smanjenu razinu triglicerida u

serumu (Slika 11) i smanjena veličina lipidnih kapljica u jetri (Slika 13), ovo istraživanje bi mogla biti potencijalna poveznica. Međutim kako je već istaknuto, analizirane genske razine markera *de novo* lipogeneze u jetri ne ukazuju na razlike između *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT kontrole (Slika 14). Osim *Il1a*, snižena je i razina *Cxcr7*. *Cxcr7* u jetri potencijalno sudjeluje u regulaciji migracije imunskih stanica [207], a prethodno je pokazana interakcija *Tff3* i *Cxcr7*, ali u epitelnim stanicama konjunktive oka [62]. Naime, tretman s *Tff3* je rezultirao povećanom migracijom epitelnih stanica konjunktive oka, dok je inhibicija *Cxcr7* blokirala tu pojavu, odnosno spriječila migraciju izazvanu s *Tff3*.

Osim upale, važne značajke patofiziologije metaboličkih poremećaja su stres endoplazmatskog retikuluma te oksidativni stres [208]. Preopterećenje zasićenim mastima, odnosno nutritivni višak može uzrokovati stres čime se aktivira engl. *unfolded protein response* (UPR) s ciljem ponovne uspostave homeostaze funkcije endoplazmatskog retikuluma. Aktivnost UPR je posredovana s tri membranska proteina: engl. *inositol-requiring protein 1 alpha* (*Ire1α*), engl. *protein kinase RNA-like ER kinase* (*Perk*), i engl. *activating transcription factor 6* (*Atf6*), koji onda daljnjom kaskadom reguliraju ekspresiju raznih gena uključenih u različite stanične procese (apoptoza, upala, metabolizam lipida, autofagija itd). *Tff* peptidi, uključujući *Tff3* su prethodno povezani sa stresom ER i oksidativnim stresom [134,209–211]. Stoga je praćena aktivacija UPR i markere oksidativnog stresa pomoću qPCR analize. Jedina uočena statistički značajna razlika je povećana razina *Atf4* kod *Tff3*^{-/-} ženki u usporedbi s WT ženkama (Slika 16b).

Atf4 je transkripcijski faktor koji pripada obitelji engl. *cAMP-responsive element-binding* (CREB) proteina, a u kontekstu uloge u UPR, dio je *Perk/Atf4/Chop* signalizacije koja je u slučaju prolongiranih oštećenja ER ključna za pokretanje stanične apoptoze [212]. Budući da nije uočena značajna razlika u razini *Chop* gena (Slika 16b), pretpostavljamo kako povećana razina *Atf4* kod *Tff3*^{-/-} ženki nije povezana s apoptotskom funkcijom. Nekoliko istraživanja je ukazalo na ulogu *Atf4* proteina u regulaciji metabolizma lipida. Nedostatak *Atf4* vodi do inhibicije akumulacije masti u jetri miševa izloženih različitim tretmanima (hrana bogata ugljikohidratima [213], fruktoza [214]) te do općenito povoljnog metaboličkog stanja u uvjetima standardne prehrane (zaštita od debljanja vezanja za starenje, bolja tolerancija na glukozu i osjetljivost na inzulin) [215]. Točni mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni, međutim pokazano je kako nedostatak *Atf4* vodi do smanjenja ekspresije markera lipogeneze u jetri [214]. Dakle, *Atf4*^{-/-} miševi ne razvijaju fenotip

MAFLD kada su izloženi različitim tretmanima, međutim kod *Tff3*^{-/-} ženki je povećana razina *Atf4* u jetri, a uočena smanjena razina masti u odnosu na jetre WT ženki (Slika 13). Također, nema značajnih razlika u markerima lipogeneze kod *Tff3*^{-/-} životinja u usporedbi s WT (Slika 14). Stoga povećana razina *Atf4* gena kod *Tff3*^{-/-} ženki bi mogla uključivati ili neke druge funkcije/procese na koje utječe ovaj transkripcijski faktor ili je zbog nekog drugog regulatornog mehanizma pojačana razina u ovom slučaju utjecala povoljno na fenotip masne jetre, no otkrivanje točnih razloga zahtijeva dodatna istraživanja.

Kada sažmemo rezultate qPCR analize u jetri miševa izloženih tretmanu visokomasne hrani pokazano je sljedeće: *Tff3*^{-/-} mušjaci imaju sniženu razinu *Il1α* i *Cxcr7*, dok *Tff3*^{-/-} ženke povećanu razinu *Irs2* i *Atf4* gena u odnosu na WT kontrole. Generalno, nisu uočene velike razlike u markerima analiziranih patofiziološkim putevima (metabolizam lipida, upala, stres endoplazmatskog retikuluma i oksidativni stres) koje bi objasnile uzrok uočenog zaštitnog fenotipa, međutim geni koji su značajno promijenjeni ukazuju smjer za daljnja ispitivanja mogućih molekularnih mehanizama djelovanja Tff3 u jetri.

Nadalje, ispitano je jesu li te razlike posljedica nedostatka Tff3 u kontekstu odgovora na izloženost stresu hrane bogate zasićenim mastima, ili su prisutne i bez tretmana, odnosno kod životinja na standardnoj prehrani (Slika 17). Nije bilo statistički značajnih promjena u razinama ispitanih markera što ukazuje na to da se navedene razlike javljaju s tretmanom visokomasne prehrane.

5.1.7. Analiza proteoma jetre miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom

Osim analiza genske ekspresije različitih relevantnih markera, provedena je LC/MS MS analiza pomoću Q-Exactive-Plus masenog spektrometra kako bi identificirali promjene u ekspresiji proteina u jetri *Tff3*^{-/-} i WT životinja oba spola izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom. Iako su detektirane razlike u dosada navedenim analizama i testovima primjerice razlike u masi, IPITT testu, razina triglicerida u serumu, masti u jetri te u razini genske ekspresije *Il1α* i *Cxcr7*, nakon korištenja FDR alata nisu identificirane statistički značajne promjene u razinama proteina u jetri *Tff3*^{-/-} mušjaka u usporedbi s WT. Iako ne postoji statistička značajnost, ne isključuje se mogućnost kako postoje biološki značajno promijenjeni proteini u jetri *Tff3*^{-/-} mušjaka u odnosu na WT mušjake, no pomoću ove metode nisu detektirani.

Međutim, proteomska analiza ukazuje na značajnu promjenu razine ukupno 28 proteina u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Među njima su ribosomalni proteini (Rpl17, Rpl19, Rpl26, Rpl28, Rsp13) koji su pojačano eksprimirani u jetrama *Tff3*^{-/-} ženki (Tablica 12). Povećana ekspresija ribosomalnih proteina ukazuje na mogućnost povećane razine biosinteze ribosoma u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Biosinteza ribosoma je jedan od energetski najzahtjevnijih procesa nužan za stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i time esencijalan za održavanje homeostaze stanice i normalan razvoj [216]. Brzina i tempo sinteze ribosoma ovise o brojnim faktorima, između ostaloga pokazano je kako visokomasna prehrana vodi do smanjenja transkripcije rRNA u jetri miševa što rezultira smanjenom oksidacijom, a povećanom sintezom lipida i posljedično povećanom akumulacijom masti u jetri tih miševa [217]. S obzirom na navedeno, jedan od mehanizama koji vodi do smanjene akumulacije masti u jetri ženki s nedostatkom *Tff3* bi mogla biti posredovan povećanom biosintezom ribosoma. Pomoću STRING programskog alata analizirani su identificirani proteini i detektirana je interakcija navedenih ribosomalnih proteina s Ybx1 proteinom (Slika 18). Ybx1 protein je pojačano eksprimiran u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke što je potvrđeno pomoću Western blot metode (Slika 19). Ybx1 je protein sa širokim spektrom funkcija kao što su regulacija transkripcije i translacije različitih gena uključenih u razne procese (proliferacija, preživljenje, migracija), *mRNA splicing*, popravak DNA itd [218]. STRING analiza je ukazala na interakciju Ybx1 s proteinom Hnrnpd (Slika 18). Pokazano je kako se Ybx1 može vezati na Hnrnpd, a njihova interakcija rezultira endonukleaznom aktivnosti, odnosno dolazi do degradacije mRNA, što može biti važan mehanizam u kontroli ekspresije gena [219,220]. Osim poveznice Ybx1-Hnrnpd, STRING analiza je ukazala na interakciju Hnrnpd sa Sfpq proteinom za koji proteomska analiza pokazuje povećanje u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT (Tablica 12, Slika 18). Analiza ekspresije gena uključenih u RNA procesiranje u uzorcima jetre pacijenata sa stanjem pretilosti i inzulinske rezistencije je pokazala kako su *Sfpq* i *Hnrnpd* među najznačajnije promijenjenim faktorima u odnosu na zdrave kontrole [221]. Oba faktora su značajno snižena u jetrama oboljelih, dok su u jetri *Tff3*^{-/-} ženki ovi proteini pojačano eksprimirani (Tablica 12), što ponovno potencijalno ukazuje na zaštitini fenotip nedostatka *Tff3* u kontekstu metaboličke funkcije jetre.

Nadalje, STRING analiza je identificirala interakcije proteine iz porodice histona (Hist1h2bp, H2afv, H2afx) s proteinom Anp32a (Slika 18). Navedeni proteini su pokazali povećanu razinu u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (Tablica 12). Povećana razina Anp32 proteina je

potvrđena i Western blot metodom (Slika 19). Anp32a je također protein sa širokim spektrom funkcija kao što su regulacija transkripcije, održavanje stabilnosti mRNA, popravak DNA, regulacija apoptoze, a u kontekstu interakcije s histonima dio je engl. *inhibitor of histone acetyltransferases* kompleksa, INHAT, koji, kako naziv sugerira, sudjeluje u procesu inhibicije acetilacije histona [222]. Acetilacija histona je jedna od epigenetskih modifikacija koja regulira ekspresiju gena modulirajući strukturu kromatina [223]. Također, pronađena je poveznica inhibicije acetilacije histona s regulacijom gena uključenih u metabolizam lipida. Naime, tretman s inhibitorom engl. *p300 histone acetyltransferase* je značajno smanjio broj lipidnih kapljica i gensku ekspresiju markera lipogeneze [224]. Nadalje, nedostatak Anp32a koji vodi do smanjene acetilacije H3 histona je povezan s promjenama u ekspresiji gena uključenim u lipidni metabolizam [225]. Ovi rezultati ukazuju na moguću poveznicu nedostatka Tff3 s inhibicijom acetilacije histona, što posljedično može utjecati na regulaciju različitih gena uključenih u lipidni metabolizam i time potencijalno objasniti uočeno smanjenje akumulacije lipida u jetri.

5.2. Učinak nedostatka Tff3 na hipokampus miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom

Kako bi utvrdili da li nedostatak Tff3 uzrokuje razlike u hipokampusu uslijed unosa prehrane s visokim udjelom zasićenih masti analizirana je genska i proteinska ekspresija relevantnih markera neurogeneze i neuroinflamacije u tkivu hipokampusa.

5.2.1. Učinak nedostatka Tff3 na markere neurogeneze u hipokampusu

Među prvim regijama mozga koje pokazuju oštećenja kod pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti je hipokampus, regija ključna za regulaciju procesa učenja i pamćenja [161]. Također, subgranularna zona dentatnog girusa u hipokampusu je poznata neurogena niša u kojoj se odvija proces adultne neurogeneze, odnosno tijekom života se stvaraju novi neuroni koji se integriraju u postojeće neuralne mreže gdje doprinose funkcionalnosti. Pokazano je kako je visokomasna hrana važan modulator procesa adultne neurogeneze, te već kratkotrajna izloženost vodi do značajnog smanjenja kapaciteta stvaranja novih neurona u odnosu na zdrave kontrole [149,158,169]. Nadalje, brojna istraživanja ukazuju na pogoršanu funkciju adultne neurogeneze u životinjskim modelima

Alzheimerove bolesti, a uočene su i značajno snižene razine markera hipokampalne neurogeneze u postmortalnim uzorcima mozga oboljelih pacijenata [170–172]. Disfunkcije u procesima adultne neurogeneze su jedan od potencijalnih mehanizama koji povezuje metaboličke i neurodegenerativne bolesti [226]. S obzirom na brojne nalaze o narušenoj adultnoj neurogenezi u neurodegenerativnim poremećajima, ispitivanje i razumijevanje tih mehanizama se smatra jednim od pristupa koji bi mogao doprinijeti boljem razumijevanju patogeneze ove kompleksne bolesti i razvoju novih terapijskih rješenja.

Prvim otkrićem njegove ekspresije u mozgu sisavaca, *Tff3* je prepoznat je kao potencijalni novi neuropeptid s još nepoznatom ulogom u SŽS-u [111]. Otada je uočena poveznica s različitim neurološkim bolestima uključujući i Alzheimerovu bolest. U cerebrospinalnoj tekućini Alzheimer pacijenata pronađena je niska razina TFF3 koja korelira s atrofijom cijelog mozga, hipokampusu i proširenjem ventrikula, te se TFF3 u toj studiji pokazao kao najsnažniji marker neurodegeneracije u analiziranom panelu različitih relevantnih biljega [41]. Također, miševi kojima je intraperitonealno injiciran TFF3 su imali bolje rezultate u testovima koji ispituju učenje i pamćenje [123]. Osim pojavnosti u različitim regijama odraslog mozga sisavaca, pronađen je ekspimiran i u živčanom tkivu mišjih embrija te u ljudskim prenatalnim mozgovima što ukazuje na moguću ulogu *Tff3* u kompleksnim procesima razvoja SŽS [116,227]. Nadalje, istraživanja u kontekstu regeneracije epitela probavnog sustava te u kontekstu malignih oboljenja, opetavano pokazuju ulogu *Tff3* u staničnoj migraciji, adheziji i proliferaciji stanica [11,51–55,228].

Budući da su to sve ključni procesi u razvoju živčanog sustava pa tako i u adultnoj neurogenezi ispitane su razine markera neurogeneze u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnoj hrani. Pomoću Western blot metode analizirana je proteinska ekspresija markera nezrelih neurona (*Dcx*) i markera zrelih neurona (*NeuN*) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (Slika 20). Hipokampalna adultna neurogeneza podrazumijeva različite faze tijekom kojih iz neuralnih matičnih stanica lociranih u subgranularnoj zoni dentatnog girusa naposljetku nastaju novi zreli neuroni koji se integriraju u postojeće neuralne mreže granularne zone dentatnog girusa. Različiti markeri se koriste za identifikaciju različitih stadija neurogeneze [229]. *Dcx* se koristi kao marker za proučavanje razine adultne neurogeneze budući da je ekspimiran specifično u nezrelim neuronima, a ne i u neuralnim matičnim stanicama, prekursorima glija stanica i glija stanicama te

je pokazano kako razina Dcx korespondira s modulacijom razine neurogeneze [230]. Tijekom procesa adultne neurogeneze, njegova ekspresija nestaje istovremene s pojavom ekspresije NeuN, markera zrelih, post-mitotskih neurona [231].

Budući da u epitelnim stanicama Tff3 djeluje kao motogen, odnosno pokreće staničnu migraciju, pretpostavka je kako će životinje s nedostatkom Tff3 imati snižene razine Dcx što ukazuje na smanjenu razinu neurogeneze u hipokampusu. Zaista, u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka je uočena značajno smanjena razina proteina Dcx u odnosu na WT mužjake izložene visokomasnoj prehrani (Slika 20 a i b). Novorazvijeni neuroni dok prolaze kroz proces sazrijevanja, migriraju iz subgranularne zone dentatnog girusa do granularne zone gdje se integriraju u postojeće neuralne mreže. Moguće je kako je zbog nedostatka Tff3 kod mužjaka djelomično narušena migracija što utječe negativno na proces adultne neurogeneze, no potrebna su dodatna istraživanja za ispitivanje te hipoteze. Također, nismo uočili razliku u markeru NeuN u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake što ukazuje kako učinak nedostatka Tff3 na adultnu neurogenezu u kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom nije dovoljno robustan da se detektira i na razini smanjenja broja zrelih neurona (Slika 20 a i b).

Iznenadujuće je da su rezultati kod *Tff3*^{-/-} ženki ukazali na suprotni učinak. Odnosno *Tff3*^{-/-} ženke imaju povećanu razinu Dcx proteina u hipokampusu u odnosu na WT ženke izložene visokomasnoj prehrani (Slika 20 c i d). Nadalje, kod *Tff3*^{-/-} ženki je povećana i razina markera zrelih neurona (NeuN) (Slika 20 c i d). Dakle, rezultati ukazuju na povoljni utjecaj nedostatka Tff3 kod ženki na neurogenezu u hipokampusu nakon izlaganja visokomasnoj hrani budući da je povećana razina i markera nezrelih neurona i posljedično markera zrelih neurona. Vizualizacija markera pomoću imunofluorescencije nije ukazala na očite razlike u lokalizaciji ili morfologiji, a čini se kako intenzitet signala prati rezultate Western blot metode (Slika 21, 22, 23 i 24).

Ovi rezultati ponovno naglašavaju važnost uključivanja oba spola u biomedicinska istraživanja, s obzirom na uočeni suprotni učinak nedostatka Tff3 kod mužjaka i kod ženki u kontekstu adultne neurogeneze. Ranije je ukazano na postojanje spolnih razlika u različitim poremećajima vezanim za integritet hipokampusu, uključujući kognitivnu funkciju, sinaptičku plastičnost i adultnu neurogenezu [232]. Postoje različiti faktori koji mogu uzrokovati uočene razlike između spolova među kojima je i djelovanje spolnih hormona koji su poznati kao snažni modulatori adultne neurogeneze u hipokampusu. Receptori estrogena se nalaze u različitim regijama mozga,

uključujući hipokampus, i poznato je da estrogen može utjecati na neurogenezu [233]. Zanimljivo je kako je u kontekstu istraživanja uloge Tff3 u raku dojke otkriveno da je njegova ekspresija značajno regulirana estrogenom, odnosno da Tff3 pripada skupini engl. *estrogen-responsive* gena [234]. Postoji mogućnost da su vidljive razlike mužjaka i ženki dijelom posljedica interakcije Tff3 i estrogena što je vrijedno daljnjeg ispitivanja.

Uočene promjene u markerima neurogeneze mogu biti posljedica nedostatka Tff3 u hipokampusu, međutim ne možemo isključiti učinak nedostatka Tff3 i u drugim regijama mozga. Primjerice, poznato je kako se Tff3 nalazi u supraoptičkim i paraventricularnim jezgrama gdje kolokalizira s oksitocinom unutar istih vezikula, pa se pretpostavlja kako se Tff3 otpušta u krvotok gdje djeluje na različite zasada još uvijek nepoznate receptore [114]. Pokazano je kako oksitocin stimulira hipokampalnu neurogenezu tako što se veže za receptore eksprimirane u piramidalnim neuronima CA3 regije [235]. Moguće je kako na sličan način djeluje i Tff3 što bi moglo objasniti smanjenu razinu Dcx markera u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka, međutim to je samo pretpostavka koju je potrebno dodatno ispitati. Također, ne možemo isključiti ni utjecaj nedostatka Tff3 u drugim organima, kako je već spomenuto Tff3 iz jetre može proći krvno-moždanu barijeru i nakupljati se u ozlijeđenom tkivu mozga gdje djeluje protektivno kod miševa kojima je eksperimentalno izazvan moždani udar [133].

