

NEDOSTATAK S-ADENOZILHOMOCISTEIN HIDROLAZE: MOLEKULARNI MEHANIZMI NOVOG OBOLJENJA

Kovačević, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:093395>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

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



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Lucija Kovačević

NEDOSTATAK S-
-ADENOZILHOMOCISTEIN HIDROLAZE:
MOLEKULARNI MEHANIZMI NOVOG
OBOLJENJA

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2017.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Lucija Kovačević

NEDOSTATAK S-
-ADENOZILHOMOCISTEIN HIDROLAZE:
MOLEKULARNI MEHANIZMI NOVOG
OBOLJENJA

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr.sc. Oliver Vugrek

Komentor: dr.sc. Igor Jurak

Rijeka, 2017.

UNIVERSITY OF RIJEKA
BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT

Lucija Kovačević

S-ADENOSYLHOMOCYSTEINE
HYDROLASE DEFICIENCY: MOLECULAR
MECHANISMS OF NOVEL DISORDER

DOCTORAL THESIS

Rijeka, 2017.

Mentor rada: Dr. sc. Oliver Vugrek

Doktorski rad obranjen je dana 12.6.2017. na Sveučilištu u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Munić – predsjednica
2. Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac – član
3. Prof. dr. sc. Jadranka Varljen – član
4. Dr. sc. Oliver Vugrek – mentor
5. Doc. dr. sc. Igor Jurak – komentor.

Zahvale

Veliko hvala mentoru Oliveru Vugreku na iskaznom povjerenju tijekom zapošljavanja na InnoMol projekt čime mi je dao priliku da pokažem svoju motivaciju i želju za radom. Zahvaljujem i na svim poticajima za upis na doktorski studij kao i svu pomoć bez koje ne bi bilo moguće ovako uspješno i brzo realizirati izradu ove doktorske disertacije. Najvažnije, vlastitim visokim znanstvenim standardom dao mi je primjer i potaknuo me da u budućem radu cijenim interdisciplinarnost i znanstvenu izvrsnost.

Dragi kolege Robert Belužić, Jelena Trmčić Cvitaš, Ivana Grbeša, Jelena Knežević, Jozefina Katić, Adriana Lepur, Filip Rokić, Pau Marc Munoz Torres! Ponaprije vam zahvaljujem za svu pomoć, savjete i potporu što je neizmjereno pridonijelo kvaliteti ove disertacije. Još više vam hvala na izvrsnom timskom radu i uvijek ugodnom radnom okruženju.

Zahvaljujem svim ostalim članovima Laboratorija za naprednu genomiku, kolegama sa zavoda, instituta, fakulteta i stranih institucija u kojima sam boravila na poticajnom znanstvenom okruženju za rad kao i za svaki put kada su mi pomogli na bilo koji način.

Zahvaljujem članovima povjerenstva koji su uvelike zaslužni za poboljšanje kvalitete ove disertacije: komentoru doc. dr. sc. Igoru Juraku na velikoj pomoći u zadnjoj fazi izrade doktorske disertacije, zatim predsjednici komisije doc. dr. sc. Ivani Munitić na iscrpnoj recenziji te članovima komisije prof. dr. sc. Anđelki Radojčić Badovinac i prof. dr. sc. Jadranki Varljen na svim preporukama tijekom pisanja rada.

Zahvaljujem mojim bliskim prijateljima koji su me pratili i podupirali: Ivi, Sari i Jeleni te bioinfo ekipi koja je iz daljine pratila moj rad i poticala moj uspjeh na nezaboravnim „reunionima“ na kojima sam „punila baterije“ za daljnji rad: Ingi, Mateji, Nikolini, Petri, Saši i Zrinku.

Zahvaljujem članovima svoje obitelji koji su me podupirali u svim aspektima života pa tako i u mojim akademskim postignućima: Ivani, Dinu, Anti, Vesni, Jakovu, Juliji, Ivanu Vidu, Vidu Vjekoslavu i Mehaliji. Zahvaljujem svojim roditeljima koji su me naučili da vjerujem u Boga, da budem strpljiva i nikada ne odustajem.

Zahvaljujem dečku Robertu na apsolutnoj potpori i razumijevanju. Radujem se našim budućim zajedničkim uspjesima.

„No road is long with good company.“ Turkish proverb

Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije je izrađen u Laboratoriju za Naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković i financiran InnoMol projektom (*„Enhancement of the Innovation Potential in SEE through new Molecular Solutions in Research and Development“*) od strane Europske komisije pod vodstvom dr.sc. Olivera Vugreka u sklopu sheme REGPOT iz Sedmog okvirnog programa (FP7) (*„7th Framework Programme for Research and Technological Development“*).

Razmjene u drugim znanstvenoistraživačkim institucijama su financirane na sljedeći način:

- Goethe Institut Frankfurt - InnoMol
- CNRS Orleans - stipendija Vlade Republike Francuske
- MUP Zagreb – volontiranje.

SAŽETAK

Uvod i cilj

Nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze (AHCY) je poremećaj uzrokovan mutacijama u genu *ahcy* čime je smanjena aktivnost proteina AHCY. AHCY ima ključnu ulogu u pravilnom odvijanju ciklusa aminokiseline metionina u stanici, stoga nedostatak njegove funkcije uzrokuje težak metabolički poremećaj. Kao jedini enzim koji hidrolizira SAH, snažni inhibitor staničnih metiltrasferaza, AHCY ima i indirektnu ulogu u održavanju metilacijskog statusa stanice. Klinička slika ovog potencijalno letalnog oboljenja je karakterizirana kombinacijom mišićnih, neuroloških i jetrenih poremećaja. Unatoč dokazanoj esencijalnosti AHCY, promjene u molekularnim mehanizmima stanice u stanju nedostatka AHCY su dosada nedovoljno istražene. Cilj ove doktorske disertacije je analiza i razumijevanje molekularnih i staničnih uloga AHCY s krajnjom svrhom probira potencijalnih biomarkera oboljenja.

Materijali i metode

U sklopu ove disertacije su rađene studije novootkrivene Y328D mutante potvrđene u pacijentici oboljeloj od nedostaka funkcije AHCY, a za dodatna istraživanja na raspolaganju su bili i primarni fibroblasti pacijentice. Zbog ograničenja u radu s primarnim fibroblastima, tijekom izrade doktorske disertacije su se pripremili, validirali i istraživali modelni stanični sustavi za što se koristila kombinacija metoda klasične biologije i različitih omiks i visokoprotočnih tehnika.

Rezultati

Po prvi puta je tijekom istraživanja AHCY korištena metoda kojom se na temelju fluorescencije dviju komplementiranih podjedinica proteina Venus s kojima su označeni proteini od interesa može pratiti njihova interakcija u ljudskim stanicama. Dokazano je da Y328D mutanta gubi sposobnost homodimerizacije, a metoda je također uspješno prilagođena na visokoprotlačno skeniranje interaktora proteina AHCY. Nadalje, uočena je smanjena razina mutiranih AHCY mRNA i proteina u fibroblastima pacijenta i u stanicama sa stabilno eksprimiranim mutiranim AHCY. U istim stanicama je također mikroskopijom pokazano da mutacije uzrokuju povećanu ili smanjenu količinu proteina u jezgri stanica u odnosu na divlji tip. U stanicama hepatocelularnog karcinoma s utišanim AHCY smanjena je proliferacija i migracija te su aktivirani stanični putevi koji signaliziraju oštećenje DNA. Tijekom analize transkriptoma i proteoma fibroblasta pacijenta i stanica hepatocelularnog karcinoma s utišanim AHCY, uočena je moguća veza proteina AHCY s patologijom različitih

neuroloških, jetrenih i mišićnih oboljenja, a predložena su i dva potencijalna biomarkera oboljenja.

Zaključci

Promjene razine AHCY mRNA i proteina, kao i lokalizacije AHCY u stanici koje su uočene u svih istraživanih mutanti proteina AHCY mogu biti odgovorne ili pridonositi patologiji kod oboljenja nedostatka AHCY. Prema predloženom mehanizmu AHCY ima utjecaj na oštećenje DNA i stanični ciklus. Dva potencijalna biomarkera su predložena s ciljem nastavka njihovog budućeg istraživanja u svrhu prognostike i dijagnostike oboljenja nedostatka AHCY.

Ključne riječi: Nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze (AHCY), metilacija, rak, sekvenciranje sljedeće generacije, SILAC, BiFC, biomarkeri

Ovaj doktorska disertacija sadrži 150 stranica, 33 slike, 15 tablica i 75 literaturnih navoda.

ABSTRACT

Introduction and aims

S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency is a disorder caused by lowered enzymatic activity of AHCY protein due to the mutations in *ahcy* gene. AHCY has a key role in proper functioning of the methionine cycle in cell, therefore the lack of AHCY function causes severe metabolic disorder. Since AHCY is a single enzyme that hydrolyses SAH, a strong inhibitor of cellular methyltransferases, it has a central role in maintaining the methylation status of the cell. Clinical presentation of this potentially lethal disorder includes a combination of muscular, neurological and hepatic disorders. Despite the essential activity of AHCY, changes in molecular and cellular mechanisms in the state of AHCY deficiency have so far been poorly investigated. The aim of this doctoral thesis is the analysis and understanding of molecular and cellular roles of AHCY and prediction of potential disease biomarkers.

Materials and methods/methodological approach

In this thesis, we performed studies of newly discovered Y328D mutant confirmed in the recent case of AHCY deficiency. Patient fibroblasts were obtained from the mentioned case, however, due to the limitations in experimental work with primary fibroblasts, we prepared, validated and investigated model cellular systems by combining methods ranging from classical biology approach to different omics and high throughput techniques.

Results

A method that enables visualization of protein interactions in human cells based on fluorescence of two complemented parts of Venus protein fused to proteins of interest was used for the first time to research AHCY protein. It is proven that Y328D mutant lacks the ability to form homodimers in human cells, and the method has been also successfully adapted to high throughput screening of AHCY protein interactors. Further, we report lower levels of mutant AHCY mRNA and protein in patient fibroblasts as well as cells that stably express AHCY mutant proteins. Microscopy revealed higher or lower amounts of mutant AHCY protein in cell nuclei in mentioned cells when compared to wild type. In hepatocellular carcinoma cells with a silenced AHCY expression we report lowered proliferation and migration as well as activation of DNA damage induced cellular pathways. While analyzing the transcriptome and proteome of patient fibroblasts and hepatocellular carcinoma cells with silenced AHCY expression, potential implications of AHCY protein in the

pathology of various neurological, hepatic and muscular diseases are recognized, and two potential disease biomarkers are suggested.

Conclusions

Changes in levels of mutant AHCY mRNA and protein, as well as changed cellular localization of mutant AHCY could be responsible for or contribute to the pathology of the AHCY deficiency. As proposed by our mechanism, AHCY can impact cellular DNA damage and cell cycle. Two biomarkers are suggested for further research and usage in prognostics and diagnostics of AHCY deficiency.

Keywords: S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency, methylation, cancer, Next generation sequencing, SILAC, BiFC, biomarkers

This doctoral thesis contains 150 pages, 33 images, 15 tables and 75 literature references.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
1.1. Nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze	2
1.2. Metilacija.....	4
1.3. Ciklus metionina	5
1.4. Uloga jetre i istraživanja poremećaja metilacije	8
1.5. Klinička slika nedostatka AHCY	9
1.6. Terapijski pristupi	10
1.7. S-adenozilhomocistein hidrolaza	11
1.8. Mutacije u genu <i>ahcy</i> i funkcionalne analize mutanti.....	15
1.9. Korelacija genotipa s kliničkom slikom u slučajevima nedostatka.....	17
AHCY.....	17
1.10. Uloge i unutarstanična lokalizacija AHCY	20
1.11. Interakcije AHCY s drugim proteinima – interaktom AHCY	22
1.12. Sistemska biologija u istraživanju proteina AHCY	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. Materijali	29
3.1.1. Antibiotici	29
3.1.2. Oligonukleotidne početnice	29
3.1.3. Bakterijski sojevi.....	31
3.1.4. Stanične linije	31
3.1.5. Genomska DNA i plazmidni vektori	32
3.2. Metode	37
3.2.1. Dekontaminacija i uvjeti rada.....	37
3.2.2. Mikrobiologija i heterologna ekspresija rekombinantnih proteina	38

3.2.2.1.	Uzgoj bakterija	38
3.2.2.2.	Manipulacija hORFeome bankom gena.....	38
3.2.2.3.	Transformacija bakterija elektroporacijom.....	39
3.2.2.4.	Probir i propagacija pozitivnih plazmidnih klonova.....	39
3.2.2.5.	Pročišćavanje plazmidnih vektora	40
3.2.2.6.	Indukcija heterologne ekspresije proteina	40
3.2.2.7.	Pročišćavanje rekombinantnih proteina na Ni ²⁺ -agarozi	41
3.2.3.	Rad s DNA	42
3.2.3.1.	LR rekombinacija (<i>Gateway</i> [®] kloniranje).....	42
3.2.3.2.	Umnažanje slijeda nukleotida s genomske DNA.....	42
3.2.3.3.	Ciljana mutageneza	45
3.2.3.4.	Elektroforeza u gelu agaroze	46
3.2.3.5.	Pročišćavanje PCR produkata iz gela	46
3.2.3.6.	Sanger sekvenciranje	46
3.2.4.	Rad s RNA	47
3.2.4.1.	Izolacija i pročišćavanje ukupne RNA iz stanica	47
3.2.4.2.	Analiza razine ekspresije gena kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	47
3.2.4.3.	Sekvenciranje transkriptoma.....	48
3.2.5.	Rad s proteinima	49
3.2.5.1.	Pripremanje proteinskih lizata	49
3.2.5.2.	Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS PAGE)	50
3.2.5.3.	Western blot.....	50
3.2.5.4.	Komparativna proteomika (SILAC + LC-MS/MS)	53
3.2.6.	Stanična biologija i mikroskopija.....	54
3.2.6.1.	Uzgoj stanica u kulturi	54
3.2.6.2.	Prolazna i stabilna transfekcija stanica	56
3.2.6.3.	Testovi proliferacije	57
3.2.6.4.	Migracijski test	58
3.2.6.5.	Komplementacija dviju molekula fluorescencijom (BiFC).....	58
3.2.6.6.	Priprema uzoraka za mikroskopiju	61

3.2.6.7. Mikroskopija	61
3.2.7. Programi i metode za obradu i statističku analizu podataka i slika	61
4. REZULTATI	65
4.1. Analiza biološkog materijala pacijenta s nedostatkom funkcije AH CY (Strauss i sur. 2015)	65
4.1.1. Potvrda mutacije u genu <i>ahcy</i> kod pacijenta s metaboličkim poremećajem.....	65
4.1.2. Analiza razine nativnog AH CY RT-qPCR-om i Western blotom	66
4.1.3. Ciljana mutageneza pET32_AH CY vektora.....	68
4.1.4. Analiza ekspresije rekombinantnih proteina SDS-PAGE..... metodom	69
4.2. Komplementacija dviju molekula fluorescencijom (BiFC)	70
4.2.1. Priprema vektora za komplementaciju dviju molekula..... fluorescencijom	70
4.2.2. Analiza molekularne stabilnosti mutante AH CY YD pomoću..... BiFC metode	71
4.2.3. Prilagodba BiFC metode na visoku protočnost koristeći AH CY..... kao mamac.....	73
4.2.4. Analiza uspješnosti visokoprotočnog skeniranja BiFC metodom.....	75
4.3. Analiza mutanti gena <i>ahcy</i> u humanim stanicama	76
4.3.1. Kloniranje vektora za ekspresiju proteina AH CY u ljudskim stanicama.....	Error! Bookmark not defined.
4.3.2. Smanjena razina ekspresije mRNA i mutiranog proteina AH CY u HEK 293 stanicama.....	78
4.3.3. Promjena lokalizacije mutanti proteina AH CY	80
4.4. Stanice s utišanim AH CY	82
4.4.1. Utišavanje ekspresije nativnog gena <i>ahcy</i>	82
4.4.2. Analiza utjecaja AH CY na karcinogeni potencijal	83

4.4.3. Promjene razine proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa	85
4.5. Primjena omiks metoda u istraživanju funkcije gena <i>ahcy</i>.....	90
4.5.1. Analiza transkriptoma i proteoma stanica Hep G2 s utišanim genom <i>ahcy</i>	90
4.5.2. Analiza transkriptoma i proteoma fibroblasta pacijenta s nedostatkom AHCY	92
4.6. Uloge AHCY i mreža interakcija s drugim proteinima.....	96
5. RASPRAVA.....	100
5.1. Analiza Y328D mutante	101
5.2. Ekspresija i lokalizacija AHCY u ljudskim stanicama.....	103
5.3. Interaktom AHCY	106
5.4. AHCY i oštećenje DNA	108
5.5. Uloge AHCY i probir biomarkera	113
6. ZAKLJUČCI.....	116
7. LITERATURA	119
8. POPIS KRATICA	129
9. POPIS ILUSTRACIJA.....	130
9.1. Slike	130
9.2. Tablice	132
10. ŽIVOTOPIS.....	133

1. UVOD

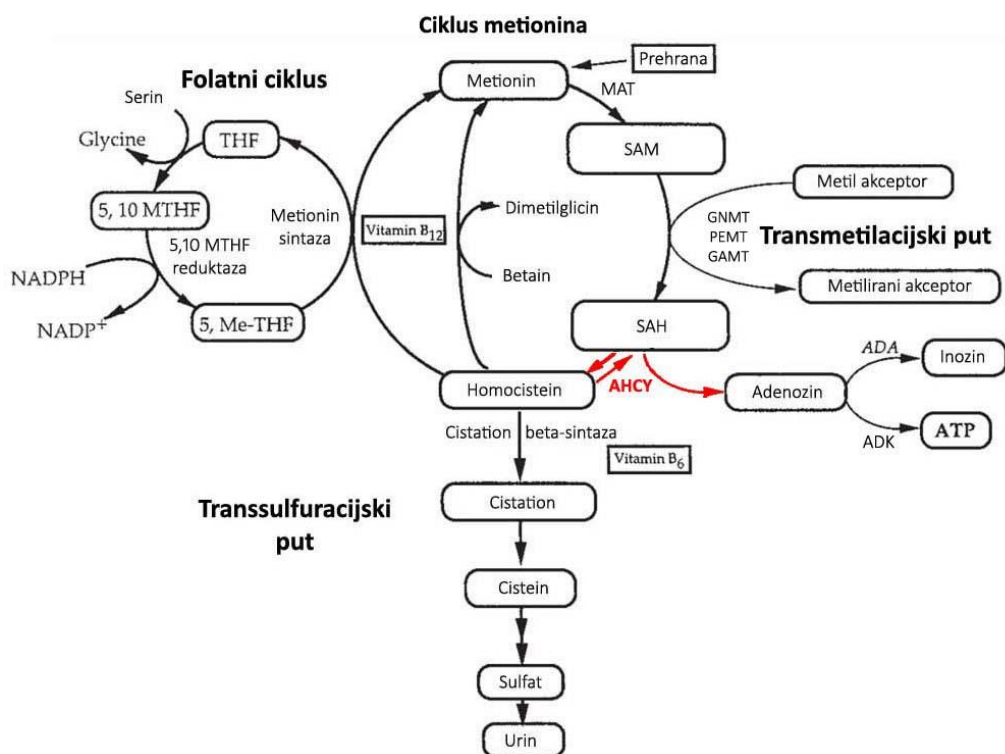
4 slike, 3 tablice

1. UVOD

1.1. Nedostatak S-adenozilhomocistein hidrolaze

Nedostatak enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze (engl. *S-adenosylhomocystein hydrolase deficiency*, AHCY) je rijetko nasljedno oboljenje uzrokovano recesivnim mutacijama u genu *ahcy* (Barić i sur. 2004). Takve mutacije dovode do smanjenja ili potpune inaktivacije enzimske aktivnosti proteina AHCY: jedinog enzima koji u ljudskim stanicama katalizira cijepanje S-adenozilhomocisteina (SAH) na adenzin i homocistein (Slika 1). Stanični SAH je produkt metiltransferaznih reakcija u kojima se koristi S-adenozilmetionin (SAM) kao donor metilne skupine za metiliranje širokog spektra supstrata, no ujedno je i snažan kompetitivni inhibitor istih metiltrasferaza (Lu i Mato 2012). Hidroliza SAH predstavlja važan korak u nizu transmetilacijskih i transulfuracijskih reakcija kao što je prikazano na Slici 1, čime AHCY indirektno sudjeluje u regulaciji i održavanju metilacijskog statusa stanice (Clarke i Banfield, 2001). Nedostatak AHCY se zbog toga uz metabolički klasificira i kao metilacijski poremećaj u kojem dolazi do spektra nepovoljnih promjena biokemijskih pokazatelja i kliničkih simptoma vezanih uz jetrene, mišićne i neurorazvojne poremećaje. Težina ove multisistemske i potencijalno letalne bolesti je evidentna i prema činjenici da je dosada u literaturi opisano tek 10 slučajeva oboljenja. Nasljedni metabolički poremećaji, uključujući i nedostatak AHCY, spadaju u rijetke bolesti koje se pojavljuju u relativno malom broju osoba u odnosu na opću populaciju (1 na 2000 osoba u Europi prema *Orphanet* bazi). Do danas je prema *Orphanet* europskoj bazi podataka rijetkih bolesti otkriveno i opisano više od 6000 rijetkih bolesti (<http://www.orpha.net/national/HR-HR/index/naslovnica/>). Rijetke bolesti su ozbiljna, često kronična i progresivna oboljenja kod kojih simptomi mogu biti primjetni nakon rođenja ili u djetinjstvu, no u više od 50% slučajeva ovakva oboljenja se mogu manifestirati i kasnije, tj. tijekom odraslog života. U polju rijetkih bolesti svakako nedostaje medicinskog i znanstvenog znanja, a s obzirom da većina liječnika nema iskustva s metilacijskim oboljenjima, pretpostavlja se da ista ostaju uvelike nedijagnosticirana (Barić i sur. 2016). Republika Hrvatska je članica projekta E-HOD (engl. *European Network and Registry for Homocystinurias and Methylation Defects*; <http://www.e-hod.org/>), mreže i registra za homocistinurije i metilacijske poremećaje čiji je cilj na temelju znanstvenih činjenica objediniti preporuke za

dijagnozu i tretman ove grupe oboljenja. Iako je tijekom proteklog desetljeća istraživanja oboljenja nedostatka AHCY došlo do pomaka u razumijevanju funkcionalnih karakteristika proteina AHCY, te biokemijskih promjena, simptoma i terapije u oboljelih, molekularni i stanični procesi u pozadini bolesti su dosada slabo istraženi. Poseban fokus ove disertacije je nedavno opisani slučaj nedostatka funkcije AHCY uslijed mutacija Y143C i Y328D (Strauss i sur. 2015). U svrhu istraživanja molekularnih mehanizama bolesti, uloga proteina AHCY u stanici i probira potencijalnih biomarkera koristili su se upravo fibroblasti dobiveni od ovog pacijenta.



Slika 1. Shematski prikaz ciklusa metionina i razgradnje SAH pomoću proteina AHCY. Preklapanje ciklusa metionina s transmetilacijskim putem osigurava AHCY proteinu (crveno) ključnu ulogu u održavanju metilacijskog potencijala stanice. Pravilno odvijanje transsulfuracijskog i folatnog staničnog puta je također ovisno o aktivnosti AHCY koji na taj način sudjeluje u očuvanju opće metaboličke homeostaze stanice (prepravljeno iz Turner i sur. 2000). ADA, adenzin deaminaza; ADK, adenzin kinaza; ATP, adenzin trifosfat; GAMT, gvanidinoacetat metiltransferaza; GNMT, glicin N-metiltransferaza; MAT, metionin adenziltransferaza; 5,10 MTHF, 5-/10-metiltetrahidrofolat; NADPH/NADP⁺, nikotinamid-adenin-dinukleotid/fosfat; PEMT, fosfatidiletanolamin N-metiltransferaza; SAH, S-adenozilhomocistein; SAM, S-adenozilmetionin; THF, tetrahidrofolat.

1.2. Metilacija

Cijeli niz staničnih procesa i funkcija je ovisan o pravilnom metilacijskom statusu stanice. Metilacija DNA je jedna od najviše proučavanih epigenetskih modifikacija kod sisavaca, a označava kovalentno vezanje metilne skupine na 5'C atom citozina unutar DNA regija bogatih GC nukleotidima (Robertson i Jones 2000). Metilacija je uz acetilaciju, ribozilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju i sumoilaciju jedna od najvažnijih kovalentnih modifikacija N-terminusa histonskih proteina. Sukladno tome je dosada potvrđeno da dinamika metilacije histonskih arginina i lizina ima uloge u osnovnim biološkim procesima (npr. regulacija staničnog ciklusa ili reakcija stanice na stres i DNA oštećenje) kao i procesima vezanima uz različite bolesti i starenje (Greer i Shi 2012). U središtu metilacijskog statusa stanice se nalaze transmetilacijske reakcije koje omogućuju regulaciju i kontrolu staničnih procesa na svim informacijskim razinama (Tehlivets i sur. 2013). Analizom otvorenih okvira čitanja gena ljudi (engl. *open reading frame*, ORF) je ustanovljeno da postoji mnogo više od dosada opisanih enzima s metiltransferaznom aktivnošću: 0,6%-1,6% ORF-ova kodiraju za SAM ovisne metiltransferaze (Katz i sur. 2003). Ovi enzimi modificiraju raznolike supstrate (DNA, razne vrste RNA, proteini, lipidi), a sudjeluju u ključnim procesima biosinteze hema, ubikvinona, kateholamina, melatonina itd. (Tehlivets i sur. 2013). Kao što je prethodno spomenuto, protein AHCY je jedini enzim u sisavaca koji hidrolizira SAH, snažan inhibitor metiltransferaza. Indirektna, ali esencijalna uloga AHCY u staničnoj metilaciji i općoj homeostazi stanice je potvrđena kod miševa s nedostatkom gena *ahcy* (engl. *AHCY knock-out*) u kojih je zabilježena letalnost u ranom embrionalnom stadiju (Miller i sur. 1994). Važnost aktivnosti AHCY u ljudi je naglašena nakon otkrića nedostatka AHCY kao vrlo teškog i potencijalno letalnog oboljenja koje uzrokuje spektar poremećaja na razini tkiva, organskih sustava i cijelog organizma. Očekivano smanjena razina metilacije zbog inhibicije metiltransferaza sa suviškom SAH nije se pokazala točnom: utvrđeno je da je nedostatak AHCY hipermetilacijski poremećaj. Pretpostavlja se da postoje specifične DNA metiltransferaze koje nisu toliko osjetljive na povišene koncentracije SAH, iako ta pretpostavka dosada nije dokazana. U Belužić i Vugrek (2010) je hipotezirano da SAH osjetljive metiltransferaze ostaju inhibirane, a da je povišeni stanični SAM u suvišku na raspolaganju neinhibiranim metiltransferazama koje hipermetiliraju DNA pacijenata. Motzek i sur. (2016) su proučavali promjene u DNA metilaciji u uzorcima krvi iz

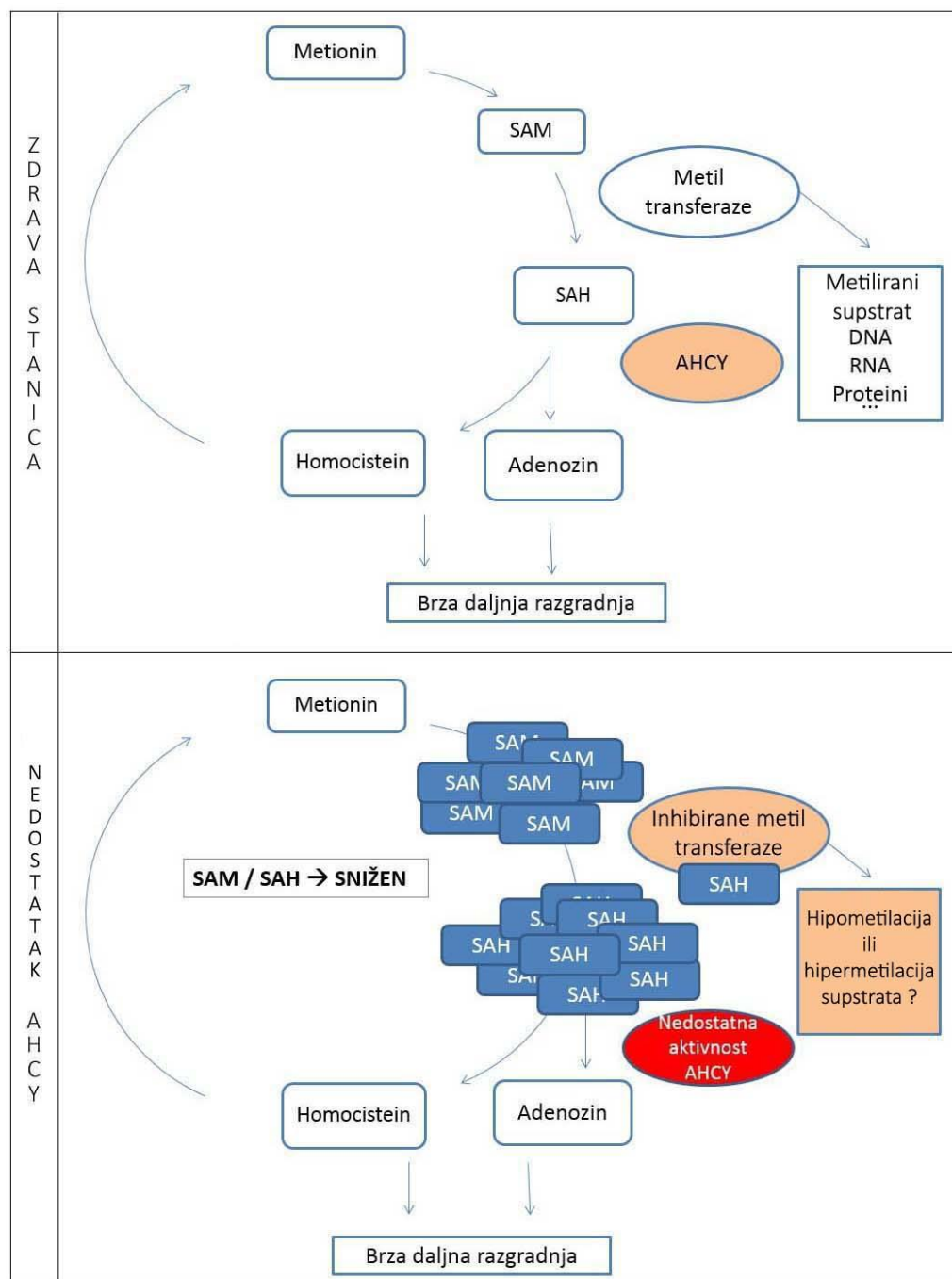
pacijenata s nedostatkom AHCY i zaključili da postoji često ponavljajuć, ali ne i konstantan uzorak metilacije koji bi se povezao s nedostatkom AHCY, već da su promjenama zahvaćene različite regije genoma u različitom stupnju. U sklopu ove doktorske disertacije neće se direktno proučavati epigenetske promjene vezane uz nedostatak AHCY već posljedice poremećenog metilacijskog statusa stanice koje su vidljive na razini transkriptoma i proteoma stanice što se smatra ključnim za razumijevanje molekularne podloge oboljenja.

1.3. Ciklus metionina

Jedna od uloga proteina AHCY je održavanje koncentracija ključnih metabolita ciklusa aminokiseline metionina u stanici: SAM, SAH, adenzina i homocisteina (Slika 2). SAM se smatra glavnim donatorom metilne skupine koju transmetilacijski enzimi koriste za metiliranje različitog spektra supstrata, a nastaje reakcijom metionina s adenzin-trifosfatom (ATP) enzimskom katalizom metiladenziltransferaze (MAT). Osim SAM, drugi poznati kofaktori koji u biološkim sustavima služe kao donori metilne skupine su metiltetrahidrolat (MTHF) ili metil-B₁₂ (Ragsdale, 2008). SAH, nusprodukt reakcija metiliranja i kompetitivni inhibitor metiltransferaza (Lu i Mato 2012), se uklanja iz njihove blizine enzimskom aktivnošću proteina AHCY. Kemijska reakcija hidrolize SAH je reverzibilna i ravnotežno preferira smjer sinteze SAH, no u fiziološkim uvjetima stanice zbog brzog uklanjanja adenzina i homocisteina (detaljnije prikazano na Slici 1) teče u smjeru hidrolize. Adenzin-monofosfat (AMP) nastaje fosforilacijom adenzina pomoću adenzin kinaze (ADK). Drugi način korištenja adenzina je deaminacija pomoću adenzin deaminaze (ADA) prilikom čega nastaje inozin. Hidroliza SAH je jedini izvor homocisteina u sisavaca iz kojeg remetilacijom nastaje metionin čime se zaokružuje ciklus metionina unutar stanice. Drugi metabolički put u koji ulazi homocistein je transsulfuracija kojom nastaje cistation odnosno cistein.

Iako je biokemijska slika pacijenata s nedostatkom AHCY vrlo složena i slična drugim metilacijskim oboljenjima (opisana u poglavlju 1.4.), bitno je napomenuti nekoliko pokazatelja važnih u dijagnostici i terapiji oboljenja. Uz povišenje metionina pri dijagnostici nedostatka AHCY ključne su vrijednosti metabolita koji sadrže sumpor jer su glavni razlikovni biokemijski pokazatelji u odnosu na druga metilacijska oboljenja: SAM i SAH s karakterističnim disbalansom SAM/SAH omjera (Hončík i sur. 2012). Izmjerene vrijednosti ovih pokazatelja u dosadašnjim slučajevima nedostatka

AHCY su popisane u Tablici 1. Zbog povišenja metionina pacijenti se nalaze u stanju hipermetioninemije pa se terapija zasniva na smanjenju unosa ukupnog metionina. Uz navedene promjene zabilježene su poremećene vrijednosti brojnih drugih metabolita od kojih je najznačajnije povišenje aminotransferaza i kreatin kinaze (Barić i sur. 2005).



Slika 2. Shematski prikaz uloge AHCY u ciklusu metionina i metilacijskim procesima u zdravoj stanici i stanici s nedostatnom aktivnošću proteina AHCY. Gore: zdrava stanica. Dolje: nedostatak AHCY. AHCY, S-adenozilhomocistein hidrolaza; SAH, S-adenozilhomocistein; SAM, S-adenozilmetionin.

Tablica 1. Vrijednosti metabolita zabilježene u dosadašnjim pacijentima s nedostatkom AHCY. Metionin (referentne vrijednosti prikazane u zagradi), S-adenozilmetionin (SAM), S-adenozilhomocistein (SAH) i SAM/SAH omjer (referentna vrijednost 2,42–7,26). Podaci su preuzeti direktno ili izračunati prema apsolutnim koncentracijama iz referenci (× = puta u odnosu na kontrolu; / = nije mjereno).

Pacijenti		Mutacije	SAH	SAM	SAM/SAH	Metionin (µM)
Broj pacijenta	Rodbinska veza (referenca)		u plazmi u odnosu na kontrolu			
1	Prvi slučaj (Barić i sur. 2004)	Y143C/W112STOP	150 ×	30 ×	0,59	477–784 (13–45)
2	Brat od pacijenta 1 (Barić i sur. 2005)	Y143C/W112STOP	5 ×	1,6 ×	1,13	16–72 (13–45)
3	Brat od pacijenata 1 i 2 (Čuk i sur. 2007)	Y143C/W112STOP	6,5 ×	1,8 ×	0,28	Bez promjene
4	Nezavisan slučaj (Buist i sur. 2008)	Y143C/A89V	28 ×	20 ×	0,71	424–542 (3,3-42,7)
5	Sestra od pacijentice 6 (Vugrek i sur. 2009)	R49C/D86G	/	/	/	/
6	Sestra od pacijentice 5 (Grubbs i sur. 2010)	R49C/D86G	81 ×	23 ×	0,28	642–1158 (13,3–42,7)
7	Nezavisan slučaj (Honzík i sur. 2012)	R49C/G71S	84 ×	23 ×	0,27	259–547 (12–45)
8	Nezavisan slučaj Strauss i sur. (2015)	Y143C/Y328D	200 ×	50 ×	0,62	591 (22–40)
9	Majka od pacijenta 10, sestra od pacijenata 11 i 12 (Stender i sur. 2015)	R49H/R49H	/	/	/	/
10	Dijete od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)	R49H/R49H	163 ×	30 ×	0,18	528 (6–60)
11	Brat od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)	vrlo vjerojatno R49H/R49H	/	/	/	/
12	Brat od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)	vrlo vjerojatno R49H/R49H	/	/	/	/

1.4. Uloga jetre i istraživanja poremećaja metilacije

Iako se SAM sintetizira u svim stanicama sisavaca, njegova razina u tkivima ovisi o funkciji određenog organa i dostupnosti metionina. Transsulfuracijske i transmetilacijske reakcije su koncentrirane u jetri (Lu i Mato 2012) u kojoj hepatociti posreduju u 85% svih transmetilacijskih reakcija i metaboliziraju 50% metionina unesenog prehranom (Finkelstein 1990). Važnost aktivnosti enzima koji su uključeni u metabolizam SAM i metionina je uočena u pacijenata s oboljenjima kao što su ciroza jetre ili hepatocelularni karcinom. Kod bolesnika s cirozom jetre je zabilježena smanjena aktivnost enzima MAT i PEMT (fosfatidiletanolamin N-metiltransferaza) (Duce i sur. 1998). Također, u velikom broju slučajeva ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma je primjećena smanjena ekspresija enzima MAT, GNMT (glicin N-metiltransferaza), PEMT i MS (metionin sintaza) (Avila i sur. 2000). S obzirom na uočenu važnu ulogu SAM u održanju funkcija jetre, nužno je njegovu razinu održavati konstantnom i to neovisno o unosu metionina ili prekursora koji sudjeluju u njegovoj sintezi (Mato i sur. 2013). Veza razine SAM i zdravlja jetre primjećena u navedenim oboljenjima se poklapa i sa svim dosada opisanim slučajevima nedostaka AHCY u kojih zamjećujemo povišenje razine SAM (Tablica 1) i različite poremećaje jetre detaljnije opisane u poglavlju fokusiranom na kliničku sliku oboljenja.

Dosada su dokumentirana razna patološka stanja povezana s poremećajima metilacije što ne čudi s obzirom na već istaknute važne uloge različitih vrsta metilacija u stanici. Osim nedostatka AHCY, poznati nasljedni metabolički poremećaji metionin-homocistein puta uključuju još neka dobro opisana oboljenja vezana uz iznad spomenute enzime prikazane na Slici 1. Sva niže spomenuta oboljenja su multisistemska, a međuostalim uključuju i simptome vezane uz bolesti jetre i/ili gušterače, što dodatno naglašava važnost održavanja vrijednosti metabolita u uskom rasponu u metabolički aktivnim organima. Dva oboljenja su klasificirana kao izolirane trajne hipermetioninemije: nedostatak MAT enzima kojim se sintetizira SAM iz metionina (Gaull i Tallan 1974) i nedostatak enzima GNMT koji koristi metilnu grupu SAM da bi se metilirao glicin i proizveo sarkozin (Mudd i sur. 2001). Iako ne spada u enzime transmetilacijskog ciklusa, adenzin kinaza (ADK) koja katalizira fosforilaciju adenzina na adenzin monofosfat (AMP) ima indirektan utjecaj na pravilno funkcioniranje metioninskog ciklusa. Naime, nakupljanje adenzina do kojeg dolazi u oboljenju nedostatne aktivnosti ADK uzrokuje povišenje razine SAH i SAM te

posljedično stanje hipermetioninemije u pacijenata (Bjursell i sur. 2011). Cystation β -sintetaza (CBS) je enzim koji povezuje metioninski i transsulfuracijski ciklus. Nedostatna aktivnost CBS primarno uzrokuje hiperhomocisteinemiju i homocistinuriju, a sekundarno onemogućava pravilno odvijanje metilacijskog ciklusa čime dolazi do stanja hipermetioninemije u pacijenata (Picker i Levy 2014).

Proučavanje metilacijskih oboljenja može dati nove uvide u uloge koje metilacija i epigenetske modifikacije mogu imati u razvoju i diferencijaciji normalnih stanica u homeostazi. Dostupni biološki materijal iz nedavnog slučaja (Strauss i sur. 2015) su fibroblasti dobiveni biopsijom, a u ovoj disertaciji će se koristiti u svrhu istraživanja promjena u molekularnim mehanizmima stanice u stanju hipermetioninemije te za probir potencijalnih biomarkera metilacijskih oboljenja. S obzirom na mali broj pacijenata, a time i nedostupnost biološkog materijala potrebnog za cijeli niz eksperimenata, cilj ove disertacije je uspostaviti i validirati nove modelne stanične sustave koji su prikladniji za daljnja istraživanja. Poseban naglasak se stavlja na istraživanje uloga AH CY u stanicama hepatocelularnog karcinoma zbog napomenute povezanosti pravilne aktivnosti AH CY i oboljenja jetre, ali i zbog zabilježene visoke razine ekspresije AH CY u ovim stanicama.

1.5. Klinička slika nedostatka AH CY

Ovisno o kombinaciji dosada otkrivenih 8 mutacija u pacijenata s nedostatkom AH CY, uočena je smanjena aktivnost enzima u tkivu u rasponu 5-20% kontrolnih vrijednosti (Buist i sur. 2006; Barić i sur. 2005; Strauss i sur. 2015). Ovako drastično smanjenje aktivnosti AH CY uzrokuje težak i potencijalno smrtonosan enzimski defekt karakteriziran kombinacijom simptoma vezanih uz:

- a) mišićne poremećaje: miopatija, mišićna hipotonija, sarkopenija, opća tromost, slaba pokretljivost, slaba kontrola glave i pokreta, hiporefleksija (oslabljeni tetivni, Moro, plantarni i ostali primitivni refleksi), konvergentni strabizam;
- b) razvojne zaostatke: smanjena razina mijelinizacije mozga, mikrocefalija, stagnacija i nazadovanje psihomotornog razvoja, nezainteresiranost, poremećaj pažnje i hiperaktivnost, opsesivno ponašanje, samoozljeđivanje, impulzivna agresija, preosjetljivost na zvukove;
- c) jetrene bolesti: blaži kronični hepatitis, portalna fibroza, hiperplazija glatkog i nedostatak zrnatog endoplazmatskog retikuluma u hepatocitima, jedan slučaj hepatocelularnog raka (pacijent broj 9 Tablica 2);

d) dodatno: fetalni hidrops u pacijenata broj 5 i 6 u Tablici 2.

1.6. Terapijski pristupi

Terapija kod nedostatka AHCY se do slučaja opisanog od Strauss i sur. (2015) primjenjivala isključivo u obliku modifikacija u prehrani pacijenata (Barić i sur. 2004; Buist i sur. 2006). Cilj terapije je smanjenje hipermetioninemije i očite inhibicije metiltransferaza (Slike 1 i 2). Osim smanjenja unosa metionina, dodaje se fosfatidilkolin zbog očekivane inhibicije enzima PEMT (Clarke i Banfield 2001) i kreatin zbog potencijalne inhibicije gvanidinoacetat metiltransferaze (GAMT) te povišenih razina gvanidinoacetata u plazmi i urinu nekih pacijenata s nedostatkom AHCY (Barić i sur. 2004; Buist i sur. 2006). U terapijsku prehranu pacijenata se dodaje i cistein zbog potencijalnog rizika od manjka glutationa. Terapijska efikasnost ovih dodataka je temeljena na teoretskom poznavanju metaboličkih ciklusa stanice, a konkretna poboljšanja kliničkih parametara su zasada vezana samo uz restrikciju metionina.

