



Sveučiliste u Splitu
Prirodoslovni-matematički fakultet
Doktorski studij Biofizika

Doktorski rad

Učinak oksidacije na protein-protein interakcije i analiza
oksidativnog oštećenja proteina detekcijom karboniliranih
proteina u ljudskoj plazmi

Sanda Raić

Split, prosinac 2025.



University of Split

Faculty of Science

Doctoral Study of Biophysics

Doctoral thesis

The effect of oxidation on protein-protein interactions and
the analysis of oxidative protein damage by detecting
carbonylated proteins in human plasma

Sanda Raić

Split, December 2025

UČINAK OKSIDACIJE NA PROTEIN-PROTEIN INTERAKCIJE I ANALIZA
OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA PROTEINA DETEKCIJOM KARBONILIRANIH
PROTEINA U LJUDSKOJ PLAZMI

Doktorski rad Sande Raić, mag. chem., kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti, izrađen je pod vodstvom mentora prof. Igora Štagljara i komentorice izv. prof. dr. sc. Viljemke Bučević Popović.

Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktorica prirodnih znanosti iz polja kemije.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. _____

izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović
(Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu - predsjednik)

2. _____

prof. dr. sc. Mila Radan
(Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu – član)

3. _____

dr. sc. Maja Katalinić, znanstvena savjetnica
(Institut za medicinsko istraživanje i medicinu rada, Zagreb - član)

Potvrđuje da je disertacija obranjena dana _____.

Voditelj doktorskog studija: izv. prof. dr. sc. Damir Kovačić

Dekanica: prof. dr. sc. Ana Maravić

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorski rad

UČINAK OKSIDACIJE NA PROTEIN-PROTEIN INTERAKCIJE I ANALIZA OKSIDATIVNOG
OŠTEĆENJA PROTEINA DETEKCIJOM KARBONILIRANIH PROTEINA U LJUDSKOJ PLAZMI

Sanda Raić

Rad je izrađen na Mediteranskom institutu za istraživanje života u Splitu.

Sažetak

Oksidativni stres definira se kao stanje neravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i sposobnosti organizma da ih neutralizira ili popravi nastala oštećenja. Među različitim oblicima oksidativnih modifikacija, proteinska karbonilacija zauzima središnje mjesto zbog svoje nepovratne prirode i povezanosti s gubitkom funkcije proteina. Ova disertacija istražuje utjecaj oksidacije na protein-protein interakcije te razvija i optimizira metodu kvantifikacije oksidativnog oštećenja proteina u ljudskoj plazmi, s ciljem identifikacije biomarkera starenja. U prvom dijelu rada ispitan je utjecaj oksidativnog oštećenja na afinitet vezanja KRAS proteina za Ras-binding domenu (RBD) c-RAF kinaze. UV-inducirana karbonilacija KRAS-a rezultirala je smanjenjem sposobnosti vezanja za RBD, što ukazuje na osjetljivost KRAS kompleksa pod oksidativnim uvjetima. U drugom dijelu rada optimizirana je 2D-OxiDIGE metoda za kvantifikaciju karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi, s mogućnošću buduće identifikacije spektrometrijom masa. Metoda je validirana za osjetljivost, selektivnost i reproducibilnost, s posebnim naglaskom na detekciju nisko zastupljenih proteina plazme koji mogu služiti kao potencijalni biomarkeri oksidativnog stresa i starenja. Rezultati integriraju molekularne, funkcionalne i metodološke pristupe za razumijevanje karbonilacije proteina te naglašavaju njezinu ulogu u regulaciji staničnog signaliziranja, uz potencijalne primjene u dijagnostici bolesti i starenja povezanih s oksidativnim stresom.

(101 stranica, 33 slika, 6 tablice, 142 literaturnih navoda, 5 priloga, jezik izvornika:hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Ključne riječi: oksidativni stres, karbonilacija proteina, protein-protein interakcije, KRAS, SIMPL, 2D-OxiDIGE, plazma, biobanka

Mentor: prof. Igor Štagljar

Ko-mentor: izv. prof. dr. sc. Viljemka Bučević Popović

Ocjenjivači:

1. izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović

2. prof. dr. sc. Mila Radan

3. dr. sc. Maja Katalinić, znanstvena savjetnica

Rad prihvaćen:

University of Split

Faculty of Science

Ph.D. thesis

THE EFFECT OF OXIDATION ON PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS AND THE ANALYSIS OF
OXIDATIVE PROTEIN DAMAGE BY DETECTING CARBONYLATED PROTEINS IN HUMAN
PLASMA

Sanda Raić

Thesis performed at Mediterranean Institute for Life Sciences in Split

Abstract

Oxidative stress is defined as a state of imbalance between the production of reactive oxygen species and the organism's ability to neutralize them or repair the resulting damage. Among various forms of oxidative modifications, protein carbonylation occupies a central role due to its irreversible nature and association with loss of protein function. This doctoral thesis investigates the impact of oxidation on protein-protein interactions and develops and optimizes a method for quantifying oxidative protein damage in human plasma, with the aim of identifying aging biomarkers. In the first part of the study, the effect of oxidative damage on the binding affinity of KRAS protein to the Ras-binding domain (RBD) of c-RAF kinase was examined. UV-induced carbonylation of KRAS resulted in reduced binding to RBD, indicating the sensitivity of the KRAS complex under oxidative conditions. In the second part, a 2D-OxiDIGE method was optimized for the quantification of carbonylated proteins in human plasma, with the potential for future identification by mass spectrometry. The method was validated for sensitivity, selectivity, and reproducibility, with particular attention to detecting low-abundance plasma proteins that may serve as potential biomarkers of oxidative stress and aging. The results integrate molecular, functional, and methodological approaches to understanding protein carbonylation and highlight its role in regulating cellular signaling, with potential applications in the diagnosis of oxidative stress-related diseases and aging.

(101 pages, 33 figures, 6 tables, 142 references, 5 appendices, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, University Library in Split, Library of the Faculty of Science University of Split

Keywords: oxidative stress, protein carbonylation, protein-protein interactions, KRAS, SIMPL, 2D-OxiDIGE, plasma, biobanka

Supervisor: Prof. Igor Štagljar, Ph.D.

Co-supervisor: Assoc. Prof. Viljemke Bučević Popović, Ph.D.

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Stjepan Orhanović, Ph.D.

2. Prof. Mila Radan, Ph.D.

3. Maja Katalinić, Ph.D.

Thesis accepted:

Mojim roditeljima

Zahvale

Zahvaljujem mentoru, prof. Igoru Štagljaru, na ukazanoj prilici da istražujem i učim od Vas. Vaš optimizam bio je vjetar u leđa u ključnim trenucima i uvelike mi je olakšao dovršetak ovog rada.

Zahvaljujem komentorici, izv. prof. dr. sc. Viljemki Bučević Popović, na strpljenju, pomoći i stručnim savjetima tijekom pisanja disertacije. Vaša podrška i upute značajno su doprinijele kvaliteti ovog rada, a osobito sam zahvalna na vremenu i trudu koje ste uložili te razumijevanju koje ste mi ukazali dok sam „crtala izvan dozvoljenih okvira“.

Veliku zahvalnost dugujem članovima povjerenstva na konstruktivnim komentarima i sugestijama koje su doprinijele unapređenju ove disertacije. Također zahvaljujem svim svojim suradnicima, bez čijeg doprinosa ovaj rad ne bi bio potpun.

Posebnu zahvalnost dugujem dr. sc. Sanji Radman, koja mi je pružila priliku da krenem ovim putem te omogućila izradu dijela ove disertacije u suradnji s dr. sc. Ozrenom Polašekom. Bez Vaše prijateljske potpore i stručnosti ne bih bila tu gdje sam danas.

Od srca zahvaljujem svim svojim kolegicama i kolegama s MEDILS-a, koji su zajedno sa mnom proživjeli ovu avanturu i pružili razumijevanje i podršku u ključnim trenucima, a posebno dr. sc. Marini Rudan-Dimlić. Hvala na ogromnoj dozi smijeha, podrške i pozitivne u trenucima pred svitanje. Sretna sam i zahvalna što si bila moj suborac u dijelu ove priče.

Jedno veliko hvala prof. dr. sc. Miroslavu Radmanu na ukazanoj prilici. Bez Vaših inspirativnih ideja, razmišljanja izvan svih okvira i nepresušnog izvora snalažljivosti ovaj rad ne bi bio moguć. Hvala.

Posebno hvala mojim kolegicama sa studija, dr. sc. Antoniji Mravak i dr. sc. Margariti Bužančić Milosavljević, na svim korisnim razgovorima, pomoći i podršci. Bile ste važan dio ove priče iza kulisa.

Veliko hvala dr. sc. Ireni Dukić, čija je podrška tijekom cijelog procesa nadilazila birokratske aspekte i bila od velike važnosti za dovršetak ovog rada.

Najveću i najiskreniju zahvalnost upućujem svojoj obitelji i prijateljima. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene, čak i kada ja nisam. Bez vaše podrške sve ovo ne bi bilo moguće i ne bi imalo nikakvog smisla. Hvala vam što kroz vaše oči, sebe gledam u najljepšem svjetlu i što se sve ono što želim ostvariti čini na dohvat ruke.

I na kraju, želim se zahvaliti sama sebi što sam uspjela nadvladati vlastite prepreke i uspješno dovesti ovu avanturu, punu uspona i padova, kraju. Neka ovo bude dokaz da se i najteži izazovi savladavaju korak po korak, čak i onda kada se čine nemogućim.

Sadržaj

I. UVOD	1
1.1. Oksidativni stres: definicija, uzorci i biološke posljedice	1
1.2. Karbonilacija proteina kao posljedica oksidativnog stresa	3
1.3. Proteostaza - homeostaza proteina	5
1.4. Protein-protein interakcije - temelj stanične organizacije i signalizacije	7
1.4.1. Interakcija KRAS-c-RAF	9
1.4.2. Metoda <i>Split Intein Mediated Protein Ligation</i> (SIMPL)	13
1.5. Karbonilirani proteini kao biomarkeri oksidativnog stresa i starenja	15
1.5.1. Problemi u postojećim metodama detekcije karbonilacije	16
1.5.2. Specifičnosti plazme kao biološkog uzorka	17
1.5.3. Biobanka „10 001 Dalmatinac”	19
1.5.4. Eksperimentalni pristup kvantifikaciji karbonilacije u ljudskoj plazmi: razvoj i optimizacija 2D-OxiDIGE metode	20
1.6. Cilj i temeljne hipoteze istraživanja	24
II. METODE	25
2.1. Ispitivanje utjecaja oksidacijskog stresa na interakciju RBD/c-RAF i KRAS proteina	25
2.1.1. Transfekcija stanica	27
2.1.2. Oksidacija UV-zračenjem	28
2.1.3. Oksidacija s H ₂ O ₂	28
2.1.4. SIMPL (<i>Split Intein Mediated Protein Ligation</i>) metoda	28
2.1.5. Označavanje karbonilnih skupina Oxime blot metodom	29
2.1.6. Imunoprecipitacija	30
2.1.7. Eksperiment spektrometrije masa	30
2.1.8. Molekularno modeliranje	32

2.1.9. Testiranje SIMPL konstrukata u „vanstaničnim” uvjetima	32
2.2. Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi temeljem proteomske metode	33
2.2.1. Odabir sudionika i prikupljanje uzoraka plazme	34
2.2.2. Uklanjanje visoko zastupljenih proteina u uzorcima plazme	35
2.2.3. Obilježavanje karbonilnih skupina u uzorcima plazme i analiza signala SDS-PAGE elektroforezom (1D-Oxi).	36
2.2.4. Utjecaj postotka akrilamida na razdvajanje plazmatskih proteina 1D-Oxi metodom	37
2.2.5. Optimizacija uvjeta za reakciju označavanja karbonilnih skupina u 2D-OxiDIGE analizi: usporedba PBS i UTC pufera	37
2.2.6. 2D-OxiDIGE metoda	38
2.2.7. Validacija metode pomoću statističke analize	40
2.3. Analiza uzoraka plazmatskih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom (2D-OxiDIGE).	40
III. REZULTATI I RASPRAVA.	42
3.1. Interakcija KRAS i RBD/c-RAF pod oksidacijskim stresom	42
3.1.1. Oksidacija izazvana UV-zračenjem narušava interakciju RBD-KRAS . .	42
3.1.2. Usporedna metoda oksidacije: djelovanje H ₂ O ₂ na protein-protein interakciju	46
3.1.3. UV-zračenje inducira oksidativno oštećenje RBD i KRAS proteina u obliku karbonilacije	47
3.1.4. Spektrometrija masa KRAS proteina otkriva povećanje oksidativnih modifikacija nakon UV zračenja	52
3.1.5. Molekularnoo modeliranje interakcija između RBD i KRAS proteina . .	55
3.1.6. Testiranje SIMPL konstrukata za interakcija u „vanstaničnim“ uvjetima	56
3.1.7. Rasprava rezultata utjecaja oksidacije na PPI i perspektive daljnjih istraživanja	59
3.2. Kvantifikacija karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi: razvoj metode i primjena	64

3.2.1. Uklanjanje visoko zastupljenih proteina za poboljšanje proteomske analize	64
3.2.2. Optimizacija fluorescentnog označavanja karboniliranih proteina u plazmi pomoću CF647DI aminooksi boje.	66
3.2.3. Učinkovitost razdvajanja proteina pri različitim postocima akrilamidnog gela	68
3.2.4. Učinkovitost različitih puferskih sustava u fluorescentnom označavanju proteina	70
3.2.5. Procjena ponovljivosti optimizirane 2-D OxiDIGE metode	71
3.3. Identifikacija potencijalnih biomarkera starenja temeljenih na karbonilaciji proteina	75
3.3.1. Ukupna razina karbonilacije proteina u zdravih ispitanika različite dobi i spola	75
3.3.2. Identifikacija proteina povezanih s dobi primjenom 2D-OxiDIGE metode	78
3.3.3. Rasprava o razvoju metode i primjeni kvantifikacija karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi	81
IV. ZAKLJUČAK	86
V. LITERATURA	88
VI. PRILOZI	
VII. ZNANSTVENI RADOVI	
VIII. ŽIVOTOPIS	

Popis kratica

1D-Oxi	jednodimenzionalna elektroforeza za određivanje ukupne karbonilacije
2D-DIGE	dvodimenzionalna diferencijalna gel-elektroforeza
2D-OxiDIGE	2D-DIGE za određivanje karbonilacije
ALA	alanin
ALY	alizin
ARG	arginin
ASA	α -aminoadipat-semialdehid
COV	koeficijent varijacije
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
GAP	protein koji aktivira GTP-azu
GDP	gvanozin-difosfat
GEF	faktor za izmjenu gvaninskog nukleotida
GSA	glutamil-semialdehid
GTP	gvanozin-trifosfat
HSA	albumin
IC	C-terminalni fragment inteina
IEF	izoelektrično fokusiranje
IGG	imunoglobulin G
IN	N-terminalni fragment inteina
ILE	izoleucin
KRAS	engl. <i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>
LEU	leucin
LYS	lizin
MEK	MAPK/ERK kinaza
pI	izoelektrična točka proteina
PPI	protein-protein interakcije
PRO	prolin
PSM	podudaranje peptida i spektra
RAF	engl. <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RBD	Ras-vezujuća domena RAF kinaze

ROS	reaktivne kisikove vrste
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza
SIMPL	metoda <i>Split Intein-Mediated Protein Ligation</i>
UV	ultraljubičasto
VAL	valin

I. Uvod

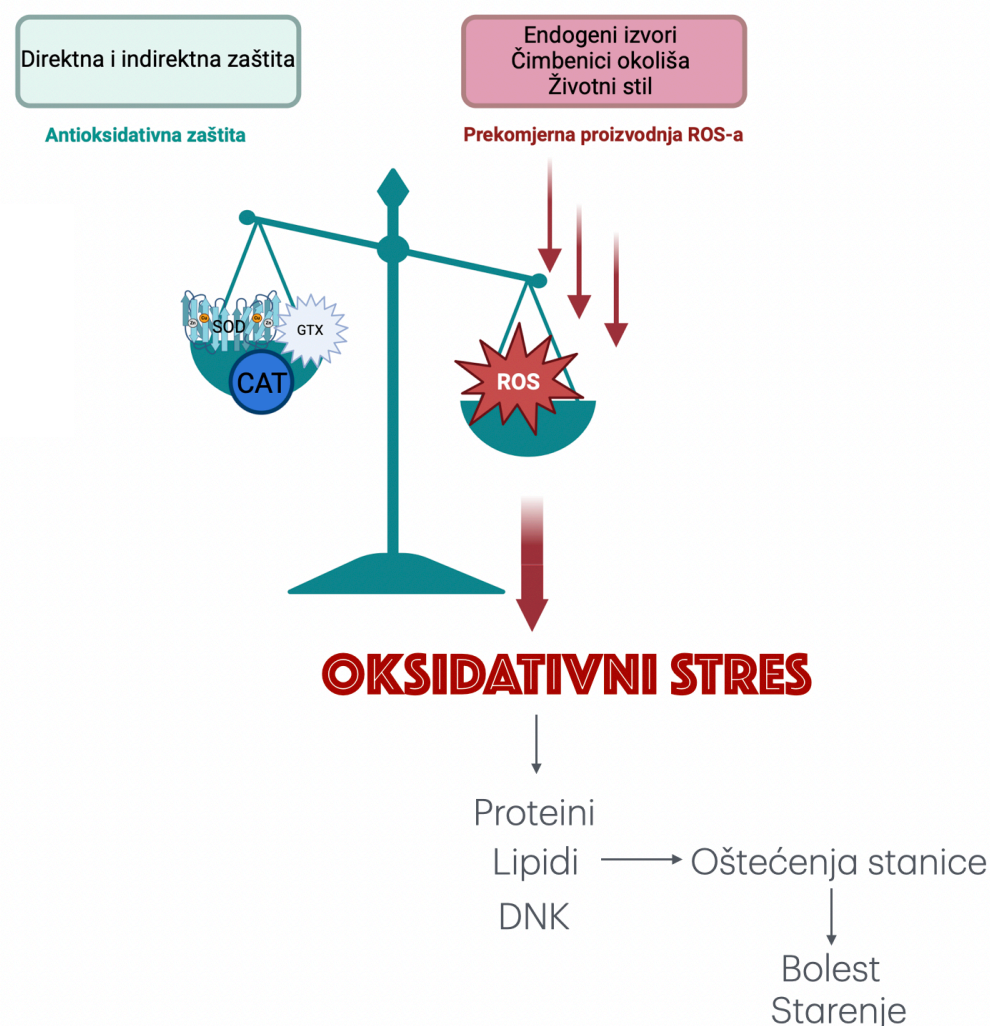
1. 1 Oksidativni stres: definicija, uzroci i biološke posljedice

Oksidativni stres označava stanje narušene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) i sposobnosti organizma da ih neutralizira ili popravi oštećenja koja one uzrokuju (Sies 1997). ROS obuhvaćaju različite kemijske spojeve, poput superoksidnog aniona ($O_2^{\bullet-}$), vodikova peroksida (H_2O_2) i hidroksilnog radikala ($\bullet OH$). Ove se molekule u stanici neprekidno stvaraju kao nusprodukti normalnih metaboličkih procesa. To se osobito odnosi na mitohondrijsku respiraciju i druge povezane metaboličke putove. Iako se ROS najčešće povezuju s oksidativnim oštećenjima, imaju i važnu ulogu u regulaciji signalnih puteva, ekspresiji gena, imunološkom odgovoru te obrani od patogena (Finkel i Holbrook 2000).

Glavni izvori endogenog ROS-a uključuju mitohondrije, NADPH-oksidade, enzime citokroma P450 i peroksisome (Reuter i sur. 2010). Osim endogenih izvora, postoje i vanjski čimbenici koji mogu povećati stvaranje ROS-a u tkivima. Među njima se nalaze ultraljubičasto (UV, engl. *ultraviolet*) i ionizirajuće zračenje, zagađenje okoliša, duhanski dim, teški metali, određeni lijekovi i različiti patološki upalni procesi (de Jager i sur. 2017).

Kako bi održale redoks ravnotežu, stanice raspolažu složenim antioksidativnim sustavom koji uključuje enzime poput superoksid-dismutaze, katalaze i glutation-peroksidaze, te niskomolekularne antioksidanse kao što su glutation, vitamin C i vitamin E. Ove komponente neutraliziraju ROS i tako štite stanice od oksidativnih oštećenja (Shacter 2000).

Ključna osobina oksidativnog stresa je njegova dvojaka priroda. U niskim koncentracijama, ROS djeluje korisno jer sudjeluje u različitim fiziološkim procesima, dok visoke koncentracije ROS-a uzrokuju oštećenja biomolekula. Kada količina ROS-a premaši antioksidativni kapacitet stanice, dolazi do nakupljanja oksidativnih oštećenja lipida, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata te osobito proteina (Dalle-Donne i sur. 2006; Levine i Stadtman 2001; Shacter 2000; Stadtman 2006). Takve visoko reaktivne vrste mogu narušiti strukturu i funkciju biomolekula, što ozbiljno ugrožava staničnu funkciju i preživljenje (Slika 1).



Slika 1. Prikaz gubitka ravnoteže između antioksidativne zaštite i proizvodnje ROS-a. Prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), potaknuta endogenim procesima, čimbenicima okoliša i načinom života, nadmašuje kapacitet antioksidativnih obrambenih sustava katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD), i glutationa (GTX). Ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.

Oksidativni stres može biti akutan ili kroničan. Akutni oblik najčešće nastaje kao odgovor na okolišne čimbenike, poput UV-zračenja ili toksina. Kronični stres razvija se postupno, zbog dugotrajne neravnoteže u antioksidativnoj obrani, i povezuje se sa starenjem te s bolestima poput kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja, raka, dijabetesa, kroničnih upala i metaboličkih disfunkcija (Dalle-Donne i sur. 2006; Levine i Stadtman 2001; Stadtman 2006).

Ovo je istraživanje usmjereno na oksidativna oštećenja proteina, budući da upravo ta vrsta modifikacija značajno narušava stanične funkcije i sudjeluje u nastanku i razvoju brojnih oboljenja (Baraibar i sur. 2012; Dalle-Donne i sur. 2006; Nystrom 2005).

1. 2. Karbonilacija proteina kao posljedica oksidativnog stresa

Zbog svoje visoke zastupljenosti i rasprostranjenosti u različitim dijelovima stanice, proteini predstavljaju najčešće mete oksidativnih oštećenja. Procjenjuje se da između 50 % i 75 % svih oštećenja izazvanih oksidativnim stresom u stanicama pogađa upravo proteine (Dean i sur. 1997). Među različitim oblicima oksidativnih modifikacija, karbonilacija se ističe svojom učestalošću, ireverzibilnošću i funkcionalnim posljedicama. Karbonilacija proteina je nepovratna oksidativna modifikacija koja nastaje uvođenjem karbonilnih skupina (aldehida ili ketona) u bočne lance određenih aminokiselina, pri čemu njihova kemijska struktura određuje osjetljivost na oksidaciju i posljedične promjene u funkciji proteina (Dalle-Donne i sur., 2003; Levine i sur., 1990; Stadtman i Levine 2003). Za razliku od reverzibilnih modifikacija, poput formiranja disulfidnih veza ili sulfenilacije, karbonilacija ostaje trajna jer stanice nemaju specifične enzime za njezino uklanjanje (Fedorova 2017).

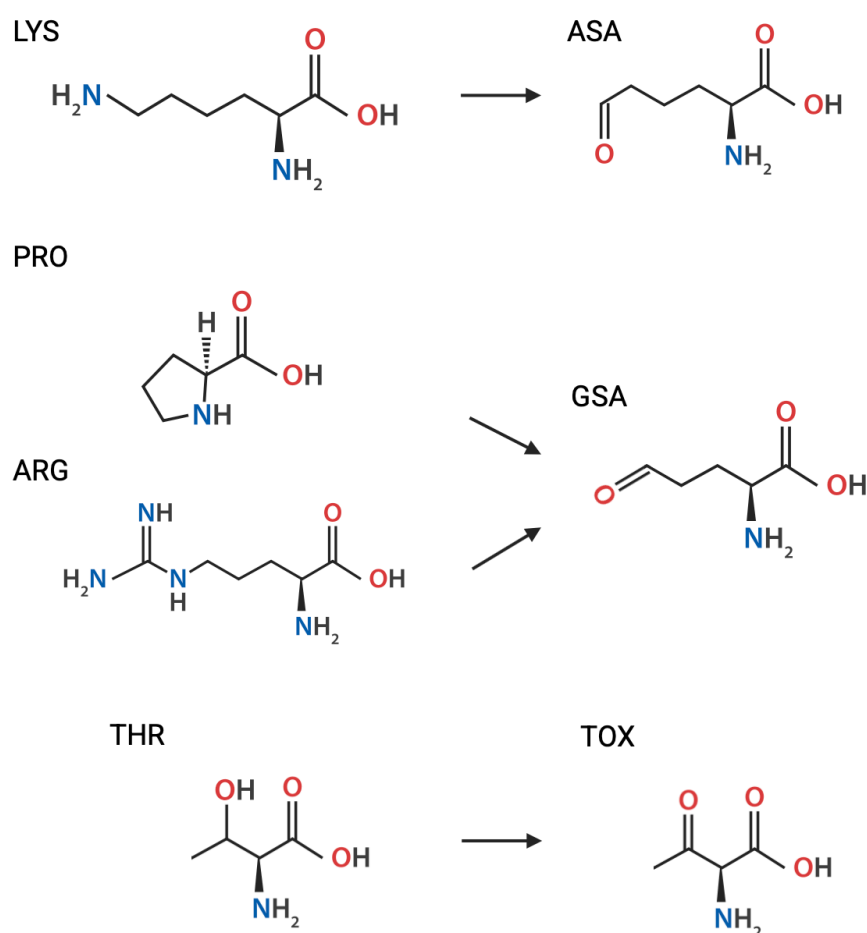
Ovisno o strukturi bočnog lanca, aminokiseline se razlikuju obzirom na različitu osjetljivost prema oksidaciji i posljedicama koje te modifikacije ostavljaju na protein. Najpodložnijima karbonilaciji smatraju se aminokiseline poput lizina (Lys), arginina (Arg), prolina (Pro) i treonina (Thr), koje tijekom oksidativnog stresa izravno podliježu uvođenju karbonilnih skupina (aldehidne ili ketonske) (Slika 2) (Stadtman i Levine 2003).

Ove aminokiseline posebno su osjetljive na oksidaciju induciranu reaktivnim kisikovim vrstama u prisutnosti prijelaznih metala, pri čemu dolazi do stvaranja specifičnih karbonilnih derivata. Oksidacijom Lys nastaje α -aminoadipat-semialdehid (Asa), oksidacijom Pro i Arg nastaje glutamil-semialdehid (Gsa), dok oksidacija Thr rezultira stvaranjem 2-amino-3-ketobutirata (Tox) (Dalle-Donne i sur. 2003; Requena i sur. 2001).

Karbonilne skupine se mogu na proteinima pojaviti i sekundarno, kroz reakcije s lipidnim peroksidima ili krajnjim produktima glikacije (engl. *Advanced glycation end-products*), umjesto izravnom oksidacijom aminokiselina (Dalle-Donne i sur. 2003; Levine i sur. 1990). Ipak, takve se modifikacije klasificiraju zasebno, dok se izravna karbonilacija smatra primarnim oblikom oksidativnog oštećenja, specifičnim za navedene aminokiseline (Stadtman i Levine 2000). Dosadašnja istraživanja ne ukazuju na druge aminokiseline kao značajne mete izravne karbonilacije u fiziološkim uvjetima.

Karbonilirani proteini najčešće zauzimaju nepravilne, denaturirane konformacije koje ih čine teško prepoznatljivima za proteolitičke sustave (Dalle-Donne i sur. 2006,

Nyström 2005). Osim toga, gubitak pravilnog savijanja (engl. *folding*) povećava njihovu sklonost agregaciji. Nastali agregati su često netopljivi i veliki, zbog čega ne mogu ući u proteasome (Nyström 2005). U uvjetima jakog oksidativnog stresa ili tijekom starenja, dolazi do ubrzanog nakupljanja karboniliranih proteina koji mogu zagušiti sustave razgradnje, dodatno pogoršavajući stanje u stanici (Krisko i Radman 2010). Štoviše, karbonilacija može zahvatiti i komponente samih razgradnih sustava, što dodatno smanjuje njihovu funkcionalnost i ubrzava nakupljanje oštećenih proteina. Posljedično, karbonilacija može dovesti do gubitka ili stjecanja enzimske funkcije, poremećaja u interakcijama između proteina, smanjene inhibicije proteaza, promjena u genskoj ekspresiji te povećanja imunogenosti endogenih proteina (Fedorova 2017). Takve promjene narušavaju stanične signalne putove i homeostatske mehanizme, što u konačnici može rezultirati funkcionalnim kolapsom i staničnom smrću.



Slika 2. Shematski prikaz oksidativne modifikacije bočnih lanaca aminokiselina uslijed karbonilacije proteina. Pod utjecajem ROS-a, aminokiseline lizin (LYS), prolin (PRO), arginin (ARG) i treonin (THR) oksidiraju se u odgovarajuće karbonilne derivate: α-aminoadipat-semialdehid (ASA), glutamil-semialdehid (GSA) i 2-amino-3-ketobutirat (TOX). Ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.

Nakupljanje karboniliranih proteina povezano je s razvojem brojnih bolesti. U neurodegenerativnim poremećajima, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, zabilježene su povišene razine karboniliranih proteina u regijama mozga pogođenima neurodegeneracijom, što upućuje na moguću uzročnu povezanost s gubitkom neuronske funkcije (Stadtman 2006). U kardiovaskularnim bolestima, karbonilacija mijenja strukturu i funkciju kontraktilnih proteina miokarda, dok u dijabetesu i kroničnim upalnim stanjima pridonosi oštećenju endotela i potiče aktivaciju imunološkog odgovora (Levine 2002; Tramutola i sur. 2020). Osim toga, kronična izloženost oksidativnom stresu rezultira postupnim porastom karboniliranih proteina s dobi, što ih čini pouzdanim biomarkerom staničnog starenja i kumulativnog oksidacijskog opterećenja (Baraibar i sur. 2013).

Na razini staničnih procesa, karbonilacija može služiti kao sredstvo deaktivacije funkcionalno kompromitiranih proteina i signal za njihovu degradaciju (Dalle-Donne i sur. 2003; Nyström 2005). Međutim, kada kapacitet staničnih sustava postane nedostatan za njihovo učinkovito uklanjanje, disfunkcionalni proteini se nakupljaju, čime se aktiviraju upalni putevi poput signalizacije NF- κ B i ekspresije proupalnih citokina, kao i sustavi za prepoznavanje oštećenih molekula (Nowotny i sur. 2015). Zbog svega navedenog, karbonilacija proteina nije samo pasivna posljedica oksidativnog stresa, već i aktivan čimbenik u progresiji bolesti i starenju. Upravo zbog toga, detekcija, kvantifikacija i razumijevanje funkcionalnih posljedica karbonilacije proteina predstavljaju ključne korake u biološkom i biomedicinskom istraživanju oksidativnog stresa.

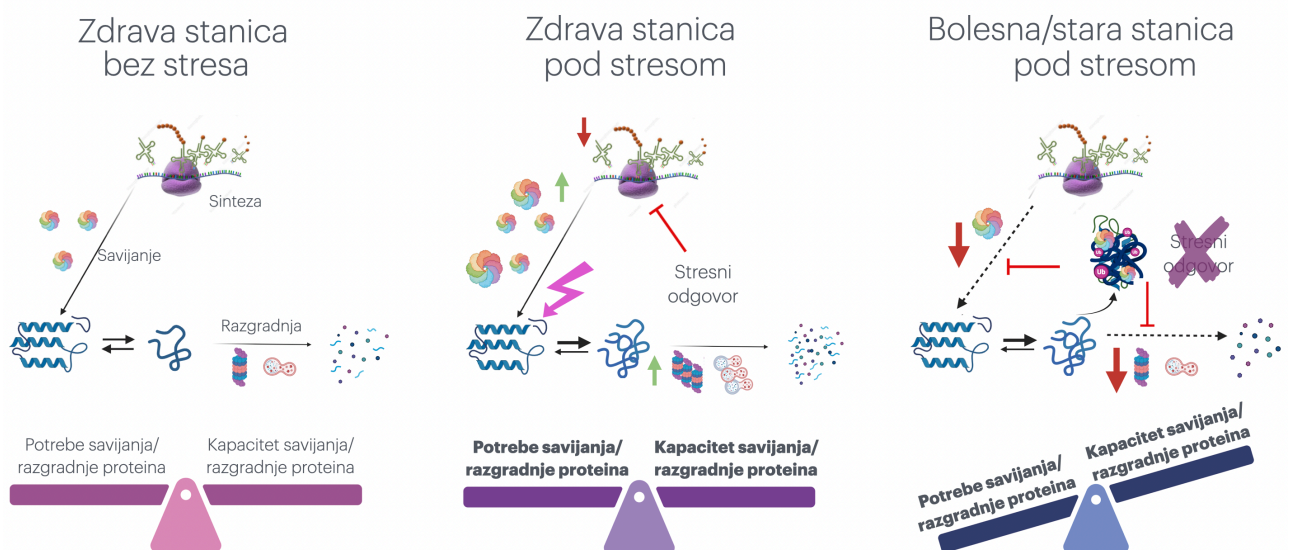
1. 3. Proteostaza - homeostaza proteina

Održavanje funkcionalnog proteoma, poznato kao proteostaza, ključno je za staničnu homeostazu i opće zdravlje organizma (Balch i sur. 2008; Hipp i sur. 2019). Proteostaza obuhvaća niz međusobno povezanih procesa, uključujući sintezu, pravilno savijanje, lokalizaciju, funkcionalnu regulaciju i degradaciju proteina (Balch i sur. 2008). Ti procesi ovise o složenoj mreži molekularnih mehanizama u koje se ubrajaju šaperoni, sustavi kontrole kvalitete proteina, ubikvitin-proteasomski sustav i autofagija.

Poremećaj proteostaze smatra se jednim od temeljnih obilježja starenja i značajno doprinosi razvoju brojnih bolesti. Gubitak učinkovitosti u održavanju funkcionalnog proteoma povezan je s nakupljanjem proteinskih agregata, što je karakteristično za

neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti (Labbadia i Morimoto 2015). Osim toga, disfunkcija proteostatske mreže doprinosi razvoju metaboličkih poremećaja, dijabetesa tipa 2 i različitih oblika raka.

Narušena proteostaza povećava osjetljivost stanica na oksidativna oštećenja, uključujući karbonilaciju, što dodatno destabilizira funkcionalni proteom i ugrožava staničnu homeostazu. U zdravim stanicama koje nisu izložene stresu, potrebe za savijanjem i razgradnjom proteina su uravnotežene s kapacitetom stanične proteostatske mreže (Slika 3). Većina proteina pravilno se savija u svoje nativno stanje, dok se njihov višak ili pogrešno savijeni proteini učinkovito uklanjaju putem proteasomskog sustava i autofagije. U uvjetima akutnog stresa, stanica aktivira adaptivni odgovor kojim povećava ekspresiju molekularnih šaperona i drugih čimbenika uključenih u održavanje proteostaze (Hipp i sur. 2019.). Time se pojačava kapacitet za pravilno savijanje proteina i ubrzava razgradnja oštećenih molekula, dok se istovremeno smanjuje sinteza novih proteina kroz inhibiciju opće translacije (Balch i sur. 2008). Iako se u uvjetima stresa povećava potreba za savijanjem i razgradnjom proteina, zdrava stanica zadržava sposobnost učinkovite prilagodbe i održavanja proteostatske ravnoteže (Kaushik i Cuervo 2015).



Slika 3. Dinamika proteostaze u zdravoj i stresom pogođenoj stanici. Lijevo: U zdravoj stanici bez stresa, sinteza, savijanje i razgradnja proteina su uravnoteženi, što održava proteom stabilnim. Sredina: Tijekom stresa (npr. oksidativnog), povećava se opterećenje na proteinski sustav, ali aktivacija stresnog odgovora (npr. putem šaperona) omogućuje održavanje ravnoteže. Desno: U bolesnoj ili starijoj stanici, dolazi do smanjenja kapaciteta za savijanje i razgradnju proteina, dok se potrebe povećavaju. Učinkovitost stresnog odgovora je smanjena, što rezultira nakupljanjem oštećenih proteina i narušenom proteostazom. Ilustracija izrađena pomoću programa BioRender.

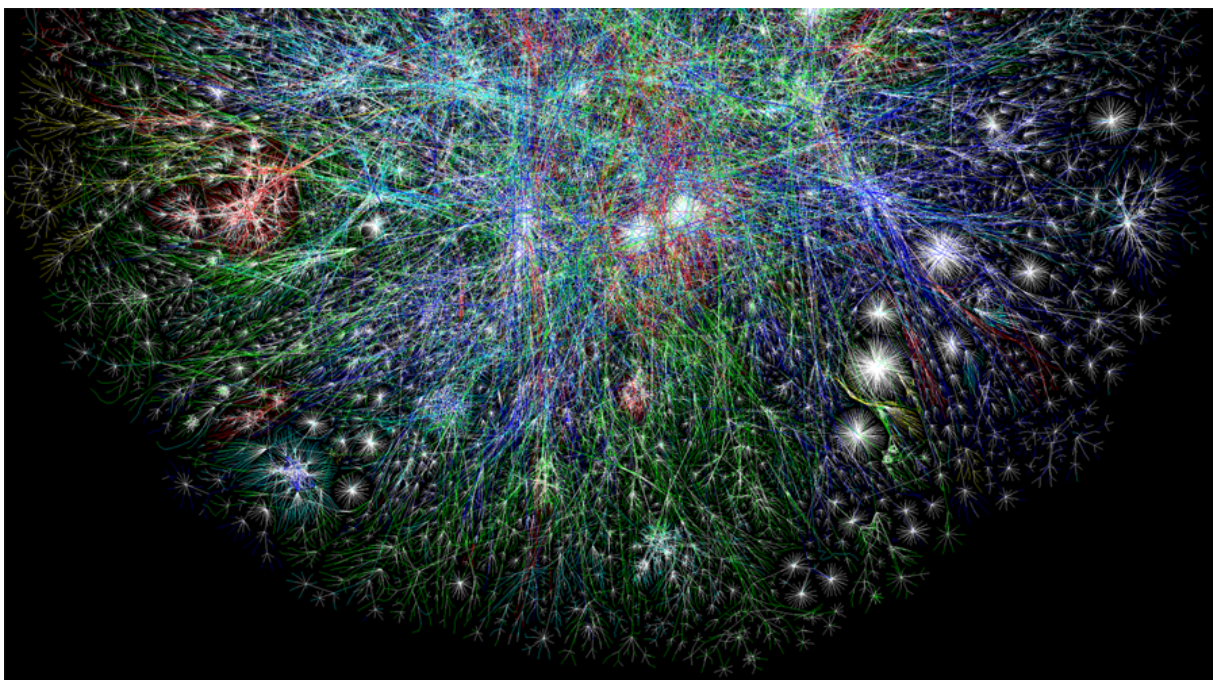
Nasuprot tome, u stanju kroničnog stresa te u bolesnim ili ostarjelim stanicama, dolazi do narušavanja ravnoteže između sve većih potreba za savijanjem i razgradnjom proteina i sve slabijeg kapaciteta proteostatske mreže. Nedostatak funkcionalnih šaperona smanjuje sposobnost savijanja novonastalih proteina, dok oslabljen proteasomski sustav dodatno onemogućuje razgradnju oštećenih struktura (Kim i sur. 2013). Učinkovitost tih sustava postupno opada, što dovodi do nakupljanja oštećenih, oksidiranih i karboniliranih proteina koji mogu narušiti stanične funkcije. Posljedično, dolazi do progresivnog nakupljanja pogrešno savijenih proteina i gubitka sposobnosti stanice da obnovi ravnotežu, što u konačnici dovodi do stanične disfunkcije i doprinosi razvoju različitih bolesti (Hipp i sur. 2019; Labbadia i Morimoto 2015).