Međutim, te hipoteze ne pružaju objašnjenje kako nedostatak Tff3 kod ženki ima suprotan učinak, odnosno povećanu razinu Dcx i NeuN markera koja ukazuje na povećanu adultnu neurogenezu. Jedno od objašnjenja za različite mehanizme djelovanja Tff3 ovisno o varijabli spola je već spomenuta regulacija spolnih hormona, odnosno estrogena. Također, kada usporedimo rezultate u kontekstu metabolizma vidimo kako *Tff3*^{-/-} mužjaci i *Tff3*^{-/-} ženke imaju većinom zaštitni fenotip uslijed izlaganja kratkotrajnom tretmanu visokomasnoj hrani u odnosu na WT kontrole. Međutim, analiza masnih kiselina i proteomska analiza pokazuju izraženije promjene u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na *Tff3*^{-/-} mužjake. Moguće je kako nedostatak Tff3 koji povoljno djeluje na metaboličke parametre u periferiji kod ženki, rezultira i protektivnim fenotipom u hipokampusu u kontekstu adultne neurogeneze. Odnosno da je zbog povoljnijeg metaboličkog fenotipa, kod *Tff3*^{-/-} ženki uočena i povećana razina NeuN i Dcx proteina u hipokampusu. Već je napomenuto kako prehrana bogata zasićenim mastima nepovoljno utječe na razine adultne neurogeneze, te već kratkotrajni

tretman uzrokuje patofiziološke značajke neurodegenerativnih poremećaja, uključujući aktivaciju upale, pogoršanu kognitivnu funkciju i narušenu energetska homeostazu u mozgu.

Također, u modelu u kojemu su isti mišji modeli hranjeni visokomasnom hranom kroz duži period od čak 8 mjeseci, bojanje *Fluro-Jade C* i *Thiazine red* bojom, od kojih jedna vizualizira oštećene neurone, a druga nakupine amiloidnih plakova, je ukazalo na moguću povećanu neurodegeneraciju u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake, te na smanjenu neurodegeneraciju *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (podaci nisu prikazani). Ovi rezultati su u skladu s uočenim fenotipom u kontekstu adultne neurogeneze gdje se čini da je kod *Tff3*^{-/-} mužjaka smanjena razina, dok je kod *Tff3*^{-/-} ženki povećana.

Nadalje, analizirano je postoje li razlike između *Tff3*^{-/-} i WT životinja u markerima neurogeneze i bez dodatnog stresa uzrokovanog nutritivnim viškom. Stoga je ispitana ekspresija proteina *Dcx* i *NeuN* i u hipokampusu životinja hranjenih standardnom prehranom (Slika 33). Nije bilo značajnih razlika u navedenim markerima između WT i *Tff3*^{-/-} životinja što ukazuje kako je uočeni učinak *Tff3* proteina u hipokampusu vezan za procese sazrijevanja novih neurona potaknut tretmanom visokomasne hrane.

Oštećenje funkcije sinapsi je također jedna od ranih značajki Alzheimerove bolesti koja korelira s gubitkom kognitivnih funkcija i progresijom bolesti, a u cerebrospinalnoj tekućini Alzheimer pacijenata je pronađena značajno povećana razina *Snap-25* proteina čime je pokazan potencijal korištenja *Snap-25* kao biomarkera u ranoj dijagnostici ove bolesti [236]. Osim glavne uloge u regulaciji sinaptičke i postsinaptičke funkcije, *Snap-25* je povezan i s procesima važnim za neurogenezu. Naime, pokazano je kako pospješuje rast neurita [237–239], a *Snap-25 knock in* miševi imaju suprimiranu razinu hipokampalne neurogeneze i oštećenja pamćenja u odnosu na kontrole [240]. Stoga je analizirana ekspresija *Snap-25* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} i WT miševa oba spola. Međutim, nisu uočene razlike ni kod životinja izloženih visokomasnom tretmanu (Slika 25), ni kod kontrolnih životinja hranjenih standardnom hranom (Slika 25).

S ciljem daljnjeg ispitivanja učinka nedostatka *Tff3* u hipokampusu analizirana je genska ekspresiju različitih markera povezanih s neurogenezom i/ili ranom patologijom Alzheimerove bolesti miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnoj hrani (Slika 26). Ispitana je genska ekspresija *Bcl2*, markera apoptoze za koji je pokazano da pospješuje neurogenezu i preživljenje neurona [241]. Također, poznata je anti-apoptotska uloga *Tff3* u epitelnim stanicama crijeva te u

tumorogenezi gdje je pokazana njegova interakcija s Bcl2 [79]. Međutim u hipokampusu miševa nije uočena razlika u genskoj ekspresiji *Bcl2* između *Tff3*^{-/-} i WT životinja oba spola (Slika 26). Nadalje, pokazano je kako Tlr4 regulira hipokampalnu neurogenezu [242], a poveznica između Tff3 i Tlr4 dolazi iz istraživanja u kontekstu upalnih crijevnih bolesti gdje je pokazano da Tff3 suprimira upalni odgovor modulirajući Tlr4/NFκB signalizaciju [57]. Stoga je ispitana gensku ekspresiju Tlr4 u hipokampusu *Tff3*^{-/-} i WT miševa, međutim nismo uočili značajne razlike. Također, nisu uočene značajne razlike ni u genskoj ekspresiji *Epac2* i *Nfl* u hipokampusu, markera povezanih s regulacijom procesa važnih za neurogenezu [243,244] (Slika 23).

Narušeno inzulinsko signaliziranje u mozgu je prepoznato kao relevantna značajka neurodegenerativnih bolesti, a osim primarne funkcije u regulaciji energetske homeostaze u mozgu, pokazana je i uloga u regulaciji proliferacije, diferencijacije i preživljenja neurona [245]. Stoga je praćena ekspresija tri markera inzulinskog signaliziranja (*Irs1*, *Irs2* i *Igfr1*) te je uočeno smanjenje *Irs2* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke (Slika 26b). Točna uloga *Irs2* u adultnoj hipokampalnoj neurogenezi nije razjašnjena, međutim pokazano je kako je kod *Irs2*^{-/-} miševa diferencijacija neurona u embrionalnom razvoju znatno oštećena što rezultira narušenim razvojem mozga [246]. Nadalje, u primarnim kulturama neurosfera dobivenim iz *Irs2*^{-/-} miševa inzulin pospješuje neurogenezu preko aktivacije *Irs2*/Akt/Cdk4 signalnog puta [247]. Međutim, smanjena signalizacija *Irs2* specifično u mozgu mišjih modela je povezana i sa zaštitnim utjecajem na značajke Alzheimerove bolesti, primjerice na smanjenje amiloidne patologije i na duži životni vijek [248,249]. Čini se kako je uloga *Irs2* proteina u mozgu kompleksna i točne funkcije nisu do kraja razjašnjene. Zanimljivo je kako je kod *Tff3*^{-/-} ženki pokazana statistički značajno povećana razina *Irs2* u jetri (Slika 14b), a smanjena u hipokampusu (Slika 26b) u odnosu na WT ženke što ukazuje na interakciju Tff3 i *Irs2* u oba analizirana tkiva uslijed izlaganja kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom.

Osim smanjenja *Irs2* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki, zabilježena je i značajno smanjena genska ekspresija *Bdnf*, a povećana ekspresija *L1cam* i *Egfr*, dok kod *Tff3*^{-/-} mužjaka nema statistički značajnih razlika u nijednom analiziranom markeru što ponovno ukazuje na značajniji učinak nedostatka Tff3 kod ženki, nego kod mužjaka (Slika 26).

L1cam gen kodira za adhezijsku molekulu eksprimiranu u neuronima duž središnjeg živčanog sustava koja pokreće niz dinamičkih procesa vezanih za staničnu pokretljivost i time igra važnu

ulogu u razvoju živčanog sustava [250]. Osim poznate uloge u razvoju središnjeg živčanog sustava, pokazana je i važna uloga u održavanju istih procesa u odrasloj dobi. Odnosno, delecija *L1cam* u neuronima rezultira smanjenjem razine hipokampalne adultne neurogeneze [251]. U hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke povećana je genska ekspresija *L1cam*, kao i genska ekspresija *Egfr* (Slika 23b). Kada je otkriven prvi klasični receptor TFF3 proteina u epitelnim stanicama crijeva pokazano je da se vezanjem TFF3 za receptor Lingo2 aktivira *Egfr* čime TFF3 vrši zaštitnu ulogu u kontekstu kolitisa i GI parazitskih infekcija [64]. *Egfr* je također eksprimiran i u neuronima te njegova aktivacija između ostalog regulira daljnju signalizaciju potrebnu za rast neurita [252]. Zanimljivo je da je otkriven evolucijski očuvan mehanizam; gdje se *L1cam* veže za *Egfr* čime omogućuje vezanje neuregulina, te je takva signalizacija potrebna za preciznost i kontrolu stanične migracije i rasta neurita tijekom razvoja živčanog sustava [253]. Iako istraživanja ove signalizacije u kontekstu adultne neurogeneze prema našim saznanjima nisu provedena, moguće je da je isti mehanizam važan ne samo za razvoj živčanog sustava nego i kod stvaranja novih neurona u odrasloj dobi. Kako je kod *Tff3*^{-/-} ženki uočena povećana razina i *L1cam* i *Egfr*, može biti kako su te interakcije uzrok uočene povećane razine *Dcx* i *NeuN* proteina. Drugim riječima, mogućnost je kako nedostatak *Tff3* kod ženki vodi do povećane razine adultne neurogeneze u hipokampusu, a da je taj učinak posredovan interakcijom s *L1cam* i *Egfr*. Međutim potrebna su daljnja istraživanja ovog molekularnog mehanizma da bi potvrdili tu hipotezu.

Bdnf je važan čimbenik rasta s funkcijama koje uključuju poticanje neurogeneze, preživljenje i diferencijaciju neurona, a smanjene razine *Bdnf* u hipokampusu koreliraju s narušenim razinama adultne neurogeneze [254]. U hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki, ekspresija *Bdnf* je značajno smanjena što je kontradiktorno s drugim analiziranim markerima (*Dcx*, *Neun*, *L1cam*, *Egfr*) koji ukazuju na povećane razine adultne neurogeneze. Međutim, u skladu je s rezultatima iz istraživanja gdje je uočen antidepresivni učinak *Tff3* kod štakora kojima je uklonjen olfaktorni bulbus koji se koriste kao eksperimentalni model za proučavanje depresivnih stanja [125]. Štakori kojima je uklonjen olfaktorni bulbus imaju snižene razine *Bdnf* u hipokampusu, a intraperitonealna primjena TFF3 kroz 7 dana normalizira tu razinu te poboljšava simptome depresije. Također, pokazano je kako je uočeni antidepresivni učinak TFF3 ovisan o *Bdnf*. Dakle, čini se kako *Tff3* može regulirati ekspresiju *Bdnf* u hipokampusu, međutim točna uloga u modelu kratkotrajne visokomasne prehrane nije poznata i zahtijeva daljnja istraživanja.

Naši rezultati ukazuju na učinak nedostatka *Tff3* u procesima sazrijevanja novih neurona u hipokampusu uslijed kratkotrajnog tretmana visokomasnom hranom. Promjene su izraženije kod *Tff3*^{-/-} ženki kod kojih razlike u ekspresiji pojedinih proteinskih i genskih markera u odnosu na WT kontrole, po prvi puta ukazuju na mogućnost povećane adultne neurogeneze.

5.2.2. Učinak nedostatka *Tff3* na markere neuroinflamacije u hipokampusu

Nadalje, analizirani su markeri ostalih glavnih tipova stanica živčanog sustava koristeći *Gfap* kao biljeg astrocita, te *Iba1* kao biljeg mikroglija. Poznato je kako tretman visokomasnom hranom uzrokuje aktivaciju astrocita i mikroglija što je karakteristika neuroinflamacije, jedne od važnih značajki neurodegenerativnih poremećaja koji se također javlja kao rani događaj u patogenezi Alzheimerove bolesti [160,173].

Iako u odraslom mozgu kod ljudi nije zabilježena pojavnost *Tff3* u astrocitima i mikroglijama [116], uočena je kolokalizacija s *Iba1* u primarnim kortikalnim i hipokampalnim kulturama što ukazuje na mogućnost da se *Tff3* eksprimira u mikroglijama samo kada su one u aktivnom stanju [118]. Iako u istom istraživanju nije uočena kolokalizacija s *Gfap*, u drugom istraživanju je pokazano kako se *Tff3* nalazi unutar vezikula u astrocitima štakorskih primarnih kultura gdje inkubacija s lipopolisaharidom rezultira smanjenjem njegove ekspresije [119]. Western blot analiza je pokazala kako razine *Gfap* proteina u hipokampusu nisu značajno promijenjene između *Tff3*^{-/-} i WT životinja oba spola i oba tretmana (Slika 27 i Slika 33), što ukazuje kako nedostatak *Tff3* nema utjecaja na razine astrocita u hipokampusu. Također, nisu uočene razlike u morfologiji i lokalizaciji astrocita između WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola (Slika 28 i Slika 29).

Vežano za razine markera mikroglija (*Iba1*), u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki nisu detektirane statistički značajne razlike ni kod životinja na standardnoj hrani (Slika 33), ni u tretmanu visokomasnom hranom (Slika 27). *Tff3*^{-/-} mužjaci hranjeni standardnom hranom također ne pokazuju značajne razlike u razini *Iba1* proteina (Slika 33), međutim nakon tretmana visokomasnom hranom, *Iba1* je značajno snižena u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka u odnosu na WT mužjake (Slika 27 a i b). Imunohistokemijskom analizom nije detektirana vidljiva razlika u lokalizaciji/morfologiji signala *Iba1* proteina u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} životinja oba spola (Slika 30 i Slika 31).

S obzirom na ulogu Tff3 u modelima kolitisa gdje je pokazano da suprimira imunološki odgovor [57], i na eksperiment gdje je pokazano kako tretman s Tff3 rezultira smanjenjem razine proupalnih citokina u mikroglijama tretiranim s lipopolisaharidom očekivali bi da će nedostatak Tff3 uzrokovati povećanu razinu markera mikroglija [119]. Međutim, u ovom modelu je uočena snižena razina Iba1 u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka uslijed kratkotrajnog tretmana visokomasnom hranom (Slika 27 a i b). Aktivacija mikroglija je kompleksan i dinamičan proces, koji može imati i neuroprotektivan i neurotoksičan učinak ovisno o različitim faktorima [255]. Također, osim uloge u održavanju homeostaze imunskog sustava mozga, pokazano je kako mikroglije imaju ulogu u regulaciji adultne neurogeneze tako što sudjeluju u više procesa uključujući proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i preživljenje neurona [256]. Moguće je kako je smanjena razina Iba1 proteina uslijed nedostatka Tff3 kod mužjaka jedan od mehanizama zbog kojeg je uočena i smanjena razina Dcx proteina u hipokampusu koja upućuje na smanjenu adultnu neurogenezu. Iako je uočena razlika suptilna, rezultat ukazuje na potencijalnu povezanost Tff3 proteina sa funkcijama mikroglija što zahtijeva dodatna ispitivanja s ciljem otkrivanja točne uloge.

Za daljnju analizu neuroinflamacije u hipokampusu životinja hranjenih visokomasnom hranom ispitana je genska ekspresija *Tgfb*, *Mcp1*, *Il-14*, *Il1β*, *Il1α*, *Il-6*, *Tnfa*, *Ccr2*, *Cxcr7*, *Cxcl1* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} životinja oba spola u usporedbi s WT kontrolama (Slika 32). Jedina statistički značajna razlika je *Cxcl1* gen koji je povećan u hipokampusu i *Tff3*^{-/-} mužjaka i *Tff3*^{-/-} ženki (Slika 32 a i b) u odnosu na WT kontrole. Prethodno je uočena poveznica Tff3 i *Cxcl1* u našim istraživanjima [104,257]. Preciznije, zabilježena je smanjena razina *Cxcl1* gena u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka tretiranih s tunikamicinom, kao i u jetri *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj hrani kroz 8 mjeseci. Iako je ukazano suprotni učinak u jetri, odnosno smanjenje razine *Cxcl1*, dok je u hipokampusu uočena povećana razina, ponovna značajna razlika ukazuje na moguću regulaciju ekspresije *Cxcl1* posredovanu s Tff3 u različitim tkivima i tretmanima. Povećana ekspresija *Cxcl1* može ukazivati na povećano upalno stanje jer je pokazano da se može aktivirati kao odgovor na ozljedu/stres te sudjelovati u regrutaciji drugih proupalnih citokina, primjerice *Il1α*, *Il1β*, *Il-6* i *Tnfa*. Međutim, razine tih proupalnih citokina nisu značajno promijenjene u našem modelu (Slika 32), pa je moguće kako je povećana razina *Cxcl1* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} životinja posljedica nekih drugih funkcija u kojima sudjeluje *Cxcl1*, primjerice proliferacija i diferencijacija neurona. Pokazano je kako tretman sa *Cxcl1* značajno inhibira rast aksona u kulturi neurona štakorskih dorzalnih ganglija [258].

Sažetak rezultata u kontekstu neuroinflamacije je značajno snižena razina proteina Iba1 u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka te povećana ekspresija kemokina *Cxcl1* u hipokampusu *Tff3*^{-/-} životinja oba spola, no utvrđivanje točnih uzroka zahtijeva dodatna istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog doktorskog rada razvijen je novi *Tff3*^{-/-} kongenični model iz već postojećeg *Tff3*^{-/-} soja miješane genske pozadine (C57BL/6J/Sv129) čime je reducirana genska varijabilnost, a osim toga razvijen je na C57BL/6N podlozi bez dodatnih mutacija relevantnih za metabolizam. Stoga predstavlja novi dragocjen model za proučavanje uloge Tff3, posebice u metaboličkim procesima.

Nakon 9 tjedana izloženosti prehrani bogatoj zasićenim mastima, nedostatak Tff3 je imao pozitivan utjecaj na dio analiziranih metaboličkih parametara kod životinja oba spola. *Tff3*^{-/-} mužjaci su imali statistički značajno manje mase, bolju toleranciju na inzulin, sniženu razinu triglicerida u serumu, smanjenu veličinu lipidnih kapljica u jetri i sniženu razinu zasićene arahidinske kiseline u odnosu na WT mužjake. *Tff3*^{-/-} ženke su također imale smanjenu masu i smanjene lipidne kapljice u jetri te povećanu razinu omega-3 polinezasićenih masnih kiselina, a smanjen omjer omega-6 i omega-3 polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na WT ženke.

Analiza ekspresije gena uključenih u relevantne patofiziološke puteve u jetri (metabolizam lipida, upala, stres endoplazmatskog retikuluma i oksidativni stres) te analiza ukupnog proteoma su pokazale kako je u jetri *Tff3*^{-/-} mužjaka značajno snižena razina *Il1a* i *Cxcr7* gena, a na razini ukupnog proteoma nisu detektirane statistički značajne promjene u odnosu na WT mužjake. Kod *Tff3*^{-/-} ženki je pokazana povećana razina *Irs2* i *Atf4* gena u jetri, a na proteomskoj razini su uočene promjene u razinama proteina uključenih u biosintezu ribosoma i inhibiciju acetilacije s povećanim razinama Ybx1 i Anp32a proteina. Uočene promjene pružaju temelj za daljnja ispitivanja s ciljem otkrivanja točnih molekularnih mehanizama uočenog zaštitnog fenotipa.

Uz praćenje učinka na jetru i metaboličke procese, istovremeno je analiziran i učinak nedostatka Tff3 na integritet hipokampusa s fokusom na procese adultne neurogeneze i neuroinflamacije. U hipokampusu je vidljiva značajna razlika u fenotipu *Tff3*^{-/-} životinja ovisno o spolu.

Nakon 9 tjedana visokomasne prehrane, *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju sniženu razinu markera nezrelih neurona (*Dcx*) u hipokampusu, dok analiza genske ekspresije markera povezanih s neurogenezom ne ukazuje na statistički značajne razlike u odnosu na WT mužjake izložene visokomasnoj hrani. Nadalje, u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka je značajno snižena razina markera mikroglia (*Iba1*), a analiza ekspresije relevantnih markera neuroinflamacije pokazuje statistički značajno povećanu

ekspresiju *Cxcl1* gena. U hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki povećana je razina *Dcx* te razina markera zrelih neurona (NeuN) uslijed izlaganja visokomasnoj hrani. Analiza genske ekspresije markera povezanih s neurogenezom je pokazala veće promjene u hipokampusu *Tff3*^{-/-} ženki budući da je povećana razina *Llcam*, *Egfr*, a snižena razina *Irs2* i *Bdnf*. Nisu uočene značajne razlike u proteinskoj ekspresiji markera mikroglia i astrocita, međutim povećana je ekspresija *Cxcl1* gena, koja je vidljiva i kod *Tff3*^{-/-} mužjaka.