U slučajevima pacijenata broj 1, 2 i 3 u Tablici 1 koji boluju od nedostatka AHCY, restrikcija unosa metionina, te suplementacija kreatinom i fosfatidilkolinom su doveli do normalizacije razine SAH. Pacijenti broj 2 i 3, braća pacijenta broj 1, su bili uključeni u terapiju ubrzo nakon rođenja te su poboljšanja u mijelinizaciji i statusu mišića i jetre bila izražajnija u odnosu na prvi slučaj u kojem je terapija uvedena nakon prve godine života. Modifikacija prehrane za pacijenta broj 4 u Tablici 1 je prekinuta nakon 5 godina. S obzirom da je bolest dijagnosticirana tek u 26-oj godini života, pretpostavlja se da je tako dug period bez terapije uzorkovao nepovratna oštećenja, te promjene u prehrani nisu mogle značajno poboljšati stanje pacijenta. Pacijentica broj 6 u Tablici 1 je stavljena na terapiju, no pacijentica je kao i sestra (pacijent broj 5 Tablica 1) preminula u 4-om mjesecu života. Terapija se primjenjivala u pacijenta broj 7 u Tablici 1 od potvrde nedostatka AHCY. Iako nisu primjećene pozitivne promjene neurološkog stanja, razine metabolita su dosegle referentne vrijednosti, a ustanovljena su poboljšanja nalaza jetre i testova koagulacije. Pacijent broj 10 u Tablici 1 je sin pacijentice s potvrđenim mutacijama u genu *ahcy* (pacijent broj 9 Tablica 1) koja je preminula od hepatocelularnog karcinoma u odrasloj dobi. Ustanovljeno je da u obitelji pacijentice također ima smrtnih slučajeva od oboljenja jetre, iako mutacije u genu *ahcy* kod preminulih nisu analizirane. Kod sina su ustanovljene mutacije i poremećene vrijednosti metabolita, ali ne i karakteristični

simptomi oboljenja, no zbog očekivanih kasnijih komplikacija temeljenih na obiteljskim slučajevima, dječak je stavljen na terapijsku dijetu. Razine aminotransferaza i metionina su se normalizirale, a razine SAH i SAM su značajno pale nakon uzimanja otprilike polovice prepisanih terapijskih dodataka.

U pacijenta broj 8 u Tablici 1 koji je od najvećeg interesa za ovo istraživanje također se prvo primijenila uobičajena terapija. Kritični SAM/SAH omjer je bio tek neznatno promijenjen, a ukupni razvojni ishodi su bili nezadovoljavajući. S tim u vidu je predloženo presađivanje jetre kao nova strategija liječenja uz pretpostavku da bi jetra kao metabolički centar organizma mogla imati ključnu ulogu u održavanju sistemskog SAM/SAH omjera. Kao što je prethodno obrazloženo, aktivnost AHCY u jetri je središnja točka homeostaze sistemskog SAM i SAH te može utjecati na metilacijski status i fiziološku funkciju ostalih tjelesnih tkiva. Ovo je potvrđeno 6 mjeseci nakon operativnog zahvata transplantacije jetre kada je uz normalnu prehranu zabilježeno uravnoteženje svih kliničkih i biokemijskih pokazatelja, te napredak u ukupnim motoričkim, govornim i socijalnim sposobnostima pacijenta. Nedostatak AHCY je zbog teških neurorazvojnih simptoma predložen kao novi poremećaj koji se svrstava među indikacije za presađivanje jetre (Strauss i sur. 2015). U najnovijim uputama za dijagnozu, tretman i praćenje oboljelih od nasljednih metilacijskih oboljenja je istaknuta činjenica da bi transplantacija jetre bila pogodna terapija ovog oboljenja (Barić i sur. 2016). Zaključak je temeljen i na slučaju pacijentice s nedostatkom AHCY koja je razvila hepatocelularni karcinom u kasnijoj životnoj dobi (pacijentica broj 9 Tablica 1). Unatoč tome trenutačna preporuka je da se kod budućih pacijenata isproba terapija prehranom prije odluke na transplantaciju i da se kroz naredni dulji period prati ishod prve izvedene transplantacije (Barić i sur. 2016).

1.7. S-adenozilhomocistein hidrolaza

Aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze je otkrivena frakcijskim pročišćavanjem ekstrakata jetre štakora u kojima je primjećena reverzibilna hidroliza SAH na adenzin i homocistein (de la Haba i Cantoni 1959). U *in vitro* uvjetima pročišćeni enzim katalizira nastajanje SAH iz adenozina i homocisteina s visokom specifičnosti, dok je u stanicama reakcija pomaknuta u smjeru hidrolize SAH (Slika 2) zbog brzog uklanjanja adenozina i homocisteina kao što je opisano prethodno.

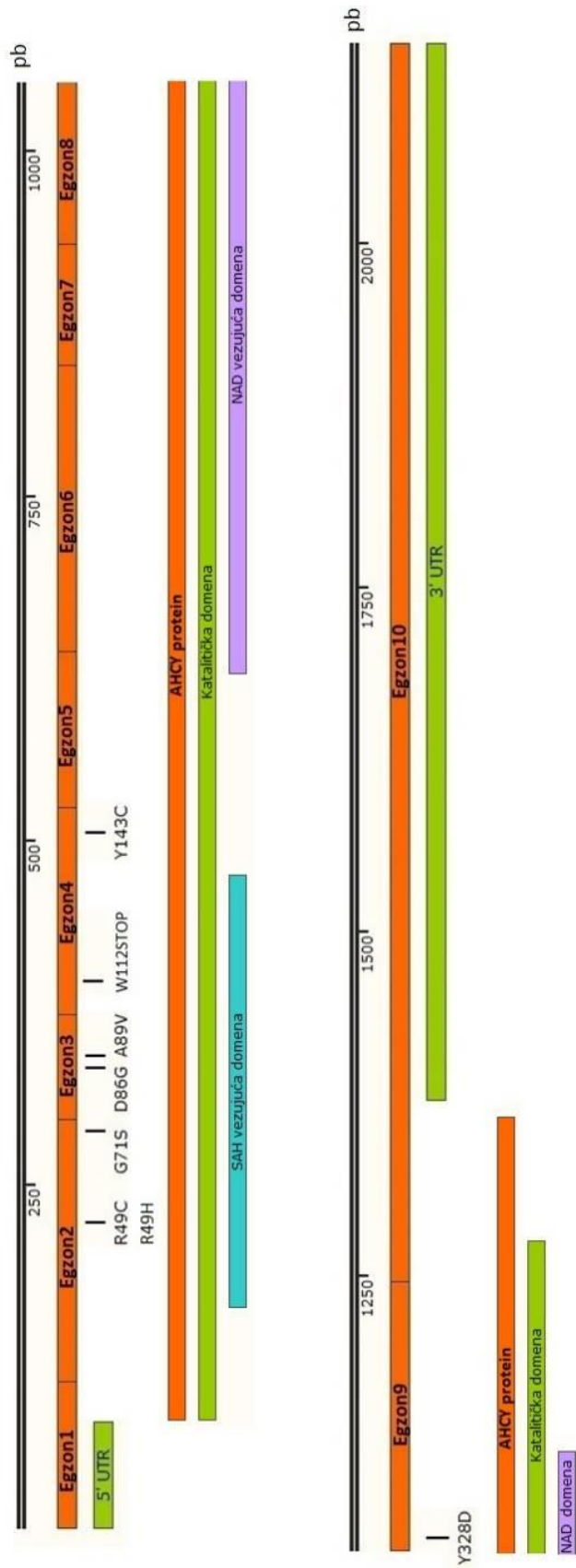
Prva saznanja o katalitičkom mehanizmu su dobivena spektrofotometrijskim mjerenjima gdje je zbog povećanja apsorpcije pri $\lambda = 327$ nm pretpostavljeno da dolazi do redukcije NAD^+ u NADH po primjeru do tada poznatih enzima koji koriste NAD(H) kao kofaktor (Palmer i Abeles 1979). Kasnije je utvrđeno da svaka podjedinica AHCY veže po jednu molekulu NAD (Fujioka i Takata 1981) te je predložen točan mehanizam (Palmer i Abeles 1976, Palmer i Abeles 1979): početna oksidacija SAH pomoću kofaktora NAD^+ u 3' keto deivat SAH , zatim β -eliminacija homocisteina, Michaelova adicija molekule vode i konačni korak redukcije koji otpušta adenzin. Nakon detaljnog objašnjenja katalitičkog mehanizma ime enzima je promijenjeno iz S-adenozilhomocisteinaza u S-adenozilhomocistein hidrolaza.

Podaci o trodimenzionalnoj strukturi AHCY čovjeka (Turner i sur. 2000) dobiveni difrakcijom X-zraka su omogućili analizu značaja pojedinih aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu enzima, ali za detaljno određivanje slijeda reakcija od velike važnosti su bile i trodimenzionalne strukture AHCY iz drugih vrsta te podaci dobiveni u *in vitro* uvjetima mutagenezama i kinetičkim mjerenjima (Hu i sur. 1999, Tanaka i sur. 2004, Reddy i sur. 2008). Svaka podjedinica proteina AHCY sadrži dvije domene karakteristične za NAD -ovisne dehidrogenaze, no za razliku od NAD -ovisnih dehidrogenaza kod kojih su interakcije s kofaktorom ograničene na jednu podjedinicu, arhitektura veznog mjesta za NAD(H) kofaktor se kod AHCY formira interakcijom 9 aminokiselinskih ostataka jedne podjedinice i 2 aminokiselinska ostatka druge. Katalitički centar, odnosno vezno mjesto za SAH supstrat, je udaljeno od veznog mjesta za kofaktor NAD(H) zbog čega je pretpostavljeno da vezanje SAH uzrokuje konformacijske promjene samog enzima da bi se premostila prostorna udaljenost molekule supstrata i kofaktora (Hu i sur. 1999). Prijelaz iz otvorene konformacije u kojoj molekule supstrata slobodno ulaze i izlaze iz aktivnog mjesta (Hu i sur. 1999) u zatvorenu konformaciju (Komoto i sur. 2000; Yang i sur. 2003) je omogućen rotacijom katalitičke domene oko spojne regije čime se zatvara procjep između dviju domena, a molekule se dovode u međusoban položaj povoljan za odvijanje reakcije.

AHCY se u stanici sisavaca nalazi u tetramernoj kvaternoj strukturi što je dokazano nativnom elektroforezom AHCY u poliakrilamidnom gelu (Fujioka i Takata 1981). Karakteristična arhitektura tetramera sadrži šuplinu u središtu ($10 \times 10 \times 50$ Å; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$) koja dozvoljava pokretljivost katalitičkih domena i omogućuje stabilizaciju strukture enzima. S obzirom da se tetramer smatra aktivnim oblikom

enzima, mutacije koje onemogućuju interakciju podjedinica i/ili formaciju pravilnih homotetramera inaktiviraju AHCY protein. Ciljanim mutagenезama je utvrđeno da potencijalni uzrok funkcijskog ispada mogu biti promijenjeni aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u reakcijskom mehanizmu što za posljedicu ima nedostatnu aktivnost enzima čak i u pravilno složenom tetrameru.

Gen koji kodira za AHCY se sastoji od 10 egzona prikazanih shematski na Slici 3, a u čovjeka je smješten na pločaju 20q13 kromosoma 20. Protein je molekularne mase od 48 kDa, a sastoji se od 432 aminokiseline. Kao što je napomenuto, osim AHCY kod viših organizama ne postoji dodatni enzim za uklanjanje SAH stoga se smatra esencijalnim te je u skladu s time evolucijski vrlo očuvan. Kod prokariota u kojih nema AHCY hidrolaze (npr. *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*) SAH se uklanja pomoću 5'-metiltioadenozin/S-adenozilhomocistein (MTA/SAH)-nukleotidaze (Cornell i Riscoe 1998).



Slika 3. Shematski prikaz strukture gena *hcy*. Narančasto su označeni ezgoni i AHcy protein. Zelene trake prikazuju 5' i 3' netranslatirajuće regije, 5' i 3'UTR (engl. untranslated regions, UTR) te položaj katalitičke domene u proteinu. SAH vezujuća domena je označena plavom trakom, NAD vezujuća domena ljubičastom, a crna traka prikazuje broj parova baza (pb). Pozicije mutacija R49C, R49H, G71S, D86G, A89V, W112STOP, Y143C, Y328D u odnosu na egzone gena i domene proteina su označene na shemi. NAD, nikotinamid adenin dinukleotid.

1.8. Mutacije u genu *ahcy* i funkcionalne analize mutanti

Većina mutacija u genu *ahcy* koje uzrokuju oboljenje nedostatka AHCY se nalaze u egzonima koji kodiraju za SAH vezujuću podjedinicu: R49C, R49H, G71S, D86G, A89V, W112STOP. Iako se Y143C mutacija ne nalazi u SAH vezujućem slijedu, ovaj aminokiselinski ostatak spada u katalitički dio enzima, a u tercijarnoj proteinskoj strukturi se nalazi u aktivnom mjestu proteina (Belužić i sur. 2006). Y328D mutacija se nalazi u egzonu 9 tj. slijedu koji kodira za vezanje NAD kofaktora koji je potreban za pravilno odvijanje reakcije hidrolize. Većina mutacija se smatra tzv. pogrešnim mutacijama (engl. *missense*) koje rezultiraju kodiranjem aminokiselina s drukčijim svojstvima (engl. *nonconservative change*): Y143C, A89V, D86G, G71S, R49C, Y328D. Poznata je i jedna mutacija W112STOP koja uzrokuje preuranjeni STOP kodon. Iako R49H mutacija spada u pogrešne (engl. *missense*), originalna aminokiselina arginin i zamjenjena histidin su obje pozitivno nabijene i slične veličine tj. sličnih svojstava (engl. *conservative change*) pa je pretpostavljeno da mutacija ne dovodi do značajne inaktivacije hidrolaze.

Dosadašnje funkcionalne studije su bazirane na kloniranju, proizvodnji i pročišćavanju rekombinantnog proteina AHCY divljeg tipa (WT), te mutanti R49C, G71S, D86G, A89V, W112STOP i Y143C. Rekombinantni proteini su se koristili za određivanje enzimske aktivnosti, termostabilnosti, te analizu promjena u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi mutantnih proteina u odnosu na WT (Belužić i sur. 2006; Belužić i sur. 2008; Vugrek i sur. 2009; Magner i sur. 2012). U Tablici 2 su popisani uvjeti heterologne ekspresije (temperatura / vrijeme od indukcije / indukcija) za sve dosada analizirane mutante kao i postotak izmjerene hidrolazne aktivnosti u odnosu na WT. Za sve mutante je bilo potrebno modificirati uvjete ekspresije: produljenje vremena i sniženje temperature. Uvjeti ekspresije koji bi bili povoljniji od onih prikazanih u Tablici 2 su također isprobani za svaku mutantu, ali nisu rezultirali većom količinom proteina. Ekspresija za mutantu R49C s vrlo niskom izmjerenom enzimskom aktivnošću je uz poboljšanje uvjeta zahtjevala i dodatak benzilnog alkohola. Benzilni alkohol oponaša izloženost stanice temperaturnom šoku, čime se potiče proizvodnja bakterijskih proteina GroEL-GroES. Ovi proteini engl. *chaperoni* pomažu u pravilnom smatanju temperaturno oštećenih bakterijskih proteina, a usput i heterolognog rekombinantnog AHCY. Mutantu G71S nije bilo moguće eksprimirati pa se enzimska aktivnost nije određivala, no pretpostavlja se da je hidrolazna aktivnost ove mutante

vrlo niska. W112STOP mutantu je bilo lako eksprimirati unatoč nedetektibilnoj enzimskoj aktivnosti. Ovo se objašnjava time da je N-terminalni dio proteina prije STOP kodona unesenog točkastom mutacijom ostao istovjetan WT pa ga je lako eksprimirati. Enzimska aktivnost se gubi jer mutant ne može stvoriti aktivne tetramere za čiju su formaciju potrebni aminokiselinski ostatci C-terminalnog dijela koji u ove mutante nedostaju.

Tablica 2. Enzimska aktivnost rekombinantnih proteina AHCY. Aktivnost mutanti eksprimiranih u *E. Coli* i pročišćenih iz bakterijskih lizata je prikazana u obliku postotka u donosu na divlji tip, a mjerena je u uvjetima *in vitro* prema Takata i sur. (2002): hidrolizom SAH nastaje adenzin kojeg adenzin deaminaza pretvara u inozin što omogućuje spektrofotometrijsko (265 nm) praćenje smanjenja količine adenozina. (0 = nedetektabilno korištenim testom; / = protein nije bilo moguće pročitati; mj = mjesec; god = godina).

AHCY	Temperatura / vrijeme od indukcije / indukcija ekspresije	% hidrolazne aktivnosti u odnosu na WT
WT	37°C / 4 h / 0,5 mM IPTG	100
R49C	25°C / 18 h / 0,5 mM IPTG + 0,1% benzilni alkohol	6,7
R49H	Nije istraživano	Nije istraživano
G71S	Neuspješno pročišćavanje / inkluzije	/
D86G	28°C / 16 h / 0,5 mM IPTG	15,5
A89V	37°C / 4 h / 0,5 mM IPTG	22,7
W112STOP	37°C / 4 h / 0,5 mM IPTG	0
Y143C	25°C / >18 h / 0,5 mM IPTG	25
Y328D	Istraživano u sklopu disertacije	

S obzirom da aktivnost AHCY enzima direktno ovisi o mogućnosti proteina da stvara homotetramere, već su se prije radile analize kvaterne strukture rekombinantnih proteina metodama u *in vitro* uvjetima. Y143C mutanta pokazuje nestabilnost i ireverzibilno raspadanje na monomere što se može do određene razine spriječiti visokim koncentracijama proteina od 10 mg/ml (Belužić i Vugrek 2010). Za W122STOP mutantu se smatra da nema sposobnost stvaranja tetramera jer je multimerizacija AHCY ovisna o C-terminalnom dijelu AHCY koji u potpunosti

nedostaje u ovoj mutanti (Belužić i sur. 2006). Nativnom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu je utvrđeno da se A89V mutanta nalazi u tetramernom obliku, ali migrira značajno brže u odnosu na WT te je pretpostavljeno da zbog mutacije dolazi do nepovoljnog prostornog razmještaja (steričkog sukoba) između aminokiselina na pozicijama 89 i 84 (valin i treonin) (Belužić i sur. 2008). R49C i D86G mutante nemaju tetramernu strukturu već su u poliakrilamidnim gelovima pri nativnim uvjetima primijećeni proteinski agregati velike molekularne mase (nepravilno smotane i agregirane strukture) (Vugrek i sur. 2009), a rekombinantna G71S mutanta se nije mogla pročistiti i analizirati (Honzík i sur. 2012).

S obzirom da je utvrđeno kako uspješnost heterologne ekspresije rekombinantnih mutanti u *E. Coli* varira u raznim uvjetima, potrebno je isprobati različite uvjete ekspresije još neistražene Y328D mutante da bi se odredila njena enzimska aktivnost i potvrdio primijećeni trend. Osim već napomenutih metoda kojima se analizirala promjena molekularne stabilnosti AHCY u uvjetima *in vitro*, dosada nisu rađene analize stabilnosti AHCY u homolognom ekspresijskom sustavu kao što su ljudske stanice u kulturi. U ovu svrhu u doktorskoj disertaciji poseban fokus se stavio na primjenu metode komplementacije dviju molekula fluorescencijom (engl. *Bimolecular Fluorescence Complementation*, BiFC) u svrhu analize samoasocijacije AHCY u ljudskim stanicama. Ova metoda omogućuje proučavanje utjecaja točkastih mutacija na sposobnost stvaranja enzimski aktivnih tetramera proteina AHCY u kontekstu stanice. S obzirom da će se u ovoj doktorskoj disertaciji koristiti fibroblasti pacijenta s Y143C i Y328D mutacijama i da je Y143C mutacija već opisana, za prilagodbu BiFC metode u svrhu analize makromolekularne stabilnosti AHCY u ljudskim stanicama koristiti će se Y328D mutanta.

1.9. Korelacija genotipa s kliničkom slikom u slučajevima nedostatka AHCY

Do danas je opisano 12 slučajeva oboljenja nedostatka AHCY koje je dijagnosticirano u pacijentima različite starosti od rođenja pa do 32 godine života (Tablica 1 i 3). Važna uloga AHCY u održavanju razine metabolita uključenih u ciklus metionina u stanici upućuje na zaključak da će snažnija inaktivacija AHCY uzrokovati veće promjene biokemijskih parametara. Održavanje vrijednosti metabolita u uskom rasponu u cijelom organizmu, a posebno u metabolički aktivnom organu kao što je jetra već je opisana, pa je pretpostavljeno da će veće promjene SAM i SAH

uzrokovati bržu pojavnost jačih simptoma. S obzirom da se pojedine mutacije smatraju manje, srednje ili snažno inaktivirajućima za enzimsku aktivnost AHCY, ovisno o kombinaciji u kojoj su nasljeđene se može predvidjeti progresija i jačina simptoma u tijeku oboljenja, te potencijalni ishod i efikasnost terapije.

U Tablici 3 su prikazane kombinacije mutacija u genu *ahcy* pronađene u dosada objavljenim slučajevima nedostatka AHCY te je za svaku kombinaciju navedena ukupna hidrolazna aktivnost. S obzirom da su roditelji sviju pacijenata u potpunosti zdravi, za zaključiti je da je ukupna stanična aktivnost AHCY od 50% ili više dovoljna za normalno funkcioniranje stanice. 2006.-te godine u pacijentu nepoznatog etniciteta od 26 godina starosti iz SAD-a su ustanovljene Y143C i A89V mutacije (Buist i sur. 2006) (pacijent broj 4 Tablica 3). Ako usporedimo sve podatke, Y143C i A89V mutante se mogu s 25% i 22,7% enzimске aktivnosti u odnosu na WT smatrati srednje inaktivirajućim mutacijama. Ukupna hidrolazna aktivnost od 47,7% je vrlo blizu minimalnih 50% aktivnosti kod zdravih pojedinaca što odgovara blažoj kliničkoj slici 26 godišnjeg pacijenta (4 Tablica 3). 2004.-te godine u petomjesečnom djetetu iz Republike Hrvatske su potvrđene dvije inaktivirajuće mutacije Y143C i W112STOP (Barić i sur. 2004) (pacijent broj 1 Tablica 3). Dvoje braće prvog pacijenta su također naslijedili iste mutacije te im je simptomatski nedostatak AHCY dijagnosticiran tijekom prvog mjeseca života (Ćuk i sur. 2007; Barić i sur. 2005) (pacijenti broj 2 i 3 Tablica 3). Y143C mutacija u kombinaciji s potpuno inaktivirajućom W112STOP mutacijom bez detektirane hidrolazne aktivnosti (0%) pretpostavlja goru prognozu što je sukladno s kliničkim i biokemijskim parametrima u ova tri obiteljski povezana slučaja. Dvije sestre iz SAD-a neutvrđenog etničkog porijekla koje su umrle u prvom i četvrtom mjesecu nakon poroda su u *ahcy* genu imale kombinaciju R49C i D86G mutacija (Vugrek i sur. 2009; Grubbs i sur. 2010) (5 i 6 Tablica 3) što odgovara činjenici da R49C i D86G mutante pokazuju samo 6,7% i 15,5% aktivnosti WT. Dodatni slučaj je zabilježen u novorođenčetu iz Češke Republike u kojem su potvrđene inaktivirajuće R49C i G71S mutacije (Honzík i sur. 2012) (pacijent broj 7 Tablica 3). Razinu inaktivacije AHCY zbog G71S mutacije nije bilo moguće odrediti zbog nemogućnosti ekspresije ove mutante (krivo smatanje proteina, inkluzijska tijela, brza degradacija). Pretpostavljeno je da G71S ima vrlo nisku hidrolaznu aktivnost ili je potpuno inaktivirajuća za enzim: u kombinaciji s 6,7% aktivnosti R49C mutante se smatra da je ukupna enzimska aktivnost AHCY izrazito niska što se vidi po jačini i opsegu simptoma u ovome slučaju. Osim navedenih

izrazito inaktivirajućih mutacija, u 2015.-oj godini je u literaturi zabilježena i nova R49H mutacija u obitelji iz Pakistana (Stender i ostali 2015). Ovu mutaciju je homozigotno naslijedila najstarija dosada zabilježena pacijentica (pacijent broj 9 Tablica 3) s komplikacijama koje su se pojavile u odrasloj dobi, a koje su uzrokovane nedostatnom aktivnošću AHCY: hepatocelularni karcinom, slabost mišića i smrt u 32-oj godini. Iz ovog obiteljskog slučaja je jasno da se posljedice nepravilne aktivnosti AHCY mogu pojaviti i u kasnijoj životnoj dobi (engl. *late/adult onset*). R49H mutacije je homozigotno naslijedio i sin preminule pacijentice (pacijent broj 10 Tablica 3) u kojeg je zabilježena poremećena razina metabolita, no pacijent je zasada zdrav. Iako neanalizirano, gotovo je sigurno da su i dva druga člana uske obitelji bili homozigoti za istu mutaciju i preminuli od posljedica uzrokovanih nedostatnom aktivnosti AHCY: epizode žutice i slabost mišića tijekom djetinjstva, intelektualne poteškoće (nikada nisu naučili čitati, pisati niti voziti) te smrt od ciroze jetre i hepatocelularnog karcinoma. Iako nisu rađene funkcionalne studije ove mutante, pretpostavljeno je da zamjena originalne aminokiseline arginina s histidinom ne dovodi do snažne inaktivacije AHCY (obje aminokiseline su pozitivno nabijene i slične veličine tj. sličnih svojstava). Zaključeno je da slaba inaktivacija proteina AHCY uzrokuje izloženost jetre i cijelog organizma manjim odstupanjima vrijednosti biokemijskih pokazatelja, ali kroz dulji vremenski period, što uzrokuje kronični tijek oboljenja i kasniju pojavnost simptoma karakterističnih za nedostatak AHCY.

U nedavnom slučaju je prijavljena kombinacija poznate Y143C mutacije i nove Y328D mutacije u 8 mjeseci staroj djevojčici iz SAD-a (Strauss i sur. 2015) (pacijent broj 8 Tablica 3). Slučaj je karakteriziran vrlo lošom kliničkom slikom i najnižim dosada izmjerenim SAM/SAH omjerom (Strauss i sur. 2015). Ako pretpostavku korelacije kliničke slike s jačinom inaktivacije AHCY (Belužić i Vugrek 2010) primjenimo i u ovom slučaju, prema rezultatima istraživanja prijašnjih slučajeva u kojima se pojavljuje Y143C mutanta (25% enzimске aktivnosti, Tablica 2) za pretpostaviti je da novookrivena Y328D mutanta većinski pridonosi vrlo lošim kliničkim i biokemijskim pokazateljima, te da će aktivnost iste biti vrlo niska. S obzirom na predviđanje niske razine aktivnosti Y328D mutante, očekuje se da će istu biti teško ili nemoguće eksprimirati i pročistiti iz induciranih bakterijskih kultura čak i u vrlo povoljnim uvjetima ekspresije.

Tablica 3. Popis dosada opisanih slučajeva nedostatka AHCY i ukupna enzimska aktivnost kombinacije nasljeđenih mutacija (prikazana je enzimska aktivnost rekombinantnih proteina koja je određena kao u Tablici 2). Prikazana je dob pacijenta u trenutku kada su se pojavili simptomi oboljenja, dob kada je potvrđena bolest i u smrtnim slučajevima dob preminuća (mj = mjesec; god = godina; ? = istraživano u sklopu disertacije).

Pacijenti		Mutacije	Pojava simptoma / potvrđena bolest (*preminuo)	Ukupna aktivnost
Broj pacijenta	Rodbinska veza (referenca)			
1	Prvi slučaj (Barić i sur. 2004)	Y143C/ W112STOP	<1 mj / 5 mj	25% + 0%
2	Brat od pacijenta 1 (Barić i sur. 2005)	Y143C/ W112STOP	<1 mj / <1 mj	25% + 0%
3	Brat od pacijenata 1 i 2 (Čuk i sur. 2007)	Y143C/ W112STOP	<1 mj / <1 mj	25% + 0%
4	Nezavisan slučaj (Buist i sur. 2008)	Y143C/ A89V	<1 mj / 26 god	25% + 22,7%
5	Sestra od pacijentice 6 (Vugrek i sur. 2009)	R49C/ D86G	<1 mj / poslije smrti (1 mj*)	6,7% + 15,5%
6	Sestra od pacijentice 5 (Grubbs i sur. 2010)	R49C/ D86G	<1 mj / poslije smrti (4 mj*)	6,7% + 15,5%
7	Nezavisan slučaj (Hončík i sur. 2012)	R49C/ G71S	<1 mj / 4,5god	6,7% + 0%*
8	Nezavisan slučaj Strauss i sur. (2015)	Y143C/ Y328D	<1 mj / 8 mj	25% + ?
9	Majka od pacijenta 10, sestra od pacijenata 11 i 12 (Stender i sur. 2015)	R49H/ R49H	23 god / poslije smrti (32 god*)	Pretpostavlja se slaba inaktivacija
10	Dijete od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)	R49H/ R49H	bez simptoma / 7 god	
11	Brat od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)	vrlo vjerojatno R49H/ R49H	od 3. god / nedokazano (35 god*)	
12	Brat od pacijentice 9 (Stender i sur. 2015)		Bez simptoma do smrti uzrokovane rakom jetre / nedokazano (17 god*)	

1.10. Uloge i unutarstanična lokalizacija AHCY

Središnji položaj proteina AHCY u metabolizmu i metilacijskim procesima stanice sugerira raznolike stanične uloge ovog enzima. Istraživanje unutarstanične lokalizacije i dinamike AHCY je započeto na temelju činjenice da se mnoge

esencijalne stanične metilacije odvijaju u jezgri: metilacija histona i zaštita mRNA (engl. *capping*). Zasada nije poznato da li se SAH proizveden u jezgri transportira u citoplazmu i tamo hidrolizira pomoću AHCY ili se AHCY upućuje u jezgru stanice. S obzirom da je SAH jedan od najsnažnijih kompetitivnih inhibitora metiltransferaza (Lu i Mato 2012) pretpostavlja se da ga je nužno vrlo brzo ukloniti te da se u tu svrhu AHCY usmjerava u neposrednu blizinu metilacijskih reakcija (Radomski i ostali 1999). Iako se AHCY smatra dominantno citoplazmatskim proteinom, nekoliko studija u životinja i biljaka sugeriraju da se AHCY također može većinski nalaziti i u jezgri. U stanicama *Xenopus Laevis* AHCY se predominantno nalazi u jezgri oocita, embrionalnih stanica na kraju gastrulacije i transkripcijski aktivnim stanicama bubrega (Radomski i sur. 1999). Ovdje njegova enzimska aktivnost omogućuje održavanje već napomenutih procesa sinteze i zaštite pre-mRNA molekula (Radomski i sur. 1999; Radomski i sur. 2002). AHCY u jezgri je također detektiran u stanicama bubrega štakora u uvjetima hipoksije (Kloor i sur. 2007). U većini stanica embrija pileta AHCY se predominantno nalazi u jezgri, osim u migratornim stanicama neuralne brazde gdje je većinom u citoplazmi (Vermillion i sur. 2014). U *Arabidopsis* je za usmjeravanje AHCY u jezgru nužna insercijska regija od 40-45 aminokiselina specifična za biljke, protozoa parazite i mnoge bakterije te ovisi o interakciji hidrolaze s adenozin kinazom i metiltransferazom koja sudjeluje u zaštiti mRNA (engl. *mRNA cap MT*; CMT) (Lee i sur. 2012). Ljudski enzim nema takvu regiju, a pretraživanjem baza podataka na temelju sličnosti slijedova nije ustanovljeno postojanje niti jednog dosada poznatog slijeda za ulaz u jezgru ili eksport iz jezgre, tzv. NLS/NES motivi (engl. *nuclear localization signal/nuclear export signal*) (Grbeša i sur. 2017). Svi iznad navedeni podaci sugeriraju da unutarstanična lokalizacija AHCY ovisi o tipu stanice, njenom statusu i mikrokruženju. Unatoč već potvrđenim važnim ulogama AHCY u preživljenju i zdravlju i dalje nedostaju informacije o lokalizaciji proteina u ljudskim stanicama te prometu hidrolaze iz citoplazme u jezgru i obrnuto. Zasada je također nepoznato da li i na koji način točkaste mutacije pronađene u pacijentima utječu na raspored AHCY u stanici. S obzirom na već opisane probleme u istraživanju rijetkih oboljenja, u ovom istraživanju je cilj razviti modelni stanični sustav u kojem će mutantni i AHCY divljeg tipa biti prikladno označeni pojačanim zelenim fluorescentnim proteinom (engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) prvenstveno u svrhu analize mikroskopom, ali i ostalih analiza unutarstaničnog kretanja AHCY.

1.11. Interakcije AHCY s drugim proteinima – interaktom AHCY

Interaktomom se smatra skup ukupnih protein-protein interakcija u stanici koji je u odnosu na genom vrlo dinamičan. Razlog tome je prolaznost proteinskih interakcija i činjenica da se neke interakcije događaju u usko specifičnom kontekstu u stanici ili u određenim stanjima tijekom razvoja. Iako se zbog toga smatra da će ukupni ljudski interaktom biti puno teže dešifrirati, sve je jasnije da su ovi podaci ključni za potpuno razumijevanje biologije zdrave i oboljele stanice. U BioGRID (<http://thebiogrid.org>) bazi podataka do sada (siječanj 2017.) je zabilježeno nešto manje od 280 000 jedinstvenih (engl. *non-redundant*) ljudskih protein-protein interakcija.

Postoje dva osnovna pristupa istraživanju proteinskih interakcija: binarnim tehnikama koje mjere direktnu fizičku interakciju između dva proteina (engl. *binary approach*) ili kompleksnim metodama koje mjere interakcije u grupama proteina u kojima ne moraju nužno svi proteini u grupi direktno fizički interagirati (engl. *complex methods*) (Bonetta, 2010). Najčešće korištena i najbolje opisana binarna metoda je tzv. engl. *yeast two-hybrid* (Y2H) sustav koji je također prilagođen na visokoprotokno skeniranje interakcija (Fields i Song 1989) dok su najpoznatije kompleksne metode koimunoprecipitacija (coIP) spregnuta sa spektrometrijom masa (MS) i pročišćavanje tandemskim afinitetom (engl. *tandem affinity purification*, TAP).

Kako bi analizirali protein-protein interakcije u ljudskim stanicama, što nije moguće s gore navedenim metodama, u disertaciji smo koristili metodu komplementacije dviju molekula fluorescencijom (BiFC). Metodom BiFC se mjeri direktna fizička interakcija između dva proteina. Koristi se N- i -C dio Venusa, snažnije verzije žutog fluorescentnog proteina (engl. *Yellow Fluorescent Protein*, YFP) koji prilikom interakcije komplementiraju i fluoresciraju ukoliko proteini s kojima su fuzionirani dolaze u kontakt. Osim što omogućuje vizualizaciju u stanicama, najveća prednost BiFC pristupa je mogućnost lokalizacije interakcija što već unaprijed sugerira o potencijalnoj funkciji proteinske interakcije. Komplementacija Venusa je ireverzibilna zbog čega se mogu vidjeti vrlo slabe i prolazne interakcije koje je nemoguće „uloviti“ klasičnim tehnikama kao što su coIP ili TAP. Trenutni konsenzus znanstvene zajednice je da se prilikom analiza novih protein-protein interakcija testiraju sve moguće topologije označavanja proteina (Hauser i sur. 2011). kako orijentacija fuzije na N-terminusu ili C-terminusu proteina od interesa ne bi

ometala interakcijski potencijal proteina ili blokirala signale za usmjeravanje u stanične odjeljke. Stoga su se u istraživanju interaktoma AHCY koristila 4 različita vektora koji kombiniraju BiFC s Gateway® sustavom kloniranja (Lepur i sur. 2016) i omogućuju kloniranje u jednom koraku bilo kojeg gena od interesa koji se nalazi u Gateway®-kompatibilnom vektoru. S obzirom da se BiFC tehnika oslanja na pojačanu ekspresiju fuzioniranih proteina u stanicama, postojao je i rizik za pogrešno smatanje i lokalizaciju proteina. Proteini koji se ne smotaju pravilno se često zadržavaju u endoplazmatskom retikulumu, krivo usmjeravaju iz Golgijevog aparata ili se talože unutar stanice (Wickner i sur. 1999), ali u svim dosada ispitanim interakcijama s AHCY nije primjećena pojava krivo smotanih proteinskih agregata (Lepur i sur. 2016). Iako na prvi pogled neočekivano, prednost BiFC sustava je upravo ta da zbog niza uvjeta koji se trebaju zadovoljiti za komplementaciju, spontana reakcija dva proteina koji ne interagiraju u stanici, a time i nespecifična fluorescencija proteina Venus, nije vjerojatna.

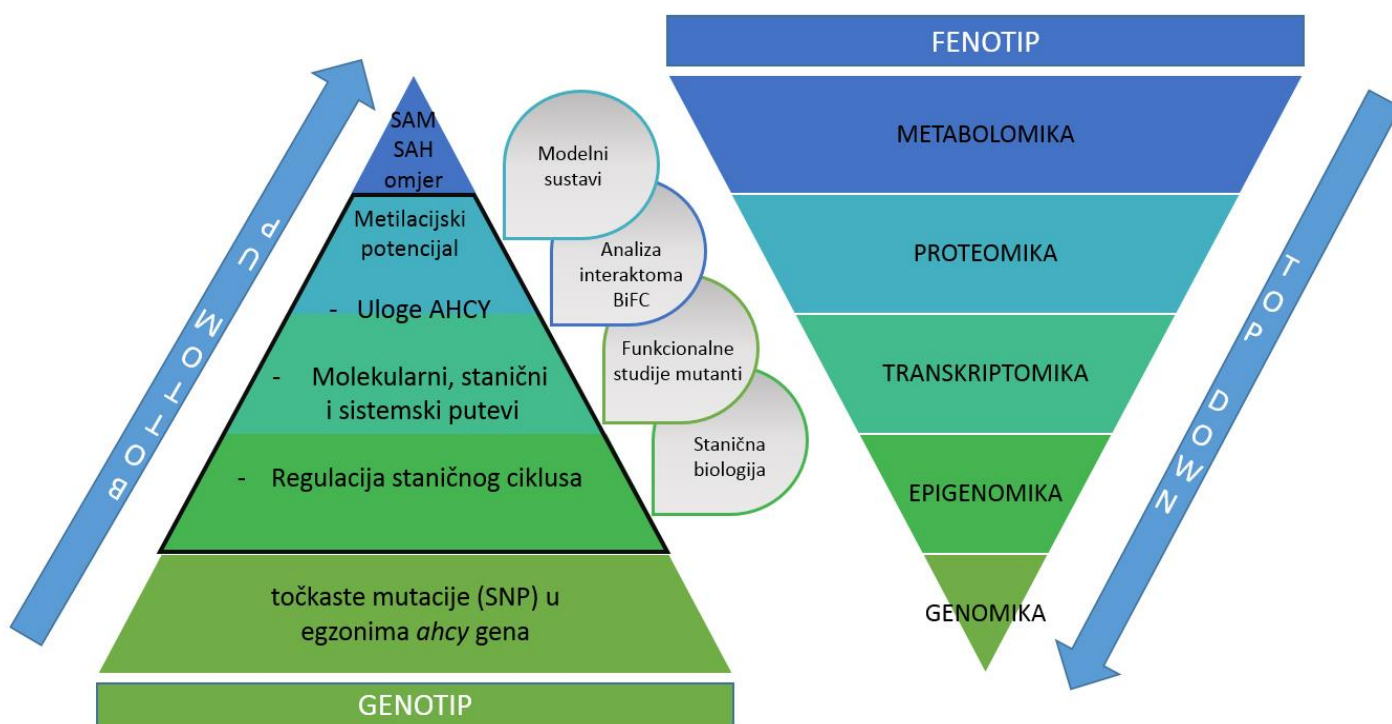
Nedostatak svih metoda za analizu interaktoma je pojava lažno pozitivnih i negativnih rezultata. Prvi način izbjegavanja lažno pozitivnih rezultata je svakako odgovarajuća negativna kontrola: mutirani mamac s Venus fuzijom u sve 4 topologije koji se pravilno eksprimira i smata u živoj stanici u istim uvjetima ekspresije kao i originalni mamac, s razlikom da mutacija uzrokuje inaktivaciju interakcijske sposobnosti mamca (Kudla i Bock 2016). Negativna kontrola za AHCY mamac koja se koristila u ovoj disertaciji je pripremljena i validirana kao što je opisano u Lepur i sur. (2016), a predstavlja skraćeni AHCY protein koji se označava s nAHCY: ovoj mutanti nedostaje C-terminalni dio proteina čime protein dokazano gubi sposobnost multimerizacije, a bazira se na saznanjima o W122STOP mutanti otkrivenoj u pacijentima s nedostatkom AHCY.

1.12. Sistemska biologija u istraživanju proteina AHCY

Za većinu rijetkih bolesti nema lijeka, ali odgovarajući tretman i medicinska skrb mogu poboljšati kvalitetu života pacijenata te tako produljiti očekivani životni vijek. Po primjeru nedostatka AHCY, ali i mnogih drugih nasljednih metaboličkih oboljenja za zaključiti je da uzrokuju manje trajnih oštećenja u organizmu što se prije počne provoditi terapija. U tu svrhu je potrebno pronaći odgovarajuće prognostičke i dijagnostičke biomarkere bazičnim istraživanjima mehanizama ovih oboljenja. Pojam biomarker (skraćeno od „biološki marker“) se odnosi na simptome koji su objektivne

indikacije medicinskog stanja pacijenta, a koje se mogu točno i reproducibilno mjeriti. Primjer biomarkera je svaka mjerljiva veličina od krvnog tlaka do podataka kompleksnih laboratorijskih testova na biološkom materijalu (Strimbu i Tavel 2010). Biomarker je bolji što je viša njegova značajnost i vrijednost (engl. *relevance* i *validity*). Značajnost označava mjeru biomarkera da točno pruži klinički važnu informaciju. Vrijednost karakterizira efikasnost biomarkera i mogućnost da se njegovo uravnoteženje koristi kao surogat kliničkog stanja, a vrlo često predstavlja spektar vrijednosti (Hsueh i sur. 2013). Cilj ove doktorske disertacije je korištenjem informacija dobivenih analizama fibroblasta pacijenta i modelnih staničnih sustava istražiti uloge proteina AHCY u molekularnim putevima u stanici. Na temelju novih saznanja predložiti će se potencijalni biomarkeri, a točnost predikcije je ovisna o metodama kojima se podaci prikupljaju i analiziraju (Slika 4). Interdisciplinarna grana biologije razvijena na ovakvom integriranom pristupu kojim se proučava međudjelovanje molekula na različitim informacijskim razinama u složenim biološkim sustavima kao što je stanica se naziva sistemska biologija. Napredak sistemske biologije kao discipline posljednjih desetljeća je proporcionalan i ovisan o tehnološkom napretku metoda prikupljanja podataka pristupom visoke protočnosti (engl. *high throughput approach*). Ovaj pristup koji omogućuje istovremeno ispitivanje ukupnih elemenata određene vrste u uzorku je osnova istraživačkog područja naziva omika (engl. *omics*), a dijeli se na pojedinačna istraživačka polja pa tako poznajemo genomiku, epigenomiku, transkriptomiku, proteomiku, metabolomiku itd.. Nedostatak AHCY je multisistemska bolest u kojoj poremećaj metilacijskog statusa stanice uzrokuje globalne promjene. Za razliku od dosadašnje analize metabolita i kliničkih simptoma te istraživanja funkcionalnih i biokemijskih parametara mutanti enzima, molekularnu pozadinu ovako složene bolesti je vrlo teško istraživati isključivo klasičnim laboratorijskim metodama. Sistemska biologija poznaje dva načina pristupa integraciji podataka, a oba su korištena prilikom izrade ove doktorske disertacije te tijekom analize i interpretacije rezultata (Slika 4). Tzv. pristup odozgo prema dolje (engl. *top-down approach*) objedinjuje omiks podatke koji se zatim usmjereno rasčlanjuju (engl. *divisive approach*) u grupe u odnosu na često vrlo složene fenotipske karakteristike (engl. *disease singature*) određenih stanja ili bolesti. Ovakve opsežne analize cijelih sustava (engl. *whole-system analysis*) se preklapaju s rezultatima tzv. pristupa odozdo prema gore (engl. *bottom-up approach*) u kojem se podaci dobiveni istraživanjima na razini pojedinačnih molekula spajaju u smislene

cjeline. U ovome pristupu se dakle koriste specifične pojedinačne informacije koje se združuju (engl. *agglomerative approach*) da bi se na taj način izgradili upotpunjeni prikazi. Preklapanje ova dva pristupa će u konačnici dati opsežnu, ali i jasnu sliku univerzalnih uloga AHCY u stanici, kao i važnost specifičnih uloga AHCY u različitim staničnim tipovima, mikrookruženjima i patološkim stanjima kao što je rak. Biološki elementi (pojedinačna molekula određene vrste) i veze (poznate poveznice elemenata) će se u ovoj disertaciji prikazivati u obliku mreža (engl. *networks*) ili puteva (engl. *pathways*). Analizom transkriptoma i proteoma se mogu ustanoviti promjene u već poznatim putevima u kojima su statistički značajno zastupljeni elementi iz našeg skupa podataka. Suprotno tome, analizama pomoću mreža se stvaraju nove funkcionalne poveznice na temelju čega se mogu donijeti zaključci o biološkim funkcijama u kojima promijenjeni biološki elementi sudjeluju (Ramanan i sur. 2012).