1. 4. Protein-protein interakcije - temelj stanične organizacije i signalizacije

Protein-protein interakcije (PPI) čine osnovu gotovo svih bioloških procesa u eukariotskim i prokariotskim organizmima. Selektivnim povezivanjem proteina u funkcionalne komplekse, ove interakcije omogućuju preciznu regulaciju staničnih funkcija, uključujući replikaciju i ekspresiju gena, stanični ciklus, metabolizam, transport, imunološki odgovor i apoptozu (Nooren i Thornton 2003). Većina proteina ne djeluje samostalno, već unutar dinamičnih mreža međusobnih interakcija koje su ključne za pravilno odvijanje staničnih procesa (Slika 4) (Rizzolo i sur. 2017).

Na molekularnoj razini, PPI uključuju širok spektar nekovalentnih interakcija, poput vodikovih veza, hidrofobnih kontakata, ionskih veza i Van der Waalsovih sila. Njihovo uspostavljanje ovisi o točnoj prostornoj orijentaciji i kemijskim svojstvima uključenih aminokiselinskih ostataka. Zbog toga svaka strukturna promjena proteina, uzrokovana mutacijama, denaturacijom ili posttranslacijskim modifikacijama, može narušiti interakcijsku površinu i dovesti do gubitka funkcije (Nooren i Thornton 2003).

PPI mogu biti stabilne, primjerice unutar strukturnih kompleksa poput ribosoma ili proteasoma, ili privremene, kao u slučaju signalnih kaskada, gdje brzina i reverzibilnost interakcije određuju kinetiku staničnog odgovora (Snider i sur. 2015). U kontekstu stanične signalizacije, PPI omogućuju prijenos, pojačavanje i modulaciju signala, a visoka specifičnost i afinitet između partnerskih molekula osiguravaju preciznost odgovora (Yao i sur. 2017).



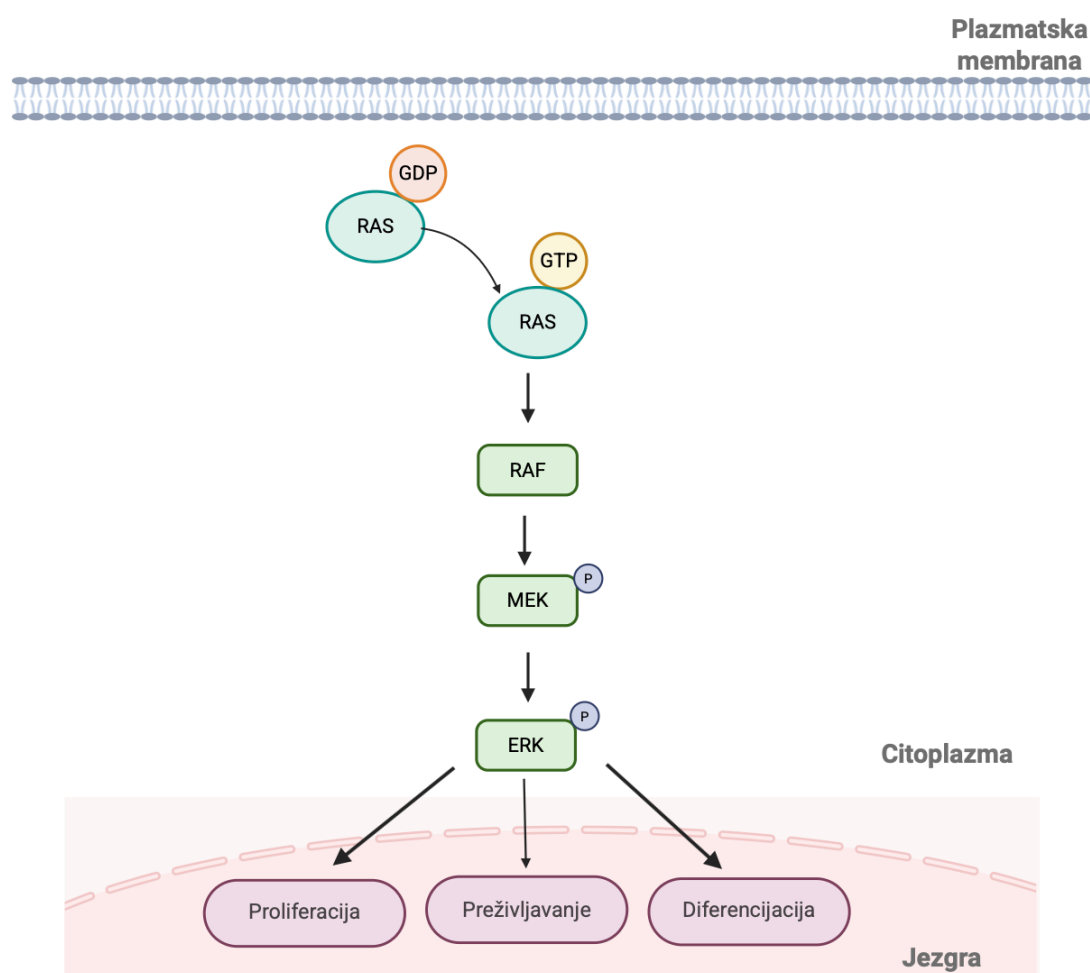
Slika 4. Apstraktna vizualizacija mreže protein–protein interakcija (PPI) u obliku gustog, višebojnog „svemira“ međusobno povezanih čvorišta. Svaki čvor predstavlja protein, a linije između njih prikazuju fizičke ili funkcionalne interakcije. Slika preuzeta s NDEx Project 2024.

Disfunkcija PPI može nastati kao posljedica mutacija, posttranslacijskih modifikacija ili djelovanja vanjskih čimbenika, što ima dalekosežne funkcionalne posljedice. Promjene u afinitetu, stabilnosti ili vremenskom trajanju interakcija mogu dovesti do deregulacije signalnih puteva, narušavanja epigenetske kontrole i patološke aktivacije transkripcijskih faktora. Takvi poremećaji često su povezani s nastankom i progresijom bolesti, uključujući karcinome, neurodegenerativne poremećaje, metaboličke bolesti i infekcije (Lopes i sur. 2015; Scott i sur. 2016).

Posebno je važno razumjeti kako oksidativne modifikacije, poput karbonilacije, utječu na PPI. Karbonilacija mijenja kemijska svojstva bočnih lanaca aminokiselina, uključujući naboj, polarnost i hidrofobnost, što može narušiti komplementarnost interakcijskih površina između proteina (Petrov i Zagrovic 2011). Karbonilacija može uzrokovati promjene u afinitetu vezanja, destabilizaciju proteinskih kompleksa i prekid ključnih regulatornih interakcija, što u patološkim i kronično stresnim stanjima dovodi do fragmentacije signalnih puteva, gubitka regulacijskih funkcija, poremećaja transkripcijske kontrole i razvoja stanične disfunkcije (Nooren i Thornton 2003; Snider i sur. 2015; Rizzolo i sur. 2017; Dalle-Donne i sur. 2006).

Fokus ove disertacije je analiza interakcije između proteina KRAS i Ras-vezajuće domene (RBD) proteina c-RAF. Sljedeće poglavlje donosi detaljniji prikaz strukture i funkcije ovih proteina. U ovom modelnom sustavu istražiti će kako oksidativne modifikacije utječu na interakciju KRAS-c-RAF, s naglaskom na karbonilaciju, promjene stabilnosti kompleksa i promjene afiniteta vezanja. Cilj istraživanja je razjasniti mehanizme putem kojih oksidativni stres može narušiti prijenos signala destabilizacijom molekularnih veza koje sudjeluju u regulaciji KRAS-RAF signalnog puta.

1. 4. 1. Interakcija KRAS – c-RAF

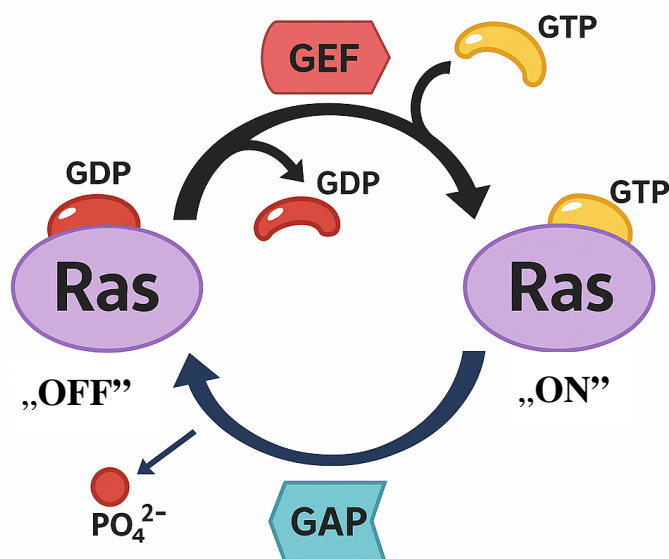


Slika 5. Prikaz signalnog puta RAS–RAF–MAPK(MEK)–ERK koji ilustrira sekvencijalnu aktivaciju kinaza kroz fosforilaciju. Fosforilirani oblici MEK-a i ERK-a označeni su plavim krugovima. ERK se fosforilacijom aktivira, translocira u jezgru i regulira transkripciju te posreduje u rastu, migraciji i diferencijaciji stanice. Slika izrađena pomoću programa BioRender.

Signalni put RAS-RAF-MAPK(MEK)-ERK jedan je od glavnih signalnih mehanizama u eukariotskim stanicama, odgovoran za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije, migracije i preživljenja (Slika 5) (Lavoie i Therrien 2015). Aktivacija ovog signalnog puta započinje djelovanjem malog GTP-vezujućeg proteina KRAS (engl. *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*), koji u svom aktivnom obliku veže RAS-vezujuću domenu (RBD, engl. *Ras-Binding Domain*) serin/treonin-specifične proteinske kinaze RAF (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). To pokreće kaskadu fosforilacija: RAF fosforilira MAPK/ERK kinazu (MEK), MEK fosforilira ERK (izvanstaničnim signalima regulirana kinaza, engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*). ERK potom postaje aktivna, dimerizira i translocira u jezgru, gdje fosforilira različite transkripcijske faktore, regulatorne proteine staničnog ciklusa i enzime povezane s preživljavanjem stanice. Uz to, fosforilirani ERK u citoplazmi modulira brojne signalne proteine, utječući na reorganizaciju citoskeleta, metaboličke procese i intracelularni transport, čime koordinira odgovore stanice na vanjske signale poput proliferacije, diferencijacije i preživljavanja (Guo i sur. 2020).

Na slici 6 prikazan je regulatorni ciklus aktivacije RAS proteina koji čini temeljni mehanizam uključivanja i isključivanja ovog signalnog puta. U neaktivnom („OFF“) stanju RAS je vezan za gvanozin-difosfat (GDP) i ne prenosi signal dalje. Aktivaciju omogućuje faktor za izmjenu gvaninskog nukleotida GEF (engl. *Guanine nucleotide Exchange Factor*), koji katalizira otpuštanje GDP-a i vezanje gvanozin-trifosfata (GTP). Time RAS prelazi u aktivno („ON“) stanje, sposobno za vezanje i aktivaciju efektorskih proteina poput RAF-a. Povratak u neaktivno stanje regulira protein koji aktivira GTP-azu (GAP, engl. *GTPase-activating protein*), GAP stimulira hidrolizu GTP-a u GDP uz oslobađanje anorganskog fosfata (PO_4^{2-}), čime se prekida signalizacija (Wennerberg i sur. 2005).

Ciklička regulacija vezanja i hidrolize gvaninskih nukleotida omogućuje prostorno i vremenski preciznu kontrolu aktivnosti KRAS-a i ostalih članova RAS obitelji, čime se osigurava pravilna regulacija staničnih procesa i sprječava nekontrolirani stanični rast.



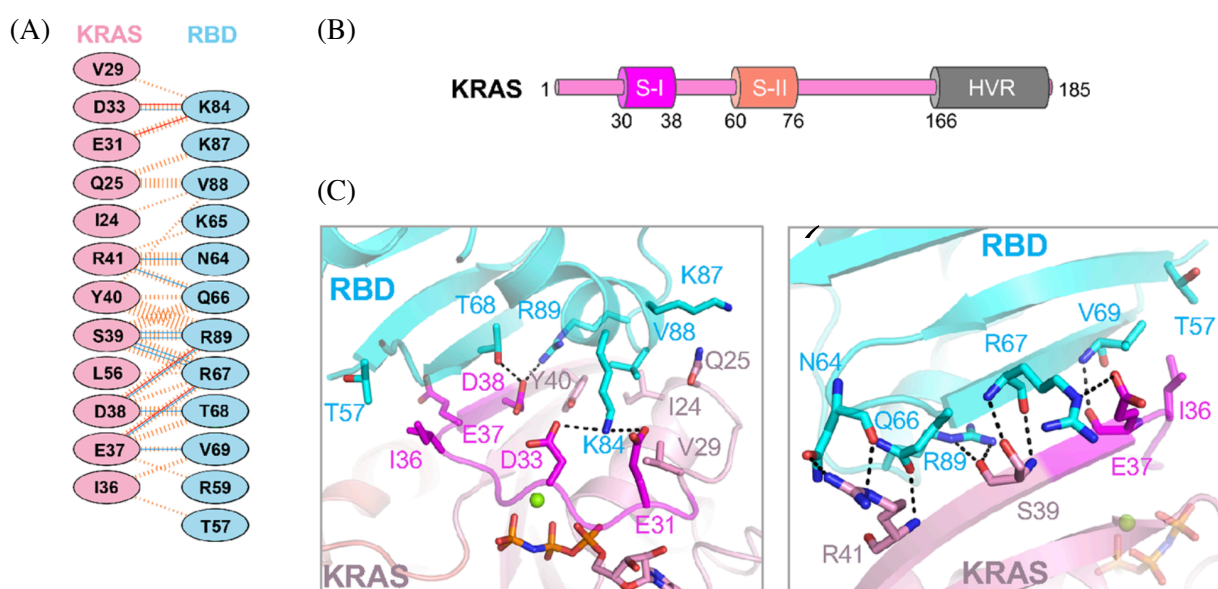
Slika 6. Prikaz regulatornog ciklusa Ras proteina koji djeluje kao molekularni prekidač u prijenosu staničnih signala. U neaktivnom („OFF”) stanju Ras je vezan za GDP, dok aktivaciju („ON”) omogućuje GEF potičući zamjenu GDP-a u GTP. Prilagođeno prema Baines i sur. 2021.

U tumorskoj biologiji, RAS proteini, osobito KRAS, prepoznati su kao jedni od najčešće mutiranih onkogeni. Mutacije u KRAS genu rezultiraju konstitutivno aktivnim KRAS proteinom, koji ostaje trajno u GTP-vezanom stanju (McCormick 2016). Posljedično dolazi do trajne aktivacije signalnih puteva, što potiče nekontrolirani stanični rast i proliferaciju. Aktivirajuće mutacije KRAS-a pronađene su u više od 20 % svih humanih karcinoma, osobito u adenokarcinomima pluća, gušterače i debelog crijeva (Moore i sur. 2020). Interakcija KRAS-a s c-RAF proteinom predstavlja ključni korak u aktivaciji MAPK/ERK signalnog puta, koji regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje (Cseh i sur. 2014). Konkretnije, c-RAF (RAF1) prepoznaje aktivirani, GTP-vezujući oblik KRAS-a putem svoje RBD domene. Kristalografske i NMR studije pokazale su da se interakcija između KRAS-a i RBD domene c-RAF-a odvija kroz specifične interakcijske površine koje obuhvaćaju kombinaciju vodikovih veza, elektrostatskih i hidrofobnih sila (Nassar i sur. 1995; Rajakulendran i sur. 2009) (Slika 7 A).

Strukturno gledano, humana RBD domena c-RAF-a prepoznaje aktivni oblik KRAS-a prvenstveno putem specifičnih interakcija s aminokiselinama smještenima unutar „switch I” regije KRAS-a (ostaci 30–38), ali i dodatnim kontaktima izvan tog segmenta (Slika 7 B). Detaljna analiza kristalnih struktura pokazuje da su za vezanje ključne interakcije između negativno nabijenih ostataka humanog KRAS-a (Asp33, Glu31, Glu37, Asp38) i pozitivno nabijenih ostataka RBD domene (Lys84, Lys87,

Arg89), što rezultira stabilnim elektrostatskim interakcijama (Slika 7 C). Uz to, hidrofilne i hidrofobne interakcije doprinose dodatnoj stabilizaciji kompleksa, na primjer Ile36 i Leu56 iz KRAS-a sudjeluju u interakcijama s Val88 i Arg67 iz c-RAF-a (Slika 7 D).

Interakcija se dodatno stabilizira putem vodikovih veza koje uključuju, između ostalih, Tyr40 i Ser39 iz KRAS-a te Gln66 i Asn64 iz RBD domene. Posebno je značajna pozicija Arg41, koja putem bočnog lanca ostvaruje kontakt s Asn64 i Gln66, doprinoseći preciznom pozicioniranju KRAS-a unutar veznog džepa c-RAF-a (Tran i sur. 2021).



Slika 7. Molekularna interakcija između humanog KRAS-a i RBD domene c-RAF-a. (A) Interakcijska matrica kontaktnih ostataka između KRAS-a (ružičasto) i RBD domene c-RAF-a (plavo), prema analizi PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). Linije prikazuju specifične kontakte (vodikove veze - pune plave linije; ionske veze (solne mostove) - pune crvene linije; nekovalentni kontakti - isprekidane narančaste linije). (B) Shematski prikaz domena KRAS proteina (izoforma KRAS-4B, 1–185). Prikazane su funkcionalne regije važne za interakcije i regulaciju: „switch I” regija (ostaci 30–38, ljubičasto) i „switch II” regija (ostaci 60–76, narančasto), povezane međuregijom („inter-switch”, 38–60). C-terminalno se nalazi hiperpromjenjiva regija (HVR, 166–185, sivo). (C) Detaljan prikaz elektrostatskih i vodikovih veza između negativno nabijenih ostataka KRAS-a (Asp33, Glu31, Glu37, Asp38) i pozitivno nabijenih ostataka c-RAF-a (Lys84, Lys87, Arg89). Interakcije ostataka KRAS-a I36, S39 i R41 s ostacima RBD domene uključujući Gln66, Asn64, Arg89 i Val69. (D) Prostorni odnosi važni za stabilizaciju kompleksa. Struktura prikazuje kako kombinacija ionskih i hidrofobnih interakcija osigurava specifičnost i afinitet vezanja između KRAS-a i c-RAF-a. Slika preuzeta iz Tran i sur. 2021.

Specifičnost i afinitet ovog kompleksa ovise o konformaciji „switch” regija humanog KRAS-a, koje mijenjaju prostorni raspored ovisno o vezanom nukleotidu (GDP ili GTP). GTP-vezujući oblik omogućuje izlaganje ključnih interakcijskih površina, što omogućuje visokoafinitetno vezanje RBD domene. Eksperimentalni podaci pokazuju da mutacije aminokiselina poput Asp33, Glu37 ili Arg41, kao i u Lys84 ili Arg89 na strani c-RAF-a, značajno smanjuju stabilnost kompleksa i mogu dovesti do poremećaja prijenosa signala kroz put MAPK/ERK (Smith i Ikura 2014; Nassar i sur. 1995).

S obzirom na finu prostornu organizaciju, prirodu aminokiselina uključenih u kontakte između dvaju proteina te osjetljivost na promjene u mikrokolišu, interakcija c-RAF/KRAS podložna je narušavanju uslijed oksidativnih modifikacija. Karbonilacija, kao nepovratna oksidativna modifikacija proteinskih bočnih lanaca, može se dogoditi upravo na ključnim aminokiselinama uključenima u interakciju, poput lizinskih i argininskih ostataka ili onima važnim za strukturnu stabilnost proteina. U tom slučaju moguće je da će doći do narušavanja afiniteta vezanja c-RAF-a i KRAS-a, i čime se funkcionalnost cijelog signalnog puta dovodi u pitanje (Petrov i Zagrovic 2011; Stadtman i Levine 2003).

U okviru ovog istraživanja, interakcija RBD/KRAS koristi se kao model za ispitivanje učinka oksidacije na protein-protein interakcije u visoko reguliranom signalnom sustavu. Cilj je razumjeti kako oksidacija inducirana UV-zračenjem odnosno karbonilacija specifičnih aminokiselinskih ostataka u c-RAF-u i KRAS-u, utječe na njihovu sposobnost međusobnog vezanja. Osim eksperimentalne analize, dodatnu dimenziju istraživanja čini molekularno modeliranje interakcijske površine s ciljem identificiranja strukturnih promjena koje uzrokuju gubitak funkcionalne interakcije.

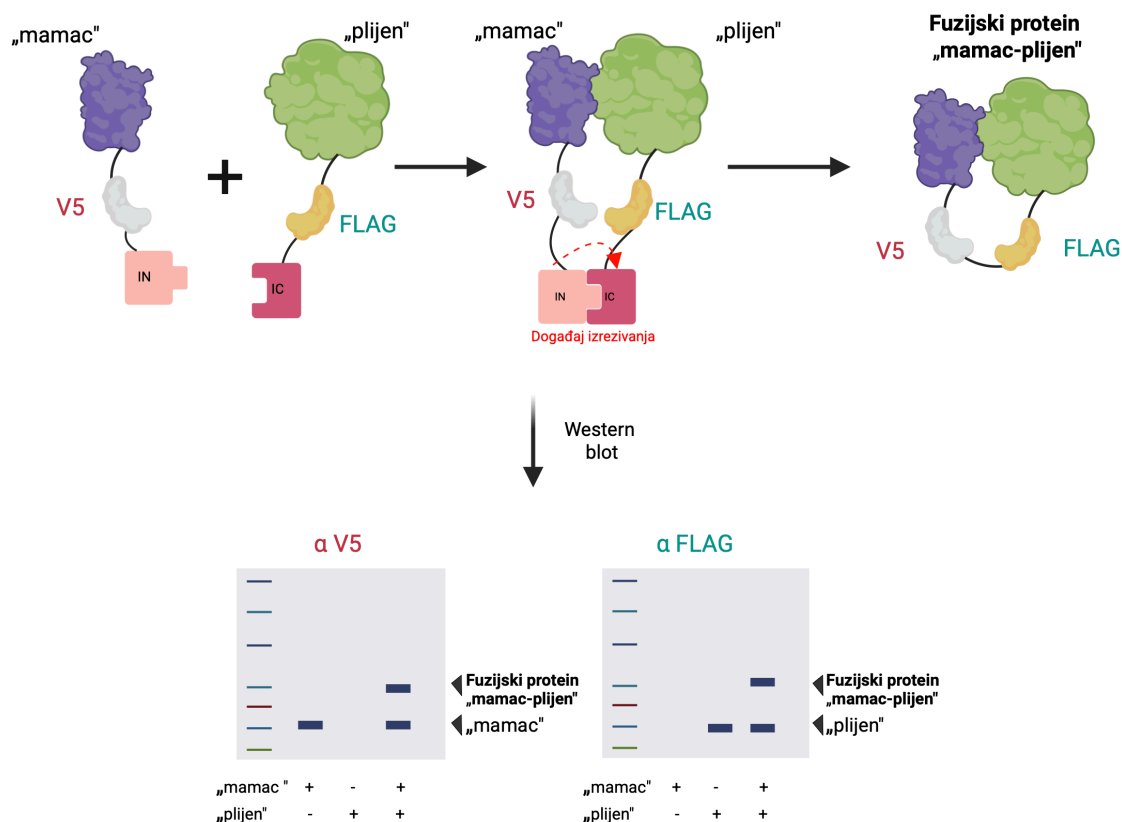
1.4.2. Metoda *Split Intein-Mediated Protein Ligation* (SIMPL)

Za analizu utjecaja oksidativnog stresa na protein-protein interakcije u ovom radu korištena je biokemijska tehnika razvijena za kvantitativno praćenje fizičke interakcije između dva proteina u stanicama tj. metoda *Split Intein-Mediated Protein Ligation* (SIMPL) (Yao i sur. 2020). Metoda uz kvantitativno praćenje, omogućuje i vrlo specifičnu validaciju interakcija između ciljanih proteina, čak i kada su one slabe ili prolazne. Osim toga, SIMPL se pokazala otpornom na varijabilnosti eksperimentalnih

uvjeta, što je čini prikladnom za pouzdanu usporedbu interakcijskih profila u različitim stanjima, uključujući i uvjete oksidativnog stresa.

SIMPL metoda temelji se na upotrebi cijepajućih inteina. Inteini su proteinski segmenti koji imaju mogućnost samoizrezivanja i rekonstrukcije peptidne veze, pri čemu nisu potrebni dodatni kofaktori ili enzimi (Noren i sur. 2000; Paulus 2001). Ovo svojstvo inteina koristi se u SIMPL sustavu, na način da je protein od interesa tzv. „mamac” spojen na N-terminalni fragment inteina (IN), dok je partnerski protein „plijen” spojen na C-terminalni fragment inteina (IC). Kada „mamac” i „plijen” stupe u fizičku interakciju, IN i IC fragmenti inteina dolaze u bliski kontakt, što omogućuje njihovo spajanje i formiranje funkcionalnog inteina. Nakon toga dolazi do samoizrezivanja rekonstruiranog inteina i direktnog kovalentnog povezivanja proteina „mamca” i „plijena” u jedinstveni fuzijski produkt (Slika 8). Ovaj produkt se zatim može detektirati standardnim metodama, poput Western blot analize, korištenjem epitopskih biljega (npr. FLAG, V5) specifičnih za svaki od uključenih proteina (Yao i sur. 2020). Prednosti SIMPL metode uključuju visoku osjetljivost, mogućnost primjene u staničnim uvjetima te kompatibilnost s drugim biokemijskim tehnikama, poput imunoprecipitacije i spektrometrije masa.

U ovom radu korištena je SIMPL metoda za analizu protein-protein interakcije između RBD domene c-RAF proteina i KRAS-a kako bi se ispitaio utjecaj oksidacije inducirane UV-zračenjem. SIMPL metoda uobičajeno uključuje kotransfekciju stanica plazmidima za ekspresiju proteina od interesa, kako bi se formirao fuzijski protein „mamac-plijen” (Yao i sur. 2020). Budući da je nakon uspostavljanja interakcije i nastanka fuzijskog proteina taj proces funkcionalno ireverzibilan, primjena standardne metode u intaktnim stanicama zapravo bi odražavala oštećenje već formiranog fuzijskog proteina, a ne sam proces interakcije između proteina od interesa. Navedena stavka je zahtjevala izmjenu standardne metode koja bi omogućila specifično ispitivanje izravnog učinka oksidativnog stresa na protein-protein interakcije. Metoda je korištena za kvantifikaciju gubitka interakcije između c-RAF i KRAS uslijed UV-zračenja, pri čemu je moguće povezati razinu karbonilacije s promjenama u afinitetu i stabilnosti kompleksa. Ovaj pristup omogućio je detaljno proučavanje kako oksidativne modifikacije utječu na funkcionalnost specifičnih PPI u fiziološki relevantnim modelima.



Slika 8. Shema prikazuje eksperimentalni princip za detekciju PPI korištenjem metode zasnovane na proteinskom spajanju uz pomoć inteina metodom SIMPL. Proteini „mamac” i „plijen” pojedinačno su povezani s fragmentima inteina (IN i IC), kao i s oznakama V5 (za mamac) i FLAG (za plijen). Kada „mamac” i „plijen” stupe u međusobnu interakciju, dolazi do približavanja fragmenata inteina i rekonstrukcije funkcionalnog inteina što pokreće reakciju izrezivanja. Rezultat tog događaja je stvaranje fuzijskog proteina „mamac-plijen”. Detekcija fuzijskog proteina provodi se Western blot metodom korištenjem protutijela na V5 i FLAG oznake. Pojava dodatne vrpce više molekulske mase na oba blota potvrđuje interakciju između ispitivanih proteina. Crtež izrađen pomoću programa Biorender.

1.5. Karbonilirani proteini kao biomarkeri oksidativnog stresa i starenja

U kontekstu biomedicinskih istraživanja, sve veći interes usmjeren je na identifikaciju pouzdanih biomolekularnih markera kronične izloženosti oksidativnom stresu. Među najperspektivnijim kandidatima ističu se karbonilirani proteini, čija se razina s vremenom povećava u različitim stanjima fiziološkog i patološkog starenja (Dalle-Donne i sur. 2003; Levine i Stadtman 2021; Stadtman i Levine 2000). Kako je ranije opisano, karbonilacija je ireverzibilna, neenzimska modifikacija proteina koja ne podliježe povratnom kemijskom uklanjanju karbonilne skupine niti staničnim

mehanizmima popravka koji bi omogućili selektivno uklanjanje oštećenja i obnovu izvorne strukture proteina. Umjesto toga, karbonilirani proteini akumuliraju se tijekom života u organizmu i uklanjaju isključivo putem proteolitičke razgradnje (Stadtman i Levine 2003; Suzuki i sur. 2010). Zbog svoje kemijske stabilnosti, karbonilne skupine se zadržavaju i u izvanstaničnim tekućinama poput plazme, što omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju u uzorcima krvi (Levine 2002; Weber i sur. 2015). Zbog tih svojstava, karbonilirani proteini predstavljaju potencijalne biomarkere ukupnog oksidativnog statusa organizma, osobito u kontekstu starenja te kroničnih i degenerativnih bolesti.

Brojna istraživanja pokazala su povišene razine karboniliranih proteina u plazmi osoba starije dobi, kao i u bolesnika s neurodegenerativnim i kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom tipa 2, kroničnim upalnim stanjima i malignim bolestima (Dalle-Donne i sur. 2006; Radman 2020). Skup svih karboniliranih proteina u organizmu, poznat kao „karbonilom”, sve se češće prepoznaje kao vrijedan izvor klinički relevantnih informacija (Delobel i sur. 2016). Posebno je važna njegova prisutnost u plazmi, jer plazmatski karbonilom odražava globalno stanje oksidativnog stresa u organizmu i može se relativno jednostavno analizirati zbog dostupnosti uzoraka u kliničkoj praksi.

Unatoč navedenim prednostima, šira primjena karboniliranih proteina kao biomarkera još je uvijek ograničena zbog brojnih metodoloških izazova. Zbog toga je razvoj novih, visokoosjetljivih i robusnih metoda za detekciju karbonilacije, osobito u plazmi, ključan korak prema standardizaciji mjerenja i mogućoj translaciji u kliničku praksu.

1.5.1. Problemi u postojećim metodama detekcije karbonilacije

Unatoč rastućem interesu za karbonilirane proteine kao biomarkere oksidativnog stresa, njihova pouzdana detekcija u složenim biološkim uzorcima i dalje predstavlja značajan tehnički izazov. Tradicionalne metode detekcije karbonilnih skupina temelje se na njihovoj derivatizaciji 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), nakon čega slijedi spektrofotometrijska, Western blot ili ELISA analiza (Dalle-Donne i sur. 2003). Iako su ove metode relativno jednostavne i široko dostupne, imaju brojna ograničenja, uključujući nisku osjetljivost, slabiju specifičnost, nemogućnost razlučivanja pojedinačnih karboniliranih proteina te visoku varijabilnost među eksperimentima (Rogowska-Wrzesinska i sur. 2014; Weber i sur. 2015). Dodatna poteškoća metoda baziranih na korištenju DNPH javlja se pri analizi složenih uzoraka, poput plazme (Cadenas-Garrido i sur. 2024; Yan i sur. 2011). Visoka zastupljenost pojedinih

proteina, kao i prisutnost drugih karboniliranih metabolita, mogu interferirati s derivatizacijom i dovesti do lažno pozitivnih ili nepreciznih rezultata (Dalle-Donne i sur. 2003; Levine i sur. 1990). Osim toga, derivatizacija DNPH-om nije kompatibilna s kasnijom primjenom spektrometrije masa, čime se ograničava mogućnost identifikacije specifičnih karboniliranih proteina (Madian i Regnier 2010).

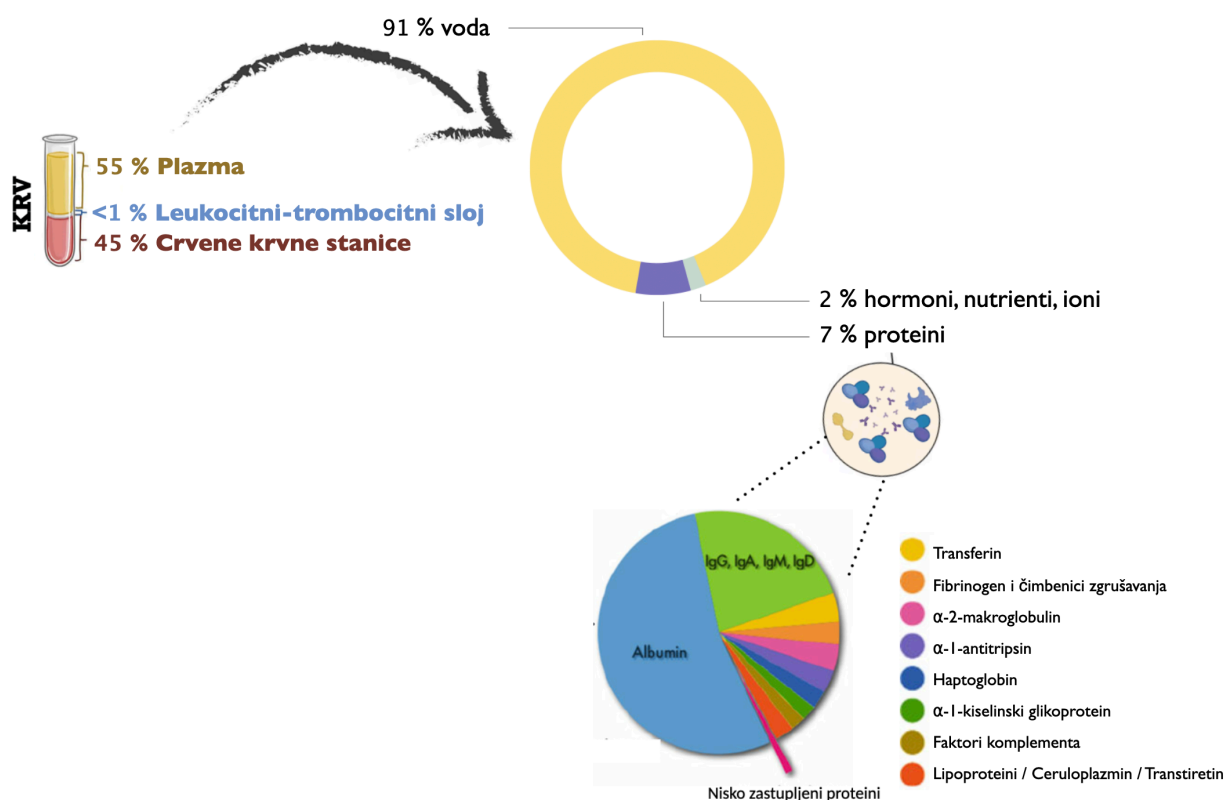
Zbog navedenih nedostataka, razvijene su alternativne metode koje se temelje na detekciji karbonilnih skupina pomoću fluorescentno obilježenih aminooksidnih sonda (Levine i sur 2000; Yan i sur. 2011). Ove sonde selektivno reagiraju s karbonilnim skupinama formirajući stabilne oksime, pri čemu fluorescentna oznaka omogućuje osjetljivu i kvantitativnu detekciju karboniliranih proteina pomoću fluorescentne elektroforeze, konfokalne mikroskopije ili spektrofluorimetrije (Bhattacharya i sur. 2011). U usporedbi s DNPH metodom, pristupi temeljeni na aminooksidnim sondama pokazuju veću osjetljivost i bolju kompatibilnost sa spektrometrijom masa (Ladouce i sur. 2023).

Ipak, njihova primjena još nije u potpunosti standardizirana, a protokoli često zahtijevaju dodatne korake optimizacije, ovisno o vrsti biološkog uzorka. Stoga i dalje postoji izražena potreba za razvojem visoko osjetljive, reproduktivne i analitički kompatibilne metode za kvantitativnu analizu karboniliranih proteina, osobito u složenim uzorcima poput plazme.

1.5.2. Specifičnosti plazme kao biološkog uzorka

Ljudska krvna plazma jedna je od najčešće korištenih bioloških tekućina u dijagnostici i istraživačkom radu, ponajviše zbog jednostavnosti i neinvazivnosti prikupljanja. Osim toga, omogućuje serijsku analizu, što znači da se od istog ispitanika mogu uzimati višestruki uzorci tijekom vremena kako bi se pratila dinamika biokemijskih markera, procjena terapijskog učinka ili progresije bolesti, bez potrebe za invazivnim zahvatima. Takav pristup pruža vrijedne informacije o promjenama u stanju organizma i osigurava veću preciznost u kvantitativnim i kvalitativnim studijama. Komponente plazme potječu iz različitih tkiva i organa te time odražavaju homeostatsko stanje organizma (Malmström i sur. 2016). Upravo zbog toga, plazma je ključna za analizu potencijalnih biomarkera koji odražavaju promjene u cijelom organizmu, uključujući i one povezane s oksidativnim stresom i starenjem (Anderson i Anderson 2002; Tu i sur. 2010).

Krvna plazma je kompleksna biološka tekućina koja čini približno 55 % ukupnog volumena krvi (Guyton i Hall 2021; Kumar i sur. 2017). Sastoji se pretežno od vode (oko 91 %), dok preostalih 9 % čine otopljeni elektroliti, metaboliti, plinovi (uglavnom kisik, ugljični dioksid i dušik), hormoni i proteini (oko 7 %), među kojima su i brojni enzimi te proteinski hormoni. Nadalje, studije su pokazale da oko 99 % ukupne proteinske mase u plazmi otpada na 22 najzastupljenija proteina, dok stotine ostalih, prisutnih u znatno manjim koncentracijama (ispod 1 µg/mL), čine preostalih ~1 % (Slika 9) (Geyer i sur. 2016; Geyer i sur. 2019). Nisko zastupljeni (engl. *low-abundance*) proteini uključuju citokine, peptide, hormone, enzime te druge signalne molekule, koje su unatoč niskoj koncentraciji iznimno važne za patofiziologiju jer predstavljaju potencijalne biomarkere za ranu dijagnostiku bolesti.



