

Izražaj ko-aktivatora 2 jezgrinih receptora u uterusu tijekom rane trudnoće u miševa

Šantek, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:292380>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**

Repository / Repozitorij:

BIotech

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Iva Šantek

*Izražaj ko-aktivatora 2 jezgrinih receptora u uterusu tijekom rane
trudnoće u miševa*

Završni rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Iva Šantek

*Izražaj ko-aktivatora 2 jezgrinih receptora u uterusu tijekom rane
trudnoće u miševa*

Završni rad

Rijeka, 2018.

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Undergraduate programme "Biotechnology and drug research"

Iva Šantek

*The expression of nuclear receptor coactivator 2 in the murine uterus
during early pregnancy*

Final paper

Rijeka, 2018.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

Komentor rada: dr. sc. Sandra Šučurović, znanstveni suradnik

Završni rad obranjen je dana 24. srpnja 2018. godine pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Ivana Ratkaj

2. doc. dr. sc. Željka Maglica

3. prof. dr. sc. Biserka Mulac-Jeričević

4. dr. sc. Sandra Šučurović, znanstveni suradnik

Rad ima 44 stranice, 14 slika i 42 literaturna navoda.

Zahvale

Prije svega, veliko hvala mentorici, prof. dr. sc. Biserki Mulac-Jeričević i dr. sc. Sandri Šućurović na pruženoj prilici. Bila mi je čast imati tako profesionalne osobe uz sebe. Od srca hvala na prenesenom znanju, strpljenju, uloženom trudu, potpori i svakom savjetu. Zahvaljujem se, kako za savjete vezane za završni rad, tako i za sve životne savjete. Jako puno sam naučila od Vas, hvala Vam.

Također, zahvalila bih se i laboranticama Tatjani Daki i Tihani Vujnović na pomoći pri izvođenju eksperimenta.

Veliko hvala mojoj obitelji, mami, tati i bratu, koji su me vodili kroz život i poticali me u svemu. Da nije njih, sigurno ne bih bila ovdje danas. Hvala na pruženoj ljubavi, strpljenju i potpori. Hvala Antoniu, koji je vjerovao u mene čak onda i kada ja to nisam. Zahvalila bih se i mojim prijateljima, posebice Barbari, Borni, Ivi, Lei i Veri na strpljenju, optimizmu i moralnoj podršci.

Hvala Vam!

Sažetak

Cilj istraživanja: Uspostava i održavanje trudnoće su kompleksni procesi kontrolirani mnogim hormonima i transkripcijskim čimbenicima te bilo kakva nepravilnost molekula koje ju vode, može uzrokovati nemogućnost začeća ili spontani gubitak trudnoće. Prema literaturnim podacima, 75 % neuspješnih trudnoća je pripisano izostanku ili nepravilnosti implantacije. Implantacija je kontrolirana progesteronom (P) i estrogenom (E) koji djeluju putem jezgrinih receptora. Aktivnost progesteronskog receptora (PR) je pod utjecajem NCOA-2, a utječe na aktivnost Hand2. Bjelančevine NCOA-2 i Hand2 su ključne u decidualizaciji. Cilj ovog rada je bio analizirati odnos između izražaja PR-a, NCOA-2 i Hand2 u ranoj trudnoći.

Materijali i metode: U istraživanju su korištene gravidne ženke miša divljeg tipa soja BALB/c. Mišice su žrtvovane na 2., 4., 6. i 7. dan nakon pojave vaginalnog čepa. Izražaj PR-a, NCOA-2 i Hand2 je određen metodom dvostruke imunofluorescencije na rezovima tkiva uterusa.

Rezultati: U razdoblju rane trudnoće, izražaj NCOA-2 i Hand2 se mijenja tijekom vremena. Prema provedenoj analizi, najveći izražaj navedenih molekula je na mjestu implantacije. Bjelančevine PR, NCOA-2 i Hand2 kolokaliziraju u stromalnim stanicama. Ko-regulator NCOA-2 je prisutan i u stanicama luminalnog (LE) i žljezdanog epitela. Molekule NCOA-2 i Hand2 su izražene u decidualnim stanicama.

Zaključak: Visoko regulirani mehanizmi u koje su uključeni PR, NCOA-2 i Hand2 su nužni za implantaciju embrija u miša. Navedene molekule su ključne i u procesu decidualizacije. Kolokalizacija PR-a, NCOA-2 i Hand2 u stromalnim stanicama upućuje na vjerojatnost da je NCOA-2 ko-regulator transkripcijske aktivnosti PR-a koji, u stromalnim stanicama, kontrolira izražaj Hand2.

Ključne riječi: Trudnoća; Implantacija; Progesteronski receptor; NCOA-2; Hand2

Summary

Aim of the study: Since the establishment and maintenance of pregnancy are complex processes run by many hormones and transcriptional factors, any irregularity between proteins included in pregnancy can lead to unsuccessful conception or spontaneous miscarriage. According to researches, 75 % of failed pregnancies are caused by improper implantation. Implantation is regulated by progesterone (P) and estrogen (E), which act through their nuclear receptors (NR). The activity of progesterone receptor (PR) is modulated with NCOA-2. Activation of PR leads to transcription of Hand2. Proteins NCOA-2 and Hand2 also play a critical role in decidualization. The aim of this research was to analyze relationship between PR, NCOA-2 and Hand2 during early pregnancy.

Material and methods: In this research, pregnant BALB/c mice were used. Mice were sacrificed 2, 4, 6 and 7 days after the appearance of vaginal plug. The expression of PR, NCOA-2 and Hand2 were determined by immunofluorescence of uterine tissues obtained from pregnant mice.

Results: During early pregnancy, the expression of NCOA-2 and Hand2 is changing in temporal manner. There is an indication that expression of these molecules is highest at the implantation site. Colocalization of PR, NCOA-2 and Hand2 was noticed in stromal cells. Coregulator NCOA-2 is located in luminal epithelial (LE) and glandular epithelial (GE) cells. Decidual cells are NCOA-2 and Hand2 positive.

Conclusion: Highly regulated mechanisms which include PR, NCOA-2 and Hand2 are essential in embryo implantation in mice. Mentioned molecules are also crucial in decidualization. Colocalization between PR, NCOA-2 and Hand2 suggests that NCOA-2 is coregulator of transcriptional activity of PR which controls the expression of Hand2 in stromal cells. **Key words:** Pregnancy; Implantation; Progesterone receptor; NCOA-2; Hand2

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Trudnoća	1
1.1.1. Oplodnja	1
1.1.2. Implantacija	2
1.1.3. Decidualizacija	3
1.2. Steroidni hormoni	4
1.2.1. Progesteron	5
1.2.2. Progesteronski receptor	6
1.3. Obitelj NCOA	8
1.3.1. Funkcije ko-regulatora NCOA obitelji	8
1.3.2. Građa NCOA obitelji i mehanizam djelovanja	9
1.3.3. Ko-aktivator 2 jezgrinih receptora	10
1.3.4. Uloga NCOA-2 u receptivnosti uterusa	11
1.4. Transkripcijski čimbenik Hand2	12
2. Cilj rada	13
3. Materijali i metode	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Protutijela za imunofluorescentnu analizu tkiva	14
3.1.1.1. Primarna protutijela	14
3.1.1.2. Sekundarna protutijela	14
3.1.2. Laboratorijske životinje	15
3.2. Metode	15
3.2.1. Imunofluorescencija	15
4. Rezultati	17
4.1. Izražaj NCOA-2 i Hand2 tijekom pred-implantacijskog razdoblja ..	17
4.2. Prostorni izražaj PR-a, NCOA-2 i Hand2 u implantacijskom razdoblju	19
4.2.1. Prostorni izražaj PR-a i Hand2 na implantacijskom mjestu	19
4.2.2. Izražaj PR-a i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu	21
4.2.3. Izražaj NCOA-2 i Hand2 na mjestu implantacije blastociste ...	23

4.2.4. Izražaj NCOA-2 i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu	25
4.3. Izražaj NCOA-2 i Hand2 u post-implantacijskom razdoblju	27
4.3.1. Prostorni izražaj NCOA-2 i Hand2 tijekom 6,5 dana trudnoće. 27	
4.3.2. Izražaj Hand2 i NCOA-2 na antimezometrijalnom polu uterusa tijekom 7,5 dana trudnoće	29
4.3.3. Izražaj Hand-2 i NCOA-2 na mezometrijalnom polu uterusa tijekom 7,5 dana trudnoće	31
5. Rasprava	33
6. Zaključak	36
7. Literatura	37
8. Životopis.....	42

1. Uvod

1.1. Trudnoća

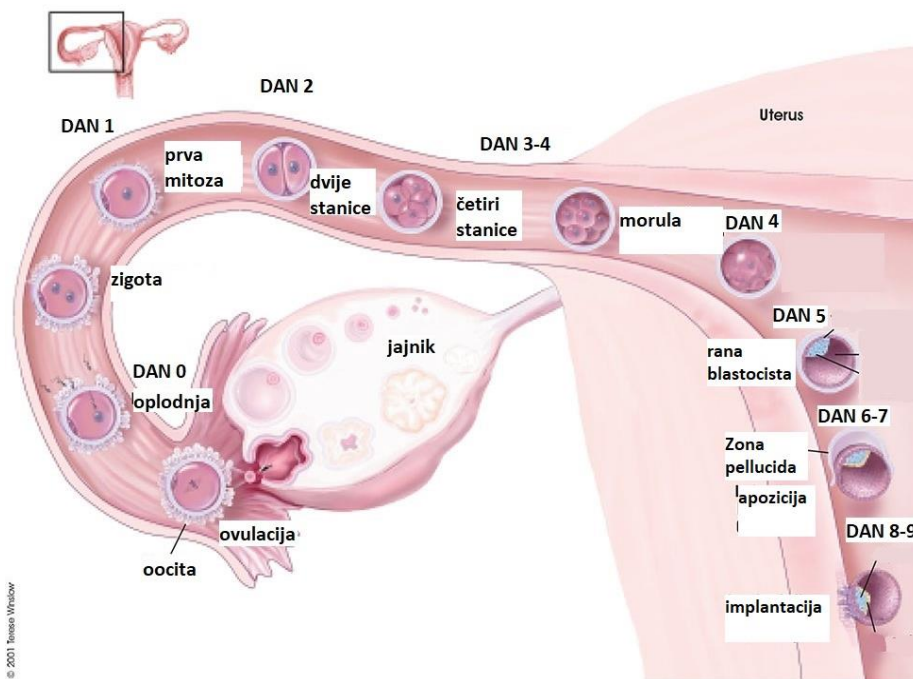
Uspostavljanje trudnoće je složeni, visoko organizirani proces koji omogućuje opstanak vrste, a sastoji se od oplodnje, implantacije, decidualizacije, placencije i porođaja. U čovjeka normalna trudnoća traje približno 280 dana (1, 2). Prema istraživanjima, svaki šesti par pati od smanjene plodnosti, čiji su uzroci u 25 % slučajeva nepoznati. Liječenje od neplodnosti postaje sve veći socio-ekonomski problem (3). Mogućnost začeca unutar jednog menstrualnog ciklusa u žena iznosi približno 30 %. Istražujući uzroke gubitka trudnoće, njih 75 % je uzrokovano neuspjehom implantacije. Iz tog razloga, implantacija se smatra kritičnim periodom u uspostavi trudnoće (1).

Kako bi se povećao postotak uspješnih trudnoća, istražuju se molekularni mehanizmi uključeni u njezinu uspostavu i održavanje. Kao model istraživanja trudnoće, iz etičkih razloga te nedostatka metoda, se koriste miševi, čija gravidnost traje 21 dan (4). Miševi su dobar model radi jednostavnog uzgoja, male veličine, kratkog reprodukcijanskog ciklusa te visoke homolognosti humanog i mišjeg genoma (5). Povrh toga, u miša i u čovjeka, trudnoća je kontrolirana vrlo sličnim molekularnim mehanizmima koje reguliraju steroidni hormoni progesteron (P) i estrogen (E) koji djeluju putem svojih jezgrinih receptora (NR, prema engl. nuclear receptor), koji su ujedno i transkripcijski čimbenici (1).

1.1.1. Oplodnja

Oplodnja je proces spajanja muške spolne stanice, haploidnog spermija i ženske, haploidne jajne stanice. U čovjeka se događa 24-48 sati nakon ovulacije, u prvoj trećini jajovoda. U razvoju od zigote do morule,

stadija od 12 do 16 blastomera, embrij je okružen zaštitnom prevlakom, zonom pellucidom. Morula ulazi u šupljinu uterusa četvrtog dana nakon oplodnje. Razvoj morule u blastocistu je praćen diferencijacijom pluripotentnih matičnih stanica kojom dolazi do stvaranja površinskog sloja trofoblasta i unutarnje stanične mase (ICM, prema engl. inner cell mass). Približno 72 sata nakon ulaska u šupljinu uterusa, zona pellucida se otpušta, što omogućuje početak implantacije (Slika 9). Procjenjuje se da samo 20 % ljudskih embrija preživi do navedenog stadija (6).



