

Analiza stabilnosti mRNA i određivanje mRNA-veznih proteina kod nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein-hidrolaze

Rokić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:217:401540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



FILIP ROKIĆ

ANALIZA STABILNOSTI mRNA I ODREĐIVANJE
mRNA-VEZNIH PROTEINA KOD NEDOSTATNE
AKTIVNOSTI S-ADENOZILHOMOCISTEIN-HIDROLAZE

Diplomski rad

Zagreb
2015.

FILIP ROKIĆ

ANALIZA STABILNOSTI mRNA I ODREĐIVANJE
mRNA-VEZNIH PROTEINA KOD NEDOSTATNE
AKTIVNOSTI S-ADENOZILHOMOCISTEIN-HIDROLAZE

Diplomski rad

Predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistra kemije

Zagreb
2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod neposrednim vodstvom dr. sc. Roberta Belužića i mentorstvom dr. sc. Olivera Vugreka te je predan na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar kemije.

Zahvale

Prevenstveno bi se htio zahvaliti dr. sc. Oliveru Vugreku na pruženoj mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković. Veliko hvala i mom neposrednom voditelju rada dr. sc. Robertu Belužiću na izuzetnoj podršci i vodstvu kroz eksperimentalni i pismeni dio rada. Hvala cijeloj ekipi iz labosa posebno Luciji i Adriani na odličnoj radnoj atmosferi, svim odgovorima na moja neumorna pitanja, savjetima i podršci.

Hvala svim mojim profesorima i asistentima na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu na svom prenesenom znanju i pomoći pruženoj pri mojim prvim laboratorijskim koracima. Posebno bi se htio zahvaliti profesorima analitičkog i biokemijskog zavoda na produbljenju mog znanja tijekom diplomskog studija.

Hvala mojoj obitelji, najviše majci Katiji i bratu Gordanu na bezuvjetnoj podršci kroz studij, a i kroz moj cijeli život. Hvala na svemu što ste mi pružili i omogućili u životu i na svim savjetima koje ste mi davali kako bi stigao tu gdje trenutno jesam.

Hvala mojim kolegama sa fakulteta Miji, Davoru, Jakovu, Nikoli, Nikolini i Marku na svim zabavnim druženjima van i unutar predavanja i praktikuma. Hvala na svim skeniranim skriptama, ispijenim kavama i „puš-pauzama“ koje su mi učinile ovaj studij nezaboravnim.

Hvala svim mojim prijateljima a posebno kronerima koji su bili tu, uz mene i za mene kad god je trebalo. Hvala na svim dubokoumnim raspravama, ispijenim pivama, pogledanim serijama i filmovima i nebrojenim partijama dote. Kroneri, sad kad smo postali odrasli...vidimo se petkom navečer u M.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

ANALIZA STABILNOSTI mRNA I ODREĐIVANJE mRNA-VEZNIH PROTEINA KOD NEDOSTATNE AKTIVNOSTI S-ADENOZILHOMOCISTEIN-HIDROLAZE

Filip Rokić

Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za naprednu genomiku,

Bijenička cesta 54, Zagreb

Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein-hidrolaze (SAHH) je nasljedno metaboličko oboljenje uzrokovano mutacijom u genu koja dovodi do inaktivacije proteina SAHH te poremećaja staničnih metilacijskih procesa. Nedavno je u ovom genu otkrivena nova mutacija koja kodira za verziju proteina SAHH_Y328D i koja uzrokuje gotovo potpuni nedostatak molekule mRNA te smanjenu ekspresiju proteina iz dosad nepoznatog razloga. Navedena mutacija ne uvodi preuranjeni STOP-kodon niti dokida postojeći, stoga su stanični mehanizmi koji uklanjaju takve transkripte isključeni. Hipoteza ovog rada uključuje moguće promjene u sekundarnoj strukturi mutiranog transkripta uzrokovane točkastom mutacijom koje dovode do aktivacije manje istraženog mehanizma degradacije uslijed zastajanja ribosoma tijekom translacije (eng. *no-go decay*, *NGD*). U cilju utvrđivanja mehanizma degradacije, *in vitro* mutagenezom uvedena je mutacija u molekulu cDNA koja kodira za protein SAHH, te je korištenjem lančane reakcije polimerazom (PCR) dobiven kalup za *in vitro* transkripciju. Instrumentnim metodama cirkularnog dikroizma (CD) i diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom (DSC) utvrđene su razlike u sekundarnim strukturama i temperaturnoj stabilnosti sintetiziranih molekula mRNA. Molekule mRNA divljeg tipa odnosno verzije mRNA koja kodira za protein SAHH_Y328D, obilježene su detiobiotinom te su iskorištenje za izdvajanje RNA-vezujućih proteina iz staničnog lizata HepG2 stanica. Izolirani proteini identificirani su spektrometrijom masa (MS) a iz diferencijalnih proteinskih profila predložen je najvjerojatniji mehanizam razgradnje molekule mRNA kod pacijenta s navedenom mutacijom.

(70 stranica, 43 slike, 14 tablica, 74 literaturna izvora, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb

Ključne riječi: Degradacija mRNA/ mutirana mRNA / SAHH/ stabilnost/ sekundarna struktura

Mentor: Dr. sc. Oliver Vugrek, v. zn. sur.

Ocjenitelji: Dr. sc. Oliver Vugrek, v. zn. sur.

Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Izv. prof. dr. sc. Nives Galić

Doc. dr. sc. Josip Požar

Rad prihvaćen: Veljača 2016.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Thesis

IDENTIFICATION OF mRNA-BINDING PROTEINS AND DETERMINATION OF mRNA STABILITY IN AHCY DEFICIENCY

Fillip Rokić

Ruder Bošković Institute, Laboratory for Advanced Genomics,
Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency is an inherited metabolic disorder caused by a mutation of the AHCY gene, which significantly reduces enzymatic activity and alters the cellular methylation potential. Recently, a novel mutation (p.Y328D) was discovered that causes its transcript to degrade leading to highly reduced expression of AHCY protein. The single nucleotide polymorphism (SNP) does not introduce a premature STOP codon nor does it affect the actual STOP codon so the cellular mechanisms that degrade such transcripts can be excluded. Main hypothesis of this paper includes changes in the secondary structure of the transcript caused by the SNP. Those changes of the overall structure could cause stalling of ribosomes during translation of the mutant transcript and activate a no-go decay (NGD) mechanism. Identical SNP was introduced into cDNA sequence of AHCY using site-directed mutagenesis. Templates for *in vitro* transcription were synthesized using polymerase chain reaction (PCR). Circular dichroism (CD) and differential scanning calorimetry (DSC) measurements were performed to show that the SNP introduces changes to the secondary structure and influences thermal stability of the mutant transcript. mRNAs were labeled on their 3' end with desthiobiotin and used for RNA-protein pull-down assay using HepG2 cell lysates. After enrichment of the RNA-binding proteins (RBPs) samples were analyzed using mass spectrometry (MS). On the basis of the identified proteins a most probable degradation mechanism was proposed for the mutant AHCY mRNA.

(70 pages, 43 figures, 14 tables, 74 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Središnja kemijska knjižnica, Horvatovac 102a, Zagreb

Key words: AHCY/ mutant mRNA/ mRNA decay/ secondary structure/ SNP/ stability

Mentor: Dr. Oliver Vugrek, SRA

Reviewers: Dr. Oliver Vugrek, SRA

Dr. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Prof.

Dr. Nives Galić, Assoc. Prof.

Dr. Josip Požar, Asst. Prof.

Thesis accepted: February 2016.

Sadržaj

1. Uvod	3
2. Literaturni pregled	4
2.1. Struktura S-adenozilhomocistein-hidrolaze	4
2.2. Reakcija koju katalizira S-adenozilhomocistein-hidrolaza	7
2.2.1. Mehanizam reakcije	8
2.2.2. Kinetika reakcije	9
2.3. Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein-hidrolaze	10
2.4. Mehanizmi degradacije mRNA	11
2.4.1. Regulacija stabilnosti transkripata	11
2.4.2. Razgradnja mRNA P-tijelima	12
2.4.3. Degradacija transkripata sa greškom	13
2.4.3.1. Prvi ciklus translacije	13
2.4.3.2. Degradacija mRNA s preuranjenim STOP-kodonom.....	14
2.4.3.3. Degradacija mRNA koja ne sadrži STOP-kodon.....	14
2.4.3.4. Degradacija mRNA uslijed zastajanja ribosoma.....	15
3. Materijali i metode	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Standardne kemikalije.....	16
3.1.2. Puferirane otopine.....	16
3.1.3. Enzimi i antitijela	16
3.1.4. Boje	17
3.1.5. Hranjivi mediji	17
3.1.6. Bakterijski soj Mach1	17
3.1.7. HepG2 stanična linija.....	17
3.1.8. Rekombinantni plazmid pOTB7	18
3.1.9. Komercijalni kompleti	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Ciljana mutageneza	19
3.2.2. Razgradnja restrikcijskom endonukleazom <i>DpnI</i>	20
3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	21
3.2.4. Transformacija elektrokompetentnih stanica Mach1 elektroporacijom.....	21
3.2.5. Uzgoj bakterijskih kultura.....	22
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA.....	22
3.2.7. Određivanje koncentracije DNA i RNA u otopinama	23
3.2.8. Restrikcijska analiza plazmidne DNA <i>AgeI</i> restrikcijskom endonukleazom.....	24
3.2.9. Određivanje nukleotidnog slijeda DNA- sekvenciranje.....	25

3.2.10.	Sinteza kalupa za <i>in vitro</i> transkripciju PCR-om	25
3.2.11.	Sinteza molekula RNA- <i>in vitro</i> transkripcija.....	27
3.2.12.	Obilježavanje molekula RNA	28
3.2.13.	Pročišćavanje obilježenih molekula RNA	31
3.2.14.	Uzgoj staničnih kultura HepG2 stanica divljeg tipa.....	31
3.2.15.	Priprema staničnog lizata	32
3.2.16.	Izdvajanje proteina koji vežu RNA pomoću magnetskih zrnca	33
3.2.17.	Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a.....	35
3.2.18.	Priprema gelova za SDS-PAGE elektroforezu	35
3.2.19.	Western analiza	35
3.2.19.1.	Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu.....	36
3.2.19.2.	Blokiranje membrane i vezanje antitijela na membranu	36
3.2.19.3.	Detekcija kemiluminescencijom	37
3.3.	Instrumentne metode.....	38
3.3.1.	Cirkularni dikroizam	38
3.3.2.	Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija	39
3.3.3.	Spektrometrija masa.....	41
4.	Rezultati.....	44
4.1.	Mutageneza <i>in vitro</i>	44
4.2.	Izolacija plazmidne DNA.....	45
4.3.	Restriksijska analiza izoliranih plazmida i sekvenciranje	46
4.4.	Sinteza kalupa za reakciju <i>in vitro</i> transkripcije.....	47
4.5.	Transkripcija <i>in vitro</i>	48
4.6.	Obilježavanje molekula RNA detiobiotinom.....	48
4.7.	Western-blot analiza	49
4.8.	Analiza promjena sekundarne strukture i termičke stabilnosti RNA.....	51
4.9.	Analiza proteina koji vežu mRNA.....	56
5.	Rasprava.....	59
6.	Zaključci.....	61
7.	Literaturna vrela.....	62
8.	Životopis.....	67
9.	Dodaci.....	68

1. Uvod

S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) je enzim koji katalizira reakciju hidrolize S-adenozil-L-homocisteina (SAH) na adenzin i homocistein¹. S-adenozil-L-homocistein (SAH) je produkt mnogih S-adenozilmetionin (SAM)-ovisnih metiltransferaza, enzima koji sudjeluju u reakcijama metilacije DNA, RNA, proteina i drugih staničnih molekula². Uz to, SAH je i snažan kompetitivni inhibitor SAM-ovisnih metiltransferaza³ stoga je bitno da u stanici postoji prikladan mehanizam njegovog uklanjanja. Omjer koncentracija SAH/SAM u stanici ključan je za održavanje njezinog metilacijskog potencijala. Smanjena funkcija S-adenozilhomocistein-hidrolaze povećava koncentraciju SAH u stanici, uzrokujući poremećaje mnogih staničnih biokemijskih procesa koji rezultiraju brojnim patološkim stanjima kod čovjeka, kao što su usporen psihomotorni razvoj, poremećaj mijelinizacije i oštećenja jetre⁴.

Dosadašnjim istraživanjima pronađen je veći broj mutacija u genu za protein SAHH koje dovode do smanjenja ili potpunog gubitka aktivnosti samog enzima^{5,6,7}. Najnovija otkrivena mutacija, pronađena kod pacijenta iz SAD-a, uzrokuje promjenu 328. aminokiseline proteina SAHH iz tirozina u aspartat⁸. Preliminarni rezultati analiza pokazuju drastično smanjenu ekspresiju proteina SAHH u stanicama pacijenta, te gotovo potpuni nedostatak mRNA koja kodira za protein SAHH. Mehanizam degradacije molekule mRNA proteina SAHH_Y328D u ovom slučaju još nije razjašnjen.

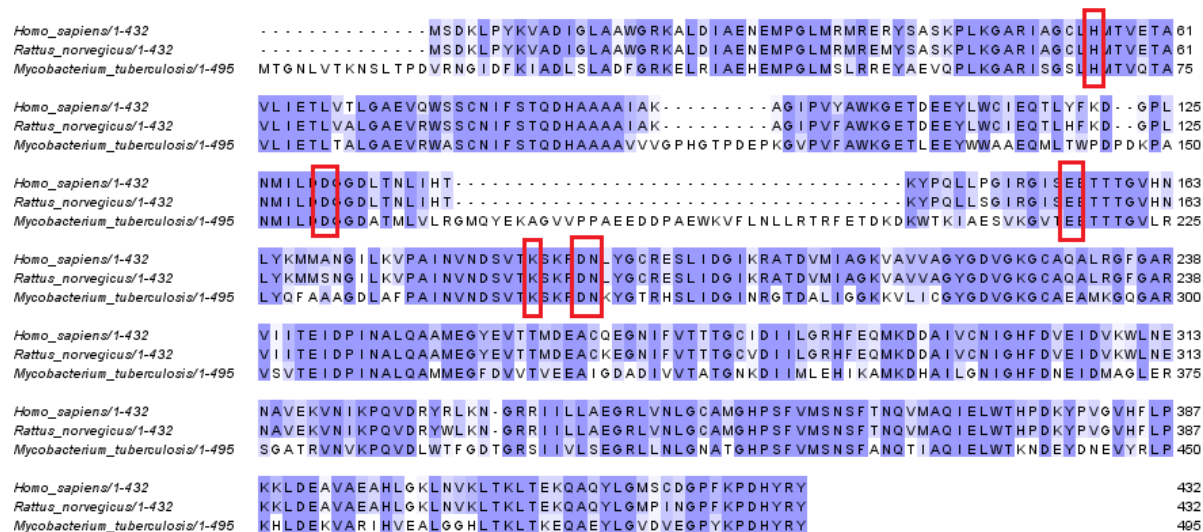
Eukariotske stanice koriste nekoliko mehanizama za regulaciju količine mRNA i uklanjanje transkripata koji sadrže greške. Uklanjanje poliA repa na 3'-kraju molekule mRNA rezultira njezinom degradacijom egzomskim kompleksom u 3' → 5' smjeru, dok uklanjanje zaštite na 5'-kraju mRNA omogućuje razgradnju egzonukleazama u 5' → 3' smjeru⁹. Ukoliko transkript sadrži preuranjeni STOP-kodon unutar nukleotidnog slijeda, aktivira se tzv. NMD (eng. *non-sense mediated decay*) mehanizam degradacije¹⁰. Transkripti bez STOP-kodona uklanjaju se tzv. NSM (eng. *non-stop decay*) mehanizmom dok se transkripti koji uzrokuju zastajanje ribosoma tijekom translacije uklanjaju tzv. NGM (eng. *no-go decay*) mehanizmom degradacije. Molekule siRNA i mikroRNA također mogu biti uključene u regulaciju degradacije glasničkih RNA molekula. siRNA (eng. *small interfering RNA*) sastavni su dio multiproteinskog kompleksa koji prepoznaje i degradira molekule mRNA koje sadrže sljedove potpuno komplementarne slijedu kompleksa siRNA. Ovaj mehanizam sastavni je dio obrane stanice od virusnih RNA¹¹. Molekule mikroRNA potiču aktivaciju deadenilacijskog kompleksa koji uklanja poliA slijed na 3'-kraju mRNA vezanjem na djelomično komplementarne sljedove mRNA nakon čega dolazi do razgradnje mRNA egzonukleazama¹².

Cilj ovog rada je identifikacija proteina koje vežu *in vitro* sintetizirane molekule RNA s navedenom mutacijom unutar svog nukleotidnog slijeda. Istražit će se struktura i stabilnost mutirane mRNA u odnosu na molekulu mRNA divljeg tipa korištenjem instrumentne metode kružnog dikroizma (eng. *circular dichroism, CD*) i diferencijalno skenirajuće kalorimetrije (eng. *differential scanning calorimetry, DSC*). Predložit će se potencijalni mehanizam degradacije mRNA analizom proteinskih profila dobivenih masenom spektrometrijom te će se ispitati utjecaj promjena u sekundarnoj strukturi mutirane molekule mRNA na aktivaciju određenog mehanizma njezine degradacije.

2. Literaturni pregled

2.1. Struktura S-adenozilhomocistein-hidrolaze

Enzim S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) je prvi puta opisan 1959. godine kao protein koji pokazuje visoku specifičnost za adozin odnosno homocistein te katalizira nastajanje S-adenozil-L-homocisteina (SAH)¹³. Jedan je od evolucijskih najočuvanijih enzima te se evolucija SAHH može pratiti od bakterija do suvremenih biljaka i sisavaca (slika 1).



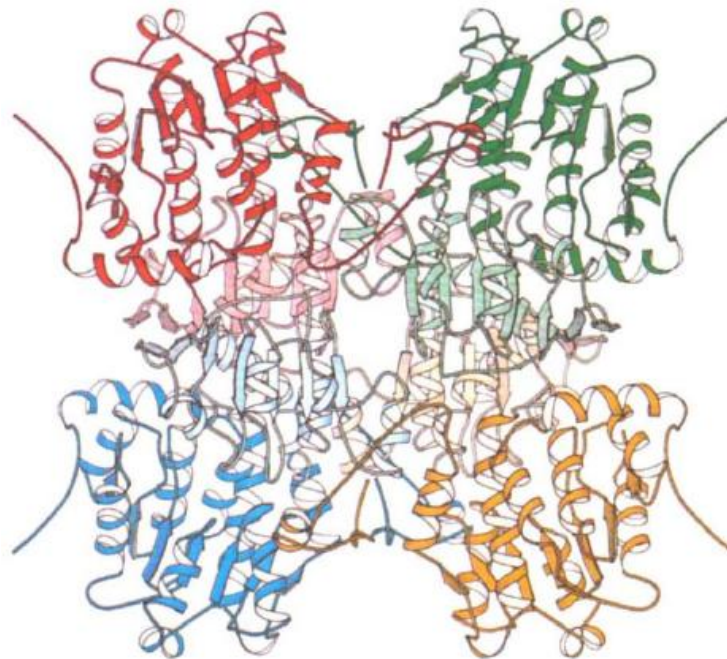
Slika 1. Rezultati poravnavanja aminokiselinskih sekvenci proteina SAHH čovjeka (*Homo sapiens*), štakora (*Rattus norvegicus*) i bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Sekvence su poravnate programom ClustalX 2.1 te vizualizirane programom Jalview 2.9. Crveno su označene aminokiseline ključne za katalitičku aktivnost enzima SAHH.

Prema podacima iz NCBI Gene¹⁴ baze podataka kod čovjeka se gen za SAHH (Acc. No.: NG_012630.1, GI:255522814) nalazi na 20. kromosomu na položaju 20q11.22. Sastoji se od 10 eksona, a približna veličina gena je 31,5 kb.

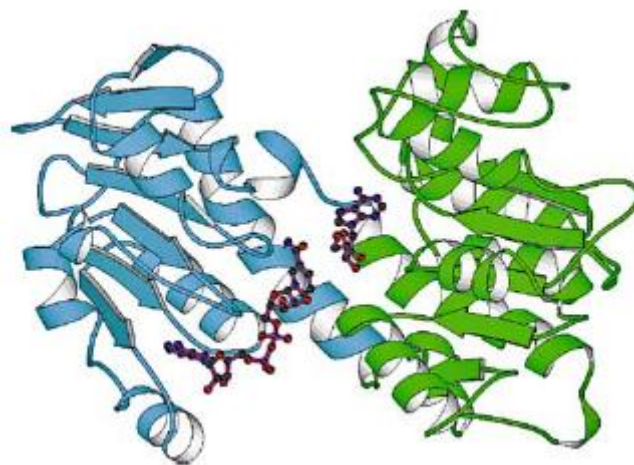
Aminokiselinski slijed proteina SAHH preuzet iz baze podataka NCBI Protein¹⁵ u nastavku je prikazan u FASTA formatu (Acc. No.: NP_000678.1, GI: 9951915).

```
MSDKLPYKVADIGLAAWGRKALDIAENEMPGLMRMRERYSASKPLKGAR IAGCLHMTVETAVLIETLVTL
GAEVQWSSCNIFSTQDHA AAAIAKAGIPVYAWKGETDEEYLWCIEQTLYFKDGPLNMI LDDGGDLTNLIH
TKYPQLLPGIRGISSEETTTGVVHNLYKMMANGILKVPAINVND SVTKSKFDNLYGCRESLIDGIKRATDVM
IAGKVAVVAGYGDVVGKCAQALRGFGARVI I TEIDPINALQAAMEGYEVTMTDEACQEGNIFVTTTGCID
I I LGRHFEQMKDDAIVCNIGHFDVEIDVKWLNENAVEKVN I KPQVDRYRLKNGRRI I ILLAEGRLVNLGCA
MGHPSPFVMSNSFTNQVMAQ IELWTHPKYPVGVHFLPKKLDEAVAE AHLGKLVNKLTKL TEKQAQYLGMS
CDGPFKPDHYRY
```

Ljudska S-adenozilhomocistein-hidrolaza je uglavnom citosolni protein molekulske mase 48 kDa koji se sastoji od 432 aminokiseline. U nativnom obliku SAHH se pojavljuje kao tetramer (slika 2) pri čemu svaka podjedinica sadrži po jednu vezanu molekulu NAD^+ kao kofaktor¹⁶. Podjedinice SAHH sastoje se od tri domene: NAD-vezujuće, katalitičke i C-terminalne domena¹⁷ (slika 3).