Slika 9. Grafički prikaz sastava krvi s naglaskom na plazmatske proteine. Lijeva strana prikazuje udio glavnih komponenti krvi. Desno je prikazan sastav plazmatskih proteina u obliku kružnog dijagrama. Prilagođeno prema Tu i sur. 2010.

Analiza proteinskog sastava plazme tehnički je izazovna zbog izrazito širokog dinamičkog raspona koncentracija, jer proteini poput albumina (HSA) i imunoglobulina G (IgG) čine više od 90 % ukupnog proteinskog sadržaja i time maskiraju prisutnost biološki značajnih, ali nisko zastupljenih komponenti (Metatla i sur. 2024). Zbog toga se u analitičkom pristupu često primjenjuju strategije deplecije i frakcioniranja visoko zastupljenih proteina (Tu i sur. 2010; Lee i sur. 2020). Posebno je važno istaknuti da se razlike u razini oksidativnih modifikacija, poput karbonilacije, često skrivaju upravo unutar nisko zastupljenih proteina, što dodatno naglašava potrebu za osjetljivim i ciljanim metodama detekcije (Geyer i sur. 2019).

Uočeno je da karbonilacija specifičnih plazmatskih proteina, poput haptoglobina, HSA ili fibrinogena, može odražavati oksidativni status organizma i potencijalno poslužiti kao biomarker bolesti (Dalle-Donne i sur. 2006; Levine i sur. 1994). Osim patoloških stanja, promjene u razini karboniliranih proteina zabilježene su i u kontekstu fizioloških izazova, poput intenzivne tjelesne aktivnosti ili starenja, što dodatno potvrđuje osjetljivost plazmatskog proteoma na oksidativna oštećenja (Stadtman i Levine 2003). Sustavna identifikacija karboniliranih proteina u plazmi otvara mogućnost razumijevanja mehanizama oštećenja u cirkulaciji, kao i razvoja neinvazivnih dijagnostičkih alata za detekciju oksidativnog stresa.

Plazma ostaje ključni biološki uzorak za translacijsku primjenu analitičkih metoda razvijenih u istraživačkom okruženju, unatoč izazovima povezanim s njenom kompleksnošću. Uspješno kvantificiranje karboniliranih proteina u plazmi, uz odgovarajuće uklanjanje ometajućih komponenti i optimizaciju derivatizacijskih protokola, otvara mogućnost dugoročnog praćenja oksidativnih promjena u populacijskim i kliničkim studijama, uključujući biobanke i kohorte usmjerene na starenje.

1.5.3. Biobanka „10 001 Dalmatinac”

Za pouzdanu analizu bioloških markera, osobito onih koji se istražuju u kompleksnim uzorcima poput ljudske plazme, od iznimne je važnosti osigurati visokokvalitetne, standardizirano prikupljene i klinički karakterizirane uzorke. U tom kontekstu, biobanka predstavlja iznimno vrijedan infrastrukturni resurs koji omogućuje provođenje populacijski utemeljenih translacijskih istraživanja s visokim stupnjem znanstvene i kliničke relevantnosti.

Projekt „10 001 Dalmatinac” pokrenut je kao nacionalna biobanka s ciljem prikupljanja i dugoročne pohrane bioloških uzoraka te pripadajućih fenotipskih podataka

više tisuća dobrovoljaca iz područja Dalmacije (Rudan i sur. 2009). Biobanka obuhvaća genetski izolirane otočne i priobalne populacije, čija manja genetska heterogenost povećava statističku snagu za otkrivanje povezanosti između genotipskih varijanti i fenotipskih obilježja, uključujući biomarkere starenja (Rudan i sur. 2009; Vitart i sur. 2006). Sudionici projekta prošli su detaljnu kliničku karakterizaciju koja je uključivala kompletnu krvnu sliku, biokemijske parametre, elektro-kardiografiju (EKG), spirometriju, mjerenje arterijskog tlaka te procjenu vaskularne funkcije. Uzorci plazme i seruma prikupljeni su pod strogo standardiziranim protokolima, procesirani unutar definiranog vremenskog okvira, i pohranjeni na -80 °C u obliku višestrukih alikvota, čime je omogućena jednokratna serijska analiza bez dodatnih ciklusa smrzavanja i otapanja. Zahvaljujući tom visokom standardu obrade i pohrane, projekt osigurava kontrolu interindividualne varijabilnosti, visoku pouzdanost i ponovljivost mjerenja, te potencijal za buduće longitudinalno praćenje biomarkera starenja.

U ovoj disertaciji materijal iz biobanke „10 001 Dalmatinac” koristi se za optimizaciju metode dvodimenzionalne diferencijalne gel-elektroforeze (2D-DIGE) u detekciji karbonilacije proteina u plazmi. Razvoj takve metode povećava reproducibilnost i pouzdanost dobivenih rezultata u analizi plazme. Takav pristup može doprinijeti boljem razumijevanju procesa starenja te poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja biomarkera povezanih s oksidativnim stresom.

1.5.4. Eksperimentalni pristup kvantifikaciji karbonilacije u ljudskoj plazmi: razvoj i optimizacija 2D-OxiDIGE metode

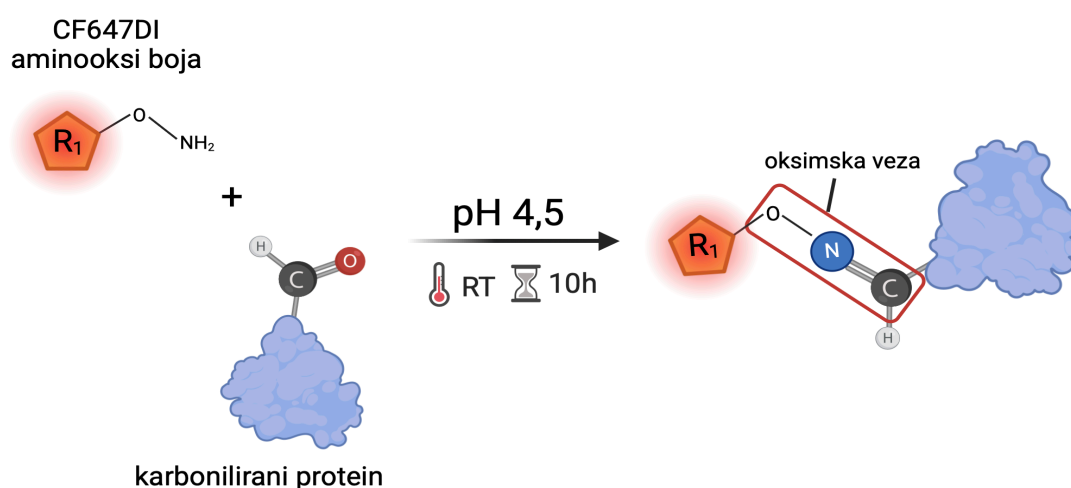
U sklopu ove disertacije razvijat će se i optimizirati metoda analize proteoma temeljena na kombinaciji selektivnog označavanja karbonilnih skupina fluorescentnim aminooksidnim reagensom i dvodimenzionalne diferencijalne gel-elektroforeze (2D-OxiDIGE) (Alban i sur. 2003). Ova metoda omogućuje istodobno odvajanje i kvantitativnu usporedbu više proteina unutar istog gela korištenjem različitih fluorescentnih boja, čime se značajno smanjuje tehnička varijabilnost i povećava osjetljivost detekcije (Ünlü i sur. 1997).

U klasičnoj 2D-DIGE metodi za označavanja proteina često se koriste fluorescentne boje poput Cy2, Cy3 i Cy5, kao i boje Alexa Fluor®, zbog njihove visoke fotostabilnosti i kompatibilnosti s laserskim skenerima (Wheelock i sur. 2006). Te boje su prilagođene za selektivnu reakciju s primarnim aminima u proteinima, i omogućuju

učinkovito označavanje bez potrebe za redukcijom disulfidnih veza i bez povećanja pozadinske fluorescencije zbog nespecifičnih elektrostatskih interakcija (Baraibar i sur. 2014; Mackintosh i sur. 2003; Tamarit i sur. 2012).

Kako bi se dodatno poboljšala specifičnost označavanja i kvaliteta fluorescentne analize u složenim biološkim uzorcima, razvijene su CF® boje nove generacije, među kojima se nalazi i CF647DI aminooksidi boja (Biotium 2021). Ove boje zadržavaju visoku fotostabilnost i fluorescentnu osjetljivost, ali su kemijski dizajnirane bez polarnih nabijenih skupina poput sulfonata, što rezultira smanjenom nespecifičnom interakcijom s proteinima i nižom pozadinskom fluorescencijom (Biotium 2021). Takav sastav omogućuje bolji omjer signal/šum u složenim uzorcima poput staničnih ekstrakata i krvne plazme.

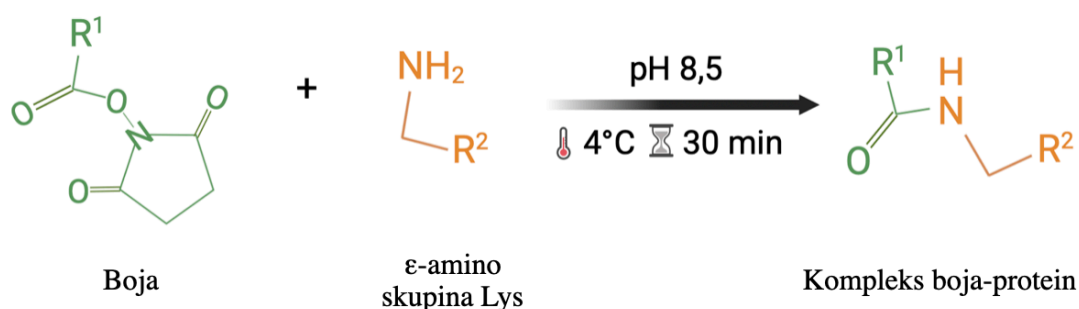
U ovom istraživanju, Cy5 boja koja se koristi u standardnoj 2D-DIGE metodi zamijenjena je CF647DI aminooksidi bojom kako bi se omogućilo selektivno označavanje karboniliranih proteina. CF647DI aminooksidi boja sadrži aminooksidi funkcijsku skupinu koja selektivno reagira s karbonilnim skupinama (aldehidima i ketonima) stvarajući stabilnu oksimsku vezu (Slika 10). Ovaj pristup omogućuje vrlo specifično i osjetljivo označavanje oksidiranih proteina, uz minimalno označavanje nativnih, nekarboniliranih molekula (Baraibar i sur. 2012; Biotium 2021).



Slika 10. Kemijska reakcija vezanja CF647DI aminooksidne boje na karbonilirani protein putem formiranja oksimske veze. Ilustracija izrađena pomoću programa Biorender.

Za razliku od tradicionalnih DNPH-baziranih metoda, koje su često nekompatibilne sa spektrometrijom masa, CF647DI aminooksi boja omogućuje izravnu identifikaciju označenih karboniliranih proteina u kasnijim fazama analize.

Osim CF647DI aminooksi boje, koja se koristi za selektivnu detekciju karboniliranih proteina, koriste se i boje Cy3 i Cy2 koje se standardno upotrebljavaju u metodi 2D-DIGE. Obje boje kovalentno se vežu za ϵ -amino skupine lizinskih ostataka (Slika 11), a zbog svoje identične veličine i jednakog pozitivnog naboja (+1), ne utječu na migraciju proteina tijekom elektroforeze. Osim toga, Cy3 i Cy2 boje stabilne su u širokom rasponu pH vrijednosti, što je važno za očuvanje intenziteta fluorescentnog signala tijekom elektroforetskih i naknadnih analiza (Mujumdar i sur. 1993). Cy3 i Cy2 fluoresciraju pri različitim valnim duljinama, što omogućuje njihovu paralelnu detekciju bez međusobnog preklapanja signala. Visoka fotostabilnost ovih boja dodatno osigurava pouzdano skeniranje i analizu fluorescentnog signala (Minden 2007; Lumiprobe 2024).



Slika 11. Reakcija vezanja Cy boje na ϵ -amino skupinu lizinskog ostatka putem NHS-estera. Ilustracija izrađena pomoću programa Biorender.

Boja Cy3 koristi se za obilježavanje ukupnih proteina u svakom pojedinačnom uzorku, što omogućuje analizu promjena u njihovoj ukupnoj ekspresiji (Foth i sur. 2008). U ovom radu koristit će se termin „ekspresija proteina” u kontekstu 2D-OxiDIGE analize plazme. Iako se ne radi o genskoj ekspresiji, već o relativnoj zastupljenosti proteina u plazmi, uobičajena praksa u proteomskim studijama koristi upravo taj termin za opis

promjena u intenzitetu točaka (Kakisaka i sur. 2007, Clement i sur. 2012, Kolialexi i sur. 2011, Zhou i sur. 2024). S druge strane, Cy2 se koristi za označavanje unutarnjeg standarda, koji se sastoji od jednakih količina proteina iz svih uspoređivanih uzoraka (Foth i sur. 2008). Taj zajednički standard se aplicira na svaki gel paralelno s uzorcima, što omogućuje normalizaciju podataka i korekciju tehničke varijabilnosti između gelova.

Nakon razdvajanja proteina u prvoj dimenziji koristeći izoelektrično fokusiranje (IEF), te drugoj dimenziji gdje se razdvajaju prema relativnoj molekularnoj masi primjenom SDS-poliakrilamidne gel-elektroforeze (SDS-PAGE), gelovi se skeniraju na odgovarajućim valnim duljinama što omogućuje istodobnu analizu razina ekspresije i karbonilacije proteina (Tannu i sur. 2006; Marouga i sur. 2005).

Dobiveni fluorescentni signali kvantificiraju se pomoću programskih alata za denzitometrijsku analizu, čime se identificiraju proteini s diferencijalnom ekspresijom i/ili promjenama u razini karbonilacije između uspoređivanih uzoraka.

1.6. Cilj i temeljne hipoteze istraživanja

Cilj ovog doktorskog istraživanja je ispitati učinak karbonilacije proteina, na strukturu i funkciju proteina kroz dva komplementarna eksperimentalna pristupa. Prvi dio rada usmjeren je na analizu utjecaja karbonilacije na stabilnost i afinitet interakcija c-RAF/KRAS.

Drugi dio rada fokusiran je na optimizaciju i validaciju pouzdane proteomske metode za kvantitativno određivanje karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi, s ciljem identifikacije fiziološkog stanja organizma. U tu svrhu koristit će se uzorci iz biobanke „10 001 Dalmatinac”.

Temeljne hipoteze:

- Hipoteza 1: Oksidativni stres, induciran UV-zračenjem, dovodi do karbonilacije specifičnih aminokiselinskih ostataka u proteinima c-RAF (RBD) i KRAS, što narušava njihovu međusobnu interakciju.
- Hipoteza 2: Razvijena metoda 2D-OxiDIGE temeljena na 2D-DIGE i aminooksidnom označavanju omogućuje preciznu i ponovljivu kvantifikaciju specifičnih karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi.

II. Metode

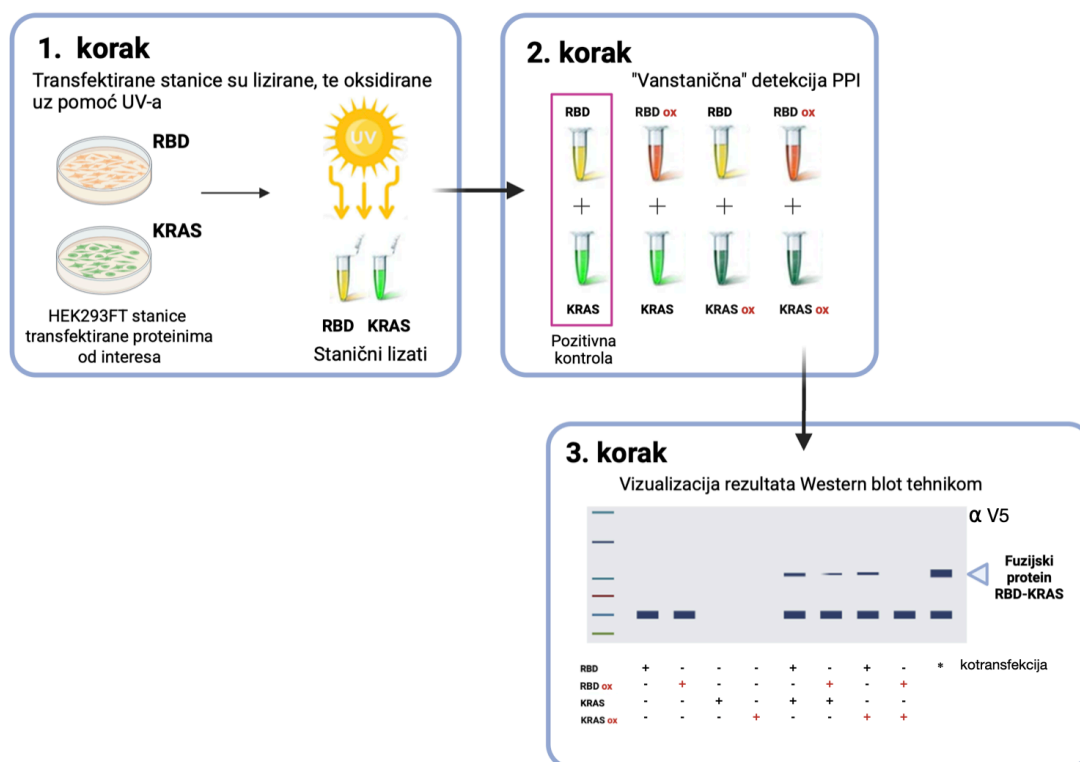
2.1. Ispitivanje utjecaja oksidacijskog stresa na interakciju RBD/c-RAF i KRAS proteina

Učinak oksidacijskog stresa istražen je na modelu interakcije RBD/c-RAF i KRAS pomoću modificirane metode SIMPL. Standardna SIMPL metoda uključuje kotransfekciju stanica plazmidima za ekspresiju oba proteina od interesa, čime se formira funkcionalno ireverzibilan fuzijski protein „mamac-plijen“ (Yao i sur. 2020). Primjena standardne metode u uvjetima oksidacijskog stresa u intaktnim stanicama bi odražavala oštećenje već formiranog fuzijskog proteina, a ne sam učinak oksidacije na interakciju. Osim toga, stanični antioksidativni mehanizmi mogli bi zamaskirati specifični odgovor protein-protein interakcije na oksidacijski stres. Da bi se to izbjeglo, miješali smo stanične lizate HEK293FT stanica nakon transfekcije samo jednim plazmidom, čime je omogućena protein-protein interakcija, koju smo u našim uvjetima nazvali „vanstanična“ interakcija. Ovaj pristup omogućuje preciznije razlučivanje učinka oksidacije na dinamiku protein-protein interakcija.

Da bismo dobili odgovor na pitanje kako oksidacijsko oštećenje utječe na protein-protein interakciju RBD i KRAS, ispitane su sve relevantne kombinacije, odnosno njihovih oksidacijom oštećenih varijanti (RBD ox i KRAS ox):

- RBD + KRAS (kontrola za proteinsku interakciju u uvjetima eksperimenta)
- RBD ox + KRAS (ispituje utjecaj oksidacijskog oštećenja RBD na proteinsku interakciju)
- RBD + KRAS ox (ispituje utjecaj oksidacijskog oštećenja KRAS na proteinsku interakciju)
- RBD ox + KRAS ox (ispituje proteinsku interakciju u uvjetima oksidacijskog oštećenja oba proteina)

Kao dodatna pozitivna kontrola za interakciju RBD i KRAS unutar stanice, služio je uzorak ukupnih staničnih proteina HEK293FT kotransfektiranih s oba plazmidna konstrukta. Za RBD protein očekuje se detekcija vrpce na molekularnoj masi od približno 30 kDa, dok se za fuzijski produkt RBD-KRAS predviđa veličina oko 73 kDa (Slika 12).

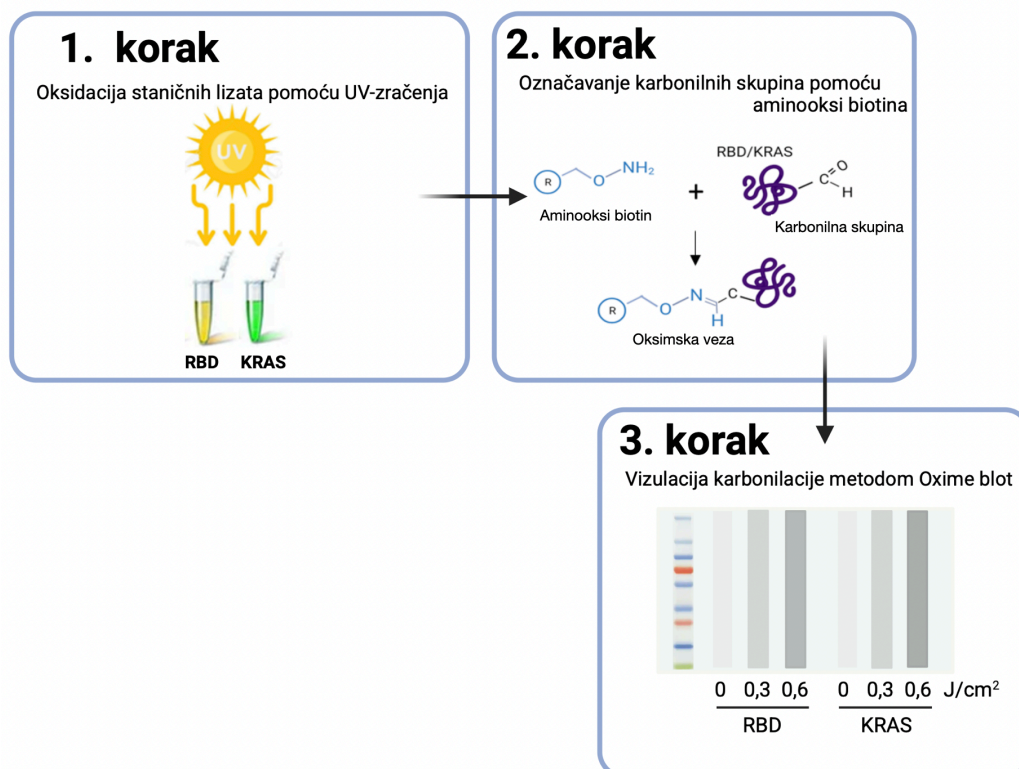


Slika 12. Eksperimentalni dizajn ispitivanja utjecaja oksidacijskog oštećenja izazvanog UV-zračenjem na interakciju RBD-KRAS. Slika je izrađena u programu BioRender.

Kako bismo istražili utjecaj UV-zračenja na oksidativno oštećenje proteina RBD i KRAS, korištena je metoda Oxime blot, koja omogućuje detekciju karbonilacije proteina kao pokazatelja oksidativnog stresa (Ladouce i sur., 2023).

Stanični lizati su derivatizirani s aminooksibiotinom, a zatim je provedena western blot analiza u kojem je biotinski biljeg detektiran uz pomoć streptavidina-HRP-a (Slika 13).

Detekcija oksidativnih oštećenja RBD i KRAS proteina provedena je sljedećim korakom eksperimenta, primjenom imunoprecipitacije i spektrometrije masa, što je omogućilo preciznu identifikaciju modificiranih rezidua na KRAS proteinu. Završni korak uključivao je primjenu molekulskog modeliranja kako bi se identificirao utjecaj oksidativnih promjena na KRAS proteinu na interakciju RBD-KRAS.



Slika 13. Eksperimentalni postupak detekcije karboniliranih proteina u staničnim lizatima Oxime blot analizom, izrađen pomoću programa BioRender.

2.1.1. Transfekcija stanica

Za ispitivanje interakcije između proteina RBD i KRAS korišten je sustav temeljen na pocijepanom inteinu GP41-1. Plazmidi korišteni u ovom eksperimentu su donirani od laboratorija prof. Štagljara (University of Toronto, Toronto, Kanada) te su konstruirani tako da omogućuju rekonstrukciju inteina isključivo u slučaju međusobne interakcije fuzijskih partnera. Jedan plazmid kodira KRAS protein s FLAG biljekom i C-terminalnim fragmentom inteina, dok drugi plazmid kodira RBD protein s V5 biljekom i N-terminalnim fragmentom inteina (Slika 8). Stanice HEK293FT donirane su od grupe dr. sc. Katarine Trajković (Mediterranski institut za istraživanje života, Split, Hrvatska) te su zasađene u šesterodijelne ploče. Stanice su izbrojene uz pomoć Luna-III automatskog brojača stanica (Labtech, Inc. SAD) te je zasađeno 500 000 stanica po jažici koje su uzgajane u DMEM mediju (Capricorn, Njemačka) obogaćenom s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS; Capricorn, Njemačka) i 1 % penicilin-streptomcina (Thermo Scientific, SAD) pri 37 °C i 5 % CO₂ sve dok se nije postigla konfluencija od približno 70 %, koja je određena subjektivnom procjenom

pod mikroskopom. Stanice su zatim transfektirane s 1 µg plazmida po jažici koristeći polietilenimin (PEI; Sigma, SAD) i inkubirane 48 sati. Nakon toga, stanični lizat pripremljen je pomoću pufera za liziranje stanica (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, Roth, Njemačka) obogaćenog inhibitorima proteaza (Thermo Scientific, SAD). Stanice su prvo oprane PBS puferom (Capricorn, Njemačka) dva puta, te je dodano 200 µL pufera za liziranje stanica. Stanice su zatim sonicirane u ledenoj kupelji (Elmasonic, Njemačka) 1 minutu, te centrifugirane (Eppendorf Centrifuge 5424R, Njemačka) 10 minuta pri 16 000 × g na 4 °C. Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (Bradford reagens, Sigma) kako je opisano od strane Ernst i Zor (2010), a uzorci su zatim dovedeni na istu koncentraciju proteina dodatkom pufera za liziranje.

2.1.2. Oksidacija UV-zračenjem

Dio liziranih uzoraka tretiran je različitim dozama UV-zračenja u komori za UV-zračenje BS-02 (Opsytec Dr. Grobel GmbH, Ettlingen, Njemačka) koristeći omjer UVC (254 nm):UVB (280-315 nm) = 1:2. Tijekom zračenja, uzorci su bili izloženi kisiku iz zraka i držani na ledu u 96-jažičnoj ploči bez poklopca do postizanje doze, dok je kontrolna skupina bila inkubirana na ledu, bez UV-zračenja.

2.1.3. Oksidacija s H₂O₂

Uzorci su tretirani različitim koncentracijama H₂O₂ (Sigma, SAD). Pripremljena je ishodna otopina koncentracije 200 mM u PBS puferu, koja je zatim dodana lizatima stanica kako bi se postigle koncentracije od 10, 20, 30 i 40 mM. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi.

2.1.4. SIMPL (*Split Intein-Mediated Protein Ligation*) metoda

Jednaki volumeni oksidiranih i kontrolnih uzoraka pomiješani su i inkubirane na termomikseru (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka) pri 800 rpm, 30 °C tijekom 20 minuta kako bi došlo do interakcije između RBD-a i KRAS-a. Uzorci su denaturirani dodatkom Laemmli pufera (40 % glicerol, 280 mM SDS, 5 % 2-merkaptotanol, 0,5 mM Bromfenol Blue, 250 mM Tris-HCl, Roth, Njemačka), nakon čega su inkubirani 5 minuta na 95 °C (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka). Proteini su zatim razdvojeni

SDS-PAGE elektroforezom koristeći Bio-rad vertikalni sustav za gel-elektroforezu (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-rad, SAD), te su preneseni na nitroceluloznu membranu (Cytiva) pomoću Trans-Blot® Turbo sustava za prijenos (Bio-Rad, SAD) uz korištenje pufera sustava (Anodni pufer I: 1,8 M Tris, pH 10,4; Anodni pufer II: 0,150 M Tris, pH 10,4; Katodni pufer: 0,15 M Tris, 0,24 M 6-ACA, pH 9,4, Roth, Njemačka). Membrane su blokirane u 2 % BSA (Roth, Njemačka) pripremljenom u PBS-T puferu (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 0,05 % Tween20, Roth, Njemačka) sat vremena na sobnoj temperaturi, a zatim inkubirane preko noći na 4 °C s primarnim protutijelima: zečje anti-V5 (1:5000; #13202 Cell Signaling, SAD) za uzorke RBD i anti-FLAG (1:10.000; #F7425 Sigma, SAD) za KRAS uzorke. Sljedećeg dana membrane su isprane triput s PBS-T, a zatim inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi sa sekundarnim HRP-konjugiranim protutijelima (1:10.000; #111-035-144 Jackson ImmunoResearch, SAD). Nakon ponovnog ispiranja, signal je razvijen pomoću ECL-supstrata (Santa Cruz Biotechnology, SAD) i vizualiziran na rendgenskom filmu (Fuji, Japan) pomoću sustava Fuji Medical Film Processor FPM-100A (Fuji, Japan). Signali su kvantificirani uz pomoć programa Image Lab (Biorad, SAD) za tri neovisna eksperimenta, a statistička analiza provedena je u programu R primjenom jednofaktorske ANOVE, nakon koje su napravljeni Tukey HSD post hoc testovi uz korekciju p-vrijednosti metodom lažno otkrivenih rezultata (FDR, engl. *False Discovery Rate*).

2.1.5. Označavanje karbonilnih skupina Oxime blot metodom

Nakon UV-zračenja, polovica uzoraka bila je izdvojena za označavanje karbonilnih skupina primjenom metode Oxime blot, uz manje modifikacije prema Ladouce i suradnicima (2023). U ovom postupku korištena je specifična kemijska sonda, 100 mM alkoksiamin-PEG4-biotin (Thermo Scientific, SAD) otopljena u DMSO-u (Merck, SAD). Alkoksiaminski dio sonde reagira s karbonilima i stvara stabilnu oksimsku vezu, dok se biotinski dio koristi za naknadnu detekciju. Uzorci su derivatizirani s 10 mM sonde razrijeđene u PBS-u, u prisutnosti 20 mM *p*-fenilendiamina kao katalizatora (Sigma, SAD), te su inkubirani preko noći pri 25 °C uz miješanje pri 600 rpm (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka). Nakon toga dodan je Laemmli pufer, a uzorci su zagrijani na 95 °C tijekom 5 minuta (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka).

Proteini su potom razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom kako je već opisano u poglavlju 2.1.4. Membrane su blokirane u 2 % BSA pripremljenom u PBS-T puferom

preko noći. Sljedećeg dana membrane su isprane tripot s PBS-T, a zatim inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom Streptavidin-HRP konjugat (1:10.000; #S5512 Sigma, SAD) koji je korišten za prepoznavanje biotinom označenih karboniliranih proteina. Streptavidin se snažno veže za biotin, a HRP omogućuje razvoj signala kroz kemiluminiscentnu reakciju čime se omogućuje vizualizacija karboniliranih proteina na membrani koristeći isti postupak opisan u poglavlju 2.1.4.

2.1.6. Imunoprecipitacija

Postupak opisan u poglavlju 2.1.1. proširen je na veću razinu (engl. *scale up*), pri čemu je na 36 Petrijevih posuda (15 cm²) zasađeno po 10 milijuna HEK293FT stanica. Sljedećeg dana polovica posuda transfektirana je s plazmidom FLAG-KRAS (25 µg DNA + 50 µL Lipofectamine 2000; ThermoFisher, SAD), a druga polovica plazmidom V5-RBD u Opti-MEM mediju (Thermo-Fisher, SAD) i inkubirana 48 h. Stanice su lizirane u puferu s inhibitorima proteaza, sonificirane i centrifugirane, a koncentracija proteina određena je Bradford metodom kako je već opisano u poglavlju 2.1.1. Imunoprecipitacija je provedena s Anti-FLAG M2 afinitetnim kuglicama na bazi agaroze (Sigma, SAD) i Anti-V5 afinitetnim kuglicama na bazi agaroze (Sigma, SAD) prema uputama proizvođača. Proteini su eluirani s 0,1 M glicinom (pH 3,5) (Roth, Njemačka) i neutralizirani s 1 M Tris-om (pH 8,0) (Roth, Njemačka). Uzorci su potom vizualizirani pomoću FLAG i V5 protutijela, prema postupku opisanom u poglavlju 2.1.4., kako bi se potvrdila uspješna izolacija proteina RBD-a i KRAS-a iz staničnih lizata. Obilježavanje karbonilnih skupina provedeno je prema postupku opisanom u poglavlju 2.1.5., a dio uzoraka namijenjenih za analizu spektrometrijom masa pohranjen je na – 80 °C.

2.1.7. Eksperiment spektrometrije masa

Eksperimentalni rad opisan u ovom poglavlju proveden je u suradnji sa Zavodom za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Marka Močiboba. Nakon razdvajanja imunoprecipitacijom, proteini su iz uzorka istaloženi dodatkom trikolorooctenom kiselinom (TCA) do konačne koncentracije od 20 % (w/v) i inkubacijom na ledu dva sata. Uzorci su centrifugirani 30 minuta pri 16 000 × g na 4 °C. Dobiveni talozi su isprani tri puta 80 % etanolom, osušeni u vakuumu i otopljeni u denaturirajućem puferu (6 M urea, 2 M tiourea u 10 mM Tris puferu, pH

8,0). Značajan gubitak proteina dogodio se tijekom pripreme uzoraka, vjerojatno tijekom koraka ispiranja.

Denaturirani uzorci su reducirani 5 mM DTT jedan sat na 25 °C, nakon čega je slijedila alkilacija 16,5 mM jodoacetamidom jedan sata na 25 °C u mraku. Uzorci su zatim razrijeđeni s četiri volumena 20 mM amonij-bikarbonata i razgrađeni tripsinom preko noći. Reakcija je zaustavljena dodatkom 1 % trifluoroctene kiseline, a nastali peptidi su odsoljeni metodom krute faze na Stage Tips kolonama.

Peptidi u 0,2 % mravljoj kiselini i 0,2 % acetonitrilu su nanесeni na EASY-nLC™ 1200 sustav (Thermo Fisher, SAD) opremljen pretkolonom (75 µm × 2 cm, čestice 3 µm) i analitičkom kolonom (EASY-Spray™ kolona, 50 µm × 15 cm, čestice 2 µm) ispunjenom C18 stacionarnom fazom za reverzno-faznu kromatografiju. Peptidi su eluirani brzinom protoka od 200 nL/min tijekom 60-minutnog gradijenta acetonitrila u 0,1 % mravljoj kiselini. NanoLC sustav je bio spojen na Q Exactive Plus maseni spektrometar (Thermo Fisher Scientific, SAD) u pozitivnom ionskom načinu rada prikupljanjem podataka ovisnom o intenzitetu iona. Cjelokupni ionski sken (MS1) je sniman pri rezoluciji od 70 000, nakon čega je slijedila fragmentacija 12 naj snažnijih prekursorskih iona i MS/MS akvizicija pri rezoluciji od 17 500 (Top12) s dinamičkom ekskluzijom od 15 sekundi.

Maseni spektrometar prvo detektira ione u MS1 analizi, a zatim fragmentira do 12 najintenzivnijih peptida, generirajući MS/MS (MS2) spektralne podatke. MS2 spektri koriste se za identifikaciju peptida, čime se određuje prisutnost proteina. Dobiveni MS1 i MS2 spektri pretražuju se u *in silico* bazi podataka, a podudaranje eksperimentalnog spektra s predviđenim peptidom naziva se podudaranje peptida i spektra (PSM, engl. *Peptide-Spectrum Match*). Pojedini protein može generirati više PSM-ova različitih naboja, a njihov broj omogućuje grubu procjenu relativne zastupljenosti proteina (spektralno brojanje). Budući da su modifikacije poput karbonilacije rijetke i niske učestalosti, rezultati triplikata su objedinjeni, a ukupan broj detektiranih karbonilacija normaliziran je prema ukupnom broju PSM-ova za KRAS u kontrolnim i UV-tretiranim uzorcima.

Dobiveni podaci analizirani su pomoću programa Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) koristeći Sequest HT tražilicu. Podaci su pretraženi prema ljudskim proteinskim sekvencama preuzetim iz UniProt baze, izdanja 2023_05. Tijekom pretraživanja peptida definirane su sljedeće varijabilne modifikacije: oksidacija metionina / +15,995 Da (M), Arg→GluSA / -43,053 Da (R), Lys→Alizin / -1,032 Da (K), Pro→piro-Glu / +13,979 Da (P), Met→AspSA / -32,008 Da (M), karbonilacija /

+13,979 Da (A,I, L, R, V), dok je alkilacija cisteina (karbamidometilacija) / +57,021 Da bila definirana kao fiksna modifikacija. Uzorci su analizirani u triplicatu.

Podaci masene spektrometrije spremljeni su u *ProteomeXchange Consortium* putem PRIDE repozitorija (Perez-Riverol i sur. 2022) pod identifikatorom skupa podataka PXD055047 i DOI:10.6019/PXD055047.

2.1.8. Molekularno modeliranje

Molekularno modeliranje u ovom dijelu rada provedeno je u sklopu suradnje s Odjelom za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Sanader Maršić. Za analize je korištena početna struktura humanog KRAS-a (ostatci 1–169) u kompleksu s RAF1 (RBD CRD) domenom (ostatci 56–185) u kristalnom obliku I (PDB: 6XI7, rezolucija 1,95 Å) (Tran i sur. 2021). UVC-inducirane oksidativne modifikacije uvedene su u strukturu KRAS-a pomoću programa Chimera (Pettersen i sur. 2004) i njegovog alata za uređivanje strukture. Na temelju oksidiranih aminokiselinских ostataka identificiranih uz pomoć masene spektrometrije istraženo je koji od njih se nalaze na sučelju s RBD domenom i mogu utjecati na njihove interakcije. Identificirani su ostatci K42, I46 i R149. Oni su zamijenjeni odgovarajućim oksidativnim produktima (Lys u Asa, karbonilirani Ile, Arg u Gsa), a njihove interakcije s RBD domenom analizirane su pomoću Arpeggio web-poslužitelja (Jubb i sur. 2017). Arpeggio se koristi za izračun interakcija unutar proteina te između proteina, DNA ili malih molekula. Interakcije su klasificirane u 15 različitih kategorija temeljenih na tipu atoma, udaljenosti i kutnim parametrima (npr. van der Waalsovi kontakti, ionske, karbonilne, metalne, hidrofobne i halogene veze, vodikove veze te interakcije specifičnih atoma s aromatskim prstenom i interakcije aromatski prsten–aromatski prsten). Analizirane su isključivo interakcije bočnih lanaca, dok su atomi glavnog lanca ostali nepromijenjeni.