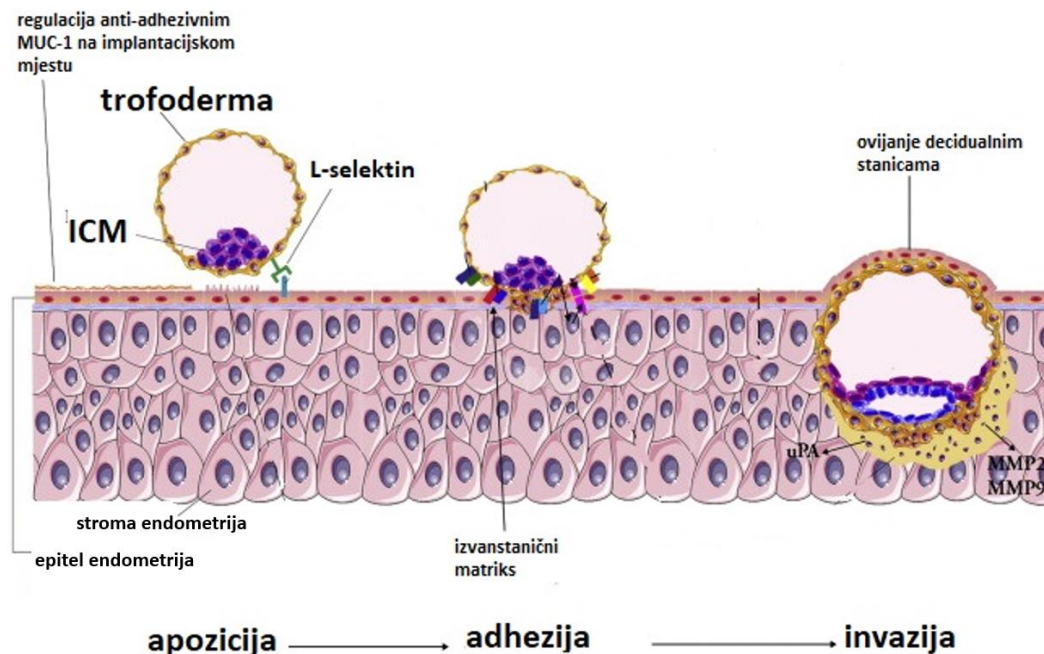
Slika 1: Shematski prikaz opodnje do implantacije blastociste u ženu.

Oplodnja se odvija u prvoj trećini jajovoda, nakon čega zigota putuje do šupljine uterusa. Morula ulazi u šupljinu uterusa četvrtog dana nakon oplodnje, nakon čega dolazi do stvaranja blastociste. Implantacija se događa u šupljini uterusa, približno osam dana nakon oplodnje. Prilagođeno prema (7).

1.1.2. Implantacija

Nakon stvaranja blastociste, dolazi do implantacije. Implantacija je podijeljena na apoziciju, adheziju (pričvršćivanje) i invaziju (Slika 2). Apozicija označava prvi kontakt između blastociste i endometrija, u kojemu blastocista pronalazi mjesto implantacije (8). Fizički kontakt blastociste i endometrija započinje fazom adhezije, kada dolazi do direktne interakcije između epitela endometrija i stanica trofoblasta

blastociste. U ljudi, orijentacija blastociste pri vezanju za endometrij nije određena ICM-om, već ICM migrira kako bi bio okrenut prema luminalnom epitelu uterusa (LE, prema engl. luminal epithelium). Iz toga slijedi da se blastocista može vezati bilo kojim dijelom svoje površine. Za razliku od toga, u miševa je ICM orijentiran prema lumenu uterusa (8, 9). Komunikacija za vrijeme apozicije i adhezije je posredovana međudjelovanjem između liganda i receptora, primjerice L-selektina, na površini trofoblasta, koji se veže za receptor na endometriju (9, 10). Konačna faza implantacije je invazija, u kojoj stanice trofoblasta prodiru u epitel endometrija i dolaze do strome (9).



Slika 2: Shematski prikaz procesa implantacije.

Apozicija označava pronalazak mjesta implantacije te komunikaciju blastociste i endometrija putem L-selektina i njegova receptora. Adhezija označava prvi fizički kontakt, a invazija prodiranje stanica trofoblasta u epitel endometrija uterusa. Prilagođeno prema (11).

1.1.3. Decidualizacija

Za uspješnu implantaciju su ključne receptivnost uterusa i kompetentnost blastociste. Receptivnost uterusa karakteriziraju morfološke i funkcijske promjene endometrija koje su uzrokovane dinamičkom promjenom lučenja hormona P-a i E-a. Kod čovjeka je uterus

receptivan za implantaciju embrija 6-10 dana nakon ovulacije, a u miša četvrtog dana trudnoće. Navedeno razdoblje je poznato pod nazivom implantacijski prozor (WOI, prema engl. window of implantation) (12, 13). U tom razdoblju se stvaraju uvjeti za implantaciju embrija, koji uključuju i diferencijaciju stromalnih stanica u decidualne stanice, procesom decidualizacije. Decidualne stanice osiguravaju dovoljno hranjivih tvari za pravilan razvoj blastociste do stvaranja funkcionalne posteljice (14). Razdoblje između oplodnje i završetka decidualizacije naziva se pred-implantacijsko razdoblje (15).

U mišica, ciklus je kratak, približno četiri dana te često nepravilan, zbog čega je teško sa sigurnošću odrediti receptivnu fazu uterusa. Kod ove vrste receptivnost je podijeljena u tri faze: pre-receptivna (do četvrtog dana trudnoće), receptivna (četvrti dan trudnoće) i refraktorna faza (peti dan trudnoće). Decidualizacija stromalnih stanica je prisutna ukoliko je došlo do oplodnje (1).

Za razliku od mišica, u žena se decidualizacija odvija neovisno o uspostavi trudnoće. Ovaj proces započinje u srednjoj luetinskoj fazi, tijekom svakog menstrualnog ciklusa (16). Decidualizacija je dinamički proces koji prati i razvoj hematopoetskih stanica, primjerice monocita, makrofaga i prirodnoubilačkih stanica (NK, prema engl. natural killer cells), bitnih u obrani embrija od majčinog imunološkog sustava (14). Povrh toga, decidualizacijom se formira izvanstanični matriks koji osigurava mikrookoliš pogodan za adheziju trofoblasta te regulaciju njegove invazije (17).

1.2. Steroidni hormoni

Steroidni hormoni djeluju vezanjem za unutarstanične receptore. Ovi hormoni se sintetiziraju iz kolesterola i njihova lipofilna struktura im omogućuje laku difuziju kroz staničnu membranu. Navedeni hormoni,

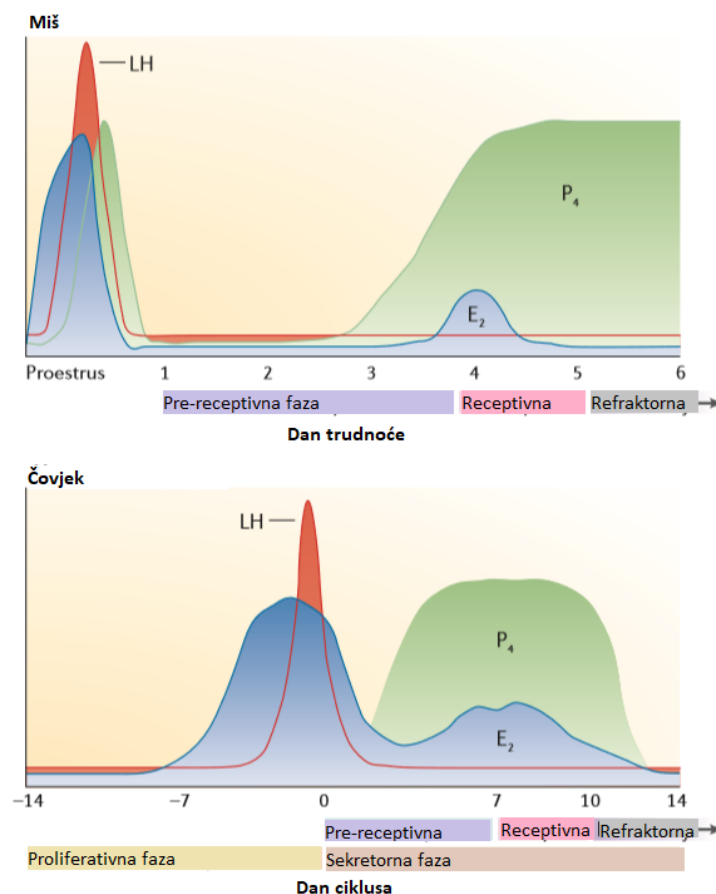
vezanjem za receptor, utječu na transkripciju gena. Spolne steroide, poput P-a i E-a, luče spolne žlijezde i oni kontroliraju svaki aspekt reprodukcije u sisavaca (18, 19). Ti hormoni svoju biološku aktivnost izvršavaju preko progesteronskog receptora (PR-a) i estrogenskog receptora (ER-a), koji su ujedno i transkripcijski čimbenici (19).

1.2.1. Progesteron

Lučenje P-a je određeno luteinizacijskim hormonom (LH) (15). Visoke koncentracije LH-a dovode do stvaranja žutog tijela, iz kojega se luči P.

U miša, trećeg dana trudnoće dolazi do naglog porasta lučenja P-a. Četvrtog dana, biološka aktivnost P-a preko PR-a potiče implantaciju embrija i diferencijaciju stromalnih stanica u decidualni fenotip (20).

U žena, maksimalna koncentracija P-a je sedmi dan nakon ovulacije. Ukoliko ne dođe do oplodnje, žuto tijelo se raspada, čime koncentracija P-a pada (Slika 3). U slučaju oplodnje, razina P-a raste tako da on, uglavnom preko aktivnosti PR-a, osigurava održavanje trudnoće. U pred-implantacijskoj fazi, P djeluje zajedno s E-om te uzrokuje promjene epitela uterusa čineći ga receptivnim za implantaciju embrija (1).



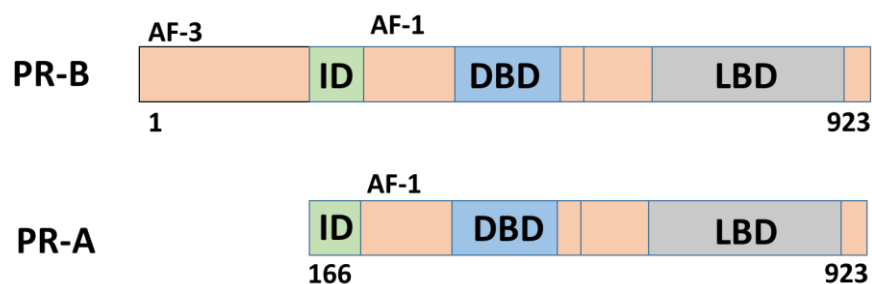
Slika 3: Koncentracija steroidnog hormona P-a tijekom pred-implantacije u miša i čovjeka.

Koncentracija P-a je uvjetovana koncentracijom LH-a te je maksimalna u receptivnoj fazi, četvrtog dana trudnoće u miša i sedmog dana menstrualnog ciklusa u žena. Prilagođeno prema (15).

1.2.2. Progesteronski receptor

Progesteronski receptori su NR-i koji spadaju u specifične transkripcijske čimbenike. Oni se vežu za regulatorne sekvence na DNA i reguliraju aktivnost RNA polimeraze II. Na taj način utječu na transkripciju gena zaslužnih za normalnu fiziologiju reprodukcije, poput ovulacije, uspostave trudnoće te razvoja mliječnih žlijezdi (21). Otkrivene su dvije izoforme PR-a, progesteronski receptor A (PR-A) i progesteronski receptor B (PR-B). Iako se bjelančevine PR-A i PR-B prepisuju s istog gena, početak njihove translacije je određen različitim AUG sekvencama koje su pod kontrolom dva različita promotora. Izoforma PR-B strukturno je veća od izoforme PR-A, to jest, sadrži dodatnu transaktivacijsku domenu 3 (AF-3,

prema engl. activation domain 3), veličine 164 aminokiselina (Slika 4). Smatra se da je domena AF-3 odgovorna za različitost biološke funkcije ovih dvaju receptora. Razlika u funkcijama navedenih receptora je dokazana analizom miševa sa selektivnom ablacijom gena za PR-A (PRAKO, prema engl. progesterone receptor A knock out) i PR-B (PRBKO, prema engl. progesterone receptor B knock out). Potpuna ablacija gena za PR (PRKO, prema engl. progesterone receptor knock out) dovodi do poremećaja ovulacije, implantacije, decidualizacije kao i morfogeneze mliječnih žlijezdi i PRKO životinje su neplodne (22). Mišice kojima nedostaje PR-A (PRAKO), su također neplodne i to zbog nepravilne funkcije jajnika i uterusa (23). Nedostatak PR-B ne utječe na plodnost PRBKO mišica, ali dovodi do poremećaja razvoja mliječnih žlijezdi (24). Obje izoforme su izražene u istim stanicama reproduktivnog sustava, međutim, njihove se koncentracije razlikuju ovisno o hormonalnom statusu i tijekom kancerogeneze (25).