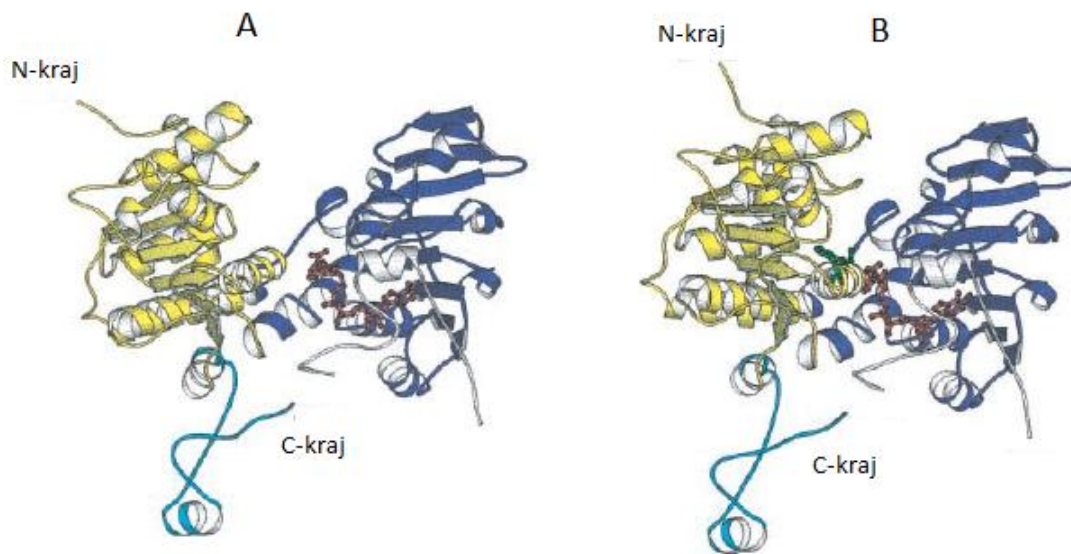


Slika 2. Tetramerna struktura S-adenozil-homocistein-hidrolaze. Svaka podjedinica prikazana je zasebnom bojom¹⁸.



Slika 3. Prikaz monomera SAHH. Katalitička domena (zeleno) veže supstrat (SAH) dok NAD-vezujuća domena (plavo) veže kofaktor NAD^+ ¹⁹.

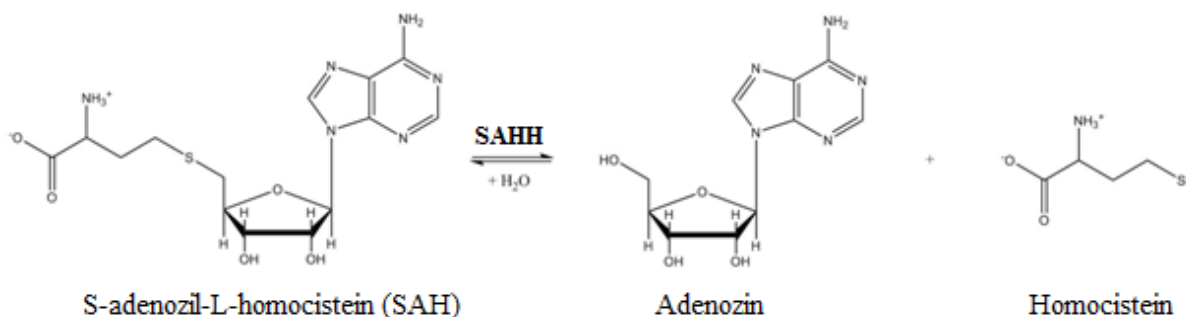
Metodom difrakcije rendgenskog zračenja određene su strukture enzima S-adenozilhomocistein-hidrolaze bez inhibitora i s inhibitorom^{18,20} te je utvrđeno da enzim zauzima dvije različite konformacije. Bez vezanog supstrata, SAHH se nalazi u otvorenoj konformaciji, a nakon vezanja supstrata enzim zauzima zatvorenu konformaciju (slika 4). Vezanjem supstrata na katalitičku podjedinicu dolazi do njezine rotacije za 16.9° oko spojnice domena čime se supstrat, koji je potrebno oksidirati, dovodi u blizinu kofaktora vezanog za NAD-vezujuću podjedinicu²¹.



Slika 4. Struktura podjedinice SAHH u otvorenoj (A) i zatvorenoj (B) konformaciji. Katalitička domena podjedinice prikazana je žutom bojom, NAD-vezujuća domena modrom, a C-terminalna plavom bojom.²¹

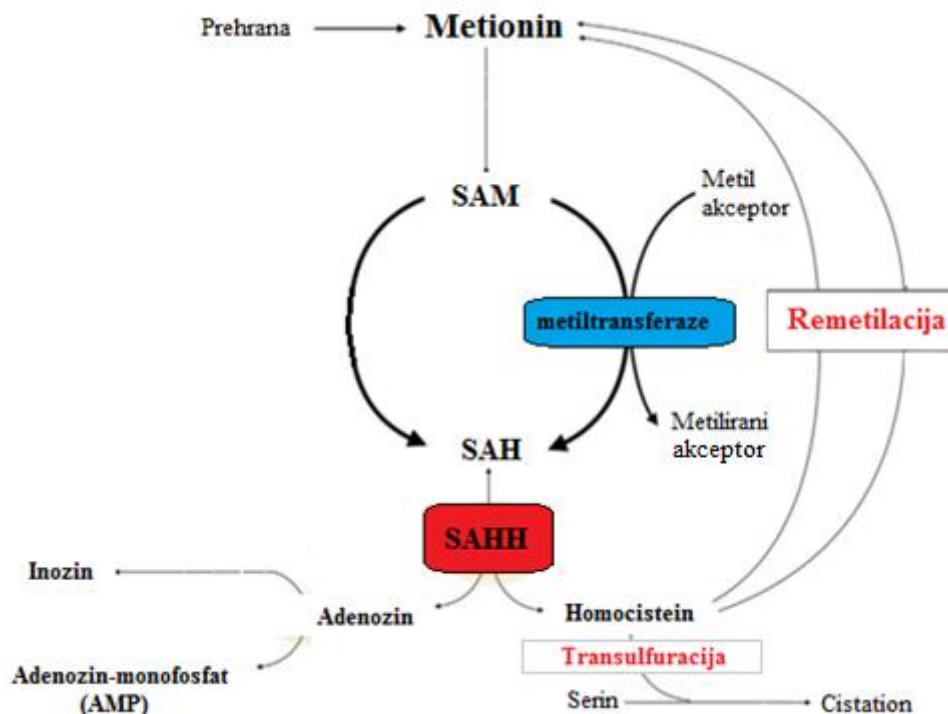
2.2. Reakcija koju katalizira S-adenozilhomocistein-hidrolaza

Enzim S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH) katalizira reakciju hidrolize S-adenozil-L-homocisteina (SAH) na adenzin i homocistein¹ (slika 5).



Slika 5. Reakcija koju katalizira S-adenozilhomocistein-hidrolaza. Slika je konstruirana korištenjem programskog alata *ChemDraw Pro 11.0*.

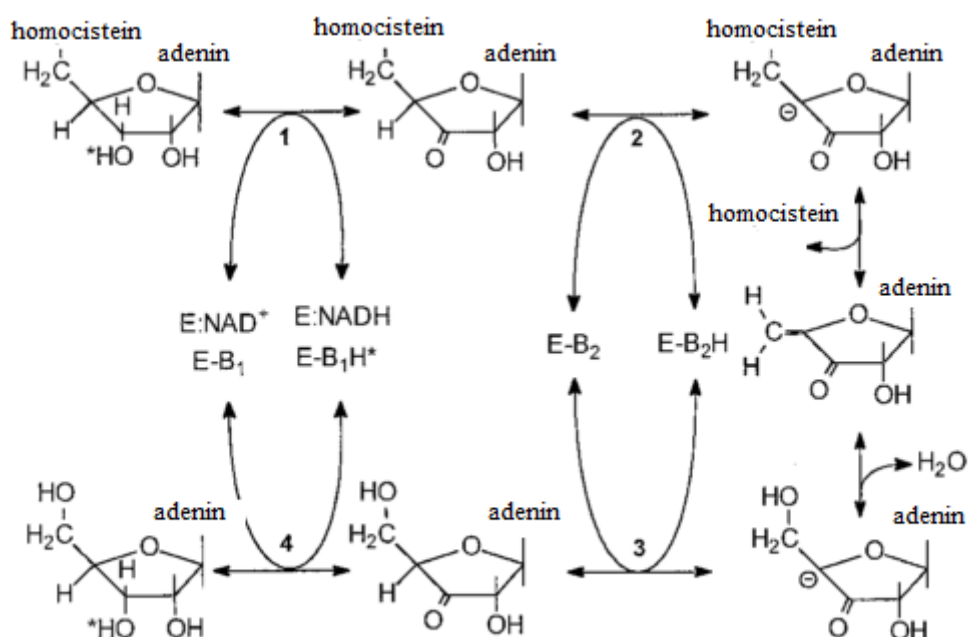
Reakcija je reverzibilna, a ravnoteža je pomaknuta u smjeru sinteze S-adenozil-L-homocisteina (SAH). Pri fiziološkim uvjetima reakcija ipak teče u smjeru hidrolize SAH zbog brzog uklanjanja produkata hidrolize, adenzina i homocisteina²². Adenzin se uklanja djelovanjem adenzin-deaminaze, pri čemu nastaje inozin, i adenzin-kinaze, pri čemu nastaje adenzin-monofosfat. Homocistein se uklanja reakcijama transulfuracije, čime nastaje cistation tj. citozin, i reakcijom remetilacije u metionin²³ (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz uloge enzima SAHH u metaboličkim putevima adenzina, metionina i homocisteina⁸.

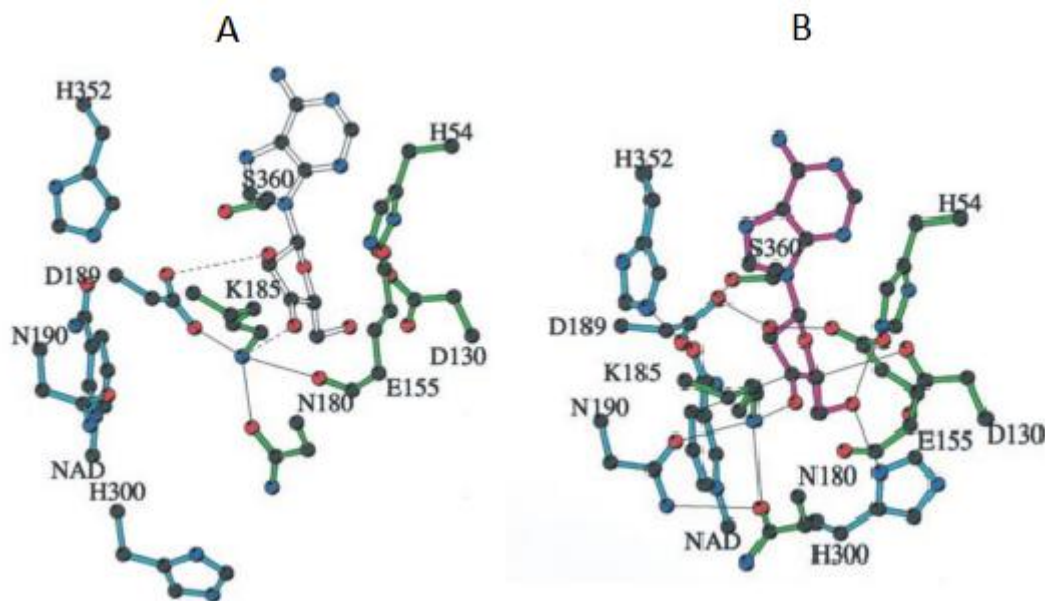
2.2.1. Mehanizam reakcije

Mehanizam reverzibilne hidrolize S-adenozil-L-homocisteina (SAH) katalizirane S-adenozil-homocistein-hidrolazom (SAHH) prvi su proučavali Palmer i Abeles^{16,24} te su pokazali da u prvom koraku reakcije nastaje 3'-keto-derivat SAH oksidacijom adenozina ili SAH uz redukciju NAD^+ u NADH. Oksidacija 3'-ugljikovog atoma SAH potiče prelazak protona sa 4'-ugljikovog atoma na bazičnu skupinu u aktivnom mjestu enzima čime nastaje 4'-karbokation koji uzrokuje eliminaciju 5'-supstituenta (homocisteina ili vode), pri čemu nastaje međuprodukt 3'-keto-4',5'-dehidroadenozin. Zadnji korak reakcije uključuje adiciju vode ili homocisteina na 3'-keto-4',5'-dehidroadenozin te redukciju 3'-keto skupine međuprodukta pomoću NADH čime nastaje konačan produkt reakcije adenozin, odnosno S-adenozin-L-homocistein (slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz katalitičkog mehanizma S-adenozil-homocistein-hidrolaze²⁵.

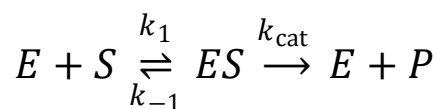
Određivanjem struktura proteina divljeg tipa²⁰ te mutirane verzije proteina D244E²¹ difrakcijom rendgenskog zračenja, pretpostavljeni su aminokiselinski ostaci koji izravno sudjeluju u katalitičkom mehanizmu SAHH. Njihov utjecaj na aktivnost enzima potvrđen je mjerenjem aktivnosti rekombinantnih proteina koji su sadržavali izmijenjene aminokiseline. Očuvanost aminokiselina koje su izravno uključene u katalitičku aktivnost SAHH, Lys185, Asp189, Asp130, Glu155, Asn190 i His54²⁵ (slika 8), vidljiva je na temelju poravnanja aminokiselinskih sekvenci SAHH iz različitih organizama (slika 1).



Slika 8. Prikaz aktivnog mjesta SAHH u otvorenoj (A) i zatvorenoj (B) konformaciji. Tankim linijama prikazane su vodikove veze. Plavom bojom označeni su aminokiselinski ostaci koji pripadaju NAD-vezujućoj domeni, a zelenom bojom aminokiseline katalitičke domene. Bijelom i ružičastom bojom prikazane su molekule supstrata SAH²⁵.

2.2.2. Kinetika reakcije

Michaelis-Mentenov model opisuje kinetiku enzimatski kataliziranih reakcija. Enzim (E) interagira sa supstratom (S) te se formira kompleks enzim-supstrat (ES) nakon čega enzim prevodi supstrat u produkt (P). Ovaj model dobro opisuje samo jednosupstratne enzimski katalizirane reakcije te ne vrijedi za reakcije u kojima postoji kooperativni efekt vezanja supstrata na enzim.



Kinetika reakcije hidrolize S-adenozil-L-homocistein hidrolaze (SAH) katalizirana S-adenozilhomocistein-hidrolazom prati Michaelis-Mentenov model enzimskih reakcija²⁶. Ispitivanja enzimске aktivnosti provode se korištenjem SAHH sa vezanim kofaktorom NAD⁺ (holoenzim) uz dodatak SAH i adenzin-deaminaze u reakcijsku smjesu. Prevođenje jednog od produkta reakcije adenzina u inozin pomoću adenzin-deaminaze uzrokuje pad apsorbancije pri 265 nm zbog čega se katalitička aktivnost SAHH može pratiti spektrofotometrijski²⁵. Također, iako je SAHH oligomerni protein koji se sastoji od više podjedinica sa zasebnim katalitičkim domenama, kooperativni efekt između njih prilikom same enzimске reakcije ne dolazi do izražaja. Same katalitičke domene su zapravo prostorno udaljene jedna od druge bez značajnih međusobnih interakcija²¹.

2.3. Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein-hidrolaze

Nedostatna aktivnost enzima S-adenozilhomocistein-hidrolaze (SAHH) je nasljedna metabolička bolest otkrivena 2004. godine u Hrvatskoj⁴. Bolest je uzrokovana mutacijom u genu koja dovodi do djelomične inaktivacije proteina SAHH što utječe na regulaciju staničnih metilacijskih procesa. Glavni simptomi su usporeni psihomotorni razvoj, smanjeni tonus mišića te značajno povišena razina SAM, SAH, metionina te kreatin-kinaze i transaminaza.

Prvi pacijent bio je dječak iz Hrvatke koji je od najranije dobi pokazivao usporen psihomotorni razvoj, smanjen tonus mišića te slabu kontrolu pokreta glave. Uočen je nedostatak interesa za vanjske podražaje te nedostatak potkožnog masnog tkiva. Laboratorijskim dijagnostičkim metodama utvrđena je povišena razina aspartat i alanin-aminotransferaza, kreatin-kinaza te čak do 60 puta veće razine metionina u krvi od normalnih vrijednosti. Svakako najkarakterističnije promjene metabolizma su drastično povišene razine SAH, do 150 puta veće od referentnih vrijednosti, te SAM do 30 puta veće od referentnih vrijednosti. Metabolička slika nije se uklapala u niti jedan dotada poznati metabolički poremećaj.

Određivanjem nukleotidnog slijeda gena za S-adenozilhomocistein-hidrolazu otkrivene su dvije naslijeđene točkaste mutacije u eksonu 4. Od majke je naslijeđena promjena nukleotida na 112. kodonu (TGG → TGA) koja uvodi preuranjeni STOP-kodon čime nastaje skraćena verzija proteina SAHH. Od oca je naslijeđena promjena nukleotida na kodonu 143 (TAC → TGC) koja uzrokuje zamjenu aminokiseline tirozina u cistein na položaju 143 aminokiselinskog slijeda proteina. Istraživanja su pokazala da mutacija proteina naslijeđena od oca (Y143C) utječe na stabilnost tetramerne strukture enzima uzrokujući spontani raspad na monomere, što rezultira potpunim gubitkom katalitičke aktivnosti S-adenozilhomocistein-hidrolaze (SAHH)²⁷. Mlađi brat prvog pacijenta također je naslijedio prethodno navedene mutacije od roditelja te je krvna slika pokazala povišene razine SAM, SAH i metionina kao i kod prvog pacijenta⁷.

Treći pacijent bio je 26-godišnji mladić kojemu su sekvenciranjem otkrivene dvije mutacije gena za SAHH⁶. Prethodno opisanu mutaciju na eksonu 4, koja rezultira mutiranom verzijom proteina (Y143C), naslijedio je od oca. Druga mutacija gena na eksonu 3 nije pronađena kod roditelja a radilo se o promjeni 89. kodona (GCC → GTG) koja rezultira promjenom 89. aminokiseline proteina iz alanina u valin (A89V). Analiza katalitičke aktivnosti verzije enzima SAHH_A89V pokazala je njezino drastično smanjenje $\geq 70\%$ u odnosu na aktivnost SAHH divljeg tipa²⁸.

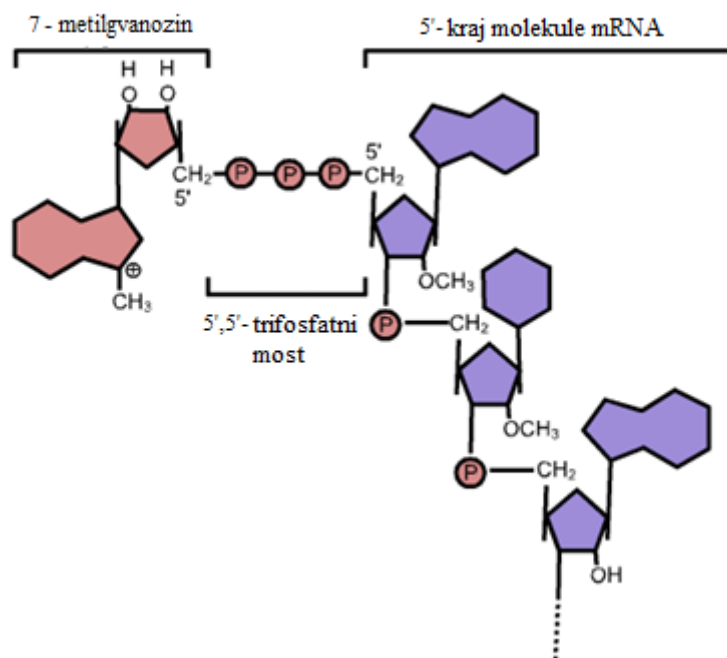
Do danas je otkriveno 7 mutacija gena za protein SAHH koje utječu na njegovu aktivnost. Osim već opisanih mutiranih verzija proteina Y134C, W112STOP, A89V, otkrivene su i nove mutirane verzije proteina SAHH sa sljedećim mutacijama: zamjena arginina u cistein na poziciji 49 aminokiselinskog slijeda proteina (R49C) koja uzrokuje formiranje makromolekularnih kompleksa proteina zbog stvaranja intermolekularnih disulfidnih veza²⁹, zamjena aspartata u glicin na poziciji 86 aminokiselinskog slijeda (D86G) zbog koje dolazi do formiranja neaktivnih agregata proteina SAHH³⁰ te najnovija mutacija 328. kodona (TAT → GAT) koja uvodi zamjenu aminokiseline tirozin u aspartat⁸.

2.4. Mehanizmi degradacije mRNA

Ekspresija gena uključuje mnoge mehanizme koji se nalaze pod strogom staničnom kontrolom. Neki od njih su transkripcija molekula mRNA, izrezivanje introna, poliadenilacija te degradacija molekula mRNA. Mnogi stanični faktori i metabolički putevi uključeni su u regulaciju degradacije mRNA bilo da se radilo o funkcionalnim transkriptima ili pak onima koji sadrže neku grešku³¹. Nedavno su otkrivena tzv. P-tijela, citosolni agregati koji se sastoje od mRNA i proteina koji igraju vrlo važnu ulogu u regulaciji translacije i degradacije mRNA³². Stabilnost molekule RNA regulirana je elementima unutar njezinog nukleotidnog slijeda, kao što su na primjer zaštita na 5'-kraju, poli(A)-rep na 3'-kraju, te specifični sljedovi unutar same kodirajuće regije molekule mRNA, AU-elementi³³.