2.1.9. Testiranje SIMPL konstrukata u „vanstaničnim uvjetima”

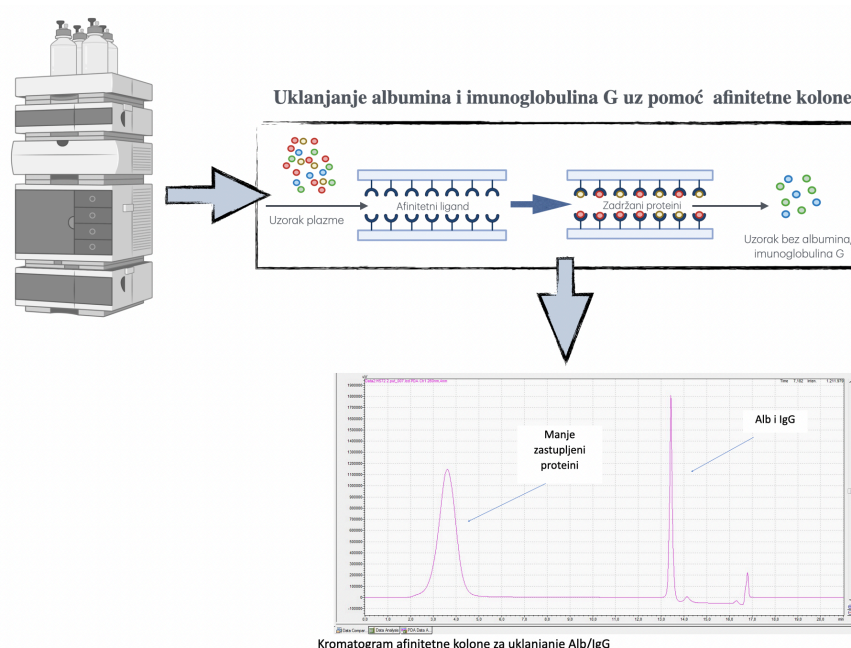
Stanice HEK293FT su transfektirane s tri različita para SIMPL plazmida konstruiranih od strane laboratorija prof. Igora Štagljara kako je već opisano u poglavlju 2.1.1. Svaki par plazmida kodira različite fuzijske proteinske parove: JUNB/BATF, CDK6/CCND3 i DR1/DRAP1. Plazmidi s FLAG biljezima i C-terminlanim fragmentom inteina uključuju BATF, CCND3 i DRAP1, dok plazmidi s V5 biljezima i N-terminalnim

fragmentom intaina kodiraju JUNB, CDK6 i DR1. Protokol za SIMPL metodu izveden je sukladno s opisom u poglavlju 2.1.3.

2.2. Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi temeljem proteomske metode

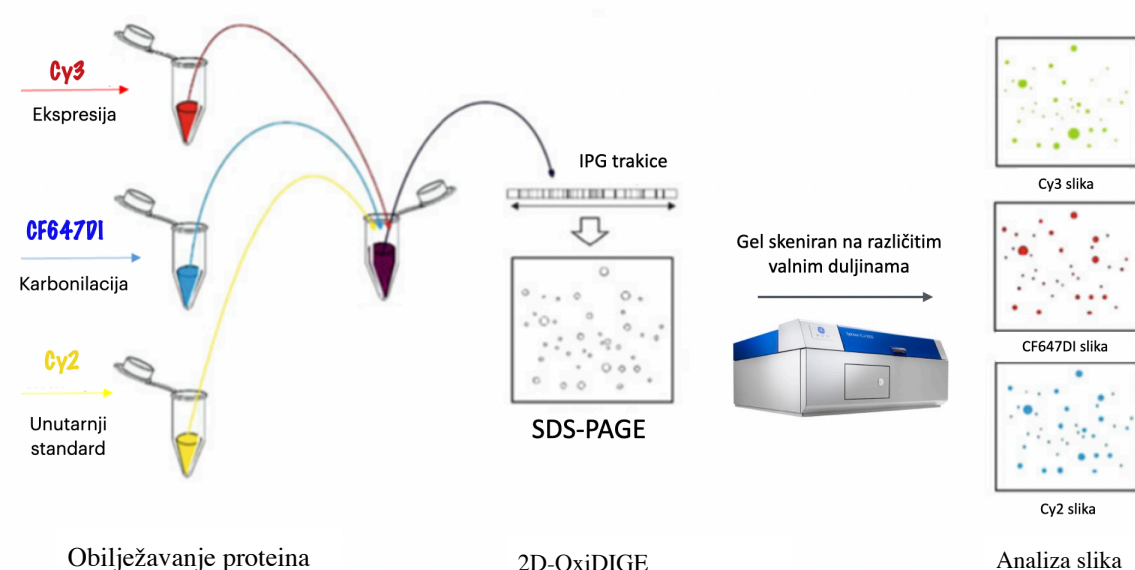
U ovom dijelu istraživanja optimizirane su metode za određivanje karbonilnih skupina na proteinima ljudske plazme, korištene na uzorcima prikupljenim iz biobanke „10 001 Dalmatinac“ (Rudan i sur. 2009). Ukupna karbonilacija proteina kvantificirana je primjenom metode 1-D Oxi, dok je za detekciju i usporedbu karbonilacije pojedinačnih proteina korištena optimizirana metoda 2-D OxiDIGE.

Prvi korak u optimizaciji metode za detekciju karbonilacije u plazmi bilo je uklanjanje visoko zastupljenih proteina HSA i IgG pomoću HPLC sustava te primjenom afinitetne kromatografije. Ova tehnika koristi kolonu sa stacionarnom fazom na koju su imobilizirana afinitetna sredstva specifična za HSA i IgG. Tijekom kromatografije, visoko zastupljeni proteini selektivno se vežu za afinitetni matriks, dok ostali proteini, uključujući one manje zastupljene, prolaze kroz kolonu i sakupljaju se u protoku. Frakcija protoka od 1,25 do 9 minuta, koja sadrži slabije zastupljene proteine, prikupljena je za daljnju analizu (Slika 14).



Slika 14. Uklanjanje HSA i IgG iz uzorka plazme primjenom afinitetne kromatografije putem HPLC sustava. Crtež izrađen pomoću programa BioRender.

Nakon uklanjanja visoko zastupljenih proteina iz uzoraka plazme, pristupilo se optimizaciji metode za označavanje karboniliranih proteina. U tom je procesu optimizirana količina boje za detekciju karbonilacije te ispitan optimalan postotak gela kako bi se postiglo najbolje razdvajanje proteina. Zadnji korak optimizacije obuhvatio je ispitivanje optimalnog pufera za označavanje proteina aminooksidi i Cy bojama kako bi se postigla stabilna i pouzdana detekcija karboniliranih proteina. Na temelju optimiziranih uvjeta, analiza je provedena na 100 uzoraka zdravih ispitanika, omogućujući određivanje ukupne karbonilacije proteina te karbonilacije pojedinačnih proteina primjenom optimizirane 2-D OxiDIGE metode (Slika 15).



Slika 15. Shematski prikaz pripreme uzoraka za 2D-OxiDIGE analizu. Pojedinačni proteinski uzorci obilježavaju se različitim fluorescentnim bojama (Cy3 i CF647DI), dok se unutarnji standard priprema obilježava dodatnim fluoroforom (Cy2). Obilježeni uzorci zatim se kombiniraju i nanose na IPG trakice za izoelektrično fokusiranje, a potom se proteini razdvajaju drugom dimenzijom SDS-PAGE.

2.2.1 Odabir sudionika i prikupljanje uzoraka plazme

Uzorci ljudske plazme korišteni u ovom istraživanju prethodno su prikupljeni u sklopu znanstvenog projekta „10 001 Dalmatinac”. U ovu analizu uključeni su isključivo uzorci zdravih osoba bez povijesti kroničnih bolesti i koje u trenutku prikupljanja uzoraka nisu koristile terapiju lijekovima. Baza sadrži za svakog ispitanika zdravstveni status uključujući kompletnu krvnu sliku, osnovne biokemijske parametre, elektrokardiogram (EKG), spirometriju, mjerenje krvnog tlaka, Doppler analizu perifernih krvnih žila (indeks gležanj-nadlaktica) te određivanje centralnog arterijskog tlaka i augme-

ntacijskog indeksa korištenjem uređaja SphygmoCor (AtCor Medical, Australija) (Pleić i sur. 2022).

Uzorci su prikupljeni iz periferne venske krvi ujutro natašte. Za plazmu su korištene EDTA-epruvete (10 mL Monovette, Sarstedt, SAD), a za serum iste vrste epruveta bez antikoagulansa. Nakon centrifugiranja pri $2000 \times g$ na 4°C tijekom 10 minuta, supernatanti su ponovno centrifugirani, a dobiveni uzorci plazme podijeljeni u alikvote (200–500 μL) i odmah pohranjeni na -80°C do daljnje obrade. Prikupljanje i početna obrada uzoraka su provedeni od strane istraživačke skupine navedenog projekta, te je dobivena dozvola za korištenje uzoraka iz biobanke od Medicinskog fakulteta u Splitu.

2.2.2. Uklanjanje visoko zastupljenih proteina iz uzoraka plazme

Prije analize plazme, dva najzastupljenija proteina, HSA i IgG, uklonjena su afinitetnom kromatografijom pomoću kolone Multiple Affinity Removal HSA/IgG, 4.6×50 mm (Agilent Technologies, SAD), spojene na HPLC sustav Shimadzu Nexera X2 (Shimadzu, Japan). Kako bi se uklonili eventualni organski ostaci i nečistoće, sustav i kolona prvo su kondicionirani prema uputama proizvođača. Kolona je najprije isprana mobilnim fazama koje su dio kompleta reagensa označenih kao Pufer A i Pufer B (Agilent Technologies, SAD) pri protoku od 1,0 mL/min. Nakon toga je sustav uravnotežen s puferom A tijekom nekoliko minuta. Prije injektiranja, uzorci plazme razrijeđeni su u omjeru 1:4 Puferom A te profiltrirani kroz membrane veličine pora 0,22 μm kako bi se uklonile čestice koje bi mogle oštetiti kolonu ili narušiti kromatografski zapis.

Po 100 μL razrijeđenog uzorka je injektirano na kolonu pri protoku od 0,25 mL/min. Tijekom prolaska kroz kolonu, HSA i IgG selektivno se vežu za imobilizirana protutijela, dok ostali proteini prolaze kroz kolonu i prikupljenaju su kao *flow-through* frakcija. Frakcija se prikupljala u intervalu od 1,25 do 9 minuta nakon injekcije uzorka. Neposredno nakon prikupljanja, frakcije su privremeno pohranjene na -20°C .

Nakon svakog uzorka, kolona je isprana puferom B pri višem protoku otapala (1,0 mL/min) kako bi se uklonili HSA i IgG. Potom je ponovno kondicionirana puferom A, čime se uspostavilo početno stanje kolone za idući uzorak. Tijekom cijelog postupka, temperatura kolone održavala se na sobnoj temperaturi.

Kako bi se uklonio višak soli i kromatografskih pufera provedena je zamjena pufera u prikupljenim uzorcima. Zamjena je provedena u PBS puferu (Biotium, SAD) koji je sadržavao koktel inhibitora proteaza (GE Healthcare, SAD), korištenjem

centrifugalnih 4 ml filter epruveta Amicon Ultra s molekularnim odsječkom od 3 kDa (Merck Millipore, SAD). Uzorci su centrifugirani na 4 °C pri 4000 × g, 40 minuta. Dobiveni koncentrat je prenesen u 0,5 mL filter epruvetu Amicon Ultra s molekularnim odsječkom od 3 kDa (Merck Millipore, SAD), dodan je PBS do volumena od 500 µL, te se ponovio postupak centrifugiranja, ali na 14 000 × g, 30 minuta. Taj je korak ponovljen tri puta. Nakon filtracije, koncentrirani uzorci su prikupljeni te su pohranjeni na –80 °C do daljnje analize.

2.2.3. Obilježavanje karbonilnih skupina u uzorcima plazme i analiza signala SDS-PAGE elektroforezom (1D-Oxi)

Ishodna otopina CF647DI aminooksi boje (CF, Biotium, Fremont, CA, SAD) koncentracije 5 mM pripremljena je dodavanjem 322,2 µL DMSO-a (Sigma, SAD) u 1 mg boje. Koncentracija proteina u uzorcima određena je pomoću Bradford reagensa (Sigma, SAD) kako je već opisano u poglavlju 2.1.1., nakon čega su uzorci razrijeđeni PBS puferom do odgovarajuće koncentracije.

Provedena je optimizacija metode obilježavanja kako bi se odredila potrebna količina boje za učinkovito označavanje karbonilnih skupina. Kao kontrolni uzorak korišten je onaj kojem je dodan ekvivalent 50 µM CF647DI aminooksi boje. Ostalim uzorcima dodano je 95 %, 80 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 % i 1 % volumena CF647DI aminooksi boje u odnosu na kontrolni uzorak.

Reakcija ligacije pokrenuta je dodatkom 1/10 volumena 10x anilina u acetatnom pufer. Uzorci su inkubirani preko noći na 4 °C uz potresanje pri 600 rpm (Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka) kako bi se osigurala potpuna derivatizacija svih aldehidnih i ketonskih skupina.

Nakon označavanja, uzorci su nanošeni na poliakrilamidni gel za 1D-Oxi elektroforezu, pri čemu je razdvajajući sloj sadržavao 12,5 % (v/v) akrilamida, a sabijajući 5 % (v/v), što omogućuje učinkovitu separaciju proteina prema njihovoj molekulskoj masi. Elektroforeza je provedena na Bio-rad vertikalnom sustav za gel-elektroforezu (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-rad, SAD) pri 75 V tijekom 30 minuta, nakon čega je napon povećan na 150 V do završetka razdvajanja. Za detekciju fluorescentog signala CF647DI aminooksi gelovi su skenirani pomoću skenera Typhoon (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD) pri valnim duljinama $\lambda_{exc} = 650$ nm, $\lambda_{em} = 665$ nm. Dobivene slike su analizirane programom TotalLab Quant (verzija 13.2, TotalLab, UK).

2.2.4. Utjecaj postotka akrilamida na razdvajanje plazmatskih proteina 1D-Oxi metodom

Za optimizaciju elektroforetskog razdvajanja pripremljeni su gelovi s različitim postotkom akrilamida od 10 %, 12,5 % i 15 %, pri čemu je uz svaki korišten sloj gela za sabijanje od 5 %. Priprema SDS-PAGE gelova provedena je prema uputama proizvođača (SERVA 2025). Prije nanošenja bioloških replika plazme na gelove, uzorcima je dodan Laemmli pufer (35 % glicerol, 280 mM SDS, 4 % 2-merkaptetanol, 1 mM Bromphenol Blue, 150 mM Tris-HCl, pH 6,8).

Devet uzoraka plazme obojeno je CF647DI aminooksi bojom kako je već opisano u poglavlju 2.2.3. Elektroforeza je započeta pri 75 V tijekom 30 minuta, nakon čega je napon povećan na 150 V i nastavljen do kraja razdvajanja. Za određivanje ukupne ekspresije proteina, gelovi su bojani bojom *SERVA Purple*. Prvi korak uključivao je fiksaciju gelova u 25–50 mL fiksacijske otopine (1 % limunska kiselina, 15 % etanol) tijekom 15 minuta uz lagano njihanje na orbitalnom miješaču (Heidolph Rotamax 120, Njemačka). Nakon toga, gelovi su inkubirani uz lagano njihanje na orbitalnom miješaču (Heidolph Rotamax 120, Njemačka) tijekom 10 minuta u svježe pripremljenoj otopini za bojenje koja je sadržavala boju *SERVA Purple* u omjeru 1 volumni dio *SERVA Purple* boje na 250 volumnih dijelova otopine za bojanje (0,1 M borna kiselina, 0,1 M NaOH; Serva, Njemačka). *SERVA Purple* se veže na ostatke lizina, arginina i histidina, te daje informaciju o ukupnoj količini proteina na gelu. Gelovi su zatim isprani u otopini za ispiranje (15 % etanol) uz lagano njihanje na orbitalnom miješaču (Heidolph Rotamax 120, Njemačka) tijekom 10 minuta, a na kraju su zakiseljeni inkubacijom u fiksacijskoj otopini također uz lagano njihanje, u trajanju od 10 minuta. Nakon bojenja, gelovi su skenirani pomoću Typhoon skenera pri valnim duljinama $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$ za *SERVA Purple*, te $\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$ za CF647DI aminooksi boju, a dobivene slike analizirane su programom TotalLab Quant (verzija 13.2, TotalLab).

2.2.5. Optimizacija uvjeta za reakciju označavanja karbonilnih skupina u 2D-OxiDIGE analizi: usporedba PBS i UTC pufera

Koncentracija proteina prikupljenih uz pomoć afinitetne kolone određena je Bradford metodom (Ernst i Zor 2010), te su uzorci pripremljeni tako da je svaki sadržavao 70 μg proteina u volumenu od 30 μL , pri čemu je dodan PBS pufer za ujednačavanje koncentracije proteina. U svrhu ispitivanja utjecaja pufera na učinkovitost označavanja

karbonilnih i ϵ -amino skupina, uzorci su za 2D-OxiDIGE analizu označeni fluorescentnim bojama: CF647DI aminooksi bojom za obilježavanje karbonilnih skupina i Cy3 bojom za obilježavanje ϵ -amino skupina Lys (Lumiprobe, Hannover, Njemačka), pri čemu je reakcija obilježavanja provedena u dva različita pufera, PBS-u i UTC puferu (7 M urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS, 40 mM ditiotritol (DTT), 0,5 % IPG-pufer, Sigma, SAD). Za označavanje karbonilnih skupina u proteinima svakom uzorku dodano je 1,2 μ L 5 mM CF647DI aminooksi boje (Biotium, SAD), prethodno otopljene u DMSO-u (Sigma, SAD), te 3,1 μ L 10 $\times$ anilina u acetatnom puferu (Biotium, SAD), koji je služio kao katalizator reakcije ligacije. Uzorci su zatim inkubirani preko noći u mraku na termobloku TS-100C (Biosan, Latvija) pri 4 °C i 600 rpm kako bi se osiguralo potpuno obilježavanje svih karbonilnih skupina.

Sljedećeg dana, uzorci su dodatno označeni bojom Cy3 prema uputama proizvođača (Lumiprobe, Njemačka). Iz svakog uzorka označenog CF647DI aminooksi bojom odvojeno je 40 μ g proteina, a pH je podešen na 8,5 dodatkom 1,5 M Tris pufera, pH 8,8. Uzorci su potom označeni s 0,8 μ L 3,3 nmol-a Cy3 boje, otopljene u dimetilformamidu. Reakcija je provedena na ledu, u mraku, tijekom 30 minuta. Nakon toga je dodano 1 μ L 10 mM lizina (Sigma, SAD) radi zaustavljanja reakcije, a uzorak je ponovno spojen s ostatkom CF647DI-označenog uzorka.

Za označavanje 50 μ g internog standarda, korišten je isti uzorak plazme, te je bojan s 1 μ L 3,3 nmol-a Cy2 boja u PBS-u ili UTC puferu. Reakcija je pratila iste uvjete kao za bojanje s Cy3 bojom. Uzorak internog standarda je spojen s uzorkom označenim s CF647DI i Cy3 bojom te je dodan rehidracijski pufer A (7 M urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS, 60 mM DTT, 0,5 % IPG pufera, 0,002 % Bromfenol Blue, Sigma SAD) do ukupnog volumena od 450 μ L po traci s imobiliziranim pH-gradijentom (IPG, GE Healthcare, SAD). Uzorak je zatim prenesen u IPG-kutiju (GE Healthcare, SAD).

2.2.6. 2D-OxiDIGE metoda

Dvanaest uzoraka plazme pripremljenih kako je opisano u poglavlju 2.2.2. bojani su fluorescentnim bojama za 2D-OxiDIGE u PBS puferu (poglavlje 2.2.5.). Uzorak bojan CF647DI aminooksi i Cy3 bojom spojen je s internim standardom (mješavina 12 testiranih uzoraka) bojanim Cy2 bojom u PBS-u te je dodan izmjenjeni rehidracijski pufer B (7 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 40 mM DTT, 1 % IPG pufera pH 4–7 i 0,002 % Bromfenol Blue, Sigma, SAD) do konačnog volumena od 450 μ L. IPG trake duljine 24 cm s pH-gradijentom 4–7 (GE Healthcare, SAD) pažljivo su postavljene u

IPG-kutiju (GE Healthcare, SAD) tako da je strana s gelom bila okrenuta prema dolje, a uzorak je ravnomjerno raspoređen ispod trake. Poklopac je zatvoren, a trake su ostavljene na rehidraciju preko noći na sobnoj temperaturi. Ovaj korak rehidracije omogućuje da se proteini iz uzorka ravnomjerno rasporede unutar gela na IPG-trakama, čime se osigurava njihovo učinkovito fokusiranje tijekom IEF.

Nakon rehidracije, IPG-trake su pažljivo premještene u uređaj Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, SAD). IEF je provedeno pri 20 °C u pet koraka (Tablica 1). Napon se primjenjivao u pet uzastopnih koraka s različitim načinima primjene (profilima). Ukupna naponska doza izražena je u kilovolta-satima (kVh).

Tablica 1. Parametri IEF-a tijekom razdvajanja proteina na uređaju Ettan IPGphor 3 u prvoj dimenziji.

Temperatura			20 °C	
Struja po traci			50 µA	
	Tip napona	Napon	Trajanje	Ukupan napon (kVh)
Korak 1	Konstantan	30 V	12 h	0.4 kVh
Korak 2	Gradijent	500 V	1 h	0.3 kVh
Korak 3	Gradijent	1000 V	1 h	0.8 kVh
Korak 4	Gradijent	8000 V	1 h	4.5 kVh
Korak 5	Konstantan	8000 V	7:30 h	60.0 kVh
Ukupno vrijeme			22:30 h	65.9 kVh

Nakon IEF-a, trake su prenesene u IPG-kutiju i inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u ekvilibracijskom puferu (6 M urea, 2 % SDS, 20 % glicerol, 20 mM Tris, pH 8,8; GE Healthcare, SAD) s dodatkom 1,5 % DTT radi redukcije proteinskih disulfidnih veza. Potom su proteini alkilirani u istom puferu koji je sadržavao 2,5 % jodoacetamida (IAA, GE Healthcare, SAD) i tragove Bromfenol blue-a (GE Healthcare, SAD), također 15 minuta na sobnoj temperaturi.

Druga dimenzija elektroforeze provedena je pomoću sustava Ettan DALTsix (GE Healthcare, SAD). IPG trake su postavljene na vrh poliakrilamidnog gela koncentracije 10 % SDS-PAGE i prekrivene agaroznom zapečaćujućom otopinom (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % SDS, 0,5 % agaroz, 0,002 % Bromfenol Blue, Sigma, SAD). Elektroforeza je provedena pri 25 °C u dvije faze: 10 mA po gelu

tijekom 1 h, zatim 40 mA po gelu do izlaska boje za praćenje iz gela, što je trajalo približno 6 h.

Gelovi su skenirani pomoću skenera Typhoon pri tri valne duljine, gdje svaka valna duljina odgovara jednom signalu: CF647DI aminooksidi ($\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$), Cy3 ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$) ili Cy2 ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$), a slike su analizirane programom SameSpots (TotalLab).

2.2.7. Validacija metode pomoću statističke analize

Analitički dio ovog istraživanja odrađen je u suradnji s voditeljem projekta „10 001 Dalmatinac“ prof.dr.sc. Ozrenom Polašekom koji je temeljen na analizi ponovljivosti, koji je proveden kroz tri metode. Prvo su izračunati koeficijenti varijacije (CoV) ili relativna standardna devijacija, definirani kao omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti za bilo koji skup ponovljenih mjerenja. Nakon izračuna CoV za svaki proteinski spot, izračunata je njihova prosječna vrijednost kako bi se dobio prosječni individualni CoV. Drugo korak bio je izračunati intraklasni koeficijenti korelacije (ICC) korištenjem dvostruko slučajnog modela s fokusom na srednje vrijednosti i apsolutnu suglasnost, koji je usmjeren na analizu pouzdanosti (Koo and Li 2016). Kako bi rezultati bili usporedivi sa sličnim istraživanjima, prikazani su i Cronbachovi α koeficijenti. Koeficijenti varijabilnosti i volumeni proteinskih spotova povezani su Spearmanovim rang-korelacijskim testom. Podaci su analizirani u programu SPSS, verzija 21 (IBM, Armonk, NY, SAD), pri čemu je razina statističke značajnosti postavljena na $p < 0,05$.

2.3. Analiza uzoraka plazmatskih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom (2D-OxiDIGE)

Deplecija HSA i IgG odrađena je prema opisu u poglavlju 2.2.2 za 100 uzoraka plazme iz biobanke „10 001 Dalmatinac“. Analiza uzoraka provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 2.2.6. Interni standard pripremljen je kao zajednički spoj jednakih volumena uzoraka deset ispitanika (pet muškaraca i pet žena), ravnomjerno raspoređenih prema dobi. Svakom uzorku označenom CF647DI aminooksidi i Cy3 bojama dodano je 40 μg internog standarda označenog Cy2 bojom te rehidracijskih pufer B do konačnog volumena od 450 μL . Nakon toga provedeni su

već opisani koraci, a gelovi su skenirani pri tri valne duljine. Dobivene slike gelova učitane su u programom SameSpots, gdje je automatski provedena provjera kvalitete.

Program SameSpots analizira skenirane slike 2D gelova tako da automatski prepoznaje, poravnava i kvantificira proteinske točke na svim gelovima. Zatim program koristi algoritme za detekciju točaka u skenovima koji prikazuju ukupne eksprimirane i karbonilirane proteine, te određuje intenzitet fluorescencije za svaku od njih. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je ekspresiji proteina odnosno stupnju karbonilacije. Nakon toga se provodi normalizacija podataka radi korekcije tehničkih varijacija između gelova, čime se osigurava da su razlike u intenzitetima biološki relevantne.

Kod 89 skeniranih gelova uzoraka nisu uočeni problemi s kvalitetom. Referentna slika odabrana je automatski, a ostale slike poravnate su s pripadajućim internim standardom. Nakon filtriranja premalih točaka, za daljnju statističku analizu preostalo je 813 proteinskih točaka, pri čemu je svaka točka dobila svoj jedinstveni identifikacijski broj.

Statistička analiza provedena je radi procjene značajnosti razlika u razinama karbonilacije i ekspresije između uzoraka. Za usporedbu intenziteta pojedinačnih točaka među uzorcima korišten je t-test, dok je Z-vrijednost primijenjena kao dodatni kriterij. Izračun se temelji na sljedećoj formuli:

$$Z = (\text{vrijednost točke} - \text{medijan svih vrijednosti}) / \text{standardna devijacija svih vrijednosti}$$

Z-vrijednost je korištena za procjenu odstupanja od medijana i identifikaciju značajno promijenjenih proteina.

III. Rezultati i rasprava

3.1. Interakcija KRAS i RBD/c-RAF pod oksidacijskim stresom

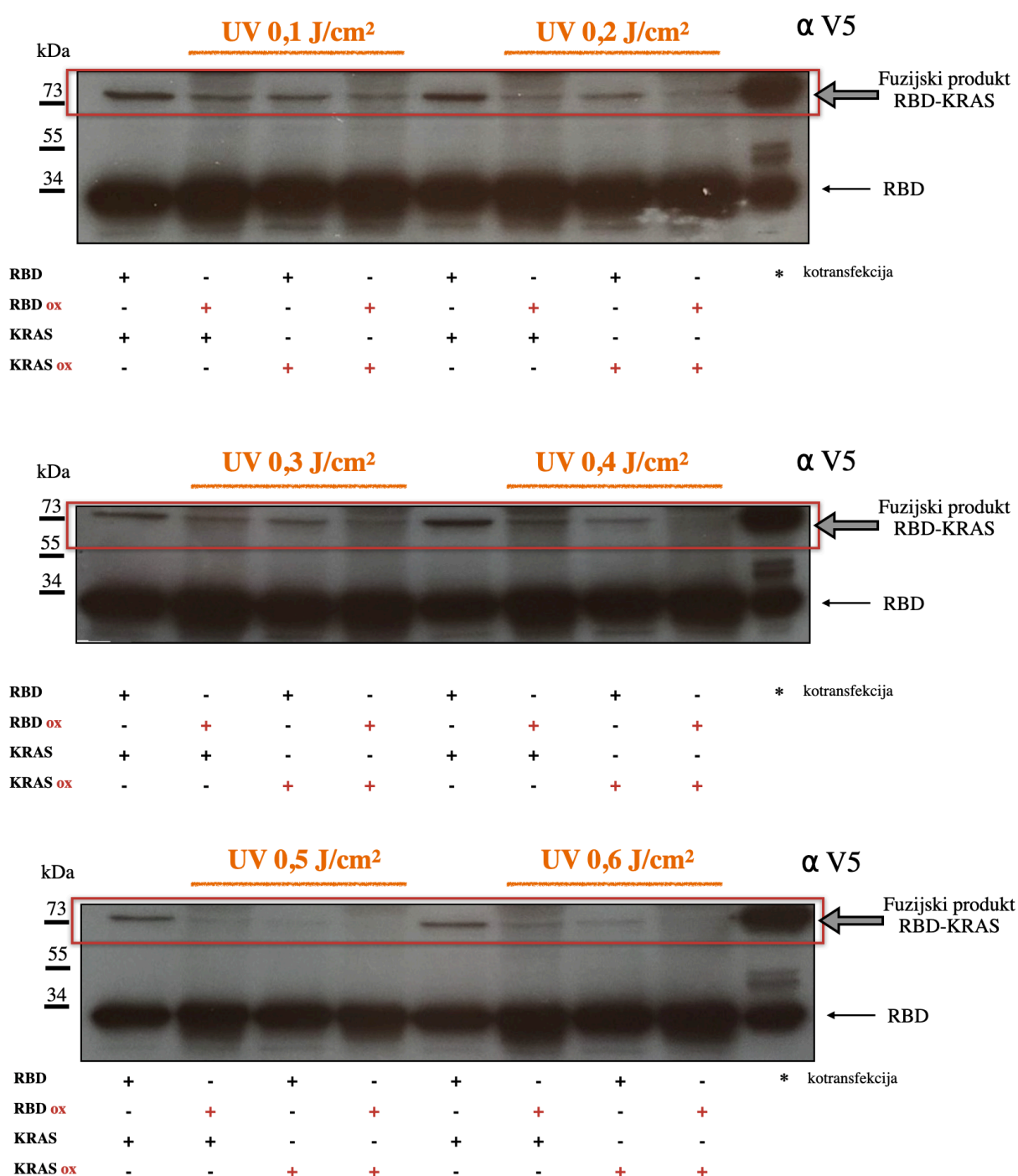
Kako bismo istražili utjecaj oksidacije na interakciju proteina RBD i KRAS, koristili smo metodu SIMPL u kojoj se međusobno reagirajući proteini povezuju pomoću autokataličkog inteina (Yao i sur. 2020).

U ovom istraživanju korištena je modificirana SIMPL metoda za ispitivanje „vanstanične“ interakcije među proteinima. Analizirana je interakcija proteina u lizatima stanica koje su eksprimirale RBD-a i KRAS-a, svaki s pripadajućim biljegom.

3.1.1. Oksidacija izazvana UV-zračenjem narušava interakciju RBD-KRAS

Za potrebe eksperimenta korištene su HEK293FT stanice, transfektirane vektorima za ekspresiju RBD-a ili KRAS-a. Nakon transfekcije, stanični lizati su bili izloženi različitim dozama UV-zračenja kako bi se odredila doza pri kojoj dolazi do gubitka interakcije između RBD i KRAS-a. Nakon zračenja, lizat RBD i lizat KRAS-a su pomiješani u jednakim količinama i inkubirani kako bi se uspostavila interakcija, te analizirani Western blot metodom (Slika 12).

Fuzijski produkt RBD-KRAS, koji nastaje kao rezultat međusobne interakcije proteina, jasno je detektiran u kontrolnim uvjetima (bez oksidacije), kao i pri nižim dozama UV-zračenja (Slika 16). S porastom doze UV-zračenja opaža se postupan gubitak signala fuzijskog proteina, što upućuje na smanjenu interakciju između RBD-a i KRAS-a. Ovaj učinak je osobito izražen u uzorcima u kojima su oba proteina podvrgnuta UV-zračenju (RBD ox i KRAS ox), a najjače dolazi do izražaja pri dozama od 0,5 i 0,6 J/cm², gdje je signal fuzijskog proteinskog kompleksa gotovo u potpunosti izgubljen.



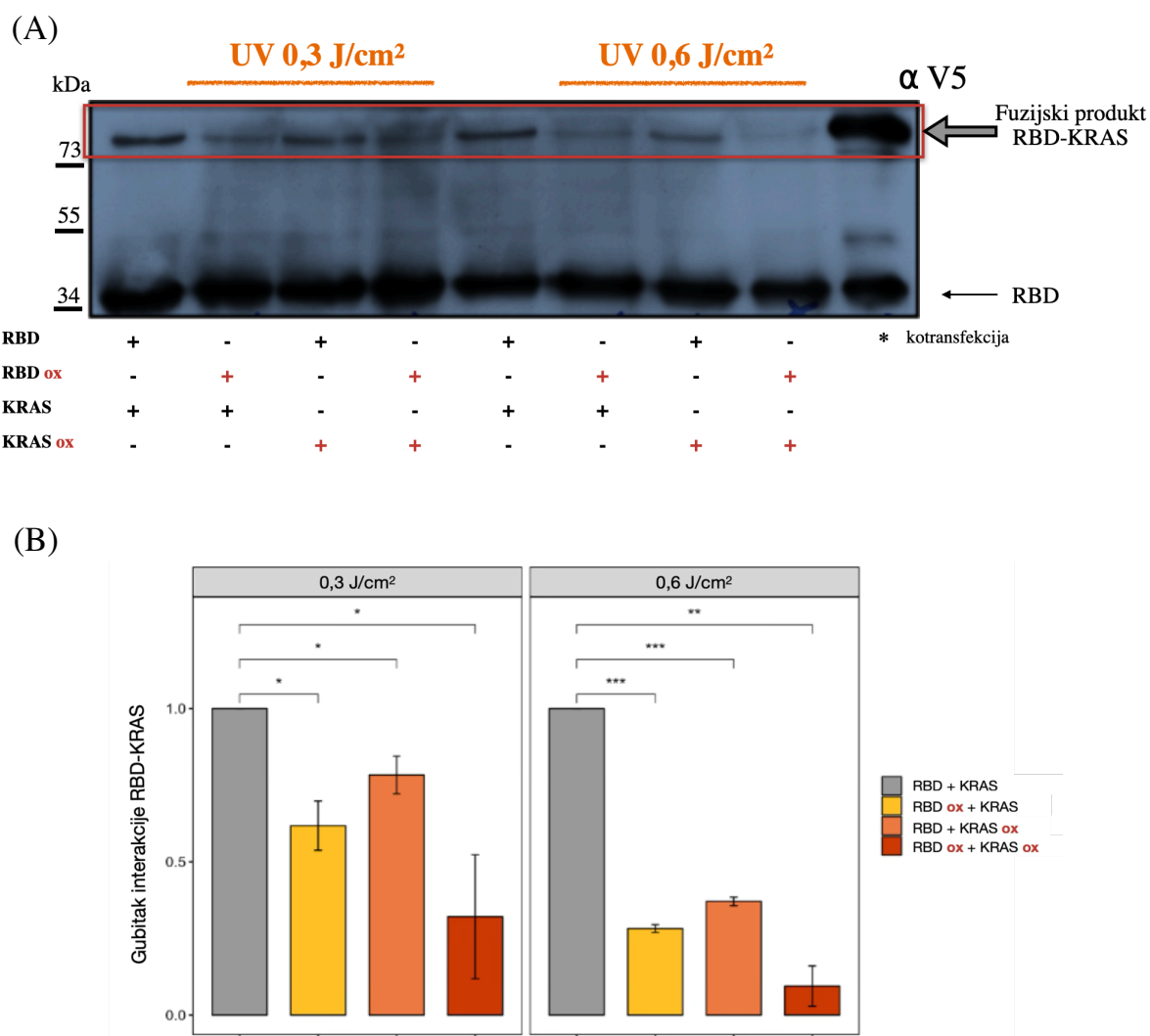
Slika 16. SIMPL analiza interakcije RBD i KRAS u staničnim lizatima izloženima različitim dozama UV-zračenja (0,1 – 0,6 J/cm²) koristeći Western blot. Za analizu je korišteno α-V5 protutijelo koje detektira biljeg na proteinu RBD, te na fuzijskom produktu RBD-KRAS. Kao pozitivna kontrola interakcije korišten je lizat kotransfektiranih stanica.

Na temelju dobivenih rezultata odabrane su dvije reprezentativne doze UV-zračenja ($0,3 \text{ J/cm}^2$ i $0,6 \text{ J/cm}^2$) za daljnje eksperimente. Kako bi se potvrdilo da su odabrane doze prikladne za kvantitativnu analizu, provedena su tri neovisna eksperimenta u kojem su stanični lizati zračeni isključivo s ove dvije doze. Intenzitet signala koji potječe od fuzijskog proteina kvantificiran je pomoću progama Image Lab za sva tri neovisna eksperimenta (Slika 17).

Slika 17 B je prikazuje relativni gubitak interakcije između proteina RBD i KRAS nakon izlaganja dvjema UV-dozama $0,3 \text{ J/cm}^2$ i $0,6 \text{ J/cm}^2$. U oba slučaja, kontrolna skupina (RBD + KRAS) pokazuje najvišu razinu interakcije, što je postavljeno kao referentna vrijednost.

Oksidacija jednog od dvaju proteina rezultira statistički značajnim smanjenjem njihove međusobne interakcije. Pri dozi od $0,3 \text{ J/cm}^2$, oksidacija RBD-a (RBD ox + KRAS) ili KRAS-a (RBD + KRAS ox) dovodi do umjerenog, ali značajnog smanjenja interakcije u usporedbi s kontrolom. Dalo bi se naslutiti da oksidativno oštećenje RBD-a (RBD ox + KRAS) snažnije narušava interakciju nego oksidacija KRAS-a (RBD + KRAS ox). Najizraženiji gubitak interakcije uočen je kada su oba proteina bila oksidirana (RBD ox + KRAS ox), iako s većom varijabilnošću rezultata, što je vidljivo iz statističkih devijacija. Statistička analiza pokazala je značajne razlike između kontrolne skupine i svih oksidiranih varijanti ($p < 0,05$).

Pri višoj dozi UV-zračenja ($0,6 \text{ J/cm}^2$), razlike su još izraženije. Oksidacija pojedinačnih proteina ponovno dovodi do značajnog smanjenja interakcije RBD s KRAS-om, a kod oksidacije oba proteina (RBD ox + KRAS ox) interakcija gotovo potpuno izostaje. U ovoj skupini gubitak interakcije bio je najsnažniji i statistički visoko značajan u usporedbi s kontrolom ($p < 0,001$), ali i u odnosu na interakciju ostvarenu kod pojedinačno oksidiranih proteina.