Slika 4. Shema integriranog pristupa istraživanju uloga AHCY. SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj doktorske disertacije je priprema modelnih staničnih sustava oboljenja nedostatka AHCY u svrhu istraživanja molekularne podloge oboljenja. Pripremljeni modelni stanični sustavi validirat će se usporedbom s podacima dobivenima analizom fibroblasta pacijenta korištenjem visokoprotčnih metoda. Razumijevanje molekularnih procesa u pozadini oboljenja omogućit će probir potencijalnih biomarkera.

Specifični ciljevi ovoga istraživanja su:

1. Potvrditi i opisati novu Y328D mutaciju u genu *ahcy* u fibroblastima pacijenta s nedostatkom AHCY funkcije. Nadalje, cilj je analizirati promjene molekularne stabilnosti i interakcijskog potencijala Y328D mutante u ljudskim stanicama u kulturi u odnosu na divlji tip metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom (BiFC). Cilj je i testirati primjenjivost BiFC metode na visoku protočnost u svrhu istraživanja AHCY interaktoma.
2. Izraditi i validirati dva modelna stanična sustava. Sustav u kojem je AHCY označen s EGFP je prikladan za ispitivanje utjecaja mutacija u genu *ahcy* na lokalizaciju i ekspresiju proteina AHCY u stanici. Utišani modelni sustav omogućuje istraživanje utjecaja smanjenje aktivnosti AHCY u stanicama hepatocelularnog karcinoma na stanični ciklus i fenotip stanica (proliferaciju i migraciju).
3. Analizirati promjene u fibroblastima pacijenta s nedostatkom AHCY pomoću podataka dobivenih omiks pristupom. Globalnim profiliranjem proteoma i transkriptoma u odnosu na zdrave kontrolne fibroblaste mogu se utvrditi promjene uzrokovane nedostatkom AHCY u poznatim staničnim putevima, ali i otkriti nove funkcionalne poveznice mrežnim analizama.
4. Probrati i predložiti potencijalne biomarkere metilacijskih oboljenja na temelju podataka iz fibroblasta pacijenta s nedostatkom AHCY. Analiza biološkog materijala pacijenta i modelnog utišanog staničnog sustava istim omiks pristupom omogućuje preklapanje rezultata i istraživanje općih staničnih puteva promijenjenih nedostatkom AHCY ili promjena specifičnih za stanični tip ili stanje stanice.

3. MATERIJALI I METODE

9 slika, 9 tablica

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Antibiotici

Za selekciju rezistentnih klonova su se koristili filterom sterilizirani antibiotici proizvođača SIGMA-ALDRICH (Tablica 4).

Tablica 4. Popis antibiotika, otapalo u kojem su pripremljene koncentrirane otopine i radna koncentracija korištena tijekom eksperimenata.

Antibiotik	Koncentrirana otopina (mg/ml)	Otapalo	Radna koncentracija (µg/mL)
Ampicilin	100	MiliQ voda	100
Spektinomycin	50	EtOH	50
Kloramfenikol	35	EtOH	35
Tetraciklin	20	EtOH	20
Puromicin	10	Fiziološka otopina	1
Geneticin	50	Fiziološka otopina	600

3.1.2. Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice (Tablica 5) su naručene od SIGMA-ALDRICH u liofiliziranom obliku (standardni uvjeti, odsoljene) i otopljene u MiliQ vodi da bi se dobila 100 µM otopina.

Tablica 5. Popis oligonukleotidnih početnica. Naveden je slijed nukleotida i eksperimenti u kojima su početnice korištene. Podebljana markirana slova (**A/C/G/T**) označavaju promijenjenu nukleotidnu bazu unešenu ciljanom mutagenezom. Smjer početnice označen je sa: F = unaprijed tj. engl. *forward*, R= unatrag tj. engl. *reverse*.

Naziv početnice/smjer	Slijed nukleotida 5' → 3'	Korištene za
INAAH9/F	CTGGAGCAGGTACCAGTT	Umnožavanje slijeda egzona 4 s genomske DNA
INAAH21/R	GGCCTGCGGCCATCATGTGGGCA	
INAAH23/F	TGGAGGCAGAGAGGCCTGCCAGA	Umnožavanje slijeda egzona 9 s genomske DNA
INAAH24/R	ATAAACTCTGGCAAGCCCTGTGT	
ahhg4/F	GTGTATGCCTGGAAGGGCGAA	Provjeru PCR produkata egzona 4 sekvenciranjem po Sangeru
INAAH6/F	GAGGGTGGGCTGTGGGA	Provjeru PCR produkata egzona 9 sekvenciranjem po Sangeru
ahhg9/R	TCTTGGGCAGGAAATGAACC	
A89V_single_2015/F	CAGGACCATGCGG T GGCTGCCATT	Ciljanu mutagenezu
D86G_single_2015/F	TTCTCCACCCAGG G CCATGCGGCG	
G71S_single_2015/F	CGTCACCCTG A GTGCTGAGGTGC	
R49C_single_2015/F	TGAAGGGCGC C TGCATCGCTGG	
Y143C_single_2015/F	CCACACCAAGT G CCCCGCAGCTTCTGCC	
Y328D_Fw/F	AGGTGGACCGG G ATCGGTTGAAGAATG	
Y328D_Rev/R	TTCTTCAACCGAT C CCGGTCCACCTGC	
AHHex5N/F	CGACTGGGGTCCACAACCTC	Provjeru pET32_AHCY sekvenciranjem
ahhg9/R	TCTTGGGCAGGAAATGAACC	
EGFP_Cf/F	GCATGGACGAGCTGTACAAG	Provjeru pEGFP_AHCY sekvenciranjem
ahhg9/F	TCTTGGGCAGGAAATGAACC	
Exon 3-4 Fw/F	ATTCCGGTGTATGCCTGGAAG	Analizu ekspresije AHCY u fibroblastima s RT-qPCR
Exon 4-5 Rev/R	GATGCCTCGGATGCCTGG	
EGFP_Cf/F	GCATGGACGAGCTGTACAAG	Analizu ekspresije EGFP-AHCY u stabilnim staničnim linijama s RT-qPCR
ahhg3/R	CGGAATGCCAGCCTTGGCAAT	
G41_Fw/F	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG	Standardi za RT-qPCR
G418_Rev/R	ATGATGGATATTTCTCGGCAGGAG	
TBP/F i R	QuantiTect Primer Assay, HS_TBP_1_SG	

3.1.3. Bakterijski sojevi

E. coli sojevi korišteni za molekularno kloniranje:

- **XL1–Blue** F':Tn10 *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi hsdR17 (rK⁻ mK⁺) glnV44 relA1 lac* (New England Biolabs)
- **One Shot® TOP10** F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 (araleu)7697galUgalKrrpsL (StrR) endA1 nupG* (Thermo Fisher Scientific)
- Ljudski ORF klonovi su pohranjeni u **DH5α** soju: F⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA⁻ argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi1 gyrA96 relA1* (hORFrome banka).

E. coli soj korišten za ekspresiju proteina:

- **BL21-Gold (DE3)pLysS** B F⁻ *ompT hsdS(r_B - m_B -) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [pLysS Cam^r]* (Agilent technologies).

Sojevi *E. coli* su uzgajani u tekućem LB mediju sastava (10 g/L tripton, 5 g/L kvašćev ekstrakt i 10 g/L NaCl) ili na krutoj LB hranjivoj podlozi pripremljenoj tako da se u tekući LB dodalo 12,5 g/L agara. Nakon pripreme, medij se sterilizira autoklaviranjem 45 min pri 120°C. Ohlađenom sterilnom mediju se po potrebi dodao antibiotik/ci. Za dugotrajnu pohranu na -80°C bakterijskoj suspenziji u tekućem LB mediju se dodaje 30% glicerol.

3.1.4. Stanične linije

Provođenje ovog istraživanja je odobreno na 70. sjedinici Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb 21. studenog 2016. u Zagrebu.

Fibroblasti pacijentice oboljele od nedostatka AHCY su dobiveni iz SAD suradnjom s Dr. S. Harvey Mudd (National Institute of Mental Health, Laboratory of Molecular Biology, Bethesda, pokojni) i Kevin A. Strauss, MD (Clinic for Special Children, Strasburg, Pennsylvania). Kontrolni fibroblasti divljeg tipa su dobiveni od dr.sc. Ksenije Fumić (Klinički bolnički centar, Zagreb). Kontrolni fibroblasti pripadaju zdravom djetetu istog spola i približne dobi, a izolirani su iz tkiva uzorkovanog biopsijom s mjesta istovjetnog onome u pacijentu. Fibroblasti su se koristili za analizu promjena na razini transkriptoma i proteoma uzrokovanih neaktivnošću AHCY, te kao referentni sustav najbližini stvarnim promjenama koje se događaju u pacijentima.

Stanična linija Hep G2 (ATCC® HB-8065™) je korištena za izradu modelne stanične linije u kojoj je umjetno utišana ekspresija nativnog gena *ahcy*. Ova stanična linija ima divlji tip proteina p53 (također potvrđeno analizom transkriptoma).

Stanična linija humanih embrionalnih stanica bubrega HEK 293 (ATCC® CRL-1573™) je korištena za izradu modelnih staničnih linija u kojima stanice stabilno ekspimiraju divlji tip ili mutantne EGFP-AHCY proteine.

Stanična linija HEK 293 s ugrađenim SV40 T-antigenom HEK 293T (ATCC® CRL-3216™) je korištena za prolazne transfekcije različitih kombinacija BiFC vektora u svrhu analize makromolekularne stabilnosti AHCY i identifikacije novih interakcijskih partnera proteina AHCY.

Ljudske stanice u kulturi su uzgajane u *Dublecco's modified eagle's* mediju (DMEM) s glukozom (4500 mg dm⁻³), L-glutaminom, natrijevim bikarbonatom, NaHCO₃ i piridoksinom. Prije upotrebe medij se suplementira s konačno 10% telećeg fetalnog seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS, SIGMA-ALDRICH) i 2 mM L-glutaminom (200 mM za staničnu kulturu, SIGMA-ALDRICH) te se tako dobije kompletirani DMEM medij. Za dugotrajnu pohranu u tekućem dušiku u kompletirani medij se dodaje konačni 5% DMSO.

U medij za uzgoj fibroblasta se dodaje faktor rasta fibroblasta α (engl. *fibroblast growth factor* α ; FGF α , SIGMA-ALDRICH) otopljen prema preporukama proizvođača u konačnoj koncentraciji od 15 ng/mL.

Tijekom uzgoja stanica za SILAC eksperimente medij se suplementirao prema naputcima iz *SILAC-Lys-8-Kit* (SILANTES) kompleta tj. prema preporukama proizvođača (poglavlje 3.4.4.).

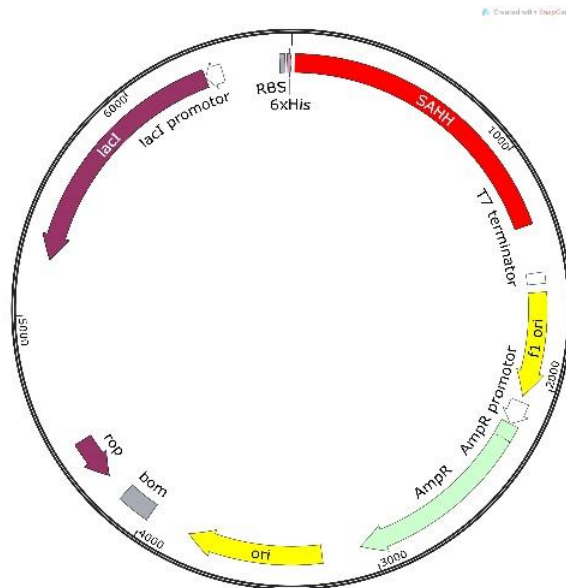
3.1.5. Genomska DNA i plazmidni vektori

Genomske DNA pacijenta i oba roditelja koje su korištene za potvrdu točkastih mutacija u egzonima gena *ahcy* dobivene su iz SAD u suradnji s Dr. S. Harvey Mudd (National Institute of Mental Health, Laboratory of Molecular Biology, Bethesda, pokojni) i Kevin A. Strauss, MD (Clinic for Special Children, Strasburg, Pennsylvania).

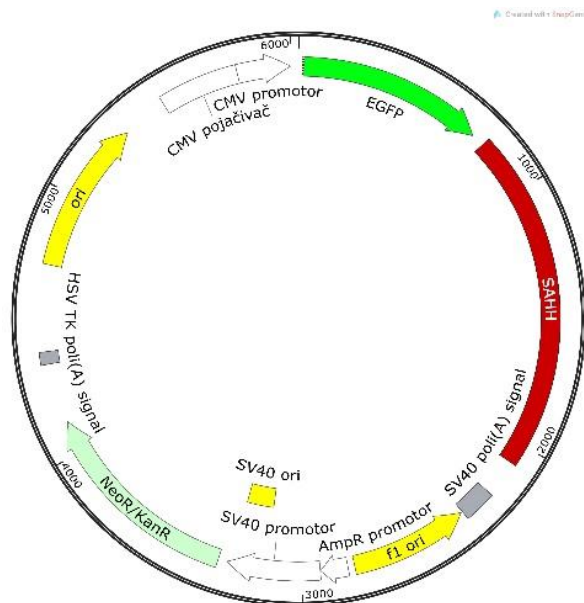
Plazmidni vektori korišteni za kloniranje:

- pET32_AHCY - za visoku ekspresiju proteina AHCY u *E. Coli* i pročišćavanje na Ni²⁺-agarozi pomoću privjeska od 6 histidinskih aminokiselinskih ostataka (Slika 5);

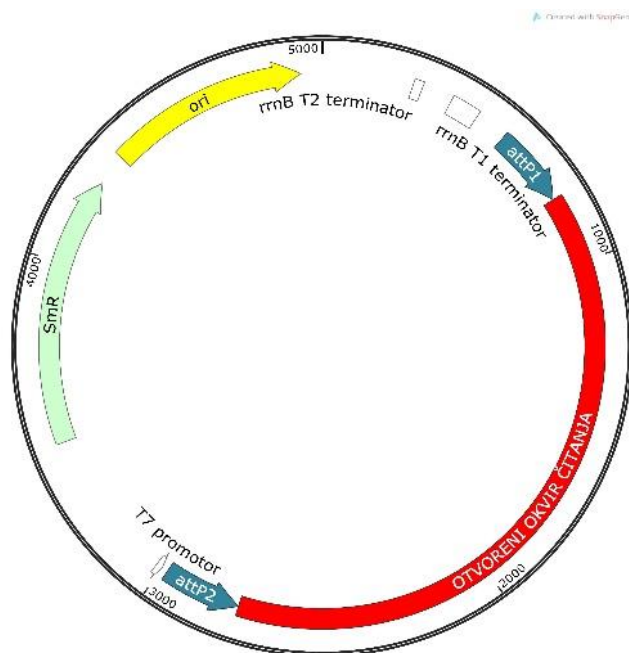
- pEGFP_AHCY – za visoku ekspresiju proteina AHCY u ljudskim stanicama i praćenje ekspresije pomoću EGFP privjeska (Slika 6);
- pDONR223 – ishodišni komercijalni vektor za Gateway® kloniranje u koji su uklonirani pojedinačni otvoreni okviri čitanja u hORFeome banci gena (Slika 7);
- BiFC vektori – četiri odredišna vektora za Gateway® kloniranje dizajnirana u LNG za analizu proteinskih interakcija u ljudskim stanicama metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom (Slika 8).



Slika 5. Mapa vektora **pET32_AHCY** (≈ 6 kb; LNG). Geni i funkcionalni genetički slijedovi: **SAHH**, cDNA slijed koji kodira za AHCY protein (crveno); **6 × His**, 6 histidinskih aminokiselinskih ostataka; **lacI**, represor laktoze (ljubičasto); **Amp^r**, rezistencija na ampicilin (svijetlo zeleno); **RBS**, vezno mjesto ribosoma (engl. ribosome binding site); **ori/f1 ori**, ishodište replikacije/f1 bakteriofaga (engl. origin of replication) (žuto); **rop**, protein za održavanje plazmida na niskom broju kopija po stanici (ljubičasto); **bom**, regija za konjugacijsku mobilnost (engl. *basis of mobility*) (sivo).

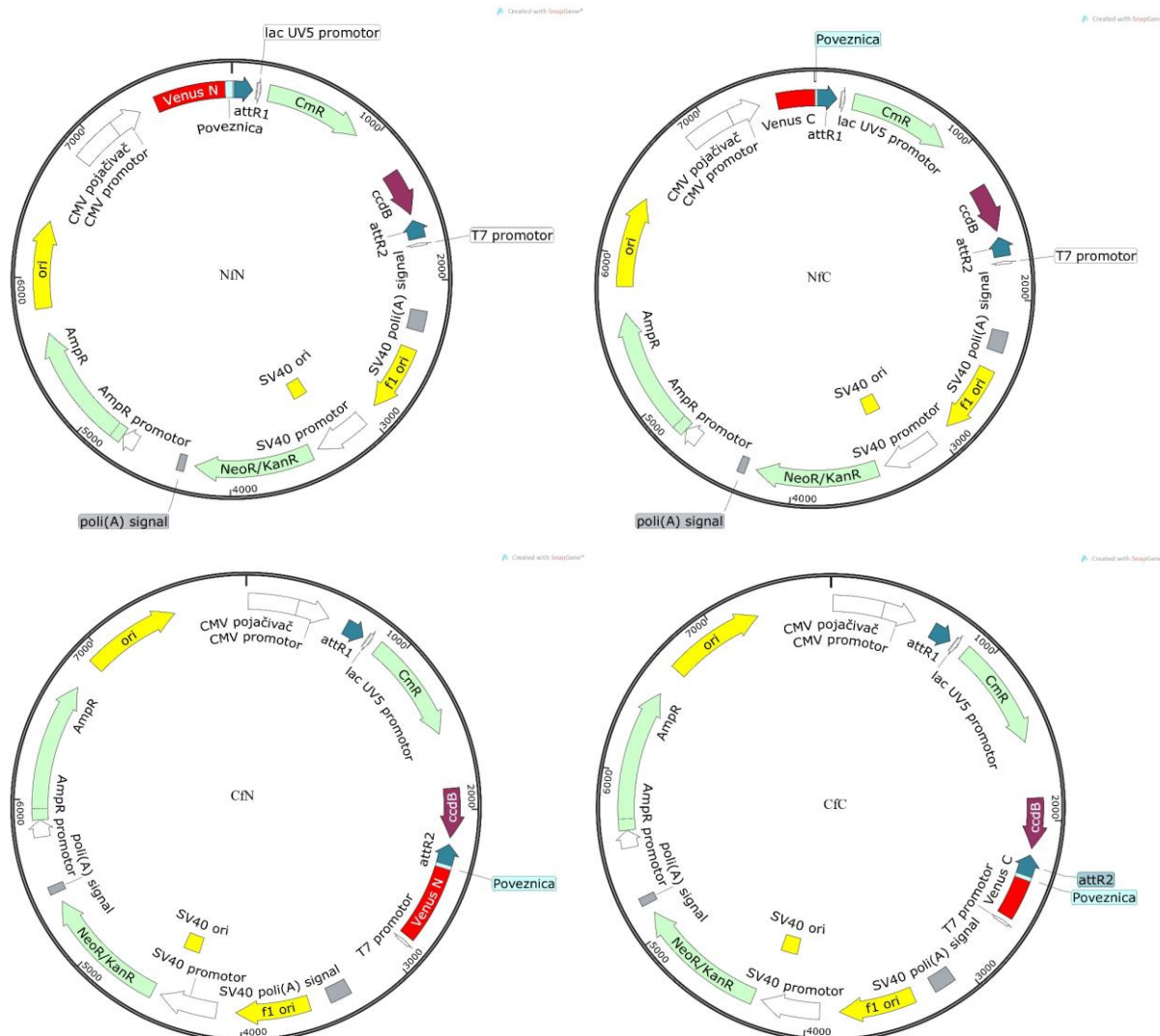


Slika 6. Mapa vektora **pEGFP_AHCY** (≈ 6 kb; LNG). Geni i funkcionalni genetički slijedovi: **SAHH**, cDNA slijed koji kodira za AHCY protein (crveno); **EGFP**, pojačani zeleni fluorescentni protein (engl. enhanced green fluorescent protein) (zeleno); **Neo^r/Kan^r**, rezistencija na neomicin i kanamicin (svijetlo zeleno); **Amp^r protomor**, promotor gena za rezistenciju na ampicilin (bijelo); **f1 ori**, ishodište replikacije f1 bakteriofaga (engl. origin of replication) (žuto); **CMV**, elementi ljudskog citomegalovirusa (bijelo); **SV 40**, elementi simian virusa 40 (bijelo i sivo); **HSC TK poli(A) signal**, poliadenilacijski signal timidin kinaze iz Herpes simpleks virusa (sivo).



Slika 7. Mapa vektora **pDONR223** (veličina ovisna o ukloniranom ishodištu replikacije; hORFeome). Funkcionalni genetički slijedovi: **Sm^r**, gen za rezistenciju na

spektinomycin i streptomycin (svijetlo zeleno); **ori**, ishodište replikacije (engl. origin of replication) (žuto); **rrnB T1** i **rrnB T2**, transkripcijski terminatori E. coli *rrnB* gena (bijelo); **T7 promotor**, promotor RNA polimeraze bakteriofaga T7 (bijelo); **attP1** i **attP2**, mjesta rekombinacije za Gateway® kloniranje (plavo).



Slika 8. Mape **BiFC vektora** (NfN 7985 pb; NfC 7712 pb; CfN 7944 pb; CfC 7713 pb; LNG). Funkcionalni genetički slijedovi: **Venus N**, N dio proteina Venus; **Venus C**, C dio proteina Venus (crveno); **Cm^r**, rezistencija na kloramfenikol (svijetlo zeleno); **Amp^r**, rezistencija na ampicilin (svijetlo zeleno); **Neo^r/Kan^r**, rezistencija na neomicin i kanamicin (svijetlo zeleno); **ori/f1 ori**, ishodište replikacije (engl. origin of replication) (žuto); **T7 promotor**, promotor RNA polimeraze bakteriofaga T7 (bijelo); **attR1** i **attR2**, mjesta rekombinacije za Gateway® kloniranje (plavo); **CMV**, elementi ljudskog citomegalovirusa (bijelo); **SV 40**, elementi simian virusa 40 (bijelo i sivo); **lac UV5 promotor**, promotor iz E. coli lac operona (bijelo); **ccdB**, gen za CcdB toksin (ljubičasto).

3.2. Metode

3.2.1. Dekontaminacija i uvjeti rada

Kvaliteta i pouzdanost rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji su ovisni o osjetljivosti korištenih metoda, stoga je bilo potrebno obratiti posebnu pažnju na pripremu i dekontaminaciju radnog prostora.

Zbog visoke osjetljivosti PCR metode i metode masivnog paralelnog sekvenciranja potrebno je maksimalno spriječiti zagađenja već postojećim PCR amplikonima u laboratoriju. Amplikoni uz željeni uzorak u enzimskim reakcijama predstavljaju dodatni kalup za umnožavanje te tako daju lažno pozitivne rezultate. Najvažnijim zagađivačem se smatra aerosol u kojem se nalaze PCR amplikoni, stoga su se pred-PCR i post-PCR aktivnosti odvijale u fizički odvojenim prostorijama. Dvije osnovne pred-PCR aktivnosti su izolacija nukleinskih kiselina i priprema reakcijskih smjesa. Za navedene aktivnosti je korišten poseban set pipeta i nastavci za pipete s barijerom za aerosol u obliku ugrađenog filtera (filter tipsevi) uz prethodnu sterilizaciju radnih površina kemijskim sredstvom i UV lampom.

Tijekom izolacije RNA i pripreme reakcijskih smjesa posebno se obratila pozornost na sprječavanje zagađenja RNAzama. Izolacija RNA se radila u laminaru s vertikalnim protokom zraka kako bi obavezna dekontaminacija radnog prostora od aktivnosti RNAza bila lakša. Stoga su radne površine, laminar, laboratorijsko posuđe za pripremu pufera i gelova, te aparatura u kojoj se odvija elektroforeza u gelu agaroze tretirani s *RNase AWAY* (CARL ROTH) uz često mijenjanje lateks rukavica bez pudera tijekom rada. Sva potrošna plastika i nastavci za pipete su čisti od RNAza prema certifikatima od proizvođača.

Razgradnja stanica i priprema proteinskih uzoraka za komparativnu proteomiku su rađeni u laminaru prethodno maksimalno očišćenom od zagađenja keratinima uz obraćanje posebne pozornosti na smanjenje količine prašine koja je glavni izvor unosa keratina u uzorke. Površine, pipete i ostali materijal dekontaminirani su svježom MiliQ vodom, 70% EtOH i UV lampom. Filter nastavci za pipete i potrošni material su isključivo otvarani u laminaru, a obavezno je nošenje i često mijenjanje nitrilnih rukavica bez pudera i čiste kute.

Mikrobiološki rad se izvodio se uz plamenik kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije.

S ljudskim staničnim kulturama se radilo u zasebnoj tzv. sterilnoj sobi, u laminaru s okomitim strujanjem zraka čija je površina prije rada sterilizirana s 70% EtOH i UV lampom. 70% EtOH se također koristio za sterilizaciju prskanjem ili prebrisavanjem svog materijala koji se koristio u laminaru, te rukavica tijekom rada. Korištene su staklene pipete sterilizirane suhom sterilizacijom na 180°C 2 h. Za neutralizaciju ostataka stanica i medija korišteno je univerzalno kemijsko sredstvo za sanitaciju i dezinfekciju *Izosan*[®]-G (*PLIVA*[®]sept).

3.2.2. Mikrobiologija i heterologna ekspresija rekombinantnih proteina

3.2.2.1. Uzgoj bakterija

Prekonoćne kulture sojeva *E. coli* su uzgajane na 37°C u rotacijskoj tresilici na 250 rpm-a u tekućem LB mediju suplementiranom odgovarajućim antibioticima (Tablica 4) da bi se zadržao selekcijski pritisak. Ploče s dubokim jažicama formata 96 su korištene za uzgoj u volumenu od 1 mL po jažici, staklene epruvete za volumene od 2 – 5 mL, a Erlenmeyerove tikvice za volumene od 100 mL.

U svrhu dugotrajnog pohranjivanja pojedinačnih klonova u tubicama za smrzavanje, 1 mL bakterijskih stanica se taloži centrifugiranjem na 2000 rpm-a 10 min, a talog se resuspendira u 1 mL medija za pohranu i sprema na -80°C. Pohranjivanje klonova u pločama formata 96 se radi na isti način, osim što se talog dobiven od 200 µL bakterijskih stanica otapa u 100 µL medija za pohranu.

Ukupne suspenzije (1 mL) bakterija transformiranih elektroporacijom su taložene na 2000 rpm 10 min, nakon čega je talog resuspendiran u 100 µL svježeg LB medija. Suspenzija je nasađivana razmazivanjem steriliziranim staklenim štapićem na krutu LB hranjivu podlogu pripremljenu u plastičnim Petrijevim zdjelicama i prethodno suplementiranu odgovarajućim antibioticima (Tablica 4). Nakon upijanja suspenzije u podlogu, ploče su inkubirane preko noći na 37°C. Kolonije s ploča su se prenosile u tekući hranjivi LB medij pomoću sterilnih nastavaka za pipete.

3.2.2.2. Manipulacija hORFeome bankom gena

Za propagaciju individualnih klonova, iz odgovarajuće jažice ploče hORFeome banke gena otopljene na sobnoj temperaturi pipetom se prenosilo 5 µL glicerolnog štoka u staklenu epruvetu s 5 mL svježeg LB medija sa spektinomycinom, te se

uzgajala prekonoćna kultura. Za replikaciju pojedinačnih klonova iz prekonoćne kulture se napravio glicerolni štok u LB mediju s 8% glicerolom i spektinomycinom.

Za repliciranje i propagaciju ploča se koristio replikator formata 96 s iglama od nehrđajućeg čelika. Replikator se prije i nakon korištenja, te između ploča sterilizirao uranjanjem u otopinu univerzalnog sredstva za sterilizaciju (*Izosan*[®] - G (PLIVA[®]sept)), MiliQ vodu i 70% EtOH, te spaljivanjem prolaskom kroz plamen. Replikator se uranjao do dna hORFeome ploče uz blago miješanje pomicanjem replikatora po unutrašnjosti jažica, a zatim se u odgovarajućoj orijentaciji uranjao u novu ploču. Za umožavanje je u novu ploču prije uranjanja replikatora dodano po 150 µL LB medija sa spektinomycinom, a za replikaciju glicerolnih štokova po 50 µL tekućeg LB medija s 8% glicerolom i spektinomycinom. Ploče su se pokrivale samoljepljivom folijom i prenosile u inkubator na 37°C 18-24 h. Iz umnoženih kultura su se pročišćavali plazmidi, a replicirani glicerolni štokovi su se pohranjivali na -80°C.

3.2.2.3. Transformacija bakterija elektroporacijom

Elektrokompetentne stanice *E. coli* su transformirane *Gene Pulser Xcell*[™] *Total System* (BIO-RAD) koristeći preprogramirani protokol (2.5 kV, 200 Ω i 25 µF). Puls u trajanju od 5,0 ms je primjenjen na 50 µL bakterijske suspenzije otopljene na ledu, prethodno pomješane s 1 – 3 µL reakcijske smjese i prebačene u ohlađene 0,2 cm kivete s aluminijskim elektrodama. Stanice su zatim resuspendirane u 1 mL toplog tekućeg LB medija i inkubirane u rotacijskoj tresilici na 37°C, 250 rpm-a, 60 min. Nakon oporavka stanice se nasađuju kao što je opisano u poglavlju 3.5.1..

3.2.2.4. Probir i propagacija pozitivnih plazmidnih klonova

Bakterijske kolonije pojedinačnih klonova su prenešene s krute LB podloge i uzgajane u obliku 3 mL prekonoćnih kultura uz odgovarajuće antibiotike (Tablica 4). Plazmidni klonovi su se iz prekonoćne kulture pročišćavali komercijalnim kompletom i pripremali za sekvenciranje po Sangeru. Kromatogrami su pregledani pomoću SnapGene Viewer programa, a probrani klonovi su korišteni za daljnje propagacije engl. *miniprepom* ili engl. *midipepom* te dugotrajnu pohranu na -80°C.

3.2.2.5. Pročišćavanje plazmidnih vektora

Komercijalni komplet *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) se koristio za izolaciju pojedinačnih plazmidnih vektora iz 1-5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura (engl. *miniprep*) prema protokolu proizvođača.

Komercijalni komplet *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega) se koristio za izolaciju pojedinačnih plazmidnih vektora iz 100 mL prekonoćnih bakterijskih kultura (engl. *midiprep*) kombiniranim protokolom proizvođača pomoću centrifugiranja i vakuuma.

Metoda izolacije bez komercijalnog kompleta tzv. „*in house*“ metoda u pločama s dubokim jažicama formata 96 (engl. *96 well plate miniprep*) se koristila za istovremenu izolaciju 96 plazmidnih vektora iz 1 mL prekonoćnih bakterijskih kultura. Prekonoćna kultura je centrifugirana na 5000 rpm-a 3 min. Talog je resuspendiran pipetiranjem u 200 μ L P1 pufera (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 μ g/ml Ribonukleaze A (CARL-ROTH)). Dodano je 200 μ L P2 pufera (200 mM NaOH, 1% SDS). Da bi se razbile stanice, ploča je prekrivena samoljepljivom folijom, lagano okrenuta 6 $\times$ i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. 200 μ L hladnog P3 pufera (3 M K-acetat, pH 5,5) je dodano za inaktivaciju razbijanja stanica i taloženje ostataka stanica i genomske DNA. Ploča je zatim prekrivena samoljepljivom folijom, lagano okrenuta 6 $\times$ i centrifugirana na 5000 rpm-a 30 min. Pazeći da se ne dotiče talog, supernatant je prenesen u čistu ploču s 96 jažica, dodano je 450 μ L 100% 2-propanola. Ploča je prekrivena samoljepljivom folijom i centrifugirana na 5000 rpm-a 1 h za precipitaciju DNA. Supernatant je maknut preokretanjem ploče i lupanjem o papirnate ubruse na površini pulta. Kako bi se isprao talog DNA, pažljivo je dodano 500 μ L 70% EtOH. EtOH je maknut preokretanjem ploče i lupanjem o papirnate ubruse na površini pulta, te je ploča ostavljena da se suši na zraku 5 min. Talog DNA je otopljen u 50 μ L MiliQ vode.

3.2.2.6. Indukcija heterologne ekspresije proteina

U svrhu indukcije sinteze rekombinantnih proteina u *E. Coli* soja *BL21-Gold (DE3)pLysS*, od pojedinačnih kolonija je pripremljeno po 1 mL prekonoćne kulture u LB mediju s ampicilinom, kloramfenikolom i tetraciklinom (Tablica 4). Prekonoćna kultura je sljedeći dan razrijeđena 1:100 u 10 mL svježeg medija. Optička gustoća kulture je određena koristeći spektrofotometar *DU 530 UV/VIS* (Beckman) postavljen

na 590 nm. Stanice su uzgajane dok nisu ušle u eksponencijalnu fazu rasta, odnosno dok optička gustoća nije dosegla $OD_{590} \sim 0,45$ (engl. *optical density*, OD).

Za ekspresije u trajanju od 16 h na 30°C ili 20 h na 20°C, bakterijska suspenzija je prije dodatka IPTG-a (0,5 mM konačno) ohlađena na sobnu temperaturu. Benzilni alkohol (10 mM konačno) je dodan tijekom ekspresije od 20 h na 20°C.

3.2.2.7. Pročišćavanje rekombinantnih proteina na Ni^{2+} -agarozi

Bakterijske kulture za pročišćavanje rekombinantnih proteina AHCY su uzgojene i inducirane kao što je opisano u 3.2.2.1. u volumenu od nekoliko mililitara u različitim uvjetima da bi se ustanovili optimalni uvjeti za sintezu i pročišćavanje mutantnog proteina AHCY. Pročišćavanje se provodilo tako da su svi puferi, tubice i koraci bili na ledu. Fosfatni pufer koji se koristio za pripremu niže navedenih pufera se sastojao od 80,2% 200mM K_2HPO_4 i 19,8% KH_2PO_4 (pH 7,4). 2 mL bakterijske kulture je taloženo 1 min at $15000 \times g$ na +4°C. Stanice su resuspendirane u 100 μ L Pufera 1 (20 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM fosfatni pufer (pH 7,4)) te zatim sonicirane na ledu s ultrasoničnim homogenizatorom *Misonix XL2000 Microson* (postavka 5,5) u 10 ciklusa koji se sastoje od 10 sek sonikacije i pauze od 30 sek. Lizat je centrifugiran 15 min na 14 000 rpm-a +4°C, te je proteinima u supernatantu određena koncentracija. Centrifugiranjem 10 min na $15\ 000 \times g$ taložili su se ostatci stanica s netopljivom proteinskom frakcijom. Supernatant tj. topljiva frakcija je korištena za izolaciju proteina na Ni^{2+} agarozi na tzv. maloj skali pomoću Pufera 2 (30 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM fosfatni pufer (pH 7,4)) kojim se ispiru nevezani proteini i Pufera 3 (300 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM fosfatni pufer (pH 7,4)) kojim se eluiraju vezani proteini. Pratio se protokol proizvođača QIAGEN „*Protein minipreps of 6xHis-tagged proteins from E. coli under native conditions*” opisan na stranici 85 u „*The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*”.

Za analizu pomoću SDS-PAGE (poglavlje 3.4.2.) su pripremljena po tri uzorka iz svakog pročišćavanja: proteini netopljive frakcije i po 20 μ L topljive nepročišćene frakcije i eluiranog proteina.

3.2.3. Rad s DNA

Za provjeru kvalitete tj. stupnja razgrađenosti genomske DNA, te veličine PCR produkata koristila se elektroforeza u gelu agaroze kao što je opisano u poglavlju 3.2.5.. Čistoća DNA od zagađenja s RNA i fenolima se provjeravala u 1 μ L uzorka spektrofotometrijom pomoću uređaja *Biospec Nano* (Shimadzu). Pratio se omjer očitavanja pri 260 nm / 230 nm (engl. *260/230 ratio*) koji za DNA čistu od fenola iznosi 2,0-2,2 te omjer očitavanja pri 260 nm / 280 nm (engl. *260/280 ratio*) koji za DNA čistu od RNA iznosi 1,8- 2,0.

Za određivanje koncentracije genomske DNA i PCR produkata se koristio *Qubit 3.0* fluorometar (Thermo Fisher Scientific) i *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) s pripadajućim standardima u *Qubit® Assay Tubes* tubicama.

3.2.3.1. LR rekombinacija (*Gateway®* kloniranje)

Ishodišni vektori iz hORFeome banke gena (Slika 7), destinacijski plazmidni vektori dizajnirani u LNG (Slika 8) i *Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix* (Thermo Fisher Scientific) uz odgovarajući komercijalni pufer su se koristili za LR reakciju rekombinacije *Gateway®* kloniranjem. Reakcijska smjesa i inkubacijski koraci su se pripremali prema preporuci proizvođača (75 ng mješavine 59 ishodišnih vekora i 150 ng odredišnog vektora u smjesi). LR reakcije su zatim elektroporirane u *E coli* soj *One Shot® TOP10* i nasađene na LB podlogu suplementiranu streptomycinom i ampicilinom (Tablica 4). Kolonije s ploča su propagirane u tekućem LB mediju u pločama s 96 dubokih jažica. Plazmidi su počišćeni „*in house 96 well plate miniprep*“ metodom kao što je opisano u poglavlju 3.2.2.5..

3.2.3.2. Umnažanje slijeda nukleotida s genomske DNA

Genomske DNA pacijenta s nedostatkom AH CY i roditelja su se koristile za umnažanje slijedova koji kodiraju za egzon 4 i egzon 9 gena *ahcy* metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) uz odgovarajuće oligonukleotidne početnice (Tablica 5) kao što je prikazano na Slici 10. Korištena je komercijalna polimeraza *Vent® DNA Polymerase* s pripadajućim 10 $\times$ *Reaction buffer* i $MgSO_4$ (New England Biolabs). Ukupni volumeni i komponente reakcijske smjese se nalaze u Tablici 6.

Tablica 6. Komponentne reakcijske mješavine i uvjeti PCR-a.

Koraci reakcije	Trajanje i temperature
početna denaturacija	5 min / 95°C
denaturacija	15 sec / 94°C
sparivanje početnica	35× { 15 sec / 58°C
produljenje	30 sec / 72°C
završno produljenje	5 min / 72°C
Reakcijska smjesa	- 5 µL 10 × <i>Reaction Buffer</i> (konačno 1 ×) - 1 µL 100 mM MgSO₄ (konačno 2 µM) - 1 µL mješavine dNTP 10 mM svaki (New England Biolabs; konačno 200 nM) - 0,5 µL polimeraze (konačno 1 jedinica) - 100 ng ukupno genomske DNA - 0,75 µL svake početnice (konačno 0,4 mM) - do 50 µL MiliQ vode

3.2.3.3. Ciljana mutageneza

Pomoću *Expand™ Long Range dNTPack* (SIGMA-ALDRICH) koji sadrži DNA polimerazu visoke vjernosti se umnažao PCR-om cijeli nukleotidni slijed plazmidnih vektora pET32_AHCY i pEGFP_AHCY. Za metodu ciljane *in vitro* mutageneze se koristila jedna (engl. *single primer mutagenesis*) ili par oligonukleotidnih početnica koje sadrže željenu mutaciju koja se uvodi i dijelove koji su komplementarni odsječku uzvodno i nizvodno od mutacije. U Tablici 7 se nalaze komponente reakcijske smjese i uvjeti PCR-a.

Tablica 7. Komponentne reakcijske mješavine i uvjeti ciljane mutageneze.

Koraci reakcije	Trajanje i temperature
početna denaturacija	4 min / 94 °C
denaturacija	10 sec / 92 °C
sparivanje početnica	10× { 55 sec / 52 °C
produljenje	1 min po kb kalupa / 68 °C
denaturacija	10 sec / 92 °C
sparivanje početnica	15× { 15 sec / 56 °C
produljenje	1 min po kb kalupa + 2 sec po ciklusu / 68 °C
završno produljenje	7 min / 68 °C
Reakcijska smjesa	- 5 µL 5x pufer bez MgCl₂ (konačno 1 ×) - 1,75 µL dNTP-ovi (konačno 0,5 mM) - 2,5 µL MgCl₂ (konačno 2,5 mM) - 0,35 µL DNA-polimeraze (konačno 3,5 jedinica) - do 500 ng kalupa - 1,5 µL jedne početnice ili 0,75 µL svake početnice (konačno 0,4 µM) - 1 µL DMSO (konačno 3%) - do 25 µL MiliQ vode

Za selektivno cijepanje kalupa koji je metiliran je korištena restriksijska endonukleaza DpnI (New England Biolabs) korištena kako bi u smjesi ostao isključivo PCR produkt koji sadrži željenu mutaciju. Smjesa za cijepanje sastava kao u Tablici 8 se inkubirala preko noći na 37°C, te se bez koraka inaktivacije koristila za transformaciju elektrokompetentnih bakterija *E. Coli* soja *XL1-Blue*.

Tablica 8. Komponente reakcijske smjese za cijepanje.

Restriksijska smjesa	- 25 µL PCR reakcije - 3 µL 10 × <i>CutSmart® Buffer</i> (konačno 1 ×) - 0,5 µL <i>DpnI</i> (konačno 10 jedinica) - do 30 µL MiliQ vode
----------------------	--

3.2.3.4. Elektroforeza u gelu agaroze

Gelovi agaroze su pripremljeni otapanjem agaroze u TAE puferu (engl. *Tris-Acetate-EDTA*; 40 mM Tris–acetat, 1 mM EDTA, 20 mM Na–acetat (pH 8,3)) uz dodatak EtBr (konačna koncentracija 0,5 µg/mL) u mikrovalnoj pećnici do vrenja te izlijevanjem u odgovarajuće kalupe s češljicama. 1% gelovi su se koristili za elektroforezu plazmidnih vektora i produkata ciljane mutageneze, a 2% gelovi za elektroforezu RNA i PCR produkata umnoženih s genomske DNA. Polimerizirani gelovi se uranjaju u kadicu s TAE puferom, te se u jažice unose uzorci prethodno pomješani s puferom za nanošenje. 6 × GLB (engl. *Gel Loading Buffer*; 30% glicerol, 0,25% bromofenol plavo, 0,25% ksilen cijanol FF) se koristio za nanošenje DNA, a 2 × *RNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) za nanošenje RNA. Veličine fragmenata su određivane pomoću DNA i RNA standarda koji se unose u jednu jažicu po gelu. Za DNA elektroforezu se koristio *Quick-Load 2-Log DNA Ladder* (New England Biolabs), a za RNA elektroforezu *RiboRuler RNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je provedena u trajanju od 20 min uz napon od 120 V koristeći aparaturu za horizontalnu elektroforezu *Wide Mini-Sub Cell GT Cell* (BIO-RAD) i *PowerPac™ Basic Power Supply* (BIO-RAD). Za detekciju i vizualizaciju DNA i RNA gelove se osvjetljavalo UV-svjetlom transiluminatora *BXT 20M MINI 6x8W 312 nm* (UVITEC) pri $\lambda = 312$ nm čime se pobuđuje fluorescencija EtBr koji je interkalirao u molekule nukleinskih kiselina.