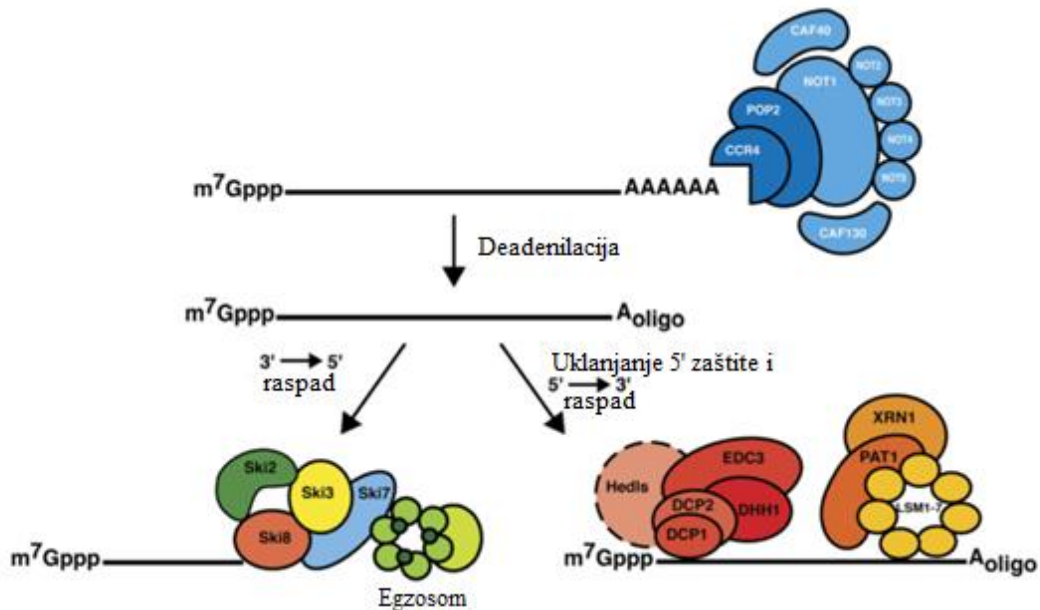
2.4.1. Regulacija stabilnosti transkripata

Eukariotska mRNA sadrži dva glavna stabilizirajuća faktora, modificirani nukleotid na 5'-kraju, 7-metilgvanozin (slika 9) i ponavljajući niz adenzin-monofosfata na 3'-kraju tzv. poli(A)-rep. Ove modifikacije štite molekulu mRNA od egzozukleaza te pospješuju inicijaciju translacije interakcijom s citosolnim proteinima eIF4E (eng. *eukaryotic translation initiation factor E4*) i PABP (eng. *polyA-binding protein*)³¹.



Slika 9. Struktura 7-metilgvanozina povezanog sa 5'-krajem mRNA preko trifosfata³⁴.

Degradacija većine eukariotskih mRNA započinje deadenilacijom i skraćivanjem poli(A)-repa na 3'-kraju molekule nakon čega se degradacija nastavlja u dva moguća smjera (slika 10). Prvi mehanizam uključuje uklanjanje zaštite na 5'-kraju mRNA omogućavajući njezinu razgradnju egzoribonukleazom u smjeru 5' → 3', dok drugi mehanizam uključuje razgradnju u 3' → 5' smjeru zbog prepoznavanja nezaštićenog 3'-kraja mRNA od strane egzosoma. Samu reakciju deadenilacije provode enzimi deadenilaze kao što su PAN2-PAN3 nukleaza, glavna deadenilaza kvasca *S. cerevisiae* CRT4-NOT³⁵ te PARN (eng. *polA-specific ribonuclease*) nukleaza³⁶.



Slika 10. Shema degradacije mRNA predvođena deadenilacijom, odnosno uklanjanjem poli(A)-repa na 3'-kraju molekule³¹.

2.4.2. Razgradnja mRNA P-tijelima

Početak 21. stoljeća otkriveni su agregati kompleksa mRNA i proteina prisutni u citoplazmi stanice, tzv. P-tijela (eng. *processing bodies, P-bodies*)³⁷. Sastavni elementi P-tijela mogu se podijeliti u tri osnovne skupine. Prvu skupinu čini očuvana skupina proteina koja je uključena u mehanizam uklanjanja 5' zaštite s molekula mRNA kao što su enzim Dcp1p/Dcp2p i Xrn1p 5' → 3' egzonukleaza. Druga skupina uključuje proteine odgovorne za degradaciju mRNA te represiju njezine translacije, kao što je kompleks CCR4/POP2/NOT, dok treću skupinu čine netranslatirajuće molekule mRNA koje su sastavni dio samog kompleksa⁹.

P-tijela se formiraju kada je prethodno opisani 5' → 3' egzonukleazni raspad mRNA blokirani, ili zbog prevelikog broja molekula RNA koje su određene za raspad, ili zbog mutacija XRN1 egzonukleaze odnosno drugih faktora koji uklanjaju zaštitu na 5'-kraju³⁷.

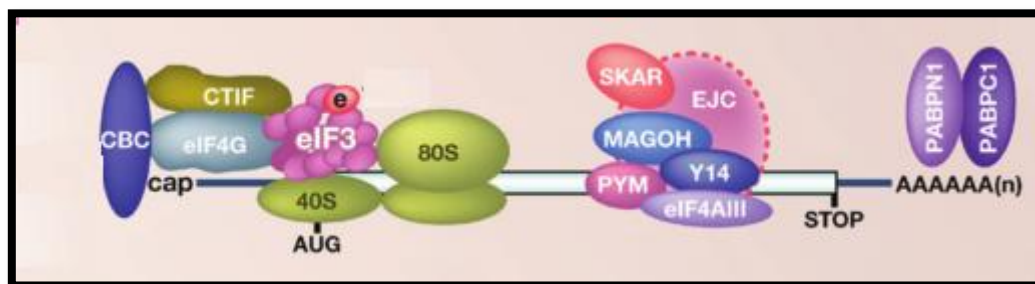
2.4.3. Degradacija transkripata sa greškom

Sinteza molekula mRNA te njihovo sazrijevanje u funkcionalne transkripte složeni su procesi u kojima u svakom trenutku može doći do pogreške. Kako bi se spriječila sinteza potencijalno toksičnih proteina, u stanicama postoje mehanizmi prepoznavanja i uklanjanja transkripata s greškom. Prepoznavanje i degradacija tih transkripata može se izvršiti u jezgri uz pomoć egzosoma raspadom u 3' → 5' smjeru³⁸, ili u citoplazmi mehanizmima koji se aktiviraju tijekom same translacije mRNA s greškom³¹.

2.4.3.1. Prvi ciklus translacije

Nakon dodavanja zaštite na 5'-kraju novosintetiziranih transkripata te prije uspostavljanja stabilne razine translacije, molekule mRNA prolaze kroz prvi ciklus translacije (eng. *pioneer round of translation*). Glavni kompleks koji sudjeluje u ovom procesu je CBP80-CBP20 (CBC) koji se veže na 7-metilgvanozin molekule mRNA te inicira njezin prvi ciklus translacije koji uključuje vezanje jednog ili više ribosoma na transkript³⁹. Na molekulama mRNA sa kompleksom CBP80-CBP20 (CBC-mRNA) ostaju vezani i EJC proteinski kompleksi (eng. *exon-junction complexes, EJC*) na položajima gdje se spajaju eksoni nakon izrezivanja introna (slika 11). Inicijacijom prvog ciklusa translacije te prolaskom prvog ribosoma koji uklanja zaostale EJC komplekse sa molekule mRNA, omogućeno je uspostavljanje stabilne razine translacije (eng. *steady-state translation*) vezanjem CBC kompleksa sa inicijacijskim faktor eIF4E.

Još jedna karakteristika molekula mRNA koje ulaze u prvi ciklus translacije je primarno nuklearni protein PABPN1 koji veže njihov poli(A)-rep na 3'-kraju. Uspostavljanjem stabilne razine translacije ovaj protein zamjenjuje se proteinom PABPC1 koji se primarno nalazi u citoplazmi. Iako CBC-mRNA i eIF4E-vezujuća mRNA koriste iste faktore inicijacije translacije (eIF4G, eIF3, eIF4B, eIF4A, eIF2), njihove stanične uloge se razlikuju. CBC-mRNA imaju ulogu u mehanizmu degradacije transkripata bez STOP-kodona (NMD)⁴⁰ opisanog u nastavku te kao takvi služe pri staničnoj kontroli kvalitete genske ekspresije.



Slika 11. Molekula mRNA u prvom ciklusu translacije sa vezanim karakterističnim proteinima EJC, PABPN1 i CBP80-CBP20 kompleksom (CBC)³⁹.

2.4.3.2. Degradacija mRNA s preuranjenim STOP-kodonom

Degradacija transkripata s preuranjenim STOP-kodonom (eng. *non-sense mediated decay*, *NMD*) najbolje je istražen mehanizam prepoznavanja transkripata s greškom koji osigurava njihovu brzu i efikasnu razgradnju. Osim što uklanja transkripte s greškom, istraživanja su pokazala da NMD regulira i dio normalne genske ekspresije kvasca⁴¹ i sisavaca⁴².

Preuranjeni STOP-kodoni mogu nastati zbog različitih razloga: zbog mutacije nukleotidnog slijeda, pomaka otvorenog okvira čitanja, neprikladnog posttranslacijskog procesiranja, ili zbog „cureće“ inicijacije translacije. Ovaj mehanizam otkriven je kod većine eukariota te uključuje četiri glavna, visoko konzervirana proteina, UPF1, UPF2 i UPF3 i SMG1 koji čine osnovni dio kompleksa NMD⁴³ (Slika 11). Smatra se da se aktivacija ovog mehanizma događa tijekom prvog ciklusa translacije. Ukoliko ribosom tijekom translacije CBC-mRNA naiđe na STOP-kodon, a nizvodno od njega još uvijek su vezani EJC kompleksi, proteini NMD kompleksa prepoznaju da se radi o preuranjenom STOP-kodonu. Aktiviraju se mehanizmi uklanjanja 5'-zaštite transkripta i mehanizam deadenilacije molekule mRNA koji uzrokuju njezinu degradaciju u 5'→3' smjeru egzozomom XRN1 i 3'→5' smjeru egzosomom⁴⁰.

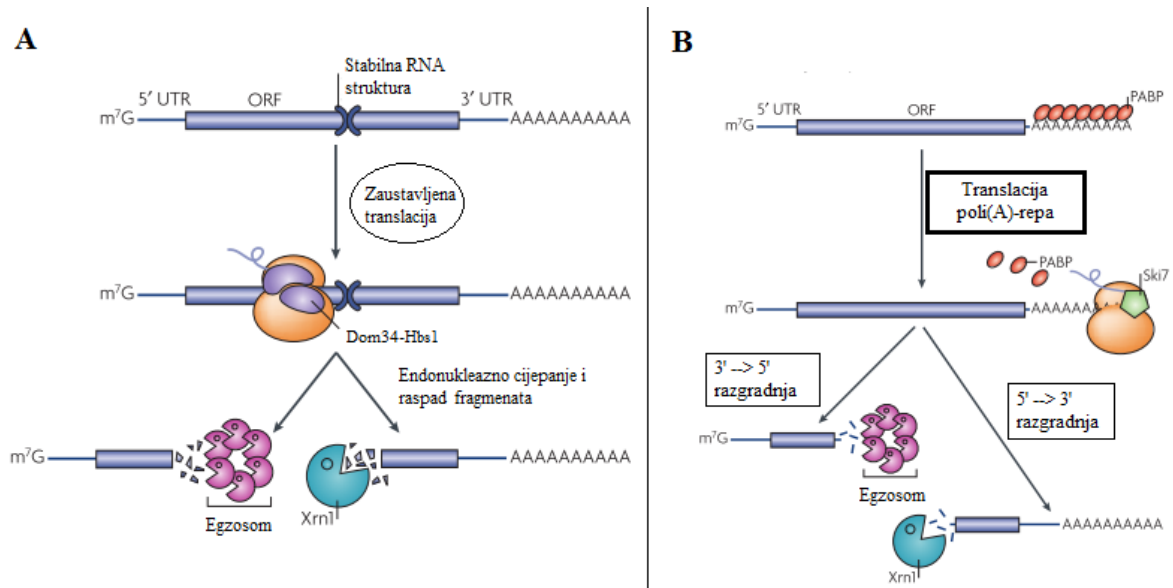
2.4.3.3. Degradacija mRNA koja ne sadrži STOP-kodon

Transkripti koji ne sadrže STOP-kodon mogu nastati uslijed pucanja same molekule, promjenom okvira čitanja, ili točkastom mutacijom čime se gubi izvorni STOP-kodon. Translacija ovakvih transkripata nastavlja se duž poli(A)-repa na 3'-kraju molekule te time nastaju produženi, uglavnom nefunkcionalni i potencijalno štetni proteinski produkti. Kako bi se to spriječilo, uslijed transkripcije transkripata bez STOP-kodona aktivira se mehanizam njegove degradacije (eng. *non-stop decay*, *NSD*). Osim što prepoznaje transkripte bez STOP-kodona te ih usmjerava u daljnji proces degradacije egzosomom ili egzozomom XRN1 (slika 12-B), ovaj mehanizam također dovodi do disocijacije ribosoma³¹.

Kod sisavaca i kvasaca mehanizam uključuje djelovanje citoplazmatskog egzosoma prepoznavanjem adaptorskog proteina Ski7 koji se veže u A-mjesto ribosoma. Vezanjem Ski7 na A mjesto dolazi do disocijacije ribosoma nakon čega se mRNA deadenilira i degradira u 3' → 5' smjeru⁴⁴. Kod kvasca *S. cerevisiae* degradacija transkripta potaknuta je uklanjanjem proteina PABP ribosomom nakon čega dolazi do raspada transkripta u 5' → 3' smjeru⁴⁵.

2.4.3.4. Degradacija mRNA uslijed zastajanja ribosoma

Određeni transkripti mogu uzrokovati zastajanje ribosoma prilikom translacije zbog specifičnih sekundarnih struktura koje onemogućuju daljnju ispravnu sintezu proteina. Mehanizam uklanjanja ovakvih transkripata (eng. *no-go decay*, *NGD*) nedavno je otkriven kod kvasca⁴⁶, a uključuje vezanje Dom34-Hbs1 proteina na transkript blizu mjesta gdje je zastao ribosom. Ovaj proteinski kompleks potom aktivira endonukleazno cijepanje molekule mRNA čime nastaju dva fragmenta koja se zatim raspadaju u 5' → 3' i 3' → 5' smjeru (slika 12-A).



Slika 12. Shema mehanizma degradacije mRNA uslijed zastajanja ribosoma (A) i degradacije mRNA bez STOP-kodona (B)³¹.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Fluka*), agarozna (*Roth*), akrilamid (*Sigma*), kloramfenikol (*Sigma*), amonijev persulfat, APS (*Serva*), *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin, TEMED (*Roth*), etanol, 96 % p.a. (*Gram-Mol*), kloroform (*Carlo Erba*), izoamil alkohol (*Kemika*), dimetil sulfoksid, DMSO, (*Sigma*), ditiotreitrol, DTT (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Sigma*), etidij bromid (*Sigma*), octena kiselina (*Kemika*), aceton (*Kemika*), 2-propanol (*Gram-Mol*), polietilenglikol, PEG (*Thermo Scientific*), natrijev klorid, NaCl (*Kemika*), glikogen (*Thermo Scientific*), glicerol (*Thermo Scientific*), Tris(hidroksimetil)aminometan, Tris (*Sigma*), Tween-20 (*Sigma*).

3.1.2. Pufferirane otopine

Expand Long Range PCR puffer bez MgCl_2 (*Roche*), CutSmart puffer (*NEB*), TAE puffer (40 mmol dm^{-3} Tris-acetat, 1 mmol dm^{-3} EDTA, pH 8,2), NEBuffer 1.1 puffer (*NEB*), TranscriptAid puffer (*Thermo Scientific*), 10x puffer za T4 RNA-ligazu (0,5 mol dm^{-3} Tris-HCl, 0,1 mol dm^{-3} MgCl_2 , 0,1 mol dm^{-3} DTT, 10 mmol dm^{-3} ATP, pH 7,8- *Thermo Scientific*), PBS puffer za stanične kulture (140 mmol dm^{-3} NaCl, 2,7 mmol dm^{-3} KCl, 10 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 , 1,8 mmol dm^{-3} KH_2PO_4 , pH 7,4), Pierce® IP puffer za lizu stanica (25 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH 7,4), 150 mmol dm^{-3} NaCl, 1% NP-40, 1 mmol dm^{-3} EDTA, 5% glicerol- *Thermo Scientific*), puffer za vezanje RNA (20 mmol dm^{-3} Tris (pH 7,5), 1 mol dm^{-3} NaCl, 1 mmol dm^{-3} EDTA- *Thermo Scientific*), 10x puffer za vezanje RNA i proteina (0,2 mol dm^{-3} Tris (pH 7,5), 0,5 mol dm^{-3} NaCl, 20 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 1% Tween-20- *Thermo Scientific*), puffer za ispiranje (20 mmol dm^{-3} Tris (pH 7,5), 10 mmol dm^{-3} NaCl, 0,1% Tween-20- *Thermo Scientific*), puffer za eluciju biotina (*Thermo Scientific*), 4x puffer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel (50 g dm^{-3} SDS, 50 mmol dm^{-3} β -merkptoetanol, 25% glicerol, 0,1 g dm^{-3} bromfenol plavo, 0,25 mol dm^{-3} Tris-HCl, pH 6,8), puffer za SDS-PAGE (190 mmol dm^{-3} glicin, 25 mmol dm^{-3} Tris, 0,1% SDS (pH 8,3)), puffer za prijenos na membranu (25 mmol dm^{-3} Tris, 190 mmol dm^{-3} glicin, 20% metanol, 0,1% SDS), PBS-T puffer (140 mmol dm^{-3} NaCl, 2,7 mmol dm^{-3} KCl, 10 mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 , 1,8 mmol dm^{-3} KH_2PO_4 , 0,1% Tween-20, pH 8,0), 10x puffer za strukturiranje RNA (100 mmol dm^{-3} Tris (pH 7,6), 1 mol dm^{-3} KCl, 100 mmol dm^{-3} MgCl_2).

3.1.3. Enzimi i antitijela

Expand Long Range smjesa enzima za PCR (*Roche*), restrikcijska endonukleaza *DpnI* (*NEB*), RNaza A (*Qiagen*), restrikcijska endonukleaza *AgeI* (*NEB*), Inhibitor RNaze (*Thermo Scientific*), T4 RNA-ligaza (*Thermo Scientific*), tripsin-EDTA otopina (*Sigma*), inhibitor proteaza (*Roche*), HuR monoklonsko antitijelo (*Thermo Scientific*), Anti-miš IgG s konjugiranom peroksidazom (*Sigma*).

3.1.4. Boje

Etidij bromid (*Sigma*), Lyse Blue (*Qiagen*), Gel Loading Dye, Purple 6x(*NEB*), 2x RNA Loading Dye (*Thermo Scientific*), Ponceau S (*Sigma*).

3.1.5. Hranjivi mediji

LB (*Luria-Bertani*) medij je hranjivi medij za uzgoj bakterijskih stanica *E. coli* sastava, 5 g dm⁻³ kvašćevog ekstrakta, 10 g dm⁻³ triptona i 10 g dm⁻³ NaCl. Nakon pripreme, medij se sterilizira autoklaviranjem 45 min pri 120 °C. Ohlađenom sterilnom mediju po potrebi se doda antibiotik kloramfenikol do konačne koncentracije 25 µg mL⁻¹. Obzirom da plazmid pOTB7 sadrži gen za otpornost na kloramfenikol, u mediju mogu preživjeti samo bakterije transformirane plazmidom. Za pripremu krutih hranjivih podloga, u tekući hranjivi medij dodaje se agar konačne koncentracije 12,5 g dm⁻³.

DMEM medij (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Sigma*) koristi se za uzgoj HepG2 stanica. Sadrži sve aminokiseline i vitamine koji su potrebni za njihov normalan rast uz dodatak glukoze koncentracije 4500 mg dm⁻³, L-glutamina, natrijevog bikarbonata, NaHCO₃ i piridoksina. Prije samo upotrebe, originalnom pakiranju medija doda se fetalni goveđi serum (FBS) do konačne koncentracije od 10%.