Slika 17. Analiza interakcije RBD i KRAS nakon tretmana UV-zračenjem pri dozama od 0,3 i 0,6 J/cm². (A) Interakcija je analizirana uz pomoć SIMPL metode te vizualizirana koristeći Western blot uz pomoć α-V5 protutijela. (B) Kvantifikacija rezultata je provedena pomoću Image Lab programa (n = 3). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Statistička značajnost određena je t-testom (p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***).

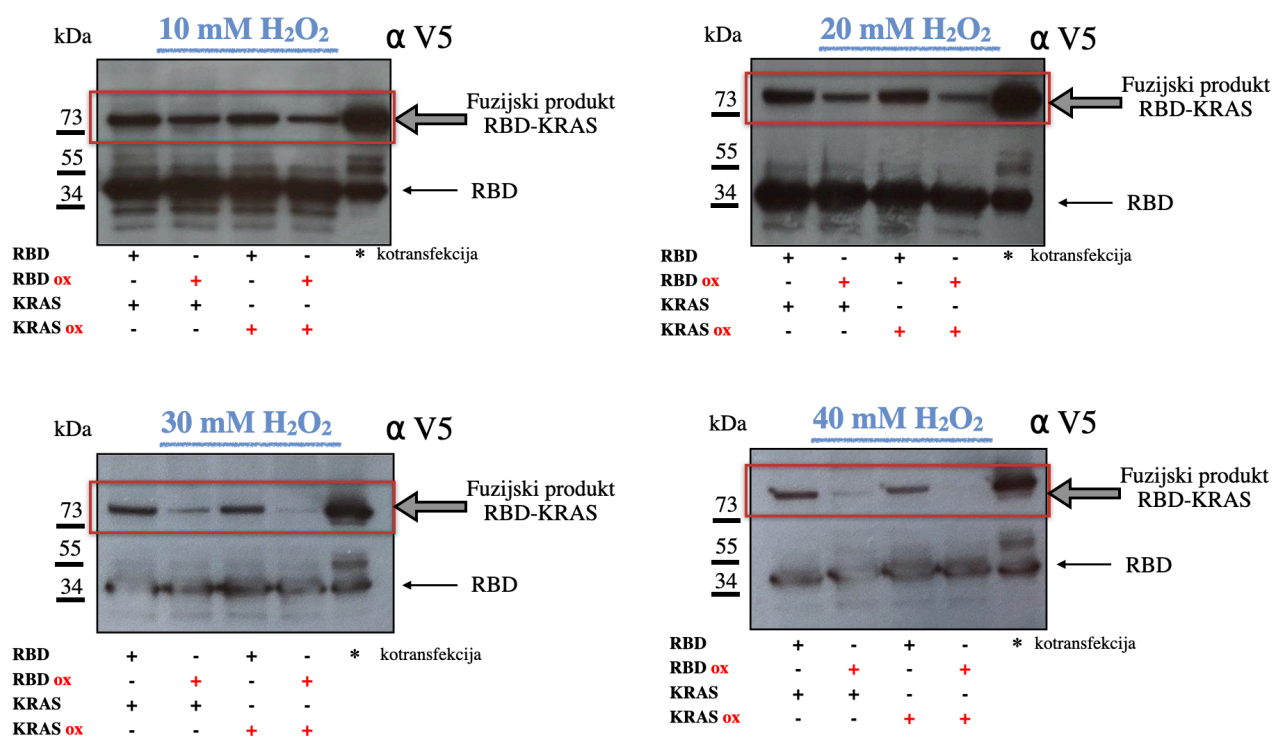
3.1.2. Usporedna metoda oksidacije: djelovanje H₂O₂ na protein-protein interakciju

Kako bi se usporedila učinkovitost različitih oksidacijskih modela, ispitana je mogućnost induciranja oksidativnog oštećenja interakcije između RBD i KRAS proteina pomoću vodikovog peroksida (H₂O₂).

Nakon transfekcije s konstruktima RBD i KRAS, stanice su lizirane te su tretirane različitim koncentracijama H₂O₂ (10, 20, 30 i 40 mM), s ciljem induciranja oksidacije. Potom su lizati pojedinačnih uzoraka miješani u jednakim omjerima kako bi se ispitala stabilnost PPI između RBD i KRAS proteina u uvjetima oksidativnog stresa. Proteini su analizirani Western blot metodom s ciljem detekcije njihovog interakcijskog produkata.

Rezultati pokazuju da porast koncentracije H₂O₂ dovodi do postepenog gubitka interakcije između RBD i KRAS proteina, s osobito izraženim slabljenjem signala fuzijskog produkta pri koncentracijama H₂O₂ od 30 i 40 mM (Slika 18). To ukazuje na strukturna oštećenja proteina i destabilizaciju njihovih interakcija uslijed jakog oksidativnog stresa, pri čemu blotovi sugeriraju da je RBD osobito osjetljiv i ima veći utjecaj na gubitak interakcije.

Iako je ova metoda jasno pokazala učinak na gubitak interakcije između RBD i KRAS proteina, nije se pokazala pogodnom za nastavak istraživanja jer nije bila kompatibilna s daljnjim eksperimentalnim koracima.



Slika 18. SIMPL analiza interakcije RBD i KRAS u staničnim lizatima izloženima različitim dozama H₂O₂ (10 - 40 mM), koristeći Western blot (n = 3). Za analizu je korišteno α-V5 protutijelo koje detektira biljeg na proteinu RDB, te na fuzijskom produktu RBD-KRAS. Kao pozitivna kontrola interakcije korišten je lizat kotransfektiranih stanica.

3.1.3. UV-zračenje inducira oksidativno oštećenje RBD i KRAS proteina u obliku karbonilacije

Kako bismo istražili utjecaj UV-zračenja na oksidativno oštećenje proteina RBD i KRAS, korištena je metoda Oxime blot, koja omogućuje detekciju karbonilacije proteina kao pokazatelja oksidativnog stresa (Ladouce i sur., 2023).

Metoda je primijenjena na stanične lizate HEK293FT stanica s eksprimiranim RBD ili KRAS proteinima, koji su nakon transfekcije izloženi različitim dozama UV-zračenja (0, 0,3 i 0,6 J/cm²) kako je opisano u poglavlju 2.1.1. i 2.1.2.

Uzorci su derivatizirani s aminooksi-biotinom, a zatim je provedena western blot analiza u kojem je biotinski biljeg detektiran uz pomoć streptavidin-HRP-a (Slika 13).

Karbonilacija je kvantificirana uz pomoć programa ImageJ, a rezultati su izraženi relativno u odnosu na kontrolnu skupinu (0 J/cm²), čija je vrijednost postavljena na 1. Podaci na slici 19 B prikazuju srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija dobivene iz tri neovisno provedena eksperimenta.

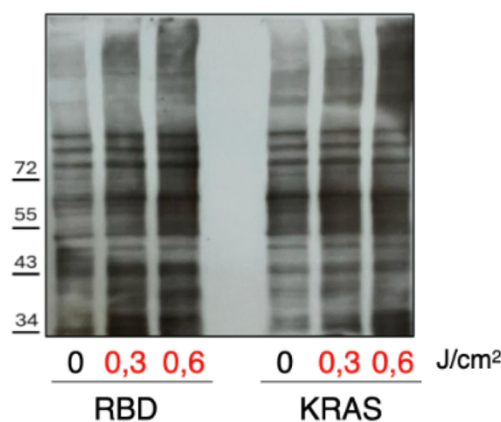
Za lizate s eksprimiranim proteinom RBD, već nakon izlaganja UV-zračenju od 0,3 J/cm² dolazi do značajnog povećanja karbonilacije u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), dok je povećanje pri 0,6 J/cm² statistički još izraženije ($p < 0,01$). Nema statistički značajne razlike između doza 0,3 i 0,6 J/cm² (Slika 19 B).

Sličan trend opažen je i u lizatima s ekprimiranim proteinom KRAS, gdje UV-doze od 0,3 i 0,6 J/cm² također rezultiraju značajnim povećanjem karbonilacije u usporedbi s kontrolom ($p < 0,05$ i $p < 0,1$, redom), dok međusobna razlika između dviju UV-doza nije statistički značajna (ns) (Slika 19 B).

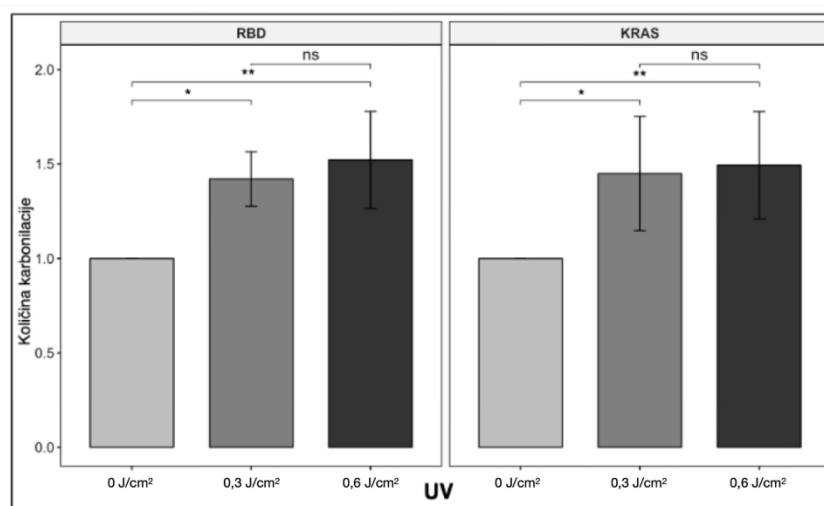
Ovi rezultati ukazuju na to da UV-zračenje inducira oksidativno oštećenje proteina u obliku karbonilacije u lizatima, s izraženim učinkom već pri nižim dozama, bez daljnjeg linearnog povećanja iznad 0,3 J/cm².

(A)

Oxime blot - ukupna karbonilacija



(B)



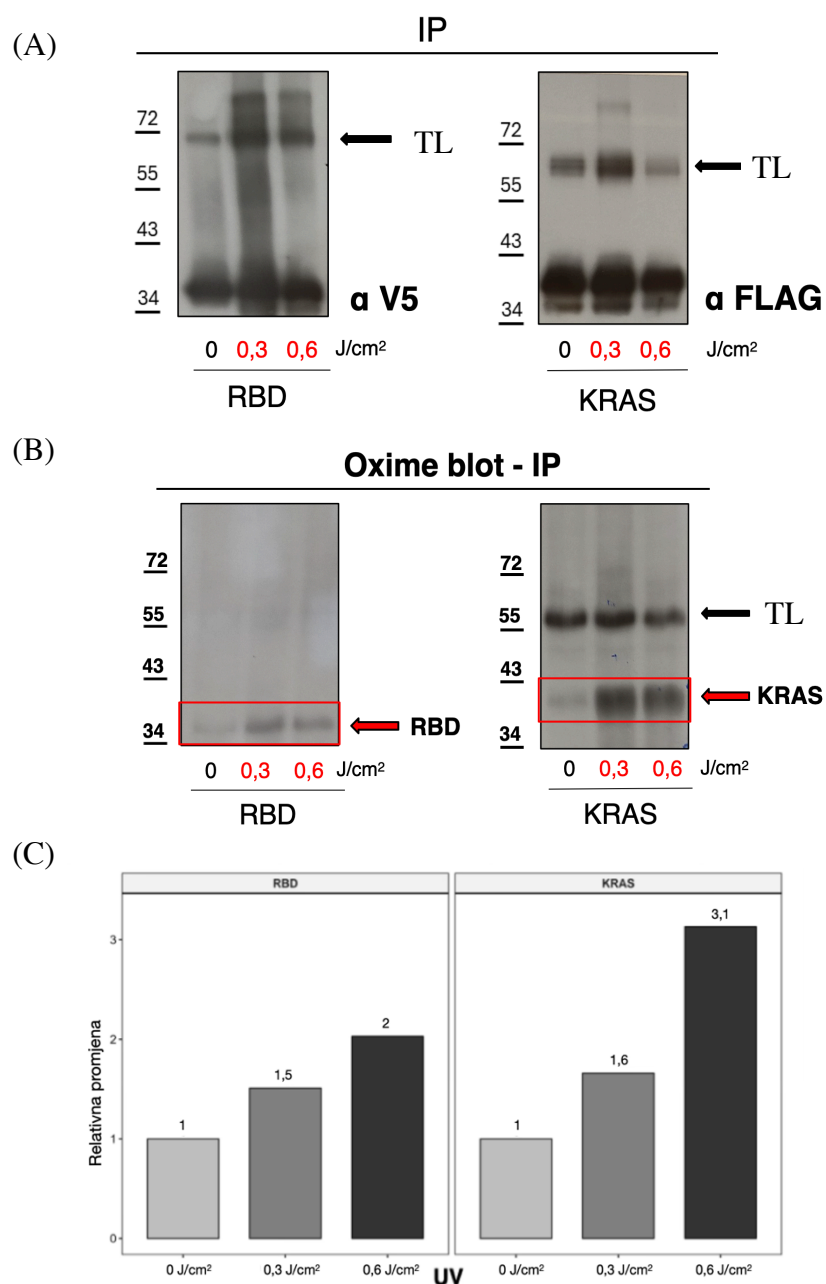
Slika 19. Analiza karbonilacije proteina u HEK293FT stanicama transfektiranim konstruktima za ekspresiju RBD ili KRAS proteina. (A) Stanice su lizirane te izložene različitim dozama UV-zračenja, a karbonilacija je analizirana metodom Oxime blot. (B) Kvantifikacija je provedena analizom blotova triju nezavisnih eksperimenata. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Statistička značajnost određena je t-testom ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,05$, ns).

Kako bi se potvrdilo da su među ostalim karboniliranim proteinima, oksidativno oštećeni RBD i KRAS proteini, oni su izolirani iz staničnih lizata. Za njihovu selektivnu izolaciju korištena je imunoprecipitacija s anti-V5 afinitetnim kuglicama na bazi agaroze za RBD protein označen V5 biljekom, te anti-Flag M2 afinitetne kuglice na bazi agaroze za KRAS protein označen Flag biljekom. Stanični lizati dobiveni iz stanica koje eksprimiraju navedene proteine prethodno su bili izloženi različitim dozama UV-zračenja (0, 0,3 i 0,6 J/cm²), pri čemu je neozračeni uzorak služio kao kontrola.

Proteini eluirani s afinitetnim kuglicama su analizirani Western blot-om korištenjem anti-V5 odnosno anti-Flag protutijela, kako bi se potvrdilo da je imuno-precipetacija uspješno provedena te da je količina izoliranih proteina između različitih uzoraka ujednačena. Time se osigurava da eventualne promjene u signalima karbonilacije proizlaze iz razlika u stupnju oksidativnog oštećenja, a ne iz varijacija u količini proteina (Slika 20 A). Potom su eluati analizirani metodom Oxime blot kako bi detektirala i kvantificirala karbonilacija proteina RBD i KRAS (Slika 20 B).

Na slici 20 C prikazana je relativna promjena (engl. *fold change*) razine karbonilacije izoliranih RBD i KRAS proteina nakon izlaganja različitim dozama UV-zračenja (0, 0,3 i 0,6 J/cm²). Dobivene vrijednosti izražene su relativno u odnosu na neozračenu kontrolu (0 J/cm²), čija je vrijednost postavljena na 1.

Za RBD protein opaženo je postepeno povećanje karbonilacije, koja je bila 1,5 puta veća pri 0,3 J/cm² te 2 puta veća pri 0,6 J/cm² u odnosu na kontrolu. Slično, karbonilacija KRAS proteina porasla je za 1,6 puta pri 0,3 J/cm² te čak 3,1 puta pri 0,6 J/cm², što ukazuje na veću osjetljivost KRAS proteina na oksidaciju induciranu UV-zračenjem.



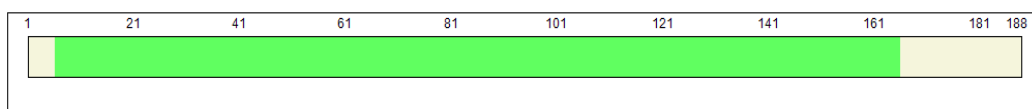
Slika 20. Analiza karbonilacije imunoprecipitiranih RBD i KRAS proteina nakon UV-zračenja pri dozama od 0,3 i 0,6 J/cm² (A) HEK293FT stanice su transfektirane, lizirane, izložene UV-zračenju, a zatim je provedena imunoprecipitacija (IP), te analiza Western blottingom uz pomoć α-V5 i α-FLAG protutijela. TL predstavlja teški lanac protutijela. (B) Razina karbonilacije određena je metodom Oxime blot. (C) Na slici je prikazana relativna promjena razine karbonilacije izoliranih RBD i KRAS proteina nakon izlaganja različitim dozama UV-zračenja (0, 0,3 i 0,6 J/cm²). Dobivene vrijednosti izražene su relativno u odnosu na neozračenu kontrolu (0 J/cm²) (n = 3).

3.1.4. Spektrometrija masa KRAS proteina otkriva povećanje oksidativnih modifikacija nakon UV zračenje

U suradnji sa Zavodom za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (doc. dr. sc. Marko Močibob), dodatnim analizama masenom spektrometrijom identificirane su specifične modifikacije povezane s karbonilacijom KRAS proteina. Kompleksna mješavina peptida dobivena tripsinskom digestijom analizirana je nanoUHPLC-MS/MS pristupom.

Među identificiranim modifikacijama utvrđene su pretvorbe Arg u Gsa kiselinu, Lys u Aly, Met u Asa kiselinu, kao i karbonilacija Ala, Ile, Leu, Val i Pro. Identificirana su 2321 proteina, s ukupno 44 404 PSM-ova. KRAS (Uniprot: P01116) je protein s najvećim brojem PSM-ova (2370), uz pokrivenost sekvence od 85 % (Slika 21 A). Od toga je 1343 PSM-ova pripadalo kontrolnim, a 1027 uzorcima tretiranim UV-zračenjem. Sva mjesta modifikacija unutar KRAS proteina prikazana su na slici 21 B, dok se detalji o modifikacijama nalaze u prilogu 1 za ne ozračeni i ozračeni uzorak (Prilog 2).

(A)



(B)

1 MTEYKLVVVG	11 AGGVGKSALT	21 IQLIQNHFVD	31 EYDPTIEDSY	41 RKQVVIDGET	51 CLLDILD TAG
			„Switch I” regija		
61 QEEYSAMRDQ	71 YMRTGEGFLC	81 VFAINNTKSF	91 EDIH HYREQI	101 KR VKD SEDVP	111 MV LVGNKCDL
121 PSRTVDTKQA	131 QDLAR SYGIP	141 FIETSAKTRQ	151 GVDDAFYTLV	161 REIRKHKEKM	171 SKDGKKKKKK
181 SKTKCVIM					

■ Mjesta modifikacije na KRAS proteinu tretiranim s UV-om
■ Mjesta modifikacije na KRAS proteinu u kontrolnom uzorku

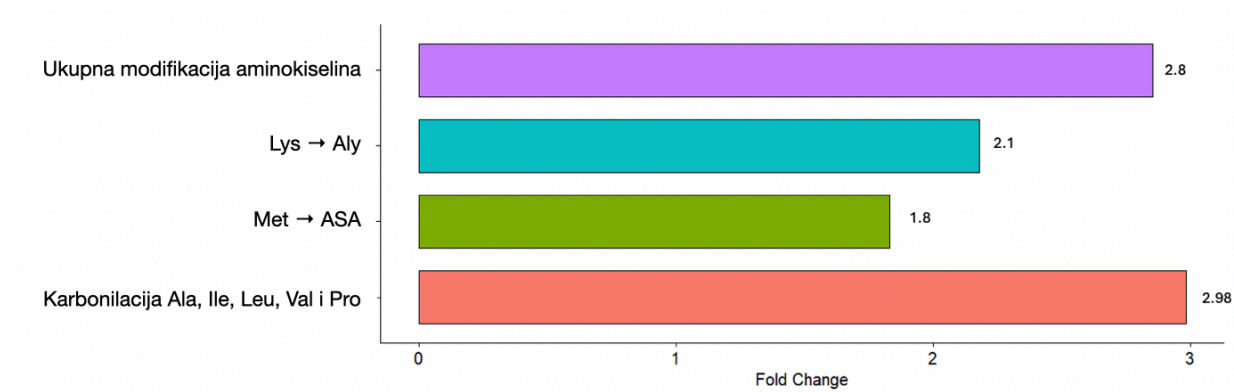
Slika 21. (A) Shematski prikaz pokrivenosti proteinske sekvence KRAS proteina detektirane nanoUHPLC-MS/MS pristupom (B) Primarna struktura proteina KRAS s naznačenim mjestima modifikacije aminokiseline.

Zabilježena je povećana karbonilacija specifičnih aminokiselina u tretiranim uzorcima, uključujući učestalije modifikacije poput: karbonilacije Ala, Ile, Leu, Val i Pro, Arg u Gsa, Met u Aas i Lys u Aly (Tablica 2). Uz navedene modifikacije identificirana je i karbamidometilacija cisteina, standardna modifikacija koja se uvrštava u analizu kako bi se eliminirala oksidacija cisteina koja se može dogoditi tijekom pripreme uzoraka te se pri analizi podataka zanemaruje (Prilog 1 i 2).

Tablica 2. Broj PSM-ova s karbonilacijskim modifikacijama

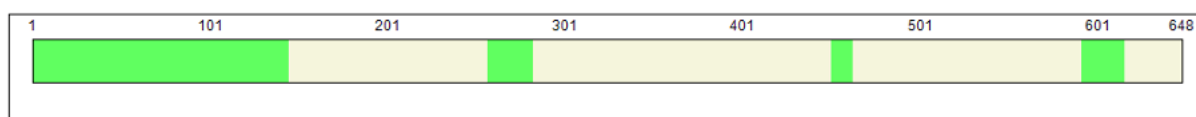
	Broj PMS-ova s modifikacijama	
	KRAS	KRAS ox
Karbonilacija Ala, Ile, Leu, Val i Pro	25	57
Arg -> Gsa kiselinu	0	3
Met -> Asa kiselinu	5	7
Lys -> Aly	3	5
Ukupno	33	72

Ukupan broj detektiranih modifikacija na aminokiselinskim ostacima iznosio je 72 u UV-tretiranim uzorcima, naspram 33 u kontrolnim. Nakon normalizacije prema broju PSM-ova (1027 za kontrolni uzorak, te 1343 za ozračeni uzorak) procijenjen je omjer karbonilacije od približno 2,9, što upućuje na izraženo povećanje oksidativnih modifikacija izazvanih UV-zračenjem (Slika 22).



Slika 22. Shematski prikaz relativne promjene (engl. *fold change*) PSM-ova koji sadrže modifikacije karakteristične za karbonilaciju KRAS proteina.

U uzorcima koji su sadržavali RBD domenu detektirano je 1306 PSM-ova koji su pripadali RBD-u. Iako taj broj ukazuje na uspješnu identifikaciju, količina RBD-a u uzorku bila je znatno manja u odnosu na KRAS. Istodobno, detektirani su brojni drugi proteini u uzorcima, najvjerojatnije kontaminanti iz imunopurifikacije, te su imali veći broj PSM-ova od samog RBD-a (Slika 23). Kvaliteta MS-podataka ne odstupa značajno od one za KRAS, što upućuje da je vjerojatno došlo do gubitka dijela uzorka tijekom imunoprecipitacije ili pripreme za MS analizu. U skladu s tim, uočeno je tek nekoliko karboniliranih peptida koji pripadaju RBD-u, pri čemu većina pripada kontrolnim uzorcima (Prilog 3). Sveukupno, analiza RBD-a dala je ograničene i varijabilne rezultate, te podaci nisu dalje analizirani.



Slika 23. Shematski prikaz pokrivenosti proteinske sekvence RBD proteina detektirane nanoUHPLC-MS/MS pristupom

3.1.5. Molekularno modeliranje interakcija između RBD i KRAS proteina

U sklopu suradnje s Odjelom za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu (izv. prof. dr. sc. Željka Sanader Maršić), provedeno je molekularno modeliranje te analiziran utjecaj karbonilacije na ostatke K42, I46 i R149 unutar KRAS proteina koje su detektirane uz pomoć masene spektrometrije te njihov učinak na interakciju s RBD domenom. Rezultati su sažeti u tablici 3, koja kvantitativno prikazuje gubitak interakcija, dok slika 24 prikazuje interakcije na molekularnom modelu.

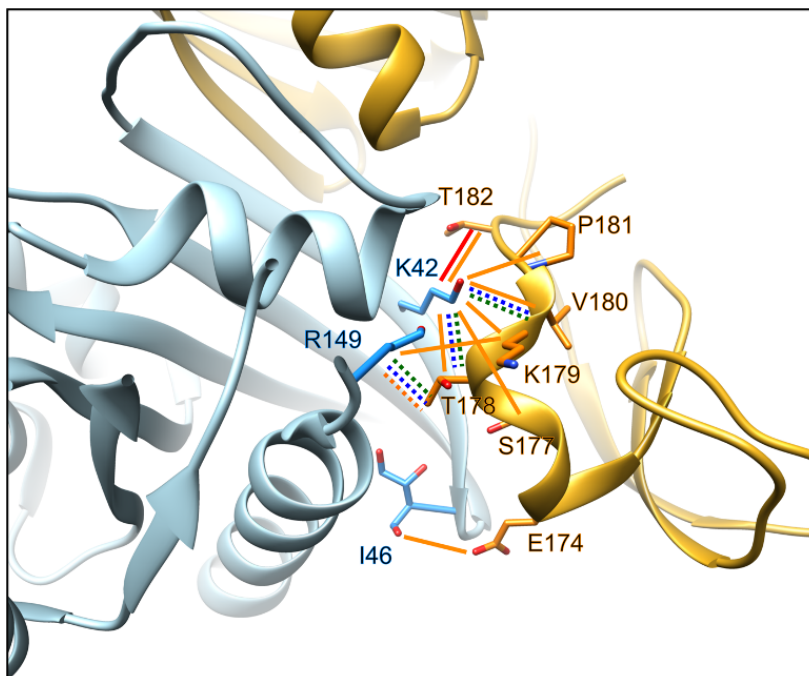
Uočeno je da oksidativne modifikacije navedenih ostataka na KRAS-u rezultiraju smanjenjem broja međuproteinskih kontakata između RBD-a i KRAS-a. Ukupno je detektirano sedam atomskih kontakata manje, uključujući gubitak tri vodikove veze (K42 i R149), tri polarne interakcije (K42 i R149) te jedne nevezujuće (engl. *nonbonding*) interakcije (R149).

Tablica 3. Broj interakcija između humanog KRAS ostataka K42, R149 i I46 (u obliku divljeg tipa i nakon oksidacije) i ostataka RBD domene. Interakcije za oksidirani oblik I46 očuvane su bez obzira na položaj karbonilacije (na atomima CD1, CG1 i CG2), te su stoga prikazane u jedinstvenom stupcu.

	K42		R149		I46	
	Divlji tip	Oksidirani	Divlji tip	Oksidirani	Divlji tip	Oksidirani (CG1,CG2 ili CD1)
Vodikove veze	2	0	1	0	0	0
Polarni kontakti	2	0	1	0	0	0
Nevezujuće interakcije	6	6	2	1	1	1
Hidrofobne veze	1	1	0	0	0	0

Što se tiče ostatka I46, oksidacija uvodi karbonilnu skupinu u bočni lanac, a to se može dogoditi na atomima ugljika CD1, CG1 ili CG2. Kako bi se procijenio utjecaj lokacije karbonilacije, modelirana je prisutnost karbonilne skupine na svim navedenim položajima. Analiza preklapanja interakcija pokazala je da različite lokacije

karbonilacije na I46 nisu utjecale na njegove kontakte s RBD-om, jer se radilo o nevezanim interakcijama koje su se očuvale i nakon karbonilacije.



Slika 24. Molekularno modeliranje interakcije između ljudskog RBD i KRAS uz specifične modifikacije nastale karbonilacijom (PDB: 6XI7). Interakcije između RBD-a (žuto; ostaci E174, S177, T178, K179, V180, P181 i T182 prikazani štapićastim prikazom) i KRAS-a (plavo; ostaci K42, I46 i R149 prikazani štapićasti prikazom). Linije prikazuju interakcije: isprekidane linije označavaju gubitak interakcije u oksidiranom obliku, dok pune linije označavaju očuvane interakcije. Plave linije predstavljaju vodikove veze, zelene polarne kontakte, narančaste nevezujuće (engl. *nonbonding*) interakcije, dok crvena linija prikazuje hidrofobnu vezu.

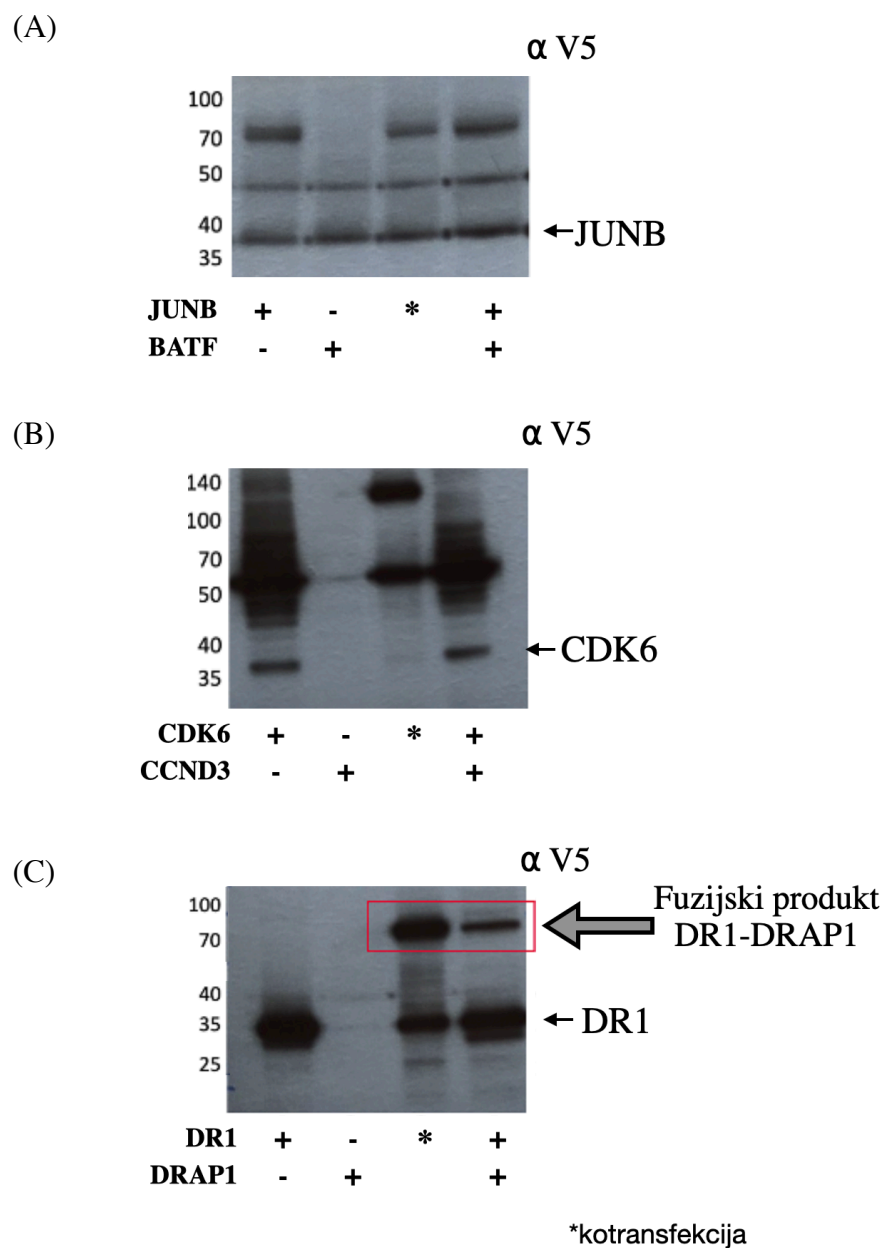
3.1.6. Testiranje SIMPL konstrukata za interakcije u „vanstaničnim“ uvjetima

U ovom radu dodatno su ispitani već dizajnirani SIMPL konstrukti kao potencijalni kandidati za analizu drugih relevantnih protein-protein interakcija. Kako bi se identificirali konstrukti pogodni za proširenje istraživanja, proveden je probir njihovog međusobnog vezanja primjenom prethodno opisane modificirane SIMPL metode. Cilj je bio identificirati one parove proteina čija je interakcija dovoljno snažna da se može detektirati ne samo unutar stanice, već i u „vanstaničnim“ uvjetima, gdje se koriste stanični lizati s eksprimiranim SIMPL konstruktima.

Eksperimentalni postupak slijedio je istu metodologiju kao u prethodnim analizama: HEK293FT stanice bile su transfektirane različitim parovima SIMPL konstrukata, nakon čega su pripremljeni stanični lizati. Ti su lizati potom bili podvrgnuti interakciji pod istim uvjetima kao što su ranije opisani za korištenu SIMPL metodu. Cilj je bio potvrditi da se ista interakcija koja se uočava u živim stanicama tijekom kotransfekcije može reproducirati i u reakcijskom sustavu izvan stanice.

Ukupno su testirana tri različita para SIMPL konstrukata. Za par JUNB i BATF, molekularna masa JUNB proteina iznosi približno 38 kDa, a fuzijski produkt interakcije JUNB–BATF očekuje se kao vrpca oko 50 kDa (Slika 25 A). Detekcija ovog interakcijskog para nije bila uspješna, jer su vrpce prisutne u svim uvjetima, neovisno o različitim transfekcijskim uvjetima. Za interakciju CDK6 i CCND3 očekuje se vrpca oko 70 kDa. U lizatima kotransfekcije i u „vanstaničnim“ uvjetima detektirana je vrpca približno te mase, no ista vrpca pojavljuje se i u uzorku s ekspresijom CDK6 proteina, što otežava interpretaciju (Slika 25 B).

Među testiranim parovima, jedino je interakcija DR1 i DRAP1 pokazala dovoljno snažnu vezu da se može pouzdano detektirati i u „vanstaničnim“ uvjetima. Fuzijski produkt DR1–DRAP1 detektiran je kao vrpca oko 75 kDa u kotransfekciji stanica kao pozitivnoj kontroli te u „vanstaničnim“ uvjetima, bez prisutnosti nespecifičnih vrpca u drugim uvjetima (Slika 25 C). Stoga bi interakcija DR1–DRAP1 mogla biti zanimljiva za daljnja istraživanja u kontekstu praćenja učinaka oksidativnih oštećenja na PPI, gdje bi taj interakcijski par bio korišten za provedenje već opisanih eksperimentalnih uvjeta.



Slika 25. Analiza novih potencijalnih interakcijskih partnera pomoću metode SIMPL. Za tri različita para proteina (A) JUNB/BATF, (B) CDK6/CCND3 i (C) DR1/DRAP1 testirana je mogućnost njihove međusobne interakcije kroz tri eksperimentalna uvjeta: pojedinačna ekspresija svakog partnera (linije 1 i 2), kotransfekcija u stanicama HEK293FT (linija 3), te „vanstanična“ interakcija staničnih lizata (linija 4). Za analizu je korišteno α -V5 protutijelo koje detektira biljeg na proteinu JUNB, CDK6 i DR1, te na fuzijskom produktu interakcije. Crveni okvir označava vrpce karakteristične za nastanak fuzijskog proteina u „vanstaničnim“ uvjetima.

3.1.7. Rasprava rezultata utjecaja oksidacije na protein-protein interakcije i perspektive daljnjih istraživanja

Oksidativni stres predstavlja jedan od ključnih čimbenika koji utječu na funkcionalni integritet proteina unutar stanice. ROS nastaje kao nusprodukt normalnih metaboličkih procesa, a njihova prekomjerna akumulacija može dovesti do oksidativnih modifikacija proteina koje narušavaju njihovu funkciju. Mehanizmi kojima ROS moduliraju protein-protein interakcije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, iako je jasno da takve modifikacije mogu imati posljedice na staničnu signalizaciju i homeostazu. U ovom radu fokus je bio na modelni sustav RBD-KRAS, gdje KRAS, kao centralni regulator MAPK/ERK puta, ovisi o preciznoj interakciji s RBD domenom c-RAF kinaze za prijenos signala. Razumijevanje kako oksidativni stres utječe na ovu interakciju pruža vrijedan uvid u molekularne mehanizme oksidativnog oštećenja i potencijalne puteve za terapijsku intervenciju.

Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na značajan utjecaj oksidativnog stresa na interakciju između KRAS proteina i njegove vezujuće domene RBD, vjerojatno zbog strukturnih promjena uzrokovanih oksidacijom koje narušavaju njihovu konformacijsku kompatibilnost. Intenzitet gubitka interakcije ovisi o dozi UV-zračenja, što potvrđuje da oksidacijsko oštećenje u ovom modelu raste s povećanjem doze. Oksidativna oštećenja inducirana UV-zračenjem dovela su do gubitka RBD-KRAS interakcije, što implicira strukturnu i funkcionalnu destabilizaciju KRAS proteina. Uočeni učinci u skladu su s ranijim izvješćima koja upućuju na to da oksidativni stres može utjecati na GTP-vezanje, membransku lokalizaciju i signalnu aktivaciju RAS proteina (Heo i Campbell 2005).

Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju da oksidacija, osobito kada zahvaća oba proteina istovremeno, značajno narušava njihovu sposobnost međusobnog vezanja, što može imati važne funkcionalne posljedice za signalne puteve u kojima sudjeluje KRAS. KRAS je ključni regulator brojnih staničnih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje, kroz aktivaciju MAPK/ERK signalnog puta (Cox i sur. 2014), pri čemu njegova funkcionalna aktivnost ovisi o pravilnoj konformaciji i sposobnosti interakcije s neposrednim faktorima poput RAF kinaza.

Provedena analiza metodom Oxim blot pokazala je značajan porast karbonilacije KRAS-a, a uz pomoć spektrometrije masa detektirana je promjena na ostacima K42, R149 i I46, koji se nalaze u neposrednoj blizini interakcijske površine s RBD-om. Molekularno modeliranje tih promjena pokazalo je gubitak kritičnih vodikovih i polarnih veza koje stabiliziraju kompleks.

Dobiveni rezultati dodatno proširuju strukturalna saznanja o RBD-KRAS interakciji uključivanjem perspektive oksidativnih oštećenja na ostacima koji do sada nisu bili prepoznati kao ključni u veznom sučelju. Karbonilacija ostataka K42 i R149, potvrđena spektrometrijom masa i analizirana molekulskim modeliranjem, rezultirala je gubitkom ukupno sedam međuproteinskih kontakata, uključujući tri vodikove i tri polarne interakcije. Iako se K42 i R149 ne nalaze unutar „*switch I*” regije koja tradicionalno dominira u veznim interakcijama, njihova uloga u stabilizaciji kompleksa jasno se očituje kroz gubitak kontaktnih površina. S druge strane, oksidacija I46 - aminokiseline koja sudjeluje u hidrofobnim, nevezanim interakcijama - nije dovela do značajnog gubitka kontakata.