U jetri i hipokampusu kontrolnih životinja oba spola na standardnoj hrani nisu uočene statistički značajne razlike u navedenim promijenjenim markerima što ukazuje kako se detektirane promjene uzrokovane nedostatkom *Tff3* javljaju uslijed nutritivnog stresa.

Konačno, rezultati ukazuju kako *Tff3* ima ulogu u patofiziološkim značajkama metaboličkih i neurodegenerativnih promjena kao što su metabolička homeostaza, nakupljanje masti u jetri i integritet hipokampusa uslijed stresa uzrokovano kratkotrajnim tretmanom visokomasnom hranom. Po prvi puta je uočen utjecaj nedostatka *Tff3* u procesu adultne neurogeneze u metabolički relevantnom modelu masne prehrane, čime se otvara novo područje vrijedno daljnjeg istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja uloge *Tff3* u hipokampusu i potencijalno identifikacije novih terapijskih meta.

Dodatno, pokazan je izraženi utjecaj spolnog dimorfizma u istraživanju uloge *Tff3* proteina, odnosno uočeni fenotip *Tff3*^{-/-} mužjaka i *Tff3*^{-/-} ženki se bitno razlikovao. Izražene spolne razlike naglašavaju važnost obuhvaćanja oba spola u istraživanjima uloge *Tff3* te potrebu za jasnim i detaljnim opisivanjem eksperimentalnih modela.

7. LITERATURA

1. Jørgensen, K.H.; Thim, L.; Jacobsen, H.E. Pancreatic Spasmolytic Polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul. Pept.* **1982**, *3*, 207–219, doi:10.1016/0167-0115(82)90126-4.
2. Jorgensen K D, T.L. United States Patent (19) Pancreatic Spasmolytic Polypeptide. *United States Pat.* **1983**.
3. Masiakowski, P.; Breathnach, R.; Bloch, J.; Gannon, F.; Krust, A.; Chambon, P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 7895–7903, doi:10.1093/nar/10.24.7895.
4. Jakowlew, S.B.; Breathnach, R.; Jeltsch, J.M.; Masiakowski, P.; Chambon, P. Sequence of the ps2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 2861–2878, doi:10.1093/nar/12.6.2861.
5. Suemori, S.; Lynch-Devaney, K.; Podolsky, D.K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 11017–11021, doi:10.1073/pnas.88.24.11017.
6. Wright, N.A.; Hoffmann, W.; Otto, W.R.; Rio, M.C.; Thim, L. Rolling in the clover: Trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.* **1997**, *408*, 121–123, doi:10.1016/S0014-5793(97)00424-9.
7. Thim, L. A new family of growth factor-like peptides “Trefoil” disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* **1989**, *250*, 85–90, doi:10.1016/0014-5793(89)80690-8.
8. Thim, L.; May, F.E.B. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2956–2973, doi:10.1007/s00018-005-5484-6.
9. Kjellev, S.; Vestergaard, E.M.; Nexø, E.; Thygesen, P.; Eghøj, M.S.; Jeppesen, P.B.; Thim, L.; Pedersen, N.B.; Poulsen, S.S. Pharmacokinetics of trefoil peptides and their stability in gastrointestinal contents. *Peptides* **2007**, *28*, 1197–1206, doi:10.1016/j.peptides.2007.03.016.
10. Westley, B.R.; Griffin, S.M.; May, F.E.B. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7967–7975, doi:10.1021/bi047287n.
11. Kinoshita, K.; Taupin, D.R.; Itoh, H.; Podolsky, D.K. Distinct Pathways of Cell Migration and Antiapoptotic Response to Epithelial Injury: Structure-Function Analysis of Human Intestinal Trefoil Factor. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 4680–4690, doi:10.1128/mcb.20.13.4680-4690.2000.
12. Braga Emidio, N.; Meli, R.; Tran, H.N.T.; Baik, H.; Morisset-Lopez, S.; Elliott, A.G.; Blaskovich, M.A.T.; Spiller, S.; Beck-Sickinger, A.G.; Schroeder, C.I.; et al. Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite. *J.*

- Med. Chem.* **2021**, *64*, 9484–9495, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00767.
13. Thim, L.; Woldike, H.F.; Nielsen, P.F.; Christensen, M.; Lynch-Devaney, K.; Podolsky, D.K. Characterization of Human and Rat Intestinal Trefoil Factor Produced in Yeast. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4757–4764, doi:10.1021/bi00014a033.
 14. Polshakov, V.I.; Williams, M.A.; Gargaro, A.R.; Frenkiel, T.A.; Westley, B.R.; Chadwick, M.P.; May, F.E.B.; Feeney, J. High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: A single trefoil motif protein. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 418–432, doi:10.1006/jmbi.1997.0896.
 15. Muskett, F.W.; May, F.E.B.; Westley, B.R.; Feeney, J. Solution Structure of the Disulfide-Linked Dimer of Human Intestinal Trefoil Factor (TFF3): The Intermolecular Orientation and Interactions Are Markedly Different from Those of Other Dimeric Trefoil Proteins. *Biochemistry* **2003**, *42*, 15139–15147, doi:10.1021/bi030182k.
 16. Jahan, R.; Shah, A.; Kisling, S.G.; Macha, M.A.; Thayer, S.; Batra, S.K.; Kaur, S. Odyssey of trefoil factors in cancer: Diagnostic and therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2020**, *1873*, 188362, doi:10.1016/j.bbcan.2020.188362.
 17. Lubka, M.; Blin, N.; Faculty, M. Trefoil factor family proteins in gastrointestinal defense. **2008**, *661*, 1–28.
 18. Seib, T.; Blin, N.; Hilgert, K.; Seifert, M.; Theisinger, B.; Engel, M.; Dooley, S.; Zang, K.D.; Welter, C. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* **1997**, *40*, 200–202, doi:10.1006/geno.1996.4511.
 19. Chinery, R.; Poulsom, R.; Cox, H.M. The gene encoding mouse intestinal trefoil factor: Structural organization, partial sequence analysis and mapping to murine chromosome 17q. *Gene* **1996**, *171*, 249–253, doi:10.1016/0378-1119(96)00074-1.
 20. Kayademir, T.; Rosewell, I.; Blin, N.; Gott, P. Genomic structure of the mouse trefoil factor (Tff) gene cluster in 17q. *GeneScreen* **2000**, *1*, 15–19, doi:10.1046/j.1466-9218.2000.00004.x.
 21. Ribieras, S.; Lefèbvre, O.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Mouse Trefoil Factor genes: Genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene* **2001**, *266*, 67–75, doi:10.1016/S0378-1119(01)00380-8.
 22. Gött, P.; Beck, S.; Machado, J.C.; Carneiro, F.; Schmitt, H.; Blin, N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur. J. Hum. Genet.* **1996**, *4*, 308–315, doi:10.1159/000472224.
 23. Poulsom, R.; Wright, N.A. Trefoil peptides: A newly recognized family of epithelial mucin-associated molecules. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **1993**, *265*, doi:10.1152/ajpgi.1993.265.2.g205.
 24. Madsen, J.; Nielsen, O.; Tornøe, I.; Thim, L.; Holmskov, U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.* **2007**, *55*, 505–513, doi:10.1369/jhc.6A7100.2007.

25. Hoffmann, W.; Jagla, W. *Cell type specific expression of secretory TFF peptides: Colocalization with mucins and synthesis in the brain*; Elsevier Masson SAS, 2002; Vol. 213;.
26. Tomasetto, C.; Rio, M.C.; Gautier, C.; Wolf, C.; Hareuveni, M.; Chambon, P.; Lathe, R. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.* **1990**, *9*, 407–414, doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08125.x.
27. Rio, M.C.; Bellocq, J.P.; Daniel, J.Y.; Tomasetto, C.; Lathe, R.; Chenard, M.P.; Batzenschlager, A.; Chambon, P. Breast cancer-Associated pS2 protein: Synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science (80-.)*. **1988**, *241*, 705–708, doi:10.1126/science.3041593.
28. Podolsky, D.K.; Lynch-Devaney, K.; Stow, J.L.; Oates, P.; Murgue, B.; DeBeaumont, M.; Sands, B.E.; Mahida, Y.R. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6694–6702, doi:10.1016/S0021-9258(18)53305-6.
29. Braga Emidio, N.; Brierley, S.M.; Schroeder, C.I.; Muttenthaler, M. Structure, Function, and Therapeutic Potential of the Trefoil Factor Family in the Gastrointestinal Tract. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, *3*, 583–597, doi:10.1021/acsptsci.0c00023.
30. Hoffman, W.; Jagla, W.; Wiede, A. Molecular medicine of TFF-peptides: From gut to brain. *Histol. Histopathol.* **2001**, *16*, 319–334, doi:10.14670/HH-16.319.
31. Thim, L.; Madsen, F.; Poulsen, S.S. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* **2002**, *32*, 519–527, doi:10.1046/j.1365-2362.2002.01014.x.
32. Langer, G.; Jagla, W.; Behrens-Baumann, W.; Walter, S.; Hoffmann, W. Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**, *40*, 2220–2224.
33. Jagla, W.; Wiede, A.; Hinz, M.; Dietzmann, K.; Gülicher, D.; Gerlach, K.L.; Hoffmann, W. Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell Tissue Res.* **1999**, *298*, 161–166, doi:10.1007/s004419900087.
34. Wiede, A.; Jagla, W.; Welte, T.; Köhnlein, T.; Busk, H.; Hoffmann, W. Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1999**, *159*, 1330–1335, doi:10.1164/ajrccm.159.4.9804149.
35. Rinnert, M.; Hinz, M.; Buhtz, P.; Reiher, F.; Lessel, W.; Hoffmann, W. Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339*, 639–647, doi:10.1007/s00441-009-0913-8.
36. Bijelić, N.; Belovari, T.; Baus Lončar, M. Trefoil factor family protein 3 (TFF3) is present in cartilage during endochondral ossification in the developing mouse fetus. *Acta Histochem.* **2013**, *115*, 204–208, doi:10.1016/j.acthis.2012.06.007.
37. Krüger, K.; Schmid, S.; Paulsen, F.; Ignatius, A.; Klinger, P.; Hotfiel, T.; Swoboda, B.;

- Gelse, K. Trefoil factor 3 (TFF3) is involved in cell migration for skeletal repair. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–13, doi:10.3390/ijms20174277.
38. Rösler, S.; Haase, T.; Claassen, H.; Schulze, U.; Schicht, M.; Riemann, D.; Brandt, J.; Wohlrab, D.; Müller-Hilke, B.; Goldring, M.B.; et al. Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 815–825, doi:10.1002/art.27295.
 39. Cook, G.A.; Familari, M.; Thim, L.; Giraud, A.S. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 155–159, doi:10.1016/S0014-5793(99)00940-0.
 40. Jackerott, M.; Lee, Y.C.; Møllgård, K.; Kofod, H.; Jensen, J.; Rohleder, S.; Neubauer, N.; Gaarn, L.W.; Lykke, J.; Dodge, R.; et al. Trefoil factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: Differential regulation by growth hormone. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5752–5759, doi:10.1210/en.2006-0601.
 41. Paterson, R.W.; Bartlett, J.W.; Blennow, K.; Fox, N.C.; Shaw, L.M.; Trojanowski, J.Q.; Zetterberg, H.; Schott, J.M. Cerebrospinal fluid markers including trefoil factor 3 are associated with neurodegeneration in amyloid-positive individuals. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e419-8, doi:10.1038/tp.2014.58.
 42. Vestergaard, E.M.; Nexø, E.; Wendt, A.; Guthmann, F. Trefoil factors in human milk. *Early Hum. Dev.* **2008**, *84*, 631–635, doi:10.1016/j.earlhumdev.2008.04.001.
 43. Barrera Roa, J.; Sanchez Tortolero, G.; Gonzalez, E. Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *J. Heal. Sci.* **2013**, *3*, 1–12, doi:10.17532/jhsci.2013.26.
 44. Zou, J.; Chen, Z.; Liang, C.; Fu, Y.; Wei, X.; Lu, J.; Pan, M.; Guo, Y.; Liao, X.; Xie, H.; et al. Trefoil factor 3, cholinesterase and homocysteine: Potential predictors for Parkinson's disease dementia and vascular parkinsonism dementia in advanced stage. *Aging Dis.* **2018**, *9*, 51–65, doi:10.14336/AD.2017.0416.
 45. Yang, Y.; Lin, Z.; Lin, Q.; Bei, W.; Guo, J. Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 1–14, doi:10.1038/s41419-022-04504-6.
 46. Mashimo, H.; Wu, D.C.; Podolsky, D.K.; Fishman, M.C. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science (80-.)*. **1996**, *274*, 262–265, doi:10.1126/science.274.5285.262.
 47. Svanes, K.; Ito, S.; Takeuchi, K.; Silen, W. Restitution of the surface epithelium of the in vitro frog gastric mucosa after damage with hyperosmolar sodium chloride. Morphologic and physiologic characteristics. *Gastroenterology* **1982**, *82*, 1409–1426, doi:10.1016/0016-5085(82)90077-4.
 48. Taupin, D.; Podolsky, D.K. Trefoil factors: Initiators of mucosal healing. **2003**, *4*, doi:10.1038/nrm1203.
 49. Taupin, D.R.; Kinoshita, K.; Podolsky, D.K. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 799–804,

doi:10.1073/pnas.97.2.799.

50. Chen, Y.H.; Lu, Y.; De Plaen, I.G.; Wang, L.Y.; Tan, X. Di Transcription factor NF- κ B signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 576–582, doi:10.1006/bbrc.2000.3176.
51. Chinery, R.; Playford, R.J. Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin-induced gastric damage in the rat. *Clin. Sci.* **1995**, *88*, 401–403, doi:10.1042/cs0880401.
52. Dürer, U.; Hartig, R.; Bang, S.; Thim, L.; Hoffmann, W. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell. Physiol. Biochem.* **2007**, *20*, 329–346, doi:10.1159/000107519.
53. Liu, D.; el-Hariry, I.; Karayiannakis, A.J.; Wilding, J.; Chinery, R.; Kmiot, W.; McCrea, P.D.; Gullick, W.J.; Pignatelli, M. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab. Invest.* **1997**, *77*, 557–563.
54. Le, J.; Zhang, D.Y.; Zhao, Y.; Qiu, W.; Wang, P.; Sun, Y. ITF promotes migration of intestinal epithelial cells through crosstalk between the ERK and JAK/STAT3 pathways. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10, doi:10.1038/srep33014.
55. Meyer zum Büschenfelde, D.; Tauber, R.; Huber, O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides* **2006**, *27*, 3383–3390, doi:10.1016/j.peptides.2006.08.020.
56. Podolsky, D.K.; Gerken, G.; Eyking, A.; Cario, E. Colitis-Associated Variant of TLR2 Causes Impaired Mucosal Repair Because of TFF3 Deficiency. *Gastroenterology* **2009**, *137*, 209–220, doi:10.1053/j.gastro.2009.03.007.
57. Teng, X.; Xu, L.F.; Zhou, P.; Sun, H.W.; Sun, M. Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF- α , TLR4, and NF- κ B in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. *Inflammation* **2009**, *32*, 120–129, doi:10.1007/s10753-009-9110-x.
58. Fu, T.; Znalesniak, E.B.; Kalinski, T.; Möhle, L.; Biswas, A.; Salm, F.; Dunay, I.R.; Hoffmann, W. TFF Peptides Play a Role in the Immune Response Following Oral Infection of Mice with *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2015**, *5*, 221–231, doi:10.1556/1886.2015.00028.
59. Albert, T.K.; Laubinger, W.; Müller, S.; Hanisch, F.G.; Kalinski, T.; Meyer, F.; Hoffmann, W. Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 3108–3117, doi:10.1021/pr100020c.
60. Madsen, J.; Sorensen, G.L.; Nielsen, O.; Tornøe, I.; Thim, L.; Fenger, C.; Mollenhauer, J.; Holmskov, U. A Variant Form of the Human Deleted in Malignant Brain Tumor 1 (DMBT1) Gene Shows Increased Expression in Inflammatory Bowel Diseases and Interacts with Dimeric Trefoil Factor 3 (TFF3). *PLoS One* **2013**, *8*, e64441, doi:10.1371/journal.pone.0064441.
61. Houben, T.; Harder, S.; Schlüter, H.; Kalbacher, H.; Hoffmann, W. Different Forms of TFF3 in the Human Saliva: Heterodimerization with IgG Fc Binding Protein (FCGBP).

Int. J. Mol. Sci. **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20205000.

62. Dieckow, J.; Brandt, W.; Hattermann, K.; Schob, S.; Schulze, U.; Mentlein, R.; Ackermann, P.; Sel, S.; Paulsen, F.P. CXCR4 and CXCR7 mediate TFF3-induced cell migration independently from the ERK1/2 signaling pathway. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57*, 56–65, doi:10.1167/iovs.15-18129.
63. Barrera Roa, G.J.; Sanchez Tortolero, G. Trefoil factor 3 (TFF3) from human breast milk activates PAR-2 receptors, of the intestinal epithelial cells HT-29, regulating cytokines and defensins. *Bratislava Med. J.* **2016**, *117*, 332–339, doi:10.4149/BLL_2016_066.
64. Belle, N.M.; Ji, Y.; Herbine, K.; Wei, Y.; Park, J.H.; Zullo, K.; Hung, L.Y.; Srivatsa, S.; Young, T.; Oniskey, T.; et al. TFF3 interacts with LINGO2 to regulate EGFR activation for protection against colitis and gastrointestinal helminths. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41467-019-12315-1.
65. Cui, H.Y.; Wang, S.J.; Song, F.; Cheng, X.; Nan, G.; Zhao, Y.; Qian, M.R.; Chen, X.; Li, J.Y.; Liu, F.L.; et al. CD147 receptor is essential for TFF3-mediated signaling regulating colorectal cancer progression. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, doi:10.1038/s41392-021-00677-2.
66. Poulsen, S.S.; Kissow, H.; Hare, K.; Hartmann, B.; Thim, L. Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul. Pept.* **2005**, *126*, 163–171, doi:10.1016/j.regpep.2004.09.007.
67. Mahmood, A.; Melley, L.; Fitzgerald, A.J.; Ghosh, S.; Playford, R.J. Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2005**, *21*, 1357–1364, doi:10.1111/j.1365-2036.2005.02436.x.
68. Peterson, D.E.; Barker, N.P.; Akhmadullina, L.I.; Rodionova, I.; Sherman, N.Z.; Davidenko, I.S.; Rakovskaya, G.N.; Gotovkin, E.A.; Shinkarev, S.A.; Kopp, M. V.; et al. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 4333–4338, doi:10.1200/JCO.2008.21.2381.
69. Oue, N.; Hamai, Y.; Mitani, Y.; Matsumura, S.; Oshimo, Y.; Aung, P.P.; Kuraoka, K.; Nakayama, H.; Yasui, W. Gene Expression Profile of Gastric Carcinoma: Identification of Genes and Tags Potentially Involved in Invasion, Metastasis, and Carcinogenesis by Serial Analysis of Gene Expression. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2397–2405, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3514.
70. Yusufu, A.; Shayimu, P.; Tuerdi, R.; Fang, C.; Wang, F.; Wang, H. TFF3 and TFF1 expression levels are elevated in colorectal cancer and promote the malignant behavior of colon cancer by activating the EMT process. *Int. J. Oncol.* **2019**, *55*, 789–804, doi:10.3892/ijo.2019.4854.
71. Qu, Y.; Yang, Y.; Ma, D.; Xiao, W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol. Rep.* **2012**, *27*, 1277–1283, doi:10.3892/or.2012.1627.