Slika 4: Strukturna organizacija progesteronskih receptora A i B.

Hipervarijabilna amino domena A/B sadrži aktivacijsku domenu 1 (AF-1, prema engl. activation domain 1) i AF-3. Progesteronski receptor A ne sadrži domenu AF-3. Identične domene u PR-A i PR-B jesu: DNA vezujuća domena (DBD, prema engl. DNA binding domain), inhibicijska domena (ID, prema engl. inhibitory domain) te ligand vezujuća domena (LBD, prema engl. ligand binding domain). Prilagođeno prema (25).

Bjelančevine čiji je izražaj reguliran P-om, a za koje je dokazano da su važne za uspostavu i održavanje trudnoće jesu Indian Hedgehog (Ihh), koštana morfogenetska bjelančevina 2 (Bmp2, prema engl. bone morphogenetic protein 2) i transkript 2 izražen u srcu i tkivima porijeklom iz neuralnog grebena (Hand2, prema engl. heart and neural crest derivatives expressed 2) (15, 26).

Regulacija transkripcijske aktivnosti PR-a je uvjetovana i ko-regulatorima. Ko-regulatori su sastavni dio transkripcijskog kompleksa i mogu aktivirati ili suprimirati aktivnost transkripcijskih čimbenika. Ko-represori suprimiraju transkripcijsku aktivnost NR-a (27). Među ko-aktivatorima PR-a se ističe ko-aktivator 2 jezgrinih receptora (NCOA-2, prema engl. nuclear receptor coactivator 2) (28), koji je ujedno i predmet ovog istraživanja.

1.3. Obitelj NCOA

Obitelj ko-regulatora steroidnih receptora NCOA (prema engl. nuclear receptor coactivator) sastoji se od tri člana: jezgrin ko-aktivator 1 (NCOA-1, prema engl. nuclear receptor coactivator 1, poznat pod imenima SRC-1/RAP140), NCOA-2 (poznat pod imenima SRC-2/TIF-2/GRIP-1) i jezgrin ko-aktivator 3 (NCOA-3, prema engl. nuclear receptor coactivator 3, poznat pod imenima SRC-3/p/CIP/RAC-3/AIB1/TRAM-1/ACTR). Sličnost sekvenci triju bjelančevina je 50-55 % (29).

1.3.1. Funkcije ko-regulatora NCOA obitelji

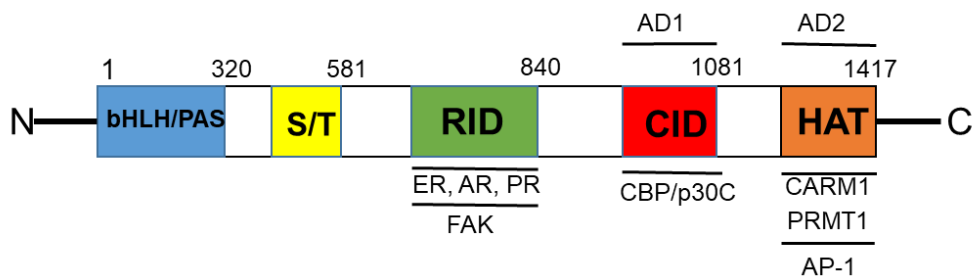
Funkcije pojedinih NCOA molekula su promatrane analizom miševa s njihovom potpunom ablacijom (KO prema engl. knock-out). Na temelju istraživanja, pokazano je da je NCOA-1 bitan za potpunu decidualizaciju uterusa (30). U NCOA-3KO (prema engl. nuclear receptor coactivator 3 knock out) ženki decidualizacija je bila potpuna, međutim, smanjen je razvoj mliječnih žlijezdi. Obje molekule su važne i u metabolizmu i homeostazi kostiju (31). Za razliku od NCOA-1KO (prema engl. nuclear receptor coactivator 1 knock out) i NCOA-3KO miševa, NCOA-2KO (prema engl. nuclear receptor coactivator 2 knock out) miševe karakteriziraju reproduktivne abnormalnosti u oba spola (32). U NCOA-2KO ženki je

izražena hipoplazija posteljice, koja smanjuje plodnost. Osim reproduktivnih poteškoća, NCOA-2KO homozigotne miševe karakterizira smanjeno postnatalno preživljavanje, nedostatak homeostaze te adrenokortikalna insuficijencija (33).

Pretjeran izražaj bjelančevina NCOA obitelji dovodi do razvoja tumora, što ko-regulatore povezuje s onkogenom aktivnošću. Bjelančevina NCOA-1 je povezana s tumorom dojke, endometrija, jajnika i prostate. Izražaj NCOA-2 je povećan u tumorima endometrija, jajnika i prostate, dok je NCOA-3 povezan s tumorom endometrija, jajnika i dojke (34).

1.3.2. Građa NCOA obitelji i mehanizam djelovanja

Bjelančevine NCOA obitelji sastoje se od tri funkcionalne domene: N-terminalne bazične *helix-loop-helix* domene (bHLH, prema engl. basic helix-loop-helix), središnje domene s dva LXXLL motiva te C-terminalne aktivacijske domene podijeljene na aktivacijsku domenu 1 (AD1, prema engl. activation domain 1) i aktivacijsku domenu 2 (AD2, prema engl. activation domain 2) (Slika 5). Domena bHLH omogućuje suradnju NCOA sa sekundarnim ko-regulatorima. Središnja domena (RID, prema engl. receptor interacting domain) omogućuje vezanje NCOA za NR, primjerice PR (35). Domena AD1 međudjeluje s kromatin modificirajućim enzimima, a AD2 se veže za histonske metiltransferaze. C-terminalna domena je zaslužna i za unutrašnju histon acetil transferaznu aktivnost (HAT, prema engl. histone acetyltransferase) (35, 36).



Slika 5: Funkcionalne domene bjelančevina NCOA obitelji.

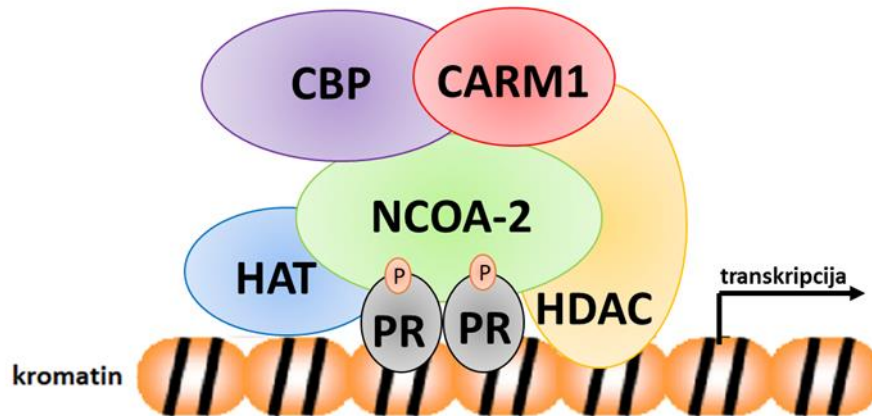
Funkcionalne domene bjelančevina NCOA obitelji sadrže: bHLH/PAS domenu, domenu bogatu serinom i treoninom (S/T), RID domenu, domenu koja međudjeluje s CBP (CID, prema engl. CBP interacting domain) i HAT domenu. Navedene domene omogućuju međudjelovanje NCOA s bjelančevinama poput bjelančevine koja veže CREB (CBP, prema engl. CREB binding protein), arginin metiltransferaze 1 povezane s ko-aktivatorom (CARM1, prema engl. coactivator associated arginine methyltransferase) i drugima. Prilagođeno prema: (35).

1.3.3. Ko-aktivator 2 jezgrinih receptora

Ko-aktivator NCOA-2 je izražen u mnogim tkivima, poput testisa, tkiva središnjeg živčanog sustava, jajnika i uterusu (37). Da bi se utvrdio odnos NCOA-2 i PR-a, provedena su istraživanja na NCOA-2KO miševima. Kod ženki s normalnim izražajem PR-a, ali s nedostatkom izražaja NCOA-2 uterus nije sposoban niti za implantaciju embrija niti razvoj mliječnih žlijezdi djelovanjem P-a (38). Pretjeran izražaj ovog ko-aktivatora dovodi do razvoja karcinoma endometrija, jajnika i prostate, što ga čini potencijalnom metom za razvoj lijekova protiv navedenih bolesti (34).

Jedan od modela predloženih za modifikaciju aktivnosti PR-a preko NCOA-2 je prikazan na Slici 6. Ko-aktivator NCOA-2 olakšava komunikaciju između specifičnih transkripcijskih čimbenika i RNA polimeraze II. On obavlja funkciju stvaranjem kompleksa bjelančevina koji se, uz NCOA-2, sastoji od sekundarnih ko-regulatora i kromatin modificirajućih enzima. Nakon vezanja za PR i promotor, NCOA-2 se spaja sa sekundarnim ko-regulatorima poput arginin metiltransferaze 1 (CARM1, prema engl. coactivator associated arginine methyltransferase) te CoCoA (prema engl. coiled-coil coactivator) (39) i kromatin modificirajućim enzimima, poput CBP, histonske deacetilaze (HDAC, prema engl. histone deacetylase), histonske acetiltransferaze (HAT, prema engl. histone acetyltransferase) i

drugih. Spajanjem NCOA-2 s navedenim molekulama dolazi do stvaranja kompleksa koji modificira strukturu kromatina te dovodi do modifikacije transkripcijske aktivnosti PR-a (35). Osim enzima uključenih u modifikaciju kromatina, u regulaciji transkripcije mogu sudjelovati i molekule koje prepoznaju modifikacije histona (40).



Slika 6: Stvaranje kompleksa između NCOA-2, sekundarnih ko-regulatora i kromatin modificirajućih enzima.

Ko-aktivator NCOA-2 se veže za PR, sekundarne ko-regulatore (CARM1) i kromatin modificirajuće enzime (HAT, CBP, HDAC) te potiče transkripciju putem PR-a. Priagođeno prema: (38).

1.3.4. Uloga NCOA-2 u receptivnosti uterusa

Istraživanja su pokazala da se miševi u kojih nedostaje gen za NCOA-2 normalno postnatalno razvijaju. Nedostatak NCOA-2 u ženki dovodi do neplodnosti zbog poremećene implantacije embrija. Pod utjecajem egzogenih decidualnih čimbenika (P-a i E-a), ženke razvijaju djelomični decidualni odgovor. Djelomični decidualni odgovor je postignut i u NCOA-1KO miševa, što upućuje da je za potpuni decidualni odgovor nužna suradnja NCOA-1 i NCOA-2. Delecija NCOA-2 i NCOA-1 dovodi do potpunog gubitka decidualizacije (32). Gubitak funkcionalnog NCOA-2 ne utječe na funkcije jajnika i hipofize, što upućuje da je PR u ovim žljezdama pod utjecajem i drugih ko-regulatora (22).

1.4. Transkripcijski čimbenik Hand2

Jedan od gena čija je transkripcija regulirana s aktivnosti PR-a je *Hand2*. Inhibicija proliferacije LE-a putem Hand2 je nužna za uspostavu trudnoće (41, 42). Bjelančevina Hand2 je izražena u stromalnim stanicama mišjeg uterusa. U istraživanju u kojem je u stanicama endometrija koje izražavaju PR selektivno uklonjen *Hand2* u postnatalnoj dobi miša, pokazano je da je aktivnost Hand2 neophodna za implantaciju embrija (42). Navedena bjelančevina je član obitelji bjelančevina koje posjeduju bHLH strukturu. Analiza izražaja gena u stromalnim stanicama endometrija miša bez *Hand2* u četvrtom danu trudnoće je pokazala da Hand2 inhibira izražaj fibroblastnih čimbenika rasta (FGFs, prema engl. fibroblast growth factor family). Ovi čimbenici, vezanjem za FGF receptore (FGFR, prema engl. fibroblast growth factor receptor) aktiviraju izvanstanične signalne kinaze 1 i 2 (ERK1/2, prema engl. mitogen-activated protein kinase 1/2) koje potiču proliferaciju epitela. Nedavno je pokazano da je FGF9 (prema engl. fibroblast growth factor 9) jedan od potencijalnih čimbenika koji sudjeluju u nastajanju mikrokoliša prikladnog za uspješnu implantaciju i održavanje trudnoće (41, 42). Također, uz upotrebu malih interferirajućih RNA (siRNA, prema engl. small interfering RNA) je pokazano da aktivnost Hand2 ima važnu ulogu i u decidualizaciji (42).

2. Cilj rada

Bez obzira na ukupno povećanje čovječanstva, neplodnost u ljudi postaje sve veći sociološki i ekonomski problem u svijetu. Prema današnjim se saznanjima smatra da je izostanak ili nepravilnost implantacije uzrok 75 % neuspješnih trudnoća. Iz tog su razloga potrebna istraživanja molekularnih mehanizma ključnih za uspostavljanje i održavanje trudnoće (1).