Funkcionalno gledano, smanjenje afiniteta RBD-KRAS interakcije kao posljedica karbonilacije može imati izravne posljedice na MAPK/ERK signalni put. MAPK signalizacija je osjetljiva na oksidativni stres, što može dovesti do disfunkcije aktivacije ERK1/2 (Rezatabar i sur. 2019). U kontekstu starenja, regulacija RAS/MAPK puta igra važnu ulogu u staničnom homeostatskom odgovoru (Deschênes-Simard i sur. 2013), a smanjen signal može predstavljati oblik negativne regulacije proliferacijskih signala u uvjetima povećanog oksidativnog stresa. Gubitak stabilne interakcije s c-RAF-om može rezultirati zaustavljanjem staničnog ciklusa, diferencijacije ili apoptoze. Naše opažanje da karbonilacija smanjuje kontakt između RBD domene i KRAS-a može predstavljati molekularni pokazatelj smanjenog proliferativnog kapaciteta stanica izloženih oksidativnom stresu. Ovi rezultati također otvaraju mogućnost eksperimentalnog dizajna mutanata KRAS-a.

Prema istraživanju Petrova i Zagrovica (2011), karbonilacija hidrofilnih ostataka lizina i arginina funkcionalno je ekvivalentna uvođenju hidrofobnih, električki neutralnih supstitucija na tim pozicijama. Takva promjena bočnih lanaca mijenja površinsku hidrofobnost i raspodjelu naboja, što može utjecati na organizaciju i stabilnost vezanja s RBD domenom c-RAF-a. U tom kontekstu, zanimljivo bi bilo eksperimentalno ispitati može li se učinak karbonilacije oponašati ciljanim točkastim mutacijama na hidrofilnim ostacima lizina i arginina. Prvi korak bio bi uvođenje supstitucija koje oponašaju gubitak naboja i povećanje hidrofobnosti te analiza njihova učinka na interakciju RBD-KRAS, kako bi se utvrdilo pokazuju li sličan obrazac smanjena interakcije kao i nakon izlaganja UV-zračenju. Nakon toga, fokus bi se mogao usmjeriti na mutacije aminokiselina koje su u ovom radu definirane kao posebno osjetljive na oksidaciju, poput K42 i R149, radi ispitivanja njihovog pojedinačnog doprinosa stabilnosti kompleksa.

Osim toga, zanimljivo bi bilo ispitati i osjetljivost dobivenih mutanata na UV-zračenje, kako bi se procijenilo u kojoj mjeri promjene u naboju i hidrofobnosti utječu na njihovu osjetljivost na takvu vrstu oksidacije. Ovaj koncept je u skladu s klasičnim pristupima ciljane mutogeneze, koja je već pokazala da ciljane zamjene aminokiselina mogu modificirati osjetljivost proteina na oksidaciju i stabilnost interakcija (Estell, Brinton, and Russell 1985). Takav pristup omogućio bi razlikovanje između učinaka samih kemijskih modifikacija i strukturnih posljedica koje one uzrokuju, čime bi se dodatno razjasnio mehanizam redoks-osjetljivosti RBD-KRAS interakcije.

Poveznica s ranijim strukturnim istraživanjima dodatno podupire opravdanost ovakvog pristupa. Fabian i sur. (1994) pokazali su da male promjene u veznom sučelju RAS-RAF kompleksa mogu drastično promijeniti afinitet interakcije, čak i bez izravnog zahvaćanja „switch“ regija. Huynh i sur. (2020) su pak kvantificirali utjecaj membranske dinamike i prostorne orijentacije KRAS-a na sposobnost vezanja RAF1, pri čemu su male promjene u naboju i hidrofobnosti rezultirale preusmjeravanjem interakcijskih mreža. Nedavno istraživanje Trana i sur. (2023) dodatno je pokazalo da mutacije koje narušavaju lokalnu konformacijsku fleksibilnost KRAS-a mogu modulirati njegovu afinitetnu selektivnost prema različitim efektorima. Ciljane točkaste mutacije na aminokiselinama koje su se pokazale osjetljivima na oksidacijski stres mogle bi otkriti kako promjene u strukturnoj fleksibilnosti KRAS-a utječu na stabilnost i afinitet njegove interakcije s RBD domenom c-RAF-a, te time rasvijetliti mehanizme kojima oksidativno oštećenje trajno mijenja funkciju komponenti signalnog puta.

Osim što bi takva analiza doprinijela razumijevanju mehanizama oksidacijske regulacije KRAS funkcije, otvaraju se i potencijalne terapijske perspektive, poput dizajna KRAS varijanti s mutacijama koje štite ključne ostatke od karbonilacije. Takve „otpornije“ KRAS molekule mogle bi biti korisne u modelnim sustavima za testiranje lijekova u kontekstu tumora s visokim razinama ROS signalizacije (Liou i Storz 2010), gdje oksidativni stres igra ulogu u regulaciji proliferacije i preživljenja stanica.

U ovom dijelu istraživanja oksidativni stres induciran je primarno UV-zračenjem, koje može djelovati izravno i neizravno na proteinske strukture. Izravno, UV fotoni uzrokuju pobuđivanje aromatskih aminokiselina poput triptofana i tirozina, što rezultira stvaranjem ROS-a. Neizravno, UV-zračenje može aktivirati fotosenzibilizatore prisutne u uzorku, koji potom generiraju ROS i posreduju oksidaciju bočnih lanaca proteina (Rastogi i sur. 2010; Cabiscol i sur. 2000).

Kako bi se ispitalo može li oksidacija izazvana kemijskim oksidansom proizvesti sličan učinak, u sljedećem koraku primijenjen je vodikov peroksid (H_2O_2) kao alternativni pristup. Rezultati su pokazali da porast koncentracije H_2O_2 dovodi do postupnog gubitka interakcije između RBD i KRAS proteina, s izraženim slabljenjem signala fuzijskog produkta pri višim koncentracijama. Ovaj rezultat upućuje na strukturno oštećenje i destabilizaciju interakcija, vjerojatno kao posljedicu oksidacije osjetljivih aminokiselinskih ostataka (Dalle-Donne i sur. 2003). Za razliku od oksidacije UV-zračenjem, koja često zahvaća lokalizirana mjesta unutar proteina, H_2O_2 djeluje difuznije i može inducirati stvaranje hidroksilnih radikala ($\bullet\text{OH}$) putem Fentonove reakcije, osobito u prisutnosti prijelaznih metala (Stadtman i Levine 2003). Ti radikali reagiraju s visokom nespecifičnošću te mogu uzrokovati karbonilaciju ostataka prolina, arginina, lizina i treonina, čime se trajno mijenja konformacija i stabilnost proteina (Levine i sur. 1999). Ipak, H_2O_2 nije korišten u daljnjem tijeku istraživanja zbog moguće nekompatibilnosti s imunoprecipitacijom i rizika od nespecifičnih interakcija koje zaostali oksidans može uzrokovati (Han i sur. 2019; Rogowska-Wrzesinska i sur. 2014).

S obzirom na složenost oksidacijskih procesa i raznolikost mogućih mehanizama, u budućim bi istraživanjima bilo relevantno ispitati i druge oksidanse, poput kombinacije željeza i askorbata ili klasične Fentonove reakcije, koje stvaraju visoko reaktivne slobodne radikale s različitim kemijskim selektivnostima (Duarte i sur. 2007). Takvi pristupi mogli bi proizvesti specifične obrasce oksidacije ovisno o tipu oksidansa i reaktivnosti prema pojedinim aminokiselinama. Time bi se moglo utvrditi stvara li svaki oksidans prepoznatljiv „otisak“ oksidacije na KRAS proteinu i ima li taj obrazac različit učinak na njegov afinitet vezanja za RBD domenu.

U ovom radu karbonilacija je izazvana UV-zračenjem kako bih se ispitao učinak oksidacije na interakciju KRAS-a s RBD domenom c-RAF-a. Gubitak interakcije je detektiran korištenjem „starije“ SIMPL metode. SIMPL metoda pouzdano pokazuje prisutnost interakcije, ali ima ograničenu osjetljivost i ne omogućuje kvantitativnu procjenu promjena interakcije nakon oksidacije. Nedavno razvijena SIMPL2 metoda, koja koristi luminescenciju podijeljene luciferaze (Yao i sur. 2024), omogućila bi precizniju i kvantitativnu analizu smanjenja interakcije uzrokovanog oksidacijom. Karbonilacija postignuta UV-zračenjem služi kao praktičan način za generiranje snažnog oksidativnog stanja i dobivanje jasne razlike između tretiranih i netretiranih uzoraka, ali ne omogućuje kontrolu nad vrstom i intenzitetom modifikacija te ne odražava kemijsku složenost *in vivo* oksidativnog stresa. Zbog toga ovaj model prve-

nstveno pokazuje da je KRAS osjetljiv na oksidaciju i da oksidativne modifikacije mogu destabilizirati njegovu interakciju s c-RAF-om. Taj zaključak vrijedi u općem smislu i potvrđuje da je KRAS strukturalno ranjiv na karbonilaciju, osobito u dijelovima uključenima u interakcijsku površinu. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja za povezivanjem dobivenih rezultata s fiziološkim ili patofiziološkim procesima. Potvrda bi zahtijevala stanične modele u kojima su razine ROS-a modulirane farmakološki ili genetski, kao i primjenu drugih izvora oksidativnog stresa koji bolje oponašaju uvjete u tumorskom mikrokruženju ili tijekom kronične upale. Ograničenja UV pristupa zato ne umanjuju vrijednost dobivenih podataka, ali određuju njihovu interpretaciju. Rezultati jasno pokazuju da KRAS može podnijeti samo ograničeni stupanj oksidativnih modifikacija prije gubitka interakcijske funkcije, dok je procjena fiziološke učestalosti takvih događaja moguća tek u biološki relevantnijim sustavima.

Na temelju dobivenih rezultata, logičan sljedeći korak bio bi proširiti istraživanje na druge protein-protein interakcije i njihovu osjetljivost na oksidativne modifikacije. U ovom radu, kao potencijalni dodatni par identificirana je interakcija DR1/DRAP1, za koju je poznato da ima ključnu ulogu u represiji transkripcije. S obzirom na njezinu funkcionalnu važnost i nuklearnu lokalizaciju, bilo bi zanimljivo ispitati pokazuje li sličnu osjetljivost na oksidacijski stres kao RBD-KRAS interakcija.

Ovakav pristup ne bi bio ograničen samo na DR1/DRAP1, već bi se mogao primijeniti i na druge poznate interakcijske parove koji sudjeluju u staničnoj regulaciji. Ispitivanjem više različitih interakcija pod kontroliranim oksidativnim uvjetima mogli bismo identificirati širi obrazac oksidacijski ranjivih kompleksa.

Dosadašnja literatura pokazuje da oksidacija specifičnih proteina može dovesti do disocijacije funkcionalnih kompleksa, čime se remeti regulacija gena, signalna transdukcija i održavanje imunosne homeostaze (Dalle-Donne i sur. 2006; Go i Jones 2013), što ističe važnost ispitivanja osjetljivosti proteina na oksidaciju i njezinog utjecaja na staničnu regulaciju.

3.2. Kvantifikacija karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi: razvoj metode i primjena

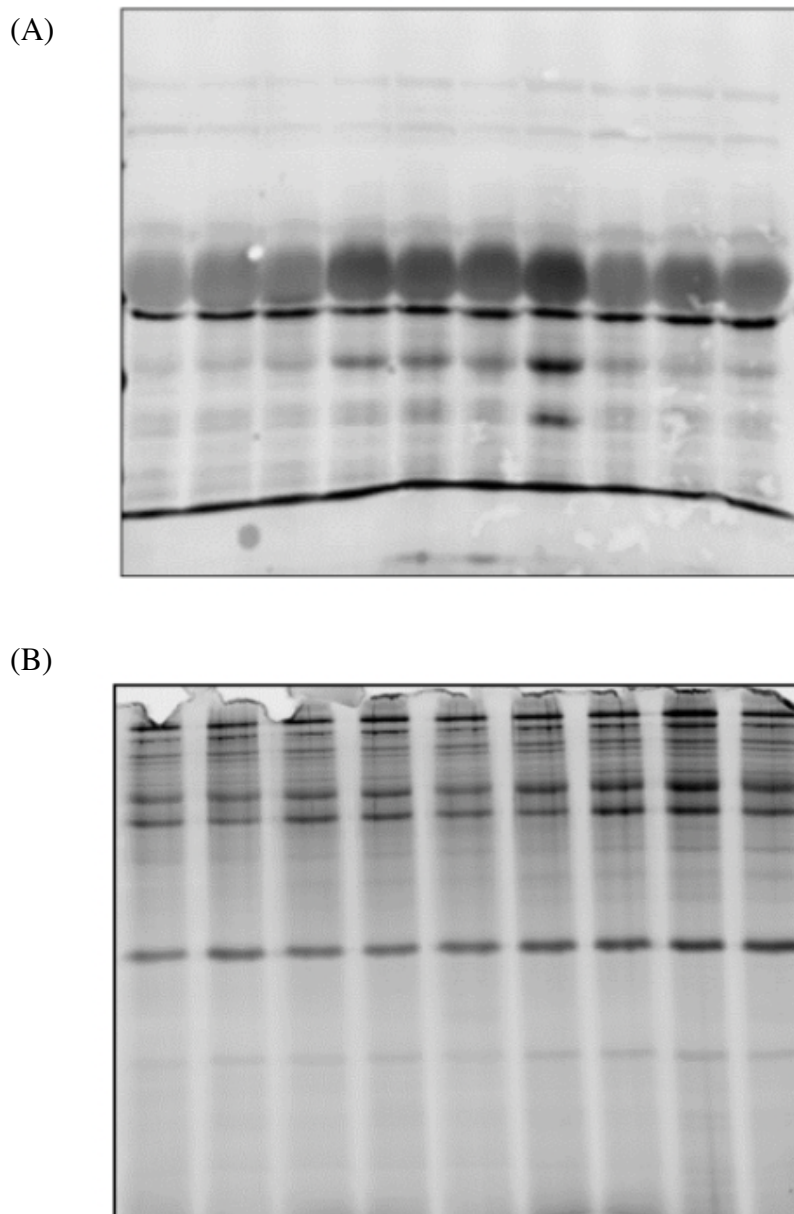
U ovom dijelu istraživanja optimizirana je metoda za određivanje karbonilnih skupina na proteinima u ljudskoj plazmi. Istraživanje je provedeno na uzorcima plazme iz biobanke „10 001 Dalmatinac“ (Rudan i sur. 2009). Za određivanje ukupne karbonilacije proteina korištena je metoda 1-D Oxi, dok je za detekciju karbonilacije pojedinačnih proteina korištena optimizirana 2-D OxiDIGE metoda.

3.2.1. Uklanjanje visoko zastupljenih proteina za poboljšanje proteomske analize

Kako bi se omogućila analiza manje zastupljenih karboniliranih proteina u kompleksnim uzorcima poput plazme, iz uzoraka su prethodno uklonjeni HSA i IgG primjenom afinitetne kromatografije.

U uzorcima plazme prije uklanjanja visoko zastupljenih proteina, jasno su vidljivi dominantni signali koji pripadaju HSA i IgG u uzorcima (Slika 26 A).

Analiza frakcije pokazuje da uklanjanje HSA i IgG, praćeno koncentriranjem pomoću centrifugalnih ultrafiltracijskih jedinica s molekularnim graničnim pragom 3 kDa (Slika 26 B), dovodi do „otvaranja“ proteinskog profila. Frakcije slabije zastupljenih proteina postaju bolje razlučive, što omogućuje precizniju detekciju karbonilacije i povećava osjetljivost metode. Time se znatno poboljšava mogućnost razlikovanja suptilnih promjena među uzorcima, što je ključno za istraživanja usmjerena na identifikaciju biomarkera oksidativnog stresa i procesa starenja.



Slika 26. 1D-Oxi analiza deset različitih uzoraka plazme prikazuje profil ukupnih proteina obojenih *SERVA Purple* bojom (A) prije i (B) nakon uklanjanja albumina (HSA) i imunoglobulina G (IgG) afinitetnom kromatografijom.

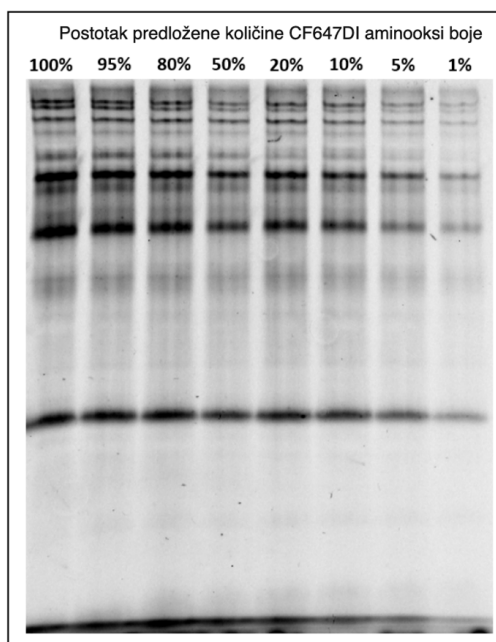
3.2.2 Optimizacija fluorescentnog označavanja karboniliranih proteina u plazmi pomoću CF647DI aminooksi boje

U ovom istraživanju, umjesto standardne Cy5 boje, primjenjena je modificirana Cy5 boja korištena s aminooksi skupinom za detekciju karbonila - CF647DI aminooksi. Reakciju aminooksi skupine s karbonilima preporučuje se provoditi na sobnoj temperaturi u trajanju od dva sata za aldehide i 5-10 sati za ketone, no kako bismo osigurali potpunu označenost svih karbonila, obilježavanje je provedeno preko noći na 4 °C uz potresanje pri 600 rpm i dodatak anilin-acetata kao katalizatora.

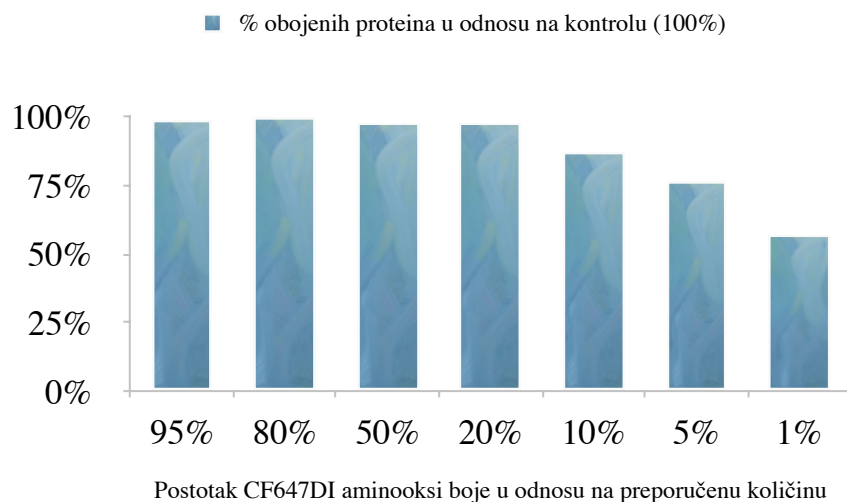
Standardni postupak podrazumijeva korištenje 50-molarnog viška CF647DI aminooksi boje u odnosu na količinu proteina u uzorku. Međutim, obzirom na činjenicu da nisu svi proteini u plazmi podložni karbonilaciji, pristupilo se optimizaciji količine fluorescentne boje. Cilj optimizacije bio je izbjeći nespecifično vezanje boje na nekarbonilirane proteine i time smanjiti pozadinski signal, poboljšati specifičnost označavanja te osigurati kvantitativno pouzdano označavanje isključivo karboniliranih ostataka. U svrhu optimizacije količine CF647DI aminooksi boje korištene za označavanje karboniliranih proteina, provedeno je testiranje različitih volumnih udjela boje u odnosu na količinu korištenu u kontrolnom uzorku. Kontrolni uzorak je sadržavao količinu boje prema preporuci proizvođača, koja odgovara 50-molarnom višku u odnosu na količinu proteina (100 %). Taj je uzorak uspoređen s uzorcima u koje je dodano 95 %, 80 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 % i 1 % volumena boje u odnosu na kontrolni. Učinkovitost označavanja pri svakom od navedenih uvjeta prikazana je na slici 27.

Rezultati optimizacije pokazali su da se korištenjem 20 % preporučene količine boje postiže označavanje 98 % karbonilnih skupina u odnosu na kontrolni uzorak, dok se i pri 10 % preporučene količine može označiti 87 % karbonila, što se također smatra prihvatljivim u određenim eksperimentalnim uvjetima. Na temelju tih rezultata definirane su prikladne količine boje za pojedine metode: za 1-D Oxi koristilo se 0,2 µL CF647DI boje na 15 µg proteina (što odgovara 13 % preporučene količine), dok se za 2D-OxiDIGE koristilo 1,2 µL boje na 70 µg proteina, što odgovara 17 % preporučene količine. Ovim pristupom postignuto je učinkovito i ekonomično označavanje karboniliranih proteina uz očuvanje kvantitativne pouzdanosti i specifičnosti metode.

(A)



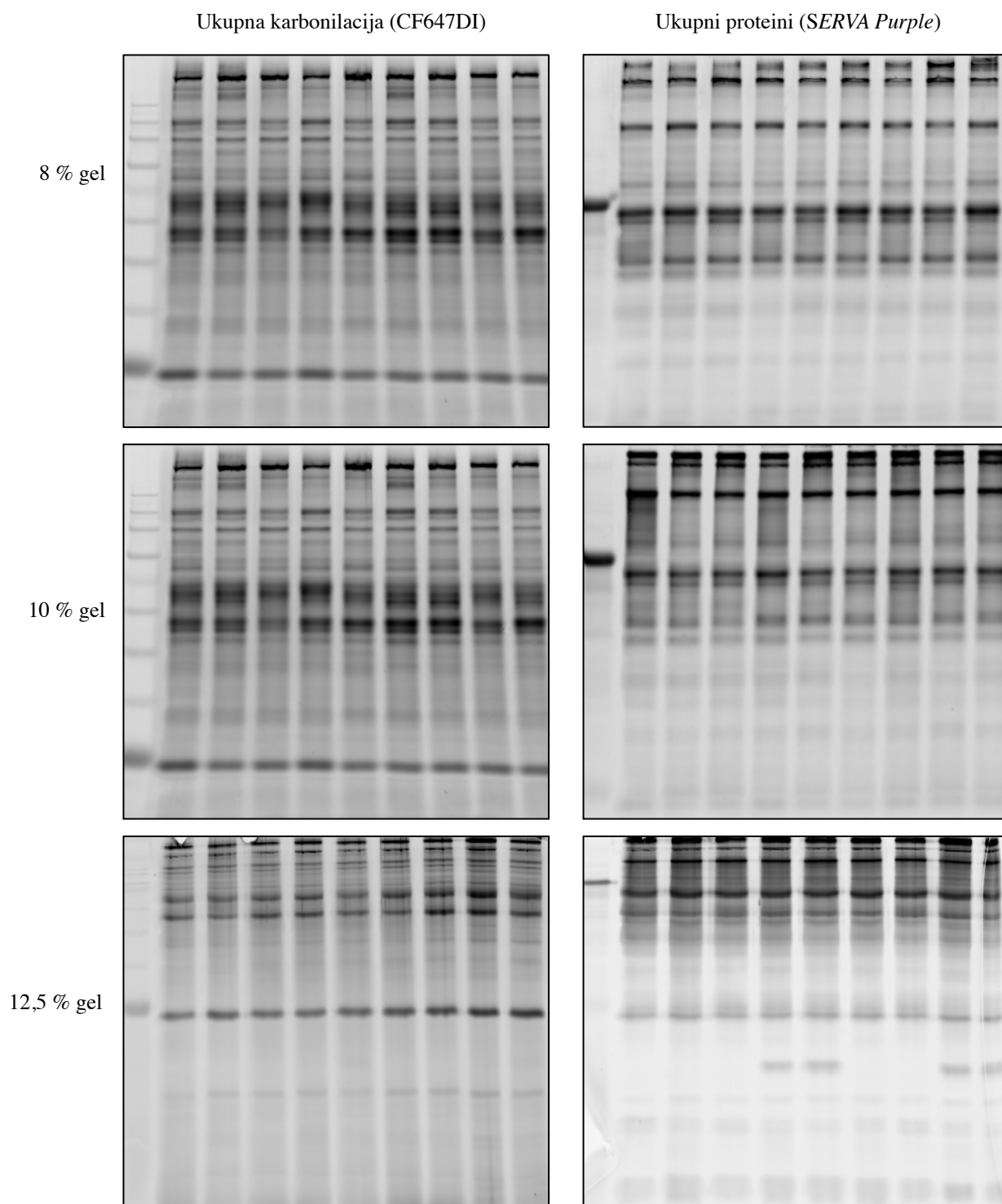
(B)



Slika 27. Optimizacija postupka obilježavanja karboniliranih proteina CF647DI aminoski bojom ($n = 3$). (A) Kontrolni uzorak (100 %) uspoređen je s uzorcima u koje je dodano 95 %, 80 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 % i 1 % volumena CF647DI aminoski boje u odnosu na količinu korištenu u kontrolnom uzorku. (B) Prikaz kvantifikacije signala prikaznog gela.

3.2.3. Učinkovitost razdvajanja proteina pri različitim postocima akrilamidnog gela

Kako bi se ispitao utjecaj različitih postotaka razdvajajućeg gela na razlučivost proteinskih vrpca u SDS-PAGE analizi, istih devet bioloških replikata plazmatskih uzoraka, nakon uklanjanja visoko zastupljenih proteina te označavanja CF647DI aminooksi bojom, nanoseno je na gelove koji su sadržavali 8 %, 10 % i 12,5 % poliakrilamida u razdvajajućem sloju gela. Nakon elektroforeze, ukupni proteini su vizualizirani bojanjem bojom *SERVA Purple*. Kao što je prikazano na slici 28, najbolja razlučivost proteinskih vrpca postiguta je s 10 %-tnim razdvajajućim slojem gela. Takav gel primijenjen je i u kasnijim 2-D analizama, gdje je također pokazao dobru razlučivost proteinskih točaka. Dobiveni rezultati u skladu su s ranije objavljenim podacima iz literature (Desrosiers i sur. 2007; Laborde i sur. 2014).



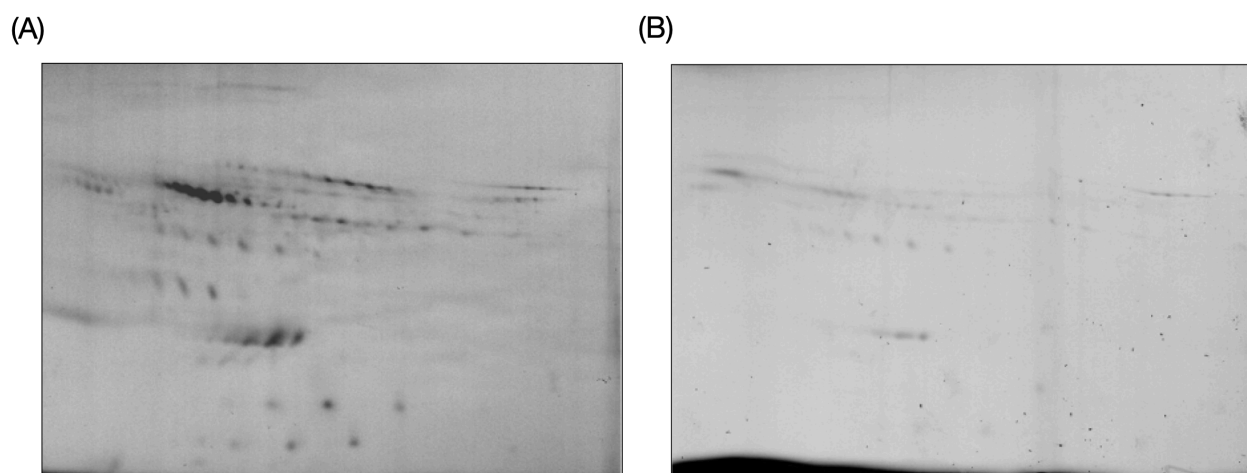
Slika 28. Prikaz 1-D Oxi gelova bojanih CF64DI aminooksi bojom (lijevo) za ukupnu karbonilaciju proteina i *SERVA Purple* bojom (desno) za vizulizaciju ukupnih proteina na gelovima s različitim postocima razdvajajućeg sloja.

3.2.4. Učinkovitost različitih puferских sustava u fluorescentnom označavanju proteina

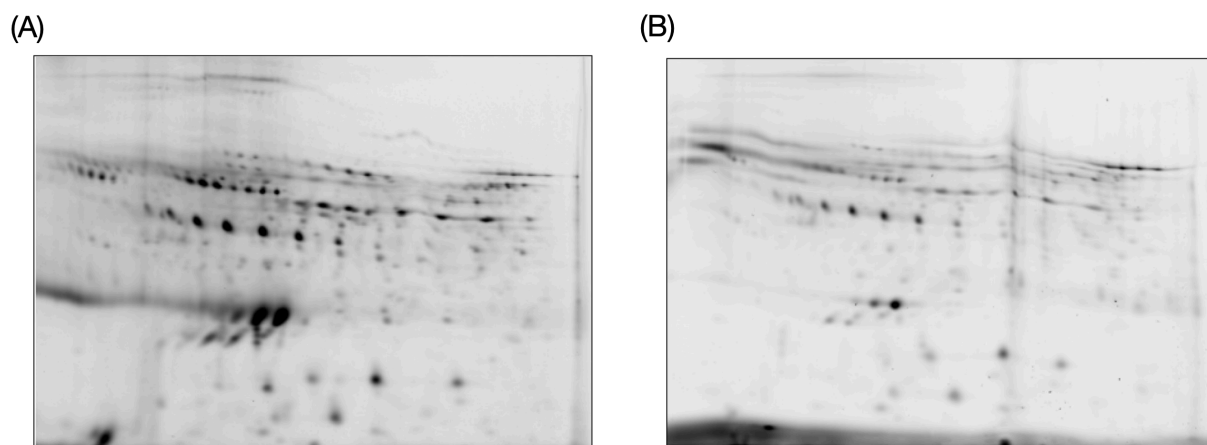
Prema uputama proizvođača za CyDye DIGE Fluor boje preporučuje se korištenje UTC pufera za pripremu uzoraka, u koje se zatim dodaju odgovarajuće fluorescentne boje (GE Healthcare 2005). Budući da su u ovom istraživanju uzorci plazme, nakon uklanjanja HSA i IgG, prevedeni u PBS pufer radi bojanja CF647DI bojom, ispitana je kompatibilnost PBS pufera s postupkom obilježavanja CyDye DIGE Fluor bojama. Isti uzorak je, prije označavanja CF647DI aminooksi i Cy3 bojama, pripremljen u dvama uvjetima: jednom u PBS, a drugi put u UTC puferu. Na taj je način dodatno ispitana i kompatibilnost CF647DI aminooksi boje s UTC puferom.

Na svaki gel nanesen je isti uzorak plazme označen s CF657DI aminooksi bojom za detekciju karbonilacije proteina, dok je ekspresija proteina detektirana pomoću obilježavanja s Cy3 bojom. Uzorci su zajedno s internim standardom kojim je u ovom slučaju bio isti uzorak plazme obilježen Cy2 bojom, naneseni na IPG traku. Gelovi su analizirani prateći protokol za 2D-OxiDIGE metodu.

Analizom slika pomoću programa SameSpots uspoređen je broj detektiranih točaka. Na temelju internog standarda detektirano je 868 točaka na slikama uzoraka u PBS puferu, dok je u uzorcima u UTC puferu detektirano 779 točaka. Uočeno je slabije označavanje karbonilnih skupina u uzorcima koji su sadržavali UTC pufer u usporedbi s onima u PBS puferu (Slika 29). Rezultati prikazani na slici 30 pokazuju da je i označavanje proteina Cy3 bojom bilo učinkovitije u uzorku koji je sadržavao PBS nego u onom koji je sadržavao UTC pufer.



Slika 29. 2D-DIGE analiza proteina iz istog uzorka plazme označenih CF647DI aminooksi bojom u različitim puferima. (A) Uzorak obojen CF647DI aminooksi bojom u PBS pufer, dok slika (B) prikazuje isti uzorak bojan CF647DI aminooksi bojom u UTC puferu.



Slika 30. 2D-DIGE analiza proteina iz istog uzorka plazme označenih Cy3 bojom u različitim puferima. **(A)** Uzorak obojen Cy3 bojom u PBS puferu. **(B)** Uzorak obojen Cy3 bojom u UTC puferu.

3.2.5. Procjena ponovljivosti optimizirane 2-D OxiDIGE metode

Ovaj dio istraživanja proveden je u suradnji s istraživačkom grupom projekta „10 001 Dalmatinac” s Medicinskog fakulteta u Splitu (prof. dr. sc. Ozren Polašek) s ciljem ispitivanja ponovljivosti i pouzdanosti novo optimizirane metode 2D-OxiDIGE za kvantifikaciju karbonilacije i ekspresije proteina u ljudskoj plazmi. Iz uzoraka krvne plazme dvanaest zdravih dobrovoljaca, uz pomoć programa SameSpots za analizu gelova, detektirano je ukupno 813 proteinskih točaka, pri čemu je svakoj točki dodijeljen jedinstveni broj. Signal očitao uz pomoć CF647DI aminooksi boje ukazuje na razinu karbonilacije u pojedinoj točki, odnosno proteinu, dok signal očitao Cy3 bojom označava razinu ekspresije.

Dobiveni podaci su zatim statistički obrađeni za procjenu tehničke ponovljivosti koja se temeljila se na izračunu koeficijenta varijacije, intraklasnog korelacijskog koeficijenta i Cronbachove alfe dobivenih normaliziranih podataka, a dobiveni podaci prikazani su u Tablici 4.

Koeficijent varijacije (CoV) definira se kao odnos standardne devijacije i aritmetičke sredine izražen u postocima i koristi se kao mjera relativne varijabilnosti unutar ponovljenih mjerenja. Niže vrijednosti upućuju na bolju ponovljivost. Dobiveni rezultati pokazali su da je koeficijent varijacije za podatke o ekspresiji proteina bio vrlo nizak, u većini slučajeva manji od deset posto. CoV za karbonilaciju bili su nešto viši (Tablica 4), što se može objasniti ovisnošću stupnja karbonilacije o količini

proteina u uzorku. Budući da manja ili veća količina proteina može proporcionalno utjecati na signal, različiti izvori varijabilnosti se naknadno zbrajaju, što rezultira većim ukupnim CoV-om.

Tablica 4. Koeficijenti varijacije (CoV), intraklasni korelacijski koeficijenti (ICC; dvosmjerni mješoviti model, mjera konzistentnosti) i Cronbachova alfa za ekspresiju i karbonilaciju proteina u plazmi kod 12 analiziranih ispitanika.

Godine, spol	Ekspresija proteina			Karbonilacija proteina (s eliminiranom točkom 355)		
	Koeficijent varijacije; srednja vrijednost $\pm$ std. dev (min-max)	ICC (95% interval pouzdanosti)	α^*	Koeficijent varijacije; srednja vrijednost $\pm$ std. dev (min-max)	ICC (95% interval pouzdanosti)	α^*
45, žena	11.0 $\pm$ 7.9 (0.3-50.0)	0.938 (0.931-0.945)	0.938	11.1 $\pm$ 7.5 (0.5-73.0)	0.760 (0.621-0.836)	0.812
64, žena	8.2 $\pm$ 6.5 (0.1-109.6)	0.972 (0.968-0.975)	0.972	8.2 $\pm$ 7.6 (0.2-164.9)	0.862 (0.843-0.879)	0.866
32, muškarac	6.8 $\pm$ 4.8 (0.1-39.7)	0.982 (0.980-0.984)	0.982	9.2 $\pm$ 5.8 (0.1-47.0)	0.819 (0.684-0.884)	0.866
65, žena	8.4 $\pm$ 5.0 (0.3-47.1)	0.979 (0.977-0.982)	0.979	8.1 $\pm$ 4.9 (0.7-50.4)	0.880 (0.863-0.895)	0.886
45, žena	8.6 $\pm$ 5.8 (0.7-62.8)	0.976 (0.974-0.979)	0.976	9.2 $\pm$ 5.4 (0.5-81.4)	0.806 (0.773-0.834)	0.820
58, žena	9.1 $\pm$ 5.7 (0.6-84.4)	0.977 (0.975-0.980)	0.977	9.3 $\pm$ 5.7 (0.7-93.0)	0.760 (0.732-0.786)	0.764
26, muškarac	7.8 $\pm$ 4.6 (0.3-29.4)	0.983 (0.980-0.984)	0.983	7.2 $\pm$ 4.8 (0.7-43.9)	0.906 (0.895-0.916)	0.907
24, muškarac	9.2 $\pm$ 6.5 (0.7-101.8)	0.975 (0.971-0.978)	0.976	8.1 $\pm$ 6.2 (0.8-114.4)	0.893 (0.880-0.904)	0.894
30, muškarac	8.4 $\pm$ 5.6 (0.7-49.7)	0.979 (0.975-0.983)	0.981	8.0 $\pm$ 5.4 (0.3-66.0)	0.893 (0.879-0.906)	0.897
28, muškarac	8.4 $\pm$ 5.7 (0.9-42.0)	0.980 (0.977-0.982)	0.981	7.4 $\pm$ 5.1 (0.6-68.3)	0.897 (0.885-0.908)	0.898
26, muškarac	9.4 $\pm$ 6.3 (0.8-95.1)	0.977 (0.966-0.983)	0.981	7.9 $\pm$ 5.4 (0.3-78.7)	0.888 (0.867-0.905)	0.897
26, muškarac	7.3 $\pm$ 6.5 (0.5-141.7)	0.986 (0.985-0.988)	0.986	7.0 $\pm$ 11.8 (0.4-322.8)	0.914 (0.904-0.924)	0.916

*Cronbachova alfa

Daljnjom analizom prepoznata je točka broj 355 koja je pokazivala značajno odstupanje u vrijednostima između ponovljenih mjerenja. Nakon što je ta točka uklonjena iz analize, vrijednosti intraklasnog korelacijskog koeficijenta, koji izražava stupanj podudarnosti između mjerenja iste varijable, dodatno su porasle.