3.1.6. Bakterijski soj Mach1

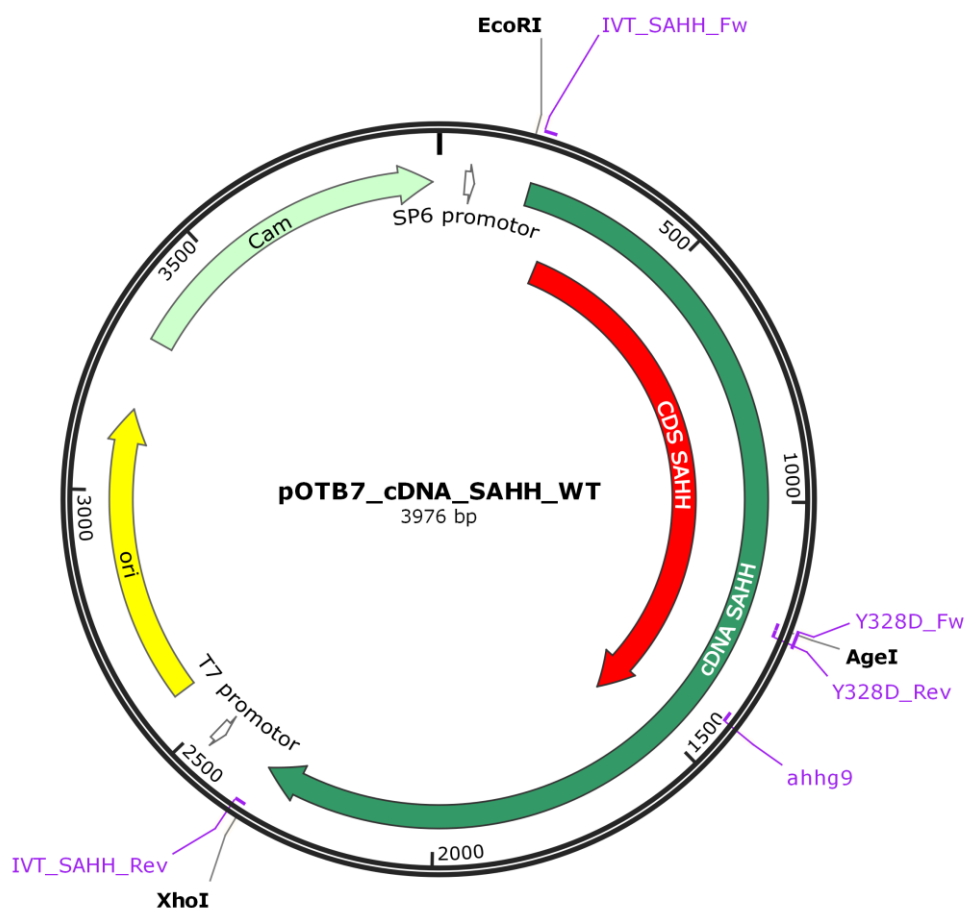
Mach1 je soj bakterije *E.coli* koji nalazi široku primjenu u laboratorijskim istraživanjima zbog svoj vrlo brzog rasta. Ovaj bakterijski soj nema rezistenciju na određene antibiotike te sadrži otpornost na T1 fage.

3.1.7. HepG2 stanična linija

HepG2 je besmrtna stanična linija stanica raka jetre. Sadrže 55 parova kromosoma te u prikladnim laboratorijskim uvjetima mogu biti uzgojene u velikim količinama. Proizvode veće količine proteina prisutnih u krvnoj plazmi kao što su transferin, fibrinogen i albumin. U usporedbi sa ostalim staničnim linijama koje se koriste u laboratorijskim istraživanjima kao što su HeLa, HEK i druge, HepG2 stanice pokazuju najveću ekspresiju proteina SAHH. Stanice su adherentne te na prikladnoj podlozi rastu kao monosloj formirajući manje agregate.

3.1.8. Rekombinantni plazmid pOTB7

Rekombinantni plazmid pOTB7 sastoji se od 3976 parova baza te sadrži ugrađeni insert cDNA proteina SAHH divljeg tipa između restrikcijskih mjesta *EcoRI* i *XhoI*. Ovaj plazmid korišten je kao kalup za uvođenje točkaste mutacije. Sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kloramfenikol (Cam), izvorište replikacije (*ori*) te T7 i SP6 promotorske sljedove.



Slika 13. Prikaz mape rekombinantnog plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_WT. Mapa je konstruirana korištenjem programskog alata *SnapGene 3.0.3*.

3.1.9. Komercijalni kompleti

QIAprep SpinMiniprep (Qiagen) komplet za izolaciju plazmidne DNA, *Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)* i *Qubit® RNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)* kompleti za određivanje koncentracija otopina RNA i DNA, *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific)* komplet za *in vitro* transkripciju, *Pierce™ RNA 3' End Desthiobiotinylation Kit (Thermo Scientific)* komplet za obilježavanje RNA, *Perice™ Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit (Thermo Scientific)* komplet za izdvajanje proteina koji vežu RNA, *Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)* komplet za detekciju.

3.2. Metode

3.2.1. Ciljana mutageneza

Metoda *in vitro* mutageneze (eng. *site-directed mutagenesis*) temelji se na umnažanju sljedova DNA lančanom reakcijom polimerazom (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) uporabom vjernih DNA-polimeraza uz par početnica. Početnice sadrže željenu mutaciju koja se uvodi u odsječak DNA ukloniran u vektor, kao i dijelove koji su komplementarni odsječku uzvodno i nizvodno od mutacije. Metoda se sastoji od provođenja lančane reakcije polimerazom korištenjem polimeraze visoke vjernosti kao što je *Pfu*-DNA-polimeraza. Zatim se restriksijskom endonukleazom *DpnI* cijepaju metilirani sljedovi DNA čime se iz reakcije uklanja kalup koji ne sadrži željenu mutaciju, dok *in vitro* sintetizirana, nemetilirana DNA, ostaje nerazgrađena u reakcijskoj smjesi. Nerazgrađena DNA se zatim transformira u kompetentne bakterije *E. coli* u svrhu odabira pozitivnih klonova.

U ovom radu, cDNA proteina SAHH koja sadrži točkastu mutaciju, tj. promijenjeni nukleotid na poziciji 1051 (T → G), dobivena je metodom ciljane mutageneze. Kao kalup za ciljanu mutagenezu korišten je vektor pOTB7 s ugrađenim odsječkom cDNA_SAHH_WT (slika 13) te par početnica Y328D_Fw i Y328D_Rev koje sadrže željenu točkastu mutaciju (crveno). Ukupni volumen PCR reakcijske smjese iznosio je 25 μ L. Komponente sastavnih reagensa PCR reakcije dio su komercijalno dostupnog kompleta *Expand Long Range dNTPack (Roche)*⁴⁷ uz dodatak ultra-čiste vode (mqH₂O).

Nukleotidni sljedovi korištenih početnica:

- Y328D_Fw 5' AGGTGGACCGG**G**ATCGGTTGAAGAATG 3'
- Y328D_Rev 5' TTCTTCAACCGAT**C**CCGGTCCACCTGC 3'

Tablica 1. Konačne koncentracije i volumeni izvornih otopina korištenih za ciljanu mutagenezu.

	Konačna koncentracija	Volumen ishodne otopine/ μ L
mqH ₂ O	-	12,9
5X pufer (bez MgCl ₂)	1x	5
dNTP-ovi	500 μ mol dm ⁻³	1,25
MgCl ₂	2,5 mmol dm ⁻³	2,5
DNA-polimeraza	3,5 U	0,35
Početnica Y328D_Rev	0,3 μ mol dm ⁻³	0,75
Početnica Y328D_Fw	0,3 μ mol dm ⁻³	0,75
pOTB7_cDNA_SAHH_WT	\approx 500 ng	1
DMSO	2%	0,5
Ukupni volumen		25

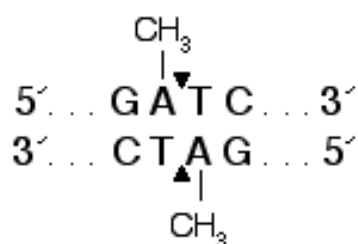
Tablica 2. Temperaturni program korišten za *in vitro* mutagenezu.

	temperatura / °C	trajanje ciklusa	broj ciklusa
početna denaturacija	94	4 min	1
denaturacija	94	10 s	25
sparivanje početnica	55	15 s	25
produljenje	68	4 min	10+15($\Delta t=2s$)
završno produljenje	68	7 min	1

3.2.2. Razgradnja restrikcijskom endonukleazom *DpnI*

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju i cijepaju specifični nukleotidni slijed dvolančane molekule DNA. Mjesto cijepanja naziva se restrikcijsko mjesto te obično uključuje 4-6 parova baza. Ovisno o mjestu prepoznavanja i cijepanja razlikuju se različiti tipovi restrikcijsko-modifikacijskih sustava. Najčešće se koriste restrikcijske endonukleaze tipa II koje prepoznaju simetrične sljedove DNA te ih cijepaju na točno određenom mjestu. Mjesta prepoznavanja restrikcijskih endonukleaza tipa II imaju dvostruku os simetrije te se još nazivaju i palindromi.

Aktivnost određenih restrikcijskih endonukleaza uvjetovana je metilacijom njihovih restrikcijskih mjesta te ishod cijepanja može ovisiti o ovoj modifikaciji dvolančane molekule DNA. Jedan od takvih enzima je i restrikcijska endonukleaza *DpnI* koja specifično prepoznaje samo metilirane nukleotidne sljedove (slika 14).



Slika 14. Mjesto prepoznavanja restrikcijske endonukleaze *DpnI*⁴⁸.

Reakcija razgradnje provedena je u volumenu od 30 μL dodatkom potrebnih reagensa prema tablici 3. Reakcijska smjesa inkubirana je 60 minuta na 37 °C nakon čega je provedena temperaturna inaktivacija *DpnI* enzima u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 80 °C.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za razgradnju restrikcijском endonukleazom *DpnI*.

Volumen / μL	
PCR reakcijska smjesa	25
<i>DpnI</i>	1
10x CutSmart pufer	3
mqH ₂ O	1
Ukupni volumen	30

3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Gel-elektroforeza na agaroznom gelu je metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i pročišćavanje nukleinskih kiselina na temelju njihovih veličina odnosno masa. Temelji se na različitom gibanju nukleinskih kiselina kroz pore agaroznog gela pod utjecajem električnog polja pri čemu se manje molekule kreću brže od većih molekula. Agaroz je linearni polimer u kojem se izmjenjuju ostaci D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze te se ovisno o koncentraciji agaroze u samom gelu može kontrolirati veličina pora odnosno raspon molekulskih masa nukleinskih kiselina koje se mogu odijeliti. Za detekciju nukleinskih kiselina unutar gela koriste se interkalirajući reagensi kao što je etidij-bromid. Vežanjem na DNA, intenzitet fluorescencije etidij-bromida znatno se povećava te je vizualizacija fragmenata u gelu moguća pobudom sa UV-svjetlom transiluminatora ($\lambda=312\text{ nm}$).

Nakon provedene mutageneze i razgradnje enzimom *DpnI*, produkti PCR reakcije analizirani su gel-elektroforezom na agaroznom gelu. Prethodno su pripremljeni 1% agarozni gelovi otapanjem 1g agaroze u 100 mL pufera TAE uz dodatak 5 μL otopine etidij-bromida, zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja te izlijevanjem u odgovarajuće kalupe. U jažice je nanoseno 1 μL uzorka uz dodatak 1 μL boje *Gel Loading Dye, Purple 6x (NEB)*. Kao marker molekulskih mana korišten je *Quick-Load 2-Log DNA Ladder(NEB)*. Elektroforeza je provedena u trajanju od 20 minuta uz napon od 120 V koristeći aparaturu za horizontalnu elektroforezu.

3.2.4. Transformacija elektrokompetentnih stanica Mach1 elektroporacijom

Elektroporacija je uz kemijsku transformaciju jedna od metoda unosa strane DNA u stanicu. Primjenom kratkog i snažnog električnog pulsa dolazi do povećanja električne provodljivosti i permeabilnosti plazmatske membrane zbog utjecaja vanjskog električnog polja što u konačnici rezultira nastajanjem pora u membrani koje omogućuju ulazak velikih molekula u stanicu kao što je molekula DNA.

Transformacija bakterijskih stanica *E.coli* soja Mach1 odrađena je u ohlađenim kivetama s aluminijskih elektrodama dodatkom 50 μ L elektrokompetentnih stanica Mach1 i 0,5 μ L reakcijske smjese koja sadrži rekombinantni plazmid sa potencijalno mutiranim insertom. Elektroporacija je izvedena na uređaju *Gene Pulser Xcell* (Bio-Rad). Parametri elektroporatora podešeni su na napon od 2,5 kV, otpor 200 Ω i kapacitivnost 25 μ F te je primijenjen puls u trajanju od 5,0 ms. Stanice su odmah nakon resuspendirane u 0,5 mL tekućeg LB medija te su inkubirane na 37 °C otprilike 60 minuta u rotacijskoj tresilici na 250 rpm-a. Nakon oporavka stanica, alikvoti stanične suspenzije od 100 μ L i 400 μ L nasađeni su na ploče sa hranjivom podlogom koja sadrži antibiotik kloramfenikol, te su ploče inkubirane preko noći na 37 °C.

3.2.5. Uzgoj bakterijskih kultura

Bakterijske stanice se danas najčešće upotrebljavaju kao sustavi za umnažanje određenog genetičkog materijala te za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina. Rad sa bakterijama zahtjeva sterilno okruženje najčešće uz plamen kako bi se smanjila bilo kakva mogućnosti kontaminacije.

Za uzgoj transformiranih bakterija na krutim LB hranjivim podlogama korišteni su alikvoti od 100 μ L i 400 μ L suspenzije stanica koje se pomoću staklenog štapića, prethodno steriliziranog u etanolu i plamenu razmazuju po pločama sa hranjivom podlogom dok se suspenzija potpuno ne upije. Nasađene ploče ostavljaju se preko noći na 37 °C u inkubatoru.

S krutih hranjivih podloga sa antibiotikom odabrano je 5 različitih bakterijskih kolonija koje su narasle na pločama preko noći. Bakterijske kolonije zatim su prenesene sterilnim nastavkom u 2 mL tekućeg LB medija koji sadrži kloramfenikol te su inkubirane preko noći na 37 °C u rotacijskoj tresilici pri 250 rpm-a.

Za dugotrajno pohranjivanje željenih transformiranih bakterijskih stanica pripremljene su glicerolne kulture iz 1 mL bakterijske kulture. Stanice su istaložene centrifugiranjem 10 minuta pri 2000 rpm-a nakon čega su resuspendirane u 1 mL tekućeg LB medija koji sadrži 30% glicerola te su spremljene na -80 °C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA

Najčešća metoda izolacije DNA iz stanica je metoda alkalne lize koja se temelji na selektivnom taloženju genomske DNA i staničnih proteina djelovanjem natrijeve lužine i deterdženta SDS-a. Natrijeva lužina denaturira nukleinske kiseline dok SDS razara staničnu membranu i denaturira proteine. Dodatkom kalijevog acetata smjesa se neutralizira pri čemu se genomska DNA i proteini istalože dok se plazmidna DNA renaturira i ostaje u otopini.

Za izolaciju plazmidne DNA iz prekonoćnih bakterijskih kultura korišten je komercijalno dostupan komplet za izolaciju *QIAprep SpinMiniprep (Qiagen)*⁴⁹ koji se temelji na metodi alkalne lize stanica te neutralizaciji otopine nakon čega dolazi do apsorbacije renaturirane plazmidne DNA na membrani od silike. 2 mL bakterijske kulture istaloženo je centrifugiranjem 5 minuta pri 5000 g te je talog resuspendiran u 250 μL pufera P1 u koji je prethodno dodana RNaza A do konačne koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i boja LyseBlue. Dobivenoj otopini doda se 250 μL pufera P2 te se otopina pažljivo promiješa prevrtanjem tubice 4-6 puta. Otopina se zatim neutralizira dodatkom 350 μL pufera N3 te se tubica promiješa prevrtanjem. Dobivena smjesa centrifugira se 10 minuta na 17900g te se 800 μL supernatanta prenese na kolonicu s membranom od silike. Kolonica sa supernatantom se centrifugira 60 sekundi pri 8000 g, filtrat se odlije a na kolonicu sa vezanom plazmidnom DNA se doda 750 μL pufera PE koji sadrži etanol. Ponovno se provede centrifugiranje pri 8000 g u trajanju od 60 sekundi te se filtrat odlije. Elucija plazmidne DNA vezane na silika membranu kolonice provede se dodatkom 50 μL ultra-čiste vode na kolonicu te centrifugiranjem 60 sekundi na 8000 g. Dobivenim otopinama koje sadrže izoliranu plazmidnu DNA odredi se koncentracija te se provede elektroforeza na agaroznom gelu.

3.2.7. Određivanje koncentracije DNA i RNA u otopinama

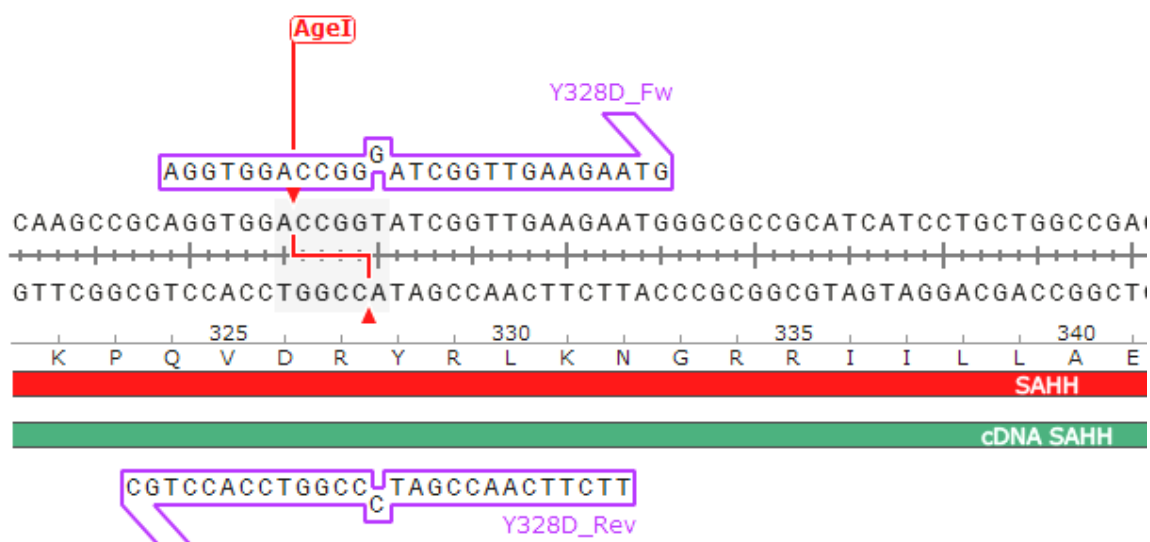
Koncentracije otopina koje sadrže molekule DNA i RNA određivane su koristeći fluorimetar *Qubit® 3.0 (Thermo Scientific)*. Ovaj instrument temelji se na korištenju fluorescentnih reagensa koji se specifično vežu na molekule RNA ili DNA uslijed čega emitiraju zračenje. Klasični UV-spektrofotometri mjere apsorbanciju pri 260 nm koja može potjecati od raznih molekula koje se nalaze u nekoj otopini kao što su RNA, DNA, proteini, slobodni nukleotidi i soli. Za razliku UV-spektrofotometra, fluorimetar mjeri emitirano zračenje koje nastaje tek nakon vezanja fluorescentnih boja na molekule RNA i DNA uklanjajući time utjecaj raznih onečišćenja na konačni rezultat analize.

Za određivanje koncentracija otopina RNA i DNA prethodno je potrebno kalibrirati instrument standardnim otopinama koje se pripremaju miješanjem reagensa iz komercijalnim kompletima *Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)* i *Qubit® RNA BR Assay Kit (Thermo Scientific)*. Radna otopina priprema se razrjeđenjem 5 μL fluorescentnog reagensa u 995 μL pufera. 190 μL radne otopine otpipetira se u tubice volumena 0,5 mL te se doda 10 μL standarda 1 dok se u drugu tubicu na isti način pripremi otopina standarda 2. Tubice sa standardnim otopinama ukupnog volumena od 200 μL postave se u instrument te se izvrši kalibracija instrumenta prema uputama proizvođača⁵⁰. Za pripremu uzoraka nepoznate koncentracije, pomiješa se 198 μL prethodno pripremljene radne otopine sa 2 μL otopine nepoznate koncentracije DNA ili RNA. Tubice se postave u instrument te se odredi masena koncentracija otopina.

3.2.8. Restriksijska analiza plazmidne DNA *AgeI* restriksijskom endonukleazom

Mutacija gena za protein SAHH koji kodira za varijantu proteina Y328D nalazi se na poziciji 1051 molekule cDNA za protein SAHH. Unutar nukleotidnog slijeda cDNA koja kodira za protein SAHH divljeg tipa nalaze se mnoga restriksijska mjesta za različite restriksijske endonukleaze. Jedno od takvih mjesta je i mjesto prepoznavanja restriksijske endonukleaze *AgeI* (slika 15).

Uvođenje željene mutacije odnosno zamjena timina u gvanin rezultira gubitkom restriksijskog mjesta za enzim *AgeI* unutar nukleotidnog slijeda molekule cDNA. Zbog toga, provjera uspješnosti uvođenja željene točkaste mutacije moguća je restriksijskom analizom na izoliranom plazmidu koristeći enzim *AgeI*. Ukoliko plazmid sadrži mutiranu verziju molekule cDNA, ne dolazi do cijepanja sa enzimom *AgeI* te plazmid ostaje superzavijen i brže putuje kroz gel prilikom elektroforeze. Ukoliko nije došlo do uvođenja točkaste mutacije, *AgeI* enzim cijepa molekulu cDNA te se cijeli plazmid linearizira i putuje sporije kroz gel.



Slika 15. Dio nukleotidnog slijeda molekule cDNA SAHH divljeg tipa koji sadrži mjesto prepoznavanja i cijepanja restriksijskim enzimom *AgeI*. Korištene početnice za uvođenje točkaste mutacije: nizvodna početnica Y328D_Fw i uzvodna početnica Y328D_Rev. Slika je konstruirana koristeći programski alat *SnapGene 3.0.3*.

Restriksijska analiza provedena je na plazmidima izoliranih iz 5 različitih bakterijskih kolonija koje su narasle na pločama sa hranjivom podlogom i antibiotikom kloramfenikolom. Reakcija je provedena u ukupnom volumenu od 10 μ L u trajanju od 60 minuta pri 37 $^{\circ}$ C. Restriksijska endonukleaza *AgeI* zatim je toplinski inaktivirana inkubacijom pri 65 $^{\circ}$ C u trajanju od 20 minuta prema uputama proizvođača. Nakon razgradnje enzimom *AgeI* provedena je elektroforeza na agaroznom gelu.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za razgradnju restriktivnim enzimom *AgeI*.

