

# Promjena signalnih putova uzrokovanih deficijencijom S-adenozinhomocistein-hidrolaze

---

**Pavičić, Ivana**

**Doctoral thesis / Doktorski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:149185>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-08**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivana Pavičić

**Promjena signalnih putova uzrokovanih  
deficijencijom S-adenozinhomocistein-  
hidrolaze**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024. godina



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivana Pavičić

**Changes in signaling pathways caused  
by S-adenosylhomocystein hydrolase  
deficiency**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

“Ovaj doktorski rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom mentora doc.dr.sc. Olivera Vugreka, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.“

## **INFORMACIJE O MENTORU**

Dr. Oliver Vugrek je istaknuti znanstvenik s iznimnim uspjesima u molekularnoj biologiji i translacijskoj medicini. Doprinos znanstvenom istraživanju i stručnost vidljivi su kroz mentorovu bogatu radnu povijest na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Od 2016. do danas, dr. Vugrek je voditelj Laboratorija za naprednu genomiku kao znanstveni savjetnik unutar Odjela molekularne medicine. Prije toga, od 2012. do 2015. godine, dr. Vugrek je imao ulogu voditelja Odjela molekularne medicine na Institutu Ruđer Bošković. Mentorova karijera seže i dalje unatrag, što je vidljivo kroz pozicije znanstvenog suradnik i voditelj Grupe za translacijsku medicinu (2009.), znanstveni suradnika i voditelja Laboratorija za molekularnu patologiju (2006.-2008.) te višeg asistenta (1999.-2005.) na istom institutu. Ove uloge naglašavaju mentorov dugogodišnji angažman i stručnost u molekularnoj i staničnoj biologiji. Osim toga, dr. Vugrek je stekao međunarodno istraživačko iskustvo kao postdoktorand na Australijskom nacionalnom sveučilištu u Canberri, Australija (1997.-1998.), te na Max-Planck-Institutu za staničnu biologiju u Heidelbergu, Njemačka (1996.-1997.). Dr. Vugrek je stekao doktorat iz biologije s odlikom magna cum laude na Sveučilištu Ruprecht Karl u Heidelbergu, Njemačka.

*Željela bih izraziti iskrenu zahvalnost svom mentoru. Zahvaljujem članovima povjerenstva koji su zaslužni za poboljšanje kvalitete ove disertacije. Također, željela bih iskreno zahvaliti kolegama. Također, željela bih izraziti iskrenu zahvalnost svojoj obitelji mami, tati, djedu i baki za njihovu beskrajnu ljubav i ohrabrenje. Njihova nepokolebljiva podrška i žrtve bile su ključne za moje postignuće, i zauvijek sam zahvalna na njihovom prisustvu u mom životu. Na kraju željela bih najviše zahvaliti jednoj posebnoj osobi koja je uvijek bila tu uz mene za svaki znanstveni i neznanstveni razgovor, Marko hvala ti puno.*

## **Promjena signalnih putova uzrokovanih deficijencijom S-adenozinhomocistein-hidrolaze**

IVANA PAVIČIĆ

Institut Ruđer Bošković

Cilj ovog doktorskog istraživanja bio je istražiti različito eksprimirane signalne putove u četiri stanične linije, odnosno SW480, MCF7, THLE3 i HEK293T, gdje je gen *SAHH* stabilno utišan korištenjem tehnika lentivirusnog utišavanja. Istraživanje je imalo za cilj identificirati zajedničke različito eksprimirane signalne putove u sve tri stanične linije, kao i odrediti specifične putove koji su pokazali najveću diferencijalnu ekspresiju u svakoj pojedinoj staničnoj liniji. Dodatno, istraživanje je imalo za cilj usporediti različito eksprimirane signalne putove u stanicama s utišanim genom *SAHH* s fibroblastima dobivenim od bolesnika s nedostatkom *SAHH*. Cilj je bio identificirati zajedničke putove između dva navedena eksperimentalna modela, pružajući tako uvid u potencijalne zajedničke mehanizme koji leže u osnovi *SAHH*-a deficijentnih staničnih procesa. Kroz sveobuhvatnu analizu i usporedbu profila ekspresije gena, istraživanje je imalo za cilj otkriti ključne putove povezane s utišavanjem *SAHH* gena u četiri stanične linije. Razjašnjavanjem ovih putova, istraživanje je imalo za cilj doprinijeti razumijevanju nedostatka *SAHH* te funkcionalne važnosti i potencijalne uključenosti u stanične procese.

(214 stranica, 97 slika, 10 tablica, 264 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: deficijencija *SAHH*-a, diferencijalno eksprimirani signalni putovi, fenotip tumorskih stanica

Mentor: doc. dr.sc. Oliver Vugrek, viši znanstveni suradnik

Ocjenjivači: izv.prof. dr. sc. Neda Slade

red. prof. dr.sc. Maja Matulić

izv.prof. dr. sc. Inga Urlić

Zamjena: izv.prof. dr. sc. Tihomir Balog

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

## **Changes in signaling pathways caused by S-adenosylhomocystein hydrolase deficiency**

IVANA PAVIČIĆ  
Rudjer Boskovic Institute

The objective of this doctoral study was to investigate differentially expressed pathways in four cell lines, namely SW480, MCF7, THLE3 and HEK293T, where the gene *SAHH* was stably silenced using lentiviral silencing techniques. The study aimed to identify common differentially expressed pathways across all four cell lines, as well as to determine the specific pathways that exhibited the highest differential expression in each cell line individually. Additionally, the research sought to compare the differentially expressed signaling pathways SAHH-knock-down cells with fibroblast obtained from patients diagnosed with SAHH deficiency. The goal was to identify any shared pathways between the two experimental models, thereby providing insights into potential common mechanisms underlying SAHH - related cellular processes. Through comprehensive analysis and comparison of gene expression profiles, the study aimed to uncover key pathways associated with SAHH silencing in the four cell lines. By elucidating these pathways, the research aimed to contribute to the understanding of SAHH's functional significance and its potential involvement in cellular processes.

(214 pages, 97 figures, 10 tables, 264 references, original in croatian)

Keywords: SAHH deficiency, differentially expressed signaling pathways, cancer cells phenotype

Supervisor: assistant professor Oliver Vugrek, PhD

Reviewers: Neda Slade PhD, professor

Maja Matulić, PhD, professor

Inga Urlić, PhD, Professor

Substitute: Tihomir Balog, PhD, Professor



## SADRŽAJ

Popis kratica i simbola .....	4
1. UVOD .....	7
2. LITERATURNI PREGLED .....	10
2.1. Povijest deficijencije SAHH .....	10
2.1. Gen <i>SAHH</i> .....	10
2.3. Mutacije u genu <i>SAHH</i> .....	11
2.4. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) .....	11
2.5. Metabolizam metionina, homocisteina i folata .....	13
2.6. S-adenozil metionin .....	14
2.7. Metilacijski potencijal .....	16
2.8. Osnovna biokemijska obilježja bolesti .....	19
2.9. Prijenos signala u stanicama .....	21
2.10. Prijenos signala u tumorskim stanicama .....	23
2.11. Deficijencija SAHH-a u tumorskim stanicama .....	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	26
3.1. Materijali .....	26
3.2. Metode .....	28
3.2.1. Transformacija bakterija elektroporacijom i uzgoj elektrokompetentnih stanica .....	34
3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija .....	35
3.2.1.2. Mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina .....	37
3.2.1.3. Restriksijsko cijepanje plazmidne DNA .....	37
3.2.1.4. Elektroforeza na gelu agaroze .....	38
3.2.1.5. Transformacija bakterija plazmidnom DNA .....	39
3.2.2. Rad sa staničnim kulturama .....	35
3.2.2.1. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi .....	40
3.2.2.1.1. Odmrzavanje staničnih kultura .....	41
3.2.2.1.2. Zamrzavanje staničnih kultura .....	42
3.2.2.2. Proizvodnja lentivirusa u stanicama HEK293T .....	42
3.2.2.3. Test MTT .....	42
3.2.2.4. Transdukcija .....	42
3.2.2.5. Određivanje multipliciteta infekcije .....	46
3.2.2.6. Izolacija RNA iz staničnih linija sa stabilno utišanim genom <i>SAHH</i> .....	46
3.2.2.7. Sinteza komplementarne DNA (cDNA) .....	45
3.2.3.1. Provjera kvalitete nukleinskih kiselina .....	46

3.2.3.3. Priprema knjižnice za sekvenciranje .....	47
3.2.3.4. Provjera kvalitete neobrađenih sekvenci i poravnanje na referentni genom.....	50
3.2.3.5. Analiza diferencijano eksprimiranih signalnih putova i gena.....	51
3.2.4.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina.....	53
3.2.4.3. Određivanje postotka utišavanja gena metodom <i>Western-blot</i> .....	55
3.2.4. Priprema uzoraka za mjerenje koncentracije metabolita SAM/SAH.....	56
3.2.4.1. Priprema uzoraka za mjerenje koncentracije adenzina .....	57
3.2.6. Statistička analiza .....	58
4. REZULTATI.....	59
4.1. Uspostava i karakterizacija stabilno utišanih staničnih linija genetski .....	59
4.2. Usporedba koncentracije metabolita S-adenozil metionina, S-adenozil homocisteina i adenzina u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> i kontrolnim staničnim linijama.....	66
4.3. Promjene signalnih putova u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> ....	71
4.4. Usporedba signalnih putova promijenjenih u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T s utišanom ekspresijom <i>SAHH</i> i putova promijenjenih u fibroblastima pacijenata s deficijencijom <i>SAHH</i> .....	123
4.5. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u sve tri stanične linije s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> u odnosu na kontrolnu staničnu liniju .....	141
4.5.1. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> .....	141
4.5.2. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> .....	153
4.5.3. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> .....	164
4.6. Provjera ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena u staničnim linijama s utišanim genom <i>SAHH</i> .....	176
5. RASPRAVA.....	179
6. ZAKLJUČAK .....	195
7. LITERATURA.....	197
8. ŽIVOTOPIS .....	214

## **Popis kratica i simbola**

ADORA2A od engl. *Adenosine A2A Receptor*  
ADP od engl. *Adenosine Diphosphate*  
ATP od engl. *Adenosine Triphosphate*  
BAX od engl. *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*  
BMP od engl. *Bone Morphogenetic Protein*  
BSA od engl. *Bovine Serum Albumin*  
CBP od engl. *CREB-binding protein*  
CDK od engl. *Cyclin Dependent Kinase*  
CDK2 od engl. *Cyclin-Dependent Kinase 2*  
DMEM od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO Dimetil sulfoksid od engl. *Dimetilsulfoxide*  
HDAC Histon deacetilaze od engl. *Histone Deacetylase*  
MAPK od engl. *Mitogen-activated Protein Kinase*  
MBD od engl. *Methyl-CpG-binding Domain*  
M-CSF od engl. *Macrophage Colony Stimulating Factor*  
NAPDH od engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*  
NF- $\kappa$ B od engl. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells*  
NLS od engl. *Nuclear Localization Signal*  
pRB-E2F od engl. *Retinoblastoma-Associated Protein - Transcription Factor E2F*  
SAM S-adenozil-L-metionin (od engl. *S-Adenosyl-L-methionine*)  
SMAD od engl. *Mothers Against Decapentaplegic (MAD) Homolog*  
SP1 od engl. *Specificity Protein 1*  
STAT3 od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*  
SUMO od engl. *Small Ubiquitin-like Modifier*  
TAE od engl. *Tris-acetate-EDTA*  
TAF(II)250 od engl. *TBP-associated Factor 250 kDa (p250)*  
TGF- $\beta$ 1 od engl. *Transforming Growth Factor Beta 1*  
TNF od engl. *Tumor Necrosis Factor*  
TP53 Tumor protein p53  
VEGF od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*  
AHCY od engl. *S-adenosylhomocysteine hydrolase*  
AMOT od engl. *Angiomotin*  
APC od engl. *Regulator of WNT Signaling Pathway*  
APC2 od engl. *APC Regulator of WNT Signaling Pathway 2*  
APLN od engl. *Apelin*  
ARHGDIB od engl. *Rho GDP Dissociation Inhibitor Beta*  
ARHGEF3 od engl. *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 3*  
ARHGEF6 od engl. *Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor 6*  
BTK od engl. *Bruton Tyrosine Kinase*  
C10orf10 od engl. *Chromosome 10 Open Reading Frame 10*  
CCR4 od engl. *C-C Chemokine Receptor 4*  
CD38 od engl. *CD38 Molecule*  
CD6 od engl. *CD6 Molecule*  
CDH1 od engl. *Cadherin 1*  
CDH11 od engl. *Cadherin 11*  
CDH11 od engl. *Cadherin 11*  
CDH12 od engl. *Cadherin 12*

CDH12 od engl. *Cadherin 12*  
CDH13 od engl. *Cadherin 13*  
CDH24 od engl. *Cadherin 24*  
CSF3 od engl. *Colony Stimulating Factor 3*  
CTGF od engl. *Connective Tissue Growth Factor*  
DIRAS3 od engl. *DIRAS Family GTPase 3*  
DKK1 od engl. *Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1*  
DKK3 od engl. *Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3*  
DKK4 od engl. *Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 4*  
DLC1 od engl. *DLC1 Rho GTPase Activating Protein*  
EGF od engl. *Epidermal Growth Factor*  
FAM129A od engl. *Family with Sequence Similarity 129 Member A*  
FGF4 od engl. *Fibroblast Growth Factor 4*  
FHL1 od engl. *Four and a Half LIM Domains 1*  
FZD7 od engl. *Frizzled Class Receptor 7*  
GJA1 od engl. *Gap Junction Protein Alpha 1*  
GNAL od engl. *G Protein Subunit Alpha L*  
GNAZ od engl. *G Protein Subunit Alpha Z*  
GNG11 od engl. *G Protein Subunit Gamma 11*  
GPR132 od engl. *Protein-Coupled Receptor 132*  
GRIP1 od engl. *Glutamate Receptor Interacting Protein 1*  
HCLS1 od engl. *Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1*  
HCLS1 od engl. *Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1*  
HNF1A od engl. *HNF1 Homeobox A*  
IFI16 od engl. *Interferon Gamma Inducible Protein 16*  
IGF1 od engl. *Insulin-Like Growth Factor 1*  
INPP5D od engl. *Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D*  
IRS4 od engl. *Insulin Receptor Substrate 4*  
ITGA1 od engl. *Integrin Subunit Alpha 1*  
ITGA10 od engl. *Integrin Subunit Alpha 10*  
ITGA11 od engl. *Integrin Subunit Alpha 11*  
ITGA9 od engl. *Integrin Subunit Alpha 9*  
ITGAX od engl. *Integrin Subunit Alpha X*  
ITGB2 od engl. *Integrin Subunit Beta 2*  
ITGB7 od engl. *Integrin Subunit Beta 7*  
ITGB8 od engl. *Integrin Subunit Beta 8*  
JUN od engl. *Jun Proto-Oncogene*  
KRBOX1 od engl. *Keratinocyte-Related Box 1*  
KRT17 od engl. *Keratin 17*  
KRT19 od engl. *Keratin 19*  
LOC101928358 od engl. *Locus 101928358 (human pseudogene or non-coding RNA)*  
LOC102724023 od engl. *Locus 102724023 (human pseudogene or non-coding RNA)*  
LTA od engl. *Lymphotoxin Alpha*  
MDK od engl. *Midkine*  
MLLT11 od engl. *Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia; Translocated to, 11*  
MMP1 od engl. *Matrix Metalloproteinase 1*  
MMP3 od engl. *Matrix Metalloproteinase 3*  
MMP7 od engl. *Matrix Metalloproteinase 7*  
MMP9 od engl. *Matrix Metalloproteinase 9*  
MRAS od engl. *Muscle RAS Oncogene Homolog*

MYH14 od engl. *Myosin Heavy Chain 14*  
MYH3 od engl. *Myosin Heavy Chain 3*  
MYL11 od engl. *Myosin Light Chain 11*  
MYL3 od engl. *Myosin Light Chain 3*  
NUPR1 od engl. *Nuclear Protein 1*  
PCDH19 od engl. *Protocadherin 19*  
PCDH8 od engl. *Protocadherin 8*  
PDIA4 od engl. *Protein Disulfide Isomerase A4*  
PMAIP1 od engl. *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*  
POU5F1 od engl. *POU Class 5 Homeobox 1*  
PPP2R2C od engl. *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B, Gamma*  
PTGS2 od engl. *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*  
PTPN7 od engl. *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 7*  
RAC2 od engl. *Rac Family Small GTPase 2*  
RARB od engl. *Retinoic Acid Receptor Beta*  
RHOQ od engl. *Ras Homolog Family Member Q*  
RHOU od engl. *Ras Homolog Family Member U*  
RHOV od engl. *Ras Homolog Family Member V*  
RND1 od engl. *Rho Family GTPase 1*  
RND3 od engl. *Rho Family GTPase 3* SFRP5 od engl. *Secreted Frizzled Related Protein 5*  
SOX5 od engl. *SRY-Box Transcription Factor 5*  
SOX6 od engl. *SRY-Box Transcription Factor 6*  
TCEAL7 od engl. *Transcription Elongation Factor A Like 7*  
TCF4 od engl. *Transcription Factor 4*  
THPO od engl. *Thrombopoietin*  
TLE1 od engl. *TLE Family Member 1, Transcriptional Corepressor*  
TLE4 od engl. *TLE Family Member 4, Transcriptional Corepressor*  
TMEM47 od engl. *Transmembrane Protein 47*  
VCAM1 od engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*  
VTN od engl. *Vitronectin*  
WNT1 od engl. *Wnt Family Member 1*  
WNT6 od engl. *Wnt Family Member 6*  
ZCCHC12 od engl. *Zinc Finger CCHC-Type Containing 12*  
ZNF737 od engl. *Zinc Finger Protein 737*

## 1. UVOD

S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) (od engl. *AHCY* - *Adenosylhomocysteinase*, na hrvatskom SAHH odnosno S-adenozil homocistein hidrolaza, dalje u tekstu se koristi SAHH kratica) je enzim koji se nalazi u svim živim organizmima te igra ključnu ulogu u metabolizmu S-adenozilmetionina (SAM), molekule koja sudjeluje u staničnim metilacijskim reakcijama. SAHH katalizira hidrolizu S-adenozilhomocisteina (SAH) stvarajući adozin (Ado) i homocistein (Hcy) (1). SAH je nusproizvod staničnih metilacijskih reakcija i istovremeno moćan kompetitivni inhibitor metiltransferaza (4). Stoga, održavanje ispravne aktivnosti SAHH-a ključno je za regulaciju staničnog metilacijskog potencijala, što je određeno omjerom metabolita SAH-a i SAM-a (5-6). Značaj S-adenozil homocistein hidrolaze u regulaciji staničnog metilacijskog potencijala istaknut je otkrićem deficijencije SAHH kod ljudi (2). Deficijencija SAHH je rijedak multisistemski poremećaj koji je uzrokovan alelnim mutacijama u genu *SAHH* i rezultira smanjenom enzimskom aktivnošću SAHH (2, 7-11). Nedostatna aktivnost SAHH-a može biti potencijalno smrtonosna jer narušava stanični metilacijski potencijal te ometa regulaciju ekspresije gena, funkciju proteina i staničnih signalnih putova. Povezana je s nizom metaboličkih poremećaja, uključujući bolesti jetre i hiperhomocisteinemiju (5-7). S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) ključni je enzim uključen u metabolizam S-adenozilmetionina (SAM), donora metila koji sudjeluje u raznim staničnim procesima, uključujući metilaciju DNA, modifikaciju histona i obradu RNA. SAHH katalizira hidrolizu S-adenozilhomocisteina (SAH), nusproizvod SAM metabolizma koji je snažan inhibitor različitih metiltransferaza (4). Deficijencije aktivnosti ovog enzima mogu rezultirati povećanom koncentracijom metabolita SAH-a i smanjenjem SAM-a, što može dovesti do različitih zdravstvenih problema, uključujući bolesti jetre, neurološke poremećaje i kardiovaskularne bolesti (6,7). Jedan potencijalni mehanizam kojim deficijencija SAHH može doprinijeti tim zdravstvenim problemima je disfunkcija signalnog puta Wnt, koji sudjeluje u raznim biološkim procesima, uključujući embriogenezu, homeostazu tkiva i diferencijaciju stanica (3). Stanja deficijencije SAH povezane su s povećanom staničnom proliferacijom, migracijom i invazijom, potencijalno zbog poremećenog statusa metilacije i promijenjenoj ekspresiji gena koji reguliraju te važne stanične procese (12). Do sada je nedostatak SAHH-a povezan s nizom metaboličkih poremećaja, uključujući bolest jetre (13). Također, smanjenje aktivnosti SAHH-a doprinosi tumorigenezi (14). Poremećaj signalnog puta Wnt povezan je s raznim bolestima, uključujući tumore i neurodegenerativne bolesti (3, 15). Polazna hipoteza doktorskog rada je da stabilno utišavanje *SAHH* gena uz pomoć RNA interferencije i uz pomoć

stabilne ugradnje lentivirusa uzrokuje značajne promjene u ekspresijskom profilu staničnih linija MCF7, SW480, THLE-3 i HEK293T što je posljedica narušenog metilacijskog potencijala stanice uslijed nedostatne aktivnosti enzima SAHH-a te uslijed poremećene koncentracije omjera metabolita SAM/SAH u korist SAH-a. Stoga je cilj ovog doktorskog rada analizirati promjene u ekspresijskom profilu stanica sa stabilno utišanom ekspresijom enzima SAHH-a. Također, cilj ovog istraživanja je i odrediti koncentraciju ključnih metabolita SAM-a, SAH-a i adenzina. S obzirom da su MCF7 i SW480 tumorske stanične linije, također cilj je vidjeti dolazi li do promjena na razini transkriptoma u proteinima koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, proliferaciji, prijenosu signala putem Wnt te proteinima LEF i STAT3 koji imaju važnu ulogu u procesu proliferacije tumorskih stanica. Također, cilj je istražiti poklapa li se promjena ekspresije na razini proteina: 4-3-3 $\zeta/\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, c-Myc, c-Raf, ciklin A, ciklin B1, ciklin D1, ciklin E, Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1/2, p21, p27, p44/42, p53, fosfo-Chk2, chk2, fosfo-B-Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK1/2), fosfo-p53, MAPK, Ras i Rb s promjenom ekspresije na razini transkriptoma u HEK293T i THLE-3 staničnoj liniji koja nije tumorska stanična linija, ali je transformirana *in vitro* i jednako promijenjena. S obzirom da je S-adenozil homocistein hidrolazna deficijencija metabolički i metilacijski poremećaj cilj je vidjeti da li će utišavanje ovog enzima imati veći utjecaj na metaboličke ili metilacijske prijenose signala, te da li će do istih efekata doći u tumorskim staničnim linijama i staničnoj liniji modificiranoj *in vitro*.

**Specifični ciljevi doktorskog rada su:**

1. Uspostaviti stabilno utišane stanične linije s ekspresijom gena za *S-adenozil homocistein hidrolazu* te odrediti koncentraciju metabolita SAM-a, SAH-a i adenzina u sve četiri stabilno utišane stanične linije.
2. Odrediti zajedničke diferencijalno eksprimirane stanične signalne putove u sve četiri stabilno utišane stanične linije u odnosu na kontrolne linije.
3. Usporediti zajedničke diferencijalno eksprimirane stanične signalne putove u sve tri stabilno utišane stanične linije s ekspresijskim profilom stanica fibroblasta izoliranih iz bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH-a.
4. Odrediti najznačajnije diferencijalno eksprimirane stanične signalne putove za svaku pojedinu stabilno utišanu staničnu liniju.
5. Odrediti postoji li promjena ekspresije na proteinskoj razini staničnih signalnih putova: signalnih putova uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, puta MAP kinaza, putova popravka DNA oštećenja u staničnoj liniji HEK293T sa stabilnim utišavanjem ekspresije, te da li postoji promjena na proteinskoj razini u ekspresiji najzanimljivijeg diferencijalno eksprimiranog staničnog signalnog puta u stanicama kolorektalnog adenokarcinoma (tumor debelog crijeva) sa stabilnim utišavanjem SAHH-a, specifičnije proteina LEF1.



## 2. LITERATURNI PREGLED

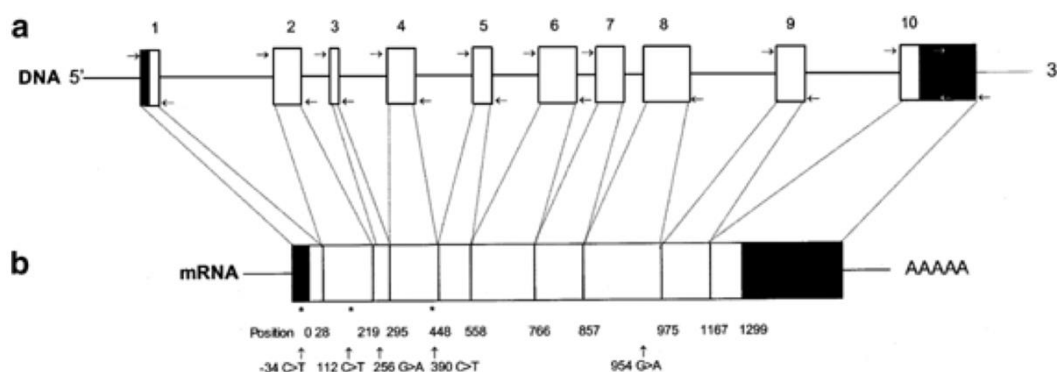
### 2.1. Povijest deficijencije SAHH

Autosomni recesivni nasljedni poremećaj metabolizma metionina je bolest koja nastaje zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH, EC 3.3.1.1 adenozilhomocisteinaza) (OMIM # 613752). Kolege Barić i suradnici zabilježili su prvi opis ovog poremećaja 2004. godine (16). Enzim SAHH katalizira pretvorbu S-adenozilhomocisteina (SAH) u homocistein (17) i adozin (Ado). SAH je iznimno snažan inhibitor brojnih metiltransferaza pa je stoga i ključan u regulaciji metilacijskih procesa u stanici (18). Zbog nedostatne aktivnosti SAHH-a i nakupljanja SAH-a nastaje multisistemska bolest koja se, u većine bolesnika, očituje miopatijom, usporenom mijelinizacijom bijele tvari mozga, poremećajem koagulacije, zaostajanjem u psihomotornom razvoju, problemima u ponašanju, i znakovima bolesti jetre (16, 19-27).

### 2.1. Gen SAHH

Na dugom kraku kromosoma 20 (20q13.1) nalazi se gen *S-adenozil homocistein hidrolaza*, koji kodira protein SAHH. Gen je dug oko 23 kb i sastoji se od 11 eksona. Prekrajanjem primarnog transkripta nastaju dvije zrele mRNA koje kodiraju dvije izoforme enzima, a te izoforme se međusobno razlikuju u N kraju (28). Prvi transkript, koji kodira izoformu proteina s 432 aminokiseline i molekularnom masom od 47,7 kDa, najviše se nalazi u jetri i bubrezima (NM\_000687.1 = ekson 1A) te je široko eksprimiran. Drugi transkript (NM\_001161766 = ekson 1B), prisutan samo u testisima, kodira protein s 404 aminokiseline i molekularnom masom od 44,7 kDa (29). Navedeni gen je vrlo visoko konzerviran na razini genoma. Konzerviranost se očituje i na razini proteina; sličnost ovog enzima između čovjeka i kvasca veća je od 70% (29-38), dodatno potvrđujući evolucijsku konzerviranu ulogu enzima SAHH u stanicama eukariota. Shematski je gen SAHH prikazan na slici 1.





**Slika 1.** Shematski prikaz gena *SAHH*. Bijelo su označeni kodirajući dijelovi egzona (UTR, engl. *untranslated region*), dok su crno označeni nekodirajući dijelovi eksona (preuzeto iz literaturnog navoda br. 29).

### 2.3. Mutacije u genu *SAHH*

Godine 2004., Barić i njegovi kolege prvi su opisali smanjenu aktivnost enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze uzrokovanu patološkom mutacijom unutar gena *SAHH* (38). U literaturi je opisano nekoliko osoba koje pate od nedostatne aktivnosti SAHH-a (30-36), kao i više od deset mutacija gena *SAHH*. Patogene mutacije koje dovode do promjene aminokiselina 49R>C, 49R>H, 71G>S, 86D>G, 89A>V i 112W>STOP nalaze se u eksonima 2, 3 i 4 koji kodiraju katalitičku podjedinicu koja veže supstrat AdoHcy. Mutacija 143Y > C također se nalazi u katalitičkoj podjedinici, dok se mutacija 328Y>D nalazi u podjedinici koja veže kofaktor NAD<sup>+</sup>. Navedene mutacije značajno smanjuju enzimsku aktivnost proteina. Prema literaturi, aktivnost enzima u eritrocitima kod većine bolesnika znatno je smanjena, između 5% i 20% u odnosu na kontrolne vrijednosti (37-39). Vugrek i suradnici detaljno su proučili mutacije 112W>STOP, 143Y>C, 89A>V, 86D>G i 49R>C te dokazali da ove specifične mutacije dovode do značajnog gubitka enzimске aktivnosti u odnosu na divlji tip proteina bez prisutnih mutacija (37 - 41). Opisane mutacije destabiliziraju terciarnu strukturu proteina, što posljedično rezultira smanjenom kinetikom enzimске reakcije (42).

### 2.4. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH)

SAHH je visoko konzervirani protein koji tvori tetramer. Svaka podjedinica SAHH sastoji se od 432 aminokiseline, s molekulskom masom od oko 48 kDa (43). Monomer se sastoji od tri

podjedinice: a) NAD-domena (aminokiseline 193-346) koja veže kofaktor NAD<sup>+</sup>, b) katalitička domena (aminokiseline 1-190 i 355-402) koja veže supstrat S-adenozil homocistein, te c) C-terminalna domena koja je dimerizacijska (aminokiseline 403-432) (44). Kristalografijom je određena struktura enzima, koja je prikazana na Slici 2. Enzim se posttranslacijski acetilira na dva mjesta, na lizinima (Lys401 i Lys408). Premda nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da acetiliranje proteina rezultira inhibicijom katalitičke aktivnosti enzima te na taj način utječe na metilacijske procese i reakcije u stanici (45). SAHH-a je jedini enzim u stanicama eukariota koji sudjeluje u pretvorbi SAH u homocistein. Njegova uloga u regulaciji metilacijskih procesa je ključna. Lokaliziran je u citoplazmi i jezgri stanice. Konformacija katalitičke domene SAHH-a vrlo je slična katalitičkim domenama metiltransferaza, što omogućuje slobodni protok SAHH-molekula između džepova koje stvaraju metiltransferaze i SAHH (46). Bliski kontakt SAHH-a i metiltransferaza u jezgri i citoplazmi stanice nužan je za neometane procese transmetilacije, čime je omogućena brza razgradnja SAH-a, koji je glavni inhibitor metiltransferaznih reakcija (47).



**Slika 2.** Struktura S-adenozilhomocistein hidrolaze. Enzim je građen kao tetramer kojem su vezna mjesta za kofaktor NAD<sup>+</sup> smještena centralno (označeno svijetlo sivom bojom), a katalitičke domene na koje se veže AdoHcy nalaze se na periferiji (označeno tamnom bojom). Preuzeto iz literaturnog navoda 48. Enzim je građen kao tetramer, od četiri identične podjedinice, N-domene koja je odgovorna za vezanje supstrata-SAH i C-domene za vezanje

kofaktora  $\text{NAD}^+$ , a monomeri su povezni L heliks povezujućom domenom. Uslijed vezanja supstrata dolazi do konformacijske promjene što omogućava prijelaz iz zatvorene u otvorenu konformaciju enzima. Vezanje jednog supstrata djeluje kooperativno na vezanje preostalih supstrata.

Homozigotna delecija gena *SAHH* u miševa uzrokuje ranu embrionalnu smrt (49), što ukazuje na izuzetnu funkcionalnu važnost ovog gena. Inhibitori SAHH-a potiču staničnu diferencijaciju te sudjeluju u regulaciji ekspresije gena i apoptozi (50), zbog čega se proučavaju i koriste kao protuvirusni, protuparazitarni, protutumorski i protuupalni lijekovi (51-53). Brojni patološki učinci hiperhomocisteinemije, uz oksidacijski stres uzrokovan stvaranjem radikala superoksid aniona i vodikovog peroksida, proizlaze iz nakupljanja AdoHcy-a i promjene metilacijskog potencijala te inhibicije transmetilacijskih reakcija (54). Nadalje, hiperhomocisteinemija je povezana s kardiovaskularnim bolestima, tromboembolijom i demencijom, što jasno ukazuje na to da neometano odvijanje procesa metilacije u stanici predstavlja preduvjet za normalno funkcioniranje cijelog organizma (55, 56).

## **2.5. Metabolizam metionina, homocisteina i folata**

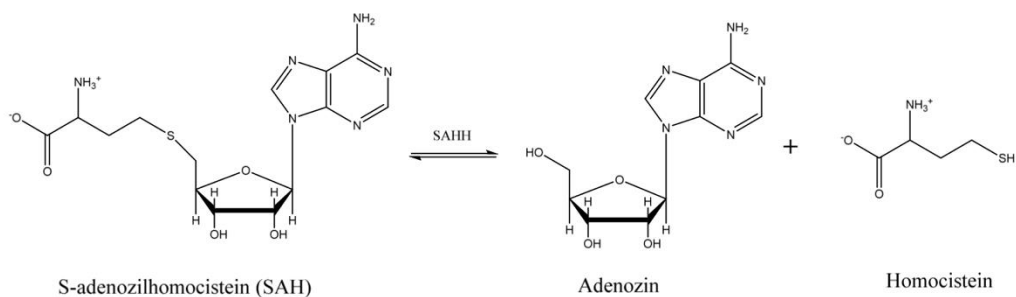
Objašnjenje uloge metabolizma metionina, homocisteina i folata u kontekstu nedostatka aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) ključno je jer ovaj poremećaj izravno utječe na te metaboličke procese. Metionin je esencijalna aminokiselina koja ima ključnu ulogu u sintezi proteina i metilacijskim reakcijama u stanicama. Homocistein je nusprodukt metabolizma metionina, a njegovo nakupljanje u tijelu može biti toksično i povezano s različitim bolestima, uključujući kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Folat je vitalni faktor za metaboličke reakcije koje reguliraju ravnotežu metionina i homocisteina. Nedostatak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) klasificira se kao metabolički i metilacijski poremećaj, stoga je važno istražiti metilacijske i metaboličke procese u kojima ovaj enzim sudjeluje. Metionin, kao aminokiselina koja sadrži sumpor, sudjeluje u staničnim procesima, pri čemu je ključna uloga u izgradnji proteina. Također, sudjeluje u dva stanična ciklusa: ciklusu metionina i procesu transsulfuracije. U ciklusu metionina, metionin služi kao izvor metilnih skupina za transmetilacijske procese u obliku ATP aktiviranog metionina, odnosno u obliku SAM-a, dok u ciklusu transsulfuracije dolazi do njegove degradacije i formiranja cisteina i cistina. Prvi korak oba ciklusa katalizira metionin adenoziltransferaza (MAT), pri čemu se formira SAM (57,58). Ciklus metionina predstavlja jedan od važnih procesa u ljudskom organizmu. Iako gotovo sve vrste stanica stvaraju SAM i koriste ga za sintezu proteina ili proces transmetilacije, jetra se izdvaja kao organ u kojem je koncentracija

SAM-a najveća, kao i aktivnost MAT-a, jer je jetra jedan od metabolički najaktivnijih organa(59).

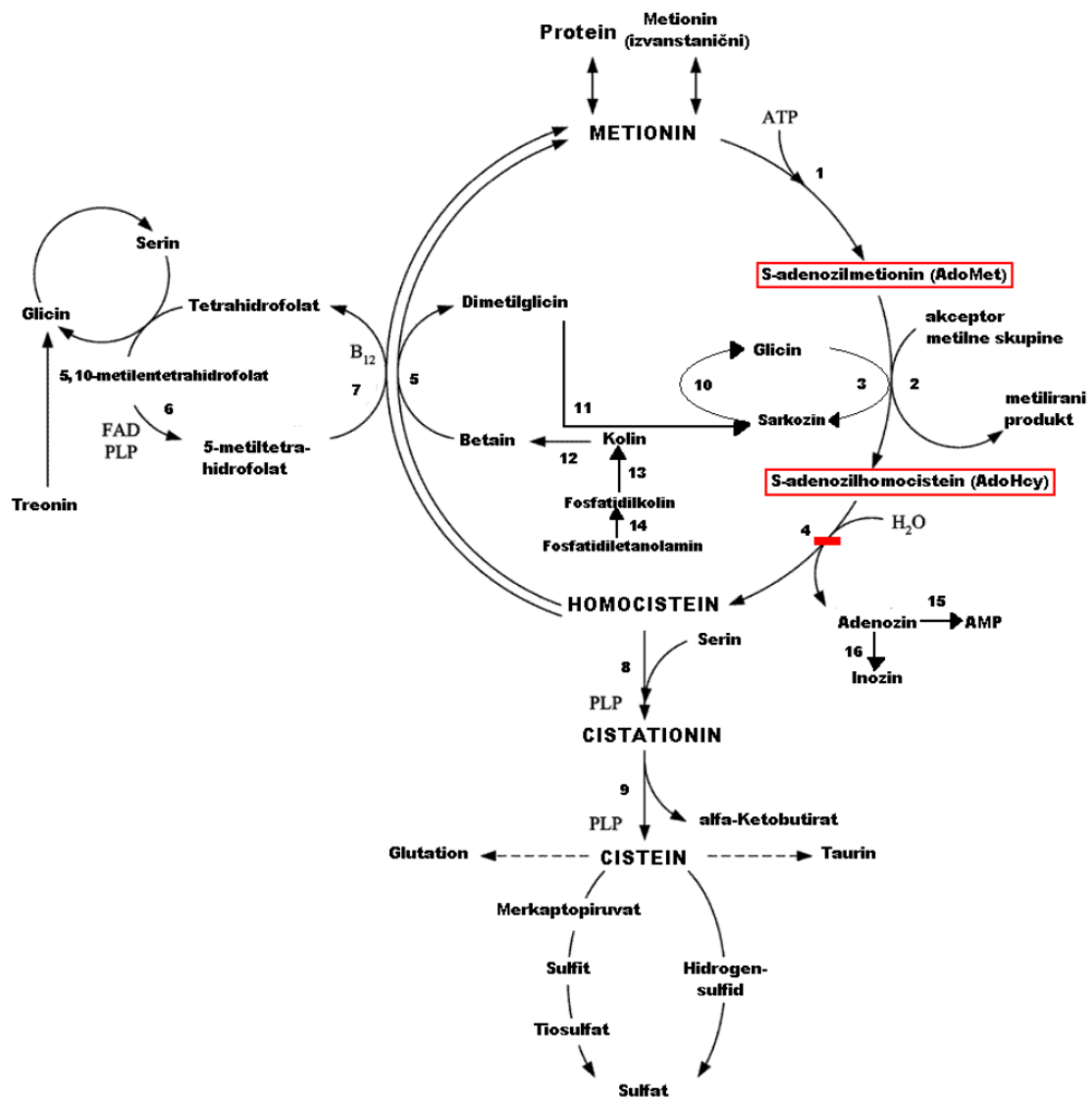
## 2.6. S-adenozil metionin

AdoMet je univerzalni donator metilnih skupina za metiliranje otoka CpG, formiranje kapice i poli-A repa RNA, metilaciju histonske jezgre, topivih citoplazmatskih proteina, strukturnih membranskih proteina stanica, posttranslacijsku modifikaciju proteina, sintezu koenzima Q, vitamina K, vitamina E, karnitina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, melatonina, fosfatidilkolina, fosfatidiletanolamina i kreatina. Objašnjenje uloge metabolizma S-adenozilmetionina (AdoMet) u kontekstu deficijencije S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) također je od suštinskog značaja. AdoMet je esencijalni metabolit koji ima ključnu ulogu u brojnim biološkim procesima, uključujući metilaciju DNA, RNA i proteina, te sudjelovanje u sintezi neurotransmitera i drugih važnih molekula. AdoMet ima izrazito važnu ulogu u regulaciji metilacijskog ciklusa. Poremećaji metabolizma AdoMet imaju ozbiljne posljedice na brojne stanične i fiziološke procese, diferencijaciju i funkciju stanica, posebno jetre i središnjeg živčanog sustava (60-83). Dosadašnja saznanja o AdoMet-u rezultirala su njegovom primjenom kao lijeka u različitim stanjima poput depresije, Parkinsonove bolesti, demencije, osteoartritisa, fibromijalgije, ciroze jetre uzrokovanom alkoholizmom i intrahepatične kolestaze, oštećenja jetre nakon terapije citostaticima. Također se istražuje njegova primjena u drugim kroničnim i zloćudnim bolestima (73-77). Hidroliza SAH-a (S-adenozilhomocistein) predstavlja važan korak u nizu transmetilacijskih i transulfuracijskih reakcija, kao što je prikazano na slici 3, čime SAHH-a indirektno sudjeluje u regulaciji i održavanju metilacijskog statusa stanice, kako su opisali kolege Clarke i Banfield 2001 godine (77-80). Nedostatak SAHH-a se stoga klasificira kao metabolički i metilacijski poremećaj. Jedna od važnih funkcija proteina SAHH-a je održavanje koncentracija ključnih metabolita u ciklusu aminokiseline metionina unutar stanice, uključujući S-adenozilmetionin (SAM), S-adenozilhomocistein (SAH), adenzin i homocistein (Slika 2). SAM je glavni donator metilne skupine koju transmetilacijski enzimi koriste za metiliranje različitih supstrata. Nastaje reakcijom metionina s adenzin-trifosfatom (ATP) putem enzimske katalize metil-adenoziltransferaze (MAT). Osim SAM-a, drugi poznati kofaktori koji djeluju kao donori metilne skupine u biološkim sustavima su metiltetrahidrofolat (MTHF) i metil-B12 što je opisano u istraživanju Ragsdale 2008. godine. SAH je nusprodukt metilacijskih reakcija i kompetitivni inhibitor metiltransferaza (81). Protein SAHH-a uklanja SAH iz blizine

metiltransferaza putem svoje enzimske aktivnosti. Kemijska reakcija hidrolize SAH je reverzibilna, ali u fiziološkim uvjetima stanice, zbog brzog uklanjanja adenzina i homocisteina (detaljnije prikazano na Slici 3), preferira se hidroliza. Adenzin-monofosfat (AMP) nastaje fosforilacijom adenzina pomoću adenzin kinaze (ADK). Drugi način korištenja adenzina je deaminacija putem adenzin deaminaze (ADA), što rezultira nastankom inozina. Hidroliza SAH-a je jedini izvor homocisteina u sisavaca, a remetilacijom se homocistein pretvara u metionin, čime se zatvara ciklus metionina unutar stanice. Homocistein također može ući u drugi metabolički put, transulfuraciju, kojom nastaje cistationin, a potom cistein. Enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) ima ključnu ulogu u pravilnom odvijanju ovih metaboličkih procesa. On je jedini enzim koji katalizira hidrolitičko cijepanje SAH-a na adenzin (Slika 3, Slika 4) i homocistein (81-84).



**Slika 3.** Reakcija koju katalizira S-adenozilhomocistein-hidrolaza. Nacrtno pomoću ChemDraw.



**Slika 4.** Metabolički putovi metionina i homocisteina (1=metionin adenoziltransferaza, 2=SAM ovisne metiltransferaze, 3=glicin N-metiltransferaza, 4=S-adenozilhomocistein hidrolaza, 5=betainhomocistein metiltransferaza, 6=metiltetrahydrofolat reduktaza, 7=metiltetrahydrofolat metiltransferaza, 8=cistationin  $\beta$  sintaza, 9=cistationin  $\gamma$  liaza, 10=sarkozin dehidrogenaza, 11=N,N-dimetilglicin dehidrogenaza, 12=kolin dehidrogenaza, 13=fosfolipaza D, 14=fosfatidiletanolamin metiltransferaza, 15=adenozin kinaza, 16=adenozin deaminaza, FAD=flavin adenin dinukleotid, PLP=piridoksalfosfat) Preuzeto s <https://core.ac.uk/download/pdf/242088919.pdf>.

## 2.7. Metilacijski potencijal

U okviru ovog doktorskog istraživanja, posebna važnost se pridaje istraživanju metilacijskog potencijala stanica, s obzirom na činjenicu da nedostatak enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze može značajno utjecati na metilacijski potencijal. Promjene u metilacijskom

potencijalu mogu imati širok spektar posljedica jer taj potencijal igra ključnu ulogu u regulaciji velikog broja gena. Promjene u metilacijskom potencijalu mogu rezultirati promjenama u ekspresiji gena, što ima važan utjecaj na mnoge biološke procese i funkcije u stanicama. Metilacijski potencijal stanice, odnosno metilacijski indeks, određuje se omjerom koncentracija metabolita SAM-a i SAH-a. Tijek transmetilacijskih reakcija ovisi o metilacijskom potencijalu. Metilacijski potencijal je važan pokazatelj metaboličke kontrole mnogih procesa u stanicama, uključujući ekspresiju gena i sintezu proteina. Viša koncentracija SAH-a rezultira nižim metilacijskim potencijalom stanice, što dovodi do jače inhibicije transmetilacijskih reakcija koje ovise o SAM-u. Vrijednosti metilacijskog potencijala variraju ovisno o vrsti stanice, stadiju rasta i razvoju tkiva. Posljedice smanjenog metilacijskog potencijala su značajne i specifične za tkiva (84). Smanjeni metilacijski potencijal dovodi do demijelinizacije središnjeg živčanog sustava, smanjene sinteze neurotransmitora, smanjene kemotaksije i fagocitoze makrofaga, promijenjenog sastava membranskih fosfolipida i poremećene propusnosti stanične membrane, promijenjene ekspresije gena, promijenjene stanične diferencijacije te otežanog sazrijevanja limfocita što može dovesti do imunosupresije. Promjene u koncentracijama SAM-a, SAH-a i metilacijskog potencijala prisutne su u mnogim neurodegenerativnim bolestima poput demencije, depresije i Parkinsonove bolesti. Poremećaj metilacije također se opisuje kod kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i jetrenih bolesti (84-100). Biološka važnost enzima SAHH-a ilustrirana je istraživanjem na miševima s homozigotnom delecijom gena *SAHH*, koji umiru tijekom ranog embrionalnog razvoja (101), kao i na biljkama s mutacijom gena *SAHH* koje pokazuju aberantni razvoj (uročnjaka, lat. *Arabidopsis*) (102-103). Nedostatak aktivnosti SAHH-a u eksperimentalnim uvjetima uzrokuje poremećaj metilacije (104). Brojna istraživanja su pokazala da je patološki učinak povišene koncentracije homocisteina, uz oksidacijski stres zbog stvaranja radikala superoksid aniona i vodikovog peroksida, rezultat nakupljanja SAH i/ili promjene metilacijskog potencijala te inhibicije transmetilacijskih reakcija (105). S obzirom na to da se hiperhomocisteinemija povezuje s raznim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne bolesti, tromboembolija i demencija (104), povećana učestalost ranih spontanih pobačaja i preeklampsije (106), razdvajanje neuralne cijevi (106), razdvajanje usne i nepca te razvojne anomalije ekstremiteta (107), neosporno je da je neometano odvijanje procesa metilacije u stanicama preduvjet za normalno funkcioniranje organizma. Pretpostavljajući da su metiltransferaze DNA inhibirane kod bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH-a i visokom koncentracijom SAH, očekivalo bi se da je DNA hipometilirana. Međutim, kod nekih bolesnika dokazano je da je DNA u leukocitima hipermetilirana. Moguće objašnjenje je različita razina inhibicije pojedinih metiltransferaza s SAH-om, pri čemu su metiltransferaze



koje su osjetljive na visoku koncentraciju SAH-a inhibirane, što rezultira većom količinom supstrata, SAM-a, koja ostaje nedostupna za metilaciju (84-99). Budući da je enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH) sposoban djelovati u oba smjera, a sintetski put prema SAH je termodinamički povoljniji, sve situacije koje dovode do hiperhomocisteinemije mogu rezultirati povećanjem koncentracije SAH i poremećajima u metilaciji (100-108). U istraživanju objavljenom 2016. godine pokazano je prisustvo globalne hipermetilacije molekule DNA u leukocitima kod nekih, ali ne kod svih bolesnika s nedostatnom aktivnošću SAHH-a. Dodatno, razina metiliranosti molekule DNA nije bila moguće povezati s biokemijskim poremećajem preostalim enzimskom aktivnošću i stupnjem povećanja SAH u odnosu na fiziološke koncentracije). Jedan od bolesnika s globalno hipermetiliranom molekulom DNA nije imao hipermetilirane upisane gene, dok kod drugog bolesnika, koji je imao hipermetilirane upisane gene, nije pronađena globalna hipermetilacija molekule DNA. Pretpostavlja se da je aberantna metilacija molekule DNA prisutna samo kod bolesnika koji su bili izloženi visokim koncentracijama SAH tijekom embrionalnog razdoblja, što može dovesti do globalne hipermetilacije DNA molekule ili hipermetilacije određenih dijelova DNA molekule (109). Promjene u koncentraciji SAM i SAH te njihovom omjeru također imaju značajnu ulogu u karcinogenezi. Opisano je rano pojavljivanje hepatocelularnog karcinoma kod mlade pacijentice s nedostatnom aktivnošću enzima SAHH-a (u dobi od 30 godina) i njezinog brata koji je preminuo u dobi od 17 godina, a pretpostavlja se da je također bolovao od iste bolesti. Brojne studije *in vitro* na mišjim i ljudskim stanicama te *in vivo* studije na mišjem modelu pokazale su da snižena koncentracija SAM-a, odnosno poremećen metilacijski potencijal, doprinosi razvoju steatohepatitisa i hepatocelularnog karcinoma (110). Također je dokazano da dodavanje SAM-a ima povoljan učinak na obrnuti patološki proces. Primjena SAM-a kod pacijenata s alkoholnim steatohepatitisom i hepatitisom C može spriječiti razvoj hepatocelularnog karcinoma (110). S druge strane, miševi s nedostatkom GNMT (glicin N-metiltransferaza), koji je enzim uključen u metabolizam aminokiselina, posebno u regulaciji razine glicina u tijelu. Ovaj enzim katalizira prijenos metilne skupine s S-adenozilmetionina na glicin, proizvodeći S-adenozilhomocistein i sarcosin. GNMT ima važnu ulogu u održavanju homeostaze metionina i glicina, te može imati ulogu u patologiji jetre i drugih bolesti, koji imaju visoke koncentracije metionina i SAM-a u jetri, blago snižen SAH (S-adenozilhomocistein) i omjer SAM/SAH koji je 100 puta veći od kontrolne skupine, razvijaju jetrenu steatozu, fibrozu i hepatocelularni karcinom (111-112). Iz toga se može zaključiti da povišen, a ne samo snižen metilacijski potencijal može stvoriti predispoziciju za ove bolesti. Istraživanje na miševima s nedostatkom gena *SAHH*, koji su pokazali smrtnost u ranom

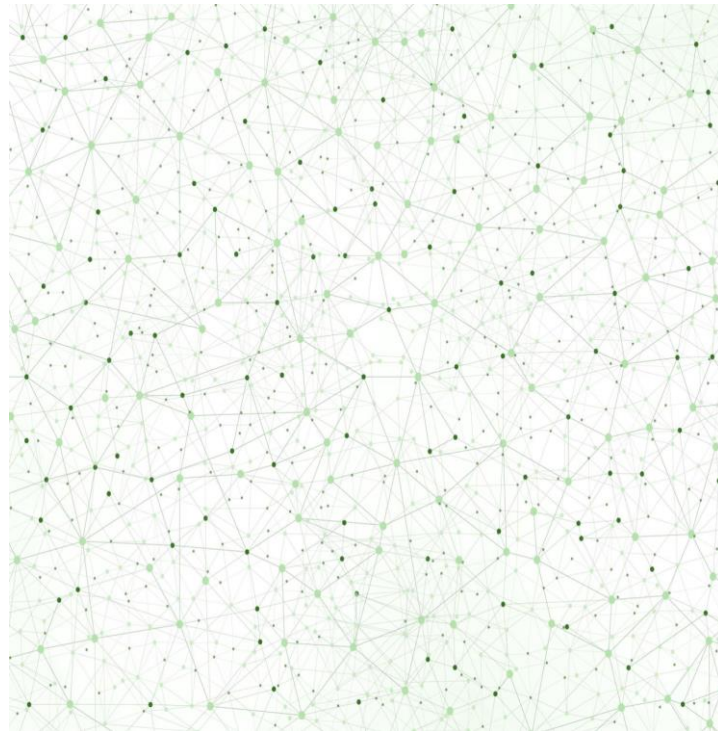
embrionalnom stadiju, potvrdilo je indirektnu, ali bitnu ulogu SAHH u staničnoj metilaciji i općoj homeostazi stanica. Iako se očekivalo da će smanjena razina metilacije biti rezultat inhibicije metiltransferaza zbog viška SAH-a, istraživanje je pokazalo da nedostatak SAHH-a zapravo uzrokuje poremećaj hipermetilacije. Pretpostavlja se da postoje specifične DNA metiltransferaze koje nisu toliko osjetljive na povišene koncentracije SAH, iako ta pretpostavka još nije potvrđena. Pretpostavlja se da su metiltransferaze osjetljive na SAH inhibirane, dok su neinhibirane metiltransferaze, koje imaju povišenu razinu staničnog SAM-a, odgovorne za hipermetilaciju DNA kod bolesnika (109).

## **2.8. Osnovna biokemijska obilježja bolesti**

Glavna obilježja bolesti uzrokovane nedostatnom aktivnošću S-adenozil homocistein hidrolaze uključuju povišene koncentracije metabolita: SAM-a, SAH-a i metionina, uz normalne ili blago povišene razine ukupnog Hcy (166). Svi pacijenti pokazuju značajno povišene razine SAM-a (1,7 do 55 puta) i SAH (5 do 300 puta) u plazmi (38-44), te snižen omjer SAM/SAH (manji od 1,13). Koncentracija metionina u plazmi pacijenata može biti unutar fizioloških vrijednosti (39,40,16). Blago povišene razine ukupnog homocisteina kod nekih pacijenata objašnjavaju se inhibicijskim djelovanjem povišenog SAM-a na MTHFR (metiltetrahydrofolat reduktazu) i poremećenom remetilacijom homocisteina u metionin. Svi pacijenti također pokazuju povišene razine kreatin kinaze (CK) (5 do 70 puta). Nositelji samo jedne mutacije gena *SAHH* nemaju kliničke ni biokemijske pokazatelje bolesti, a razine SAM-a, SAH-a i metilacijski potencijal su im normalni (38). Klinička slika bolesti uzrokovane nedostatkom aktivnosti enzima SAHH-a značajno varira, a moguće je da ovisi o preostaloj aktivnosti enzima. U nekim slučajevima opisani su teški simptomi kao što su fetalni hidrops, zatajenje jetre, hipotonija, razvojne anomalije mozga i zatajenje disanja koji su rezultirali smrtnim ishodom u ranoj dojenačkoj dobi (43). Većina pacijenata s umjerenim simptomima bolesti pokazuje znakove i simptome u novorođenačkoj ili dojenčadi dobi (82). Svi pacijenti imaju miopatiju i/ili trajno povišenu aktivnost kreatin kinaze. Ovisno o kombinaciji simptoma, mogu se javiti zaostatak u psihomotornom razvoju, poremećaji ponašanja, mikrocefalija, zakasnjela mijelinizacija, strabizam, koagulopatija i oštećenje jetre. Biopsija mišića kod nekih pacijenata pokazuje distrofiju mišića. U jednom slučaju opisanom 2015. godine, bolesnica je razvila simptome hepatopatije i slabosti mišića u kasnijoj životnoj dobi. Nakon dijagnoze, u dobi od 30 godina, utvrđeno je da je imala hepatocelularni karcinom te je preminula u dobi od 32 godine zbog mutacije 49R>H/49R>H (c.146G>A/c.146G>A) (43). Sedmogodišnji sin nositelj je istih

mutacija, ali nije pokazivao nikakve simptome, iako je imao povišene koncentracije SAM-a i SAH-a u plazmi (162). Godine 2017. opisana su dva brata i sestra s dvije heterozigotne mutacije gena *SAHH* (p.49R>C i p.363T>I), koji su imali značajno povećane koncentracije SAH-a i SAM-a u plazmi, ali klinička slika se razlikovala od prethodno opisanih bolesnika. Četnaestogodišnji dječak imao je infantilni autizam i insuficijenciju gušterače, petogodišnja djevojčica imala je cerebralnu paralizu i spasticitet, dok je dvogodišnji dječak imao mišićnu hipotoniju, zaostatak u psihomotornom razvoju i epilepsiju. Nijedno dijete nije imalo povišene razine aminotransferaza i kreatin kinaze, niti zakašnjelu mijelinizaciju.

## 2.9 Prijenos signala u stanicama



**Slika 5.** Shematski prikaz kompleksnosti signalnih mreža, napravljeno uz pomoć IPA programa (od engl. *Ingenuity pathways analysis*). Može se vidjeti da je prijenos signala unutar stanice vrlo složen i precizno reguliran proces.

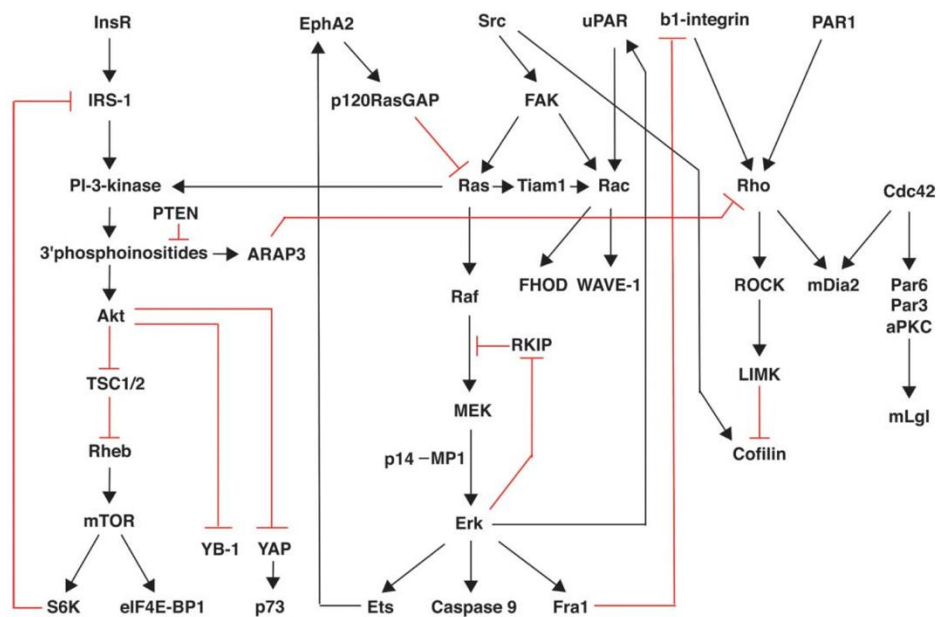
Razumijevanje staničnog prijenosa signala ključno je za dešifriranje regulatornih mreža (Slika 5) u biološkim sustavima. U ovom istraživanju, posebno smo zainteresirani za identifikaciju i analizu promjena u staničnom prijenosu signala unutar staničnih linija u kojima će biti utišan gen *S-adenozil homocistein hidrolaza (SAHH)*. Stanice primaju i odgovaraju na vanjske signale putem receptora. Prvi odgovor je pokretanje složenih signalnih mreža koje prenose vanjske signale u stanicu, kulminirajući u preprogramiranju različitih biokemijskih, genetskih i strukturnih procesa. Stanični prijenos signala započinje čim se prvi posrednik (ligand) veže za svoj receptor - protein sa komplementarnom strukturom na transmembranskom proteinu ili unutar stanice. Vezanje liganda uzrokuje konformacijske promjene u receptoru i aktivira dobro kontrolirane nizove reakcija koje izvode drugi posrednici ili signalni intermediari koji prenose poruku od receptora do kvantificiranih efektorskih funkcija. Dakle, stanični prijenos signala ključan element u staničnom sustavu odgovora. Otkriće staničnog prijenosa signala datira unatrag do 1855. kada je Claude Bernard opisao kako određene "unutarnje sekrecije" bezvodnih žlijezda, otpuštene u krvotok, mogu imati učinke na udaljene stanice. Oko 1880., britanski prirodoslovac Charles Darwin i njegov sin Francis Darwin otkrili su sličan fenomen

fototropizma kod vrhova izdanka u biljkama i zaključili "Utjecaj se prenosi od vrha do bazalnijih područja izdanka, regulirajući tako rast i inducirajući zakrivljenost" (113). Ovaj prenosivi faktor ili posrednik kasnije je nazvan auksin. Nekoliko godina kasnije, John Langley i njegov student Thomas Elliott otkrili su "prihvatljivu tvar" ili receptore proučavajući simpatički neuroefektorski prijenos (113). Kasnije, 1905. godine, Ernest Starling prvi put skovao riječ "hormon" (grč. pobuđivanje ili poticanje) kako bi objasnio: "Kemijski posrednici koji se šire iz stanice u stanicu duž krvotoka, mogu koordinirati aktivnosti i rast različitih dijelova tijela" (114). Nakon otkrića posrednika i receptora, unutarstanični događaji počeli su se otkrivati tijekom 1950-ih. Rita Levi-Montalcini otkrila je da ekstrakti tumora mogu potaknuti izrastanje neurita i identificirala faktor rasta živaca (NGF, od engl. *neural growth factor*) (115). Otkriće inozitol fosfatnog puta (116), proteina ovisnih o fosforilaciji (117), te spoznaja da se skeletna kontrakcija događa regulacijom iona kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$  se unosi u stanice otvaranjem kanala) i da vezanje adrenalina i glukagona na stanične receptore dovodi do generiranja cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) (118), dodatno su razotkrivali pojedinosti stanične signalizacije. Uslijedilo je otkriće epidermalnog faktora rasta (119), G-proteina (120), faktora tumorske nekroze (TNF, od engl. *tumor necrosis factor*), te retrovirusnog proteina Src koji djeluje kao tirozin-specifična kinaza (122). Sva ova otkrića dovela su do povećanog razumijevanja kako stanice primaju, percipiraju i dekodiraju signal. Riječ "transdukcija signala" pojavila se u biološkoj literaturi 1970-ih (123-126), daljnje razjašnjenje čega je pružio Martin Rodbell 1980. godine koji je postulirao da su "pojedinačne stanice kibernetički sustavi sastavljeni od tri različite molekulske komponente: diskriminatora, prijenosnika i pojačala." Stanice su diskriminatori koji primaju vanjske signale i procesuiraju ovu informaciju preko staničnih prenosnika kroz staničnu membranu. Pojačanje signala događa se putem pojačala koja prenose signale unutar ili između stanica. Transdukcija signala nije linearni sekvencijalni aktivacijski niz signalnih molekula, već umjesto toga mreža signalnih releja unutar stanice. Stanice percipiraju vanjske signale, koje obrađuju i interpretiraju intracelularni mehanizmi na definiran način. U nekim slučajevima konformacijske promjene u receptoru vezanom za ligand aktiviraju njegovu kinaznu aktivnost, pokrećući nizvodnu signalizaciju. Dok u drugim slučajevima, receptori vezani za ligand regrutiraju adaptore koji uključuju niz signalnih intermediara, prije svega kinaza, kako bi formirali kompleks signalizacije (CSN od engl. *complex of signaling*). To dalje prenosi signal putem različitih drugih drugih posrednika poput kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cAMP-a, cikličkog guanozin monofosfata (cGMP), diacilglicerola (DAG), inozitol trifosfata (IP3), kinaza, lipida derivata, fosfataza itd. Takvi 'sekundarni posrednici' međusobno komuniciraju, integriraju raznolike informacije i prenose ih ciljnim molekulama u

citoplazmi i/ili jezgri, aktivirajući efektorske funkcije (120-126).

## **2.10. Prijenos signala u tumorskim stanicama**

Tumor nastaje kao rezultat genetskih i epigenetskih promjena koje potiču nekontrolirano razmnožavanje stanica i izbjegavanje normalnih mehanizama koji reguliraju njihovu preživljavanje i migraciju. Mnoge od ovih promjena povezane su sa signalnim putovima koji kontroliraju rast, diobu, smrt, sudbinu i pokretljivost stanica. Ove promjene mogu biti povezane s promjenama širih signalnih mreža koje potiču napredovanje tumora, kao što su promjene u tumorskom okruženju, angiogeneza i upala. Mutacije koje pretvaraju proto-onkogene u onkogene mogu uzrokovati prekomjernu aktivnost ovih signalnih putova, dok isključivanje tumorskih supresora eliminira ključne negativne regulatore signalizacije (127). Pregled puta PI3K-Akt i puta Ras-MAP-ERK ilustrira kako ove promjene poremete prijenos signala u stanicama i dovode do karakterističnih značajki tumora. Složenost mreža staničnih signalnih putova ima važne implikacije za razumijevanje ponašanja tumorskih stanica i našu sposobnost primjene tog znanja u terapiji tumora. Proliferacija, pokretljivost i preživljavanje stanica reguliraju se putem više putova, a promjene koje se događaju u stanicama tumora rezultat su brojnih promjena u staničnoj signalizaciji. Stanice tumora su genetski nestabilne, prolaze kroz višestruke genetske i epigenetske promjene te se kontinuirano razvijaju pod utjecajem selektivnih pritisaka. Čak i ako se mutacijski aktivirani put može blokirati inhibitorom, tumorske stanice mogu izbjeći inhibitor aktiviranjem drugih putova. Stoga, iako rane faze maligniteta mogu reagirati na pojedinačne inhibitore - kao što je primjer lijeka Gleevec (Imatinib, STI-571, inhibitor tirozinskih kinaza) (128) - učinkovite terapije za naprednije malignitete mogu zahtijevati kombinacije inhibitora signalizacije ili kombinaciju inhibitora signalizacije s tradicionalnim kemoterapijskim sredstvima koja oštećuju DNA. Neke od najčešće promijenjenih signalnih putova prikazane su na slici 6.

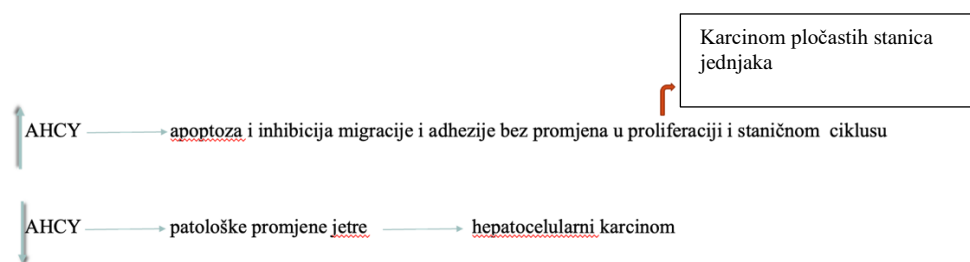


**Slika 6.** Slika prikazuje signalne mreže koje su najviše promijenjene u tumorskim stanicama. Može se vidjeti da do najvećih promjena dolazi u prijenosu signala u procesima koji su uključeni u staničnu proliferaciju (129) (Ras, Raf, MEK) migraciju-adheziju (b1 integrin).

## 2.11. Deficijencija SAHH u tumorskim stanicama

Promjene u signalnim putovima uzrokovane deficijencijom S-adenozilhomocistein-hidrolaze (SAHH) mogu imati značajan utjecaj na metilacijske reakcije u stanicama. Metilacijske reakcije, koje uključuju dodavanje metilne skupine DNA i drugim molekulama, igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Nedostatak aktivnosti SAHH-a može dovesti do neravnoteže u razinama S-adenozilhomocisteina (SAH), što može ometati metilacijske reakcije u stanicama. Ova poremećena epigenetska regulacija može utjecati na ekspresiju gena koji su uključeni u rast stanica, diferencijaciju i apoptozu (programiranu staničnu smrt), što je sve povezano s razvojem tumorskih stanica. Stanice tumora pokazuju nekontrolirani rast i proliferaciju. Nakupljanje SAH-a zbog nedostatka aktivnosti SAHH-a može utjecati na ove procese putem promjena u obrascima metilacije i ekspresiji gena. Promijenjeni obrasci metilacije mogu dovesti do poremećaja gena koji kontroliraju napredak staničnog ciklusa i rast, potencijalno promovirajući formiranje i rast tumora. Nedostatak aktivnosti SAHH-a također može poremetiti ravnotežu metabolita u metaboličkom putu jednog ugljika, što je ključno za osiguravanje metilnih skupina za različite stanične procese. Ovi metabolički poremećaji mogu utjecati na

sposobnost tumorskih stanica da zadovolje svoje metaboličke zahtjeve za brzim rastom i proliferacijom. Stoga je cilj ove doktorske disertacije analizirati diferencijalno eksprimirane signalne putove u staničnim linijama MCF7, SW480 i te HEK293T (HEK293T stanična linija je *in vitro* transformirana, potrebna nam je za usporedbu između tumorskih i *in vitro* transformiranih staničnih signalnih putova), kako bismo bolje razumjeli mehanizme povezane s nedostatkom SAHH i njegov utjecaj na razvoj tumora.



**Slika 7.** Shematski prikaz uloga SAHH u različitim staničnim linijama.

Ovisno o tipu tumora koji se proučava razina SAHH-a ima različite učinke na stanični fenotip. U slučaju povećane aktivnosti SAHH-a dolazi do apoptoze i inhibicije migracije i adhezije bez promjena u proliferaciji i staničnom ciklusu karcinoma pločastih stanica jednjaka (Slika 7). U slučaju smanjene aktivnosti SAHH-a dolazi do patoloških promjena jestre i hepatocelularnog karcinoma. Zbog toga se smatra da je uloga S-adenozil homocistein hidrolaze potencijalno tkivno specifična. Gen za *S-adenozil homocistein hidrolazu* prvotno je kategoriziran kao tumor supresor.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

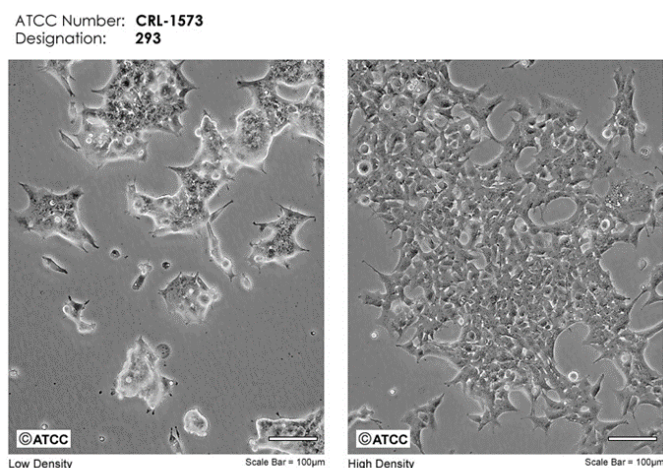
#### 3.1. Materijali

U Tablici 1. navedene su stanične linije koje su korištene za uspostavu eksperimentalnog modela u izradi ove doktorske disertacije.

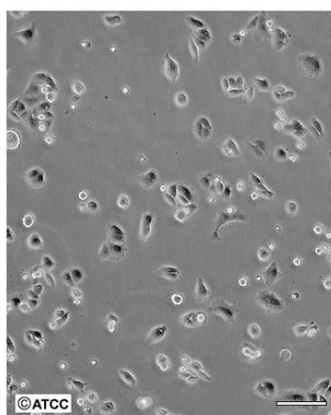
**Tablica 1.** Korištene stanične kulture

Ime	ATCC® kod	Opis
MCF7	HTB-22	Stanična linija karcinoma dojke
HEK293T	CRL-1573™	Stanična linija epitelnih stanica bubrega iz embrija
SW480	CCL-228	Stanična linija kolorektalnog tumora
THLE3	CRL-3583™	Stanična linija epitelnih stanica izolirana iz lijevog režnja jetre donora, primarna kultura

Postoji nekoliko varijanti staničnih linija izvedenih iz HEK293, od kojih je posebno važna HEK293T stanična linija koja je iznimno pogodna za transfekciju jer sadrži virusni (SV40) T-antigen koji omogućuje episomsku replikaciju transfeciranih plazmida koji sadrže ishodište replikacije r SV40. Na slici 7.1. prikazane su slike staničnih linija korištenih u izradi eksperimenata.

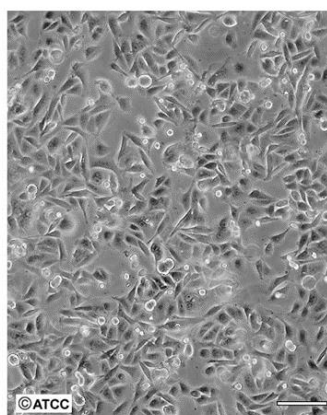


ATCC Number: **CCL-228**  
Designation: **SW 480**



©ATCC  
Low Density

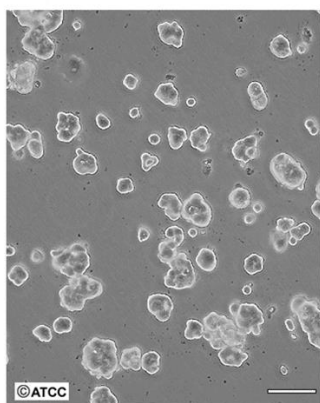
Scale Bar = 100µm



©ATCC  
High Density

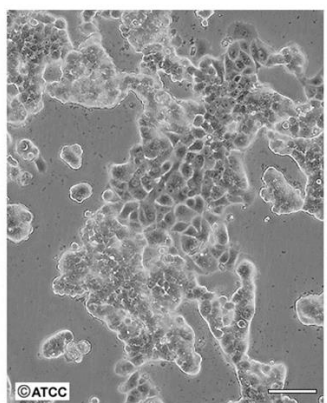
Scale Bar = 100µm

ATCC Number: **HTB-22**  
Designation: **MCF-7**



©ATCC  
Low Density

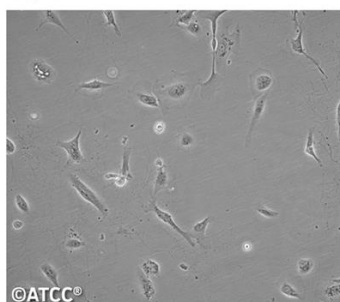
Scale Bar = 100µm



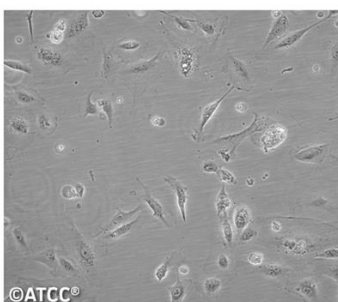
©ATCC  
High Density

Scale Bar = 100µm

ATCC Number: **CRL-11233**  
Designation: **THLE-3**



©ATCC  
Low Density



©ATCC  
High Density

**Slika 7.1.** MCF7, SW480, THLE3 i HEK293T su stanice koje su korištene u ovom doktorskom istraživanju za uspostavljanje eksperimentalnog modela. Preuzeto s <https://www.atcc.org>. Dio analize RNA-seq podataka je proveden na sirovim RNA-seq podacima dobivenim iz fibroblasta bolesnika koji su dobiveni i dostupni u našem laboratoriju iz prethodnih istraživanja CTRL-vs-CRO (usporedba diferencijalne ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika CRO i kontrolnog zdravog fibroblasta CTRL) i FibrosTENA-vs-FibrosUSA (usporedba diferencijalne

ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika FibrosUSA i kontrolnog zdravog fibroblasta FibrosTENA).

### 3.2. Metode

Metodološki prikaz eksperimentalnog tijeka izrade ove disertacije prikazan je na Slici 12.



**Slika 12.** Shematski prikaz izvedbe pokusa doktorske disertacije. Nakon proizvodnje lentivirusa u pakirajućim stanicama uslijedilo je generiranje stabilno utišanih staničnih linija. Prvi korak provjere efikasnosti utišavanja je provjera razine proteina S- adenozil homocistein hidrolaze metodom Western blota. Nakon što je uspješno provjerena i potvrđena smanjena razina SAHH određen je omjer metabolita SAM/SAH za sve tri stabilno utišane stanične linije (HEK293T, SW480, MCF7) nakon toga je provedena metoda RNAseq te su u konačnici analizirani signalni putovi uz pomoć programa IPA (od engl. *Ingenuity Pathway Analysis*).

Laboratorij za naprednu genomiku raspolaže s plazmidima psPAX2 i pMD2.G potrebnim za formiranje ovojnice lentivirusa te plazmidima s konstruktom za utišavanje gena *SAHH* shRNA2, shRNA3, shRNA4, shRNA 5 u bakterijskim kulturama koje su pohranjene pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Stoga je plazmide trebalo najprije izolirati iz bakterija. Dok je kontrolnu shRNA (engl. *scrambled*) trebalo unijeti u bakterije elektroporacijom.

#### 3.2.1. Transformacija bakterija elektroporacijom i uzgoj elektrokompetentnih stanica

Za umnažanje plazmidnih konstrukata korišten je elektrokompetentni soja bakterije *Escherichia coli* soj DH5 $\alpha$ . To su genetski modificirane bakterijske stanice koje su sposobne prihvatiti strane molekule DNA putem elektroporacije. One se često koriste u molekularnoj biologiji za transformaciju i amplifikaciju rekombinantne DNA, a također su osjetljive na širok spektar antibiotika, što olakšava selekciju transformiranih stanica. Bakterije su uzgojene preko noći u 100 mL tekućeg medija LB (od engl. *Lauria-Bertani*), pri temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$  i uz rotaciju 250 rpm. Slijedeći dan suspenzija bakterija inkubirana je na ledu 30 min, nakon čega je centrifugirana 5 min pri  $6000 \times g$  i temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ . Potom je talog bakterija resuspendiran je

u sterilnoj otopini CaCl<sub>2</sub>, te je ponovno centrifugirana 5 min pri 6000 × g i temperaturi 4°C. Dobiven talog je na kraju resuspendiran u 10 mL prethodno pripremljene otopine CaCl<sub>2</sub> s 25%-tnim glicerolom. Suspenzija bakterija je alikvotirana po 100 µL, te pohranjena pri -80°C do uporabe. Ovaj postupak je proveden za kontrolni plazmid shRNA (od engl. *scrambled*) koji je bilo potrebno unijeti u bakterije elektroporacijom, ali je prije toga bilo potrebno uzgojiti odgovarajuće bakterije koje su elektrokompetentne. Kako bismo učinkovito umnožili plazmide koji sadrže shRNA za utišavanje sa slučajnim rasporedom, transformirali smo bakterijske stanice koristeći postupak elektroporacije. Na taj način omogućili smo plazmidu da se umnoži unutar bakterija, što će rezultirati dobivanjem dovoljne količine plazmida za daljnje eksperimente. Elektroporacija je učinkovita metoda za unošenje stranog genetskog materijala u bakterijske stanice. Elektrokompetentne stanice *E. coli* su transformirane pomoću uređaja 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 kivete s aluminijskim elektrodama. Stanice su zatim resuspendirane u 1 mL toplog tekućeg medija LB i inkubirane u rotacijskoj tresilici pri 37°C, 250 rpm-a, 60 min. Nakon oporavka stanice se nasađuju u tekućem mediju LB s dodatkom odgovarajućih antibiotika da bi se zadržao selekcijski pritisak. Prekonoćne kulture sojeva *E. coli* su uzgajane pri 37°C u rotacijskoj tresilici pri 250 rpm-a. U svrhu dugotrajnog pohranjivanja pojedinačnih klonova u epruvetama za smrzavanje, 1 mL bakterijskih stanica se taloži centrifugiranjem pri 2000 rpm-a 10 min, a talog se resuspendira u 1 mL medija za pohranu i sprema pri -80°C. Ukupne suspenzije (1 mL) bakterija transformiranih elektroporacijom su taložene pri 2000 rpm 10 min, nakon čega je talog resuspendiran u 100 µL svježeg medija LB. Suspenzija se nasađuje razmazivanjem steriliziranim staklenim štapićem na krutu hranjivu podlogu LB pripremljenu u plastičnim Petrijevim zdjelicama s prethodno dodanim odgovarajućim antibioticima. Nakon upijanja suspenzije u podlogu, ploče su inkubirane preko noći pri 37°C. Kolonije s ploča su se prenosile u tekući hranjivi LB medij pomoću sterilnih nastavaka za pipete. Sasatv medija i hranjivih podloga za uzgoj bakterijskih i humanih stanica prikazan je u Tablici 1.1.