3.2.3.5. Pročišćavanje PCR produkata iz gela

PCR produkti su skalpelom izrezani iz gela agaroze nakon elektroforeze i pročišćavani koristeći komercijalni komplet *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN) prema preporukama proizvođača.

3.2.3.6. Sanger sekvenciranje

Reakcijske smjese za sekvenciranje se pripremaju u MiliQ vodi tako da se pomješa DNA (ukupno 500 ng plazmidnog vektora ili 1 ng po 1 pb PCR produkta pročišćenog iz gela agaroze) i 1 µL oligonukleotidne početnice (Tablica 5) koncentracije 3,2 pmol/µL u ukupnom volumenu od 13 µL i šalju u servis za sekvenciranje Instituta Ruđer Bošković (Laboratorij za Molekularnu

Genetiku). Komatogrami su pregledavani i uspoređivani sa slijedom divljeg tipa gena *ahcy* pomoću SnapGene Viewer programa.

3.2.4. Rad s RNA

Za provjeru kvalitete tj. stupnja razgrađenosti ukupne stanične RNA, koristila se elektroforeza u gelu agaroze.

Za određivanje koncentracije RNA se koristio *Qubit 3.0* fluorometar (Thermo Fisher Scientific) i *Qubit® RNA Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) s pripadajućim standardima u *Qubit® Assay Tubes* tubicama.

2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) je korišten za određivanje kvalitete RNA prije pripreme biblioteka za sekvenciranje transkriptoma. Osnovni pokazatelj kvalitete tj. stupnja integriteta uzorka je RIN vrijednost (engl. *RNA Integrity Number*) koja za pripremu biblioteka mora biti iznad 7,0. Koristio se komercijalni komplet *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies) prema protokolu proizvođača.

3.2.4.1. Izolacija i pročišćavanje ukupne RNA iz stanica

Ukupna stanična RNA je izolirana komercijalnim reagensom *Invitrogen™ TRIzol™* (Thermo Fisher Scientific) iz stanica koje su uzgajane, odljepljene od podloge i isprane PBS-om (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)). Koristilo se 1 mL reagensa na 1×10^6 stanica, te se izolacija provodila u uvjetima bez zagađenja RNAzama na ledu prema protokolu proizvođača koristeći laboratorijski kloroform. Uzorci RNA su se čistili od DNA pomoću komercijalnog kompleta *TURBO DNA-free™ Kit* (Thermo Fisher Scientific) prema protokolu proizvođača za teža zagađenja genomskom DNA.

3.2.4.2. Analiza razine ekspresije gena kvantitativnim PCR-om u

stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real time Quantitative PCR*; RT-qPCR) je korišten za analizu relativne razine ekspresije gena. Ukupna stanična RNA je korištena kao kalup za sintezu cDNA metodom reverzne transkripcije koristeći *ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit* (New England Biolabs) kao što je

navedeno u Tablici 9. cDNA je korištena kao kalup u reakcijskoj smjesi za RT-qPCR koja je pripremljena u optički pogodnim pločama s 96 jažica (engl. *Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base (cell culture)*, Thermo Fisher Scientific) i reagensima iz komercijalnog kompleta 2 × *SYBR Green qPCR Master Mix* (Biotool). Komponente reakcijske smjese i uvjeti PCR reakcije se nalaze u Tablici 10. Za reakciju je korišten uređaj *Abi 7200* (Applied Biosystems) na „*standard curve*” postavkama i očitavanju fluorescencije na kraju koraka produljenja svakog ciklusa. Rezultati su analizirani u Microsoft Excell kao što je opisano u poglavlju 3.6..

Tablica 9. Protokol za reverznu transkripciju.

Smjesa za reverznu transkripciju	- 800 ng ukupne stanične RNA - 2 µL 50 µM <i>Oligo dT</i> mješavine početnica (5 µM konačno) - do 8 µL MiliQ vode
Denaturacija uzorka	5 min na 65°C; kratko centrifugirati i staviti na led
Dodati u smjesu za reverznu transkripciju	- 10 µL 2 × <i>ProtoScript II</i> reakcijska mješavina (konačno 1 ×) - 2 µL 10 × <i>ProtoScript II</i> enzimska mješavina (konačno 1 ×)
Sinteza cDNA	- 42°C 1 h
Inaktivacija enzima	- 80°C 5 min

Tablica 10. Protokol za RT-qPCR reakciju.

Koraci RT-qPCR	Trajanje i temperature
početna denaturacija	5 min / 95°C
denaturacija produljenje	40× { 15 sec / 95°C 35 sec / 60°C
RT-qPCR smjesa	- 10 µL 2 × <i>Syber Master Mix</i> (1 × konačno) - 0,4 µL <i>ROX1</i> - 1 µL cDNA (ili MiliQ vode za negativne kontrole) - 0,2 µL svake početnice (0,1 µM konačno) - do 20 µL MiliQ vode

3.2.4.3. Sekvenciranje transkriptoma

NeoPrep Library System (Illumina) i *TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit for NeoPrep* (Illumina) su korišteni za automatiziranu pripremu biblioteka za sekvenciranje iz 90 ng početne ukupne RNA. Priprema se 16 biblioteka po jednom

ciklusu aparata, odnosno iz jednog komercijalnog kompleta, a aparat automatski određuje koncentraciju dobivenih biblioteka i namješta biblioteku na 10 nM. Gotove biblioteku su razrijeđene na 1,4 pM prema uputama proizvođača i sekvencirane na *NextSeq System* (Illumina) koristeći komplet *NextSeq 500/550 High-Output v2 Kit 75 cycles* (Illumina). Postavke sekvenciranja, automatsko prenošenje podataka, demultipleksiranje i analiza su napravljeni pomoću *BaseSpace Sequence Hub* (Illumina) sučelja kao što je opisano u poglavlju 3.6..

3.2.5. Rad s proteinima

Koncentracija proteina je određena prije SDS-PAGE i miješanja SILAC uzoraka za LC/MS-MS pomoću *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) prema protokolu proizvođača u pločama s 96 jažica (engl. *Microplate Procedure*; omjer uzorka prema radnoj otopini = 1:8), a rezultati su očitani na *Multiskan EX* (Thermo Fisher Scientific) pri 570 nm.

3.2.5.1. Pripremanje proteinskih lizata

Proteinski uzorci dobiveni iz induciranih bakterijskih kultura su u svrhu pročišćavanja rekombinantnih proteina AHCY pripremani kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.7..

Za provjeru razine ekspresije proteina u ljudskim stanicama metodom Western blota su pripremljeni proteinski lizati tako da su stanice skupljene i isprane s PBS-om (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)) centrifugiranjem na 300 × g 5 min. Stanični talog je resuspendiran u 50 µL pufera za razgradnju stanica (0,9% NaCl, 2,4% Tris, 0,08% EDTA, 0,01% NP-40, 1 tableta *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA.ALDRICH) na 10 mL pufera) na 1 × 10⁶ stanica i inkubiran na ledu 30 min. Stanice su razbijene sonikacijom na ledu s ultrasoničnim homogenizatorom *Misonix XL2000 Microson* (postavka 5,5) u 8 ciklusa koji se sastoje od 5 sek sonikacije i pauze od 30 sek. Lizat je centrifugiran 15 min na 14 000 rpm-a +4°C, a proteinima u supernatantu je određena koncentracija kao što je opisano u poglavlju 3.4..

Proteinski uzorci iz stanica uzgajanih SILAC metodom za LC-MS/MS su pripremljeni kao što je opisano u poglavlju 3.4.4..

3.2.5.2. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS PAGE)

Za razdvajanje proteina u uzorcima je korištena elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida ili SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Poliakrilamidni gelovi su izljevani koristeći *Mini-PROTEAN® Tetra* (BIO-RAD) sustav za izljevanje gelova. Za izljevanje razdvajajućeg 10% gela se pripremala otopina sastava: 10 % akrilamid i bis-akrilamid otopina (maseni omjer 29:1), 0,39 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,08% TEMED. Za izljevanje sabijajućeg 5% gela se pripremala otopina sastava: 5% akrilamid i bis-akrilamid otopina (maseni omjer 29:1), 0,13 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED.

Proteinski uzorci su pripremljeni u 1 × SB (razrijeđeni 4 × pufer za nanošenje uzoraka; engl. *Sample Buffer*; 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% β-merkaptotanol, 8% SDS, 40% glicerol, 0,04% bromofenol plavo), inkubirani na 95°C 10 min te zatim nanešeni u jažice gela prethodno uronjenog u kadicu *Mini-PROTEAN II* (BIO-RAD) napunjenu puferom za elektroforezu (24,8 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS (pH 8,3)). Elektroforeza je provedena pri 150 V dok se uzorci nisu sabili na granici dviju faza gela, a zatim pri 180 V dok boja nije iscurila iz gela. Proteini su odmah preneseni na membranu ili vizualizirani bojanjem u puferu za bojanje 30 min (45% MetOH, 10% ledena octena kiselina, 0,05% Coomassie R-250), a zatim uklanjanjem viška boje odbojavanjem u odgovarajućem puferu (45% MetOH, 10% ledena octena kiselina) preko noći na horizontalnoj njihalici.

3.2.5.3. Western blot

Western blot metoda je korištena za provjeru ekspresije mutantnih pEGFP-proteina AHCY u ljudskim stanicama u kulturi i analizu ekspresije proteina uključenih u stanični ciklus u stanicama hepatocelularnog karcinoma s utišanim AHCY. Proteinski uzorci su pripremljeni kao u poglavlju 3.4.1. i kvantificirani kao što je opisano u poglavlju 3.4.. Proteini su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom i prenešeni na nitrocelulozne membrane koristeći *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (BIO-RAD) i *Mini Nitrocellulose Transfer Packs* (BIO-RAD) prema preporukama proizvođača na turbo postavkama za prijenos proteina širokog spektra molekulskih masa. Za provjeru uspješnosti prijenosa i kvantifikaciju ukupnih proteina na membrani, proteini su prolazno bojani Ponceau S otopinom (0,1% Ponceau S, 5%

ledena octena kiselina) te odbojavani u TBS-T puferu za ispiranje (engl. *Tris Buffered Saline Tween*; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween–20). Membrana je zatim blokirana u puferu za blokiranje (5% bezmasno mlijeko u prahu u TBS-T-u) 1 h na sobnoj temperaturi i oprana 3 × 15 min u TBS-T puferu. Odgovarajuće primarno protutijelo (Tablica 11) je razrijeđeno u puferu za blokiranje prema preporuci proizvođača, te je membrana inkubirana 2 h na sobnoj temperaturi ili preko noći na +4°C. Membrana je oprana 3 × 15 min u puferu za ispiranje i dodano je odgovarajuće sekundarno protutijelo (Tablica 11) razrijeđeno u puferu za blokiranje prema preporuci proizvođača, te je membrana inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi. Membrana je oprana 3 × 15 min u puferu za ispiranje. Kemiluminiscentni signal je razvijen pomoću *Clarity™ Western ECL Blotting Substrate* (BIO-RAD) kompleta prema preporuci proizvođača i detektiran na *C-DiGit® Blot Scanner* (LI-COR). Denzitometija signala na slikama membrana je napravljena pomoću ImageJ programa.

Tablica 11. Popis protutijela korištenih za Western blot. CST – Cell Signaling Technology.

Naziv protutijela	Proizvođač	Kataloški broj	Alternativni naziv/prijevod proteina
14-3-3ζ/δ (D7H5)	CST	#7413	14-3-3 protein
AHCY	Abcam	ab134966	S-adenozilhomocistein hidrolaza
anti-biotin HRP-linked Ab	CST	#7075	sekundarno antitijelo
ATM	Novus Bio	NB100-309	ATM serin/treonin kinaza
beta – actin	Abcam	8226	Beta aktin
B-Raf (55C6)	CST	#9433	serin/treonin protein kinaza B-Raf
cdc2 (POH1)	CST	#9116	Ciklin ovisna kinaza 1 (CDK1)
CDK2	Santa cruz	sc-163	Ciklin ovisna kinaza 2
CDK6 (DCS83)	CST	#3136	Ciklin ovisna kinaza 6
Chk1	Santa cruz	sc-8408	Kontrolna kinaza 1 (serin/treonin protein kinaza)
cMyc	Santa cruz	sc-8351	Myc protoonkogen
C-Raf	CST	#9422	Raf protoonkogen
Cyclin A	Santa cruz	sc-8351	Ciklin A
cyclinB1 (D5C10) XP®	CST	#12231	Ciklin B1
cyclinD1 (92G2)	CST	#2978	Ciklin D1
cyclinE (HE12)	CST	#4129	Ciklin E

Tablica 11. Nastavak.

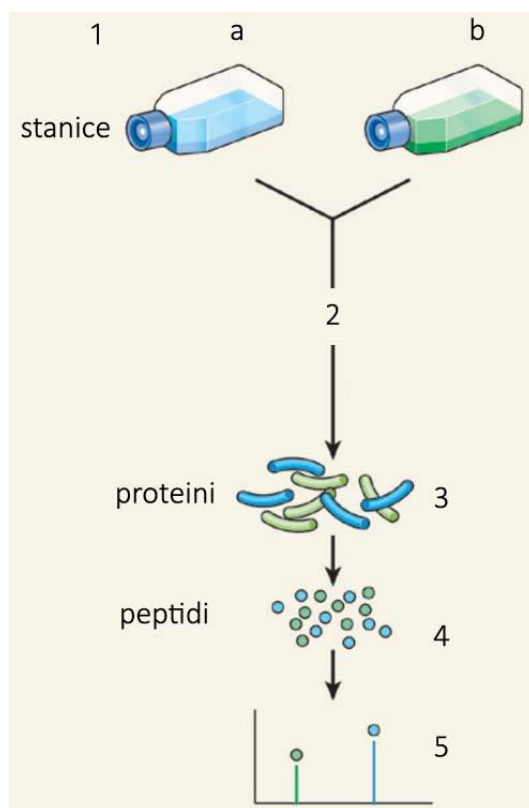
Naziv protutijela	Proizvođač	Kataloški broj	Alternativni naziv/prijevod proteina
Gadd45α (D17E8)	CST	#4632	Gadd45α
EGFP	Biorbyt	Orb48096	pojačani zeleni fluorescentni protein
goat anti-mouse IgG, AlexaFluor594	Invitrogen	A-11005	sekundarno antitijelo
goat anti-mouse IgG, pAb	Enzo	ADI-SAB-100	sekundarno antitijelo
goat anti-rabbit IgG, pAb	Enzo	ADI-SAB-300-J	sekundarno antitijelo
MDM2 (SMP14)	Santa cruz	sc-965	MDM2 protoonkogen
MEK1/2 (L38C12)	CST	#4694	Mitogen aktivirana protein kinaza
p21 waf1/cip1 (DCS60)	CST	#2946	Ciklin ovisni inhibitor kinaza 1
p27	Santa cruz	sc528	Ciklin ovisni inhibitor kinaza 1B
p44/42 MAPK (Erk1/2)	CST	#9102	Kinaza regulirana izvanstaničnim signalima 2
p53 (DO-1)	Santa cruz	sc-126	Tumor supresor
pChk2 and chk2	Novus Bio	NB100-500	Kontrolna kinaza 2 (serin/treonin protein kinaza)
Phospho-B-Raf (Ser445)	CST	#2696	Fosforilirane forme proteina
phospho-cdc2 (Tyr15) (10A11)	CST	#4539	
Phospho-C-Raf (Ser259)	CST	#9421	
phospho-MDM2 (Ser166)	Santa cruz	sc-293105	
Phospho-MEK1/2 (Ser221) (166F8)	CST	#2338	
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2)	CST	#4377	
phospho-p53 (Ser15)	Santa cruz	sc-101762	
Ras (27H5)	CST	#3339	P21 protein aktivator 1
Rb	Abcam	ab24	Tumor supresor retinoblastoma protein

3.2.5.4. Komparativna proteomika (SILAC + LC-MS/MS)

Komparativna proteomika se koristila da bi se ispitala promjene u proteomu pomoću SILAC pristupa (engl. *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) prikazanog na Slici 11. Medij u kojem se uzgajaju fibroblasti pacijenta (fibroPacijent) ili Hep G2 stanična linija s utišanim nativnim AHCY (shAHCY) je suplementiran teškim oblikom lizina (L-Lys-8; $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$ – označeni lizin) čime dolazi do *in vivo* metaboličke ugradnje oznake u sve nosintetizirane stanične proteine. Kontrolni fibroblasti (fibroKontrola) i kontrolne Hep G2 stanice (shKontrola) se uzgajaju u istim uvjetima i mediju s lakim lizinom. Sve stanice su uzgajane prema preporukama proizvođača SILANTES kompleta. Stanice za SILAC su uzgajane 8 pasaža u triplikatu u 15 cm posudama.

Proteinski uzorci se pripremaju u prostoru očišćenom od keratina i u puferima s dodatkom koncentrirane otopine inhibitora proteaza (1 tableta *cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA-ALDRICH) u 500 μL MiliQ). Medij je uklonjen i stanice su isprane 2 $\times$ u hladnom PBS-u (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 (pH 7,4)). Sa stanica se pipetom dobro uklonio ostatak PBS-a i posude su se odložile na led. Stanice su skupljene s podloge i grubo razbijene struganjem pomoću *TPP Cell Scraper* s fleksibilnom glavom (engl. *rubber policeman*) u 2 mL RIPA-M pufera (0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% Na deoksikolat, 10 mM NaF, 5 mM Na ortovanadat, 1% koncentrirana otopina inhibitora proteaza). Stanice su se fino razbijale na hladnom koristeći ohlađeni stakleni homogenizator *Dounce tissue grinder set* (SIGMA-ALDRICH) s uskim tučkom (engl. *Tight Pestle B*) s 10 poteza. Uzorak se centrifugirao 15 min na 20 000 $\times$ g i +4°C, te se supernatant prebacio u nove tubice i čuvao na ledu. Talog se resuspendirao u 200 μL UREA-T pufera (0,05 M Tris-HCl (pH 8,1), 0,075 M NaCl, 8 M urea, 10 mM NaF, 5 mM Na ortovanadat, 1% koncentrirana otopina inhibitora proteaza) sonikacijom na ledu s ultrasoničnim homogenizatorom *Misonix XL2000 Microson* (postavka 5,5) u 5 ciklusa koji su se sastojali od 5 sek sonikacije i pauze od 15 sek. Uzorak se zatim centrifugirao 15 min na 20 000 $\times$ g i +4°C, te se supernatant spajao s odgovarajućim supernatantom iz prethodnog koraka. Pripremljeni proteinski uzorci shAHCY i fibroPacijent su se miješali s kontrolama shKontrola i fibroKontrola u omjeru 1:1, te pohranjivali na -80°C do analize. Uzorci se nakon razgradnje s LysC analiziraju u triplikatu na *Orbitrap*

Velos Pro (Thermo Scientific), a podaci su analizirani pomoću *IPA programa* (QIAGEN) kao što je opisano u poglavlju 3.6..



Slika 11. Shematski prikaz SILAC metode spregnute s LC-MS/MS. **1)** ispitivane stanice se uzgajaju u **a)** „teškom” mediju (teški oblik lizina), dok se kontrolne stanice uzgajaju u **b)** „lakom” mediju (obični lizin) **2)** uzorci se miješaju u omjeru 1:1 **3)** proteini se izoliraju i kvantificiraju **4)** peptidi se analiziraju pomoću spregnutog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije **5)** komparativna analiza dobivenih podataka. Prepravljeno iz Mourelatos (2008).

3.2.6. Stanična biologija i mikroskopija

3.2.6.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanice se uzgajaju u plastičnim bocama ili pločama u kompletiranom DMEM mediju u *Heracell™ VIOS 160i* (Thermo Fisher Scientific) inkubatoru na 37°C, u atmosferi zasićenoj vodenom parom uz prisutstvo 5% ugljikovog (IV) oksida (CO₂). Stanice su nasađivane za umnožavanje i pokuse kao što je navedeno u Tablici 12 prema preporukama iz *“Useful Numbers for Cell Culture”* (Thermo Fisher Scientific).

Stanice se uvode u kulturu nasađivanjem iz pohrane u tekućem dušiku brzim odleđivanjem u 10 mL toplog medija na 37°C, talože centrifugiranjem 5 min pri 300 × g, resuspendiraju u svježem mediju i nasađuju u plastičnu bocu T25. Nakon 24 h u inkubatoru stanice su zaljepljene za podlogu boce i oporavljene od odleđivanja.

Mjera rasta stanica je konfluentnost tj. postotak površine koju zauzimaju stanice u odnosu na ukupnu površinu posude. Kada je konfluentnost viša od 95% dio stanica se prebacuje u novu posudu sa svježim medijem što se naziva pasažiranje. Prilikom presađivanja stanica, stari medij se odlije te se stanice ispiru s PBS-om (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)). Dodaje se komercijalna otopina tripsina (2,5 g tripsina iz svinje i 0,2 g EDTA na 500 mL) te se pričekava dok se stanice ne odlijepe od podloge. Djelovanje tripsina se inaktivira dodavanjem kompletiranog medija i stanice se broje na *Z2 Particle Counter* (BECKMAN COULTER). Odgovarajući volumen stanica u kojem se nalazi potreban ukupan broj stanica za daljnje nasađivanje se odvađa, stanice se centrifugiraju, resuspendiraju u svježem mediju i nasađuju u nove boce, posude ili ploče.

Prethodno nasađivanju stanica koje će biti korištene kao preparati za mikroskopiju, u jažice ploče formata 24 se stavljaju pokrovna stakalca (BIOGNOST; VitroGnost). Stakalca se steriliziraju u 70% EtOH minimalano 30 min, te se zatim u laminaru pomoću pincete prebacuju u jažice. Stakalca u jažicama se ispiru 2 × s PBS-om te se nakon toga na njih nasađuju stanice prema Tablici 12.

Za potrebe dugotrajnijeg čuvanja stanica priprema se 1 – 2 milijuna stanica u 1 mL medija za smrzavanje, prebacuje u tubice za smrzavanje i pohranjuje na -80°C u *Nalgene® Mr. Frosty™* posudu za smrzavanje. Nakon 24 h tubice se prebacuju u tekući dušik.

Tablica 12. Formati uzgoja stanica za umnožavanje i pokuse prema preporukama iz „Useful Numbers for Cell Culture” (Thermo Fisher Scientific).

Format boce s filter čepom	Nasađivanje % konfluentnosti	Primjena
T25	20	Uzgoj besmrtnih linija
	50	Uzgoj fibroblasta
T75	20	Uzgoj besmrtnih linija
	50	Uzgoj fibroblasta za SILAC
Format petrijeve posude ili ploče	Nasađivanje % konfluentnosti	Primjena
10 cm	75	Transfekcija Hep G2
15 cm	50	Uzgoj fibroblasta za SILAC
6 jažica	75	Transfekcija za stabilne klonove
24 jažice	75	Transfekcija za mikroskopiju i BiFC
96 jažica	40	Uzgoj za testiranje antibiotika i testove proliferacije
96 jažica	75	Transfekcija HEK 293T za BiFC skeniranje

3.2.6.2. Prolazna i stabilna transfekcija stanica

Stanice za transfekciju su pripremljene i nasađivane kao što je opisano u poglavlju 3.5.1.. Koristio se komercijalni reagens *ViaFect Transfection Reagent* (Promega) prema preporuci proizvođača u omjerima DNA:reagens 2:1 i komercijalni medij za transfekciju *Opti-MEM™ Gibco™* (Thermo Fisher Scientific; Gibco). Klasični protokol transfekcije se koristio za utišavanje nativnog AHCY u Hep G2 stanicama shMISSION klonovima. Povratni protokol (engl. *reverse transfection*) transfekcije se koristio za stabilnu transfekciju pEGFP_AHCY vektora u HEK 293 stanicama i za prolaznu transfekciju BiFC vektora u HEK 293T stanicama.

Prolazno transfecirane stanice su analizirane nakon 24 h. Za pripremu stabilno transfeciranih stanica, 48 h nakon transfekcije stanice su prebačene u veću posudu u svježi medij suplementiran genetinom (pEGFP_AHCY) ili puromicinom (shMISSION) čime stanice koje ne ugrade vektor u genomsku DNA ugibaju. Korištena je minimalna koncentracija antibiotika (Tablica 4) pri kojoj ugibaju netranfecirane stanice, a ista se određuje se MTT testom prema krivulji preživljenja (engl. *kill curve*) (poglavlje 3.5.3.). Plutajuće uginule stanice se miču po potrebi zamjenom sa svježim medijem s antibiotikom. Selekcija traje otprilike dva tjedna u genetinu, a u puromicinu tjedan dana.

3.2.6.3. Testovi proliferacije

MTT test citotoksičnosti kojim se mjeri metabolička aktivnost stanica se koristio da bi se odredila optimalna koncentracija antibiotika za selekciju stanica u kulturi. Stanice su nasađene u ploče formata 96 te je nakon 24 h stari medij zamjenjen sa svježim medijem uz dodatak antibiotika (Tablica 4). Za puromicin su testirane koncentracije od 0,2 do 2 µg/mL u razmacima od 0,1, dok je za geneticin testirano 10 serijskih razrjeđenja $\frac{1}{2}$ počevši od maksimalne koncentracije antibiotika 2 mg/mL. Stanice su uzgajane dok u najvećim koncentracijama nije primjećena potpuna smrt stanica u jažici svjetlosnim mikroskopom. U medij je dodano 20 µL koncentrirane otopine MTT (5 mg/mL 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolijum Bromid u DMSO), te su stanice vraćene u inkubator na 1 h. Medij je uklonjen, stanice su isprane s PBS-om (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)) i dodano je 100 µL DMSO po jažici. Ploče su prekrivene folijom, a kristali formazana otopljeni treskanjem ploča 10 min na vorteks tresilici (postavka 3). Apsorpcija je mjerena s *Multiskan EX* (Thermo Scientific) na 570 nm.

Brzina proliferacije stanica je određena mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica MTT testom citotoksičnosti i Neutralno crveno testom (engl. *Neutral red assay*) 48 h nakon nasađivanja jednakog broja stanica u ploče formata 96. MTT test je napravljen na isti način kao što je opisano iznad. Za neutralno crveno test je dan prije pokusa pripremljen neutralno red medij otapanjem koncentrirane otopine neutralno red (4 mg/mL neutral crvena u PBS-u) u nekompletiranom DMEM mediju (konačno 40 µg/mL). Neutralno red medij je inkubiran u vodenoj kupelji na 37°C preko noći. Stari medij je maknut sa stanica te je dodano 100 µL neutralno red medija po jažici, a ploča je vraćena u inkubator na 4 h. Medij je uklonjen, stanice su oprane s PBS-om, te je dodano 150 µL otopine za odbojavanje (50% EtOH, 1% ledena octena kiselina) po jažici. Ploče su prekrivene folijom, a neutralno crvena u stanicama je otopljena treskanjem ploča 10 min na vorteks tresilici (postavka 3). Apsorpcija je mjerena s *Multiskan EX* (Thermo Scientific) na 540 nm.

3.2.6.4. Migracijski test

Prije nasađivanja stanica kojima se određivala migracija pripremljena je ploča formata 24 u čije je jažice (tzv. donja komora) stavljeno po 500 µL kompletiranog DMEM medija i insert (engl. *transwell insert*; CORNING, BD Falcon) za testiranje migracije s PET membranom dijametra pora 8,0 µm (tzv. gornja komora). Ploča je stavljena u inkubator dok se ne pripremi 10 000 stanica na način da se 3 puta operu u DMEM mediju bez seruma s koracima centrifugiranja od 5 min na 300 × g između ispiranja. Stanice se resuspendiraju u 500 µL DMEM bez seruma, nasađuju u gornju komoru i stavljaju u inkubator na 24 h kako bi migrirale kroz pore inserta iz gornje komore tj. medija bez seruma u donju komoru tj. kompletirani medij sa serumom. Nakon 24 h medij se makne iz obje komore te se dodaje otopina za fiksaciju (4% paraformaldehid, u PBS-u) i inkubira 10 min. Nemigrirane stanice koje su ostale na membrani na strani gornje komore se miču pomoću vatenih štapića. Migrirane stanice se permeabiliziraju uranjanjem inserta u hladni 100% MetOH 20 min na sobnoj temperaturi, a zatim bojaju uranjanjem inserta u otopinu za bojanje s kristal violet bojom (0,1% kristal violet, 25% MetOH). Inserti se odbojavaju uranjanjem 3 × u PBS i zatim u MiliQ vodu, te su spremni za mikroskopiranje.

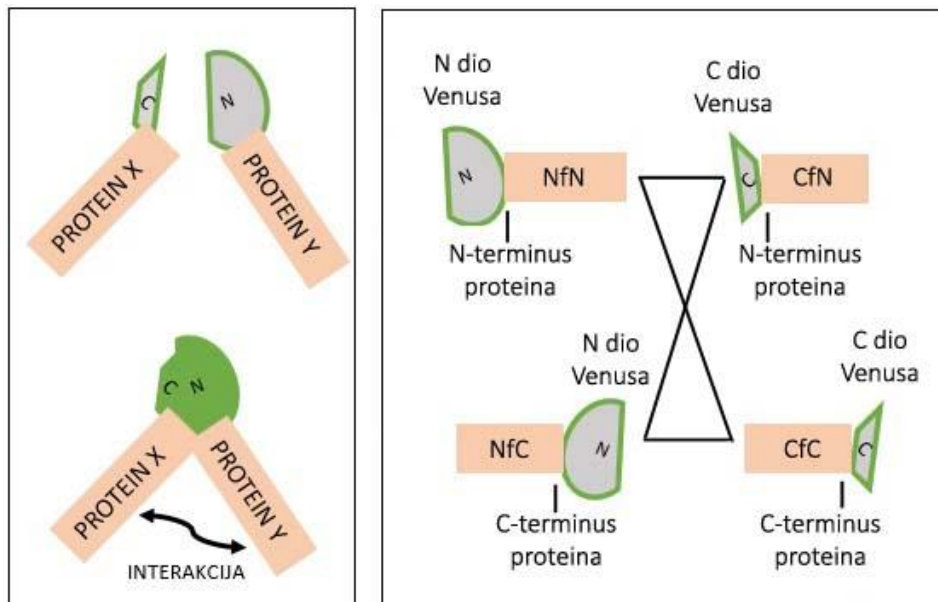
3.2.6.5. Komplementacija dviju molekula fluorescencijom (BiFC)

Ishodišni plazmid (Slika 7) iz hORFeome banke gena u kojem se nalazi AHCY (hORFeome identifikator: ID 5896) je rekombiniran LR reakcijom u sva 4 odredišna BiFC vektora (Slika 8). Iz ovih vektora su pomoću klasičnih metoda kloniranja pripremljeni nAHCY konstrukti korišteni kao negativna kontrola kao što je opisano u Lepur i sur. (2016). Navedeni vektori su se koristili i kao kalupi za unošenje točkaste Y328D mutacije ciljanom mutagenezom.

Za detaljne analize, HEK 293T stanice se nasađuju na stakalca za mikroskopiju i reverzno transfeciraju odgovarajućim kombinacijama BiFC plazmida (Slika 8). 24 h nakon transfekcije se pripremaju preparati za mikroskopiranje, a fluorescencija se analizira na konfokalnom mikroskopu.

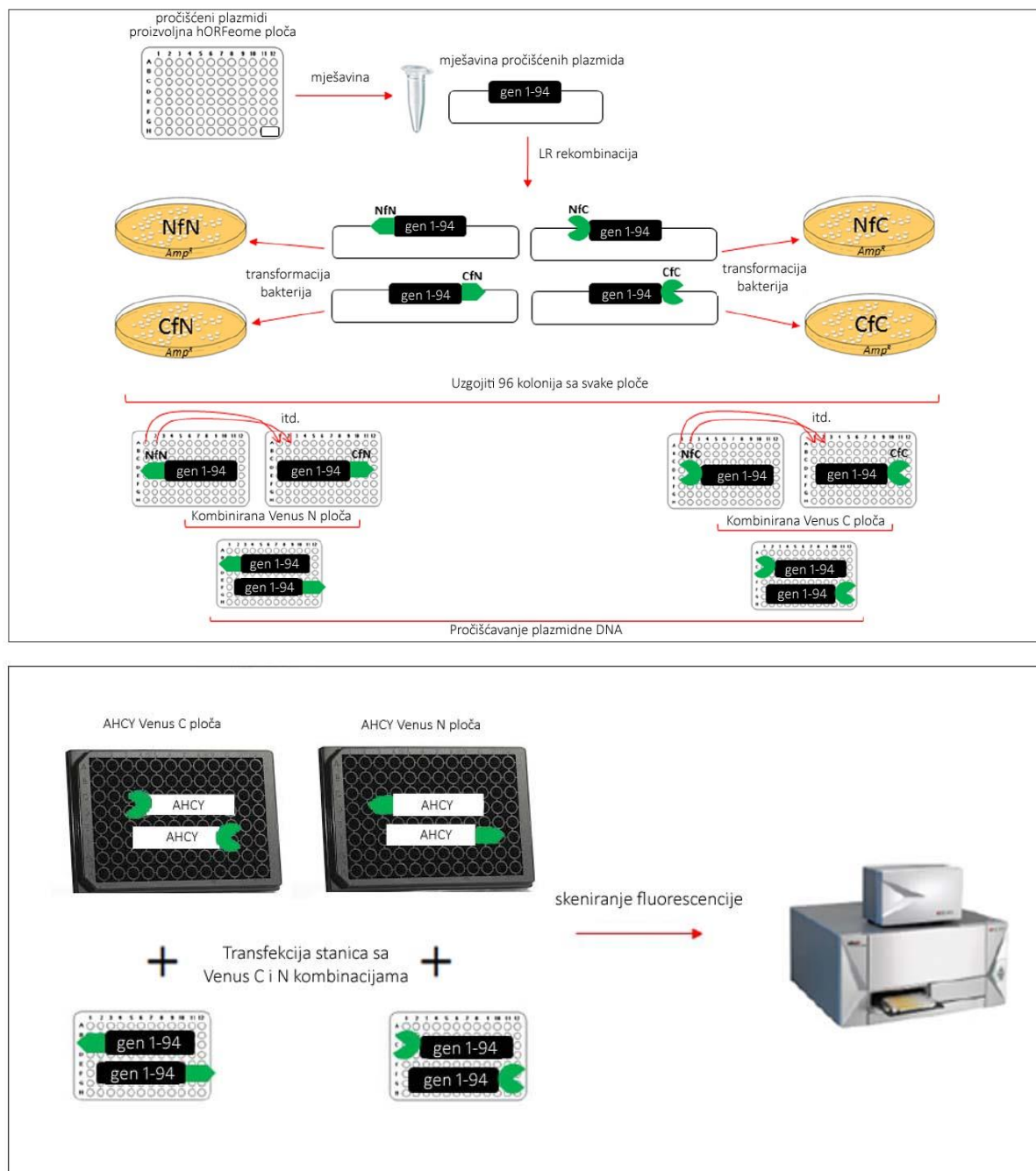
Visokoprotlačna skeniranja su se radila kao što je shematski prikazano na Slici 13. Ishodišni plazmidi iz banke gena se miješaju (engl. *pool*) te se koriste za četiri multipleksne reakcije LR rekombinacije što omogućuje prebacivanje svih ORF-ova u mješavini u pojedinačne BiFC odredišne vektore: svaki ORF označen je –N ili –C

dijelom Venusa u sve četiri topologije. Reakcije rekombinacije se unose elektroporacijom u *One Shot® TOP10*, a bakterijske suspenzije se nasađuju na LB ploče i selektiraju ampicilinom (Tablica 4). Bakterijske kolonije tj. pojedinačni klonovi se prenose u tekući LB medij i uzgajaju u četiri ploče formata 96. Nakon uzgoja, u istoj orijentaciji se kombiniraju po dvije ploče u kojima su ORF-ovi fuzionirani s istovjetnim dijelom Venusa: CfN + NfN ploča i CfC + NfC ploča. Plazmidi se pročišćavaju s „*in house 96 well plate miniprep*“ metodom (poglavlje 3.2.2.5.) i unose u HEK 293T stanice metodom transfekcije skupa s BiFC plazmidom u kojem se nalazi AHCY (odgovarajuće kombinacije na Slici 12). Pozitivna kontrola je samoasocijacija AHCY, negativna kontrola nAHCY, a obje se transfeciraju paralelno tijekom svakog skeniranja. U opisanom pristupu AHCY se koristi kao mamac da bi se „ulovili“ potencijalni proteini interaktori, što se vidi u obliku fluorescencije uzrokovane komplementacijom Venusa. 24 h nakon transfekcije stanice se fiksiraju kao kad se uzgajaju na stakalcima, te skeniraju na *Tecan (Infinite M200)* koristeći postavke: valna duljina ekscitacije/emisije 500 nm / 530 nm, širina frekvencijskog područja (engl. *bandwidth*) ekscitacije/emisije 9 nm / 20 nm, postavka dobiti fluorescencije (engl. *gain*) 150, broj pulseva (engl. *flash*) ekscitacije 5.



Slika 12. Lijevo: Pojednostavljena shema komplementacije N- i -C dijela proteina Venus nakon interakcije proteina X i Y s kojima su fuzionirani. **Desno:** Shematski prikaz načina označavanja Venus konstrukata u sve 4 topologije. Prvo slovo označava dio Venusa, slovo „f“ označava riječ fuzioniran, treće slovo označava na kojem kraju proteina se nalazi Venus: NfN = N dio Venusa fuzioniran na N-terminus

proteina; NfC = N dio Venusa fuzioniran na C-terminus proteina; CfC = C dio Venusa fuzioniran na C-terminus proteina; CfN = C dio Venusa fuzioniran na N-terminus proteina. Crne crte prikazuju sve moguće kombinacije (ukupno 4) u kojima je omogućena komplementacija Venusa, a koje su se koristile za testiranje protein-protein interakcija.



Slika 13. Shematski prikaz skeniranja potencijalnih interaktora AHCY iz hORFeome banke gena koristeći AHCY kao mamac. Oznake NfN, NfC, CfN i CfC su opisane na Slici 12.

3.2.6.6. Priprema uzoraka za mikroskopiju

Sa stanica na pokrovnim stakalcima (BIOGNOST; Vitrognost) se makne medij, isperu se PBS-om (engl. *Phosphate Buffer Saline* sastava 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)) te se inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi u mraku u 200 µL otopine za fiksaciju (2% paraformaldehid u PBS-u). Nakon fiksacije stanice se ispiru 2 × u PBS-u. Pokrovna stakalca s fiksiranim i ispranim stanicama se pomoću igle i pincete vade iz jažice ploče za uzgoj stanica formata 24, ispiru umakanjem u MiliQ vodu i prenose na predmetno stakalce (BIOGNOST; Vitrognost) na kojem se prethodno pripremi kapljica medija za uklapanje *Fluoroshield™ with DAPI* (SIGMA-ALDRICH) tako da se stanice u konačnom preparatu nalaze u mediju između dva sloja stakla. Preparati se suše preko noći u mraku na sobnoj temperaturi, a zatim pohranjuju na +4°C u mraku do analize na mikroskopu.

3.2.6.7. Mikroskopija

Svjetlosni mikroskop *Olympus CKX41* je korišten prilikom rada sa stanicama za provjeru stanja i konfluentnosti. Isti mikroskop s pripadajućim fotoaparatom i adapterom se koristio za fotografiranje PET membrana inserata nakon testiranja migracije stanica na ukupnom povećanju od 40 ×.

Fluorescencijske mikroskopske slike širokog polja su napravljene u jedinici za mikroskopiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković na *Leica SP8 X FLIM* konfokalnom mikroskopu koristeći objektiv *HC PL APO CS2 63 × /1.40 OIL*.

3.2.7. Programi i metode za obradu i statističku analizu podataka i slika

Mape plazmidnih vektora su konstruirane korištenjem programskog alata *SnapGene 3.0.3*, a isti program je korišten za analize slijedova DNA nakon sekvenciranja po Sangeru.

Denzitometrija na slikama eksponiranih membrana u 16 bit formatu je analizirana u *ImageJ* pomoću *Measure* opcije. Ukupni intenzitet linije ispitivanog proteina se normalizirao s intenzitetom linije kontrolnog proteina (engl. *loading control*) iz istog proteinskog uzorka ili s obojenjem ukupnih proteina u uzorku (Ponceau S), a zatim se radila relativna kvantifikacija ispitivanog proteina među različitim uzorcima.

Analiza RT-qPCR se radila u Microsoft Excell programu relativnom kvantifikacijom ekspresije određenog gena tj. omjerom ekspresije u ispitivanom uzorku u odnosu na kontrolu. Prije usporedbe, vrijednosti zasebnih uzoraka su se normalizirale ekspresijom s kontrolnog gena (engl. *housekeeping gene*) pri čemu se koristila matematička metoda standardne krivulje (engl. *standard curve*) i C_t vrijednost u formuli: $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Fluorescencija na mikroskopskim slikama u 16 bit formatu je analizirana u *ImageJ* programu s "*Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm Tool*" alatom za mjerenje omjera intenziteta u jezgri i citoplazmi. Istim alatom je izračunat icn faktor kojim se predstavlja raspodjela proteina u jezgri i citoplazmi, a računa se kao omjer dva intenziteta sljedećom formulom: $icn = \% \text{ jezgra} / \% \text{ citoplazma}$. Vrijednost icn faktora iznosi između 0 i 1, a što je viši znači da se više proteina nalazi u jezgri. Sva mjerenja uključuju automatsku korekciju pozadinske fluorescencije. *ImageJ* program se koristio i za analizu razine fluorescencije proteina Venus u stanicama prolazno transfeciranim BiFC konstruktima. Koristio se ROI (engl. *region of interest*) iste veličine kojim se mjerila razina fluorescencije u pojedinačnim stanicama na slikama u 16 bit formatu.

Aritmetička sredina (engl. *mean*) i standardna devijacija su računati u Microsoft Excell programu pomoću formula AVERAGE i STDEV. Za određivanje statističke značajnosti koristio se nezavisni dvostrani (dvosmjerni) T-test u Microsoft Excell (formula TTEST). Razina značajnosti je postavljena na 5%, odnosno granica p-vrijednosti na 0,05 prema čemu su se sve razlike $<0,05$ smatrale statistički značajnima.

BaseSpace Sequence Hub (Illumina) sučelje je korišteno za namještanje postavki izrade biblioteka, sekvenciranja, automatsko prenošenje podataka, demultipleksiranje i analizu u *RNAexpress* aplikaciji.

Više od 10 000 značajno više ili manje eksprimiranih gena (sekvenciranje transkriptoma) ili proteina (komparativna proteomika) u odnosu na kontrolu se unosi u *Ingenuity Pathway Analysis* program (IPA, QIAGEN). Grupe podataka s identifikatorima (engl. *gene/protein identifiers*) unešeni su zajedno s odgovarajućim logaritamskim vrijednostima omjera promjene (engl. *fold change*) pri čemu se rabi logaritam po bazi 2 (engl. *log2 fold change*). Podaci su analizirani usporedbom s informacijama sadržanim u bazi podataka „*Ingenuity Knowledge Base*“, repozitoriju bioloških međudjelovanja i funkcionalnih obilježja. Funkcionalna analiza je provedena

pomoću opcije *Core Analysis* kojom se promijenjeni geni povezuju s 85 funkcionalnih kategorija iz baze podataka. P-vrijednost se računa na temelju broja unesenih gena povezanih s određenom funkcionalnom kategorijom. *IPA network generation algorithm* omogućuje izradu funkcionalnih mreža u kojima su prikazane međusobne veze unesenih gena prema *Global Molecular Network* predlošku. Mreže se povezuju s različitim funkcionalnim kategorijama i rangiraju prema p-vrijednosti koja označava vjerojatnost da se geni iz stvorene mreže nađu u nasumično odabranom skupu gena (koristi se engl. *right-tailed Fisher exact test*).