Volumen / μL	
Izolirani plazmid	1
<i>AgeI</i>	1
10x NEBuffer 1.1	1
mqH ₂ O	7
Ukupni volumen	10

3.2.9. Određivanje nukleotidnog slijeda DNA- sekvenciranje

Za konačnu potvrdu uspješno provedene mutageneze, izoliranim plazmidima određen je točan nukleotidni slijed metodom sekvenciranja koje je provedeno u servisu za sekvenciranje *Macrogen* u Nizozemskoj. Pripremljeni su alikvoti plazmida volumena 40 μL , izoliranih iz pet različitih bakterijskih klonova približne koncentracije 100 ng μL^{-1} kao i alikvot od 20 μL početnice *ahhg9*. Koncentracija otopine početnice iznosila je 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Početnica *ahhg9* komplementarna je nukleotidnom slijedu cDNA proteina SAHH koji se nalazi blizu željene točkaste mutacije stoga je prikladna za potrebe sekvencioniranja (slika 13).

Nukleotidni slijed *ahhg9* početnice: 5' TCTTGGGCAGGAAATGAACC 3'

Nukleotidni sljedovi dobiveni sekvencioniranjem poravnavati su sa nukleotidnim slijedom cDNA molekule za protein SAHH divljeg tipa koristeći programski alat *SnapGene 3.0* (slika 29).

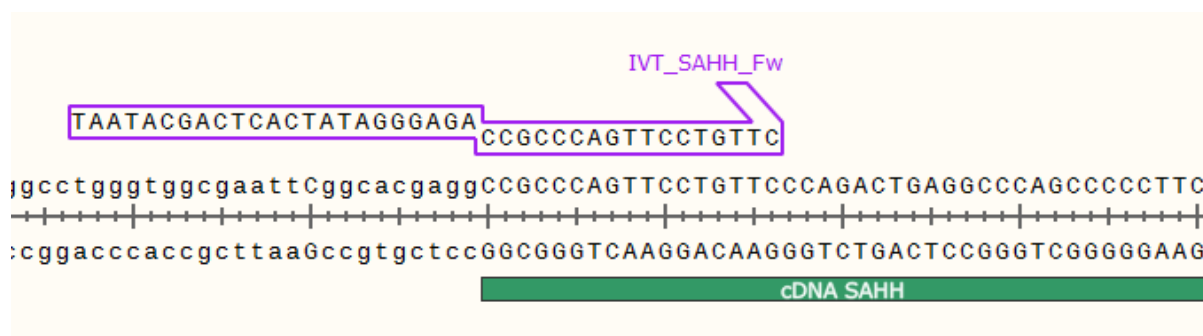
3.2.10. Sinteza kalupa za *in vitro* transkripciju PCR-om

Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) je metoda umnažanja željenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*. Za potrebe *in vitro* transkripcije odnosno sinteze RNA molekule, prethodno je potrebno pripremiti prikladan DNA kalup koji uz željeni gen sadrži i promotorsku regiju za neke od specifičnih RNA-polimeraza kao što su T7- i SP6-polimeraza.

Pripremljene su dvije različite PCR reakcije. Prva PCR reakcijska smjesa je kao kalup sadržavala plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT dok je druga reakcija sadržavala plazmid sa uvedenom točkastom mutacijom, pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D. Korištene su dvije početnice, nizvodna početnica IVT_SAHH_Fw i uzvodna početnica IVT_SAHH_Rev (Slika 13). Prethodno su pripremljeni alikvoti plazmida koncentracije 10 ng μL^{-1} . Za uvođenje T7 promotora u PCR produkt, konstruirana je početnica IVT_SAHH_Fw koja uzvodno od slijeda koji je komplementaran sa cDNA slijedom sadrži i T7 promotorski slijed (slika 16).

Nukleotidni sljedovi korištenih početnica:

- IVT_SAHH_Fw: 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGCCCAGTTCCTGTTC 3'
- IVT_SAHH_Rev: 5' ACCCGACATAGATGCCTCGAG 3'



Slika 16. Poravnata sekvenca nizvodne početnice IVT_SAHH_Fw koja sadrži T7 promotorski slijed sa nukleotidnim slijedom plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_WT. Slika je konstruirana koristeći programski alat *SnapGene 3.0.3*.

Tablica 5. Sastav PCR reakcijske smjese korištene za sintezu DNA kalupa za *in vitro* transkripciju.

	Koncentracija u reakcijskoj smjesi	Volumen ishodne otopine/ μL	
mqH ₂ O	-	13,4	13,4
5XLR pufer (bez MgCl ₂)	1x	5	5
dNTPs	500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	1,25	1,25
MgCl ₂	2,5 mmol dm^{-3}	2,5	2,5
DNA-polimeraza	3,5 U	0,35	0,35
Početnica IVT_SAHH_Fw	0,3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	0,75	0,75
Početnica IVT_SAHH_Rev	0,3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$	0,75	0,75
pOTB7_cDNA_SAHH_WT	≈ 10 ng	1	-
pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D	≈ 10 ng	-	1
Ukupni volumen		25	25

Tablica 6. Temperaturni program korišten za PCR reakciju.

	temperatura / $^{\circ}\text{C}$	trajanje ciklusa	broj ciklusa
početna denaturacija	94	4 min	1
denaturacija	94	10 s	30
sparivanje početnica	53	15 s	30
produljenje	68	2 min	30
završno produljenje	68	7 min	1

Nakon provedene PCR reakcije, dobiveni produkti tretirani su restriksijskom endonukleazom *DpnI* za razgradnju metiliranog plazmida pOTB7 koji sadrži dodatni T7 promotorski slijed. Reakcijska smjesa inkubirana je 60 minuta na 37 °C nakon čega je provedena temperaturna inaktivacija *DpnI* enzima u trajanju od 20 minuta na temperaturi od 80 °C. Uzorcima su zatim određene koncentracije DNA koristeći instrument *Qubit® 3.0* (*Thermo Scientific*).

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese za razgradnju restriksijskom endonukleazom *DpnI*.

Volumen / μL	
PCR reakcijska smjesa	25
<i>DpnI</i>	1
10x CutSmart pufer	3
mqH ₂ O	1
Ukupni volumen	30

3.2.11. Sinteza molekula RNA- *in vitro* transkripcija

Sinteza molekula RNA jedan je od ključnih i neizostavnih koraka raznih tehnika koje se danas koriste u znanosti. Transkripcija *in vitro* najčešće se koristi za sintezu obilježenih RNA molekula, koje služe kao sonde za potrebe hibridizacije, ili za sintezu većih količina neobilježene RNA koje se zatim koriste za ekspresijska istraživanja kao npr. *in vitro* translacija ili za strukturne analize kao što su analiza protein-RNA interakcija. Tipična reakcijska smjesa za *in vitro* transkripciju uključuje kalup DNA koji sadrži specifične promotorske slijedove za neke od RNA-polimeraza faga koje su visoko procesivne i specifične za vlastite promotore. Uz RNA-polimerazu koja omogućuje veliki prinos RNA molekula, reakcijska smjesa za *in vitro* transkripciju sadrži i slobodne nukleozid-trifosfate (ATP, CTP, GTP, UTP) koji po potrebi mogu biti radioaktivno ili neradioaktivno obilježeni.

U ovom radu, koristeći komercijalno dostupni komplet za *in vitro* transkripciju *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit* (*Thermo Scientific*)⁵¹, sintetizirane su veće količine neobilježenih molekula RNA. Pripremljene su tri reakcijske smjese za *in vitro* transkripciju ukupnog volumena 20 μL od kojih je prva kao DNA kalup sadržavala PCR produkt dobiven umnažanjem odsječka plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_WT dok je druga reakcijska smjesa kao kalup sadržavala odsječak plazmida sa uvedenom mutacijom pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D. Za treću reakcijsku smjesu korišten je DNA kalup pozitivne kontrole veličine 2,2 kb. Prilikom pripreme reakcijskih smjesa i rada sa molekulama RNA općenito, bitno je ukloniti bilo kakvu mogućnost kontaminacije RNazama iz okoline uporabom sterilnih plastičnih nastavaka za pipete, čestim mijenjanjem laboratorijskih rukavica i slično.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za *in vitro* transkripciju.

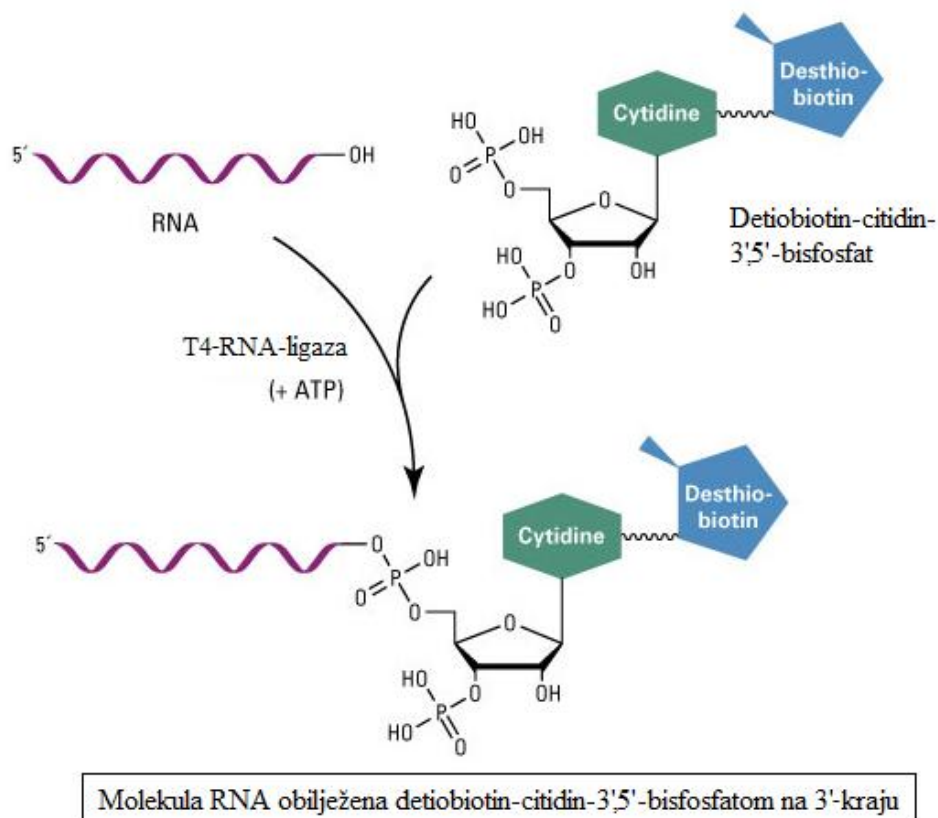
	Volumen ishodne otopine/ μL
5X TranscriptAid pufer	4
Smjesa NTP-ova	8
DNA kalup ($\approx 1 \mu\text{g}$)	6
TranscriptAid smjesa enzima	2
Ukupni volumen	20

Pripremljene reakcijske smjese inkubirane su 2 sata na 37°C prema preporuci proizvođača. Nakon provedene reakcije *in vitro* transkripcije, uzorcima su određene koncentracije molekula RNA. Za analizu sintetiziranih molekula RNA elektroforezom na agaroznom gelu, alikvot od $5 \mu\text{L}$ reakcijske smjese razrijeđen je u $195 \mu\text{L}$ vode. $3 \mu\text{L}$ razrijeđene otopine pomiješano je sa $3 \mu\text{L}$ boje *2x RNA Loading Dye (Thermo Scientific)* te su uzorci inkubirani 10 minuta na 70°C nakon čega su stavljeni na led. Nakon denaturacije RNA, uzorci se sa leda nanese na gel te se provede elektroforeza pri 120 V u trajanju od 20 minuta. Kao RNA marker se koristi *RiboRuler RNA Ladder (Thermo Scientific)*.

3.2.12. Obilježavanje molekula RNA

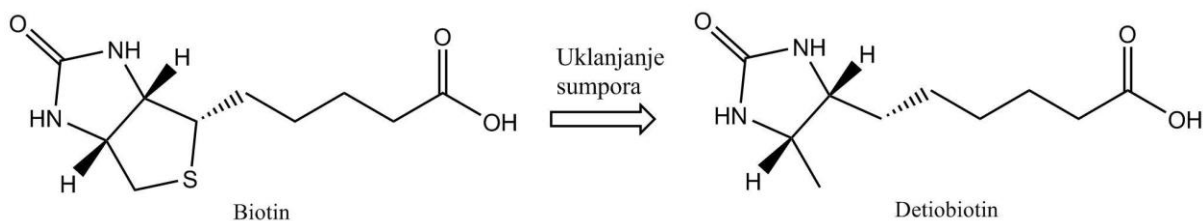
Obilježavanje nukleinskih kiselina radioaktivnim ili neradioaktivnim metodama jedna je od ključnih metoda koja omogućuje njihovo lakše pročišćavanje i identifikaciju. Molekule DNA ili RNA nakon obilježavanja se mogu koristiti i kao sonde za identifikaciju i/ili izolaciju molekula sa kojima interagiraju. Neke od najčešće korištenih biljega su radioaktivno obilježeni fosfati, biotin, razni fluorofori ili pak cijeli enzimi⁵².

U ovom radu, *in vitro* sintetizirane molekule RNA obilježene su neradioaktivnim biljekom koristeći T4-RNA-ligazu te modificirani nukleotid-3',5'-bisfosfat, detiobiotin-citidin-3',5'-bisfosfat. T4-RNA-ligaza je enzim T4-bakteriofaga koji katalizira reakciju stvaranja kovalentne veze između terminalnog 5'-fosfata biljega i terminalne 3'-hidroksilne skupine molekule RNA (slika 17).



Slika 17. Shematski prikaz reakcije koju katalizira T4-RNA-ligaza⁵³.

Korišteni modificirani nukleotid-bisfosfat, detiobiotin-citidin-3',5'-bisfosfat, kao oznaku sadrži detiobiotin, modificirani oblik biotina (slika 18). Zbog svog visokog afiniteta i specifičnosti vezanja prema streptavidinu, biotin se koristi kao osnova mnogih tehnika istraživanja koja uključuju obilježavanje, detekciju i pročišćavanje bioloških makromolekula. Jedna od glavnih prepreka kod uporabe biotin-streptavidin interakcije u svrhu pročišćavanja i detekcije proteina je ireverzibilnost same interakcije pri fiziološkim uvjetima. Naime, nakon stupanja u interakciju i formiranja kompleksa biotin-streptavidin potrebni su vrlo oštri uvjeti za njihovu disocijaciju kao što su zagrijavanje na visoke temperature, podešavanje pH na visoke ili niske vrijednosti te uporaba denaturirajućih reagensa. Ovi postupci najčešće dovode do denaturacije samih proteina od interesa stoga, da bi se izbjeglo njihovo korištenje, za obilježavanje nukleotid-bisfosfata koristi se modificirani oblik biotina, detiobiotin. Detiobiotin se za razliku od biotina slabije veže na streptavidin te se eluiranje molekula obilježenih detiobiotinom provodi pri blagim uvjetima zadržavajući visoku specifičnost same interakcije sa streptavidinom bez denaturacije interagirajućih proteina i narušavanja proteinskih kompleksa⁵⁴.



Slika 18. Strukture biotina i detiobiotina. Slika je konstruirana korištenjem programskog alata *ChemDraw Pro 11.0*.

Obilježavanje je provedeno koristeći komercijalno dostupan komplet za obilježavanje molekula RNA *PierceTM RNA 3' End Desthiobiotinylation Kit (Thermo Scientific)*⁵⁵. Sveukupno je pripremljeno tri različite reakcije obilježavanja. Volumen reakcijskih smjesa s molekulama RNA koje kodiraju za protein SAHH divljeg tipa odnosno mutirane verzije SAHH_Y328D iznosio je 90 μL a za reakciju s kontrolnom RNA 30 μL . Prije dodatka potrebnih reagensa za obilježavanje, provedena je temperaturna denaturacija sekundarnih struktura molekula RNA inkubacijom u trajanju od 4 minute na temperaturi od 85 $^{\circ}\text{C}$. Reakcijska smjesa inkubirana je pri 16 $^{\circ}\text{C}$ preko noći te se po završetku inkubacije smjesa razrijedila dodatkom 210 μL ultra-čiste vode odnosno 70 μL za reakciju s kontrolnom RNA.

Nukleotidna sekvenca kontrolne RNA koja veže protein HuR:

- 5' CCUGGUUUUUAAGGAGUGUCGCCAGAGUGCCGCGAAUGAAAAA 3'

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese obilježavanja molekula RNA.

	Konačna koncentracija u otopini	Kontrolna RNA	RNA proteina SAHH
		Volumen ishodne otopine/ μL	
m qH_2O		3	12
10X pufer za RNA ligazu	1x	3	9
Inhibitor RNaze	40 U/120 U	1	3
RNA proteina SAHH	150 pmol	-	12
Kontrolna RNA	50 pmol	5	-
detiobiotinilirani citidin-3',5'-bisfosfat	1 nmol/3 nmol	1	3
T4-RNA ligaza	40 U/120 U	2	6
PEG 30%	15 %	15	45
Ukupni volumen		30	90

3.2.13. Pročišćavanje obilježenih molekula RNA

Nakon provedene reakcije obilježavanja detiobiotin-citidin-3',5'-bisfosfatom, molekule RNA pročišćene su ekstrakcijom RNA-ligaze kloroformom te precipitacijom molekula RNA etanolom.

Konačnom volumenu razrijeđene reakcijske smjese od 300 μL doda se jednak volumen smjese kloroforma i izoamil alkohola (24:1). Dobivena smjesa se kratko promiješa te se centrifugira 3 minute na 14000 g kako bi se razdvojile faze. Nakon centrifugiranja, gornji vodeni sloj otpipetira se u čistu tubicu te mu se doda 10 μL otopine natrijevog klorida koncentracije 5 mol dm^{-3} , 1 μL otopine glikogena koncentracije 20 mg mL^{-1} i 300 μL prethodno ohlađenog 96% etanola. Otopina se potom ostavi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sat vremena nakon čega se ponovi centrifugiranje u trajanju od 15 minuta na 4 ° pri 14000 g. Supernatant se odlije, a preostali bijeli talog se ispere dodatkom 300 μL 70% otopine etanola koja je također prethodno ohlađena. Nakon ispiranja taloga, otopina etanola se odlije a preostali talog se suši na zraku 10 minuta nakon čega se resuspendira u 50 μL ultra-čiste vode.

3.2.14. Uzgoj staničnih kultura HepG2 stanica divljeg tipa

HepG2 je ljudska stanična stanica raka izoliranih iz tkiva jetre petnaestogodišnjaka koji je bolovao od primarnog raka jetre, hepatocelularnog raka⁵⁶. Spadaju u epitelne stanice koje se dijele neograničen broj puta te se u laboratoriju, uz prikladne hranidbene uvjete, mogu uzgojiti u velikim količinama. HepG2 stanice su adherentne što znači da rastu kao monoslojevi u obliku malih agregata.

Stanice se uzgajaju u plastičnim bocama površine 25-162 cm^2 uz dodatak hranidbenog medija DMEM-a. Sam uzgoj stanica odvija se u inkubatoru na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, u atmosferi zasićenoj vodenom parom uz prisutstvo 5 % ugljikovog (IV) oksida, CO_2 . Nakon što stanice popune površinu plastične boce, presađuju se u bocu veće površine sve dok se ne uzgoji željena količina stanica.

Pri samom početku rada sa stanicama, alikvot HepG2 stanica odmrznut je iz spremnika sa tekućim dušikom i prenesen u plastičnu bocu površine 25 cm^2 sljedećim postupkom: 1 mL zaleđenog alikvota stanica prenese se u plastičnu tubicu koja sadrži 5 mL DMEM medija te se suspenzija centrifugira 5 minuta pri 300 g kako bi se stanice istaložile na dnu tubice. Medij se odlije, a talog stanica se resuspendira u 5 mL sterilnog DMEM medija koji je prethodno termostatiran na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobivena suspenzija stanica prebaci se u plastičnu bocu površine 25 cm^2 te se ostavi u inkubatoru preko noći. Kada stanice prekriju plastičnu bocu, nakon otprilike 24 h, potrebno ih je presađiti u plastičnu bocu veće površine. Prilikom presađivanja stanica, za početak se stari hranjivi medij odlije te se stanice isperu sa 5 mL pufera PBS. Zatim se u plastičnu bocu doda 0,5 mL otopine tripsina te se pričekava 10 minuta kako bi se stanice odlijepile od podloge nakon čega se suspenziji stanica doda 5 mL DMEM hranjivog medija u svrhu inaktivacije tripsina. Stanice se nakon toga ponovno centrifugiraju 5

minuta pri 300 g, medij se odlije a dobiveni talog stanica se resuspendira u 10 mL svježeg hranjivog medija i prebaci u novu plastičnu bocu površine 75 cm² te se ostavi u inkubatoru. Nakon otprilike 48 h potrebno je ponovno presaditi stanice u plastičnu bocu površine 162 cm². Postupak ispiranja stanica puferom PBS se ponovi ali ovog puta većim volumenom od 10 mL. 1 mL tripsina doda se u bocu srednje veličine te se postupak centrifugiranja stanica ponovi. Za uzgoj stanica u plastičnim bocama najveće površine, stalog stanica resuspendira se u 20 mL svježeg medija te se ostavi u inkubatoru. Nakon dodatnih 48 h stanice prekriju površinu najveće plastične boce te su spremne za daljnju uporabu. Za potrebe dugotrajnijeg čuvanja stanica potrebno je pripremiti alikvote stanica u 5% DMSO-u koji se čuvaju u spremniku sa tekućim dušikom.