**Tablica 1.1.** Sastav hranjivih podloge i medija za uzgoj bakterijski i humanih stanica

Naziv	Sastav
<i>Lauria-Bertani</i> (LB) hranjiv tekući medij za uzgoj bakterija	Sigma, SAD 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl,

	10 g/L tripton
<i>Lauria-Bertani</i> (LB) hranjiv kruti medij za uzgoj bakterija	Sigma, SAD 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton, 13 g/L agar
Tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica DMEM ( <i>engl. Minimum Essential Medium Eagle</i> )	Sigma, SAD Nadopunjena dodatkom 10 % (v/v) seruma goveđeg albumina
Tekuća hranjiva podloga za uzgoj stanica DMEM ( <i>engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Sigma, SAD Nadopunjena dodatkom 10 % (v/v) seruma goveđeg albumina
Reducirana tekuća hranjiva podloga <i>Opti-MEM</i> <sup>®</sup>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD
Serum goveđeg albumina ( <i>engl. Fetal Bovine Serum</i> , FBS)	Sigma, SAD
Otopina tripsina za presađivanje stanica	Sigma, SAD 0,05 % (w/v) tripsin, 1 mM EDTA
Fosfatni pufer ( <i>engl. Phosphate buffered saline</i> , PBS)	Sigma, SAD

Za transformaciju bakterija plazmidnom DNA korištene su kemokompetentne i elektrokompetentne bakterije. Soj XL1 je soj *recA*<sup>-</sup>, odnosno deficijentan je za rekombinazu A, što omogućuje umnažanje plazmida u bakterijama bez mogućnosti njegove rekombinacije. Popis korištenih enzima i plazmida u izradi eksperimentalnog modela naveden je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Popis korištenih enzima i plazmida u izradi eksperimentalnog modela

Naziv kompleta	Proizvođač
<b>RNA Zymo Research Quick-RNA Miniprep kit</b>	Zymo, USA, California
pMD2.G, plazmid koji kodira gene za lentivirusnu ovojnica	Sigma Aldrich
shRNA kontrolni plazmid ( <i>engl. scrambled</i> )	Sigma Aldrich
shRNA 2 sekvenca za utišavanje gena od interesa SAHH	Sigma Aldrich
shRNA 3 sekvenca za utišavanje gena od interesa SAHH	Sigma Aldrich
shRNA 4 sekvenca za utišavanje gena od interesa SAHH	Sigma Aldrich
shRNA 5 sekvenca za utišavanje gena od interesa SAHH	Sigma Aldrich

### 3.2.1.1. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

Idući korak je izolacija plazmidne DNA iz bakterija. Plazmidi, kao kružni molekularni entiteti prisutni u bakterijskim stanicama, često sadrže ključne genetske informacije i elemente kao što su geni za rezistenciju na antibiotike ili gene odgovorne za sintezu važnih proteina. Izolacija plazmidne DNA omogućava pristup ovim ključnim informacijama, u ovom slučaju to je sekvenca potrebna za utišavanje gena od interesa shRNA2, shRNA3, shRNA4, shRNA5 te shRNA. Komercijalni komplet PureYield™ Plasmid Miniprep System se koristio za izolaciju pojedinačnih plazmidnih vektora iz 1-5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura prema uputama proizvođača. Za izolaciju plazmidnih DNA najprije su uzgojene prekonoćne bakterijske kulture. U 5 mL medija dodan je odgovarajući antibiotik. Budući da plazmidna DNA sadži gen koji bakterijama daje otpornost na ampicilin, kod uzgoja bakterija koje sadrže ovu plazmidnu DNA korišten je ampicilin konačne koncentracije 100 µg/mL. Dok je kod uzgoja bakterija s plazmidnom DNA dodan streptomycin konačne koncentracije 50 µg/mL, pošto plazmid sadži gen za rezistenciju na antibiotik streptomycin. Nastavkom za pipete uzet je mali alikvot matične otopine bakterija, koje su zatim inkubirane u inkubatoru pri 37 °C uz trešnju (200 rpm) preko noći. Sljedeći dan, kada su se bakterije razmnožile iz njih je izolirana plazmidna DNA pomoću komercijalnog kompleta prema uputama proizvođača. Ukratko 3 mL prekonoćne bakterijske kulture se centrifugira u epruveti od 1,5 mL i centrifugira 1 min pri sobnoj temperaturi i 12 000 x g, talog stanica se zatim resuspendira u 600 µL vode, te se doda 100 µL pufera za lizu stanica i promiješa se okretanjem 6 puta. Zatim se doda 350 µL hladne otopine za neutralizaciju i dobro se promiješa okretanjem. Smjesa se zatim centrifugira 3 minute na sobnoj temperaturi pri 12 000 x g, te se supernatant prebaci na kolonice i centrifugira se 1 min pri 12 000 x g kako bi došlo do vezanja nukleinskih kiselina na kolonicu. Zatim se doda 200 µL pufera za uklanjanje endotoksina te se kolonica ispere centrifugiranjem tijekom 1 min pri 12 000 x g. Ukloni se supernatant te se doda 400 µL otopine za ispiranje i centrifugira tijekom 1 min pri 12 000 x g. Ukloni se supernatant, kolonica se stavi u novu mikroeprevetu od 1,5 mL te se doda 30 µL otopine za eluciju. Kolonica se inkubira tijekom 2 min pri sobnoj temperaturi kako bi se pospješila elucija nukleinskih kiselina s kolonice, zatim se centrifugira 1 min pri 12 000 x g. Izoliranim nukleinskim kiselinama izmjeri se koncentracija, te se pohrane pri -20 °C do daljnje uporabe. U svrhu dobivanja veće količine plazmidne DNA, bakterije su uzgojene u 200 mL medija LB s dodatkom amplicilna preko noći pri 37°C uz trešnju (200 rpm), te je izolirana

plazmidna DNA koristeći PureYield™ Plasmid Midiprep System (proizvođač) komplet prema uputama proizvođača. Ukratko, 100 mL prekonoćne bakterijske kulture centrifugirano je tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi pri brzini 5 000 x g. Supernatant je maknut, te je talog bakterija resuspendiran u 3 mL otopine za resuspenziju stanica. Kako bi došlo do lize stanica dodano je 3 mL otopine za lizu stanica te je smjesa promiješana okretanjem 5 puta i inkubirana pri sobnoj temperaturi 3 min. Nakon inkubacije dodano je 5 mL otopine za neutralizaciju, te je smjesa promiješana i centrifugirana 15 min pri sobnoj temperaturi pri 15 000 x g. Plazmidna DNA koja se nalazila u supernatantu, prenijeta je na epruvetu za čišćenje, koja se nalazila iznad kolonice za vezanje. Primjenom vakuuma smjesa je prošla kroz obje kolonice te se plazmidna DNA vezala za kolonicu za vezanje. Plazmidna DNA je zatim pročišćena dodavanjem 5 mL pufera za odstranjivanje endotoksina, zatim 20 mL otopine za ispiranje kolonice. Kolonica je nakon ispiranja stavljena iznad mikroepirivete od 1,5 mL, te je dodano 600 µL redestilirane vode kako bi se plazmidna DNA eluirala. Nakon inkubacije koja je trajala 1 min, primijenjen je vakuum te je plazmidna DNA eluirana u epruvetu. Plazmidnoj DNA izmjerena je koncentracija kao što je opisano u sljedećem poglavlju, te je pohranjena pri -20°C. Ovaj postupak je proveden za plazmide: hRNA2, shRNA3, shRNA4, shRNA5 te plazmid shRNA.

### **3.2.1.2. Mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina**

Za određivanje koncentracije plazmidne DNA koristio se fluorometar Qubit 3.0 i Qubit® dsDNA BR Assay Kit (oba Thermo Fisher Scientific) s pripadajućim standardima u mikroepirivetama Qubit® Assay Tubes. Metoda se temelji na specifičnom vezanju fluorescentnog reagensa na molekulu DNA koje dovodi do emitiranja zračenja. Fluorimetar mjeri samo zračenje emitirano uslijed vezanja fluorescentne boje na molekulu DNA, čime se eliminira utjecaj onečišćenja na rezultat analize. Ova metoda je pouzdanija od metode mjerenja koncentracije klasičnim UV-spektrofotometrom jer se klasičnom metodom mjeri ukupna apsorbanacija koja može potjecati od različitih molekula i onečišćenja u otopini. Prije mjerenja koncentracije DNA u uzorku, potrebno je kalibrirati instrument korištenjem standardnih otopina, prema uputama proizvođača. Radna otopina se pripremi miješanjem 1 µL fluorescentnog reagensa i 189 µL pufera te se u nju doda 10 µL otopine standarda 1, odnosno standarda 2. Otopine za mjerenje koncentracije DNA u nepoznatim uzorcima pripreme se miješanjem 1 µL otopine fluorescentnog reagensa s 198 µL pufera. Tako pripremljenoj otopini dodaje se 1 µL uzorka DNA nepoznate koncentracije. Optički pogodna epruveta s pripremljenim uzorkom stavi se u uređaj i izmjeri se masena koncentracija DNA u uzorku.

### **3.2.1.3. Restriksijsko cijepanje plazmidne DNA**

Restriksijske endonukleaze su skupina enzima koji cijepaju nukleinske kiseline na određenim mjestima unutar lanca. U molekularnoj biologiji često se koriste za linearizaciju plazmidnih DNA, izrezivanje odsječaka DNA iz nukleinskih kiselina te uvođenje dvolančanih lomova. Za potrebe izrade ove disertacije restriksijske endonukleaze su se koristile za linearizaciju plazmidnih DNA, kako bi se mogla provjeriti njihova veličina elektroforezom na agaroznom gelu. Netaknute plazmidne DNA se u otopini mogu nalaziti u više oblika, najčešće u superzavijenom obliku, koji tijekom elektroforeze ne putuju ovisno o veličini. Linearizacijom plazmidne DNA omogućava se da ona putuje kroz agarozni gel ovisno o njezinoj veličini. Kako bi se elektroforezom na gelu agaroze mogla provjeriti veličina plazmidnih DNA, najprije se uz pomoć restriksijske endonukleaze lineariziraju. U tu svrhu koristi se restriksijska endonukleaza koja određenu plazmidnu DNA cijepa specifično samo na jednom mjestu. U ovom slučaju korištena je endonukleaza koja ima restriksijsko mjesto u genu za puromicinsku rezistenciju jer naši plazmidi sadrže puromicin kao selekcijski marker. Reakcijska smjesa se sastojala od 500 ng plazmidne DNA, 2,5  $\mu\text{L}$  pripadajućeg pufera pogodnog za određenu restriksijsku endonukleazu, 0,5  $\mu\text{L}$  restriksijske endonukleaze koncentracije 10 U/ $\mu\text{L}$ , te po potrebi redestilirana voda do ukupnog volumena reakcijske smjese 25  $\mu\text{L}$ .

### **3.2.1.4. Elektroforeza na gelu agaroze**

Elektroforeza je pogodan način karakterizacije makromolekula na temelju njihove brzine kretanja u električnom polju. Kako su po prirodi nukleinske kiseline negativno nabijene zbog posjedovanja fosfatnih skupina, lako se kreću pod utjecajem električnog polja. Agarozna nam služi kao molekularno sito pa s obzirom na činjenicu da je omjer naboja i mase gotovo jednak za sve polinukleotide dolazi do odvajanja manjih nukleotida od većih. Manji fragmenti lakše prolaze kroz pore, te tako brže putuju od većih. Ako na gelu uz ispitivane uroke imamo marker s poznatim veličinama nukleinskih kiselina, može se procijeniti veličinu uzorka. Za pripremu 1%-tnog gela agaroze potrebno je 1 g agaroze otopiti u 100 mL pufera TAE uz zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici. Nakon što se otopina ohladi doda se etidij-bromid finalne koncentracije 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , koji se interkalira između baza nukleinskih kiselina te kasnije služi za njihovu detekciju pod UV-svjetlom. Otopina se zatim izlije u odgovarajuću kadu, te se doda češalj za formiranje jažica. Kada se gel polimerizira izvadi se češalj, te je spreman za korištenje.



Pripremljeni gel stavi se u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi pufer TAE. Prije nanošenja uzorci su pomiješani sa 6× smjesom za nanošenje nukleinskih uzoraka na gel, tako da je finalna koncentracija smjese 1×. U jažice je nanošen tako pripremljen uzorak, a u dodatnu jednu jažicu dodao se marker s poznatim veličinama nukleinskih kiselina Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder. Nakon što se nanese uzorci pokrene se elektroforeza pri 120 V u trajanju od 20 do 30 min. Nakon elektroforeze nukleinske kiseline detektiraju se pomoću transiluminatora Uvitec. 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 pomiješani s puferom za nanošenje. 6 × GLB (od 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 6×8W 312 nm (UVITEC) pri  $\lambda = 312$  nm čime se pobuđuje fluorescencija EtBr koji je interkalirao u molekule nukleinskih kiselina.

### **3.2.1.5. Transformacija bakterija plazmidnom DNA**

Transformacija, unos strane plazmidne DNA u stanice bakterija, izvedena je pomoću elektroporacije. Kod elektroporacije primjenjuje se kratak i snažan električni puls zbog kojeg dolazi do kratkotrajne promjene strukture stanične stijenke bakterija što rezultira povećanom permeabilnošću za molekule DNA i time mogućnošću njenog ulaska u stanicu. Plazmidne DNA korištene kod transformacije sadrže mjesto replikacije, čime je omogućeno umnažanje same plazmidne molekule DNA u bakterijskim stanicama, kako bi se mogla proizvesti veća količina plazmidne DNA. U svrhu provjere i dobivanja veće količine plazmidne DNA nakon LR reakcije, 1  $\mu$ L smjese nakon LR reakcije je dodan u 50  $\mu$ L elektrokompetentnih stanica E. coli DH5 $\alpha$ . Smjesa je zatim prebačena u hladnu kivetu za elektroporaciju te su bakterije podvrgnute električnom pulsu pomoću elektroporatora GenePulser Xcell™. Neposredno nakon elektroporacije stanice su resuspendirane u 1 mL LB medija sobne temperature i inkubirane 1

sat pri 37 °C uz protresanje. Po završetku inkubacije 200 µL suspenzije stanica nasađeno je na selekcijske podloge koje se sastoje od LB medija u kojem je dodan agar i ampicilin. Podloge su inkubirane preko noći na 37°C pri čemu su na selektivnim podlogama rasle samo bakterije koje su primile plazmid s genom za rezistenciju na ampicilin. Sljedeći dan nasumično je odabrano 5 naraslih kolonija iz kojih je izolirana plazmidna DNA koja je zatim linearizirana restriksijskom endonukleazom, te provjerena elektroforezom na agaroznom gelu kao što je opisano u prethodnim poglavljima. Ukoliko je došlo do uspješne transformacije i izolacije tražene plazmidne DNA, određeni alikvot transformiranih bakterijskih stanica pomiješa se sa 50%-tnom vodenom otopinom glicerola (v/v) u omjeru 1:1, te su tako transformirane bakterije pohranjene pri -80 °C.

### **3.2.2. Rad sa staničnim kulturama**

U izradi ove doktorske disertacije za potrebe uspostavljanja stabilno utišanih staničnih linija za gen *SAHH* korištene su stanične linije: SW480, MCF7 i HEK293T. Stanice su uzgajane u tekućem hranjivom mediju DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) obogaćenim 10%-tnim FBS-om (od engl. *Fetal Bovine Serum*) i L- glutaminom. Stanice u mediju su uzgajane u sterilnim uvjetima, u sterilnoj prostoriji za rad sa staničnim kulturama, u plastičnim posudicama u inkubatoru pri 37°C u vlažnoj atmosferi, obogaćenoj s 5%-tnim CO<sub>2</sub>. Stanična linija THLE3 uzgaja se u potpunom mediju koji se priprema od BEGM (od engl. *Bronchial Epithelial Growth Medium*) bazalnog medija. Ovaj komplet uključuje 500 mL bazalnog medija i odvojene smrznute dodatke, pri čemu se iz sastava izostavlja gentamicin/amfotericin (GA) i epinefrin, a dodaju se dodatne komponente u obliku 5 ng/mL epidermalnog faktora rasta (EGF, od engl. epidermal growth factor), 70 ng/mL fosfoetanolamina i 10% FBS-a. Ovaj prilagođeni medij osigurava optimalne uvjete za rast i održavanje stanica THLE3 u laboratorijskom okruženju.

#### **3.2.2.1. Presađivanje i održavanje stanica u kulturi**

Za uspostavu staničnih kultura, uzet je alikvot stanica pohranjen u tekućem dušiku u tekućem mediju za zamrzavanje. Stanice su brzo odmrznute te je dodan 1 mL svježeg medija ovisno o korištenoj staničnoj liniji. Suspenzija stanica je zatim prebačena u epruvetu za centrifugiranje od 15 mL te je centrifugirana 5 min pri sobnoj temperaturi i brzini od 250 × g. Nakon centrifugiranja stanice su resuspendirane u 10 mL svježeg medija i prebačene u plastičnu Petrijevku za uzgoj stanice, te stavljene u inkubator. Nakon što stanice dosegnu ~90 %

konfluentnosti bile su presađene i/ili korištene za izvođenje daljnjih eksperimenata. Stanične linije HEK293T, SW480 i MSCF7 rastu kao adherentne stanice, stoga je kod njihovog presađivanja najprije uklonjen medij te su stanice isprane sa 3 mL PBS-a. Kako bi se stanice odvojile od dna posudice, dodan je 1,5 mL otopine tripsina, te su stanice inkubirane 5 min u inkubatoru. Nakon što su se odvojile od podloge, dodano je 5 mL hranjivog medija za uzgoj, te je alikvot stanica prebačen u novu posudicu za uzgoj i nadopunjen svježim medijem za uzgoj stanica. Ako je kod nasađivanja stanica i izvođenja eksperimenata bio potreban određen broj stanica, uzet je alikvot stanica od 150  $\mu$ L nakon tretmana tripsinom i dodatkom 9 mL medija, te je 100  $\mu$ L stanične suspenzije korišteno za brojanje stanica pomoću brojača stanica Beckman Coulter Z2. Brojač stanica koristi princip električne impedancije kako bi odredio broj stanica u uzorku. Impedancija je mjera ukupnog otpora električnoj struji koja prolazi kroz materijal ili sustav. Ona uključuje otpor, reaktancu i fazni kut te se obično izražava u ohmima ( $\Omega$ ). Kada se stanična suspenzija ubrizga u brojač stanica, prolazi kroz uski otvor kroz koji prolazi električna struja. Stanice u suspenziji stvaraju promjene u električnoj impedanciji dok prolaze kroz otvor. Ove promjene u impedanciji bilježe se i analiziraju. Brojač stanica koristi ove promjene impedancije kako bi identificirao i brojao pojedinačne stanice. U kontekstu brojača stanica, impedancija se koristi za mjerenje promjena u električnoj struji koje nastaju kada stanice prolaze kroz uski otvor. Stanice, kao električni provodnici, mijenjaju protok struje zbog svoje veličine, oblika i električnih svojstava. Ove promjene u struji bilježe se kao promjene u impedanciji. Mjerenje impedancije omogućuje brojaču stanica da identificira i broji pojedinačne stanice u uzorku. Otpor i reaktanca koje se mjere pomažu u razlikovanju stanica od drugih čestica ili neživih materijala koji mogu biti prisutni u uzorku. Na temelju tih podataka, brojač stanica izračunava koncentraciju stanica u uzorku, izraženu kao broj stanica po mililitru.

### **3.2.2.1.1. Odmrzavanje staničnih kultura**

Nakon što su zamrznute stanice izvađene iz zamrzivača ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), uronjene su u vodenu kupelj pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Pazilo se da se ampule ili epruvete s stanicama ne otvore tijekom uranjanja. Ostavljene su u vodenoj kupelji samo dok se sadržaj ampule ili epruvete nije otopio dovoljno da se može prenijeti u staničnu kulturu. Sadržaj ampule prenesen je u sterilnu epruvetu koja je sadržavala svježi stanični medij odnosno 5 ml svježeg medija. Nježno se promiješalo kako bi se osiguralo ravnomjerno miješanje stanica s medijem. Epruveta s mješavinom stanica i medija je centrifugirana kako bi se odstranili ostatci zamrznutog medija i koncentrirale stanice na dnu epruvete. Pažljivo se uklonio supernatant (tekućina iznad taloga) kako bi se izbjegao gubitak

stanica. Ostavljena je mala količina medija kako bi se stanice resuspendirale. Svježi stanični medij, 5 ml je dodan u epruvetu kako bi se stanice resuspendirale. Nježno se promiješalo kako bi se osiguralo ravnomjerno raspoređivanje stanica u mediju. Resuspendirane stanice su prebačene u pripremljenu staničnu kulturu od ukupno 10 ml. Pazilo se da se koriste sterilni uvjeti i alati kako bi se spriječila kontaminacija. Stanična kultura je inkubirana na optimalnoj temperaturi od 37 °C i uvjetima rasta kako bi se omogućio oporavak stanica. Važno je napomenuti da su specifični koraci i uvjeti odmrzavanja stanica ovisni o vrsti stanica koje se koriste. Stoga je uvijek preporučljivo konzultirati protokole i upute dobavljene od proizvođača stanica ili literature koja se odnosi na specifičnu staničnu liniju.

#### **3.2.2.1.2. Zamrzavanje staničnih kultura**

Stanične kulture su zamrznute koristeći sljedeći postupak. Nakon što su stanice dostigle odgovarajuću gustoću, uklonjena je većina medija iz stanične kulture. Stanice su zatim resuspendirane u hladnom mediju za zamrzavanje od 5 mL koji sadrži odgovarajući krioprezervans odnosno dimetilsulfoksid. DMSO (dimetilsulfoksid) ima važnu ulogu u procesu zamrzavanja staničnih kultura. On djeluje kao zaštitna tvar koja pomaže u očuvanju stanica tijekom zamrzavanja i odmrzavanja. DMSO ima sposobnost prodrijeti u stanične membrane i smanjiti stvaranje leda unutar stanica tijekom zamrzavanja. To smanjuje rizik od oštećenja stanica uslijed stvaranja leda i kristalizacije. Također, DMSO ima svojstva koja pomažu u očuvanju staničnih membrana i stabilizaciji enzima i proteina unutar stanica tijekom zamrzavanja. To pridonosi očuvanju vitalnih funkcija stanica i njihovoj sposobnosti oporavka nakon odmrzavanja. Važno je napomenuti da se DMSO koristi u određenim koncentracijama i da se mora pažljivo rukovati kako bi se izbjegla moguća toksičnost. Pažljivo se pazilo da se stanice ravnomjerno rasporede u mediju. Nakon što su stanice resuspendirane, prenesene su u sterilne ampule za zamrzavanje. Ampule s resuspendiranim stanicama su postupno ohlađene na nisku temperaturu, obično koristeći kontrolirani zamrzivač ili tekući dušik. To je omogućilo postupno smanjenje temperature i sprečavanje oštećenja stanica. Konačno, zamrznute epruvete ili ampule su prenesene u zamrzivač gdje su čuvane na vrlo niskim temperaturama kako bi se osiguralo privremeno očuvanje stanica.

#### **3.2.2.2. Proizvodnja lentivirusa u stanicama HEK293T**

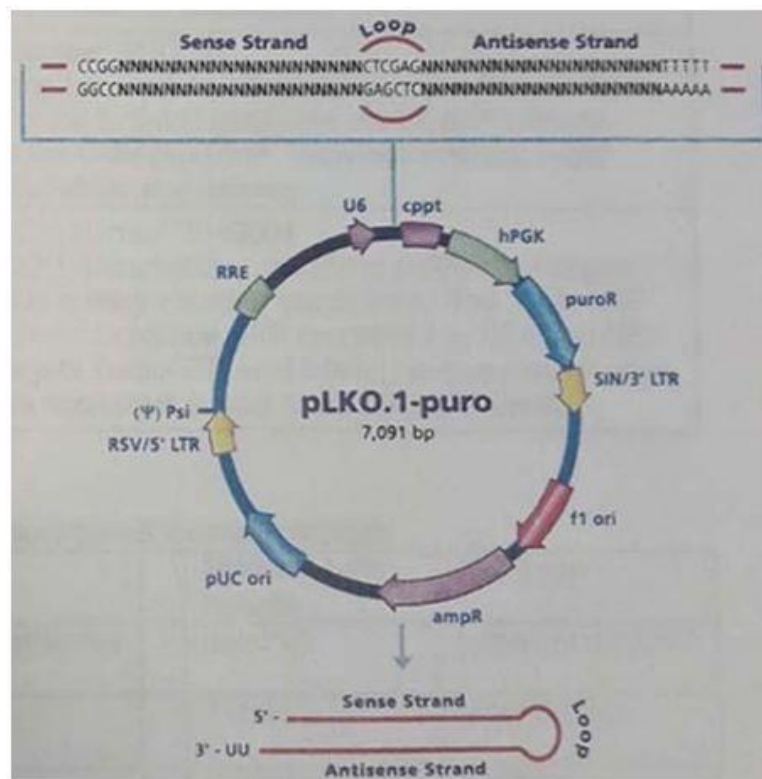
Stanice HEK293T, derivati linije HEK293, često se koriste kao domaćini za proizvodnju

lentivirusa zbog njihove visoke transfekcijske učinkovitosti i sposobnosti stvaranja visokih titara virusa. Ovaj proces uključuje transfekciju HEK293T stanica vektorima koji sadrže gensku informaciju za željeni lentivirus, čime se omogućava izlučivanje lentivirusnih čestica u medij. Nakon proizvodnje i koncentracije lentivirusa, dobivaju se visoke koncentracije infektivnih čestica koje se mogu koristiti za transdukciju ciljanih stanica i isporuku genetskog materijala.

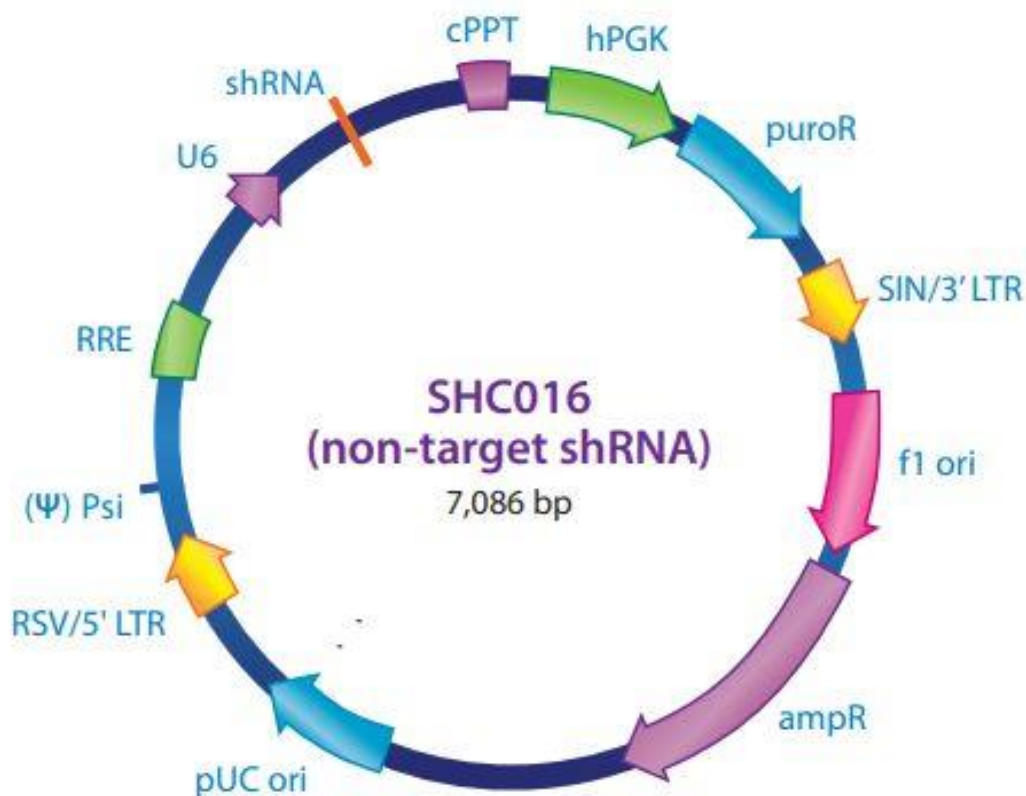
Transfekcija je proces namjernog unosa DNA u eukariotske stanice. Postoje različite fizikalne i kemijske metode za transfekciju, kao što su elektroporacija, lipofekcija ili transfekcija mikroinjekcijom. Ovdje je korištena metoda transfekcije uz reagens Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific). Reagens sadrži kationsku, lipidnu formulaciju koja omogućuje nastajanje kompleksa s negativno nabijenom plazmidnom DNA te pakiranje nastalih kompleksa u liposome. Nastali liposomi imaju pozitivno nabijenu površinu, što im omogućuje fuzioniranje s negativno nabijenom staničnom membranom te unos plazmidne DNA u stanicu. U četiri petrijevke promjera 10 cm nasadeno je po 4 milijuna stanica HEK293T, u 10 mL medija DMEM. Nakon 24 h, na stanice se dodaje smjesa reagensa za transfekciju pripremljena na sljedeći način: u jednoj mikroepreveti pomiješa se 42 µL transfekcijskog reagensa Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent i 500 µL medija za transfekciju Opti-MEM. U drugoj tubi pomiješa se 500 µL medija za transfekciju Opti-MEM, 36 µL p3000™ reagensa i ukupno 18 µg DNA, odnosno smjese plazmida kao što je navedeno u poglavlju o transdukciji. Bitno je da se plazmidi dodaju u ekvimolarnim omjerima. Pripremljene smjese se pomiješaju i inkubiraju 15 min pri sobnoj temperaturi, a zatim se konačna smjesa doda na stanice. Za stvaranje lentivirusnih čestica koje sadrže željeni insert potrebno je, uz sh RNA, odnosno plazmide za utišavanje (shRNA2, shRNA 3, shRNA4, shRNA5), dodati plazmid koji kodira gene za pakiranje lentivirusa (psPAX2) i plazmid koji kodira gene za lentivirusnu ovojnica (pMD2.G). Nakon 24 h promjeni se transfekcijski medij u petrijevkama te se stanicama doda 6 mL svježeg medija. Medij koji sadrži lentiviruse prvi put se skupi 48 h nakon transfekcije te se profiltrira kroz filter veličine pora od 0,45 µm kako bi se iz lentivirusnog supernatanta uklonile zaostale stanice. Na transfecirane stanice ponovno se doda 6 mL svježeg medija te se stanice ostave u inkubatoru dodatnih 24 h. Postupak sakupljanja lentivirusa se ponovi još jednom 72 h nakon transfekcije. Sakupljeni medij s lentivirusnim česticama čuva se pri -80°C. Ovaj postupak je proveden tako da su lentivirusi za kontrolnu shRNA (od engl. *scrambled*) proizvedeni odvojeno dok su shRNA 2 i shRNA 4 producirani zajedno u jednoj reakciji te su također sh RNA 3 i sh RNA 5 producirani kao kombinacija.

Za dobivanje lentivirusnih čestica, uz plazmide shRNA 2, shRNA3, shRNA4, shRNA5 koji sadrže sekvencu za utišavanje gena *SAHH* koja se stabilno ugrađuje u širu regiju genoma

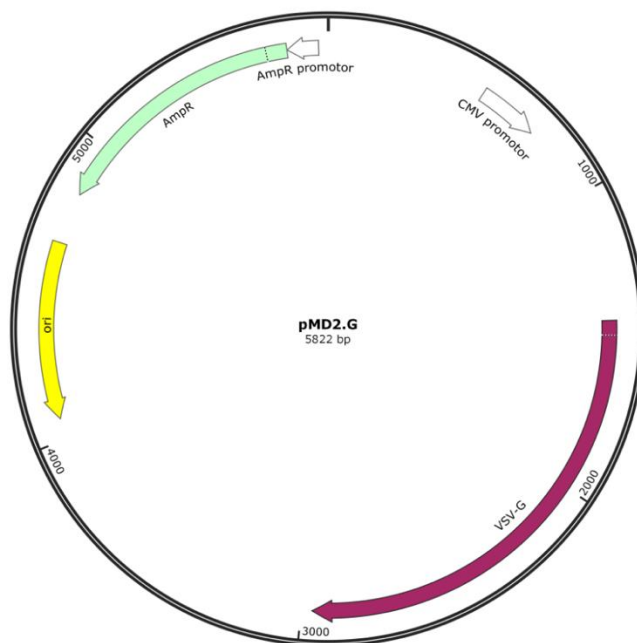
staničnih linija također su korišteni i plazmidi pMD2.G32 i psPAX233. Ti plazmidi sadrže kodirajuće sljedove za proteine koji su potrebni za nastajanje funkcionalnih lentivirusnih čestica (VSV-G, HIV-1 gag, HIV-1 pol). Mape plazmida prikazane su na slikama 10 i 11. Također, za proizvodnju kontrolnih lentivirusa korišten je kontrolni plazmid shRNA (od engl. *scrambled*) (Slika 8, Slika 9) koji sadrži kontrolnu nasumičnu sekvencu koja se stabilno ugrađuje u genom također u širu regiju genoma, ali ne kodira nijedan produkt uz plazmide pMD2.G32 i psPAX233.



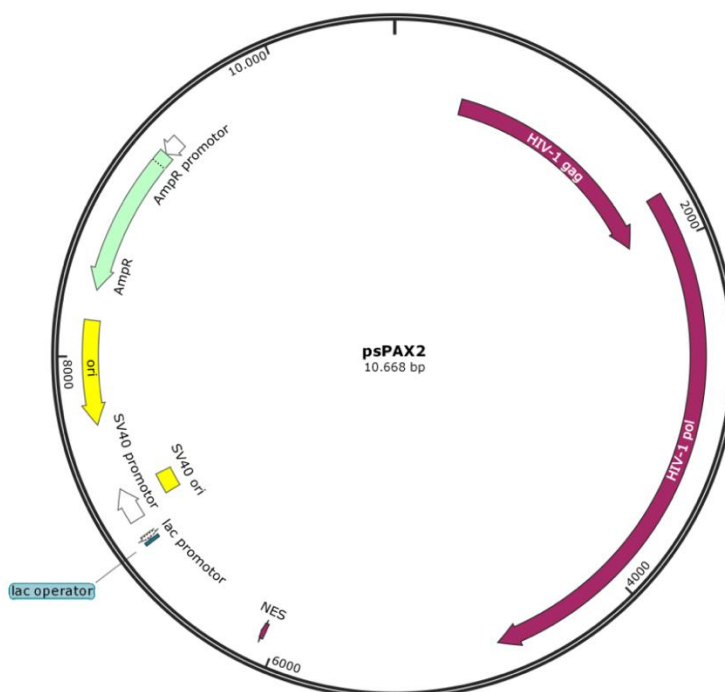
**Slika 8.** Restriksijska mapa shRNA plazmida sa sekvencom za utišavanje gena *SAHH*, plazmidi shRNA 2, shRNA3, shRNA4, shRNA5 imaju pLKO.1-puro kostur. Funkcionalni genetički slijedovi: U6, U6 promotor (ružičasto); cppt, centralni polipurinski dio (engl. ) (ružičasto); hPGK, promotor ljudske fosfoglicerat kinaze (zeleno); puroR/ampR, rezistencija na puromicin/ampicilin (plavo); SIN/3'LTR, 3' samoinaktivirajući dugački ponavljajući terminalni slijed (LTR, engl. *long terminal repeat*) (žuto); f1/pUC ori, f1/pUC ishodište replikacije (engl. *origin of replication*) (crveno i plavo); 5'LTR, 5' dugački ponavljajući terminalni slijed (žuto); Psi, signal za pakiranje RNA; RRE, element s odgovorom na Rev (engl. *Rev response element*) (zeleno); engl. *Sense/antisense strand*, smisleni/besmisleni slijed; engl. *Loop*, petlja. Preuzeto sa <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>.



**Slika 9.** Restriksijska mapa kontrolnog plazmida SHC016 (engl. *scrambled*) potrebnog za proizvodnju kontrolnih lentivirusa za kontrolu lentivirusne transdukcije. Funkcionalni genetički slijedovi: U6, U6 promotor (ljubičasto); cppt, centralni polipurinski dio (ljubičasto); hPGK, promotor ljudske fosfoglicerat kinaze (zeleno); puroR/ampR, rezistencija na puromicin/ampicilin (plavo); SIN/3'LTR, 3' samoinaktivirajući dugački ponavljajući terminalni slijed (engl. *long terminal repeat*) (žuto); f1 ori ishodište replikacije (engl. *origin of replication*) (crveno i plavo); 5'LTR, 5' dugački ponavljajući terminalni slijed (žuto); Psi, signal za pakiranje RNA; RRE, element s odgovorom na Rev (engl. *Rev response element*) (zeleno); engl. *Sense/antisense strand*, smisleni/besmisleni slijed; engl. *Loop*, petlja. Preuzeto sa <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>.



**Slika 10.** Mapa plazmida pMD2.G. Konstruirano korištenjem SnapGene Viewer 4.3.7. programskog alata. Plazmidni vektor sadrži promotor CMV (bijelo), gen VSV-6 (ljubičasto), rezistenciju na ampicilin (zeleno), promotor AmpR, ori ishodište replikacije (žuto).



**Slika 11.** Mapa plazmida psPAX2. Konstruirano korištenjem SnapGene Viewer 4.3.7. programskog alata. Plazmidni vektor sadrži promotor CMV (bijelo), gene HIV-1gag i HIV-1 POL (ljubičasto), rezistenciju na ampicilin (zeleno), promotor AmpR, ori ishodište replikacije (žuto), SV40 ori i SV40 promotor.



### 3.2.2.3. Test MTT

Kako bi bilo moguće provesti selekciju staničnih linija puromicinom, potrebno je odrediti njegovu radnu koncentraciju, odnosno najmanju koncentraciju antibiotika pri kojoj ne dolazi do rasta stanica. Radna koncentracija antibiotika određena je testom MTT, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na mjerenju apsorbancije formazana ( $\lambda=570$  nm). Budući da formazan nastaje redukcijom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijevog bromida (MTT) pomoću NAD(P)H ovisnih oksidoreduktaza, ovom metodom se može utvrditi udio metabolički aktivnih stanica. Test MTT se temelji na sposobnosti živih stanica da pretvore reagens MTT u formazan kristale, koji se mogu kvantitativno izmjeriti spektrofotometrijski. Ova konverzija ovisi o aktivnosti enzima u mitohondrijima, koji je povezan s metabolizmom stanica. Test MTT se često koristi za procjenu citotoksičnosti tvari, kao i za određivanje učinka terapijskih agenasa na stanice. Također se može koristiti za određivanje stanične proliferacije, invazivnosti i migracije. Ovaj test je brz, jednostavan i pouzdan. Test MTT je napravljen u svrhu određivanja toksičnosti puromicina i određivanja broja virusnih čestica. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasadi se po 3000 stanica HEK293T resuspendiranih u 200  $\mu\text{L}$  DMEM medija. Stanice se 24 h inkubiraju pri 37°C, a zatim im se doda antibiotik puromicin ( $\gamma = 10$  mg/mL) u sljedećim koncentracijama: 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrola koriste se jažice bez antibiotika, a sam test se provodi u tehničkim triplikatima. Stanice s antibiotikom se inkubiraju 5 dana pri 37°C. Sadržaj mikrotitarske pločice (medij) izlije se te se u svaku jažicu dodaje po 40  $\mu\text{L}$  otopine MTT. Stanice se inkubiraju 4 h na 37°C kako bi oksidoreduktaze ovsine o NAD(P)H u metabolički aktivnim stanicama reducirale MTT u netopljivi formazan. Potom se u svaku jažicu doda po 170  $\mu\text{L}$  DMSO, te se stavi na tresilicu 15 min kako bi se kristali formazana otopili. Mikrotitarska pločica se zatim stavi u spektrofotometar i očita se apsorbancija na  $\lambda=570$  nm za svaku pojedinu jažicu. Dobiveni podaci se analiziraju i odredi se postotak preživjelih stanica u mediju s različitim koncentracijama puromicina.

### 3.2.2.4. Transdukcija

Transdukcija je proces unosa DNA u stanicu pomoću virusa. U prirodi dovodi do horizontalnog prijenosa gena među bakterijama, a u laboratoriju se koristi za uvođenje gena u genom bakterijskih i eukariotskih stanica. U prirodi transdukciju provode bakteriofazi, a u laboratoriju se najčešće koriste retrovirusi te lentivirusi. Lentivirusi su podvrsta retrovirusa koji, za razliku

od retrovirusa, mogu inficirati i stanice koje se ne dijele, što ih čini najpogodnijima za unos DNA u stanicu. Sadrže gen za reverznu transkriptazu, koja omogućuje prepisivanje virusne RNA u DNA, te integrazu koja omogućuje ugradnju DNA u stanicu domaćina.

**Tablica 3.** Ekvimolarna množina plazmida shRNA korištenih u ovom eksperimentu.

	m/ng
<b>pMD2G</b>	3600
<b>pSPAX2</b>	6588
<b>shrna 2</b>	3890
<b>shrna 3</b>	3940
<b>shrna 4</b>	3200
<b>shrna 5</b>	3658

Za povećanje uspješnosti transfekcije korišten je reagens polibren (od engl. *Polybrene*, Sigma Aldrich), kationski polimer (heksadimetrin bromid) koji neutralizira elektrostatsko odbijanje između virusnih čestica i površine stanice. Njegova uloga je poboljšati transdukciju i povećati učinkovitost prijenosa gena u ciljne stanice. Polibren djeluje tako da neutralizira negativno nabijene površine stanica, što olakšava vezanje i ulazak lentivirusnih čestica u stanice. Osim toga, polibren može pomoći u sprečavanju agregacije virusnih čestica, što može poboljšati njihovu stabilnost i sposobnost infekcije. Dodavanje polibrena u medij za infekciju lentivirusom može rezultirati povećanom stopom transdukcije, tj. prenošenjem genetskog materijala u ciljne stanice. To može biti posebno korisno u slučajevima kada je potrebno postići visoku učinkovitost transdukcije ili kada su ciljne stanice inače teže za infekciju. U mikrotitarsku pločicu s 12 jažica nasadi se po 300 000 stanica po jažici, u 2 mL DMEM medija s dodanim polibrenom do konačne koncentracije 8 µg/mL. Na stanice se dodaju sljedeći volumeni lentivirusnih čestica: 0 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL i 400 µL. Pripremljena smjesa za transdukciju centrifugira se 2 h pri 33°C i 1000 × g. Nakon 24 h medij s reagensima za transdukciju se makne, stanice se dva puta isperu PBS-om i presade se iz mikrotitarske pločice s 12 jažica u pločicu s 96 jažica. Nasađuje se po 2500 stanica po jažici, po četiri jažice za svaki uvjet u kojem se provodila transdukcija (za svaki dodani volumen lentivirusnih čestica). Stanice se nasađuju u 200 µL DMEM medija. U dvije od četiri jažice nasađene za svaki uvjet, dodaje se antibiotik puromicin do konačne koncentracije 0,6 µg/mL. Stanice se

uzgajaju 5 dana u inkubatoru pri 37°C. Iz očitane apsorbancije pri 570 nm izračuna se postotak preživjelih stanica u jažicama s dodanim antibiotikom, odnosno stanica koje su ugradile plazmid s usmjeravajućim nukleotidnim slijedom za narušavanje gena. Iz broja preživjelih stanica odredi se broj lentivirusnih čestica u 1 mL medija prema formuli:

$$\text{titar} = \frac{1\text{mL}}{\text{razrijeđenje}} \times \frac{\% \text{ preživljenja}}{100 \%} \times \text{broj nasađenih stanica}$$

**Slika 13.** Formula za određivanje lentivirusnog titra.

Ovaj postupak je proveden tako da je svaka stanična linija ( MCF7, SW480, HEK293T, THLE3) inficirana s dvije kombinacije lentivirusa shRNA 2+ sh RNA4 i shRNA 3 + shRNA 5) te je također svaka stanična linija inficirana i shRNAscrambled lentivirusima.

### 3.2.2.5. Određivanje multipliciteta infekcije

Na temelju prethodno određene koncentracije lentivirusa, izračuna se broj stanica koji je potrebno inficirati tako da multiplicitet infekcije bude jednak 10 (od engl. multiplicity of infection, MOI), kako bi se osigurao gotovo siguran unos DNA u svaku stanicu. Multiplicitet infekcije odnosi se na omjer broja lentivirusnih čestica i broja stanica koje se inficiraju. Broj stanica za infekciju uz multiplicitet infekcije (MOI) 10. Odgovarajući broj stanica nasadi se u mikrotitarsku pločicu s 12 jažica u mediju DMEM s dodatkom polibrena do konačne koncentracije 8 µg/mL. Na stanice se doda 1 mL suspenzije lentivirusnih čestica te se pripremljena smjesa centrifugira 2 h pri 33°C i 1000 × g. Kao negativna kontrola transdukcije, koriste se stanice bez dodatka lentivirusa. Nakon centrifugiranja, stanice se prebace u inkubator. Nakon 24 h stanicama se promjeni medij uz dodatak puromicina do konačne koncentracije od 0,6 µg mL<sup>-1</sup>. Selekcija puromicinom provodi se 5 dana, odnosno sve dok u kontrolnim jažicama bez dodatka lentivirusa nema preživjelih stanica. Nakon selekcije, preživjele stanice koje su primile plazmid s puromocinskom rezistencijom (shRNA, shRNA 2 + shRNA 4, shRNA 3 + shRNA 5), uzgajaju se u mediju DMEM do potrebnog broja stanica da daljnju analizu. Preostali alikvoti stanica čuvaju se u mediju s 5 % DMSO-a pri -80°C te se nakon toga prebacuju u spremnik s tekućim dušikom.

### **3.2.2.6. Izolacija RNA iz staničnih linija sa stabilno utišanim genom SAHH**

Za izolaciju ukupne RNA korišten je komercijalno dostupan komplet RNeasy Plus Mini Kit. Nakon što su stanice uzgojene u željenim uvjetima, isprane su PBS i tripsinirane. Zatim su centrifugirane kako bi se odstranio medij. Na talog stanica doda se 600  $\mu\text{L}$  pufera RLT, te se dobro izmiješaju pomoću vorteksa. Nakon homogenizacije smjesa se prebaci na kolonicu za uklanjanje genomske DNA, te se centrifugira 1 min pri 8 000 x g. Kolonica se baci, te se u preostalu otopinu doda 600  $\mu\text{L}$  70 %-tnog (v/v) etanola i dobro promiješa. Smjesa se zatim prenese na RNeasy kolonicu te se centrifugira 1 min pri 8 000 x g. Nakon centrifugiranja kolonica se najprije ispere sa 700  $\mu\text{L}$  pufera RW1, te se centrifugira 1 min pri 8 000 x g. Zatim slijedi ispiranje sa 500  $\mu\text{L}$  pufera RPE i centrifugiranje 1 min pri 8 000 x g, te još jedno ispiranje sa 500  $\mu\text{L}$  pufera RPE i centrifugiranje 2 minute pri 8 000 x g. Kako bi se uklonio etanol, kolonica se prebaci u čistu mikroeprevetu te se dodatno centrifugira 1 min pri 8 000 x g. Kolonica se zatim stavi u novu mikroeprevetu od 1,5 mL, doda se 40  $\mu\text{L}$  redestilirane vode koja je prisuta u sastavu kompleta bez prisutnih RNaza i DNaza, te se inkubira 2 minute. Nakon inkubacije ukupna RNA se eluira sa kolonice centrifugiranjem 1 min pri 8 000 x g. Izoliranoj RNA izmjeri se koncentracija. Kako bi se uklonila genomske DNA, koja može zaostati tijekom izolacije RNA, a može smetati pri daljnjoj analizi, provodi se DNazni tretman. Dnaza specifično prepoznaje i cijepa molekule DNA, dok RNA molekule ostaju netaknute. Za uklanjanje zaostale DNA korišten je komplet TURBO DNA-free™, prema uputama proizvođača. Ukupno 10  $\mu\text{g}$  RNA je dodano u tubicu od 1,5 mL, te je dodana redestilirana voda do ukupnog volumena 44  $\mu\text{L}$ . Zatim se u reakcijsku smjesu doda 5  $\mu\text{L}$  pufera za Dnazu, te 1  $\mu\text{L}$  Dnaze. Smjesa se promiješa, te se ukratko centrifugira, te se inkubira 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije doda se 5  $\mu\text{L}$  reagensa za inaktivaciju Dnaze, te se inkubira na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje. Nakon inaktivacije Dnaze smjesa se centrifugira 2 minute pri 10 000 x g. Supernatant, gdje se nalazi RNA, se prebaci u novu eprevetu od 1,5 mL te se RNA izmjeri koncentracija kao što je prethodno opisano.

### **3.2.2.7. Sinteza komplementarne DNA (cDNA)**

Komplet Luna One Step RT-qPCR Kit je inovativno rješenje u području molekularne biologije i kvantitativne PCR-analize (qPCR, od engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Ovaj komplet omogućava izvođenje reverzne transkripcije (RT) i qPCR-a u jednom koraku, što značajno pojednostavljuje i ubrzava proces analize genetskog materijala u usporedbi s klasičnim metodama koje zahtijevaju odvojene korake za RT i PCR. Ovo znači da su koraci RT

i qPCR kombinirani u jednoj reakciji, što smanjuje rizik od kontaminacije, ubrzava vrijeme analize i čini postupak praktičnijim. Za svaku reakciju, priprema se smjesa prema uputama proizvođača. Smjesa uključuje Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2×), Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20×), početnice i sonde. Uzorci RNA dodaju se u reakcijsku smjesu, koja se pažljivo izmiješa, a zatim se dodaje u pločicu za qPCR. Reakcija qPCR-om provodi se na odgovarajućem instrumentu prema naznačenom termostatskom protokolu, kako je opisano u tablici 9. Detekcija fluorofora u smjesi osigurana je odabirom odgovarajućeg kanala na instrumentu.

Volumeni reakcijskih komponenata za jednu qPCR reakciju su kako slijedi (Tablica 4):

Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X): 20 µl
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X): 10 µl
F- početnica (10 µM): 1 µL
R- početnica (10 µM): 0.8 µL
Sonda (10 µM): 0.8 µL
Predložak RNA: 1 µg ukupne RNA
Nuclease-free Water, komercijalna voda : dodati vodu po potrebi do ukupnog volumena od 20 µl

**Tablica 4.** Reakcijske komponente za jednu qPCR reakciju.

### 3.2.3.1. Provjera kvalitete nukleinskih kiselina

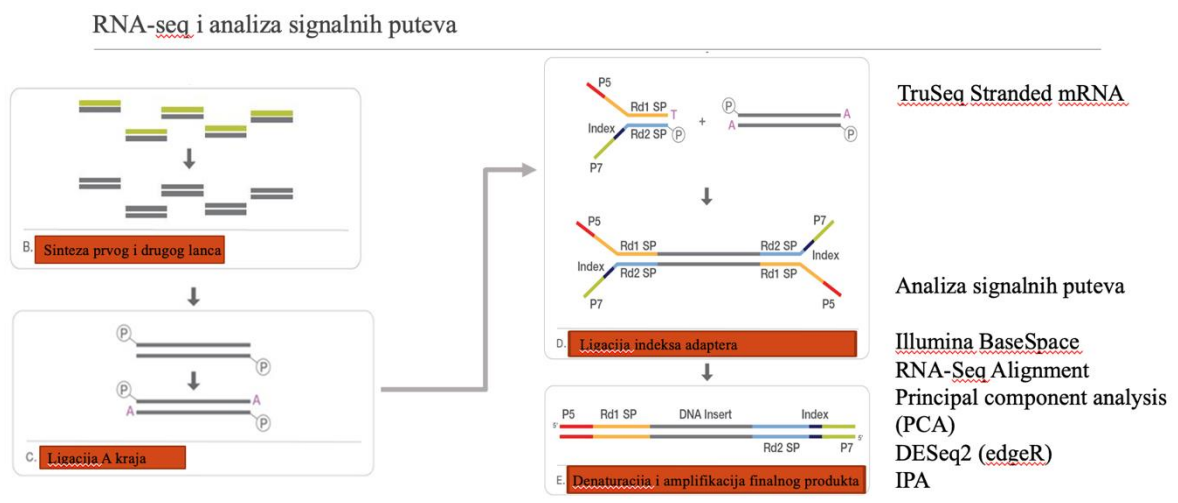
Za preciznu i pouzdanu procjenu stanja RNA koristi se napredna tehnologija kao što je bioanalizator na čipu. Ova metoda omogućava visoko preciznu analizu veličine, koncentracije i integriteta RNA molekula, čime se osigurava kvalitetan i pouzdan genetski materijal za daljnje eksperimente i analize. Provjera očuvanosti RNA u uzorku važan je korak u pripremi biblioteka za sekvenciranje. Kvaliteta RNA u uzorku procjenjuje se pomoću vrijednosti RIN (od engl. *RNA Integrity Number*) izračunate na temelju omjera fluorescentnog signala 28S i 18S rRNA. RIN vrijednost može iznositi između 1 i 10. 10 označava vrlo očuvanu RNA, dok vrijednost 1 označava degradiranu RNA čija prisutnost može znatno utjecati na kvalitetu rezultata daljnjih analiza. Za provjeru kvalitete RNA korišten je komercijalni komplet *RNA Nano 6000 Kit*, te uređaj BioAnalyzer 2100. Princip rada uređaja BioAnalyzer temelji se na razdvajanju i analizi RNA-fragmenata kapilarnom elektroforezom koje se mogu detektirati zbog prisustva fluorescentne boje. Ukratko, u gel za elektroforezu dodana je fluorescentna boja, koja se veže

na nukleinske kiseline, te se gel pročistio na kolonicama iz kompleta, centrifugiranjem tijekom 10 min, kako bi se uklonili mogući zaostaci većih komadića gela. 9  $\mu\text{L}$  gela je potom nanijeto na čipove zajedno sa 1  $\mu\text{L}$  uzorka i 5  $\mu\text{L}$  markera po jažici. 1  $\mu\text{L}$  standarda (uzorak poznatih veličina fragmenata RNA, od engl. *Ladder*) dodan je u zasebnu jažicu. Čip je potom vorteksiran 1 min pri 2400 rpm, te je stavljen na uređaj i pokrenuta je kapilarna elektroforeza. Reakcija je uspješna ukoliko se na elektroferogramu standarda mogu vidjeti dobro razdvojene vrpce fragmenata RNA samog standarda, jedna vrpca koja potječe od markera. Ovom metodom je također provjerena kvaliteta pripremljene biblioteke za sekvenciranje. Važno je provjeriti kvalitetu knjižnice, odnosno njezinu veličinu, kako bi samo sekvenciranje bilo uspješno. Kako se knjižnica za sekvenciranje sastoji od lanca DNA, za njezinu provjeru kvalitete korišten je komplet *DNA High Sensitivity Kit*. Postupak uporabe ovog kompleta je jednak kao i gore navedeni postupak korištenja kompleta za analizu RNA.

### 3.2.3.3. Priprema knjižnice za sekvenciranje

Provjerom kvalitete izolirane ukupne RNA, ustanovljeno je da svi uzorci imaju RIN-vrijednost 10, što ukazuje da je ukupna RNA nije degradirana, te je pogodna za daljnju pripremu knjižnice za sekvenciranje. Za pripremu knjižnice za sekvenciranje korišten je komplet TruSeq Stranded mRNA. *TruSeq Stranded mRNA* pruža precizan i pouzdan protokol za pripremu visokokvalitetnih biblioteka mRNA uzoraka za sekvenciranje. Njegova ključna značajka je sposobnost fragmentacije mRNA i njena naknadna sinteza u cDNA u kojoj se očuva informacija o smjeru transkripcije. Ovaj protokol se koristi u mnogim genomskim i transkriptomskim istraživanjima kako bi se dobile informacije o ekspresiji gena i razumio regulacijski mehanizam na razini transkriptoma. U ovom protokolu, mRNA molekule se izoliraju, fragmentiraju i pretvaraju u cDNA kako bi se omogućila daljnja priprema za sekvenciranje. Nakon pripreme uzorka, mRNA molekule se selektivno vežu na oligo-dT kuglice koje omogućuju vezanje repa poliA. Ove kuglice se zatim koriste za izolaciju mRNA iz ukupne RNA populacije. Nakon izolacije mRNA, one se fragmentiraju kako bi se dobili kratki fragmenti koji će se koristiti za sintezu cDNA. Fragmentirane mRNA molekule se zatim pretvaraju u prve lančane cDNA fragmente pomoću reverzne transkriptaze i nasumičnih heksamernih početnica. Nakon sinteze prvog lanca cDNA-a, drugi lanac cDNA se sintetizira dodavanjem druge početnice i enzima za DNA sintezu. Ovaj korak omogućava dobivanje dvolančane cDNA-a koji sadrži sekvence koje su komplementarne originalnoj mRNA molekuli. Dvolančane cDNA se zatim podvrgava popravku kako bi se popravili oštećeni krajevi

i dodali A-sljedovi. Poli A sljedovi omogućavaju vezanje adaptera na krajeve molekula cDNA. Nakon popravka i dodavanja adaptera, molekule cDNA, odnosno biblioteke se amplificiraju pomoću PCR kako bi se povećala količina materijala za sekvenciranje. PCR amplifikacija uključuje dodavanje indeksnih sekvenci na krajeve cDNA molekula kako bi se omogućilo istovremeno sekvenciranje više uzoraka. Nakon amplifikacije, cDNA se čisti odnosno biblioteke se čiste i pripremaju za sekvenciranje. Konačno, biblioteke se normaliziraju kako bi se izjednačile koncentracije prije nego što se spoje da bi se dobila konačna biblioteka spremna za sekvenciranje. Ovaj sistematičan protokol omogućava pripremu visokokvalitetnih biblioteka za sekvenciranje mRNA uzoraka, čime se omogućava detaljna analiza ekspresije gena i transkriptoma u biološkim istraživanjima. Priprema knjižnice pomoću navedenog kompleta zasniva se najprije na izdvajanju poli(A)-transkripata, uključujući mRNA, pomoću magnetskih kuglica koje na sebi sadrže oligo(dT)-sljedove, te zatim slijedi sinteza cDNA i u konačnici ligacija adaptera. Ovaj protokol omogućava analizu eksprimiranih gena i identifikaciju transkriptnih varijanti u uzorcima, pružajući važne informacije o transkriptomskim profilima i regulaciji gena u istraživanjima genetike i biologije.



**Slika 14.** Shematski prikaz protokola RNA-seq, preuzeto i modificirano iz qiagen.com. Korišten je protokol Truseq stranded mRNA koji se bazira na principu detekcije poli-A repa zrelih transkripata mRNA ali i dio tRNA, rRNA te dugih nekodirajućih RNA. Nakon što su sekvence obrađene u platformi Illumine Basespace-u za pohranu i analizu RNAseq podataka te mapiranja redova na referentni genom uz pomoć poravnanja RNA-seq (*alignment*). Najčešće korišteni referentni genom je *Reference Consortium Human Build 38*, te PCA-analize (kontrola kvalitete, klasteriranje podataka) koja se u analizi RNA-seq može koristiti za identifikaciju ekstremnih vrijednosti uzorka ili za vizualizaciju ukupnih obrazaca ekspresije gena u podacima i statističke analize DEseq2. Ovo su statističke metode za analizu RNA-seq podataka za određivanje diferencijalne ekspresije gena između skupina uzoraka gdje se određuje broj redova

po genu i uspoređuje s kontrolnom skupinom. DESeq2 i edgeR dvije su popularne metode za analizu diferencijalne ekspresije podataka dobivenih RNA-seq-om. Dobivena je lista gena koja se unosi u program IPA (od engl. *Ingenuity Pathway Analysis*) gdje se u analizu uključuju samo diferencijalno eksprimirani geni.

Prema uputama proizvođača, prvi korak protokola je izdvajanje poli(A) transkripata. U ovom koraku se uzorak RNA pomiješa sa magnetskim kuglicama koje na sebi sadrže sljedove oligo (dT) na koje se vežu sljedovi poli(A) sljedovi (Slika 14). Ispiranjem magnetskih kuglica iz smjese se odstranjuju nevezane nukleinske kiseline i soli te se na kraju vezane molekule RNA eluiraju s magnetskih kuglica. Eluirana RNA je zatim fragmentirana na fragmente prosječne veličine 151 pb koje je potrebno prevesti u cDNA. Najprije se sintetizira prvi lanac cDNA, u slijedećem koraku drugi lanac, te kao produkt nastaje dvolančana cDNA. Dobivena cDNA je zatim pomoću magnetskih kuglica pročišćena od korištenih soli i komponenata za sintezu cDNA, koji bi mogli smetati u daljnjoj obradi. Pročišćenoj cDNA su zatim popravljani krajevi, odnosno proces u kojem cDNA poprima tupe krajeve kako bi se u slijedećem koraku mogli vezati adapteri. Nakon koraka ligacije slijedi obogaćivanje fragmenata DNA pomoću reakcije PCR. U ovom koraku umnažaju se samo oni fragmenti DNA kod kojih je došlo do vezanja adaptera te se ujedno i pripremljena knjižnica obogaćuje. Sam proces PCR-a proveden je u 20 ciklusa te je nakon reakcije knjižnica pročišćena pomoću magnetskih kuglica. U konačnici knjižnica je provjerena pomoću uređaja *BioAnalyzer 2100* korištenjem kompleta *DNA High Sensitivity* (poglavlje 3.2.3.2) kako bi se provjerila veličina knjižnice. Knjižnice su potom razrijeđene i sekvencirane na platformi Illumina. Korištene su dvije različite pasaže za izolaciju RNA i za SAHH-deficijentne i kontrolne stanice koje će biti tretirane kao biološki replikati. Koncentracije RNA su određene korištenjem Qubit 3.0 Fluorometra i *Qubit® RNA BR test* kompleta (*Thermo Fisher Scientific*). *Agilent 2100 Bioanalyzer* i *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (*Agilent Technologies*) korištene su za procjenu kvalitete uzorka. Komplet *TruSeq Stranded mRNA* korišten je za pripremu knjižnica od 90 ng ukupne ulazne RNA. Prikupljene biblioteke analizirane su na *2100 Bioanalyzeru*, razrijeđene do 1,4 pM i sekvencirane na *Illumina NextSeq500* sekvenatoru pomoću *NextSeq 500/550 High-Output v2* kompleta sa 75 ciklusa (*Illumina*). Postavke, prijenos podataka, demultipleksiranje i analize izvedene su pomoću aplikacije *RNA Express BaseSpace* sa zadanim parametrima analize. Dobiveni podaci koriste se za nizvodnu analizu pomoću specijaliziranih programa.



### 3.2.3.4. Provjera kvalitete neobrađenih sekvenci i poravnanje na referentni genom

U analizi podataka dobivenih analizom *RNA-Seq*, provjera kvalitete neobrađenih sekvenci i njihovo poravnanje na referentni genom predstavljaju ključne faze u razumijevanju ekspresijskog profila gen. U ovom istraživanju, fokus je na analizu utišanih staničnih linija s posebnim naglaskom na gen *SAHH*. Analiza podataka *RNA-Seq* zahtijeva pažljivu obradu i kontrolu kvalitete kako bismo izbjegli potencijalne artefakte i osigurali da naši rezultati budu znanstveno valjani i relevantni za razumijevanje bioloških mehanizama regulacije gena. Nakon sekvenciranja dobiveni su neobrađeni podaci u formatu *fastq*. Prije daljnje obrade i analize podataka sekvenciranja, potrebno je provesti provjeru kvalitete sirovih podataka te je korišten program FastQC. Kvaliteta očitanih sekvenci se ispituje kako bi se osiguralo da su dodijeljene baze u sekvenci očitane s visokom pouzdanošću, da udio GC nukleotida u sekvencama odgovara očekivanoj distribuciji, da motivi kratkog niza (od engl. *k-mers*) nisu previše zastupljeni i da je stopa dupliciranih sekvenci prihvatljiva. Kvaliteta očitane sekvence izražava se pomoću vrijednosti Phred, te označava vjerojatnost da je očitani nukleotid u sekvenci zaista točno očitani. Vrijednost Phred izražava se u postocima, te veći postotak govori da je velika vjerojatnost da je očitani nukleotid točno očitani. Prije poravnanja neobrađenih podataka na genom potrebno je ukloniti sekvence adaptera. Uklanjanje sekvenci adaptera s neobrađenih očitavanja povećati će mapiranje odnosno očitavanje samih neobrađenih podataka na genom, što znatno utječe na daljnju analizu. Za uklanjanje sekvenci adaptera iz neobrađenih podataka korišten je program *fastp*. Ukoliko nam je poznata sekvencija adaptera, korištenih u pripremi knjižnice, sekvencija se može unijeti u program *fastp*, koji će zatim iz neobrađenih podataka ukloniti sekvenciju. Ukoliko nije poznata sekvencija adaptera, program *fastp* može prepoznati ponavljajuće sekvence na početku neobrađenih podataka, odnosno sekvence adaptera, te ih zatim uklanja. U izradi ove disertacije korištena je opcija automatskog prepoznavanja i uklanjanja sekvenci adaptera iz neobrađenih podataka. Nakon uklanjanja adaptera podatke je potrebno poravnati na referentni genom. Za poravnavanje na referentni genom korišten je program Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR), a kao referentni genom korištena je verzija GRCh38.p13 humanog genoma. STAR poravnava sekvence na referentni genom u dva koraka: najprije traži sekvenciju *seed*, te ih kasnije grupira. U prvom koraku STAR traži za maksimalnim prefiksom koji se može poravnati (od engl. *Maximal Mappable Prefix, MMP*) počevši od prve baze sekvence te zatim se pretraga MMP ponavlja za neporavnati dio očitavanja te ih poravnava na pripadajući dio genoma. U drugoj fazi algoritma, STAR poravnava cijele sekvence čitanjem i spajanjem svih dobivenih sekvenci prve faze *seed*. U konačnici se

poravnata očitavanja kvantificiraju metodom kvazi-mapiranja pomoću programa Salmon, gdje se očitavanja najprije mapiraju na referentni genom, te se zatim kvantificira kako bi dobili broj očitavanja po genu. Tijekom same kvantifikacije uzima u obzir potencijalne sistematske pogreške (od engl. *bias*) koje su specifične za metodu RNA-Seq, kao što su razlika u dubini čitanja sekvenci ovisno o poziciji, *bias* na 5' i 3' krajevima očitane sekvence koji je specifičan za sekvencu, udjela baza GC u fragmentima sekvenci, *bias* koji nastaje zbog korištenja specifičnih protokola za pripremu knjižnice i u distribuciji duljine fragmenata. Na kraju se dobije popis kvantificiranih transkripata u svakom uzorku koji se dalje obrađuju.

### **3.2.3.5. Detekcija diferencijalno eksprimiranih gena nakon utišavanja *S-adenozil homocistein hidrolaze***

Diferencijalno eksprimirani geni predstavljaju ključnu komponentu u istraživanju ekspresije gena i razumijevanju promjena u biološkim sustavima. To su geni čija je ekspresija značajno promijenjena u specifičnim uvjetima ili tijekom određenih bioloških procesa. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena omogućava dublje razumijevanje regulacije gena i identifikaciju kritičnih molekularnih događaja povezanih s raznim fiziološkim i patološkim stanjima. Razumijevanje diferencijalne ekspresije gena *SAHH* može pružiti dublji uvid u regulaciju ovih ključnih metaboličkih putova i njihovu povezanost s različitim biološkim procesima. Analiza diferencijalne ekspresije gena *SAHH* u ovom istraživanju ima za cilj razotkriti moguće veze između promjena u njegovoj ekspresiji i specifičnih bioloških procesa u tumorskim staničnim linijama (MCF7, SW480) i staničnoj liniji HEK293T. Za analizu je korišten paket DESeq2 u programu Illumina Basespace. DESeq2 je alat koji omogućava kvantitativnu analizu RNA-Seq podataka koristeći procjenitelje skupljanja za disperziju (od engl. *Shrinkage estimators for dispersion*) i logaritamsku promjenu ekspresije (engl. *Logarithmic Fold Change*,  $\log_2FC$ ), uključujući rangiranje gena prema promjeni ekspresije i njihovu vizualizaciju, testiranje nulte hipoteze ispod i iznad granice (od engl. *threshold*), kao i procjenu kvalitete i klasteriranje prekomjerno raspršenih očitanih sekvenci pomoću regulirane logaritamske transformacije (od engl. *Regularized Logarithm transformation*, rlog). Geni su okarakterizirani kao statističko diferencijalno eksprimirani na temelju postavljene granične vrijednosti  $|\log_2FC| \geq 0,5$  i prilagođene statističke značajnosti  $p < 0,05$ , prema metodi Benjamin-Hochberg.

### 3.2.3.6. Analiza diferencijalno eksprimiranih signalnih putova i gena

Diferencijalno eksprimirani signalni putovi igraju ključnu ulogu u razumijevanju složenih bioloških regulacijskih mreža i njihovih uloga u različitim biološkim kontekstima. Ovi putovi često su središnji za prijenos informacija unutar stanica i između stanica te su odgovorni za kontrolu brojnih bioloških procesa. Identificiranje diferencijalno eksprimiranih signalnih putova omogućava nam bolje razumijevanje kako promjene u genetskoj ekspresiji doprinose različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Za analizu signalnih putova korišten je program *IPA*, *Ingenuity Systems* (vidi <http://www.ingenuity.com>). Analiza srži (IPA Core Analiza) provedena je uz opciju *Causal Network Analysis* (Analiza kauzalne mreže) na podacima iz analize Deseq2. Dodatni relevantni parametri uključuju: mjerne vrijednosti za transkriptom:  $\log_2$  (log od engl. *Fold change*), prag: -0,5-0,5; uključivanje gore / dolje reguliranih gena. Da bi se izvršila komparativna analiza podataka RNA-seq, dobiveni rezultati se preklapaju, a p-vrijednost izračunava se pomoću 'right-tailed' Fisher Exact Test-a. IPA je softver namijenjen za analizu, integraciju i tumačenje podataka dobivenih omics-metodama te omogućuje vizualizaciju i konstruiranje diferencijalno eksprimiranih mreža. Program se bazira na algoritmu koji koristi bazu podataka koja sadrži publicirane eksperimentalne molekularne interakcije uz pomoć kojih se identificiraju uzvodni regulatori, tj. uzvodni regulatori se identificiraju *enrichmentom downstream* gena, algoritam funkcionira optimalno ukoliko se u analizu uzima od 300 do 1000 diferencijalno eksprimiranih gena tako da smo za svaku Core-analizu za svaku pojedinačnu liniju odabrali identičan broj diferencijalno eksprimiranih gena. Predviđa se stanje aktivnosti krovnog regulatora korelacijom efekata iz literature s opaženom genskom ekspresijom. Također nam omogućava vizualizaciju i predviđanje biološkog utjecaja genskih ekspresijskih promjena. Omogućuje stvaranje hipoteze kako je fenotip, funkcija ili bolest regulirana u podacima s aktiviranim ili inhibiranim uzvodnim regulatorima tj. objašnjavanje utjecaja uzvodnih molekula na nizvodnu biologiju. Koriste se objavljene eksperimentalne molekularne interakcije za identificiranje uzvodnih regulatora te se identificiraju uzvodni regulatori po ekspresiji odnosno obogaćenju gena nizvodno od gena od interesa. Predviđa se stanje aktivnosti regulatora korelacijom literaturnih podataka prijavljenih učinaka s uočenom ekspresijom gena omogućava nam vizualizaciju i predviđa biološki utjecaj promjena ekspresije gena. Hipotetski objašnjava utjecaj uzvodnih molekula na nizvodnu biologiju.

### 3.2.4.2. Određivanje ukupne koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina koristio se komercijalan komplet *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, prema uputama proizvođača. BCA (od engl. *bicinchoninic acid assay*) je kolorimetrijska metoda koja se temelji na promjeni boje iz zelene u ljubičastu, odnosno redukciji iona  $\text{Cu}^{2+}$  u ione  $\text{Cu}^+$ . Proteini u otopini reduciraju  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$ , čime je količina nastalih iona  $\text{Cu}^+$  proporcionalna količini proteina. U otopini se nalazi bikonična kiselina koja stvara ljubičasti kompleks s nastalim ionima  $\text{Cu}^+$  što omogućava praćenje količine  $\text{Cu}^+$  spektrofotometrijom. Kako bi se izračunala koncentracija ukupnih proteina u uzorcima najprije je potrebno napraviti standardnu krivulju pomoću poznatih koncentracija BSA (od engl. *bovine serum albumin*). U duplikatima na pločici s 96 jažica prirede se razrjeđenja BSA finalnih koncentracija 2000, 1500, 1000, 750, 500, 500, 250, 125 i 25  $\mu\text{g/mL}$ . U 25  $\mu\text{L}$  otopine BSA doda se 200  $\mu\text{L}$  smjese reagensa A i reagensa B u omjeru 50:1. Pločica se protrese 30 s te se inkubira 30 min pri 37 °C nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 570 nm. Iz dobivenih vrijednosti priredi se standardna krivulja za izračun koncentracija ukupnih proteina u uzorcima. Za dobivanje koncentracija ukupnih proteina u našim uzorcima postupak se ponovi koristeći 25  $\mu\text{L}$  pojedinog uzorka, te se očita apsorbancija, pomoću koje se interpolacijom dobivene standardne krivulje dobije koncentracija ukupnih proteina.

### 3.2.4.3. Određivanje postotka utišavanja gena metodom *Western-blot*

Metoda western blot predstavlja esencijalnu tehniku za analizu specifičnih proteina u biološkim uzorcima. Ovaj molekularni biološki postupak omogućava selektivno prepoznavanje i kvantifikaciju proteina na temelju njihove veličine i antigenskih svojstava. U svrhu određivanja uspješnosti utišavanja gena *SAHH*, provedena je analiza ekspresije proteina metodom western blot. U svakom uzorku specifičnim antitijelom pratila se količina utišanog gena, odnosno proteina, te proteina GAPDH (od engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza) kao endogene kontrole kako bi se uzorci mogli uspoređivati. Razdvajanje proteina u 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu uz prisustvo natrijevadodecil sulfata (od engl. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS), omogućilo je razdvajanje proteina na temelju njihove molekulske mase. Jednaka količina ukupnih proteina u svakom uzorku pomiješana je s puferom za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel, zagrijana 5 min pri 95 C, te je smjesa nanesa u jažice gela i pokrenuta je elektroforeza najprije 15 min pri 120 V, a

zatim 30 min pri 160 V. Nakon razdvajanja proteini su sa gela preneseni na membranu PVDF (od engl. *Polyvinylidene Fluoride*, 0,22 mikrona, Merck), tako da se priredila „sendvič“ konstrukcija koja se sastojala od filter papira namočenih u pufer za transfer, membrane, poliakrilamidnog gela te još jednog sloja filter papira namočenih u pufer za transfer. Konstrukcija je stavljena u uređaja za transfer *Trans-Blot Turbo Transfer System*, te je pokrenut program u trajanju od 7 min. Nakon samog prijenosa proteina, membrana je blokirana 1 h u puferu TBST koji sadrži 5%-tno nemasno mlijeko. Nakon blokiranja membrana je inkubirana u odgovarajućem primarnom antitijelu prekononočno uz njihanje pri +4 °C. Slijedeći dan membrana je isprana 3 puta puferom TBST uz njihanje tijekom 15 min te je zatim inkubirana s odgovarajućim sekundarnim antitjelom tijekom 2 sata. Nakon inkubacije membrana je isprana 3 puta puferom TBST uz njihanje 15 min. Zatim je slijedila vizualizacija proteina pomoću kompleta *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate*. Supstrat iz kompleta je dodan na mebranu te je membrana inkubirana 3 min u mraku kako bi se razvila kemiluminescencija. U konačnici proteini su vizualizirani pomoću uređaja *Uvitec Alliance Q9 mini*. Nakon detekcije proteina, intenziteti vrpca su analizirani pomoću programa ImageJ te je ekspresija SAH normalizirana endogenom kontrolom GAPDH. Ovaj postupak proveden je za sve tri utišane stanične line (MCF7, SW480, HEK293T). Također dodatno su prema ovom postupku također analizirani proteini iz Tablice 5. za utišanu staničnu liniju HEK293T koja nakon utišavanja nosi oznaku HEK293T 2+4 skraćeno od shRNA 2 i shRNA 4.

Popis korištenih antitijela kod analize metode western blot-a, kao i njihova korištena razrjeđenja prikazana su u Tablici 5.

**Tablica 5.** Popis korištenih antitijela kod analize metode western blot.

<b>Antitijelo</b>		
4-3-3ζ/δ (D7H5)	Cell Signaling Technology	#7413
SAHH	Abcam	ab134966
anti-biotin HRP-linked Ab	Cell Signaling Technology	#7075
ATM	Novus Bio	NB100–309
beta - actin	Abcam	8226
B-Raf (55C6)	Cell Signaling Technology	#9433
cdc2 (POH1)	Cell Signaling Technology	#9116

---

CDK2	Santa Cruz Biotechnology	sc-163
CDK6 (DCS83)	Cell Signaling Technology	#3136
Chk1	Santa Cruz Biotechnology	sc-8408
cMyc	Santa Cruz Biotechnology	sc-8351
C-Raf	Cell Signaling Technology	#9422
Cyclin A	Santa Cruz Biotechnology	sc-8351
Cyclin B1 (D5C10) XP®	Cell Signaling Technology	#12231
Cyclin D1 (92G2)	Cell Signaling Technology	#2978
Cyclin E (HE12)	Cell Signaling Technology	#4129
FITC Mouse Anti-BrdU (Clone B44)	BD Biosciences	347583
Gadd45 $\alpha$ (D17E8)	Cell Signaling Technology	#4632
Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-11005
Goat anti-mouse IgG, pAb	Enzo	ADI-SAB-100
Goat anti-rabbit IgG, pAb	Enzo	ADI-SAB-300-J
MDM2 (SMP14)	Santa Cruz Biotechnology	sc-965
MEK1/2 (L38C12)	Cell Signaling Technology	#4694
p21 waf1/cip1 (DCS60)	Cell Signaling Technology	#2946
p27	Santa Cruz Biotechnology	sc528
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology	#9102
p53 (DO-1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
pChk2 and chk2	Novus Bio	NB100-500
fosfo-B-Raf (Ser445)	Cell Signaling Technology	#2696
fosfo-cdc2 (Tyr15) (10A11)	Cell Signaling Technology	#4539
fosfo-C-Raf (Ser259)	Cell Signaling Technology	#9421
fosfo-MDM2 (Ser166)	Santa Cruz Biotechnology	sc-293105
fosfo-MEK1/2 (Ser221) (166F8)	Cell Signaling Technology	#2338
fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2)	Cell Signaling Technology	#4377

---

fosfo-p53 (Ser15)	Santa Cruz Biotechnology	sc-101762
Ras (27H5)	Cell Signaling Technology	#3339
Rb	Abcam	(ab181616)
SAHH	Abcam	(ab134966)
LEF1	Abcam	(ab137872)
STAT3	Abcam	(ab31370)
Goat Anti-mouse	Sigma Aldrich	(sc-516102)
Goat Anti-rabbit	Abcam	(ab205718)

### 3.2.4. Priprema uzoraka za mjerenje koncentracije metabolita SAM/SAH

Metaboliti, odnosno male molekule ( $\leq 500$  Da), mogu nam dati bolji opis odnosa genotipa i fenotipa samih stanica. Stanice karcinoma imaju značajno promijenjen metabolizam, pa time i metabolite, ponajprije kako bi se povećala proliferacija ali i drugi stanični procesi. Iz tog razloga je važno proučavati i promjene u metabolitima karcinoma. Metoda tekućinske kromatografije povezane s tandemskom masenom spektrometrijom za određivanje S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u ljudskim stanicama razvijena je kao modifikacija prethodno objavljene metode laboratorija Kozich (129). Naime, umjesto korištenja perklorične kiseline, postupci su modificirani u korist amonijeva formata. Matične otopine SAM-a i SAH-a pripravljene su kao 1 mg/mL otopine u hladnoj vodi *Milli-Q* (*MERCK MILLIPORE, Synergy*). Koncentracije su određene pomoću UV-spektroskopije koristeći molarni ekstenzijski koeficijent  $\epsilon=15400$ . Alikvoti matičnih otopina SAM-a i SAH-a su razrijeđeni zajedno u vodi *Milli-Q* kako bi se dobile koncentracije od 10  $\mu\text{g/mL}$  za svaku tvar.  $[2\text{ H}3]$ -SAM je razrijeđen s 0,1% FA (mravlja kiselina) u *Milli-Q* vodi, dok je  $[13\text{C}5]$ -SAH dobiven iz otopine od 30,3  $\mu\text{g/mL}$  u *Milli-Q* vodi. Otopine označenih SAM i SAH pripravaka su dobivene razrjeđivanjem  $[2\text{ H}3]$ -SAM u *Milli-Q* vodi i dodatkom  $[13\text{C}5]$ -SAH. Sve standardne otopine su pohranjene pri  $-20^\circ\text{C}$ . Kalibracijski uzorci su pripremljeni iz matičnih otopina SAM-a i SAH-a u 1 M trifluorocenoj kiselini (TFA) s dodatkom otopine obilježenih radioaktivnim elementima ( $[2\text{ H}3]$ -SAM 7.54  $\mu\text{g/mL}$  i  $[13\text{C}5]$ -SAH 2.66  $\mu\text{g/mL}$ ). Kalibracijski uzorci su neutralizirani s 5 M otopinom amonijeva formijata neposredno prije analize, a ukupni volumen svakog kalibracijskog uzorka je bio 300  $\mu\text{L}$ . Posebni kalibracijski bodovi za SAM i SAH su bili 11, 28, 56, 111, 333, 833, 1333 i 1666 ng/mL. Kontrolni uzorci su pripremljeni kao 333 ng/mL otopina

1 M TFA/5 M amonijeva formijata s dodatkom označenih unutarnjih standarda. Kalibracijska krivulja je dobivena linearnom regresijom, a omjer površine vrška (analit/unutarnji standard) je prikazan nasuprot koncentraciji analita. Stanice su uzgajane na pločama promjera 10 cm, i nakon što su dosegle 80% konfluenciju, kratko su isprane u PBS-u. Liza je izvedena u 1 M TFA na ledu. Homogenat je kratko soniciran i očišćen nakon centrifugiranja pri  $16\,000 \times g$  tijekom 10 minuta na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 100  $\mu\text{L}$  uzorka staničnog homogenata je pomiješano s unutarnjim standardom ([ $^2\text{H}_3$ ]-SAM 7.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i [ $^{13}\text{C}_5$ ]-SAH 2.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Uzorci su neutralizirani s 190  $\mu\text{L}$  5 M otopine amonijeva formijata neposredno prije analize, a bistra otopina je ubrizgana u LC stupac. Analiza LC–MS/MS je provedena pomoću HPLC sustava *Agilent Technologies* serije 1200 opremljenog binarnom pumpom, vakuumskim membranskim degazerom, automatskim autosamplerom i injektorskim sučeljem s masenim spektrometrom s trostrukim kvadrupolom 6420 s izvorom elektrosprej ionizacije (ESI; *Agilent Technologies*). Separacija je izvedena na stupcu *Kinetex C18* (75 $\times$ 4,6 mm, veličina čestica 2,6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, SAD). Otapala za analizu su bila 0,1% FA u vodi (otapalo A) i 0,1% FA u acetonitrilu (otapalo B). Gradijent je primijenjen kako slijedi: 0 min pri 100% A, 0–3 min pri 100% A, 3–12 min pri 100% A–10% A, 12–14 min pri 10% A, 14–16 min pri 10% A–90% A, i 16–25 min pri 100% A. Protok je bio 0,3 mL/min. Između 2,5 i 15 min svakog izvođenja, eluent je preusmjeren prema ionskom izvoru, dok je na početku i kraju izvođenja eluent preusmjeren prema otpadu. ESI je bio pokrenut u pozitivnom modu, a uzorci su detektirani u načinu multiplekcijskog praćenja reakcija (MRM, od engl. *Multiple Reaction Monitoring*), s vremenom zadržavanja od 200 ms po MRM tranziciji. Temperatura plina za desolvaciju je bila  $300^{\circ}\text{C}$ , s protokom od 8,0 L/min, napon kapilara je bio 4,0 kV.

#### **3.2.4.1. Priprema uzoraka za mjerenje koncentracije adenoza**

Kako bi se pripremili uzorci za mjerenje koncentracije adenoza nasađene su stanice s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i roditeljske kontrolne stanične linije u Petrijevke promjera 10 mm te su uzgajane do konfluentnosti. Stanice su sakupljene kao što je opisano u poglavlju izolacija proteina te je određena koncentracija proteina i za svaki uvjet je izdvojena u zasebne mikropruvete jednaka količina proteina. Uzeli smo jednaku količinu proteina iz svakog uzorka, a zatim su uzorci nadopunjeni do istog volumena s vodom. Nakon toga dodano je  $2,5 \times V$  96% hladnog etanola i centrifugirano tijekom 1 h pri  $+4^{\circ}\text{C}$  pri  $15\,000 g$ . Nakon toga supernatant se odvoji i upari u uređaju Speedvac (Thermo Fisher Scientific) dok etanol ne ispari. Zatim se etanol otopi u adozin assay puferu 10  $\mu\text{L}$  za razrjeđenje 1:25 te se ostatak protokola provede



prema uputama proizvođača kompleta *Adenosine Assay* (Fluorometric, Abcam) (ab211094). Uzorci su prethodno normalizirani na jednaku količinu proteina kako bi se osigurala pouzdanost i usporedivost rezultata između različitih uzoraka. Potrebno je napraviti sljedeće korake: Priprema standardnih otopina adenzina s poznatim koncentracijama. Priprema uzoraka stabilno utišanih staničnih linija za gen *SAHH*. Dodavanje adenzin reagensa u svaki standard i uzorak. Nježno miješanje uzoraka kako bi se ravnomjerno rasporedili reagensi. Inkubacija uzoraka na odgovarajućoj temperaturi i vremenskom periodu. Mjerenje fluorescencije svih standarda i uzoraka na fluorometru (Tecan spektrofotofluorimetar (Infinite M200), postavljajući fluorometar na odgovarajuće uvjete za mjerenje adenzina. Analiza podataka, uključujući stvaranje kalibracijske krivulje za povezivanje fluorescencije s poznatim koncentracijama adenzina. Na temelju kalibracijske krivulje, izračunavanje koncentracije adenzina u uzorcima stabilno utišanih staničnih linija normaliziranih na jednaku količinu proteina. Ovaj protokol omogućava kvantitativno određivanje koncentracije adenzina u uzorcima stabilno utišanih staničnih linija za gen *SAHH*, uz osiguranu usporedivost rezultata zbog prethodne normalizacije na količinu proteina.