4. REZULTATI

19 slika, 2 tablice

4. REZULTATI

4.1. Analiza biološkog materijala pacijenta s nedostatkom funkcije AHCY (Strauss i sur. 2015)

4.1.1. Potvrda mutacije u genu *ahcy* kod pacijenta s metaboličkim poremećajem

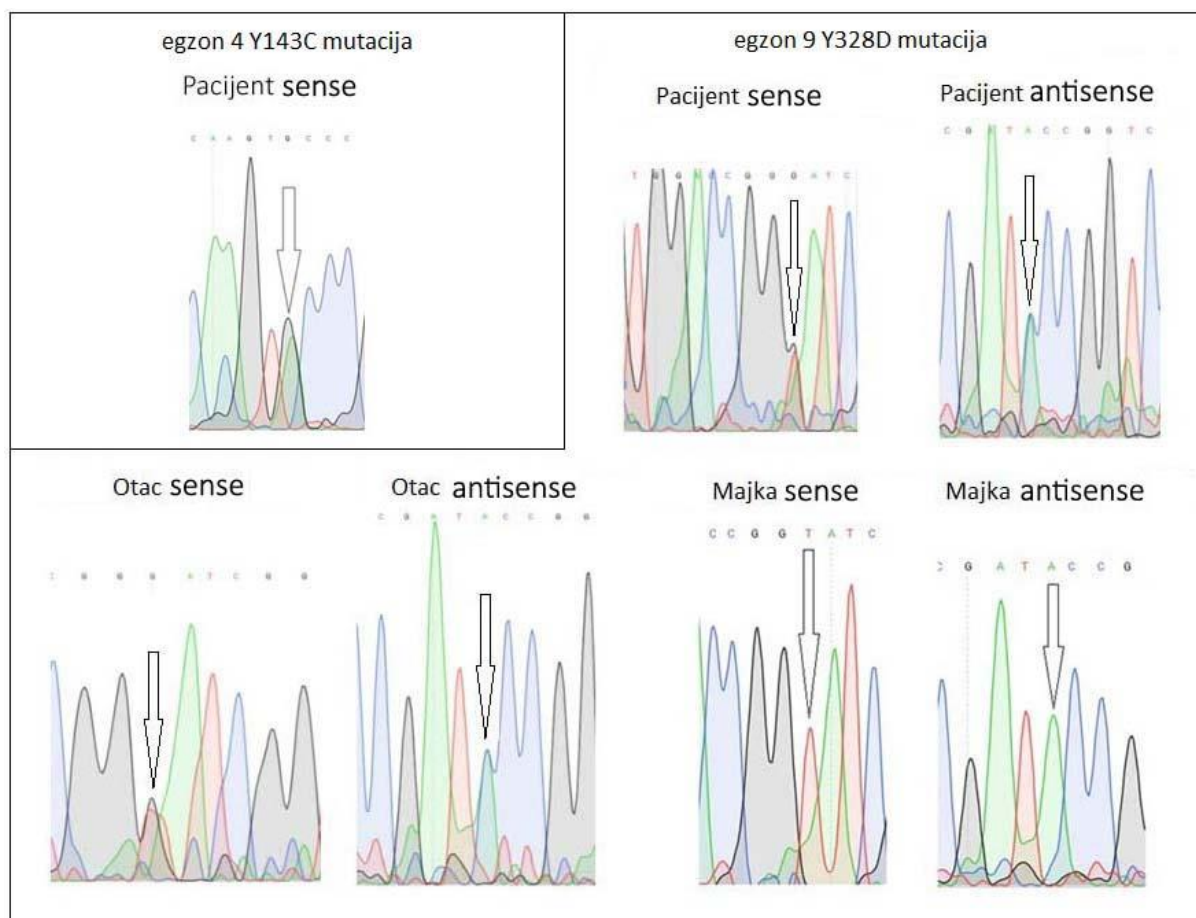
Zbog biokemijskih promjena i simptoma uočenih u pacijenta broj 8 (Tablica 3) i sumnje na metabolički poremećaj uzrokovan nedostatkom proteina AHCY, genomske DNA pacijenta i oba roditelja podvrgnute su analizi mutacija u genu *ahcy*. Uzorci DNA dobiveni su ljubaznošću Dr. S. Harvey Mudd (National Institute of Mental Health, Laboratory of Molecular Biology, Bethesda, pokojni) i Kevin A. Strauss, MD (Clinic for Special Children, Strasburg, Pennsylvania), a klinički podaci opisani u Strauss i sur. (2015). Pomoću PCR-a su umnoženi egzoni 4 i 9 gena *ahcy* s odgovarajućim oligonukleotidnim početnicama (Slika 10; Tablica 5). PCR produkti su analizirani elektroforezom u gelu agaroze kao što je prikazano na Slici 14. Dobiveni su DNA fragmenti odgovarajuće veličine od 282 pb za egzon 4 i 360 pb za egzon 9.



Slika 14. Analiza PCR produkata umnoženih egzona 4 i 9 gena *ahcy*. Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom na 2% gelu agaroze. Oznake: (Majka/Otac/Pacijent) PCR reakcija s genomskom DNA majke/oca/pacijenta; (X) negativna kontrola bez DNA kalupa u reakciji; (M) *Quick-Load 2-Log DNA Ladder*, veličina DNA fragmenata standarda su naznačene lijevo i desno od panela.

Kako bismo ispitali prisutnost mutacija u genu *ahcy*, DNA fragmenti umnoženi PCR-om su nakon elektroforeze izrezani iz gela i pročišćeni, a slijed nukleotida je određen standardnim sekvenciranjem prema Sanger-u koristeći odgovarajuće početnice (Tablica 5) i u „sense“ i „antisense“ smjeru. Očekivano, potvrđeno je da pacijent boluje od oboljenja nedostatka AHCY jer je od majke naslijedio mutaciju c.428A>G (p.Tyr143Cys, Y143C) u egzonu 4 koja je opisana kod drugih bolesnika te

od oca dosada neopisanu mutaciju c.982T>G (p.Tyr328Asp, Y238D) u egzonu 9. Kromatogrami sekvenciranja i postojanje mutacija prikazani su na Slici 15.



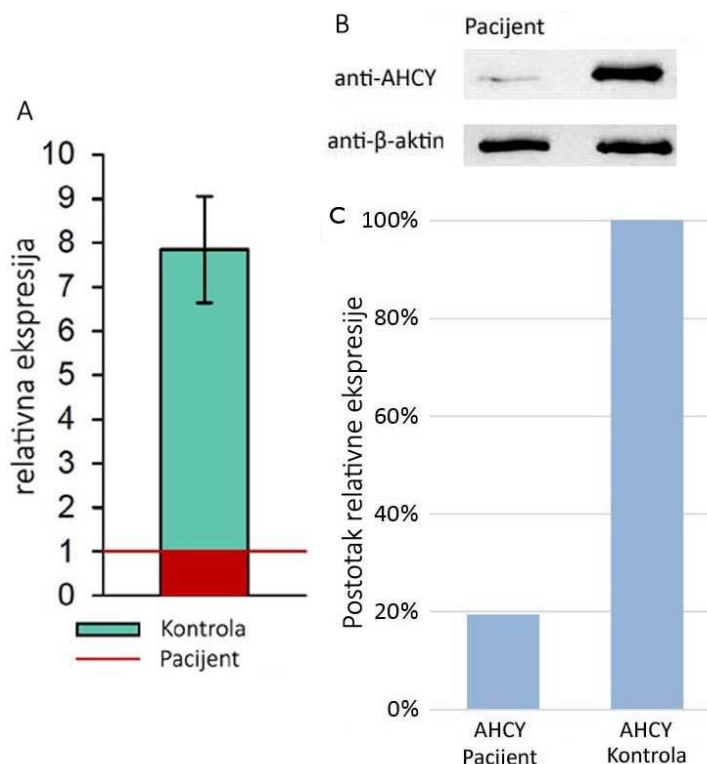
Slika 15. Potvrda nasljeđenih točkastih mutacija gena *ahcy* u pacijentu s nedostatkom AHCY. Slika prikazuje dio kromatograma sekvenciranja PCR produkata koji se odnosi na mutaciju. Mutacija i uzorak DNA ispitanika su označeni iznad kromatograma, a „sense“ ili „antisense“ označavaju smjer sekvenciranja. Strelica označava analiziranu bazu na kromatogramu tj. promjene nasljeđene od majke i oca koje se vide u obliku preklopljenih pikova. Korištene su početnice popisane u Tablici 5: ahhg4 za egzon 4, te INAHH6 i ahhg9 za egzon 9.

4.1.2. Analiza razine nativnog AHCY RT-qPCR-om i Western blotom

Kako bi smo ispitali dovodi li otkrivena mutacija u genu *ahcy* do nedostatka AHCY, analizirali smo utjecaj mutacija na ukupnu količinu mRNA kod mutiranog gena te ukupnu razinu mutiranog proteina AHCY u fibroblastima pacijenta. Ukratko, za određivanje razine AHCY mRNA iz fibroblasta je izolirana ukupna stanična RNA, prepisana u cDNA i kvantificirana pomoću kvantitativnog PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Smanjenje mutantne AHCY mRNA u fibroblastima pacijenta u odnosu

na AHCY mRNA divljeg tipa u kontrolnim fibroblastima se vidi na Slici 16 na grafičkom prikazu rezultata nakon relativne kvantifikacije. Y143C i Y328D mutacije ne uvode preuranjeni STOP kodon niti dokidaju postojeći, stoga su isključeni stanični mehanizmi odgovorni za uklanjanje takve vrste pogrešnih transkripata. Pretpostavljena je aktivacija manje istraženog mehanizma degradacije tzv. engl. *No-go decay* (NGD) koji je posljedica zastajanja ribosoma tijekom translacije zbog promjena u sekundarnoj strukturi transkripta uzrokovanih mutacijom.

Razina nativnog proteina AHCY u staničnom lizatu (ukupni proteini) fibroblasta pacijenta s nedostatkom AHCY i odgovarajućih kontrolnih fibroblasta je provjerena Western blotom. Vidljivo je drastično smanjenje količine nativnog mutantnog proteina AHCY u fibroblastima pacijenta s nedostatkom AHCY ($\approx 80\%$ manje) u odnosu na nativni AHCY divljeg tipa u kontrolnim fibroblastima. Slika eksponirane membrane i graf koji prikazuje rezultate denzitometrije su prikazani na Slici 16. Iako je smanjenje količine mutantnih proteina proporcionalno uočenom smanjenju mutantne mRNA, nije isključeno da se dio translatiranih mutantnih proteina AHCY usmjerava u puteve selektivne razgradnje oštećenih ili krivo smotanih proteina u stanici.

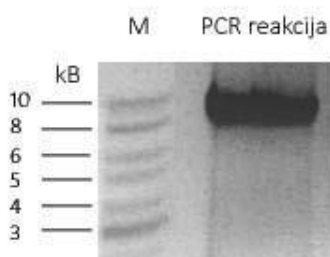


Slika 16. Smanjena razina ekspresije mRNA i proteina gena *ahcy* u fibroblastima pacijenta. **A)** Ukupna RNA izdvojena je iz fibroblasta pacijenta (Pacijent) i kontrolnih fibroblasta (Kontrola) te je razina ekspresije mRNA gena *ahcy* određena pomoću RT-

qPCR u triplikatima. Vrijednosti ekspresije AHCY su normalizirane u odnosu na vrijednosti ekspresije gena *tbp* (engl. *TATA-Box Binding Protein*) (Tablica 5). Standardna devijacija je prikazana vertikalnom linijom na stupcu. **B)** Razina proteina AHCY u ukupnim lizatima fibroblasta pacijenta (Pacijent) i kontrolnih fibroblasta (Kontrola) je analizirana Western blotom pomoću antitijela anti-AHCY i normalizirana pomoću razine β -aktina detektiranog anti- β -aktin antitijelom. **C)** Grafički prikaz relativne ekspresije AHCY u fibroblastima pacijenta (AHCY Pacijent) u odnosu na kontrolne fibroblaste (AHCY Kontrola) je napravljen prema podacima dobivenima denzitometrijom linija na membrani pod **B)** pomoću ImageJ programa.

4.1.3. Ciljana mutageneza pET32_AHCY vektora

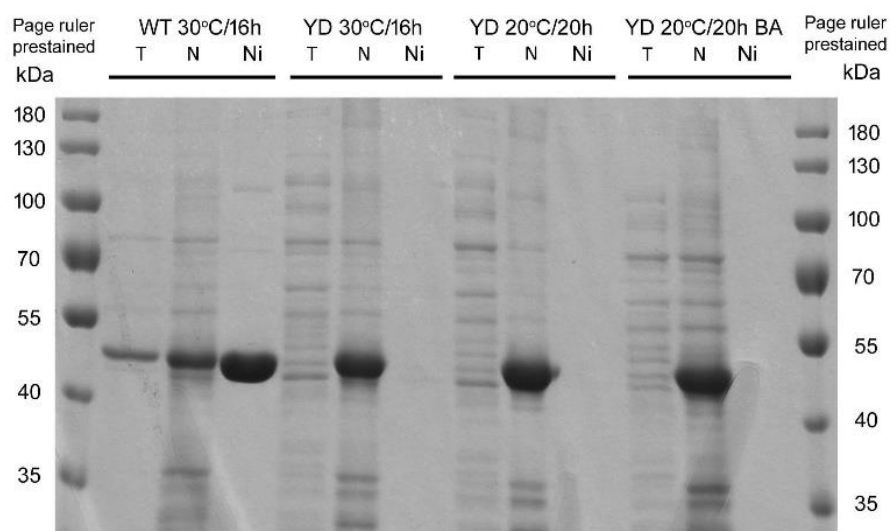
Za mutacije koje su pronađene kod različitih pacijenata, a koje se vezuju uz nedostatak AHCY, uključujući novootkrivenu mutaciju Y328D kod pacijenta broj 8 (Tablica 3) pretpostavlja se da dovode do nestabilnosti i/ili nefunkcionalnosti enzima. Kako bi smo ispitali utjecaj mutacije Y328D na sam protein AHCY u već prethodno pripremljen vektor za ekspresiju u bakterijama koji sadrži divlji tip gena *ahcy* pET32_AHCY (Slika 5) unesena je točkasta mutacija koristeći ciljanu mutagenezu. Ukratko, pomoću PCR reakcije i početnica kojima se unosi mutacija umnožen je cijeli plazmid, a uspješnost reakcije je provjerena pomoću elektroforeze u gelu agaroze kao što je prikazano na Slici 17. Dobiveni PCR produkt odgovarajuće veličine je elektroporiran u bakterije soja *XL1-Blue* te je probran i pročišćen klon pET32_AHCY_YD koji sadrži željenu mutaciju.



Slika 17. Analiza produkata ciljane mutageneze pET32_AHCY vektora. Elektroforeza u 1% gelu agaroze. Za ciljanu mutagenezu su korištene početnice Y328D_Fw i Y328D_Rev (Tablica 5). Oznake: (M) *Quick-Load 2-Log DNA Ladder*; veličina DNA fragmenata standarda naznačene su lijevo od panela; (PCR reakcija) 5 μ L reakcijske smjese.

4.1.4. Analiza ekspresije rekombinantnih proteina SDS-PAGE metodom

Mutacije otkrivene u genu *ahcy* su dosada funkcionalno istražene, stoga smo u daljnjem radu detaljno izučavali funkcionalne karakteristike samo novootkrivene mutacije Y328D. Stoga, u svrhu ekspresije i pročišćavanja divljeg tipa i mutiranog proteina, vektori pET32_AHCY (divlji tip) i pET32_AHCY_YD (mutacija Y328D) su transformirani u *E. coli* soja *BL21(DE3)pLysS*. U bakterijskim kulturama je inducirana ekspresija gena IPTG-om u različitim uvjetima kako bi se utvrdili optimalni uvjeti ekspresije mutante. Izolirane ukupne topive i netopive proteinske frakcije su analizirane elektroforezom u denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) usporedno s proteinima koji su pročišćeni iz topive frakcije na Ni²⁺-agarozi. Za razliku od divljeg tipa (WT), mutanta Y328D (YD) se ne eksprimira u topljivoj frakciji kod svih testiranih uvjeta ekspresije (Slika 18), tj. uočili smo da se glavnina eksprimiranog mutantnog proteina nalazi u netopivoj frakciji zbog čega vjerojatno nije bilo moguće pročistiti dobiveni protein na Ni²⁺-agarozi. Iako nismo uspjeli pronaći odgovarajuće uvjete za pročišćavanje mutiranog proteina, na temelju prijašnjih iskustava u ekspresiji različitih mutanti AHCY proteina (npr. G71S mutanta; Honzík i sur. 2012) odustali smo od daljnjih napora poboljšanja uvjeta ekspresije. Osim toga, moguće je da je za pravilnu ekspresiju ovog proteina nužna proteinska mašinerija eukariota te smo stoga nastavili istraživanje u ljudskim stanicama (opisno ispod).



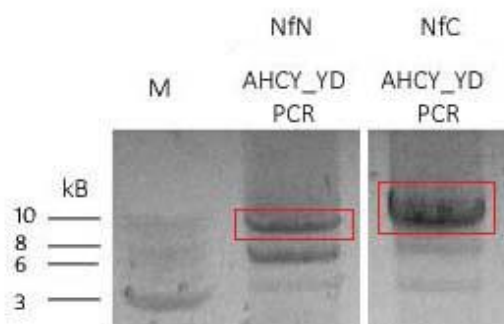
Slika 18. Analiza ekspresije rekombinantnih proteina AHCY i AHCY_YD. Proteinski izolati iz IPTG induciranih *E. coli* su analizirani pomoću SDS-PAGE metode. Korišteni su različiti uvjeti ekspresije označeni na slici na sljedeći način: (WT 30°C/16

h) divlji tip 16 h indukcije na 30°C; (YD 30°C/16 h) YD mutanta 16 h indukcije na 30°C; (YD 20°C/20 h) YD mutanta 20 h indukcije na 20°C; (YD 20°C/20 h BA) YD mutanta 20h indukcije uz benzilni alkohol na 20°C; (T) topiva frakcija, (N) netopiva frakcija, (Ni) pročišćeno na Ni²⁺ agaroz; (*Page ruler prestained* kDa) marker s veličinama linija u kDa naznačenih lijevo i desno od panela.

4.2. Komplementacija dviju molekula fluorescencijom (BiFC)

4.2.1. Priprema vektora za komplementaciju dviju molekula fluorescencijom

Za analizu molekularne stabilnosti mutantnog AHCY_YD proteina u odnosu na divlji tip AHCY u ljudskim stanicama koristila se metoda komplementacije dviju molekula fluorescencijom (BiFC; detaljno opisano u poglavlju 3.5.5.). Interakcija dvije podjedinice proteina AHCY uzrokuje komplementaciju i fluorescenciju N- i -C dijela Venus proteina koji su fuzionirani na AHCY što je vidljivo u stanicama fluorescentnim konfokalnim mikroskopom. Za tu svrhu je bilo potrebno pripremiti odgovarajuće BiFC vektore (Slika 8). Ukratko, četiri BiFC vektora koji u sebi sadrže divlji tip gena *ahcy* (NfN_AHCY, NfC_AHCY, CfN_AHCY, CfC_AHCY) su korištena kao kalup za unošenje točkaste Y328D mutacije pomoću ciljane mutagenze nakon čega je PCR reakcija provjerena pomoću elektroforeze u gelu agaroze kao što je prikazano na Slici 19 na kojoj se vidi PCR produkt odgovarajuće veličine. PCR smjesa je elektroporirana u bakterije soja *XL1-Blue* te su probrani i pročišćeni odgovarajući mutantni AHCY_YD vektori (NfN_AHCY_YD, NfC_AHCY_YD, CfN_AHCY_YD, CfC_AHCY_YD).



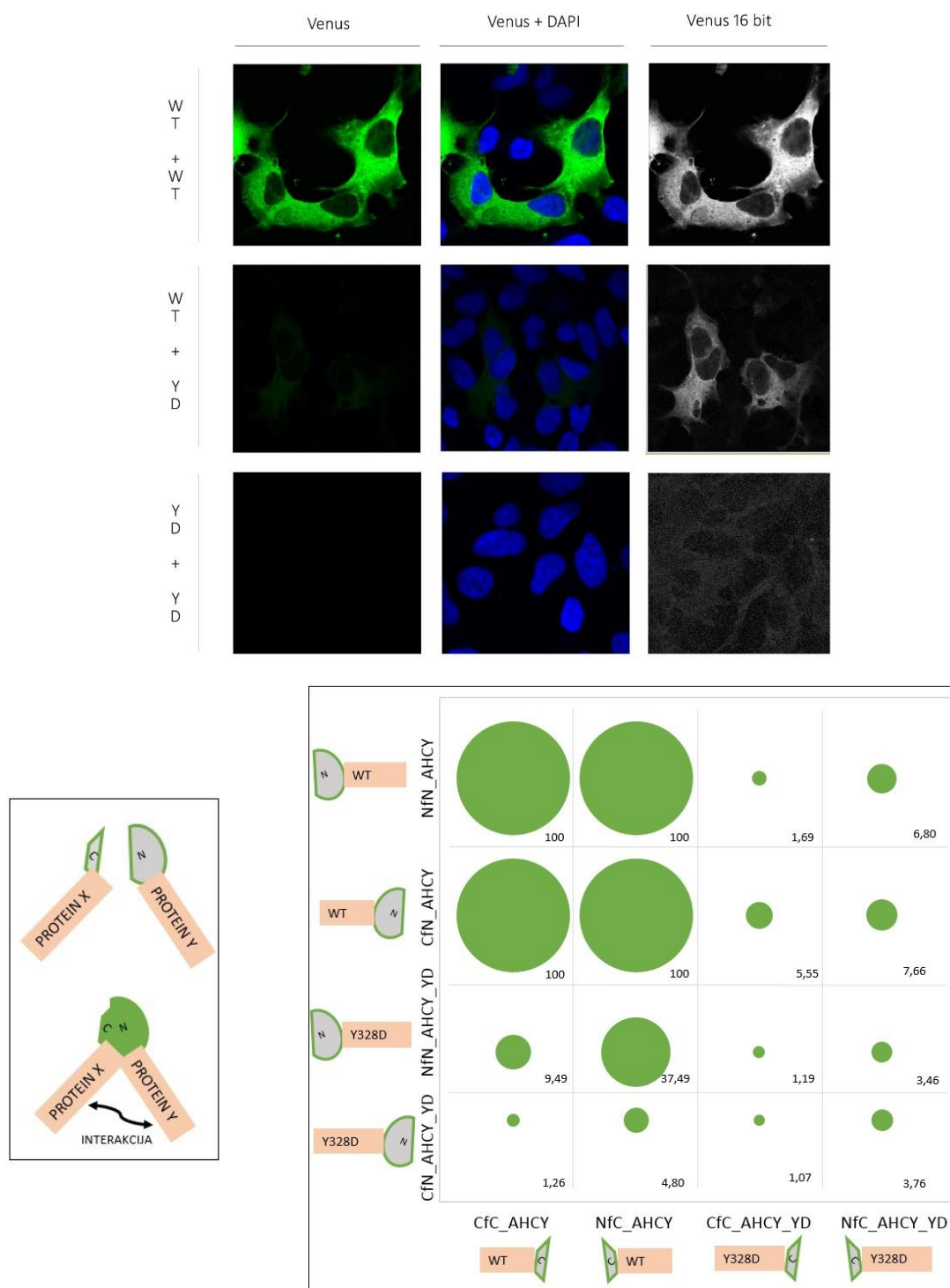
Slika 19. Analiza produkata ciljane mutagenze BiFC vektora elektroforezom u 1% gelu agaroze. Oznake: (M) *Quick-Load 2-Log DNA Ladder*, veličine DNA fragmenata standarda naznačene su lijevo od panela; (NfN) BiFC NfN vektor; (NfC) BiFC NfC

vektor; (AHCY_YD PCR) 5 µL reakcijske smjese. Linearni PCR produkti su označeni crvenim kvadratom na slici.

4.2.2. Analiza molekularne stabilnosti mutante AHCY YD pomoću BiFC metode

Zbog nemogućnosti ekspresije mutiranog proteina Y328D u heterolognom sustavu nije bilo moguće provesti funkcionalne studije ove mutante. Stoga se krenulo u analizu molekularne stabilnosti mutante u ljudskim stanicama metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom (BiFC; detaljno opisano u poglavlju 3.5.5.). Prethodno pripremljeni vektori za BiFC analizu makromolekularne stabilnosti AHCY_YD mutante su transfekcijom unešeni u HEK 293T stanice pri čemu se obraćala pažnja na odgovarajuće kombinacije N- i -C dijela Venusa kako bi se omogućila komplementacija Venus proteina (detaljno opisano u poglavlju 3.5.5. i shematski prikazano na Slici 12). Primjer fluorescencije koja označava interakciju prikazan je na gornjem dijelu Slike 20 koji prikazuje reprezentativne slike s konfokalnog mikroskopa koje su korištene za statističku analizu. Crno bijela verzija slike (16 bit opcija u ImageJ) je dodana zbog nemogućnosti ljudskog oka, ekrana ili printera da se vidi ili prikaže vrlo niska fluorescencija AHCY_YD mutante koju je moguće detektirati konfokalnom mikroskopijom i analizirati isključivo specijaliziranim programom za analizu slike. Statistička analiza se temelji na mjerenju ukupnog intenziteta fluorescencije u jednakim površinama (engl. *region of interest*; ROI) u minimalno 50 stanica za pojedinu kombinaciju, a prikazana je na shemi u donjem dijelu Slike 20. Fluorescencija najslabijih interakcija dvije mutantne Y328D podjedinice AHCY proteina je gotovo istovjetna pozadinskoj fluorescenciji za razliku od jasno vidljive i snažne fluorescencije interakcije dvije AHCY podjedinice divljeg tipa. Homodimerizacija dva AHCY divljeg tipa prema tome predstavlja maksimum interakcije u BiFC sustavu, odnosno kontrolne vrijednosti koje su postavljene na 100% za sve četiri moguće kombinacije. Interakcija Y328D mutantne podjedinice s podjedinicom AHCY divljeg tipa smanjuje sposobnost stvaranja heterodimera u sve četiri kombinacije. Iz rezultata zaključujemo da različiti postotak inaktivacije ovisno o kombinaciji upućuje na utjecaj veličine i položaja fuzije dodane proteinu na sposobnost multimerizacije i još jednom naglašava važnost isprobavanja sve 4 Venus topologije. Nadalje, ovi rezultati jasno pokazuju da Y328D mutacija uzrokuje drastično smanjenje interakcijskog potencijala AHCY jer onemogućava dimerizaciju

AHCY proteina, a time i stvaranje tetramera nužnih za pravilnu enzimsku aktivnost AHCY. Daljnja istraživanja analize ekspresije mutante Y328D i svih dosada poznatih mutanti AHCY opisana su u narednim poglavljima u kojima su se također koristile ljudske stanice sa posttranslacijskim procesima specifičnima za eukariote koji bi mogli djelovati na konačnu stabilnost proteina.



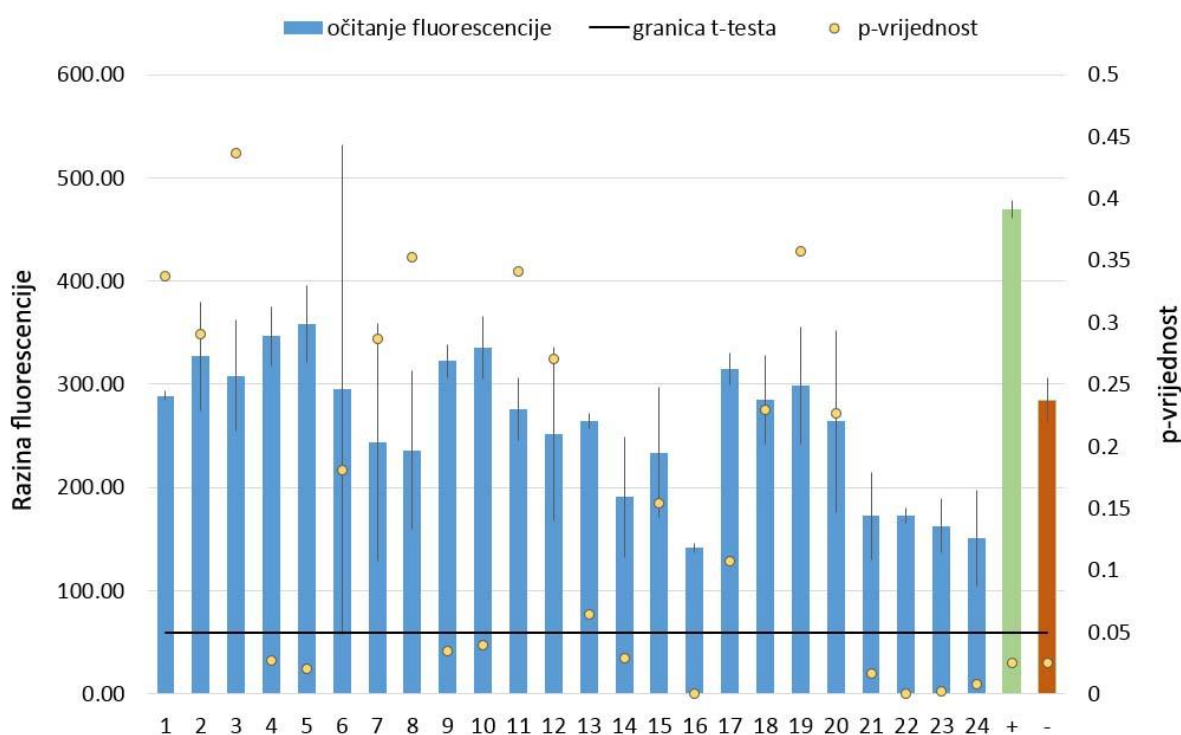
Slika 20. Analiza makromolekularne stabilnosti proteina AHCY. **Iznad:** HEK 293T stanice prolazno transfecirane kombinacijama BiFC vektora u kojima su AHCY

divljeg tipa (WT) i Y328D mutanta (YD) fuzionirani s N- ili -C dijelom Venus proteina. Interakcija AH CY tj. komplementacija Venus proteina je vidljiva u obliku zelene fluorescencije (jezgre obojane plavo s DAPI). Snimljeno s *Leica SP8 X FLIM* konfokalnim mikroskopom (objektiv *HC PL APO CS2 63 × /1.40 OIL*). Crno bijela verzija slika je napravljena 16 bit opcijom u ImageJ programu. **Ispod** Shematski prikaz analize molekularne stabilnosti AH CY proteina pomoću metode komplementacije dviju molekula fluorescencijom. Oznake: (WT) divlji tip; (N) N dio Venus proteina; (C) C dio Venus proteina. Korištena su četiri BiFC vektora u kojima se nalazi AH CY divljeg tipa (NfN_AH CY, NfC_AH CY, CfN_AH CY, CfC_AH CY) i četiri vektora u kojima je AH CY s Y328D mutacijom (NfN_AH CY_YD, NfC_AH CY_YD, CfN_AH CY_YD, CfC_AH CY_YD). U HEK 293T stanice su transfekcijom unešeni vektori u kombinacijama kao što je prikazano na shemi. Svako polje označava jednu kombinaciju, a veličina kruga prikazuje postotak fluorescencije tj. interakcije (vrijednost u desnom donjem kutu svakog polja) u odnosu na istu kombinaciju dva AH CY divljeg tipa (kontrolne vrijednosti postavljene na 100%). Intenzitet fluorescencije je mjeran ImageJ programom u minimalno 50 jednakih ROI (engl. *region of interest*) označenih na mikroskopskim slikama.

4.2.3. Prilagodba BiFC metode na visoku protočnost koristeći AH CY kao mamac

Nakon uspješno uspostavljene metode BiFC u ispitivanju dimerizacije proteina AH CY, željeli smo prilagoditi tehniku za visokoprotočno skeniranje banke gena ljudi (hORFeome; detaljno opisano u poglavlju 3.5.5.) u svrhu određivanja interakcijskih partnera proteina AH CY. Na temelju naših prethodnih rezultata koimunoprecipitacije spregnute sa spektrometrijom masa (coIP/MS) odabrano je 59 potencijalnih interaktora proteina AH CY koji su ispitivani BiFC metodom. Ukratko, četiri BiFC vektora u kojima se nalazi AH CY divljeg tipa su korištena kao mamac (engl. *bait*) te je pripremljena tzv. „proizvoljna” (engl. *custom made*) ploča u kojoj se u konačnici nalazi 59 ishodišnih klonova (neobjavljeni kandidati). Skeniranje se provodilo u HEK 293T stanicama prema shemi prikazanoj na Slici 13. Interakcije su se klasificirale kao pozitivne ukoliko je izračunata statistička značajnost u odnosu na pozitivne i negativne kontrole pri čemu je pozitivna kontrola samoasocijacija AH CY, a negativna nAH CY mutanta koja ne može stvarati dimere. Ukupno je skeniranjem utvrđeno 49 pozitivnih interakcija, a primjer rezultata i analize nakon skeniranja jedne ploče je

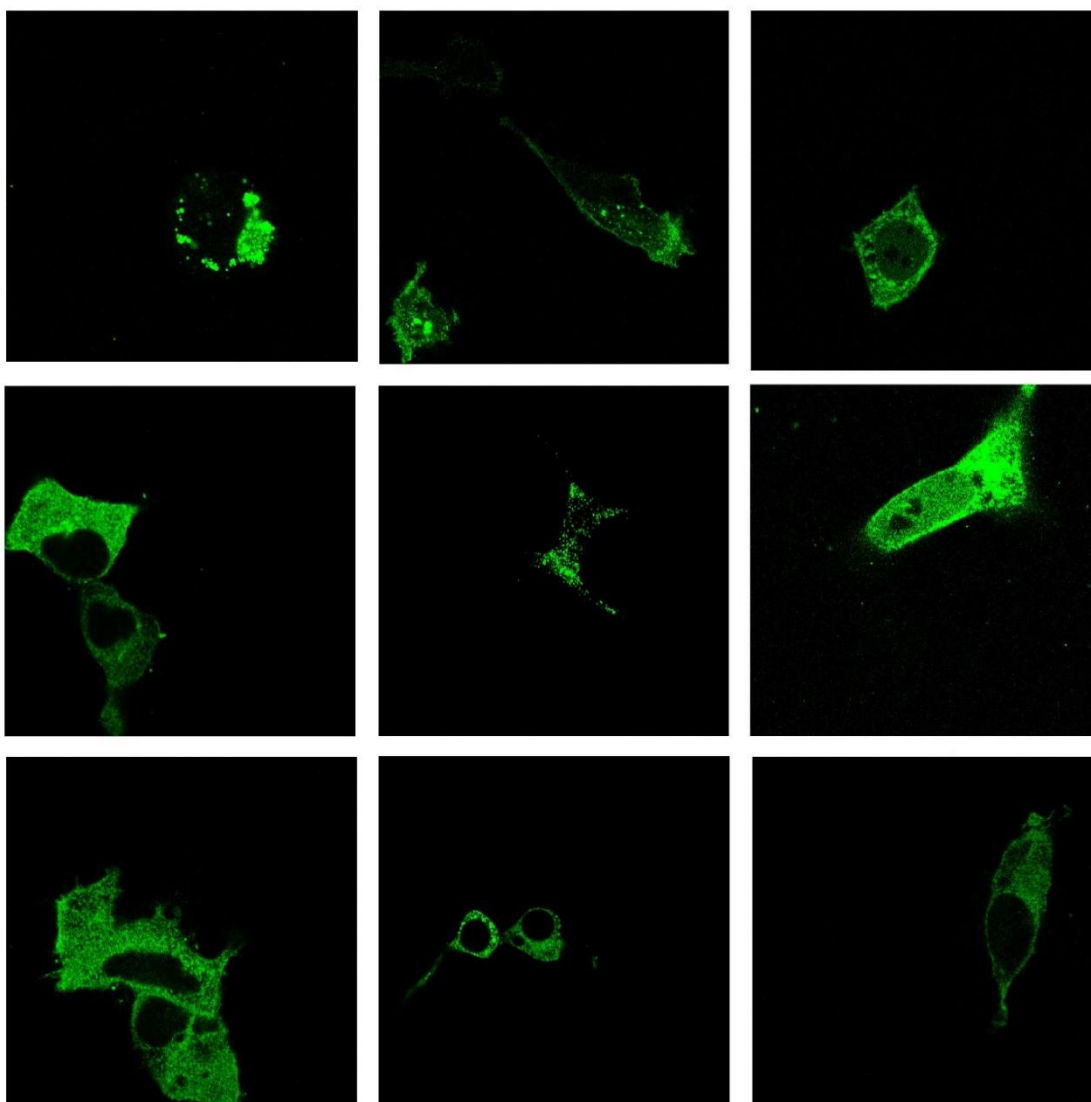
prikazan na Slici 21. 80% od 59 ispitivanih proteina se dakle može detektirati s obje metode: colP/MS i BiFC, pa se ovi kandidati smatraju potvrđenim interaktorima AH CY. Iako je za procjenu uspješnosti obje metode interesantan visoki postotak preklapanja rezultata, važno je obratiti pozornost na 10 interaktora iz colP/MS rezultata koji nisu detektirani BiFC skeniranjem. Pretpostavlja da su ovo ili lažno negativni kandidati BiFC metode ili lažno pozitivni kandidati colP/MS metode što još jednom naglašava važnost korištenja barem dvije metode kako bi se dobila točna slika interaktoma proteina od interesa.



Slika 21. Primjer rezultata visokoprotočnog skeniranja potencijalnih interakcijskih partnera AH CY proteina metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom. Svaki plavi stupac (1-24) predstavlja srednju vrijednost razine fluorescencije (lijeva y os) triplicate očitane na skeneru nakon transfekcije para BiFC plazmida: npr. NfC_1 i CfC_1 s NfN_AH CY koji je korišten kao mamac. Zeleni stupac (+) predstavlja pozitivnu kontrolu u kojoj je transfeciran CfC_AH CY s NfN_AH CY, dok je negativna kontrola predstavljena crvenim stupcem (stanice tretirane samim transfekcijskim reagensom bez DNA i transfecirane s nAH CY mutantom koja nema sposobnost multimerizacije). P-vrijednosti prikazane su žutom točkom (desna y os), granica od 0,05 horizontalnom crnom linijom, a standardna devijacija vertikalnim linijama na svakom stupcu. Prosječno je detektirano 8 statistički značajnih pozitivnih interakcija po ploči.

4.2.4. Analiza uspješnosti visokoprotalnog skeniranja BiFC metodom

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio validirati BiFC metodu i usporediti istu s drugim metodama analize interakcija kako bi se mogla koristiti kao alat u budućim istraživanjima proteina AHCY. Stoga se smatralo da u sklopu ove disertacije nije potrebno prikazati o kojim se potvrđenim interakcijskim partnerima radi, već isključivo koliki je udio interakcija pozitivan (prethodno poglavlje) i koju vrstu informacije o proteinskim interakcijama možemo očekivati ovom metodom. Stoga je dio od 49 pozitivnih kandidata skeniranja nasumično odabrano za provjeru konfokalnom mikroskopijom. Uočene su interakcije s AHCY različitog intenziteta, lokalizacije (citoplazma, jezgra ili stanični organeli) i raspodjele u stanici (jednolika fluorescencija ili nakupine). Primjer rezultata devet pozitivnih interakcija je prikazan na Slici 22. Zaključak je da se za razliku od colP metode koja daje isključivo informaciju o tome da li dva proteina interagiraju ili ne, BiFC metodom mogu dobiti dodatne informacije jer omogućuje kvantitativni i kvalitativni opis proteinskih interakcija.



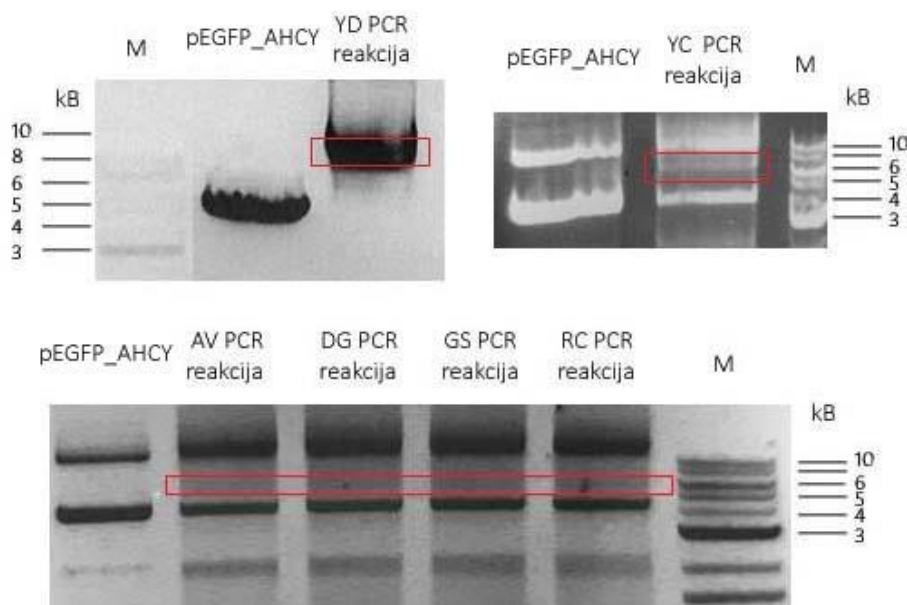
Slika 22. Devet nasumično odabranih pozitivnih interakcijskih partnera otkrivenih visokoprotoknim skeniranjem metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom. Analiza konfokalnom mikroskopijom na *Leica SP8 X FLIM* (objektiv *HC PL APO CS2 63 × /1.40 OIL*). Fluorescencija označava interakciju proteina. Svako polje prikazuje HEK 293T stanice prolazno transfecirane komercijalnim reagensom s jednim pozitivnim interakcijskim partnerom iz testa skeniranja (NfC_X ili CfC_X) i mamcem NfN_AHCY.

4.3. Analiza mutanti gena *ahcy* u humanim stanicama

4.3.1. Unos točkastih mutacija u vektore za ekspresiju proteina AHCY u ljudskim stanicama

Dosadašnjim istraživanjem smo pokazali da su određene mutante proteina AHCY eksprimirane u bakterijama znatno nestabilnije od divljeg tipa. Međutim, kako

se radi o heterolognom sustavu kod kojeg nedostaju mnogi posttranslacijski procesi specifični za eukariote, a koji bi mogli djelovati na konačnu stabilnost proteina, bilo je važno ispitati stabilnost mutanti u ljudskim stanicama. Da bismo napravili stanični sustav za istraživanje ekspresije i lokalizacije mutantnih AHCY proteina u ljudskim stanicama, pripremili smo eukariotske ekspresijske vektore u kojima je AHCY označen s EGFP. Ukratko, u plazmid pEGFP_AHCY koji nosi divlji tip gena (Slika 6) su ciljanom mutagenезom odgovarajućim oligonukleotidnim početnicama (Tablica 5) pomoću PCR-a unešene točkaste mutacije A89V, D86G, G71S, R49C, Y143C i Y328D. Uspješnost PCR reakcija je provjerena pomoću elektroforeze u gelu agaroze kao što je prikazano na Slici 23 na kojoj se vide PCR produkti odgovarajuće veličine. Pročišćeni PCR produkti su elektroporirani u bakterije soja *XL1 Blue* te su probrane odgovarajuće mutante. Generirani mutirani geni su označeni prema nomenklaturi: „naziv vektora_protein_unesena aminokiselinska izmjena“, uključujući pEGFP_AHCY_YC, pEGFP_AHCY_YD, pEGFP_AHCY_AV, pEGFP_AHCY_DG, pEGFP_AHCY_GS, pEGFP_AHCY_RC.