3.2.15. Priprema staničnog lizata

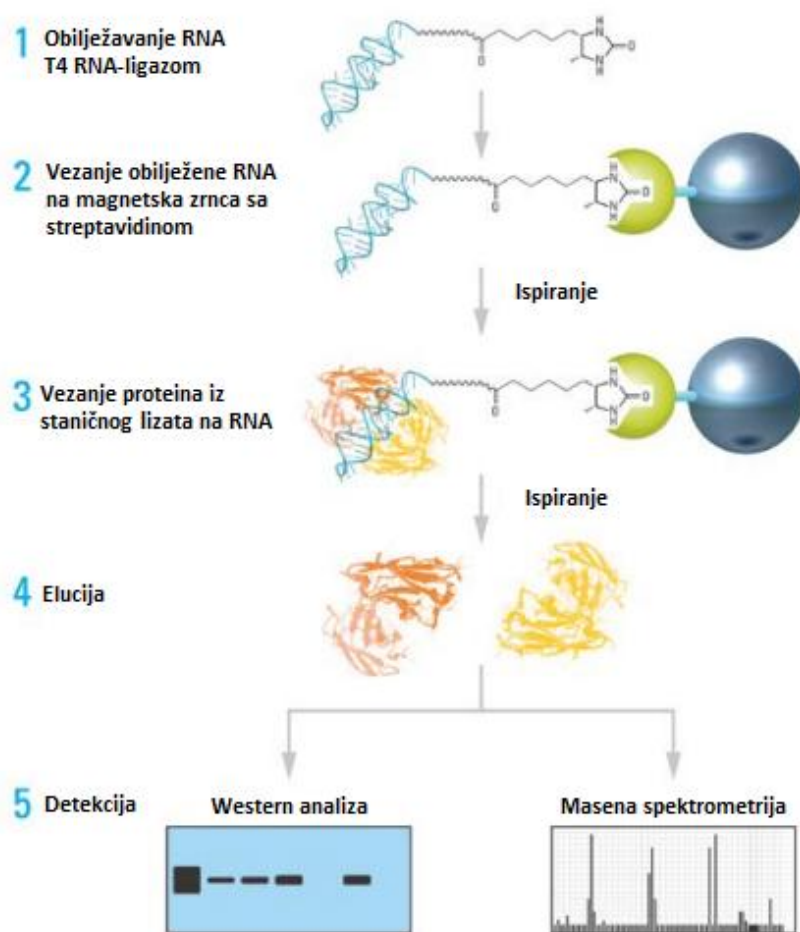
Nakon uzgoja željene količine stanične kulture HepG2 stanica, pripremljen je stanični lizat korištenjem *Pierce® IP Lysis Buffer (Thermo Scientific)* pufera za lizu stanica koji ne sadrži SDS. Ovaj pufer lizira stanice pod blagim uvjetima koji omogućuju otapanje staničnih proteina bez razaranja prisutnih proteinskih kompleksa zbog čega je i odabran za ovaj rad.

Iz plastičnih boca u kojima se nalazi uzgojena stanična kultura odlije se medij te se stanice isperu sa 15 mL pufera PBS. Zatim se doda 0,5 mL pufera za lizu stanica koji je prethodno ohlađen te u koji je dodan inhibitor proteaza. Nakon dodatka pufera za lizu, plastična boca postavi se na led te se inkubira 5 minuta uz povremeno miješanje. Lizat se zatim prenese u tubicu te se centrifugira 10 minuta na 4 °C pri 13000 g. Nakon centrifugiranja supernatant koji sadrži stanični lizat se prenese u čistu tubicu i spremi na -20 °C.

3.2.16. Izdvajanje proteina koji vežu RNA pomoću magnetskih zrnca

Interakcije staničnih proteina s molekulama RNA imaju bitnu ulogu u cjelokupnom staničnom ciklusu nekog organizma. Njihovo proučavanje od velike je važnosti za razumijevanje mnogih ključnih staničnih procesa kao što su ekspresija gena, prepoznavanje, procesiranje i sazrijevanje molekula mRNA, te u konačnici njihova degradacija. Do danas su razvijene mnoge metode istraživanja proteina koji vežu molekule RNA te njihovih interakcija u *in vivo* i *in vitro* sustavima.

U ovom radu korištena je *in vitro* metoda izdvajanja proteina iz cjelokupnog staničnog lizata koji vežu molekulu RNA korištenjem magnetskih zrnca sa konjugiranim streptavidinom (eng. *RNA pull-down assay*). Ova metoda temelji se na obilježavanju molekule RNA oznakom koja ima visoki afinitet i specifičnost vezanja prema supstratu. Konkretno, molekule RNA obilježene su detiobiotinom dok je njegov ligand, streptavidin vezan na magnetska zrnca koja omogućuju brzo i jednostavno pročišćavanje i izdvajanje proteina i proteinskih kompleksa nakon njihovog vezanja na molekulu RNA. Nakon izdvajanja proteina, daljnju njihovu analizu i detekciju moguće je provesti western-blot analizom ili masenom spektrometrijom (slika 19).



Slika 19. Shema glavnih koraka izdvajanja proteina koji vežu molekulu RNA korištenjem magnetskih zrnca⁵⁷.

U ovom radu korišten je komercijalni komplet za izdvajanje proteina koji vežu RNA, *Perice™ Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit (Thermo Scientific)*⁵⁷. Sveukupno je obrađeno 8 uzoraka, po tri uzorka za dvije različite verzije mRNA (divlji tip i mutirana verzija mRNA), jedan uzorak pozitivne kontrole s kontrolnom RNA koja veže HuR protein te jedan uzorak koji ne sadrži RNA već samo magnetska zrnca kao negativna kontrola.

50 μL suspenzije magnetskih zrnca prebaci se u čistu tubicu koja se postavi na magnetski stalak te se preostali supernatant odlije. Magnetska zrnca potom se isperu sa 50 μL 20 mmol dm^{-3} Tris otopine (pH 7,5) resuspendiranjem, postavljanjem na magnetski stalak te izlijevanjem preostalog supernatanta. Postupak ispiranja ponovi se još jednom. Nakon ispiranja, magnetska zrnca se pipetiranjem resuspendiraju u 50 μL pufera za vezanje RNA nakon čega se u suspenziju doda 50 pmol obilježene RNA te se tubica promiješa blagim pipetiranjem i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi u tresilici. Nakon provedene inkubacije, tubica se postavi na magnetski stalak te se supernatant odlije a zaostala magnetska zrnca ponovno se isperu s 70 μL 20 mmol dm^{-3} Tris (pH 7,5) otopine. Nakon drugog ispiranja, magnetska zrnca se resuspendiraju u 1x puferu za vezanje RNA i proteina koji je prethodno pripremljen razrjeđenjem 100 μL 10x pufera za vezanje RNA i proteina u 900 μL ultra-čiste vode. Prije daljnjeg provođenja eksperimenta pripremi se otopina za reakciju vezanja RNA i proteina prema tablici 10. Nakon kondicioniranja u puferu za vezanje RNA i proteina, tubica se postavi na magnetski stalak, supernatant se odlije a zaostala magnetska zrnca sa vezanim molekulama RNA resuspendiraju se u 100 μL otopine za reakciju vezanja RNA i proteina. Suspenzija se zatim inkubira 60 minuta na 4 °C uz miješanje nakon čega se ponovno postavi na magnetski stalak te se supernatant odlije. Magnetska zrnca isperu se sa 100 μL pufera za ispiranje sveukupno tri puta nakon čega se zrnca resuspendiraju u 50 μL pufera za eluciju biotina i inkubiraju 30 minuta na 37 °C uz miješanje. Nakon inkubacije, tubice se ponovno postavljaju na magnetski stalak, a supernatant koji sadrži izdvojene proteine, prenese se u čistu tubicu i spremi na -20 °C za daljnju uporabu.

Tablica 10. Sastav glavne otopine za reakciju vezanja RNA i proteina.

	Volumen ishodne otopine/ μL
10x pufer za vezanje RNA i proteina	100
50% glicerol	300
Stanični lizat	300
m qH_2O	300
Ukupni volumen	1000

3.2.17. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a

Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost deterdženta natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) široko je korištena metoda analize proteina, njihove ekspresije, pročišćavanja i interakcija. SDS-PAGE spada u denaturirajuće elektroforeze jer se djelovanjem određenih reagensa narušava nativna struktura analiziranih proteina. Prije nanošenja na poliakrilamidni gel, uzorcima proteina dodaje se pufer za nanošenje na gel koji sadrži natrijev dodecilsulfat (SDS) i reducirajući reagens β -merkaptotanol. Zbog djelovanja SDS-a dolazi do disocijacije podjedinica proteina te narušavanja tercijarne strukture proteina dok β -merkaptotanol reducira disulfidne mostove između polipeptidnih lanaca, narušavajući time sekundarnu strukturu. SDS stvara komplekse s polipeptidnim lancima koji zauzimaju konformaciju nasumičnog klupka zbog čega se svi proteini ponašaju kao da su jednakog oblika dok putuju kroz gel. SDS također maskira i naboj bočnih aminokiselinskih ogranaka vežući se na proteine u stalnom omjeru po jedinici mase pa denaturirani proteini u kompleksu sa SDS-om imaju jednak omjer mase i naboja. U skladu s tim, proteini se na gelu odjeljuju isključivo na temelju njihove mase odnosno prema efektu tkz. „molekulskog sita“ pri čemu se kroz gel brže kreću manje molekule.

Elektroforeza je provedena 10 min pri 150 V, a zatim 40 min pri 200 V u puferu za SDS-PAGE. Prije nanošenja na gel, uzorcima je dodan pufer za denaturaciju te su uzorci zagrijani 5 min u termobloku na 95 °C nakon čega su nanoseni na gel. Kao marker molekularne mase korišten je *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*.

3.2.18. Priprema gelova za SDS-PAGE elektroforezu

Poliakrilamidni gelovi koji se koriste u SDS-PAGE elektroforezi su polimeri akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida te se prilikom njihove pripreme kao katalizatori polimerizacije koriste amonijev persulfat (APS) i N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED). Ovisno o količini krutih stvari i stupnju umreženja polimera moguće je kontrolirati veličinu pora konačnog gela. Sama priprema gelova sastoji se od izlivanja smjese za gel između dva stakalca pričvršćenih na postolje uz korištenje razmaknica koje određuju debljinu gela. U ovom radu korišteni su 10%-tni gelovi za razdvajanje te 5%-tni gelovi za sabijanje, debljine 1,0 mm.

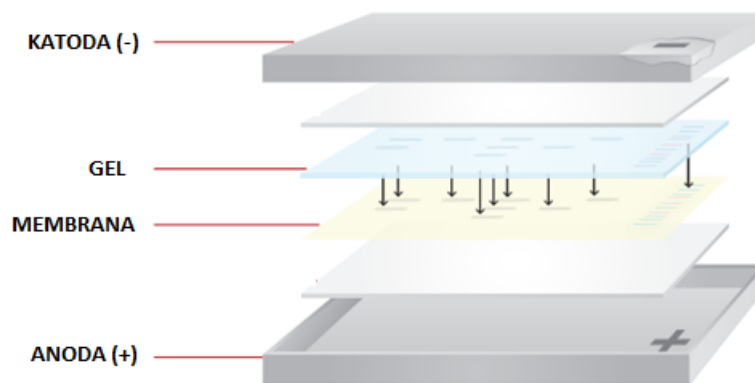
3.2.19. Western analiza

Western analiza je tehnika koja se koristi za identifikaciju i određivanje prisutnosti manjih količina proteina. Temelji se na prepoznavanju i stvaranju kompleksa između antigena koji je imobiliziran na membrani i njegovog protutijela⁵². Nakon provedene elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, proteini se sa gela prenose i imobiliziraju na membranu koja je najčešće načinjena od nitroceluloznih vlakana ili sintetskih polimera kao što je najlon. Postoji više različitih tehnika prijenosa na membranu kao što su kapilarni prijenos gdje se molekule

prenose tokom pufera sa mokrog na suhi papir ili elektroforetski prijenos uz korištenje izvora istosmjerne električne struje koja prenosi proteine sa gela na membranu. Nakon prijenosa, u svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela, membrana se zasićuje proteinima kao što su albumin goveđeg seruma (BSA) ili obranim mlijekom u prahu. Blokirane membrane potom se inkubiraju u otopini koja sadrži specifično primarno antitijelo za određeni protein. Detekcija proteina i određivanje njegovog položaja na membrani izvodi se primjenom sekundarnih antitijela koja obično sadrže kovalentno vezanu molekulu enzima čija se aktivnost može detektirati kolorimetrijom ili kemiluminescencijom.

3.2.19.1. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Prijenos proteina sa gela na nitroceluloznu membranu proveden je koristeći instrument *TranBlot*® *Turbo*™ *BlottingSystem* (Bio-Rad). Prije samog prijenosa na membranu, gel se namoči u malom volumenu pufera za prijenos na membranu. Između poklopaca sa anodom i katodom postavi se nitrocelulozna membrana i gel (slika 20). Sastavljena konstrukcija unese se u instrument te se podesi željeni program prijenosa. Korišten je program pri stalnoj jakosti struje od 1,3 A, napona 25 V u trajanju od 7 minuta. Nakon prijenosa, membrana se privremeno oboji bojom *Ponceau S* za vizualizaciju proteinskih vrpca. Odbojavanje membrane izvrši se njezinim ispiranjem 5 puta u malim količinama destilirane vode.



Slika 20. Prikaz konstrukcije za prijenos na membranu⁵⁸.

3.2.19.2. Blokiranje membrane i vezanje antitijela na membranu

Za popunjavanje praznog prostora te sprječavanje nespecifičnog vezanja protutijela na membranu, napravljeno je blokiranje nitrocelulozne membrane na koju su preneseni proteini sa gela. Prije samog blokiranja membrana se ispere u malom volumenu PBS-T pufera te se pripremi 5%-tna otopina nemasnog mlijeka u prahu otapanjem 5 g mlijeka u 100 mL pufera PBS-T na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Isprana membrana postavi se u malu

plastičnu posudu te joj se doda mali volumen 5% otopine mlijeka u prahu. Membrana se inkubira pri sobnoj temperaturi 60 minuta uz miješanje.

Kada je blokiranje membrane završeno, pripremi se otopina primarnog monoklonskog anti-HuR antitijela razrjeđenjem 10 μ L izvorne otopine antitijela u 10 mL 5%-tne otopine mlijeka u prahu. Membrana se potom inkubira otopinom primarnog antitijela preko noći pri 4 °C.

Nakon inkubacije primarnim antitijelom, membrana se ispere 5 puta po 5 minuta sa puferom PBS-T te se inkubira otopinom sekundarnog antitijela. Anti-miš imunoglobulin G sa konjugiranom peroksidazom koristi se kao sekundarno tijelo a otopina se pripremi dodatkom 5 μ L izvorne otopine antitijela u 5 mL 5% otopine mlijeka u prahu. Inkubacija membrane sekundarnim antitijelom izvodi se pri sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta nakon čega se membrana ponovno ispere PBS-T puferom 5 puta po 5 minuta.

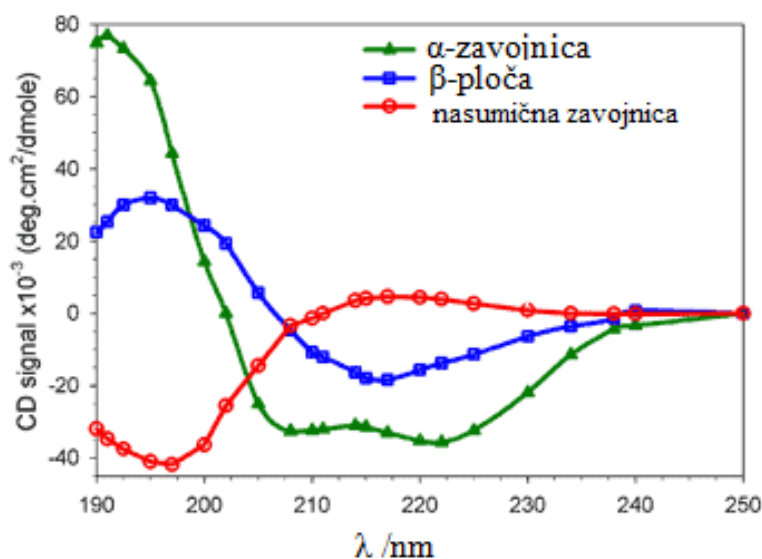
3.2.19.3. Detekcija kemiluminescencijom

Detekcija proteinske vrpce HuR proteina na nitroceluloznoj membrani izvodi se koristeći komercijalno dostupan komplet za detekciju *Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)*. Pripremi se 1 mL smjese otopina miješanjem 0,5 mL otopine luminola (reagens A) te 0,5 mL otopine peroksida (reagens B) koje su sastavni dio kompleta. Membrana se zatim prelije pripremljenom otopinom i inkubira 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije odlije se višak otopine sa membrane te se membrana skenira uređajem *C-Digit® Blot Scanner* sa ekspozicijom u trajanju od 12 minuta.

3.3. Instrumentne metode

3.3.1. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (eng. *circular dichroism*, *CD*) je spektroskopska metoda koja se temelji na različitoj interakciji određenih molekula sa lijevo- i desno- polariziranom svjetlošću. Kiralne molekule kao što su DNA, RNA i proteini različito apsorbiraju lijevo- i desno- kružno polarizirano zračenje, a razlika se naziva cirkularni dikroizam⁵⁹. Cirkularnim dikroizmom moguće je razlikovati elemente sekundarne strukture proteina npr. α -zavojnice i β -ploče (slika 21), promjene u terciarnoj strukturi proteina kao i konformacijske promjene na primjer, uslijed vezanja proteina sa ligandom. Ovom metodom također je moguća analiza različitih konformacija nukleinskih kiselina kao što su A-, B- i Z- konformacije molekule DNA, te analiza termičke stabilnosti RNA i DNA⁶⁰.



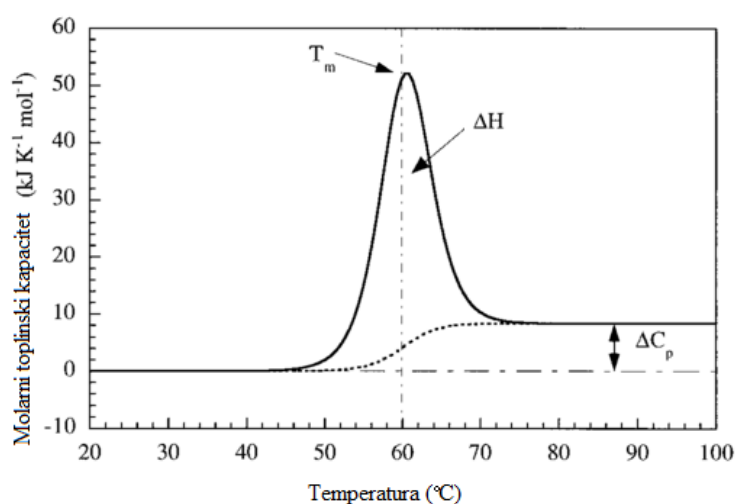
Slika 21. CD spekter različitih elemenata sekundarnih struktura proteina⁶¹.

Purinske i pirimidinske baze, odgovorne za kiralnost molekula DNA i RNA, apsorbiraju zračenje u rasponu od 180 nm do 300 nm stoga se CD analiza njihovih sekundarnih struktura provodi u tom dijelu UV zračenja. Metodom cirkularnog dikroizma moguće je odrediti termostabilnost makromolekula snimanjem CD spektara uz temperaturni gradijent. CD signal može biti negativan ili pozitivan ovisno o omjeru apsorpcije lijevo- polariziranog zračenja u odnosu na apsorpciju desno- polariziranog zračenja. Ukoliko je apsorpcija lijevo- polariziranog zračenja veća, CD signal je pozitivan, a ukoliko je apsorpcija desno- polariziranog zračenja veća tada je CD signal negativan.

CD analiza sekundarnih struktura molekula mRNA proteina SAHH divljeg tipa i verzije koja kodira za Y328D mutant, provedena je u laboratoriju za studij interakcija biomakromolekula na instrumentu Jasco J-715. Pripremljeno je sveukupno 6 uzoraka konačnog volumena od 2 mL. Za svaku mRNA (divlji tip i mutant) pripremljeno je 3 otopine različitih koncentracija: $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Uzorcima su snimljeni CD i apsorpcijski spektri korištenjem kvarcne kivete debljine 1 cm pri sobnoj temperaturi u rasponu valnih duljina od 200-300 nm. Razlučivost je podešena na 0,5 nm a brzina snimanja iznosila je 200 nm/min. Temperaturna stabilnost molekula mRNA praćena je snimanjem CD spektara otopina koncentracije $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ pri četiri različite temperature 20, 50, 70 i 90 °C. Također, mjereni uzorak je nakon zagrijavanja na 90 °C ohlađen natrag na 20 °C te mu je snimljen CD spektar.

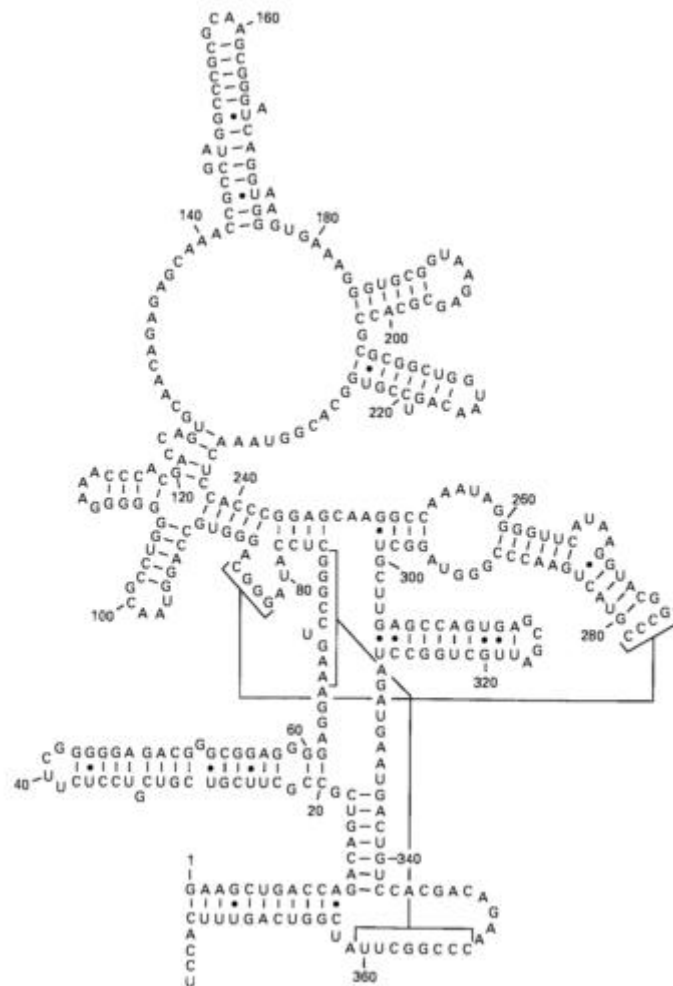
3.3.2. Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija

Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC) je tehnika koja omogućava kvantitativnu analizu prijelaza između određenih stanja molekula DNA, RNA i proteina uzrokovanih promjenom temperature kao što je na primjer vezanje liganada ili proces denaturacije⁶². Metoda se temelji na mjerenju toplinskog kapaciteta pri stalnom tlaku (C_p) uzorka u ovisnosti o promjeni temperature. Toplinski efekt promjene registrira se mjerenjem energije utrošene za održavanje mjerne i referentne ćelije na istim temperaturama. Obradom dobivenih podataka moguće je direktno izračunati ukupno apsorbiranu toplinu prilikom razmatanja molekule (ΔH) te temperaturu pri kojoj dolazi do prijelaza između dva stanja odnosno temperaturi pri kojoj je 50% molekula denaturirano tzv. temperatura mekšanja (T_m) (slika 22).