### **3.2.6. Statistička analiza**

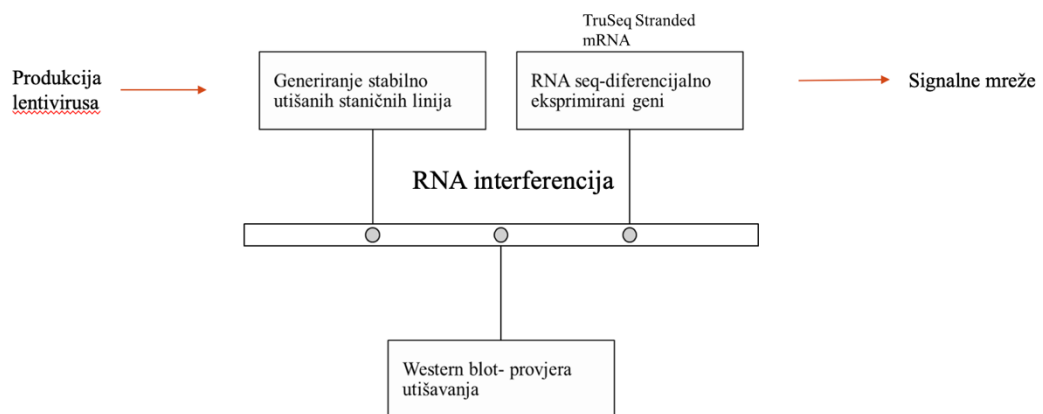
Za obradu podataka koristili smo metode deskriptivne statistike. Varijable su izražene kao aritmetička sredina +/- standardna devijacija. Razlika srednjih vrijednosti između skupina kod testa MTT izračunata je pomoću analize varijanci (ANOVA) testa, te se za korekciju vrijednosti p zbog višestrukih testiranja koristila metoda Tukey. Za korekciju vrijednosti p u koristio se pristup stope lažnog otkrivanja, FDR. Značajnost je izražena kao vrijednost p, a za sve testove vrijednost  $p \leq 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Statistička analiza napravljena je pomoću programa GraphPad Prism. Koristila se korekcija Bonferroni vrijednosti p. Vrijednost  $p < 0,05$  označena je s \*, vrijednost  $p < 0,01$  označena je s \*\*, te vrijednost  $p < 0,001$  označena je s \*\*\*.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uspostava i karakterizacija stabilno utišanih staničnih linija genetski

U ovom istraživanju, stanične linije SW480, MCF7 i HEK293T su modificirane kako bi se postiglo utišanje ekspresije gena *SAHH*. Nakon uspostavljanja stabilnih staničnih linija s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (SW480, MCF7 i HEK293T) i kontrolnih staničnih linija (SW480 WT, SW480 SCR, MCF7 WT, MCF7 SCR, HEK 293T WT, HEK293T SCR), analizirana je ukupna ekspresija njihove RNA kako bi se utvrdile promjene u ekspresijskom profilu u usporedbi s kontrolnim stanicama. Nadalje, istražene su razlike u aktivnosti pojedinih signalnih putova u utišanim staničnim linijama u odnosu na kontrolne stanice, s ciljem boljeg razumijevanja funkcije gena *SAHH* u biološkim procesima. Ova analiza omogućit će dublje uvide u mehanizme djelovanja gena *SAHH* i njegovu ulogu u regulaciji signalnih putova u istraživanim staničnim linijama.

Na slici 15. prikazan je shematski prikaz kojim procesima je dobiven ključni i najvažniji dio rezultata ove disertacije, a to su signalne mreže.

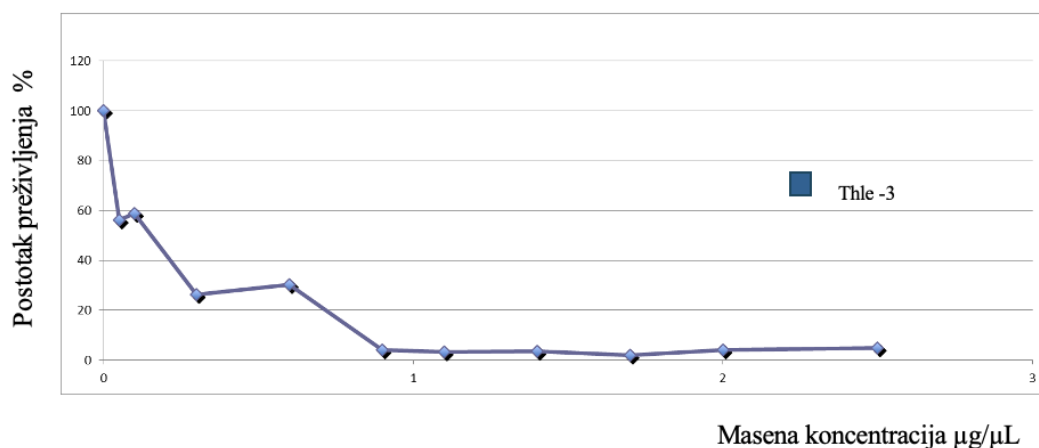


**Slika 15.** Shematski prikaz provedbe eksperimenta. U ovom poglavlju koncentrirati ćemo se na rezultate dobivene pokusima koji su provedeni u ovom shematskom prikazu.

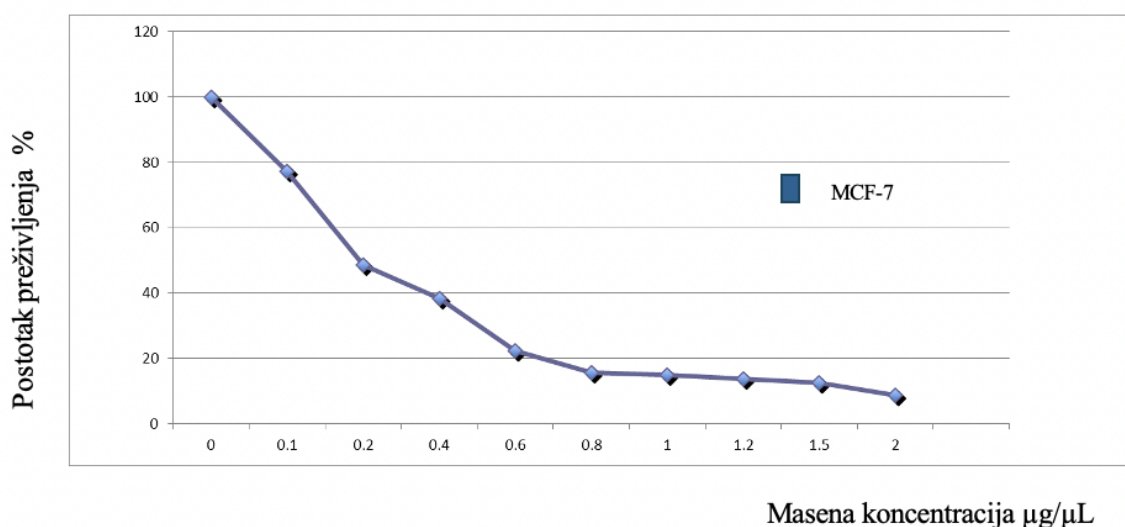
Nakon što su proizvedeni lentivirusi koji sadrže sekvencu shRNA 2, shRNA 3, shRNA 4, shRNA 5 za utišavanje gena *SAHH* u HEK293T staničnoj liniji te nakon što je određena testom MTT koncentracija puromicina potrebna za selekciju stanica koje su primile insert, potrebno je bilo odrediti koja lentivirusna kombinacija najbolje utišava gen *SAHH*. Stoga je napravljen test MTT na stanicama SW480, MCF7, THLE3, HEK293T inficiranim različitim kombinacijama lentivirusa sa sekvencama za utišavanje shRNA 2, shRNA3 , shRNA 4, shRNA 5.

#### 4.1.2. Određivanje koncentracije puromicina za selekciju stabilnih klonova stanica s utišanim genom *SAHH*

Najprije je određena koncentracija puromicina testom MTT (Slika 16, Slika 17, Slika 18) za sve četiri stanične linije koja je potrebna za selekciju stanica u koje je ugrađena sekvenca za utišavanje gena *SAHH*.

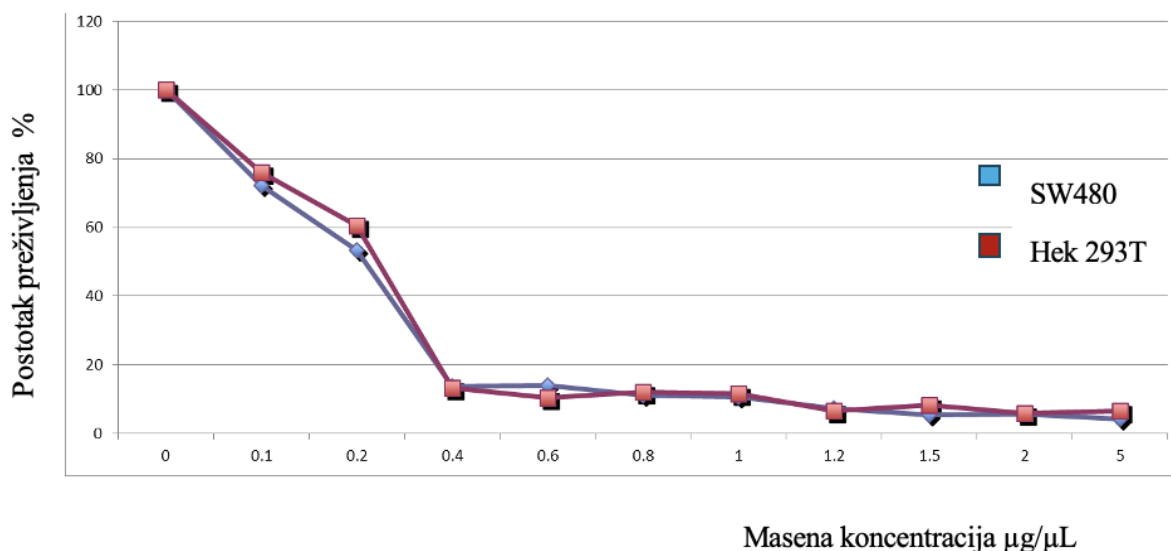


**Slika 16. Rezultati testa MTT, određivanje toksičnosti puromicina, stanice THLE3.** Radna koncentracija antibiotika određena je testom MTT, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na mjerenju apsorbanije formazana. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasadi se po 3000 stanica resuspendiranih u 200  $\mu\text{L}$  DMEM medija. Stanice se 24 h inkubiraju na 37°C, a zatim im se doda antibiotik puromicin (Thermo Fisher Scientific, Gibco) ( $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u sljedećim koncentracijama: 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrola koriste se jažice bez antibiotika, a sam test se provodi u tehničkim triplicatima. Stanice s antibiotikom se inkubiraju 5 dana pri 37°C. IC50 vrijednost je koncentracija antibiotika pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50%. Na temelju toga je određena radna koncentracija antibiotika. Potrebna koncentracija iznosi 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .



**Slika 17.** Određivanje toksičnosti puromicina u staničnoj liniji MCF-7. Radna koncentracija antibiotika određena je testom MTT, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na mjerenju

apsorbancije formazana. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasadi se po 3000 stanica po jažici resuspendiranih u 200  $\mu\text{L}$  DMEM medija. Stanice se 24 h inkubiraju pri 37°C, a zatim im se doda antibiotik puromicin (Thermo Fisher Scientific, Gibco) ( $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u sljedećim koncentracijama: 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrola koriste se jažice bez antibiotika, a sam test se provodi u tehničkim triplikatima. Stanice s antibiotikom se inkubiraju 5 dana na 37°C. IC50 vrijednost je koncentracija antibiotika pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50%. Na temelju toga je određena radna koncentracija antibiotika, odlučili smo se za koncentraciju gdje je postotak preživljenja stanica manji od 20 %. Potrebna koncentracija iznosi 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

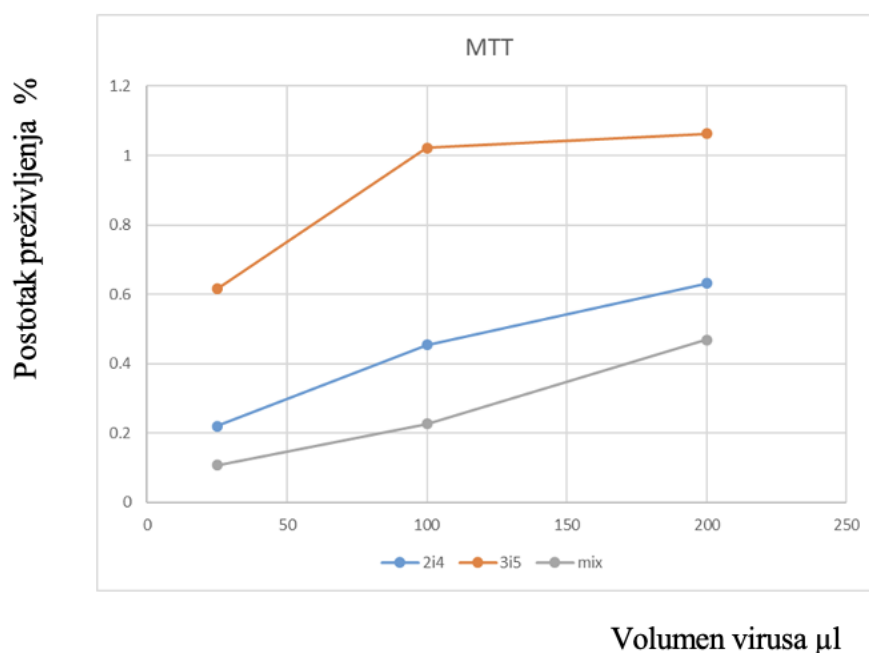


**Slika 18.** Određivanje toksičnosti puromicina u staničnim linijama SW480 i HEK293T. Radna koncentracija antibiotika određena je testom MTT, kolorimetrijskom metodom koja se temelji na mjerenju apsorbanije formazana. U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica nasadi se 3000 stanica po jažici resuspendiranih u 200  $\mu\text{L}$  medija. Stanice se 24 h inkubiraju pri 37°C, a zatim im se doda antibiotik puromicin (Thermo Fisher Scientific, Gibco) ( $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u sljedećim koncentracijama: 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao kontrola koriste se jažice bez antibiotika, a sam test se provodi u tehničkim triplikatima. Stanice s antibiotikom se inkubiraju 5 dana pri 37°C. Vrijednost IC50 je koncentracija antibiotika pri kojoj je preživljavanje stanica smanjeno za 50 %. Na temelju toga je određena radna koncentracija antibiotika te smo odlučili koristiti koncentraciju gdje je postotak preživljenja stanica manji od 20 %. Potrebna koncentracija iznosi 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  za staničnu liniju SW480 i 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  za HEK293T.

Odlučeno je koristiti radnu koncentraciju puromicina u kojoj je postotak preživljenja stanica koje su primile insert za utišavanje gena *SAHH* manji od 20 %. Tako radna koncentracija puromicina za selekciju stanica MCF7, THLE3 i HEK293T iznosi 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  te 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  za staničnu liniju SW480. Iako stanična linija HEK293T i SW480 imaju istu krivulju pri 0,8 i 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  prilikom izvođenja eksperimenta i selekcije klonova koje su primile insert primjećeno

je da je staničnoj liniji HEK293T u odnosu na kontrolu potreban još jedan dodatan dan selekcije u puromicinu te je stoga za iduće eksperimente odabrana koncentracija puromicina od  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  zbog potrebe brže provedbe eksperimenta jer u tom slučaju selekcija stanica koje su primile insert traje dan kraće, a s obzirom da se radilo s više staničnih linija vrijeme je bio bitan faktor. Svi eksperimenti su provedeni u odnosu na kontrolu.

#### 4.1.3. Određivanje virusnog titra

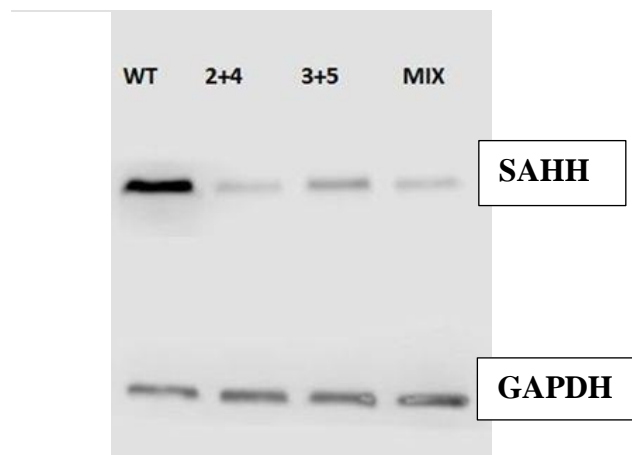


**Slika 19.** Određivanje virusnog titra. Virusni titar određen je testom MTT koji se temelji na mjerenju apsorbancije formazana, odnosno volumena virusa potrebnog za optimalnu infekciju stanica. Ovaj eksperiment je proveden na staničnoj liniji SW480. U mikrotitarsku pločicu nasadi se po 300 000 stanica po jažici, u 2 mL DMEM medija s dodanim polibrenom do konačne koncentracije  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Navedena koncentracija polibrena je određena po protokolu proizvođača za transfekciju jer navedena koncentracija polibrena u toj koncentraciji nije toksična za većinu staničnih linija, a omogućava olakšano formiranje liposomnih čestica i unos konstrukta, dok je navedena koncentracija puromicina korištena također jer se najčešće koristi  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  u većini staničnih linija, a i zbog jednostavnosti eksperimenta je korištena jer je upravo ta koncentracija najviša za selekciju za sve tri stanične linije odnosno za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena, jer se provodio eksperiment paralelno, samo je za preostale dvije stanične linije u odnosu na kontrolu eksperiment trajao dva, a ne tri dana, kao prvotni eksperiment MTT za selekciju stanica koje su primile insert. Na stanice se dodaju sljedeći volumeni lentivirusnih čestica:  $0 \mu\text{L}$ ,  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $150 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$ . Nakon 24 h medij s reagensima za transdukciju se ukloni, stanice se dva puta isperu PBS-om i presade se iz mikrotitarske pločice s 12 jažica u pločicu s 96 jažica. Nasađuje se po 2500 stanica po jažici, po četiri jažice za svaki uvjet u kojem se provodila transdukcija (za svaki dodani volumen lentivirusnih čestica). Stanice se nasađuju u  $200 \mu\text{L}$  medija DMEM. U dvije od četiri jažice nasađene za svaki uvjet, dodaje se puromicin do konačne koncentracije  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Stanice se

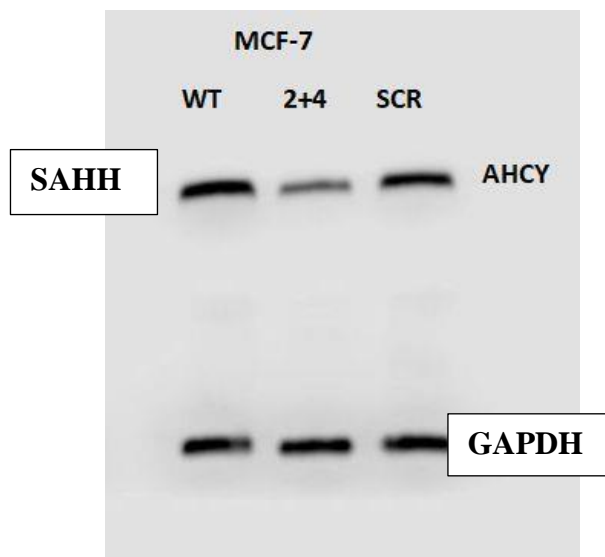
uzgajaju tijekom 5 dana u inkubatoru pri 37 °C. 2 i 4 označuje kombinaciju lentivirusnih čestistica sa shRNA 2 i shRNA 4 za utišavanje gena *SAHH*, 3 i 5 označuje kombinaciju lentivirusnih čestistica sa shRNA 3 i shRNA 5 sekvencom za utišavanje gena *SAHH*, dok *mix* označuje kombinaciju lentivirusnih čestica s shRNA 2, shRNA 4, shRNA 3 i sh RNA 5 za utišavanje gena *SAHH*.

Može se vidjeti iz grafičkog prikaza (Slika 19) da najveće preživljenje stanica imam volumen od 200 µL lentivirusa za sve tri kombinacije lentivirusnih čestica koje sadrže sekvence za utišavanje gena *SAHH* koje se nasumično ugrađuju u širu regiju genoma staničnih linija.

#### 4.1.4. Određivanje uspješnosti utišavanja gena *SAHH* metodom western blota



**Slika 20.** Provjera efikasnosti utišavanja *SAHH*-a u staničnoj liniji SW480 metodom Western blota. U svakom uzorku specifičnim antitijelom pratila se količina proteina *SAHH* te *GAPDH* kao endogena kontrola kako bi se uzorci mogli uspoređivati. Korištene su kombinacije lentivirusa: shRNA 2 + shRNA 4, shRNA 3 + shRNA5, *SAHH* - protein čija se ekspresija proučava, *GAPDH* - unutarnja kontrola. Naneseno je 50 µg proteina na gel za svaki uzorak. WT oznaka označava nepromijenjenu roditeljsku staničnu liniju SW480, 2 + 4 označava kombinaciju lentivirusnih čestica sa shRNA 2 i shRNA 4, a 3 + 5 kombinaciju lentivirusnih čestistica s shRNA 3 i sh RNA 5, dok *mix* označava kombinaciju lentivirusnih čestica sa shRNA 2, shRNA 4, shRNA 3 i sh RNA 5 za utišavanje gena *SAHH*.

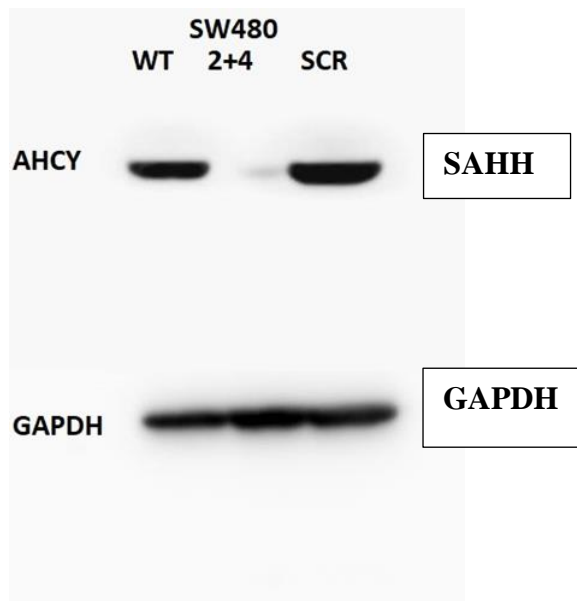


**Slika 21.** Rezultati uspostavljanja stabilno utišane stanične linije MCF 7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Metodom western blota u svakom uzorku pratila se ekspresija gena *SAHH* te smo kao endogenu kontrolu koristili GAPDH. MCF7 WT- roditeljske stanice, MCF7 SCR- kontrolna stanična linija dobivena infekcijom lentivirsima koji sadrže kontrolnu shRNA s nasumičnom sekvencom koja ne kodira produkt, ali se nasumično ugrađuje u širu regiju genoma te se u eksperimentima uz WT roditeljsku staničnu liniju koristi kao kontrola. 2 + 4 označava kombinaciju lentivirskih čestica sa shRNA 2 i shRNA 4 za utišavanje gena *SAHH*. Naneseno je 50 µg proteina na gel za svaki uzorak.



**Slika 22.** Rezultati uspostavljanja stabilno utišane stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Metodom western blota u svakom uzorku pratila se ekspresija gena *SAHH* te smo kao endogenu kontrolu koristili GAPDH. HEK WT- roditeljske stanice, HEK SCR - kontrolna stanična linija dobivena infekcijom lentivirsima koji sadrže kontrolnu shRNA s nasumičnom sekvencom koja ne kodira produkt, ali se nasumično ugrađuje u širu regiju genoma te se u eksperimentima uz WT roditeljsku staničnu liniju koristi kao kontrola. 2 + 4

označava kombinaciju lentivirskih čestica sa shRNA 2 i shRNA 4 za utišavanje gena *SAHH*. Naneseno je 50 µg proteina na gel za svaki uzorak.



**Slika 23.** Rezultati uspostavljanja stabilno utišane stanične linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Metodom western blota u svakom uzorku specifičnim antitijelom pratila se ekspresija gena *SAHH* te Kao endogenu kontrolu koristili smo GAPDH. SW480 WT-roditeljske stanice, SW480 SCR - kontrolna stanična linija dobivena infekcijom lentivirima koji sadrže kontrolnu shRNA s nasumičnom sekvencom koja ne kodira produkt, ali se nasumično ugrađuje u širu regiju genoma te se u eksperimentima uz WT roditeljsku staničnu liniju koristi kao kontrola. 2 + 4 označava kombinaciju lentivirskih čestica sa shRNA 2 i shRNA 4 za utišavanje gena *SAHH*. Naneseno je 50 µg proteina na gel za svaki uzorak.

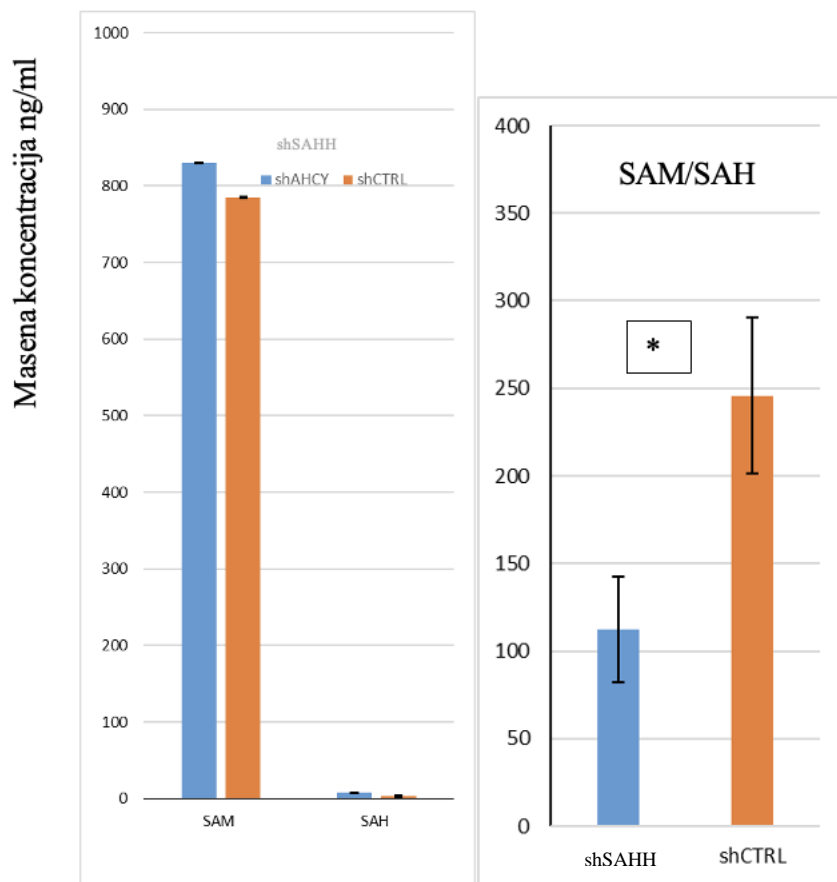
Može se vidjeti da različite sekvence za utišavanje imaju drugačiji utjecaj na razinu ekspresije gena *SAHH* (Slika 20). Iako su korištene dvije identične sekvence shRNA za utišavanje u sve tri stanične linije, razina utišavanja nije identična u svima (Slika 21, Slika 22, Slika 23). Stanice THLE3 nakon utišane ekspresije gena *SAHH* nije bilo moguće održati u kulturi za daljnje eksperimente jer umiru apoptozom nakon tjedan dana uzgoja u kulturi. U daljnim eksperimentima i analizama diferencijalne ekspresije oznaka 2+4 označava stabilno utišanu staničnu liniju koja je korištena kao stanična linija sa sniženom ekspresijom gena *SAHH* dok SCR označava staničnu liniju koja ima stabilno ugrađenu kontrolnu shRNA tj. nasumični kontrolni plazmid.



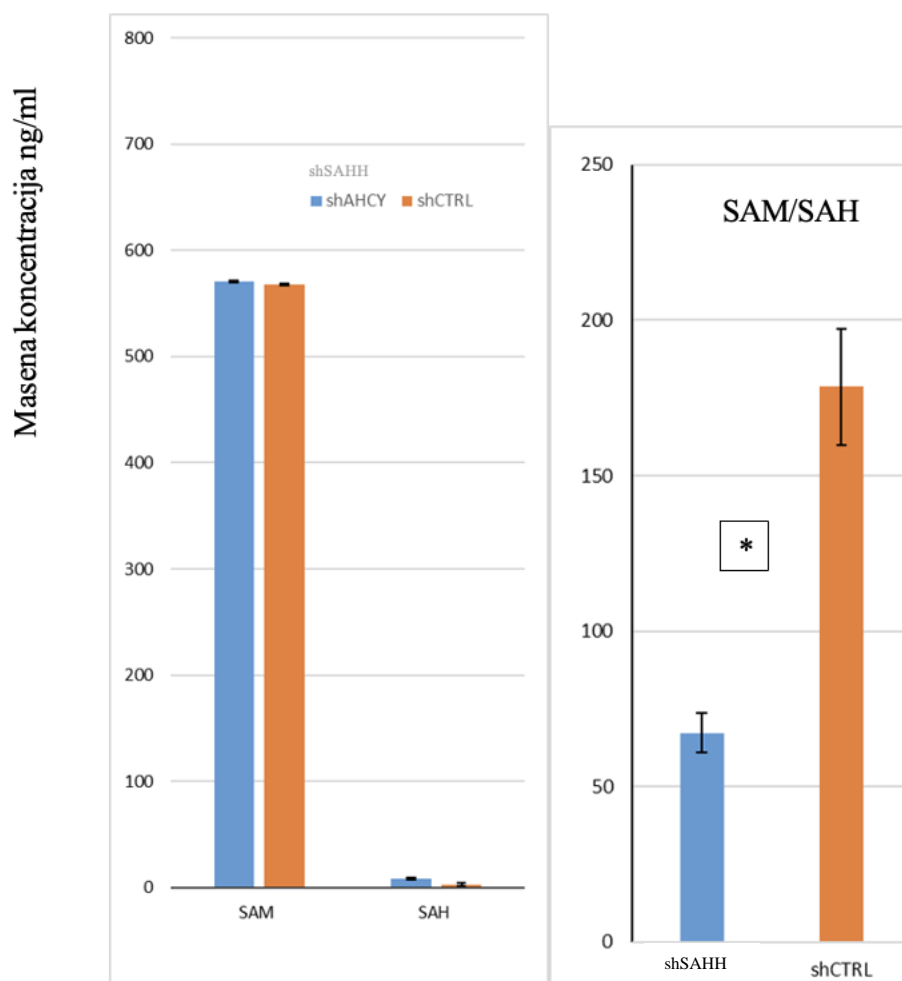
#### **4.2. Usporedba koncentracije metabolita S-adenozil metionina, S-adenozil homocisteina i adenzina u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i kontrolnim staničnim linijama**

Nakon produkcije lentivirusa u stanicama HEK293T generirane su stabilno utišane stanične linije s utišanim genom *SAHH* (MCF7, SW480, HEK293T) te je provjerena efikasnost utišavanja metodom western blota i određen je omjer metabolita SAM/SAH nakon čega je uslijedio RNA-Seq i analiza podataka. Unatoč dokazanoj esencijalnosti *SAHH*-a, promjene u molekularnim mehanizmima stanice u stanju nedostatka su do sada nedovoljno istražene. Stoga je naš cilj vidjeti do kakvih sve promjena dolazi u staničnoj signalizaciji prvo na razini genske ekspresije zatim na proteinskoj razini te konačno koji su stanični putevi promijenjeni u stanju stabilno smanjene ekspresije *SAHH*-a. Kako bi se utvrdilo da li ovi modelni sustavi staničnih linija s utišanom ekspresijom gena *SAHH* reflektiraju stanje deficijencije *SAHH*-a u pacijenata određena je koncentracija ključnih metabolita: SAM-a, SAH-a i adenzina. Mjerenje koncentracije SAM-a i SAH-a u staničnim linijama u kojima je utišan gen *SAHH* ima važnu ulogu u razumijevanju metaboličkih procesa i metilacijskog potencijala stanica. U ovom istraživanju, stanične linije SW480, MCF7 i HEK293T su genetski modificirane kako bi se postiglo utišanje gena *SAHH*. Budući da je *SAHH*-a ključni enzim u metabolizmu SAM-a i SAH-a, važno je istražiti kako utišavanje gena *SAHH* utječe na koncentraciju ovih metabolita. Ova analiza omogućit će bolje razumijevanje metaboličkih promjena i metilacijskog potencijala stanica te potvrditi utjecaj utišavanja gena *SAHH* na koncentraciju SAM-a i SAH-a u staničnim linijama SW480, MCF7 i HEK293T. Metoda tekućinske kromatografije povezane s tandemskom masenom spektrometrijom za određivanje SAM-a i SAH-a u ljudskim stanicama razvijena je kao modifikacija prethodno objavljene metode laboratorija Kozich (129).

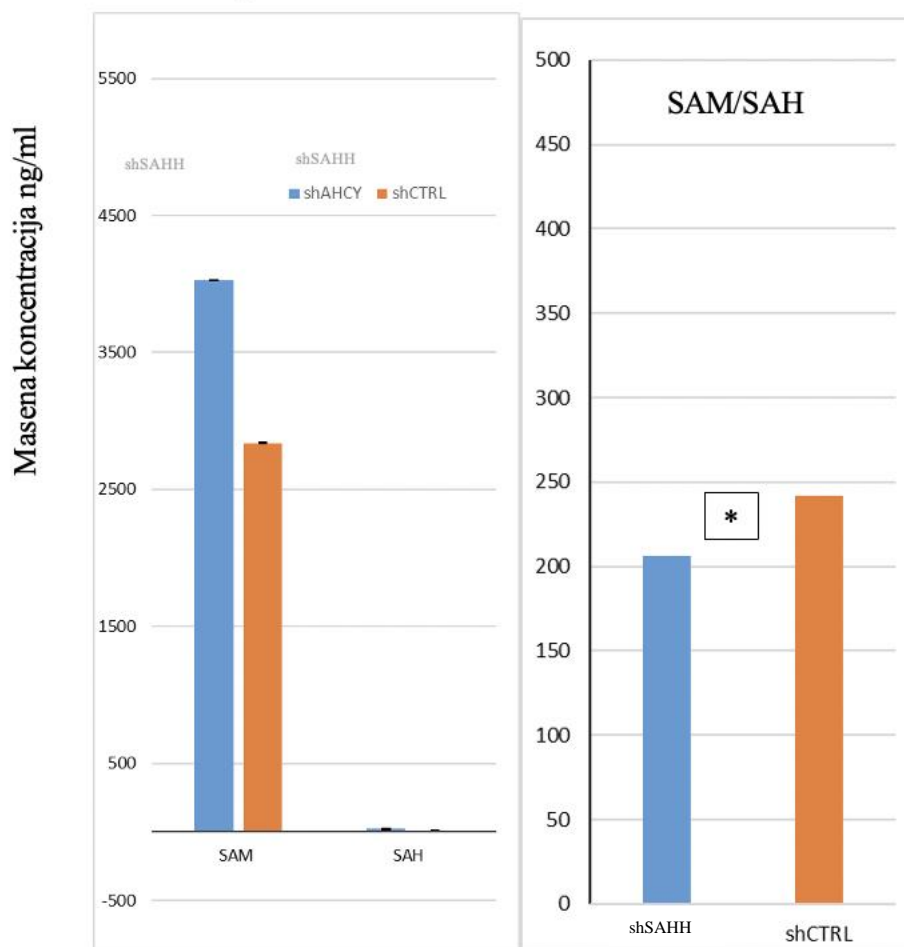
#### 4.2.1. Određivanje koncentracije SAM i SAH nakon utišavanja gena *SAHH*



**Slika 24.** Razine SAM-a i SAH-a (ng/mL) i njihov omjer (SAM/SAH) u lizatima stanica HEK293T s utišanim genom *SAHH* i kontrolnim stanicama izmjerene pomoću LC-MS/MS. Na slici je prikazana usporedba koncentracije SAM-a i SAH-a u staničnim lizatima kontrolnih stanica HEK293T (shCTRL) i stanica s utišanim genom *SAHH* (shSAHH) analizirana pomoću spektrometrije masa (MS/MS).  $\pm$  SD je prikazana kao vertikalna crta i temelji se na tri nezavisna mjerenja.



**Slika 25.** Razine SAM-a i SAH-a (ng/mL) i njihov omjer (SAM/SAH) u staničnim lizatima stanica s utišanim genom *SAHH* i kontrolnim stanicama mjerenom pomoću LC-MS / MS.  $\pm$  SD je prikazana kao vertikalna crta i temelji se na tri nezavisna mjerenja. Na slici je prikazana usporedba koncentracije metabolita SAM-a i SAH-a u staničnim lizatima kontrolnih stanica SW480 (shCTRL) i stanica s utišanim genom *SAHH* (shSAHH) analizirana pomoću spektrometrije masa (MS/MS).  $\pm$  SD je prikazana kao vertikalna crta i temelji se na tri nezavisna mjerenja.



**Slika 26.** Razine SAM-a i SAH-a (ng/mL) i njihov omjer (SAM/SAH) u lizatima stanica MCF7 s utišanim genom *SAHH* i kontrolnim stanicama mjenom pomoću LC-MS / MS. Na slici je prikazana usporedba koncentracije metabolita SAM-a i SAH-a u staničnim lizatima kontrolnih stanica MCF7 (shCTRL) i stanica s utišanim genom *SAHH* (shSAHH) analizirana pomoću spektrometrije masa (MS/MS).  $\pm$  SD je prikazana kao vertikalna crta i temelji se na tri nezavisna mjerenja.

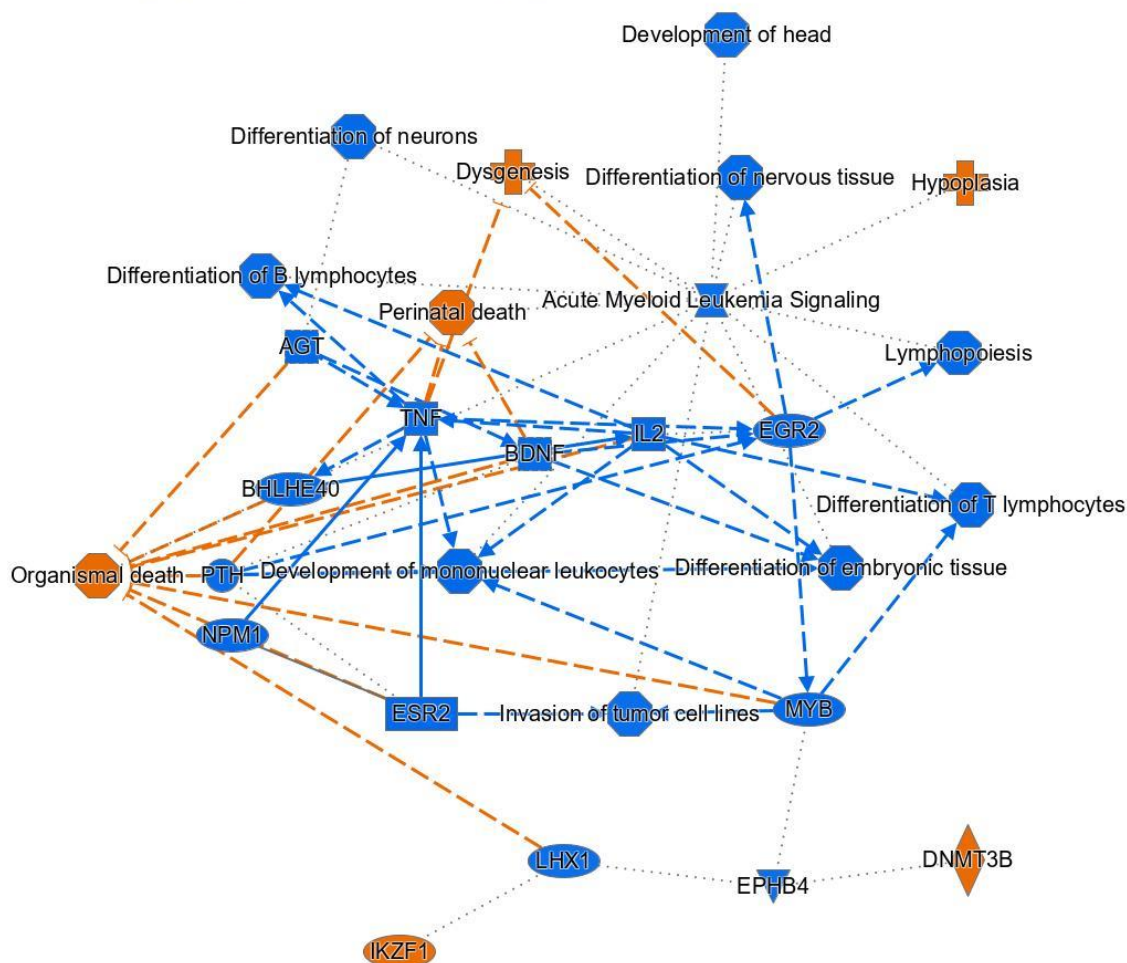
Prema dobivenim rezultatima (Slika 24, Slika 25, Slika 26) može se vidjeti da uslijed nedostatne aktivnosti SAHH-a dolazi do povećane akumulacije metabolita SAH-a u sve tri stanične linije s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (MCF7 2+4, SW480 2+4, HEK293T 2+4), vidljivo je i povećanje razine metabolita SAM-a u sve tri utišane stanične linije te dolazi do promjene omjera SAM-a i SAH-a. Također vidljivo je da do najveće promjene u koncentraciji metabolita dolazi u utišanoj staničnoj liniji SW480 kod koje je najviše smanjena ekspresija proteina S-adenozil homocistein hidrolaze (Slika 23).

#### 4.2.2. Analiza razine adenzina nakon utišavanja gena *SAHH*

Mjerenje koncentracije adenzina u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* ima važnu ulogu u razumijevanju metaboličkih procesa i metilacijskog potencijala stanica. *SAHH* je ključni enzim u metabolizmu S-adenozil metionina (SAM) i S-adenozil homocisteina (SAH), a smanjenje njegove ekspresije može dovesti do promjena u koncentraciji adenzina. Adenzin je važna molekula koja sudjeluje u različitim biološkim procesima, uključujući regulaciju staničnog rasta, diferencijacije i signalizacije. Potencijalna poveznica između promijenjene razine koncentracije adenzina i promijenjenog metilacijskog potencijala uslijed smanjenja ekspresije enzima *SAHH*-a može pružiti dublje uvide u mehanizme regulacije metaboličkih putova i epigenetskih procesa u stanicama. Ovo istraživanje će doprinijeti boljem razumijevanju uloge *SAHH*-a u metabolizmu adenzina te potencijalnih posljedica smanjenja ekspresije ovog enzima na stanične funkcije i metaboličke procese. Komercijalni protokol za mjerenje koncentracije adenzina uključuje pripremu staničnih uzoraka, ekstrakciju adenzina iz uzoraka. Mjerenje koncentracije adenzina u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* pokazalo je da nije zabilježena značajna promjena u koncentraciji adenzina u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi rezultati sugeriraju da nedostatak *SAHH*-a možda nema značajan utjecaj na metabolizam adenzina u staničnoj liniji SW480. U staničnoj lini MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* također nije zabilježena značajna promjena u koncentraciji adenzina u odnosu na kontrolnu skupinu. U staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *S-adenozil homocistein hidrolaze* zabilježena je snižena koncentracija adenzina u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovi rezultati podržavaju pretpostavku da nedostatak S-adenozil homocistein hidrolaze može utjecati na metabolizam adenzina u tumorskim stanicama. Smanjena koncentracija adenzina može ukazivati na brzi metabolizam adenzina u staničnoj liniji HEK293T, što može biti posljedica nedostatka S-adenozil homocistein hidrolaze. Adenzin, kao toksični nukleozid, vjerojatno se brzo metabolizira u ovoj staničnoj liniji, što također može rezultirati smanjenom koncentracijom adenzina. Uzimajući u obzir ove rezultate, može se zaključiti da nedostatak *SAHH*-a može utjecati na koncentraciju adenzina u tumorskim stanicama, ali ta promjena nije konzistentna u svim staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *S-adenozil homocistein hidrolaze*. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se detaljnije razumjelo kompleksno djelovanje *SAHH*-a i njegov utjecaj na metabolizam adenzina u tumorskim stanicama.

### 4.3. Promjene signalnih putova u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*

Analiza sekvenci RNA u kontrolnim stanicama i stanicama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* omogućila je usporedbu ekspresije niza gena. Kod linije SW480 nakon utišavanja *SAHH*-a faktor povećanja iznosi (od engl. *log<sub>2</sub>FoldChange*) -3.03, dok za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* iznosi -2.2 te je nešto niža promjena razine ekspresije za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i iznosi -0.9. Za analizu staničnih signalnih putova napravljen je preklap zajedničkih podataka između roditeljske stanične linije SW480 i SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *sw480wt-vs-siAHC*) te stanične linije SW480 s ugrađenim plazmidom s nasumičnom sekvencom za utišavanje koja ne kodira nijedan poznati proteinski produkt i stanične linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *sw480scr-vs-siSAHH*). Identična procedura tj. preklap podataka napravljen je za HEK293T roditeljsku staničnu liniju i HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *HEK293Twt-vs-siSAHH*) te za staničnu liniju HEK293T s ugrađenim plazmidom s nasumičnom sekvencom za utišavanje koja ne kodira nijedan poznati proteinski produkt i HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *HEK 293Tscr-vs-siSAHH*). Ista procedura napravljenja je analogno i za staničnu liniju MCF7, za MCF7 roditeljsku staničnu liniju i staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *MCF7wt-vs-siSAHH*) te za staničnu liniju MCF7 s ugrađenim plazmidom s nasumičnom sekvencom za utišavanje koja ne kodira nijedan poznati proteinski produkt i stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (od engl. *MCF7scr-vs-siSAHH*).



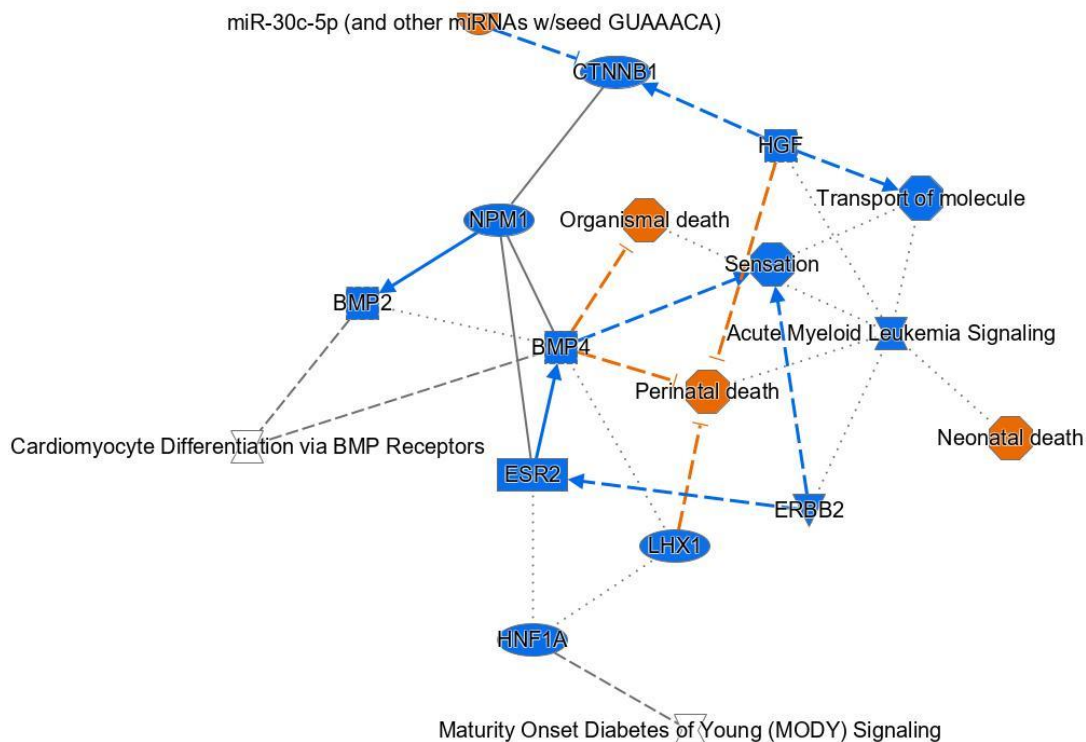
© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 27.** Usporedba ekspresije između roditeljske stanične linije SW480 i stanične linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i diferencijalne ekspresije gena dobiveni su uz pomoć IPA-programa za bioinformatičku analizu. Parametri analize su faktor povećanja (od engl. *Log<sub>2</sub> Fold change*) vrijednosti u rasponu od -2 do 2, uz p-vrijednost od 0,05. Slika prikazuje grafički sažetak analize gdje može se vidjeti da u stanju utišane ekspresije gena *SAHH* u staničnoj liniji SW480 2+4 u odnosu na kontrolu staničnu liniju (WT od engl. *wilde type*); narančasto: povećane aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnosti, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa. Oznake najznačajnijih kratica i simbola: DNMT3B – DNA metiltransferaza 3B (od engl. *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B*), EPHB4 – Ephrin receptor B4 (od engl. *Ephrin type-B receptor 4*), MYB – Mieloblastomski proto-onkogen (od engl. *Myeloblastosis proto-oncogene*) ESR2 – Estrogen receptor 2 (od engl. *Estrogen Receptor 2*), NPM1 – Nukleoplasmin 1 (od engl. *Nucleophosmin 1*), PTH - Paratiroidni hormon (od engl. *Parathyroid Hormone*), EGR2 – (od engl. *Early growth response 2*) – Odgovor ranog razvoja 2, TNF – Faktor nekroze tumora (od engl. *Tumor Necrosis Factor*), BHLH340 – Osnovna petlja-Zavojnica-Petlja-Zavojnica 340 (od engl. *Basic Helix-Loop-Helix 340*), BDNF – Neurotrofni faktor dobiven iz mozga (od engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), AGT – Angiotenzinogen (od engl. *Angiotensinogen*).

Nakon provedene analize srži i diferencijalne ekspresije gena u IPA-programu u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* imamo zabilježenu povećanu aktivnost procesa

gena odgovornih za staničnu smrt, hipoplaziju i disgenezu odnosno poremećen razvoj organa tkiva i struktura u organizmu. Također je zabilježena i povećana aktivnost DNMT3B metiltransferaze. Uz povećane aktivnosti ovih procesa zamijećena je i smanjena razina diferencijacije (Slika 27).

Observation 2 Summary Graph



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

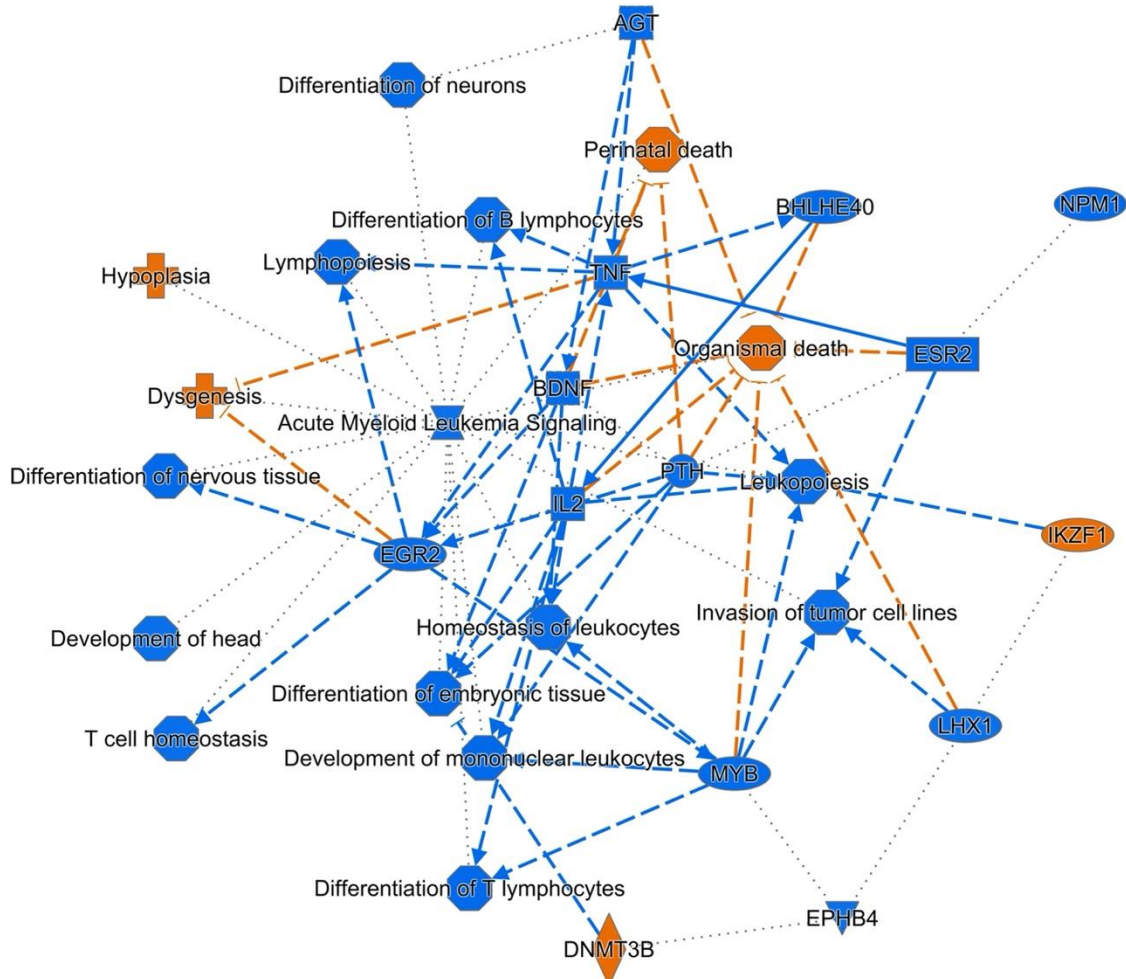
**Slika 28.** Usporedba ekspresije između roditeljske stanične linije SW480 i staničnije linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć IPA programa za bioinformatičku analizu; slika prikazuje grafički sažetak analize gdje se može vidjeti da u stanju utišane ekspresije gena *SAHH* u staničnoj liniji MCF7 2+4 u odnosu na kontrolnu staničnu liniju s ugrađenim plazmidom s nasumičnom sekvencom za utišavanje koja ne kodira nijedan poznati proteinski produkt (SCR, od engl. *scrambled*); narančasto: povećanje aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnost, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa dok puna linija označava direktnu interakciju između molekula i procesa. Oznake najznačajnijih kratica i simbola: LHX1 - LIM homeobox 1 (od engl. *LIM Homeobox 1*), HNF1A – Hepatocitni nuklearni faktor 1 alfa (od engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha*), ESR2 – Estrogen receptor 2 (od engl. *Estrogen receptor 2*), BMP2 – Koštani morfogenetski protein 2 (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 2*), BMP4 – Koštani morfogenetski protein 4 (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 4*), NPM1 – Nukleoplazmin 1 (od engl. *Nucleophosmin 1*), HGF – Hepatocitni faktor rasta (od engl. *Hepatocyte Growth Factor*), ERBB2 – Receptor tirozin kinaze erbB-2 (od engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), CTNNB1 – Beta katenin 1 (od engl. *Catenin Beta-1*).

Nakon provedene analize srži i diferencijalne ekspresije gena u IPA-programu u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* imamo zabilježenu povećanu aktivnost procesa



vezanih uz aktivaciju stanične smrti (Slika 28). Uz povećane aktivnosti ovih procesa zamijećena je i smanjena razina HGF i transporta molekula (Slika 28).

SW480-wt-vs-siAHY3(-2,2,0.05) - 2022-03-30 11:40 AM Summary Graph



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

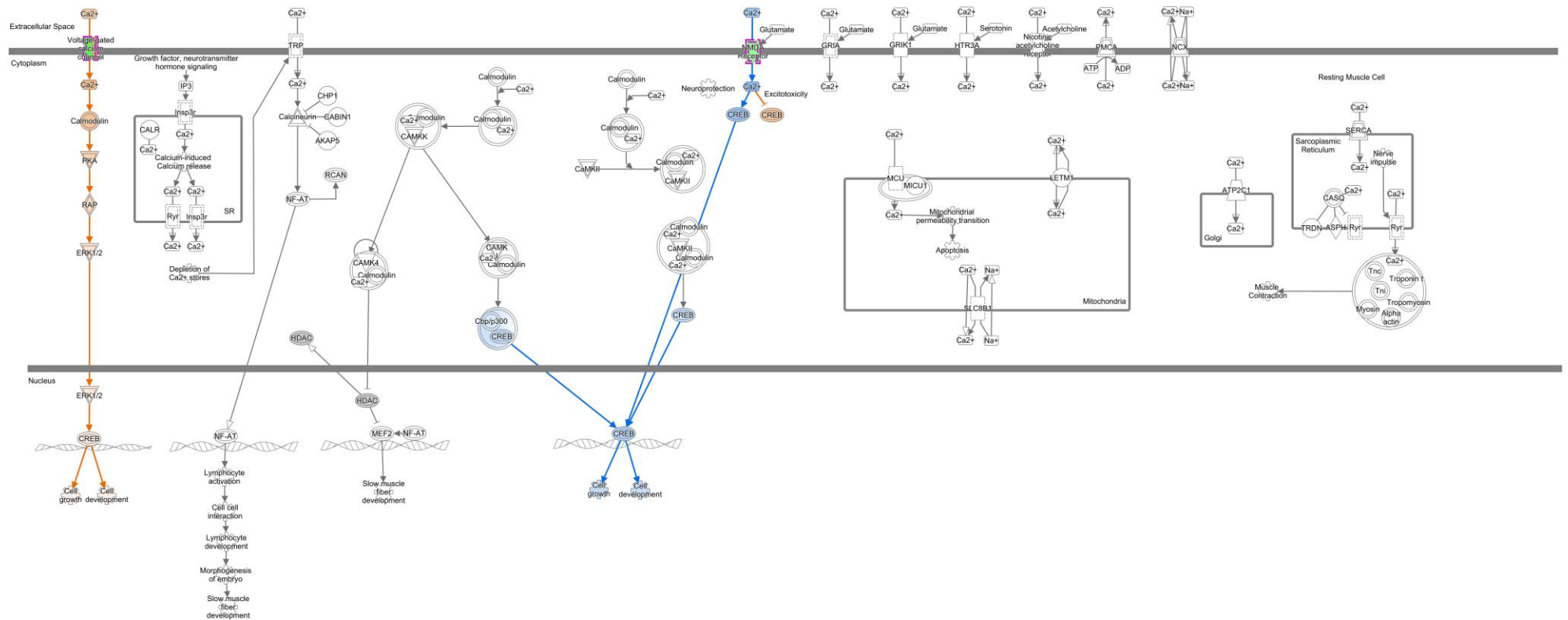
**Slika 29.** Usporedba ekspresije između roditeljske stanične linije SW480 i SW480 stanične linije s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Slika prikazuje rezultate analize srži (od engl. *Core analysis*) i diferencijalne ekspresije gena dobivene uz pomoć IPA-programa za bioinformatičku analizu; grafički sažetak prikazuje rezultat analize gdje se može vidjeti da u stanju utišane ekspresije gena *SAHH* u staničnoj liniji SW480 u odnosu na kontrolu gdje smo preklapili zajedničke podatke WT i SCR kontrolne grupe podataka. Narančasto: povećanje aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnost, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa dok puna linija označava direktnu interakciju između molekula i procesa. Za identifikaciju gena koji su značajno regulirani u usporedbi s kontrolnim uzorcima, korišten je prag od -2 do 2 za faktor povećanja (od engl. *Fold change*), što omogućava identifikaciju gena koji pokazuju značajnu promjenu u ekspresiji. P-vrijednost: Za statističku značajnost razlika u ekspresiji gena korišten je prag p-vrijednosti od 0.05. Geni s p-vrijednostima manjim od ovog praga smatrat će se statistički značajnima. Oznake najznačajnijih kratica i simbola: Protein cinkovog prsta obitelji Ikaros 1 (od engl. *IKZF1 - Ikaros Family Zinc Finger 1 (IKZF1)*), LIM Homeobox 1 – LHX1 – (od engl. *LIM Homeobox 1 (LHX1)*), DNA metil-transferaza 3 beta, DNMT3B – (od engl. *DNA Metiltransferaza 3 Beta, 4*), IL2 - Interleukin 2 (IL2) - Interleukin

2, Faktor nekroze tumora (od engl. *TNF - Tumor Necrosis Factor*) (*TNF*), Neurotrfni faktor dobiven iz mozga (od engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), Rani odgovor na rast 2 - *EGR2* (od engl. *Early Growth Response 2* (*EGR2*)), Osnovna zavojnica-petlja-zavojnica obitelj, član e40 BHLHE40 (od engl. *Basic Helix-Loop-Helix Family, Member e40*), MYB proto-onkogen, Faktor transkripcije MYB (od engl. *MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor* (MYB)).

Rezultati diferencijalne analize pokazuju da smanjenje ekspresije gena *SAHH* može biti povezano sa smanjenjem ekspresije drugih gena i procesa u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T. Nakon provedene analize srži koja obuhvaća analizu putova (od engl. *Pathway Analysis*), analizu uzvodnih regulatora (od engl. *Upstream Regulator Analysis*), analizu bolesti i funkcija (od engl. *Diseases and Functions Analysis*), učinke regulatora (od engl. *Regulator Effects*) i analizu mreža (od engl. *Networks Analysis*), dobivene su statistički značajno povezane mreže koje predviđaju direktnu i indirektnu interakciju gena u ovom setu podataka. U obje stanične linije s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, MCF7 i SW480, predviđena je indirektna interakcija histona H3 i *SAHH*-a (Slika 29), što ukazuje na potencijalni utjecaja na regulaciju strukture kromatina. Analiza mreža omogućava identifikaciju obogaćenih kanonskih putova, pri čemu su zajednički i značajni putovi u sve tri utišane stanične linije: prijenos signala posredovan  $Ca^{2+}$ , signalni put STAT3, prijenos signala Notch i epitelno-mezenhimalna tranzicija, EMT. Može se vidjeti da dolazi do povećane aktivacije gena odgovornih za staničnu smrt, hipoplaziju i disgenezu odnosno poremećen razvoj organa tkiva i struktura u organizmu. Također je zabilježena i povećana aktivnost metiltransferaze DNMT3B. Uz povećane aktivnosti ovih procesa zamijećena je i smanjena razina diferencijacije (Slika 29). Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu važnost ovih putova u regulaciji procesa u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Zajednički faktori analize u sve tri preklapajuće observacije s utišanom ekspresijom gena *SAHH* su povećana aktivacija gena odgovornih za perinatalnu staničnu smrt i hipoplaziju.

## Prijenos signala posredovan kalcijem Ca<sup>2+</sup>

Calcium Signaling : sw480screwtoverlap : Expr Log Ratio

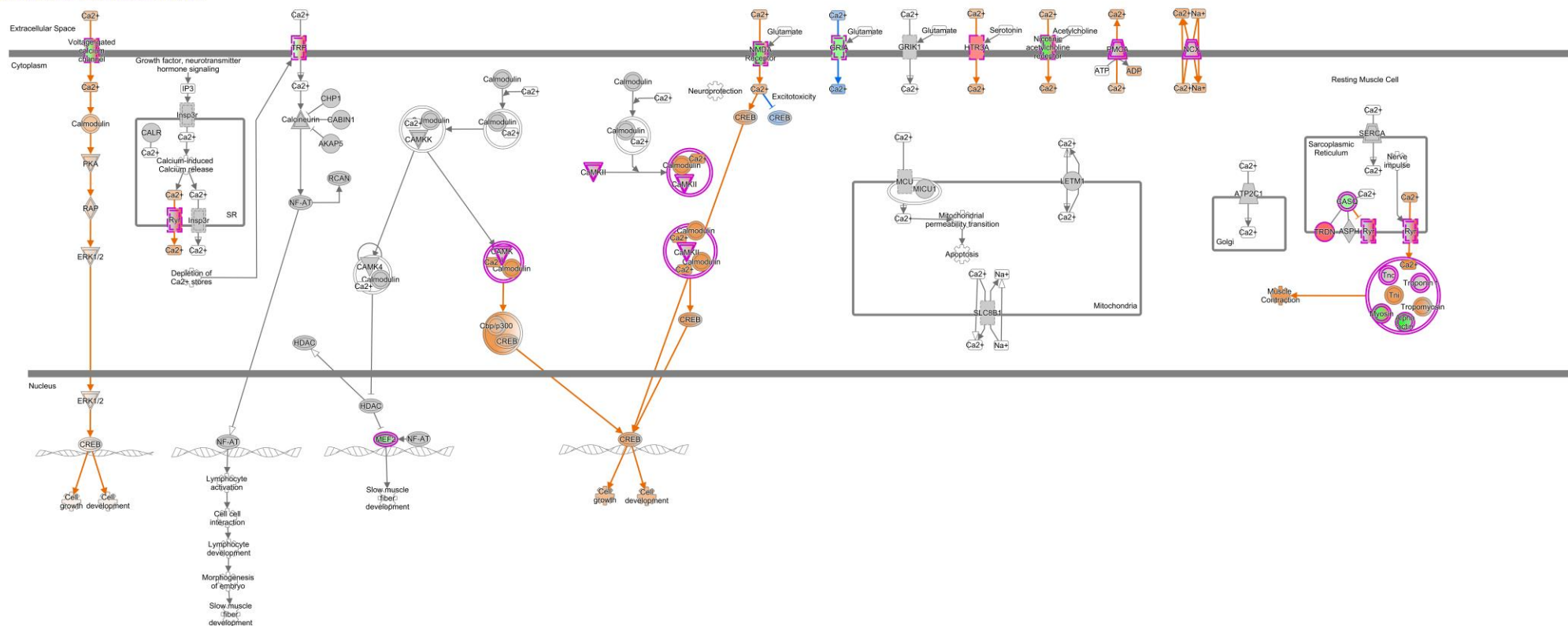


© 2000-2023 DIAGEN. All rights reserved.

**Slika 30.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways analysis*) pomoću programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Slika prikazuje aktivnost prijenosa signala posredovanog Ca<sup>2+</sup> u utišanoj staničnoj liniji SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost, ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Puna linija označava direktnu interakciju molekula. Oznake najznačajnijih kratica i simbola: NF-AT - Nuklearni faktor aktivacije T-stanica (od engl. *Nuclear Factor of Activated T cells*), CREB - Ciklički AMP vezujući protein (od engl. *cAMP Response Element-Binding protein*), CaMKII - Kalcij-kalmodulin ovisna

protein kinaza II (od engl. *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*), NMO receptor - Neuromijelitis optički receptor (od engl. *Neuromyelitis Optical Receptor*), CAMKK - Kalcij-kalmodulin-ovisna protein kinaza (od engl. *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase*), HDAC - Histonska deacetilaza (od engl. *Histone Deacetylase*), MEF - pojačivački faktor miocita (od engl. *Myocyte Enhancer Factor*), SERGA - Serin glicin bogati proteinski adaptori (od engl. *Serine Glycine-Rich Proteins Adaptors*), MEF2 - pojačivački faktor 2 miocita (od engl. *Myocyte Enhancer Factor 2*), Tmc Iry - Transmembranski ionski kanal kanal reguliran cikličkim nukleotidima, iridoforin (od engl. *Transmembrane Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel*), Iridophorin.

Iz rezultata nakon diferencijalne ekspresije gena i analize putova u IPA-programu može se vidjeti da je povećana aktivnost gena povezanih uz stanični rast u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (Slika 30) (*Cell growth*) i stanični razvoj (*Cell development*). Povećana je razina prijenosa signala  $Ca^{2+}$ , kalmodulina i CAMK-a.



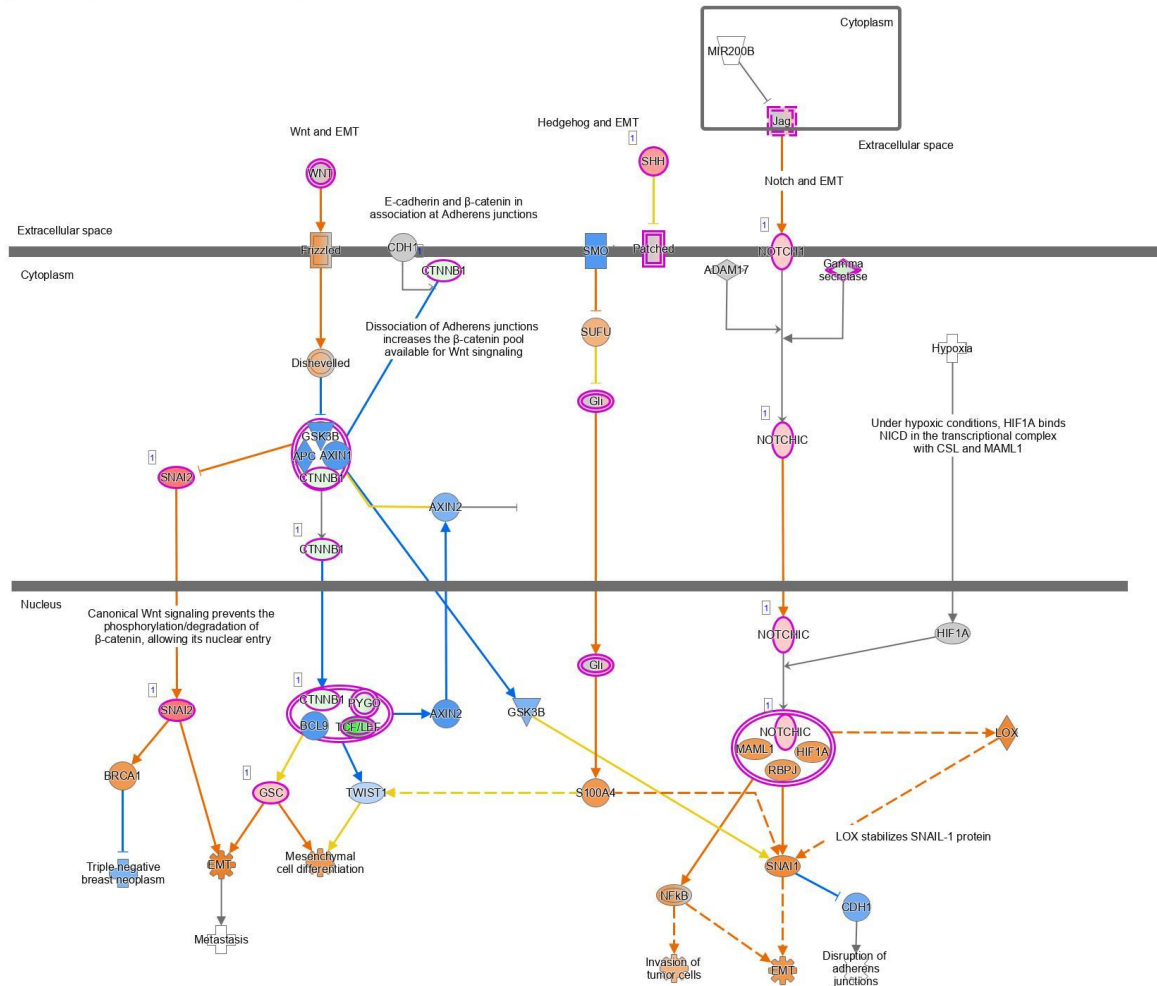
**Slika 31.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways analysis*) pomoću programa IPA u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Slika prikazuje aktivnost prijenosa signala posredovanog  $Ca^{2+}$  u utišanoj staničnoj liniji HEK293T u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost, ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Puna linija označava direktnu interakciju molekula. Oznake kratica i simbola: NF-AT - Nuklearni faktor aktivacije T-stanica od engl.

*Nuclear Factor of Activated T-cells*, CREB - Ciklički AMP vezujući protein (od engl. *cAMP Response Element-Binding protein*), CaMKII - Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza II (od engl. *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II*), NMO receptor Neuromijelitis optički receptor (od engl. *Neuromyelitis Optica receptor*), CAMKK - Kalcij-kalmodulin ovisna protein kinaza kinaze (od engl. *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase*) HDAC - Histonska deacetilaza (od engl. *Histone Deacetylase*), MEF - pojačivački faktor miocita (od engl. *Myocyte Enhancer Factor*), SERGA - Serin glicin bogati proteinski adaptor (od engl. *Serine Glycine-Rich Proteins Adaptors*), MEF2 - pojačivački faktor 2 miocita (od engl. *Myocyte Enhancer Factor 2*), Tmc Iry - Transmembranski ionski kanal reguliran cikličkim nukleotidima, iridoforin (od engl. *Transmembrane Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel, Iridophorin*), PKA - Protein kinaza A (od engl. *Protein Kinase A*), RAP - Ras povezani protein (od engl. *Ras-Associated Protein*), ERK 1/2 – Kinaza 1/2 regulirana izvanstaničnim signalom (od engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), TRP - Transientni receptori potencijalnih kanala (od engl. *Transient Receptor Potential channels*), Osnovna zavojnica-petlja-zavojnica obitelj, član e40-Cbp/p300 (od engl. *CREB-binding protein/p300*), GRM - Metabotropni glutamatni receptor (od engl. *Metabotropic Glutamate Receptor*), TRDN - Triadin (od engl. *Triadin*), HTR3A - Serotoninski receptor tipa 3A (od engl. *Serotonin Receptor Type 3A*), PMCA - pumpa za kalcij-ATPazu (od engl. *Plasma Membrane Calcium-ATPase*).

Iz rezultata analize putova u programu IPA može se vidjeti da je u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* povećana aktivnost gena povezanih uz stanični rast i razvoj. Povećana je razina prijenosa signala  $Ca^{2+}$ , kalmodulina, CAMK-a (kalcij-kalmodulin ovisna proteinska kinaza). Također je zabilježena povećana aktivnost gena koji sudjeluju u CREB – Cop/p300 prijenosu signala. Vezano uz prijenos signala kalcijem, na temelju analize putova može se uočiti da dolazi do povećane aktivnosti prijenosa signala uz pomoć kalcija u staničnim linijama MCF7 i SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (Slika 30, Slika 31). Povećana aktivnost PKA (Protein kinaza A), RAP (Ras-povezani protein) i ERK 1/2 (kinaza regulirana izvanstaničnim signalima 1/2) u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* može biti povezana sa zabilježenom povećanom aktivnošću staničnog rasta u prijenosu signala posredovanim kalcijem. Povećana aktivnost ovih signalnih mreža i kaskada može doprinijeti regulaciji procesa staničnog rasta i razvoja. Zanimljivo je da je zabilježena povećana razina ekspresije i aktivnosti proteina triadin. Triadin je protein koji se nalazi u srčanim mišićima i igra važnu ulogu u regulaciji kontrakcije srčanog mišića. On je ključni regulator interakcije između trijada proteina u srčanim mišićima, što omogućava efikasnu kontrakciju srčanog mišića. Triadin je važan za održavanje homeostaze kalcija u mišićnim stanicama i za pravilno funkcioniranje srčanog mišića. Jedan od procesa koji je detektiran kao zajednički nakon analize putova uz pomoć programa IPA u utišanim staničnim linijama MCF7 i SW480 je i epitelno-mezenhimalna tranzicija, EMT (Slika 32).

## Epitelno mezenhimalna tranzicija (EMT)

Regulation Of The Epithelial Mesenchymal Transition In Development Pathway



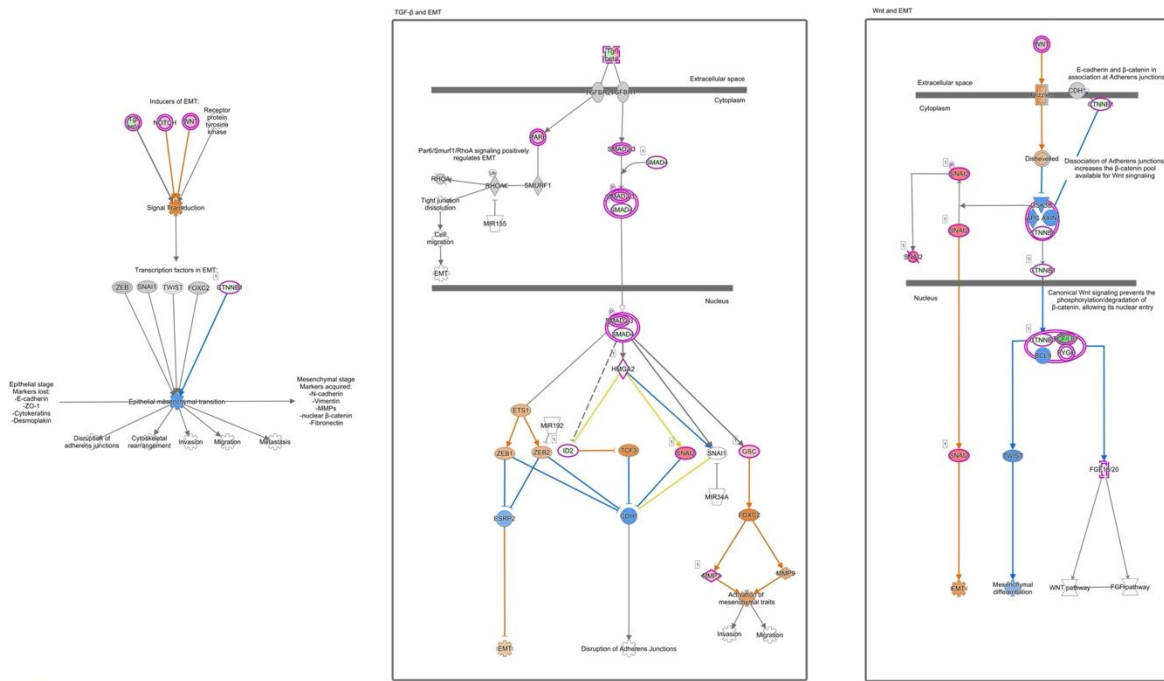
© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 32.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways analysis*) pomoću programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* gdje možes se vidjeti prikaz i stanje povećane aktivacije gena koji sudjeluju u epitleno-mezenhimalnoj tranziciji, EMT. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost, zelena boja označava sniženu razinu transkripcije, ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenje značenja najznačajnijih kratica i simbola: *Notch* – Notch signalni put (od engl. *Notch Signaling Pathway*), NFκB – Nuklearni faktor kappa B (od engl. *Nuclear Factor kappa B*), *SNAI1* – Snail homolog 1 (od engl. *Snail Homolog 1*), *WNT* – Wingless-povezano mjesto integracije (od engl. *Wingless-Integrated Frizzled*), Frizzled Receptor (od engl. *Frizzled – receptor*), *S100A* - S100 kalcij vezujući protein (od engl. *S100 Calcium-Binding Protein*), *LOX* – Lozil oksidaza (od engl. *Lysyl Oxidase*), *RBPJ* - Rekombinantni signalni vezujući protein Jk (od engl. *Recombined Signal Binding Protein Jk*), *HF1A* – Heksfluoridin-1-alfa (od engl. *Hexafluoride-1-alpha*), *CDH1* – kadherin 1 (od engl. *Cadherin 1*).