Trudnoća je kompleksan proces kontroliran mnogim hormonima i transkripcijskim čimbenicima. Jedan od glavnih hormona, P, regulira procese implantacije i decidualizacije, djelujući putem PR-A i PR-B (1, 19). Ko-regulator NCOA-2 utječe na transkripcijsku aktivnost PR-a tako da modificira strukturu transkripcijskog kompleksa, kromatina i/ili histona (35). Aktivnost PR-a utječe na izražaj Hand2, koji je transkripcijski čimbenik važan za uspostavu receptivnog uterusa i decidualizaciju, procese ključne u uspostavi trudnoće (41, 42).

Cilj ovog rada je bio utvrditi odnose izražaja između PR-a, NCOA-2 i Hand2, tijekom rane trudnoće. Da bi se analizirala prostorna i vremenska distribucija navedenih bjelančevina, u ovim istraživanjima je korištena metoda dvostruke imunofluorescencije. Istraživanje je provedeno na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Rijeka, u sklopu projekta „Uloga progesterona u reprodukcijским i nereprodukcijским tkivima“ (HRZZ 3432), pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Protutijela za imunofluorescentnu analizu tkiva

3.1.1.1. Primarna protutijela

- DAPI (5mg/ml), *Thermo Scientific*, Rockford, SAD – u razrjeđenju 1:2000 u 1XPBS-u
- Kozje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg Hand2 (M-19), *Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, SAD – u razrjeđenju 1:100 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv mišjeg NCOA2, *Abcam*, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo - u razrjeđenju 1:500 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃
- Zečje poliklonsko protutijelo protiv ljudskog Progesteronskog receptora (PR), *DakoCytomation*, Glostrup, Danska – u razrjeđenju 1:100 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃

3.1.1.2. Sekundarna protutijela

- Magareće protu-zečje IgG (H+L) poliklonsko protutijelo obilježeno s AlexaFluor 594, *Molecular Probes, Life Technologies*, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:500 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃
- Konjsko protu-kozje protutijelo obilježeno biotinom, *Vector Laboratories*, Burlingame, SAD u razrjeđenju 1:400 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃
- Streptavidin AlexaFluor 488, *Molecular Probes, Life Technologies*, Carlsbad, SAD – u razrjeđenju 1:1000 u 1 % BSA/PBS/0.001 % NaN₃

3.1.2. Laboratorijske životinje

Divlji tip ženki soja BALB/c je stavljen na rasplod s istim sojem mužjaka. Jutro kada je uočen vaginalni čep označava 0,5 dan gestacije. Mišice su žrtvovane na drugi, četvrti, šesti, i sedmi dan nakon pojave vaginalnog čepa. Za istraživanje su korištena tkiva uterusa fiksirana u 4 % paraformaldehidu. Ženke divljeg tipa soja BALB/c su uzgajane u vivariju Zavoda za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Životinje su uzgajane u kontroliranim uvjetima vlažnosti, temperature, uz prirodan ciklus izmjene svjetla i tame te slobodan pristup hrani za laboratorijske životinje i vodi. Istraživanje je provedeno u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe u sklopu projekta „Uloga progesterona u reprodukcijским i nereprodukcijским tkivima“, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Biserke Mulac-Jeričević. Projekt ima odobrenje Ministarstva poljoprivrede za korištenje eksperimentalnih životinja (EP 60-2/2016).

3.2. Metode

3.2.1. Imunofluorescencija

Tkiva uterusa su fiksirana 24 h u 4 % otopini paraformaldehida (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). Nakon fiksacije, tkiva su isprana u etanolu (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) u rasponu razrjeđenja od 75 % do 100 % te uklopljena u parafin. Za daljnju su analizu korišteni rezovi tkiva debljine 5 μ m. Uzorci su deparafinizirani ispiranjem u Tissue Clear otopini (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Nizozemska), tri puta po 5 min. Hidratacija tkiva je provedena ispiranjem tkiva u 100 %, 96 % te 75 % etanolu. Tkiva su potom isprana tri puta po 5 min u 1X fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS, prema engl. phosphate buffered saline), pripremljenoj na Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Rijeci. Antigeni su razotkriveni (prema engl. antigen retrieval)

kuhanjem uzoraka u natrijevom citratu (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka), pH 6,0, tri puta po 5 min u mikrovalnoj pećnici (Whirlpool, Benton-Harbor, SAD), na 350 W. Nakon hlađenja je provedeno ispiranje, dva puta po 5 min u destiliranoj vodi te jednom po 5 min u 1X PBS-u. Da bi se izbjeglo nespecifično vezanje protutijela, uzorci su inkubirani u goveđem serumskom albuminu (BSA, prema engl. bovine serum albumin, Affymetrix, Santa Clara, SAD) otopljenom u 1X PBS-u i natrijevom azidu (1%BSA/PBS/0.001%/NaN₃), pripremljenom na Zavodu za fiziologiju i imunologiju. Inkubacija je trajala 1 h u vlažnoj komori. Potom su na uzorke nanjena primarna protutijela (potpoglavlje 3.1.1.1.) protiv NCOA-2, Hand2 i PR-a. Specifičnost vezanja protutijela je potvrđena negativnom kontrolom, gdje uzorcima nisu dodana primarna protutijela, već samo 1 % BSA/PBS/0.001%/NaN₃. Rezovi su inkubirani preko noći, na +4 °C. Drugi dan pokusa provedeno je ispiranje uzoraka 1X PBS-om, tri puta po 5 min. Bjelančevine NCOA-2, Hand2 i PR su detektirane sekundarnim protutijelima (potpoglavlje 3.1.1.2.). Molekula Hand2 je detektirana metodom amplifikacije biotinom (potpoglavlje 3.1.1.2.). Uzorci su zatim inkubirani 1 h u vlažnoj komori u mraku te isprani tri puta po 5 min u otopini 1X PBS-a. Biotin vezani kompleks je detektiran dodavanjem streptavidina (potpoglavlje 3.1.1.2.). U idućem koraku, uzorci su ponovno isprani u otopini 1X PBS-a, na prethodno opisani način. Jezgra je vizualizirana inkubacijom uzoraka u otopini DAPI boje (potpoglavlje 3.1.1.2), u trajanju od 5 min. Zatim su uzorci ponovno isprani u 1X PBS-u, te uklopljeni otopinom Mowiol-a (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD). Preparati su analizirani fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 te računalnim softwarom CellF (Olympus, Tokyo, Japan). Dobivene slike su uređene i uklopljene računalnim programom Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, SAD).

4. Rezultati

Jedne od ključnih molekula u uspostavi i održavanju trudnoće jesu PR, NCOA-2, i Hand2. Da bi se utvrdila njihova međusobna ovisnost, analiziran je njihov izražaj na tkivu mišjeg uterusa tijekom rane trudnoće. Analiza izražaja NCOA-2 i Hand2 je provedena metodom dvostruke imunofluorescencije tkiva uterusa ženke miša pripremljenim na 2,5, 4,5, 6,5 i 7,5 dan trudnoće. U svrhu histološkog uvida u strukturu tkiva je korišten DAPI, koji obilježava jezgre u tkivu i vidljiv je kao plava boja. Prisustvo ko-aktivatora NCOA-2 je analizirano crvenom fluorescencijom, dok je za analizu izražaja Hand2 korištena zelena fluorescencija. Tijekom 4,5 dana trudnoće istim postupkom je analiziran i izražaj PR-a. Kao indikator njegove prisutnosti je korištena crvena fluorescencija.

4.1. Izražaj NCOA-2 i Hand2 tijekom pred-implantacijskog razdoblja

Pred-implantacijsko razdoblje obuhvaća 2,5 dan trudnoće. U to vrijeme NCOA-2 (crvena fluorescencija) je prisutan u jezgrama stanica LE-a, kao i jezgrama stanica žljezdanog epitela (GE, prema engl. glandular epithelium). Također je izražen i u stromalnim stanicama endometrija u blizini LE-a (Slika 7A i B).

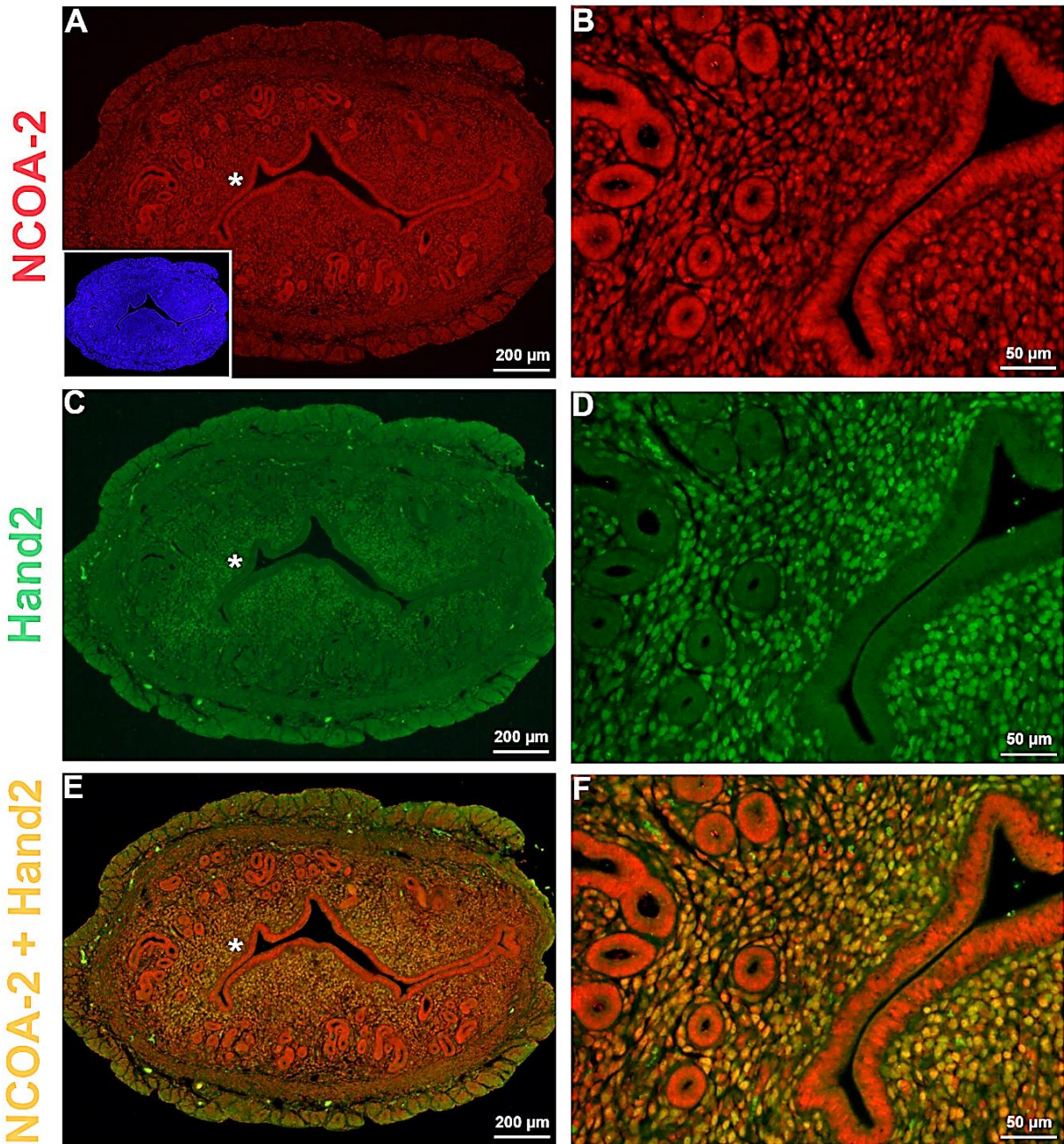
Istovremeno, Hand2 je prisutan u jezgrama stromalnih stanica koje okružuju LE (zelena fluorescencija). Bjelančevina Hand2 nije prisutna niti u stanicama LE-a niti GE-a (Slika 7C i D).

Da bi se istražio odnos NCOA-2 i Hand2 u pred-implantacijskom razdoblju, analizirana je njihova kolokalizacija. Navedene bjelančevine kolokaliziraju u jezgrama stromalnih stanica endometrija (Slika 7E i F).