Slika 22. DSC eksperiment prijelaza globularnog proteina između dva stanja⁶³.

Za razliku od DNA, molekule mRNA sastoje se od jednog lanca nukleotida te mogu stvarati kompleksne sekundarne strukture intramolekulskim povezivanjem kratkih komplementarnih sljedova (slika 23). Zbog ovog razloga, razmatanje dužih molekula RNA ne može se smatrati ravnotežnim procesom dva stanja već molekule prelaze kroz veći broj diskretnih koraka unutar šireg temperaturnog područja⁶⁴.



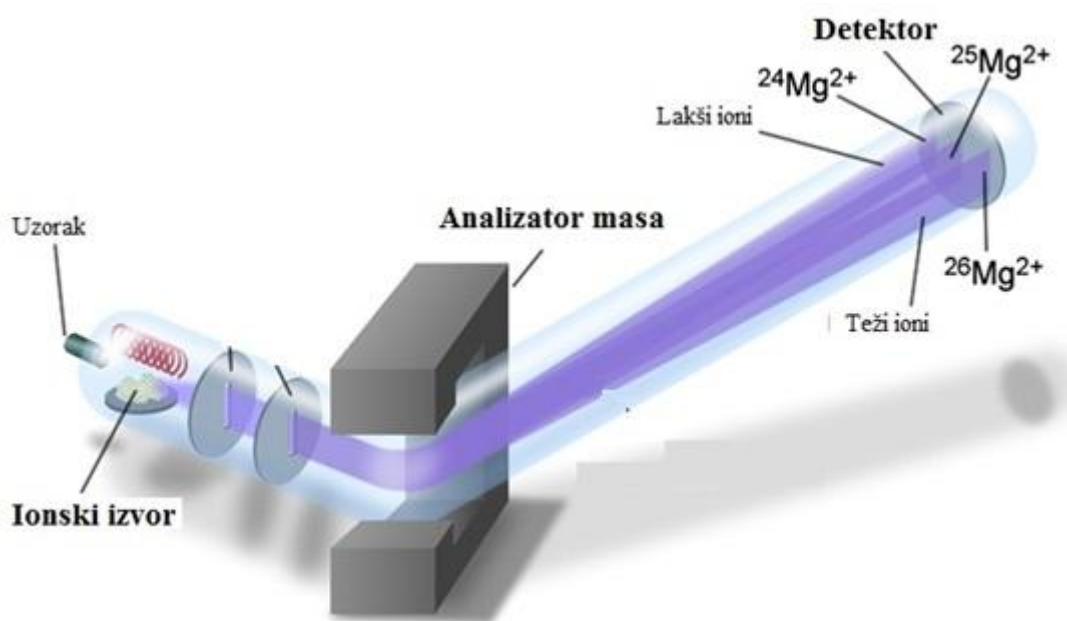
Slika 23. Prikaz sekundarne strukture P RNA bakterije E.coli⁶⁴.

DSC eksperimenti provedeni su u laboratoriju za studij interakcija biomakromolekula na instrumentu nanoDSC (*TA Instruments*). Pripremljeni su uzorci mRNA divljeg tipa i mutanta koncentracije 220 nmol dm⁻³ te referentni uzorak sa puferom. Za ispravno strukturiranje molekula RNA, izvorne otopine razrijeđene su u 900 μL ultra čiste vode te su uzorci zagrijani na 90 °C u trajanju od 2 minute čega su stavljeni na led 2 minute. Uzorcima je zatim dodano 100 μL 10x pufera za strukturiranje RNA te su ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta. DSC eksperiment izveden je u temperaturnom rasponu od 25-130 °C uz brzinu zagrijavanja od 1°C po minuti.

3.3.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika koja omogućuje analizu širokog spektra svojstava kemijskih i bioloških uzoraka. Neke od osnovnih primjena uključuju određivanje elementnog sastava uzorka, omjera izotopa u uzorku, kvantitativnog i kvalitativnog sastava smjese te određivanje strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula⁶⁵. Glavne karakteristike metode uključuju njezinu visoku osjetljivost, niske detekcijske granice te brzinu samog mjerenja. Zbog svojih osobitih karakteristika te brzog tehnološkog razvoja različitih dijelova samog instrumenta, ova metoda omogućava relativno brzu analizu velikog broja uzoraka kompleksnog sastava što je trenutno čini najpogodnijom analitičkom tehnikom u proteomici, metabolomici te ostalim biološkim granama znanosti⁶⁶.

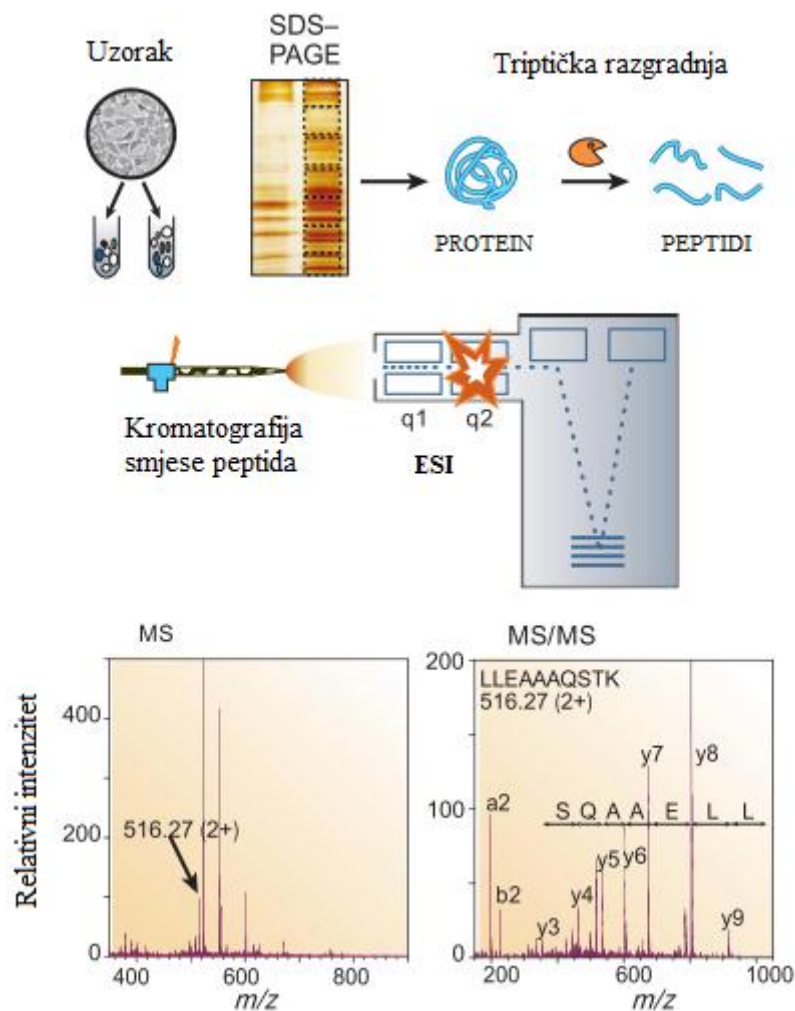
Tehnika se temelji na ionizaciji molekula analita te razdvajanju i detekciji nastalih iona na temelju omjera njihove mase i naboja (m/z). Glavni dijelovi instrumenta uključuju ionski izvor, analizator masa i detektor (slika 24). Postoji mnogo različitih tehnika generiranja iona analita u plinskoj fazi, a izbor prikladne tehnike ovisi velikim dijelom o fizikalno-kemijskim svojstvima samog analita. Neke od glavnih tehnika ionizacije uključuju ionizaciju elektronima, kemijsku ionizaciju, desorpciju laserom i plazmom, matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserom (MALDI), termoraspršenje te elektroraspršenje (ESI). Razdvajanje iona analita na temelju njihove mase omogućuju analizatori masa kao što su kvadrupolni analizator masa (Q), analizator koji mjeri vrijeme leta (TOF), ionska stupica (IT) i Fourier-transformirana spektrometrija masa (FT-ICT, FT-OT). Svi analizatori masa primjenjuju statičko ili dinamičko električno i/ili magnetsko polje za razdvajanje iona, razlike se pojavljuju u izvedbi te načinu primjene samih polja. Razdvojeni ioni analita detektiraju se i prevode u mjerljivi električni signal pomoću detektora što su elektronski multiplikatori ili fotomultiplikatori.



Slika 24. Prikaz glavnih dijelova spektrometra masa⁶⁷.

Proteomika je jedna od važnih grana znanosti koja izučava stanične procese i funkciju gena na proteinskoj razini. Kompleksnost staničnih proteoma te niske koncentracije određenih staničnih proteina u smjesama predstavljaju ograničenja kod izbora metoda njihove analize. Spektrometrija masa zbog svoje visoke protočnosti te niskih detekcijskih granica nalazi se među glavnim tehnikama za analizu proteina kao što je određivanje njihove primarne strukture i posttranslacijskih modifikacija te analiza proteinskih interakcija⁶⁸.

Za identifikaciju i kvantifikaciju proteina u uzorku spektrometrijom masa potrebno je kombinirati različite korake (slika 25). Do danas su razvijena dva pristupa koja se najčešće primjenjuju u proteomici. Prvi pristup uključuje razdvajanje proteina 2D elektroforezom, izrezivanje analizirane proteinske vrpce iz gela te njihovu triptičku razgradnju nakon čega se uzorci analiziraju MS-om. Drugi pristup uključuje automatizirani vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa MS/MS uz ionizaciju elektroraspršenjem s obzirom da ta tehnika ionizacije omogućuje direktno povezivanje sa tekućinskom kromatografijom (LC-MS).



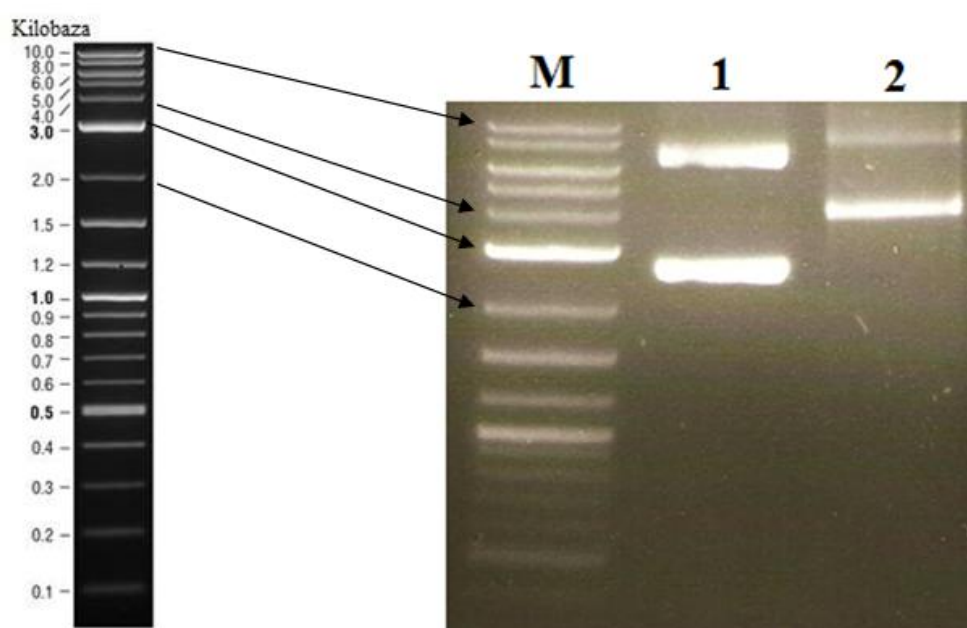
Slika 25. Prikaz glavnih koraka tipične analize smjese proteina MS tehnikom⁶⁸.

Uzorci prikupljeni nakon izdvajanja proteina koji vežu RNA pomoću magnetskih zrnca analizirani su u servisu za masenu spektrometriju u Njemačkoj u centru za proteomiku sveučilišta u Tübingenu. Prikupljenom volumenu od 50 μ L dodano je 400 μ L acetona te su uzorci proslijeđeni na analizu. Prema napomenama servisa, uzorcima nije bilo moguće odrediti koncentraciju stoga su triplikati proteina nanoseni zajedno u jažicu te je proveden SDS-PAGE u kratkom trajanju. Uzorci proteina koji vežu mRNA proteina SAHH divljeg tipa (WT), mRNA mutanta (MUT) te uzorak proteina nespecifično vezanih na sama magnetska zrnca (-) razgrađeni su tripsinom u gelu te je provedena LC-MS/MS analiza uz analizator masa FT-Orbitrap.

4. Rezultati

4.1. Mutageneza *in vitro*

Mutacija 1051. nukleotida (T → G) molekule cDNA proteina SAHH uvedena je lančanom reakcijom polimerazom koristeći plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT kao kalup uz par početnica, Y328D_Fw i Y328D_Rev (3.2.1.). Nakon provedene PCR reakcije, produkti reakcije razgrađeni su restrikcijskom endonukleazom *DpnI* te su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu (slika 26). Izmjerena je masena koncentracija produkata reakcije koja je iznosila 384 ng μL^{-1} .

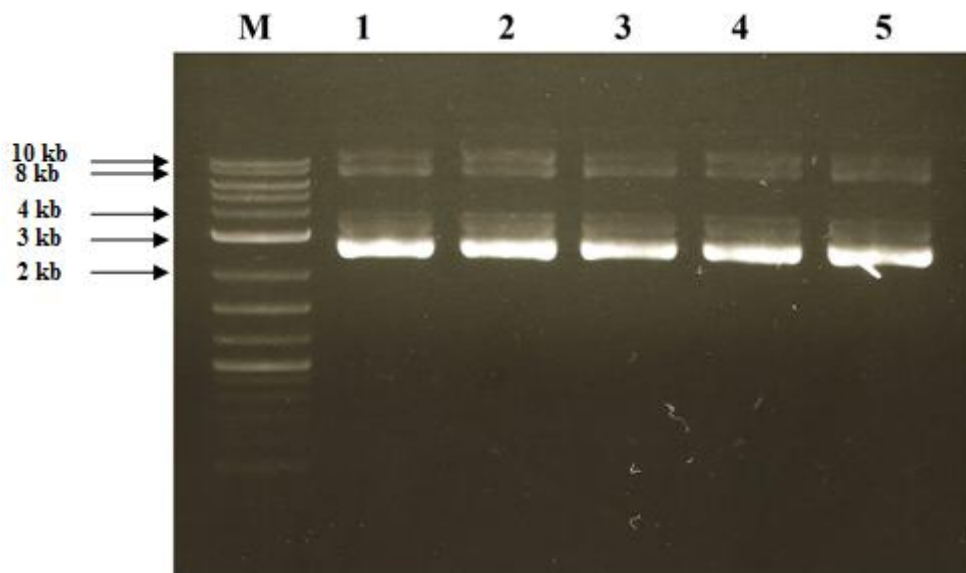


Slika 26. Elektroforeza na agaroznom gelu PCR produkata nakon provedene *in vitro* mutageneze. Na gel je nanesen marker molekulskih masa (M), plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT (1) i produkti PCR reakcije *in vitro* mutageneze (2).

U prvoj jažici na koju je nanesen uzorak samog plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_WT vidljiva je vrpca između 2 i 3 kb te vrpca pri otprilike 8 kb. Ove vrpce mogu se pripisati superzavijenom obliku plazmida (vrpca između 2 i 3 kb) i relaksiranom kružnom obliku plazmida. U drugoj jažici najveći intenzitet ima vrpca pri 4 kb koja se može pripisati linearnom obliku plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_WT koji se sastoji od 3976 pb (slika 13) te bi ta vrpca odgovarala željenom produktu nakon mutageneze. Uz vrpca pri 4 kb, vidljiva je i vrpca fragmenta DNA veće duljine otprilike 8 kb.

4.2. Izolacija plazmidne DNA

Prekonoćne bakterijske kulture 5 odabranih klonova uzgojene su radi izolacije plazmida kojim su bakterije prethodno transformirane. Također, linearni produkt *in vitro* mutageneze transformacijom u bakterije se cirkularizira. Nakon izolacije plazmidne DNA, provedena je elektroforeza na agaroznom gelu (slika 27) te je izmjerena koncentracija otopina plazmida.



Slika 27. Elektroforeza na agaroznom gelu plazmida izoliranih iz 5 bakterijskih kolonija. Marker molekulskih masa (M), plazmidi iz različitih bakterijskih kolonija (1, 2, 3, 4, 5).

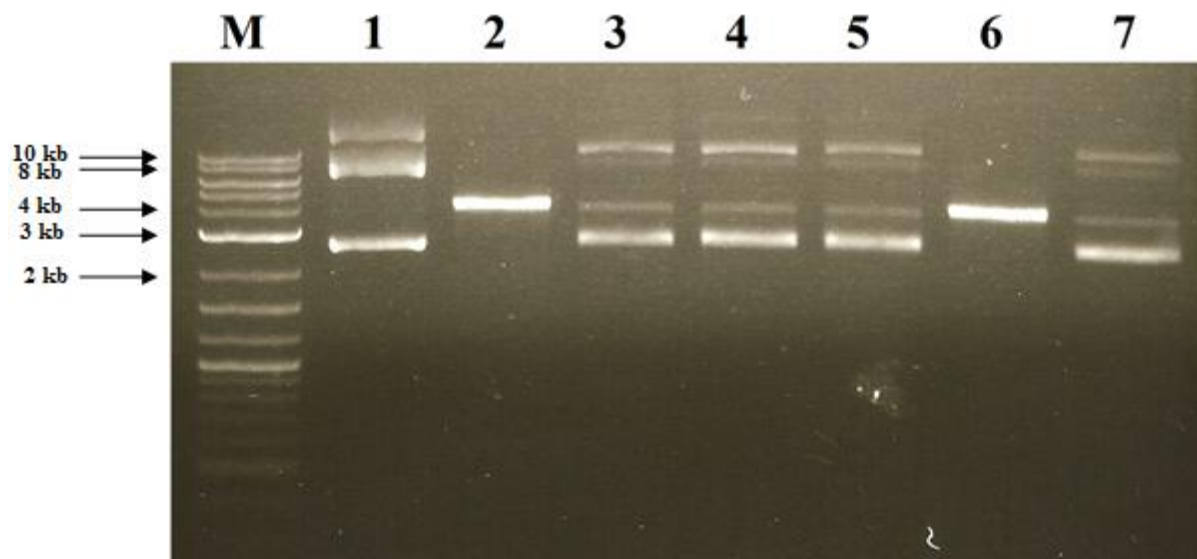
Na gelu je vidljiva dominantna vrpca između 2 i 3 kb kod svih uzorka plazmida (klon 1,2,3,4,5) koja bi odgovarala superzavijenom plazmidu pOTB7_cDNA_SAHH. Također su vidljive i vrpce pri većim veličinama fragmenata od otprilike 4 kb i 8 kb koje odgovaraju ostalim oblicima plazmida kao što je linearni oblik i relaksirani kružni plazmid.

Tablica 11. Masene koncentracije otopina plazmida izoliranih iz 5 različitih bakterijskih kolonija.

Koncentracija/ ng μL^{-1}	
Klon 1	105
Klon 2	124
Klon 3	111
Klon 4	98
Klon 5	115

4.3. Restriksijska analiza izoliranih plazmida i sekvenciranje

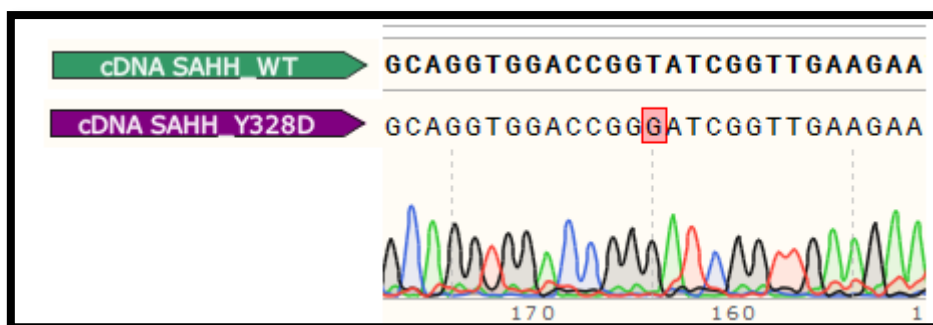
Uvođenje točkaste mutacije u plazmid pOTB7 koji sadrži molekulu cDNA proteina SAHH divljeg tipa provjereno je na dva načina: restriksijskom analizom cijepanjem s restriksijskom endonukleazom *AgeI* nakon čega su dobiveni produkti analizirani gel-elektroforezom (slika 28) i određivanjem slijeda nukleotida.



Slika 28. Elektroforeza na agaroznom gelu nakon razgradnje sa restriksijskom endonukleazom *AgeI*. Na gel je nanesen marker molekulskih masa (M), necijepani plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT (1), plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT tretiran sa *AgeI* (2), te plazmidi iz 5 različitih bakterijskih kolonija tretirani sa *AgeI* (3, 4, 5, 6, 7).