72. You, M.L.; Chen, Y.J.; Chong, Q.Y.; Wu, M.M.; Pandey, V.; Chen, R.M.; Liu, L.; Ma, L.; Wu, Z.S.; Zhu, T.; et al. Trefoil factor 3 mediation of oncogenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma is AKT-BCL-2 dependent. *Oncotarget* **2017**, *8*, 39323–39344, doi:10.18632/oncotarget.16950.
73. Ahmed, A.R.H.; Griffiths, A.B.; Tilby, M.T.; Westley, B.R.; May, F.E.B. TFF3 is a normal breast epithelial protein and is associated with differentiated phenotype in early breast cancer but predisposes to invasion and metastasis in advanced disease. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 904–916, doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.022.
74. Garraway, I.P.; Seligson, D.; Said, J.; Horvath, S.; Reiter, R.E. Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer. *Prostate* **2004**, *61*, 209–214, doi:10.1002/pros.20096.
75. Pandey, V.; Wu, Z.S.; Zhang, M.; Li, R.; Zhang, J.; Zhu, T.; Lobie, P.E. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16*, 1–20, doi:10.1186/s13058-014-0429-3.
76. Gu, J.; Zheng, L.; Zhang, L.; Chen, S.; Zhu, M.; Li, X.; Wang, Y. TFF3 and HER2 expression and their correlation with survival in gastric cancer. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 3001–3007, doi:10.1007/s13277-014-2933-6.
77. Perry, J.K.; Kannan, N.; Grandison, P.M.; Mitchell, M.D.; Lobie, P.E. Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol. Metab.* **2008**, *19*, 74–81, doi:10.1016/j.tem.2007.10.003.
78. Zhang, Y.; Liu, Y.; Wang, L.; Song, H. The expression and role of trefoil factors in human tumors. *Transl. Cancer Res.* **2019**, *8*, 1609–1617, doi:10.21037/tcr.2019.07.48.
79. Liu, J.; Kim, S.Y.; Shin, S.; Jung, S.H.; Yim, S.H.; Lee, J.Y.; Lee, S.H.; Chung, Y.J. Overexpression of TFF3 is involved in prostate carcinogenesis via blocking mitochondria-mediated apoptosis. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, doi:10.1038/s12276-018-0137-7.
80. Lin, X.; Zhang, H.; Dai, J.; Zhang, W.; Zhang, J.; Xue, G.; Wu, J. TFF3 contributes to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in papillary thyroid carcinoma cells via the MAPK/ERK signaling pathway. *J. Cancer* **2018**, *9*, 4430–4439, doi:10.7150/jca.24361.
81. Storesund, T.; Hayashi, K.; Kolltveit, K.M.; Bryne, M.; Schenck, K. Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. *Eur. J. Oral Sci.* **2008**, *116*, 135–140, doi:10.1111/j.1600-0722.2007.00516.x.
82. Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 1745–1770, doi:10.1007/s00018-019-03351-7.
83. Zetter, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 407–424, doi:10.1146/annurev.med.49.1.407.
84. Befani, C.; Liakos, P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 9087–9098, doi:10.1002/jcp.26805.
85. Furuta, G.T.; Turner, J.R.; Taylor, C.T.; Hershberg, R.M.; Comerford, K.; Narravula, S.;

- Podolsky, D.K.; Colgan, S.P. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, 1027–1034, doi:10.1084/jem.193.9.1027.
86. Hernández, C.; Santamatilde, E.; McCreath, K.J.; Cervera, A.M.; Díez, I.; Ortiz-Masiá, D.; Martínez, N.; Calatayud, S.; Esplugues, J. V.; Barrachina, M.D. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: Implications for gastric mucosal healing. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 262–272, doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00044.x.
 87. Guleng, B.; Han, J.; Yang, J.Q.; Huang, Q.W.; Huang, J.K.; Yang, X.N.; Liu, J.J.; Ren, J.L. TFF3 mediated induction of VEGF via hypoxia in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 4127–4134, doi:10.1007/s11033-011-1195-2.
 88. Sun, Y.; Wang, L.; Zhou, Y.; Mao, X.; Deng, X. Human Trefoil Factor 3 induces the transcription of its own promoter through STAT3. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8, doi:10.1038/srep30421.
 89. Rivat, C.; Rodrigues, S.; Bruyneel, E.; Piétu, G.; Robert, A.; Redeuilh, G.; Bracke, M.; Gerspach, C.; Attoub, S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 195–202.
 90. Pandey, V.; Zhang, M.; You, M.; Zhang, W.; Chen, R.; Zhang, W.; Ma, L.; Wu, Z.S.; Zhu, T.; Xu, X.Q.; et al. Expression of two non-mutated genetic elements is sufficient to stimulate oncogenic transformation of human mammary epithelial cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41419-018-1177-6.
 91. Lobie United States Patent Application - Compounds useful in inhibiting human trefoil factor 3.
 92. Zhang, M.; Wang, B.; Chong, Q.Y.; Pandey, V.; Guo, Z.; Chen, R.M.; Wang, L.; Wang, Y.; Ma, L.; Kumar, A.P.; et al. A novel small-molecule inhibitor of trefoil factor 3 (TFF3) potentiates MEK1/2 inhibition in lung adenocarcinoma. *Oncogenesis* **2019**, *8*, doi:10.1038/s41389-019-0173-8.
 93. Chen, R.M.; Chiou, Y.S.; Chong, Q.Y.; Poh, H.M.; Tan, T.Z.; Zhang, M.Y.; Ma, L.; Zhu, T.; Pandey, V.; Salundi, B.; et al. Pharmacological inhibition of TFF3 enhances sensitivity of CMS4 colorectal carcinoma to 5-fluorouracil through inhibition of p44/42 MAPK. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–21, doi:10.3390/ijms20246215.
 94. Carcinoma, E.R.M.; Poh, H.M.; Chiou, Y.S.; Chong, Q.Y.; Chen, R.; Pandey, V.; Lee, S.; Lobie, P.E. Inhibition of TFF3 Enhances Sensitivity — and Overcomes Acquired Resistance — to Doxorubicin in. **2019**, *3*.
 95. Brown, A.C.; Olver, W.I.; Donnelly, C.J.; May, M.E.; Naggert, J.K.; Shaffer, D.J.; Roopenian, D.C. Searching QTL by gene expression : analysis of diabetes. **2005**, *9*, 1–9, doi:10.1186/1471-2156-6-12.
 96. Xue, Y.; Shen, L.; Cui, Y.; Zhang, H.; Chen, Q.; Cui, A.; Fang, F.; Chang, Y. Tff3, as a Novel Peptide, Regulates Hepatic Glucose Metabolism. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–8,

doi:10.1371/journal.pone.0075240.

97. Wu, X.; Zheng, H.; Yang, R.; Luan, X.; Zhang, L.; Jin, Q.; Jin, Y.; Xue, J. Mouse trefoil factor 3 ameliorated high-fat-diet-induced hepatic steatosis via increasing peroxisome proliferator-activated receptor- α -mediated fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2019**, *317*, E436–E445, doi:10.1152/ajpendo.00454.2018.
98. Guillén, N.; Navarro, M.A.; Arnal, C.; Noone, E.; Arbonés-Mainar, J.M.; Acín, S.; Surra, J.C.; Muniesa, P.; Roche, H.M.; Osada, J.S. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol. Genomics* **2009**, *37*, 187–198, doi:10.1152/physiolgenomics.90339.2008.
99. Ge, H.; Gardner, J.; Wu, X.; Rulifson, I.; Wang, J.; Xiong, Y.; Ye, J.; Belouski, E.; Cao, P.; Tang, J.; et al. Trefoil factor 3 (TFF3) is regulated by food intake, improves glucose tolerance and induces mucinous metaplasia. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0126924.
100. Zhu, Y.; Zhao, S.; Deng, Y.; Gordillo, R.; Ghaben, A.L.; Shao, M.; Zhang, F.; Xu, P.; Li, Y.; Cao, H.; et al. Hepatic gale regulates whole-body glucose homeostasis by modulating tff3 expression. *Diabetes* **2017**, *66*, 2789–2799, doi:10.2337/DB17-0323.
101. Tyagi, S.; Gupta, P.; Saini, A.; Kaushal, C.; Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2*, 236–240, doi:10.4103/2231-4040.90879.
102. Bujak, M.; Bujak, I.T.; Sobočanec, S.; Mihalj, M.; Novak, S.; Cosić, A.; Levak, M.T.; Kopačin, V.; Mihaljević, B.; Balog, T.; et al. Trefoil Factor 3 Deficiency Affects Liver Lipid Metabolism. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *47*, 827–841, doi:10.1159/000490039.
103. Shah, A.A.; Leidinger, P.; Keller, A.; Wendschlag, A.; Backes, C.; Baus-Loncar, M.; Meese, E.; Blin, N. The intestinal factor Tff3 and a miRNA network regulate murine caloric metabolism. *RNA Biol.* **2011**, *8*, 1–6, doi:10.4161/rna.8.1.13687.
104. Šešelja, K.; Bazina, I.; Vrecl, M.; Welss, J.; Schicht, M.; Mihalj, M.; Kopačin, V.; Paulsen, F.; Pirman, T.; Baus Lončar, M. Tff3 Deficiency Protects against Hepatic Fat Accumulation after Prolonged High-Fat Diet. *Life* **2022**, *12*, 1–22, doi:10.3390/life12081288.
105. Schächtle, M.A.; Rosshart, S.P. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease and Its Implications for Translational Research. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 1–16, doi:10.3389/fncel.2021.698172.
106. Vilchez-Vargas, R.; Salm, F.; Znalesniak, E.B.; Hauptenthal, K.; Schanze, D.; Zenker, M.; Link, A.; Hoffmann, W. Profiling of the Bacterial Microbiota along the Murine Alimentary Tract. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23031783.
107. Fueger, P.T.; Schisler, J.C.; Lu, D.; Babu, D.A.; Mirmira, R.G.; Newgard, C.B.; Hohmeier, H.E. Trefoil factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet β -cell replication with retention of function. *Mol. Endocrinol.* **2008**, *22*, 1251–1259, doi:10.1210/me.2007-0500.
108. Winkel, L.; Bagge, A.; Larsen, L.; Haase, T.N.; Rasmussen, M.; Lykke, J.; Holmgaard,

- D.B.; Thim, L.; Nielsen, J.H.; Dalgaard, L.T. Trefoil factor 3 in perinatal pancreas is increased by gestational low protein diet and associated with accelerated β -cell maturation. *Islets* **2018**, *10*, 124–135, doi:10.1080/19382014.2018.1472186.
109. Mohammadi-Shemirani, P.; Sjaarda, J.; Gerstein, H.C.; Treleaven, D.J.; Walsh, M.; Mann, J.F.; McQueen, M.J.; Hess, S.; Paré, G. A Mendelian randomization-based approach to identify early and sensitive diagnostic biomarkers of disease. *Clin. Chem.* **2019**, *65*, 427–436, doi:10.1373/clinchem.2018.291104.
 110. Brott, D.A.; Furlong, S.T.; Adler, S.H.; Hainer, J.W.; Arani, R.B.; Pinches, M.; Rossing, P.; Chaturvedi, N. Characterization of renal biomarkers for use in clinical trials: Effect of preanalytical processing and qualification using samples from subjects with diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3191–3198, doi:10.2147/DDDT.S78792.
 111. Probst, J.C.; Skutella, T.; Müller-Schmid, A.; Jirikowski, G.F.; Hoffmann, W. Molecular and cellular analysis of rP1.B in the rat hypothalamus: In situ hybridization and immunohistochemistry of a new P-domain neuropeptide. *Mol. Brain Res.* **1995**, *33*, 269–276, doi:10.1016/0169-328X(95)00137-H.
 112. Probst, J.C.; Zetzsche, T.; Weber, M.; Theilemann, P.; Skutella, T.; Landgraf, R.; Jirikowski, G.F. Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. *FASEB J.* **1996**, *10*, 1518–1523, doi:10.1096/fasebj.10.13.8940297.
 113. Griepentrog, T.; Bauer, M.; Hornstein, C.; Sauer, H.; Jirikowski, G.F. Coexistence of intestinal trefoil factor (hITF) and oxytocin in magnocellular neurons in the human hypothalamus. *Horm. Metab. Res.* **2000**, *32*, 121–124, doi:10.1055/s-2007-978604.
 114. Jagla, W.; Wiede, A.; Dietzmann, K.; Rutkowski, K.; Hoffmann, W. Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1126–1131, doi:10.1096/fasebj.14.9.1126.
 115. Schwarz, H.; Jagla, W.; Wiede, A.; Hoffmann, W. Ultrastructural co-localization of TFF3-peptide and oxytocin in the neural lobe of the porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 411–416, doi:10.1007/s004410100412.
 116. Gert, H.; Henrik, B.; Trübner, K.; Steiner, J.; Bogerts, B. Differential regional and cellular distribution of TFF3 peptide in the human brain. **2015**, 1053–1063, doi:10.1007/s00726-015-1938-9.
 117. Hinz, M.; Schwegler, H.; Chwieralski, C.E.; Laube, G.; Linke, R.; Pohle, W.; Hoffmann, W. Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: Changes in the developing cerebellum. *Peptides* **2004**, *25*, 827–832, doi:10.1016/j.peptides.2004.01.020.
 118. Fu, T.; Stellmacher, A.; Znalesniak, E.B.; Dieterich, D.C.; Kalbacher, H.; Hoffmann, W. Tff3 is expressed in neurons and microglial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *34*, 1912–1919, doi:10.1159/000366389.
 119. Arnold, P.; Rickert, U.; Helmers, A.K.; Spreu, J.; Schneppenheim, J.; Lucius, R. Trefoil factor 3 shows anti-inflammatory effects on activated microglia. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 3–11, doi:10.1007/s00441-016-2370-5.

120. Gardiner, E.J.; Cairns, M.J.; Liu, B.; Beveridge, N.J. Gene expression analysis reveals schizophrenia-associated dysregulation of immune pathways in peripheral blood mononuclear cells. *J. Psychiatr. Res. J.* **2012**.
121. Hashimoto, J.G.; Forquer, M.R.; Tanchuck, M.A.; Deborah, A.; Wiren, K.M. Following Chronic Alcohol Intoxication. **2012**, 57–75, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.11.006.Importance.
122. US Patent Application for gamma secretase notch biomarkers Patent Application (Application #20080020395 issued January 24, 2008) Justia Patent Search Available online: <https://patents.justia.com/patent/20080020395> (accessed on Nov 21, 2022).
123. Shi, H.S.; Yin, X.; Song, L.; Guo, Q.J.; Luo, X.H. Neuropeptide Trefoil factor 3 improves learning and retention of novel object recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.* **2012**, 227, 265–269, doi:10.1016/j.bbr.2011.10.051.
124. Schwarzberg, H.; Kalbacher, H.; Hoffmann, W. Differential behavioral effects of TFF peptides injections of synthetic TFF3 into the rat amygdala. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1999**, 62, 173–178, doi:10.1016/S0091-3057(98)00137-3.
125. Li, J.; Luo, Y.; Zhang, R.; Shi, H.; Zhu, W.; Shi, J. Neuropeptide trefoil factor 3 reverses depressive-like behaviors by activation of BDNF-ERK-CREB signaling in olfactory bulbectomized rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 28386–28400, doi:10.3390/ijms161226105.
126. Shi, H.-S.; Zhu, W.-L.; Liu, J.-F.; Luo, Y.-X.; Si, J.-J.; Wang, S.-J.; Xue, Y.-X.; Ding, Z.-B.; Shi, J.; Lu, L. PI3K/Akt Signaling Pathway in the Basolateral Amygdala Mediates the Rapid Antidepressant-like Effects of Trefoil Factor 3. *Neuropsychopharmacol.* **2012**, 37, 2671–2683, doi:10.1038/npp.2012.131.
127. Wu, P.; Shi, H.S.; Luo, Y.X.; Zhang, R.X.; Li, J.L.; Shi, J.; Lu, L.; Zhu, W.L. Neuropeptide trefoil factor 3 attenuates naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **2014**, 231, 4659–4668, doi:10.1007/s00213-014-3615-1.
128. Qin, J.; Yang, X.; Mi, J.; Wang, J.; Hou, J.; Shen, T.; Li, Y.; Wang, B.; Li, X.; Zhu, W. Enhanced antidepressant-like effects of the macromolecule trefoil factor 3 by loading into negatively charged liposomes. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, 9, 5247–5257, doi:10.2147/OPTH.S69335.
129. Yang, Y.; Wang, J.Z. From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits. *Front. Neural Circuits* **2017**, 11, 1–8, doi:10.3389/fncir.2017.00086.
130. Lubka, M.; Müller, M.; Baus-loncar, M.; Hinz, M.; Blaschke, K.; Hoffmann, W.; Pfister, M.; Pusch, C.M.; Knipper, M.; Blin, N. Cellular Physiology and Biochemistry Lack of Tff3 Peptide Results in Hearing Impairment and Accelerated Presbycusis. *Cell Physiol Biochem* **2008**, 18, 437–444.
131. Hoffmann, W. Trefoil factor family (TFF) peptides and their diverse molecular functions in mucus barrier protection and more: Changing the paradigm. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1–20, doi:10.3390/ijms21124535.
132. Lubka, M.; Shah, A.A.; Blin, N.; Baus-Lončar, M. The intestinal trefoil factor (Tff3), also

- expressed in the inner ear, interacts with peptides contributing to apoptosis. *J. Appl. Genet.* **2009**, *50*, 167–171, doi:10.1007/BF03195669.
133. Liu, S.Q.; Roberts, D.; Zhang, B.; Ren, Y.; Zhang, L.Q.; Wu, Y.H. Trefoil Factor 3 as an Endocrine Neuroprotective Factor from the Liver in Experimental Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0077732.
 134. Kozina, N.; Mihaljević, Z.; Lončar, M.B.; Mihalj, M.; Mišir, M.; Radmilović, M.D.; Justić, H.; Gajović, S.; Šešelja, K.; Bazina, I.; et al. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in tff3^{-/-}/c57bl/6n knockout and wt (C57bl/6n) control mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20205188.
 135. Sigmund, C.D. Viewpoint : Are Studies in Genetically Altered Mice Out of Control ? **2000**, 1425–1429.
 136. Doetschman, T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *530*, 423–433, doi:10.1007/978-1-59745-471-1_23.
 137. Rogner, U.C.; Avner, P. Congenic mice : Cutting tools for complex immune disorders. **2003**, *3*, doi:10.1038/nri1031.
 138. Mekada, K.; Abe, K.; Murakami, A.; Nakamura, S.; Nakata, H.; Moriwaki, K.; Obata, Y.; Yoshiki, A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim.* **2009**, *58*, 141–149, doi:10.1538/expanim.58.141.
 139. Simon, M.M.; Greenaway, S.; White, J.K.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; Wells, S.; Sorg, T.; Wong, K.; Bedu, E.; Cartwright, E.J.; et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* **2013**, *14*, 1–22, doi:10.1186/gb-2013-14-7-r82.
 140. Hoek, J.B.; Rydstrom, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* **1988**, *254*, 1–10, doi:10.1042/bj2540001.
 141. Leung, J.H.; Schurig-Briccio, L.A.; Yamaguchi, M.; Moeller, A.; Speir, J.A.; Gennis, R.B.; Stout, C.D. Division of labor in transhydrogenase by alternating proton translocation and hydride transfer. *Science (80-.)*. **2015**, *347*, 178–181, doi:10.1126/science.1260451.
 142. Nicholson, A.; Reifsnyder, P.C.; Malcolm, R.D.; Lucas, C.A.; MacGregor, G.R.; Zhang, W.; Leiter, E.H. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity* **2010**, *18*, 1902–1905, doi:10.1038/oby.2009.477.
 143. Rendina-Ruedy, E.; Hembree, K.D.; Sasaki, A.; Davis, M.R.; Lightfoot, S.A.; Clarke, S.L.; Lucas, E.A.; Smith, B.J. A comparative study of the metabolic and skeletal response of C57BL/6J and C57BL/6N mice in a diet-induced model of type 2 diabetes. *J. Nutr. Metab.* **2015**, *2015*, 17–21, doi:10.1155/2015/758080.
 144. Fisher-wellman, K.H.; Ryan, T.E.; Smith, C.D.; Gilliam, L.A.A.; Lin, C.; Reese, L.R.; Torres, M.J. A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice. **2016**, *65*, 3249–3261, doi:10.2337/db16-0291.