2,5 dpc

10X

40X



Slika 7: Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 tijekom pred-implantacijskog razdoblja. (A&B) Izražaj NCOA-2. (C&D) Izražaj Hand2. (E&F) Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva mišjeg uterusa sa zečjim poliklonskim protutijelom za NCOA-2 (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva nakon preklapanja A i C te B i D. Umetnuta slika na A prikazuje jezgre obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od tri uzoraka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

4.2. Prostorni izražaj PR-a, NCOA-2 i Hand2 u implantacijskom razdoblju

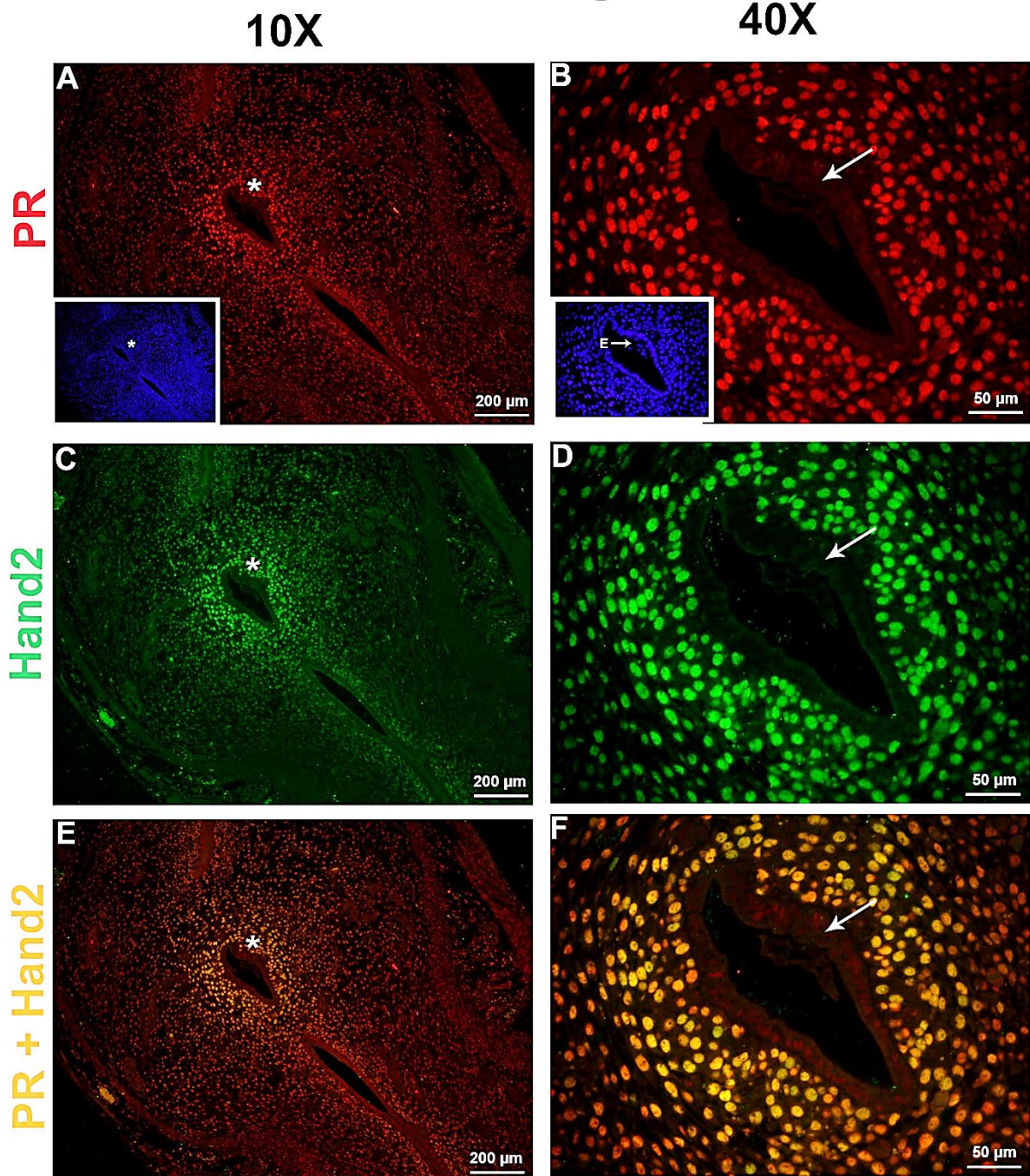
4.2.1. Prostorni izražaj PR-a i Hand2 na implantacijskom mjestu

Tijekom 4,5 dana trudnoće, PR je izražen na implantacijskom mjestu u stromalnim stanicama oko LE-a (crvena fluorescencija). U usporedbi sa stromalnim stanicama, stanice LE-a i GE-a izražavaju nisku razinu PR-a (Slika 8A i B).

Bjelančevina Hand2 je jače izražena na mjestu implantacije, u odnosu na stromalne stanice udaljene od mjesta implantacije (zelena fluorescencija) (Slika 8C i D). Stanice LE-a i GE-a ne izražavaju Hand2 (Slika 8C i D).

Budući da je iz dosadašnje literature poznato da PR regulira izražaj Hand2, u ovom radu je analizirana njihova kolokalizacija. Iz analize preklopljenih slika je vidljivo da, u 4,5 dana trudnoće, svaka Hand2 pozitivna stanica izražava i PR (Slika 8E i F).

4,5 dpc



Slika 8: Izražaj PR-a i Hand2 na implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće.

(A&B) Izražaj PR-a. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Kolokalizacija PR-a i Hand2. Tkiva mišjeg uterusa su obilježena metodom dvostruke fluorescencije. Crvena boja prikazuje zečje poliklonsko protutijelo za PR, a zelena kozje poliklonsko protutijelo za Hand2. Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Umetnute slike na A i B prikazuju jezgre obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od tri uzorka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

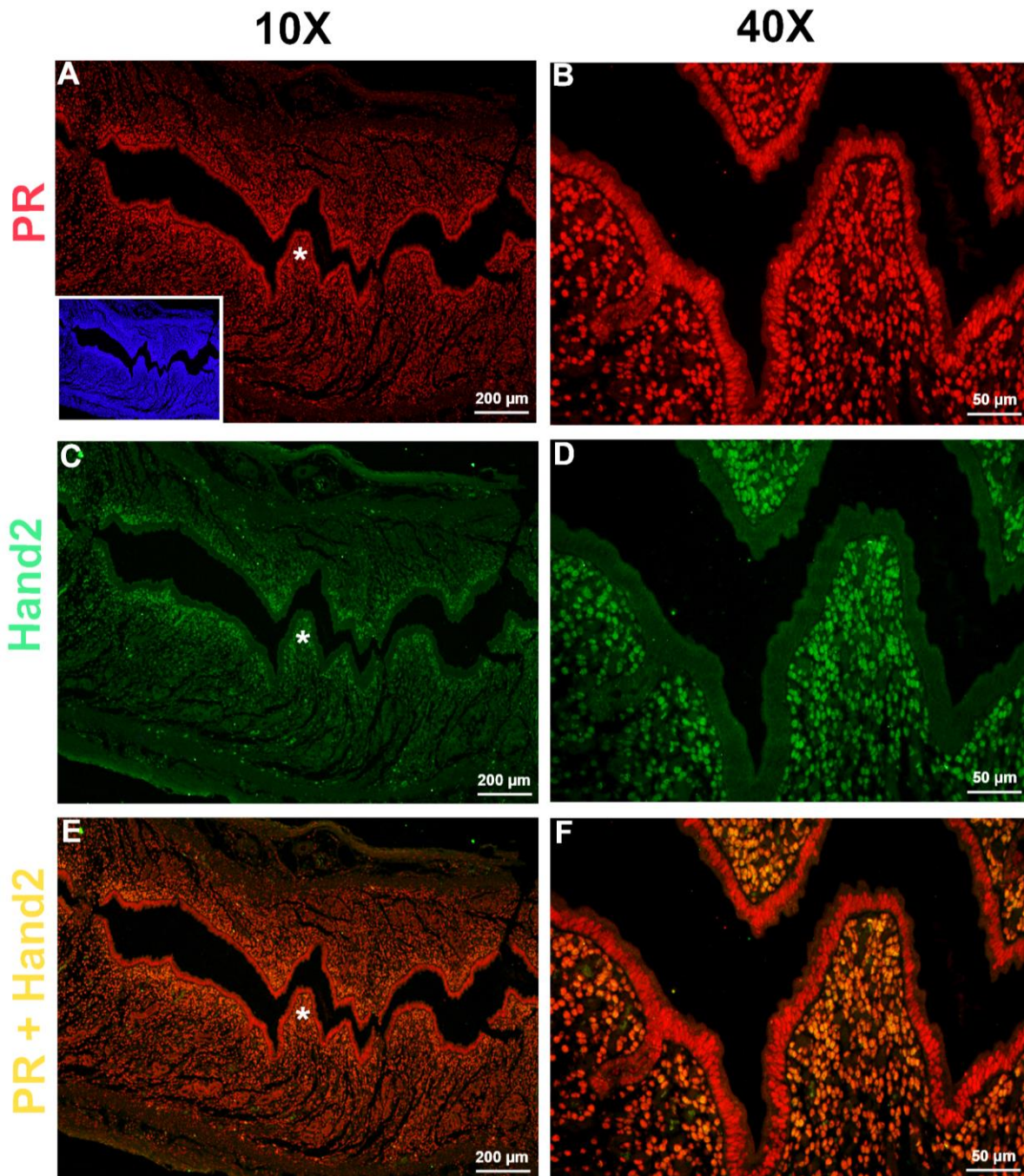
4.2.2. Izražaj PR-a i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu

Na ne-implantacijskom mjestu, PR je slabije izražen u stromalnim stanicama (crvena fluorescencija) (Slika 9A i B) u odnosu na mjesto implantacije (Slika 8A i B). Stanice LE-a su PR pozitivne (Slika 9A i B).

Kao i PR, Hand2 je slabije izražen u stromalnim stanicama na ne-implantacijskom mjestu (zelena fluorescencija) (Slika 9C i D) u odnosu na mjesto implantacije (Slika 8C i D). Bjelančevina Hand2 nije izražena u stanicama LE-a niti GE-a.

Preklapanje slika ukazuje na kolokalizaciju Hand2 s PR-om, u stromalnim stanicama oko LE-a (Slika 9E i F). Svaka Hand2 pozitivna stanica je i PR pozitivna stanica.

4,5 dpc



Slika 9: Kolokalizacija PR-a i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće.

(A&B) Izražaj PR-a. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Kolokalizacija PR-a i Hand2. Tkiva mišjeg uterusa obilježena su metodom dvostruke fluorescencije sa zečjim poliklonskim protutijelom za PR (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Umetnuta slika na A prikazuje jezgre obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od tri uzorka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

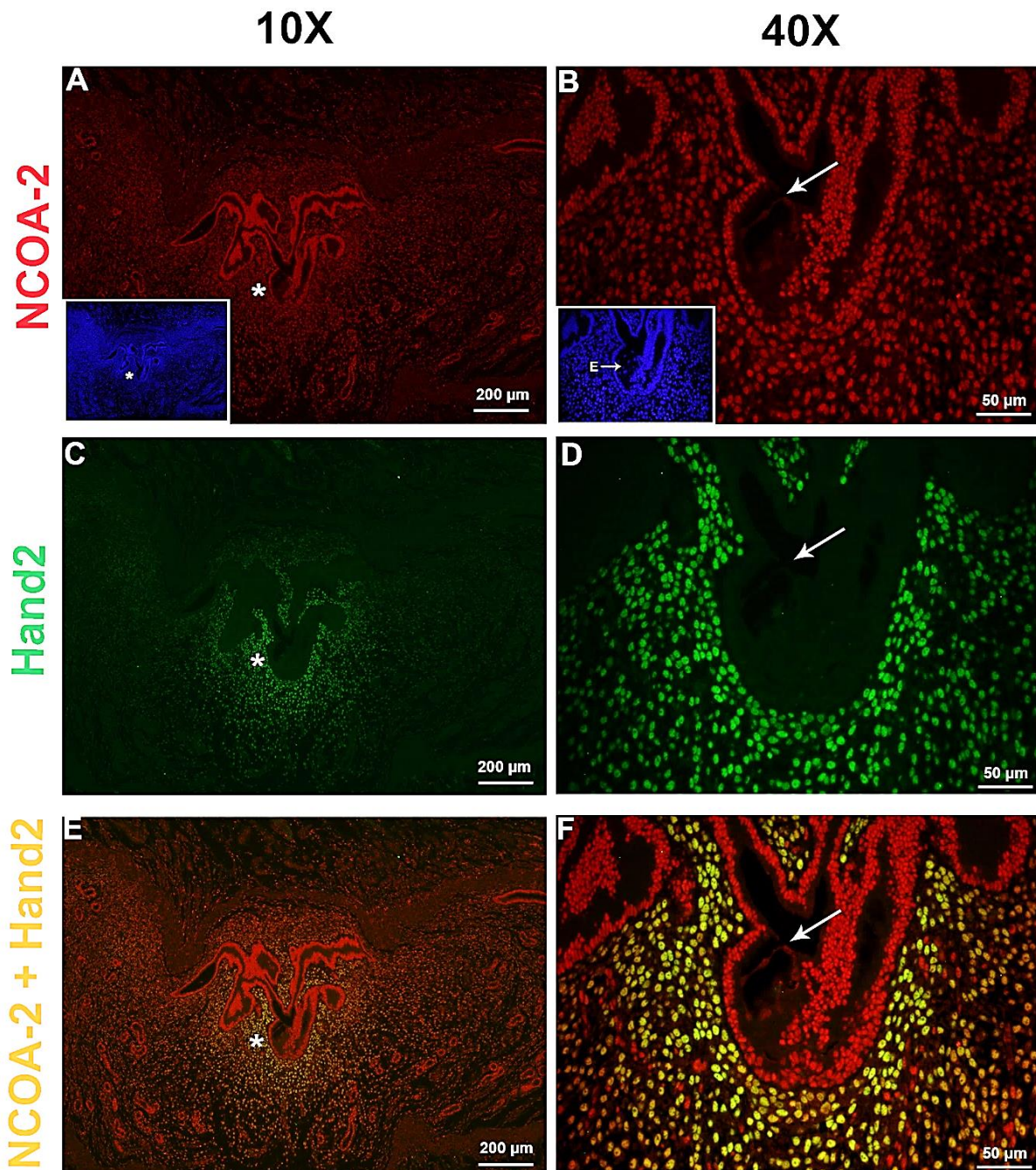
4.2.3. Izražaj NCOA-2 i Hand2 na mjestu implantacije blastociste

Na mjestu implantacije blastociste, NCOA-2 je izražen u stromalnim stanicama te u stanicama LE-a i GE-a. (Slika 10A i B).