Cronbachova alfa korištena je kao dodatna mjera unutarnje konzistencije, odnosno povezanosti između točaka unutar pojedinog uzorka ispitanika, koja dodatno mjeri

unutarnju konzistenciju rezultata unutar svakog uzorka ispitanika. Visoke vrijednosti Cronbachove alfe za ekspresiju proteina su se kretale između 0,938 i 0,986. Za karbonilaciju su vrijednosti bile nešto niže, u rasponu od 0,764 do 0,916, što je u skladu s dodatnom biološkom varijabilnošću povezanom s oksidativnim oštećenjima proteina. Sveukupno gledano, dobivene vrijednosti upućuju na to da je korištena metoda robusna i da daje konzistentne rezultate za oba analizirana parametra. Uz to, analizirana je povezanost između volumena točke, koji odgovara ukupnoj količini pojedinog proteina, i koeficijenta varijacije (Tablica 5). Utvrđena je snažna negativna korelacija, pri čemu se pokazalo da je varijabilnost veća kod točaka s manjim volumenom. Primjerice, kada su u analizu uključeni svi proteini ($n = 813$), prosječni individualni koeficijent varijacije iznosio je $8,39 \pm 4,42$. Uvođenjem pragova (engl. *cut-off*) vrijednosti volumena točke, broj proteina koji ulaze u analizu se smanjuje, a paralelno se smanjuje i prosječni CoV. Tako je pri pragu od 50 preostalo 799 proteina s prosječnim CoV-om od $8,12 \pm 2,75$, dok je pri pragu od 200 broj proteina smanjen na 606, uz CoV od $7,05 \pm 1,87$. Daljnjim povećanjem praga vrijednosti (*cut-off*), primjerice na 500 (420 proteina), prosječni CoV se smanjuje na $6,35 \pm 1,57$, a kod najvišeg praga od 2000, u kojem ostaje samo 86 proteina, postiže se najniža varijabilnost ($5,07 \pm 1,37$). Ovi rezultati jasno pokazuju da je kvantifikacija proteina niskog intenziteta zahtjevnija i podložnija većim odstupanjima, dok se pouzdanost mjerenja povećava s rastom intenziteta proteina.

Tablica 5. Usporedba praga vrijednosti volumena točaka 2D Oxi-DIGE analize i broja uključenih točaka u analizu te njihovih koeficijenata varijacije.

Volumen točaka	Broj detektiranih točaka	Prosječni individualni koeficijent varijacije (CoV) $\pm$ standardna devijacija
Svi proteini	813	$8,39 \pm 4,42$
50	799	$8,12 \pm 2,75$
100	732	$7,66 \pm 1,11$
150	667	$7,32 \pm 2,04$
200	606	$7,05 \pm 1,87$
250	562	$6,89 \pm 1,79$
500	420	$6,35 \pm 1,57$
1000	220	$5,66 \pm 1,37$
2000	86	$5,07 \pm 1,37$

Na temelju svih prikupljenih podataka može se zaključiti da metoda 2D-OxiDIGE pokazuje visoku ponovljivost i pouzdanost, osobito kod proteina višeg udjela u plazmi, te da je primjenjiva za detekciju razlika u karbonilaciji i ekspresiji proteina u različitim biološkim uzorcima.

3.3. Identifikacija potencijalnih biomarkera starenja temeljenih na karbonilaciji proteina

Nakon što je optimizirana metoda za detekciju karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi, sljedeći korak u istraživanju bio je primijeniti razvijeni pristup na veću skupinu zdravih ispitanika s ciljem identifikacije potencijalnih biomarkera starenja. Kao što je ranije navedeno, u ovom dijelu istraživanju koristili su se uzorci krvne plazme 100 unaprijed odabranih zdravih osoba pohranjeni u biobanci „10 001 Dalmatinac“. Konkretno, odabrani su biološki uzorci ispitanika iz kohorte Korčula, pri čemu populacija obuhvaća osobe u dobi od 18 do 83 godine. Ispitanici su bili podijeljeni po spolu: 40 muškaraca (20 - 83 godine) i 60 žena (18 - 75 godina) (Prilog 4).

Kriteriji odabira uzoraka bio je: odsutnost kroničnih bolesti povezanih s dobi (potvrđena medicinskom dokumentacijom i pregledima), dostupnost opsežnih genetskih podataka (uključujući SNP genotipizaciju, egzomsku i cjelogenomsku sekvencu). Ovaj podskup ispitanika, temeljen na uzorcima prikupljenima između 2007. i 2013. godine, čini reprezentativan model za istraživanje utjecaja oksidativnih oštećenja, posebice karbonilacije proteina.

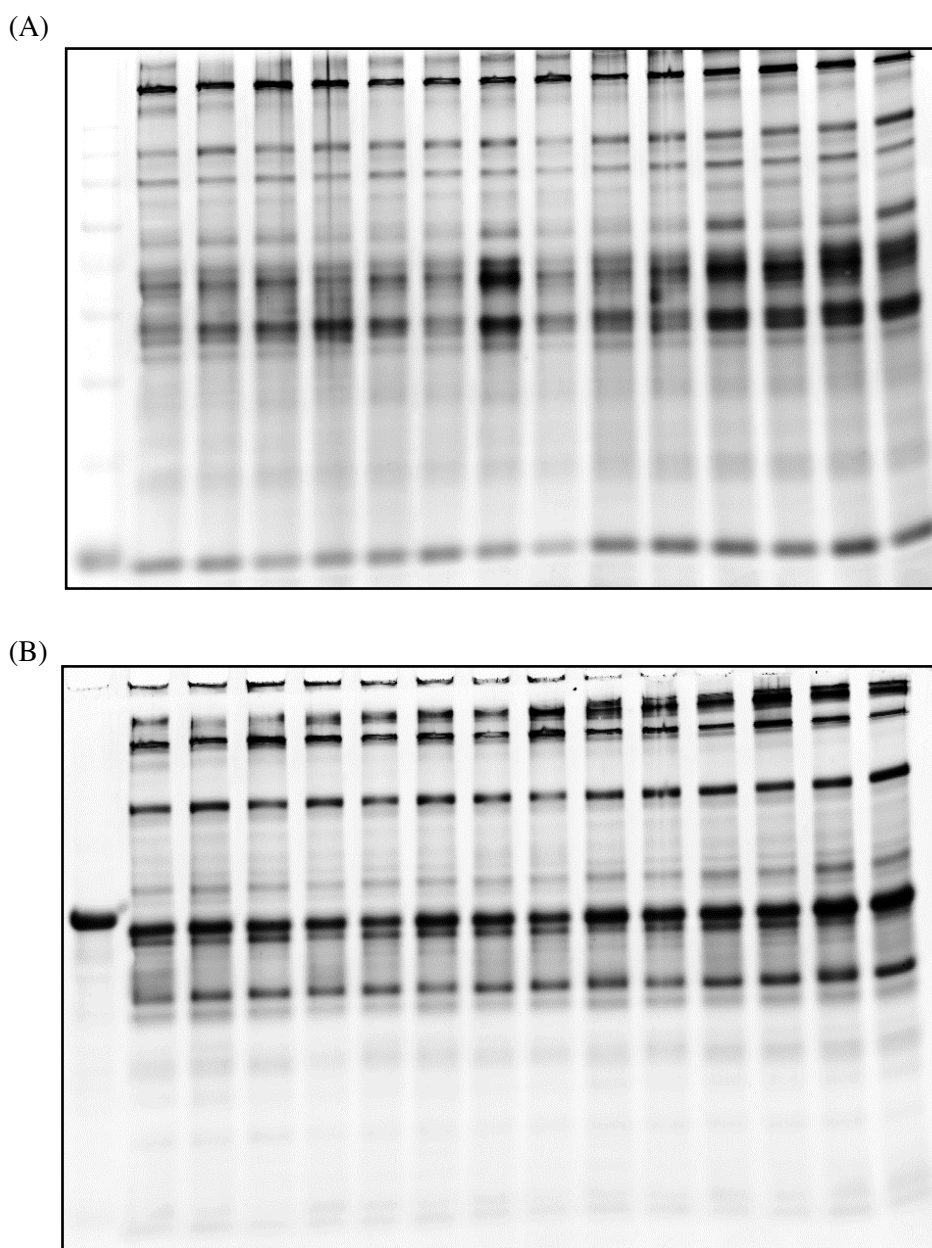
Primarni cilj bio je ispitati povezanost između karbonilacije proteina i zdrave kronološke dobi te istražiti moguću upotrebu razine karbonilacije proteina kao biomarkera biološke dobi.

3.3.1. Ukupna razina karbonilacije proteina u zdravih ispitanika različite dobi i spola

Kao početni korak u analizi uzoraka krvne plazme stotinu zdravih ispitanika provedeno je kvantitativno određivanje ukupne karbonilacije proteina metodom 1D-Oxi kako je opisano u poglavljima 2.2.3. i 2.2.4., uz primjenu optimiziranog udjela CF647Di aminooksi boje i odgovarajućeg postotka SDS-gela. Cilj ove analize bio je ispitati postoji li povezanost između ukupne razine karbonilacije i kronološke dobi i/ili spola ispitanika.

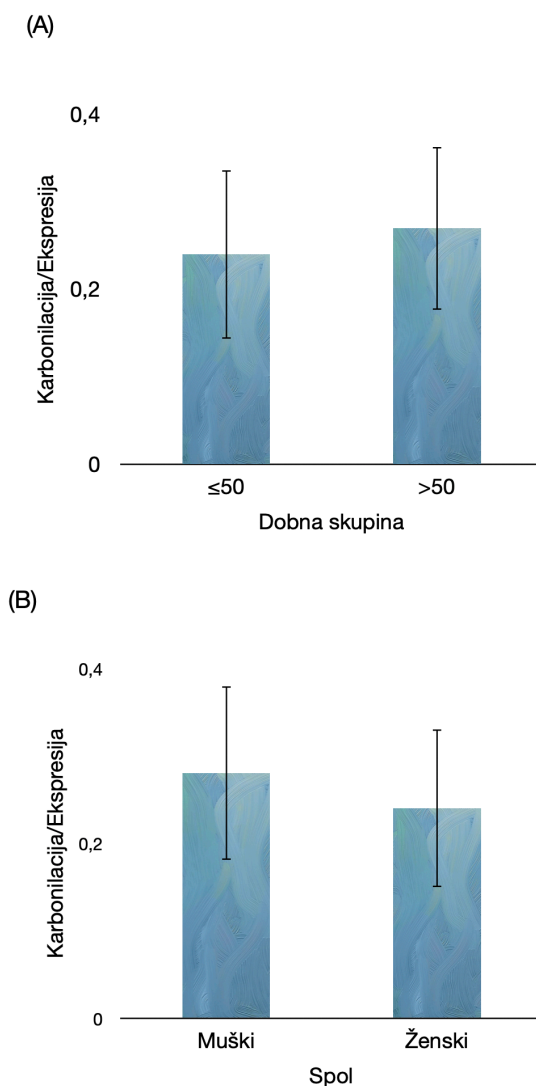
Prije elektroforeze, uzorci plazme su pripremljeni uklanjanjem visoko zastupljenih proteina HSA i IgG, prevedeni u PBS pufer te im je određena koncentracija proteina kako je opisano u poglavlju 2.2.2. Za svaku analizu korišteno je 15 µg proteina koji su označeni CF647DI aminooksi bojom (Slika 31 A). Elektroforeza je provedena na 10 %

poliakrilamidnom gelu. Nakon razdvajanja, gel je obojan *SERVA Purple* bojom radi provjere količine proteina u uzorcima i normalizacije signala karbonilacije (Slika 31 B). Ovaj korak je ključan kako bi se isključio utjecaj varijacija u ukupnom sadržaju proteina između uzoraka, te je fluorescentni signal karbonilacije normaliziran na ukupnu količinu proteina detektiranu *SERVA Purple* bojom. Na taj način osigurano je da prikazani rezultati odražavaju stvarne razlike u stupnju karbonilacije, a ne razlike u količini proteina među ispitanicima.



Slika 31. Prikaz reprezentativnog 1D-Oxi gela s 14 različitih plazmatskih uzoraka. (A) Ukupna karbonilacija proteina vizualizirana koristeći CF647DI aminooksi boju. (B) Prikaz ukupne količine proteina koristeći *SERVA Purple* boju.

Rezultati skeniranja i kvantifikacije pokazali su nešto veću karbonilaciju proteina u skupini ispitanika starijih od 50 godina u odnosu na one mlađe od 50 godina, kao i višu razinu karbonilacije kod muškaraca u usporedbi sa ženama (Slika 32). Međutim, nije utvrđena statistički značajna razlika u karbonilaciji ni između različitih dobnih skupina, niti između spolova.



Slika 32. Ukupna karbonilacija proteina u ljudskoj plazmi između različitih (A) dobnih skupina (≤ 50 , $n = 63$ i > 50 godina, $n = 35$) te između (B) spolova (muški, $n = 39$ i ženski, $n = 59$), određene metodom 1D-Oxi elektroforeze.

Ovi rezultati upućuju na to da ukupna razina karbonilacije, iako može pokazati određene trendove, nije dostatan pokazatelj za razlikovanje pojedinaca prema dobi ili spolu unutar zdrave populacije. Stoga je fokus istraživanja preusmjeren na dublju

analizu na razini pojedinačnih proteina primjenom metode 2D-OxiDIGE, kako bi se identificirali specifični proteini čija karbonilacija potencijalno pokazuje povezanost s dobi.

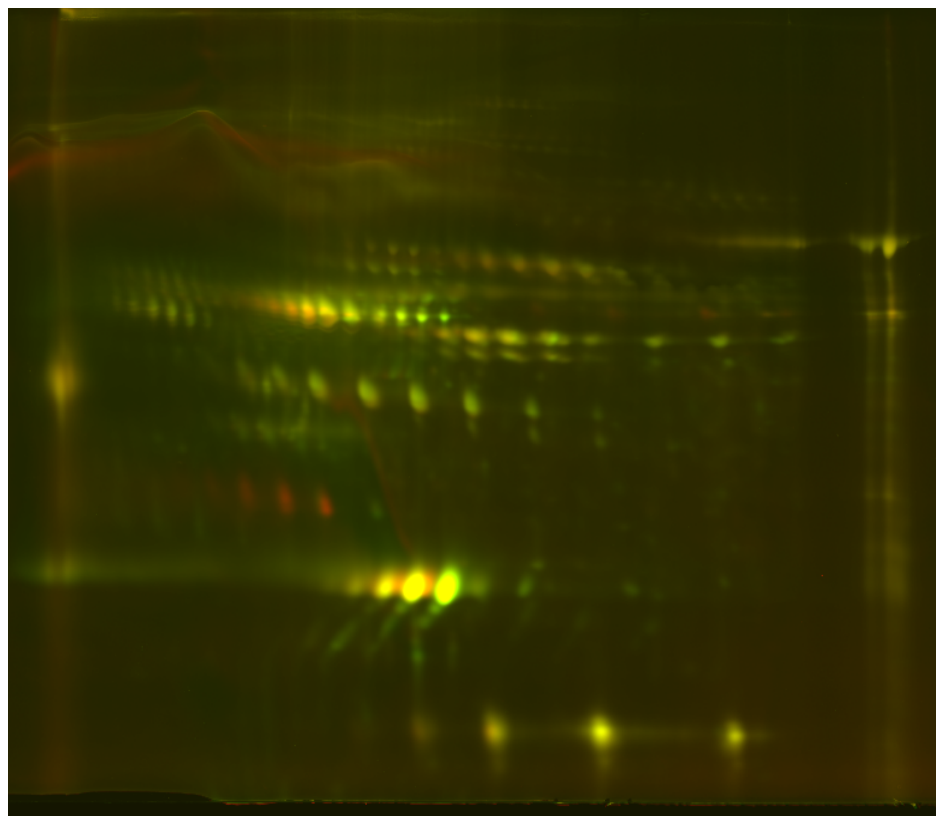
3.3.2. Identifikacija proteina povezanih s dobi primjenom 2D-OxiDIGE metode

Za detaljniju analizu specifičnih promjena u karbonilaciji i ekspresiji proteina u ljudskoj plazmi primijenjena je metoda 2D-OxiDIGE na istih 100 uzoraka plazme. Svaki gel sadržavao je jedan uzorak, označen fluorescentnim bojama: CF647DI aminooksidi za karbonilaciju proteina i Cy3 za ekspresiju, te Cy2 za interni standard. Interni standard je činio ključni element analize jer je omogućavao točnu međusobnu usporedbu gelova i kvantifikaciju rezultata. Sastojao se od mješavine ukupnih proteina iz 10 pojedinačnih plazmatskih uzoraka, odabranih tako da predstavljaju širok dobni raspon ispitanih uzoraka (18 - 75 godina) i podjednaki broj muškaraca i žena unutar ispitanika, čime je osigurana biološka raznolikost i tehnička konzistentnost kroz cijelo ispitivanje (Prilog 4).

Proteini su prvo prošli razdvajanje u prvoj dimenziji na temelju svoje pI točke uz pomoć IEF. Nakon fokusiranja, trake su postavljene na vrh 10 % poliakrilamidnog gela, nakon čega je provedena elektroforeza u drugoj dimenziji gdje su se proteini razdvojili na temelju svoje molekularne veličine. Potom su gelovi skenirani na zadanim valjnim duljinama, te analizirani uz pomoć SameSpots programa kako je već opisano u poglavlju 2.2.6. Analiza skeniranih gelova pokazala je zadovoljavajuću kvalitetu za 89 uzoraka, a ukupno je detektirano 813 točaka prisutnih u svim uzorcima (Slika 33).

Statističku analizu dobivenih rezultata provela je istraživačka grupa s Medicinskog fakulteta u Splitu (prof. dr. sc. Ozren Polašek), s ciljem utvrđivanja značajnih razlika u razinama karbonilacije i ekspresije proteina između mlađih i starijih ispitanika, zasebno za ukupnu populaciju te za žensku i mušku podskupinu.

Za izračun p-vrijednosti korišten je t-test. Dobivena p-vrijednost pokazuje kolika je vjerojatnost da je uočena razlika rezultat slučajnosti - što je p-vrijednost manja, to je veća vjerojatnost da je razlika stvarna, tj. biološki značajna. P-vrijednosti korištene u analizi bile su $p \leq 0,001$ i $p \leq 0,01$. (Tablica 6).



Slika 33. Reprezentativni prikaz jednog uzorka dobiven metodom 2D-Oxi DIGE. Slika prikazuje preklapanje triju valnih duljina: zeleno označava ekspresiju proteina obojenih Cy3 bojom, crveno karbonilaciju proteina obojenih CF647DI aminooksi bojom, žuto interni standard označen Cy2 bojom, a narančasto je preklapanje pojedinih točaka.

Rezultati statističke analize pokazali su značajne razlike u razinama karbonilacije i ekspresije proteina među različitim dobnim skupinama. U ukupnoj populaciji (≤ 25 i ≥ 65 godina), detektirane su statistički značajne razlike u karbonilaciji kod 3 proteina na razini značajnosti $p \leq 0,001$ te kod dodatnih 15 proteina na razini $p \leq 0,01$. Kada se analizira ekspresija proteina u istoj skupini, uočene su razlike kod 4 proteina gdje je $p \leq 0,001$ i kod 27 proteina ($p \leq 0,01$).

Kod ženske populacije (≤ 25 i ≥ 65 godina), utvrđene su promjene u karbonilaciji kod 2 proteina na razini $p \leq 0,001$ i kod 17 proteina na $p \leq 0,01$. Istovremeno, ekspresija proteina pokazala je razlike kod 3 proteina na razini $p \leq 0,001$ i kod 29 proteina na $p \leq 0,01$.

U muškoj populaciji (≤ 28 i ≥ 60 godina), nije bilo značajnih razlika u karbonilaciji na razini $p \leq 0,001$, ali su uočene razlike kod 12 proteina na $p \leq 0,01$. Što se tiče

ekspresije, zabilježena su dva proteina s razlikama pri $p \leq 0,001$, dok su pri $p \leq 0,01$ zabilježene razlike kod deset proteina.

Ukupno je detektirano 79 proteinskih točaka koje su pokazale statistički značajne razlike, obzirom da se neke točke preklapaju između različitih skupina i vrsta analize (karbonilacija i ekspresija).

Tablica 6. Broj plazmatskih proteina za koje je opažena statistički značajna razlika u karbonilaciji i ekspresiji između mlađih i starijih dobnih skupina (≤ 25 i ≥ 65 godina za žene i ukupnu populaciju; ≤ 33 i ≥ 55 godina za muškarce), dobiven 2D-OxiDIGE analizom. Prikazane su razlike pri razinama značajnosti $p \leq 0,001$ i $p \leq 0,01$.

	KARBONILACIJA	EKSPRESIJA
	# proteina s $p \leq 0.01$ ($p \leq 0.001$)	# proteina s $p \leq 0.01$ ($p \leq 0.001$)
Ukupna populacija ≤ 25 i ≥ 65	15 (3)	27 (4)
Ženska populacija ≤ 25 i ≥ 65	17 (2)	29 (3)
Muška populacija ≤ 28 i ≥ 60	12 (0)	10 (2)

Iako je početna statistička analiza temeljena na t-testu poslužila za identifikaciju točaka sa značajnim razlikama u karbonilaciji i ekspresiji između dobnih skupina, ovaj pristup sam po sebi nije bio dovoljan za konačan odabir točaka za identifikaciju. T-test, naime, informira o statističkoj značajnosti razlike između dviju skupina, ali ne nužno i o veličini promjene niti o tome koliko je određena točka specifično istaknuta u kontekstu ukupne varijabilnosti populacije. Kako bi se dodatno kvantificirao intenzitet odstupanja svake pojedine točke od populacijskog medijana, primijenjena je analiza tzv. Z-vrijednosti (engl. *Z-score*). Z-vrijednost je standardizirana metrika koja pokazuje koliko se neka vrijednost razlikuje od centralne vrijednosti distribucije (u ovom slučaju, medijana svih ispitanika), izraženo u jedinicama standardne devijacije.

U ovom radu Z-vrijednosti su se izračunavale posebno za omjere karbonilacije i za omjere ekspresije. Time se za svaku točku dobila mjera koja pokazuje koliko je

promjena izražena u odnosu na tipičnu varijaciju među svim uzorcima. Visoke Z-vrijednosti označavaju izrazita odstupanja, odnosno točke koje se ističu kao biološki najrelevantnije jer predstavljaju iznimno izražene promjene, a ne samo statistički značajne.

Za analitičku selekciju točaka karbonilacije i ekspresije proteina koje najviše razlikuju mlade i stare ispitanike, korišten je prag Z-vrijednosti od $\geq 4,0$ ili $\geq 4,5$. Ovaj prag odgovara točkama koje su više od četiri standardne devijacije udaljene od medijana, što se statistički nalazi među samo 0,0063 % svih vrijednosti u normalnoj distribuciji. Time se znatno povećava selektivnost - označene su isključivo one točke koje se najviše razlikuju između skupina, i koje samim time najvjerojatnije predstavljaju ključne proteine uključene u proces oksidativnog stresa ili starenja. Primjenom ove metode identificirano je ukupno 62 točaka karbonilacije sa Z-vrijednošću većom ili jednakom 4, te 19 točaka sa Z-vrijednošću većom ili jednakom 4 za ekspresiju proteina. Ove točke predstavljaju kandidate za buduću identifikaciju pomoću masene spektrometrije (Prilog 5).

Također je zanimljivo za istaknuti da tri pojedinca među uzorcima imaju šest ili više karboniliranih proteina s odstupanjem od medijana većim od 4.

3.3.3. Rasprava o razvoju metode i primjeni kvantifikacija karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi

U ovoj liniji istraživanja razvijen je i validiran osjetljiv metodološki pristup za detekciju i kvantifikaciju karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi, koji se temelji na 2D-OxiDIGE tehnici u kombinaciji s fluorescentnim označavanjem CF647DI aminooksid bojom. S obzirom na visoku kompleksnost plazmatskog proteoma, posebno u kontekstu značajnog udjela visoko zastupljenih proteina (HSA i IgG) koji maskiraju slabije zastupljene proteine, prvi korak bio je uklanjanje tih dominantnih proteina. Korištenje afinitetne kromatografske kolone specifične za HSA/IgG omogućilo je njihovu selektivnu depleciju bez gubitka manje zastupljenih proteina, čime je postignuto „otvaranje“ proteinskog profila i omogućena detekcija biološki važnih proteina niže zastupljenosti (Slika 26) (Bellei i sur. 2011).

Sljedeći važan aspekt bio je odabir prikladne fluorescentne sonde i optimizacija njezine koncentracije. Proizvođač ističe da je CF647DI aminooksidna boja izuzetno učinkovita i selektivna za označavanje karbonilnih skupina, a optimizacijom njezine količine postignuto je značajno smanjenje pozadinskog signala uz zadržavanje visoke

efikasnosti označavanja, što je u skladu s podacima o kinetici reakcije aminooksidne boje (Slika 27) (Baraibar i sur. 2014).

Posebna pažnja posvećena je elektroforetskoj separaciji. Rezultati pokazuju da gel s 10 % poliakrilamida daje najbolju razlučivost, što je u skladu s prethodnim optimizacijama elektroforetskih sustava za plazmatske proteine (Slika 28) (Desrosiers i sur. 2007; Laborde i sur. 2014).

Također, ustanovljeno je da je označavanje u PBS puferu učinkovitije s CF647DI (Slika 29) i Cy3 bojama (Slika 30) u usporedbi s UTC puferom, što je važno za stabilnost i učinkovitost označavanja u budućim primjenama.

S ciljem ispitivanja ponovljivosti optimiziranih uvjeta 2D-OxiDIGE metode, analizirani su gelovi s uzoracima dvanaest zdravih pojedinaca. Pomoću programa SameSpots detektirano je ukupno 813 točaka koje su bile zajedničke u svim uzorcima. Statističkom analizom koeficijenta varijacije, intraklasnog korelacijskog koeficijenta i Cronbachove alfe pokazala je visoku tehničku pouzdanost metode, dok su nešto veće varijacije kod karbonilacije. Dobiveni rezultati potvrđuju da je optimizirani 2D-OxiDIGE protokol robustan i ponovljiv, osobito za proteine srednje i visoke zastupljenosti u plazmi.

Snažna negativna korelacija između volumena proteinskih točaka i varijabilnosti potvrđuje da manja količina proteina povećava tehničku osjetljivost i zahtijeva posebnu pažnju pri kvantifikaciji. Ipak, metoda je omogućila pouzdanu detekciju i kvantifikaciju karboniliranih proteina, što potvrđuje njezinu primjenjivost u biološkim i kliničkim uzorcima.

Nakon što je metoda validirana u tehničkom smislu, primijenjena je na analizu 100 uzoraka ljudske plazme iz biobanke „10 001 Dalmatinac“, specifično iz populacije otoka Korčule (Radman i sur. 2020). Cilj je bio istražiti utjecaj kronološke dobi na karbonilaciju proteina i identificirati moguće biomarkere oksidativnog oštećenja te ih povezati s fiziološkim stanjem organizma, odnosno starenjem. Iako ukupna karbonilacija nije pokazala statistički značajnu povezanost s dobi, detaljna 2D-OxiDIGE analiza detektirala je ukupno 84 točaka s izraženim razlikama u karbonilaciji i/ili ekspresiji između mlađih i starijih ispitanika.

Ovakav nalaz podupire sve širu hipotezu da se biološko starenje ne ogleda nužno u globalnim razinama oksidativnog oštećenja, već u selektivnim modifikacijama određenih ciljanih proteina (Go i Jones 2013; Stadtman i Levine 2003). U tom smislu, razina karbonilacije pojedinog proteina mogla bi bolje odražavati biološku, a ne samo

kronološku dob, što ih čini potencijalnim biomarkerima starenja (Gonos i sur. 2018). Identifikacija proteina s izraženim razlikama u karbonilaciji temeljena je na Z-vrijednosti većoj od 4 ili 4,5, čime je dodatno naglašena biološka važnost tih promjena.

Među analiziranim uzorcima, tri pojedinca ističu se po većem broju značajno karboniliranih proteina, pri čemu svaki od njih pokazuje šest ili više proteina s odstupanjem od medijana većim od 4. Ova pojava upućuje na moguće interindividualne razlike u osjetljivosti na oksidativno oštećenje ili u učinkovitosti mehanizama za uklanjanje oštećenih proteina. Takvi uzorci predstavljaju zanimljivu podskupinu za dodatnu analizu, jer mogu otkriti specifične obrasce selektivne karbonilacije povezane s bržim biološkim starenjem ili s individualnim fenotipovima stanične otpornosti. Proučavanje ovih pojedinaca moglo bi doprinijeti identifikaciji ključnih proteina čija karbonilacija ima najveći potencijal kao biomarker biološke dobi, ali i razumijevanju varijabilnosti unutar populacije.

Posebno zanimljiv je pojedinac kod kojeg je zabilježena točka odstupanja 355, koja ima najveću Z-vrijednost među svim analiziranim uzorcima. Promatranje ovog ekstremnog uzorka može pružiti uvid u mehanizme koji dovode do izrazito povećane karbonilacije određenih proteina te pomoći u identifikaciji specifičnih proteina s najvećom osjetljivošću na oksidativna oštećenja.

Rezultati ovog istraživanja prvenstveno postavljaju optimiziranu metodu za analizu karbonilacije proteina u ljudskoj plazmi. Dobiveni rezultati omogućuju prepoznavanje proteina koji pokazuju razlike u količini karbonilacije i ekspresije između mladih i starih ispitanika, ali ne uključuju identifikaciju pojedinačnih proteina uz pomoć spektrometrije masa. Spektrometrija masa omogućila bi preciznu identifikaciju proteina i njihovih modifikacija, čime bi se potvrdila njihova uloga u procesu starenja, te procjenu njihove biološke ili kliničke relevantnosti (Rabbani i sur. 2016).

Pri tumačenju razlika u karbonilaciji između dobnih skupina potrebno je uzeti u obzir da razine oksidativnog stresa mogu varirati i zbog čimbenika koji nisu izravno povezani sa starenjem. Životne navike poput pušenja, prehrane i tjelesne aktivnosti, mogu modulirati redoks ravnotežu i time utjecati na razine oksidativno oštećenih proteina u plazmi (Dalle-Donne i sur. 2006; Dossena i Marino 2024; Fedorova i sur. 2014). Iako ovi čimbenici nisu bili u fokusu ovog istraživanja, vrijedi ih spomenuti kao moguće izvore dodatne varijabilnosti u opaženim uzorcima.

Nastavno na dobivene rezultate, postoji više smjerova za proširenje istraživanja:

1. Longitudinalna validacija dobivenih biomarkera: Još jedan mogući pravac uključuje longitudinalno praćenje pojedinaca kroz više godina kako bi se ispitalo može li promjena karbonilacije istih proteina u vremenu predvidjeti funkcionalno starenje, razvoj bolesti ili smanjenje otpornosti. Time bi se dodatno potvrdila prediktivna vrijednost karbonilacijskih biomarkera za biološko starenje (Jones 2006). Idealno bi bilo analizirati iste osobe kroz više vremenskih točaka, kako bi se utvrdilo raste li karbonilacija tih proteina s vremenom i u kojoj mjeri korelira s drugim biološkim pokazateljima starenja, poput epigenetskih satova, telomera ili fizioloških parametara (krvni tlak, BMI, upalni markeri i dr.) (Englelfriet i sur. 2013., Hartmann i sur. 2021, Vaiserman i Krasnienkov 2020.).
2. Identifikacija pojedinačnih odstupanja u karbonilaciji i njihova moguća genetska podloga: Još jedan aspekt budućeg istraživanja bio bi pokušaj pronalaska potencijalnih izuzetaka (engl. *outlier*) na razini pojedinačnih proteina po ispitaniku, unutar ukupne populacije. Takvi proteini s neuobičajno visokom karbonilacijom mogli bi ukazivati na prisutnost mutacija koje uzrokuju nestabilnost proteinske strukture (Dalle-Donne i sur. 2006). Osnovna ideja pristupa bila bi najprije detektirati pojedinačne proteine s neuobičajeno visokom razinom karbonilacije kod određenog ispitanika, zatim ih identificirati. Budući da su svi analizirani uzorci popraćeni sekvenciranim genomima, moguće je za svaki identificirani protein pronaći pripadajući gen te provjeriti postoji li mutacija u tom genu kod ispitanika kod kojeg je zabilježena iznimna karbonilacija. Ako se potvrdi da je mutacija prisutna isključivo kod te osobe i izostaje u ostalim uzorcima, to bi moglo predstavljati dokaz da određena mutacija može rezultirati funkcionalnim, ali strukturno nestabilnim proteinom sklonim oksidativnom oštećenju putem karbonilacije (Go i Jones 2013).
3. *In vitro* validacija oksidativne osjetljivosti identificiranih proteina: Jednom kada se proteini identificiraju, mogu se rekombinantno eksprimirati i *in vitro* podvrgnuti oksidacijskim uvjetima kako bi se ispitala njihova specifična osjetljivost na karbonilaciju. Kombinacijom točkaste mutageneze i oksidacijskih tretmana moguće je mapirati oksidacijski najosjetljivije ostatke i utvrditi koje strukturne karakteristike određuju njihovu ranjivost.
4. Razvoj prediktivnih modela biološke dobi: Dobivene podatke moguće je ugraditi u računalne modele strojnog učenja koji, temeljem proteomsko-oksidativnih

profila, predviđaju fiziološko stanje organizma. Modeli predstavljaju dijagnostički alat u procjeni starenja i ranom otkrivanju degenerativnih bolesti, čime bi se omogućila personalizirana preventivna medicina.

U konačnici, kombinacija visoko osjetljive proteomske metode (2D-OxiDIGE), precizne kvantifikacije, statističke selekcije i funkcionalne validacije proteina otvara realnu mogućnost razvoja pouzdanih biomarkera oksidativnog oštećenja povezanih sa starenjem i raznim drugim oboljenjima koji nisu samo deskriptivni, već imaju i prediktivnu vrijednost.

Razvoj metode za kvantifikaciju karbonilnih skupina na proteinima u ljudskoj plazmi imao bi važnu znanstvenu i translacijsku vrijednost jer bi omogućilo pouzdano, reproducibilno i osjetljivo praćenje oksidativnih modifikacija u biološkom sustavu koji odražava cjelokupno fiziološko stanje organizma. Plazma predstavlja dinamičan odraz staničnih i tkivnih procesa te je iznimno prikladna za identifikaciju biomarkera povezanih s oksidativnim stresom, starenjem i razvojem bolesti.

Korištenje karboniliranih proteina kao bioloških biljega omogućilo bi procjenu biološke dobi, koja preciznije opisuje funkcionalno stanje organizma od kronološke dobi. Male, ali specifične promjene u karbonilaciji određenih proteina mogu odražavati selektivne biološke procese povezane s oksidativnim stresom, metaboličkim opterećenjem ili ranim stadijima patoloških stanja. Stoga je razvoj robusne i standardizirane metode ključan za detekciju takvih suptilnih promjena.

Identificirani biomarkeri karbonilacije proteina mogli bi poslužiti kao temelj za razvoj dijagnostičkih i prognostičkih testova koji bi omogućili ranu detekciju oksidativnog oštećenja, praćenje napredovanja bolesti ili procjenu učinkovitosti terapijskih intervencija usmjerenih na smanjenje oksidativnog stresa. Osim toga, standardizirana metoda kvantifikacije karbonilacije u plazmi omogućila bi usporedivost rezultata među različitim modelima, čime bi se unaprijedilo razumijevanje mehanizama oksidativnih oštećenja i njihovih učinaka na ljudsko zdravlje.

Multidimenzionalna i nelinearna priroda starenja zahtijeva korištenje više vrsta biomarkera koji mogu obuhvatiti različite (patološke i biološke) aspekte procesa starenja kroz različite životne faze. Kombiniranjem različitih biomarkera moguće je dobiti uvid u njihovu potencijalnu sinergiju i zajedničku varijancu, što može unaprijediti razumijevanje mehanizama starenja i poboljšati njihovu prediktivnu vrijednost. Dugoročne kohortne biobanke u tom su kontekstu posebno vrijedan resurs, jer omogućuju brzi pristup podacima prikupljenim kroz cijeli životni vijek ispitanika.

III. Zaključak

Oksidativna oštećenja proteina poznata su po svojim štetnim učincima na proteinsku funkciju. U ovom istraživanju je pokazano da oksidativna modifikacija, karbonilacija, KRAS-a dovodi do poremećaja u formiranju stabilnog kompleksa s RBD domenom c-RAF-a. Rezultati jasno pokazuju da UV-zračenje, putem oksidacije, značajno narušava ovu interakciju. Korištenjem SIMPL metode vizualiziran je gubitak fuzijskog proteinskog kompleksa nakon izlaganja različitim dozama UV-zračenja, što upućuje na osjetljivost ovog signalnog para na oksidativne modifikacije.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da oksidacija ima potencijal djelovati na KRAS na sličan način kao i patološke točkaste mutacije, mijenjajući afinitet prema partnerima i time narušavajući signalne funkcije. Ovaj rad predstavlja prvi eksperimentalni dokaz da karbonilacija specifičnih ostataka u KRAS-u može dovesti do destabilizacije njegove interakcije s c-RAF-om, čime se dodatno potvrđuje važnost redoks ravnoteže u regulaciji stanične signalizacije.

Ireverzibilna karbonilacija povezuje se s procesima starenja i kraćim životnim vijekom različitih organizama, te sa staničnim posljedicama poput smanjenja vitalnosti i programirane smrti stanica, od bakterijskih do ljudskih sustava. Smatra se da takva oštećenja doprinose gubitku stabilnosti proteoma, čime se povećava funkcionalni šum u starenju. Rezultati dobiveni u ovom radu podupiru takav mehanizam jer pokazuju da oksidacijski stres narušava specifične proteinske interakcije i time može destabilizirati signalne puteve uključene u proliferaciji, diferencijaciju i održavanje homeostaze. Ovi rezultati potvrđuju postavljenu hipotezu kako oksidativni stres uzrokovan UV-zračenjem uzrokuje karbonilaciju KRAS-a i RBD domene c-RAF-a, te smanjuje njihovu protein-protein interakciju.

U drugoj liniji istraživanja optimizirana je metoda za kvantifikaciju karbonilacije proteina u ljudskoj plazmi, temeljena na 2D-OxiDIGE metodi. Pokazalo se da metoda ima vrlo dobru ponovljivost, nešto nižu kada se analizira ekspresija proteina, pri čemu je niska zastupljenost proteina ograničavajući čimbenik zbog blizine granici detekcije. Unatoč tome, metoda omogućuje širu pokrivenost proteoma i pouzdaniju kvantifikaciju u odnosu na prethodno opisane pristupe u literaturi.

Volumen proteinske točke pokazao se kao glavni čimbenik koji utječe na ponovljivost procjene karbonilacije. Iako metoda ne omogućuje identifikaciju pojedinih proteina u

trenutnoj fazi, njezina integracija sa spektrometrijom masa predstavlja sljedeći korak u razvoju, s ciljem biološke validacije i otkrivanja potencijalnih biomarkera.

Ovi rezultati potvrđuju drugu postavljene hipotezu u ovom radu, pokazujući da razvijena metoda 2D-OxiDIGE, temeljena na 2D-DIGE i aminooksidnom označavanju, omogućuje preciznu i ponovljivu kvantifikaciju specifičnih karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi.