145. Kawashita, E.; Ishihara, K.; Nomoto, M.; Taniguchi, M.; Akiba, S. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41598-018-36862-7.
146. Close, A.F.; Chae, H.; Jonas, J.C. The lack of functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase only moderately contributes to the impairment of glucose tolerance and glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6J vs C57BL/6N mice. *Diabetologia* **2021**, *64*, 2550–2561, doi:10.1007/s00125-021-05548-7.
147. Buettner, R.; Schölmerich, J.; Bollheimer, L.C. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **2007**, *15*, 798–808, doi:10.1038/oby.2007.608.
148. Kim, D.G.; Krenz, A.; Toussaint, L.E.; Maurer, K.J.; Robinson, S.A.; Yan, A.; Torres, L.; Bynoe, M.S. Non-alcoholic fatty liver disease induces signs of Alzheimer’s disease (AD) in wild-type mice and accelerates pathological signs of AD in an AD model. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, doi:10.1186/s12974-015-0467-5.
149. Park, H.R.; Park, M.; Choi, J.; Park, K.Y.; Chung, H.Y.; Lee, J. A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* **2010**, *482*, 235–239, doi:10.1016/j.neulet.2010.07.046.
150. Tan, B.L.; Norhaizan, M.E. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients* **2019**, *11*, 2579.
151. Chatterjee, S.; Mudher, A. Alzheimer’s disease and type 2 diabetes: A critical assessment of the shared pathological traits. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, doi:10.3389/fnins.2018.00383.
152. De La Monte, S.M.; Wand, J.R. Alzheimer ’ s Disease Is Type 3 Diabetes — Evidence Reviewed. *Eur Neuropsychopharmacol.* **2014**, *24*, 1954–60.
153. Barbagallo, M. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer’s disease. *World J. Diabetes* **2014**, *5*, 889, doi:10.4239/wjd.v5.i6.889.
154. Wennberg, A.M.V.; Spira, A.P.; Pettigrew, C.; Soldan, A.; Zipunnikov, V.; Rebok, G.W.; Roses, A.D.; Lutz, M.W.; Miller, M.M.; Thambisetty, M.; et al. Blood glucose levels and cortical thinning in cognitively normal, middle-aged adults. *J. Neurol. Sci.* **2016**, *365*, 89–95, doi:10.1016/j.jns.2016.04.017.
155. Sim, A.Y.; Barua, S.; Kim, J.Y.; Lee, Y.H.; Lee, J.E. Role of DPP-4 and SGLT2 Inhibitors Connected to Alzheimer Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 1–11, doi:10.3389/fnins.2021.708547.
156. Marrano, N.; Biondi, G.; Borrelli, A.; Rella, M.; Zambetta, T.; Gioia, L. Di; Caporusso, M.; Logroscino, G.; Perrini, S.; Giorgino, F.; et al. Type 2 Diabetes and Alzheimer ’ s Disease : The Emerging Role of Cellular Lipotoxicity. **2023**, 1–22.
157. Sharma, S. High fat diet and its effects on cognitive health: alterations of neuronal and vascular components of brain. *Physiol. Behav.* **2021**, *240*, 113528, doi:10.1016/j.physbeh.2021.113528.

158. Yoo, D.Y.; Kim, W.; Yoo, K.Y.; Nam, S.M.; Chung, J.Y.; Yoon, Y.S.; Won, M.H.; Hwang, I.K. Effects of pyridoxine on a high-fat diet-induced reduction of cell proliferation and neuroblast differentiation depend on cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the mouse dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.* **2012**, *90*, 1615–1625, doi:10.1002/jnr.23035.
159. Arnold, S.E.; Lucki, I.; Brookshire, B.R.; Carlson, G.C.; Browne, C.A.; Kazi, H.; Bang, S.; Choi, B.R.; Chen, Y.; McMullen, M.F.; et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *67*, 79–87, doi:10.1016/j.nbd.2014.03.011.
160. de Paula, G.C.; Brunetta, H.S.; Engel, D.F.; Gaspar, J.M.; Velloso, L.A.; Engblom, D.; de Oliveira, J.; de Bem, A.F. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 1–12, doi:10.3389/fnins.2021.734158.
161. Kanoski, S.E.; Davidson, T.L. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol. Behav.* **2011**, *103*, 59–68, doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003.
162. Rao, Y.L.; Ganaraja, B.; Murlimanju, B. V.; Joy, T.; Krishnamurthy, A.; Agrawal, A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer’s disease: a review. *3 Biotech* **2022**, *12*, 1–10, doi:10.1007/s13205-022-03123-4.
163. Toda, T.; Parylak, S.L.; Linker, S.B.; Gage, F.H. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 67–87, doi:10.1038/s41380-018-0036-2.
164. Altman, J.; Das, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **1966**, *126*, 337–389, doi:10.1002/cne.901260302.
165. Altman, J.; Das, G.D. Altman_et_al-1965-The_Journal_of_Comparative_Neurology. *J. Comp. Neurol.* **1965**, *124*, 319–336.
166. Moreno-Jiménez, E.P.; Terreros-Roncal, J.; Flor-García, M.; Rábano, A.; Llorens-Martín, M. Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 2541–2553, doi:10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020.
167. Jurkowski, M.P.; Bettio, L.; K. Woo, E.; Patten, A.; Yau, S.Y.; Gil-Mohapel, J. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 1–36, doi:10.3389/fncel.2020.576444.
168. Baptista, P.; Andrade, J.P. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Front. Neuroanat.* **2018**, *12*, 1–23, doi:10.3389/fnana.2018.00044.
169. Chiazza, F.; Bondi, H.; Masante, I.; Ugazio, F.; Bortolotto, V.; Canonico, P.L.; Grilli, M. Short high fat diet triggers reversible and region specific effects in DCX+ hippocampal immature neurons of adolescent male mice. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–14, doi:10.1038/s41598-

021-01059-y.

170. Mu, Y.; Gage, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2011**, *6*, 1–9, doi:10.1186/1750-1326-6-85.
171. Moreno-Jiménez, E.P.; Flor-García, M.; Terreros-Roncal, J.; Rábano, A.; Cafini, F.; Pallas-Bazarra, N.; Ávila, J.; Llorens-Martín, M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 554–560, doi:10.1038/s41591-019-0375-9.
172. Scopa, C.; Marrocco, F.; Latina, V.; Ruggeri, F.; Corvaglia, V.; La Regina, F.; Ammassari-Teule, M.; Middei, S.; Amadoro, G.; Meli, G.; et al. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ.* **2020**, *27*, 934–948, doi:10.1038/s41418-019-0409-3.
173. Holmes, C. Inflammation in Alzheimer's disease. *Dementia, Fifth Ed.* **2017**, *14*, 508–518, doi:10.1201/9781315381572.
174. Envigo Mouse speed congenic services Available online: <https://www.envigo.com/genetic-testing/speed-congenic-services> (accessed on Dec 21, 2022).
175. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) Protocol - IMPReSS Available online: <https://www.mousephenotype.org/impress/ProcedureInfo?action=list&procID=531> (accessed on Nov 21, 2022).
176. Fawaz G. Haj Intraperitoneal Insulin Tolerance Test Available online: <https://www.mmpc.org/shared/document.aspx?id=84&docType=Protocol> (accessed on Nov 21, 2022).
177. PARK, P.W.; GOINS, R.E. In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1262–1266, doi:10.1111/J.1365-2621.1994.TB14691.X.
178. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613, doi:10.1093/NAR/GKY1131.
179. Thaler, J.P.; Yi, C.X.; Schur, E.A.; Guyenet, S.J.; Hwang, B.H.; Dietrich, M.O.; Zhao, X.; Sarruf, D.A.; Izgur, V.; Maravilla, K.R.; et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 153–162, doi:10.1172/JCI59660.
180. Clayton JA; Collins FS NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* **2014**, *509*, 282–283.
181. Hertel, S.C.; Chwieralski, C.E.; Hinz, M.; Rio, M.C.; Tomasetto, C.; Hoffmann, W. Profiling trefoil factor family (TFF) expression in the mouse: Identification of an antisense TFF1-related transcript in the kidney and liver. *Peptides* **2004**, *25*, 755–762, doi:10.1016/j.peptides.2003.11.021.

182. Eslam, M.; Sanyal, A.J.; George, J.; Sanyal, A.; Neuschwander-Tetri, B.; Tiribelli, C.; Kleiner, D.E.; Brunt, E.; Bugianesi, E.; Yki-Järvinen, H.; et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1999–2014.e1, doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312.
183. Badmus, O.O.; Hillhouse, S.A.; Anderson, C.D.; Hinds, T.D.; Stec, D.E. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. *Clin. Sci. (Lond)*. **2022**, *136*, 1347–1366, doi:10.1042/CS20220572.
184. Juárez-Hernández, E.; Chávez-Tapia, N.C.; Uribe, M.; Barbero-Becerra, V.J. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 1–10, doi:10.1186/s12937-016-0191-8.
185. Fridén, M.; Rosqvist, F.; Ahlström, H.; Niessen, H.G.; Schultheis, C.; Hockings, P.; Hulthe, J.; Gummesson, A.; Wanders, A.; Rorsman, F.; et al. Hepatic Unsaturated Fatty Acids Are Linked to Lower Degree of Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Med.* **2022**, *8*, 1–9, doi:10.3389/fmed.2021.814951.
186. Rosqvist, F.; Kullberg, J.; Ståhlman, M.; Cedernaes, J.; Heurling, K.; Johansson, H.E.; Iggman, D.; Wilking, H.; Larsson, A.; Eriksson, O.; et al. Overeating Saturated Fat Promotes Fatty Liver and Ceramides Compared with Polyunsaturated Fat: A Randomized Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 6207–6219, doi:10.1210/jc.2019-00160.
187. Meex, R.C.R.; Blaak, E.E. Mitochondrial Dysfunction is a Key Pathway that Links Saturated Fat Intake to the Development and Progression of NAFLD. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, 1–11, doi:10.1002/mnfr.201900942.
188. Wang, D.; Wei, Y.; Pagliassotti, M.J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* **2006**, *147*, 943–951, doi:10.1210/en.2005-0570.
189. Leamy, A.K.; Egnatchik, R.A.; Young, J.D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 165–174, doi:10.1016/j.plipres.2012.10.004.
190. Lee, C.-H. Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Non-Alcoholic Fatty Liver: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2020**.
191. Shantanam, S.; Mueller Omega-3 Fatty Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults and Children: Where Do We Stand? HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **2018**, *176*, 139–148, doi:10.1097/MCO.0000000000000539.Omega-3.
192. Masterton, G.S.; Plevris, J.N.; Hayes, P.C. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**, *31*, 679–692, doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04230.x.
193. Jeyapal, S.; Kona, S.R.; Mullapudi, S.V.; Putcha, U.K.; Gurumurthy, P.; Ibrahim, A. Substitution of linoleic acid with α -linolenic acid or long chain n-3 polyunsaturated fatty acid prevents Western diet induced nonalcoholic steatohepatitis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14, doi:10.1038/s41598-018-29222-y.

194. Schmöcker, C.; Weylandt, K.H.; Kahlke, L.; Wang, J.; Lobeck, H.; Tiegs, G.; Berg, T.; Kang, J.X. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* **2007**, *45*, 864–869, doi:10.1002/hep.21626.
195. Kotronen, A.; Seppänen-Laakso, T.; Westerbacka, J.; Kiviluoto, T.; Arola, J.; Ruskeepää, A.L.; Orešič, M.; Yki-Järvinen, H. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* **2009**, *58*, 203–208, doi:10.2337/db08-1074.
196. Chiappini, F.; Coilly, A.; Kadar, H.; Gual, P.; Tran, A.; Desterke, C.; Samuel, D.; Duclos-Vallée, J.C.; Touboul, D.; Bertrand-Michel, J.; et al. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–17, doi:10.1038/srep46658.
197. Allard, J.P.; Aghdassi, E.; Mohammed, S.; Raman, M.; Avand, G.; Arendt, B.M.; Jalali, P.; Kandasamy, T.; Prayitno, N.; Sherman, M.; et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 300–307, doi:10.1016/j.jhep.2007.09.009.
198. Name, M.A. Van; Savoye, M.; Chick, J.M.; Galuppo, B.T.; Feldstein, A.E.; Pierpont, B.; Johnson, C.; Shabanova, V.; Ekong, U.; Valentino, P.L.; et al. A Low ω -6 to ω -3 PUFA Ratio (n-6/n-3 PUFA) Diet to Treat Fatty Liver Disease in Obese Youth.pdf. **2020**, 2314–2321.
199. Valenzuela, R.; Videla, L.A. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct.* **2011**, *2*, 644–648, doi:10.1039/c1fo10133a.
200. Sertoglu, E.; Kayadibi, H.; Uyanik, M. A biochemical view: Increase in polyunsaturated fatty acid ω -6/ ω -3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Diabetes Complications* **2015**, *29*, 157, doi:10.1016/j.jdiacomp.2014.10.005.
201. Honma, M.; Sawada, S.; Ueno, Y.; Murakami, K.; Yamada, T.; Gao, J.; Kodama, S.; Izumi, T.; Takahashi, K.; Tsukita, S.; et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 1544–1555, doi:10.1038/s41366-018-0062-9.
202. Kubota, N.; Tobe, K.; Terauchi, Y.; Eto, K.; Yamauchi, T.; Suzuki, R.; Tsubamoto, Y.; Komeda, K.; Nakano, R.; Miki, H.; et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. *Diabetes* **2000**, *49*, 1880–1889, doi:10.2337/diabetes.49.11.1880.
203. Kubota, N.; Kubota, T.; Kajiwara, E.; Iwamura, T.; Kumagai, H.; Watanabe, T.; Inoue, M.; Takamoto, I.; Sasako, T.; Kumagai, K.; et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–16, doi:10.1038/ncomms12977.
204. Krause, C.; Geißler, C.; Tackenberg, H.; El Gammal, A.T.; Wolter, S.; Spranger, J.; Mann, O.; Lehnert, H.; Kirchner, H. Multi-layered epigenetic regulation of IRS2 expression in the liver of obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* **2020**, *63*,

- 2182–2193, doi:10.1007/s00125-020-05212-6.
205. Tilg, H.; Effenberger, M.; Adolph, T.E. A role for IL-1 inhibitors in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opin. Investig. Drugs* **2020**, *29*, 103–106, doi:10.1080/13543784.2020.1681397.
206. Almog, T.; Kandel Kfir, M.; Levkovich, H.; Shlomai, G.; Barshack, I.; Stienstra, R.; Lustig, Y.; Leikin Frenkel, A.; Harari, A.; Bujanover, Y.; et al. Interleukin-1 α deficiency reduces adiposity, glucose intolerance and hepatic de-novo lipogenesis in diet-induced obese mice. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2019**, *7*, 1–11, doi:10.1136/bmjdr-2019-000650.
207. Wang, S.; Gao, S.; Li, Y.; Qian, X.; Luan, J.; Lv, X. Emerging Importance of Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand in Liver Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 1–15, doi:10.3389/fcell.2021.716842.
208. Zhang, X.Q.; Xu, C.F.; Yu, C.H.; Chen, W.X.; Li, Y.M. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 1768–1776, doi:10.3748/wjg.v20.i7.1768.
209. Torres, L.; Karam, S.M.; Wendling, C.; Chenard, M.; Kershenobich, D.; Tomasetto, C.; Rio, M. Trefoil Factor 1 (TFF1 / pS2) Deficiency Activates the Unfolded Protein Response. **2002**, *8*, 273–282.
210. Ren, C.; Dokter-fokkens, J.; Lozano, S.F.; Zhang, Q.; Haan, B.J. De; Zhang, H.; Faas, M.M.; Vos, P. De Lactic Acid Bacteria May Impact Intestinal Barrier Function by Modulating Goblet Cells. **2018**, *1700572*, 1–14, doi:10.1002/mnfr.201700572.
211. Asada, R.; Saito, A.; Kawasaki, N.; Kanemoto, S.; Iwamoto, H.; Oki, M.; Miyagi, H.; Izumi, S.; Imaizumi, K. The Endoplasmic Reticulum Stress Transducer OASIS Is involved in the Terminal Differentiation of Goblet Cells in the Large Intestine * □. **2012**, *287*, 8144–8153, doi:10.1074/jbc.M111.332593.
212. Sivanand Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Physiol. Behav.* **2019**, *176*, 139–148, doi:10.1016/j.tem.2017.07.003.Surviving.
213. Li, H.; Meng, Q.; Xiao, F.; Chen, S.; Du, Y.; Yu, J.; Wang, C.; Guo, F. ATF4 deficiency protects mice from high-carbohydrate-diet-induced liver steatosis. *Biochem. J.* **2011**, *438*, 283–289, doi:10.1042/BJ20110263.
214. Xiao, G.; Zhang, T.; Yu, S.; Lee, S.; Calabuig-Navarro, V.; Yamauchi, J.; Ringquist, S.; Dong, H.H. ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 25350–25361, doi:10.1074/jbc.M113.470526.
215. Seo, J.; Fortunato, E.S.; Jae, M.S.; Stenesen, D.; Tang, W.; Parks, E.J.; Adams, C.M.; Townes, T.; Graff, J.M. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes* **2009**, *58*, 2565–2573, doi:10.2337/db09-0335.
216. Pelletier, J.; Thomas, G.; Volarevic, S. Players and Therapeutic Avenues. *Nat. Publ. Gr.* **2017**, *18*, 51–63.