Bjelančevina Hand2 je prisutna u stromalnim stanicama, na mjestu implantacije, a nije prisutna niti u LE-u niti u GE-u (zelena fluorescencija) (Slika 10C i D).

Da bi se utvrdila kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 na mjestu implantacije blastociste, analizirane su slike koje prikazuju odvojeni izražaj navedenih bjelančevina (Slika 10E i F). Kao i u pred-implantacijskom razdoblju (Slika 7E i F), kolokalizacija je prisutna u stromalnim stanicama (Slika 10E i F). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da je, u stromalnim stanicama, NCOA-2 sastavni dio PR kontroliranog transkripcijskog kompleksa uključenog u transkripciju Hand2.

4,5 dpc



Slika 10: Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 na implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće.

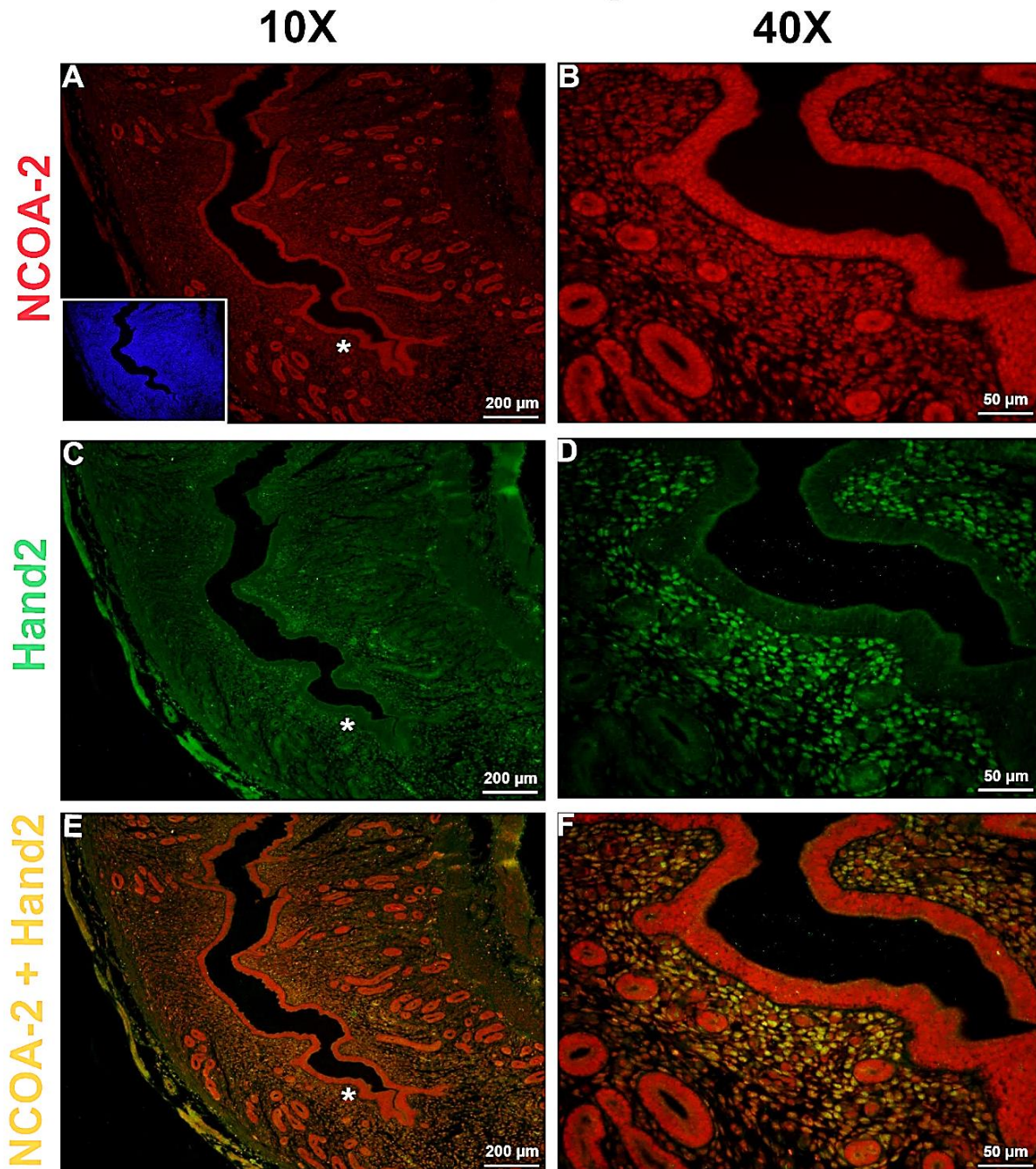
(A&B) Izražaj NCOA-2. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2. Tkiva mišjeg uterusa obilježena su metodom dvostruke fluorescencije sa zečjim poliklonskim protutijelom za NCOA-2 (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Strelice na slikama B, D i F prikazuju mjesto implantacije blastociste. Umetnute slike na A i B prikazuju DAPI-jem obojane jezgre (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od tri uzoraka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

4.2.4. Izražaj NCOA-2 i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu

Iako su Hand2 i NCOA-2 izraženi u stromalnim stanicama na implantacijskom i ne-implantacijskom mjestu, njihov izražaj znatno je manji na ne-implantacijskom mjestu (Slika 11A, B, C i D). Za razliku od implantacijskog mjesta, gdje je NCOA-2 prisutan isključivo u jezgrama (Slika 10A i B), na ne-implantacijskom mjestu on je izražen i u citoplazmi (Slika 11A i B).

Kolokalizacija Hand2 i NCOA-2 je vidljiva u stromalnim stanicama, dok stanice LE-a i GE-a izražavaju NCOA-2, a ne izražavaju Hand2 (Slika 11E i F).

4,5 dpc



Slika 11: Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 na ne-implantacijskom mjestu tijekom 4,5 dana trudnoće.

(A&B) Izražaj NCOA-2. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Izražaj NCOA-2 i Hand2. Tkiva mišjeg uterusa su obilježena metodom dvostruke fluorescencije sa zečjim poliklonskim protutijelom za NCOA-2 (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Umetnuta slika na A prikazuje jezgre obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od tri uzoraka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

4.3. Izražaj NCOA-2 i Hand2 u post-implantacijskom razdoblju

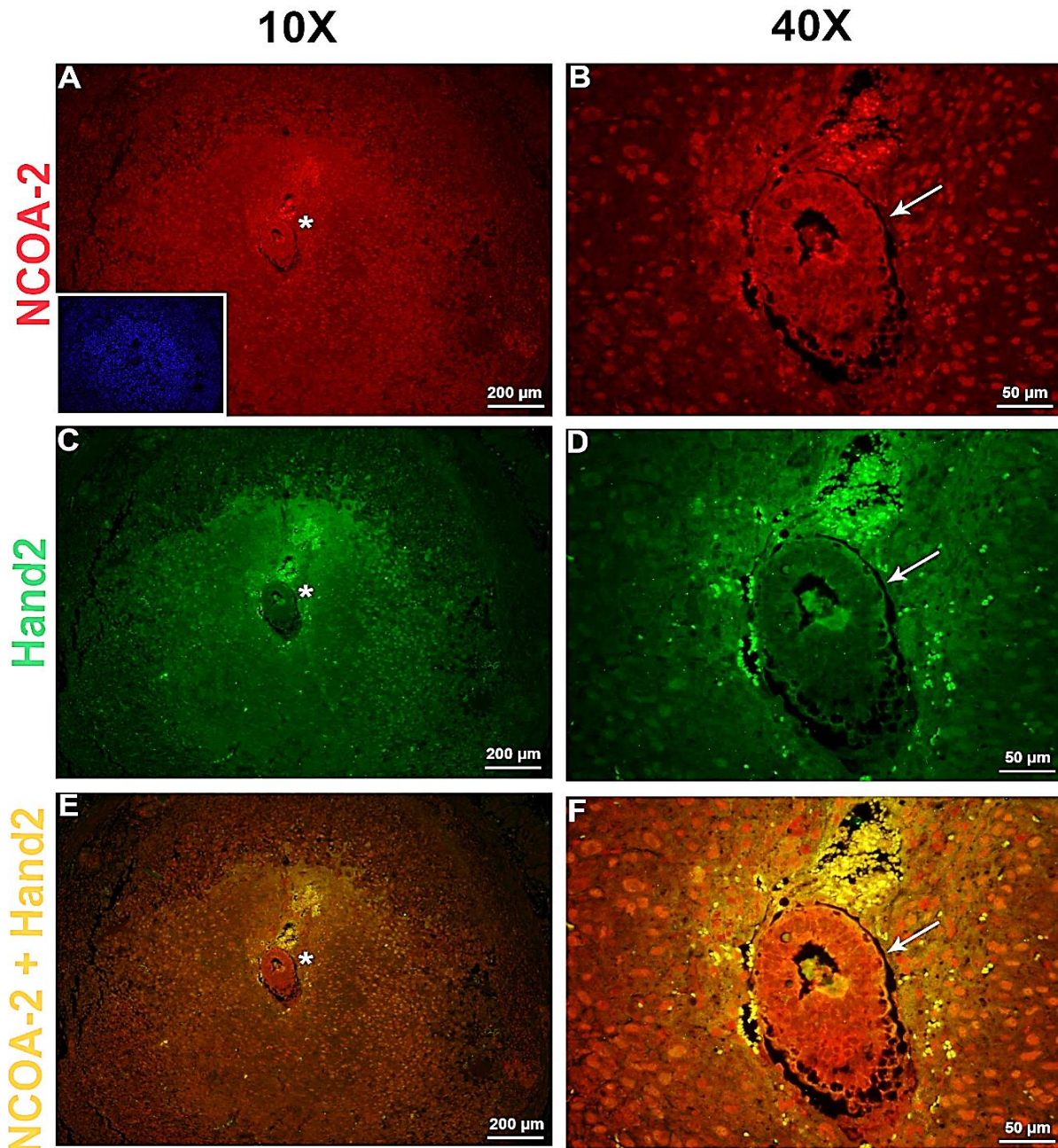
4.3.1. Prostorni izražaj NCOA-2 i Hand2 tijekom 6,5 dana trudnoće

Post-implantacijsko razdoblje (6,5 i 7,5 dan trudnoće) je okarakterizirano morfološkim promjenama. Prema izražaju analiziranih bjelančevina, decidualne stanice, koje se počinju diferencirati u 4,5 danu trudnoće, najizraženije su u 6,5 danu trudnoće. Bjelančevina NCOA-2 je izražena u decidualnim stanicama, na mjestu implantacije (crvena fluorescencija) (Slika 12A i B).

Na antimezometrijalnom polu uterusa decidualne stanice su Hand2 pozitivne (zelena fluorescencija) (Slika 12C i D).

Analizom kolokalizacije NCOA-2 i Hand2 je vidljivo da bjelančevine kolokaliziraju na mjestu implantacije (Slika 12E i F). U post-implantacijskom razdoblju (Slika 12E i F) dolazi do pada razine izražaja NCOA-2 i Hand2, u odnosu na implantacijsko razdoblje (Slika 10E i F).

6,5 dpc



Slika 12: Izražaj NCOA-2 i Hand2 u na implantacijskom mjestu u 6,5 danu trudnoće.