Primjenom razvijene metode na 100 uzoraka plazme iz populacije otoka Korčule detektirane su izražene razlike u karbonilaciji i/ili ekspresiji u ukupno 84 proteinske točke između mlađih i starijih ispitanika. Te su točke odabrane na temelju visokih Z-vrijednosti, što ih čini kandidatima za potencijalne biomarkere starenja. Premda ukupna razina karbonilacija nije bila statistički povezana s kronološkom dobi, selektivne promjene podupiru hipotezu da se biološko starenje ne ogleda nužno u globalnim razinama oksidativnog oštećenja, već u ciljanom narušavanju specifičnih proteina. Ovakav nalaz potvrđuje da razina karbonilacije pojedinih proteina može bolje odražavati biološku, a ne samo kronološku dob, čime se ističe njihov potencijal kao funkcionalnih biomarkera starenja. Sljedeći korak uključuje identifikaciju tih točaka pomoću spektrometrije masa, što bi omogućilo preciznu validaciju njihove uloge u procesu starenja i dodatno osnažilo primjenjivost ove metodologije u biogerontološkim istraživanjima. Razvijena metoda kvantifikacije karbonilnih skupina u plazmi predstavlja važan korak prema standardiziranom, pouzdanom i osjetljivom praćenju oksidativnih modifikacija u biološkim uzorcima, otvarajući mogućnost otkrivanja specifičnih proteina čija karbonilacija odražava biološku dob i rane promjene povezane sa starenjem ili razvojem bolesti. Takav pristup može poslužiti kao temelj za razvoj dijagnostičkih i prognostičkih alata te produbiti razumijevanje mehanizama oksidativnih oštećenja u ljudskom organizmu.

IV. Literatura

Akkour, K., Alanazi, I.O., Alfadda, A.A., Masood, A., Alhalal, H., Joy, S.S., Bassi, A., Alshehri, E., Alwehaibi, M.A., Arafah, M. and Benabdelkamel, H., 2024. Plasma-based proteomic profiling identifies the distinct regulation of proteins in hyperplasia and endometrial cancer. *BMC Cancer*, 24(752), p.1-17.

Anderson, N.L. and Anderson, N.G., 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *MCP*, 1(11), pp.845–867.

Baines, A.T., Dapeng, X. and J, D.C., 2011. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med. Chem.*, 3(14) pp.1787–1808.

Baker, R., Wilkerson, E.M., Sumita, K., Isom, D.G., Sasaki, A.T., Dohlman, H.G. and Campbell, S.L., 2013. Differences in the regulation of K-Ras and H-Ras isoforms by monoubiquitination. *J. Biol. Chem.*, 288(52), pp.36856–36862.

Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A. and Kelly, J.W., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319 (5865), pp.916–919.

Baraibar, M., Ladouce, R. and Friguet, B., 2014. Oxi-DIGE: A novel proteomic approach for detecting and quantifying carbonylated proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, 92, pp.63-70.

Baraibar, M.A., Ladouce, R. and Friguet, B., 2013. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *J. Proteomics*, 75, pp.63–70.

Baraibar, M.A., Liu, L., Ahmed, E.K. and Friguet, B., 2012. Protein Oxidative Damage at the Crossroads of Cellular Senescence, Aging, and Age-Related Diseases. *Oxid. Med. and Cell. Longev.*, 2012, pp.1–8.

Bellei, E., Bergamini, S., Monari, E., Fantoni, L.I., Cuoghi, A., Ozben, T. and Tomasi, A., 2011. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. *Amino acids*, 40, pp.145–156.

Berlett, B.S. and Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272(33), pp.20313–20316.

Bhattacharya, A., Leonard, S., Tardif, S., Buffenstein, R., Fischer, K.E., Richardson, A., Austad, S.N. and Chaudhuri, A.R., 2011. Attenuation of liver insoluble protein carbonyls: indicator of a longevity determinant? *Aging cell*, 10(4), pp.720–723.

Butterfield, D.A., Lange, M.L.B. and Sultana, R., 2010. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 1801(8), pp.924–929.

Cabiscol Catalā, E., Tamarit Sumalla, J. and Ros Salvador, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internatl. Microbiol.*, 3(1), pp.3-8

Cadenas-Garrido, P., Schonvandt-Alarcos, A., Herrera-Quintana, L., Vázquez-Lorente, H., Santamaría-Quiles, A., Ruiz De Francisco, J., Moya-Escudero, M., Martín-Oliva, D., Martín-Guerrero, S.M., Rodríguez-Santana, C., Aragón-Vela, J. and Plaza-Díaz, J., 2024. Using Redox Proteomics to Gain New Insights into Neurodegenerative Disease and Protein Modification. *Antioxidants*, 13(1), p.127.

Chen, K., Xie, F., Liu, S., Li, G., Chen, Y., Shi, W., Hu, H., Liu, L. and Yin, D., 2011. Plasma reactive carbonyl species: Potential risk factor for hypertension. *Free Radic. Res.*, 45(11), pp.568–574.

Chiang, C.-Y., Fan, S., Zheng, H., Guo, W., Zheng, Z., Sun, Y., Zhong, C., Zeng, J., Li, S., Zhang, M., Xiao, T. and Zheng, D., 2023. Methylation of KRAS by SETD7 promotes KRAS degradation in non-small cell lung cancer. *Cell Rep.*, 42(9), p.113003.

Chromy, B.A., Gonzales, A.D., Perkins, J., Choi, M.W., Corzett, M.H., Chang, B.C., Corzett, C.H. and McCutchen-Maloney, S.L., 2004. Proteomic Analysis of Human Serum by Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis after Depletion of High-Abundant Proteins. *J. Proteome Res.*, 3(6), pp.1120–1127.

Chuang, E., Barnard, D., Hettich, L., Zhang, X.-F., Avruch, J. and Marshall, M.S., 1994. Critical Binding and Regulatory Interactions between Ras and Raf Occur through a Small, Stable N-Terminal Domain of Raf and Specific Ras Effector Residues. *Mol. Cell. Biol.*, 14(8), pp.5318–5325.

Clement, C.C., Aphkhasava, D., Nieves, E., Callaway, M., Olszewski, W., Rotzschke, O. and Santambrogio, L., 2013. Protein expression profiles of human lymph and plasma mapped by 2D-DIGE and 1D SDS-PAGE coupled with nanoLC-ESI-MS/MS bottom-up proteomics. *J. Proteomics*, pp.172–187.

Cox, A.D., Fesik, S.W., Kimmelman, A.C., Luo, J. and Der, C.J., 2014. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 13, pp.828–851.

Cseh, B., Doma, E. and Baccarini, M., 2014. “RAF” neighborhood: Protein–protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Letters*, 588(15), pp.2398–2406.

Cyanine dyes. [online] Lumiprobe. Available at: <<https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes>>.

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell Mol. Med.*, 329 (1-2), pp.389–406.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 10(2), pp.23–38.

Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.*, 324(1), pp.1–18.

Delobel, J., Prudent, M., Tissot, J. and Lion, N., 2016. Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates. *Proteom. – Clin. Appl.*, 10(3), pp.257–266.

Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.-F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S., Saad, F., Mes-Masson, A.-M. and Ferbeyre, G., 2013. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.*, 27(8), pp.900–915.

Desrosiers, R.R., Beaulieu, É., Buchanan, M. and Béliveau, R., 2007. Proteomic analysis of human plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis and by antibody arrays following depletion of high-abundance proteins. *Cell Biochem. Biophys.*, 49(3), pp.182–195.

Dimlić, M.R., Raić, S., Močibob, M., Maršić, Ž.S., Yao, Z., Radman, M. and Stagliar, I., 2024. Oxidative protein damage negatively affects protein-protein interaction: The case of KRAS-cRAF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 734, p.150792.

Dossena, S. and Marino, A., 2024. Oxidative Stress and Antioxidants in Aging. *Antioxidants*, 13(11), p.1288..

Duarte, T.L. and Jones, G.D., 2007. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 43(8), pp.1165-1175.

Engelfriet, P.M., Jansen, E.H.J.M., Picavet, H.S.J. and Dollé, M.E.T., 2013. Biochemical markers of aging for longitudinal studies in humans. *Epidemiol Rev.*, 35(1), pp.132–151.

Ernst, O. and Zor, T., 2010. Linearization of the bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (38), p.1918..

Estell, D.A., Graycar, T.P. and Wells, J.A., 1985. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.*, 260(11), pp.6518–6521.

Fabian, J.R., Vojtek, A.B., Cooper, J.A. and Morrison, D.K., 1994. A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(13), pp.5982–5986.

Fedorova, M., Bollineni, R.C. and Hoffmann, R., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.*, 33(2), pp.79–97.

Fedorova, M., 2017. Diversity of protein carbonylation pathways: Direct oxidation, glycoxidation, and modifications by lipid peroxidation products. *Protein carbonylation: Principles, analysis, and biological implications*, pp.48-82.

Finkel, T. and Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, pp.239–247.

Foth, B.J., Zhang, N., Mok, S., Preiser, P.R. and Bozdech, Z., 2008. Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites. *Genome Biology*, 9(12), p.R177.

G. E. Healthcare, 2005. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. Handbook.

Geyer, P.E., Kulak, N.A., Pichler, G., Holdt, L.M., Teupser, D. and Mann, M., 2016. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst.*, 2(3), pp.185–195.

Geyer, P.E., Voytik, E., Treit, P.V., Doll, S., Kleinhempel, A., Niu, L., Müller, J.B., Buchholtz, M.-L., Bader, J.M., Teupser, D., Holdt, L.M. and Mann, M., 2019. Plasma Proteome Profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies. *EMBO Mol. Med.*, 11, pp1-12

Go, Y.M. and Jones, D.P., 2013. The redox proteome. *J. Biol. Chem.*, 288(37), pp.26512–26520.

Gonos, E.S., Kapetanou, M., Sereikaite, J., Bartosz, G., Naparlo, K., Grzesik, M. and Sadowska-Bartosz, I., 2018. Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging*, 10(5), pp.868-901.

Goppelt, A., Stelzer, G., Lottspeich, F. and Meisterernst, M., 1996. A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains. *EMBO J.*, 15(12), pp.3105-3116.

Grozavu, I., Stuart, S., Lyakisheva, A., Yao, Z., Pathmanathan, S., Ohh, M. and Stagljar, I., 2022. D154Q Mutation does not Alter KRAS Dimerization. *J. Mol. Biol.*, 434 (2) p.167392.

Grune, T., Jung, T., Merker, K. and Davies, K.J.A., 2004. Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(12), pp.2519–2530.

Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y. and Hu, L., 2020. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. and Ther. Med.*, 19(3), p.1997–2007

Guyton, Arthur C., and John E. Hall. 2021. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 14th ed. Philadelphia: Elsevier. Poglavlje 25, "Body Fluid Compartments: Extracellular and Intracellular Fluids.

Han, S., Cui, Y. and Helbing, D.-L., 2019. Differential effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment on epitope recognition in western blotting. *Anal. Biochem.*, 586, p.113417.

Hartmann, A., Hartmann, C., Secci, R., Hermann, A., Fuellen, G. and Walter, M., 2021. Ranking Biomarkers of Aging by Citation Profiling and Effort Scoring. *Front. Genet.*, 12, p.686320

Heo, J. and Campbell, S.L., 2005. Mechanism of redox-mediated guanine nucleotide exchange on redox-active Rho GTPases. *J. Biol. Chem.*, 280(35), pp.31003–31010.

Heywood, W.E., Madgett, T.E., Wang, D., Wallington, A., Hogg, J., Mills, K. and Avent, N.D., 2011. 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. *Proteome Sci.*, 9, p.56.

Hipp, M.S., Kasturi, P. and Hartl, F.U., 2019. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 20, pp.421–435.

Inostroza, J.A., Mermelstein, F.H., Ha, L., Lane, W.S. and Reinberg, D., 1992. Drl , a TATA-Binding Protein-Associated Phosphoprotein and Inhibitor of Class II Gene Transcription. *Cell*, 7(39), pp.477–499.

Jager, T.L. de, Cockrell, A.E. and Plessis, S.S.D., 2017. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Adv. Exp. Med. Biol.*, pp.15–23.

Jaros, J.A.J., Guest, P.C., Bahn, S. and Martins-De-Souza, D., 2013. Affinity Depletion of Plasma and Serum for Mass Spectrometry-Based Proteome Analysis. *Methods Mol. Biol.*, pp.1–11.

Jeronicic, A., Memari, Y., Ritchie, G.R., Hendricks, A.E., Kolb-Kokocinski, A., Matchan, A., Vitart, V., Hayward, C., Kolcic, I., Glodzik, D., Wright, A.F., Rudan, I., Campbell, H., Durbin, R., Polašek, O., Zeggini, E. and Perica, V.B., 2016. Whole-exome sequencing in an isolated population from the Dalmatian island of Vis. *Eur. J. Hum. Genet.*, 24, pp.1479–1487.

Joshi, P.K., Esko, T., Mattsson, H. et al., 2015. Directional dominance on stature and cognition in diverse human populations. *Nature*, 523, pp. 459–462.

Jubb, H.C., Higuieruelo, A.P., Ochoa-Montaña, B., Pitt, W.R., Ascher, D.B. and Blundell, T.L., 2017. Arpeggio: A Web Server for Calculating and Visualising Interatomic Interactions in Protein Structures. *J. Mol. Biol.*, 429(3), pp.365–371.

Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. and Ulrich Hartl, F., 2013. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, 82(1), pp.323–355.

Klaips, C.L., Jayaraj, G.G. and Hartl, F.U., 2018. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.*, 217(1) pp.51–63.

Koo, T.K. and Li, M.Y., 2016. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J. Chiropr. Med*, 15(1), pp.155–163.

Krisko, A. and Radman, M., 2010. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(32), pp.14373–14377.

Krištić, J., Vučković, F., Menni, C., Klarić, L., Keser, T., Beceheli, I., Pučić-Baković, M., Novokmet, M., Mangino, M., Thaqi, K., Rudan, P., Novokmet, N., Šarac, J., Missoni, S., Kolčić, I., Polašek, O., Rudan, I., Campbell, H., Hayward, C., Aulchenko, Y., Valdes, A., Wilson, J.F., Gornik, O., Primorac, D., Zoldoš, V., Spector, T. and Lauc, G., 2014. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J. Gerontol.*, 69(7), pp.779–789.

Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, and Jon C. Aster. 2017. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier.

Labbadia, J. and Morimoto, R.I., 2015. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 84, pp.435-464.

Laborde, C.M., Alonso-Orgaz, S., Mourino-Alvarez, L., Moreu, J., Vivanco, F., Padial, L.R. and Barderas, M.G., 2014. The plasma proteomic signature as a strategic tool for early diagnosis of acute coronary syndrome. *Proteome Sci.*, 12, pp.1–14.

Ladouce, R., Combes, G.F., Trajković, K., Hofman, I.D. and Merćep, M., 2023. Oxime blot: A novel method for reliable and sensitive detection of carbonylated proteins in diverse biological systems. *Redox Biol.*, 63, p.102743.

Lavoie, H. and Therrien, M., 2015. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, pp.281–298.

Lee, P.Y., Osman, J., Low, T.Y. and Jamal, R., 2019. Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. *Bioanalysis*, 11(19), pp.1799–1812.

Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 32(9), pp.790–796.

Levine, R.L. and Stadtman, E.R., 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.*, 36(9), pp.1495–1502.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P. and Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 233, pp.346–357.

Liou, G.Y. and Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.*, 44(5), pp.479–496.

Lopes, J.P., Morató, X., Souza, C., Pinhal, C., Machado, N.J., Canas, P.M., Silva, H.B., Stagliar, I., Gandía, J., Fernández-Dueñas, V., Luján, R., Cunha, R.A. and Ciruela, F., 2015. The role of parkinson's disease-associated receptor GPR37 in the hippocampus: functional interplay with the adenosinergic system. *J. Neurochem.*, 134(1), pp.135–146.

Mackintosh, J.A., Choi, H.Y., Bae, S.H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., Dyk, D.D.V., Verrills, N.M., Paik, Y.K. and Karuso, P., 2003. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 3(12), pp.2273–2288.

Madian, A.G. and Regnier, F.E., 2010. Profiling carbonylated proteins in human plasma. *J. Proteome Res.*, 9(3), pp.1330–1343.

Malm, C., Hadrevi, J., Bergström, S.A., Pedrosa-Domellöf, F., Antti, H., Svensson, M. and Frängsmyr, L., 2008. Evaluation of 2-D DIGE for skeletal muscle: Protocol and repeatability. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 68(8), pp.793–800.

Malmström, E., Kilsgård, O., Hauri, S., Smeds, E., Herwald, H., Malmström, L. and Malmström, J., 2016. Large-scale inference of protein tissue origin in gram-positive sepsis plasma using quantitative targeted proteomics. *Nat. Commun.*, 7(1), p.10261.

McCormick, F., 2016. K-Ras protein as a drug target. *J. Mol. Med.*, 94(3), pp.253–258.

Metatla, I., Roger, K., Chhuon, C., Ceccacci, S., Chapelle, M., Pierre-Olivier Schmit, Demichev, V. and Guerrero, I.C., 2024. Neat plasma proteomics: getting the best out of the worst. *Clin. Proteom.*, 21(1), p.22.

Miller, M.S. and Miller, L.D., 2012. RAS Mutations and Oncogenesis: Not all RAS Mutations are Created Equally. *Front. Genet.*, 2, p.100.

Minden, J.S., 2012. Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* pp.287–304.

Moore, A.R., Rosenberg, S.C., McCormick, F. and Malek, S., 2020. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19, pp.533–552.

Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J. and Waggoner, A.S., 1993. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.*, 4(2), pp.105–111.

Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C.A., Scherer, A., McCormick, F. and Wittinghofer, A., 1995. The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, 375, pp.554–560.

Noren, C.J., Wang, J. and Perler, F.B., 2000. Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew. Chem.* ,39(3), pp.450–466.

Nooren, I.M.A. and Thornton, J.M., 2003. Diversity of protein–protein interactions. *EMBO J.*, 22, pp.3486–3492.

Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D. and Grune, T., 2015. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*, 5(1), pp.194–222.

Nyström, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.*, 24(7), pp.1311–1317.

Paulus, H., 2001. Inteins as enzymes. *Bioorg. Chem.*, 29(3), pp.119–129.

Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., Kundu, D.J., Prakash, A., Frericks-Zipper, A., Eisenacher, M., Walzer, M., Wang, S., Brazma, A. and Vizcaíno, J.A., 2022. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.*, 50(D1), pp.D543–D552.

Petrov, D. and Zagrovic, B., 2011. Microscopic analysis of protein oxidative damage: Effect of carbonylation on structure, dynamics, and aggregability of villin headpiece. *J. Am. Chem. Soc.*, pp.7016–7024..

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(11), pp.1605–1612.

Pillich, R., 2016. The Human Interactome Unveiled... [online] The NDEx Project. Available at: <<http://www.home.ndexbio.org/human-interactome-unveiled/>> [Accessed 13 October 2025].

Polašek, O., 2013. Future of biobanks - bigger, longer, and more dimensional. *Croat. Med. J.*, 54(5), p.496.

Prior, I.A., Lewis, P.D. and Mattos, C., 2012. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.*, 72(10), pp.2457–2467.

Pritchard, J.K., Pickrell, J.K. and Coop, G., 2010. The Genetics of Human Adaptation: Hard Sweeps, Soft Sweeps, and Polygenic Adaptation. *Curr. Biol.*, 20(4), pp.R208–R215.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. and Bar-Sagi, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 11, pp.761–774.

Qu, L., Pan, C., He, S.M., Lang, B., Gao, G.D., Wang, X.L. and Wang, Y., 2019. The ras superfamily of small gtpases in non-neoplastic cerebral diseases. *Front. Mol. Neurosci.*, p.449639.

Rabbani, N., Ashour, A. and Thornalley, P.J., 2016. Mass spectrometric determination of early and advanced glycation in biology. *Glycoconj. J.*, 33, pp.553–568.

Radman, M., 2020. Dysfunction and toxicity of damaged proteins in the etiology of aging and age-related degenerative and malignant diseases. *Croat. Med. J.*, 61(2), pp.159-166.

Radman, S., Raić, S., Bućan, I., Pribisalić, A., Dunatov, J., Mudnić, I., Boban, M., Pellay, F.X., Kolčić, I. and Polašek, O., 2020. Searching for carbonylome biomarkers of aging-development and validation of the proteomic method for quantification of carbonylated protein in human plasma. *Croat. Med. J.*, 61(2), pp.119-125.

Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F. and Therrien, M., 2009. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*, 461, pp.542–545.

Rastogi, R.P., Richa, null, Kumar, A., Tyagi, M.B. and Sinha, R.P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids*, p.592980.

Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. and Stadtman, E.R., 2001. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(1), pp.69–74.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.*, 49(11), pp.1603–1616.

Rezatabar, S., Karimian, A., Rameshknia, V., Parsian, H., Majidinia, M., Kopi, T.A., Bishayee, A., Sadeghinia, A., Yousefi, M., Monirialamdari, M. and Yousefi, B., 2019. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J. Cell. Physiol.*, 234(9), pp.14951–14965.

Rizzolo, K. and Houry, W.A., 2019. Multiple functionalities of molecular chaperones revealed through systematic mapping of their interaction networks. *J. Biol. Chem.*, 294(6), pp.2142–2150.

Rizzolo, K., Huen, J., Kumar, A., Boone, C., Babu, M., Correspondence, W.A.H., Phanse, S., Vlasblom, J., Kakihara, Y., Zeineddine, H.A., Minic, Z., Snider, J., Wang, W., Pons, C., Seraphim, T.V., Boczek, E.E., Alberti, S., Costanzo, M., Myers, C.L., Stagljär, I. and Houry, W.A., 2017. Features of the Chaperone Cellular Network Revealed through Systematic Interaction Mapping. *Cell Rep.*, 20(11), pp.2735–2748.

Rogowska-Wrzesinska, A., Wojdyla, K., Nedić, O., Baron, C.P. and Griffiths, H.R., 2014. Analysis of protein carbonylation — pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Radic. Res.*, 48(10), pp.1145–1162.

Rudan, I., Marušić, A., Janković, S., Rotim, K., Boban, M., Lauc, G., Grković, I., Dogaš, Z., Zemunik, T., Vataavuk, Z., Benčić, G., Rudan, D., Mulić, R., Krželj, V., Terzić, J., Stojanović, D., Puntarić, D., Bilić, E., Ropac, D., Ariana, V.J., Znaor, A., Stevanović, R., Biloglav, Z. and Polašek, O., 2009. ‘10001 Dalmatians:’ Croatia launches its national biobank. *Croat. Med. J.*, 50(1), pp.4–6.

Scott, D.E., Bayly, A.R., Abell, C. and Skidmore, J., 2016. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 15, pp.533–550.

SERVA. 2025. Preparation of Acrylamide Solutions for Casting of SDS-PAGE Gels. SERVA Electrophoresis Available at: https://www.serva.de/en/DE/613_Information_Center_Electrophoresis_SDS_PAGE_Preparation_of_acrylamide_solutions_for_casting_of_gels.html

Shacter, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples*. *Drug Metab. Rev.*, 32(3-4), pp.307–326.

Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82(2), pp.291–295.

Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A. and Markesbery, W.R., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(23), pp.10540–10543.

Smith, M.J. and Ikura, M., 2014. Integrated RAS signaling defined by parallel NMR detection of effectors and regulators. *Nat. Chem. Biol.*, 10, pp.223–230.

Snider, J., Kotlyar, M., Saraon, P., Yao, Z., Jurisica, I. and Stagljar, I., 2015. Fundamentals of protein interaction network mapping. *Mol. Syst. Biol.*, 11, p.848.

Stadtman, E.R., 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.*, 40(12), pp.1250–1258.

Stadtman, E.R. and Levine, R.L., 2006. Protein Oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899(1), pp.191–208.

Stadtman, E.R. and Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, pp.207–218.

Sultana, R. and Butterfield, D.A., 2007. Regional expression of key cell cycle proteins in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem. Res.*, pp.655–662.

Suzuki, Y.J., Carini, M. and Butterfield, D.A., 2010. Protein carbonylation. *Antioxid. Redox Signal.*, 12(3), pp.323–325.

Tamarit, J., Hoogh, A. de, Obis, E., Alsina, D., Cabiscol, E. and Ros, J., 2012. Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides. *J. Proteomics*, 75(12), pp.3778–3788.

Tishkoff, S., 2015. Strength in small numbers. *Science*, 349(6254), p.1282.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Valle, N.R.D. and Huang, P., 2010. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.*, 10(8), pp.1343–1374.

Tramutola, A., Falcucci, S., Brocco, U., Triani, F., Lanzillotta, C., Donati, M., Panetta, C., Luzi, F., Iavarone, F., Vincenzoni, F., Castagnola, M., Perluigi, M., Domenico, F.D. and Marco, F.D., 2020. Protein Oxidative Damage in UV-Related Skin Cancer and Dysplastic Lesions Contributes to Neoplastic Promotion and Progression. *Cancers*, 21(1), p.110.

Tran, T.H., Chan, A.H., Young, L.C., Bindu, L., Neale, C., Messing, S., Dharmaiah, S., Taylor, T., Denson, J.P., Esposito, D., Nissley, D.V., Stephen, A.G., McCormick, F. and Simanshu, D.K., 2021. KRAS interaction with RAF1 RAS-binding domain and cysteine-rich domain provides insights into RAS-mediated RAF activation. *Nat. Commun.*, 12, pp.1–16.

Tu, C., Rudnick, P.A., Martinez, M.Y., Cheek, K.L., Stein, S.E., Slebos, R.J.C. and Liebler, D.C., 2010. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J. Proteome Res.*, 9(10), pp.4982–4991.

Unlü, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), pp.2071–2077.

Vaiserman, A. and Krasnienkov, D., 2021. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front. Genet.*, 11, p.630186.

Vitart, V., Biloglav, Z., Hayward, C., Janicijevic, B., Smolej-Narancic, N., Barac, L., Pericic, M., Klaric, I.M., Skaric-Juric, T., Barbalic, M., Polasek, O., Kolcic, I., Carothers, A., Rudan, P., Hastie, N., Wright, A., Campbell, H. and Rudan, I., 2006. 3000 years of solitude: extreme differentiation in the island isolates of Dalmatia, Croatia. *Eur. J. Hum. Genet.*, 14, pp.478–487.

Weber, D., Davies, M.J. and Grune, T., 2015. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol.*, 5, pp.367–380.

Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J., 2005. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.*, 118(5), pp.843–846.

Wheelock, Å.M., Morin, D., Bartosiewicz, M. and Buckpitt, A.R., 2006. Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 6(5), pp.1385–1398.

Yan, L.-J. and Forster, M.J., 2011. Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: A review. *Journal of Chromatography B*, 879(17–18), pp.1308–1315.

Yao, Z., Aboualizadeh, F., Kroll, J., Akula, I., Snider, J., Lyakisheva, A., Tang, P., Kotlyar, M., Jurisica, I., Boxem, M. and Stagljar, I., 2020. Split Intein-Mediated Protein Ligation for detecting protein-protein interactions and their inhibition. *Nat. Commun.*, 11, pp.1–14.

Yao, Z., Darowski, K., St-Denis, N., Wong, V., Offensperger, F., Villedieu, A., Amin, S., Maltby, R., Aoki, H., Guo, H., Xu, Y., Iorio, C., Kotlyar, M., Emili, A., Jurisica, I., Neel, B.G., Babu, M., Gingras, A.C. and Stagljar, I., 2017. A Global Analysis of the Receptor Tyrosine Kinase-Protein Phosphatase Interactome. *Mol. Cell*, 65(2), pp.347–360.

Yao, Z., Kim, J., Geng, B., Chen, J., Wong, V., Lyakisheva, A., Snider, J., Dimlić, M.R., Raić, S. and Stagljar, I., 2025. A split intein and split luciferase-coupled system for detecting protein-protein interactions. *Mol. Syst. Biol.*, 21, pp.107–125.

Yoo, B.S. and Regnier, F.E., 2004. Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis*, 25(9), pp.1334–1341.

V. Prilozi

Prilog 1. Pregled modifikacija s pozicijom i metom identificiranih uz pomoć MS analize KRAS proteina.

Ne tretiran KRAS protein			
Pozicija	Aminokiselina	Modifikacija	Sekvencijski motiv
34	P	Karbonilacija	FVDEYDpTIEDSY
36	I	Karbonilacija	DEYDPTiEDSYRK
51	C	Karbamidometil	VIDGETcLLDILD
52	L	Karbonilacija	IDGETCILDILDT
53	L	Karbonilacija	DGETCLIDILDTA
67	M	Met->Asa	QEEYSAmRDQYMR
80	C	Karbamidometil	TGEGFLcVFAINN
97	R	Karbonilacija	EDIHHYrEQIKRV
104	K	Lys->Aly	EQIKRVkDSEDVP
110	P	Karbonilacija	KDSEDVpMVLVGN
111	M	Met->Asa	DSEDVPmVLVGNK
117	K	Lys->Aly	MVLVGNKcDLPSR
118	C	Karbamidometil	VLVGNKcDLPSRT
139	I	Karbonilacija	LARSYGiPFIETS
140	P	Karbonilacija	ARSYGIpFIETSA
155	A	Karbonilacija	RQGVDDaFYTLVR
159	L	Karbonilacija	DDAFYTIVREIRK

Prilog 2. Pregled modifikacija s pozicijom i metom identificiranih uz pomoć MS analize UV-tretiranog KRAS protein.

UV-tretiran KRAS protein			
Pozicija	Aminokiselina	Modifikacija	Sekvencijski motiv
36	I	Karbonilacija	DEYDPTiEDSYRK
42	K	Lys->Aly	IEDSYRkQVVIDG
46	I	Karbonilacija	YRKQVViDGETCL
51	C	Karbamidometil	VIDGETcLLDILD
55	I	Karbonilacija	ETCLLDiLDTAGQ
80	C	Karbamidometil	TGEGFLcVFAINN
93	I	Karbonilacija	TKSFEDiHHYREQ
97	R	Karbonilacija	EDIHHYrEQIKRV
103	V	Karbonilacija	REQIKRvKDSEdV
104	K	Lys->Aly	EQIKRVkDSEDVP
109	V	Karbonilacija	VKDSEdVPMVLVG
110	P	Karbonilacija	KDSEdVpMVLVGN
111	M	Met->Asa	DSEdVpmVLVGnK
112	V	Karbonilacija	SEdVPMvLVGNKC
114	V	Karbonilacija	DVPMVLvGNKCDL
118	C	Karbamidometil	VLVGnKcDLPSRT
133	L	Karbonilacija	TKQAQDIARSYGI
135	R	Karbonilacija	QAQDLArSYGIPF
139	I	Karbonilacija	LARSYGiPFIETS
149	R	Arg->Gsa	ETSAKTrQGVDDA
155	A	Karbonilacija	RQGVDDaFYTLVR
159	L	Karbonilacija	DDAFYTIVREIRK

Prilog 3. Broj PSM-ova s PMS modifikacijama na neozračenom RBD proteinu.

	Broj PMS-ova s modifikacijama
	RBD
Karbonilacija Ala, Ile, Leu, Val i Pro	10
Arg -> Gsa kiselinu	2
Met -> Asa kiselinu	0
Lys -> Aly	0
Ukupno	12

Prilog 4. Popis uzoraka plazme s pripadajućim demografskim podacima. Uzorak označen žutom bojom predstavlja unutarnji standard, dok su sivo označeni uzorci kod kojih rezolucija gelova nije bila uspješna za daljni nastavak analize.

Uzorak	Godine	Spol
HS 1	53	Muško
HS 2	56	Žensko
HS 3	66	Muško
HS 4	60	Žensko
HS 5	67	Muško
HS 6	83	Muško
HS 7	83	Muško
HS 8	67	Žensko
HS 9	69	Muško
HS 10	38	Muško
HS 11	41	Muško
HS 12	46	Žensko
HS 13	37	Žensko
HS 14	66	Žensko
HS 15	37	Žensko
HS 16	39	Žensko
HS 17	31	Muško
HS 18	18	Žensko
HS 19	35	Muško
HS 20	67	Žensko
HS 21	66	Žensko
HS 22	49	Žensko
HS 23	67	Žensko
HS 24	67	Žensko
HS 25	28	Muško
HS 26	64	Žensko
HS 27	36	Žensko
HS 28	32	Žensko
HS 29	30	Žensko
HS 30	36	Žensko
HS 31	34	Muško
HS 32	38	Žensko
HS 33	44	Žensko
HS 34	29	Muško
HS 35	44	Žensko

Uzorak	Godine	Spol
HS 36	42	Muško
HS 37	36	Žensko
HS 38	32	Žensko
HS 39	35	Muško
HS 40	29	Žensko
HS 41	54	Žensko
HS 42	49	Žensko
HS 43	61	Žensko
HS 44	49	Žensko
HS 45	38	Muško
HS 46	64	Žensko
HS 47	36	Muško
HS 48	62	Muško
HS 49	56	Žensko
HS 50	39	Žensko
HS 51	51	Muško
HS 52	24	Žensko
HS 53	24	Žensko
HS 54	32	Muško
HS 55	26	Muško
HS 56	43	Žensko
HS 57	61	Muško
HS 58	54	Žensko
HS 59	44	Muško
HS 60	31	Žensko
HS 61	73	Muško
HS 62	28	Muško
HS 63	43	Žensko
HS 64	56	Žensko
HS 65	20	Muško
HS 66	45	Žensko
HS 67	65	Žensko
HS 68	54	Muško
HS 69	44	Žensko
HS 70	24	Žensko

Uzorak	Godine	Spol
HS 71	39	Muško
HS 72	65	Muško
HS 73	63	Žensko
HS 74	38	Žensko
HS 75	46	Žensko
HS 76	45	Žensko
HS 77	40	Žensko
HS 78	29	Muško
HS 79	60	Muško
HS 80	61	Žensko
HS 81	46	Muško
HS 82	32	Muško
HS 83	22	Žensko
HS 84	38	Muško
HS 85	45	Žensko
HS 86	57	Muško
HS 87	19	Žensko
HS 88	64	Žensko
HS 89	64	Žensko
HS 90	40	Muško
HS 91	19	Žensko
HS 92	32	Žensko
HS 93	37	Muško
HS 94	29	Žensko
HS 95	40	Žensko
HS 96	49	Muško
HS 97	19	Žensko
HS 98	75	Žensko
HS 99	60	Muško
HS 100	28	Muško

Prilog 5. Prikazane su točke detektirane 2D-OxiDIGE analizom, čije Z-vrijednosti prelaze prag od 4. Sivo su označene one točke koje predstavljaju karbonilaciju.

Točka	Z vrijednost	Uzorci sa pragom 4 ili većim	Godine	Spol
503	4,1	HS7	83	muško
522	4,6			
537	4,5			
540	5,2			
566	4,1			
618	4,4			
640	4,8			
740	4,4			
817	6,1			
236	4,1	HS9	69	muško
406	4,2	HS10	38	muško
49	4,4	HS11	41	muško
92	4,7	HS16	39	žensko
80	4,7	HS18	18	žensko
465	4,0	HS21	66	žensko
735	5,1	HS25	28	muško
77	4,4	HS26	64	žensko
109	4,5			
599	6,2	HS27	36	žensko
355	9,4	HS29	30	žensko

Točka	Z vrijednost	Uzorci sa pragom 4 ili većim	Godine	Spol
201	4,2	HS32	38	žensko
697	5,0			
703	4,3			
717	5,0			
728	4,2			
739	4,1			
764	4,5			
776	4,1			
778	4,2			
796	4,1			
86	4,3	HS34	29	muško
476	4,5			
6	6,4	HS35	44	žensko
183	4,4			
185	4,8			
467	4,8			
613	5,0	HS36	42	muško
354	4,7			
116	4,1	HS48	62	muško
190	4,5	HS51	51	muško
707	5,0	HS54	32	muško
808	4,3	HS55	26	muško
840	4,9	HS58	54	žensko

*Učinak oksidacije na protein-protein interakcije
i analiza oksidativnog oštećenja proteina detekcijom karboniliranih proteina u ljudskoj plazmi*

Točka	Z vrijednost	Uzorci sa pragom 4 ili većim	Godine	Spol
140	4,0	HS59	44	muško
198	4,3			
206	4,9			
227	4,8			
246	4,8			
260	4,0			
276	4,2			
277	4,6			
279	5,0			
288	4,5			
294	4,3			
298	4,8			
300	4,7			
302	5,2			
312	6,1			
317	5,9			
330	4,6			
347	4,3			
361	4,7			

Točka	Z vrijednost	Uzorci sa pragom 4 ili većim	Godine	Spol
338	5,3	HS60	31	žensko
350	4,8	HS61	73	muško
454	5,1			
752	4,1			
410	4,2	HS62	28	muško
487	4,4	HS64	56	žensko
668	4,2	HS65	20	muško
68	4,1	HS71	39	muško
269	4,7			
346	4,4			
405	4,2	HS72	65	muško
597	4,1	HS74	38	žensko
54	4,0	HS79	60	muško
58	4,1			
62	4,3			
666	4,0	HS87	19	žensko
500	4,3	HS90	40	muško
241	4,1	HS93	37	muško
772	5,2			
779	4,8			
124	4,7	HS94	29	žensko
400	4,3	HS95	40	žensko

VI. Znanstveni radovi

Objavljeni znanstveni radovi:

- Yao, Z., Kim, J., Geng, B., Chen, J., Wong, V., Lyakisheva, A., Snider, J., Dimlić, M.R., Raić, S. i Stagljarić, I., 2025. A split intein and split luciferase-coupled system for detecting protein-protein interactions. *Molecular systems biology*, pp.107-125.
- Dimlić, M.R., Raić, S.*, Močibob, M., Maršić, Ž.S., Yao, Z., Radman, M. and Stagljarić, I., 2024. Oxidative protein damage negatively affects protein-protein interaction: The case of KRAS-cRAF. *Biochemical and biophysical research communications*, p.150792.
- Radman, S., Raić, S.*, Bućan, I., Pribisalić, A., Dunatov, J., Mudnić, I., Boban, M., Pella, F.X., Kolčić, I. and Polašek, O., 2020. Searching for carbonylome biomarkers of aging—development and validation of the proteomic method for quantification of carbonylated protein in human plasma. *Croatian medical journal*, pp.119-125.

*Prvo autorstvo s jednakim doprinosom

VII. Kratki životopis

SANDA RAIĆ

Datum rođenja: 01.10.1998

E-mail: sraic@medils.unist.hr

Obrazovanje:

- **2016. - danas** Doktorski sveučilišni studij Biofizike
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu
- **2012. - 2014. MASTER OF SCIENCE Chemistry**
Montclair State University, Montclair, NJ, SAD
- **2007. - 2011. UNIV. BACC. KEMIJE**
Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

Radno iskustvo:

- **rujan 2024. - danas** Laboratorijski inženjer
Mediterranski institut za istraživanje života, Sveučilište u Splitu
- **svibanj 2015. - kolovoz 2024.** Laboratorijski inženjer
Mediterranski institut za istraživanje života, Split
- **studeni 2013. - svibanj 2014.** Analitički kemičar/Mikrobiolog
Qualimax LLC, NJ, USA