Prema rezultatima vidljivima iz prikaza epitelno-mezenhimske tranzicije (Slika 30) i regulacije epitelno-mezenhimalne tranzicije (Slika 32) te regulacije aktivnosti S100 proteina (Slika 33)

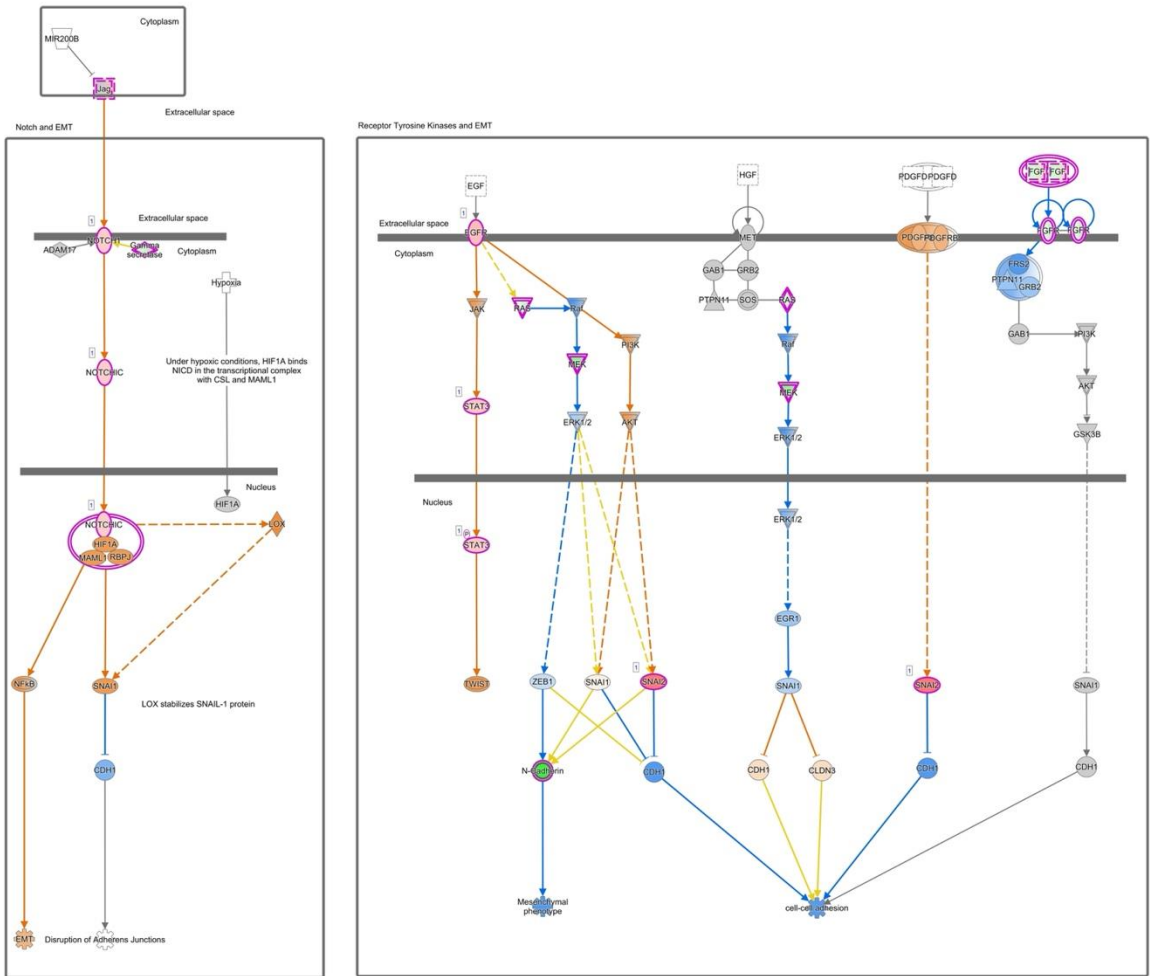
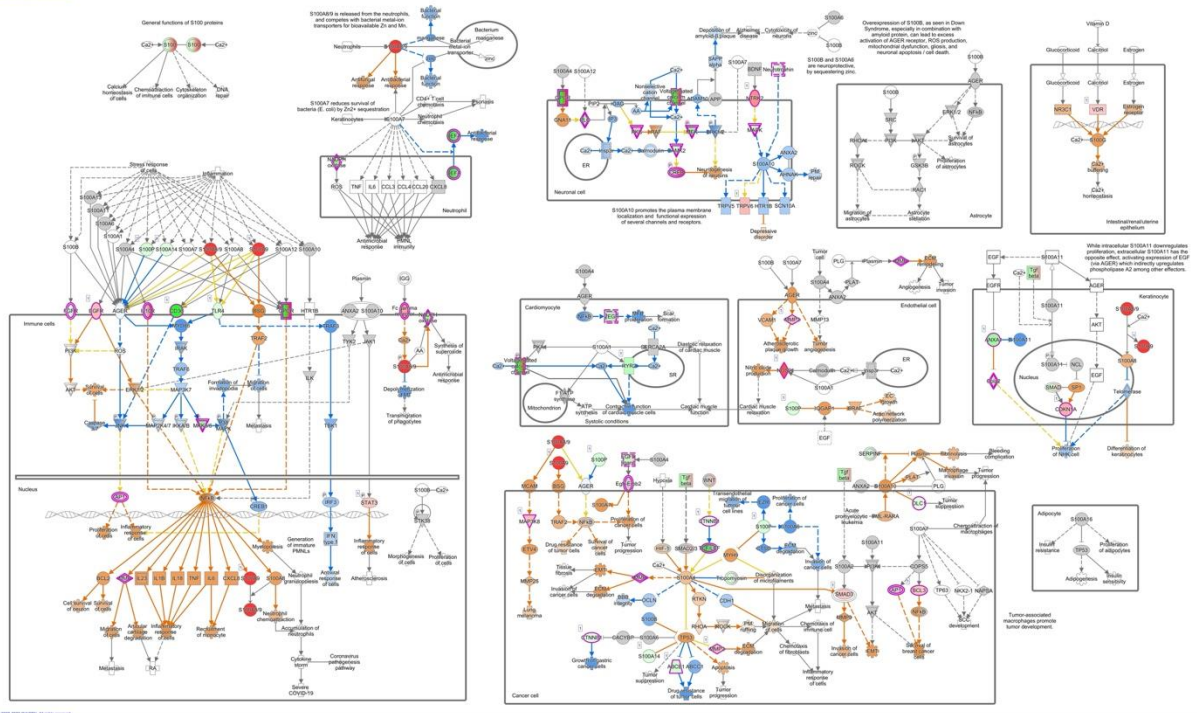
može se vidjeti da uslijed utišavanja gena *SAHH* dolazi do promjene aktivnosti u genima povezanim s procesom EMT: Notch, NFkB, SNAI1, WNT, Frizzled, S100A, LOX, RBPJ, HF1A, MAML1. SNAI1 je transkripcijski faktor koji je poznat po svojoj ulozi u indukciji procesa EMT. On može aktivirati genetske programe koji potiču prelazak stanica iz epitelnog u mezenhimalni tip. Signalni put Wnt je također povezan s regulacijom EMT. Aktivacija signalnog puta Wnt može potaknuti promjene u fenotipu stanica koje su karakteristične za EMT. NFkB je transkripcijski faktor koji igra važnu ulogu u upalnim procesima i može biti uključen u regulaciju EMT putem interakcije s drugim signalnim putovima. Također vidljiva je smanjena aktivnost *CDH1*, što dodatno potiče EMT narušavajući adhezijske spojeve. RBPJ je transkripcijski faktor koji igra važnu ulogu u regulaciji gena uključenih u EMT, koji je ključan za promjenu fenotipa stanica iz epitelnog u mezenhimalni tip. RBPJ može interagirati s drugim transkripcijskim faktorima kako bi kontrolirao ekspresiju gena koji su važni za EMT.

Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway



© 2005-2012 SAGE. All rights reserved.

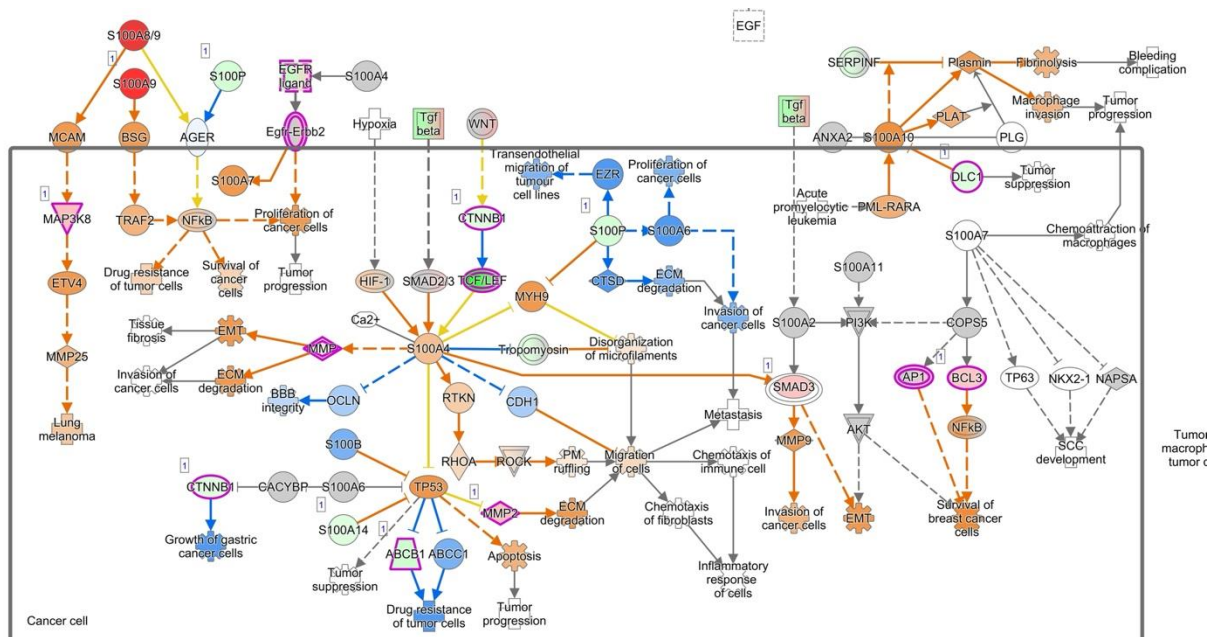




**Slika 33.** Analiza putova (od engl. *Pathways analysis*) napravljena je pomoću programa IPA u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u odnosu na kontrolnu staničnu liniju

gdje se može vidjeti prikaz i stanje povećane aktivacije gena koji sudjeluju u samoj regulaciji EMT. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost, plava označava smanjenu aktivnost, ljubičasta boja označava interakciju više molekula, crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CDH1 – Kadherin 1 (od engl. *Cadherin 1*), od engl. N-cadherin – N-kadherin, Twist – Twist, STAT3 – Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), Notch – Notch, HIF1A – HIF1A Hipoksija inducibilni faktor 1 alfa (od engl. *Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha*), MAML1 – Mastermind sličan gen 1 (od engl. *Mastermind-Like Protein 1*), RBPJ - Rekombinantni signal vezujući protein Jk (od engl. *Recombined Signal Binding Protein Jk*), LOX - Lizil oksidaza (od engl. *Lysyl Oxidase*), CLDN3 - Klaudin 3 (od engl. *Claudin 3*), Akt – Akt (protein kinaza B) (od engl. *Protein Kinase B*), PI3K - Fosfatidilinozitol 3-kinaza (od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), Wnt – Wnt, Frizzled – Frizzled, Dishevelled – Dishevelled, TCF/LEF – TCF/LEF (faktor T stanica/ faktor koji veže limfoidni pojačivač (od engl. *T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*), AGER – Receptor za napredne glikacijske proizvode (od engl. *Advanced Glycation End-Product Receptor*), VCAM1 – Vaskularna adhezijska molekula 1 (od engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), NOS2 – sintaza dušikovog monoksida 2 (od engl. *Nitric Oxide Synthase 2*), S100A8/9 – S100A8/9 (S100 kalcij-vezujući protein A8/9 (od engl. *Calcium-Binding Protein A8/A9*), S100A10 – S100A10 (od engl. *Calcium-Binding Protein A10*), S100A7 - S100A7 (od engl. *Calcium-Binding Protein A7*).

Jedan od procesa koji utječu na EMT su i proteini S100 A 8/9, S100A10, S100A7 (Slika 32, Slika 33, Slika 34). Poznatno je da su povezani s procesima razgradnje izvanstaničnog matriksa i proliferacijom te preživljenjem tumorskih stanica kao što je vidljivo u rezultatima analize putova (od engl. *Pathways analysis*) u staničnoj liniji s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Također, vidljiva je smanjena aktivnost CDH1, što dodatno potiče EMT narušavajući međustaničnu adheziju. Također, u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* uočena je povećana aktivnost MMP9, Notch, NFkB, FOXC2 te BCL2 koji sudjeluju u procesu preživljavanja stanica.



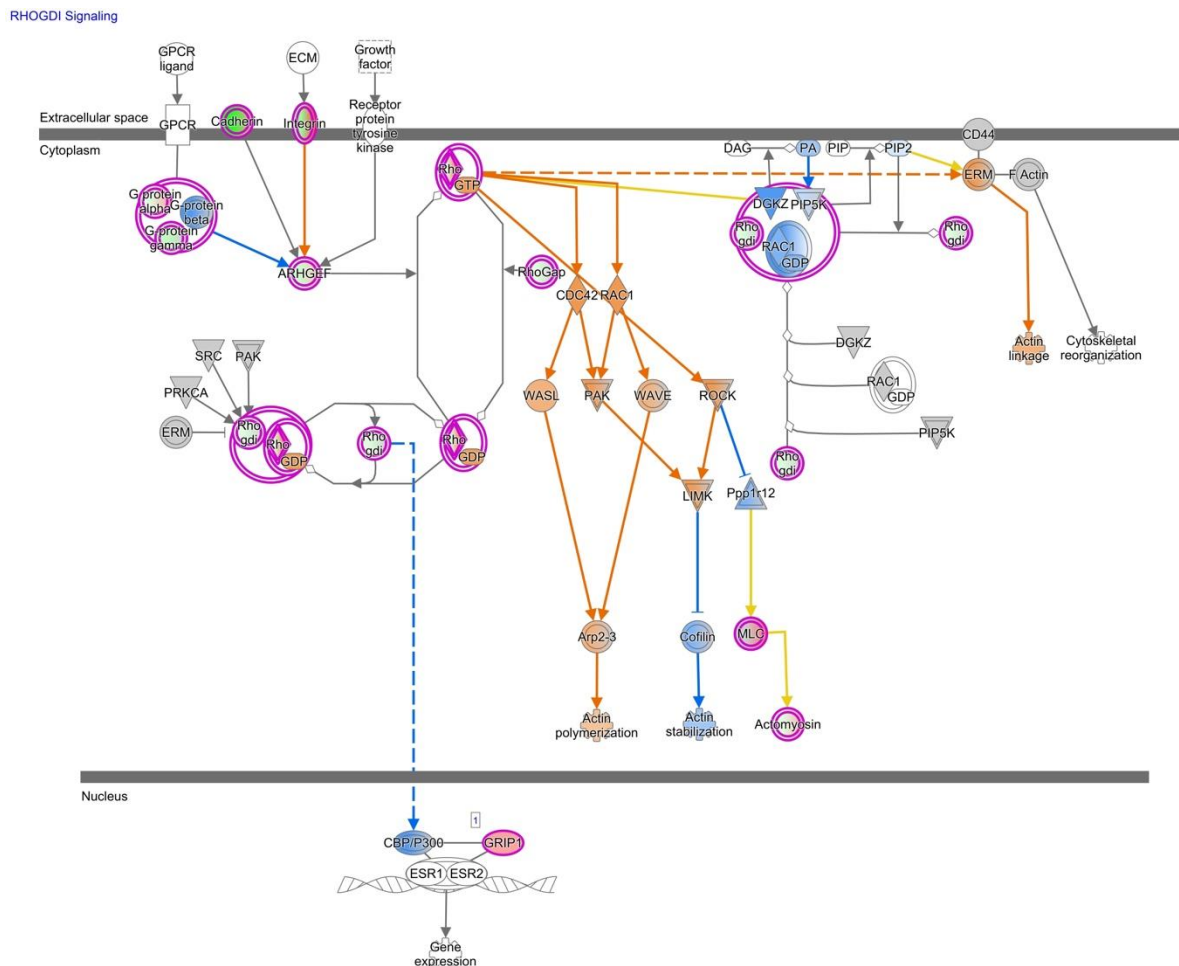
**Slika 34.** Rezultati analize putova napravljene pomoću programa IPA gdje vidimo prikaz i stanje povećane aktivacije gena *S100* koji sudjeluju u regulaciji EMT u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost, plava označava smanjenu aktivnost, crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana crta označava indirektnu interakciju molekula. Objasnjenje kratica i simbola: SMAD3 – SMAD3 transkripcijski faktor (od engl. *SMAD3 Transcription Factor*), MMP9 – metaloproteinaza matriksa 9 od engl. *Matrix Metalloproteinase 9*, PLAT – Plasminogeni aktivator tkivnog tipa (od engl. *Tissue-Type Plasminogen Activator*), Plasmin – Plasmin (od engl. *Plasmin*), MMP25 – metaloproteinaza matriksa 25 (od engl. *Matrix Metalloproteinase 25*), ETV4 – ETV4, MAP3K8 – Proteinska kinaza aktivirana mitogenom 8 (od engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase 8*), RhoA – RhoA (od engl. *RhoA GTPase*), RTKN – Rhotekin (od engl. *Rhotekin*), MYH9 - Teški lanac miozina 9 (od engl. *Myosin Heavy Chain 9*), MCAM – Adhezijske molekule stanica melanoma (od engl. *Melanoma Cell Adhesion Molecule*), BSG – Basigin (od engl. *Basigin*).

U analizi putova pomoću programa IPA u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u procesu EMT, istaknuli su se sljedeći proteini kao najznačajniji: MMP9, Notch, NFkB, SMAD3, MMP9, PLAT, Plasmin, MMP25, ETV4, MAP3K8, RhoA, RTKN, MYH9, MCAM, i BSG, FOXC2 te BCL2 (Slika 34) koji sudjeluje u procesu preživljenja stanica. SMAD3 je član proteinske obitelji SMAD koji je uključen u signalni put TGFβ. On djeluje kao transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena povezanih s različitim biološkim procesima, uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Ovaj protein ima ključnu ulogu u prijenosu signala od receptora TGFβ do jezgre, gdje utječe na transkripciju ciljnih gena. MMP9 (metaloproteinaza matriksa 9) je enzim koji je odgovoran za razgradnju izvanstaničnog matriksa. MMP9 igra važnu ulogu u procesima kao što su remodeliranje tkiva, angiogeneza i metastaziranje. Ovaj enzim omogućava stanicama da se kreću kroz izvanstanični matriks, što

je ključno za procese poput rasta tumora i formiranja novih krvnih žila. PLAT (od engl. *Plasminogen aktivator tkivnog tipa*) je enzim koji je odgovoran za pretvaranje plazminogena u plazmin, ključni faktor je u procesima fibrinolize i razgradnje fibrina. PLAT ima važnu ulogu u regulaciji koagulacije krvi i rješavanju krvnih ugrušaka. Plazmin je enzim koji razgrađuje fibrin u krvnim ugrušcima i igra važnu ulogu u procesima poput fibrinolize i remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Plazmin omogućava normalno održavanje i popravak tkiva kroz razgradnju fibrina. MMP25 (od engl. *Matrix metaloproteinaza 25*) je enzim koji također sudjeluje u razgradnji izvanstaničnog matriksa i može biti povezan s procesima kao što su invazija stanica i metastaziranje. MMP25 omogućava stanicama da prelaze barijere izvanstaničnog matriksa, što je ključno za invaziju i širenje tumora. ETV4 je transkripcijski faktor koji je povezan s regulacijom gena uključenih u različite biološke procese, uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju i metastazu. ETV4 može utjecati na ekspresiju gena koji su ključni za razvoj i progresiju tumora. MAP3K8 je proteinska kinaza aktivirana mitogenom koja igra ulogu u putu prijenosa signala koji regulira staničnu proliferaciju, preživljavanje i upalne odgovore. MAP3K8 je važna za odgovor stanica na vanjske signale i može biti uključena u razvoj upalnih procesa i karcinogeneze. RhoA je mali GTP-vezujući protein koji regulira organizaciju aktinskog citoskeleta i sudjeluje u različitim staničnim procesima, uključujući staničnu migraciju i adheziju. RhoA ima ključnu ulogu u regulaciji promjena oblika stanica i njihove pokretljivosti. RTKN (od engl. *Rhotekin*) je protein koji regulira aktivnost Rho GTPaza i može biti uključen u regulaciju stanične migracije i invazije. RTKN sudjeluje u prenosu signala koji utječu na organizaciju citoskeleta i pokretljivost stanica. MYH9 (od engl. *Myosin heavy chain 9*) je protein koji čini dio miozinskog filamenata i igra važnu ulogu u kontrakciji mišićnih stanica. Također je važan za mehaničke aspekte stanične migracije i adhezije. MCAM (od engl. *Melanoma cell adhesion molecule*, adhezijska molekula stanica melanoma) je molekula na površini stanica koji je važan za staničnu adheziju i migraciju, te može biti povezana s invazivnim svojstvima stanica. MCAM ima ulogu u međustaničnoj komunikaciji i migraciji stanica. BSG (Basigin) je transmembranski protein koji je uključen u različite stanične procese, uključujući staničnu adheziju, migraciju i invaziju. BSG može igrati ulogu u progresiji tumora i metastaziranju, utječući na interakcije između stanica i njihovog mikrookruženja. Također, utjecaj na EMT ima i prijenos signala putem RHO A, specifičnije uloga integrina i kadherina.

## Prijenos signala putem RhoA

Prijenos signala putem RhoA (Slika 35), člana obitelji Rho GTPaza, igra ključnu ulogu u regulaciji različitih staničnih procesa, uključujući promjene u citoskeletu, staničnu adheziju, migraciju, proliferaciju i preživljavanje. Zbog svoje središnje uloge u regulaciji ovih procesa, RhoA je također povezan s razvojem i progresijom tumora. Prijenos signala putem RhoA je ključan za reorganizaciju aktinskog citoskeleta, što je važno za migraciju i invaziju tumorskih stanica. Aktivacija RhoA može potaknuti formiranje filopodija i lamelipodija, struktura koje omogućavaju stanicama da se kreću i prodiru u okolno tkivo, što je ključno za metastaziranje tumora. RhoA može promicati proliferaciju tumorskih stanica i njihovo preživljavanje putem različitih signalnih putova, uključujući MAPK/ERK i PI3K/AKT. Ovi putovi su ključni za rast tumora i otpornost na apoptozu (programiranu staničnu smrt).



**Slika 35.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways analysis*) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* gdje se može vidjeti promjenu u razini aktivacije pojedinih gena u prijenosu signala putem RHO A. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja

označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CDC42 – Kontrolni protein diobe staničnog ciklusa CDC42, (od engl. *Cell Division Control Protein 42*), RAC1 Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1 (od engl. *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*), WASL – Sindrom poput Wiskott-Aldrich Sindroma, (od engl. *Wiskott-Aldrich Syndrome-Like*), PAK – P21 aktivirana kinaza (od engl. *p21-Activated Kinase*, WAVE - Wiskott-Aldrich Sindrom Verprolin-Homologni proteini, od engleski *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Verprolin-Homologous*), ROCK – Rho-Povezana Kinaza (od engl. *Rho-associated Coiled-Coil Forming Kinase*) LIMK, LIM domenska kinaza (od engl. *LIM Domain Kinase*), ARP 2-3 – Protein 2/3 povezan aktinom (od engl. *Actin-related Protein 2/3*), ERM, Ezrin-Radixin-Moesin, (od engl. *Ezrin-Radixin-Moesin*), RHO – Rho GTPaza, (od engl. *Rho GTPase*), GTP – Gvanozin Trifosfat, (od engl. *Guanosine Triphosphate*).

Kao jedan od zajednički signalnih putova u sve tri stabilno utišane stanične linije izdvojio se Rho prijenos signala gdje se može vidjeti sniženu razinu kadherina i integrina te G proteina dok je povećana aktivnost ROCK kinaze, CDC42, i RAC1 (Slika 35). Povećana aktivnost kinaza kao što su ROCK kinaza, CDC42 i RAC1 može imati značajnu ulogu u tumorskim staničnim linijama, posebno u kontekstu migracije stanica. Ove kinaze su ključni regulatori reorganizacije aktinskog citoskeleta, što je temeljni proces u migraciji stanica. Njihova povećana aktivnost može dovesti do promjena u adheziji stanica, polaritetu, formiranju filopodija i lamelipodija, što su sve ključni aspekti migracije stanica. Nadalje, ROCK kinaze (Rho-povezane kinaze) su serin/treonin kinaze koje su direktno uključene u kontraktilnost aktina i miozina, što rezultira promjenama u obliku stanice i povećanom motilitetom. U tumorskim stanicama, povećana aktivnost ROCK kinaza može potaknuti invazivnost i metastaziranje tako što olakšava migraciju stanica kroz izvanstanični matriks. CDC42 (od engl. *Cell Division Control Protein 42*) je član Rho GTPaza obitelji koji djeluje kao molekularni prekidač u regulaciji različitih staničnih funkcija, uključujući reorganizaciju citoskeleta i formiranje filopodija. Povećana aktivnost CDC42 u tumorskim stanicama može potaknuti formiranje filopodija, što stanici omogućava "ispitivanje" okoline i usmjeravanje migracije. RAC1 (od engl. *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*) također je član obitelji Rho GTPaza i igra ključnu ulogu u formiranju lamelipodija, širokih, ravnih struktura na prednjoj strani migrirajuće stanice. Povećana aktivnost RAC1 može dovesti do povećane migracije stanica poticanjem formiranja lamelipodija i promicanjem polariteta stanica, što je ključno za usmjerenu migraciju. Povećana aktivnost ovih kinaza u tumorskim staničnim linijama može dovesti do povećane migracije i invazivnost. Značajno je snižena ekspresija kadherina 11, kadherina 12 i integrina 7. Snižena razina transkripcije gena koji kodiraju za kadherin 11, kadherin 12 i integrin 7 može značajno utjecati na povećanu razinu migracije tumorskih staničnih linija, s obzirom na važnu ulogu ovih

proteina u međustaničnoj adheziji i migraciji stanica. Kadherin 11 i kadherin 12 su transmembranski proteini koji igraju ključnu ulogu u međustaničnoj adheziji, omogućavajući stanicama da se povežu jedna s drugom i formiraju stabilne stanične strukture. Snižena ekspresija kadherina 11 i 12 rezultira smanjenjem njihove prisutnosti na površini stanica, što dovodi do oslabljene međustanične adhezije. Nedostatak ovih kadherina može uzrokovati smanjenu sposobnost stanica da se čvrsto povežu s okolnim stanicama, što olakšava njihovu migraciju i invaziju u okolna tkiva. Integrini su skupina transmembranskih proteina koji posreduju u interakciji stanica s izvanstaničnim matriksom. Osim toga integrin 7 je specifičan integrin koji igra važnu ulogu u regulaciji migracije stanica, posebno u kontekstu tumorskih stanica. Snižena ekspresija integrina 7 može dovesti do poremećaja u interakciji stanica s okolnim tkivom, što može potaknuti povećanu migraciju tumorskih stanica. Detaljan popis svih faktora koji sudjeluju u Rho prijenosu signala može se vidjeti u Tablici 6.

**Tablica 6.** Rezultati diferencijalne ekspresije gena u staničnoj liniji SW480 s utišanim genom *SAHH* u kontekstu prijenosa signala putem Rho GTPaza. Pripadajuće vrijednosti faktora povećanja (od engl. *Fold change, Expr Log Ratio*) navedene su za gene koji su ključni za ovaj signalni put.

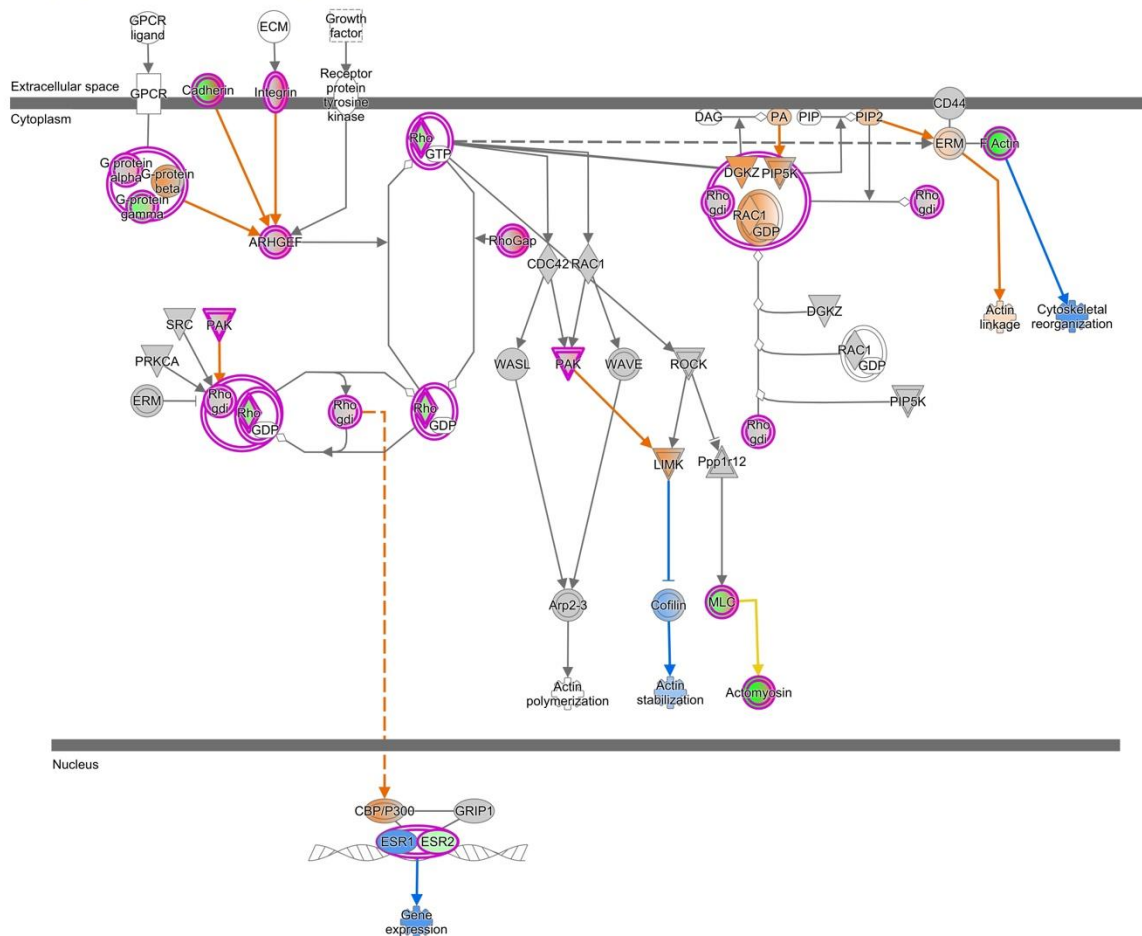
Simbol	Naziv gena	Faktor povećanja
ARHGDI3	od engl. <i>Rho GDP dissociation inhibitor beta</i> , Rho inhibitor beta za disocijaciju GDP-a	-0.574
ARHGEF3	od engl. <i>Rho guanine nucleotide exchange factor 3</i> , Rho faktor za razmjenu guanin nukleotida 3	0.678
ARHGEF6	od engl. <i>RacCdc42 guanine nucleotide exchange factor 6</i> , RacCdc42 faktor za razmjenu guanin nukleotida 6	-1.334
CDH11	od engl. <i>cadherin 11</i> , kadherin 11	-6.375
CDH12	od engl. <i>cadherin 12</i> , kadherin 12	-8.596
CDH13	od engl. <i>cadherin 13</i> , kadherin 13	0.956
CDH24	od engl. <i>cadherin 24</i> , kadherin 24	0.502
DIRAS3	od engl. <i>DIRAS family GTPase 3</i> , DIRAS obitelj GTPaza 3	3.131

DLC1	od engl. <i>DLC1 Rho GTPase activating protein</i> , DLC1 aktivirajući protein za Rho GTPazu	-0.572
GNAL	od engl. <i>G protein subunit alpha L</i> , G proteinska podjedinica alfa L	0.947
GNAZ	od engl. <i>G protein subunit alpha z</i> , G proteinska podjedinica alfa z	-0.649
GNG11	od engl. <i>G protein subunit gamma 11</i> , G proteinska podjedinica gama 11	-1.581
GRIP1	od engl. <i>Glutamate receptor interacting protein 1</i> , protein koji interagira s glutamatnim receptorom 1	0.936
ITGA1	od engl. <i>integrin subunit alpha 1</i> , integrinska podjedinica alfa 1	-0.52
ITGA9	od engl. <i>integrin subunit alpha 9</i> , integrinska podjedinica alfa 9	2.204
ITGA10	od engl. <i>integrin subunit alpha 10</i> , integrinska podjedinica alfa 10	0.961
ITGA11	od engl. <i>integrin subunit alpha 11</i> , integrinska podjedinica alfa 11	0.622
ITGAX	od engl. <i>integrin subunit alpha X</i> , integrinska podjedinica alfa X	0.654
ITGB2	od engl. <i>integrin subunit beta 2</i> , integrinska podjedinica beta 2	1.271
ITGB7	od engl. <i>integrin subunit beta 7</i> , integrinska podjedinica beta 7	-2.437
ITGB8	od engl. <i>integrin subunit beta 8</i> , integrinska podjedinica beta 8	0.56
MRAS	od engl. <i>muscle RAS oncogene homolog</i> , homolog onkogeni RAS u mišićima	-0.815
MYH3	od engl. <i>myosin heavy chain 3</i> , teški lanac miozina 3	-0.613
MYH14	od engl. <i>myosin heavy chain 14</i> , teški	-0.577



	lanac miozina 14	
MYL3	od engl. <i>myosin light chain 3</i> , laki lanac	0.839
	miozina 3	
MYL11	od engl. <i>myosin light chain 11</i> , laki lanac	1.469
	miozina 11	
RAC2	od engl. <i>Rac family small GTPase 2</i> , Rac	0.635
	obitelj malih GTPaza 2	
RHOQ	od engl. <i>ras homolog family member Q</i> ,	0.753
	član obitelji ras homologa Q	
RHOU	od engl. <i>ras homolog family member U</i> ,	0.799
	član obitelji ras homologa U	
RHOV	od engl. <i>ras homolog family member V</i> ,	0.621
	član obitelji ras homologa V	
RND1	od engl. <i>Rho family GTPase 1</i> , Rho obitelj	-0.696
	GTPaza 1	
RND3	od engl. <i>Rho family GTPase 3</i> , Rho obitelj	0.508
	GTPaza 3	

Iz rezultata (Tablica 6) jasno je vidljivo da su geni *CDH11* i *CDH12* izdvojeni kao nositelji najznačajnijih promjena u ovom prijenosu staničnog signala putem RhoA GTPaza s najvećim faktorom povećanja ekspresije gena (od engl. *Fold change*). Ovaj podatak upućuje na njihovu ključnu ulogu u regulaciji prijenosa signala Rho i ukazuje na njihov potencijalni doprinos staničnoj migraciji i invaziji u ovom kontekstu. Detaljnija analiza ovih gena može pružiti dublje razumijevanje njihove uloge u staničnoj dinamici i biološkim procesima povezanim s invazivnošću tumorskih stanica. Pojedini geni koji su zajednički u navedenom prijenosu signala u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* također sudjeluju i u drugim staničnim ulogama kao što je stanično pokretanje i migracija tumorskih stanica.



© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

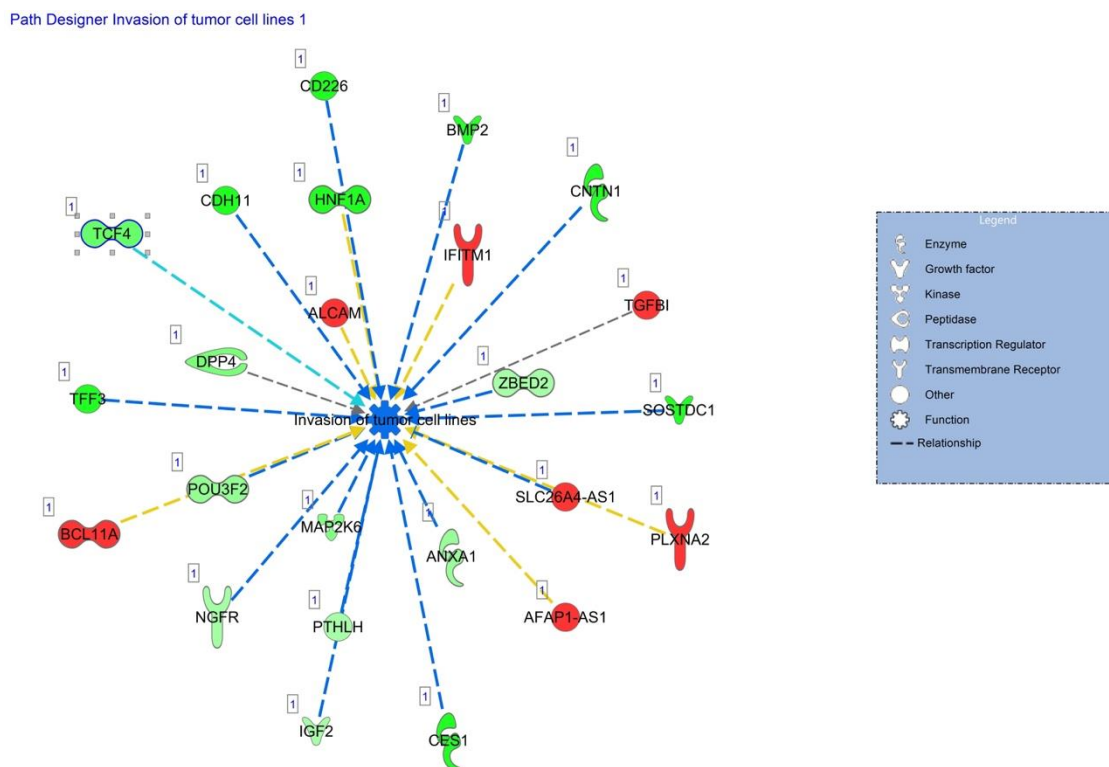
**Slika 36.** Rezultati analize putova (*Pathways analysis*) u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* gdje se može vidjeti promjenu u razini aktivacije pojedinih gena u prijenosu signala putem RhoA. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CDC42 – Kontrolni protein diobe staničnog ciklusa CDC42, (od engl. *Cell Division Control Protein 42*), RAC1 – Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1 (od engl. *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*), WASL – Sindrom poput Wiskott-Aldrich Sindrom (od engl. *Wiskott-Aldrich Syndrome-Like*), PAK – P21 aktivirana kinaza (od engl. *p21-Activated Kinase*), WAVE – Wiskott-Aldrich Sindrom Verpolin-homologni proteini, (od engleski *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Verprolin-Homologous*), ROCK – Rho-povezana kinaza (od engl. *Rho-associated Coiled-Coil Forming Kinase*), LIMK, LIM Domenska Kinaza (od engl. *LIM Domain Kinase*), ARP 2-3 – Protein 2/3 povezan s aktinom (od engl. *Actin-related Protein 2/3*), ERM, Ezrin-Radixin-Moesin (od engl. *Ezrin-Radixin-Moesin*), RHO – Rho GTPaza (od engl. *Rho GTPase*), GTP – Gvanozin trifosfat (od engl. *Guanosine Triphosphate*).

Kao jedan od zajednički signalnih putova u sve tri stanične linije izdvojio se Rho prijenos signala (Slika 35, Slika 36) gdje se može vidjeti sniženu razinu kadherina i integrina te G-proteina. Povećana aktivnost RAC1 zabilježena je u staničnoj liniji HEK293T s utišanom

ekspresijom gena *SAHH* kao i u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Također, značajno je snižena razina ekspresije za kadherin 11, kadherin 12 i integrin 7 kao i u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* kao i u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.

### Stanično pokretanje i invazivnost tumorskih stanica u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*

Nakon provođenja eksperimenta sekvenciranja RNA (od engl. *RNA seq*) i detaljne analize diferencijalne ekspresije gena, otkriveni su značajni rezultate koji bacaju novo svjetlo na mehanizme migracije tumorskih stanica. U staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, detektirali smo veliki broj gena koji su diferencijalno ekspimirani (Slika 37). Ovi geni igraju ključne uloge u procesima migracije i invazije, što ukazuje na to da *SAHH*-a može imati značajnu ulogu u regulaciji ovih staničnih funkcija.

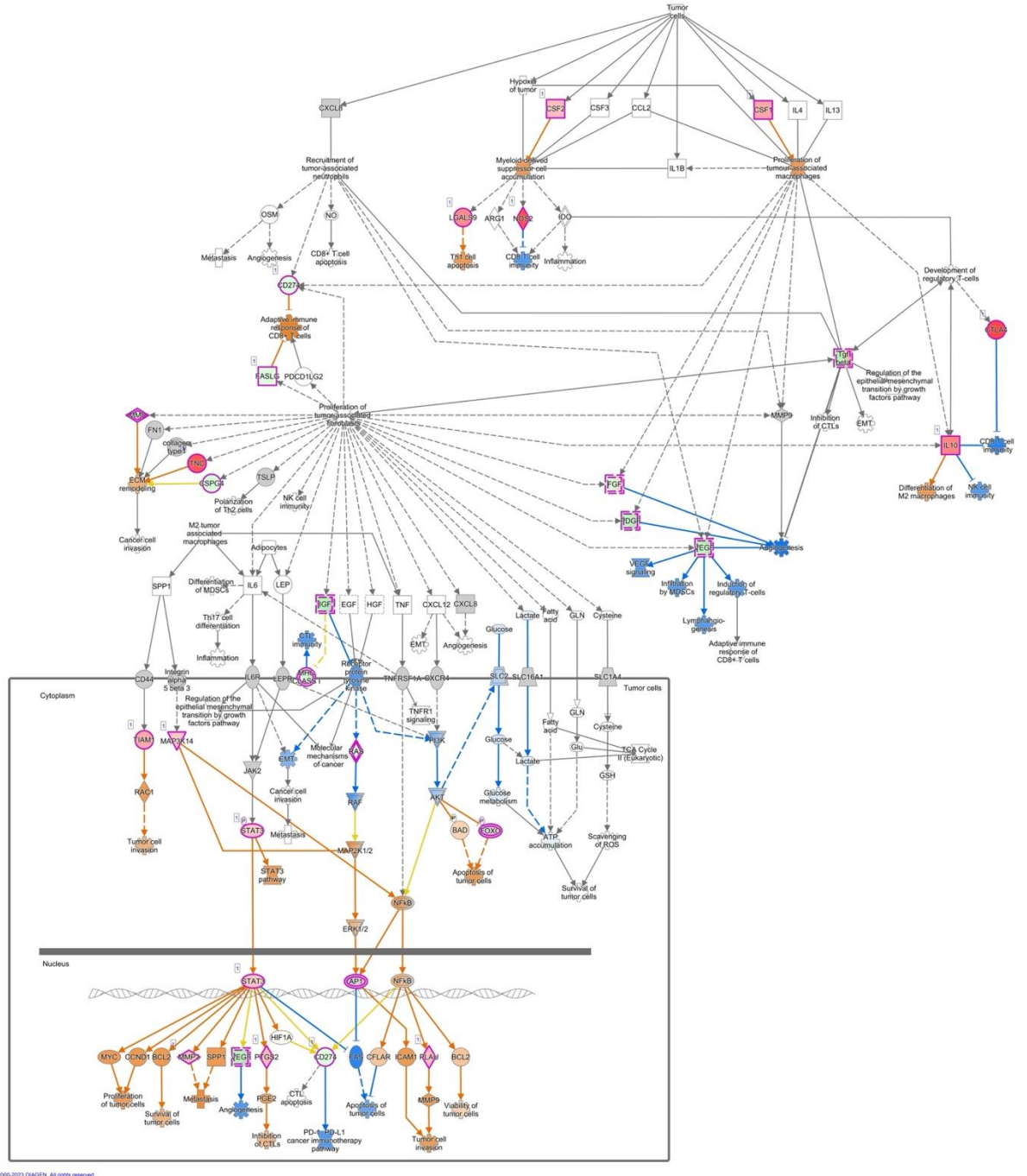


S © 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 37.** Grafički prikaz rezultata diferencijalne ekspresije gena uz pomoć programa IPA koji prikazuje promjenjenje razine ekspresije gena u staničnim linijama MCF7 i SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Prikazane su molekule koje sudjeluju u procesu invazije tumorskih stanica. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Plava boja označava smanjenu aktivnost, a narančasta boja označava

pojačanu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: TGFBI – Transformirajući faktor rasta beta (od engl. *Transforming Growth Factor Beta Induced*), ALCAM - Aktivirana stanična molekula adhezije (od engl. *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*), IFITM1 – Interferonom inducirani transmembranski protein 1 (od engl. *Interferon-Induced Transmembrane Protein 1*), PLXNA2 – Pleksin A2 (od engl. *Plexin A2*), TCF4 – Transkripcijski faktor TCF4 (od engl. *Transcription Factor 4*), CDH1 - E-kadherin (od engl. *E-Cadherin*), NGFR – Receptor neuronalnog faktora rasta (od engl. *Nerve Growth Factor Receptor*), BMP2 – Koštani morfogenetski protein 2 (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 2*), CD226 – Klusterska diferencijacija 226 (od engl. *Cluster of Differentiation 226*).

Može se vidjeti da je povećana ekspresije gena *TGFBI*, *ALCAM*, *IFITM1*, *PLXNA2* nakon diferencijalne ekspresije gena u IPA programu u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* dok je snižena razina ekspresije gena *TCF4*, *CDH1*, *NGFR*, *BMP2*, *CD226* (Slika 37). Osim gena koji pojedinačno imaju ulogu u staničnoj invaziji i migraciji (Slika 37) kao zajednički signalni put u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* izdvojio se Prijenos signala mikro-okoline tumora u kojem STAT3 ima važnu ulogu (Slika 38).

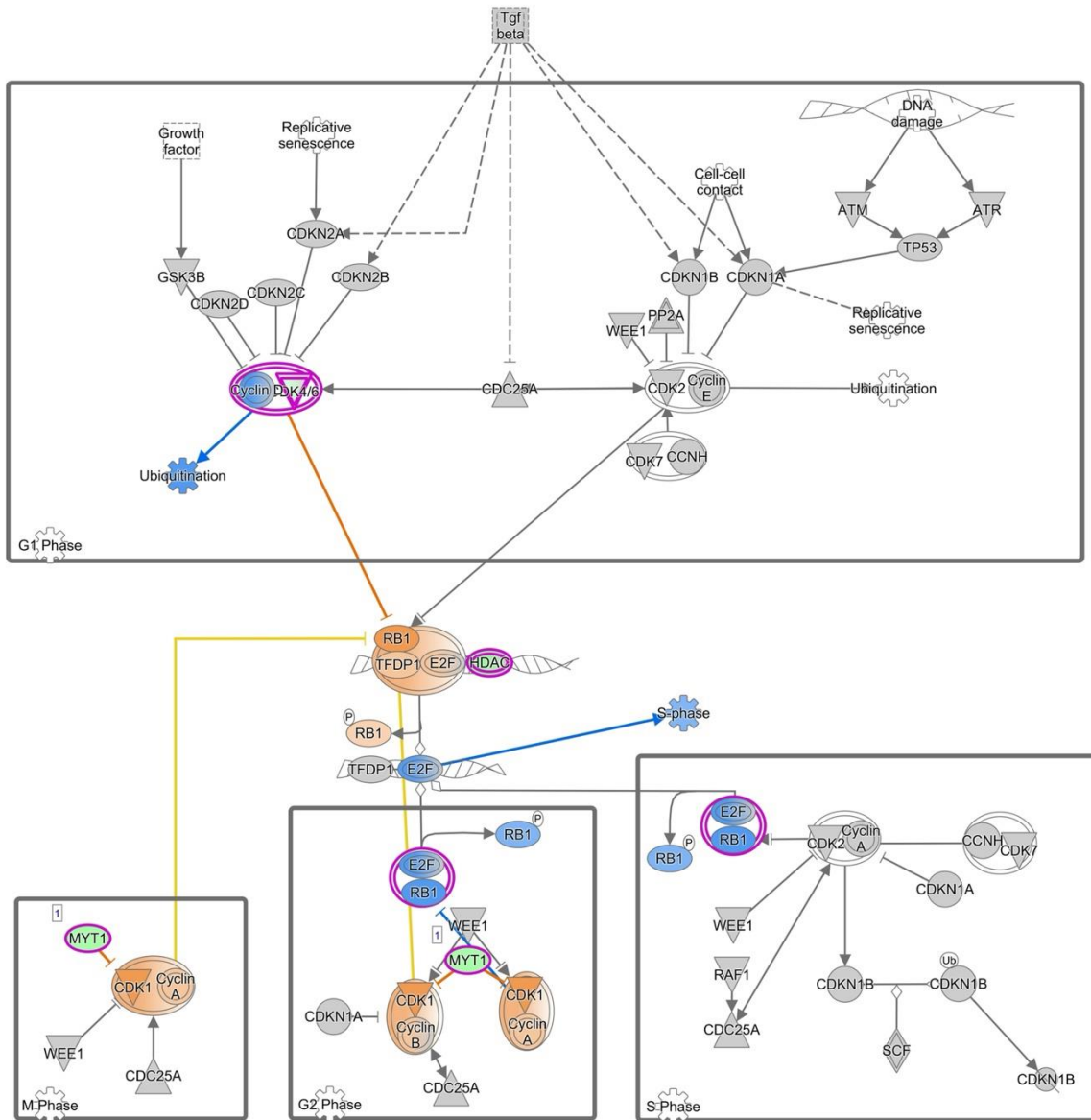


© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 38.** Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih staničnih putova u procesu prijenosa signala putem mikro-okoline tumora dobivenih analizom signalnih putova (od engl. *Pathway Analysis*) uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije. Plava boja označava smanjenu aktivnost. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objasnjenje kratica i simbola: MYC - MYC proto-onkogen, bHLH transkripcijski faktor / od engl. *MYC proto-oncogene*, bHLH transcription factor, CCND1 - Ciklin D1 / od engl. *Cyclin D1*, BCL2 - B-stanični limfom 2 / od engl. *B-cell lymphoma 2*, SPP1 - Sekretirani fosfoprotein 1, osteopontin / od engl. *Secreted phosphoprotein 1*, osteopontin, PTGS2 - Prostaglandin-endoperoksid sintaza 2,

ciklooksigenaza-2 (COX-2) / od engl. *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, cyclooxygenase-2* (COX-2) 6PGE2 - Prostaglandin E2, RAC1 - Ras-sličan C3 botulinum toksin substrat 1 / od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, STAT3 - Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 / od engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*, MMP9 - Matriks metalopeptidaza 9 / od engl. *Matrix metalloproteinase 9*, ICAM1 - Međustanična adhezijska molekula 1 / od engl. *Intercellular adhesion molecule 1*, TIAM1 - T-limfocitni invazivni i metastatski 1 / T-lymphoma invasion and metastasis 1, MAP2K14 - Mitogenom aktivirana protein kinaza kinaza 14 / od engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase 14*, 1CFLAR - CASP8 i FADD- regulator sličan apoptozi / od engl. *CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*, ERK 1/2 - Izvanstaničnim signalom regulirana kinaza 1/2 / od engl. *Extracellular signal-regulated kinases 1/2*, MAP2K 1/2 - Mitogen-aktivirana protein kinaza kinaza 1/2 / od engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2*, BAD - BCL2 antagonist stanične smrti / od engl. *BCL2 antagonist of cell death*.

Rezultati (Slika 38) ove analize jasno ukazuju na povećanu aktivaciju ključnih komponenti ovog puta, uključujući povećanu razinu gena poput *MYC*, *CCND1*, *BCL2*, *SP1*, *STAT3*, *SPPI*, *PGE2*, *ICAM1*, *NFκB*, *MMP9*, *ERK1/2*, *BAD* i *RAC1*. Ovaj put signalizacije igra ključnu ulogu u reguliranju rasta, preživljavanja i migracije tumorskih stanica. Povećana razina gena poput *MYC*, *CCND1* i *BCL2* sugerira intenzivnu proliferaciju stanica, dok prisutnost gena kao što su *SP1*, *STAT3*, *SPPI*, *PGE2*, *ICAM1* i *NFκB* ukazuje na aktivaciju upalnih procesa i procesa odgovornih za preživljavanje. Uz to, prisutnost faktora kao što je *MMP9* ukazuje na pojačanu aktivnost razgradnje izvanstaničnog matriksa, što može potaknuti invaziju tumorskih stanica u okolna tkiva. Povećana aktivnost proteina kao što su *ERK1/2*, *BAD* i *RAC1* dodatno sugerira visoku razinu signalizacije koja potiče preživljavanje, migraciju i invaziju stanica. Naposljetku, istaknuta je i povećana aktivnost remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Ovo ukazuje na promjene u strukturi i kompoziciji okolnog staničnog okruženja koje podržava rast i invaziju tumora. Svi ovi elementi zajedno čine kompleksnu mrežu interakcija unutar mikrookoline tumora, naglašavajući važnost ovog signalnog puta u procesima povezanim s progresijom tumora. Dodatno sam *STAT3* signalni put također se izdvojio kao zajednički u staničnoj liniji MCF7 i SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Signalni put *STAT3* (od engl. *Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3*) ima važnu ulogu u tumorskim stanicama. U normalnim stanicama, *STAT3* aktivira se samo privremeno u odgovoru na vanjske signale, ali u tumorskim stanicama *STAT3* može biti stalno aktiviran što dovodi do promjena u procesima koji reguliraju rast, preživljavanje i invaziju stanica. Aktivacija *STAT3* u tumorskim stanicama potiče ekspresiju gena koji potiču proliferaciju, inhibiraju apoptozu i potiču angiogenezu.



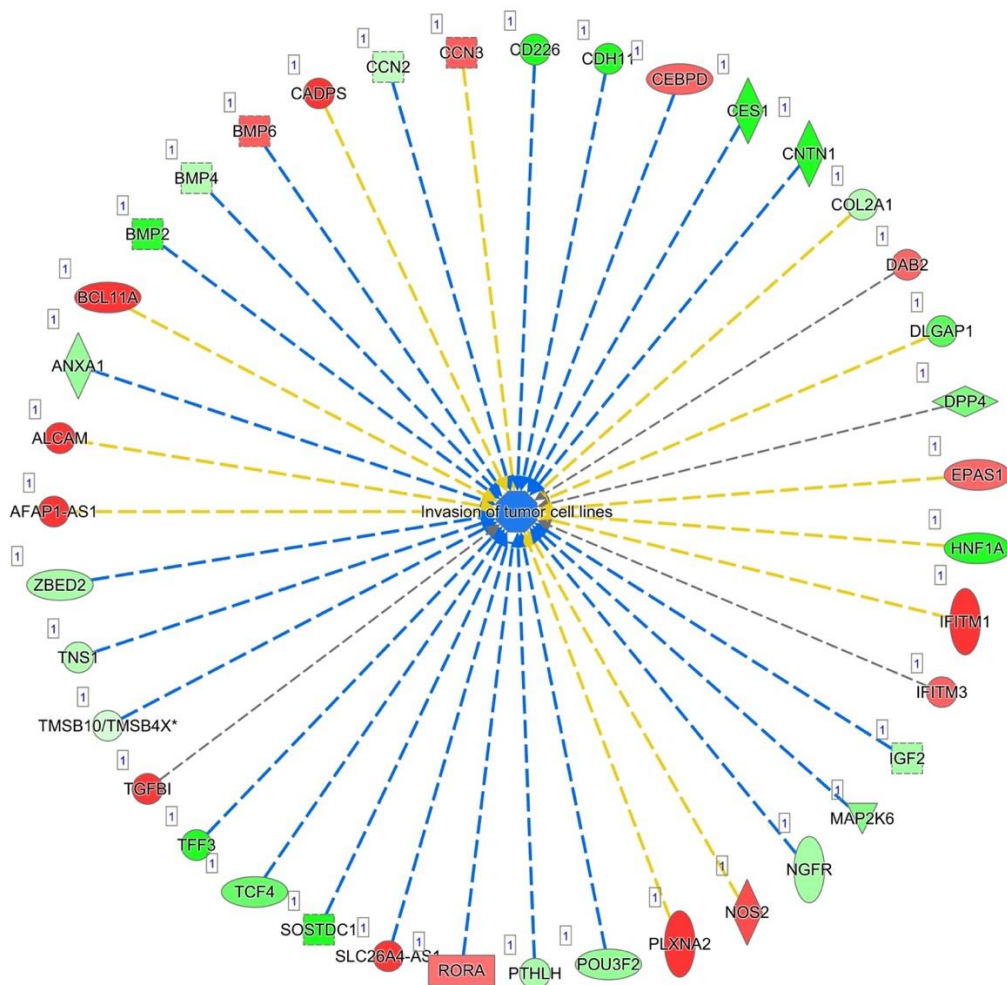
© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 39.** Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih staničnih putova u procesu Regulacije staničnog ciklusa i regulacije ciklina dobivenih analizom signalnih putova (od engl. *Pathway Analysis*) uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objašnjenje kratica i simbola: RB1 - Retinoblastom 1 gen / od engl. *Retinoblastoma 1 gene*, E2F - Transkripcijski faktor E2F / od engl. *Transcription factor E2F*, TFDP1 - Transkripcijski faktor DP-1 / od engl. *Transcription factor DP-1*, CDK1 - Ciklin-ovisna kinaza 1 / od engl. *Cyclin-dependent kinase 1*, od engl. *CYCLIN A* - Ciklin A, MYT1 - Membranska protein kinaza tipa 1 / od engl. *Membrane-type 1 protein kinase*, od engl. *CYCLIN B* - Ciklin B, HDAC - Histonska deacetilaza / od engl. *Histone deacetylase*.

Ovi geni (Slika 39), proteini i enzimi su ključni u regulaciji staničnog ciklusa, kontroliranju

stanične proliferacije i diferencijacije te održavanju genomske stabilnosti. Njihova disfunkcija može dovesti do nekontrolirane stanične diobe i razvoja bolesti poput tumora. *RB1* gen je tumorsupresorski gen koji igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i inhibiciji nekontrolirane stanične proliferacije. Enzim HDAC regulira epigenetske promjene u kromatinu deacetilacijom histonskih proteina, što može utjecati na ekspresiju gena. Ciklin B je proteinski partner CDK1 koji igra ključnu ulogu u prijelazu iz G2 faze u mitozu. MYT1 je kinaza koja inhibira aktivnost CDK1 i regulira prijelaz iz G2 faze u mitozu. Ciklin A je proteinski partner CDK1 koji regulira njegovu aktivnost tijekom staničnog ciklusa. Također, CDK1 je enzim koji regulira progresiju staničnog ciklusa i kontrolira prijelaz iz G2 faze u mitozu. Uz to TFDP1 je transkripcijski faktor koji zajedno s E2F regulira ekspresiju gena u staničnom ciklusu. Nadalje, E2F je obitelj transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju gena uključenih u stanični ciklus, apoptozu i diferencijaciju. Osim toga, gen *RB1* je tumorsupresorski gen koji igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i inhibiciji nekontrolirane stanične proliferacije. STAT3 igra ključnu ulogu u regulaciji samoodržavanja i proliferacije embrionalnih matičnih stanica (EMSC). Slika 39 ilustrira uključenost STAT3 u održavanje pluripotentnog stanja EMSC te poticanje njihove proliferacije, ističući ključne efektore nizvodno i signalne putove. Može se vidjeti povećana aktivaciju ciklina A, ciklina B, ciklin ovisne kinaze 1, RB1, E2F, TFDP1.



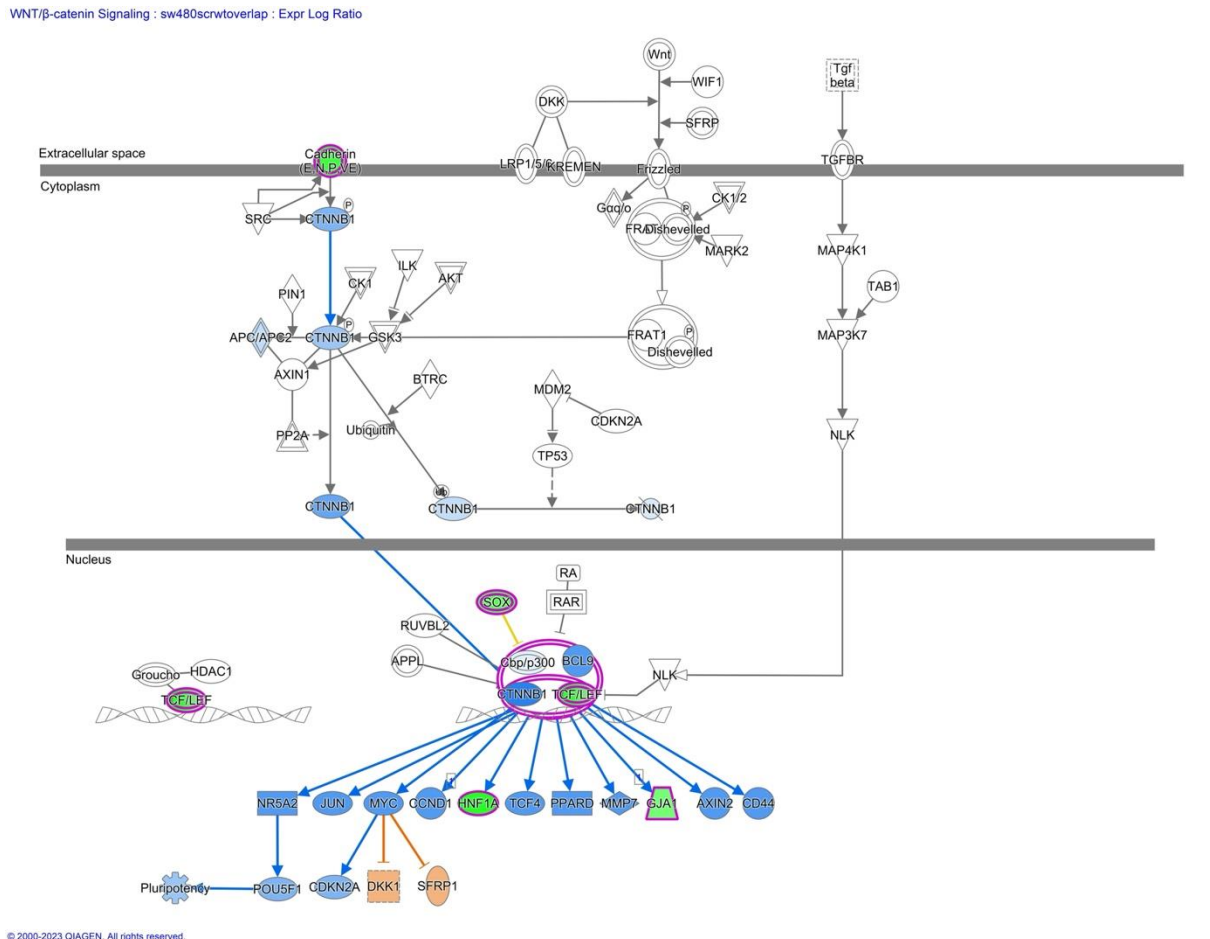


© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 40.** Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih staničnih gena dobivenih analizom signalnih putova u procesu invazije staničnih linija tumora (od engl. *Pathway Analysis*) uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Objašnjenje kratica i simbola: TGFβ1 – Transformirajući faktor rasta beta 1 (od engl. *Transforming Growth Factor Beta 1*) RORA – od engl. *RAR-related orphan receptor A*, RAR povezani receptor A, DAB2 – od engl. *Disabled homolog 2* (DAB2), također poznat kao Disabled-2 protein koji kodira gen DAB2. Igra ulogu u endocitozi i signalnim putovima., BMP6 – Koštani morfogenetSKI protein 6 (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 6*), NOS2 - Sintaza dušikovog monoksida 2 (od engl. *Nitric Oxide Synthase 2*), PLXNA2 – Pleksin B2 (od engl. *Plexin B2*), CADPS – Aktivator sekrecije proteina ovisan o kalciju (od engl. *Calcium-Dependent Secretion Activator*).

Analiza diferencijalne ekspresije gena u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* otkrila je značajne promjene u genima povezanim s invazijom tumorskih stanica.

*TGFβ1*, *RORA*, *DAB2*, *BMP6*, *NOS2*, *PLXN2* i *CADPS* pokazali su značajnu povećanu ekspresiju, dok su *TCF4* i *SAHH* (Slika 41) značajno smanjeni. Analiza srži (od engl. *Core analysis*) je provedena u programu IPA uz strogo definirane parametre, uključujući raspon faktora povećanja (logaritamskih od engl. *Fold change*) od -0.5 do 0.5. Rezultat te analize jasno ističe prijenos signala Wnt kao zajednički signalni put koji se izdvaja među promijenjenim genima u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.



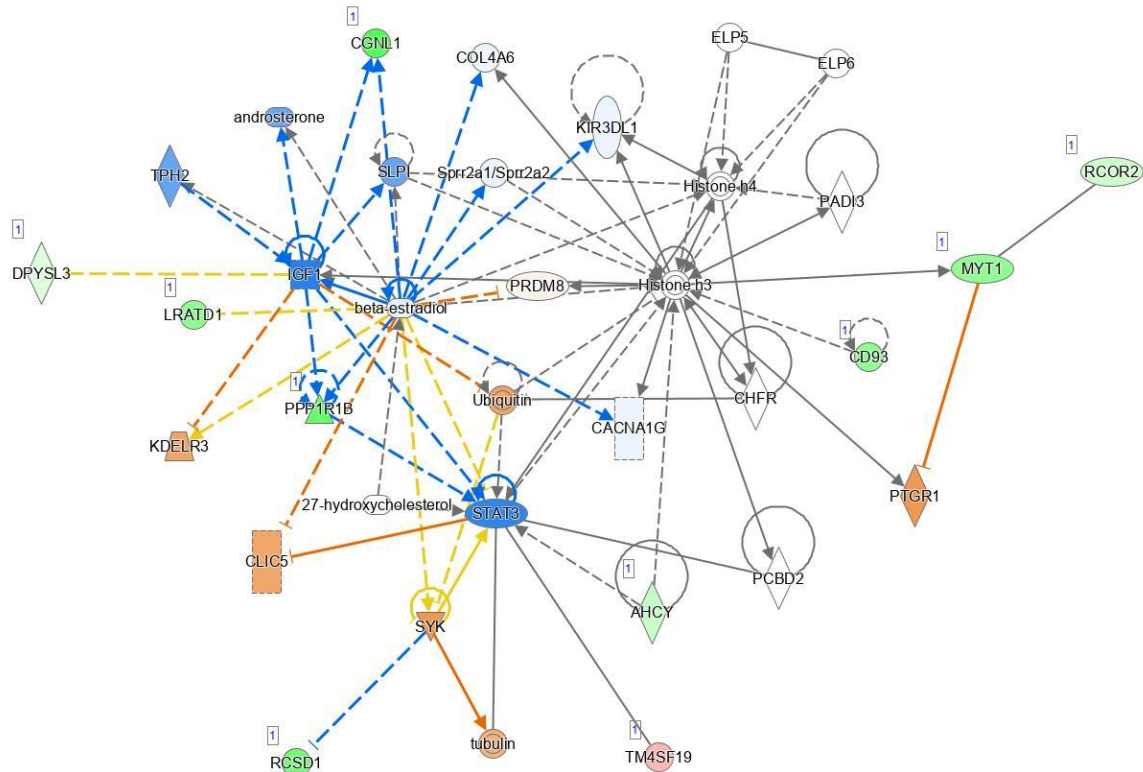
**Slika 41.** Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova dobivenih analizom signalnih putova (od engl. *Pathway Analysis*) i analizom srži (od engl. *Core analysis*) uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Prijenos signala putem WNT – β katenin izdvojio se kao diferencijalno eksprimirani u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Zelena boja označava sniženu razinu transkripta. Puna linija označava direktnu interakciju između molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula. Analiza je provedena uz strogo definirane parametre, uključujući raspon faktora povećanja (logaritamskih od engl. *Fold change*) od -0.5 do 0.5. Objašnjenje kratica i simbola: APC2 – Adenomatous Polyposis Coli 2 (od engl. *Adenomatous Polyposis Coli 2*), CDH12 - Kaderin 12 (od engl. *Cadherin 12*), DKK1 - Dickkopf 1, 4. DKK3 – od engl- *Dickkopf 3*, DKK4 – Dickkopf 4, FZD7 – od engl. *Frizzled 7*, GJA1 – od engl. *Gap Junction Protein Alpha 1* (Protein alfa 1 pukotinskih spojeva),

HNF1A – Hepatocitni nuklearni faktor 1 alfa (od engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha*), POU5F1 – POU Transkripcijski faktor 1 POU domena, razred 5 (od engl. *POU Domain Class 5 Transcription Factor 1*), RARB – Receptor beta retinoične kiseline (od engl. *Retinoic Acid Receptor Beta*), SFRP5 – od engl. *Secreted Frizzled-Related Protein 5* (Izlučeni frizzled-srodni protein 5), SOX5 – Transkripcijski faktor SOX5, (od engl. *SRY-Box Transcription Factor 5*), SOX6 – od engl. *SRY-Box Transcription Factor 6* – SOX6 transkripcijski faktor, TCF4 - Transkripcijski faktor 4 (od engl. *Transcription Factor 4*), TLE1 – Protein 1 sličan transducinu (od engl. *Transducin-Like Enhancer Protein 1*), TLE4 – Protein 4 sličan transducinu (od engl. *Transducin-Like Enhancer Protein 4*), WNT6 – član obitelji Wingless-MMTV integracijsko mjesto 6 (od engl. *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 6*).

Primjećujemo da neki geni pokazuju značajne promjene u ekspresiji, pri čemu su *CDH12* i *HNF1A* istaknuti s najvećom vrijednošću faktora povećanja. Ovi rezultati sugeriraju da bi *CDH12* i *HNF1A* mogli imati ključnu ulogu u regulaciji prijenosa signala putem Wnt-a u kontekstu smanjene ekspresije *SAHH*. Ovi geni (Tablica 7), proteini i faktori transkripcije igraju važne uloge u različitim biološkim procesima kao što su razvoj, diferencijacija stanica, prijenos signala i regulacija gena. Njihova disfunkcija može biti povezana s različitim bolestima i stanjima.

**Tablica 7.** Rezultati diferencijalne ekspresije gena u prijenosu signala putem Wnt, dobiveni uz pomoć analize putova, analize srži i analize kanonskih putova funkcija (od engl. *Pathways analysis, Core analysis, Canonical Pathways Analysis*) i programa IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.

Simbol	Naziv gena	Ensembl	Faktor povećanja
APC2	Od engl. <i>APC regulator of WNT signaling pathway 2</i> , APC regulator prijenosa signala WNT 2	ENSG00000115266.7	3,428
CDH12	Od engl. <i>cadherin 12</i> , kadherin 12	ENSG00000154162.9	-11,706
DKK1	Od engl. <i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> , DKK1 inhibitor prijenosa signala Wnt	ENSG00000107984.5	-3,416
DKK3	Od engl. <i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3</i>	ENSG00000050165.13	3,316
DKK4	DKK4 inhibitor prijenosa signala Wnt	ENSG00000104371.4	-3,791
FZD7	Od engl. <i>Frizzled class receptor 7</i> , receptor 7	ENSG00000155760.1	4,134
GJA1	Od engl. <i>Gap junction protein alpha 1</i> , protein alpha 1 pukotinskih spojeva	ENSG00000152661.7	-5,544
HNF1A	Od engl. <i>HNF1 homeobox A</i> , HNF1 homeobox A	ENSG00000135100.13	-13,408
POU5F1	Od engl. <i>POU class 5 homeobox 1</i> , POU homeobox 1	ENSG00000204531.11	-5,964
RARB	<i>retinoic acid receptor beta</i> , receptor beta retionične kiseline	ENSG00000077092.14	-7,753
SFRP5	Od engl. <i>Secreted frizzled related protein 5</i>	ENSG00000120057.4	3,362
SOX5	Protein 5 povezan s <i>frizzled</i> receptorom	ENSG00000134532.11	-8,898
SOX6	Od engl. <i>SRY-box transcription factor 5</i>	ENSG00000110693.11	-3,842
TCF4	SRY transkripcijski faktor 6	ENSG00000196628.9	-3,915
TLE1	Od engl. <i>Transcription factor 4</i> , transkripcijski faktor 4	ENSG00000196781.9	4,455
TLE4	Od engl. <i>TLE family member 1, transcriptional corepressor, TLE 1</i> korepresor	ENSG00000106829.14	4,145
WNT6	Od engl. <i>TLE family member 4, transcriptional corepressor</i> , transkripcijski korepresor TLE4	ENSG00000115596.3	4,078
	Od engl. <i>Wnt family member 6, član Wnt 6 proteina</i>		



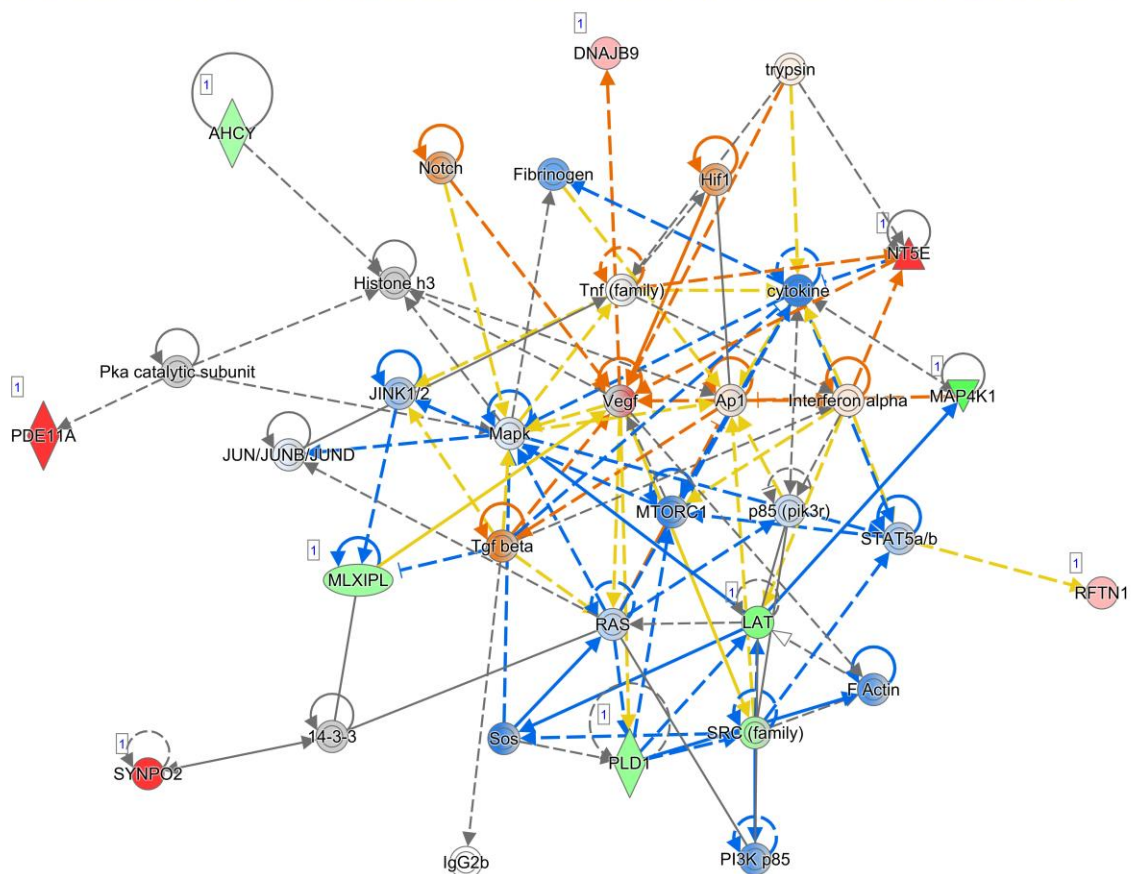
© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 42.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways Analysis*) i analize srži (od engl. *Core analysis*) napravljeni u programu IPA u staničnim liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Ova signalna mreža prikazuje molekule koje su u direktnoj i indirektnoj interakciji sa *SAHH*-a u utišanoj staničnoj liniji SW480 u usporedbi s kontrolom staničnom linijom. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Isprekidana linija označava indirektnu interakciju, dok puna linija označava direktnu interakciju. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: *STAT3* – Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), od engl. *HISTONE H3* – histon H3, od engl. *HISTONE H4* – histon H4, *TM4SF19* – Transmembranski protein 4 L šest, član obitelji 19 (od engl. *Transmembrane 4 L Six Family Member 19*), *CD93* Molekula – *CD93*, *MYT1* - tirozin/treoninska protein kinaza 1 povezana s membranom (od engl. *Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1*), *RCS1* – od engl. *RCS1 Domain Containing 1* je protein koji ima ulogu u vezanju filamenata aktina.

Najznačajniji geni dobiveni analizom putova uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (Slika 42) su: *SAHH*, *STAT3* - Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), *HISTONE H3*, *HISTONE H4*, *TM4SF19* - Transmembranski 4 L šest protein član obitelji 19 (od engl. *Transmembrane 4 L Six Family Member 19*), *CD93* Molekula *CD93*, *MYT1* - Tirozin/treoninska protein kinaza 1 povezana s membranom (od engl. *Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1*), *RCS1* - Regulator cappinga 1, Regulator domene za stanično signaliziranje (od engl. *CAPER, Regulator of Cellular Signaling Domain 1*).

STAT3 - Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) je protein koji djeluje kao transkripcijski faktor, igrajući važnu ulogu u mnogim staničnim funkcijama kao što su rast, preživljavanje i diferencijacija. Histonski protein H3 jedan je od pet glavnih histonskih proteina koji zajedno s H2A, H2B, H4, i H1, čini strukturu nukleosoma, osnovne jedinice kromatina, i igra ključnu ulogu u regulaciji gena. Histon H4 je jedan od glavnih histonskih proteina koji sudjeluje u strukturi nukleosoma i igra važnu ulogu u pakiranju DNA i regulaciji gena. Protein TM4SF19 pripada obitelji transmembranskih 4 L šest proteina, ali specifična funkcija ovog proteina može varirati i trenutno nije široko poznata ili dobro dokumentirana. Molekula CD93 je glikoprotein koji se nalazi na površini stanica i igra ulogu u različitim imunološkim procesima, uključujući fagocitozu i upalu. Tirozin/treoninska protein kinaza 1 povezana s membranom (od engl. *Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1*) je kinaza koja sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, posebno u inhibiciji prijelaza iz G2 faze u mitozu. Protein RCSD1- RCSD ima ulogu u vezanju filamenata aktina.

Network 12 : MCF7.WT.vs.AHCY(-1.5,1.5,0.05) - 2022-03-28 01:01 PM : MCF7.WT.vs.AHCY : MCF7.WT.vs.AHCY(-1.5,1.5,0.05) - 2022-03-28 01:01 PM



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 43.** Rezultati analize putova (od engl. *Pathways Analysis*) i analize srži (od engl. *Core analysis*) napravljeni u programu IPA u staničnim liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Ova signalna mreža prikazuje molekule koje su u direktnoj i indirektnoj interakcije s

SAHH-a u utišanoj staničnoj liniji SW480 u usporedbi s kontrolom staničnom linijom. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Isprekidana linija označava indirektnu interakciju, dok puna linija označava direktnu interakciju. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: PDE11A - Fosfodiesteraza 11A (od engl. *Phosphodiesterase 11A*), SYNPO2 - Sinaptopodin 2, NOTCH - signalni put Notch, RFTN1 - Raftlin 1, NT5E - 5'-nukleotidaza, ektocitoplazmatska (od engl. *Ecto-5'-nucleotidase*, TGF BETA, DNAJB9 - DnaJ (Hsp40) homolog, subobitelj B, član 9, Histonski protein H3 (od engl. *HISTONE H3*), AP1 - Aktivacijski protein 1 (od engl. *Activator Protein 1*), INTERFERON ALPHA - Interferon alfa, HIF1- Hipoksija-inducibilni faktor 1 (od engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1*), FIBRINOGEN - Fibrinogen, TRYPsin - Tripsin.

Najznačajniji geni dobiveni analizom putova uz pomoć programa IPA u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena SAHH (Slika 43) su: *PDE11A*, *SYNPO2*, *HIF1*, *Fibrinogen*, *Interferon alfa*, *AP1*, *Histon H3*, *DNAJB9*, *TGF beta*, *NT5E* - 5'-nukleotidaza, ektocitoplazmatska, *VEGF*, *RFTN1*, interferon alfa, DNAJB9 - DnaJ (Hsp40) homolog, AP1. Fosfodiesteraza 11A (*PDE11A*, od engl. *Phosphodiesterase 11A*) je enzim koji sudjeluje u razgradnji cikličnih nukleotida unutar stanica, igrajući ulogu u signalnim putovima koji reguliraju različite stanične funkcije. Sinaptopodin je protein koji igra ulogu u organizaciji aktinskog citoskeleta, posebno u područjima kao što su dendritičke bodlje neurona, što je važno za sinaptičku plastičnost i funkciju. Signalni put Notch je ključni signalni put u mnogim vrstama stanica koji regulira staničnu diferencijaciju, proliferaciju i sudbinu. NOTCH se odnosi na obitelj transmembranskih receptora koji sudjeluju u ovom putu. RFTN1 je protein koji igra ulogu u organizaciji lipidnih splavova (od engl. *rafts*) na staničnoj membrani, što može utjecati na signalizaciju i transport unutar stanice. Enzim koji sudjeluje u metabolizmu nukleotida je NT5E - 5'-nukleotidaza, ektocitoplazmatska (od engl. *Ecto-5'-nucleotidase*), posebno u pretvaranju ekstracelularnog AMP u adenzin, što ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora i upale. Vaskularni endotelni faktor rasta (*VEGF*, od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) je ključni signalni protein koji potiče rast i formiranje krvnih žila (angiogeneza), važan u procesima kao što su razvoj tkiva i zacjeljivanje rana. Transformirajući faktor rasta beta (*TGFβ*, od engl. *Transforming Growth Factor Beta*) je velika obitelj signalnih molekula koje imaju ključne uloge u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije, apoptoze i drugih funkcija. DNAJB9 je protein koji pomaže u pravilnom sklapanju drugih proteina i odgovoru na stres, djelujući kao molekularni šaperon. Histonski protein H3 je jedan od pet glavnih histonskih proteina koji zajedno s drugima čini strukturu nukleosoma, osnovne jedinice kromatina, i igra ključnu ulogu u regulaciji gena. Aktivacijski protein 1 (*AP1*, od engl. *Activator Protein 1*) je transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena u odgovoru na različite stanične

stimuluse, uključujući rast, diferencijaciju i apoptozu. Interferon alfa je skupina proteina s antivirusnim, antitumorskim i imunomodulacijskim svojstvima, dio šire obitelji interferona koji igraju ključnu ulogu u obrani tijela od virusnih infekcija hipoksija-inducibilni faktor 1 (HIF1, od engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1*) ima ključnu ulogu u odgovoru stanica na hipoksiju (niska razina kisika) regulirajući ekspresiju gena koji sudjeluju u metabolizmu, angiogenezi i preživljavanju stanica. Fibrinogen je plazma protein koji se pretvara u fibrin tijekom zgrušavanja krvi, ključan za formiranje krvnog ugruška. Tripsin je enzim koji se nalazi u probavnom sustavu, posebno u gušterači, gdje sudjeluje u razgradnji proteina na manje peptidne lance ili aminokiseline tijekom probave. Prema rezultatima (Slika 38, Slika 39) dobivenim analizom srži i analizom putova uz pomoć programa IPA može se vidjeti da je predviđena indirektna interakcija SAHH-a i histona H3 u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* kao u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (faktor povećanja, od eng.  $\log_2$  *Fold change* -2.2.). Indirektna interakcija SAHH-a i histona H3 te STAT3 prisutna je u obje obzervacije, također može se vidjeti značajno sniženu razinu ekspresije RCSD1 i CD93 u obje analize tj. u staničnim linijama SW480 i MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Analiza srži nam također nudi opciju sažetog pregleda i kategorizacije podataka nakon diferencijalne ekspresije gena uz pomoć programa IPA. Može se vidjeti da diferencijalno eksprimirani geni u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* najviše aktivni za procese staničnog pokretanja, staničnog razvoja, staničnog rasta i proliferacije, stanične signalizacije i interakcije te stanične organizacije. Dok se kod stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* također radi o staničnoj signalizaciji, staničnom pokretanju s većim naglasom na stanični transport i signalizaciju. Kao što može vidjeti, slično je i u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, no, u ovom slučaju tu se još ubraja i stanična morfologija. Opcija sažetog pregleda i kategorizacije dobivenih diferencijalno eksprimiranih gena omogućila nam je uvid u procese koji su najviše promijenjeni, odnosno aktivni uslijed utišavanja gena *SAHH* u staničnim linijama SW480, MCF7 i HEK293T (Slika 40, Tablica 8). Za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* može se vidjeti da u je u procesu staničnog pokretanja 741 molekula diferencijalno eksprimirana, u staničnom razvoju 886 molekula, stanični rast i proliferacija 887 molekula, stanični prijenos signala i interakcija 554, stanično organizacija 559 molekula. Za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* imamo 886 molekula diferencijalno eksprimiranih koje sudjeluju u staničnoj interakciji, staničnom pokretanju 962, molekularnom transportu 990, staničnom funkcioniranju i održavanju 726 te u staničnoj signalizaciji 342 molekule. Za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* imamo 976 molekulu diferencijalno eksprimiranu



u procesima staničnog pokretanja dok je u procesima stanične organizacije 876 molekula te staničnih funkcija i održavanja 1064 molekula, stanična morfologija 637 molekula, te u procesima stanične smrt i preživljenja 1223 molekule.

**Tablica 8.** Popis staničnih procesa koji su različito aktivni odnosno diferencijalno eksprimirani kod stanica divljeg tipa linija MCF, SW480 i HEK293T i staničnih linija s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.