(A&B) Izražaj NCOA-2. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2. Dvostrukom fluorescencijom su obilježena tkiva mišjeg uterusa. Bjelančevina NCOA-2 je obilježena zečjim poliklonskim protutijelom (crveno), a Hand2 kožjim poliklonskim protutijelom (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Strelice na slikama B, D i F prikazuju embrij na mjestu implantacije. Umetnuta slika na A prikazuje DAPI-jem obojane jezgre (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od pet uzoraka. dpc: days post coitum; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

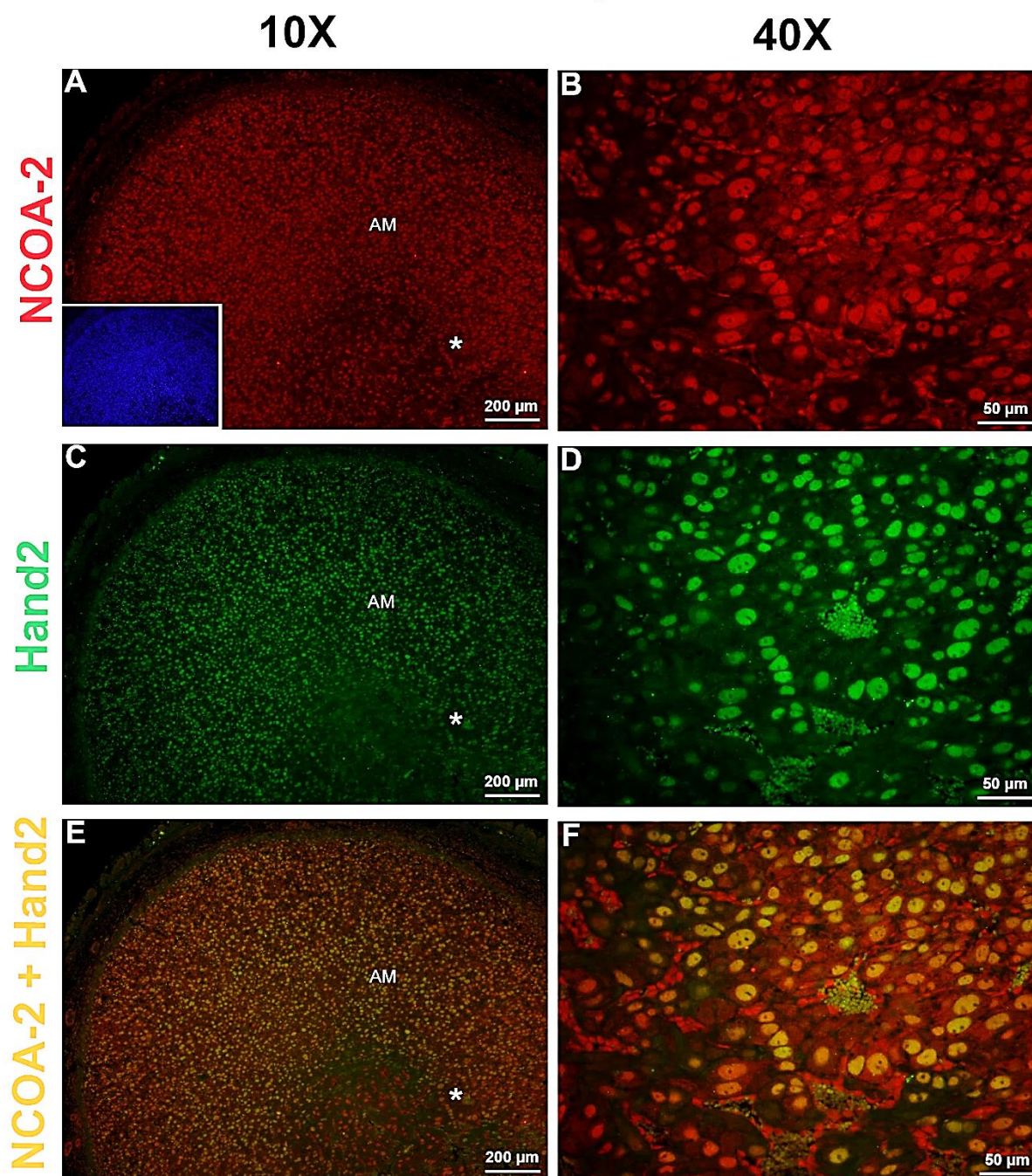
4.3.2. Izražaj Hand2 i NCOA-2 na antimezometrijalnom polu uterusa tijekom 7,5 dana trudnoće

Za vrijeme 7,5 dana trudnoće, NCOA-2 je prisutan u jezgrama decidualnih stanica na antimezometrijalnom polu uterusa (crvena fluorescencija). Također, na mjestu implantacije, svaka decidualna stanica je NCOA-2 pozitivna (Slika 13A i B).

Bjelančevina Hand2, prikazana zelenom fluorescencijom, je izražena u jezgrama velikih decidualnih stanica. (Slika 13C i D).

Da bi se usporedio prostorni razmještaj NCOA-2 i Hand2 u post-implantacijskom razdoblju, analizirana je njihova kolokalizacija. Decidualne stanice su pozitivne i na NCOA-2 i Hand2 (Slika 13E i F).

7,5 dpc



Slika 13: Izražaj NCOA-2 i Hand2 u decidualnim stanicama tijekom 7,5 dana trudnoće.

(A&B) Izražaj NCOA-2. **(C&D)** Izražaj Hand2. **(E&F)** Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2. Tkiva mišjeg uterusa su obilježena metodom dvostruke fluorescencije sa zečjim poliklonskim protutijelom za NCOA-2 (crvena fluorescencija) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno fluorescencija). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Umetnuta slika na A prikazuje jezgre stanica obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 µm (A, C i E) i 50 µm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od 3 uzoraka. dpc: days post coitum; AM – antimezometrijalni pol uterusa; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

4.3.3. Izražaj Hand-2 i NCOA-2 na mezometrijalnom polu uterusa tijekom 7,5 dana trudnoće

Na mezometrijalnom polu uterusa stanice se morfološki razlikuju od stanica na antimezometrijalnom polu uterusa. Bjelančevina NCOA-2 je prisutna u stanicama rezidualnog LE-a, a nije prisutna neposredno oko njega, u stromalnim stanicama (crvena fluorescencija) (Slika 14A i B).

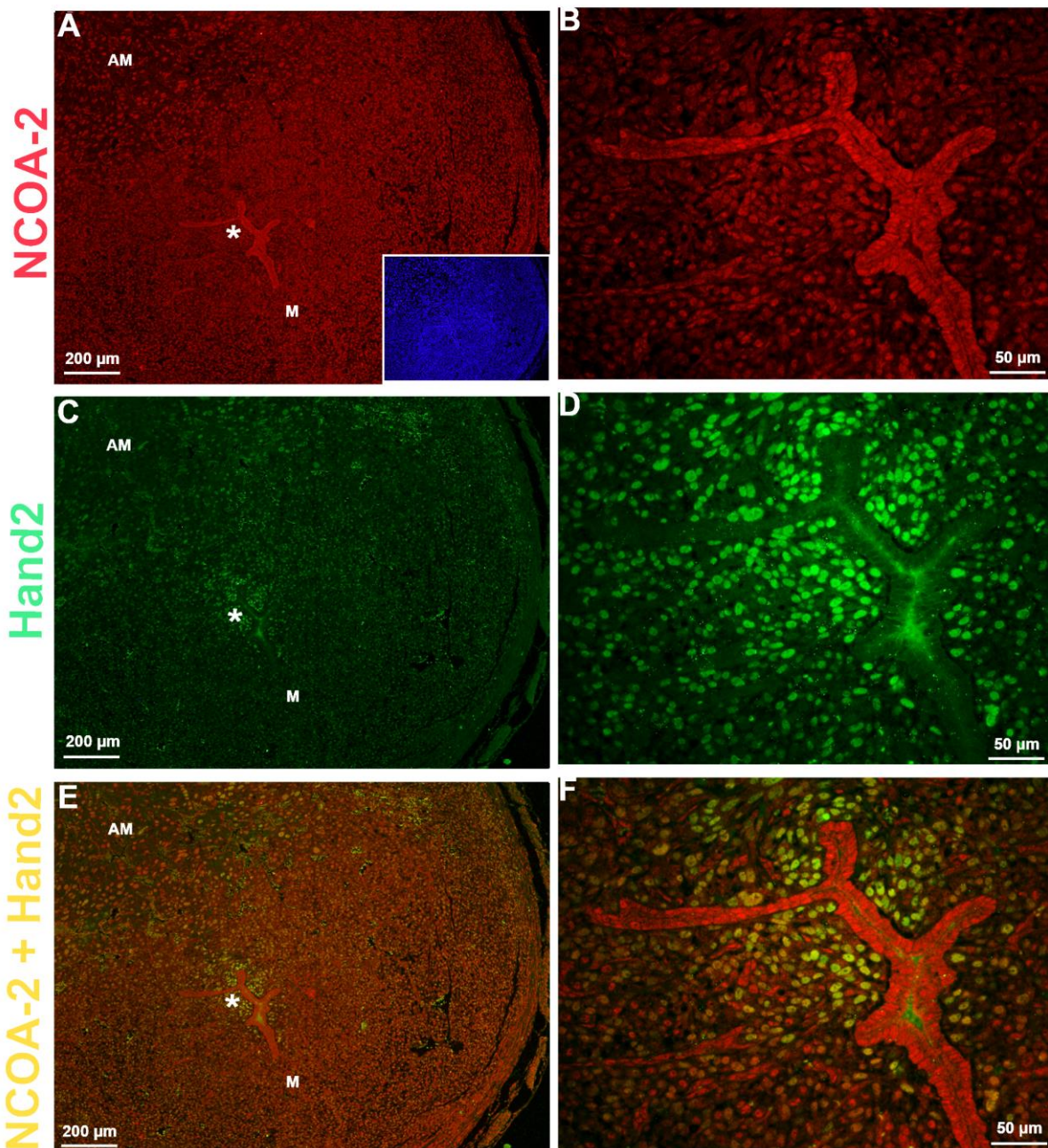
Za razliku od NCOA-2, Hand2 je izražen u stromalnim stanicama, neposredno oko rezidualnog LE-a (zelena fluorescencija) (Slika 14C i D).

Analizom kolokalizacije NCOA-2 i Hand2 u 7,5 danu trudnoće je vidljivo da bjelančevine samo djelomično kolokaliziraju neposredno oko LE-a (Slika 14E i F). Međutim, udaljavanjem od LE-a dolazi do kolokalizacije navedenih bjelančevina (Slika 14E i F).

7,5 dpc

10X

40X



Slika 14: Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 u post-implantacijskom razdoblju na mezometrijalnom polu uterusa.

(A&B) Izražaj NCOA-2 tijekom 7,5 dana trudnoće. **(C&D)** Izražaj Hand2 tijekom 7,5 dana trudnoće. **(E&F)** Izražaj NCOA-2 i Hand2 tijekom 7,5 dana trudnoće. Dvostruko imunofluorescentno obilježavanje tkiva mišjeg uterusa sa zečjim poliklonskim protutijelom za NCOA-2 (crveno) i kozjim poliklonskim protutijelom za Hand2 (zeleno). Kolokalizacija NCOA-2 i Hand2 (E i F) je vidljiva preklapanjem A i C te B i D. Umetnuta slika na A prikazuje jezgre stanica obojane DAPI bojom (plavo). Skala od 200 μm (A, C i E) i 50 μm (B, D i F). Rezultat je ogledni primjer jednog od 6 uzoraka. dpc: days post coitum; M – mezometrijalni pol uterusa; AM – antimezometrijalni pol uterusa; (*) predstavlja područje većeg povećanja.

5. Rasprava

Opstanak vrste je omogućen uspješnom trudnoćom, koja započinje oplodnjom, odnosno spajanjem haploidnog spermija i jajne stanice. U čovjeka se oplodnja odvija 24-48 sati poslije ovulacije, nakon čega slijedi razvoj od zigote do morule. U tom stadiju embrij je okružen zonom pellucidom, koja se otpušta približno 72 sata nakon ulaska u šupljinu uterusa, čime započinje proces implantacije (6). Proces implantacije uključuje apoziciju, adheziju i invaziju te podrazumijeva pričvršćivanje embrija za stijenku uterusa (8). Da bi se osiguralo dovoljno hranjivih tvari do stvaranja posteljice, stromalne stanice uterusa se diferenciraju u decidualne stanice, tijekom procesa koji zovemo decidualizacija (14). Ovaj proces osigurava mikrokoliš pogodan za adheziju embrija neophodnu za uspostavu implantacije i održavanje trudnoće (14, 16). Također, u ovom periodu se razvijaju i specifične imunološke stanice, za koje se pretpostavlja da imaju ulogu u obrani ploda od majčinog imunološkog sustava. Kod svih do sada istraživanih organizama, aktivnost P-a je neophodna za proces decidualizacije (14, 20).

Mogućnost začeća unutar jednog menstrualnog ciklusa iznosi otprilike 30 %, od čega u približno 75 % trudnoća dolazi do neuspjeha implantacije, što govori o njezinoj visokoj kompleksnosti uspostave i održavanja. O molekularnim mehanizmima koji su uključeni u proces uspostave trudnoće, danas se još uvijek malo zna. Iz tog razloga je potrebno njihovo istraživanje, što bi poboljšalo rezultate tretiranja neplodnosti (1). Iz etičkih razloga i nedostataka metoda, za proučavanje molekularnih mehanizama trudnoće koriste se laboratorijske životinje. Miš se pokazao kao dobar model za proučavanje trudnoće zbog kratkog reprodukcijuskog ciklusa te sličnih molekularnih mehanizama kao i u ljudi (4, 5). Zbog važnosti PR, NCOA-2 i Hand2 u uspostavljanju trudnoće, svrha ovog rada je bila proučiti vremenski i prostorni izražaj ovih molekula tijekom rane trudnoće.