217. Oie, S.; Matsuzaki, K.; Yokoyama, W.; Tokunaga, S.; Waku, T.; Han, S.I.; Iwasaki, N.; Mikogai, A.; Yasuzawa-Tanaka, K.; Kishimoto, H.; et al. Hepatic rRNA Transcription Regulates High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 807–820, doi:10.1016/j.celrep.2014.03.038.
218. Lyabin, D.N.; Eliseeva, I.A.; Ovchinnikov, L.P. YB-1 protein: Functions and regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2014**, *5*, 95–110, doi:10.1002/wrna.1200.
219. Wang, L.; Gulappa, T.; Menon, K.M.J. Identification and characterization of proteins that selectively interact with the LHR mRNA binding protein (LRBP) in rat ovaries. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803*, 591–597, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.02.003.
220. Salerno, A.G.; Rentz, T.; Dorighello, G.G.; Marques, A.C.; Lorza-Gil, E.; Wanschel, A.C.B.A.; De Moraes, A.; Vercesi, A.E.; Oliveira, H.C.F. Lack of mitochondrial NADP(H)-transhydrogenase expression in macrophages exacerbates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Biochem. J.* **2019**, *476*, 3769–3789, doi:10.1042/BCJ20190543.
221. Pihlajamäki, J.; Lerin, C.; Itkonen, P.; Boes, T.; Floss, T.; Schroeder, J.; Dearie, F.; Crunkhorn, S.; Burak, F.; Jimenez-Chillaron, J.C.; et al. Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 208–218, doi:10.1016/j.cmet.2011.06.007.
222. Reilly, P.T.; Yu, Y.; Hamiche, A.; Wang, L. Cracking the ANP32 whips: Important functions, unequal requirement, and hints at disease implications. *BioEssays* **2014**, *36*, 1062–1071, doi:10.1002/bies.201400058.
223. Gujral, P.; Mahajan, V.; Lissaman, A.C.; Ponnampalam, A.P. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2020**, *18*, 1–11, doi:10.1186/s12958-020-00637-5.
224. Shin, H.S.; Lee, Y.; Shin, M.H.; Cho, S.I.; Zouboulis, C.C.; Kim, M.K.; Lee, D.H.; Chung, J.H. Histone deacetylase 1 reduces lipogenesis by suppressing srebp1 transcription in human sebocyte cell line sz95. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–14, doi:10.3390/ijms22094477.
225. Yang, X.; Lu, B.; Sun, X.; Han, C.; Fu, C.; Xu, K.; Wang, M.; Li, D.; Chen, Z.; Opal, P.; et al. ANP32A regulates histone H3 acetylation and promotes leukemogenesis. *Leukemia* **2018**, *32*, 1587–1597, doi:10.1038/s41375-018-0010-7.
226. Ho, N.; Sommers, M.S.; Lucki, I. *Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: Links to cognition and depression*; Elsevier Ltd, 2013; Vol. 37; ISBN 2155733305.
227. Belovari, T.; Bijelić, N.; Levak, M.T.; Lončar, M.B. Trefoil factor family peptides TFF1 and TFF3 in the nervous tissues of developing mouse embryo. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2015**, *14*, 33–37, doi:10.17305/bjbms.2015.251.
228. Tian, X.; Liu, Z.; Niu, B.; Zhang, J.; Tan, T.K.; Lee, S.R.; Zhao, Y.; Harris, D.C.H.; Zheng, G. E-Cadherin/β-catenin complex and the epithelial barrier. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, doi:10.1155/2011/567305.
229. Sierra, A.; Encinas, J.M.; Maletic-Savatic, M. Adult human neurogenesis: From

- microscopy to magnetic resonance imaging. *Front. Neurosci.* **2011**, *5*, 1–18, doi:10.3389/fnins.2011.00047.
230. Couillard-Despres, S.; Winner, B.; Schaubeck, S.; Aigner, R.; Vroemen, M.; Weidner, N.; Bogdahn, U.; Winkler, J.; Kuhn, H.G.; Aigner, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 1–14, doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x.
231. Gusel'nikova, V. V.; Korzhevskiy, D.E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae* **2015**, *7*, 42–47, doi:10.32607/20758251-2015-7-2-42-47.
232. Yagi, S.; Galea, L.A.M. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **2019**, *44*, 200–213, doi:10.1038/s41386-018-0208-4.
233. Sheppard, P.A.S.; Choleris, E.; Galea, L.A.M. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Mol. Brain* **2019**, *12*, 28–30, doi:10.1186/s13041-019-0442-7.
234. Mhaweche-Fauceglia, P.; Wang, D.; Samrao, D.; Liu, S.; Dupont, N.C.; Pejovic, T. Trefoil factor family 3 (TFF3) expression and its interaction with estrogen receptor (ER) in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *130*, 174–180, doi:10.1016/j.ygyno.2013.03.030.
235. Lin, Y.T.; Chen, C.C.; Huang, C.C.; Nishimori, K.; Hsu, K. Sen Oxytocin stimulates hippocampal neurogenesis via oxytocin receptor expressed in CA3 pyramidal neurons. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/s41467-017-00675-5.
236. Brinkmalm, A.; Brinkmalm, G.; Honer, W.G.; Frölich, L.; Hausner, L.; Minthon, L.; Hansson, O.; Wallin, A.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; et al. SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9*, 53, doi:10.1186/1750-1326-9-53.
237. Grosse, G.; Grosse, J.; Tapp, R.; Kuchinke, J.; Gorsleben, M.; Fetter, I.; Höhne-Zell, B.; Gratzl, M.; Bergmann, M. SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **1999**, *56*, 539–546, doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990601)56:5<539::AID-JNR9>3.0.CO;2-Y.
238. Stepanow, S.; Honolka, J.; Gambardella, P.; Vitali, L.; Abdurakhmanova, N.; Tseng, T.C.; Rauschenbach, S.; Tait, S.L.; Sessi, V.; Klyatskaya, S.; et al. [19 9 3 Nature Publishing Group](#). *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2517–2528.
239. Lakin, N.D.; Morris, P.J.; Theil, T.; Sato, T.N.; Möröy, T.; Wilson, M.C.; Latchmant, D.S. Regulation of neurite outgrowth and SNAP-25 gene expression by the Brn-3a transcription factor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15858–15863, doi:10.1074/jbc.270.26.15858.
240. Ohira, K.; Kobayashi, K.; Toyama, K.; Nakamura, H.K.; Shoji, H.; Takao, K.; Takeuchi, R.; Yamaguchi, S.; Kataoka, M.; Otsuka, S.; et al. Synaptosomal-associated protein 25 mutation induces immaturity of the dentate granule cells of adult mice. *Mol. Brain* **2013**, *6*, 1–17, doi:10.1186/1756-6606-6-12.

241. Zhang, R.; Xue, Y.Y.; Lu, S.D.; Wang, Y.; Zhang, L.M.; Huang, Y.L.; Signore, A.P.; Chen, J.; Sun, F.Y. Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *24*, 345–356, doi:10.1016/j.nbd.2006.07.012.
242. Connolly, M.G.; Yost, O.L.; Potter, O. V.; Giedraitis, M.E.; Kohman, R.A. Toll-like receptor 4 differentially regulates adult hippocampal neurogenesis in an age- and sex-dependent manner. *Hippocampus* **2020**, *30*, 958–969, doi:10.1002/hipo.23209.
243. Seo, H.; Lee, K. Cell-specific expression of Epac2 in the subventricular and subgranular zones. *Mol. Brain* **2019**, *12*, 10–13, doi:10.1186/s13041-019-0537-1.
244. Yuan, A.; Sasaki, T.; Rao, M. V.; Kumar, A.; Kanumuri, V.; Dunlop, D.S.; Liem, R.K.; Nixon, R.A. Neurofilaments form a highly stable stationary cytoskeleton after reaching a critical level in axons. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 11316–11329, doi:10.1523/JNEUROSCI.1942-09.2009.
245. Blázquez, E.; Velázquez, E.; Hurtado-Carneiro, V.; Ruiz-Albusac, J.M. Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2014**, *5*, 1–21, doi:10.3389/fendo.2014.00161.
246. Schubert, M.; Brazil, D.P.; Burks, D.J.; Kushner, J.A.; Ye, J.; Flint, C.L.; Farhang-Fallah, J.; Dikkes, P.; Warot, X.M.; Rio, C.; et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 7084–7092, doi:10.1523/jneurosci.23-18-07084.2003.
247. Chirivella, L.; Kirstein, M.; Ferrón, S.R.; Domingo-Muelas, A.; Durupt, F.C.; Acosta-Umanzor, C.; Cano-Jaimez, M.; Pérez-Sánchez, F.; Barbacid, M.; Ortega, S.; et al. Cyclin-Dependent Kinase 4 Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation in Response to Insulin. *Stem Cells* **2017**, *35*, 2403–2416, doi:10.1002/stem.2694.
248. Killick, R.; Scales, G.; Leroy, K.; Causevic, M.; Hooper, C.; Irvine, E.E.; Choudhury, A.I.; Drinkwater, L.; Kerr, F.; Al-Qassab, H.; et al. Deletion of Irs2 reduces amyloid deposition and rescues behavioural deficits in APP transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 257–262, doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.032.
249. Freude, S.; Schilbach, K.; Schubert, M. The Role of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor Signaling for the Pathogenesis of Alzheimers Disease: From Model Organisms to Human Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 213–223, doi:10.2174/156720509788486527.
250. Schmid, R.S.; Maness, P.F. L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2008**, *18*, 245–250, doi:10.1016/j.conb.2008.07.015.
251. Grońska-Pęski, M.; Schachner, M.; Hébert, J.M. L1cam curbs the differentiation of adult-born hippocampal neurons. *Stem Cell Res.* **2020**, *48*, doi:10.1016/j.scr.2020.101999.
252. Galvez-Contreras, A.Y.; Quiñones-Hinojosa, A.; Gonzalez-Perez, O. The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of the adult mammalian brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 1–13,

doi:10.3389/fncel.2013.00258.

253. Donier, E.; Gomez-Sanchez, J.A.; Grijota-Martinez, C.; Lakomá, J.; Baars, S.; Garcia-Alonso, L.; Cabedo, H. L1CAM binds ErbB receptors through Ig-like domains coupling cell adhesion and neuregulin signalling. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0040674.
254. Miranda, M.; Morici, J.F.; Zanoni, M.B.; Bekinschtein, P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–25, doi:10.3389/fncel.2019.00363.
255. Tang, Y.; Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 1181–1194, doi:10.1007/s12035-014-9070-5.
256. Robison, L.S.; Albert, N.M.; Camargo, L.A.; Anderson, B.M.; Salinero, A.E.; Riccio, D.A.; Abi-Ghanem, C.; Gannon, O.J.; Zuloaga, K.L. High-fat diet-induced obesity causes sex-specific deficits in adult hippocampal neurogenesis in mice. *eNeuro* **2020**, *7*, doi:10.1523/ENEURO.0391-19.2019.
257. Šešelja, K.; Bazina, I.; Welss, J.; Schicht, M.; Paulsen, F.; Bijelić, N.; Rođak, E.; Horvatić, A.; Gelemanović, A.; Mihalj, M.; et al. Effect of Tff3 deficiency and ER stress in the liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20184389.
258. Deftu, A.T.; Ciorescu, R.; Gheorghe, R.O.; Mihăilescu, D.; Ristoiu, V. CXCL1 and CXCL2 Inhibit the Axon Outgrowth in a Time- and Cell-Type-Dependent Manner in Adult Rat Dorsal Root Ganglia Neurons. *Neurochem. Res.* **2019**, *44*, 2215–2229, doi:10.1007/s11064-019-02861-x.

8. ILUSTRACIJE

8.1. Popis tablica

Tablica 1. Sastav PCR reakcijskih smjesa za jedan uzorak

Tablica 2. Početnice korištene za genotipizaciju *Tff3*^{-/-} miševa

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije

Tablica 4. Početnice korištene za qPCR analize s optimiziranim uvjetima

Tablica 5. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju za jedan uzorak - prema High Capacity DNA Reverse Transcription Kit uz dodatak RNAznih inhibitora

Tablica 6. Uvjeti reakcije reverzne transkriptaze

Tablica 7. Sastav qPCR reakcijske smjese za jednu reakciju

Tablica 8. Uvjeti QPCR reakcije

Tablica 9. Sastav Tris-Glicin SDS poliakrilamidnog gela

Tablica 10. Popis korištenih antitijela i razrjeđenja

Tablica 11. Analiza masnih kiselina u jetri životinja hranjenih visokomasnom prehranom 9 tjedana

Tablica 12. Rezultati LC MS/MS analize – proteini sa značajno promijenjenom ekspresijom u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke izložene visokomasnoj prehrani kroz 9 tjedana

8.2. Popis slika

Slika 1. Shema sekundarne strukture TFF proteina. Crvenim krugom označen primjer engl. *trefoil* domene kod TFF3 proteina. Karakterističnu domenu koja sadržava cisteinske ostatke koji formiraju tri disulfidne veze u konfiguraciji CysI–V, CysII–IV, and CysIII–V ima i TFF1, a dvije takve domene TFF2 protein, kako je prikazano na slici. Preuzeto i prilagođeno prema [17].

Slika 2. Molekularni mehanizam djelovanja TFF3 u GI sustavu. Ligandi Tlr2, kao što je Pam3CysSK4, stimuliraju sekreciju TFF3 iz vrčastih stanica i TFF3 se može vezati na receptor Lingo2 čime povećava signalizaciju Egfr i posljedično pospješuje epitelnu migraciju i blokira *anoikis* (vrsta apoptoze koja se pokreće kada se stanica odvajaju od substrata) s ciljem zacijeljivanja ozljede. Nadalje, TFF3 suprimira crijevnu upalu preko Par-2 i Tlr4/NFkB signalnog puta. Prilagođeno i preuzeto prema [45].

Slika 3. Prikaz i usporedba klasičnog i selektivnog križanja kao dva pristupa razvijanja novog kongeničnog mišjeg soja. Statistički izračuni ukazuju kako je u prosjeku klasičnim pristupom potrebno oko 10 generacija križanja da se eliminiira genomski materijal soja donora mutacije, dok je selektivnim križanjem gdje se odabiru ‘genski najsličniji’ životinje u svakoj generaciji potrebno oko 5. Preuzeto i prilagođeno prema [137].

Slika 4. Generiranje heterozigota (*Tff3*^{+/-}) F1 generacije. Genotip miševa određen je metodom PCR i umnažanjem gena *Tff3*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane u agaroznom gelu kako je prikazano na slici. Miševi koji posjeduju funkcionalni *Tff3* gen su divlji tip životinje i na gelu su vizualizirani jednom DNA vrpcom od 300pb (oznaka WT – engl. wild-type). Heterozigotni miševi posjeduju ‘divlji tip’ alel i *Tff3* *knock out* mutaciju, a vizualizirani su s dvije DNA vrpce od 300pb i od 500pb (oznaka HET). *Tff3*^{-/-} miševi su označeni s oznakom KO. Za provjeru veličine PCR produkata korišten je DNA marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

Slika 5. Generiranje homozigota (*Tff3*^{-/-}) na C57BL/6N genskoj podlozi. Genotip miševa određen je metodom PCR i umnažanjem gena *Tff3*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane u agaroznom gelu kako je prikazano na slici. Heterozigotni miševi posjeduju ‘divlji tip’ alel i *Tff3* *knock out* mutaciju, a vizualizirani su s dvije DNA vrpce od 300pb i od 500pb (oznaka HET). *Tff3*^{-/-} miševi s delecijom *Tff3* gena su označeni oznakom KO (engl. *knock out*) i vizualizirani jednom DNA vrpcom od 500pb. Za provjeru veličine PCR produkata korišten je DNA marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

Slika 6. Tjelesna masa WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj i standardnoj hrani a) masa miševa starosti 9 tjedana hranjenih standardnom hranom (SD) b) masa miševa

starosti 20 tjedana nakon 9 tjedana visokomasne hrane (HFD). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$.

Slika 7. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na 9 tjedana starim miševima izloženim standardnoj prehrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Slika 8. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na 17 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 6 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*.

Slika 9. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 9 tjedana starim miševima izloženim standardnoj hrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*.

Slika 10. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 18 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 7 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) je mjerena u različitim vremenskim intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Slika 11. Nakon 9 tjedana visokomasne hrane *Tff3*^{-/-} mužjaci imaju sniženu razinu triglicerida u serumu u usporedbi sa WT mužjacima. Izmjerene su razine LDL (engl. *low density lipoprotein*) kolesterola, HDL kolesterola (engl. *high density lipoprotein*), ukupnog kolesterola, triglicerida, urata, uree, ukupnih proteina, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) i alkalne fosfataze (ALP) za sve grupe životinje te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija (n=5 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Bonferoni post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Slika 12. Genska ekspresija *Tff3* u jetri C57BL/6N miševa hranjenih standardnom i visokomasnom prehranom. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) WT ženke na standardnoj prehrani (SD) u odnosu na WT mužjake na standardnoj prehrani (SD) (WT mužjak SD=1) b) WT ženke na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT mužjake na visokomasnoj prehrani (HFD) (WT mužjak HFD=1) c) WT mužjaci na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT mužjake na standardnoj prehrani (SD) (WT mužjak SD=1) d) WT ženke na visokomasnoj prehrani (HFD) u odnosu na WT ženke na standardnoj prehrani (SD) (WT ženke SD=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću *** $p \leq 0.001$.

Slika 13. Vizualizacija lipida pomoću Oil Red O bojanja u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom prehranom. Kriorezovi jetre su bojani Oil Red O za vizualizaciju lipida (crveno), a jezgre su obojane hematoksilin bojom (ljubičasto). Mjerilo: 200 μ m.

Slika 14. Genska ekspresija markera uključenih u metabolizam lipida u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću ** $p \leq 0.01$.

Slika 15. Genska ekspresija markera upale u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green

detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1) (n=5 miševa po grupi). Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Slika 16. Genska ekspresija markera stresa endoplazmatkog retikuluma i oksidativnog stresa u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću ** $p \leq 0.01$.

Slika 17. Genska ekspresija *Cxcr7*, *Il1a*, *Irs2* i *Atf4* u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola, starosti 20 tjedana izloženih standardnoj prehrani (engl. SD). Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženka=1).

Slika 18. Shematski prikaz interakcija proteina koji su statistički značajno promijenjeni u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u usporedbi s WT ženkama na visokomasnoj prehrani. Interakcije su vizualizirane koristeći programski alat STRING [178], a proteini su označeni imenima iz STRING baze.

Slika 19. Razina *Ybx1* i *Anp32a* proteina je značajno povećana u jetri *Tff3*^{-/-} ženki u odnosu na WT ženke. Izolirani su proteini iz tkiva jetre miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina jetre iz 1 životinje). a) razina proteina *Ybx1* i *Anp32a* u jetri WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Slika 20. Razina NeuN i Dcx proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} miševa oba spola u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusa iz 1 životinje). a) razina proteina NeuN i Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. c) razina proteina NeuN i Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$.

Slika 21. Imunohistokemijska analiza markera NeuN u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera zrelih neurona (NeuN) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali NeuN (crveno) su preklopljeni (merge) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 22. Imunohistokemijska analiza markera NeuN u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera zrelih neurona (NeuN) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali NeuN (crveno) su preklopljeni (merge) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 23. Imunohistokemijska analiza markera Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera nezrelih neurona (Dcx) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Dcx (crveno) su preklopljeni (merge) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 24. Imunohistokemijska analiza markera Dcx u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgovu su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera nezrelih

neurona (Dcx) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Dcx (crveno) su preklapljeni (merge) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 25. Razina Snap-25 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusa iz 1 životinje). a) razina proteina Snap-25 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja c) razina proteina Snap-25 hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

Slika 26. Genska ekspresija markera adultne neurogeneze u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo hipokampusa iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Slika 27. Razine Gfap i Iba1 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene visokomasnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih visokomasnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot. a) razina proteina Gfap i Iba 1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela b) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja c) razina proteina Gfap i Iba 1 hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih visokomasnoj prehrani (HFD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$.

Slika 28. Imunohistokemijska analiza markera Gfap u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgov su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera astrocita (Gfap) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Gfap (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 29. Imunohistokemijska analiza markera Gfap u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgov su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera astrocita (Gfap) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Gfap (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 30. Imunohistokemijska analiza markera Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgov su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera mikroglia (Iba1) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Iba1 (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 31. Imunohistokemijska analiza markera Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih kratkotrajnom tretmanu visokomasnom hranom. Nakon perfuzije životinja, polovice mozgov su fiksirane, uklopljene, izrezane i obilježene specifičnim protutijelima za vizualizaciju markera mikroglia (Iba1) u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki. Sekcije su analizirane koristeći Olympus BX51TF mikroskop, Olympus Stream Essentials (Olympus, Japan) i ImageJ programski alat. Signali Iba1 (crveno) su preklopljeni (*merge*) s DAPI bojom (plavo) koja boja jezgre.

Slika 32. Genska ekspresija upalnih markera u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Miševi su žrtvovani, prikupljeno je tkivo jetre iz kojeg je izolirana RNA i za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na Sybr green detekciji (n=5 miševa po grupi). Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na WT mužjake (WT mužjak=1) b) *Tff3*^{-/-} ženke u odnosu na WT ženke (WT ženke=1). Statistička značajnost je prikazana pomoću. ** $p \leq 0.01$.