Slika 23. Analiza produkata ciljane mutageneze vektora pEGFP_AHCY. Produkti PCR-a su analizirani elektroforezom u 1% gelu agaroze. (M) *Quick-Load 2-Log DNA Ladder*, veličine DNA fragmenata standarda naznačene su lijevo i desno od panela; (pEGFP_AHCY) vektor koji je korišten kao kalup u reakciji nanesen na gel za usporedbu veličina, na slici se vide superzavijene forme plazmida. (PCR reakcija) 5 μ L reakcijske smjese za mutageneze (YD, YC, AV, DG, GS, RC) Y328D, Y143C,

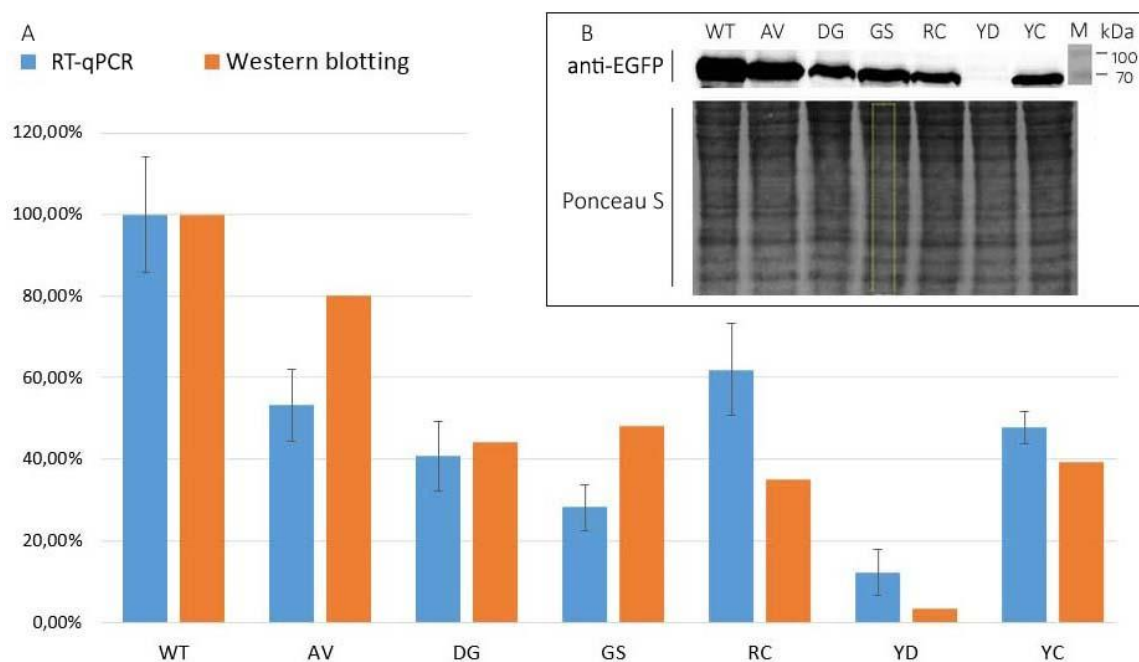
A89V, D86G, G71S, R49C. Linearni PCR produkti odgovarajuće visine označeni su crvenim kvadratom na slici.

4.3.2. Smanjena razina ekspresije mRNA i mutiranog proteina AHCY u HEK 293 stanicama

Vektori dobiveni ciljanom mutagenezom su transfekcijom unešeni u HEK 293 stanice te su pomoću selekcije genetikinom pripremljene stabilno transfecirane stanične linije označene na sljedeći način: WT (pEGFP_AHCY), YC (pEGFP_AHCY_YC), YD (pEGFP_AHCY_YD), AV (pEGFP_AHCY_AV), DG (pEGFP_AHCY_DG), GS (pEGFP_AHCY_GS), RC (pEGFP_AHCY_RC). Istovjetno analizi fibroblasta pacijenta, za analizu razine mutantne mRNA korištena je metoda RT-qPCR, dok je razina mutantnih proteina analizirana Western blotom. Mutirani proteini imaju EGFP privjesak, što je omogućilo da se prilikom analize selektivno kvantificira EGFP_AHCY: početnicama koje prepoznaju slijed koji kodira za EGFP i antitijelom koje prepoznaje EGFP. Na ovaj način može se zanemariti ekspresija nativnog AHCY što omogućuje lakšu analizu podataka.

Za određivanje razine EGFP_AHCY mRNA izolirana je ukupna stanična RNA, prepisana u cDNA i kvantificirana RT-qPCR-om. Za standardizaciju ekspresije je umjesto engl. *housekeeping* gena korištena razina ekspresije gena za otpornost na genetikin (Neo^r/Kan^r slijed u mapi plazmida na Slici 6). Ovaj gen se stabilno ugrađuje u DNA stanica tijekom ugradnje cijelog plazmidnog vektora pEGFP_AHCY pa se i jednako eksprimira u svim staničnim linijama pod istim dozama antibiotika. Za određivanje razine EGFP_AHCY proteina u ukupnim staničnim lizatima se koristila metoda Western blota i standardizacija ekspresije pomoću ukupnih proteina nakon bojanja s Ponceau S. Razina mutantnih EGFP_AHCY mRNA i proteina ovisno o mutanti je smanjena u različitom postotku u odnosu na divlji tip (Slika 24). Iz rezultata se može pretpostaviti da se svim točkastim mutacijama unose promjene u sekundarnu strukturu mRNA molekule što vjerojatno uzrokuje zastoj translacije i aktivaciju tzv. engl. *No-go decay* puta razgradnje nepravilnih transkripata. Također, može se primjetiti različit omjer mRNA i proteina ovisno o mutaciji: kod A89V, D86G, G71S ima manje mRNA od proteina, dok kod R49C, Y143C, Y328D ima više proteina u odnosu na mRNA. Moguće je da neke točkaste promjene uzrokuju manje promjene sekundarne strukture mRNA i slabiju aktivaciju engl. *No-go decay* puta, odnosno da se uspješno translatirani, ali nepravilno smotani mutantni proteini

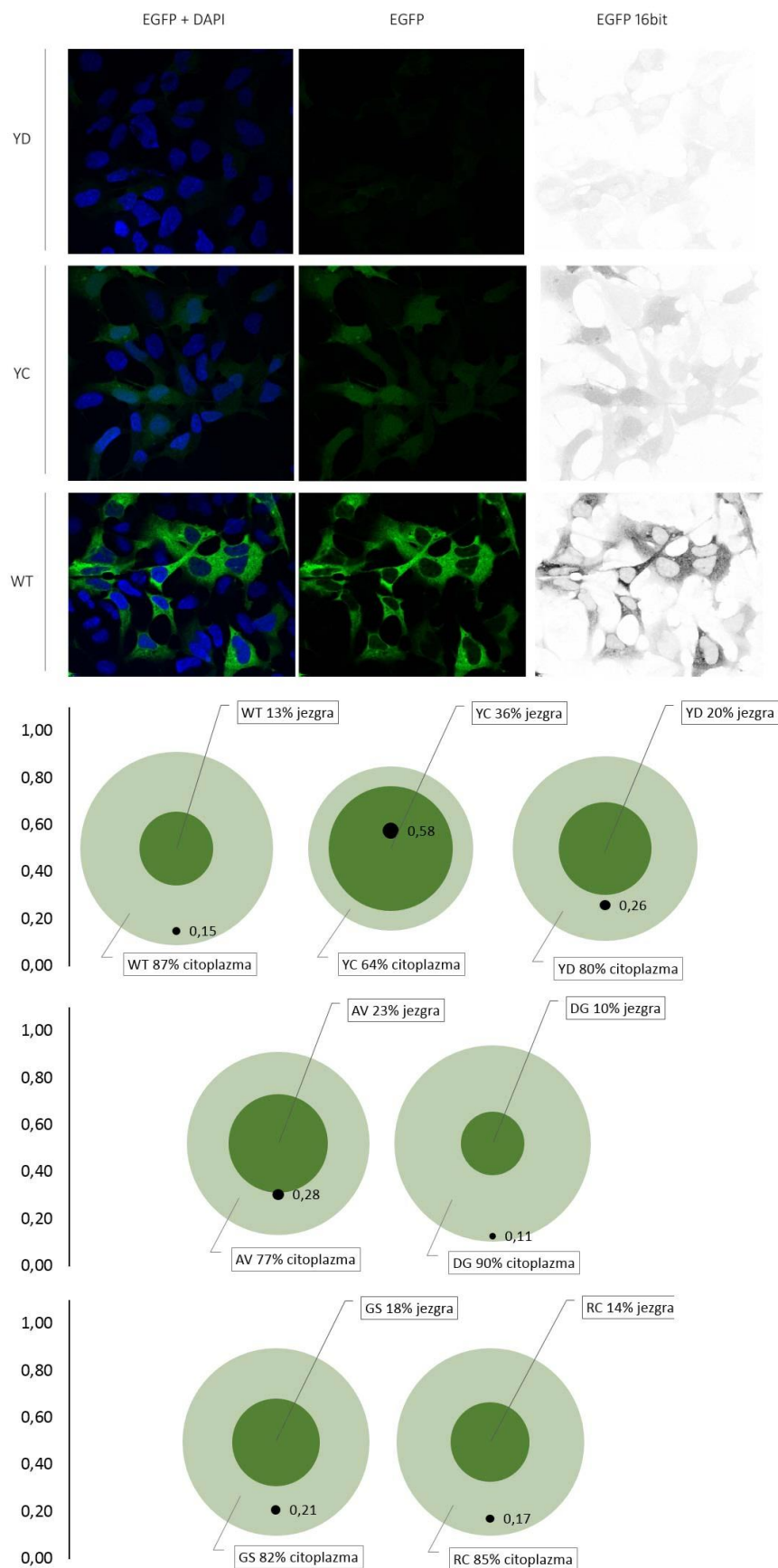
degradiraju klasičnim putevima degradacije oštećenih proteina u stanici.



Slika 24. Smanjene razine ekspresije mutanti AHCY u HEK 293 stanicama. Oznake: (WT) divlji tip; (AV) A89V mutanta; (DG) D86G mutanta; (GS) G71S mutanta; (RC) R49C mutanta, (YD) Y328D mutanta; (YC) Y143C mutanta **A)** Plavi stupci na grafu prikazuju rezultate Western blot analize razine proteina EGFP_AHCY, a narančasti stupci prikazuju razinu mRNA EGFP_AHCY dobivene pomoću RT-qPCR metode. Za Western blot je grafički prikazan postotak jačine signala na membrani (kvantifikacija denzitometrijom nakon normalizacije linija prema Ponceau S), a za RT-qPCR postotak ekspresije (normalizacija pomoću vrijednosti ekspresije otpornosti na geneticin). Svi rezultati su kvantificirani za mutantne EGFP_AHCY u odnosu na divlji tip koji je postavljen na 100%. Vertikalnim crtama je prikazana standardna devijacija. **B)** Eksponirana membrana nakon Western blot analize lizata stabilnih staničnih linija koja se koristila za izradu grafa pod A). Oznake: (M) *Page ruler prestained* marker s veličinama linija u kDa naznačenima desno od panela; (anti-EGFP) anti EGFP antitijelo; (Ponceau S) ukupni proteini korišteni za normalizaciju linija denzitometrijom.

4.3.3. Promjena lokalizacije mutanti proteina AHCY

Kako bi smo ispitali dolazi li, uz promijenjenu stabilnost, i do promjene lokalizacije mutiranih proteina AHCY, stanice koje eksprimiraju AHCY s EGFP privjeskom analizirali smo pomoću konfokalne mikroskopije. Valja napomeniti da u ovoj analizi pretpostavljamo da dodatak EGFP na ciljani protein ne mjenja njegovu lokalizaciju, odnosno da odražava njegovu nativnu lokalizaciju. Iako su analizirane sve mutante, za prikaz rezultata je odabran divlji tip (WT) te mutante Y143C i Y328D koje su utvrđene u DNA pacijenta broj 8 s nedostatkom AHCY (Tablica 3) čiji su fibroblasti korišteni u doktorskoj disertaciji (Strauss i sur. 2015). Crno bijela verzija slika (16 bit opcija u ImageJ) je dodana zbog nemogućnosti ljudskog oka, ekrana ili printera da se vidi ili prikaže vrlo niska fluorescencija Y328D mutante koju je moguće detektirati konfokalnom mikroskopijom i analizirati isključivo specijaliziranim programom za analizu slike. Već i prije statističke analize se može uočiti slabija fluorescencija mutanti u odnosu na WT, a također i drukčiji raspored mutantnih AHCY proteina, posebno značajno veća količina Y143C mutante u jezgrama stanica. Primjer nekoliko originalnih slika stabilnih stanica koje su se koristile u daljnjim pokusima prikazan je u gornjem dijelu Slike 25. Rezultati statističke analize su temeljeni na izračunu icn faktora formulom: $icn = \% \text{ proteina u jezgri} / \% \text{ proteina u citoplazmi}$, a prikazani su na donjem dijelu Slike 25. Prema rezultatima za Y143C, Y328D, A89V i G71S stanice i povišenju icn faktora se vidi da se mutantni proteini u odnosu na WT nalaze više u jezgri. Mutant R49C pokazuje vrlo malu promjenu icn faktora u odnosu na WT, dok se D86G mutant više nalazi u citoplazmi ako se usporedi s WT. Potencijalni razlog za drukčiju distribuciju mutanti u odnosu na divlji tip je nemogućnost pravilnog ulaska i/ili izlaska proteina u/iz jezgre zbog nepravilne strukture uzrokovane aminokiselinskim izmjenama. Aminokiselinski slijedovi koji su u divljeg tipa izloženi za interakcije s drugim proteinima u svrhu usmjeravanja i/ili transporta AHCY mogu u pogrešno smotanim proteinima biti nedostupni. Promjene u distribuciji AHCY mogu biti uzrokovane i namjernim pojačanim unosom i/ili zadržavanjem veće količine mutanti u jezgri od uobičajenih da bi se nadomjestila potrebna razina aktivnosti divljeg tipa.



Slika 25. Promijenjena lokalizacija mutiranog proteina AHCY. **Iznad:** HEK 293 stanice u kojima su stabilno eksprimirane varijante AHCY proteina označene s EGFP

(zeleno). Prikazani klonovi s AHCY divljeg tipa (WT), Y328D mutacijom (YD) i Y143C mutacijom (YC). Snimljeno s *Leica SP8 X FLIM* konfokalnim mikroskopom (objektiv *HC PL APO CS2 63 × /1.40 OIL*). Jezgre su obojane DAPI bojom (plavo), a crno-bijela verzija slika napravljena je 16 bit opcijom u ImageJ programu. **Ispod:** Analiza nukleoplazmatske distribucije AHCY proteina u stabilnim staničnim linijama. 100-150 stanica po mutanti su analizirane pomoću ImageJ programa i „*Intensity Ratio Nuclei Cytoplasm Tool*” alata. Prikazani postotak lokalizacije u stanici je istovjetan površini krugova na grafu, a raspodjeljen je na postotak intenziteta u području jezgre (% jezgra) i citoplazme (% citoplazma). Standardna devijacija postotka intenziteta je u rasponu od 1,197% do 4,786%. Ukupni intenzitet fluorescencije stanice je postavljen na 100%. Icn faktor je naznačen na grafu u obliku crne točke i izračunat formulom $icn = \% jezgra / \% citoplazma$. Visina točke na y osi i njena površina su proporcionalni s vrijednosti icn faktora (također naznačena na grafu). Standardna devijacija vrijednosti icn faktora je u rasponu od 0,018 do 0,081. Oznake: (WT) divlji tip; (AV) A89V mutanta; (DG) D86G mutanta; (GS) G71S mutanta; (RC) R49C mutanta, (YD) Y328D mutanta; (YC) Y143C mutanta.

4.4. Stanice s utišanim AHCY

4.4.1. Utišavanje ekspresije nativnog gena *ahcy*

Iako primarni neimortalizirani fibroblasti pacijenta imaju gubitak funkcije AHCY, zbog određenih kompleksnosti i ograničenja u eksperimentalnom radu s ovim tipom stanica nije bilo moguće provoditi sve željene eksperimente na ovim stanicama. Ograničenja uključuju spor rast u kulturi, ovisnost o dodatku faktora rasta i ograničenje rasta na otprilike 20 pasaža. Zbog navedenoga ove stanice se nisu mogle koristiti za istraživanje utjecaja smanjene aktivnosti AHCY proteina na stanične mehanizme i procese metodama koje zahtijevaju više biološkog materijala ili brz rast u staničnoj kulturi. Stanični sustav u kojem je AHCY umjetno utišan je napravljen u stanicama hepatocelularnog karcinoma koje su odabrane zbog visoke razine ekspresije AHCY i njegove uoge u održavanju metilacijske homeostaze u metabolički aktivnim stanicama. Uspješnost utišavanja gena *ahcy* pomoću shMISSION vektora (Slika 9) koji ekspimiraju male interferirajuće RNA ukosnice (engl. *short RNA hairpin*) komplementarne genu *ahcy*, je provjerena pomoću Western blota u uzorcima lizata stabilno transfeciranih stanica. Stanice koje istovjetno

tretirane i bile podvrgnute selekciji s antibiotikom, ali u kojima se nije utišao AHCY su se smatrale kontrolnim stanicama (shKontrola). Transfekcijom shAHCY vektora postignuto je vidljivo utišavanje nativnog AHCY na $\approx 42\%$ u odnosu na razinu proteina kod kontrole, a rezultati su prikazani na Slici 26. Nakon utišavanja AHCY, uočeno je kako je stanicama potrebno dulje vremena za postizanje konfluentnosti u odnosu na kontrolne stanice što nas je potaknulo na ispitivanje karcinogenog potencijala stanica.

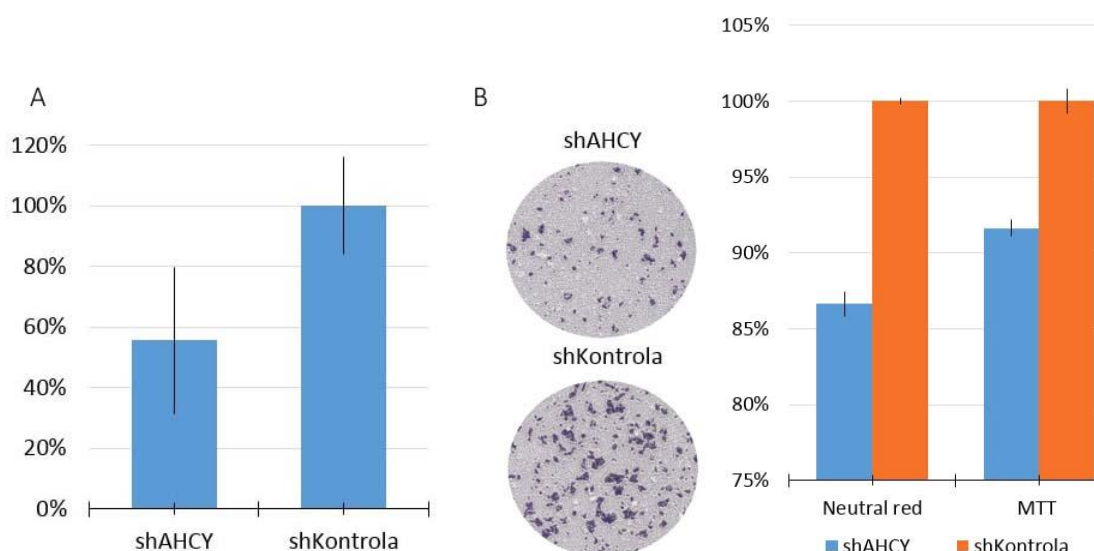


Slika 26. Utišana ekspresija gena *ahcy* pomoću shRNA. Stanice hepatocelularnog karcinoma su transfecirane s vektorom shAHCY i selektirane puromicinom. Za Western blot analizu je korišteno 30 μ g ukupnih proteina po uzorku. **Lijevo:** Western blot analiza. Oznake: (shAHCY) lizat Hep G2 klon sa stabilno utišanim nativnim AHCY; (shKontrola) lizat kontrolnih Hep G2. Lijevo od panela su navedena protutijela korištena u analizi: anti-AHCY i anti- β -aktin. **Desno:** Grafički prikaz analize Western blota denzitometrijom. Vrijednosti za AHCY su normalizirane u odnosu na vrijednosti β -aktina, te je prikazan postotak jačine signala za AHCY u shAHCY u odnosu na shKontrolu koja je postavljena na 100%.

4.4.2. Analiza utjecaja AHCY na karcinogeni potencijal

Temeljeno na literaturi prema kojoj se razina ekspresije AHCY povezuje sa karcinogenim potencijalom različitih tipova raka, pristupilo se analizi fenotipskih karakteristika Hep G2 stanica u kojima smo utišali ekspresiju AHCY. Kako bismo opisali fenotipske karakteristike stanica, analizirali smo staničnu migraciju i proliferaciju. Smanjenje sposobnosti migracije shAHCY stanica za 45% u odnosu na shKontrola je vidljivo na grafičkom prikazu rezultata na Slici 27, na kojoj se nalazi i slika PET membrane inserta s obojanim stanicama koje su prošle kroz pore

membrane. Razina aktivnosti AHCY je proporcionalna migratornoj sposobnosti stanica raka, što znači da AHCY direktno ili indirektno može utjecati na stanično kretanje. Dva testa, MTT i Neutralno red su korišteni u ovoj doktorskoj disertaciji za analizu stanične proliferacije pomoću mjerenja metaboličke aktivnosti stanica. Iako oba testa opisuju istu fenotipsku osobinu, koriste različite stanične pokazatelje: MTT testom se mjeri aktivnost staničnih mitohondrijskih dehidrogenaza, Neutralno red test mjeri sposobnost živih stanica da unose boju u lizosome. S obzirom da sve uloge AHCY još nisu poznate, postojala je mogućnost da nedostatna aktivnost AHCY ima utjecaj na mitohondrijske funkcije ili integritet lizosoma. S tim u vidu su korištene obje metode kako neka od njih ne bi dala lažno pozitivni rezultat. Uočeno je smanjenje proliferacije shAHCY stanica na 86,6% kontrolnih vrijednosti za Neutralno red test i 91,6% kontrolnih vrijednosti za MTT test što je grafički prikazano na desnoj strani Slike 27. Naši neobjavljeni podaci zasada sugeriraju da ne dolazi do stanične smrti koja bi mogla biti uzrok smanjene proliferacije i migracije, no potencijalna stanična smrt nakon utišavanja AHCY je svakako mogućnost koju je potrebno imati u vidu prilikom daljnjih istraživanja i analize podataka. Smanjenje proliferacijske sposobnosti stanica je najčešće povezano sa zastojem staničnog ciklusa, stoga se pretpostavlja se da bi AHCY mogao imati ulogu u putevima odgovornima za pravilno odvijanje staničnog ciklusa. Analiza proteina uključenih u ove procese je prikazana u sljedećem poglavlju.



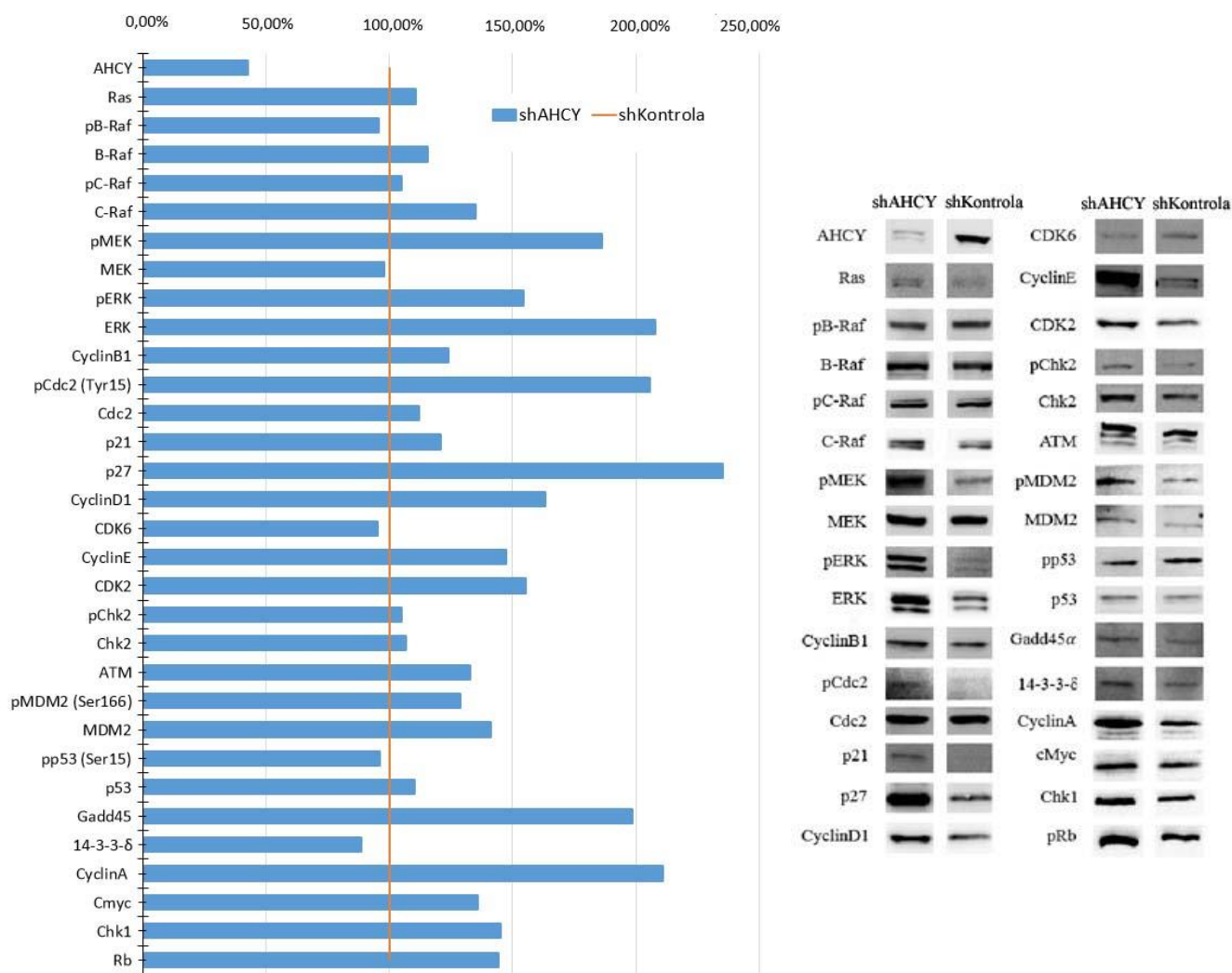
Slika 27. Smanjena migracija i proliferacija stanica hepatocelularnog karcinoma nakon utišavanja AHCY. Oznake: (shAHCY) stanice sa stabilno utišanim nativnim AHCY; (shKontrola) kontrolne Hep G2. **A)** Plavi stupci prikazuju postotak smanjenja

migracije kao srednju vrijednost tri nezavisna eksperimenta u triplicatima. **B)** Originalne mikroskopske slike (*Olympus CKX41 40 ×*) fiksiranih i obojanih stanica koje su prošle kroz pore PET membrane *Transwell* inserta (ljubičasto kristal violet). Stupci prikazuju postotak smanjenja proliferacije kao srednju vrijednost tri nezavisna eksperimenta u 10 jažica. Na svim grafovima kontrola je postavljena na 100%, a standardna devijacija prikazana vertikalnim linijama na stupcima.

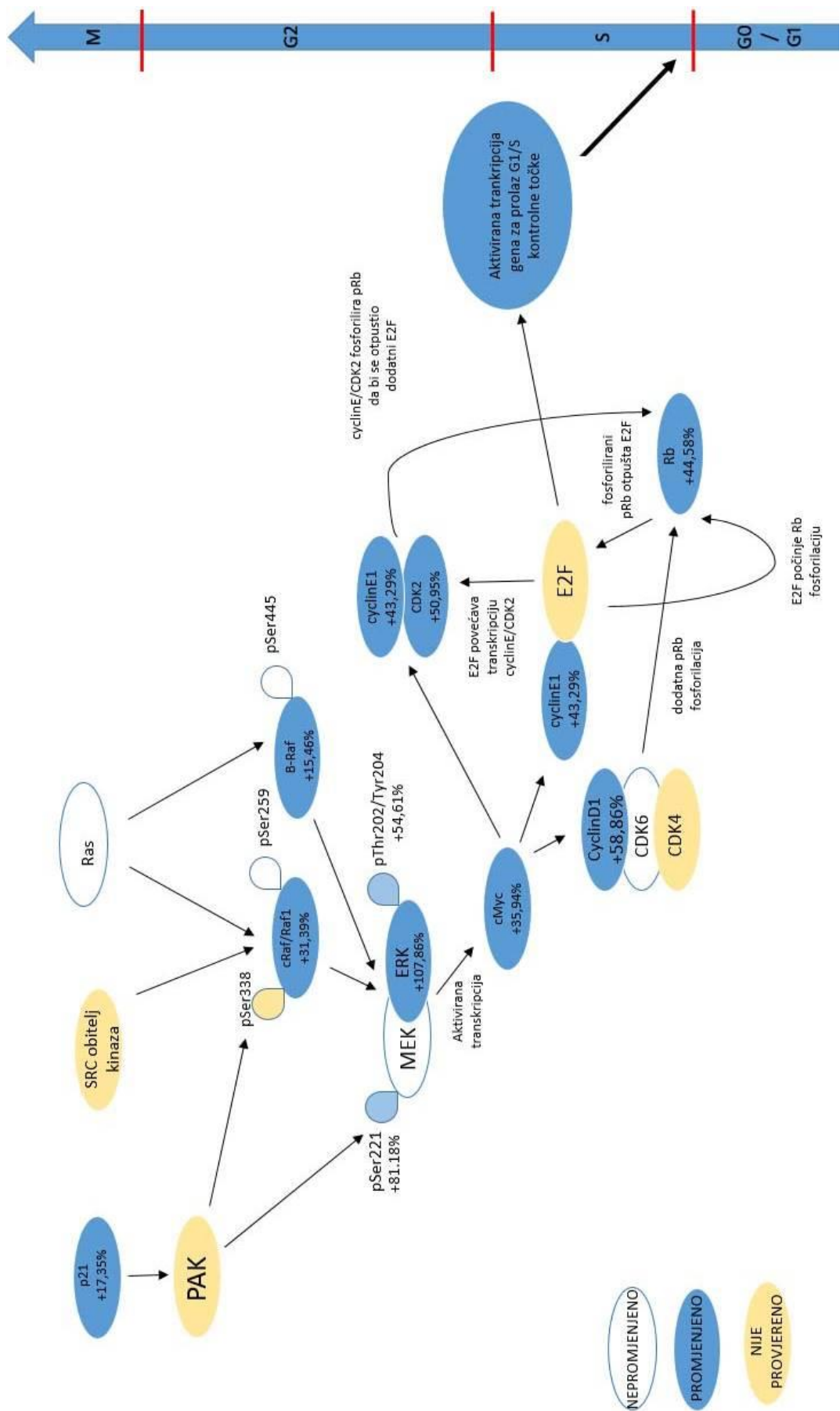
4.4.3. Promjene razine proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa

Opažena smanjena proliferacija i aktivnost stanica uzrokovnih smanjenom aktivnosti AH CY mogle bi biti rezultat neoptimalnih koncentracija metabolita koji dovode do stanja staničnog stresa. Pretpostavlja se da bi ovaj efekt mogao biti izraženiji u visoko metabolički aktivnim stanicama poput hepatocelularnog karcinoma. Na navedene fenotipske karakteristike se može utjecati aktivacijom signalnih kaskada koje reguliraju odvijanje staničnog ciklusa. Da bi se rasvijetlila uloga AH CY u ovim procesima, Western blotom je provjerena razina 30 različitih proteina (Tablica 11) uključenih u regulaciju staničnog ciklusa. Proteini su analizirani u lizatima shAH CY stanica i odgovarajućoj kontroli (shKontrola), a rezultati su prikazani na Slici 28: lijevo se nalazi grafički prikaz nakon statističke analize membrana koje su prikazane desno. Maksimalna promjena između signala za β -aktin u istom lizatu na 10 membrana eksponiranih u isto vrijeme je $\pm 11,2\%$ i korištena je za utvrđivanje stupnja reproducibilnosti metode. Sve promjene veće od $\pm 11,2\%$ smatraju se signifikantnima i prikazane su na shematskom prikazu na Slici 29. Shematski prikaz temeljen na saznanjima iz relevantne literature je napravljen u svrhu boljeg razumijevanja rezultata, a prikazano je da li dolazi do aktivacije ili inhibicije proteinskih kaskada, te utjecaj takvih promjena na glavne regulacijske točke u staničnom ciklusu. Vidljiva je pojačana ekspresija proteina u nekoliko puteva za koje je poznato da se aktiviraju kod različitih tipova oštećenja DNA i stresa. Zatim je uočena aktivacija MEK/ERK puta kojim receptori aktivirani izvanjskim signalima (faktori rasta, stres, mitogeni, citokini) preko Ras/Raf proteina šalju informaciju od površine stanica do jezgre. S obzirom da je utišavanje AH CY unutarnja promjena neovisna o izvanstaničnoj signalizaciji i da je razina Ras/Raf efektoru nepromijenjena, zaključuje se da je MEK/ERK put aktiviran na neki drugi način koji ovisi o razini aktivnosti AH CY. Dosada u literaturi nije opisana povezanost AH CY i

puteva koji sudjeluju u signalizaciji oštećene DNA, pa dobivene informacije nisu bile dovoljne da bi se u potpunosti razjasnila uloga AH CY u ovim procesima. Stoga se istraživanje ove problematike nastavilo korištenjem omiks metoda čiji su rezultati prikazani i opisani u sljedećim poglavljima.



Slika 28. Promjena razine proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa. Stabilno transfecirane stanice u kojima je utišan AHCY su analizirane Western blotom. **Lijevo:** Grafički prikaz analize linija denzitometrijom. Vrijednosti za svaku liniju su normalizirane u odnosu na vrijednosti β -aktina te je prikazan postotak jačine signala u shAHCY u odnosu na shKontrola čije vrijednosti su postavljene na 100% i prikazane narančastom linijom. **Desno:** Slika eksponiranih membrana koje su korištene za statističku analizu. Oznake na slici su popisane u Tablici 11.



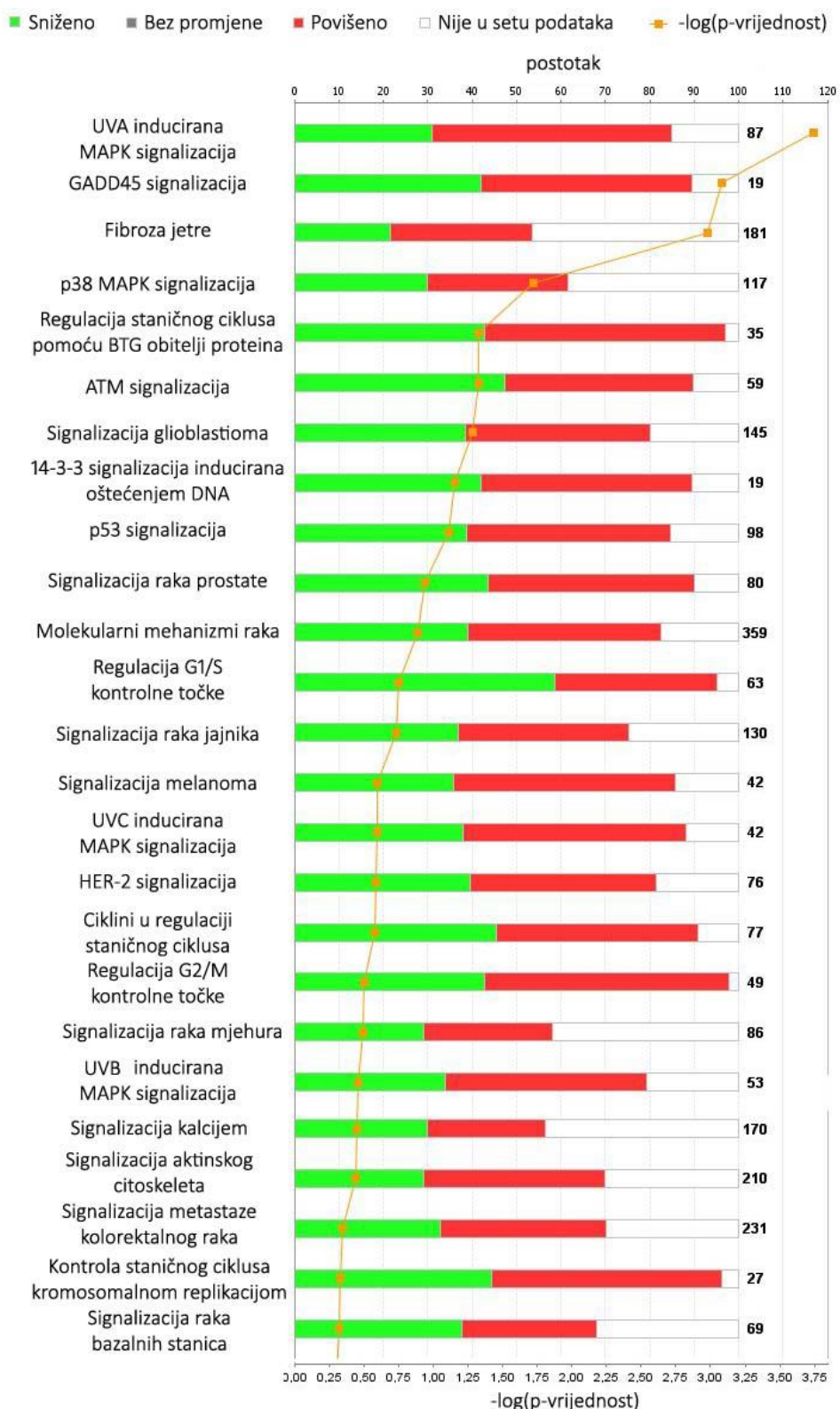
Slika 29. Nastavak.

4.5. Primjena omiks metoda u istraživanju funkcije gena *ahcy*

Podaci transkriptoma i proteoma omogućuju istovremeno praćenje globalnih promjena u stanici, a analiza takvih podataka daje uvid u neistražene uloge AHCY proteina pomoću dodjeljivanja novih poveznica među poznatim molekulama i procesima. Za analizu se koristi IPA program (detaljnije u poglavlju 3.6.) u kojem su svi podaci podvrgnuti osnovnoj analizi (engl. *Core analysis*) na način da su uspoređeni s informacijama sadržanim u bazi podataka *Ingenuity Knowledge Base*, repozitoriju bioloških međudjelovanja i funkcionalnih obilježja te zatim povezani s 85 funkcionalnih kategorija iz baze podataka. Daljnje specifične analize i način prikaza rezultata ovise o skupu podataka koji se analizira i o smjeru istraživanja, stoga su zasebno opisani u narednim poglavljima.

4.5.1. Analiza transkriptoma i proteoma stanica Hep G2 s utišanim genom *ahcy*

Sekvenciranjem transkriptoma stanica hepatocelularnog karcinoma u kojima je utišan AHCY protein (shAHCY) i profiliranjem proteoma na istim stanicama SILAC LC-MS/MS metodom dobivena su dva skupa podataka koja su osnovnom analizom povezana s 85 funkcionalnih kategorija u IPA programu. Daljnja analiza podataka je usredotočena na povezanost rezultata s promjenama u staničnom ciklusu kao potencijalnom uzroku promjena u osnovnim značajkama raka (engl. *hallmarks of cancer*): migraciji i proliferaciji. Vidljiv je utjecaj utišavanja ekspresije AHCY na kontrolne točke staničnog ciklusa aktivacijom različitih signalnih puteva i kaskada. Isti putevi koji su prethodno analizirani Western blotom i vezani uz odgovor stanice na razne vrste oštećenja DNA se također vide u omiks rezultatima. Aktivacija MEK/ERK puta koja nije mogla biti objašnjena u rezultatima Western blota je ovdje stavljena u kontekst Ras/Raf-neovisne aktivacije p38 MAPK puta. Ovaj put je aktiviran općenitim DNA stresom i oštećenjem zbog UVA/B/C zračenja. S obzirom da stanice nisu zračene, zaključeno je da je nešto drugo uzrok oštećenja DNA istovjetnog onome kao kod zračenja. Rezultati su prikazani na Slici 30. Iz priloženoga možemo zaključiti kako smanjena razina AHCY direktno ili indirektno uzrokuje oštećenje DNA i aktivaciju signalnih puteva u stanici kojima se zaustavlja stanični ciklus i usporava proliferacija i migracija da bi se oštećenja u DNA popravila prije stanične diobe.



Slika 30. Grafički prikaz funkcionalnih kategorija povezanih s promjenama u Hep G2 stanicama u kojima je utišan AHCY. Rezultati su dobiveni iz preklapljenih skupova podataka transkriptoma i proteoma. Kategorije su rangirane prema $-\log(p\text{-vrijednost})$ koja se računa kao što je opisano u poglavlju 3.6.. Svaki stupac označava jednu funkcionalnu kategoriju, a broj na vrhu svakog stupca označava broj molekula u

našem skupu podataka koje se preklapaju sa kandidatima pojedine funkcionalne kategorije. Od ukupnog broja molekula u funkcionalnoj kategoriji, crvenom bojom na stupcu je prikazan udio naših molekula sa sniženom razinom ekspresije, zelenom bojom udio naših molekula s povišenom razinom ekspresije, a bijelom bojom udio molekula koji nije pronađen u našem skupu podataka.

4.5.2. Analiza transkriptoma i proteoma fibroblasta pacijenta s nedostatkom AHCY

Podaci fibroblasta pacijenta su podvrgnuti osnovnoj analizi u IPA programu, a daljnja interpretacija podataka je fokusirana na povezanost s različitim oboljenjima, poremećajima i patološkim stanjima. Rezultati se prikazuju tablično: bilježi se broj molekula iz našeg skupa podataka koje su ujedno vezane i uz promjene u određenoj bolesti ili poremećaju što upućuje na to da dolazi do aktivacije istih staničnih procesa pozadini navedenih oboljenja i nedostatka AHCY. Na popisu u Tablici 13 se npr. mogu uočiti različite vrste distrofija mišića i miopatija što je očekivano s obzirom na mišićne poremećaje zabilježene u svih pacijenata oboljelih od nedostatka AHCY. Proučavanje ovakvih poveznica je od interesa jer se liječenje oboljenja može poboljšati preuzimanjem određenih terapijskih smjernica prema uočenim zajedničkim molekularnim procesima. Suprotno tome, primjećena je asocijacija s patologijama koje nisu zabilježene u pacijenata s nedostatkom AHCY: dermatološke i kardiološke bolesti te poremećaji vezivnih tkiva (Tablica 13). Proučavanje ovih molekularnih poveznica nam može dati uvid u specifične uloge AHCY koje dolaze do izražaja u određenim staničnim tipovima ili stanjima.

Tablica 13. Popis probranih oboljenja i poremećaja pronađenih i predviđenih IPA programom nakon analize transkriptoma i proteoma fibroblasta pacijenta. Prikazan je broj molekula koje se nalaze u našem skupu podataka i u molekularnim procesima navedenih poremećaja te vjerojatnost da se geni iz mreže nađu u nasumično odabranom skupu gena (p–vrijednost).