Oplodnja, implantacija i decidualizacija su regulirane P-om, koji, vezanjem za PR, aktivira transkripciju gena nužnih u uspostavi i održavanju trudnoće (1). Razina P-a je određena LH-om, te je u miša najviša četvrtog dana trudnoće, a u čovjeka sedmog dana nakon ovulacije (1, 15, 20). Pravilna tkivno specifična transkripcijska aktivnost PR-a, je regulirana sastavom transkripcijskog kompleksa, u kojemu se nalazi NCOA-2. Aktivnost NCOA-2 sudjeluje u modulaciji biološke aktivnosti PR-a te time omogućuje implantaciju i razvoj mliječnih žlijezdi (35). Bjelančevina NCOA-2, vezanjem za PR te spajanjem sa sekundarnim ko-regulatorima i kromatin modificirajućim enzimima, stvara komplekse bjelančevina. Kompleksi bjelančevina povećavaju pristup kromatinu, što dovodi do aktivacije transkripcije putem PR-a (35, 39). Provedena analiza izražaja NCOA-2 je pokazala da je on prisutan u fazi pred-implantacije, implantacije i post-implantacije. Ko-aktivator NCOA-2 je izražen u stromalnim stanicama, stanicama LE-a i GE-a, čime se može pretpostaviti njegova uloga u receptivnosti uterusa. Decidualne stanice također izražavaju NCOA-2, što upućuje da je on važan i u procesu decidualizacije. Rezultati dobiveni provedenom analizom upućuju na ulogu NCOA-2 u kontroli aktivnosti PR-a u ranoj trudnoći. Literaturni izvor također opisuje važnost regulacije aktivnosti PR-a putem NCOA-2 (27).

U uterusu, transkripcijska aktivnost PR-a regulira izražaj Hand2 (26). Progesteronom inducirani Hand2 inhibira izražaj FGF-ova i proliferaciju LE-a, što je nužno za uspostavljanje trudnoće (41, 42). Bjelančevina Hand2 je izražena u stromalnim stanicama u pred-implantacijskoj, implantacijskoj i post-implantacijskoj fazi trudnoće. Za razliku od NCOA-2, Hand2 nije pronađen niti u stanicama LE-a niti GE-a.

Budući da je dokazano da PR ima ključnu ulogu u uspostavi i održavanju trudnoće, da je reguliran NCOA-2 te da utječe na transkripciju Hand2, bilo kakva nepravilnost u signalizaciji između ove tri molekule može utjecati na tijek implantacije.

U ovom radu je analiziran vremenski i prostorni izražaj PR s NCOA-2 i Hand2. Dobiveni rezultat ukazuje na staničnu specifičnost njihovog izražaja. U svrhu poboljšanja razumijevanja transkripcijskog djelovanja P-a preko PR-a trebalo bi istražiti odnos izražaja PR mRNA i NCOA-2 mRNA u stanicama strome, LE-a i GE-a tijekom rane trudnoće. Ova istraživanja bi mogla doprinjeti boljem razumijevanju uloge NCOA-2 kao ko-regulatora u aktivnosti PR-a, u različitoj staničnoj populaciji u endometriju tijekom rane trudnoće.

6. Zaključak

Prostorni izražaj te međusobni odnos PR-a, NCOA-2 i Hand2 bjelančevina se mijenja tijekom rane trudnoće. Izražaj navedenih molekula je povećan u razdoblju implantacije, u odnosu na pred-implantacijsko i post-implantacijsko razdoblje. Povrh toga, navedene molekule su izraženije na mjestu implantacije blastociste, u odnosu na mjestu udaljenom od implantacije, iz čega slijedi da su biološke aktivnosti PR, NCOA-2 i Hand2, uz aktivnosti ostalih molekula, važne za uspješnu implantaciju embrija. Budući da navedene bjelančevine kolokaliziraju u stromalnim stanicama, zaključuje se da su one međusobno ovisne. U implantacijskom razdoblju, svaka Hand2 pozitivna stanica ujedno je i PR pozitivna, što dalje potvrđuje da je transkripcijska aktivnost PR-a nužna za izražaj Hand2. Bjelančevine NCOA-2 i Hand2 kolokaliziraju u stromalnim stanicama u implantacijskom razdoblju, no NCOA-2 je vidljiv i u stanicama LE-a i GE-a. Navedeno upućuje da je, u uterusu, NCOA-2 dio transkripcijskog kompleksa koji kontrolira aktivnost PR-a ovisno u vrsti stanica. Post-implantacijsko razdoblje karakteriziraju decidualne stanice, pozitivne na Hand2 i NCOA-2, iz čega slijedi da su navedene bjelančevine nužne za proces decidualizacije. S obzirom da neuspjeh implantacije uzrokuje 75 % gubitaka trudnoća te da su PR, NCOA-2 i Hand2 ključni u implantaciji, navedene molekule su potencijalne mete za razvoj terapija koje bi omogućile porast broja uspješnih trudnoća. Za bolje razumijevanje molekularnih mehanizama važnih u uspostavi i održavanju trudnoće, kao budući eksperimenti se predlažu analize odnosa izražaja PR mRNA i NCOA-2 mRNA u RNA selektivno izoliranih iz stromalnih stanica, LE-a odnosno GE-a tijekom rane trudnoće.

7. Literatura

- (1) Cha J, Sun X and Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nat Med** 2012; **18(12)**: 1754-67.
- (2) Margulis AV, Palmsten K, Andrade SE, Charlton RA, Hardy JR, Cooper WO and Hernández-Díaz S. Beginning and duration of pregnancy in automated health care databases: review of estimation methods and validation results. **Pharmacoepidemiol Drug Saf** 2015; **24(4)**: 335-42.
- (3) Su RW and Fazleabas AT. Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates. **Adv Anat Embryol Cell Biol** 2015; **216**: 189-213.
- (4) Lim HJ and Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. **J Clin Invest** 2010; **120(4)**: 1004-15.
- (5) Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature** 2002; **420(6915)**: 520-62.
- (6) Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med** 2001; **345(19)**: 1400-08.
- (7) Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M and Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J Clin Invest** 2004; **114(6)**: 744-54.
- (8) Achache H and Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Hum Reprod Update** 2006; **12(6)**: 731-46.
- (9) Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA and Yoshinaga K. Embryo implantation. **Dev Biol** 2000; **223(2)**: 217-37.

- (10) Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD and Fisher SJ. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. **Science** 2003; **299(5605)**: 405-08.
- (11) James JL, Carter AM and Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? **Placenta** 2012; **33(5)**: 327-34.
- (12) Donaghay M and Lessey BA. Uterine receptivity: alterations associated with benign gynecological disease. **Semin Reprod Med** 2007; **25**: 461-75.
- (13) Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. **Fertil Steril** 2011; **96**: 522-29.
- (14) Dunn CL, Kelly RW and Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. **Reprod Biomed Online.** 2003; **7(2)**: 151-61.
- (15) Wang H and Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nat Rev Genet** 2006; **7(3)**: 185-99.
- (16) Brosens JJ and Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. **J Mol Endocrinol** 2006; **36(3)**: 389-98.
- (17) Gellersen B, Brosens IA and Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Semin Reprod Med** 2007; **25(6)**: 445-53.
- (18) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell** 1995; **83(6)**: 835-39.

- (19) Bhurke AS, Bagchi IC and Bagchi MK. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. **Am J Reprod Immunol** 2016; **75(3)**: 237–45.
- (20) Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T and Wang H. Molecular cues to implantation. **Endocr Rev** 2004; **25(3)**: 341-73.
- (21) Clarke CL and Sutherland RL. Progestin regulation of cellular proliferation. **Endocr Rev** 1990; **11(2)**: 266-301.
- (22) Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM and O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev** 1995; **9(18)**: 2266-78.
- (23) Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP and Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science** 2000; **289**: 1751–54.
- (24) Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ and Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **PNAS** 2003; **100**: 9744–49.
- (25) Mulac-Jericevic B and Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. **Reproduction** 2004; **128(2)**: 139-46.
- (26) Li Q, Kannan A, DeMayo FJ, Lydon JP, Cooke PS, Yamagishi H, Srivastava D, Bagchi MK and Bagchi IC. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2. **Science** 2011; **331(6019)**: 912-16.
- (27) Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R and Lam EW. Steroid receptor action. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2004; **18(2)**:265-83.
- (28) Oñate SA, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. **Science** 1995; **270**: 1354–57.

- (29) Johnson AB and O'Malley BW. Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. **Mol Cell Endocrinol** 2012; **348(2)**: 430-39.
- (30) Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. **Science** 1998; **279(5358)**: 1922-25.
- (31) Xu J, Liao L, Ning G, Yoshida-Komiya H, Deng C and O'Malley BW. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; **97(12)**: 6379-84.
- (32) Gehin M, Mark M, Dennefeld C, Dierich A, Gronemeyer H and Chambon P. The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. **Mol Cell Biol** 2002; **22(16)**: 5923-37.
- (33) Patchev AV, Fischer D, Wolf SS, Herkenham M, Götz F, Gehin M, Chambon P, Patchev VK and Almeida OF. Insidious adrenocortical insufficiency underlies neuroendocrine dysregulation in TIF-2 deficient mice. **FASEB J** 2007; **21(1)**: 231-38.
- (34) Wang L, Lonard DM and O'Malley BW. The Role of Steroid Receptor Coactivators in Hormone Dependent Cancers and Their Potential as Therapeutic Targets. **Horm Cancer** 2016; *7(4)*: 229-35.
- (35) Xu J, Wu RC and O'Malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. **Nat Rev Cancer** 2009; **9(9)**: 615-30.
- (36) Koh SS, Chen D, Lee YH and Stallcup MR. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. **J Biol Chem** 2001; **276(2)**: 1089-98.

- (37) McKenna NJ and O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002; *108(4)*: 465-74.
- (38) Mukherjee A, Amato P, Allred DC, DeMayo FJ and Lydon JP. Steroid receptor coactivator 2 is required for female fertility and mammary morphogenesis: insights from the mouse, relevance to the human. *Nucl Recept Signal* 2007; *5*: 1-7.
- (39) Hoon Kim J, Li H and Stallcup M. CoCoA. a Nuclear Receptor Coactivator which Acts through an N-Terminal Activation Domain of p160 Coactivators. *Mol Cell* 2003; *12(6)*: 1537-49.
- (40) Jenuwein T and Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; *293(5532)*: 1074-80.
- (41) Šućurović S, Nikolić T, Brosens JJ and Mulac-Jericevic B. Spatial and Temporal Analyses of FGF9 Expression During Early Pregnancy. *Cell Physiol Biochem* 2017; *42(6)*: 2318-29.
- (42) Huyen DV and Bany BM. Evidence for a conserved function of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 in mouse and human decidualization. *Reproduction* 2011; *142(2)*: 353-68.

8. Životopis

OSOBN INFORMACIJE

Šantek Iva

 Rastočine 4, 51000 Rijeka (Hrvatska)

 +385 989120579

 iva.santek96@gmail.com

Spol Žensko | Datum rođenja 11/03/1996 | Državljanstvo hrvatsko

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015–danas

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

2011–2015

Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, Rijeka (Hrvatska)

2003–2011

Osnovna škola Škurinje Rijeka, Rijeka (Hrvatska)

OSOBN VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C1	C1	C1
talijanski	C1	C1	B2	B2	B2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske
vještine

Komunikativna i otvorena osoba, prilagodljiva u multikulturalnoj i multinacionalnoj okolini zbog mnogih putovanja u inozemstvo. Sposobna za samostalan i timski rad, lako prilagodljiva na nove situacije.

Organizacijske /
rukovoditeljske
vještine

Iskustvo u vođenju grupnog školskog rada.

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

Dobro korištenje Microsoft Office programa (Word, PowerPoint i Excel).

Vozačka dozvola

B

DODATNE
INFORMACIJE

Seminari i aktivnosti

- Spring School "ICT, economical and organizational issues for e-health integration in the enlarged Europe" (Koper, 2017)
- pasivno sudjelovanje na BRIK-u, "International Biomedical Student Congress Rijeka" (Rijeka i Poreč, 2017)
- posjet bečkom Biocentru "Vienna Biocenter" (Beč, 2016)
- posjet IBS "Institut de Biologie Structurale" (Grenoble, 2017)
- volontiranje u laboratoriju (Zavod za fiziologiju, imunologiju i patofiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ljeto 2017)
- Spring School "IoT, economic and management challenges for e-health integration in the enlarged Europe" (Koper, 2018)
- demonstrator na kolegiju "Organska kemija"
- volontiranja u sklopu Udruge studenata biotehnologije
- volontiranje u projektu "Putujući znanstvenici"
- držanje instrukcija iz kemije, matematike i fizike za osnovnu i srednju školu