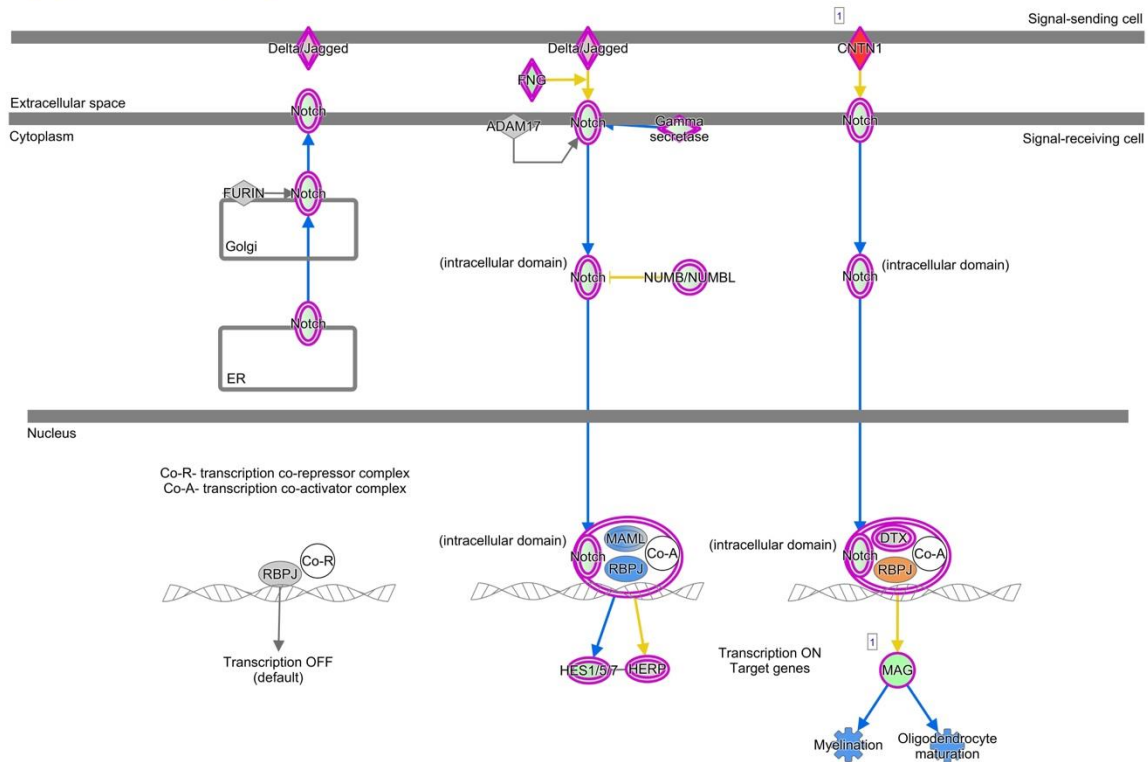
Stanična linija MCF7 s utišanim <i>SAHH</i> genom	Broj molekula
Stanično pokretanje	976
Stanična smrt i preživljavanje	876
Stanična funkcija	1064
Stanična morfologija	637
Stanična smrt i preživljavanje	1223

Stanična linija HEK293T s utišanim <i>SAHH</i> genom	Broj molekula
Prijenos signala i interakcija između stanica	866
Stanično pokretanje	962
Transport molekula	990
Stanična funkcija i održavanje	726
Prijenos staničnog signala	342

Stanična linija SW480 s utišanim <i>SAHH</i> genom	Broj molekula
Pokretanje stanica	741
Razvoj stanica	886
Razvoj stanica i proliferacija	887
Prijenos signala i interakcija između stanica	554
Organizacija stanica	559

## Signalni put Notch

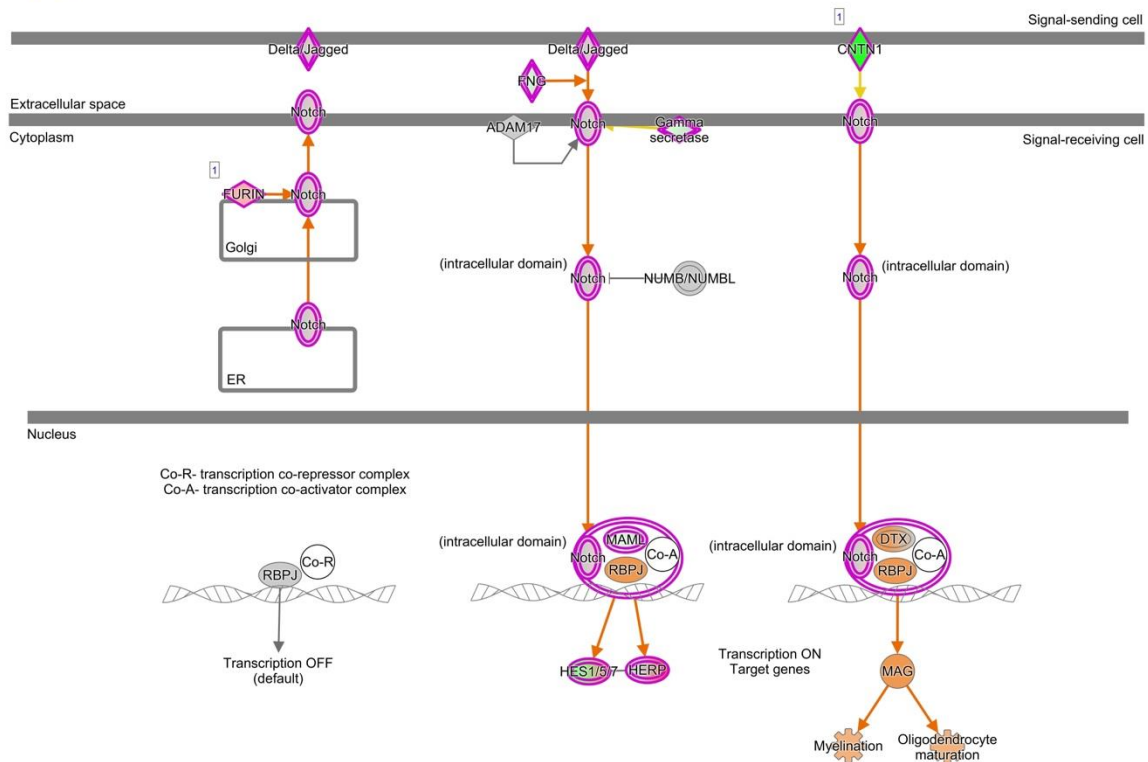
Notch Signaling : MCF7.WT.vs.AHCY : Expr Log Ratio



© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 44.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojoj su identificirane diferencijalne promjene u ekspresiji gena u signalnom putu Notch. Analiza je provedena uz strogo definirane parametre, uključujući raspon faktora povećanja (od engl. *Fold change*) vrijednosti u rasponu od - 0.5 do 0.5 u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Isprekidana linija označava indirektnu interakciju, dok puna linija označava direktnu interakciju. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CNTN1 - Kontaktin 1 (od engl. *Contactin 1*), RBPJ - protein koji veže rekombinacijski signal za imunoglobulin J regiju, (od engl. *Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region*), MAG - Glikoprotein vezan za mijelin, (od engl. *Myelin-Associated Glycoprotein*), HERP - Homocistein-inducirani ER protein (od engl. *Homocysteine-Inducible ER Protein*), NOTCH - Notch receptor (od engl. *Notch Receptor*), DTX (Deltex): Obitelj gena Deltex (od engl. *Deltex Family of Genes*).

Rezultat analize srži uz pomoć programa IPA jasno ističe signalni put Notch (Slika 44, Slika 45) kao zajednički signalni put koji se izdvaja među promijenjenim genima u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i stanicama fibrolasta pacijenata s deficijencijom *SAHH*-a.



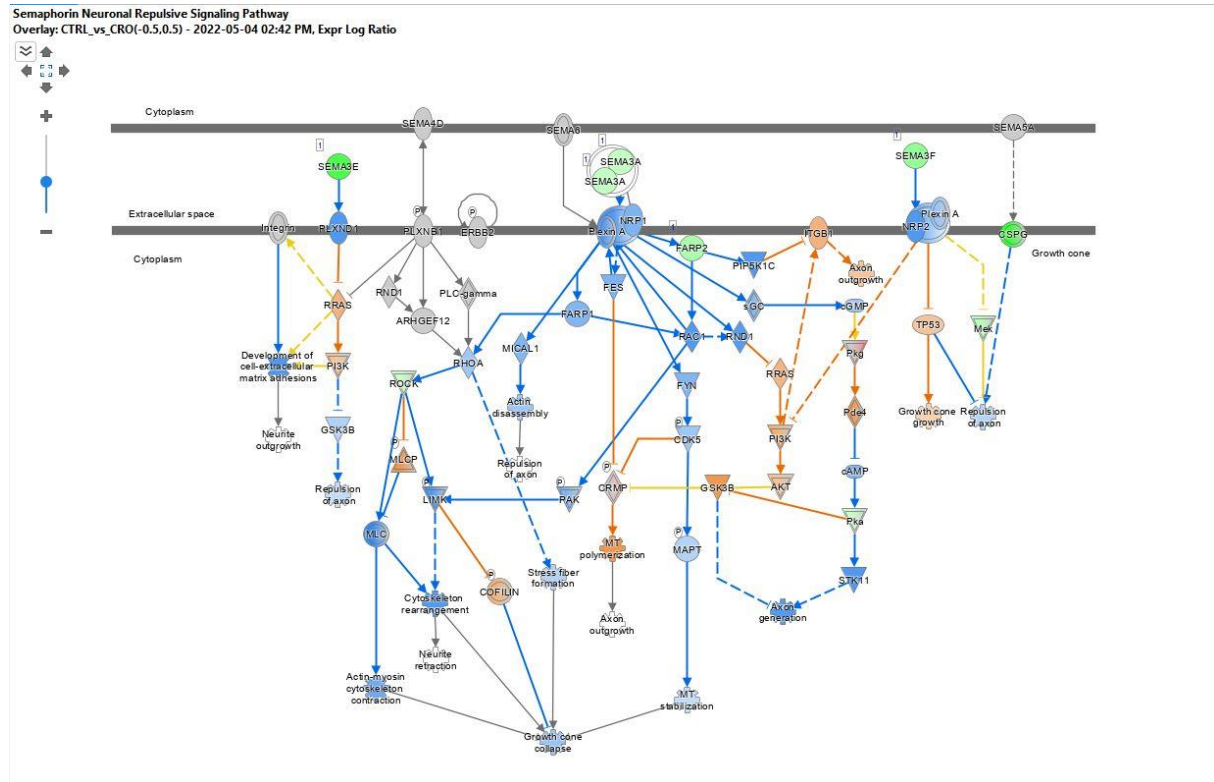
© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 45.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojoj su identificirane diferencijalne promjene u ekspresiji gena u signalnom putu Notch. Analiza je provedena uz strogo definirane parametre, uključujući raspon faktora povećanja (logaritamskih od engl. *Fold change*) vrijednosti u rasponu od - 0.5 do 0.5 u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Isprekidana linija označava indirektnu interakciju, dok puna linija označava direktnu interakciju. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CNTN1 - Kontaktin 1 (od engl. *Contactin 1*), RBPJ protein koji veže rekombinacijski signal za imunoglobulin J regiju (od engl. *Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region*), MAG - Glikoprotein vezan za mijelin (od engl. *Myelin-Associated Glycoprotein*), HERP - Homocistein-inducirani ER protein (od engl. *Homocysteine-Inducible ER Protein*), NOTCH - receptor Notch (od engl. *Notch Receptor*), DTX (Deltex): Obitelj gena Deltex (od engl. *Deltex Family of Genes*).

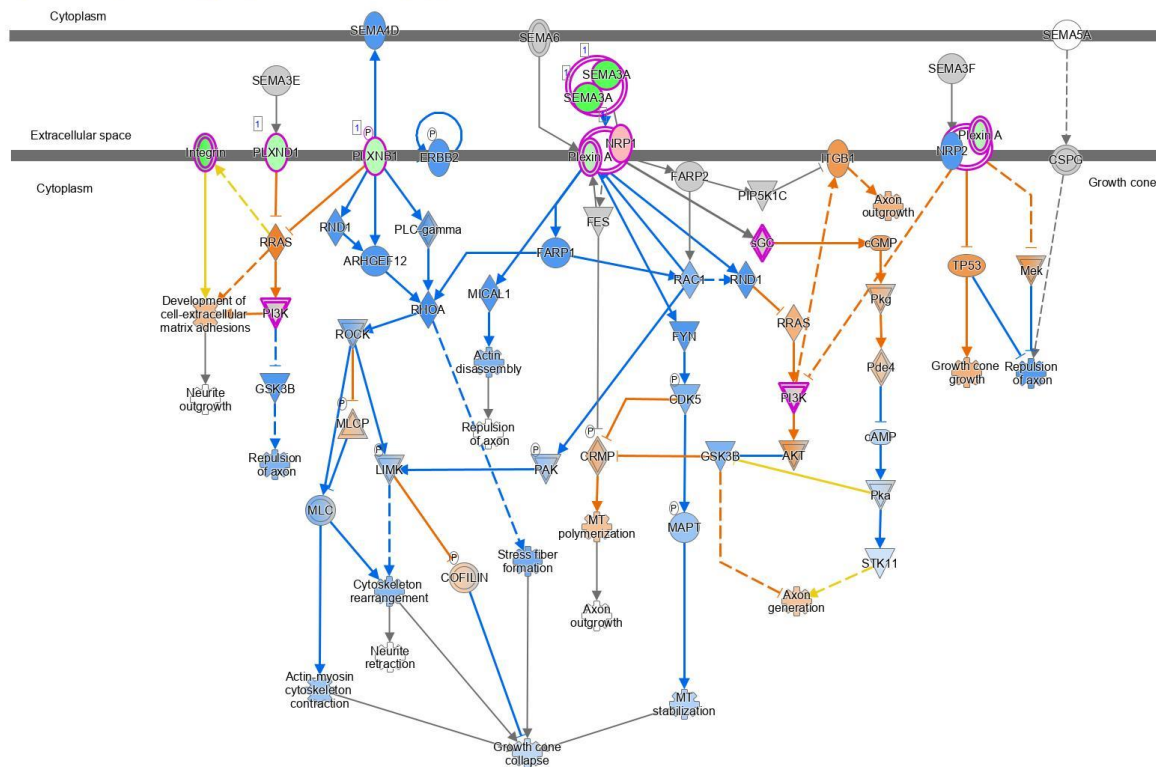
Signalni put Notch igra ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji i razvoju organizma. Aktivacija receptora Notch pokreće kaskadu događaja koja može utjecati na staničnu proliferaciju, diferencijaciju, apoptozu i staničnu sudbinu. U staničnom putu Notch posebno je zanimljiv gen *CNTN1* koji je povećano eksprimiran u tumorskoj staničnoj liniji s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Dodatno, *CNTN1* je gen koji kodira protein koji pripada obitelji adhezivnih molekula i igra važnu ulogu u razvoju živčanog sustava. Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da *CNTN1* gen može imati i ulogu u progresiji tumora. Studije su pokazale da povećana ekspresija

*CNTN1* gena može biti povezana s agresivnijim oblikom tumora i lošijim ishodom kod pacijenata s različitim vrstama karcinoma, uključujući rak dojke, pluća i debelog crijeva. Protein CNTN1 može poticati invaziju i metastaziranje tumora putem interakcija s drugim staničnim molekulama i signalnih putova koji potiču rast i preživljavanje tumorskih stanica. Osim toga, gen *CNTN1* može biti uključen u regulaciju procesa angiogeneze (formiranje novih krvnih žila) u tumorskom mikrokruženju, što može podržati rast tumora i širenje metastaza. U ovom istraživanju su prepoznati su kao zajednički signalni putovi staničnih linija MCF7, SW480 HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i uzoraka fibroblasta bolesnika sljedeći signalni putovi: *Semaphorin neuronal repulsive signaling pathway* (Put neuronskog odbojnog signaliziranja semaforina) (Slika 43, Slika 45), *CREB signaling in neurons* (CREB-prijenos signala u neuronskim stanicama), *IDI signaling pathway* (Put signalizacije gena *IDI*), *LXR/RXR activation* (Aktivacija receptora LXR/RXR), *Semaphorin neuronal signaling pathway* (Put neuronske signalizacije semaforina) (Slika 44) i *STAT3 signaling pathway* (Put signalizacije gena *STAT3*). Ovi putovi su identificirani kao zajednički unatoč tome što nisu specifični za navedene stanične linije SW480, MCF7, HEK 293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Analizom diferencijalne ekspresije gena i analize srži, ovi stanični putovi izdvojili su se kao zajednički u sve tri stanične linije (MCF7, SW480, HEK293T) u kojima je utišan gen *SAHH* te u fibroblastima bolesnika koji postoje u našem laboratoriju iz prethodnih istraživanja.

## Put neuronske signalizacije putem semaforina (od engl. *Semaphorin neuronal signaling pathway*)



**Slika 46.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojoj su identificirane diferencijalne promjene u putu neuronske signalizacije semaforina u uzorcima izoliranim iz fibroblasta bolesnika u usporedbi s zdravim fibroblastima CTRL. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: AKT (Proteinska kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), ROCK (proteinska kinaza povezana s Rho od engl. *Rho-Associated Protein Kinase*), TP53 (Tumorski supresor p53, od engl. *Tumor Suppressor Protein p53*), AKT (Protein kinaz B, PKB, od engl. *Protein kinase B*), Cofilin (odnosi se na gene kao što su CFL1, koji kodira kofilin-1, od engl. *Cofilin I*), SEMA3A (Semaforin 3A od engl. *Semaphorin 3A*).

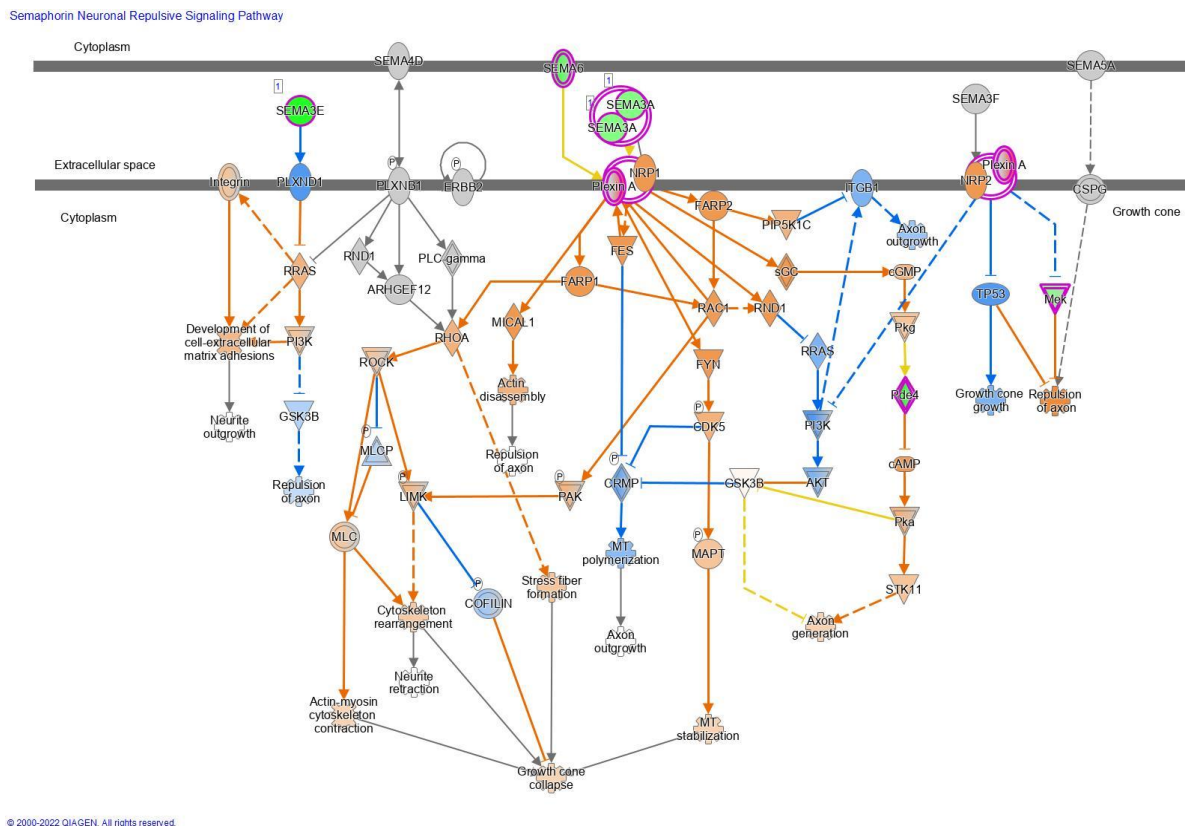


© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 47.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u Putu neuronske signalizacije semaforina u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: AKT (Proteinska kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), ROCK (proteinska kinaza povezana s Rho od engl. *Rho-Associated Protein Kinase*), TP53 (Tumorski supresor p53, od engl. *Tumor Suppressor Protein p53*), AKT (Protein kinaz B, PKB, od engl. *Protein kinase B*), Cofilin (odnosi se na gene kao što su CFL1, koji kodira kofilin-1, od engl. *Cofilin 1*), SEMA3A (Semaforin 3A od engl. *Semaphorin 3A*).

Dobiveni podaci nakon diferencijalne ekspresije gena i obrade podataka u IPA programu ilustriraju zajednički diferencijalno eksprimirani signalni put Put neuronske signalizacije semaforina (od engl. *Semaphorin neuronal signaling pathway*) u staničnim linijama SW480 i MCF7 i fibroblastima bolesnika s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (Slika 46, Slika 47, Slika 48). Podaci ilustriraju zajednički diferencijalno eksprimirani signalni put neuronske signalizacije semaforina u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i fibroblastima bolesnika s deficijencijom *SAHH*-a, nakon temeljite analize korištenjem strogo definiranih parametara analize s fokusom na faktor povećanja vrijednosti (logaritamske

vrijednosti) unutar raspona od -0.5 do 0.5. Analizom je izdvojen signalni put neuronske signalizacije semaforina kao jedan od zajedničkih diferencijalno eksprimiranih putova u utišanim staničnim linijama i u stanicama izoliranih iz fibroblasta bolesnika.



**Slika 48.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u Putu neuronske signalizacije semaforina u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: AKT (Proteinska kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), ROCK (proteinska kinaza povezana s Rho od engl. *Rho-Associated Protein Kinase*), TP53 (Tumorski supresor p53, od engl. *Tumor Suppressor Protein p53*), AKT (Protein kinaz B, PKB, od engl. *Protein kinase B*), Cofilin (odnosi se na gene kao što su CFL1, koji kodira kofilin-1, od engl. *Cofilin I*), SEMA3A (Semaforin 3A od engl. *Semaphorin 3A*).

Prema rezultatima može se vidjeti da u staničnim linijama SW480 i MCF7 te uzorcima fibroblasta bolesnika s utišanom ekspresijom gena *SAHH* imamo značajno nižu razinu ekspresije gena *SEMA3A* i *SEMA3E*. Ekspresijski profili stanične linije MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i uzorci fibroblasta bolesnika sa sniženom ekspresijom gena *SAHH* su

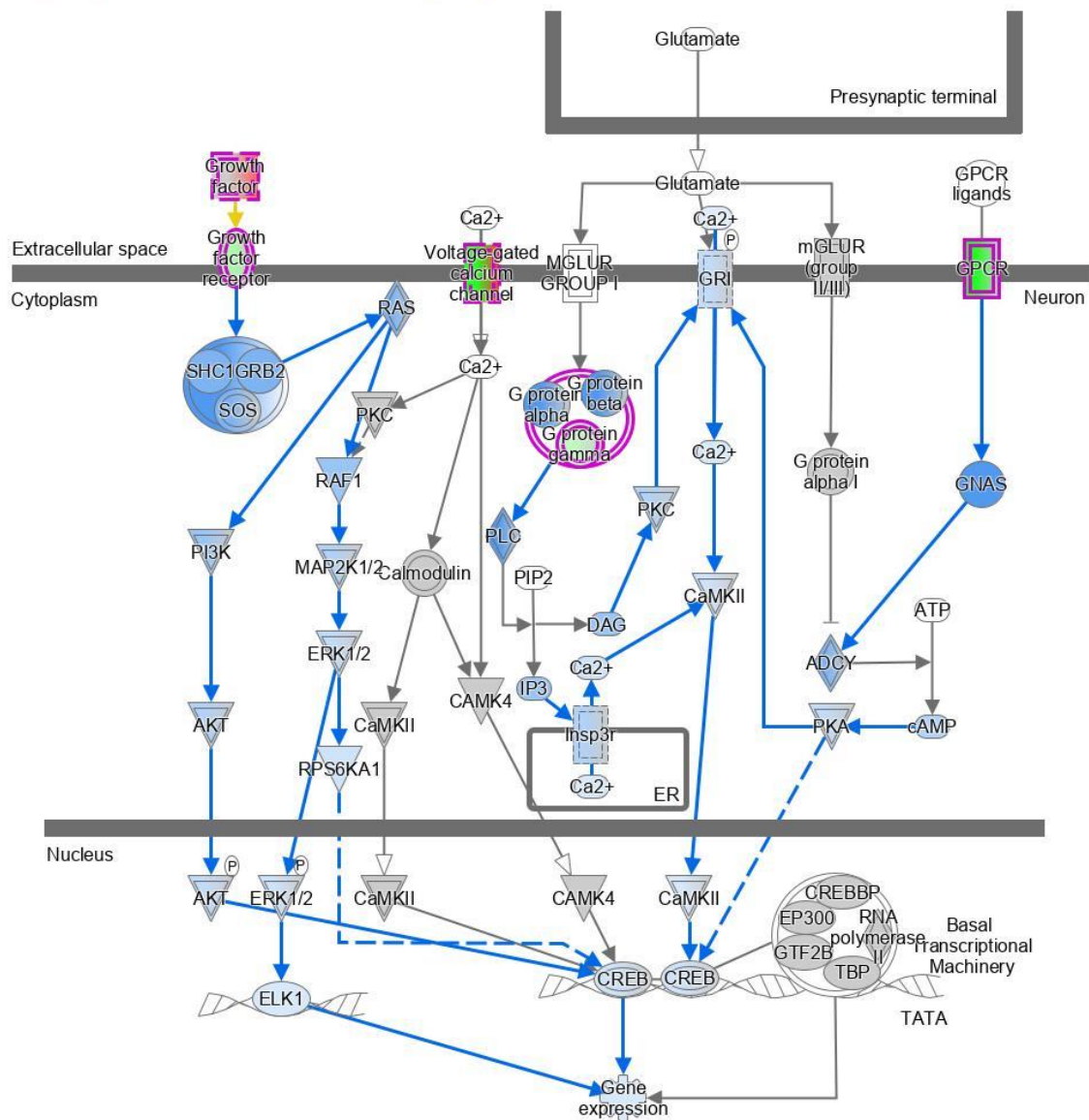
međusobno sličniji dok se ekspresijski profil stanične linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u kontekstu signalnog puta neuronske signalizacije samforina značajno razlikuje. Semaphorin 3A (SEMA3A) je član obitelji semaforina, koji su poznati po svojoj ulozi u vođenju aksonalnog rasta tijekom razvoja živčanog sustava. Međutim, njihova uloga se proteže i izvan živčanog sustava, uključujući regulaciju imunoloških odgovora i tumorigeneze. Nadalje, SEM3A, posebno, privlači značajnu pažnju zbog svoje potencijalne uloge kao tumorskog supresora u različitim tipovima tumora. U kontekstu tumora dojke, istraživanja su pokazala da je SEMA3A smanjeno reguliran u tumorskim tkivima i da njegova ekspresija negativno korelira sa stadijem tumora. Ovo sugerira da SEMA3A može djelovati kao tumorski supresor, čija je smanjena ekspresija povezana s napredovanjem tumora. Studije *in vivo* su dodatno potvrdile ulogu SEMA3A u inhibiciji tumorigeneze, pokazujući da dodatak SEMA3A može inhibirati rast tumora. U kontekstu tumora mozga, posebno je zanimljiva uloga Sema3A u regulaciji proliferacije i invazije matičnih stanica tumora mozga (BTSC, od engl. *Brain Tumor Stem Cell Invasion*). Pretpostavlja se da SEMA3A direktno inhibira proliferaciju BTSC i potiče njihovu invaziju putem interakcija s receptorima neuropilin 1 (Nrp1) i pleksin. Ovo ukazuje na složenu ulogu SEMA3A u regulaciji dinamike tumora mozga, gdje može djelovati kao supresor rasta, ali i kao regulator invazivnog ponašanja. U kontekstu tkivne specifičnosti, važno je napomenuti da uloga SEMA3A može varirati ovisno o tipu tkiva i tumorskom mikrokruženju. U našim staničnim linijama, snižena ekspresija gena *SEMA3A* mogla bi potencijalno rezultirati povećanom onkogenezom, što ukazuje na značajnu poveznicu između regulacije ekspresije gena *SEMA3A* i tumorigeneze. Ovo je posebno relevantno u svjetlu saznanja da *SAHH*-a ima ključnu ulogu u regulaciji metilacije DNA i, posljedično, ekspresiji gena, uključujući i *SEMA3A*. Smanjena aktivnost *SAHH*-a mogla bi dovesti do promjena u metilacijskom statusu promotorskih regija gena *SEM3A*, što bi moglo objasniti sniženu ekspresiju SEMA3A u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.



## CREB prijenos signala u neuronskim stanicama (od engl. *CREB signaling in neurons*)

Prijenos signala putem CREB-a (ciklički adenzin monofosfat vezujući protein) transkripcijskog faktora igra važnu ulogu u neuronskim stanicama regulirajući ekspresiju gena kao odgovor na različite podražaje. Kada su neuroni aktivirani, pokreću se signalni putovi koji dovode do aktivacije CREB transkripcijskih faktora. Nakon aktivacije, CREB se veže na specifične DNA sekvence poznate kao cAMP odgovorne elemente (CREs) u promotorskim regijama ciljanih gena, čime se potiče njihova transkripcija. Zanimljivo je primijetiti da se u utišanim staničnim linijama za gen *SAHH* (Slika 49) može vidjeti poremećaj u ovoj signalizaciji s obzirom da je djelomično regulirana koncentracijom adenzina.

CREB Signaling in Neurons : SW480-wt-vs-siAHCY2 : Expr Log Ratio

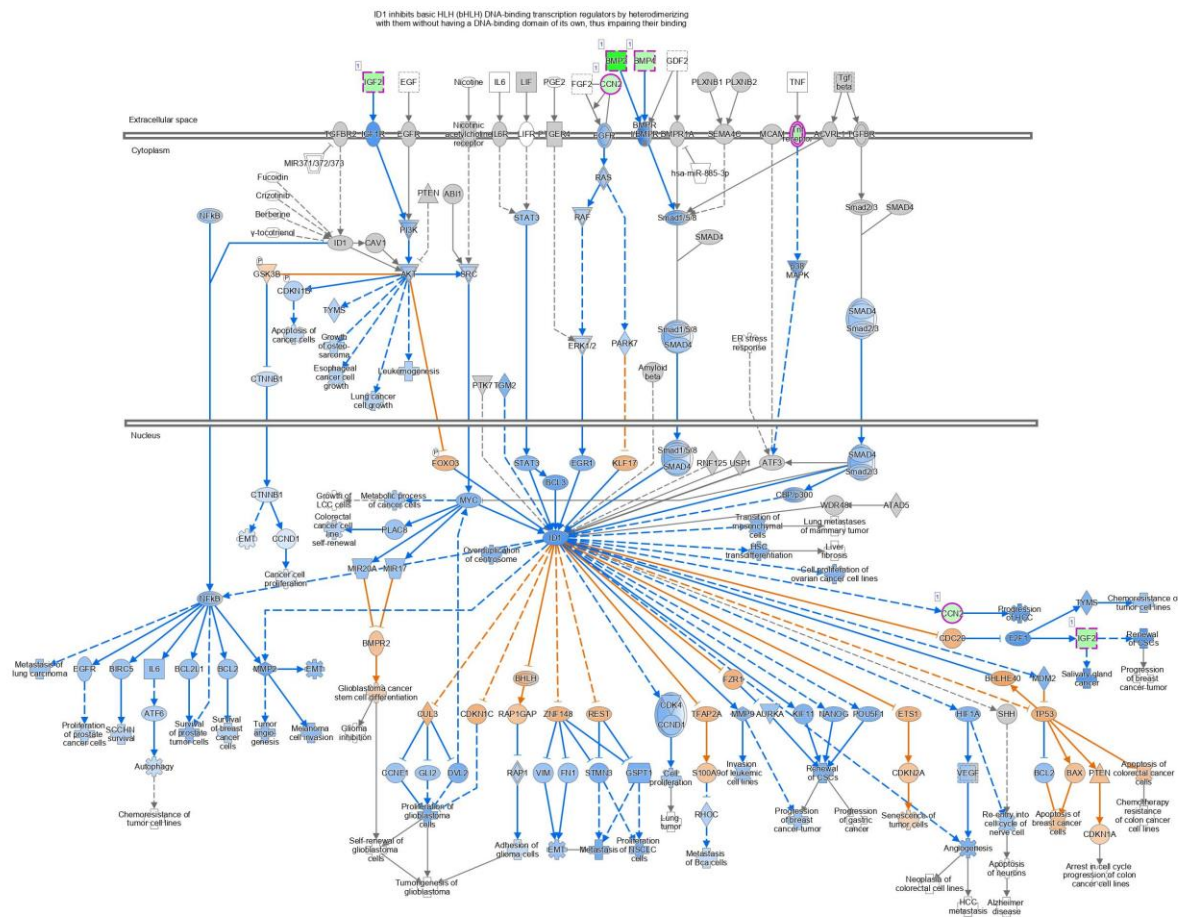


**Slika 49.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u Putu CREB-prijenosa signala u neuronskim stanicama u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini (od engl. *RAS proteins*), AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B (PKB)*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*), cREB (CAMP-vezujući protein, ciklički adenozin monofosfat vezujući protein, od engl. *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*).

### ***Put prijenosa signala putem gena ID1 (od engl. ID1 signaling pathway)***

*ID1* (od engl. *Inhibitor of DNA Binding 1*, Inhibitor 1 DNA vezanja) je gen koji kodira protein koji pripada obitelji transkripcijskih regulatora zavojnica-petlja zavojnica (HLH, od engl. *helix-loop-helix*). Nadalje, *ID1* funkcionira kao dominantni negativni regulator diferencijacije inhibirajući aktivnost drugih HLH-proteina koji su ključni za procese stanične diferencijacije. Umjesto da direktno veže DNA, *ID1* se veže za druge HLH-proteine, sprječavajući ih da formiraju funkcionalne transkripcijske faktore, što rezultira inhibicijom diferencijacije i poticanjem proliferacije. U kontekstu tumorskih staničnih linija, gen *ID1* igra značajnu ulogu u promicanju tumorigeneze i progresije karcinoma na nekoliko načina. Prekomjerna ekspresija gena *ID1* u nekim tumorskim staničnim linijama povezana je s povećanom proliferacijom i preživljavanjem stanica, što može doprinijeti rastu tumora. Također, *ID1* može inhibirati procese koji vode staničnoj diferencijaciji, omogućavajući stanicama da ostanu u proliferativnom, nediferenciranom stanju. Isto tako, *ID1* može također promicati angiogenezu, proces formiranja novih krvnih žila, što je ključno za rast tumora i metastaziranje. To se može dogoditi kroz regulaciju faktora rasta i drugih molekula koje su uključene u angiogenezu. Prekomjerna ekspresija *ID1* povezana je s povećanom sposobnošću tumorskih stanica da metastaziraju. Dakle, *ID1* može utjecati na ekspresiju različitih gena koji su uključeni u migraciju i invaziju tumorskih stanica, olakšavajući njihovo širenje iz primarnog tumora u druge dijelove tijela.





© 2006-2022 GENEN. All rights reserved.

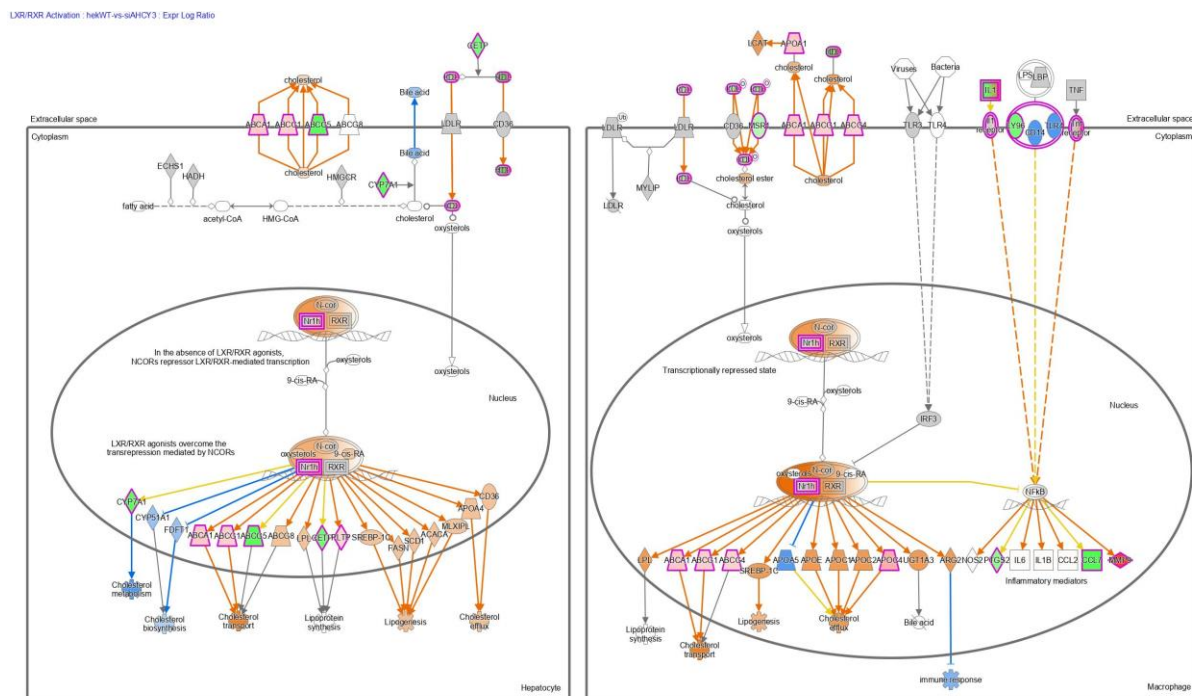
**Slika 51.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u Putu signalizacije *ID1* gena u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objasnjena najznačajnijih kratica i simbola: FOXO3 - (od engl. *Forkhead box O3*), VEGF - Vaskularni endotelni faktor rasta - (od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*).

Ova promjena u ekspresiji gena unutar signalnog puta ID1 (Slika 46, Slika 47, Slika 48) može ukazivati na ključne mehanizme regulacije i interakcije u stanicama. ID1 (od engl. *Inhibitor of DNA binding 1*) je regulator koji igra ulogu u kontroli stanične diferencijacije i proliferacije. Analiza ovog signalnog puta pruža uvid u to kako promjene u ekspresiji gena unutar ovog puta mogu utjecati na stanične procese i biološke funkcije u obje utišane stanične linije MCF7 (Slika 50) i SW480 (Slika 51) i u uzorcima fibroblasta bolesnika. Povećana ekspresija *VEGF* gena u tumorskoj staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (Slika 50) može imati značajan utjecaj na progresiju tumora. Vaskularni endotelni faktor rasta je ključni faktor u

angiogenezi, procesu stvaranja novih krvnih žila, što je važno za opskrbu tumora kisikom i hranjivim tvarima. Povećana ekspresija VEGF-a može potaknuti formiranje novih krvnih žila oko tumora, što može rezultirati povećanom vaskularizacijom tumora i poticanjem rasta i metastaza.

### Aktivacija receptora LXR/RXR od engl. (*LXR/RXR activation*)

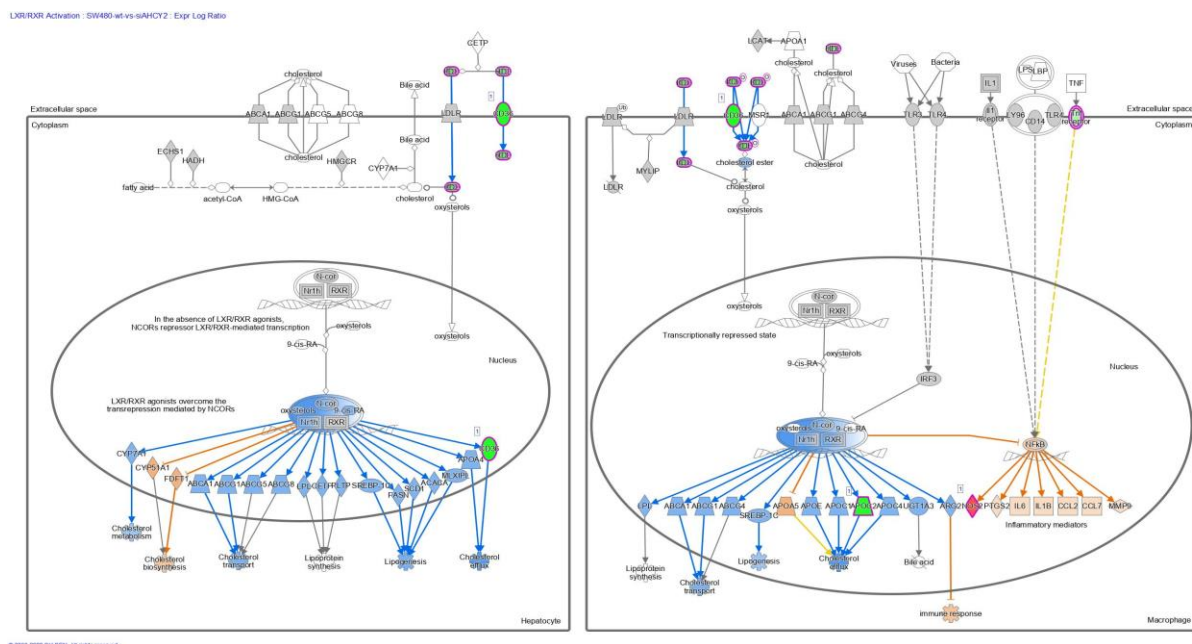
Aktivacija receptora LXR (od engl. *Liver X receptor*) i RXR (od engl. *Retinoid X receptor*) igra ključnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida, kolesterola i glukoze. Ovi nuklearni receptori djeluju kao transkripcijski faktori koji reguliraju ekspresiju gena uključenih u metabolizam lipida i kolesterola, kao i u upalne procese. Kada receptori LXR i RXR formiraju heterodimer, aktivirani kompleks može se vezati za specifične DNA sekvence, poznate kao LXR-responsivni elementi (od engl. *LXRE*), u promotorima gena povezanih s metabolizmom lipida i kolesterola. Ova veza rezultira povećanom ekspresijom gena koji su uključeni u sintezu i transport lipida, kao i u regulaciju homeostaze kolesterola. Osim toga, receptori LXR/RXR mogu regulirati upalne procese u tijelu putem inhibicije ekspresije gena koji su uključeni u upalne odgovore, što može imati pozitivan učinak na smanjenje upale i poboljšanje metaboličkog statusa.



**Slika 52.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u Aktivacija LXR/RXR receptora u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom HEK293T. Narančasta boja označava pojačanu

aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: Biosinteza kolesterola (od engl. *Cholesterol biosynthesis*), IL2 – Interleukin 2, IL6 - Interleukin 6, CD36 - Klaster diferencijacije 36 (od engl. *Cluster of differentiation*), CCL2 - Kemokinski (C-C motiv) ligand 2 (od engl. *Chemokine (C-C motif) Ligand 2*), CCL7 - Kemokinski (C-C motiv) ligand 7 (od engl. *Chemokine (C-C motif) Ligand 7*), NOS2 - Inducirana dušikov monoksid sintaza, MMP9 - Metaloproteinaza matriksa 9 (od engl. *Matrix Metalloproteinase 9*).

Na slici 49 prikazani su rezultati analize srži koja je identificirala promjene u ekspresiji gena u signalnom putu LXR/RXR-a koji se izdvojio kao zajednički u staničnim linijama HEK293T (Slika 52) i SW480 (Slika 53) s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Analiza je provedena uz strogo definirane parametre, s naglaskom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) vrijednosti unutar raspona od -0.5 do 0.5. Rezultati jasno ističu signalni put aktivacije receptora LXR/RXR (od engl. *LXR/RXR receptor activation*) kao zajednički izdvojen među promijenjenim genima u oba tipa uzoraka stanica sa smanjenom ekspresijom gena *SAHH*.



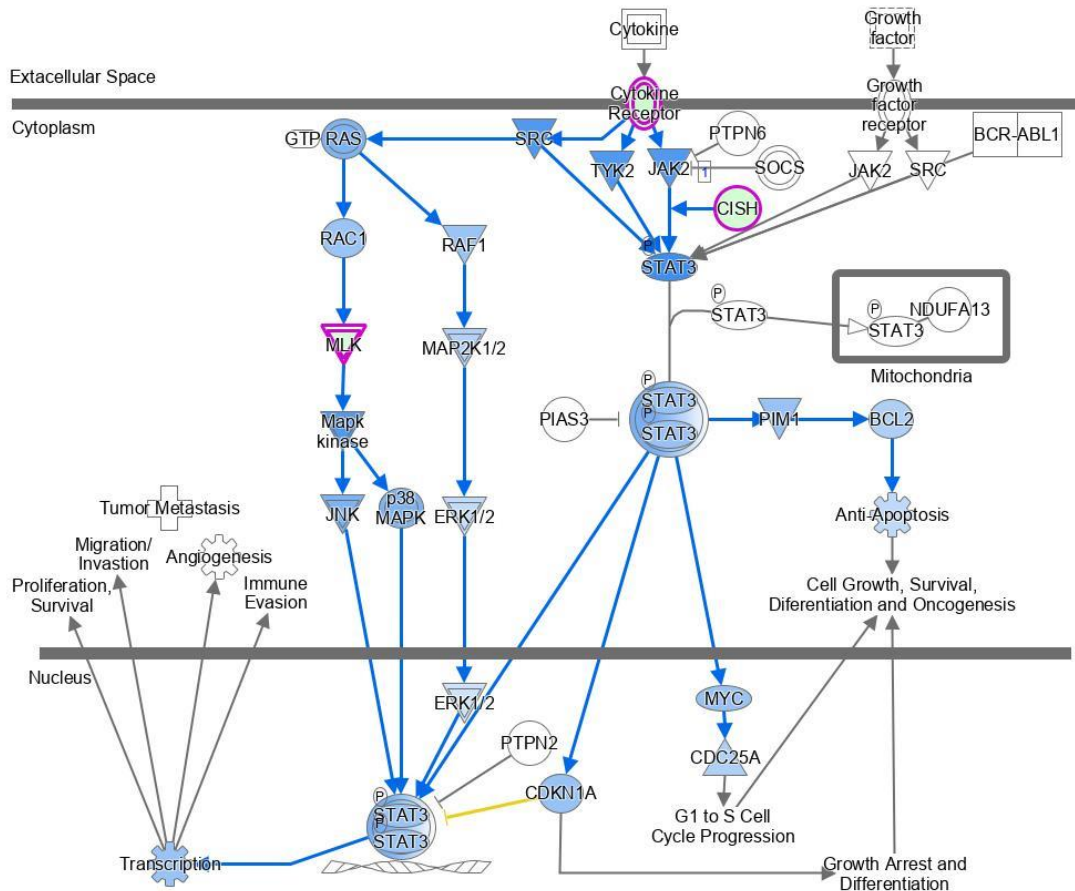
**Slika 53.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u aktivaciji receptora LXR/RXR u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok

isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: od engl. *Cholesterol biosynthesis* - Biosinteza kolesterola, IL2 - Interleukin 2, IL6 – Interleukin 6, CD36 – Klaster diferencijacije 36 (od engl. *Cluster of differentiation*), CCL2 – Kemokinski (C-C motiv) ligand 2 (od engl. *Chemokine (C-C motif) Ligand 2*), CCL7 - Kemokin (C-C motiv) ligand 7 (od engl. *Chemokine (C-C motif) Ligand 7*), NOS<sub>2</sub> – Inducirana sintaza dušikovog monoksida, MMP9 – Metaloproteinaza matriksa 9 (od engl. *Matrix Metalloproteinase 9*).

Na slici su prikazani rezultati analize srži koja je identificirala promjene u ekspresiji gena u signalnom putu LXR/RXR-a koji se izdvojio kao zajednički u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena. Analiza je provedena uz strogo definirane parametre, s naglaskom na faktor povećanja (od engl. *Fold change* vrijednosti) unutar raspona od -0.5 do 0.5. Rezultati jasno ističu signalni put aktivacije LXR/RXR receptora kao zajednički izdvojen među promijenjenim genima u oba tipa uzoraka. Ova promjena u ekspresiji gena unutar LXR/RXR aktivacijskog puta (Slika 52, Slika 53) ukazuje na važne mehanizme regulacije i komunikacije u stanicama. Aktivacija receptora LXR/RXR-a ima ključnu ulogu u regulaciji lipida i metabolizma. Analiza ovog signalnog puta pruža dublje razumijevanje kako promjene u izražavanju gena unutar ovog puta mogu utjecati na stanične procese i biološke funkcije u ispitivanim uzorcima. U rezultatima analize srži signalnog puta LXR/RXR-a u staničnoj liniji s utišanom ekspresijom gena vidimo povećanu ekspresiju gena *NOS2* i smanjenu ekspresiju *CD36* (Slika 53). Ovo bi potencijalno moglo utjecati na migraciju tumorskih stanica na način da povećana ekspresija *NOS2*, koja kodira induciranu sintazu dušikovog monoksida, može poticati stvaranje dušikova oksida (NO). Također, NO može djelovati kao signalna molekula koja potiče angiogenezu i modulira staničnu adheziju i migraciju, što može olakšati migraciju tumorskih stanica. S druge strane, smanjena ekspresija *CD36*, koji je uključen u uzimanje masnih kiselina i može djelovati kao receptor koji modificira adheziju staničnih stanica, može dodatno modificirati stanično ponašanje na način koji favorizira migraciju. Ove promjene u ekspresiji gena unutar signalnog puta LXR/RXR-a mogu stoga imati važnu ulogu u regulaciji migracijskih sposobnosti tumorskih stanica, potencijalno doprinoseći njihovoj invazivnosti i metastatskom potencijalu.

## Put prijenosa signala gena *STAT3* (od engl. *STAT3 signaling pathway*)

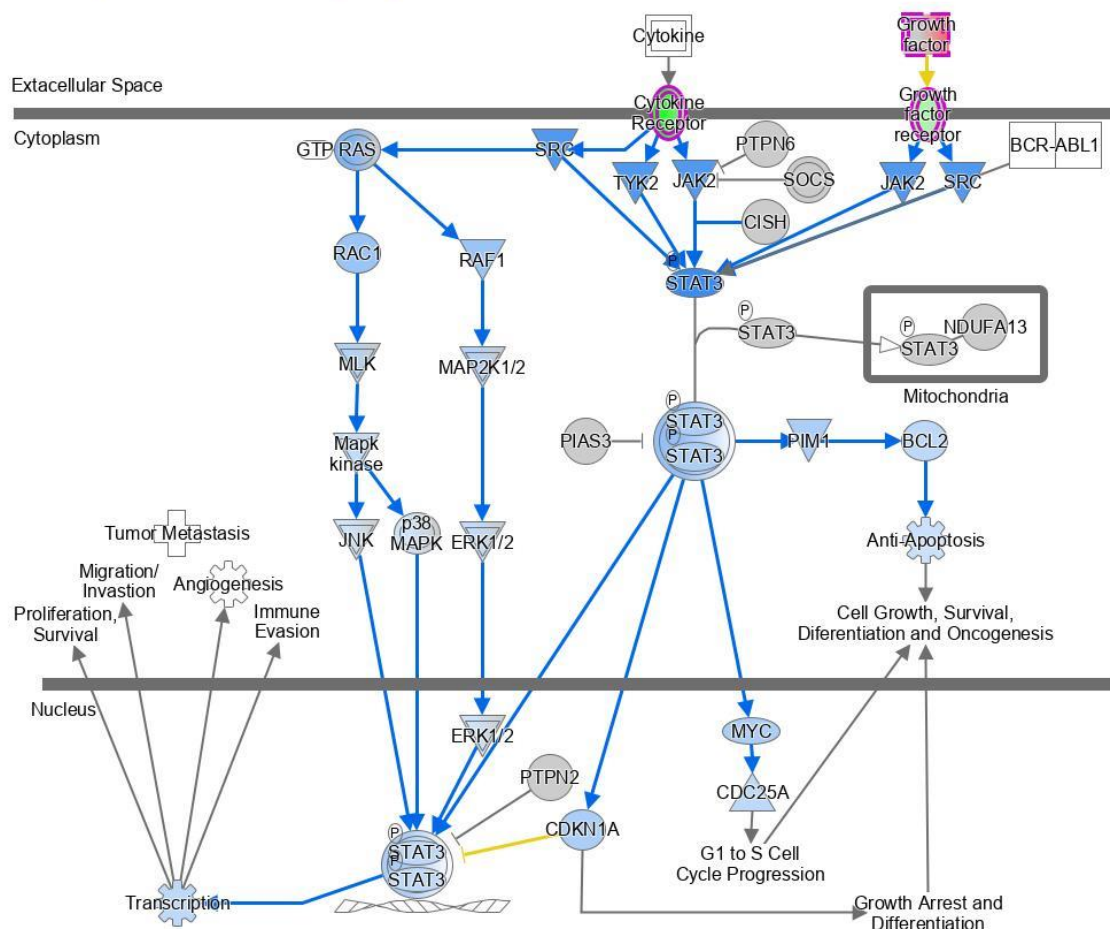
STAT3 Pathway : mcf7overlapwtscr : Expr Log Ratio



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 54.** Rezultati analize srži (od engl. Core analysis) i analize putova (Pathways analysis) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem *STAT3* u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C od engl. *Protein Kinase C*), *STAT3* - Signalni transdudktor i aktivator transkripcije 3 od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, MYC – Proto-onkogen c-Myc, od engl. *Proto-oncogene c-Myc*, CDC25A – Fosfataza kontrole staničnog ciklusa 25A od engl. *Cell Division Cycle 25A (CDC25A)*, JNK – c-Jun N-terminalna kinaza od engl. *c-Jun N-terminal Kinase*, CISH – SH2 - sadržavajući protein induciran citokinom od engl. *Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein (CISH)*.





© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

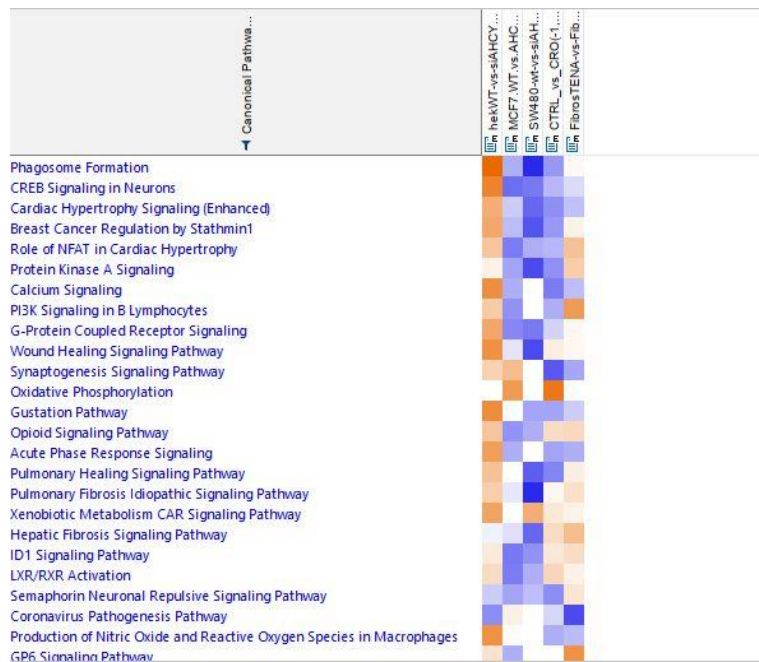
**Slika 55.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem STAT3 u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametara analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C od engl. *Protein Kinase C*), STAT3 - Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, MYC – Proto-onkogen c-Myc, od engl. *Proto-oncogene c-Myc*, CDC25A – Fosfataza kontrole staničnog ciklusa 25A od engl. *Cell Division Cycle 25A (CDC25A)*, JNK – c-Jun N-terminalna kinaza od engl. *c-Jun N-terminal Kinase*, CISH – SH2 - sadržavajući protein induciran citokinom od engl. *Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein (CISH)*.

Promjene u ekspresiji gena unutar signalnog puta STAT3 (Slika 54, Slika 55) sugeriraju važne regulacijske mehanizme i komunikaciju unutar stanica. Signalni transduktor i aktivator

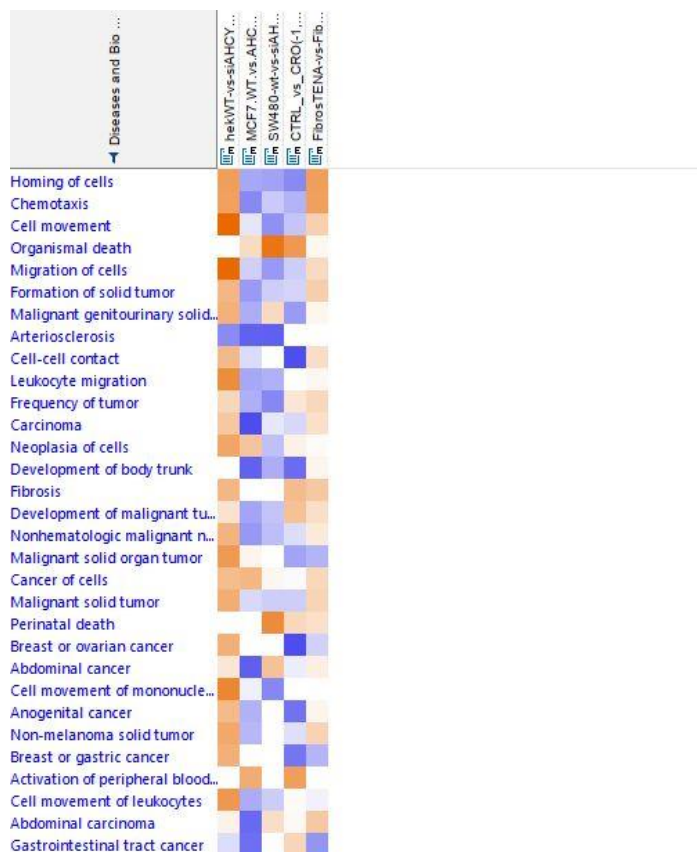
transkripcije (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) igra ključnu ulogu u prenošenju unutarstaničnih signala u stanicama te regulaciji brojnih bioloških funkcija, uključujući proliferaciju, preživljavanje stanica i imunološki odgovor. Analiza je provedena uz stroge parametre faktora povećanja unutar raspona od -0.5 do 0.5.

#### **4.4. Usporedba signalnih putova promijenjenih u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T s utišanom ekspresijom SAHH i putova promijenjenih u fibroblastima pacijenata s deficijencijom SAHH**

Cilj ove doktorske disertacije jest utvrditi postojanje zajedničkih signalnih putova između utišanih staničnih linija i uzoraka fibroblasta pacijenata, pri čemu se situacija razlikuje zbog prisutnosti mutacija kod pacijenata koje utječu na aktivnost i lokalizaciju enzima S – adenzilhomocistein hidrolaze. Diferencijalno ekspimirane analize gena, izoliranih iz fibroblasta pacijenata, dostupni su u laboratoriju na temelju prethodnih istraživanja. Kako je prethodno navedeno, utišane stanične linije karakterizira samo smanjena ekspresija proteina S-adenozilhomocistein hidrolaze, dok kod pacijenata postoji mogućnost aktivacije postranslacijskih procesa koji detektiraju nepravilno složene proteine, stoga se ne očekuje sličan profil ekspresije. Unatoč navedenim razlikama, kao zajednički signalni putovi istaknuti su prijenos signala posredovan CREB-ovim receptorima, prijenos signala posredovan G proteinima, formiranje fagosoma te prijenos signala u stanici posredovan protein kinazom A. U sklopu ove doktorske studije, provedena je usporedba kanonskih signalnih putova i profila ekspresije između utišanih staničnih linija i uzoraka fibroblasta pacijenata. Utišane stanične linije obuhvaćaju SW480, MCF7 i HEK293T s utišanom ekspresijom SAHH, dok su pacijenti podijeljeni u dvije skupine: CTRL-vs-CRO (od engl. *CTRL-vs-CRO* što označava usporedbu diferencijalne ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika CRO i kontrolnog zdravog fibroblasta CTRL) i FibrosTENA-vs-FibrosUSA (od engl. *FibrosTENA-vs-FibrosUSA*) što označava usporedbu diferencijalne ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika fibros USA i kontrolnog zdravog fibroblasta Fibros TENA). Analizom diferencijalne ekspresije gena, primijenjeni su strogi parametri s vrijednostima faktora povećanja (od engl. *Log<sub>2</sub> Fold change*) između -1 i 1. Ovaj metodološki pristup omogućio je identifikaciju gena čija se ekspresija značajno razlikuje između uspoređenih uvjeta. Fokusirali smo se na ključne signalne putove i procese s ciljem dubljeg razumijevanja promjena u staničnoj signalizaciji i biološkim procesima.



**Slika 56.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć analize putova i analize kanonskih putova (od engl. *Pathways analysis* i *Canonical Pathways Analysis*) i programa IPA za kanonske signalne putove u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i putova promijenjenih u fibroblastima pacijenata s deficijencijom *SAHH*-a. Kanonski putovi su poredani prema njihovoj povezanosti s ekspresijom gena u utišanim staničnim linijama (SW480, MCF7, HEK293T) u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom (WT) i uzorcima fibroblasta pacijenata (*CTRL-vs-CRO*, *FibrosTENA-vs-FibrosUSA*) u usporedbi s kontrolnim zdravim fibroblastima (*CTRL*, *FibrosUSA*) od najznačajnijeg prema najmanje značajnom. U istraživanju diferencijalno eksprimiranih kanonskih signalnih putova, rezultati su poredani od najznačajnijeg do najmanje značajnog kanonskog signalnog puta. Plava boja označava smanjenu aktivnost dok narančasta boja označava povećanu aktivnost kanonskih putova. Najznačajniji kanonski signalni putovi: CREB prijenos signala u neuronima (od engl. *CREB Signaling in neurons*), formiranje fagosoma (od engl. *Phagosome formation*), prijenos signala putem  $Ca^{2+}$  (od engl. *Calcium signaling*) – Prijenos signala putem  $Ca^{2+}$ , prijenos signala putem protein kinaze A, od engl. *Protein kinase A signaling*, prijenos signala putem G protein-spregnutih receptora (od engl. *G – protein coupled receptor signaling*).



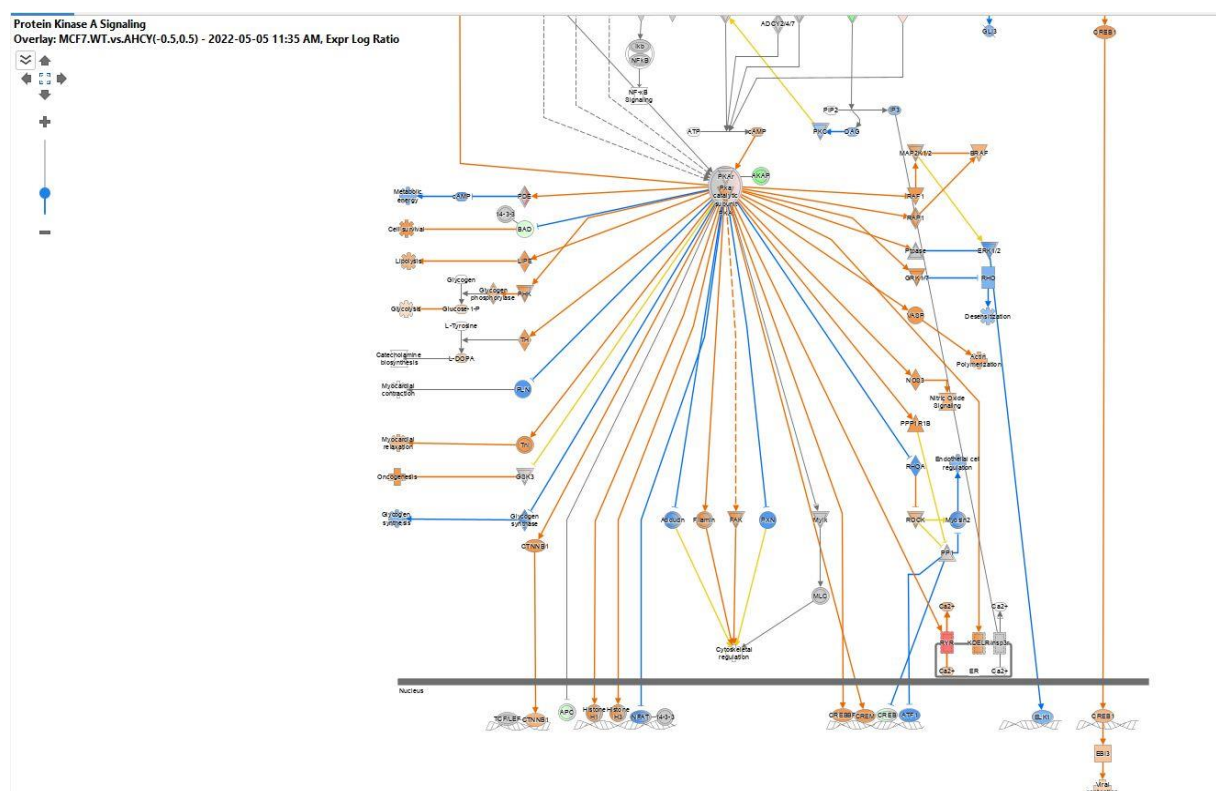
**Slika 57.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć analize putova, analize kanonskih putova i analize bolesti i bioloških funkcija (od engl. *Pathways analysis* i *Canonical Pathways Analysis*) u programu IPA u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T s utišanom ekspresijom *SAHH* i putova promijenjenih u fibroblastima pacijenata s deficijencijom *SAHH*. Kanonski putovi su poredani prema njihovoj povezanosti s ekspresijom gena u utišanim staničnim linijama (SW480, MCF7, HEK293T) u usporedbi s roditeljskom staničnom linijom (WT) i uzorcima fibroblasta pacijenata (*CTRL-vs-CRO*, *FibrosTENA-vs-FibrosUSA*) u usporedbi s kontrolnim zdravim fibroblastima (*CTRL*, *FibrosUSA*) od najznačajnijeg prema najmanje značajnom. U istraživanju diferencijalno ekspimiranih kanonskih signalnih putova, rezultati su poredani od najznačajnijeg do najmanje značajnog kanonskog signalnog puta. Plava boja označava smanjenu aktivnost dok narančasta boja označava povećanu aktivnost kanonskih putova. Najznačajnije uočene biološke funkcije: stanično pokretanje (od engl. *Cell movement*), migracija stanica (od engl. *Migration of cells*).

Utišane stanične linije SW480, MCF7 i HEK293T sa sniženom ekspresijom gena *SAHH* te uzorci fibroblasta bolesnika CRO (*CTRL-vs-CRO* što označava usporedbu diferencijalne ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika CRO i kontrolnog zdravog fibroblasta CTRL) i TENA (*FibrosTENA-vs-FibrosUSA* što označava usporedbu diferencijalne ekspresije gena uzorka fibroblasta bolesnika fibros TENA i kontrolnog zdravog fibroblasta Fibros USA) analizirani su uz faktor povećanja vrijednosti između -1 i 1, pri čemu su parametri analize ekspresije gena odrađeni u strogim uvjetima definiranim u rasponu faktora povećanja od -1 do 1. Uočeno je da sličan ekspresijski profil dijele utišane stanične linije SW480, MCF7 i CRO

uzorak fibroblasta bolesnika (Slika 56, Slika 57), dok sličan ekspresijski profil imaju stanična linija HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i uzorak fibroblasta bolesnika TENA (Slika 56, Slika 57, Tablica 9). Važno je napomenuti da stanične linije imaju utišanu ekspresiju gena *SAHH*, dok pacijenti pokazuju deficijenciju u ekspresiji gena *SAHH* u slučaju točkastih mutacija gena *SAHH*.

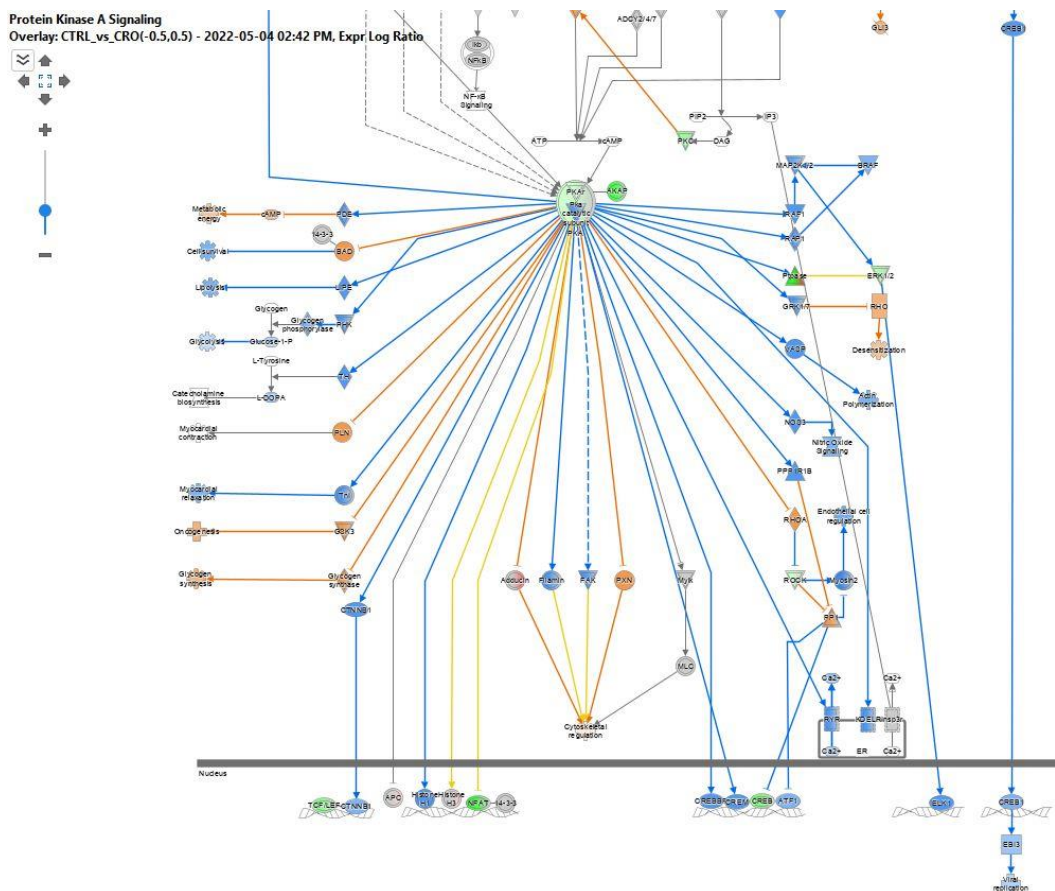
**Tablica 9.** Rezultati usporedbe ekspresijskih profila i diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć analize putova, analize kanonskih putova i analize bolesti i bioloških funkcija (od engl. Pathways analysis i Canonical Pathways Analysis) i IPA programa u staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* i putova promijenjenih u fibroblastima pacijenata s deficijencijom *SAHH*-a. Parametri analize: faktor povećanja (od engl. *Log<sub>2</sub> Fold change*) iznosi -1,1.

Stanične linije s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i> : SW480, MCF7, HEK293T
Pacijenti s <i>SAHH</i> -deficijencijom : <i>CTRL-vs-CRO</i> , <i>FibrosTENA-vs-FibrosUSA</i> ,
Sličan ekspresijski profil imaju : SW480 2+4, MCF7 2+4 i <i>CTRL-vs-CRO</i> uzorak
Sličan ekspresijski profil imaju: HEK293T 2+4 i <i>fibrosTENA-vs-fibrosUS</i>



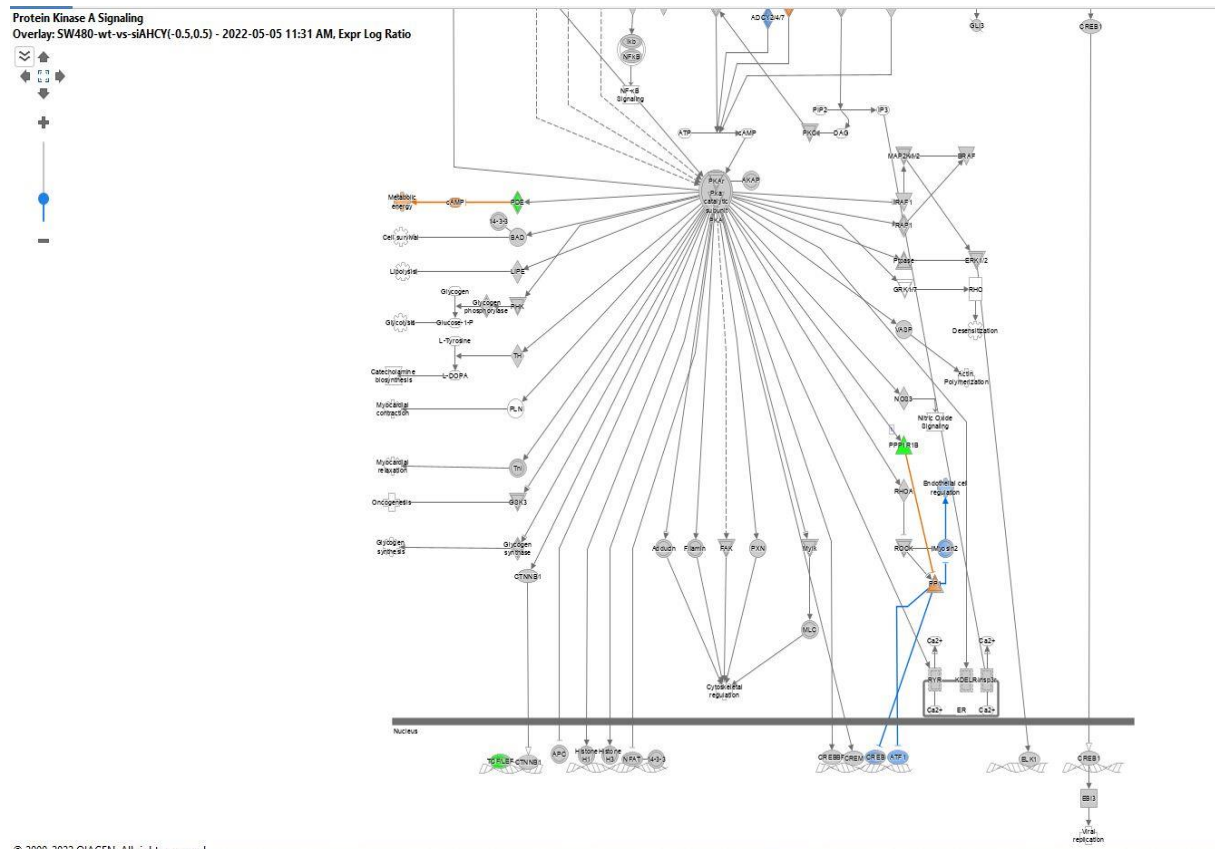
**Slika 58.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem protein kinaze A u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parametri analize diferencijalne ekspresije

gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: CREB1 – ciklički adenozin monofosfat vezujući protein 1, (od engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate-Binding Protein 1*), FAK – Kinaza fokalnih adhezija, (od engl. *Focal Adhesion Kinase*), RAF1 - RAF proto-onkogen 1, (od engl. *RAF Proto-Oncogene 1*), LIPE – Lipaza, hormonski osjetljiva, (od engl. *Hormone-Sensitive Lipase*). Polimerizacija aktina (od engl. *Actin polymerization*), Histon H1 (od engl. *Histone H1*), Histon H3 (od engl. *Histone H3*), CTNNB1 – Beta katenin 1 od engl. *Catenin Beta 1*, ROCK - Rho-kinaza (od engl. *Rho Kinase*), PDE – Fosfodiesteraza, (od engl. *Phosphodiesterase*).



**Slika 59.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem protein kinaze A u uzorcima fibroblasta bolesnika CRO s SAHH-a deficijencijom u usporedbi s zdravim uzorkom bolesnika CTRL. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: CREB1 – ciklički adenozin monofosfat vezujući protein 1, (od engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate-Binding Protein 1*), FAK – Kinaza fokalnih adhezija,

(od engl. *Focal Adhesion Kinase*), RAF1 – RAF proto-onkogen 1, (od engl. *RAF Proto-Oncogene 1*), LIPE – Lipaza, hormonski osjetljiva, (od engl. *Hormone-Sensitive Lipase*). Polimerizacija aktina (od engl. *Actin polymerization*), Histon H1 (od engl. *Histone H1*), Histon H3 (od engl. *Histone H3*), CTNNB1 – Beta katenin 1 od engl. *Catenin Beta 1*, ROCK – Rho kinaza (od engl. *Rho Kinase*), PDE – Fosfodiesteraza, (od engl. *Phosphodiesterase*).



**Slika 60.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem protein kinaze A u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: CREB1 – ciklički adenozin monofosfat vezujući protein 1, (od engl. *Cyclic Adenosine Monophosphate-Binding Protein 1*), FAK – Kinaza fokalnih adhezija, (od engl. *Focal Adhesion Kinase*), RAF1 – RAF proto-onkogen 1, (od engl. *RAF Proto-Oncogene 1*), LIPE – Lipaza, hormonski osjetljiva, (od engl. *Hormone-Sensitive Lipase*). Polimerizacija aktina (od engl. *Actin polymerization*), Histon H1 (od engl. *Histone H1*), Histon H3 (od engl. *Histone H3*), CTNNB1 – Beta katenin 1 od engl. *Catenin Beta 1*, ROCK – Rho-kinaza (od engl. *Rho Kinase*), PDE – Fosfodiesteraza, (od engl. *Phosphodiesterase*).

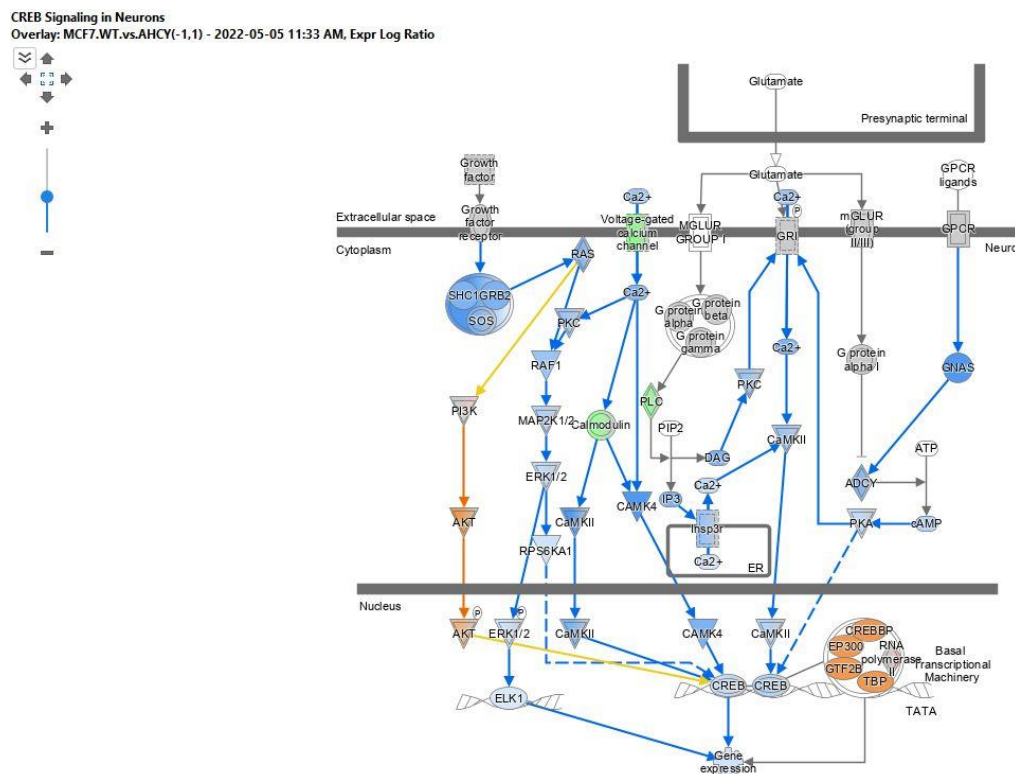
Signalni put protein kinaze A (PKA) je vitalni enzimski signalni put unutar stanica koji igra ključnu ulogu u prenošenju signala različitih izvanstaničnih faktora u unutrašnjost stanica.