Kategorija u IPA	Oboljenje / poremećaj	p-vrijednost	Broj molekula
Razvojni poremećaji; nasljedni poremećaji	distrofija mišića	1,59E-08	18
	Emery-Dreifuss distrofija mišića	3,10E-13	14
	Duchenne distrofija mišića	1,48E-09	14
	Nasljedna anomalija oka	8,47E-06	11
	Bolest lizosomske pohrane (engl. <i>lysosomal storage disease</i>)	4,20E-03	5
	hipertrofija	4,46E-03	5
	Obiteljska Alzheimerova bolest	5,31E-03	3
	mikrotalamija	8,22E-03	3
	Bethlem miopatija	1,31E-03	2
	Ullrich nasljedna distrofija mišića	1,31E-03	2
	Nasljedna hemartroza	1,31E-03	2
	Huntingtonova bolest	7,70E-04	20
	Nasljedna miopatija	1,11E-08	27
	Nasljedno oboljenje očiju	5,28E-03	11
Dermatološke bolesti i stanja	psorijaza	1,01E-05	28
	dermatitis	1,44E-05	19
	atopični dermatitis	3,42E-06	17
	dermatomiozitis	2,47E-10	14
	discoid lupus erythematosus (+ poremećaj vezivnog tkiva)	2,16E-03	2
Ozljeđe i abnormalnosti organa	endometrioza	1,44E-04	19
	fibroza	5,16E-04	12
	čir	2,16E-05	7
	Nefroza; engl. <i>minimal change nephrotic syndrome</i>	5,87E-05	4
Poremećaji vezivnog tkiva	Reumatoidna bolest	1,69E-03	33
	artropatija	1,10E-03	30
	Upala zglobova	1,61E-03	29
	Marfan sindrom	1,40E-07	7
	sinovitis	4,11E-04	4
	Displazija kosti	6,67E-03	3
	parvovirus artritis	2,16E-03	2
	Nasljedna opća lipodistrofija	1,31E-03	2

Tablica 13. Nastavak

Kategorija u IPA	Oboljenje / poremećaj	p-vrijednost	Broj molekula
Kardiovaskularne bolesti	Obiteljska kardiovaskularna bolest	3,61E-05	13
	Obiteljska bolest žila	2,95E-04	6
	Loeys-Dietz sindrom	4,99E-04	3
	Fanconi anemija grupa I	4,45E-03	2
	Obiteljski engl. <i>cardiofaciocutaneous syndrome</i> (+ dermatološka bolest)	1,31E-03	2
	Obiteljska aneurizma torakalne aorte	7,48E-03	2
Neurološke i mišićne bolesti	Neuromuskularna bolest	3,93E-03	27
Poremećaji kostura i mišića	Progresivna miopatija	2,82E-08	15
Slušne i dermatološke bolesti	kolestatom	2,16E-03	2
Rak i abnormalnosti vezane uz tumore	abdominalna neoplazma	2,90E-03	240
	Rak urinarnog trakta	9,43E-07	60
	Rak i tumor bubrega	3,01E-06	49
	Mijeloproliferativni poremećaj	6,85E-03	46
	muscle tumor (engl. <i>smooth muscle tumor; leiomyomatosis</i>)	4,51E-03	37

Nadalje, u IPA programu je nakon osnovne analize napravljena i analiza engl. *Biomarker discovery* s postavkama kojima je pretraga biomarkera ograničena na biološke tekućine: krv i serum, slinu, urin. Metilacijska oboljenja su multisimptomatska i vrlo rijetka pa je predviđeno da često ostaju nedijagnosticirana. Prognostički i dijagnostički biomarkeri koji bi lako i brzo mogli ukazati na poremećaj metilacije u pacijenata bi bili od izuzetne koristi jer bi omogućili brzu terapijsku intervenciju, ključnu kod ovakvih oboljenja. Ovakvi biomarkeri važni su i za dijagnostiku metilacijskih poremećaja u kojih za razliku od nedostatka AHCY ne nailazimo na drastične promjene SAM, SAH i Met, tj gdje poremećaj metilacijskog statusa stanice nije primarni, već dodatni simptom oboljenja. Stoga se pristupilo analizi biomarkera u biološkim tekućinama koje je lako uzorkovati i koje se trenutno koriste kao materijal za široki spektar analiza u medicinskoj praksi. Popis potencijalnih biomarkera i omjera promjene u biološkom materijalu se nalazi u Tablici

14, a potencijalna primjena dva biomarkera od interesa u našem skupu podataka je opisana u raspravi doktorske disertacije.

Tablica 14. Popis predviđenih biomarkera prema IPA programu. Označen je tip molekule, biološki materijal u kojem je detektabilan i eksperimentalni omjer promjene u fibroblastima pacijenta u odnosu na kontrolne fibroblaste.

Simbol	Ime gena na engleskom (Entrez baza)	Lokacija	Tip molekule	Eksperimentalni omjer promjene (engl. <i>fold change</i>)
krv, plazma/serum i urin				
ACTN1	actinin alpha 1	citoplazma	transkripcijski regulator	1,086
CSTB	cystatin B	citoplazma	peptidaza	-1,560
CTSB	cathepsin B	citoplazma	peptidaza	-2,770
FLNB	filamin B	citoplazma	(ostalo)	-4,195
GSTM3	glutathione S-transferase mu 3	citoplazma	enzim	-1,266
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	citoplazma	(ostalo)	-5,141
P4HB	prolyl 4-hydroxylase subunit beta	citoplazma	enzim	-39,070
PLS3	plastin 3	citoplazma	(ostalo)	-1,309
PYGB	phosphorylase, glycogen; brain	citoplazma	enzim	-2,095
TAGLN2	transgelin 2	citoplazma	(ostalo)	-1,476
TXN	thioredoxin	citoplazma	enzim	-5,572
FN1	fibronectin 1	Izvanstanični prostor	enzim	-1,465
PSAP	prosaposin	Izvanstanični prostor	(ostalo)	-2,821
THBS1	thrombospondin 1	Izvanstanični prostor	(ostalo)	-1,168
LMNA	lamin A/C	Jezgra	(ostalo)	-9,019
CAP1	adenylate cyclase associated protein 1	Stanična membrana	(ostalo)	-3,966
CDH13	cadherin 13	Stanična membrana	(ostalo)	2,066

Tablica 14. Nastavak

Simbol	Ime gena na engleskom (Entrez baza)	Lokacija	Tip molekule	Eksperimentalni omjer promjene (engl. <i>fold change</i>)
krv, plazma/serum i urin				
EZR	ezrin	Stanična membrana	(ostalo)	1,199
TLN1	talin 1	Stanična membrana	(ostalo)	-6,536
VCL	vinculin	Stanična membrana	enzim	-2,225
slina				
B2M	beta-2-microglobulin	Stanična membrana	transmembranski receptor	-0,332

4.6. Uloge AHCY i mreža interakcija s drugim proteinima

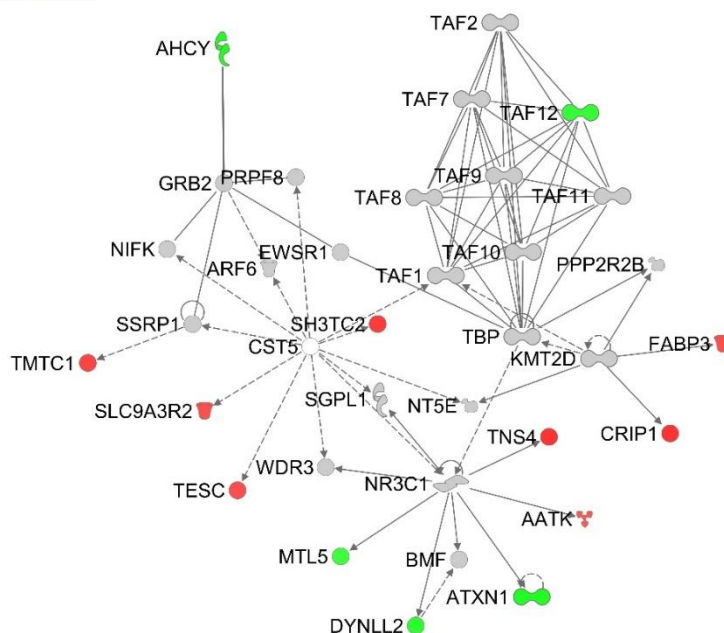
U svrhu utvrđivanja bazičnih, odnosno univerzalnih uloga AHCY u stanici napravljen je mrežni prikaz na kojem su označene mRNA molekule (iz podataka transkriptoma) ili proteini (iz podataka SILAC LC/MS-MS) čija je razina povišena ili snižena u našim analiziranim skupovima podataka (Slika 31). Mreža prikazuje vezu AHCY sa skupom molekula koje sudjeluju u DNA replikaciji, rekombinaciji i popravku, a vezane su i uz neurološke bolesti. Ovo je od posebnog interesa s obzirom na uočenu vezu AHCY i oštećenja DNA te asocijaciju s neurološkim poremećajima u pacijenata s oboljenjem nedostatka AHCY.

Stanično specifične uloge AHCY mogu se analizirati ako usporedimo omiks rezultate stanica hepatocelularnog karcinoma i fibroblasta pacijenta (Slika 32). Na usporednom grafičkom prikazu funkcionalnih kategorija rangiranih prema $-\log(p\text{-vrijednosti})$ se može uočiti da su promjene vezane uz stanični ciklus karakteristične za stanice hepatocelularnog karcinoma. Suprotno tome, rezultati fibroblasta pacijenta asociraju se uz npr. ulogu osteoblasta, osteoklasta i hondrocita u reumatoidnom artritisu. Ove funkcionalne kategorije se poklapaju s prethodnim rezultatima analiza u kojima su podaci fibroblasta pacijenta povezni s bolestima vezivnog tkiva.

Ukupno gledano, ovakve informacije služe za usmjeravanje daljnjeg istraživanja uloga AHCY u oboljenjima koja dosada nisu s njim bila povezana te u svrhu odabira odgovarajućih eksperimentalnih pristupa i staničnih sustava za istraživanje.

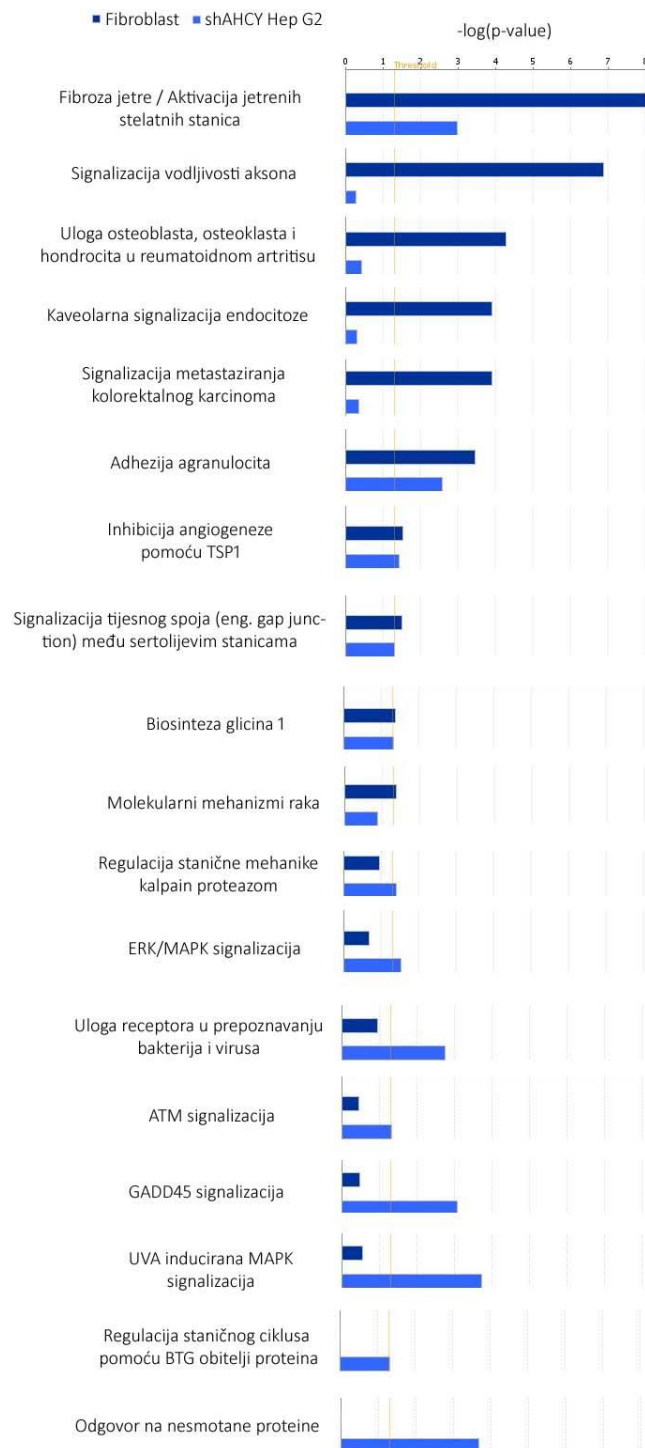


Path Designer Network 15



© 2005-2017 QiAGEN. All rights reserved.

Slika 31. Shematski mrežni prikaz pretpostavljene univerzalne uloge AHCY proteina vezane uz ekspresiju gena, DNA replikaciju, rekombinaciju i popravak te neurološke bolesti. Obojani kandidati na slici su pronađeni u našim skupovima podataka i uklopljeni u poznatu mrežu iz IPA baze podataka.



Slika 32. Grafički prikaz funkcionalnih kategorija proteina AHCY. Rezultati su dobiveni na osnovi analize transkriptoma i proteoma u stanicama hepatocelularnog karcinoma (Hep G2) u kojima je aktivnost AHCY smanjena utišavanjem te fibroblasta pacijenta s nedostatnom aktivnošću AHCY. Funkcionalne kategorije su rangirane IPA programom prema $-\log(p\text{-vrijednosti})$.

5. RASPRAVA

1 slika, 1 tablica

5. RASPRAVA

Nedostatak enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze (AHCY) uzrokuje kompleksni metabolički poremećaj, međutim molekularne osnove ovog oboljenja su nepoznate. Glavni cilj ove doktorske disertacije je pridonijeti razmišljanju molekularnih mehanizama kompleksnog oboljenja nedostatka AHCY te pronaći biomarkere koji bi se mogli koristiti u dijagnostici, prognostici i određivanju odgovarajuće terapije kod metaboličkih oboljenja. Naime, poznato je da AHCY, kao jedan od enzima metilacijskog ciklusa, ima ključnu ulogu u održavanju metilacijskog potencijala stanice što je posebno izraženo u metabolički aktivnim stanicama, tkivima i organima. Istraživanje promjena u staničnoj metilaciji se provodi u Laboratoriju za naprednu genomiku, no nije rađeno u sklopu ove doktorske disertacije. Fokus disertacije je istraživanje kumulativnih efekata uzrokovanih promjenama u metilaciji i metabolizmu stanice tj. opće posljedice nedostatka funkcije AHCY. Unatoč već uspostavljenoj vezi između aktivnosti AHCY i raznih patologija u pacijenata s nedostatkom AHCY, vrlo malo se zna o ulogama i aktivnosti AHCY u zdravim ljudskim stanicama, npr. o prometovanju AHCY u stanici ili o značaju interakcija AHCY s drugim proteinima u stanici. S obzirom da je nedostatak AHCY rijedak poremećaj, pretpostavljeno je da se brojne uloge AHCY ne mogu istražiti isključivo na temelju biološkog materijala iz pacijenta. Stoga je jedan od ciljeva disertacije razvoj staničnih sustava za istraživanje univerzalnih uloga AHCY u zdravim stanicama, ali i njegove uloge u razvoju simptoma karakterističnih za oboljenje nedostatne aktivnosti AHCY. Nakon izrade modelnih staničnih sustava svakako je potrebno te sustave validirati, ali i iz njih probrati kvalitetne i pouzdane informacije. U tu svrhu su se koristile uhodane laboratorijske metode, ali i spektar metoda koje dosada nisu korištene u istraživanju ovog oboljenja. Tu se prvenstveno misli na omiks pristup tj. visokoprotodne metode kojima se istraživao interakom AHCY te transkriptom i proteom stanica. S obzirom na veći broj korištenih metoda i dobivenih rezultata, rasprava je podjeljena na zasebna poglavlja kako bi se što preglednije naglasile nove spoznaje. Bitno je napomenuti da je fokus ove doktorske disertacije na slučaju opisanom u Strauss i sur. (Strauss i sur. 2015): pacijentice koja je naslijedila otprije poznatu mutaciju Y143C i dosada neistraženu mutaciju Y238D. Za omiks analize su korišteni fibroblasti iz navedenog slučaja, a prilikom uvođenja i

validacije novih metoda za istraživanje proteina AHCY, naglasak je bio na mutaciji Y328D.

5.1. Analiza Y328D mutante

Dosadašnje funkcionalne analize mutanti AHCY su rađene u Laboratoriju za naprednu genomiku ubrzo nakon otkrića oboljenja nedostatka AHCY (Belužić i sur. 2006) te usporedno s otkrivanjem novih mutacija tijekom narednih godina. U nekoliko članaka (Belužić i sur. 2006; Fumić i sur. 2006; Belužić i sur. 2008; Vugrek i sur. 2009) su opisane metode kojima se istraživala molekularna stabilnost AHCY u uvjetima *in vitro* te biokemijske analize rekombinantnih mutantnih proteina. Nakon usporedbe zabilježenih rezultata od dotada poznatih mutanti predložena je korelacija težine kliničke slike pacijenata s razinom inaktivacije enzima (Belužić i Vugrek 2010). Praćenjem pacijenata i odgovora oboljelih na terapiju, ova pretpostavka se pokazuje sve točnijom: mutanta jače pridonosi biokemijskim i kliničkim poremećajima u pacijenata što je niža njezina enzimska aktivnost u odnosu na divlji tip. U istraživanom slučaju iz 2015.-te godine Sangerovim sekvenciranjem je potvrđena poznata Y143C mutacija, te nova Y328D mutacija. Funkcionalnim analizama mutante Y143C (Belužić i sur. 2006) eksprimirane pri blažim uvjetima u odnosu na divlji tip (25°C, >18 h) je utvrđeno da zadržava 25% hidrolaze aktivnosti. Smatra se da je ova mutacija srednje inaktivirajuća i da prognoza oboljenja ovisi o kombinaciji Y143C s drugim mutacijama: blaži simptomi s A89V (22,7% aktivnosti; Buist i sur. 2008) i snažni simptomi s W112STOP (0% aktivnosti; Barić i sur. 2004). S obzirom da je pacijentica s nasljeđenom kombinacijom Y143C i Y328D mutacija imala najlošije dosada izmjerene biokemijske i kliničke pokazatelje, pretpostavljeno je da upravo novootkrivena Y328D mutanta snažno inaktivira AHCY protein i pridonosi jačini oboljenja u ovom slučaju.

U svrhu istraživanja Y328D mutacije ispitano je nekoliko uvjeta ekspresije s varijacijama temperature i trajanja te uz dodatak benzilnog alkohola, ali bezuspješno. Y328D mutanta se u svim uvjetima ekspresije u potpunosti nalazila u talogu u netopljivoj proteinskoj frakciji, odnosno inkluzijskim tijelima. Daljnji pokušaji modifikacija uvjeta ekspresije nisu se provodili zbog dosadašnjeg iskustva u ekspresiji mutanti AHCY. Iako se hidrolazna aktivnost Y328D mutante nije mogla odrediti, pretpostavljeno je da je vrlo niska. Zaključak je izveden prema podacima iz prethodnih slučajeva: mutante koje se nisu mogle eksprimirati (G71S; Honzík i sur.

2012) ili su eksprimirane uz velike modifikacije uvjeta (R49C; Vugrek i sur. 2009) su vezane uz vrlo teške slučajeve i klasificirane kao snažno inaktivirajuće za enzim. Iako analize mutanti u *in vitro* uvjetima mogu dati važne informacije o proteinu AHCY, na primjeru ovih nekoliko mutanti vidimo da zbog nemogućnosti njihove ekspresije o točnom uzroku smanjenja aktivnosti AHCY možemo samo nagađati: da li protein gubi sposobnost multimerizacije ili se ne može provoditi reakcija hidrolize u pravilno složenom tetrameru? Za razliku od opsežnih istraživanja u uvjetima *in vitro* dosada nisu rađene analize molekularne stabilnosti proteina AHCY u ljudskim stanicama u kulturi. Ljudske stanice u odnosu na prokariotske stanice *E. Coli* imaju dodatne mehanizme procesiranja i modifikacije proteina nakon translacije i tijekom njegova života u stanici te se stoga smatraju boljim sustavom za proučavanje mutanti proteina AHCY. S tim u vidu u ovoj disertaciji se za analizu makromolekularne stabilnosti AHCY u živim stanicama koristila BiFC metoda. Pomoću imunocitokemije je ustanovljeno da je lokalizacija i količina proteina AHCY označenog s proteinom Venus u sve četiri topologije istovjetna onoj nativnog AHCY (Lepur i sur. 2016) što je potaknulo korištenje iste za analizu utjecaja točkastih mutacija na stabilnost hidrolaze u živim stanicama. Mutanta Y328D je odabrana zbog toga što se nije mogla eksprimirati u heterolognom sustavu, čime se dodatno dobila informacija o tome mogu li se metodom BiFC nadomjestiti nedostaci heterolognog sustava. Doista je pokazano da mutantne Y328D podjedinice gotovo potpuno gube sposobnost dimerizacije u stanicama HEK 293T. S obzirom da je AHCY aktivan u obliku tetramera, mutacijom Y328D se posljedično ukida i enzimska aktivnost proteina AHCY. Prednost sustava BiFC je ta što se u BiFC vektore s AHCY WT mogu unjeti sve poznate točkaste mutacije na način kao što je opisano u ovoj disertaciji. Prvo sljedeće od interesa bi bila priprema mutante Y143C. Prema rezultatima *in vitro* studija (Belužić i Vugrek 2010) ova mutanta bi trebala zadržati sposobnost samoasocijacije tj fluoresciranja u sustavu BiFC, te bi ovo bila dodatna provjera metode BiFC. Nadalje, pripremom ostalih mutanti, bilo bi moguće transfecirati stanice s kombinacijama različitih mutanti kao što je pronađeno u pacijentima. Na ovaj način moglo bi se utvrditi koja mutacija i u kojoj mjeri inaktivira AHCY na principu disrupcije sposobnosti proteina da stvara enzimski aktivne tetramere u živoj stanici, te tako nadopuniti informacije koje nedostaju korištenjem isključivo metoda u uvjetima *in vitro*.

5.2. Ekspresija i lokalizacija AH CY u ljudskim stanicama

Analizom fibroblasta pacijenta s nasljeđenim Y143C i Y328D mutacijama u genu *ahcy* je utvrđena smanjena količina mRNA i proteina u odnosu na kontrolne stanice. Iznenadjujuće, u analizi transkriptoma nismo uočili smanjenu količinu mRNA što tumačimo izrazito niskim brojem očitavanja u oba ispitana uzorka. Razlog tome je općenito slabija ekspresija AH CY u fibroblastima (*The Human Protein Atlas*, <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000101444-AH CY/cell>). Smanjenje ukupne razine mutančnih proteina je ispitano Western blotom u fibroblastima pacijenta u odnosu na zdrave kontrolne fibroblaste što je validirano i rezultatima LC-MS/MS nakon SILAC-a. Točkaste mutacije ne uklanjaju niti uvode preuranjeni STOP kodon, zbog čega se smanjena količina mutantne mRNA ne može objasniti staničnim mehanizmima zaduženima za uklanjanje takve vrste pogrešnih transkripata. Dosada je u literaturi opisan samo jedan mehanizam tzv. engl. *No-go decay* (NGD) kojim se aktivira degradacija mRNA zbog zastajanja ribosoma tijekom translacije. Zastoj može biti uzrokovan različitim faktorima: prerana poliadenilacija, nagli prekid translacije ili promjene u sekundarnoj strukturi transkripta koje mogu fizički blokirati kretanje translacijskog kompleksa po transkriptu (Klauer i van Hoof 2012). Iako je uočeno smanjenje količine mutančnih proteina logična posljedica zastoja translacije, moguće je da se i mutančni AH CY proteini usmjeravaju u puteve razgradnje oštećenih ili krivo smotanih proteina u stanici. Poseban interes za istraživanje problematike razgradnje mRNA proizlazi iz činjenice da je dosada zabilježeno i nekoliko oboljenja uzrokovanih promijenjenom stabilnosti mRNA transkripata kao npr. vrlo česte mutacije u DEFB126 genu za koje se pretpostavlja da je homozigotno čak 20% muške populacije (Tollner i sur. 2011). U nekim slučajevima, kao kod nedostatka AH CY, dio mutančnih proteina koji se uspiju translirati su djelomično funkcionalni zbog čega se istražuju načini stabilizacije ili povećanja proizvodnje molekula mRNA u stanici. No da bi se upravljalo i modificiralo ovim procesima u terapijske svrhe, potrebno je i potpuno razumijevanje osnovnih principa funkcioniranja istih.

S obzirom da je količina materijala iz pacijenta s nedostatkom AH CY ograničena jer se radi o neimortaliziranim primarnim fibroblastima koji su ujedno zahtjevni za uzgoj i održavanje u kulturi, u svrhu daljnjih istraživanja su u sklopu doktorske disertacije izrađeni dodatni modelni stanični sustavi. Uz mutacije Y143C i Y328D potvrđene u fibroblastima pacijenta iz Strauss i sur. (Strauss i sur. 2015),

pripremljene su i stanične linije u kojima se stabilno eksprimiraju sve dosada poznate mutante AHCY označene s EGFP. Zabilježen je različit postotak smanjenja mRNA i proteina ovisno o mutaciji i drukčiji omjer količine mRNA i proteina. Ovo govori u prilog o kombiniranim mehanizmima razgradnje mRNA i proteina ovisno o promjenama koje mutacija uzrokuje. Putevi razgradnje proteina koji su krivo smotani te način na koji stanica odabire u koji od tih puteva će usmjeriti takve proteine su već poznati i dobro opisani, a uključuju: degradaciju pomoću 26S proteasoma, autofagijom ili autofagijom potpomognutom engl. *chaperon*-ima (Kraft i sur. 2010). Kako bi se potvrdilo o kojim se procesima radi, pripremljene stabilne stanice mogu poslužiti za engl. *pull down* proteina vezanih na mutantnu mRNA i/ili protein. Naime, za usmjeravanje mRNA transkripata u NGD proces su zaduženi proteini Dom34 i Hbs1 koji su povezani s faktorima terminacije translacije eRF1 i eRF3. MS analizom proteina vezanih na mutantnu mRNA bi dobili uvid u mehanizam razgradnje takvih transkripata, a isti pristup vrijedi i za istraživanje načina na koji stanica uklanja mutantne AHCY proteine. Dodatni pokusi koji bi rasvijetlili ove procese bi uključivali analizu sekundarne strukture mRNA metodama *in silico* i *in vitro*: očekuje se da mutante za koje je uočena manja razina mRNA u odnosu na protein u stabilnim linijama ujedno imaju i veće promjene sekundarne strukture mRNA.

Smanjena količina mutantnih proteina AHCY u stabilnim staničnim linijama se može uočiti i konfokalnom mikroskopijom prema intenzitetu fluorescencije EGFP proteina kojim je AHCY označen. No, ova oznaka na AHCY je od dodatnog značaja jer također omogućuje i istraživanje lokalizacije AHCY u stanicama. Važno je napomenuti da je već ranije u našoj grupi imunocitokemijom utvrđeno kako EGFP oznaka (kao i Venus fuzija) nema utjecaja na distribuciju AHCY divljeg tipa u stanici. Raspodjela mutantnih proteina u stanici između citoplazme i jezgre se može pratiti pomoću icn faktora koji odražava postotke proteina u jezgri u odnosu na citoplazmu, a na temelju kojega zaključujemo sljedeće promjene u odnosu na WT (osim kod mutante R49C): A89V, G71S, Y143C, Y328D mutante se nalaze više u jezgri, dok se više D86G proteina nalazi u citoplazmi. Pregledom i usporedbom ovih rezultata s dosadašnjim saznanjima o utjecaju mutacija na hidrolaznu aktivnost AHCY studijama *in vitro* nije primijećen trend između razine inaktivacije enzimске sposobnosti proteina i njegove lokalizacije u stanici; usporedba je prikazana u Tablici 15.

Tablica 15. Rezultati lokalizacije AHCY mutanti u stanicama stabilnih staničnih linija izrađenih u doktorskoj disertaciji. U tablici je prikazana usporedba lokalizacije proteina s prethodnim analizama hidrolazne aktivnosti AHCY mutanti u uvjetima *in vitro*. Icn faktor se računa prema formuli: $\text{icn} = \% \text{ jezgra} / \% \text{ citoplazma}$.

AHCY	% hidrolazne aktivnosti u odnosu na WT	Icn faktor	% jezgra	% citoplazma
WT	100	0,15	13	87
R49C	6,7	0,17	14	86
R49H	?	x	x	x
G71S	0*	0,21	18	82
D86G	15,5	0,11	10	90
A89V	22,7	0,28	22	78
W112STOP	0	x	x	x
Y143C	25	0,58	36	64
Y328D	0*	0,26	20	80

Postoji više pretpostavki zašto dolazi do promjena u unutarstaničnoj lokalizaciji mutanti AHCY. Moguće je da dolazi do pojačanog unošenja mutanti u jezgru u blizinu metiltransferaznih reakcija da bi se nadomjestila potrebna razina hidrolize SAH što je onemogućeno mutacijama. Također je moguće da zbog mutacija AHCY ne može stvoriti pravilnu trodimenzionalnu strukturu što utječe na interakcije s drugim proteinima i/ili mehanizme koji omogućuju ulazak i/ili izlazak AHCY iz jezgre. Odgovarajuća unutarstanična lokalizacija proteina je ključna jer daje fiziološki kontekst njegovoj funkciji, pa tako pogrešna lokalizacija proteina može uzrokovati krivu regulaciju aktivnosti, inaktivaciju (engl. *loss of function*) ili štetnu aktivnost proteina na neodgovarajućem mjestu (engl. *gain of function*). Unutarstanična lokalizacija također i određuje dostupnost proteina interakcijskim partnerima i posttranslacijskim kompleksima što je često nužno za integraciju proteina u funkcionalne biološke mreže (Klauer i van Hoof 2012). Kriva lokalizacija proteina koja pridonosi patogenezi mnogih bolesti je najčešće uzrokovana mutacijama u slijedovima koji služe za usmjeravanje i transport proteina kao npr. signali za ulaz i izlaz iz jezgre (engl. *nuclear import/export*). No u nekih oboljenja je zabilježena promjena u lokalizaciji proteina iako se mutacija nalazi izvan signalnih slijedova. Npr. mutacije u engl. *zinc finger* domeni transkripcijskog faktora AIRE mogu uzrokovati poliendokrinopatičnu-kandidaznu-ektodermalnu distrofiju jer onemogućuju ulazak proteina u jezgru iako je signalni slijed za ulazak u jezgru nepromijenjen (Bjorses i sur. 2000). Mutacije u AIRE stoga uzrokuju nepravilno smatanje proteina, preduvjet

potreban za njegov transport, što bi mogao biti slučaj i kod mutanti AHCY: nepravilna struktura onemogućuje prometovanje u/iz jezgre. Ključnu ulogu u pravilnoj lokalizaciji proteina mogu imati i posttranslacijske modifikacije. U engl. *Noonan-like* sindromu u protein SHOC2 se mutacijom uvodi novo mjesto N-miristoilacije zbog čega se protein nakon stimulacije stanice faktorima rasta pogrešno usmjerava na membranu stanice ili u jezgru (Cordeddu i sur. 2009).

Nastavak istraživanja dinamike AHCY u stanici je od interesa jer je ustanovljeno da iste mutacije u *ahcy* genu koje su vezane uz patološka stanja u pacijentima također uzrokuju i promjene u lokalizaciji proteina. Daljnji interes za istraživanje ove problematike proizlazi iz činjenice da u proteinskom slijedu AHCY nije pronađen niti jedan uobičajeni signal vezan uz prometovanje u/iz jezgre što znači da se radi o neuobičajenim načinima usmjeravanja proteina u stanici. Posttranslacijske modifikacije AHCY proteina također nisu dosada istraživane, a njihova potencijalna uloga u unutarstaničnoj dinamici AHCY potiče na analizu proteina AHCY i s ovoga aspekta. Rezultati dobiveni u doktorskoj disertaciji dakle mogu usmjeriti daljnji smjer istraživanja i što je svakako važnije, upućuju na to da bi ovaj modelni sustav bio koristan u budućim istraživanjima lokalizacije i dinamike AHCY, prvenstveno jer omogućuju da se budući eksperimentalni pristupi temelje na korištenju ljudskih stanica u kulturi.

5.3. Interaktom AHCY

Potreba za analizom interaktoma AHCY je proizašla iz pretpostavke da AHCY interagira s mnoštvom drugih molekula: AHCY se nalazi u središtu metilacijskih procesa stanice, a nalazimo ga u jezgri i citoplazmi stanica. Naša hipoteza bila je da AHCY pomoću interakcija može indirektno sudjelovati u staničnim procesima i putevima koji se direktno ne bi povezali uz enzim koji provodi vrlo specifičnu hidrolaznu reakciju. Tome u prilog ide činjenica da nedostatna aktivnost AHCY uzrokuje niz biokemijskih promjena, kliničkih simptoma i patoloških stanja različitih tkiva i organa. Istraživanje protein-protein interakcija izuzetno je ovisno o sustavu u kojem se istraživanje provodi jer proteinske interakcije mogu biti specifične u odnosu na tip stanice i njezino okruženje; činjenica koja je posebno važna za AHCY i pretpostavljeni spektar njegovih uloga. Iako je istraživanje interaktoma AHCY započeto korištenjem metode koimunoprecipitacije (coIP/MS; neobjavljeno), pokus je rađen u jednom tipu stanica, a osim toga navedena metoda ima i nekoliko tehničkih

nedostataka poput činjenice da se ne mogu detektirati slabe ili kratkotrajne interakcije i da se interakcije analiziraju izvan konteksta žive stanice. Potreba za dodatnom metodom koja će omogućiti istraživanje interaktoma AHCY u bilo kojoj staničnoj liniji, a samim time i u različitim uvjetima, potaknula je uvođenje i validaciju BiFC metode. Važno je napomenuti da ova metoda omogućuje praćenje proteinskih interakcija AHCY u živim stanicama s bilo kojim kandidatom iz banke ljudskih gena, hORFeome (Ohara, 2009) kojom raspolaže naš laboratorij. Validacija BiFC vektora i sustava se radila potvrdom već dobro poznate interakcije: samoasocijacije AHCY (Hu i sur. 2008) uz odgovarajuće negativne kontrole. Tijekom izrade vektora koji su kompatibilni s Gateway® sustavom kloniranja (Lepur i sur. 2016) riješeno je i nekoliko potencijalnih negativnih aspekata BiFC sustava poput potencijalne krivog smatanja ili lokalizacije proteina s fuzijom Venus, a daljnja validacija metode i prilagodba na visokoprotočno skeniranje je rađena u sklopu ove doktorske disertacije. Svi ispitivani proteini su označeni s N- i -C dijelom Venusa na oba kraja proteina (engl. *N and C fusion*). Testirano je 59 pozitivnih interakcija iz colP/MS rezultata, te je ukupno 49 potvrđeno visokoprotočnim skeniranjem metodom BiFC koristeći AHCY kao mamac. Na ovaj način se mogu utvrditi osjetljivost, specifičnost i ograničenja BiFC metode u odnosu na colP/MS te do koje mjere ove dvije metode mogu komplemetirati jedna drugoj da bi se omogućila što preciznija analiza interaktoma AHCY. U ovom istraživanju rezultati colP/MS i BiFC se preklapaju u 83% interakcijskih partnera AHCY. Svi nasumično odabrani partneri koji su dodatno detaljno analizirani su bili pozitivni. Preostalih 10 interakcija iz colP/MS rezultata koje nisu detektirani BiFC metodom potrebno je dodatno provjeriti, ali se pretpostavlja neka od sljedećih mogućnosti:

- interakcije su lažni pozitivi colP/MS metode;
- interakcije su snažne, ali je fluorescencija slaba (npr. interakcije na membranama) pa ih se skeniranjem nije moglo detektirati kao statistički značajne u odnosu na negativnu kontrolu;
- Venus fuzija u sve četiri topologije na potencijalnim interaktorima ometa interakciju s AHCY ili uzrokuje njihovo nepravilno smatanje i razgradnju.

Zbog svega navedenoga, jasno je da je potrebno interaktom bilo kojeg proteina, pa tako i AHCY, istraživati kombinacijom najmanje dvije metode. U ovoj doktorskoj disertaciji to je svakako dokazano na primjeru AHCY, te se smatra kako je visokoprotočno skeniranje sustavom BiFC-Gateway® efikasan pristup koji

komplementira coIP/MS metodi u svrhu boljeg razumijevanja uloga AHCY u stanici. Neke od dodatnih prednosti BiFC metode koje su uočene tijekom izrade doktorske disertacije su:

- negativne kontrole su bile efikasne na svakoj razini korištenja BiFC metode (visokoprotodne, detaljne analize, analize makromolekulrne stabilnosti *in vivo*);
- nije primjećena pojava nepravilnih struktura ili nedefiniranih nakupina fluorescencije koje bi se mogle smatrati artefaktima;
- proces izrade vektora za skeniranje je brz zbog Gateway® tehnologije;
- pozitivni interaktori pronađeni skeniranjem se mogu odmah nastaviti istraživati detaljnim analizama jer su vektori za transfekciju dostupni u pločama koje su se koristile za skeniranje;
- pripremljeni vektori se mogu koristiti u bilo kojem tipu stanica;
- osim informacije o tome da li je došlo do interakcije ili ne („da ili ne“ rezultat), moguće je dobiti dodatnu informaciju o jačini i lokalizaciji interakcije („gdje; kako; zašto“ rezultat koji određuje daljnji smjer istraživanja).

5.4. AHCY i oštećenje DNA

Kod svih slučajeva oboljenja nedostatka AHCY su uočeni različiti poremećaji jetre, a u najnovijem slučaju u pacijenta u odrasloj životnoj dobi (Stender i sur. 2015) smanjena aktivnost proteina AHCY je uzrokovala hepatocelularni rak. Već je naglašena važnost pravilne aktivnosti AHCY u održavanju vrijednosti metabolita metilacijskog ciklusa i posljedično pravilnih funkcija jetre kao visoko metabolički aktivnog organa. Zasad se može zaključiti da snažna inaktivacija AHCY uzrokuje brzu pojavu simptoma oboljenja nedostatka AHCY, dok se kod slabije inaktivacije simptomi pojavljuju kasnije kao posljedica kontinuirane izloženosti jetre stresu. Upravo zbog očitih implikacija AHCY u patološkim procesima jetre u ovoj doktorskoj disertaciji su u svrhu istraživanja uloga AHCY odabrane stanice hepatocelularnog karcinoma (Hep G2) kao osnova za pripremu modelnog staničnog sustava. Dodatan razlog je visoka ekspresija AHCY proteina u ovim stanicama (*The Human Protein Atlas*, <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000101444-AHCY/cell>), pa se pretpostavilo da će smanjenje aktivnosti AHCY uzrokovati izraženije promjene. Neravnoteža metilacijskog statusa koji primjećujemo u zdravim stanicama sa smanjenom aktivnosti AHCY bi mogao biti još veći u stanicama različitih vrsta raka. Stanice raka često pokazuju visoku metaboličku aktivnost nužnu da bi održale

agresivan fenotip opisan svojstvima stanica raka poznatima pod nazivom engl. *hallmarks of cancer* (Hanahan i Weinberg 2000): proliferacija, izbjegavanje supresora rasta, invazivnost i metastaziranje, replikativna besmrtnost, indukcija angiogeneze, izbjegavanje stanične smrti. Prema novim saznanjima 2011.-te godine u „*The hallmarks of cancer: Next generation*“ (Hanahan i Weinberg 2011): ova svojstva nadopunjuju isti autori: deregulacija stanične energetike i izbjegavanje imunološkog uništavanja. Stoga bi inače neželjene posljedice smanjenja aktivnosti AHCY za zdravu stanicu u slučaju stanica raka predstavljale poželjan efekt potencijalno koristan pri liječenju različitih vrsta raka kao što je prijavljeno u nekoliko nedavnih studija. Smanjenjem aktivnosti AHCY (utišavanjem s siRNA ili korištenjem AdOX inhibitora) se smanjuje invazivna sposobnost MDA-MB-231, MCF-7 i U87 stanica raka preko inhibicije Ras/Raf-1/ERK/AP-1 staničnog puta (Kim i sur. 2013). U MCF-7 stanicama s divljim i mutiranim p53 je predloženo nekoliko mehanizama pomoću kojih AHCY sudjeluje u smanjenju fenotipa raka (Park i sur. 2015). Obrnuti efekt je primijećen u ESCC stanicama karcinoma jednjaka (engl. *esophageal squamous cell carcinoma*): ekspresija AHCY je bila niža u odnosu na normalne stanice, a povećanje ekspresije AHCY je uzorkovalo apoptozu, inhibiciju stanične migracije i adhezije bez ustanovljenih promjena u proliferaciji i staničnom ciklusu (Li i sur. 2014). U dva priopćenja AHCY je povezan s neuroblastomom. Loša prognoza u pacijenata s engl. *MYCN-amplified* neuroblastomom je popraćena s povišenom razinom AHCY, PKMYT1 i BLM mRNA, a također je utvrđena i mutacija u AHCY za koju je sugerirano da bi mogla biti povezana sa sporim napretkom bolesti, čak i u agresivnim tipovima neuroblastoma (Novak i sur. 2016). Koktel inhibitora (male molekule) za CKS1B, AHCY, BLM i PKMYT1 je utjecao na rast staničnih linija neuroblastoma te selektivno uzrokovao smrt engl. *MYCN-amplified* stanica (Chayka i sur. 2014). U tri istraživanja kolorektalnog karcinoma je također implicirana veza s AHCY. Koristeći novu metodu *Hyperplex-MRM* s visokom preciznošću, osjetljivošću i reproducibilnošću AHCY je detektiran kao jedan od tri najvažnija biomarkera u tkivima kolorektalnog karcinoma u različitim stadijima (Yin i sur. 2013). U još jednoj opsežnoj studiji (Loo i sur. 2013) u >70% uzoraka kolorektalnog karcinoma je ustanovljena overekspresija gena s 20q11-20q13 amplikona među kojima se nalazi i AHCY. Metodom *aRNA-LongSAGE* (Fan i sur. 2011) je utvrđen novi potencijalni prognostički biomarker raka crijeva FERMT1, ali je i AHCY pronađen kao značajno povišeno eksprimirani gen.

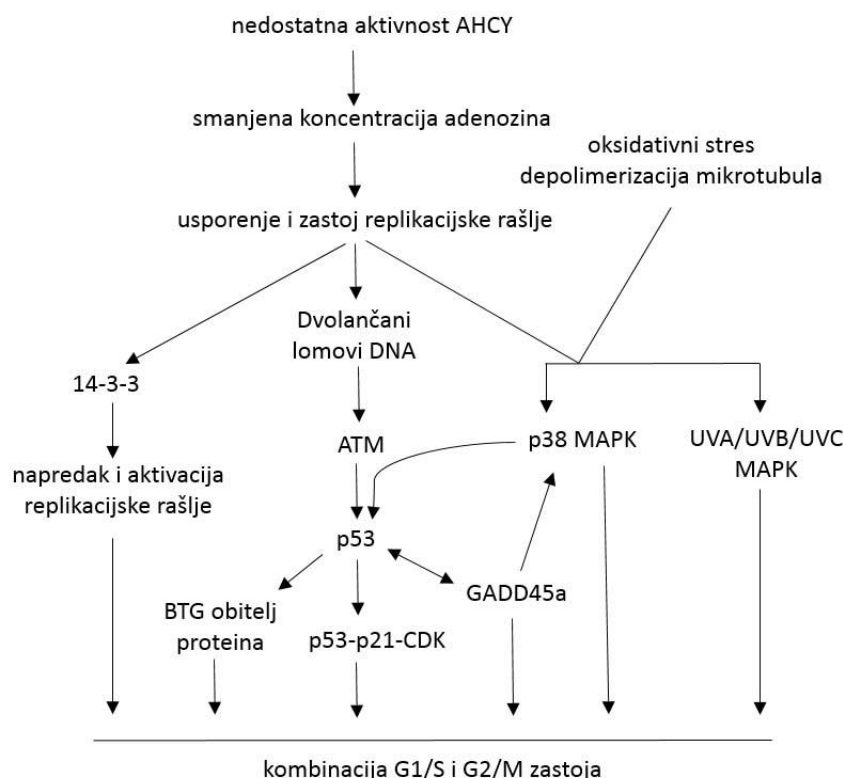
U ovoj doktorskoj disertaciji u Hep G2 stanicama je ekspresija proteina AHCY smanjena na 40% kontrolnih vrijednosti. Klasični testovi stanične biologije kojima se analiziraju proliferacija i migracija stanica su korišteni za procjenu općeg stanja stanice kod smanjene aktivnosti AHCY. Oba testa proliferacije su pokazala slično smanjenje od 15-20%, dok je migracijska sposobnost stanica smanjena za 45% u odnosu na kontrolu. Ove fenotipske promjene su potvrđene i omiks analizama, gdje su rezultati asocirani s različitim funkcionalnim poveznicama temeljenima na promjenama staničnog rasta i kretanja. Zbog preklapanja svih rezultata, omiks podaci su se smatrali validiranim kako bi se iz njih izvodile prediktivne hipoteze i planirale daljnje studije.