Slika 33. Razine NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 proteina u hipokampusu *Tff3*^{-/-} mužjaka i ženki u odnosu na WT kontrole izložene standardnoj prehrani. Izolirani su proteini iz hipokampusa miševa izloženih standardnoj prehrani i analizirani su metodom Western blot (n=5 miševa po grupi, 1 vrpca predstavlja uzorak proteina hipokampusa iz 1 životinje). a) razina proteina NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} mužjaka izloženih standardnoj prehrani (SD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela c) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. b) razina proteina NeuN, Dcx, Snap-25, Gfap i Iba1 hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} ženki izloženih standardnoj prehrani (SD) analizirana metodom Western blot koristeći specifična protutijela d) rezultati su kvantificirani pomoću programa ImageJ, a signali su normalizirani pomoću amidoblack bojanja. Za statističku analizu dobivenih vrijednosti je korišten Studentov t test i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

9. ŽIVOTOPIS

Kate Šešelja je rođena 6. studenog 1991. godine u Zadru. Osnovnu školu Petar Lorini je završila u Salima na Dugom otoku, a 2010. godine je maturirala u gimnaziji Jurja Barakovića (prirodoslovno-matematički smjer) u Zadru. Iste godine je upisala preddiplomski studij biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu, nakon čega na istome odsjeku upisuje diplomski studij eksperimentalne biologije (modul Fiziologija i Imunologija). Diplomirala je 2016. godine čime stječe titulu magistre eksperimentalne biologije, a svoj diplomski rad je izradila na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF. Zatim je u sklopu organizacije Erasmus odradila stručnu praksu u trajanju od 3 mjeseca u istraživačkoj grupi pod vodstvom dr. sc. Pavela Stopke na *Faculty of Science, Charles University, Prag*. Pri povratku u Zagreb, zapošljava se (stručno osposobljavanje bez zasnivanja radnog odnosa) na mjesto kustosa u Prirodoslovnom muzeju u Zagrebu gdje također sudjeluje u znanstveno-istraživačkom radu pod vodstvom mentorice dr. sc. Martine Podnar Lešić. Od veljače 2018. godine zaposlena je kao asistent u u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković gdje je izradila svoju doktorsku disertaciju pod mentorstvom dr. sc. Mirele Baus Lončar. Tijekom zaposlenja bila je istraživač na više znanstvenih projekata, aktivno je sudjelovala na tri međunarodna kongresa te je položila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama (B kategorija) održan na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Također, usavršavala se na *Institute of Functional and Clinical Anatomy, FAU Erlangen, Njemačka* u sklopu bilateralnog projekta *Systemic impact of TFF3 deficiency on tissue integrity*. Istraživački rad je rezultirao s tri objavljena znanstvena rada, od toga dva kao prvi autor. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih organizacija.

10. POPIS PUBLIKACIJA

- Kozina, N.; Mihaljević, Z.; Lončar, M.B.; Mihalj, M.; Mišir, M.; Radmilović, M.D.; Justić, H.; Gajović, S.; Šešelja, K.; Bazina, I.; et al. Impact of high salt diet on cerebral vascular function and stroke in Tff3^{-/-} C57BL6/N knockout and WT (C57BL6/N) control mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20205188.
- Šešelja, K.; Bazina, I.; Welss, J.; Schicht, M.; Paulsen, F.; Bijelić, N.; Rođak, E.; Horvatić, A.; Gelemanović, A.; Mihalj, M.; et al. Effect of Tff3 deficiency and ER stress in the liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20184389.
- Šešelja, K.; Bazina, I.; Vrecl, M.; Welss, J.; Schicht, M.; Mihalj, M.; Kopačin, V.; Paulsen, F.; Pirman, T.; Baus Lončar, M. Tff3 Deficiency Protects against Hepatic Fat Accumulation after Prolonged High-Fat Diet. *Life* **2022**, *12*, 1–22, doi:10.3390/life12081288.

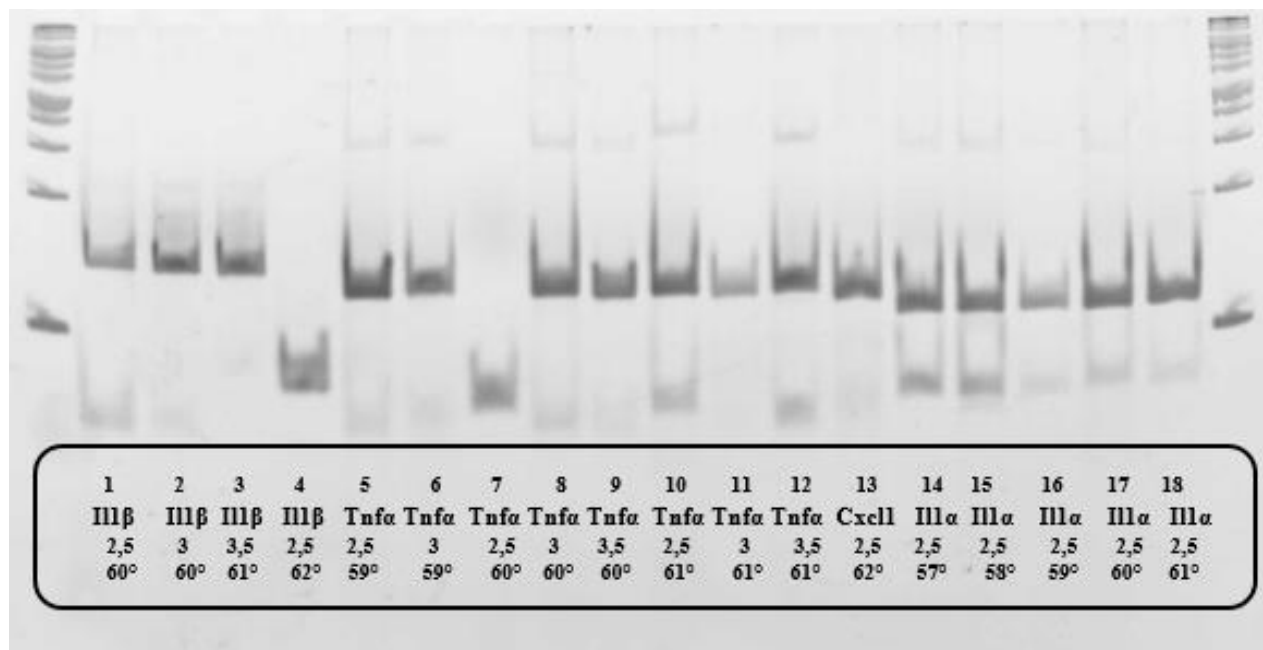
11. POPIS KRATICA

ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin transaminaza
AMPC	molekula inhibitor Tff3 od engl. <i>2-amino-4-(4-(6-fluoro-5-methylpyridin-3-yl)phenyl)-5-oxo-4H,5H-pyrano[3,2-c]chromene-3-carbonitrile</i>
ANOVA	analiza varijanci
Anp32a	engl. <i>acidic nuclear phosphoprotein pp32</i>
Araf	engl. <i>serine/threonine-protein kinase A-Raf</i>
AST	aspartat transaminaza
Atf4	engl. <i>activated transcription factor 4</i>
Atf6	engl. <i>activating transcription factor 6</i>
Bat3	engl. <i>Y2H-HLA-B-associated transcript 3</i>
BCA	bicinhoninska kiselina
Bdnf	engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CD147	engl. <i>extracellular MMP inducer</i>
CD44	engl. <i>CD44 antigen</i>
cDNA	komplementarna DNA od engl. <i>complementary DNA</i>
ChE	engl. <i>cholinesterase activity</i>
CMS	engl. <i>chronic mild stressor model</i>
CREB	engl. <i>cAMP-responsive element-binding</i>
C _T	prag ciklusa od engl. <i>cycle threshold</i>
Cxcl1	engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
Cxcr4	engl. <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
Cxcr7	engl. <i>atypical chemokine Receptor 3</i>
db/db	mišji model tip 2 dijabetesa s mutacijom gena (db) koji kodira za receptor leptina
Dcx	engl. <i>doublecortin</i>
DIO	engl. <i>diet induced obesity</i>
Dmbt1	engl. <i>deleted In Malignant Brain Tumors 1</i>
DTT	engl. <i>dithiothreitol</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina od engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Egf	engl. <i>epidermal growth factor</i>
Egfr	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
Erk	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
Erk1/2	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
Fcgbp	engl. <i>IgG Fc binding protein</i>
FDR	stopa lažnog otkrivanja od engl. <i>false discovery rate</i>
Gale	engl. <i>UDP-glucose 4-epimerase</i>
Gfap	engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GI	Gastrointestinalni
Hcy	engl. <i>homocysteine</i>
HDL	lipoprotein visoke gustoće od engl. <i>high-density lipoprotein</i>
HET	Heterozigot

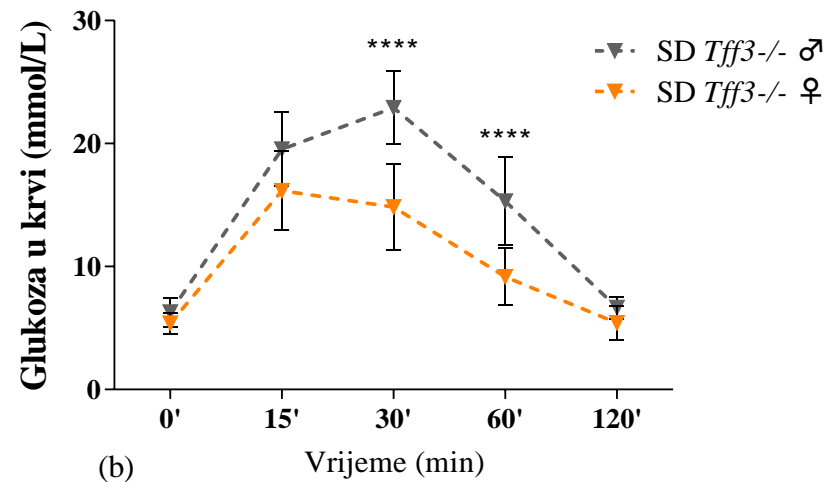
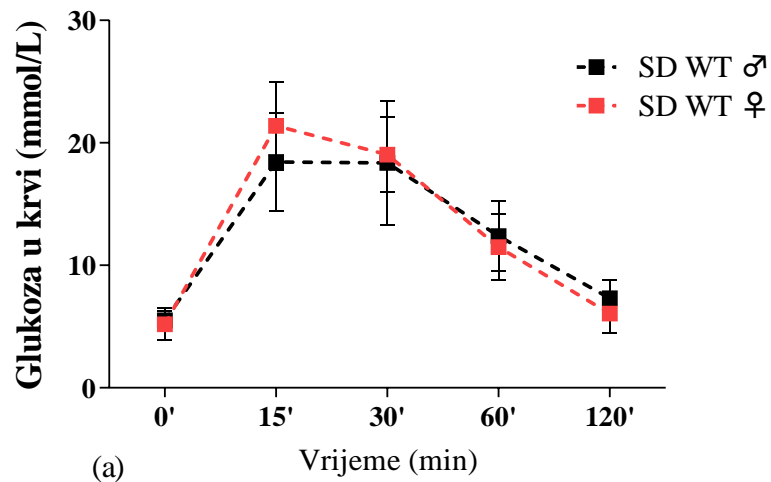
HFD	visokomasna hrana od engl. <i>high-fat diet</i>
Hif1 α	engl. <i>hipoxia inducible transcription factor -1 α</i>
Hnrnd	engl. <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>
Iba1	engl. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
Il1 α	engl. <i>interleukin 1α</i>
INHAT	engl. <i>inhibitor of histone acetyltransferases</i>
IPGTT	intraperitonealni test tolerancije na glukozu
IPITT	intraperitonealni test tolerancije na inzulin
Ire1 α	engl. <i>inositol-requiring protein 1 alpha</i>
Irs2	engl. <i>insulin receptor substrate 2</i>
ITF	engl. <i>intestinal trefoil factor</i>
JAK	engl. <i>janus kinase</i>
KO	engl. <i>knock out</i>
L1cam	engl. <i>L1 cell adhesion molecule</i>
LC MS/MS	tekućinske kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa od engl. <i>liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometry</i>
LDL	lipoprotein niske gustoće od engl. <i>low-density lipoprotein</i>
Lingo2	engl. <i>leucine-rich repeat receptor and nogo-interacting protein 2</i>
MAFLD	engl. <i>metabolic associated fatty liver disease</i>
Mapk	engl. <i>mitogen activated protein kinase</i>
mRNA	glasnička RNA od engl. <i>messenger RNA</i>
Muc2	mucin 2
Muc5ac	mucin 5ac
Muc6	mucin 6
NADH+	engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide+</i>
NADPH	engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAFLD	nealkoholna masna bolest jetre od engl. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NeuN	engl. <i>neuronal nuclear protein</i>
NF- κ B	engl. <i>nuclear factor kappa B</i>
Nnt	engl. <i>nicotinamide nucleotide transhydrogenase</i>
Notch	engl. <i>neurogenic locus notch homolog</i>
ob/ob	mišji model tip 2 dijabetesa s mutacijom gena (ob) koji kodira za leptin
PAGE	engl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Par2	engl. <i>protease activated receptor 2</i>
Pb	parovi baza
PBS	otopina puferirana fosfatima od engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom od engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pCreb	engl. <i>phosphorylated cAMP response element-binding protein</i>
Pcsk	lipopolipeptid Pam3CysSK4
Perk	engl. <i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>
PFA	Paraformaldehid
p-I3K	engl. <i>phosphatidylinositol 3-kinases</i>
Ppara	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
Ppary	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>

ps2	engl. <i>human breast cancer-associated ps2</i>
Ptgs2	engl. <i>prostaglandin G/H synthase 2</i>
PUFA	polinezasičene masne kiseline od engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom od engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
rRNA	ribosomalna RNA
SD	standardna hrana od engl. <i>standard diet</i>
SDS	natrijev dodecilsulfat od eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFA	zasičene masne kiseline od engl. <i>saturated fatty acids</i>
Sirt1	engl. <i>sirtuin 1</i>
Sfpq	engl. <i>splicing factor, proline and glutamine rich protein</i>
Snap-25	engl. <i>synaptosomal-Associated Protein, 25kDa</i>
Stat3	engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STRING	engl. <i>search tool for the retrieval of interacting genes/proteins</i>
SŽS	središnji živčani sustav
TBST	otopina puferirana Trisom s dodatkom Tweena od engl. <i>Tris-buffered Saline with Tween</i>
TFF1	engl. <i>trefoil factor 1</i>
TFF2	engl. <i>trefoil factor 2</i>
TFF3	engl. <i>trefoil factor 3</i>
Tlr2	engl. <i>toll-like receptor 2</i>
Tlr4	engl. <i>toll-like receptor 4</i>
UPR	engl. <i>unfolded protein response</i>
Vegf	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	divlji tip od engl. <i>wild type</i>
Ybx1	engl. <i>Y-box binding protein 1</i>

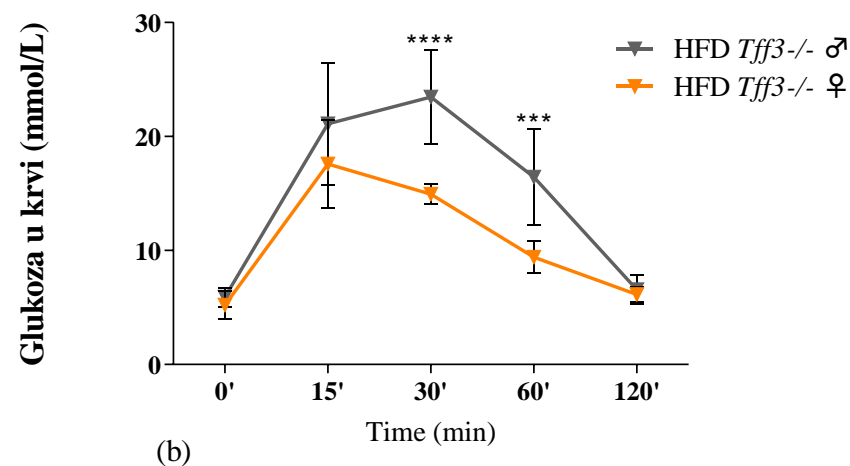
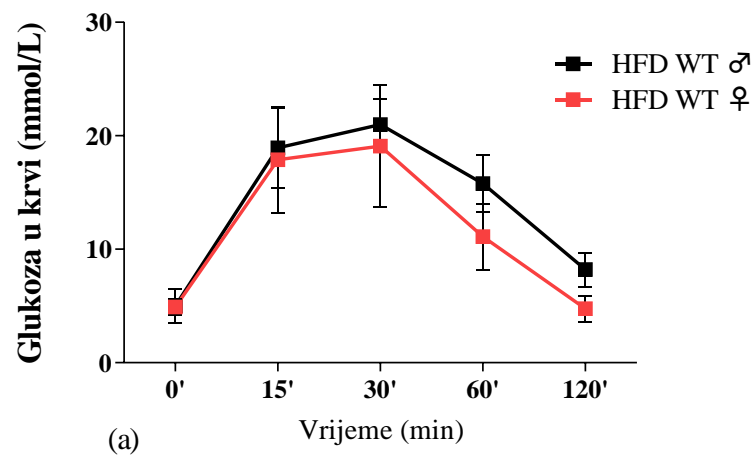
12. PRIVITAK



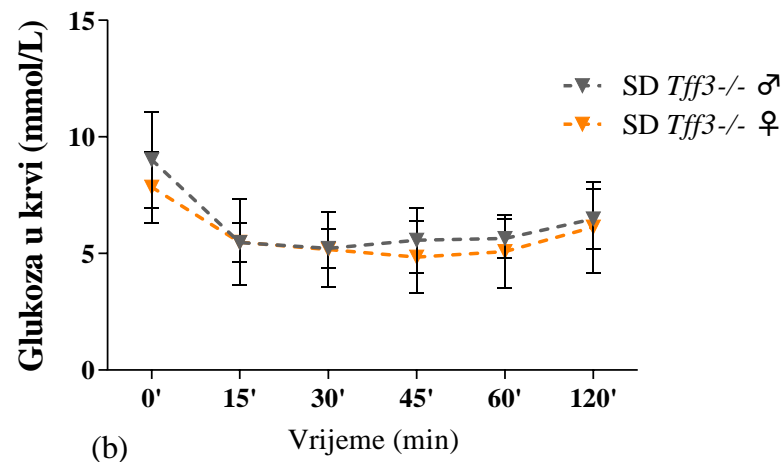
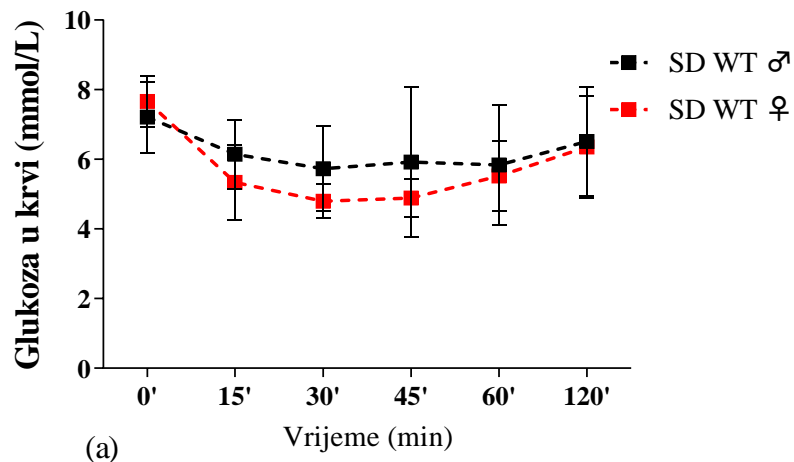
Privitak 1. Provjera specifičnosti početnica *IL1β*, *Tnfα*, *Cxcl1* i *Il1α* za qPCR analizu pomoću vertikalne elektroforeze i 12% PAGE gela. Za reprezentativni primjer postupka optimizacije početnica prikazana je provjera specifičnosti *IL1β*, *Tnfα*, *Cxcl1* i *Il1α* početnica, a ista analiza je provedena za sve početnice korištene u okviru ovog doktorskog rada koje su navedene u Tablici 4. Isprobane su različite koncentracije MgCl₂ u reakcijskoj smjesi (2,5, 3 i 3,5mM) te različite temperature vezanja početnica. Vizualizirane DNA vrcpe na 12% poliakrilamidnom gelu pokazuju koje su reakcije specifične, odnosno za koju qPCR reakciju postoji 1 umnožen produkt. Takve reakcije i odgovarajući optimizirani uvjeti su korišteni u provedenim qPCR analizama. Za provjeru veličine PCR produkata korišten je DNA marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.