Aktivacija PKA pokreće složenu kaskadu događaja koja može značajno utjecati na različite stanične procese. Osim što regulira gene, PKA također ima važnu ulogu u kontroliranju stanične proliferacije i diferencijacije, što dodatno naglašava njegovu ključnu ulogu u održavanju homeostaze i pravilnog funkcioniranja stanica. Protein kinaza A (PKA), ključni regulatorni enzim unutar signalnih putova eukariotskih stanica, igra značajnu ulogu u modulaciji stanične proliferacije kroz preciznu regulaciju različitih gena i proteina. Aktivacija PKA može dovesti do promjena u ekspresiji i funkciji brojnih gena koji su direktno uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, diferencijaciju i proliferaciju. U ovom kontekstu, razmatranje specifičnih gena koji su pod utjecajem PKA pruža uvid u mehanizme kojima se regulira stanična proliferacija. Jedan od ključnih ciljeva PKA u regulaciji stanične proliferacije je CREB (od engl. *cAMP Response Element-Binding protein*). CREB je transkripcijski faktor koji se aktivira fosforilacijom od strane PKA. Jednom aktiviran, CREB promiče ekspresiju ciljnih gena koji su ključni za staničnu proliferaciju, uključujući *c-FOS*, *c-JUN*, i *BCL-2*, koji su vitalni za progresiju staničnog ciklusa i preživljavanje stanica. Osim toga, PKA regulira Rb protein (Retinoblastoma protein), ključni negativni regulator staničnog ciklusa. Fosforilacijom Rb proteina, PKA indirektno promiče tranziciju iz G1 u S fazu staničnog ciklusa, čime se potiče stanična proliferacija. PKA također utječe na signalni put Wnt, koji je ključan za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja. Aktivacija PKA može modulirati aktivnost  $\beta$ -katenina, centralnog proteina u putu Wnt, čime se indirektno utječe na ekspresiju gena koji promiču proliferaciju. U kontekstu tumorigeneze, deregulacija PKA signalnog puta može dovesti do nekontrolirane stanične proliferacije. Na primjer, prekomjerna aktivacija PKA može dovesti do hiperaktivacije CREB-a i drugih transkripcijskih faktora, što rezultira povećanom ekspresijom gena koji promiču proliferaciju i onkogenezu. Signalni kaskada CREB-a započinje aktivacijom adenilat ciklaze (AC) nakon stimulacije staničnih receptora spregnutih s G-proteinom (GPCR) neurotransmiterima, što dovodi do povećanja razine cAMP. To, pak, aktivira PKA. Katalitičke podjedinice PKA prelaze u jezgru i fosforiliraju CREB na poziciji Ser133. U kontekstu eksperimentalnih nalaza ove doktorske disertacije, uočeno je da u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena i u fibroblastima pacijenata s deficijencijom SAHH-a, postoji poremećaj u ekspresiji aktivacije PKA i aktivacije transkripcijskog faktora CREB. Ovaj podatak je posebno značajan s obzirom na to da je istraživanje provedeno na tumorskim staničnim linijama, čime se uspostavlja nova veza između gena SAHH i procesa u tumorskim stanicama. Ova povezanost sugerira da SAHH gen igra ključnu ulogu u regulaciji signalnih putova koji su odgovorni za aktivaciju PKA (Slika 58, Slika 59, Slika 60) i CREB-a (Slika 61, Slika 62, Slika 63, Slika 64), što je ključno za razumijevanje mehanizama koji

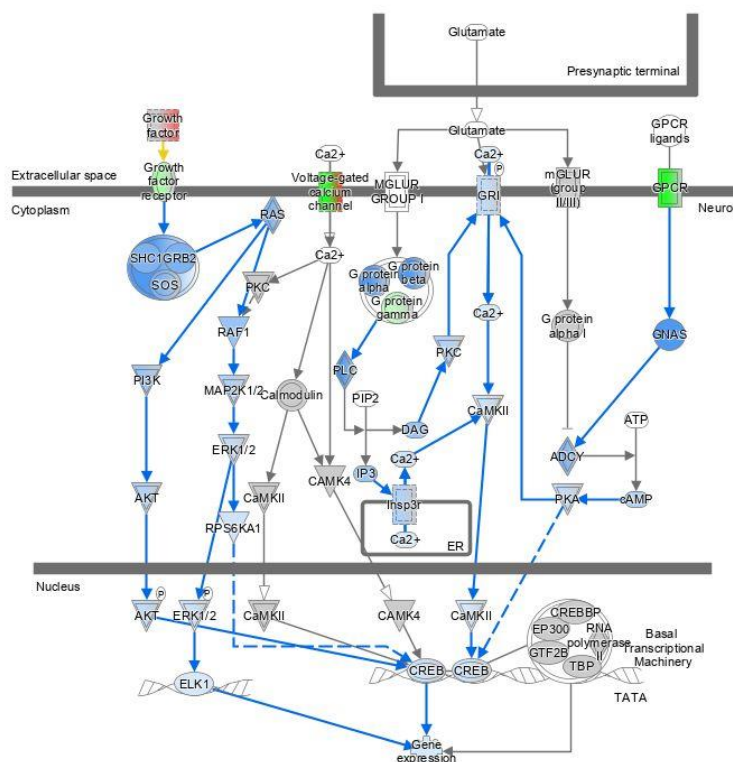


doprinosu tumorigenezi. S obzirom na to da su PKA i CREB vitalni za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja, poremećaji u njihovoj aktivaciji mogu imati značajne posljedice za razvoj i progresiju tumora. Stoga, otkriće da deficijencija SAHH-a utječe na aktivaciju PKA i CREB-a u tumorskim stanicama pruža novi uvid u molekularne mehanizme koji leže u osnovi tumorigeneze.

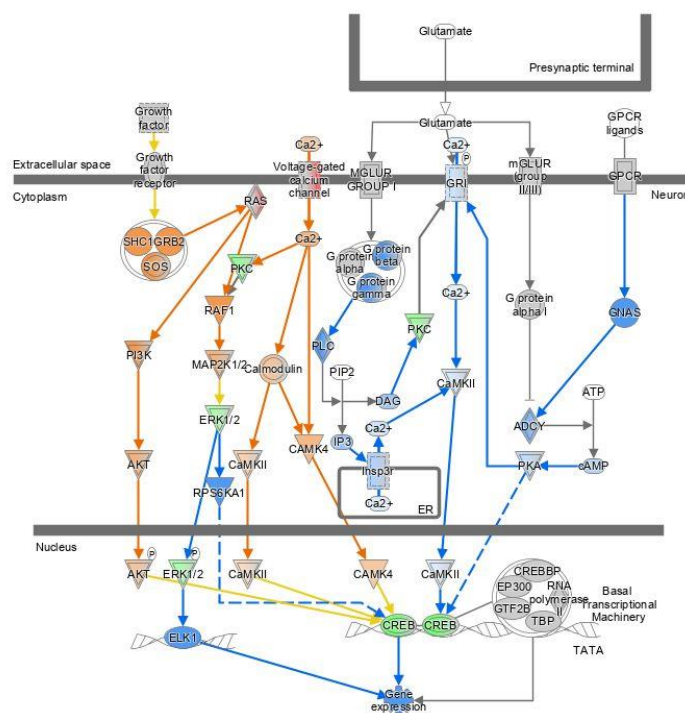
## Prijenos signala putem transkripcijskog faktora CREB



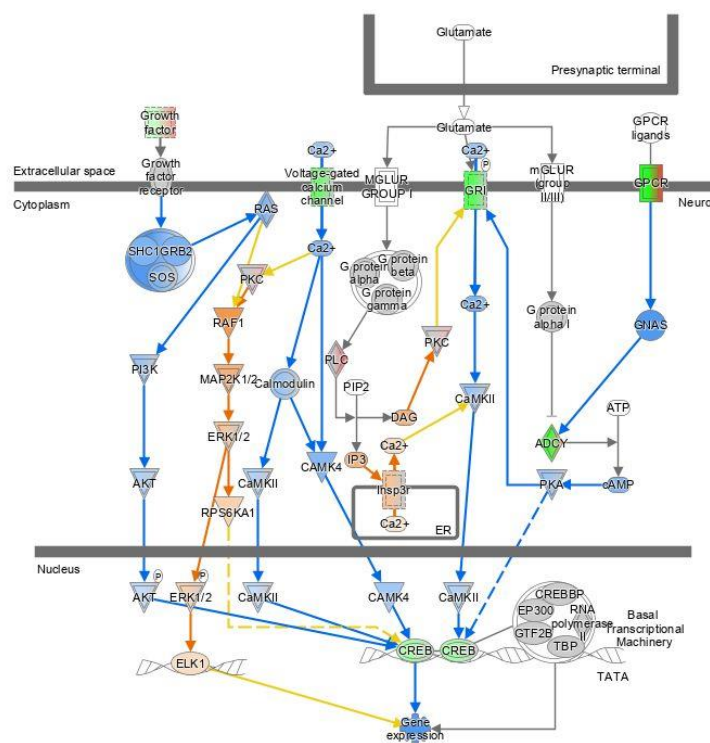
**Slika 61.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u CREB prijenosu signala u neuronima u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0.5 do 0.5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao *c-Raf*): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B (PKB)*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*), cCREB (CAMP-vezujući protein, ciklički adenzin monofosfat vezujući protein, od engl. *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*).



**Slika 62.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u CREB prijenosu signala u neuronima u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B (PKB)*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*), cCREB (CAMP-vezujući protein, ciklički adenzin monofosfat vezujući protein, od engl. *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*).



**Slika 63.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u CREB prijenosu signala u u uzorcima fibroblasta bolesnika CRO s SAHH-a deficijencijom u usporedbi s zdravim uzorkom fibroblasta bolesnika CTRL. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B (PKB)*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*), cCREB (CAMP-vezujući protein, ciklički adenozin monofosfat vezujući protein, od engl. *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*).

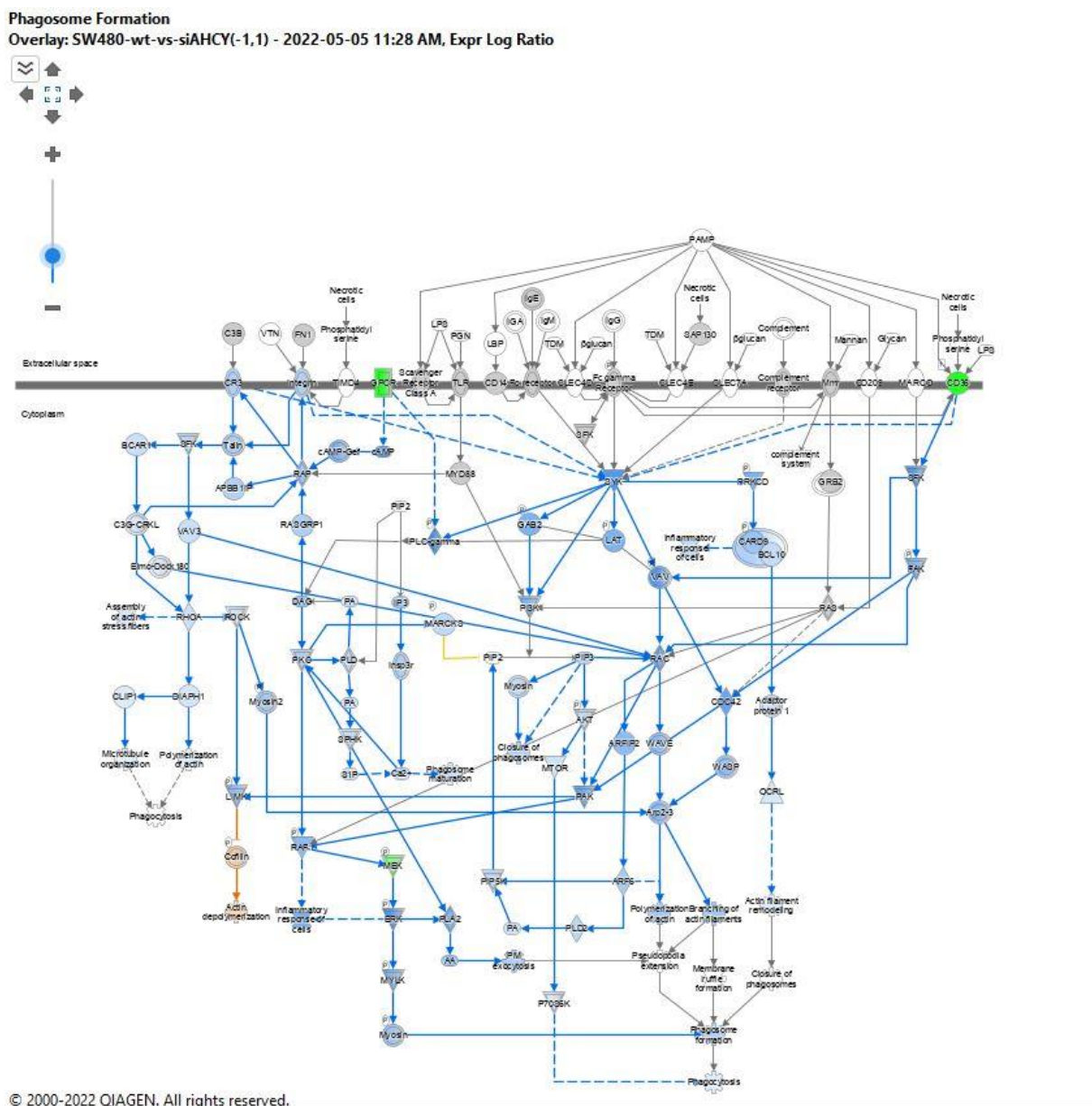


**Slika 64.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u CREB prijenosu signala u u uzorcima fibroblasta bolesnika USA s deficijencijom SAHH-a u usporedbi s zdravim uzorkom fibroblasta bolesnika TENA. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: GPCR (od engl. *G protein-coupled receptors*, Receptori spregnuti s G proteinom), RAF1 (također poznat kao c-Raf): RAF1, RAS: RAS proteini od engl. *RAS proteins*, AKT (Protein kinaza B, PKB, od engl. *Protein Kinase B (PKB)*), PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaza, od engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*), PKC (Protein kinaza C, od engl. *Protein Kinase C*), cCREB (CAMP-vezujući protein, ciklički adenozin monofosfat vezujući protein, od engl. *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*).

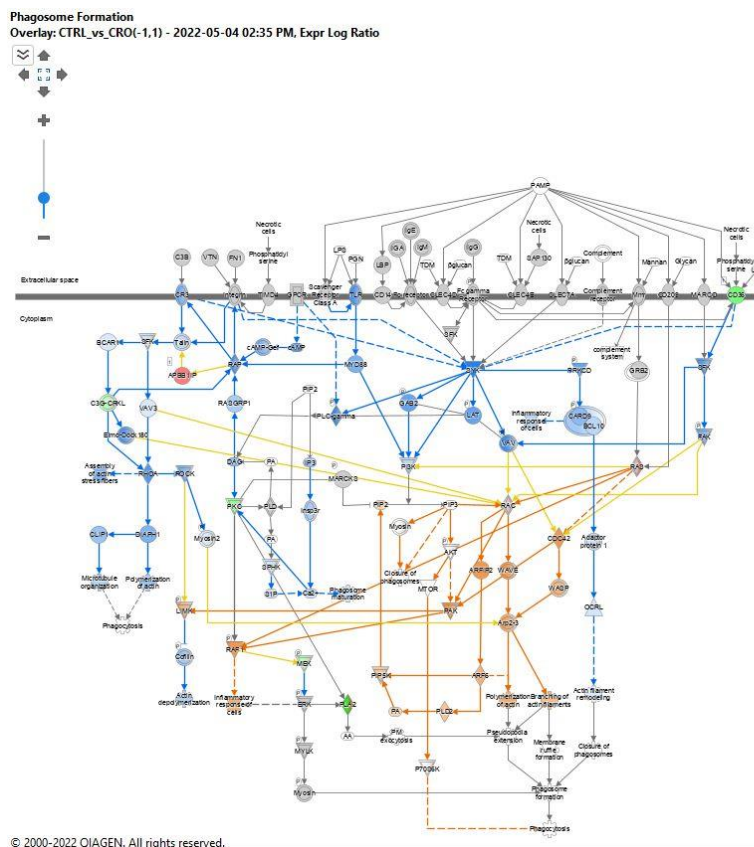
Utišane stanične linije koje imaju sniženu ekspresiju gena *SAHH* i stanice pacijenata s deficijencijom *SAHH*-a pokazuju poremećaje u aktivaciji prijenosu signala putem PKA i CREB-a naglašava ključnu ulogu ovog signalnog puta u regulaciji tumorskih procesa i povezanosti deficijencije *SAHH*-a i tumorigeneze. Ova povezanost produbljuje naše razumijevanje molekularnih mehanizama koji stoje iza tumorigeneze.

## Formiranje fagosoma

U tumorskim staničnim linijama, formiranje fagosoma predstavlja važan proces koji igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog metabolizma, homeostaze i odgovora na stanični stres. Fagosomi su membranske vezikule koje se formiraju tijekom autofagije, procesa u kojem stanice razgrađuju i recikliraju svoje oštećene organele i proteine radi održavanja energetske ravnoteže i preživljavanja. U kontekstu tumorigeneze, formiranje fagosoma može imati kompleksne učinke na proliferaciju, preživljavanje i invaziju tumorskih stanica te može predstavljati važan regulatorni mehanizam u razvoju i progresiji tumora.



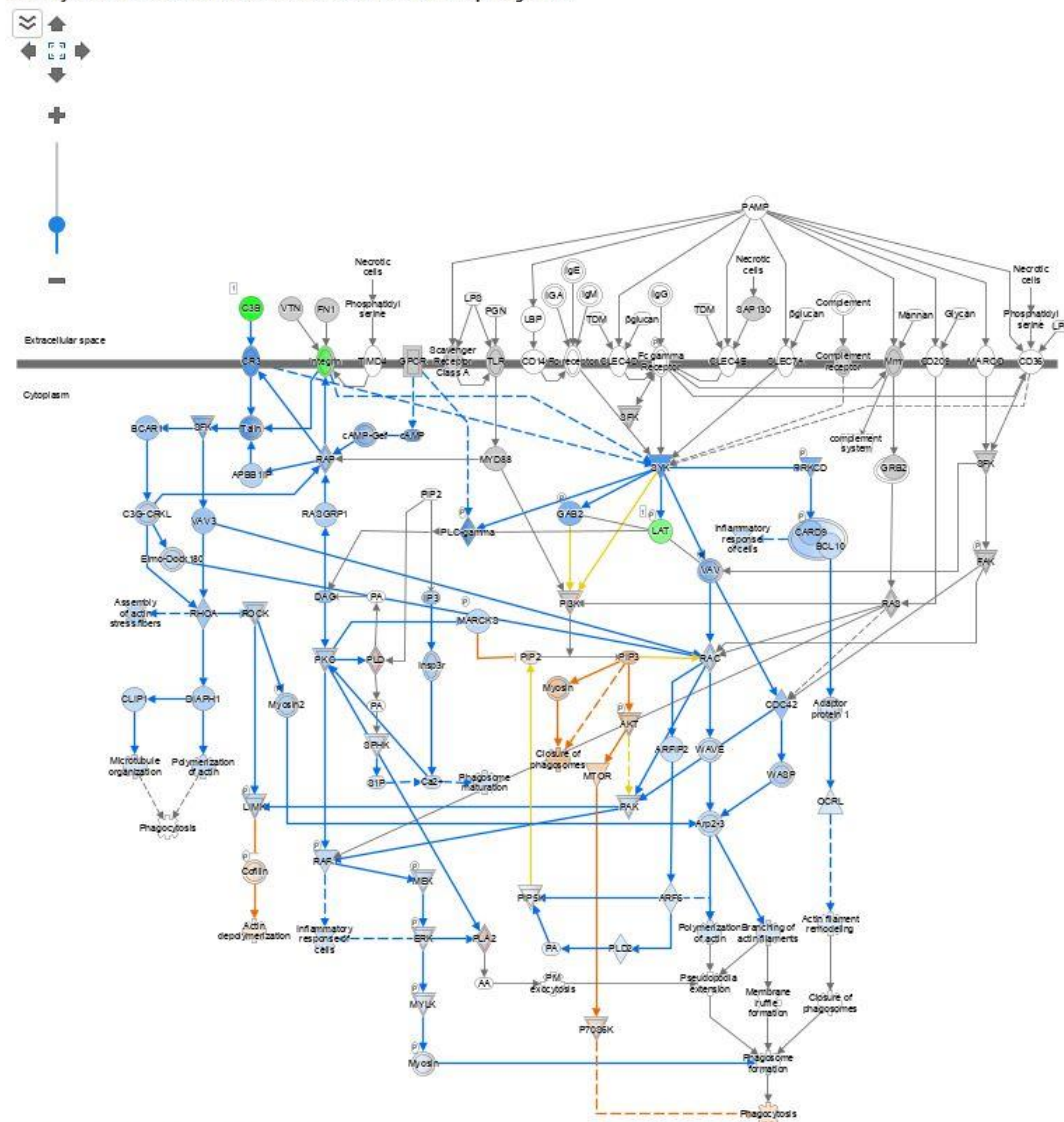
**Slika 65.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (od engl. *Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u procesu formiranja fagosoma u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom SW480. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: RAS-Obitelj RAS gena, (od engl. *Ras Family of Genes*) (RAS geni su proto-onkogeni koji kodiraju male GTPaze; odgovorni su za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja), PIP2-Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, (od engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (lipid koji igra ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji), RAF1-RAF1, (od engl. *RAF1 - RAF1 Proto-Oncogene*), Proto-onkogen, serin/treonin kinaza, CDC42 (od engl. *CDC42 - Cell Division Cycle 42 GTPase*) - Kontrolni protein diobe staničnog ciklusa CDC42GTPaza koja igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (CDC42), PIP5K (od engl. *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*) - Fosfatidilinozitol-4-fosfat 5-kinaza (obitelj gena koja katalizira fosforilaciju PIP2 u PIP3), ARP 2/3 (od engl. *Actin-Related Protein 2/3 complex*) - Protein 2/3 povezan s aktinom kompleks (nije gen, već kompleks proteina koji sudjeluje u nukleaciji aktinskih filamenata), RAC (od engl. *RAC*) - Odnosi se na obitelj gena, uključujući RAC1 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RAC2 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 2 (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), Grananje aktinskih filamenata (od engl. *Branching of actin filaments*) (opisuje stanični proces, a ne specifični gen), CD36 (od engl. *CD36* molekula (trombospondin receptor), C3G - CRKL - Ovo se odnosi na interakciju između C3G (gvanin nukleotidni razmjenjivač faktor, (od engl. *guanine nucleotide exchange factor*) i CRKL (CRK sličan protein od engl. *CRK-like protein*).



**Slika 66.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u procesu formiranja fagosoma u uzorcima fibroblasta bolesnika CRO s deficijencijom SAHH-a u usporedbi s zdravim uzorkom fibroblasta bolesnika CTRL. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: RAS-Obitelj RAS gena, (od engl. *Ras Family of Genes*) (RAS geni su proto-onkogeni koji kodiraju male GTPaze; odgovorni su za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja), PIP2-Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, (od engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (lipid koji igra ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji), RAF1-RAF1, (od engl. *RAF1 - RAF1 Proto-Oncogene*), Proto-onkogen, serin/treonin kinaza, CDC42 (od engl. *CDC42 - Cell Division Cycle 42 GTPase*) - Kontrolni protein diobe staničnog ciklusa CDC42GTPaza koja igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (CDC42), PIP5K (od engl. *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*) - Fosfatidilinozitol-4-fosfat 5-kinaza (obitelj gena koja katalizira fosforilaciju PIP2 u PIP3), ARP 2/3 (od engl. *Actin-Related Protein 2/3 complex*) - Protein 2/3 povezan s aktinom kompleks (nije gen, već kompleks proteina koji sudjeluje u nukleaciji aktinskih filamenata), RAC (od engl. *RAC*) - Odnosi se na obitelj gena, uključujući RAC1 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RAC2 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 2 (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), Grananje aktinskih filamenata (od engl. *Branching of actin filaments*) (opisuje stanični proces, a ne specifični gen), CD36 (od engl. *CD36* molekula (trombospondin receptor), C3G – CRKL - Ovo se odnosi na interakciju između C3G (gvanin nukleotidni razmjenjivač faktor, (od engl. *guanine nucleotide exchange factor*) i CRKL (CRK sličan protein od engl. *CRK-like protein*).

**Phagosome Formation**

Overlay: MCF7.WT.vs.AHCY(-1,1) - 2022-05-05 11:33 AM, Expr Log Ratio



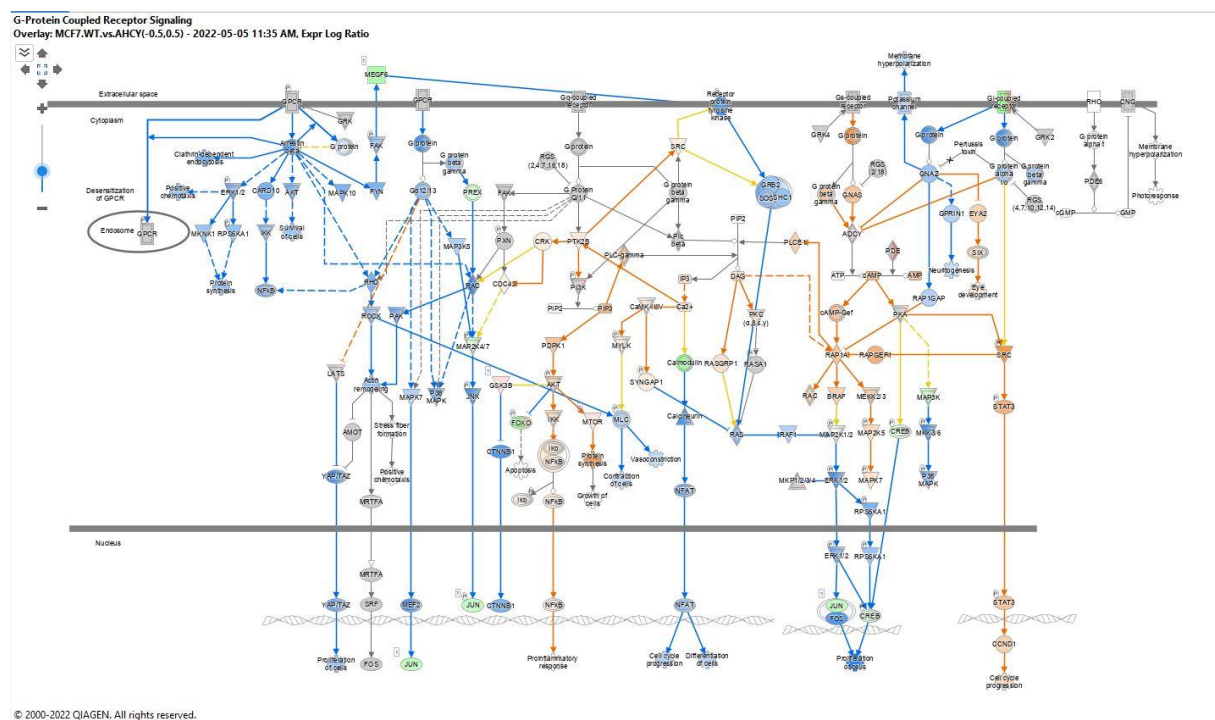
© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 67.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (od engl. *Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u procesu formiranja fagosoma u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: RAS-Obitelj RAS gena, (od engl. *Ras Family of Genes*) (RAS geni su proto-onkogeni koji kodiraju male GTPaze; odgovorni su za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja), PIP2-Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, (od engl. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (lipid koji igra ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji), RAF1-RAF1, (od engl. *RAF1 - RAF1 Proto-Oncogene*), Proto-onkogen, serin/treonin kinaza, CDC42 (od engl. *CDC42 - Cell Division Cycle 42 GTPase*) - Kontrolni protein diobe staničnog ciklusa CDC42GTPaza koja igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa (CDC42), PIP5K (od engl. *Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase*) - Fosfatidilinozitol-4-fosfat 5-kinaza (obitelj gena koja katalizira fosforilaciju PIP2 u PIP3), ARP



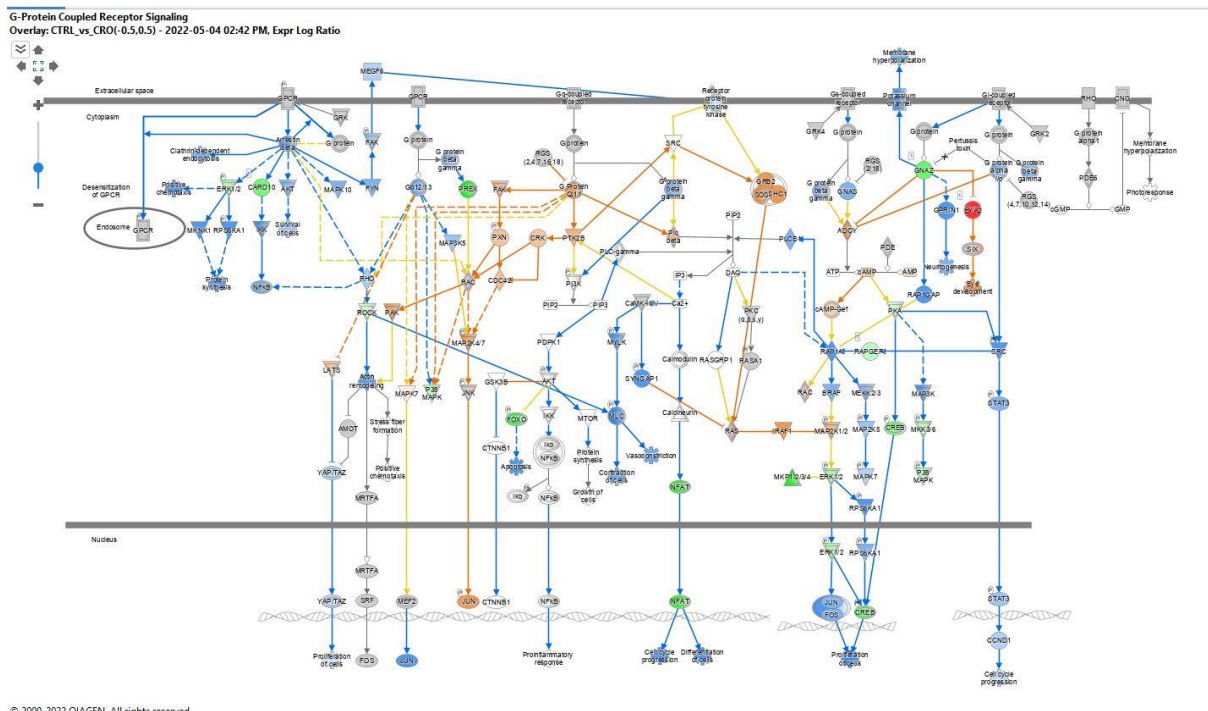
2/3 (od engl. *Actin-Related Protein 2/3 complex*) - Protein 2/3 povezan s aktinom kompleks (nije gen, već kompleks proteina koji sudjeluje u nukleaciji aktinskih filamenata), RAC (od engl. *RAC*) - Odnosi se na obitelj gena, uključujući RAC1 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RAC2 (Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 2 (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), Grananje aktinskih filamenata (od engl. *Branching of actin filaments*) (opisuje stanični proces, a ne specifični gen), CD36 (od engl. *CD36* molekula (trombospondin receptor), C3G – CRKL - Ovo se odnosi na interakciju između C3G (gvanin nukleotidni razmjenjivač faktor, (od engl. *guanine nucleotide exchange factor*) i CRKL (CRK sličan protein od engl. *CRK-like protein*).

U staničnim linijama MCF7, SW480 i HEK293T, primjećujemo značajne promjene u procesu formiranja fagosoma (Slika 65, Slika 66, Slika 67) nakon diferencijalne ekspresije gena. Analizom putova i analizom srži uz pomoć programa IPA, uočili smo povećanu depolimerizaciju aktina i povećanu aktivnost kofilina, što ukazuje na promjene u citoskeletnoj dinamici koje olakšavaju formiranje fagosoma. Osim toga, primjećena je povećana fagocitoza i aktivnost signalnih putova odgovornih za progresiju tumora.



**Slika 68.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putova (*Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem GPCR s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u usporedbi s kontrolnom staničnom linijom MCF7. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -0,5 do 0,5. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: G proteini (od engl. *G protein*) - opći naziv za obitelj proteina

uključenih u prijenos kemijskih signala izvan stanice, uzrokujući promjene unutar stanice. Uključeni su u različite stanične procese, uključujući aktivaciju signalnih putova), GNAS - GNAS Kompleksni Lokus (od engl. *GNAS Complex Locus*), RAC – RAC odnosi se na obitelj gena, uključujući RAC1 Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RAC2 Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 2, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), MAPK7 – Protein kinaza 7 aktivirana mitogenom (od engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase 7*), BRAF – B-Raf Proto-Onkogen, (od engl. *B-Raf Proto-Oncogene*), Serin/Treonin Kinaza (od engl. *Serine/Threonine Kinase*), SRC – SRC Proto-Onkogen, (od engl. *SRC Proto-Oncogene*), Ne-receptorska Tirozin Kinaza (od engl. *Non-Receptor Tyrosine Kinase*), STAT3 – Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Non-Receptor Tyrosine Kinase*), MTOR Mehanistički cilj rapamicina (od engl. *mammalian target of rapamycin*), PIP3-Fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat, (od engl. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), (PIP3 je produkt enzimske aktivnosti i ne odnosi se izravno na gen, već na molekulu koja igra ključnu ulogu u mnogim signalnim putovima), PDK1-Fosfoinozimid-ovisna proteinska kinaza 1 (od engl. *Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*), GSK3B – Kinaza glikogen sintaze 3 beta (od engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*).



**Slika 69.** Rezultati analize srži (od engl. *Core analysis*) i analize putove (od engl. *Pathways analysis*) dobiveni uz pomoć programa IPA u kojima su identificirane diferencijalne promjene u prijenosu signala putem GPCR u uzorcima fibroblasta bolesnika CRO s SAHH-a deficijencijom u usporedbi s zdravim uzorkom fibroblasta bolesnika CTRL. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Parameteri analize diferencijalne ekspresije gena s fokusom na faktor povećanja (od engl. *Fold change*) su unutar raspona vrijednosti od -1 do 1. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Puna linija označava direktnu interakciju molekula dok isprekidana linija označava indirektnu interakciju molekula. Ljubičasta boja označava interakciju više molekula. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: G proteini (od engl. *G protein*) - opći naziv za obitelj proteina uključenih u prijenos kemijskih signala izvan stanice, uzrokujući promjene unutar stanice. Uključeni su u različite stanične procese, uključujući

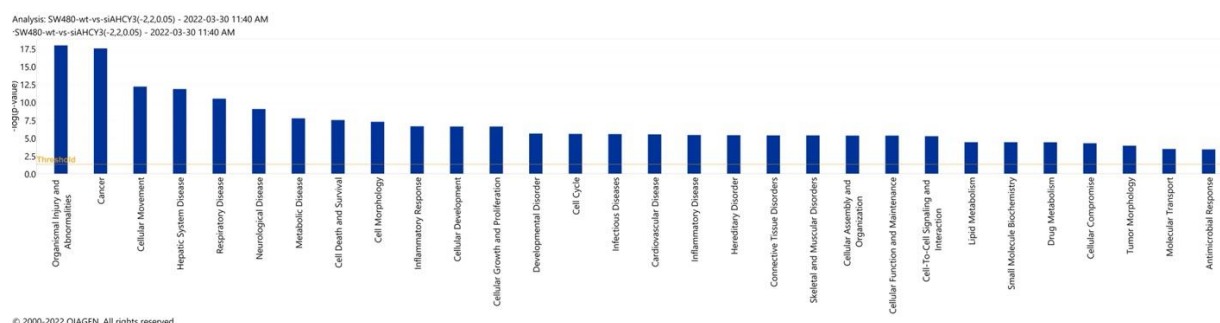
aktivaciju signalnih putova), GNAS - GNAS Kompleksni Lokus (od engl. *GNAS Complex Locus*), RAC – RAC odnosi se na obitelj gena, uključujući RAC1 Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 1, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i RAC2 Ras-povezani C3 botulinum toksin supstrat 2, (od engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), MAPK7 – Protein kinaza 7 aktivirana mitogenom (od engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase 7*), BRAF – B-Raf Proto-Onkogen, (od engl. *B-Raf Proto-Oncogene*), Serin/Treonin Kinaza (od engl. *Serine/Threonine Kinase*), SRC - SRC Proto-Onkogen, (od engl. *SRC Proto-Oncogene*), Ne-receptorska Tirozin Kinaza (od engl. *Non-Receptor Tyrosine Kinase*), STAT3 – Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (od engl. *Non-Receptor Tyrosine Kinase*), MTOR Mehanistički cilj rapamicina (od engl. *mammalian target of rapamycin*), PIP3-Fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat, (od engl. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), (PIP3 je produkt enzimske aktivnosti i ne odnosi se izravno na gen, već na molekulu koja igra ključnu ulogu u mnogim signalnim putovima), PDK1 – Fosfoinozimid-ovisna proteinska kinaza 1 (od engl. *Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*), GSK3B – Kinaza glikogen sintaze 3 beta (od engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*).

U tumorskim staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (stanična linija *MCF7*) i u stanicama fibroblasta bolesnika s deficijencijom *SAHH*-a (uzorak *CRO*) u procesu signalizacije putem GPCR-a, primjećena je povećana aktivnost nekoliko ključnih kinaza, uključujući Jun, AKT, SRC, STAT3, mTOR i FAK (Slika 68, Slika 69). Ova promjena događa se u kontekstu snižene razine ekspresije GPCR-a (G-protein spregnutih receptora), što može rezultirati nedostatkom vanjskog signala putem GPCR. Kao posljedica toga, unutarstanične kinaze mutiraju i postaju aktivnije, što može potaknuti signalizaciju unutar stanice. Jun je komponenta AP-1 transkripcijskog faktora koji igra ključnu ulogu u regulaciji rasta stanica i odgovoru na stres. AKT, poznat i kao Protein kinaza B, ključan je signalni protein u mnogim staničnim procesima, uključujući metabolizam, proliferaciju, preživljavanje stanica, rast i angiogenezu. Dodatno, SRC pripada obitelji ne-receptorskih tirozin kinaza koje su uključene u regulaciju rasta, diferencijacije i preživljavanja stanica. Prijenosnik signala i aktivator transkripcije 3, STAT3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) je transkripcijski faktor koji prenosi signale iz citoplazme u jezgru, odgovarajući na različite stanične stimulanse, uključujući citokine i faktore rasta. Protein kinaza mTOR (od engl. *mammalian target of rapamycin*) je ključni regulator staničnog rasta i metabolizma, odgovoran za prilagodbu staničnih procesa na okolišne uvjete. Protein kinaza mTOR igra ključnu ulogu u regulaciji rasta stanica, proliferacije, mobilnosti stanica, sinteze proteina, autofagije i preživljavanja. Središnji dio mTOR signalnog puta je mTOR protein, koji je važan za detekciju i integraciju različitih vanjskih i unutarnjih signala stanice, uključujući hranjive tvari, energiju (ATP razinu), rastuće faktore i stres. Ovaj put je ključan za mnoge fiziološke procese i može pridonijeti razvoju različitih bolesti, uključujući tumor, metaboličke poremećaje i

neurodegenerativne bolesti, kada je dereguliran. Protein FAK (od engl. *Focal Adhesion Kinase*) je tirozin kinaza koja igra važnu ulogu u signalizaciji povezanoj s adhezijom stanica i migracijom. Povećana aktivnost ovih kinaza u tumorskim staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* može dovesti do promjena u signalnim putovima koji reguliraju ključne aspekte stanične funkcije, uključujući proliferaciju, preživljavanje i migraciju.

#### 4.5. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u sve tri stanične linije s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u odnosu na kontrolnu staničnu liniju

##### 4.5.1 Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*

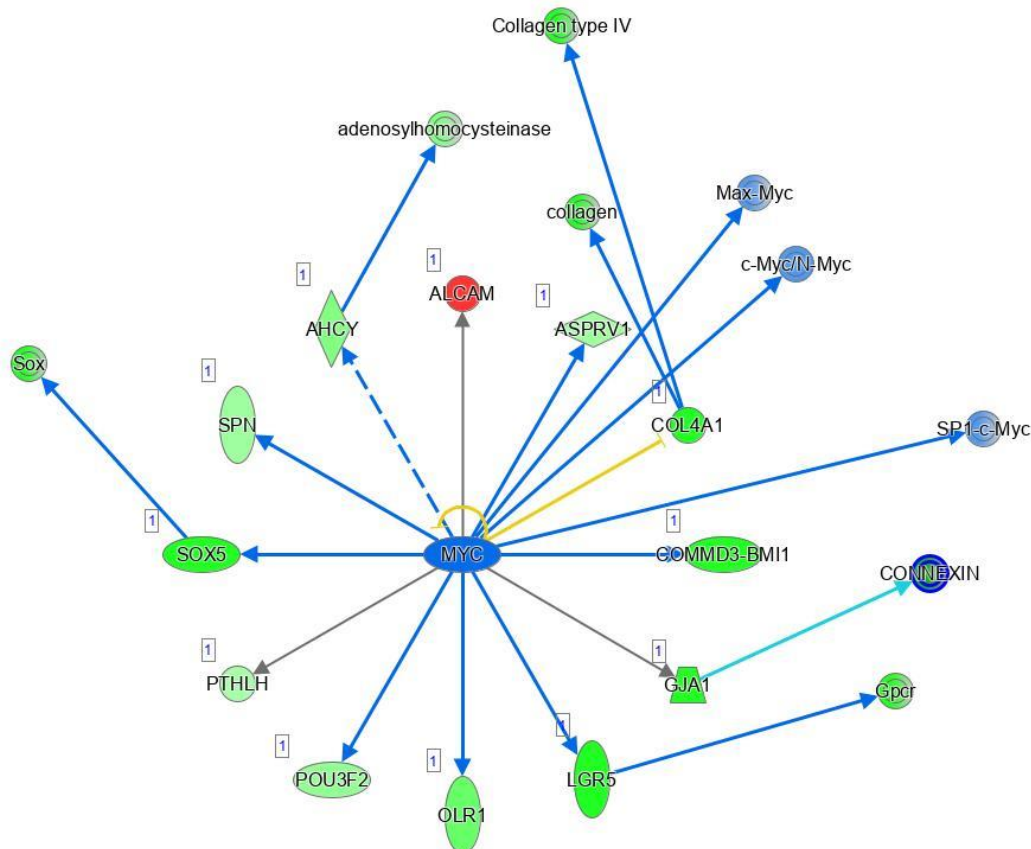


**Slika 70.** Kategorizacija promijenjenih signalnih putova u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, s obzirom na tip poremećaja. Analiza srži (od engl. *Core analysis*) provedena je uz pomoć programa IPA. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: Abnormalnosti organizma, (od engl. *Organismal Injury and Abnormalities*), Tumor (od engl. *Cancer*), Stanično pokretanje (od engl. *Cellular Movement*).

U programu IPA (od engl. *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, uspješni smo kategorizirati naše podatke o diferencijalnoj ekspresiji s posebnim naglaskom na poremećaje uzrokovane deficijencijom *SAHH*-a. Rezultati su pokazali da je najveći broj diferencijalno eksprimiranih gena zastupljen u kategorijama koje se odnose na tumore, inicijaciju staničnog ciklusa, te poremećaje i abnormalnosti unutar organizma (Slika 70). Ovi podaci pružaju uvid u potencijalne mehanizme putem kojih deficijencija *SAHH*-a može doprinijeti razvoju i progresiji tumora, kao i drugim staničnim i organizacijskim abnormalnostima. Ovaj postupak je ključan za dublje razumijevanje dobivenih podataka i omogućava nam bolju interpretaciju bioloških procesa koji su se dogodili u ovom eksperimentalnom sustavu s utišanom ekspresijom *SAHH*. Spomenuto je da analiza srži ima

moćnost izračuna krovnog regulatora uz pomoć obogaćenja nizvodnih gena kao zajednički krovni regulator izdvojile se se izoforme *MYC* gena: *MYC 2* (Slika 73), *MYC 5* (Slika 71) i *MYC 3* (Slika 72) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. U ovom slučaju predviđa se da krovni regulator *MYC* djeluje inhibicijski na veliki set gena.

#### MYC 5

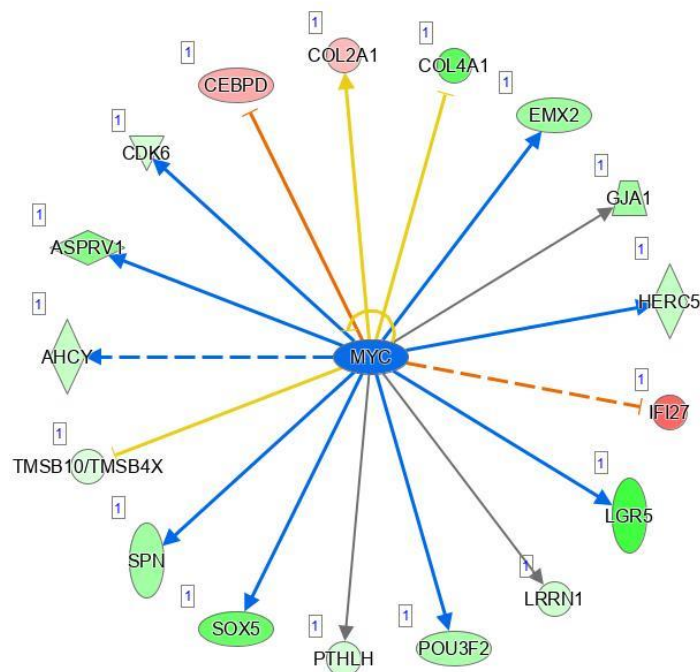


© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 71.** Rezultat kategorizacije podataka i predikcije krovnog regulatora *MYC* uz pomoć programa IPA i analize srži (od eng. *Core Analysis*) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: LGR5 (od engl. *Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) = Leucinski receptor spregnut s G proteinom, (od engl. *Activated leukocyte cell adhesion molecule*): ALCAM = Aktivirana molekula adhezije stanica leukocita, AHCY = SAHH (od engl. *Adenosylhomocysteinase*) = S-adenozil homocistein hidrolaza, SOX5 (od engl. *SRY-box transcription factor 5*) = transkripcijski faktor SOX5, SPN (od engl. *Sialoporphin*): SPN gen sijaloforin, OLR1= OLR1 Receptor 1 za oksidirane lipoproteine niske gustoće, PTHL (od engl. *Parathyroid hormone-like hormone*) = Hormon sličan paratiroidnom hormonu, POU3F2 (od engl. *POU class 3 homeobox 2*) = POU razred 3 homeobox 2.

Nakon diferencijalne ekspresije gena i analize srži (od engl. *Core analysis*) predviđa se *MYC5* kao krovni regulator transkripcije koji regulira aktivnost gen (Slika 70) *LGR5*, *ALCAM*, *SAHH*, *SOX5*, *SPN*, *OLR1*, *COLLAGEN*, *COLLAGEN TYPE IV*, *SPN*, *PTHLH* i *POU3F2*. Gen *LGR5* je identificiran kao gen koji je u interakciji s GPCR. U kontekstu tumorskih procesa i migracije, ovi geni imaju važne uloge. Gen *LGR5* (od engl. *Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) je često povezan s tumorskim procesima. Uz to, *ALCAM* (od engl. *Activated leukocyte cell adhesion molecule*) je gen koji igra ulogu u adheziji stanica i interakcijama između stanica. Povezan je s migracijom stanica i invazijom, te se njegova disfunkcija može povezati s promjenama u migracijskim svojstvima stanica. Dodatno, *SOX5* je transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena u različitim staničnim procesima, uključujući razvoj i diferencijaciju stanica. Povezan je s različitim tipovima tumora i može utjecati na migraciju stanica. Također, gen *SPN* (od engl. *Sialophorin*) kodira glikoprotein koji je uključen u interakcije između stanica i prijenos signala. Može igrati ulogu u migraciji stanica i invaziji u tumorskim procesima. Gen *OLR1* (od engl. *Oxidized low-density lipoprotein receptor 1*) je gen koji kodira receptor za oksidirane lipoproteine i može biti povezan s procesima upale i stanične signalizacije u tumorskim procesima. Gen *PTHLH* (od engl. *Parathyroid hormone-like hormone*) kodira hormon sličan paratiroidnom hormonu i igra važnu ulogu u regulaciji metabolizma kalcija i fosfata. Može biti povezan s proliferacijom stanica i tumorskim procesima. Gen *POU3F2* (od engl. *POU class 3 homeobox 2*) kodira transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju gena u različitim staničnim procesima, uključujući razvoj i diferencijaciju stanica. Može biti povezan s tumorskim procesima i migracijom stanica. Ukratko, ovi geni imaju različite funkcije u tumorskim procesima i migraciji, te njihova regulacija *MYC5* izoformom može imati značajan utjecaj na biološke procese povezane s razvojem tumora i migracijom stanica. Snižena ekspresija u tumorima je zabilježena kod proteina *SPN* (od engl. *Sialophorin*) i *POU3F2* (od engl. *POU class 3 homeobox 2*).

MYC 3



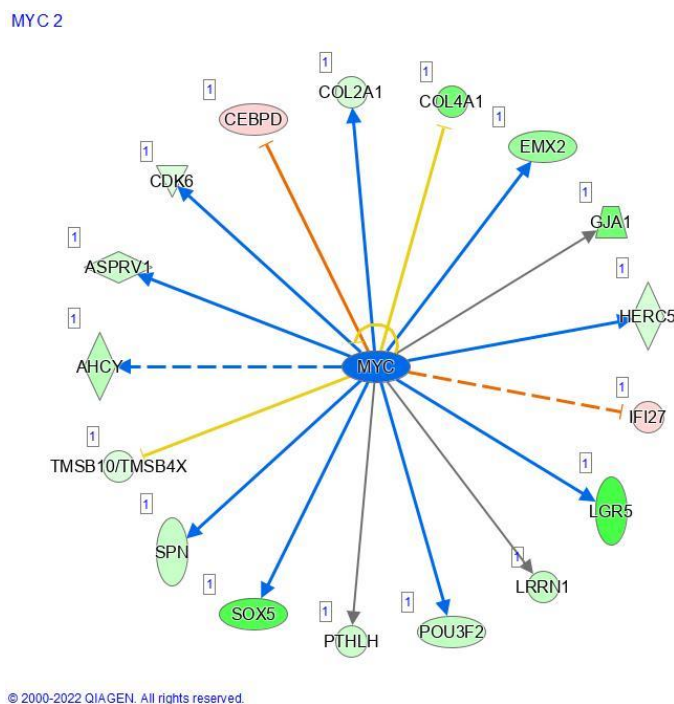
© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 72.** Rezultat kategorizacije podataka i predikcije krovnog regulatora MYC uz pomoć IPA programa i analize srži (od eng. *Core Analysis*) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*). Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: PTHLH (od engl. *Parathyroid hormone-like hormone*) = Hormon sličan paratiroidnom hormonu, SOX5 (od engl. *SRY-box transcription factor 5*) = Transkripcijski faktor SOX5 (SRY - box faktor 5), SPN (od eng. *Sialophorin*) = Sijaloforin, LG5 (od eng. *Leukocyte antigen G5*) = Leukocitni antigen G5, IFI27 (od engl. *Interferon alpha-inducible protein 27*) = Protein 27 induciran interferonom alfa, AHCY = SAHH (od engl. *Adenosylhomocysteinase*) Adenozilhomocisteinaza = S-adenozil homocistei hidrolaza, CDK6 (od engl. *Cyclin-dependent kinase 6*) = Ciklin - ovisna kinaza 6, EMX2 (od engl. *Empty spiracles homeobox 2*) = Homeobox 2 praznih spirakula, COL4A1 (od engl. *Collagen type IV alpha 1 chain*) = Kolagen tipa IV alfa lanac 1, CEBPD (od engl. *CCAAT/enhancer-binding protein delta*) = CCAAT/pojačivač-vezujući protein delta, COL2A1 (od engl. *Collagen type II alpha 1 chain*) = Kolagen tipa II alfa 1 lanac, HERC5 (od engl. *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5*) = E3 ubikvitin-protein ligaza 5 s HECT i RLD domenom, LRRN1 (od engl. *Leucine-rich repeat neuronal protein 1*) = neuronalni protein 1 bogat leucinom, GJA1 (od engl. *Gap junction alpha-1 protein*) = Alfa-1 protein pukotinskih spojeva, TMSB10/TMSB4X (od engl. *Thymosin beta-10/Thymosin beta-4X*) = Timozin beta-10/Timozin beta-4X.

Nakon analize diferencijalne ekspresije gena u programu IPA, predviđa se izoforma *MYC3* kao krovni regulator transkripcije regulira aktivnost sljedećih gena (Slika 72) : *PTHLH*, *SOX5*, *SPN*, *LG5*, *IFI27*, *SAHH*, *CDK6*, *EMX2*, *COL4A1*, *CEBPD*, *COL2A1*, *HERC5*, *LRRN1*, *GJA1*,

*TMSB10/TMSB4X*. Ovi geni imaju različite uloge u tumorskim procesima, migraciji stanica ili su povezani s deficijencijom SAHH-a. Evo kratkog pregleda njihovih funkcija. Protein PTHLH (od engl. *Parathyroid hormone-like hormone*) je protein uključen u regulaciju metabolizma kalcija, proliferaciju stanica i može doprinijeti metastaziranju tumora. Transkripcijski faktor SOX5 (od engl. *SRY-box transcription factor 5*) sudjeluje u razvoju i diferencijaciji stanica, može biti povezan s invazijom i metastazom tumora. Dodatno, SPN (od engl. *Sialophorin*) je glikoprotein koji sudjeluje u staničnoj adheziji i signalizaciji, može utjecati na migraciju i invaziju tumora. Također, IFI27 (Interferon, od engl. *Alpha-inducible protein 27*) može biti povezan s odgovorom na interferon i ima ulogu u progresiji tumora. Ciklin ovisna kinaza CDK6 (od engl. *Cyclin-dependent kinase 6*) je ključna za regulaciju staničnog ciklusa, može promovirati rast tumora inhibiranjem procesa diferencijacije stanica. Nadalje, EMX2 (od engl. *Empty spiracles homeobox 2*) je transkripcijski faktor koji može imati ulogu u razvoju i diferencijaciji, povezan s nekoliko vrsta tumora. Koalgeni COL4A1 (od engl. *Collagen, type IV, alpha 1*) i COL2A1 (od engl. *Collagen, type II, alpha 1*) pružaju strukturnu podršku tkivima i mogu biti uključeni u migraciju tumora i metastaziranje. Nadalje, CEBPD (od engl. *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta*) je faktor transkripcije koji može biti uključen u upalne odgovore i odgovor na stres, povezan s nekim tumorskim procesima. Ubikvitin protein ligaza HERC5 (od engl. *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5*) je uključena u imunološki odgovor, može imati ulogu u odgovoru na virusne infekcije i potencijalno u tumorskim procesima. Protein LRRN1 (od engl. *Leucine rich repeat neuronal 1*) može biti uključen u razvojne procese i signalizaciju u mozgu te je potencijalno povezan s tumorskim procesima. Gen *GJA1* (od engl. *Gap junction protein, alpha 1*) kodira protein koji formira stanične spojeve, važan je za komunikaciju između stanica i može utjecati na širenje signala povezanih s rastom tumora. Aktin vezujući protein MSB10/TMSB4X (od engl. *Thymosin beta 10/Thymosin beta 4, X-linked*) može utjecati na promjene u citoskeletu, migraciju stanica i metastaziranje tumora. Timozin beta 10/Timozin beta 4, X-povezan je važan regulator procesa kao što su migracija stanica, remodeliranje citoskeleta i ozdravljenje rana. Ovi geni zajedno igraju složene uloge u regulaciji tumorskih procesa, migraciji stanica i potencijalno su povezani s deficijencijom SAHH-a, što ukazuje na njihovu važnost u razumijevanju mehanizama tumorskih procesa.





**Slika 73.** Rezultat kategorizacije podataka i predikcije krovnog regulatora MYC2 uz pomoć programa IPA i analize srži (od eng. *Core Analysis*) u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*). Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: PTHLH (od engl. *Parathyroid hormone-like hormone*) = Hormon sličan paratiroidnom hormonu, SOX5 (od engl. *SRY-box transcription factor 5*) = Transkripcijski faktor SOX5 (SRY-box faktor 5), SPN (od engl. *Sialophorin*) = Sijaloforin, LG5 (od engl. *Leukocyte antigen G5*) = Leukocitni antigen G5, IFI27 (od engl. *Interferon alpha-inducible protein 27*) = Protein 27 induciran interferonom alfa, AHCY = SAHH (od engl. *Adenosylhomocysteinase*) = Adenozilhomocisteinaza, S – adenozil homocistein hidrolaza, CDK6 (od engl. *Cyclin-dependent kinase 6*) = Ciklin-ovisna kinaza 6, EMX2 (od engl. *Empty spiracles homeobox 2*) = Homeobox 2 praznih spirakula, COL4A1 (od engl. *Collagen type IV alpha 1 chain*) = Kolagen tipa IV alfa lanac 1, CEBPD (od engl. *CCAAT/enhancer-binding protein delta*) = CCAAT/pojačivač-vezujući protein delta, COL2A1 (od engl. *Collagen type II alpha 1 chain*) = Kolagen tipa II alfa 1 lanac, HERC5 (od engl. *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5*) = E3 ubikvitin protein ligaza 5 s HECT i RLD domenom, LRRN1 (od engl. *Leucine-rich repeat neuronal protein 1*) = neuronalni protein 1 bogat leucinom, GJA1 (od engl. *Gap junction alpha-1 protein*) = Alfa-1 protein pukotinskih spojeva, TMSB10/TMSB4X (od engl. *Thymosin beta-10/Thymosin beta-4X*) = Timozin beta-10/Timozin beta-4X.

Prema rezultatima dobivenim nakon diferencijalne ekspresije gena u programu IPA (Slika 73), *MYC2* izoforma *MYC* gena smatra se krovnim regulatorom transkripcije nakon analize diferencijalne ekspresije gena te regulira aktivnost sljedećih gena *CDK6*, *SPN*, *SOX5*, *LGR5*, *LRRN1*, *CEBPD*, *COL2A1*, *COL4A1*, *EMX2*, *GJA1*, *IFI27*, *ASPRV1*, *TMSB10*, *TMSB4X*.



gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: ALCAM (od engl. *Adhesion molecule ALCAM*) = Adhezijska molekula ALCAM, BCL11A (od engl. *Transcription factor BCL11A*) = Transkripcijski faktor BCL11A, CHI3L1AFAP1-AS1 (od engl. *Long non-coding RNA CHI3L1AFAP1-AS1*) = Duga nekodirajuća RNA CHI3L1AFAP1-AS1, TGFBI (od engl. *Transforming growth factor beta-induced protein*) = Protein induciran transformirajućim faktorom rasta beta, HDAC9 (od engl. *Histone deacetylase 9*) = Histonska deacetilaza 9, HNF1A (od engl. *Transcription factor HNF1A*) = Transkripcijski faktor HNF1A, GPX2 (od engl. *Glutathione peroxidase 2*) = Glutation peroksidaza 2, BMP2 i BMP5 (od engl. *Bone morphogenetic protein family proteins*) = Proteini obitelji koštanih morfogenetskih proteina 2 i 5, CD226, CD36, i CDH11 (od engl. *Cluster of differentiation 226, 36, Cadherin 11*) = adhezijske molekule kadherin 11, LGR5 (od engl. *Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) = transmembranski receptor LGR5, receptor 5 spregnut s G proteinom bogatim leucinom.

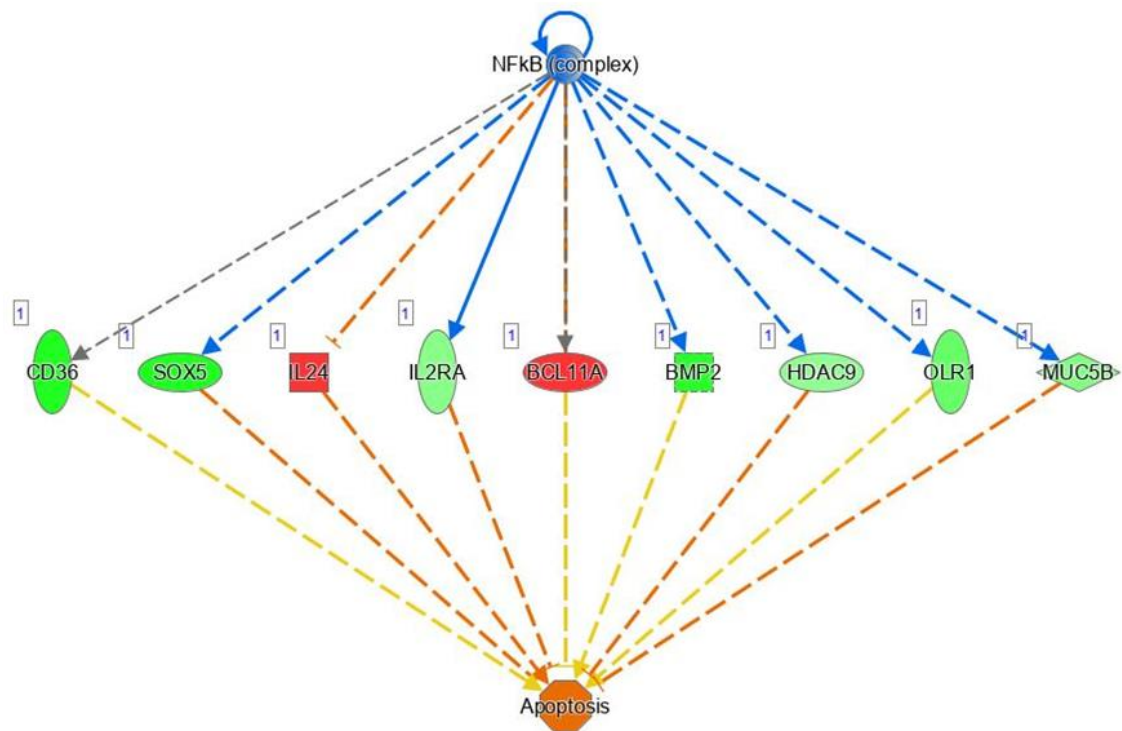
ADGRL2 ↓	AFAP1-AS1 ↑	ALCAM ↑	ALPK2 ↓
AMOTL1 ↓	ANPEP ↓	ANXA1 ↓	BCL11A ↑
BMP2 ↓	BMP5 ↓	CD226 ↓	CD36 ↓
CDH11 ↓	CES1 ↓	CHI3L1 ↑	CHL1 ↓
COL4A1 ↓	COMMD3-BMI1 ↓	CSRNP3 ↓	DEFA5 ↓
DPEP1 ↓	DPP4 ↓	GJA1 ↓	GPX2 ↓
HDAC9 ↓	HNF1A ↓	IGF2 ↓	IL24 ↑
IL2RA ↓	KCNMA1 ↑	KITLG ↓	LGR5 ↓
MAP2K6 ↓	MUC16 ↓	MUC5B ↓	NEUROD1 ↓
NGFR ↓	NKX2-5 ↓	OLR1 ↓	PAEP ↑
PDE4B ↓	POU2AF1 ↓	POU3F2 ↓	PPP1R1B ↓
PTHLH ↓	RASSF6 ↓	SEMA3A ↓	SEMA3C ↓
SERPINI1 ↓	SORCS2 ↑	SOX5 ↓	SPN ↓
SSTR1 ↓	SYCP2 ↓	TCF4 ↓	TFF3 ↓
TGFBI ↑			

**Slika 75.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji SW480 za gen *SAHH* u programu IPA u procesu apoptoze dobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju SW480. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: ALCAM (od engl. *Adhesion molecule ALCAM*) = Adhezijska molekula ALCAM, BCL11A (od engl. *Transcription factor BCL11A*) = Transkripcijski faktor BCL11A, CHI3L1AFAP1-AS1 (od engl. *Long non-coding RNA CHI3L1AFAP1-AS1*) = Duga nekodirajuća RNA CHI3L1AFAP1-AS1, TGFBI (od engl. *Transforming growth factor beta-induced protein*) = Protein induciran transformirajućim faktorom rasta beta, HDAC9 (od engl. *Histone deacetylase 9*) = Histonska deacetilaza 9,

HNF1A (od engl. *Transcription factor HNF1A*) = Transkripcijski faktor HNF1A, GPX2 ( od engl. *Glutathione peroxidase 2*) = Glutation peroksidaza 2, BMP2 i BMP5 (od engl. *Bone morphogenetic protein family proteins*) = Proteini obitelji koštanih morfogenetskih proteina 2 i 5, CD226, CD36, i CDH11 (od engl. *Cluster of differentiation 226, 36 Cadherin 11*) = adhezijske molekule kadherin 226, 36, 11, LGR5 (od engl. *Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) = transmembranski receptor LGR5, receptor 5 spregnut s G proteinom bogat leucinom.

Slika 74. prikazuje sve gene koji aktivno sudjeluju u procesu apoptoze unutar stanične linije SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u IPA programu. Ovaj vizualni prikaz ilustrira diferencijalnu ekspresiju tih gena u usporedbi s kontrolnim stanicama, naglašavajući pojačanu aktivaciju signalnog puta apoptoze u našoj utišanoj staničnoj liniji za gen *SAHH*. Rezultati (Slika 74, Slika 75) pružaju ključne uvide u genetske promjene povezane s apoptozom u našoj utišanoj staničnoj liniji. Boje jasno ističu promjene u ekspresiji gena, što je od suštinske važnosti za razumijevanje utjecaja gena *SAHH* i njegovih regulatora na proces apoptoze u ovom eksperimentalnom kontekstu.

32

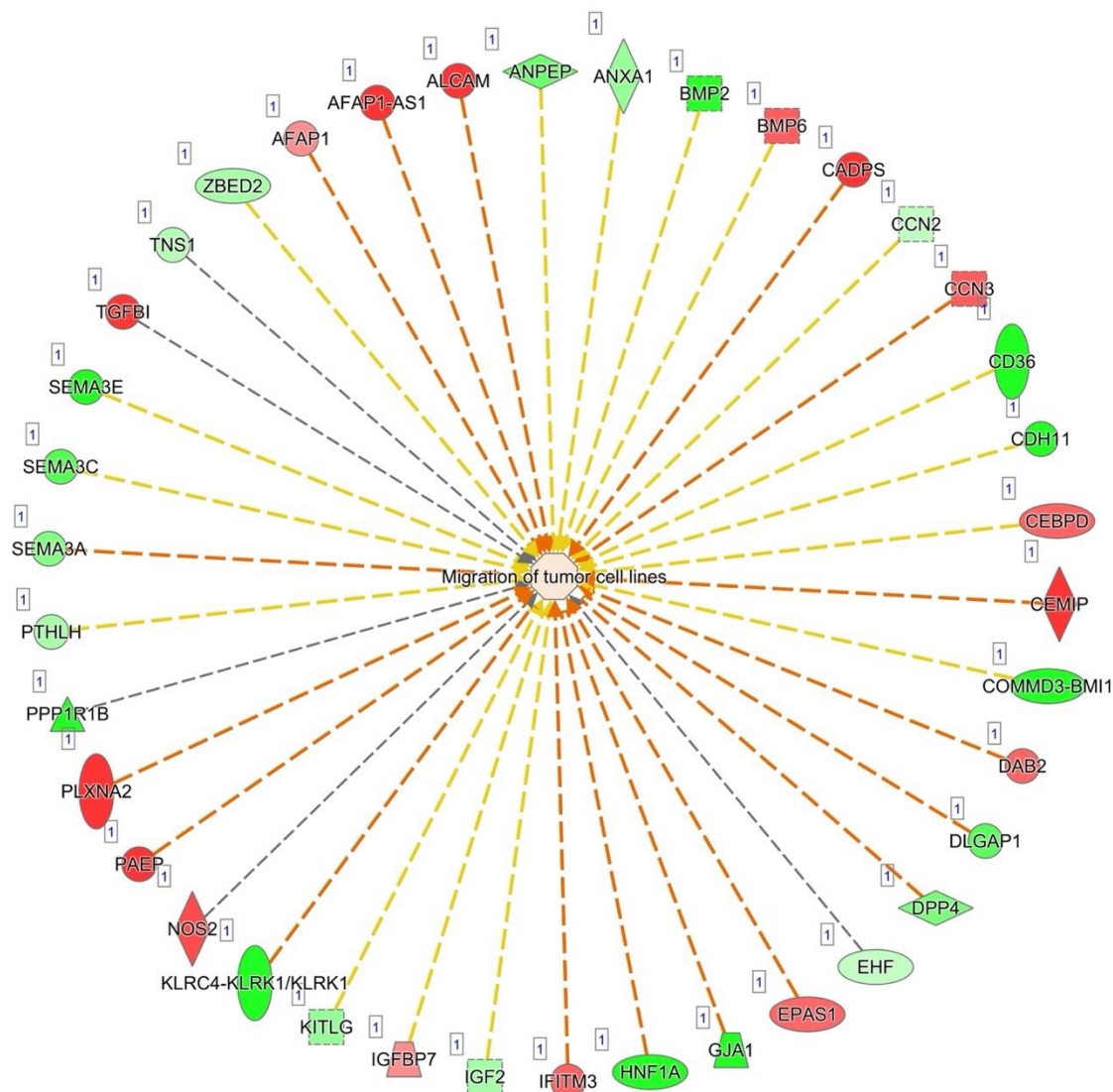


© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 76.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj tumorskoj liniji SW480 s utišanim genom *SAHH* u IPA programu u procesu apoptoze dobiveni pomoću analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju SW480. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja

označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: od engl. *Apoptosis*- apoptoza, BCL11A: od engl. *B-Cell CLL/Lymphoma 11A* – CLL/limfom B-stanica 11A, BMP2 od engl. *Bone Morphogenetic Protein 2* – Koštani morfogenetski protein 2, HDAC9 (od engl. *Histone Deacetylase 9*) – histonska deacetilaza 9, OLR1: (od engl. *Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1*) – Receptor 1 za oksidirani lipoprotein niske gustoće, IL24: Interleukin 24, SOX5: (od engl. *SRY-Box Transcription Factor 5*), Transkripcijski factor 5 SRY box, CD36: (od engl. *Cluster of Differentiation 36*) – Klaster diferencijacije 36, receptor za trombospondin.

Vizualizacija koju promatramo (Slika 76) pruža uvid u ključne molekule koje igraju značajnu ulogu u apoptozi i regulaciji NF-kB procesa. Među ovim molekulama su CD36, SOX5, IL24, IL2RA, BMP2, HDAC9, OLR1, MUC5B i BCL11A. Primjećujemo povišenu ekspresiju molekula IL24 i BCL11A, što sugerira njihovu aktivnu ulogu u apoptozi i regulaciji NF-kB procesa. S druge strane, ostale molekule poput CD36, SOX5, IL2RA, BMP2, HDAC9, OLR1 i MUC5B pokazuju smanjenu ekspresiju u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ova smanjena ekspresija ukazuje na moguće promjene u regulaciji ovih molekula te može imati implikacije na procese apoptoze i regulaciju NF-kB u okviru ovog eksperimentalnog modela. Razumijevanje kako snižena ekspresija SAHH-a utječe na tumorske procese može pružiti vrijedne uvide u mehanizme tumorigeneze. Nakon analize diferencijalne ekspresije gena i provedene analize srži u programu IPA u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* u odnosu na kontrolnu staničnu liniju, primijetili smo značajan broj diferencijalno eksprimiranih gena (Slika 77) koji su uključeni u proces migracije tumorskih staničnih linija. Među diferencijalno eksprimiranim genima koji su se istaknuli kao rezultati u usporedbi s kontrolom su: *NOS2*, *PAEP*, *PLXNA2*, *SEMA3E*, *SEMA3C*, *CDH11*, *CD36*, *CADPS*, *CCN3*, *DAB2*, *ALCAM*, *AFAP1*, *EMP6* i *BMP2*.



© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

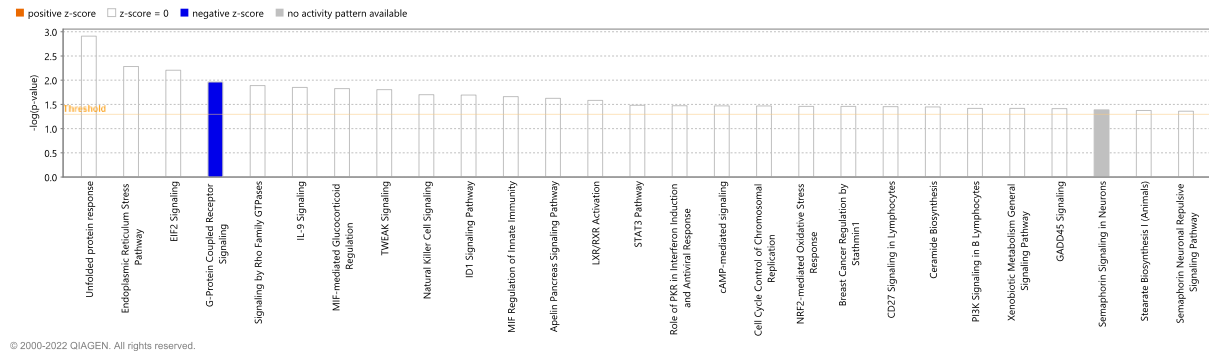
**Slika 77.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena staničnoj tumorskoj liniji SW480 s utišanim genom *SAHH* u programu IPA u procesu migracije tumorskih stanica dobiveni pomoću analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju SW480. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: CDH11: (od engl. *Cadherin 11*) – Kadherin 11, DAB2 (od engl. *Disabled homolog 2*) - Dizabilirani homolog 2, CCN3: (od engl. *Cellular communication network factor 3*) - Faktor 3 stanične komunikacijske mreže, CADPS: (od engl. *Calcium-dependent activator protein for secretion*) – Aktivator za sekreciju proteina ovisan o kalciju, EPAS1: (od engl. *Endothelial PAS domain-containing protein 1*) – Endotelni protein 1 s PAS domenom, PAEP: (od engl. *Progesterone-associated endometrial protein*) - Endometrijski protein povezan s progesteronom, PLXNA2: (od engl. *Plexin A2*) - Pleksin A2, HNF1A: (od engl. *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) – Hepatocitni jezgrin faktor 1 alfa.

Vizualizacija prikazuje (Slika 77) sve molekule koje sudjeluju u migraciji i imaju diferencijalnu

ekspresiju gena u našoj utišanoj staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Molekule s povišenom ekspresijom su *NOS2*, *ALCAM*, *BMP6*, *CADPS*, *TGFBI*, *PLXN2* i *PAEP*, dok geni s smanjenom ekspresijom uključuju *SEMA3A*, *SEMA3C*, *HNF1A*, *CD3G* i *CDH11*. *NOS2* (od engl. *Nitric Oxide Synthase 2*) utječe na proizvodnja dušikova monoksida (NO) što može poticati angiogenezu i modulirati staničnu adheziju, što može olakšati migraciju tumorskih stanica. Uz to, *ALCAM* (od engl. *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) sudjeluje u staničnoj adheziji; povišena ekspresija može poticati interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša, olakšavajući migraciju. Transkripcijski faktor *BMP6* (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 6*) je član obitelji BMP koji može utjecati na diferencijaciju i rast stanica, potencijalno promičući migraciju tumorskih stanica kroz modulaciju mikrookoliša. Nadalje, *CADPS* (od engl. *Calcium-Dependent Secretion Activator*) je uključen u sekrecijske procese, može utjecati na oslobađanje faktora koji promiču migraciju. Također, *TGFBI* (od engl. *Transforming Growth Factor Beta-Induced*) je protein koji može modulirati ekstracelularni matriks i signalne putove koji su ključni za migraciju i invaziju. Dodatno, *PLXN2* (od engl. *Plexin A2*) sudjeluje u signalnim putovima semaforina, koji reguliraju citoarhitekturu i migraciju stanica. Gen *PAEP* (od engl. *Progesterone-Associated Endometrial Protein*) je poznatiji po svojoj ulozi u reproduktivnom sustavu, promjene u ekspresiji mogu indirektno utjecati na ponašanje tumorskih stanica. Proteini *SEMA3A* i *SEMA3C* (od engl. *Semaphorin 3A i 3C*) su poznati po svojoj ulozi u inhibiciji migracije i rasta tumora, stoga smanjena ekspresija može ukloniti ove inhibicijske učinke. Dodatno, *HNF1A* (od engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha*) je primarno povezan s funkcijom jetre, promjene u ekspresiji mogu utjecati na metabolički status stanica i indirektno na migraciju. Uz to, *CD3G* (od engl. *CD3 Gamma*) je dio T-staničnog receptora, njegova smanjena ekspresija može utjecati na imunološki odgovor na tumor. Kadherin *CDH11* (od engl. *Cadherin 11*) je uključen u staničnu adheziju. Smanjena ekspresija *CDH11* može smanjiti koheziju između tumorskih stanica, olakšavajući diseminaciju. Kombinacija povišene ekspresije gena koji promiču migraciju i smanjene ekspresije gena koji inhibiraju migraciju može značajno utjecati na povećanu migraciju tumorskih stanica, što je ključno za metastaziranje.

## 4.5.2. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*

Analysis: wt-vs-simc7overlap



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 78.** Kategorizacija promijenjenih signalnih putova u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, s obzirom na tip poremećaja. Analize srži (od engl. *Core analysis*) provedena je uz pomoć programa IPA. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*). Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola: Prijenos signala EIF2 (od engl. *EIF2 Signaling*), Prijenos signala posredovan proteinom G (od engl. *G Protein Coupled Receptor Signaling*), Prijenos signala ID1 (od engl. *ID1 Signaling Pathway*).

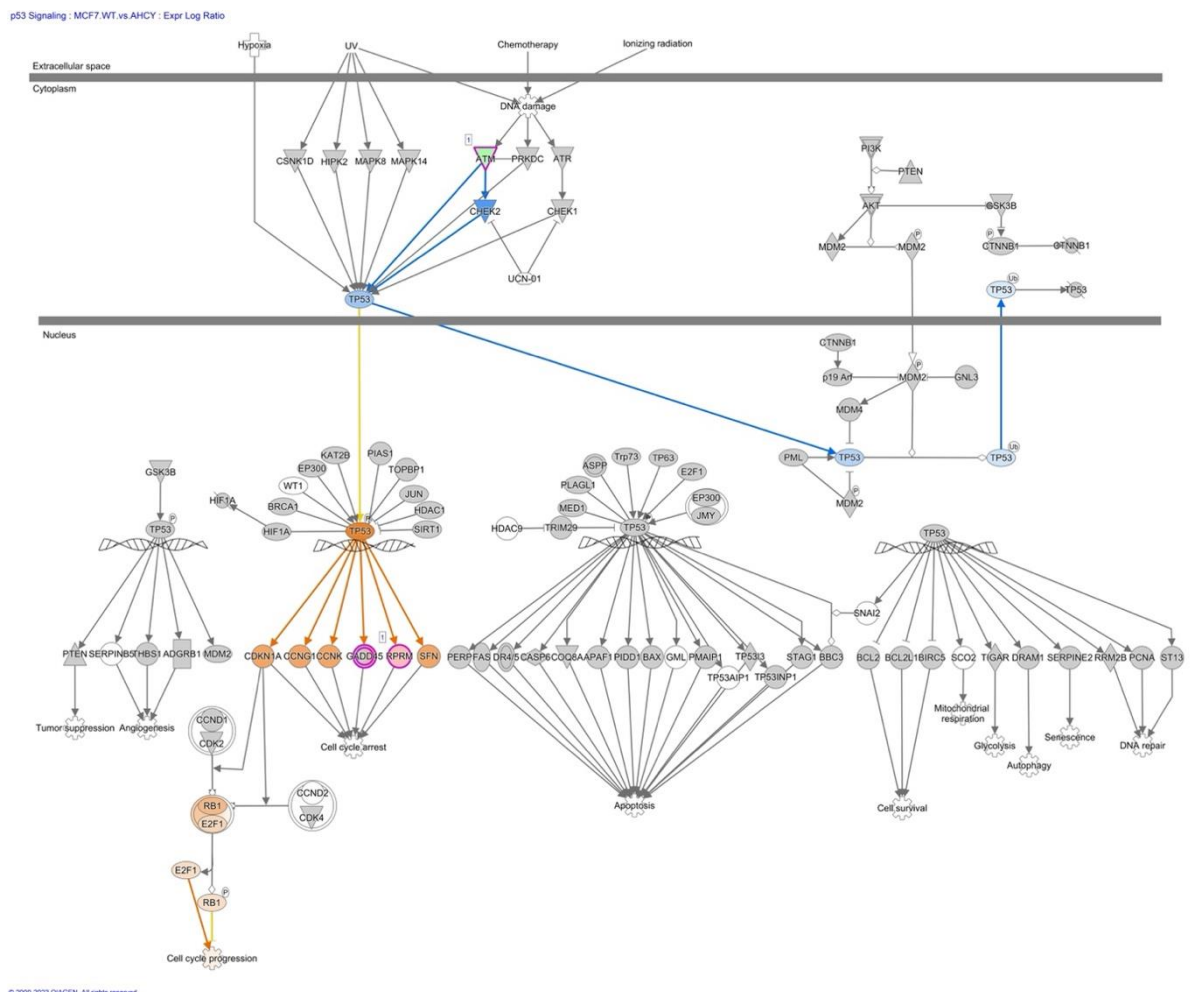
U programu IPA (od engl. *Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*) u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH)*, uspjeti smo kategorizirati naše podatke o diferencijalnoj ekspresiji s posebnim naglaskom na poremećaje uzrokovane deficijencijom SAHH-a. Rezultati su pokazali da je najveći broj diferencijalno eksprimiranih gena zastupljen u kategorijama koje se odnose na EIF2 prijenosu signala, G proteinima posredovanom prijenosu signala i ID1 signali put (Slika 78). Ovi podaci pružaju uvid u potencijalne mehanizme putem kojih deficijencija SAHH-a može doprinijeti razvoju i progresiji tumora, kao i drugim staničnim i organizacijskim abnormalnostima. Ovaj postupak je ključan za dublje razumijevanje dobivenih podataka i omogućava nam bolju interpretaciju bioloških procesa koji su se dogodili u ovom eksperimentalnom sustavu s utišanom ekspresijom S-adenozil homocistein hidrolaze.





**Slika 79.** Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih signalnih mreža u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji MCF7 za gen *SAHH* u IPA programu u procesu migracije tumorskih stanica dobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju SW480. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.

Ukupno je identificirano 25 značajno diferencijalno ekspresiranih signalnih mreža (Slika 79) nakon analize diferencijalne ekspresije gena u programu IPA uz pomoć analize srži. Ovi rezultati ukazuju na kompleksne promjene u regulaciji staničnih procesa nakon utišavanja *SAHH*-a, koja igra ključnu ulogu u metaboličkim putovima stanica. Detekcija ovih diferencijalnih mreža prijenosa signala (Slika 79) pruža dublje uvide u interakcije proteina i putanja unutar stanica te ukazuje na potencijalne biološke promjene koje proizlaze iz utišavanja gena *SAHH*.

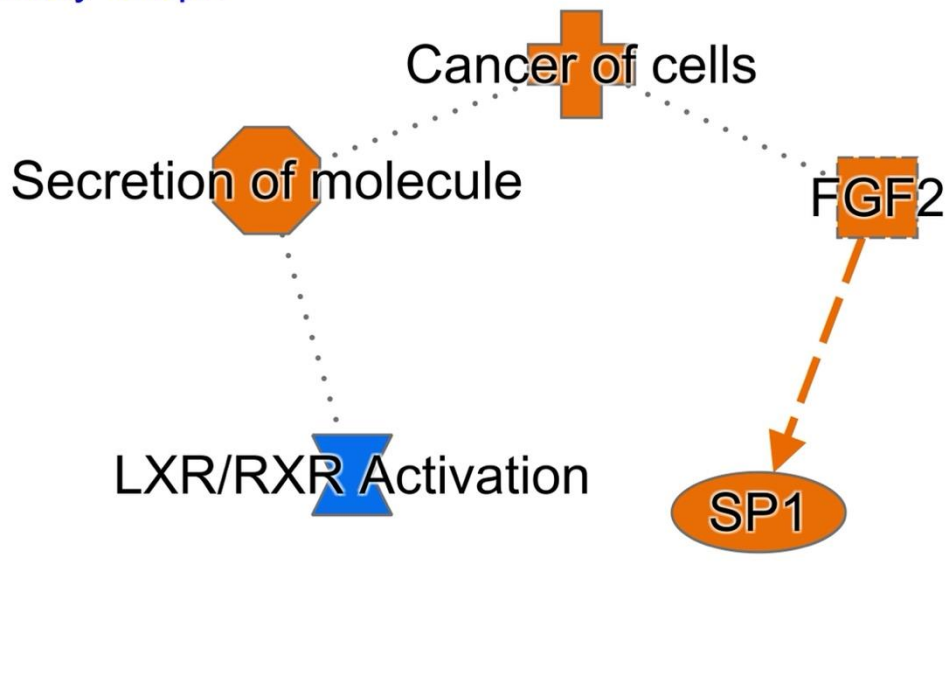


**Slika 80.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj tumorskoj liniji MCF7 s utišanim genom u IPA programu u prijenosu signala putem p53 dobiveni pomoću analize srži

(od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju SW480. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: RB1 od engl. *Retinoblastoma 1* - Retinoblastom 1, E2F1 - E2F od engl. *Transcription Factor 1* - E2F transkripcijski faktor 1, od engl. *Cell Cycle Progression* - Ovaj izraz se ne odnosi na specifičan gen, već na proces napredovanja staničnog ciklusa. Na hrvatskom bi se to moglo prevesti kao "Napredovanje staničnog ciklusa", SFN - Stratifin, također poznat kao od engl. *14-3-3 sigma* - *Stratifin*, također poznat kao 14-3-3 sigma, CCNK od engl. *Cyclin K* - Ciklin K, CCNG1 - od engl. *Cyclin G1* - Ciklin G1, CDKN1 - Ovaj izraz može se odnositi na više gena iz obitelji inhibitora ciklina, kao što su CDKN1A (p21) ili CDKN1B (p27). Na hrvatskom bi se to moglo prevesti kao "Inhibitor ciklina 1A (p21)" za CDKN1A ili "Inhibitor ciklina 1B (p27)" za CDKN1B, ATM, od engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated* - Mutirani ataksija-telangiektazija, od engl. *Checkpoint Kinase 2* - Kinaza provjere 2, TP53 - od engl. *Tumor Protein p53* - Tumorski protein p53.