Iako je prema rezultatima očito da sniženje aktivnosti AHCY ima jednak efekt na staničnu proliferaciju i migraciju, razina smanjenja ova dva fenotipska pokazatelja se razlikuje. Prema tzv. engl. *go or grow* hipotezi migracija i proliferacija se međusobno prostorno i vremenski isključuju (Garay i sur. 2013), no u različitim vrsta tumora to ne mora biti tako. Ove fenotipske karakteristike su zasebno analizirane prvenstveno jer promjena u migraciji može, ali i ne mora nužno korelirati promjeni proliferacije, ali i zbog oprečnih rezultata studija iz literature u kojima je istraživana aktivnost AHCY u različitim tipovima raka.

Vrlo čest uzrok fenotipskih promjena stanica raka je vezan je uz regulaciju staničnog ciklusa (Rhind i Russell 2012): u sklopu ove disertacije Western blotom je analizirana razina 30 proteina vezanih uz stanični ciklus. Iz podataka koji su nakon statističke obrade prikazani shematski je očito da je promijenjeno nekoliko preklapajućih staničnih puteva koji se aktiviraju u stanici DNA oštećenjem. Uočena je i snažna aktivacija MEK/ERK puta, ali načinom neovisnim o klasičnoj signalizaciji preko Ras/Raf. Tek nakon analize omiks podataka ustanovljeno je da se radi o Ras/Raf-neovisnoj aktivaciji p38 MAPK puta kojom se signalizira DNA stres i oštećenje. Prema rezultatima je zaključeno da AHCY ima direktnu ili indirektnu ulogu u integritetu DNA i aktivaciji signalnih puteva kojima se zaustavlja stanični ciklus da bi se oštećenja u DNA popravila. Konkretni odgovori stanice na oštećenja koja nastaju zbog zastoja replikacijske rašlje i predloženi mehanizam su prikazani na Slici 33 i detaljnije opisani niže u tekstu. Tijekom replikacije DNA stanici je potrebno osigurati dovoljnu količinu „mašinerije“ i „materijala“ za brzu progresiju replikacijskih rašlji. Ukoliko tijekom replikacije dođe do ograničenih količina ili deplecije deoksinukleotid trifosfata (dNTP), DNA polimeraza će usporiti ili stati što se naziva zastojem

replikacijske rašlje. Prema rezultatima iz ove doktorske disertacije, pretpostavlja se da zbog nedostatne aktivnosti AHCY dolazi do drastičnog smanjenja produkata hidrolize: adenzina i homocisteina. Adenzin predstavlja neophodan prekursor prilikom replikacije DNA, a za pretpostaviti je da stanice raka zahtijevaju veće količine materijala od uobičajenih zbog povišene stanične aktivnosti. Nedovoljna količina adenzina dakle uzrokuje zastoj replikacijske rašlje koji je ponekad reverzibilan, ali često rezultira raspadom rašlje i nastankom dvolančanih lomova u DNA. Dvolančani lomovi DNA koji nastaju zbog zakočenih replikacijskih rašlji aktiviraju ATM protein, tj. mašineriju za popravak lomova DNA. Tijekom produljenih zastoja replikacijskih rašlji, što je vjerojatan slučaj prilikom nedostatka adenzina, ATM aktivira i p53 protein. Tumor supresor p53 ovisni odgovor na stres često je povezan s mnogim vrstama tumora, a djeluje međuostalim i na način da aktivira transkripciju p21 tj. p53–p21–CDK regulatorni modul. Direktna transkripcijska meta p53 proteina je i BTG obitelj proteina što utječe na njihovu ulogu u supresiji tumora i odgovoru na oštećenje DNA zabilježenu u različitim staničnim tipovima (Winkler 2010). U usporenim i zaustavljenim replikacijskim rašljama jednolančana DNA je nezaštićena što se također smatra jakim staničnim stresom. Ovaj stres signalizira se stanici u obliku fosforilacije različitih proteina prepoznate od strane 14-3-3 proteina. 14-3-3 proteini stabiliziraju jednolančanu DNA u rašlji ili potiču progresiju i ponovnu aktivaciju replikacije zaustavljene zbog ograničenih koncentracija nukleotida (Engels i sur. 2011). Najpoznatiji put aktivacije MEK/ERK puta je tzv. Ras–Raf–MEK–ERK mitogen-aktivirani protein kinazni (MAPK) put aktivacije transkripcije preko CiklinaD (Morrison, 2012). U ovoj doktorskoj disertaciji nije uočena aktivacija Ras/Raf nego nešto neuobičajenija aktivacija tzv. MAPK-ovisne stresne kontrolne točke (engl. *MAPK-dependent stress checkpoint*) p38 MAPK putem (Zhang i Liu 2002). Zaključeno je da određen postotak replikacijskih rašlji vrlo spore progresije direktno aktivira p38 MAPK put, ali i UVA, UVB UVC MAPK puteve jer oštećenja DNA koja nastaju zastojem rašlji imitiraju oštećenja nastala UV radijacijom. p38 MAPK kontrolni mehanizam stanice aktivira se i nizom drugih oblika staničnog stresa, pa se smatra važnim napomenuti da su oksidativni stres i depolimerizacija mikrotubula također bili među rezultatima omiks metoda (nije prikazano u rezultatima). GADD45 obitelj proteina, od kojih je najpoznatiji i prvi otkriveni član Gadd45a je često induciran DNA oštećenjem i drugim stresnim signalima povezanim uz stanični zastoj i apoptozu. Iako su *in vivo* zabilježene različite uloge ovisno o tkivima i staničnim tipovima,

mnoge su povezane upravo uz signalizaciju preko p38 MAPK puta (direktno ili aktivacijom uzvodnih kinaza). Osim što može pridonositi aktivaciji p53 preko p38 MAPK, Gadd45a također može biti i sam reguliran od strane p53 (Salvador i sur. 2013). Iz podataka se može zaključiti da aktivnost AHCY ima važnu ulogu u održavanju integriteta DNA i da sudjeluje u signalizaciji DNA oštećenja u stanici. Daljnji smjer istraživanja podrazumijeva validaciju predloženog mehanizma, a predlažu se sljedeći pokusi: analiza staničnog ciklusa protočnom citomerijom, analiza DNA oštećenja u stanici (Comet test, imunocitokemija na markere oštećenja), mjerenje razine adenoizina u staničnim lizatima (HPLC).



Slika 33. Shematski prikaz predloženog mehanizma zastoja staničnog ciklusa u Hep G2 stanicama nakon utišavanja AHCY. ATM, Ataxia Telangiectasia Mutated serin/treonin kinaza; UVA/UVB/UVC MAPK- mitogen aktivirana fosfokinaza aktivirana pomoću ultraljubičastog zračenja A/B/C; CDK, ciklin ovisna kinaza; BGT, protein kodiran s engl. *B-cell translocation gene*.

Osim istraživanih Hep G2 stanica, prema predloženom mehanizmu pretpostavlja se da bi smanjenje aktivnosti AHCY moglo uzrokovati oštećenje DNA i u drugim tipovima raka u kojima je AHCY jače eksprimiran ili koje zbog visoke metaboličke i replikativne aktivnosti zahtijevaju veće koncentracije adenoizina. Ovisno

o načinu signalizacije DNA oštećenja u pojedinom tipu raka pretpostavlja se aktivacija različitih staničnih puteva. Razlike u signalizaciji mogu uzrokovati zastoj staničnog ciklusa u drugoj kontrolnoj točki i varijaciju fenotipskih promjena u odnosu na one uočene u Hep G2. Ovo objašnjava i varijaciju rezultata dosadašnjih studija opisanih u literaturi u kojima smanjenje AHCY u različitim stanicama raka nije uzrokovalo istovjetne promjene. Suprotno tome, pretpostavlja se da konstantno niska razina aktivnosti AHCY uzrokuje kroničnu nisku razinu oštećenja DNA što u nekarcinogenim stanicama može uzrokovati stanje stalnog stresa, jednog od uzročnika genetičke nestabilnosti i posljedične pojave raka kao u slučaju nedostatka AHCY opisanom od Stender i suradnika (Stender i sur. 2015).

5.5. Uloge AHCY i probir biomarkera

Omiks pristupom se dobila potpuna slika mehanizma staničnog zastoja u Hep G2 stanicama nakon utišavanja AHCY, međutim ovi podaci su se također koristili za usporedbu s omiks podacima fibroblasta pacijenta. Uočene su promjene u nekim univerzalnim staničnim putevima, ali i specifične uloge AHCY u odnosu na tip i stanje stanice. Npr. mehanizmi zastoja staničnog ciklusa u Hep G2 stanicama nisu pronađeni u skupu podataka iz fibroblasta. U prilog ovome ide činjenica o niskoj razini ekspresije AHCY (*The Human Protein Atlas*, <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000101444-AHCY/cell>) i općenite manje stanične aktivnosti fibroblasta u odnosu na Hep G2 stanice. Za očekivati je da u visokoproliferirajućim stanicama raka postoji puno veći broj replikacijskih rašlji u odnosu na fibroblaste, pa njihova kompromitiranost zbog nedostatka adenozina uzrokuje i snažniji odgovor stanice. Suprotno tome u fibroblastima je zabilježena aktivacija puteva vezanih uz jetrene bolesti i mehanizme nastanka raka, što upućuje na to da kronični slabi nedostatak AHCY može uzrokovati patološka stanja kao što je primjećeno u prijavljenom slučaju nedostatka AHCY u pacijenta broj 9 u Tablici 3 (Stender i sur. 2015). Nadalje, fibroblasti mogu poslužiti i kao dobar izvor predikcijskih podataka o stanjima drugih organa ili staničnih tipova. U rezultatima vidimo niz patoloških stanja koja se podudaraju s već opisanim kliničkim simptomima nedostatka AHCY kao što su mišićne ili neurorazvojne bolesti, no važno je obratiti pažnju na podatke koji se preklapaju s raznim drugim nasljednim i rijetkim poremećajima na razini molekularnih mehanizama. Predikcije koje su temeljene na globalnoj analizi pojedinačnih molekula omogućuju upravo da se navedeni procesi i

stanja analiziraju na molekularnoj razini. Dobar primjer su mehanističke mreže u kojima se AHCY preko interakcije s GRB2 povezuje s dodatnim molekulama iz našeg skupa podataka (Breitkopf i sur. 2012). Zajedno s informacijama o međudjelovanju molekula predviđa se utjecaj na stanične procese: ekspresiju gena, DNA replikaciju, rekombinaciju i popravak, te procese vezane uz neurološke bolesti.

Na temelju analize transkriptoma i proteoma fibroblasta, u ovoj doktorskoj disertaciji predloženi su i potencijalni biomarkeri za oboljenje nedostatka AHCY. Iako se serum smatra najboljim izvorom proteinskih biomarkera jer cirkulira kroz i dolazi u kontakt sa svim tkivima, također je i jedan od najkompleksnijih ljudskih proteoma sa širokim dinamičkim rasponom koncentracija (Seibert i sur. 2005). Svi biomarkeri pronađeni u fibroblastima se stoga trebaju dodatno detaljno istražiti, ali na prvi pogled posebno interesantnima se čine dva kandidata. Jedini biomarker koji je predviđen u slini je B2M (engl. *beta-2-microglobulin*): transmembranski receptor na staničnoj membrani. Prema *BiomarkerBase* (<https://www.biomarkerbase.com/>, siječanj 2017.), mjerenja B2M se već koriste u kontekstu 39 bolesnih stanja i 76 kliničkih studija pomoću 8 dostupnih laboratorijskih testova. Iako je omjer promjene od -0,332 u podacima iz fibroblasta nizak, moguće je da je promjena B2M viša u slini, te bi svakako daljnim studijama bilo korisno istražiti raspon vrijednosti B2M u različitim oboljenja s poremećajima metilacije. Drugi biomarker predviđen u krvi, plazmi, serumu i urinu je P4HB (engl. *prolyl 4-hydroxylase subunit beta*). Ovaj citoplazmatski enzim je interesantan zbog vrlo velike promjene omjera uočene u našem skupu podataka od -39,070. Iako se pretraživanjem literature nailazi na nekoliko studija u kojima se P4HB predlaže kao biomarker, u *BiomarkerBase* nije zabilježen niti jedan dostupan laboratorijski test, te posljedično nijedna klinička studija u kojoj se prati ovaj protein. No potreba za korištenjem PH4B kao biomarkera vidi se po primjeru patenta odobrenog 2015.-te godine engl. *Markers for endometrial cancer* (US 9046522 B2) u kojem se RT-qPCR-om mjeri razina P4HB i GMIP. S obzirom na očitu veliku promjenu u našem skupu podataka, od interesa je nakon izrade ove doktorske disertacije pratiti tržište laboratorijskih testova, da bi se što prije detaljnije istražio ovaj biomarker u kontekstu nedostatka AHCY.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Kod pacijenta broj 8 (Tablica 3) sa simptomima koji su upućivali na metilacijski poremećaj (Strauss i sur. 2015) otkrivena je prethodno opisana mutacija Y143C te nova mutacija Y328D u genu *ahcy*.
2. Mutacije Y143C i Y328D dovode do smanjene razine mRNA i proteina AHCY u stanicama fibroblasta pacijenta broj 8 (Tablica 3).
3. Mutantu Y328D nije bilo moguće eksprimirati u heterolognom sustavu uz produljeno trajanje i smanjenu temperaturu ekspresije ili uz dodatak benzilnog alkohola.
4. Mutacija Y328D u proteinu AHCY onemogućuje dimerizaciju proteina AHCY u ljudskim stanicama u kulturi.
5. Metoda komplementacije dviju molekula fluorescencijom je prilagođena na visokoprotlačno skeniranje interakcijskih partnera proteina AHCY.
6. Svi interaktori AHCY koji su dodatno ispitivani nakon identifikacije skeniranjem metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom su pozitivni.
7. Mutacije A89V, D86G, G71S, R49C, Y143C i Y328D dovode do smanjene razine mRNA i proteina AHCY u stanicama sa stabilno eksprimirajućim mutiranim proteinima AHCY.
8. U stanicama sa stabilno eksprimirajućim mutiranim proteinima AHCY, mutacije A89V, G71S, Y143C i Y328D dovode do povećanja količine proteina AHCY u jezgri stanica, mutacija D86G dovodi do smanjenja količine proteina AHCY u jezgri, dok mutacija R49C ne uzrokuje promjene u lokalizaciji u odnosu na divlji tip.
9. Proliferacija i migracija stanica hepatocelularnog karcinoma se smanjuje nakon utišavanja ekspresije nativnog gena *ahcy* na $\approx 42\%$ vrijednosti ekspresije kontrolnih stanica.
10. U stanicama hepatocelularnog karcinoma s utišanom ekspresijom gena *ahcy* aktiviraju se stanični putevi kojima se signalizira oštećenje DNA.
11. Aktivnost proteina AHCY je povezana s patologijom neuroloških, jetrenih i mišićnih oboljenja, zatim oboljenja vezivnog tkiva i sa sljedećim staničnim procesima: ekspresijom gena, DNA replikacijom, DNA rekombinacijom i DNA popravkom.

12. B2M (engl. *beta-2-microglobulin*) i P4HB (engl. *prolyl 4-hydroxylase subunit beta*) su dva predložena potencijalna prognostička i dijagnostička biomarkera oboljenja nedostatka AHCY.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- [1] Avila, M. A., Berasain, C., Torres, L., Martín-Duce, A., Corrales, F. J., Yang, H., Prieto, J., Lu, S. C., Caballería, J., Rodés, J. i Mato, J. M. (2000). Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 33(6), 907–14.
- [2] Barić, I., Fumić, K., Glenn, B., Ćuk, M., Schulze, A., Finkelstein, J. D., James, S. J., Mejaški-Bošnjak, V., Pažanin, L., Pogribny, I. P., Radoš, M., Sarnavka, V., Šćukanec-Špoljar, M., Allen, R. H., Stabler, S., Uzelac, L., Vugrek, O., Wagner, C., Zeisel, S. i Mudd, S. H. (2004). S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4234–4239.
- [3] Barić, I., Ćuk, M., Fumić, K., Vugrek, O., Allen, R. H., Glenn, B., Maradin, M., Pažanin, L., Pogribny, I., Radoš, M., Sarnavka, V., Schulze, A., Stabler, S., Wagner, C., Zeisel, S. H. i Mudd, S. H. (2005). S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(6), 885–902.
- [4] Belužić, R., Ćuk, M., Pavkov, T., Barić, I. i Vugrek, O. (2008). S-Adenosylhomocysteine hydrolase (AdoHcyase) deficiency: Enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(1), 30–36.
- [5] Belužić, R., Ćuk, M., Pavkov, T., Fumić, K., Barić, I., Mudd, S. H., Jurak, I. i Vugrek, O. (2006). A single mutation at Tyr143 of human S -adenosylhomocysteine hydrolase renders the enzyme thermosensitive and affects the oxidation state of bound cofactor nicotinamide–adenine dinucleotide. *Biochemical Journal*, 400(2), 245–253.
- [6] Belužić, Robert i Vugrek, O. (2010). S-ADENOSYLHOMOCYSTEINE HYDROLASE (AHCY) DEFICIENCY: A NATURAL MODEL SYSTEM FOR METHYLATION RESEARCH. *Rad Hrvatske Akademije Znanosti i Umjetnosti. Medicinske Znanosti*, 508(35), 77.

- [7] Björnses, P., Halonen, M., Palvimo, J. J., Kolmer, M., Aaltonen, J., Ellonen, P., Perheentupa, J., Ulmanen, I. i Peltonen, L. (2000). Mutations in the AIRE Gene: Effects on Subcellular Location and Transactivation Function of the Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis–Ectodermal Dystrophy Protein. *The American Journal of Human Genetics*, 66(2), 378–392.
- [8] Bonetta, L. (2010). Protein–protein interactions: Interactome under construction. *Nature*, 468(7325), 851–854.
- [9] Breitkopf, S. B., Yuan, M., Pihan, G. A. i Asara, J. M. (2012). Detection of a rare BCR-ABL tyrosine kinase fusion protein in H929 multiple myeloma cells using immunoprecipitation (IP)-tandem mass spectrometry (MS/MS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16190–5.
- [10] Buist, N. R. M., Glenn, B., Vugrek, O., Wagner, C., Stabler, S., Allen, R. H., Pogribny, I., Schulze, A., Zeisel, S. H., Barić, I. I Mudd, S. H. (2006). S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *Journal of inherited metabolic disease*, 29(4), 538–45.
- [11] Chayka, O., D’Acunto, C. W., Middleton, O., Arab, M. i Sala, A. (2015). Identification and pharmacological inactivation of the MYCN gene network as a therapeutic strategy for neuroblastic tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 290(4), 2198–212.
- [12] Clarke, S. i Banfield, K. (2001). S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. U *Homocysteine in health and disease* (Sv. 131). Jacobsen Cambridge University Press, 387–388.
- [13] Cordeddu, V., Di Schiavi, E., Pennacchio, L. A., Ma’ayan, A., Sarkozy, A., Fodale, V., Cecchetti, S., Cardinale, A., Martin, J., Schackwitz, W., Lipzen, A., Zampino, G., Mazzanti, L., Digilio, M. C., Martinelli, S., Flex, E., Lepri, F., Bartholdi, D., Kutsche, K., Ferrero, G. B., Anichini, C., Selicorni, A., Rossi, C., Tenconi, R., Zenker, M., Merlo, D., Dallapiccola, B., Iyengar, R., Bazzicalupo, P., Gelb, B. D. i Tartaglia, M. (2009). Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nature genetics*, 41(9), 1022–6.
- [14] Cornell, K. A. i Riscoe, M. K. (1998). Cloning and expression of Escherichia coli 5’-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase: identification of the pfs gene product. *Biochimica et biophysica acta*, 1396(1), 8–14.

- [15] de la Haba, G. i Cantoni, G. L. (1959). The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *The Journal of biological chemistry*, 234(3), 603–8.
- [16] Duce, A. M., Ortíz, P., Cabrero, C. i Mato, J. M. (1988). S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology*, 8(1), 65–8.
- [17] Duronio, R. J. i Xiong, Y. (2013). Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a008904–a008904.
- [18] Engels, K., Giannattasio, M., Muzi-Falconi, M., Lopes, M. i Ferrari, S. (2011). 14-3-3 Proteins regulate exonuclease 1-dependent processing of stalled replication forks. *PLoS genetics*, 7(4), e1001367.
- [19] Fan, J., Yan, D., Teng, M., Tang, H., Zhou, C., Wang, X., Li, D., Qiu, G. i Peng, Z. (2011). Digital transcript profile analysis with aRNA-LongSAGE validates FERMT1 as a potential novel prognostic marker for colon cancer. *Clinical cancer research*, 17(9), 2908–18.
- [20] Fields, S. I Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246.
- [21] Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of nutritional biochemistry*, 1(5), 228–37.
- [22] Fujioka, M. I Takata, Y. (1981). S-Adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties. *The Journal of biological chemistry*, 256(4), 1631–5.
- [23] Fumić, K., Belužić, R., Ćuk, M., Pavkov, T., Kloor, D., Barić, I., Mijić, I. i Vugrek, O. (2006). Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *European journal of human genetics*, 15(3), 347–51.
- [24] Garay, T., Juhász, É., Molnár, E., Eisenbauer, M., Czirók, A., Dekan, B., László, V., Hoda, M. A., Döme, B., Tímár, J., Klepetko, W., Berger, W. i Hegedűs, B. (2013). Cell migration or cytokinesis and proliferation? – Revisiting the “go or grow” hypothesis in cancer cells in vitro. *Experimental Cell Research*, 319(20), 3094–3103.

- [25] Gaull, G. E. i Tallan, H. H. (1974). Methionine adenosyltransferase deficiency: new enzymatic defect associated with hypermethioninemia. *Science*, 186(4158), 59–60.
- [26] Grbeša, I., Kalo, A., Belužić, R., Kovačević, L., Lepur, A., Rokić, F., Hochberg, H., Kanter, I., Simunović, V., Muñoz Torres, P. M., Shav-Tal, Y., Vugrek, O. (2017). Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *European Journal of Cell Biology*, prihvaćen za objavljivanje 3.5.2017.
- [27] Greer, E. L. i Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews. Genetics*, 13(5), 343–57.
- [28] Grubbs, R., Vugrek, O., Deisch, J., Wagner, C., Stabler, S., Allen, R., Barić, I., Rados, M. i Mudd, S. H. (2010). S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *Journal of inherited metabolic disease*, 33(6), 705–13.
- [29] Hanahan, D. i Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- [30] Hanahan, D. i Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- [31] Havugimana, P. C., Hart, G. T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A. L., Li, Z., Wang, P. I., Boutz, D. R., Fong, V., Phanse, S., Babu, M., Craig, S. A., Hu, P., Wan, C., Vlasblom, J., Dar, V.-N., Bezginov, A., Clark, G. W., Wu, G. C., Wodak, S. J., Tillier, E. R. M., Paccanaro, A., Marcotte, E. M. i Emili, A. (2012). A census of human soluble protein complexes. *Cell*, 150(5), 1068–81.
- [32] Honzík, T., Magner, M., Krijt, J., Sokolová, J., Vugrek, O., Belužić, R., Barić, I., Hansíková, H., Elleder, M., Veselá, K., Bauerová, L., Ondrušková, N., Ješina, P., Zeman, J. i Kožich, V. (2012). Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 107(3), 611–3.
- [33] Hsueh, C.-T., Liu, D. i Wang, H. (2013). Novel biomarkers for diagnosis, prognosis, targeted therapy and clinical trials. *Biomarker Research*, 1(1), 1.
- [34] Hu, C., Fang, J., Borchardt, R. T., Schowen, R. L. i Kuczera, K. (2008). Molecular dynamics simulations of domain motions of substrate-free S-adenosyl- L-homocysteine hydrolase in solution. *Proteins*, 71(1), 131–43.

- [35] Katz, J. E., Dlakić, M. i Clarke, S. (2003). Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Molecular & cellular proteomics*, 2(8), 525–40.
- [36] Kim, J. H. J. H., Kim, J. H. J. H., Kim, S. C., Yi, Y.-S., Yang, W. S., Yang, Y., Kim, H. G., Lee, J. Y., Kim, K.-H., Yoo, B. C., Hong, S. i Cho, J. Y. (2013). Adenosine dialdehyde suppresses MMP-9-mediated invasion of cancer cells by blocking the Ras/Raf-1/ERK/AP-1 signaling pathway. *Biochemical pharmacology*, 86(9), 1285–300.
- [37] Klauer, A. A. i van Hoof, A. (2012). Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley interdisciplinary reviews.*, 3(5), 649–60.
- [38] Kloor, D., Hermes, M., Fink, K., Schmid, H., Klingel, K., Mack, A., Grenz, A. i Osswald, H. (2007). Expression and localization of S-adenosylhomocysteine-hydrolase in the rat kidney following carbon monoxide induced hypoxia. *Cellular physiology and biochemistry*, 19(1–4), 57–66.
- [39] Kraft, C., Peter, M. i Hofmann, K. (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature cell biology*, 12(9), 836–41.
- [40] Kudla, J. i Bock, R. (2016). Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *The Plant cell*, 28(5), 1002–8.
- [41] Lee, S., Doxey, A. C., McConkey, B. J. i Moffatt, B. A. (2012). Nuclear targeting of methyl-recycling enzymes in *Arabidopsis thaliana* is mediated by specific protein interactions. *Molecular plant*, 5(1), 231–48.
- [42] Lepur, A., Kovačević, L., Belužić, R. i Vugrek, O. (2016). Combining Unique Multiplex Gateway Cloning and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) for High-Throughput Screening of Protein-Protein Interactions. *Journal of biomolecular screening*, 21(10), 1100–1111.
- [43] Li, Q., Mao, L., Wang, R., Zhu, L. i Xue, L. (2014). Overexpression of S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines: effects on apoptosis, migration and adhesion of cells. *Molecular biology reports*, 41(4), 2409–17.
- [44] Lu, S. C. i Mato, J. M. (2012). S-adenosylmethionine in Liver Health, Injury, and Cancer. *Physiological Reviews*, 92(4), 1515–1542.

- [45] Miller, M. W., Duhl, D. M., Winkes, B. M., Arredondo-Vega, F., Saxon, P. J., Wolff, G. L., Epstein, C. J., Hershfield, M. S. i Barsh, G. S. (1994). The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcy) gene. *The EMBO journal*, 13(8), 1806–16.
- [46] Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a011254.
- [47] Motzek, A., Knežević, J., Switzeny, O. J., Cooper, A., Barić, I., Beluzić, R., Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Mudd, S. H., Vugrek, O., Zechner, U., Belužić, R., Strauss, K. A., Puffenberger, E. G., Mudd, S. H., Vugrek, O. i Zechner, U. (2016). Abnormal Hypermethylation at Imprinting Control Regions in Patients with S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (AHCY) Deficiency. *PloS one*, 11(3), e0151261.
- [48] Mourelatos, Z. (2008). Small RNAs: The seeds of silence. *Nature*, 455(7209), 44–45.
- [49] Mudd, S. H., Cerone, R., Schiaffino, M. C., Fantasia, A. R., Minniti, G., Caruso, U., Lorini, R., Watkins, D., Matiaszuk, N., Rosenblatt, D. S., Schwahn, B., Rozen, R., LeGros, L., Kotb, M., Capdevila, A., Luka, Z., Finkelstein, J. D., Tangerman, A., Stabler, S. P., Allen, R. H. i Wagner, C. (2001). Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *Journal of inherited metabolic disease*, 24(4), 448–64.
- [50] Novak, E. M., Halley, N. S., Gimenez, T. M., Rangel-Santos, A., Azambuja, A. M. P., Brumatti, M., Pereira, P. L., Vince, C. S. C., Giorgi, R. R., Bendit, I., Cristofani, L. M. i Odone-Filho, V. (2016). BLM germline and somatic PKMYT1 and AHCY mutations: Genetic variations beyond MYCN and prognosis in neuroblastoma. *Medical hypotheses*, 97, 22–25.
- [51] Ohara, O. (2009). ORFeome Cloning. U *Reverse Chemical Genetics, Methods and Protocols, Methods in molecular biology* (Sv. 577) Humana Press, 3–9.
- [52] Palmer, J. L. i Abeles, R. H. (1979). The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *The Journal of biological chemistry*, 254(4), 1217–26.
- [53] Park, S. J., Kong, H. K., Kim, Y. S., Lee, Y. S. i Park, J. H. (2015). Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase decreases cell mobility and cell proliferation through cell cycle arrest. *American journal of cancer research*, 5(7), 2127–38.

- [54] Picker, J. D. i Levy, H. L. (1993). *Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency*. U *GeneReviews*[®]. University of Washington, Seattle.
- [55] Radomski, N., Kaufmann, C. i Dreyer, C. (1999). Nuclear accumulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in transcriptionally active cells during development of *Xenopus laevis*. *Molecular biology of the cell*, 10(12), 4283–98.
- [56] Radomski, N., Barreto, G., Kaufmann, C., Yokoska, J., Mizumoto, K. i Dreyer, C. (2002). Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus laevis* with mRNA(guanine-7-)methyltransferase: implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1590(1–3), 93–102.
- [57] Ragsdale, S. W. (2008). Catalysis of methyl group transfers involving tetrahydrofolate and B(12). *Vitamins and hormones*, 79, 293–324.
- [58] Ramanan, V. K., Shen, L., Moore, J. H. i Saykin, A. J. (2012). Pathway analysis of genomic data: concepts, methods, and prospects for future development. *Trends in genetics*, 28(7), 323–32.
- [59] Rhind, N. i Russell, P. (2012). Signaling Pathways that Regulate Cell Division. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), a005942–a005942.
- [60] Robertson, K. D. i Jones, P. A. (2000). DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21(3), 461–7.
- [61] Salvador, J. M., Brown-Clay, J. D. i Fornace, A. J. (2013). GADD45 IN STRESS SIGNALING, CELL CYCLE CONTROL, AND APOPTOSIS. U *Advances in Experimental Medicine and Biology, Gadd45 Stress Sensor Genes*, (Sv. 793), Springer-Verlag New York, 1-3.
- [62] Seibert, V., Ebert, M. P. A. i Buschmann, T. (2005). Advances in clinical cancer proteomics: SELDI-ToF-mass spectrometry and biomarker discovery. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 4(1), 16–26.
- [63] Stender, S., Chakrabarti, R. S., Xing, C., Gotway, G., Cohen, J. C. i Hobbs, H. H. (2015). Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 116(4), 269–74.
- [64] Strauss, K. A., Ferreira, C., Bottiglieri, T., Zhao, X., Arning, E., Zhang, S., Zeisel, S. H., Escolar, M. L., Presnick, N., Puffenberger, E. G., Vugrek, O., Kovačević, L., Wagner, C., Mazariegos, G. V, Mudd, S. H. i Soltys, K. (2015).

- Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 116(1–2), 44–52.
- [65] Strimbu, K. i Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–6.
- [66] Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y., Shiraiwa, K., Yabe, S., Ito, Y., Kitade, Y. i Nakamura, K. T. (2004). Crystal Structure of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase from the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology*, 343(4), 1007–1017.
- [67] Tehlivets, O., Malanovic, N., Visram, M., Pavkov-Keller, T. i Keller, W. (2013). S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(1), 204–15.
- [68] Tollner, T. L., Venners, S. A., Hollox, E. J., Yudin, A. I., Liu, X., Tang, G., Xing, H., Kays, R. J., Lau, T., Overstreet, J. W., Xu, X., Bevins, C. L. i Cherr, G. N. (2011). A Common Mutation in the Defensin DEFB126 Causes Impaired Sperm Function and Subfertility. *Science Translational Medicine*, 3(92), 92ra65-92ra65.
- [69] Turner, M. A., Yang, X., Yin, D., Kuczera, K., Borchardt, R. T. i Howell, P. L. (2000). Structure and Function of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 33(2), 101–125.
- [70] Vermillion, K. L., Lidberg, K. A. i Gammill, L. S. (2014). Cytoplasmic protein methylation is essential for neural crest migration. *The Journal of cell biology*, 204(1), 95–109.
- [71] Vugrek, O., Belužić, R., Nakić, N., & Mudd, S. H. (2009). S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Human mutation*, 30(4), E555-65.
- [72] Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286(5446), 1888–93.
- [73] Winkler, G. S. (2010). The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1), 66–72.
- [74] Yin, H.-R., Zhang, L., Xie, L.-Q., Huang, L.-Y., Xu, Y., Cai, S.-J., Yang, P.-Y. i Lu, H.-J. (2013). Hyperplex-MRM: a hybrid multiple reaction monitoring method using mTRAQ/iTRAQ labeling for multiplex absolute quantification of human colorectal cancer biomarker. *Journal of proteome research*, 12(9), 3912–9.

- [75] Zhang, W. i Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9–18.

8. POPIS KRATICA

9. POPIS ILUSTRACIJA

8. POPIS KRATICA

Ado - Adenozin

AHCY – S-adenozilhomocistein hidrolaza

g/ mg / kg – gram / miligram / kilogram

kDa - kiloDalton

Hyc - Homocistein

kV- kiloVolt

LNG –Laboratorij za naprednu genomiku

Met - Metionin

MiliQ voda – ultračista voda, tip 1 (MERCK MILLIPORE, Synergy®)

ml - mililitar

rpm – engl. *revolutions per minute*

SAD – Sjedinjene Američke Države

SAH – S-adenozilhomocistein

SAM – S-adenozilmetionin

sek / min – sekunda / minuta

Ω – Ohm

μF – mikroFarad

9. POPIS ILUSTRACIJA

9.1. Slike

Slika 1. Shematski prikaz ciklusa metionina i razgradnje SAH pomoću proteina AHCY.

Slika 2. Shematski prikaz uloge AHCY u ciklusu metionina i metilacijskim procesima u zdravoj stanici i stanici s nedostatnom aktivnošću proteina AHCY.

Slika 3. Shematski prikaz strukture gena *ahcy*.

Slika 4. Shema integriranog pristupa istraživanju uloga AHCY.

Slika 5. Mapa vektora **pET32_AHCY** (≈ 6 kb; LNG).

Slika 6. Mapa vektora **pEGFP_AHCY** (≈ 6 kb; LNG).

Slika 7. Mapa vektora **pDONR223** (veličina ovisna o ukloniranom ishodištu replikacije; hORFeome).

Slika 8. Mape **BiFC vektora** (NfN 7985 pb; NfC 7712 pb; CfN 7944 pb; CfC 7713 pb; LNG).

Slika 9. Lentiviralni shMISSION plazmidni vektor (≈7 kB; SIGMA-ALDRICH).

Slika 10. Prikaz slijeda egzona 4 i 9 gena *ahcy*, te uzvodnih i nizvodnih slijedova.

Slika 11. Shematski prikaz SILAC metode spregnute s LC-MS/MS.

Slika 12. **Lijevo:** Pojednostavljena shema komplementacije N- i -C dijela proteina Venus nakon interakcije proteina X i Y s kojima su fuzionirani. **Desno:** Shematski prikaz načina označavanja Venus konstrukata u sve 4 topologije.

Slika 13. Shematski prikaz skeniranja potencijalnih interaktora AHCY iz hORFeome banke gena koristeći AHCY kao mamac.

Slika 14. Analiza PCR produkata umnoženih egzona 4 i 9 gena *ahcy*.

Slika 15. Potvrda nasljeđenih točkastih mutacija gena *ahcy* u pacijentu s nedostatkom AHCY.

Slika 16. Smanjena razina ekspresije mRNA i proteina gena *ahcy* u fibroblastima pacijenta.

Slika 17. Analiza produkata ciljane mutageneze pET32_AHCY vektora. Elektroforeza u 1% gelu agaroze.

Slika 18. Analiza ekspresije rekombinantnih proteina AHCY i AHCY_YD.

Slika 19. Analiza produkata ciljane mutageneze BiFC vektora elektroforezom u 1% gelu agaroze.

- Slika 20.** Analiza makromolekularne stabilnosti proteina AHCY.
- Slika 21.** Primjer rezultata visokoprotocnog skeniranja potencijalnih interakcijskih partnera AHCY proteina metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom.
- Slika 22.** Devet nasumično odabranih pozitivnih interakcijskih partnera otkrivenih visokoprotocnim skeniranjem metodom komplementacije dviju molekula fluorescencijom.
- Slika 23.** Analiza produkata ciljane mutageneze vektora pEGFP_AHCY.
- Slika 24.** Smanjene razine ekspresije mutanti AHCY u HEK 293 stanicama.
- Slika 25.** Promijenjena lokalizacija mutiranog proteina AHCY.
- Slika 26.** Utišana ekspresija gena *ahcy* pomoću shRNA.
- Slika 27.** Smanjena migracija i proliferacija stanica hepatocelularnog karcinoma nakon utišavanja AHCY.
- Slika 28.** Promjena razine proteina uključenih u regulaciju staničnog ciklusa.
- Slika 29.** Predloženi mehanizam utjecaja AHCY na stanični ciklus potencijalno preko oštećenja DNA.
- Slika 30.** Grafički prikaz funkcionalnih kategorija povezanih s promjenama u Hep G2 stanicama u kojima je utišan AHCY.
- Slika 31.** Shematski mrežni prikaz pretpostavljene univerzalne uloge AHCY proteina vezane uz ekspresiju gena, DNA replikaciju, rekombinaciju i popravak te neurološke bolesti.
- Slika 32.** Grafički prikaz funkcionalnih kategorija proteina AHCY.
- Slika 33.** Shematski prikaz predloženog mehanizma zastoja staničnog ciklusa u Hep G2 stanicama nakon utišavanja AHCY.

9.2. Tablice

Tablica 1. Vrijednosti metabolita zabilježene u dosadašnjim pacijentima s nedostatkom AHCY.

Tablica 2. Enzimska aktivnost proteina AHCY.

Tablica 3. Popis dosada opisanih slučajeva nedostatka AHCY i ukupna enzimska aktivnost (prema Tablici 2) kombinacije nasljeđenih mutacija.

Tablica 4. Popis antibiotika, otapalo u kojem su pripremljene koncentrirane otopine i radna koncentracija korištena tijekom eksperimenata.

Tablica 5. Popis oligonukleotidnih početnica.

Tablica 6. Komponentne reakcijske mješavine i uvjeti PCR-a.

Tablica 7. Komponentne reakcijske mješavine i uvjeti ciljane mutageneze.

Tablica 8. Komponente reakcijske smjese za cijepanje.

Tablica 9. Protokol za reverznu transkripciju.

Tablica 10. Protokol za RT-qPCR reakciju.

Tablica 11. Popis protutijela korištenih za Western blot. CST – Cell Signaling Technology.

Tablica 12. Format uzgoja stanica za umnožavanje i pokuse prema preporukama iz „*Useful Numbers for Cell Culture*” (Thermo Fisher Scientific).

Tablica 13. Popis probranih oboljenja i poremećaja pronađenih i predviđenih IPA programom nakon analize transkriptoma i proteoma fibroblasta pacijenta.

Tablica 14. Popis predviđenih biomarkera prema IPA programu.

Tablica 15. Rezultati lokalizacije AHCY mutanti u stanicama stabilnih staničnih linija izrađenih u doktorskoj disertaciji.

10. ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Lucija Kovačević

Adresa: Kopernikova 8, 10000 Zagreb (Hrvatska)

Mob: (+385)918804285

E-mail: lucija.kovacevic@gmail.com

Datum rođenja 22/04/1989

Državljanstvo hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

- 8.5.2017.–8.11.2017. Stručni suradnik u u Laboratoriju za naprednu genomiku, Institut Ruđer Bošković
- 15.12.2016.–14.03.2017. Stručni suradnik u u Laboratoriju za naprednu genomiku, Institut Ruđer Bošković
- 02.09.2013.–01.09.2016. FP7 project „Enhancement of the Innovation Potential in SEE through new Molecular Solutions in Research and Development“ – InnoMol, Institut Ruđer Bošković
- 2010.–2013. "Basic molecular and biological research of streptomyces" scientific project Cooperation, Institut Ruđer Bošković

OBRAZOVANJE

- 2013.–2017. Poslijediplomski studij "Medicinska kemija", Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka
- 2010.–2013. Diplomski studij, Molekularna i računalna biologija, Sveučilište u Zagrebu, PMF, Biološki odsjek, Zagreb
- 2007.–2010. Preddiplomski studij, Molekularna biologija, Sveučilište u Zagrebu, PMF, Biološki odsjek, Zagreb

OSPOSOBLJAVANJE

- 17.10.2016.–17.12.2016. Usavršavanje Ministarstvo Unutarnjih Poslova, Zagreb, "Next generation sequencing" Financirano: volontiranje; kontakt: dr.sc. Marina Korolija
- 01.09.2016.–30.09.2016. Usavršavanje Centre de biophysique moléculaire, Orlenas, "BiFC to investigate AH CY interactome" Financirano: Stipendija Francuske Vlade; kontakt: dr.sc. Chantal Pichon (voditelj "Cell Biology Department")
- 01.05.2016.–28.05.2016. Usavršavanje Goethe University, Institute for Biochemistry II (IBCII), Frankfurt, "CRISPRCas9 to investigate mutant AH CY mRNA metabolism in cells" Financirano: InnoMol projekt; kontakt: dr.sc Manuel Kaulich (voditelj "Gene Editing Group")
- 2015. Radionica "Genomics and Bioinformatics", Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- 2015. Trening "Illumina NeoPrep Library System", Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- 2015. Trening "Illumina NextSeq 500 sample preparation, instruments and software", Institut Ruđer Bošković, Zagreb
- 2014. Radionica "Bioimaging", Institut Ruđer Bošković, Zagreb

KONGRESI I KONFERENCIJE

- 3.11.-4.11.2016. prisustvovanje, autor poster prezentacije, Best poster award: "HDIR-4 Meeting "From Bench to Clinic" (Zagreb)
- 1.6.-4.6.2016. prisustvovanje, autor poster prezentacije, Best poster award: Congress HDBMB2016 – on the Occasion of the 40th Anniversary" (Split)
- 24.4.–28.4.2016. prisustvovanje, autor poster prezentacije: "Game of Epigenomics" (Dubrovnik)
- 24.4.–28.4.2016. prisustvovanje, koautor abstracta i 2 postera: "Game of Epigenomics" (Dubrovnik)
- 26.4.-29.4.2015. prisustvovanje, koautor abstracta: "3rd CROATIAN MICROSCOPY CONGRESS with International Participation" (Zadar)
- 30.8.-4.9.2014. koautor poster prezentacije: "FEBS EMBO 2014 Conference" (Pariz)
- 15.06.-18.06.2016. koautor poster prezentacije: "6th Croatian Congress of Microbiology with International Participation" (Sv. Martin na Muri)
- 4.7.-5.7.2016. koautor poster prezentacije: "Symposium TRANSLATION OF BASIC

IMMUNOLOGY AND NEUROSCIENCE TOOLS TO THERAPIES: WHERE ARE WE NOW?" (Rijeka)

STIPENDIJE I NAGRADE

- 2016. Stipendija Francuske Vlade
- 2014. Godišnja nagrada za najbolji diplomski rad u području molekularne genetike "Zoran Zgaga", Hrvatska Udruga Genetičkih Inženjera (HUGI)
- 2011. – 2013. Stipendija grada Zagreba
- 2012. Rektorova nagrada za sudjelovanje na "Noć biologije", Sveučilište u Zagrebu

POPIS PUBLIKACIJA

- Grbeša, I., Kalo, A., Belužić, R., Kovačević, L., Lepur, A., Rokić, F., Hochberg, H., Kanter, I., Simunović, V., Muñoz Torres, P. M., Shav-Tal, Y., Vugrek, O. (2017). Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *European Journal of Cell Biology*, prihvaćen za objavljivanje 3.5.2017.
- Lepur, A., Kovačević, L., Belužić, R. i Vugrek, O. (2016). Combining Unique Multiplex Gateway Cloning and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) for High-Throughput Screening of Protein-Protein Interactions. *Journal of biomolecular screening*, 21(10), 1100–1111.
- Strauss, K. A., Ferreira, C., Bottiglieri, T., Zhao, X., Arning, E., Zhang, S., Zeisel, S. H., Escolar, M. L., Presnick, N., Puffenberger, E. G., Vugrek, O., Kovacevic, L., Wagner, C., Mazariegos, G. V, Mudd, S. H. i Soltys, K. (2015). Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 116(1–2), 44–52