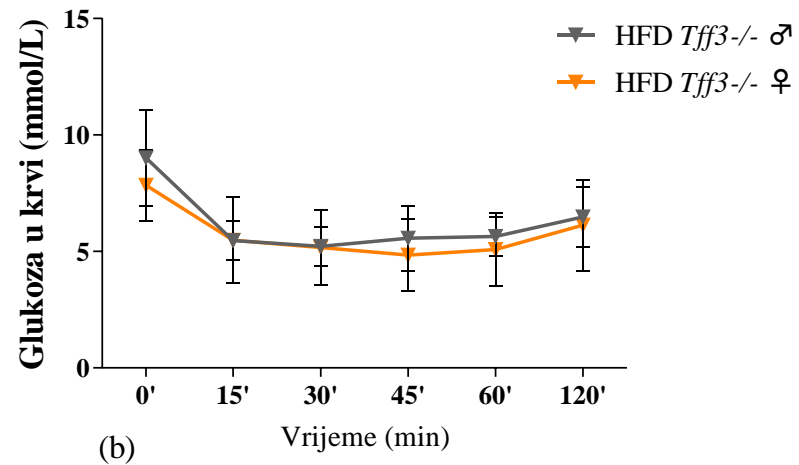
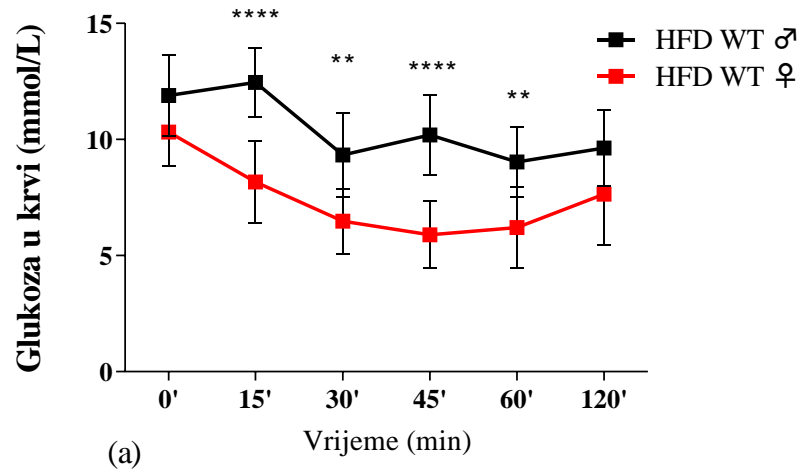
Privitak 2. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na miševima starim 9 tjedana izloženim standardnoj prehrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) mjerena je u različitim vremenski intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću **** $p \leq 0.0001$.



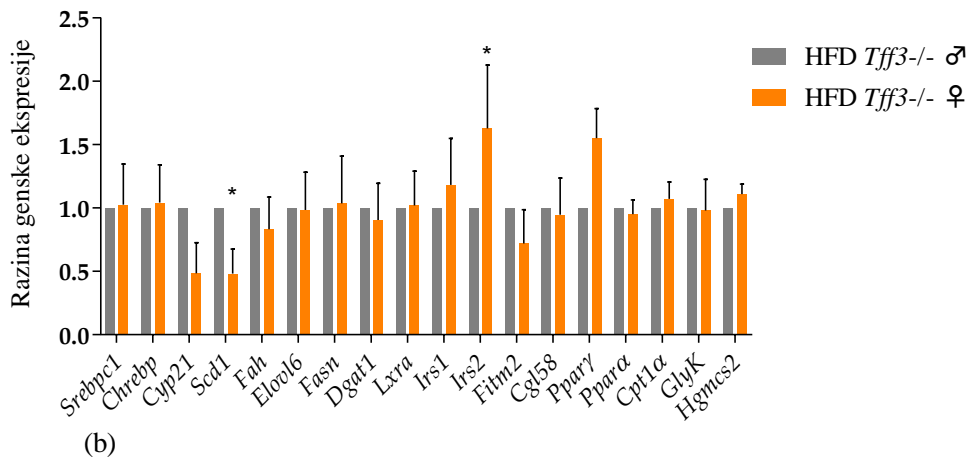
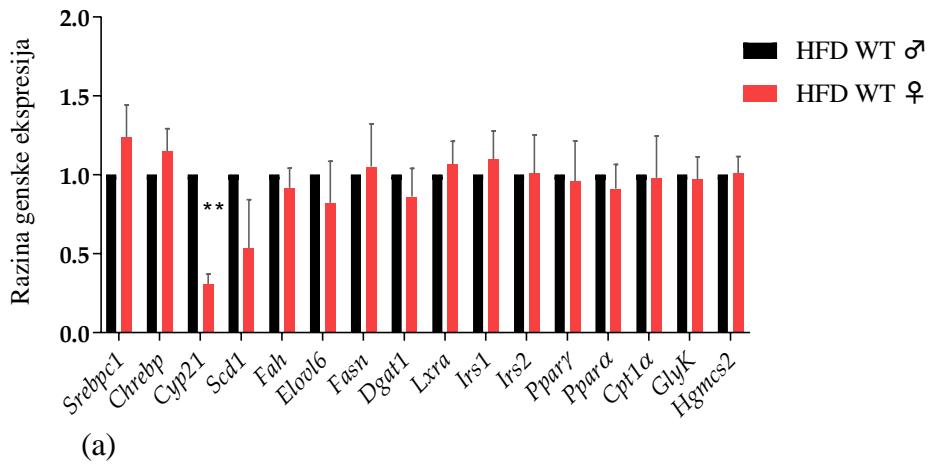
Privitak 3. Intraperitonealni test tolerancije na glukozu (IPGTT) proveden na 17 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 6 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) mjerena je u različitim vremenski intervalima, prije injiciranja glukoze (0min) te nakon (15, 30, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana pomoću *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$.



Privitak 4. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 9 tjedana starun miševima izloženim standardnoj prehrani. Razina glukoze u krvi (mmol/L) mjerena je u različitim vremenski intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*.

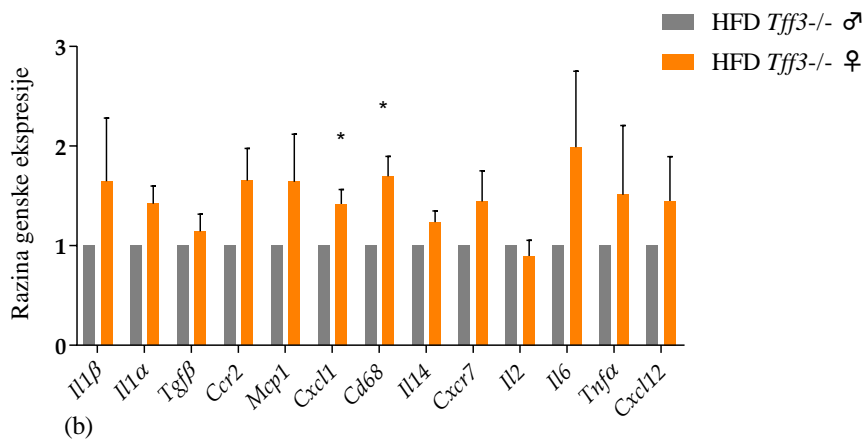
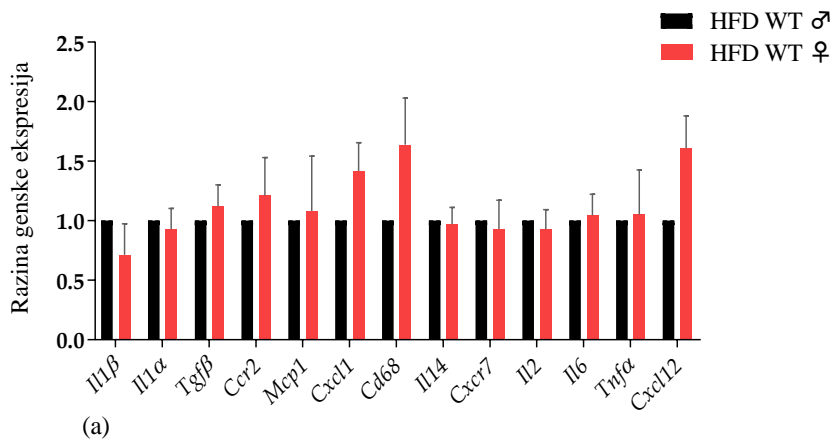


Privitak 5. Intraperitonealni test tolerancije na inzulin (IPITT) proveden na 18 tjedana starim miševima izloženim visokomasnoj hrani 7 tjedana. Razina glukoze u krvi (mmol/L) mjerena je u različitim vremenski intervalima, prije injiciranja inzulina (0min) te nakon (15, 30, 45, 60 i 120 min). Rezultati u obliku srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) su prikazani a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n~10 miševa po grupi). Za statističku analizu korišten je test *Two-way ANOVA* pa *Tukey post hoc*, a značajnost je prikazana sa ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.



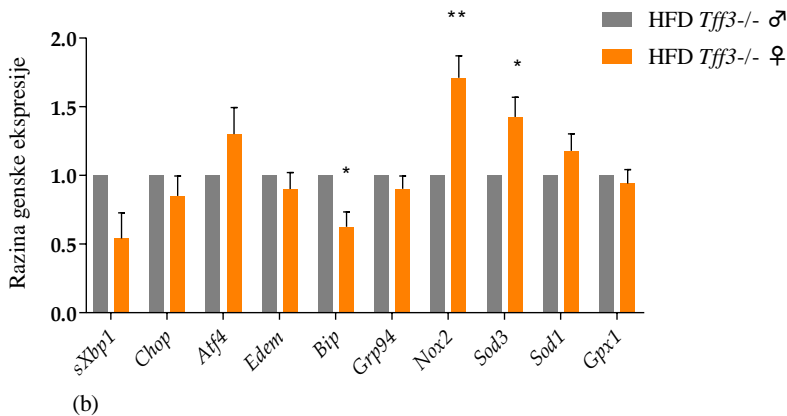
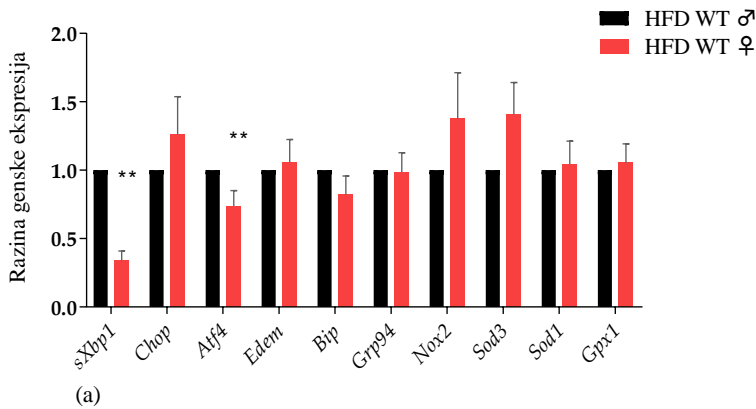
Privitak 6. Genska ekspresija markera uključenih metabolizma lipida u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na SYBR green detekciji. Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*) a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n=5 miševa po grupi). Statistička značajnost je prikazana pomoću *p< 0.05 ** p< 0.01.

Nazivi gena na engleskom jeziku: *Srebp1*—sterol regulatory element-binding transcription factor 1; *Chrebp*—carbohydrate response element-binding protein; *Cyp21*—cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1; *Scd1*- stearyl-CoA desaturase 1, *Fah*- fumarylacetoacetate hydrolase, *Elovl6*- elongation of long-chain fatty acids family member 6; *Fasn*- fatty acid synthase; *Dgat1*—diacylglycerol O-acyltransferase; *Lxra*- nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; *Irs1*—insulin receptor substrate 1; *Irs2*—insulin receptor substrate 2;; *Fitm2*—fat storage-inducing transmembrane protein 2; *Cgl58*—alpha/beta-hydrolase domain containing 5; *Ppara*—peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *Pparγ*—peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *Glyk*—glycerol kinase; *Hmgcs2*—3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase *Fabp1*—fatty acid-binding protein 1;



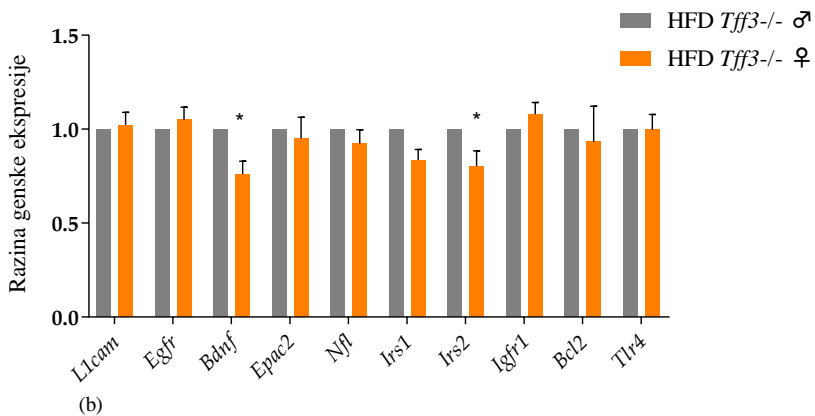
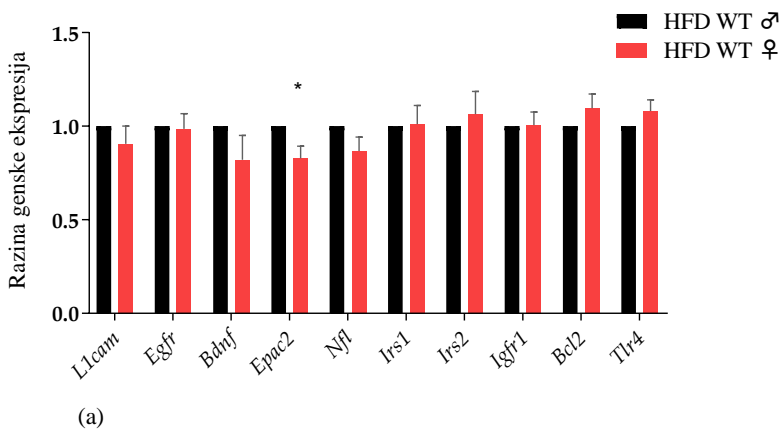
Privitak 7. Genska ekspresija markera upale u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na SYBR green detekciji. Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*) su prikazani (a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n=5 miševa po grupi). Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$.

Nazivi gena na engleskom jeziku: *Il-1 β* —interleukin 1 beta ; *Il-1 α* —interleukin 1 alpha; *Tgf β* —tumor growth factor beta; *Ccr2*—chemokine (C-C motif) receptor 2; *Mcp1*- chemokine (C-C motif) ligand 2; *Cxcl1*— C-X-C motif chemokine ligand 1; *Cd68*—mouse CD68 antigen; *Il-14*—interleukin 14; *Cxcr7*—atypical chemokine receptor 3; *Il-2*- interleukin 2; *Il-6*—interleukin 6, *Tnf α* —tumour necrosis factor alpha; *Cxcl12*— C-X-C motif chemokine ligand 12

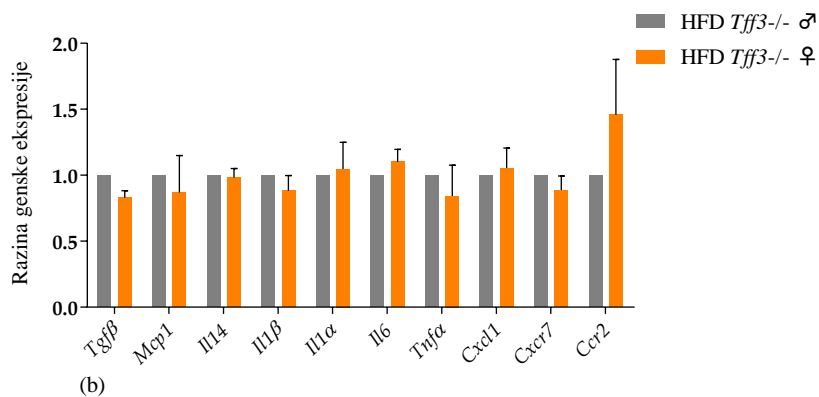
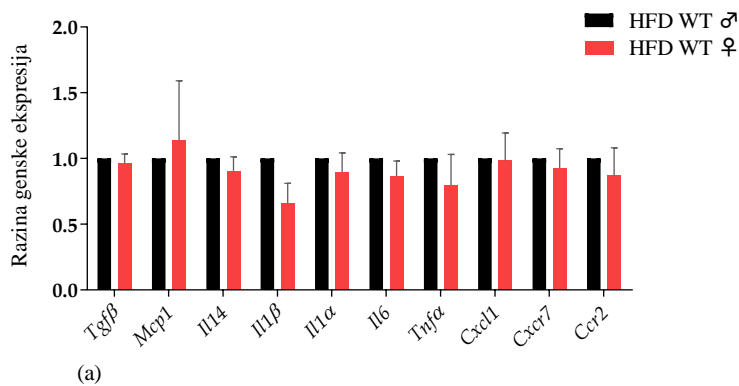


Privitak 8. Genska ekspresije markera stresa endoplazmatkog retikuluma i oksidativnog stresa u jetri WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na SYBR green detekciji. Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke. Statistička značajnost je prikazana pomoću * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

Nazivi gena na engleskom jeziku: *sXbp1* – spliced X-box binding protein 1 ; *Chop* - C/EBP-homologous protein, *Atf4* - activating transcription factor 4; *Edem* - ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein; *Bip* - binding immunoglobulin protein ; *Grp94* - glucose-regulated protein 94; *Nox2*—NADPH oxidase 2 ; *Sod3*— superoxide dismutase 3; *Sod1*— superoxide dismutase 1; *Gpx1*- glutathione peroxidase 1



Privitak 9. Genska ekspresije markera adultne neurogeneze u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na SYBR green detekciji. Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of the mean, SEM*). a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n=5 miševa po grupi). Statistička značajnost je prikazana pomoću *p ≤ 0.05.



Privitak 10. Genska ekspresija upalnih markera u hipokampusu WT i *Tff3*^{-/-} miševa oba spola izloženih visokomasnoj prehrani (engl. HFD) kroz 9 tjedana. Za analizu genske ekspresije korištena je qPCR metoda zasnovana na SYBR green detekciji. Dobivene Ct vrijednosti su analizirane pomoću softvera REST ©, a rezultati su prikazani u obliku srednje vrijednosti stope promjene (engl. *fold change mean*) i standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error*

of the mean, SEM). a) WT mužjaci u odnosu na WT ženke b) *Tff3*^{-/-} mužjaci u odnosu na *Tff3*^{-/-} ženke (n=5 miševa po grupi).

Nazivi gena na engleskom: *Tgfb*—tumor growth factor beta; *Mcp1*- chemokine (C-C motif) ligand 2; *Il-14*—interleukin 14; *Il-1β*—interleukin 1 beta ; *Il-1α*—interleukin 1 alpha; *Il-6*—interleukin 6; *Tnfα*—tumour necrosis factor alpha; *Cxcl1*— C-X-C motif chemokine ligand 1; *Cxcr7*—atypical chemokine receptor 3