Prvenstveno, registrirana je izražena povećana aktivnost ključnih regulatornih proteina, uključujući TP53, RB1 i E2F1 (Slika 80). Ovo povećanje aktivnosti sugerira potencijalni utjecaj utišavanja gena *SAHH* na regulaciju staničnog ciklusa i progresiju tumorskih stanica. Paralelno s ovim promjenama, promatrana je značajna povećana aktivnost faktora koji su uključeni u progresiju staničnog ciklusa, uključujući CDKN1A, CCNG1, CCNK i SFN. Ovi podaci sugeriraju da utišavanje gena *SAHH* može imati duboki utjecaj na regulaciju staničnog ciklusa i brzinu stanične diobe. Ovaj kompleksan signalni put, obogaćen promjenama u aktivnosti ključnih regulatornih proteina i faktora staničnog ciklusa, pruža važan uvid u molekularne mehanizme koji su povezani s utišavanjem gena *SAHH* u staničnoj liniji MCF7.

MCF7.WT.vs.AHCY(-1.5,1.5,0.05) - 2022-03-28 01:01 PM  
Summary Graph

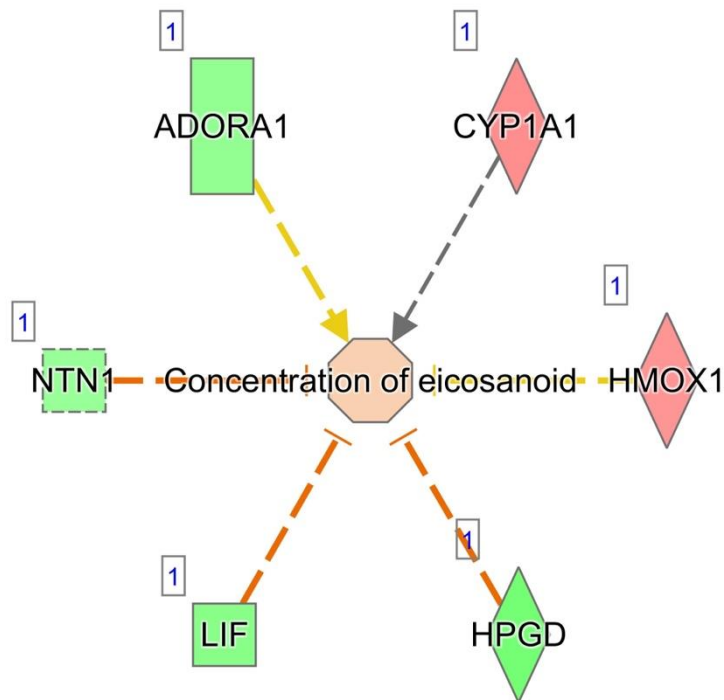


**Slika 81.** Usporedba ekspresije između kontrolne stanične linije MCF7 i staničnije linije MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Slika prikazuje rezultate analize srži (od engl. *Core analysis*) diferencijalne ekspresije gena dobivene pomoću programa IPA za bioinformatičku analizu. Narančasto: povećanje aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnost, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa dok puna linija označava direktnu interakciju između molekula i procesa. Za identifikaciju gena koji su značajno regulirani u usporedbi s kontrolnim uzorcima, korišten je prag od -1.5 do 1.5 za faktor povećanja (od engl. *Fold change*). Objašnjenja najznačajnijih kratica i simbola : od engl. *Secretion of molecule* - sekrecija molekula, od engl. *Cancer of cells* - tumor stanica, FGF2 - Faktor rasta fibroblasta 2 od engl. *Fibroblast Growth Factor 2* , SP1 - Specifični protein 1 od engl. *Specific Protein 1*.

Na slici 81 prikazan je koncizan grafički prikaz rezultata analize srži (od engl. *Core analysis*) koji proizlazi iz diferencijalne ekspresije gena u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, koja je karakterizirana utišanjem gena *SAHH*. Vidljivo je povećanje aktivnosti sekrecije molekula te SP1 i FGF2 te se može vidjeti da je u utišanoj staničnoj liniji došlo do povećane aktivacije tumorskih obilježja stanice. Grafički prikaz ukazuje na značajno povećanje aktivacije tumorskih fenotipova u utišanoj staničnoj liniji, što sugerira moguću ulogu gena *SAHH* u supresiji tumorskih svojstava. Nadalje, istraživanje otkriva znatno povećanu sekreciju molekula, što potencijalno implicira u promjenama u intersticijskoj staničnoj komunikaciji ili interakcijama s mikrookolinom. Uočava se i značajno povećanje aktivnosti faktora rasta FGF2 (od engl. *Fibroblast growth factor 2*) i SP1 (od engl. *Specificity protein 1*), što ukazuje na moguću ključnu ulogu ovih faktora u staničnom odgovoru na utišanje gena *SAHH*. U utišanoj tumorskoj staničnoj liniji MCF7, s reduciranom ekspresijom gena *SAHH*, zabilježena je

pojačana aktivnost sekrecije molekula. Tijekom ovog procesa dolazi do regulacije održavanja koncentracije eikozanoida (Slika 82) i masnih kiselina (Slika 83), kao i do modulacije sekrecije neurotransmitera (Slika 84). Također, primijećen je i poremećaj u generiranju adenzina, što ukazuje na značajne promjene u metaboličkim i signalnim putovima unutar utišane stanične linije MCF7.

### Concentration of eicosanoid 5

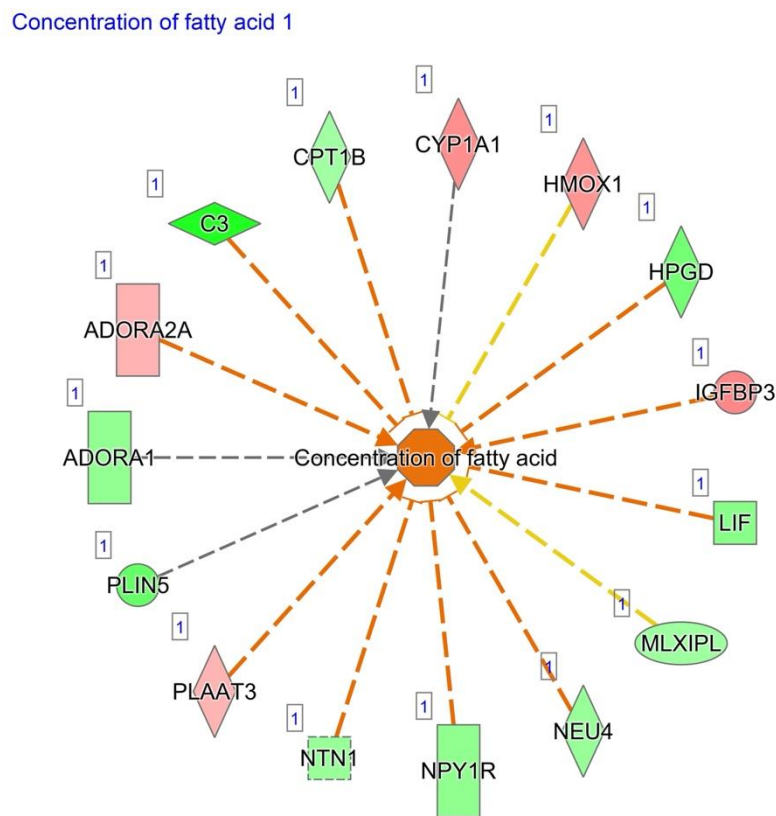


© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 82.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj tumorskoj liniji MCF7 s utišanim genom *SAHH* u procesu reguliranja koncentracije eikozanoida (od engl. *Concentration of eicosanoid*) dobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju MCF7. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objasnjenje najznačajnijih kratica i simbola: ADORA1 od engl. *Adenosine A1 Receptor* - Receptor adenzina A1, LIF - od engl. *Leukemia Inhibitory Factor* - Faktor inhibicije leukemije, HPG - od engl. *Hepatocyte Growth Factor* - Hepatocitni faktor rasta, NTN1- od engl. *Netrin-1* - Netrin-1. CYP1A1- od engl. *Cyclophilin A1* - Ciklofilin A1, HMOX- od engl. *Heme Oxygenase* - Hem oksigenaza.

Na ovoj slici (Slika 82) prikazani su rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, s posebnim naglaskom na genetičkim

promjenama koje su se dogodile nakon utišavanja gena *S-adenozil homocistein hidrolaze*. Analiza je fokusirana na promjene u transkripciji određenih gena i koncentraciji metabolita, pružajući dublji uvid u stanične odgovore na ovu genetičku modifikaciju. Uočavaju se značajne promjene u ekspresiji gena, pri čemu su geni *CYP1A1* i *HMOX1* istaknuti po povećanoj razini transkripcije. Suprotno tome, primjećuje se smanjenje ekspresije gena *ADORA1*, *LIF*, *HPG* i *NTN1*, što ukazuje na potencijalne promjene u regulaciji tih gena nakon genetičke modifikacije. Ovi geni su povezani s različitim biološkim procesima, uključujući metabolizam i antioksidativnu obranu, što sugerira da je njihova povećana ekspresija rezultat utišavanja gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Dodatno, zapaženo je povećanje koncentracije eikozanoida, koji su lipidni metaboliti s važnom ulogom u signalizaciji i upalnim procesima u stanicama. Ovo povećanje sugerira da je lipidni metabolizam također podložan promjenama nakon utišavanja gena *SAHH*.



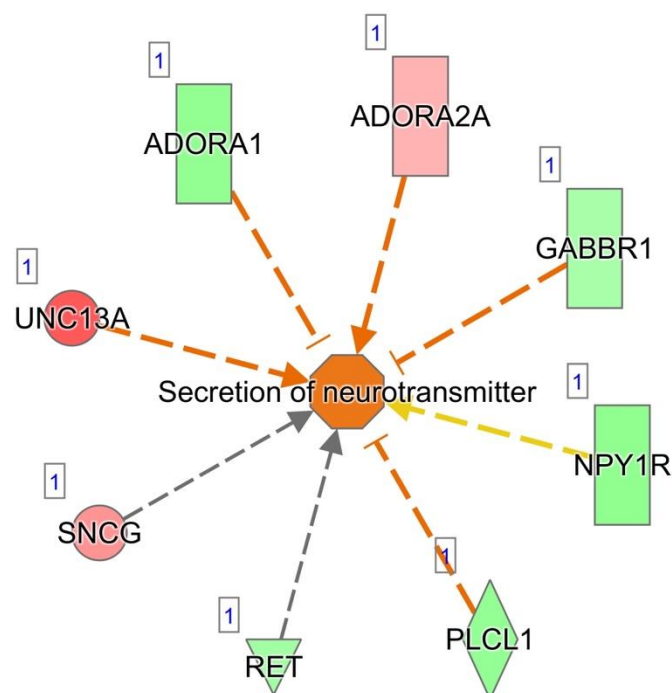
© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 83.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj tumorskoj liniji MCF7 s utišanim genom *SAHH* u procesu reguliranja koncentracije masnih kiselina (od engl. *Concentration of fatty acid*) dobiveni pomoću analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju MCF7. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok

plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: LIF- od engl. *Leukemia Inhibitory Factor* - Faktor inhibicije leukemije, NEU4 - od engl. *Neuraminidase 4* - Neuraminidaza 4, NTN1- od engl. *Netrin 1* - Netrin 1, ADORA1- od engl. *Adenosine A1 Receptor* - Receptor adenoza A1, CPT1B - od engl. *Carnitine Palmitoyltransferase 1B* - od engl. Karnitin palmitoiltransferaza 1B, MLXIPL - od engl. *MLX Interacting Protein-Like* - Protein sličan MLX interagirajućem proteinu, HPGD - od engl. *Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD)* - Hidroksiprostaglandin dehidrogenaza 15-(NAD), PLIN5 - od engl. Perilipin 5 - Perilipin 5.

Ovaj grafički prikaz pruža zaključak o značajnim metaboličkim i genskim regulacijama, uključujući procese antioksidativne zaštite, detoksikacije i rasta stanica. Stoga, povećana ekspresija ovih gena sugerira specifične promjene u staničnim funkcijama kao odgovor na utišavanje gena *SAHH*. Suprotno tome, zapaženo je smanjenje ekspresije gena (Slika 83) *C3*, *LIF*, *NEU4*, *NTN1*, *ADORA1*, *CPT1B*, *MLXIPL*, *HPGD* i *PLIN5*. Ovo smanjenje ekspresije tih gena ukazuje na moguće inhibicije njihovih funkcionalnih uloga, što može značiti disfunkciju u staničnim procesima vezanim uz imunološki odgovor, rast stanica, metabolizam i lipolizu.

#### Secretion of neurotransmitter 2



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

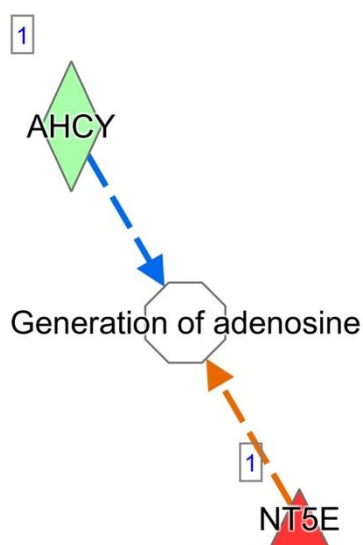
**Slika 84.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u staničnoj tumorskoj liniji MCF7 z s utišanim genom *SAHH* u procesu reguliranju koncentracije neurotransmitera (od engl. *Secretion of neurotransmitter*) dobiveni pomoću analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju MCF7. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl.

*Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: *GABBR1*- od engl. *Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1* - Receptorska podjedinica B tipa za gama-aminomaslačnu kiselinu 1, *NPY1R* - od engl. *Neuropeptide Y Receptor Y1* - Receptor neuropeptida Y Y1 - *PLCL1* od engl. *Phospholipase C Like 1* - Fosfolipaza C sličan 1, od engl. *RET- Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret* - Proto-onkogen tirozin-proteinska kinaza receptor Ret, *ADORA1*- od engl. *Adenosine A1 Receptor* - Receptor adenzina A1, 1. *SNCG* - od engl. *Synuclein Gamma* - Sinuklein gama, *ADORA2A*- od engl. *Adenosine A2a Receptor* - Receptor adenzina A2a, *UNC13A* (od engl. *Unc-13 Homolog A* - Homolog A UNC-13).

Ovaj grafički prikaz (Slika 84) pruža vrijedan uvid u promjene u procesu sekrecije neurotransmitera u staničnoj liniji MCF7, u kojoj je gen za *SAHH* utišan. Ključni podaci obuhvaćaju promjene u ekspresiji ključnih gena povezanih s neurotransmisijom. Prvo, primjećujemo smanjenje ekspresije gena *GABBR1* (od engl. *Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1*), *NPY1R* (od engl. *Neuropeptide Y Receptor Y1*), *PLCL1* (od engl. *Phospholipase C Like 1*), *RET* (od engl. *Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Receptor Ret*) i *ADORA1* (od engl. *Adenosine A1 Receptor*). Ova smanjenja u ekspresiji sugeriraju potencijalne promjene u receptornim signalnim putovima, koje mogu utjecati na regulaciju neurotransmitera i stanične komunikacije. Suprotno tome, zabilježeno je povećanje ekspresije gena *SNCG* (od engl. *Synuclein Gamma*), *ADORA2A* (od engl. *Adenosine A2a Receptor*), *UNC13A* (od engl. *Unc-13 Homolog A*), što sugerira da bi ovi geni mogli igrati ključnu ulogu u pojačanju sekrecije neurotransmitera u ovoj staničnoj liniji nakon utišavanja gena *SAHH*.



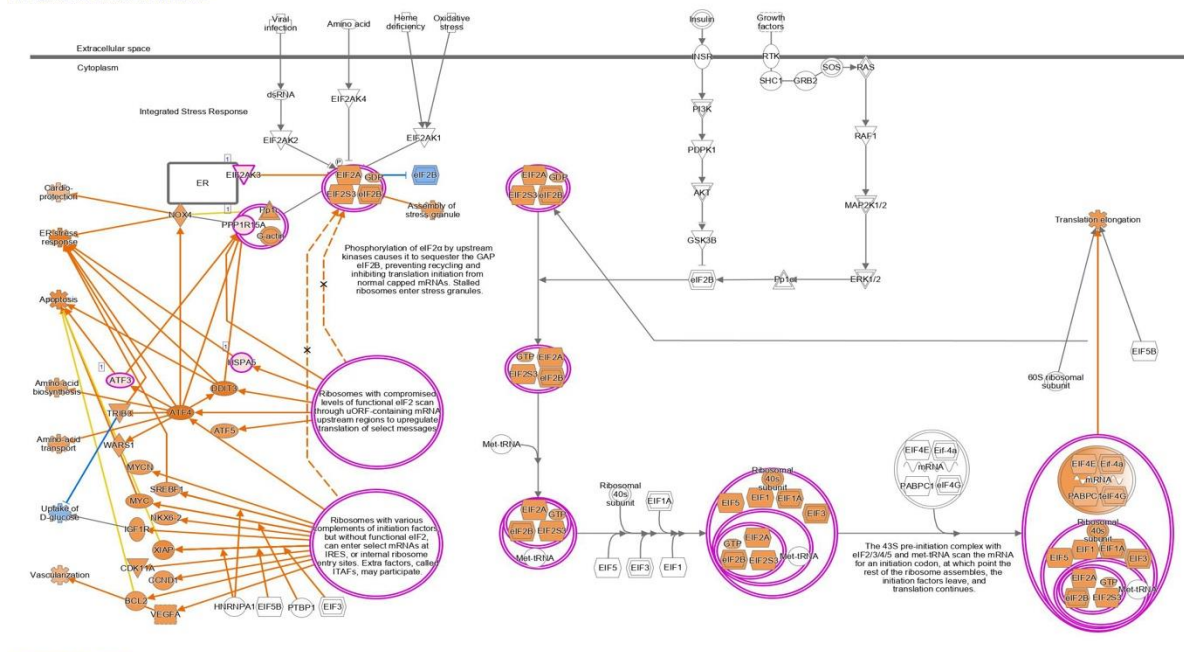
### Generation of adenosine 3



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 85.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji MCF7 za gen *SAHH* u IPA programu u procesu stvaranja adenzina (od engl. *Generation of adenosine*) dobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju MCF7. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: *NT5E* (5'-Nukleotidaza Ecto, od engl. *5'-Nucleotidase Ecto*), *SAHH* = *AHCY* (*S*-adenozil homocistein hidrolaza, od engl. *S-adenosylhomocysteine hydrolas*).

U rezultatima (Slika 85) su prikazane značajne promjene u ekspresiji gena koji igraju ključnu ulogu u metabolizmu adenzina u utišanoj staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Uočava se povećana ekspresija gena *NT5E* (od engl. *5'-Nucleotidase Ecto*). Povećana ekspresija gena *NT5E* ukazuje na pojačanu aktivnost enzima koji katalizira pretvorbu adenzina u inozin. S druge strane, smanjenje ekspresije gena *SAHH* sugerira inhibiciju aktivnosti enzima koji igraju ulogu u održavanju visokih razina adenzina. Ova kombinacija promjena u ekspresiji gena rezultira potencijalno smanjenjem ili nepromjenjenom razine adenzina u stanicama. Adenzin je ključna signalna molekula s raznim funkcijama u staničnoj signalizaciji, pa takve promjene mogu imati duboke posljedice na biološke procese unutar stanica. Ovaj grafikon (Slika 85) pruža važan uvid u mehanizme koji reguliraju razinu adenzina i njegovu biološku funkciju.



© 2000-2022 Cytogen. All rights reserved.

**Slika 86.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji MCF7 za gen *SAHH* u IPA programu u prijenosu signala EIF2 (od engl. *EIF2 Signaling*) dobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju MCF7. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: EIF2 kompleks = Faktor 2 inicijacije eukariotske translacije, od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*), GDP (Guanozin difosfat od engl. *Guanosine Diphosphate*), EIF2S3 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit 3* Podjedinica 3 faktora 2 inicijacije eukariotske translacije), 40S ribosomalna podjedinica (Ribosomska podjedinica 40S od engl. *Ribosomal Subunit 40S*), EIF1 (Faktor 1 inicijacije eukariotske translacije od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1*), EIF1A (Faktor 1A inicijacije eukariotske translacije od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A*), EIF3 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 3*, Faktor 3 inicijacije eukariotske translacije), EIF5 (Faktor 5 inicijacije eukariotske translacije od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 5*), Translokacija elongacije (od engl. *Elongation Translocation*, Translokacija elongacije), MYC (Proto-onkogen MYC, od engl. *Myc Proto-Oncogene*), BCL2 (Limfom B-stanica 2, od engl. *B-Cell Lymphoma 2*), CDK11A (Ciklin-ovisna kinaza 11A, (od engl. *Cyclin-Dependent Kinase 11A*), ATF4 (Aktivirajući transkripcijski faktor 4 (od engl. *Activating Transcription Factor 4*), XIAP (X-povezani inhibitor apoptoze proteina, od engl. *X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), ATF5 (Aktivirajući transkripcijski faktor 5, od engl. *Activating Transcription Factor 5*), DDIT3 (Transkript induciran oštećenjem DNA 3, od engl. *DNA Damage Inducible Transcript 3*), VEGFA (Faktor rasta vaskularnog endotela A, od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor A*).

Na ovoj slici (Slika 86) prikazani su rezultati diferencijalne ekspresije gena i analize srži (od engl. *Core analysis*) u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena, gdje gen *SAHH*-utišan, prikazuju značajne promjene u staničnoj signalnoj mreži. Ove promjene ukazuju na

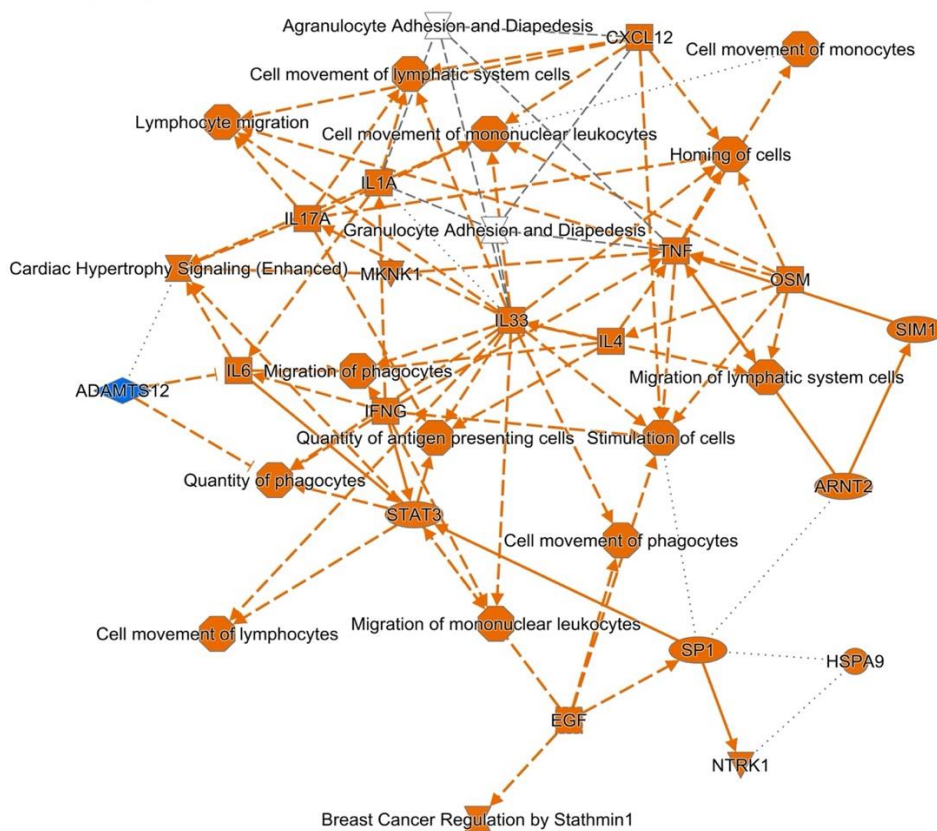
kompleksne biološke procese koji se događaju nakon utišavanja ovog gena. Prvo, primjećujemo značajno povećanu aktivaciju EIF2 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*) prijenosa signala unutar stanice. Ova aktivacija uključuje povećanu aktivnost specifičnih komponenti, uključujući EIF2A (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A*), GDP (od engl. *Guanosine Diphosphate*), EIF2S3 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit 3*), kao i EIF2B kompleksa. Također, promatra se povećana aktivnost ribosomalnog kompleksa sastavljenog od 40S podjedinice, EIF1 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1*), EIF1A (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A*), EIF3 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 3*), EIF5 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 5*), EIF2A (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A*), EIF2B i EIF2S3 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit 3*). Također, vidljiva je povećana aktivnost translokacije elongacije, što sugerira brže i učinkovitije procese produženja peptidnog lanca tijekom translacije. Dodatno, primjećuje se povećana aktivnost nekoliko ključnih faktora uključenih u staničnu regulaciju i preživljavanje, uključujući MYC (od engl. *Myc Proto-Oncogene*), BCL2 (od engl. *B-Cell Lymphoma 2*), CDK11A (od engl. *Cyclin-Dependent Kinase 11A*), ATF4 (od engl. *Activating Transcription Factor 4*), XIAP (od engl. *X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), ATF5 (od engl. *Activating Transcription Factor 5*), DDIT3 (od engl. *DNA Damage Inducible Transcript 3*) i VEGFA (od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor A*). Ovi faktori mogu igrati ključnu ulogu u regulaciji staničnih odgovora na promjene u signalnim putovima. Ova analiza pruža detaljan uvid u kompleksne promjene u staničnoj signalnoj mreži nakon utišavanja gena *SAHH*. Nema evidentiranih promjena u smjeru smanjene aktivnosti proteina ili procesa u ovom prijenosu signala.

#### **4.5.3. Analiza diferencijalno eksprimiranih staničnih signalnih putova u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH***

Nakon provedene analize srži (od engl. *Core analysis*), i diferencijalne ekspresije gena u IPA programu su rezultirala kategorizacijom podataka koja se temelji na promjenama u ekspresiji gena. Ovaj postupak je ključan za dublje razumijevanje podataka i omogućava nam bolju interpretaciju bioloških procesa koji su se dogodili u ovom eksperimentalnom sustavu s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 0,5$  i  $\leq 0,5$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Može se vidjeti da do najveće promjene u ekspresiji molekula dolazi u kategoriji tumorskih procesa (Slika 87). U HEK293T staničnoj

liniji s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, identificirani su najviše diferencijalno eksprimirani procesi povezani s migracijom (Slika 90) i staničnim pokretanjem (Slika 91), što je prikazano u grafičkom sažetku rezultata na Slici 86. Također, uočena je sinteza pirimidina *de novo* (Slika 92) i hipermetionemija (Slika 92), agregaciju tumorskih stanica (Slika 93) te je predviđena indirektna interakcija između Histona H3 i S-adenozil homocistein hidrolaze. Kroz stroge parametre analize, identificirano je 28 diferencijalno eksprimiranih gena (Tablica 15) i diferencijalno eksprimirani prijenos signala u kojoj sudjeluje S-adenozil homocistein hidrolaza (Slika 88).

hekWT-vs-siAHCYnonres - 2022-04-13 12:53 PM Summary Graph



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 87.** Usporedba ekspresije između kontrolne stanične linije HEK293T i stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Slika prikazuje rezultate analize srži (od engl. *Core analysis*) diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć IPA programa za bioinformatičku analizu; grafički sažetak prikazuje rezultat analize gdje se može stanje utišane ekspresije *SAHH* gena u staničnoj liniji HEK293T u odnosu na kontrolu gdje smo preklapili zajedničke podatke WT (od engl. *wild type*) i SCR (od engl. *scrambled, siAHCY = si SAHH*) kontrolne grupe podataka. Narančasto: povećanje aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnost, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa dok puna linija označava direktnu interakciju između molekula i procesa. Za identifikaciju gena koji su značajno regulirani u usporedbi s kontrolnim uzorcima, korišten je prag od -2 do 2 za faktor povećanja (od engl. *Fold change*). Ovo omogućava identifikaciju gena koji pokazuju značajnu promjenu u ekspresiji. P-vrijednost: Za statističku značajnost razlika u ekspresiji gena korišten

je prag p-vrijednosti od 0.05. Geni s p-vrijednostima manjim od ovog praga smatrat će se statistički značajnima. Oznake najznačajnijih kratica i simbola: isintegrin i metaloproteinaza s trombospondinskim motivima 12 - ADAMTS12 - (od engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 12*).

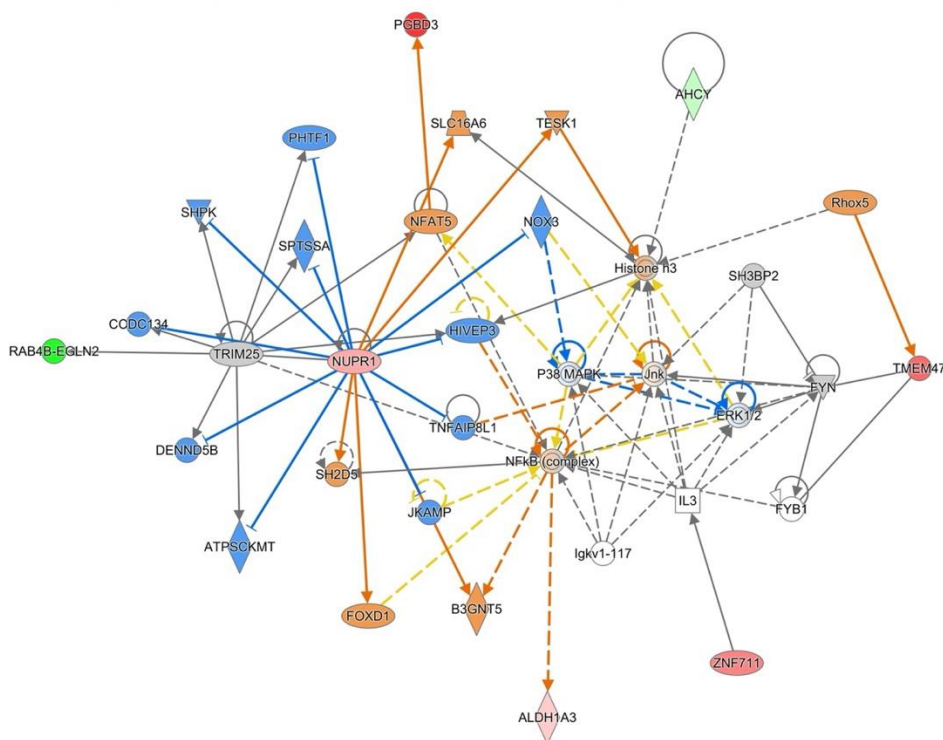
Ovaj grafički prikaz rezultata (Slika 87) predstavlja rezultate analize diferencijalne ekspresije u HEK293T staničnoj liniji, nakon što je gen *SAHH* utišan i provedena je bioinformatička analiza srži (od engl. *Core analysis*). Uočene su važne promjene u staničnim procesima. Specifično, uočena je smanjena aktivnost ADAMTS12 procesa, što sugerira smanjenu funkciju ovog procesa nakon utišavanja gena *SAHH*. Protein ADAMTS12 pripada obitelji enzima koji su uključeni u razgradnju ekstracelularnog matriksa, što je važno za mnoge biološke procese, uključujući razvoj tkiva, angiogenezu, i patološka stanja poput artritisa i tumora. Suprotno tome, primijetili smo povećanu aktivnost procesa povezanih s regulacijom migracije stanica. Ovi rezultati ukazuju na složene promjene u staničnim procesima nakon utišavanja gena *SAHH*, s potencijalnim implikacijama za regulaciju migracije stanica. Faktor povećanja (od engl. *log2 Fold change*) iznosi -0.9 za utišanu staničnu liniju HEK293T za gen *SAHH*.

**Tablica 10.** Rezultati diferencijalno eksprimiranih gena u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Ovi geni su identificirani kao značajno regulirani i predstavljaju skup molekula čija je ekspresija promijenjena u kontekstu smanjene prisutnosti adenzil homocistein hidrolaze. Prikazane vrijednosti p-vrijednosti su postavljene unutar raspona od -0,5 do 0,5 kako bi se identificirali geni čija je diferencijalna ekspresija statistički značajna i kako bi se obuhvatili oni geni čija se ekspresija mijenja unutar tog raspona. Ovaj raspon omogućuje prepoznavanje gena čija promjena u ekspresiji može imati biološki značaj unatoč manjim varijacijama.

Stanična linija HEK293T s utišanom ekspresijom gena <i>SAHH</i>	
Naziv gena	Faktor povećanja
<i>SAHH</i>	-0.92
<i>IRS4</i> , Supstrat 4 inzulinskog receptora, od engl. <i>Insulin Receptor Substrate 4</i>	5.91
<i>PCDH19</i> , Protokaderin 19, od engl. <i>Protocadherin 19</i>	2.42
<i>TCEAL7</i> , Transkripcijski faktor A sličan faktoru za produženje transkripcije 7, od engl. <i>Transcription Elongation Factor A-Like 7</i>	1.6
<i>TMEM47</i> , Transmembranski protein 47, od engl. <i>Transmembrane Protein 47</i>	3.47
<i>INPP5D</i> , Inozitol polifosfat-5-fosfataza D - Inozitol	1.29

polifosfat-5-fosfataza D, od engl. <i>Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase D</i>	
<i>CTGF</i> , Faktor rasta vezivnog tkiva, od engl. <i>Connective Tissue Growth Factor</i>	-0.96
LOC101928358, Lokus 101928358 (ljudski pseudogen)	3.59
<i>NUPRI</i> , Jezgrin protein 1, od engl. <i>Nuclear Protein 1</i>	2.43
C10orf10, Kromosom 10 otvoreni okvir čitanja 10	-0.59
<i>HCLS1</i> , Hematopoetski stanično-specifični Lyn supstrat 1, od engl. <i>Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1</i>	2.71
LOC102724023, Lokus 102724023	2.76
<i>MDK</i> , Midkin, od engl. <i>Midkine</i>	0.82
<i>ZCCHC12</i> - Protein cinkovog prsta CCHC tipa 12, od engl. <i>Zinc Finger CCHC-Type Domain-Containing Protein 12</i>	1.57
<i>FHL1</i> , Četiri i pol LIM domene 1, od engl. <i>Four and a Half LIM Domains 1</i>	-0.55
<i>KRT19</i> , Keratin 19, od engl. <i>Keratin 19</i>	0.75
<i>FAM129A</i> , Obitelj sa sličnošću sekvence 129, član A, od engl. <i>Family with Sequence Similarity 129, Member A</i>	1.36
<i>KRT17</i> Keratin 17, od eng. <i>Keratin 17</i>	1.57
MLLT11, Mijeloidna/limfoidna ili mješana leukemija; Translocirana na kromosom 11, od engl. <i>Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia; Translocated to Chromosome 11</i>	0.99
<i>ZNF737</i> , Protein cinkovih prstiju 737, od engl. <i>Zinc Finger Protein 737</i>	1.09
<i>KRBOX1</i> , Gen koji sadrži KRAB box domenu 1, od engl. <i>KRAB Box Domain-Containing Protein 1</i>	2.14
<i>JUN</i> , Jun proto-onkogen, od engl. <i>Jun Proto-Oncogene</i>	0.54
<i>PMAIP1</i> , Protein induciran s PMA i miristat-13-acetatom 1, od engl. <i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i>	0.58
IFI16, Interferon-gama induciran protein 16, od engl.	2.63





© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

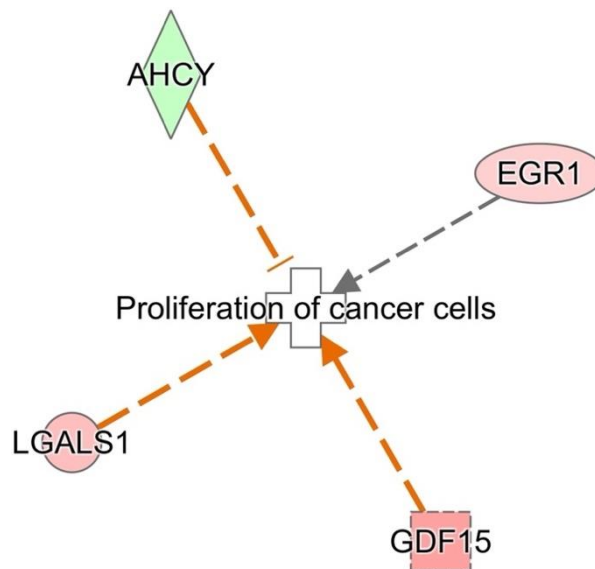
**Slika 89.** Usporedba ekspresije između kontrolne stanične linije HEK293T i stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Rezultati analize Srži (od engl. *Core analysis*) diferencijalne ekspresije gena dobiveni uz pomoć IPA programa za bioinformatičku analizu; slika prikazuje grafički sažetak prikazuje rezultat analize gdje se može vidjeti rezultate utišane ekspresije *SAHH* gena u staničnoj liniji HEK293T u odnosu na kontrolu staničnu liniju s ugrađenim kontrolnim plazmidom s nasumičnom sekvencom za utišavanje koja ne kodira nijedan poznati proteinski produkt (SCR, od engl. *scrambled*) (narančasto: povećanje aktivnosti, plavo: smanjenje aktivnost, isprekidana linija označava indirektnu interakciju između molekula i procesa dok puna linija označava direktnu interakciju između molekula i procesa. Objasnjenje najznačajnijih kratica i simbola: *PGBD3* (od engl. *PiggyBac Transposable Element Derived 3*), *TMEM47*- (od engl. *Transmembranski protein 479*, *ZNF711* - Protein cinkovog prsta 711 (od engl. *Zinc Finger Protein 711*), *NUPR1*- Jezgrin protein 1 (od engl. *Nuclear Protein 1*), *RhoX5*- Reproductivni Homeobox 5 (od engl. *Reproductive Homeobox 5*), (od engl. *Histone H3*) - Histon H3, *FOXD1* (od engl. *Forkhead Box D1*), *SH2D5* - SH2 domena sadržavajući 5 (od engl. *SH2D5 - SH2 Domain-Containing 5*), *NFAT5* - Nuklearni faktor aktiviranih T stanica 5 (od engl. *Nuclear Factor of Activated T Cells 5*), *B3GNT5*-Beta-1,3-N-Acetilglukozaminiltransferaza 5 (od engl. *Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 5*), *SLC16A6* - Prenosnik obitelji 16 član 6 (od engl. *Solute Carrier Family 16 Member 6*), *NOX3*-NADPH oksidaza 3 (od engl. *NADPH Oxidase 3*), *SHPK*- Sedoheptulokinaza (od engl. *Sedoheptulokinase*), *ATPCKMT* - ATP kinaza mitohondrijske sulfurilaze i cisteinske sintaze (od engl. *ATP Kinase of Mitochondrial Sulfurase and Cysteine Synthase*).

Značajne promjene u ekspresiji gena uključuju povećanu razinu transkripcije gena *PGBD3*, *TMEM47*, *ZNF711*, *NUPR1* (Slika 89) te smanjenu razinu ekspresije gena *RAB4B-EGLN2*. Također, primijetili smo povećanu aktivnost različitih proteina i faktora, uključujući *RHOX5*, Histon H3, *FOXD1*, *SH2D5*, *NFAT5*, *B3GNT5*, *SLC16A6*, dok je istovremeno zabilježena



smanjena aktivnost gena *NOX3*, *HIVEP3*, *SHPK*, *CODC134*, *PHTF1*, *ATPCKMT*, *DENND5b*. Zanimljivo je napomenuti da je predviđena indirektna interakcija između Histona H3 i S-adenozil homocistein hidrolaze, što ukazuje na potencijalno složenu mrežu regulacije u staničnim procesima. Također, zanimljivo je vidjeti povećanu ekspresiju proteina NUPR1, poznat i kao p8, je proteinski odgovor na stres koji igra ulogu u različitim staničnim procesima poput proliferacije stanica, diferencijacije, apoptoze i odgovora na stres. Uključen je u regulaciju ekspresije gena, progresiju staničnog ciklusa i preživljavanje stanica pod različitim uvjetima stresa. NUPR1 je povezan s razvojem i napredovanjem tumora, kao i s metaboličkim poremećajima i neurodegenerativnim bolestima. Njegove točne funkcije mogu varirati ovisno o staničnom kontekstu i signalnim putovima uključenima.

### Proliferation of cancer cells 13



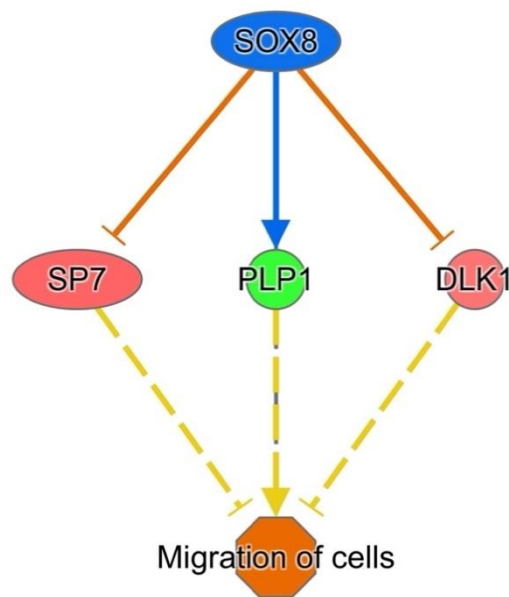
© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 90.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji HEK293T za gen *SAHH* u IPA programu u procesu proliferacije tumorskih stanica (od engl. *Proliferation of cancer cells*) adobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na roditeljsku staničnu liniju odnosno kontrolnu staničnu liniju HEK293T. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. Fold change)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: GR1 Rani gen 1 - (od engl. *Early Growth Response 1*), GDF15 Rast i diferencijacija faktora 15 - (od engl. *Growth Differentiation Factor 15*), LGALS1, Galaktin 1 - (od engl. *Galectin 1*).

U rezultatima analize diferencije ekspresije gena (Slika 90) primjećena je značajne promjene u

ekspresiji gena i proteina povezane s procesom proliferacije tumorskih stanica. EGR1 (Rani rani gen 1) od engl. *Early Growth Response 1*, GDF15 (Rast i diferencijacija faktora 15) od engl. *Growth Differentiation Factor 15*, LGALSa (od eng. *Galaktin-1*) - Galectin-1 u smjeru povećanja ekspresije gena. Konkretno, vidljiva je povećana razina ekspresije gena *EGRI*, *GDF15* i *LGALS1*, što ukazuje na povećanu aktivnost ovih gena u regulaciji stanične proliferacije.

33 16

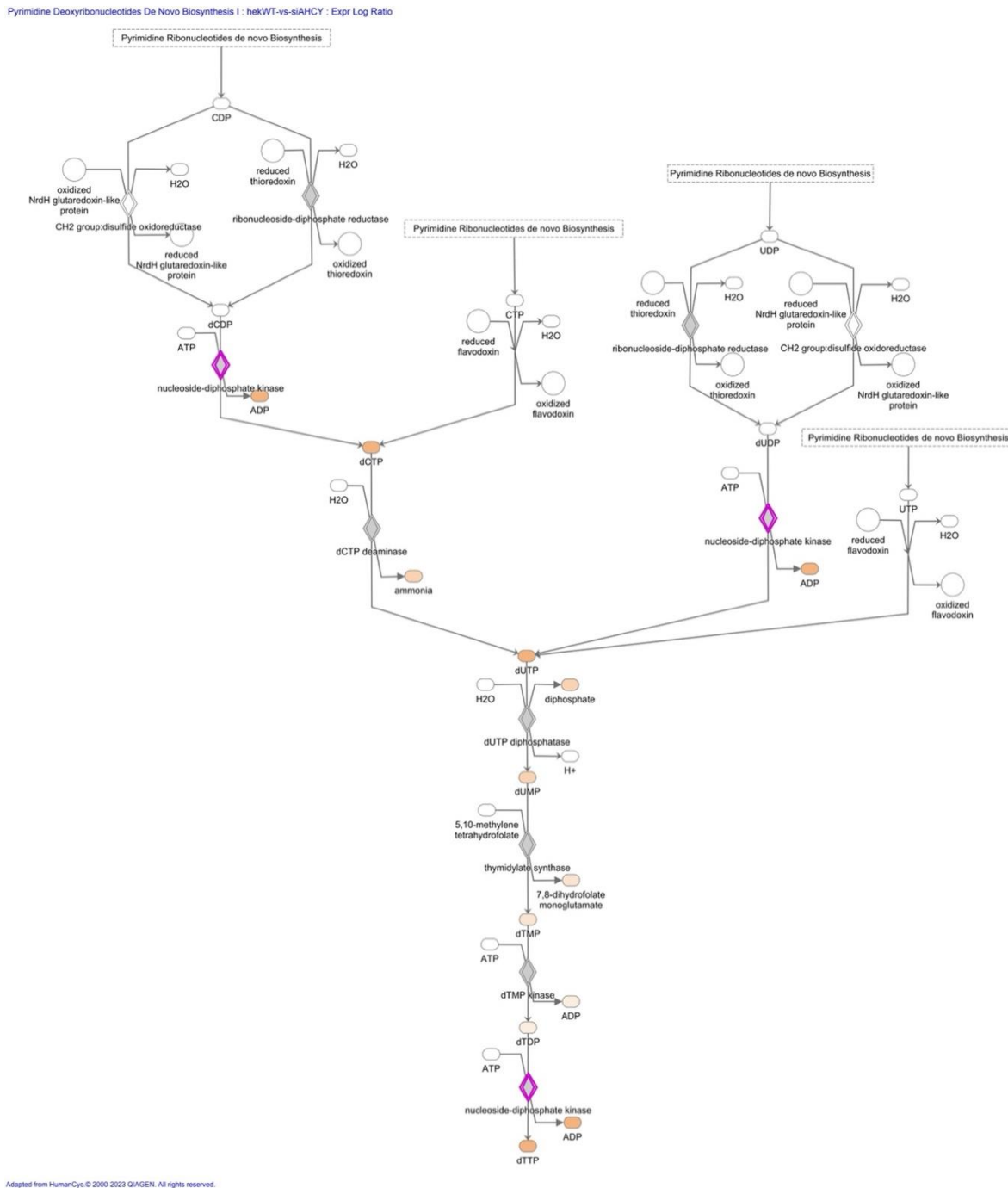


© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 91.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji HEK293T za gen *SAHH* u IPA programu u procesu migracije stanica (od engl. *migration of cells*) adobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju HEK293T. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: SP7 - Osteokalcin (od engl. *Osteocalcin*), DLK1 - Delta slični ne-kanonski Notch ligand 1 (od engl. *Delta-like Non-Canonical Notch Ligand 1*), SOX8 - SRY - Box transkripcijski faktor 8 (od engl. *SOX8 - SRY-Box Transcription Factor 8*).

Slika 91 prikazuje rezultate dobivene nakon diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj liniji HEK293T, u kojoj je gen *S-adenozilhomocistein hidrolaza*, utišan. Na rezultatima može se vidjeti povećanje transkripcije gena SP7 (od engl. *Osteocalcin*), DLK1 (od engl. *Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) i smanjenju aktivnost SOX8 (od engl. *SRY-Box Transcription Factor 8*) te smanje transkripcije gena *PLP*. Ove promjene u ekspresiji gena i aktivnosti

proteina predstavljaju ključne nalaze analize te ukazuju na potencijalnu ulogu gena *SP7* i *DLK1* u staničnim procesima nakon utišavanja gena *SAHH*.



**Slika 92.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji HEK293T za gen *SAHH* u IPA programu u procesu sinteze pirimidina de novo (od engl. *pyrimidine de novo biosynthesis*) adobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju HEK293T. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje

najznačajnijih kratica i simbola: dUTP (od engl. *Deoxyuridine Triphosphate*, Deoksiuridin trifosfat), dCTP (od engl. *Deoxycytidine Triphosphate*, Deoksicitidin trifosfat), dUMP (od engl. *Deoxyuridine Monophosphate*, Deoksiuridin monofosfat), ADP (od engl. *Adenosine Diphosphate*, Adenozin difosfat).

Dodatno, slika 92 prikazuje rezultate dobivene nakon diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj liniji HEK293T, u kojoj je gen, *S-adenozilhomocistein hidrolaza*, utišan. U ovim rezultatima primjećena je povećana aktivnost sinteze pirimidina *de novo*: Ova promjena ukazuje na pojačanu sintezu pirimidina iz osnovnih molekula u stanici. Povećana izmjena dUTP-a: Povećana razina dUTP-a sugerira da se dinukleotid uridin trifosfat sve više koristi u staničnim procesima. Ovi rezultati ukazuju na promjene u metaboličkim putovima povezanim s sintezom pirimidina i izmjenom nukleotida u stanicama nakon utišavanja gena *SAHH*. Ova saznanja mogu pružiti dublje razumijevanje regulacije metaboličkih procesa u stanicama i njihovih uloga u biološkim funkcijama.

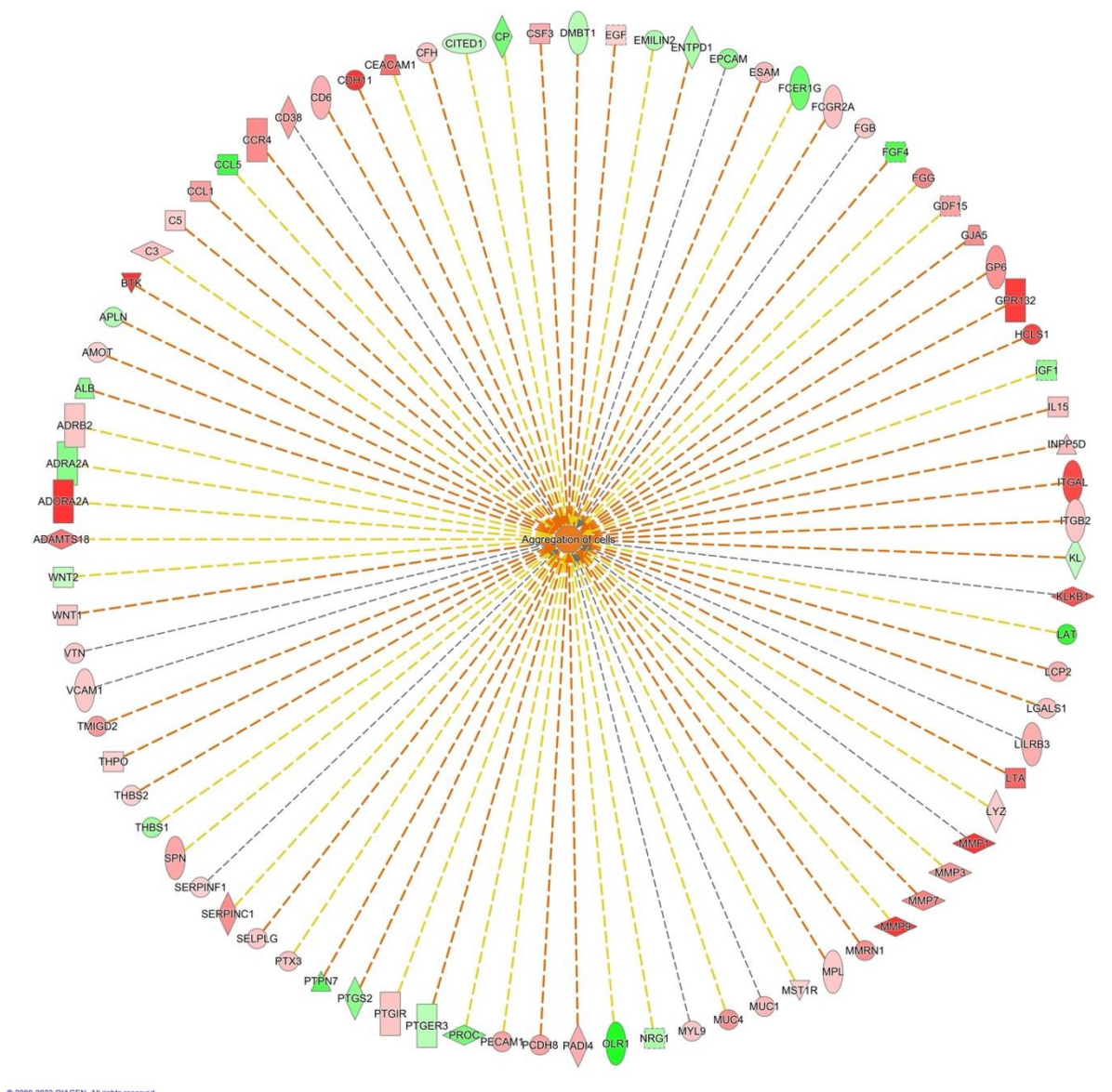
#### Hypermethioninemia with S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency 14



© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

**Slika 93.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji HEK293T za gen *SAHH* u IPA programu u procesu hypermethioninemia (od engl. hypermethioninemia) dobiveni uz pomoć Analize srži (od engl. Core analysis) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju HEK293T. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. Fold change)  $\geq 2$  i  $\leq -2$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: hipermetionemija (od engl. *hypermethioninemia*), S - adenozil homocistein hidrolazna deficijencija (od engl. *S - adenozil homocysteine hydrolase deficiency*).

Također, slika 93 prikazuje rezultate dobivene nakon diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj liniji HEK293T, u kojoj je gen, *S-adenozilhomocistein hidrolaza*, utišan. U ovim rezultatima primjećujemo i stanje hipermetionemije. Ovi podaci ukazuju na smanjenje razine hipermetionemije, što je stanje koje karakterizira visoka razina metionina u tijelu. Ovi podaci sugeriraju da utišavanje gena *S-adenozilhomocistein hidrolaza* može dovesti do regulacije metabolizma aminokiselina, posebno metionina, i smanjenja hipermetionemije u stanicama. To može imati važne implikacije za biološke procese i zdravlje stanica.



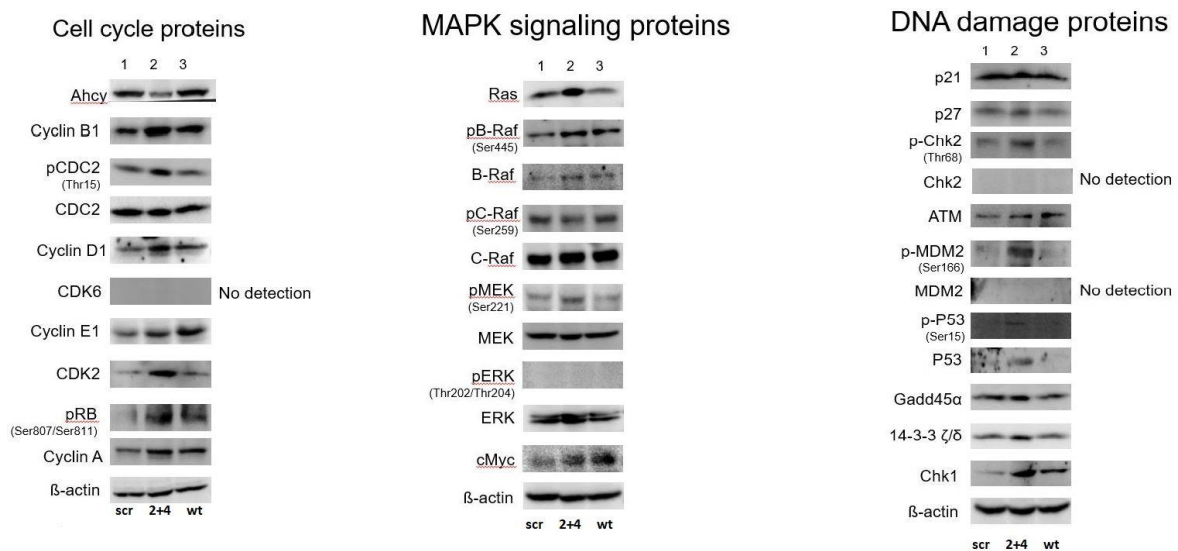
**Slika 94.** Rezultati analize diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj tumorskoj liniji HEK293T za gen *SAHH* u IPA programu u procesu agregacije stanica (od engl. *aggregation of cells*) adobiveni uz pomoć analize srži (od engl. *Core analysis*) u odnosu na kontrolnu staničnu liniju HEK293T. U analizi su korišteni parametri faktora povećanja (od engl. *Fold change*)  $\geq 0,5$  i  $\leq -0,5$  uz p-vrijednost od 0.05 kao prag signifikantnosti za staničnu liniju HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Narančasta boja označava pojačanu aktivnost dok plava označava smanjenu aktivnost. Crvena boja označava povećanu razinu transkripcije dok zelena boja označava sniženu razinu transkripcije. Objašnjenje najznačajnijih kratica i simbola: WNT1 - Wnt obitelj proteina 1 (od engl. *Wnt Family Protein 1*), CD6-CD6 molekula (od engl. *CD6 Molecule*), VTN - (od engl. *Vitronectin*), VCAM1 - (od engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), THPO - Trombopoeitin (od engl. *Thrombopoietin*), ADORA2A - Receptor adozina A2A (od engl. *Adenosine A2A Receptor*), CD38-CD38 molekula, (od engl. *CD38 Molecule*), CDH1-Kadherin 1 (od engl. *Cadherin 1*), CCR4 - CCR4, kemokinski receptor 4 (od engl. *Chemokine Receptor 4*), CSF3 Stimulirajući faktor rasta kolonija 3 (od engl. *Colony Stimulating Factor 3*), EGF-Epidermalni faktor rasta (od engl. *Epidermal Growth Factor*), HCLS1-Hematopoetski stanični-specifični Lyn substrat 1 (od engl. *Hematopoietic Cell-Specific Lyn Substrate 1*), MMP7 - Metalopeptidaza matriksa 7 (od engl. *Matrix*

*Metalloproteinase 7*), MMP- Metalopeptidaza matriksa 9 (od engl. *Matrix Metalloproteinase 9*), PCDH8 - Protokadherin 8 (od engl- *Protocadherin 8*), PDIA4 - Protein disulfid isomeraza A4 (od engl. *Protein Disulfide Isomerase A4*), AMOT-Angiomotin (od engl. *Angiomotin*), MMP1 - Metalopeptidaza matriksa 1 (od engl. *Matrix Metalloproteinase*), MMP3 - Metalopeptidaza matriksa 3 (od engl. *Matrix Metalloproteinase 3*), LTA - Limfotoksin alfa (od engl. *Lymphotoxin Alpha*), GPR132 - Receptor spregnut s G proteinom 132 (od engl. *G Protein-Coupled Receptor 132*), BTK Bruton tirozin kinaza(od engl *Bruton's Tyrosine Kinase*), CDH11- Kadherin 11 (od engl. *Cadherin 11*).

Uz to, slika 94 prikazuje rezultate dobivene nakon diferencijalne ekspresije gena u utišanoj staničnoj liniji HEK293T, u kojoj je gen, *SAHH*, utišan. Na ovim rezultatima primjećujemo povećanu ekspresiju gena: *WNT1*, *CD6*, *VTN*, *VCAM1*, *THPO*, *ADORA2A*, *CD38*, *CDH1*, *CCR4*, *CSF3*, *EGF*, *HCLS1*, *MMP7*, *MMP9*, *PCDH8*, *PDIA4*, *AMOT C3*, *MMP1*, *MMP3*, *LTA*, *GPR132*, *BTK*, *CDH11* i smanjenje ekspresije gena *IGF1*, *FGF4*, *PTPN7*, *PTGS2*, *KL*, *APLN*. Ovi rezultati ukazuju na promjene u ekspresiji gena koji su uključeni u proces agregacije stanica nakon utišavanja gena *S-adenozilhomocistein hidrolaza*. Ova saznanja mogu pružiti bolje razumijevanje mehanizama koji reguliraju staničnu agregaciju i njihovog utjecaja na biološke procese. Dodatno, *VCAM1* (Vaskularni stanična adhezijski molekula 1) je ključna molekula u procesu adhezije stanica, posebno leukocita, na unutarnjoj stijenci krvnih žila. Povećana ekspresija *VCAM1* može povećati adheziju leukocita na endotelne stanice, što može biti korisno u imunološkim reakcijama i upalnim procesima. Kadherin *CDH1* je član kadherinske obitelji proteina koji su važni za održavanje mehaničke adhezije između stanica. Povećana ekspresija *CDH1* može potaknuti snažniju adheziju između stanica, što može pridonijeti čvršćem povezivanju stanica u tkivima. Također, *CSF3* (Stimulirajući faktor nastanka kolonija 3) potiče stvaranje neutrofila, koji igraju važnu ulogu u adheziji i migraciji stanica prema mjestima upale. Povećana ekspresija *CSF3* može rezultirati povećanom adhezijom neutrofila na ciljane stanice. Metalopeptidaze matriksa *MMP7* (Matriks metalopeptidaza 7) i *MMP9* (Matriks metalopeptidaza 9) sudjeluju u razgradnji izvanstaničnog matriksa i mogu olakšati adheziju stanica na okolnoj matrici. Povećana ekspresija *MMP7* i *MMP9* može potencijalno potaknuti proces adhezije stanica na matriks. Povećana adhezija ovih gena može rezultirati jačim povezivanjem stanica i može imati različite učinke ovisno o kontekstu. U kontekstu upalnih procesa, to može pomoći u jačanju imunološkog odgovora, dok u drugim situacijama može utjecati na normalnu funkciju tkiva. Važno je daljnje istraživanje kako bi se razumjelo sve implikacije ovih promjena u ekspresiji gena na staničnu adheziju i biološke procese.

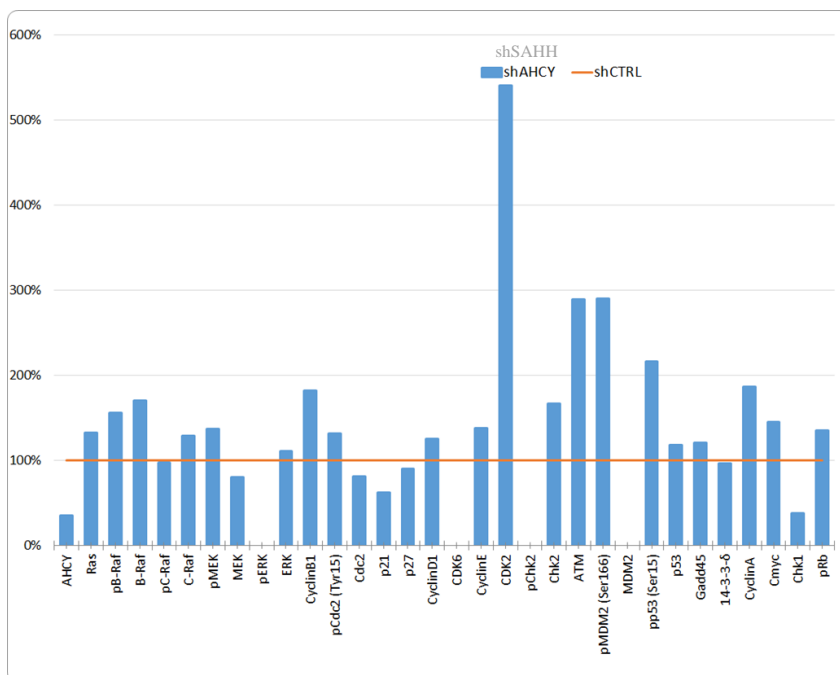
#### 4.6. Provjera ekspresije diferencijalno eksprimiranih gena u staničnim linijama s utišanim genom *SAHH*

Western blot metoda, također poznata kao imunoblotting, predstavlja esencijalnu tehniku za analizu specifičnih proteina u biološkim uzorcima. U ovoj fazi doktorske disertacije, provedena je Western blot metoda kako bismo istražili razinu ekspresije ključnih proteina koji igraju vitalnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, popravku DNA te signalnom prijenosu putem RAS proteina u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Posebno smo usmjereni na proučavanje razina ekspresije proteina STAT3 i LEF1 u tumorskim stanicama SW480 i MCF7.



**Slika 95.** Rezultati analize metode Western blot. U svakom uzorku specifičnim antitijelom pratila se količina utišanog gena *SAHH* i analiziranih proteina prijenosa signala MAPK (od engl. *MAPK signaling proteins*), (od engl. *Cell cycle proteins*) i (od engl. *DNA damage proteins*), te β-aktin (engl. *β-actin*), kao endogena kontrola kako bi se uzorci mogli uspoređivati. U Western blot metodi u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, nanoseno je 50 mikrograma proteina na gel za svaki uzorak. WT oznaka i broj 3 oznaka označava nepromijenjenu roditelju staničnu liniju HEK293T, 2 + 4 i oznaka 2 označuje kombinaciju lentivirskih čestica s shRNA 2 i shRNA 4 sekvencom za utišavanje gena *SAHH*, scr oznaka i oznaka 1 predstavlja kontrolnu staničnu liniju HEK293T s ugrađenim nasumičnim kontrolnim plazmidom scr (od engl. *scrambled*). Lista gena analiziranih western blot metodom: 4-3-3ζ/δ (D7H5), ATM, B-Raf, CDC2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, C-Raf, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E, Gadd45α, MDM2, MEK 1 / 2, p21, p27, p44/42, p53, pChk2, chk2, fosfo-B- Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK ½), fosfo-p53, MAPK, Ras, Rb. Cell cycle proteins = signalni putova uključenih u regulaciju staničnog ciklusa, MAPK signaling proteins = put MAP kinaza, DNA damage proteins = putovi popravka DNA oštećenja.

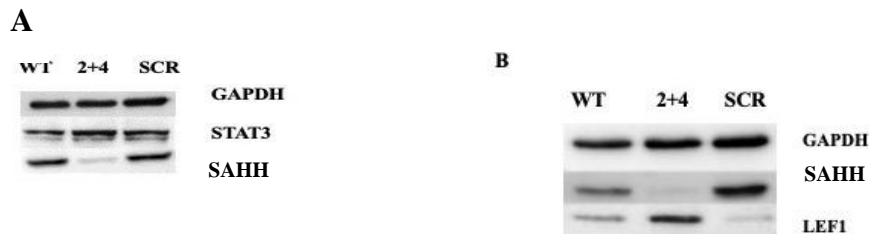
Na temelju Western blot analize (Slika 95) u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* može se vidjeti da do povećane ekspresije proteina dolazi u slučaju ciklina B1, pCDC2 i Ras proteina (Slika 96). Nisu detektirani pERK, Chk2, i CDK6, MDM2 proteini. Za preostale proteine: 4-3-3 $\zeta/\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, C-Raf, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E, Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1 / 2, p21, p27, p44/42, p53, pChk2, chk2, fofo-B- Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, phospho-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK 1/2), fosfo-p53, MAPK, Ras, Rb nije zabilježena značajna promjena na razini ekspresije proteina.



**Slika 96.** Rezultati analize metode Western blot u staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *S* - adenozil homocistein hidrolaza. Shematski dijagrami rezultata Western blot analize, pri čemu su promjene signala za svaki analizirani protein u lizatima stanica s utišanim *SAHH*=*AHCY* genom prikazane kao promjena u postotku u odnosu na kontrolne stanice (postavljene na 100%). Signal za svaki analizirani protein u stanicama sa utišanim *SAHH* genom prikazan je kao promjena u postotku u odnosu na shCTRL, koji je postavljen na 100% (narančasta crta). Lista gena analiziranih western blot metodom: 4-3-3 $\zeta/\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, C-Raf, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E,



Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1 / 2, p21, p27, p44/42, p53, pChk2, chk2, fosfo-B- Raf, fosfo-CDC2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK 1/2), fosfo-p53, MAPK, Ras, Rb. Korišten je program Image J za obradu rezultata.



**Slika 97.** Rezultati metode Western blot u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (a) rezultati Western blot analize proteina STAT3 u stanicama SW480, GAPDH je korišten kao unutarnja kontrola, 30  $\mu$ g cjelokupnih staničnih proteina je učitano po uzorku (b) rezultati Western blot metode proteina LEF1, GAPDH je korišten kao kontrola, 30  $\mu$ g cjelokupnih staničnih proteina je nanoseno po svakom uzorku. WT (od engl. *wilde type*) oznaka označava nepromijenjenu roditelju staničnu liniju SW480, 2 + 4 označuje kombinaciju lentivirskih čestistica s shRNA 2 i shRNA 4 sekvencom za utišavanje gena *SAHH*, SCR oznaka predstavlja kontrolnu staničnu liniju SW480 s ugrađenim nasumičnim kontrolnim plazmidom SCR (od engl. *scrambled*).

Prema rezultatima analize metode Western blot-a (Slika 97) može se vidjeti da je zabilježena značajno povećana ekspresija proteina LEF1 te da je također povećana ekspresija STAT3 proteina u utišanoj staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*.

## 5. RASPRAVA

Polazna hipoteza doktorskog rada je da stabilno utišavanje gena *SAHH* uz pomoć siRNA uzrokuje značajne promjene u ekspresijskom profilu staničnih linija MCF7, SW480, THLE3 i HEK293T zbog narušenog metilacijskog potencijala stanice uslijed nedostatne aktivnosti enzima SAHH-a te uslijed poremećene koncentracije omjera metabolita SAM/SAH u korist SAH-a. Stoga je cilj ovog doktorskog rada analizirati promjene u ekspresijskom profilu stanica sa stabilno utišanom ekspresijom enzima SAHH-a. Također, cilj ovog istraživanja je i odrediti koncentraciju ključnih metabolita SAM-a, SAH-a i adenzina. S obzirom da su MCF7 i SW480 tumorske stanične linije također nas zanima dolazi li do promjena na razini transkriptoma u proteinima koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, proliferacije, prijenosa signala putem Wnt te proteinima LEF i STAT3 koji imaju važnu ulogu u procesu proliferacije tumorskih stanica. Također cilj je vidjeti da li se promjena ekspresije na razini proteina: 4-3-3 $\zeta$ / $\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, Raf, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E, Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1/2, p21, p27, p44/42, p53, pChk2, chk2, fosfo-B- Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK  $\frac{1}{2}$  ), fosfo-p53, MAPK, Ras, Rb poklapa s promjenom ekspresije na razini transkriptoma u staničnoj liniji HEK293T koja nije tumorska, ali je transformirana *in vitro*. S obzirom da je deficijencija SAHH-a metabolički i metilacijski poremećaj, cilj je vidjeti hoće li utišavanje ovog enzima imati veći utjecaj na metaboličke ili metilacijske prijenose signala te hoće li do istih efekata doći u tumorskim staničnim linijama i staničnoj liniji modificiranoj *in vitro*. Utvrđeno je da je razina aktivnosti SAHH-a održana na 20% u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, korištenjem lentivirusa za utišavanje gena, postignuto je najveće smanjenje ekspresije SAHH-a u SW480 staničnoj liniji, zatim u MCF7 staničnoj liniji, dok je u HEK293T staničnoj liniji zabilježena najmanja razina smanjenja ekspresije SAHH-a. Za THLE3 staničnu liniju nije bilo moguće uspostaviti model S-adenozil homocistein hidrolazne deficijencije jer stanice nakon utišavanja lentivirusima umiru apoptozom. Ovi rezultati su u skladu s analizom RNA - seq koja je provedena kako bi se istražila promjena u ekspresiji gena u utišanim staničnim linijama. U SW480 utišanoj staničnoj liniji zabilježeno je najviše diferencijalno eksprimiranih gena, dok je u HEK293T utišanoj staničnoj liniji zabilježeno najmanje diferencijalno eksprimiranih gena. Ova promjena u ekspresiji gena može se povezati s ulogom SAHH u održavanju metilacijskog potencijala stanice i epigenetičkim regulacijama s obzirom da upravo u SW480 utišanoj staničnoj liniji imamo najbolje utišan gen *SAHH* dok je HEK293T utišanoj staničnoj liniji najviše zadržana aktivnost gena *SAHH*. Prethodna istraživanja su pokazala da SAHH-a igra

ključnu ulogu u metabolizmu S-adenozil metionina (SAM), koji je važan donor metilne skupine u brojnim biološkim procesima, uključujući metilaciju DNA i histona. Smanjenje aktivnosti SAHH-a može rezultirati smanjenjem dostupnosti SAM-a, što može utjecati na metilacijski potencijal stanice i epigenetičke regulacije gena. Ovo može objasniti promjene u ekspresiji gena koje su zabilježene u utišanim staničnim linijama. Podršku ovim podacima pronalazimo u literaturi. Prethodna istraživanja su pokazala da smanjenje aktivnosti SAHH-a može rezultirati promjenama u metilacijskom potencijalu stanica i epigenetičkim regulacijama gena (131). Također, istraživanja su pokazala da promjene u ekspresiji gena mogu biti povezane s nedostatkom SAHH-a i smanjenjem dostupnosti SAM-a (132). Uzimajući u obzir ove podatke, može se zaključiti da smanjenje aktivnosti SAHH-a u utišanim staničnim linijama SW480, MCF7 i HEK293T rezultira promjenama u ekspresiji gena, pri čemu je najizraženija promjena zabilježena u SW480 utišanoj staničnoj liniji. Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu SAHH-a u održavanju metilacijskog potencijala stanica i epigenetičkim regulacijama gena. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se detaljnije razumjelo kompleksno djelovanje SAHH-a i njezin utjecaj na stanične procese i funkcije. Na temelju rezultata analize Western blota, primijećeno je da utišavanje gena *SAHH* u staničnoj liniji HEK293T rezultira povećanom ekspresijom proteina ciklina 1, pCDC2 i proteina Ras. Ovi proteini su ključni regulatori staničnog ciklusa i signalne transdukcije te su povezani s procesima proliferacije i tumorigeneze (133, 134). S druge strane, nisu uočene značajne promjene u ekspresiji proteina pERK, Chk2, CDK6 i MDM2. To sugerira da utišavanje gena *SAHH* ne utječe na njihovu ekspresiju u analiziranoj staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Ostali analizirani proteini, uključujući 4-3-3 $\zeta/\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, C-Raf, ciklin A, ciklin D1, ciklin E, Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1/2, p21, p27, p44/42, p53, pChk2, chk2, fosfo-B-Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK (ERK 1/2), fosfo-p53, MAPK, Rb, nisu pokazali značajne promjene u ekspresiji proteina nakon utišavanja gena *SAHH*. Navedeni rezultati ukazuju na specifičan utjecaj utišavanja gena *SAHH* na ekspresiju određenih proteina u staničnoj liniji HEK293T. Povećana ekspresija ciklina B1, pCDC2 i Ras (133,134) može imati važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i signalnih putova povezanih s proliferacijom stanica. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razumjelo kako ove promjene u ekspresiji proteina utječu na staničnu fiziologiju i moguće terapijske strategije za ciljanje gena *SAHH* u kontekstu bolesti. Na temelju rezultata može se zaključiti da putovi detekcije oštećenja DNA nisu pod utjecajem utišavanja gena *SAHH* dok su putovi uključeni u regulaciju staničnog ciklusa i putovi MAP kinaza pod utjecajem utišavanja gena *SAHH*. Na temelju dodatnih rezultata analize Western blota, primijećeno je da utišavanje gena

*SAHH* u staničnoj liniji SW480 rezultira povećanom ekspresijom proteina LEF1 i STAT3 u usporedbi s kontrolnim linijama (SCR, WT). Povećana ekspresija proteina LEF1 sugerira aktivaciju signalizacijskog puta Wnt. LEF1 je transkripcijski faktor koji igra ključnu ulogu u regulaciji gena povezanih s prijenosom signala putem Wnt. Ova promjena u ekspresiji proteina LEF1 može ukazivati na aktivaciju signalnog puta Wnt, koji je važan za regulaciju stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja (135). Također, primjećeno je povećanje ekspresije proteina STAT3 u staničnoj liniji SW480 s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. STAT3 je signalni transkripcijski faktor koji je uključen u brojne biološke procese, uključujući regulaciju rasta, preživljavanja i imunološkog odgovora. Povećana ekspresija proteina STAT3 može ukazivati na aktivaciju STAT3 signalnog puta, koji može imati važnu ulogu u promicanju stanične proliferacije i preživljavanja (136). Ovi rezultati sugeriraju da utišavanje gena *SAHH* može imati utjecaj na aktivaciju prijenosa signala putem Wnt povećane ekspresije proteina LEF1, kao i na aktivaciji STAT3 signalnog puta putem povećane ekspresije proteina STAT3. Ova saznanja mogu pružiti nove uvide u mehanizme regulacije staničnih procesa i mogućnosti terapijsko ciljanja gena *SAHH* u kontekstu bolesti. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razumjelo kako ove promjene u ekspresiji proteina LEF1 i STAT3 utječu na staničnu signalizaciju i fiziologiju te kako se mogu iskoristiti u razvoju novih terapijskih strategija. Primijećeno je da koncentracija adenzina nije konzistentna u sve tri stanične linije (MCF7, SW480, HEK293T) s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, što može ukazivati na brzu metabolizaciju adenzina zbog njegove toksičnosti. U staničnoj liniji HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH* zabilježena je snižena koncentracija adenzina u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovo može ukazivati na moguću ulogu *SAHH*-a u metabolizmu adenzina. Pretpostavlja se da nedostatak aktivnosti *SAHH*-a može rezultirati akumulacijom S-adenozil homocisteina, što može inhibirati enzime uključene u metabolizam adenzina i dovesti do smanjene koncentracije adenzina. Međutim, u utišanim staničnim linijama MCF7 i SW480 zabilježena je nepromjenjena razina koncentracije adenzina u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovo može ukazivati na prisutnost alternativnih metaboličkih putova koji kompenziraju nedostatak *SAHH*-a u održavanju normalne koncentracije adenzina. Prethodna istraživanja su pokazala da *SAHH*-a igra ključnu ulogu u metabolizmu adenzina, te da njezina deficijencija može rezultirati promjenama u koncentraciji adenzina (130). Također, istraživanja su pokazala da brza metabolizacija adenzina može biti posljedica njegove toksičnosti, što može objasniti varijabilnost u koncentraciji adenzina u različitim staničnim linijama (131). Uzimajući u obzir ove podatke, može se zaključiti da utišanje ekspresije S-adenozil homocistein hidrolaze može rezultirati promjenama u koncentraciji adenzina u stanicama, ali je uloga tkivno specifična.

Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razumjelo kompleksno djelovanje S-adenozil homocistein hidrolaze i njezin utjecaj na metabolizam adenoizina. Razumijevanje ovih mehanizama može pružiti nove uvide u patofiziologiju i potencijalne terapijske ciljeve povezane s deficijencijom S-adenozil homocistein hidrolaze. Nakon utišavanja THLE3 stanična linija umire apoptozom te nije bilo moguće uzgojiti dovoljno stanica za daljnje eksperimente što sugerira da je uloga S-adenozil homocistein hidrolaze tkivno specifična i esencijalna za THLE3 staničnu liniju. Na temelju dobivenih rezultata, primijećeno je da nedostatak enzima SAHH u staničnim linijama (SW480, MCF7, HEK293T) s utišanom ekspresijom gena *SAHH* rezultira značajnim povećanjem razine SAH-a, dok razine SAM-a nisu pokazale značajnu razliku u odnosu na kontrolnu staničnu liniju. Povećanje razine SAH-a u SAHH-deficijentnim stanicama ukazuje na narušavanje kapaciteta metilacije, budući da SAH-a djeluje kao inhibitor enzima metiltransferaze. Ova promjena u omjeru SAM/SAH u korist SAH-a može imati značajan utjecaj na metilacijski potencijal stanica (132), što može rezultirati epigenetičkim modifikacijama i promjenom u ekspresiji gena koji su povezani s deficijencijom SAHH-a. S obzirom na to da je SAM prethodnik SAH-a i ključni donator metila, očekivalo se da će se u SAHH-a deficijentnim stanicama primijetiti smanjenje razine SAM-a. Međutim, iako su razine SAM-a bile nešto niže u SAHH-deficijentnim stanicama u usporedbi s kontrolnim stanicama, ta razlika nije bila značajna. Ovi rezultati ukazuju na narušavanje omjera metaboličkog potencijala između SAM-a i SAH-a u korist SAH-a u SAHH-a deficijentnim stanicama. Taj poremećaj može imati važne posljedice na metilacijski potencijal stanica, budući da je metilacija ključan proces u regulaciji ekspresije gena i epigenetičkim modifikacijama. Povećana razina SAH-a kao inhibitora metiltransferaza može rezultirati smanjenom dostupnošću metilnih donora i poremećajem metilacijskih procesa (133). Ovi podaci sugeriraju da deficijencija enzima SAHH-a dovodi do narušavanja omjera SAM/SAH, što može imati značajan utjecaj na epigenetičke modifikacije i promjenu u ekspresiji gena povezanih s deficijencijom SAHH-a. Razumijevanje ovih metaboličkih promjena može pružiti nove uvide u mehanizme regulacije gena i potencijalno otvoriti put za razvoj terapijskih strategija usmjerenih na obnovu normalnog metaboličkog potencijala i metilacijskih procesa u tim stanicama. Integrativna analiza ekspresije gena pokazala je promjene u putu Wnt. Odnosno u aktivnosti molekula c-Myc, LBH, Oct4, NANOG i LEF1. Navedeni geni povezani su s povećanom ekspresijom proteina koji su tipično uključeni u tumoru dojke, gastrointestinalnom tumoru, tumoru prostate, leukemiji (139-161). Ključni geni koji održavaju osobine matičnih stanica uključuju c-myc, ciklin D1, Oct4 i NANOG, a njihovo utišavanje pokreće diferencijaciju (162-174). Ti geni su također efektorski geni prijenosa signala putem Wnt-a i

aktiviraju se regrutiranjem LEF1 na njihove odgovarajuće promotorske lokacije. c-MYC je transkripcijski faktor koji je ključan za embriogenezu i regulira transkripciju gena uključenih u stanični ciklus te ciljane molekule u prijelazu G1/S kao što su CDK2, CDK4, CDC25A i E2F (174). Ciklin D1 sudjeluje u progresiji staničnog ciklusa, posebno u G1 fazi te je neophodan za rast i proliferaciju (153). Promotori za c-myc i ciklin D1 sadrže LEF1-konsenzusne sekvence koje omogućuju vezivanje kompleksa  $\beta$ -katenin-LEF1 i modulaciju ekspresije c-myc i ciklin D1 (153-156). Osim toga, transkripcijski faktor Myc identificiran je kao glavni regulator u ovom sustavu diferencijalno eksprimiranih odnosno izraženih gena, što ukazuje da igra ključnu kao potencijalni glavni krovni (*master*) regulator u diferencijalno eksprimiranim signalnim mrežama u stanicama SW480 s nedostatnom aktivnošću SAHH-a. Nadalje, transkripcijski faktor LEF1 ima povećanu razinu ekspresije uz faktor povećanja od 0.433419319 u ovim signalnim putovima u podacima dobivenim nakon diferencijalne ekspresije gena. Točkaste mutacije *LEF1* smještene u egsonima 2 (K86E) i 3 (P106L) rezultiraju povećanom aktivnošću promotora i ekspresijom c-MYC-a i ciklina D1, što uzrokuje povećanu proliferaciju stanica leukemije (168). Ekspresija LEF1 značajno je veća u tkivima kolorektalnog karcinoma (CRC, od engl. *colorectal carcinoma*) nego u kontrolnim stanicama debelog crijeva, što je negativno povezano s ekspresijom Notch2 (165). Promijenjena ekspresija i funkcija LEF1 često se javljaju u nekoliko vrsta tumora, poput adenokarcinoma pluća, karcinoma debelog crijeva, karcinoma endometrija, tumor prostate i leukemije (164-168). Visoka ekspresija LEF1 i niska ekspresija Notch2 povezani su s tumorigenezom, kraćim ukupnim vremenom preživljavanja i većim rizikom od smrti kod pacijenata s CRC-om (164-166). Dodatno, prisutnost povećane razine LEF1 povezana je s povećanim rizikom od metastaza jetre kod CRC. Smanjenje ekspresije LEF1 u stanicama CRC rezultira različitim učincima na stanične procese kao što su a) povećana apoptoza u usporedbi s kontrolnim stanicama *in vitro*, i smanjeni rast tumora u usporedbi s normalnim stanicama tumora debelog crijeva *in vivo* (168), b) smanjena invazivnost putem smanjene ekspresije MMP-2 i MMP-9, i c) promijenjena ekspresija gena uključenih u regulaciju ekspresije metalopeptidaza matriksa (169) kao što je metalopeptidaza 7 (MMP7, enzim proteolitički ovisan o  $Zn^{2+}$ ). Ove studije pokazuju važnost LEF1 u razumijevanju tipičnih karakteristika tumora, uključujući proliferaciju, invaziju, migraciju i preživljavanje, među različitim vrstama tumora te ističu njegovu nužnost u propagiranju ovih učinaka. LEF1 ne samo da se nalazi u središtu signalnih putova i mehanizama koji pokreću i održavaju karcinogenezu, nego i smanjene ekspresije LEF1 smanjuje proliferativna i invazivna svojstva tumora. Ove informacije pokazuju da LEF1 igra ključnu ulogu u preživljavanju i aktivnosti tumorskih procesa. Prethodno je već pokazano da LEF1 ima važnu ulogu u signalnom putu Wnt/ $\beta$ -katenin,

koji je je u interakciji s nekoliko signalnih putova. Odnosno, zabilježeno je da LEF1 potiče EMT u stanicama tumora aktivirajući Wnt/ $\beta$ -katenin prijenos signala, što može aktivirati prijenos signala posredovan Notch i GPCR receptorima. Slično tome, pokazano je da prijenos signala putem kalcija regulira Wnt/ $\beta$ -katenin prijenos signala aktiviranjem kalcijem-kalmodulin ovisnog prijenosa signala i prijenosa signala posredovanog proteinskom kinazom II (CaMKII, od engl. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*), koja može fosforilirati LEF1, aktivirati njegovu transkripcijsku aktivnost i potaknuti EMT. Stoga LEF1 može neizravno modulirati aktivnost nekoliko signalnih putova identificiranih analizom RNA-seq interakcijom s drugim ključnim signalnim molekulama, kao što su  $\beta$ -katenin, Notch i GPCR. Niža ekspresija TCF4 (-3.915) primijećena je u prije spomenutim signalnim putovima, a poznato je da je TCF4 u direktnoj interakciji s LEF1, poznatoj kao interakcija TCF/LEF. Kada je LEF1 prekomjerno izražen, potiče povećanu invazivnost tumorskih stanica i inducira EMT (168-171-174). Transkripcija LEF1 može se direktno regulirati kompleksima TCF4- $\beta$ -katenin. Transkripcijski faktori TCF (od engl. *T-cell factor*) i LEF (od engl. *lymphoid enhancer-binding factor*) pripadaju istoj porodici transkripcijskih faktora i oba se vežu za isto mjesto na lancu DNA. Oni se natječu za vezanje na specifične sljedove DNA koje se nazivaju TCF/LEF-vezna mjesta (od engl. *TCF/LEF binding sites*). Kada se TCF/LEF faktori vežu na ove specifične sljedove DNA, mogu aktivirati ili inhibirati ekspresiju gena koji su regulirani tim putem. Put TCF/LEF uključen je u signalni put Wnt, koji je važan za različite biološke procese kao što su razvoj, proliferacija stanica, diferencijacija i regulacija gena. Kada se signalni put Wnt aktivira, TCF/LEF se aktiviraju i prelaze u jezgru stanice gdje se vežu za specifične sljedove DNA i reguliraju ekspresiju gena koji su ključni za određene biološke procese. Ovaj put igra važnu ulogu u razvoju organizma i održavanju homeostaze. Budući da se LEF1 ne eksprimira u normalnoj sluznici debelog crijeva, već se nalazi u ljudskom CRC-u (171), tijekom karcinogeneze može doći do promjene partnera koji se vežu za  $\beta$ -katenin s TCF4 na LEF1, što može omogućiti povećan EMT i zloćudnu progresiju. LEF1 može posredovati ekspresiju gena prijenosa signala Wnt putem regrutiranja  $\beta$ -katenina na promotore ciljnih gena. Brojni nizvodni ciljni geni mogli bi biti pogođeni, poput *c-MYC*, *CYCD1-1* (kodira za ciklin D1), *BIRC5* (kodira za survin) i *VEGF*. Zaključno, kanonski put Wnt i LEF1 povezani su s navedenim signalnim putovima: prijenos signala posredovan kalcijem - može se preklapati s nekanonskim putem Wnt putem različitih mehanizama. Kalcijevi ioni mogu modulirati aktivnost komponenata signalizacije Wnt, uključujući LEF1, utječući na stabilnost  $\beta$ -katenina, interakciju između  $\beta$ -katenina i LEF1 ili na same događaje nizvodne signalizacije. Aktivacija prijenosa signala Wnt također je odgovorna za regulaciju ekspresije gena, ali i za preuređenje staničnog citoskeleta

zajedno s kinazama ROCK i JNK. Put WNT/Ca<sup>2+</sup> povezan je s kontrakcijom mišića, transkripcijom gena i aktivacijom enzima te aktivira putove ovisne o  $\beta$ -kateninu i neovisne o  $\beta$ -kateninu što je vrlo zanimljivo jer pacijenti imaju simptome miopatije. Dodatno, LEF1, kao nizvodni izvođač kanonskog puta Wnt, može sudjelovati u regulaciji EMT-a. Također, EMT je dinamičan proces uključen u preoblikovanje tkiva i napredovanje tumora. Aktivacija kanonskog puta Wnt, uključujući sudjelovanje LEF1, povezana je s indukcijom ili održavanjem programa EMT. Prijenos signala putem GPCR-a može se preklapati s kanonskim putem Wnt putem različitih mehanizama. Ligandi Wnt-a mogu biti aktivirani od strane kinaza GPCR-a, što dovodi do aktivacije nizvodnih signalnih kaskada koje mogu modulirati kanonski put Wnt i potencijalno utjecati na aktivnost LEF1, što je vidljivo u rezultatima analize RNA-seq-a niži diferencijalni izraz odnosno smanjenu ekspresiju GPCR-a. Osim LEF1 na razini proteina, temeljem analize IPA podataka dobivenih analizom RNA-seq, otkriven je *Wnt6* kao diferencijalno eksprimirani gen s faktorom povećanja 4,078. *Wnt6*, član obitelji Wnt koji je visoko očuvan u različitim vrstama, uglavnom se smatra članom puta signalizacije Wnt ovisnog o  $\beta$ -kateninu. Međutim, također djeluje putovima neovisnim o  $\beta$ -kateninu. Visoka ekspresija *Wnt6*-a povećava proliferativnu sposobnost stanica CRC-a (humanih linija CRC-a). Gubitak proteina *Wnt6* inhibira aktivnost kaspaze-3 i povećava ekspresiju proteina X povezanog s limfomom B stanica 2 (*Bax*). Međutim, prekomjerna ekspresija *Wnt6* obrće ovaj učinak. To ukazuje da ekspresija proteina *Wnt6* može utjecati na gene koji reguliraju aktivnost apoptoze kako bi inhibirao apoptozu i poticao razvoj tumora. Nadalje, visoka razina proteina *Wnt6* povećava ekspresiju *MMP2* i potiče migraciju stanica CRC-a (174-177). *MMP2* također sudjeluje u razgradnji izvanstaničnog matriksa (176). Stoga ekspresija *Wnt6* potiče razvoj i metastaziranje CRC-a. Osim toga, promotorsko područje *Wnt6* veže polimorfni adenomski protein (*PLAGL2*) u jezgri stanica CRC-a (177-178). Protoonkogen *PLAGL2* (od engl. *Pleomorphic Adenoma Gene Like 2*), protein iz obitelji gena *PLAG* (178-184), je protoonkogen i transkripcijski aktivator. *PLAGL2* se povezuje s promotorskim područjem *Wnt6* i aktivira put prijenosa signala Wnt ovisan o  $\beta$ -kateninu, čime potiče ekspresiju ciljanih gena nizvodno (kao što su *MMP7*, *CCND1*) i potiče razvoj tumora. Na temelju analize podataka dobivenih analizom RNA-seq, identificirano je nekoliko proteina koji su potencijalno regulirani putem proteina *Myc*. Geni *SAHH*, *SOX5*, *SON*, *OLRQ*, *LGRP* i *COL4AQC* bi mogli biti regulirani putem *MYC* gena na temelju provedenih analiza. Zajedno s *Oct4* i *NANOG*, *SOX2* regulira pluripotenciju i samoobnovu matičnih stanica, utječući na promotore velikog broja drugih gena. Također ima utjecaj na proliferaciju i apoptozu, kao i na migraciju i adheziju stanica (185). U slučaju proteina *Col4a1*, koji je komponenta bazalnih membrana, niža ekspresija potencijalno bi moglo narušiti



integritet bazalnih membrana i utjecati na ponašanje stanica tumora, invaziju i metastazu. Međutim, precizan utjecaj ovisio bi o specifičnim molekularnim mehanizmima i interakcijama unutar tumorskog mikrookruženja. Protein MYC - transkripcijski aktivator, djeluje kao glavni regulator u regulaciji ekspresije gena, posebno u potencijalnom smanjenju ekspresije proteina poput Sox5, Spn, Olr1, Lgrp i Col4a1. MYC ostvaruje svoju regulatornu ulogu direktnim vezanjem na regulatorna područja ovih gena i moduliranjem njihove transkripcijske aktivnosti. Kroz svoju regulatornu funkciju, MYC pridonosi kontroli staničnih procesa, uključujući rast, proliferaciju i diferencijaciju stanica. Smanjenje ekspresije ovih proteina putem proteina MYC važno je za održavanje normalnih staničnih funkcija i homeostaze. Proteini poput Sox5, Spn i Olrq povezani su s različitim aspektima napredovanja tumora i metastaza. Snižena ekspresija ovih proteina potencijalno može dovesti do promjena u ekspresiji gena i staničnim procesima povezanim s migracijom i metastazama. Međutim, točne posljedice smanjene ekspresije ovise o specifičnim molekularnim putovima i staničnim kontekstima uključenim u svaki slučaj. Važno je napomenuti da je uloga ovih proteina u tumorima složena i višestрана, a njihovi učinci mogu varirati ovisno o specifičnom tipu tumora i njegovim molekularnim karakteristikama. Osim toga, ALCAM (aktivna molekula adhezije leukocita, od engl. *Activated leukocyte cell adhesion molecule*), također poznat kao CD166, ima značajnu ulogu u poticanju migracije stanica tumora. Kao molekula adhezije stanica, ALCAM sudjeluje u olakšavanju interakcija između stanica i njihova okoliša. Nadalje, utjecaj ALCAM-a proteže se na preuređenja staničnog citoskeleta, potičući stvaranje izbočina stanica koje ubrzavaju usmjerenje stanične migracije. Njegova interakcija s molekulama signalizacije modulira putove bitne za učinkovito kretanje stanica. Također, doprinos ALCAM-a u procesu EMT-a je očigledan, dodatno poboljšavajući pokretljivost i invazivnost stanica tumora. Važno je napomenuti da naša opažanja u stanicama s nedostatkom SAHH-a pružaju uvid u ove procese produbljujući razumijevanje složene uloge koju ima molekula ALCAM unutar metastatskog potencijala (185-192). Također primijećena je u regulaciji puta epitelno-mezenhimalne tranzicije diferencijalna ekspresija uz vrijedost faktora povećanja (od engl. *log Fold change*) -11,705 za *CDH12*. Smanjena ekspresija kadherina 12 (gen *CDH12*), člana porodice kadherina, molekula adhezije stanica, povezano je s poticanjem povećane metastatske sposobnosti i migracije stanica. Kadherini igraju ključnu ulogu u održavanju adhezije stanica i integriteta tkiva. Gubitak ili smanjenje ekspresije *CDH12* može poremetiti adhezivne interakcije između stanica, dovodeći do smanjenog kohezivnog ponašanja unutar primarnog tumora i olakšavanja odvajanja tumorskih stanica sa primarnog mjesta. Ovaj gubitak stanične adhezije može pojačati migracijsku sposobnost stanica tumora, omogućavajući im invaziju u okolna tkiva i širenje na

udaljene lokacije. Posljedično, smanjenja ekspresija *CDH12*, zajedno sa smanjenim molekulama adhezije, može doprinijeti agresivnijem i metastatskom fenotipu kod stanica tumora (186-193). Karakterističan znak EMT-a je gubitak epitelnih markera, obično označen prisutnošću E-kadherina, uz dobivanje ekspresije mezenhimalnih markera poput N-kadherina i vimentina, praćeno invazivnim fenotipom. Epitelne stanice određene su apikalno-bazalnom polaritetom, pričvršćenjem na bazalnu laminu i čvrstim staničnim spojevima, dok su mezenhimske stanice karakterizirane odvojenim rasporedom u stromi s apikalno-bazalnim polaritetom i sposobnošću migracije. Koncept klasičnog binarnog EMT-a je proširen na sveobuhvatniji pogled na napredovanje tumora, nadopunjujući tradicionalnu "potpunu fenotipsku konverziju" tijekom invazije i metastaza. EMT se sada smatra fleksibilnim statusom plastičnosti poznatim kao "djelomični EMT program", umjesto da nosi status potpune fenotipske transformacije tijekom napredovanja tumora (195-203). Članovi obitelji Snail (Snail (SNAI1) i Slug) i članovi obitelji s veznom domenom E-box za cink (ZEB) dobro su poznati kao krovni transkripcijski faktori i oni utišavaju ekspresiju epitelnih gena, među kojima su E kadherin, klaudin i okcludin. Direktno se vežu i suzbijaju E-kadherin na bliskom promotoru *CDH1* te preuređuju međustaničnu adheziju (103). Snail i ZEB također suzbijaju druge epitelne markere i aktiviraju mezenhimalne gene. Nadalje, poznato je da krovni transkripcijski faktori EMT preuređuju epitelne polariteta i ometaju stvaranje bazalne membrane kako bi potaknuli povoljne okolnosti za invaziju. Snail, Slug i ZEB mogu direktno vezati na promotore gena koji kodiraju ključne komponente bazalne membrane, kao što su laminini, kolageni i nidogeni, te suzbijati njihovu ekspresiju. Smanjenjem ekspresije ovih proteina, transkripcijski faktori smanjuju integritet i funkciju bazalne membrane, što olakšava razgradnju i reorganizaciju tijekom EMT-a. Kroz represiju gena kao što je *CDH1*, koji kodira E-kadherin, ovi faktori smanjuju staničnu koheziju unutar epitelnog sloja. E-kadherin je ključan za održavanje stanične adhezije i polariteta, a njegova represija dovodi do gubitka stanične adhezije i povećane mobilnosti stanica. Ovi putevi poznati su po važnim ulogama u različitim staničnim procesima, kao što su rast i proliferacija stanica, stanično kretanje te stvaranje i organizacija stanica. Povećana ekspresija LEF1 u tim putovima može ukazivati na moguću regulatornu ulogu LEF1 u tim procesima. Nadalje, u kontekstu nedostatka SAHH-a, povećana ekspresija LEF1 može pridonijeti disfunkciji tih putova, dodatno ističući važnost SAHH-a u održavanju pravilne stanične funkcije. Mutacija gena *CDH1* i gubitak pripadajućeg proteina E-kadherina potiču EMT pri čemu stanica gubi svoju sposobnost adhezije stanica i apikalne polaritete (204-219). Osim toga, važne signalne interakcije između E-kadherina i drugih staničnih putova uključuju putove RTK/EGFR/MAPK, P-120/Rho/RAC i  $\beta$ -katenin/Wnt. Ovi signalni putevi poznati su

po važnim ulogama u različitim staničnim procesima, kao što su rast i proliferacija stanica, stanično kretanje te stvaranje i organizacija stanica. Povećana ekspresija LEF1 u ovim putovima može sugerirati moguću regulatornu ulogu LEF1 u tim procesima. Prijenos signala E-kadherin/ $\beta$ -katenin/Wnt  $\beta$ -katenin ima središnju ulogu kao proteinski adapter koji povezuje E-kadherin s aktinskim citoskeletom u adheziji stanica-stanica. Također ostaje ključna komponenta u signalizaciji putem prijenosa signala Wnt. U fiziološkim uvjetima, citoplazmatski  $\beta$ -katenin ostaje u neaktivnom stanju vežući se za degradacijski kompleks APC/GSK3 $\beta$ /Axin/CK1 i podvrgava se fosforilaciji radi ubikvitinacije. Prijenos signala putem Wnt-a inhibira ovaj degradacijski kompleks fosforilacijom i inhibicijom kompleksa GSK3 $\beta$ -a. To povećava kritični prag  $\beta$ -katenina u citoplazmi potreban za translokaciju u jezgru. U uvjetima koji omogućuju nenormalnu signalizaciju putem Wnt-a, kao što su parakrini faktori iz tumorskog okruženja, citokini iz stromalnih stanica i TNF- $\alpha$  iz makrofaga,  $\beta$ -katenin se translocira u jezgru i veže se za TCF-4/LEF1 kako bi inducirao ciljne gene putem Wnt-a kao što su c-MYC, ciklini, MMP. To dovodi do nekontrolirane stanične proliferacije i rasta (216). U odsustvu E-kadherina, oslobađanje nezadržanog  $\beta$ -katenina iz membranski vezanog kompleksa kadherin-katenin dovodi do viška citoplazmatskog  $\beta$ -katenina. Pokazano je da  $\beta$ -katenin koristi istu veznu površinu kao i TCF i E-kadherin, pri čemu E-kadherin proteini imaju superiornu afinitetnu vezu. Vjerojatno koristi istu (svoju) domenu za vezanje i E kadherina i TCF, ali E kadherin s većim afinitetom. Postoji naznaka kako E-kadherin gubi svoju prisutnost, višak nezadržanog citoplazmatskog  $\beta$ -katenina izbjegava degradaciju i ulazi u jezgru kako bi se vezao za TCF i aktivirao put Wnt. Kinaza glikogen sintaze 3 (GSK-3, od engl. *Glycogen synthase kinase 3*) igra ključnu ulogu u regulaciji  $\beta$ -katenina putem njegove degradacije. U normalnim uvjetima, GSK-3 fosforilira  $\beta$ -katenin, označavajući ga za degradaciju putem proteasoma. Međutim, kada je put Wnt aktiviran, dolazi do inhibicije GSK-3, što rezultira smanjenom fosforilacijom  $\beta$ -katenina i sprječava njegovu degradaciju. Kada je E-kadherin prisutan, on ima superiornu afinitetnu vezu s  $\beta$ -kateninom, što znači da se  $\beta$ -katenin preferencijalno veže za E-kadherin i ostaje u citoplazmi. Međutim, kada E-kadherin gubi svoju prisutnost, višak nevezanog citoplazmatskog  $\beta$ -katenina može izbjeći degradaciju putem GSK-3 i nakupiti se u citoplazmi. Ovaj nevezani  $\beta$ -katenin može zatim ući u jezgru stanice, gdje se može vezati za transkripcijske faktore poput TCF i aktivirati put Wnt. Osim aktivacije nizvodnih gena povezanih s Wnt, također je pokazano da nuklearna translokacija  $\beta$ -katenina potiskuje ekspresiju PTEN. Dodatno, PTEN je tumorski supresor i ključni regulator puta AKT/mTOR. Time je pažljivo uravnoteženo djelovanje puta Wnt/ $\beta$ -katenin/E-kadherin nagnuto u korist nekontrolirane stanične proliferacije koja promovira onkogenezu.

Diferencijalna ekspresija ciklina i regulacija signala staničnog ciklusa te nedostatak enzima SAHH-a mogu značajno utjecati na stanične procese, uključujući regulaciju staničnog ciklusa. Kroz sveobuhvatnu analizu sekvenciranja RNA (RNA-seq), istražena je razlika u ekspresiji komponenata ciklina i povezanih signalnih putova u stanicama SW480 s nedostatkom aktivnosti SAHH-a. Primijećena je povećana razina transkripata za ciklin A, ciklin B i CDK1. Ciklin B, u suradnji s CDK1, regulira prijelaz iz faze G2 u mitotsku fazu, omogućujući uspješnu staničnu diobu (216-219). Povećana ekspresija ciklina B i CDK1 sugerira povećanu proliferaciju stanica koja utječe na to da je ukupno veći broj stanica u ciklusu, što se očituje kao povećana ekspresija ovih ciklina i kinaza, povećana sklonost prema mitozu, što može biti kompenzacijski mehanizam pokrenut nedostatkom SAHH-a. Također primijećena je povećana ekspresija transkripata za RB1, E2F i TFDP1, koji su ključni regulatori staničnog ciklusa. Ovi podaci sugeriraju da su ove molekule aktivnije u proučavanim stanicama. RB1, kada je neaktivna ili fosforiliran, oslobađa svoj inhibicijski učinak na aktivator transkripcije E2F. Aktivni faktori E2F potiču transkripciju gena uključenih u replikaciju DNA i staničnu diobu. TFDP1 je u interakciji s E2F, stvarajući kompleks E2F/TFDP1, koji pojačava transkripcijsku aktivnost E2F. Taj kompleks dodatno potiče ekspresiju gena potrebnih za sintezu DNA. Također smo primijetili promjene u genskoj ekspresiji u putanji prijenosa signala tumorskog mikrookruženja, uključujući povećanu ekspresiju *MMP19*, *MMP24* i *CSF2*, kao i povećanu aktivaciju *PLAU-a* (urokinazni plazminogeni aktivator) i *BCL2*. Ove promjene su povezane s povećanim razinama proteina LEF1 i nedostatkom SAHH-a, što ukazuje na potencijalne implikacije za modulaciju tumorskog mikrookruženja kao odgovor na nedostatak SAHH-a. Također smo primijetili povišene razine transkripata za gen *CSF2*, citokin koji igra važnu ulogu u regulaciji stanica imunološkog sustava. Osim imunomodulatornih funkcija, *CSF2* također može doprinijeti migraciji i invaziji stanica tumora u kontekstu metastaza. Primijećena je povećana ekspresija gena *TIAM1*, koji je potreban za tumorigenski potencijal stanica malih stanica pluća, važan za preživljavanje stanica putem regulacije apoptoze. Tumorsko mikrookruženje u SAHH-a deficijentnim stanicama SW480 pokazuje značajne promjene u ekspresiji, uključujući povećano ekspresiju *MMP19*, *MMP24* i *CSF2*, kao i povećanu aktivaciju *PLAU* i *BCL2*. U stanicama epitelnog ovarijalnog tumora, aktivacija *CSF2/p-STAT3* puta dovodi do povećanja svojstava sličnih matičnim stanicama u stanicama tumora (219). U setu diferencijalno eksprimiranih gena u tumorskom staničnom mikrookruženju kod SAHH-a deficijentnih stanica SW480, zabilježen je faktor povećanja od 4,435 za *CSF2*. *TIAM1* je potreban za tumorigenski potencijal stanica malih stanica pluća. Gubitak *TIAM1* ili inhibicija *RAC1* izaziva staničnu smrt putem *BAX/BAK*-posredovane apoptoze. Interakcija između

TIAM1 i Nur77 ključna je za preživljavanje stanica malih stanica pluća. Osim toga, ekspresija TIAM1 je povišena u karcinomu štitnjače, a smanjenje ekspresije TIAM1 potiskuje proliferaciju stanica tumora štitnjače i potiče ferroptozu putem regulacije osi Nrf2/HO-1 (220). U podacima dobivenim nakon diferencijalne ekspresije gena otkriveno je da je aktivacija STAT3 ključna za samoobnavljanje odnosno održavanje pluripotencije embrionalnih matičnih stanica putem kontrole važnih gena pluripotencije poput *OCT4*, *NANOG* i *SOX2*. Također, STAT3 utječe na rast i proliferaciju ESC-a (od engl. *Embryonal stem cells*) putem regulacije gena uključenih u stanični ciklus, kao što su *CCND1* i *c-MYC*. Nizvodni čimbenik c-MYC također ima ulogu u razvoju, staničnom rastu, proliferaciji i održavanju pluripotencije. Ova analiza povezuje nedostatak SAHH-a i održavanje pluripotencije te rasvjetljava interakciju između STAT3 i nizvodnih elemenata u mreži HESCPS. Analiza diferencijalne genske ekspresije u SAHH-a utišanim stanicama SW480 otkrila je značajne promjene u genima povezanim s invazijom tumorskih stanica. *TGFβ1*, *ROAR*, *DAB2*, *BMP6*, *NOS2*, *PLXN2* i *CADPS* pokazali su značajno povećanje ekspresije, dok je TCF4 značajno smanjen. Ove promjene u ekspresiji gena potencijalno su povezane s povećanom proliferacijom što rezultira povećanim razinama ekspresije proteina LEF1, aktiviranim prijenosom signala Wnt i potencijalnim implikacijama za povećanu invaziju stanica putem povećane ekspresije ciklina A i ciklina B. Ovi podaci otkrivaju promjene u aktivnosti gena povezane s napretkom tumora i metastazama. Povećana aktivnost TGFβ1 ukazuje na promociju invazije, porast ROAR sugerira pojačanu invazivnost, a porast DAB2 odražava dinamiku invazije. Povećanje BMP6 ukazuje na napredak tumora, povećanje NOS2 povezano je s invazivnošću, a povećanje PLXN2 implicira sudjelovanje u migraciji. Porast CADPS-a ukazuje na invazivnost (219-233). Potencijalna međusobna interakcija s proteinom LEF1: Promijenjeni omjer SAM-a i SAH-a uočen u stanicama s nedostatkom SAHH-a ukazuje na neravnotežu u metilacijskom ciklusu. Nakupljanje SAH-a sugerira smanjenje uklanjanja SAH-a ili povećanu upotrebu SAM-a, što dovodi do smanjenih mogućnosti metilacije u stanicama. Rezultati istraživanja ukazuju na to da nedostatak SAHH-a uzrokuje poremećaj homeostaze SAM/SAH i narušenu ravnotežu sposobnosti metilacije. Povišene razine SAH-a u stanicama s nedostatkom SAHH-a mogu imati značajne posljedice za stanične procese koji ovise o pravilnoj metilaciji, kao što su regulacija ekspresije gena i epigenetske modifikacije. U ovom istraživanju primjećena je aktivacija kinaze ROCK, što dodatno pridonosi preuređenju citoskeleta i kontraktilnosti stanica. Osim toga, povećana aktivacija FAK-a, vidljiva kroz njegovu fosforiliranu formu, ukazuje na intenzivniju interakciju fokalnih adhezija i adheziju stanica sa supstratom, što rezultira reorganizacijom citoskeleta (233-249). Povećana ekspresija proteina LEF1, kako je prikazano na slici 97,

sugerira njegov potencijalni angažman u posredovanju učinaka Rho prijenosa signala na staničnu migraciju i invaziju. LEF1 je transkripcijski faktor koji regulira gene povezane s EMT i metastazama, uz povećanu ekspresiju MMP19 i Bcl-2 (251). Ovi podaci pružaju uvid u moguću mehanističku vezu između nedostatka SAHH-a, Rho prijenosa signala, preuređenja citoskeleta i stanične migracije/invazije u stanicama SW480 s povećanim razinama proteina LEF1. Slika 35 i slika 36 vizualno prikazuju molekulske promjene povezane s nedostatkom SAHH-a, sugerirajući potencijalnu ulogu Rho signalizacije i njenih nizvodnih efektoru u poticanju sposobnosti staničnog kretanja i invazivnih ponašanja. Ovi rezultati ukazuju na ključnu ulogu opisanih putova i signalizacijskih mehanizama u poticanju migracije i invazije tumorskih stanica. Aktivacija signalizacije Wnt, STAT3, Rho GTPaza, ROCK-kinaze, FAK, regulacija puta EMT i povećana ekspresija proteina LEF1 zajedno doprinose preuređenju citoskeleta, staničnom prometu i povećanoj sposobnosti staničnog kretanja. Ovi podaci ističu složenu mrežu molekularnih događaja uključenih u invazivno ponašanje tumorskih stanica. Osim toga, podaci analize RNA-seq-a otkrili su zanimljivo opažanje u vezi diferencijalne ekspresije receptora vezanih uz GPCR. Primijetili smo smanjenu ekspresiju receptora Adora (GPCR) u stanicama s nedostatkom SAHH-a, što sugerira moguću promjenu u staničnim odgovorima na vanjske podražaje. Ovo smanjenje može staviti tumorske stanice pod povećani stress odnosno selekciju, čineći ih konkurentnijima za ograničene resurse i potičući aktivaciju mehanizama odgovornih za staničnu migraciju i invaziju (252-253). Sveukupno, ovi podaci pružaju dragocjen uvid u kompleksno međudjelovanje različitih signalizacijskih putova i molekularnih aktera uključenih u migraciju i invaziju tumorskih stanica. Razumijevanje ovih mehanizama na molekularnoj razini može otvoriti put za razvoj ciljanih terapijskih intervencija usmjerenih na narušavanje ovih putanja i inhibiranje metastaza tumora. Daljnja istraživanja preciznih molekularnih mehanizama koji leže u osnovi promjena u signalizaciji G-proteinskih receptora i njihovih implikacija za napredak tumora (252-253) bit će ključna za sveobuhvatno razumijevanje biologije tumora i povezanosti sa deficijencijom SAHH-a. Jedna od značajnih promjena uočeni u analizi diferencijalne ekspresije gena u staničnoj liniji MCF7 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* je povećana aktivacija EIF2 (od engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*) prijenosa signala unutar stanice. Ova aktivacija uključuje povećanu aktivnost specifičnih komponenti, kao što su kompleks EIF2A, GDP, EIF2S3 i EIF2B. Također, primjećuje se povećana aktivnost kompleksa ribosoma sastavljenog od 40S podjedinice i drugih faktora koji su uključeni u translaciju. Osim toga, uočena je povećana aktivnost translokacije elongacije, što ukazuje na brže i učinkovitije procese produženja peptidnog lanca tijekom translacije. Ova promjena može imati utjecaj na brzinu sinteze proteina i stanični metabolizam.

Moguće su i to posljedice povećane proliferacije i rasta stanica, pa ukupno ima više ribosoma (a ne brzina sinteze proteina). Također, analiza otkriva povećanu aktivnost nekoliko ključnih faktora uključenih u staničnu regulaciju i preživljavanje, kao što su MYC, BCL2, CDK11A, ATF4, XIAP, ATF5, DDIT3 i VEGFA. Ovi faktori mogu imati važnu ulogu u regulaciji staničnih odgovora na promjene u signalnim putovima. Geni *CYP11A1* i *HMOX1* pokazuju povećanu razinu ekspresije, dok se geni *ADORA1*, *LIF*, *HPG* i *NTN1* sniženu u odnosu na kontrolu. Ove promjene u ekspresiji gena mogu ukazivati na potencijalne promjene u regulaciji tih gena nakon genetičke modifikacije. U cjelini, ovi rezultati sugeriraju da utišavanje gena S-adenozil homocistein hidrolaze ima kompleksan utjecaj na staničnu signalnu mrežu u staničnoj liniji MCF7. Promjene u aktivaciji signalnih putova, translaciji i ekspresiji gena mogu imati važne posljedice na biološke procese i funkcije stanica. Daljnje istraživanje ovih promjena može pružiti dublje razumijevanje mehanizama regulacije gena i staničnih odgovora na utišavanje gena *SAHH*. Nakon RNA-seq analize utišane stanične linije HEK293T s utišanom ekspresijom gena *SAHH*, primijećene su značajne promjene u ekspresiji i aktivnosti gena. Analiza je identificirala nekoliko gena čija je ekspresija i aktivnost bila povećana, kao i nekoliko gena čija je ekspresija i aktivnost bila smanjena. Među genima s povećanom ekspresijom su *PGBD3*, *TMEM47*, *ZNF711*, *NUPR1*, *Rhox5*, *Histone H3*, *FOXD1*, *SH2D5*, *NFAT5*, *B3GNT5* i *SLC16A6*. Povećana ekspresija i aktivnost ovih gena mogu ukazivati na promjene u regulaciji gena i signalnim putovima koji su povezani s nedostatkom SAHH-a. Neki od ovih gena, poput histona H3, mogu biti povezani s epigenetičkim modifikacijama i regulacijom ekspresije gena (254). S druge strane, identificirani su geni s smanjenom ekspresijom, uključujući *RAB4B-EGLN2*, *NOX3*, *SHPK*, *CODC134*, *PHTF1*, *ATPSCKMT* i *DENND5b*. Smanjena ekspresija i aktivnost ovih gena mogu ukazivati na poremećaje u metaboličkim putovima, signalnim putovima ili regulaciji gena koji su povezani s nedostatkom SAHH-a. Ovi rezultati sugeriraju da nedostatak SAHH-a može imati značajan utjecaj na ekspresiju gena i aktivnost u stanicama HEK293T. Promjene u ekspresiji i aktivnosti ovih gena mogu rezultirati različitim biološkim procesima i funkcijama stanica. Daljnje istraživanje ovih gena i njihovih uloga u kontekstu nedostatka SAHH-a može pružiti nove uvide u mehanizme regulacije gena i metaboličke procese povezane s ovim nedostatkom. S-adenozil homocistein hidrolazna deficijencija je složeni multisistemski, metilacijski i biokemijski poremećaj koji ima značajan utjecaj na signalne mreže u staničnim linijama s utišanom ekspresijom gena *SAHH* (MCF7, SW480, HEK293T). U ovom istraživanju, fokus je na zajedničkim staničnim signalnim putovima koji imaju važnu ulogu u tumorskim stanicama. Jedan od zajedničkih signalnih putova koji je identificiran u sve tri utišane stanične linije je signalni put STAT3.

STAT3 je transkripcijski faktor koji ima ključnu ulogu u regulaciji preživljavanja, proliferacije i invazije tumorskih stanica. Prethodne studije su pokazale da deficijencija S-adenozil homocistein hidrolaze može aktivirati signalni put STAT3 (255), što može doprinijeti malignom fenotipu i progresiji tumora. Drugi zajednički signalni put je prijenos signala Notch. Signalni put Notch je važan regulator razvoja i homeostaze tkiva, ali je također povezan s karcinogenezom. Studije su pokazale da deficijencija SAHH-a može utjecati na aktivaciju signalnog puta Notch, što može promijeniti diferencijaciju i proliferaciju tumorskih stanica (256). EMT je proces koji je ključan za invaziju i metastiranje tumora. Zajednički nalaz u sve tri utišane stanične linije je povezanost s EMT-om. Prethodne studije su pokazale da deficijencija SAHH-a može potaknuti EMT, što može doprinijeti invazivnosti i metastazi tumora. Također, identificiran je  $Ca^{2+}$ -posredovan prijenos signala kao zajednički signalni put u sve tri utišane stanične linije.  $Ca^{2+}$  je važan sekundarni glasnik koji regulira različite stanične procese, uključujući proliferaciju, migraciju i preživljavanje. Deficijencija SAHH-a može utjecati na homeostazu  $Ca^{2+}$  i poremetiti normalne stanične funkcije (257). Ovi zajednički signalni putovi pružaju uvid u mehanizme koji su pogođeni deficijencijom SAHH-a u tumorskim stanicama. Razumijevanje ovih putova može pružiti nova saznanja na molekularnoj razini koja su povezana s ovim poremećajem. Također, važno je uzeti u obzir simptome kod pacijenata s S-adenozil homocistein hidrolaznom deficijencijom, kao što su neurološki simptomi, kardiovaskularni poremećaji i metabolički poremećaji. Daljnje istraživanje i eksperimentalni rad su potrebni kako bi se potvrdili ovi podaci i razumjelo kompleksno djelovanje SAHH-a u tumorskim stanicama i utjecaj na simptome kod pacijenata. Analizirani su zajednički putovi koji su se izdvojili u sve tri stabilno utišane stanične linije i fibroblastima bolesnika odnosno prijenos signala posredovan CREB transkripcijskim faktorom, prijenos signala posredovan G-proteinima, formiranje fagosoma i prijenos signala u stanici posredovan protein kinazom A. Prijenos signala posredovan receptorima CREB važan je signalni put koji regulira ekspresiju gena i sudjeluje u raznim biološkim procesima. Prethodne studije su pokazale da aktivacija transkripcijskog faktora CREB-a može potaknuti preživljavanje stanica, inhibirati apoptozu i potaknuti proliferaciju. U kontekstu S-adenozil homocistein hidrolazne deficijencije, istraživanja su pokazala da ova deficijencija može utjecati na aktivnost CREB-a, što može rezultirati promjenama u ekspresiji gena i poremećajima u staničnim funkcijama (258-259). Prijenos signala posredovan G-proteinima je ključni mehanizam prenošenja signala izvanstaničnih molekula u stanicu. G-proteini su uključeni u regulaciju raznih bioloških procesa, uključujući proliferaciju, migraciju i preživljavanje stanica. Prethodne studije su pokazale da deficijencija SAHH-a može utjecati na aktivaciju G-proteina i poremetiti normalne



stanične funkcije povezane s tim signalnim putem (260). Formiranje fagosoma je ključni proces uklanjanja i razgradnje patogenih mikroorganizama i oštećenih staničnih komponenti (261). Deficijencija SAHH-a može potencijalno utjecati na povećano formiranje fagosoma u tumorskim stanicama, što može rezultirati olakšanim remodeliranjem unutarstaničnih struktura tumorskih stanica, ali i povećane potencijalne autofagije fibroblasta bolesnika. Prijenos signala u stanici posredovan protein kinazom A (PKA) je važan regulatorni mehanizam koji utječe na razne stanične procese, uključujući metabolizam, proliferaciju i diferencijaciju. Ovo istraživanje potencijalno indicira da deficijencija SAHH-a može utjecati na aktivaciju PKA i poremetiti normalne stanične funkcije povezane s tim signalnim putem u korist povećane aktivacije signalnih putova odgovornih za proliferaciju i migraciju tumorskih stanica na temelju povećane aktivnosti PKA na temelju analize srži (od engl. *Core analysis*) u IPA program (262-264). Ovi podaci ukazuju na važnost zajedničkih signalnih putova u sve tri stabilno utišane stanične linije i fibroblastima bolesnika. Razumijevanje ovih putova može pružiti nove terapijske ciljeve za liječenje poremećaja povezanih s deficijencijom SAHH-a. Važno je daljnje istraživanje i eksperimentalni rad kako bi se potvrdili ovi podaci i razumjelo kompleksno djelovanje SAHH-a u stanicama te utjecaj na simptome kod pacijenata.

## 6. ZAKLJUČAK

Utišavanjem S-adenozil homocistein hidrolaze dolazi do nakupljanja metabolita S-adenozil homocisteina i S-adenozil metiona u staničnim linijama (MCF7, SW480, HEK293T) s utišanom ekspresijom gena *SAHH*. Razina aktivnosti SAHH-a održana je 20%. Staničnu liniju THLE3 s utišanom ekspresijom gena *SAHH* nije bilo moguće uspostaviti. Izmjerena koncentracije adenzina nije konzistentna u sve tri utišane stanične linije. Zabilježena je snižena koncentracija adenzina u utišanoj staničnoj liniji HEK293T liniji dok je u utišanim staničnim linijama SW480 i MCF7 zabilježena nepromijenjena razina koncentracije adenzina. U ovoj doktorskoj disertaciji prikazna su samo zajednička značajna preklapanja i pojedini stanični signalni putovi koji imaju ulogu u tumorskim stanicama. Zajednični signalni putovi u sve tri utišane stanične linije su: **STAT3 signalni put, Notch prijenos signala, epitelno mezenhimalna tranzicija i prijenos signala posredovan kalcijem Ca<sup>2+</sup>**. Zajednički signalni putovi u sve tri stabilno utišane stanične linije i fibroblastima bolesnika izdvojili su se **prijenos signala posredovan putem transkripcijskog faktora CREB, prijenos signala posredovan G-proteinima, formiranje fagosoma te prijenos signala u stanici posredovan protein kinazom A**. Također može se vidjeti da dolazi do promjene u razini ekspresije proteina ciklina B1, fosfo-CDC2 i Ras u utišanoj staničnoj liniji HEK293T. Nema značajne promjene ekspresije proteina 4-3-3 $\zeta$ / $\delta$  (D7H5), ATM, B-Raf, cdc2, CDK2, CDK6, Chk1, cMyc, C-Raf, Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin D1, Cyclin E, Gadd45 $\alpha$ , MDM2, MEK 1 / 2, p21, p27, p44/42, p53, fosfo-Chk2, chk2, fosfo-B- Raf, fosfo-cdc2, fosfo-C-Raf, fosfo-MDM2, fosfo-MEK 1/2, fosfo-p44/22, MAPK, (ERK  $\frac{1}{2}$  ), fosfo-p53, MAPK, Ras, Rb. U utišanoj staničnoj liniji SW480 zabilježen je porast razine ekspresije proteina STAT3 i LEF1. Sličan ekspresijski profil imaju utišane tumorske stanična linija SW480 i MCF7. Analiza je pokazala značajne razlike u ekspresijskom profilu između uzoraka fibroblasta bolesnika, što potvrđuje da nedostatak aktivnosti SAHH-a može imati širok spektar utjecaja na gensku ekspresiju. U staničnim linijama HEK293T, MCF7 i SW480, u kojima je gen *SAHH* utišan prisutan je veći broj diferencijalno eksprimiranih gena, što je posljedica nakupljanja SAH-a, koji ima važnu ulogu u regulaciji metiltransferaznih reakcija i epigenetičkim regulacijama genske ekspresije. Ove promjene u ekspresijskom profilu povezane su s tumorskim fenotipom i karakteristikama ovih staničnih linija. Ovi rezultati naglašavaju važnost epigenetičkih mehanizama, poput metilacija, u regulaciji genske ekspresije. Promjene u metilacijskim obrascima mogu dovesti do promijenjene ekspresije gena i mogu biti povezane s različitim patološkim procesima. U ovom slučaju, povišena koncentracija SAH-a, koji se nakuplja uslijed nedostatne aktivnosti SAHH-a,

može imati štetne učinke na stanične funkcije i doprinijeti razvoju bolesti.

## 7. LITERATURA

1. De La Haba G, Cantonini GL. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem.* 1959;234(3):603-8.
2. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 23;101(12):4234-9.
3. Santiago L, Daniels G, Wang D, Deng FM, Lee P. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *Am J Cancer Res.* 2017 Jun 1;7(6):1389-1406.
4. Borchardt RT, Huber JA, Wu YS. Potential inhibitors of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. 4. Further modifications of the amino and base portions of S-adenosyl-L-homocysteine. *J Med Chem.* 1976;19(9):1094-9.
5. Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, Haefeli WE, Fowler B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(3):656-61.
6. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, James SJ. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr.* 2001;131(11):2811-8.
7. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat.* 2009 ;30(4):E555-65.
8. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, Barić I, Rados M, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):705-13.
9. Buist NR, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, Pogribny I, Schulze A, Zeisel SH, Barić I, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(4):538-45.
10. Beluzić R, Cuk M, Pavkov T, Fumić K, Barić I, Mudd SH, Jurak I, Vugrek O. 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. *Biochem J.* 2006 1;400(2):245-53
11. Honzík T, Magner M, Krijt J, Sokolová J, Vugrek O, Beluzić R, Barić I, Hansíková H, Elleder M, Veselá K, Bauerová L, Ondrušková N, Ješina P, Zeman J, Kožich V. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012;107(3):611-3.
12. Luo X, Xiao Y, Song F, Yang Y, Xia M, Ling W. Increased plasma S-adenosyl-homocysteine levels induce the proliferation and migration of VSMCs through an oxidative stress-ERK1/2 pathway in apoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res.* 2012 15;95(2):241-50.
13. Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, Gotway G, Cohen JC, Hobbs HH. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2015;116(4):269-74.
14. Leal JF, Ferrer I, Blanco-Aparicio C, Hernández-Losa J, Ramón Y Cajal S, Carnero A, Lleónart ME. S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis.

*Carcinogenesis*. 2008,29(11):2089-95.

15. Anastas JN, Moon RT. Wnt signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(1):11-26.
16. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 23;101(12):4234-9.
17. Palmer JL, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem*. 1979, 25;254(4):1217-26.
18. Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. U: Carmel R, Jacobsen DW, ur. Homocysteine in health and disease. Cambridge, U.K.: *Cambridge University Press*; Stranice 63-78.
19. Barić I, Cuk M, Fumić K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, Maradin M, Pazanin L, Pogribny I, Rados M, Sarnavka V, Schulze A, Stabler S, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(6):885-902.
20. Buist NR, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, Pogribny I, Schulze A, Zeisel SH, Barić I, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(4):538-45.
21. Čuk M, Lovrić M, Fumić K, Vugrek O, Mudd SH, Sarnavka V, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital myopathy. 6th Conference on Homocysteine Metabolism World Congress on Hyperhomocysteinemia, Saarbruecken 2007, *Clin Chem Lab Med* 2007;45:43.
22. Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis*. 2009 Aug;32(4):459-71.
23. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, Barić I, Rados M, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis*. 2010,33(6):705-13.
24. 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, Kožich V. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab*. 2012,107(3):611-3.
25. Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, Gotway G, Cohen JC, Hobbs HH. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2015,116(4):269-74.
26. Strauss KA, Ferreira C, Bottiglieri T, Zhao X, Arning E, Zhang S, Zeisel SH, Escolar ML, Presnick N, Puffenberger EG, Vugrek O, Kovacevic L, Wagner C, Mazariegos GV, Mudd SH, Soltys K. Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2015;116(1-2):44-52.
27. Brust P, Johannsen J, Gersting S, Muntau AC, Blom H, Lessel D. i sur. Reverse phenotyping of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency (SAHHD): new cases 84 illustrate phenotypical and clinical variability. 49th European Metabolic Group Conference, Zagreb 2017, knjiga sažetaka, Stranice 77-8.
28. Feng Q, Keshtgarpour M, Pelleymounter LL, Moon I, Kalari KR, Eckloff BW, Wieben ED,

- Weinshilboum RM. Human S-adenosylhomocysteine hydrolase: common gene sequence variation and functional genomic characterization. *J Neurochem.* 2009;110(6):1806-17.
29. Gellekink H, den Heijer M, Kluijtmans LA, Blom HJ. Effect of genetic variation in the human S-adenosylhomocysteine hydrolase gene on total homocysteine concentrations and risk of recurrent venous thrombosis. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(11):942-8.
  30. Buist NR, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, Pogribny I, Schulze A, Zeisel SH, Barić I, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(4):538-45.
  31. Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital miopathy. *Clin Chem Lab Med* 2007;5:A43.
  32. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, Barić I, Rados M, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):705-13.
  33. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat.* 2009;30(4):E555-65.
  34. Barić I, Ćuk M, Petković-Ramadža D, Bilić K, Zibar K, Sarnavka V, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency - a review of nine patients. *Mol Genet Metab* 2012;105:303.
  35. Stender S, Chakrabarti RS, Xing C, Gotway G, Cohen JC, Hobbs HH. Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2015;116(4):269-74.
  36. Brust P, Johannsen J, Gersting S, Muntau AC, Blom H, Lessel D, i sur. Reverse phenotyping of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency (SAHHD): new cases illustrate phenotypical and clinical variability. 49th European Metabolic Group Conference: Zagreb; 2017, knjiga sažetaka, Stranice 77-78.
  37. Barić I, Fumić K, Glenn B, Ćuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 23;101(12):4234-9.
  38. Barić I, Ćuk M, Fumić K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, Maradin M, Pazanin L, Pogribny I, Rados M, Sarnavka V, Schulze A, Stabler S, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(6):885-902.
  39. Buist NR, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, Pogribny I, Schulze A, Zeisel SH, Barić I, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis.* 2006;29(4):538-45.
  40. Beluzić R, Vugrek O. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: a natural model system for methylation research. *Rad Med Sci* 2010;35:77-92.
  41. Beluzić R, Ćuk M, Pavkov T, Barić I, Vugrek O. S-Adenosylhomocysteine hydrolase (AdoHcyase) deficiency: enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 28;368(1):30-6.
  42. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat.* 2009;30(4):E555-65.

43. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys*. 2000;33(2):101-25.
44. Prigge ST, Chiang PK. S-Adenosylhomocysteine hydrolase. U: Carmel R, Jacobsen DW. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, StANICE. 63-78.
45. Wang Y, Kavran JM, Chen Z, Karukurichi KR, Leahy DJ, Cole PA. Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by lysine acetylation. *J Biol Chem*. 2014 7;289(45):31361-72.
46. Hu Y, Komoto J, Huang Y, Gomi T, Ogawa H, Takata Y, Fujioka M, Takusagawa F. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry*. 1999 29;38(26):8323-33.
47. Grbeša I, Kalo A, Belužić R, Kovačević L, Lepur A, Rokić F, Hochberg H, Kanter I, Simunović V, Muñoz-Torres PM, Shav-Tal Y, Vugrek O. Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *Eur J Cell Biol*. 2017;96(6):579-590.
48. Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys*. 2000;33(2):101-25.
49. Miller MW, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, Epstein CJ, Hershfield MS, Barsh GS. The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcyl) gene. *EMBO J*. 1994 15;13(8):1806-16.
50. Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther*. 1998 ;77(2):115-34.
51. Cai S, Li QS, Borchardt RT, Kuczera K, Schowen RL. The antiviral drug ribavirin is a selective inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem*. 2007 1;15(23):7281-7.
52. Lee JK, Kim KC. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 6;438(4):647-52.
53. Aury-Landas J, Bazille C, Allas L, Bouhout S, Chesneau C, Leclercq S, Boumédiène K, Baugé C. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor 3-Deazaneplanocin A, in human articular chondrocytes. *Sci Rep*. 2017 25;7(1):6483.
54. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*. 2000 22;275(38):29318-23.
55. Bolander-Gouaille C. How can hyperhomocysteinaemia be harmful. U: Bolander- Gouaille C, ur. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. Second ed. Pringer Verlage France 2002. Str. 32-68.
56. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2 Suppl):S116-25.
57. MUDD SH, CANTONI GL. Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. *J Biol Chem*. 1958;231(1):481-92.
58. Cantoni GL. Biological methylation: selected aspects. *Ann Rev Biochem* 1975;44:435- 51.
59. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990;1(5):228-37.
60. Surtees R, Leonard J, Austin S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet*. 1991 21-

28;338(8782-8783):1550-4.

61. Surtees R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway. *Eur J Pediatr*. 1998;157 Suppl 2:S118-21.
62. Mudd SH, Cerone R, Schiaffino MC, Fantasia AR, Minniti G, Caruso U, Lorini R, Watkins D, Matiaszuk N, Rosenblatt DS, Schwahn B, Rozen R, LeGros L, Kotb M, Capdevila A, Luka Z, Finkelstein JD, Tangerman A, Stabler SP, Allen RH, Wagner C. Glycine N-methyltransferase deficiency: a novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *J Inherit Metab Dis*. 2001;24(4):448-64.
63. Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 23;101(12):4234-9.
64. Barić I, Cuk M, Fumić K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, Maradin M, Pazanin L, Pogribny I, Rados M, Sarnavka V, Schulze A, Stabler S, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(6):885-902.
65. Buist NR, Glenn B, Vugrek O, Wagner C, Stabler S, Allen RH, Pogribny I, Schulze A, Zeisel SH, Barić I, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(4):538-45.
66. Čuk M, Lovrić M, Fumić K, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital miopathy. *Clin Chem Lab Med* 2007;5:A43.
67. Grubbs R, Vugrek O, Deisch J, Wagner C, Stabler S, Allen R, Barić I, Rados M, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(6):705-13.
68. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat*. 2009;30(4):E555-65.
69. Barić I, Čuk M, Petković-Ramadža D, Bilić K, Zibar K, Sarnavka V, i sur. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency - a review of nine patients. *Mol Genet Metab* 2012;105:303.
70. Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(4):459-71.
71. Honzík T, Magner M, Krijt J, Sokolová J, Vugrek O, Beluzić R, Barić I, Hansíková H, Elleder M, Veselá K, Bauerová L, Ondrušková N, Ješina P, Zeman J, Kožich V. Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab*. 2012;107(3):611-3.
72. Barić I, Stauffer C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, Opladen T, Petković Ramadža D, Rakić B, Wedell A, Blom HJ. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(1):5-20.
73. Barić I, Stauffer C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, Opladen T, Petković Ramadža D, Rakić B, Wedell A, Blom HJ. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(1):5-20.
74. Mato JM, Cámara J, Fernández de Paz J, Caballería L, Coll S, Caballero A, García-Buey L, Beltrán J, Benita V, Caballería J, Solà R, Moreno-Otero R, Barrao F, Martín-Duce A, Correa



- JA, Parés A, Barrao E, García-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Boissard G, Ortiz P, Rodés J. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol*. 1999;30(6):1081-9.
75. Santini D, Vincenzi B, Massacesi C, Picardi A, Gentilucci UV, Esposito V, Liuzzi G, La Cesa A, Rocci L, Marcucci F, Montesarchio V, Groeger AM, Bonsignori M, Tonini G. S-adenosylmethionine (AdoMet) supplementation for treatment of chemotherapy-induced liver injury. *Anticancer Res*. 2003;23(6D):5173-9.
  76. Vincenzi B, Daniele S, Frezza AM, Berti P, Vespasiani U, Picardi A, Tonini G. The role of S-adenosylmethionine in preventing oxaliplatin-induced liver toxicity: a retrospective analysis in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab plus oxaliplatin-based regimen. *Support Care Cancer*. 2012;20(1):135-9.
  77. Papakostas GI, Cassiello CF, Iovieno N. Folates and S-adenosylmethionine for major depressive disorder. *Can J Psychiatry*. 2012;57(7):406-13.
  78. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet*. 1996;5(12):1851-8.
  79. Ćuk M, Lovrić M, Fumić K, Wagner C, Stabler S, Allen R, i sur. The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: further evidence of congenital miopathy. *Clin Chem Lab Med* 2007;5:A43.
  80. Clarke, S. i Banfield, K. (2001). S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. U Homocysteine in health and disease (Sv. 131). Jacobsen Cambridge University Press, 387–388.
  81. Vugrek O, Beluzić R, Nakić N, Mudd SH. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat*. 2009;30(4):E555-65.
  82. S-adenosylmethionine in Liver Health, Injury, and Cancer. *Physiological Reviews*, 92(4), 1515–1542.
  83. Barić I. Inherited disorders in the conversion of methionine to homocysteine. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(4):459-71.
  84. Greenberg ML, Chaffee S, Hershfield MS. Basis for resistance to 3-deazaaristeromycin, an inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, in human B-lymphoblasts. *J Biol Chem*. 1989 15;264(2):795-803.
  85. Scott JM, Molloy AM, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG. Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1994;154:27-31.
  86. Molloy AM, Orsi B, Kennedy DG, Kennedy S, Weir DG, Scott JM. The relationship between the activity of methionine synthase and the ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine in the brain and other tissues of the pig. *Biochem Pharmacol*. 1992 6;44(7):1349-55.
  87. Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ. Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-l-homocysteine. *J Neurochem*. 1981;36(5):1739-48.
  88. Leonard EJ, Skeel A, Chiang PK, Cantoni GL. The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978 14;84(1):102-9.
  89. Chiang PK, Im YS, Cantoni GL. Phospholipids biosynthesis by methylations and choline incorporation: effect of 3-deazaadenosine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980 14;94(1):174-81.
  90. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell

- survival and cell death. *Oncogene*. 1998 24;17(25):3207-13.
91. Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther*. 1998;77(2):115-34.
  92. Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis*. 1991;12(7):1307-12.
  93. Pogribny IP, Miller BJ, James SJ. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett*. 1997 1;115(1):31-8.
  94. Chiang PK. Conversion of 3T3-L1 fibroblasts to fat cells by an inhibitor of methylation: effect of 3-deazaadenosine. *Science*. 1981 13;211(4487):1164-6.
  95. Kredich NM, Hershfield MS. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(5):2450-4.
  96. Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine: a better indicator of vascular disease than homocysteine? *Am J Clin Nutr*. 2007 ;86(6):1581-5.
  97. Herrmann W, Obeid R. Biomarkers of folate and vitamin B(12) status in cerebrospinal fluid. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):1614-20.
  98. Di Padova C. S-adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis. Review of the clinical studies. *Am J Med*. 1987 20;83(5A):60-5.
  99. Tavoni A, Vitali C, Bombardieri S, Pasero G. Evaluation of S-adenosylmethionine in primary fibromyalgia. A double-blind crossover study. *Am J Med*. 1987 20;83(5A):107-10.
  100. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990;1(5):228-37.
  101. Miller MW, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, Epstein CJ, Hershfield MS, Barsh GS. The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) gene. *EMBO J*. 1994 15;13(8):1806-16.
  102. Rocha PS, Sheikh M, Melchiorre R, Fagard M, Boutet S, Loach R, Moffatt B, Wagner C, Vaucheret H, Furner I. The Arabidopsis HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell*. 2005;17(2):404-17.
  103. Mull L, Ebbs ML, Bender J. A histone methylation-dependent DNA methylation pathway is uniquely impaired by deficiency in Arabidopsis S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Genetics*. 2006;174(3):1161-71.
  104. Bolander-Gouaille C. How can hyperhomocysteinaemia be harmful? U: Bolander- Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL, Gouaille C, ur. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. Second ed. Pringer Verlage. France: 2002; str. 32-68.
  105. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*. 2000 22;275(38):29318-23.
  106. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA*. 2002 16;288(15):1867-73.
  107. Huhta JC, Hernandez-Robles JA. Homocysteine, folate, and congenital heart defects. *Fetal Pediatr Pathol*. 2005 ;24(2):71-9.
  108. Belužić, R., Vugrek, O. S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (AHCY) Deficiency: A natural model system for methylation research. *Rad Med Sci* 2010;35:77-92.

109. Beluzić R, Strauss KA, Puffenberger EG, Mudd SH, Vugrek O, Zechner U. Abnormal Hypermethylation at Imprinting Control Regions in Patients with S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (AHCY) Deficiency. *PLoS One*. 2016 14;11(3):e0151261.
110. Frau M, Feo F, Pascale RM. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. *J Hepatol*. 2013;59(4):830-41.
111. Luka Z, Mudd SH, Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J Biol Chem*. 2009 21;284(34):22507-11.
112. Huang Y, Chang R, Abdenur JE. The biochemical profile and dietary management in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab Rep*. 2022 Jun 23;32:100885. Fujiwara K, Ohuchida K, Sada M, Horioka K, Ulrich CD 3rd, Shindo K, Ohtsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M. CD166/ALCAM expression is characteristic of tumorigenicity and invasive and migratory activities of pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2014 ;9(9).
113. Darwin C. The power of movement in plants. D. Appleton and Company; New York, NY, USA: 1897.
114. Langley JN. Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *J Physiol*. 1901 16;27(3):237-56.
115. Starling EH. Discussion on the Therapeutic Value of Hormones. *Proc R Soc Med*. 1914;7(Ther Pharmacol Sect):29-31.
116. LEVI-MONTALCINI R, HAMBURGER V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*. 1951;116(2):321-61.
117. HOKIN MR, HOKIN LE. Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem*. 1953;203(2):967-77.
118. KREBS EG, FISCHER EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1956;20(1):150-7.
119. Sutherland E.W., Rall T.W. The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg<sup>++</sup>, and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc*. 1957;79:3608.
120. COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962;237:1555-62.
121. Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*. 1977 25;252(20):6966-9.
122. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666-70.
123. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(3):1311-5.
124. Hildebrand E. What does Halobacterium tell us about photoreception? *Biophys Struct Mech*. 1977 21;3(1):69-77.
125. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
126. Krieghoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm*. 2017 Feb;40(2):48-54. English, German.
127. Moen MD, McKeage K, Plosker GL, Siddiqui MA. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*. 2007;67(2):299-320.

128. Li L, Zhao GD, Shi Z, Qi LL, Zhou LY, Fu ZX. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett.* 2016 12(5):3045-3050.
129. Krijt J, Duta A, Kozich V. Determination of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine by LC-MS/MS and evaluation of their stability in mice tissues. *Journal of Chromatography. B, Analytical Tech. in the Biomed. and Life Science.* 2009;877(22):2061–2066.
130. Belužić L, Grbeša I, Belužić R, Park JH, Kong HK, Kopjar N, Espadas G, Sabidó E, Lepur A, Rokić F, Jerić I, Brkljačić L, Vugrek O. Knock-down of AHCY and depletion of adenosine induces DNA damage and cell cycle arrest. *Sci Rep.* 2018 18;8(1):14012.
131. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pathological overproduction: the bad side of adenosine. *Br J Pharmacol.* 2017;174(13):1945-1960.
132. Vizán, P., Di Croce, L., Aranda, S. (2021). Functional and Pathological Roles of AHCY. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654344.
133. Vizán, P., Di Croce, L., Aranda, S. (2021). Functional and Pathological Roles of AHCY. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654344
134. Xie B, Wang S, Jiang N, Li JJ. Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance. *Cancer Lett.* 2019 28;443:56-66..
135. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(10):607-632.
136. Santiago L, Daniels G, Wang D, Deng FM, Lee P. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *Am J Cancer Res.* 2 1;7(6):1389-1406.
137. Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal.* 2020 28;18(1):33.
138. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 4;281(5382):1509-12.
139. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 11;96(10):5522-7.
140. Huang C, Qin D. Role of Lef1 in sustaining self-renewal in mouse embryonic stem cells. *J Genet Genomics.* 2010 37(7):441-9.
141. Kim CG, Chung IY, Lim Y, Lee YH, Shin SY. A Tcf/Lef element within the enhancer region of the human NANOG gene plays a role in promoter activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 8;410(3):637-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.044. Epub 2011 13. *Erratum in: Biochem Biophys Res Commun.* 2011 19;412(1):193.
142. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005 14;434(7035):843-50.
143. Rieger ME, Sims AH, Coats ER, Clarke RB, Briegel KJ. The embryonic transcription cofactor LBH is a direct target of the Wnt signaling pathway in epithelial development and in aggressive basal subtype breast cancers. *Mol Cell Biol.* 2010 ;30(17):4267-79.
144. Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 2008 15;22(6):746-55.
145. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem.* 2002 6;277(36):33398-410.

146. Jung HC, Kim K. Identification of MYCBP as a beta-catenin/LEF-1 target using DNA microarray analysis. *Life Sci.* 2005 29;77(11):1249-62.
147. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1999 155(4):1033-8.
148. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene.* 1999 6;18(18):2883-91.
149. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene.* 2009 15;433(1-2):1-7.
150. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005 23;122(6):947-56.
151. Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(2):225-35.
152. Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Sugahara H, Mizuki M, Shibayama H, Ishiko E, Ishiko J, Nakajima K, Kanakura Y. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem.* 2004 11;279(24):24986-93.
153. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993;7(5):812-21
154. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 4;281(5382):1509-12.
155. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 11;96(10):5522-7.
156. Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG. Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 18;100(6):3245-50.
157. Guo X, Zhang R, Liu J, Li M, Song C, Dovat S, Li J, Ge Z. Characterization of LEF1 High Expression and Novel Mutations in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One.* 2015 5;10(5).
158. Li Y, Wang L, Zhang M, Melamed J, Liu X, Reiter R, Wei J, Peng Y, Zou X, Pellicer A, Garabedian MJ, Ferrari A, Lee P. LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion. *Cancer Res.* 2009 15;69(8):3332-8.
159. Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, Stadler CR, Rawat VP, Deshpande AJ, Heilmeyer B, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med.* 2008 17;205(3):515-22.
160. Waterman ML. Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 ;23(1-2):41-52.
161. Shelton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, Liu X, Xie W, Meyerholz DK, Engelhardt JF, Goodheart MJ. The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis. *PLoS One.* 2012;7(7).

162. Shelton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, Liu X, Xie W, Meyerholz DK, Engelhardt JF, Goodheart MJ. The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis. *PLoS One*. 2012;7(7).
163. Guo X, Zhang R, Liu J, Li M, Song C, Dovat S, Li J, Ge Z. Characterization of LEF1 High Expression and Novel Mutations in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One*. 2015 5;10(5).
164. Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M, Gerald WL, Massagué J. Wnt/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell*. 2009 10;138(1):51-62.
165. Wang WJ, Yao Y, Jiang LL, Hu TH, Ma JQ, Ruan ZP, Tian T, Guo H, Wang SH, Nan KJ. Increased LEF1 expression and decreased Notch2 expression are strong predictors of poor outcomes in colorectal cancer patients. *Dis Markers*. 2013;35(5):395-405.
166. Lin AY, Chua MS, Choi YL, Yeh W, Kim YH, Azzi R, Adams GA, Sainani K, van de Rijn M, So SK, Pollack JR. Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker. *PLoS One*. 2011 24;6(2).
167. Lin AY, Chua MS, Choi YL, Yeh W, Kim YH, Azzi R, Adams GA, Sainani K, van de Rijn M, So SK, Pollack JR. Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker. *PLoS One*. 2011 24;6(2).
168. Wang WJ, Yao Y, Jiang LL, Hu TH, Ma JQ, Liao ZJ, Yao JT, Li DF, Wang SH, Nan KJ. Knockdown of lymphoid enhancer factor 1 inhibits colon cancer progression in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013 2;8(10).
169. Lu K, Dong JL, Fan WJ. Twist1/2 activates MMP2 expression via binding to its promoter in colorectal cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Dec;22(23):8210-8219.
170. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002;26(5).
171. Li TW, Ting JH, Yokoyama NN, Bernstein A, van de Wetering M, Waterman ML. Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer. *Mol Cell Biol*. 2006 ;26(14).
172. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996 15;382(6592):638-42.
173. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe RF, Waterman ML. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet*. 2001;28(1):53-7.
174. Yokoyama NN, Pate KT, Sprowl S, Waterman ML. A role for YY1 in repression of dominant negative LEF-1 expression in colon cancer. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(19):6375-88.
175. Hao YH, Lafita-Navarro MC, Zacharias L, Borenstein-Auerbach N, Kim M, Barnes S, Kim J, Shay J, DeBerardinis RJ, Conacci-Sorrell M. Induction of LEF1 by MYC activates the Wnt pathway and maintains cell proliferation. *Cell Commun Signal*. 2019;17;17(1):129.
176. Schmeckpeper J, Verma A, Yin L, Beigi F, Zhang L, Payne A, Zhang Z, Pratt RE, Dzau VJ, Mirotsov M. Inhibition of Wnt6 by Sfrp2 regulates adult cardiac progenitor cell differentiation by differential modulation of Wnt pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 ;85:215-25.
177. Zheng XL, Yu HG. Wnt6 contributes tumorigenesis and development of colon cancer via its effects on cell proliferation, apoptosis, cell-cycle and migration. *Oncol Lett*. 2018 ;16(1):1163-1172.

178. Li R, Wang C, Tong J, Su Y, Lin Y, Zhou X, Ye L. Wnt6 promotes the migration and differentiation of human dental pulp cells partly through c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *J Endod.* 2014 ;40(7):943-8.
179. Schmeckpeper J, Verma A, Yin L, Beigi F, Zhang L, Payne A, Zhang Z, Pratt RE, Dzau VJ, Mirotsov M. Inhibition of Wnt6 by Sfrp2 regulates adult cardiac progenitor cell differentiation by differential modulation of Wnt pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 ;85:215-25.
180. Zheng XL, Yu HG. Wnt6 contributes tumorigenesis and development of colon cancer via its effects on cell proliferation, apoptosis, cell-cycle and migration. *Oncol Lett.* 2018 ;16(1):1163-1172.
181. Kas K, Voz ML, Hensen K, Meyen E, Van de Ven WJ. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem.* 1998 4;273(36):23026-32.
182. Furukawa T, Adachi Y, Fujisawa J, Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Kuwahara J, Ikehara S, Tokunaga R, Taketani S. Involvement of PLAGL2 in activation of iron deficient- and hypoxia-induced gene expression in mouse cell lines. *Oncogene.* 2001 2;20(34):4718-27.
183. Wezensky SJ, Hanks TS, Wilkison MJ, Ammons MC, Siemsen DW, Gauss KA. Modulation of PLAGL2 transactivation by positive cofactor 2 (PC2), a component of the ARC/Mediator complex. *Gene.* 2010 15;452(1):22-34.
184. Li N, Li D, Du Y, Su C, Yang C, Lin C, Li X, Hu G. Overexpressed PLAGL2 transcriptionally activates Wnt6 and promotes cancer development in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2019 ;41(2):875-884.
185. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. Myc influences global chromatin structure. *EMBO J.* 2006 21;25(12):2723-34.
186. Ma J, Zhao J, Lu J, Wang P, Feng H, Zong Y, Ou B, Zheng M, Lu A. Cadherin-12 enhances proliferation in colorectal cancer cells and increases progression by promoting EMT. *Tumour Biol.* 2016 ;37(7):9077-88.
187. Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res.* 2008;151(3):122-8.
188. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 ;7(2):131-42.
189. Degen, W. G., & van Kempen, L. C. (2002). ALCAM: shedding light on the role of CD166 in normal and pathological cell processes. *Tissue Antigens*, 60(2), 89-98.
190. Kuświk, M., Bieńkowski, M., & Jankowska-Steifer, E. (2021). ALCAM (CD166) in Cancer Biology: More Than Just a Cell Adhesion Molecule. *Cancers*, 13(11). Hansen AG, Swart GW, Zijlstra A. ALCAM: Basis Sequence: Mouse. AFCS Nat Mol Stranice. 2011;2011.
191. Yuan, W., & Chen, Z. (2017). An emerging role of ALCAM in regulating malignant progression of cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 93. Yang, Y.; Sanders, A.J.; Dou, Q.P.; Jiang, D.G.; Li, A.X.; Jiang, W.G. The Clinical and Theranostic Values of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)/CD166 in Human Solid Cancers. *Cancers* 2021, 13, 5187.
192. Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Liu, Y., Wu, H., Liu, Q., Wu, G. S., & Wu, K. (2017). Enrichment of CD166+ cells promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Aging*, 9(4), 1404-1419.
193. Fan J, Yang X, Li J, et al. (2017). Downregulation of cadherin 12 contributes to the progression and metastasis of prostate cancer. *Oncology Reports*, 38(3) Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, Yu-Lee LY, Zhang S, Yeh ET, Hu MC, Logothetis CJ, Lin SH. Cadherin-

- 11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res.* 2008 ;6(8):1259-67.
194. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 25;139(5):871-90.
195. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014 23;7(344).
196. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):8-20.
197. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016 30;166(1):21-45.
198. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* 2001 28;153(5):1049-60.
199. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* 2008 Nov 24;27(55):6920-9.
200. Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;116:409-32.
201. Bruner HC, Derksen PWB. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 1;10(3).
202. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004 5;303(5663):1483-7.
203. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008;14(6):818-29.
204. Bremm A, Walch A, Fuchs M, Mages J, Duyster J, Keller G, Hermannstädter C, Becker KF, Rauser S, Langer R, von Weyhern CH, Höfler H, Luber B. Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations. *Cancer Res.* 2008 1;68(3):707-14.
205. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008 15;68(10):3645-54.
206. Figueiredo J, Melo S, Carneiro P, Moreira AM, Fernandes MS, Ribeiro AS, Guilford P, Paredes J, Seruca R. Clinical spectrum and pleiotropic nature of CDH1 germline mutations. *J Med Genet.* 2019 ;56(4):199-208.
207. Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM. E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):2013-25.
208. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):76-83.
209. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6).
210. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1049–1060.



211. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 2008;27(55):6920–6929.
212. Kourtidis A, Ngok SP, Anastasiadis PZ. p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:409–432.
213. Bruner HC, Derksen PWB. Loss of E-Cadherin-dependent cell-cell adhesion and the development and progression of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(3).
214. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483–1487.
215. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008;14(6):818–829.
216. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001 ;29(2):117-29.
217. Clemm von Hohenberg K, Müller S, Schleich S, Meister M, Bohlen J, Hofmann TG, Teleman AA. Cyclin B/CDK1 and Cyclin A/CDK2 phosphorylate DENR to promote mitotic protein translation and faithful cell division. *Nat Commun*. 2022 3;13(1):668.
218. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 2000 1;14(19):2393-409.
219. Li X, Wang J, Wu W, Gao H, Liu N, Zhan G, Li L, Han L, Guo X. Myeloid-derived suppressor cells promote epithelial ovarian cancer cell stemness by inducing the CSF2/p-STAT3 signalling pathway. *FEBS J*. 2020 ;287(23):5218-5235.
220. Li, W.; Huang, G.; Wei, J.; Cao, H.; Jiang, G. ALKBH5 inhibits thyroid cancer progression by promoting ferroptosis through TIAM1-Nrf2/HO-1 axis. *Mol. Cell. Biochem*. 2023, 478, 729–741.
221. Ward SG. T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol*. 2006 ;27(2):80-7.
222. Mo W, Chen J, Patel A, Zhang L, Chau V, Li Y, Cho W, Lim K, Xu J, Lazar AJ, Creighton CJ, Bolshakov S, McKay RM, Lev D, Le LQ, Parada LF. CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell-cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cell*. 2013 28;152(5):1077-90.
223. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009 ;9(11):798-809.
224. Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol*. 2006 ;16(6):285-92.
225. Zhang Y, Wang D, Xu J, Wang Y, Ma F, Li Z, Liu N. Stat3 activation is critical for pluripotency maintenance. *J Cell Physiol*. 2019 ;234(2):1044-1051.
226. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2011 27;7(5):536-50.
227. Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, Denissov S, Børgesen M, Francoijs KJ, Mandrup S, Stunnenberg HG. Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev*. 2008 1;22(21):2953-67.
228. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. Myc influences

- global chromatin structure. *EMBO J.* 2006 21;25(12):2723-34.
- 229.** Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 2001 ;29(2):117-29.
- 230.** Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 ;7(2):131-42.
- 231.** Hocevar BA, Mou F, Rennolds JL, Morris SM, Cooper JA, Howe PH. Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *Embo J.* 2003 16;22(12):3084-94.
- 232.** Morrissey C, Brown LG, Pitts TE, Vessella RL, Corey E. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment. *Neoplasia.* 2010;12(2):192-205.
- 233.** Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(7):521-34.
- 234.** Artigiani S, Conrotto P, Fazzari P, Gilestro GF, Barberis D, Giordano S, Comoglio PM, Tamagnone L. Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO Rep.* 2004 ;5(7):710-4.
- 235.** Zhao GX, Xu YY, Weng SQ, Zhang S, Chen Y, Shen XZ, Dong L, Chen S. CAPS1 promotes colorectal cancer metastasis via Snail mediated epithelial mesenchymal transformation. *Oncogene.* 2019 ;38(23):4574-4589.
- 236.** Zhao GX, Xu YY, Weng SQ, Zhang S, Chen Y, Shen XZ, Dong L, Chen S. CAPS1 promotes colorectal cancer metastasis via Snail mediated epithelial mesenchymal transformation. *Oncogene.* 2019 ;38(23):4574-4589.
- 237.** Drimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2020 ;67(Pt 1):122-153.
- 238.** He X, Wang L, Li H, Liu Y, Tong C, Xie C, Yan X, Luo D, Xiong X. CSF2 upregulates CXCL3 expression in adipocytes to promote metastasis of breast cancer via the FAK signaling pathway. *J Mol Cell Biol.* 2023.
- 239.** Payapilly A, Guilbert R, Descamps T, White G, Magee P, Zhou C, Kerr A, Simpson KL, Blackhall F, Dive C, Malliri A. TIAM1-RAC1 promote small-cell lung cancer cell survival through antagonizing Nur77-induced BCL2 conformational change. *Cell Rep.* 2021 9;37(6):109979.
- 240.** Payapilly A, Guilbert R, Descamps T, White G, Magee P, Zhou C, Kerr A, Simpson KL, Blackhall F, Dive C, Malliri A. TIAM1-RAC1 promote small-cell lung cancer cell survival through antagonizing Nur77-induced BCL2 conformational change. *Cell Rep.* 2021 9;37(6):109979.
- 241.** Li W, Huang G, Wei J, Cao H, Jiang G. ALKBH5 inhibits thyroid cancer progression by promoting ferroptosis through TIAM1-Nrf2/HO-1 axis. *Mol Cell Biochem.* 2023 ;478(4):729-741..
- 242.** Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* 2006;16(6):285-92.
- 243.** dams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998 28;281(5381):1322-6.
- 244.** Zhang Y, Wang D, Xu J, Wang Y, Ma F, Li Z, Liu N. Stat3 activation is critical for pluripotency maintenance. *J Cell Physiol.* 2019;234(2):1044-1051.

245. Fagnocchi L, Zippo A. Multiple Roles of MYC in Integrating Regulatory Networks of Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Feb 3;5:7.
246. Westhoff MA, Serrels B, Fincham VJ, Frame MC, Carragher NO. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol.* 2004 ;24(18):8113-33.
247. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet.* 1998 ;19(4):379-83.
248. Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE. Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2001 1;97(11):3342-8.
249. Cowell CF, Yan IK, Eiseler T, Leightner AC, Döppler H, Storz P. Loss of cell-cell contacts induces NF- $\kappa$ B via RhoA-mediated activation of protein kinase D1. *J Cell Biochem.* 2009 1;106(4):714-28.
250. Chen Z, Wu G, Ye F, Chen G, Fan Q, Dong H, Zhu X, Wu C. High expression of MMP19 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2019 14;19(1):448.
251. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998 28;281(5381):1322-6.
252. Wang L, Gesty-Palmer D, Fields TA, Spurney RF. Inhibition of Wnt signaling by G protein-coupled receptor (GPCR) kinase 2 (GRK2). *Mol Endocrinol.* 2009 ;23(9):1455-65.
253. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene.* 2007 14;26(22):3122-42.
254. Vizán, P., Di Croce, L., Aranda, S. (2021). Functional and Pathological Roles of AHCY. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 654344.
255. [https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene\\_set/STAT3/Pathway+Commons+Protein-Protein+Interactions](https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene_set/STAT3/Pathway+Commons+Protein-Protein+Interactions)
256. Shen Q, Reedijk M. Notch Signaling and the Breast Cancer Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1287:183-200
257. Wu L, Lian W, Zhao L. Calcium signaling in cancer progression and therapy. *FEBS J.* 2021 ;288(21):6187-6205.
258. Liu X, Song J, Zhang H, Liu X, Zuo F, Zhao Y, Zhao Y, Yin X, Guo X, Wu X, Zhang H, Xu J, Hu J, Jing J, Ma X, Shi H. Immune checkpoint HLA-E:CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance. *Cancer Cell.* 2023 F 13;41(2):272-287.e9.
259. Lasko LM, Jakob CG, Edalji RP, Qiu W, Montgomery D, Digiammarino EL, Hansen TM, Risi RM, Frey R, Manaves V, Shaw B, Algire M, Hessler P, Lam LT, Uziel T, Faivre E, Ferguson D, Buchanan FG, Martin RL, Torrent M, Chiang GG, Karukurichi K, Langston JW, Weinert BT, Choudhary C, de Vries P, Van Drie JH, McElligott D, Kesicki E, Marmorstein R, Sun C, Cole PA, Rosenberg SH, Michaelides MR, Lai A, Bromberg KD. Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature.* 2017 5;550(7674):128-132.
260. Chaudhary PK, Kim S. An Insight into GPCR and G-Proteins as Cancer Drivers. *Cells.* 2021 24;10(12):3288.
261. Hernandez GA, Perera RM. Autophagy in cancer cell remodeling and quality control. *Mol Cell.* 2022 21;82(8):1514-1527.

- 262.** Ahmed MB, Alghamdi AAA, Islam SU, Lee JS, Lee YS. cAMP Signaling in Cancer: A PKA-CREB and EPAC-Centric Approach. *Cells*. 2022 24;11(13):2020.
- 263.** Stratakis CA. Cyclic AMP, protein kinase A, and phosphodiesterases: proceedings of an international workshop. *Horm Metab Res*. 2012;44(10):713-5.
- 264.** Kilanowska A, Ziłkowska A, Stasiak P, Gibas-Dorna M. cAMP-Dependent Signaling and Ovarian Cancer. *Cells*. 2022 29;11(23):3835.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ivana Pavičić rođena je 9. lipnja 1992. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Nova Rača upisala je Opću gimnaziju u Bjelovaru koju je završila 2011. godine. Iste godine upisala je Preddiplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Molekularne biologije upisala je 2015. godine. Magistarski rad nosio je naziv "Raznolikost Cryphonectria hypovirus 1 na području Kašta" i bio je dio projekta financiranog od strane SCOPES Švicarske nacionalne zaklade za znanost. Za vrijeme studija nekoliko puta je sudjelovala na manifestaciji "Noć biologije" i "Otvoreni dan kemije" te je dobitnik posebne Rektorove nagrade u sklopu manifestacije "Otvoreni dan kemije". Također, sudjelovala je u radu studentske udruge BIUS. Sudjelovala je i u istraživanjima u okviru multilateralnog međunarodnog projekta *SCOPES Joint Research Project Invasive chestnut diseases in the Balkans and Georgia – epidemiological research and management options*. Na Zavodu za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković zaposlila se kao asistentica 2019. godine u Laboratoriju za naprednu genomiku, te je iste godine upisala Doktorski studij biologije na PMF-u. Izrada ove doktorske disertacije financirana je projektom Hrvatske zaklade za znanost "Molekularni aspekti patogeneze bolesti uzrokovane nedostatkom AHCY". U sklopu izrade ove disertacije objavljen je znanstveni rad pod nazivom *Effects of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Downregulation on Wnt Signaling Pathway in SW480 Cells* (Pavičić, I.; Rokić, F.; Vugrek, O. Effects of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Downregulation on Wnt Signaling Pathway in SW480 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 16102. <https://doi.org/10.3390/ijms242216102>). Također, završila je tečaj rada s laboratorijskim životinjama na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu i pohađala je radionicu Molekularne evolucije i filogenije u Njemačkoj. Sudjelovala je na desetak skupova s poster prezentacijom svojih istraživanja. Sudjelovala je u popularizaciji znanosti kroz predstavljanje Biološkog odsjeka PMF-a na Smotri sveučilišta i Otvorene dane Instituta Ruđer Bošković.