U jažicama 3, 4, 5 i 7 vidljive su vrpce plazmida izoliranih iz bakterija pri otprilike 2,7 kb, 4 kb, 8 kb i 10 kb isto kao i u jažici 1 na koju je nanesen samo plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT koji nije cijepan restriksijskom endonukleazom *AgeI*. Plazmid izoliran iz bakterijskog klon 4 (jažica 6) na gelu se pojavljuje samo kao jedna vrpca pri 4 kb isto kao i u jažici 3 u koju je nanesen plazmid bez mutacije pOTB7_cDNA_SAHH_WT koji je tretiran enzimom *AgeI*. Vrpce pri 4 kb odgovarale bi lineariziranom plazmidu pOTB7_cDNA_SAHH_WT (3976 pb).

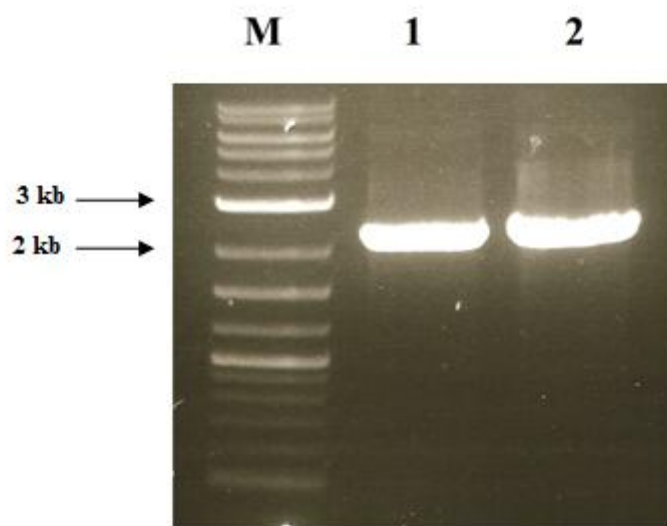
Uz restriksijsku analizu, uspješnost *in vitro* mutageneze potvrđena je određivanjem nukleotidnih sljedova plazmida iz 4 različitih bakterijskih kolonija (klon 1, 2, 3 i 5) te je utvrđeno da svi bakterijski klonovi sadrže točkastu mutaciju odnosno plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D (slika 29). Za daljnje provođenje eksperimentalnog dijela ovog rada odabran je plazmid izoliran iz bakterijskog klon 5.



Slika 29. Kromatogram dijela nukleotidnog slijeda plazmida pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D izoliranog iz bakterijskog klon 5 koji sadrži uvedenu točkastu mutaciju T → G (crveno). Sekvenca je poravnata sa nukleotidnim slijedom cDNA proteina SAHH divljeg tipa uporabom programskog alata *SnapGene* 3.0.

4.4. Sinteza kalupa za reakciju *in vitro* transkripcije

Kalup za reakciju *in vitro* transkripcije dobiven je PCR reakcijom umnažanja slijeda cDNA ukloniranog u plazmid pOTB7_cDNA_SAHH_WT odnosno pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D. Korištene su dvije početnice koje su komplementarne sa cDNA slijedom na 5'- i 3'-kraju. Nizvodna početnica IVT_SAHH_Fw dodatno sadrži i T7 promotorski slijed za potrebe *in vitro* transkripcije kako je već opisano u poglavlju 3.2.10. Produkti navedene PCR reakcije analizirani su gel elektroforezom (slika 30) te im je izmjerena koncentracija.



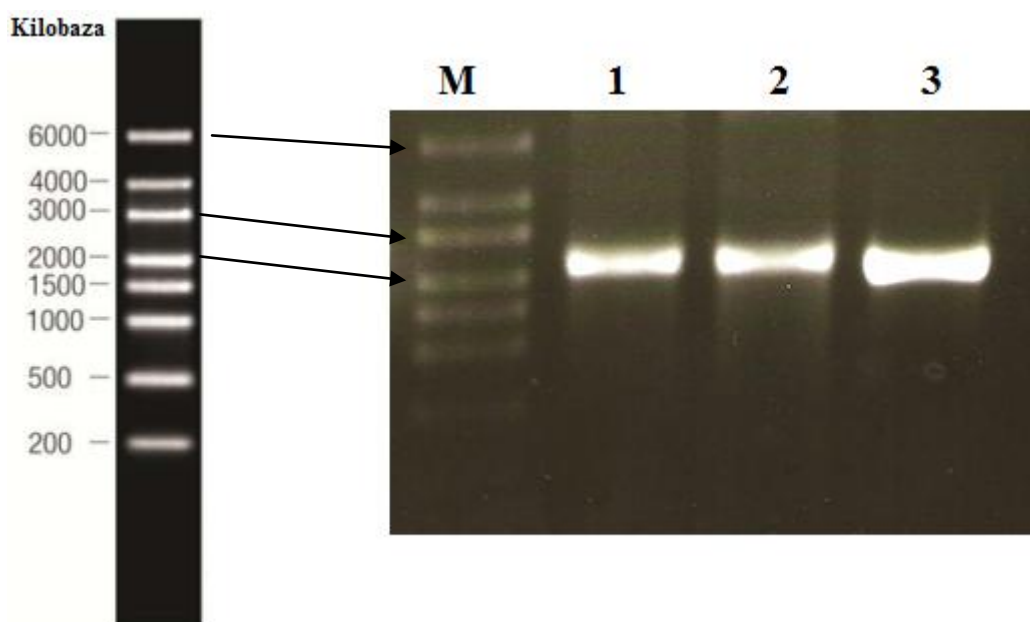
Slika 30. Produkti PCR reakcije za dobivanje kalupa za *in vitro* transkripciju. Marker molekulske mase (M), produkt dobiven uporabom plazmida bez mutacije (pOTB7_cDNA_SAHH_WT) kao kalupa (2), produkt dobiven korištenjem plazmida sa mutacijom (pOTB7_cDNA_SAHH_Y328D) kao kalupa (3).

U jažicama 1 i 2 vidljiva je jedna vrpca pri otprilike 2,2 kb koja bi odgovarala očekivanom fragmentu koji nastaje umnažanjem cDNA slijeda unutar plazmida pOTB7. Očekivani produkt PCR reakcije sastojao bi se od 2210 parova baza. Koncentracije PCR produkata iznosile su: $\gamma(\text{PCR produkt 1}) = 147 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $\gamma(\text{PCR produkt 2}) = 153 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

4.5. Transkripcija *in vitro*

Molekule mRNA proteina SAHH sintetizirane su T7-RNA-polimerazom koja specifično prepoznaje T7 promotorsku sekvencu. Kao kalup za *in vitro* transkripciju korišteni su PCR produkti kojima je na 5'-kraju dodana T7 promotorska sekvenca uporabom početnice IVT_SAHH_Fw (slika 16).

Nakon provedene *in vitro* transkripcije, produkti reakcije analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu (slika 31) uz prethodnu pripremu uzoraka kako je opisano u poglavlju 3.2.11. te su im izmjerene koncentracije RNA molekula.

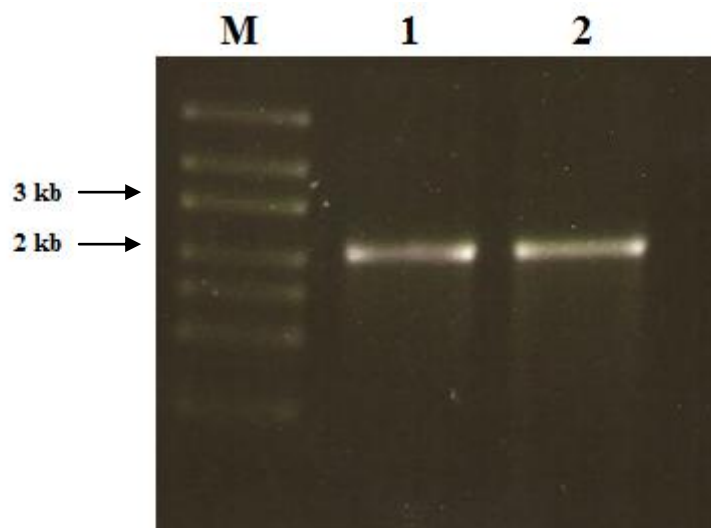


Slika 31. Produkti *in vitro* transkripcije. Marker molekulskih masa (M), mRNA proteina SAHH divljeg tipa (1), mRNA proteina SAHH_Y328D, pozitivna kontrola (3).

Na gelu su vidljive vrpce pri približno 2,2 kb u svim jažicama (1,2 i 3). Prema napomenama proizvođača⁶⁹, veličina kalupa korištenog za sintezu RNA pozitivne kontrole iznosi 2,2 kb što odgovara veličini vrpce RNA u jažici 3. Očekivana veličina molekule mRNA proteina SAHH bi također iznosila 2,2 kb usporedbom sa veličinom prethodno sintetiziranog kalupa. Koncentracije otopina RNA iznosile su: $\gamma(\text{RNA divlji tip}) = 9,2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, $\gamma(\text{RNA sa mutacijom}) = 9,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

4.6. Obilježavanje molekula RNA detiobiotinom

Prethodno sintetizirane molekule RNA divljeg tipa i molekule RNA koje kodiraju za varijantu proteina SAHH_Y328D, obilježene su detiobiotinom (slika 18) na svom 3' kraju. Nakon reakcije obilježavanja, molekule RNA pročišćene su prethodno opisanim postupkom (3.2.13.). Provedena je elektroforeza na agaroznom gelu (slika 32) kako bi provjerili je li došlo do degradacije RNA prilikom njezinog obilježavanja i pročišćavanja.



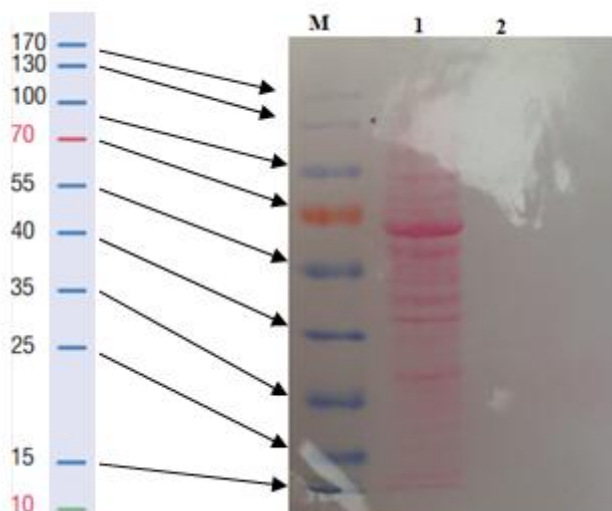
Slika 32. Elektroforeza na agaroznom gelu nakon pročišćavanja obilježenih molekula RNA. Marker molekulskih masa (M), mRNA proteina SAHH divljeg tipa (1), mRNA koja kodira za varijantu proteina SAHH_Y328D(2).

Na gelu su vidljive vrpce pri otprilike 2,2 kb što bi odgovaralo veličini molekula mRNA koje kodiraju za protein SAHH.

4.7. Western-blot analiza

Za potvrdu metode izdvajanja proteina koje vežu RNA pomoću magnetskih zrnca napravljena je western analiza za detekciju HuR proteina koji veže kontrolnu RNA opisanu u poglavlju 3.2.12.

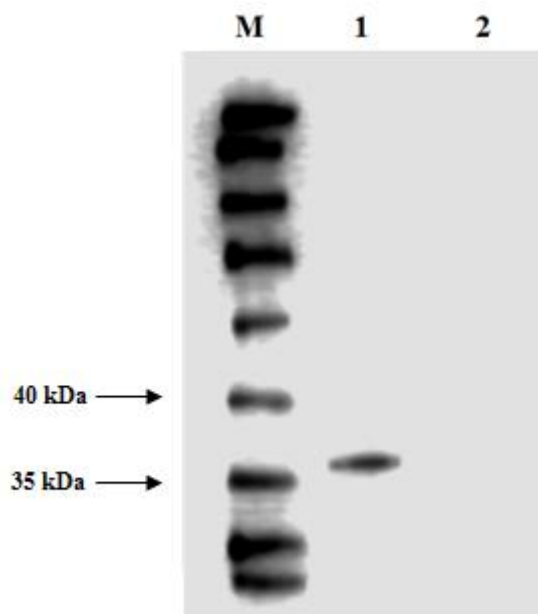
Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz dodatak SDS-a provedena je za dva uzorka: ukupnom staničnom lizatu (1) i uzorku koji sadrži protein koji veže kontrolnu RNA (2). Proteini su s gela preneseni na nitroceluloznu membranu te je membrana obojana *Ponceau S* bojom za proteine (slika 33).



Slika 33. Nitrocelulozna membrana na koju su preneseni proteini s gela obojana bojom Ponceau S. Marker proteinskih masa (M), ukupni stanični lizat (1), proteini koji vežu kontrolnu RNA (2).

Na membrani su na poziciji 1 vidljive proteinske vrpce raznih proteina prisutnih u staničnom lizatu. Na poziciji 2 nisu vidljive vrpce proteina HuR koji veže kontrolnu RNA.

Nakon prijenosa proteina s gela na membranu, napravljeno je blokiranje membrane te inkubacija s primarnim monoklonskim antitijelom, anti-HuR i sekundarnim antitijelom anti-miš IgG s kovalentno vezanom peroksidazom. Nakon dodatka luminola i peroksida kao supstrata peroksidaze sekundarnog antitijela provedena je detekcija (slika 34).



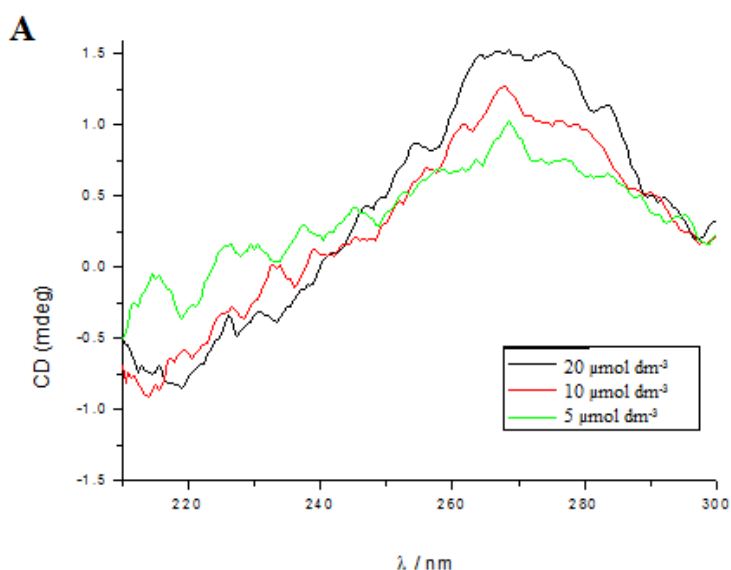
Slika 34. Nitrocelulozna membrana nakon provedene ekspozicije u trajanju od 12 minuta. Marker proteinskih masa (M), ukupni stanični lizat (1), proteini koji vežu kontrolnu RNA (protein HuR) (2).

HuR protein očekivano je detektiran u uzorku ukupnog staničnog lizata. Na poziciji 1 membrane vidljiva je vrpca pri nešto više od 35 kDa koja bi odgovarala proteinu HuR čija je masa 36 kDa. Signal HuR proteina nije vidljiv u uzorku na poziciji 2. S obzirom da je kvalitativna analiza proteina izoliranih iz uzoraka mRNA molekula proteina SAHH i SAHH_Y328D uspješno provedena spektrometrijom masa, ali ne i njihova kvantitativna analiza, moguća je pretpostavka da je nedostatak signala uzrokovan preniskim koncentracijama izoliranih proteina.

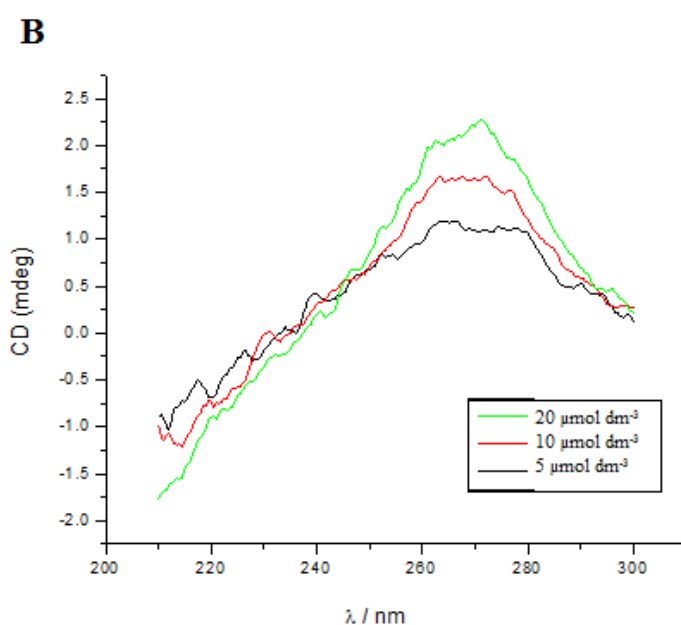
4.8. Analiza promjena sekundarne strukture i termičke stabilnosti RNA

Instrumentnim metodama kružnog dikroizma (CD) i diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom (DSC) analizirana je termička stabilnost i razlike u sekundarnoj strukturi između mRNA proteina SAHH koja kodira za verziju proteina Y328D i mRNA proteina SAHH divljeg tipa.

Analiza sekundarne strukture provedena je usporedbom CD spektara mRNA koja kodira za protein SAHH divljeg tipa (slika 35) i mRNA proteina SAHH koja kodira za verziju Y328D (slika 36). Snimljeni su spektri tri različite koncentracije mRNA u UV području u rasponu valnih duljina od 200-300 nm. Analiza termičke stabilnosti molekula RNA provedena je CD eksperimentom na četiri različite temperature.

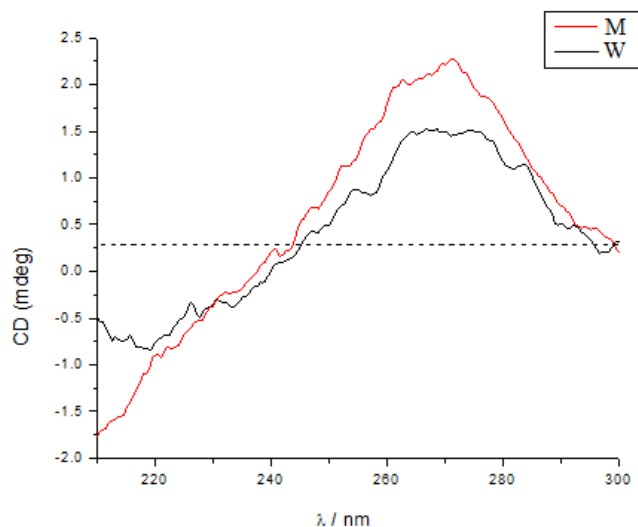


Slika 35. CD spektar otopina mRNA proteina SAHH divljeg tipa.

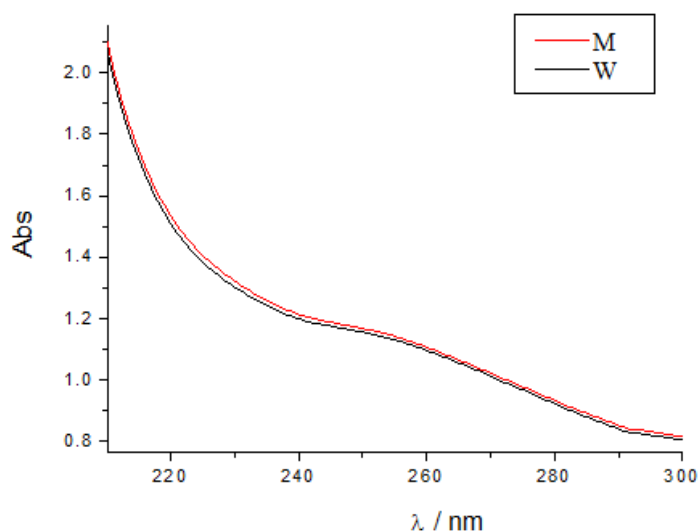


Slika 36. CD spektar otopina mRNA proteina SAHH koja kodira za verziju Y328D.

Spektri svih otopina RNA pokazuju negativno zakretanje kružno polariziranog svjetla ispod 245 nm te maksimum pozitivnog zakretanja pri 270 nm. Također, vidljivo je da je intenzitet CD signala proporcionalan koncentraciji molekula RNA u uzorcima.

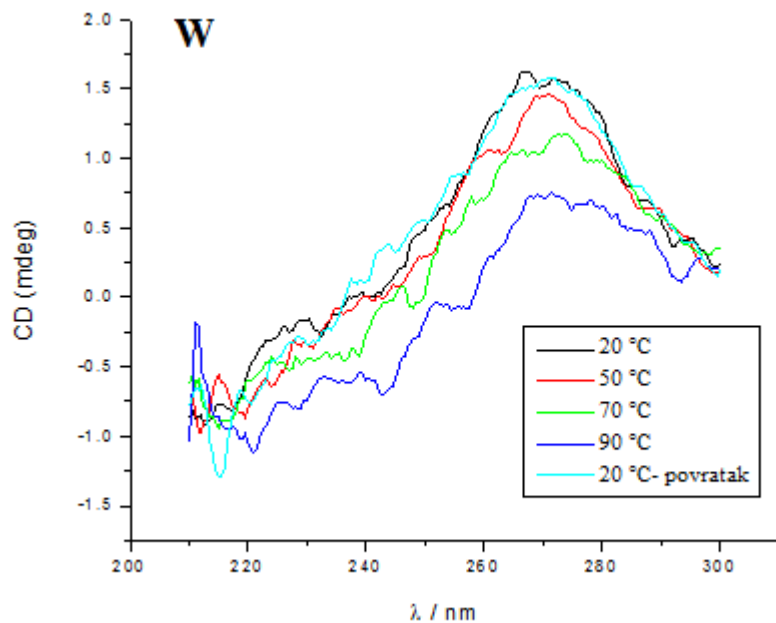


Slika 37. Usporedba CD spektra otopina istih koncentracija mRNA divljeg tipa (crno) i mRNA sa mutacijom (crveno).

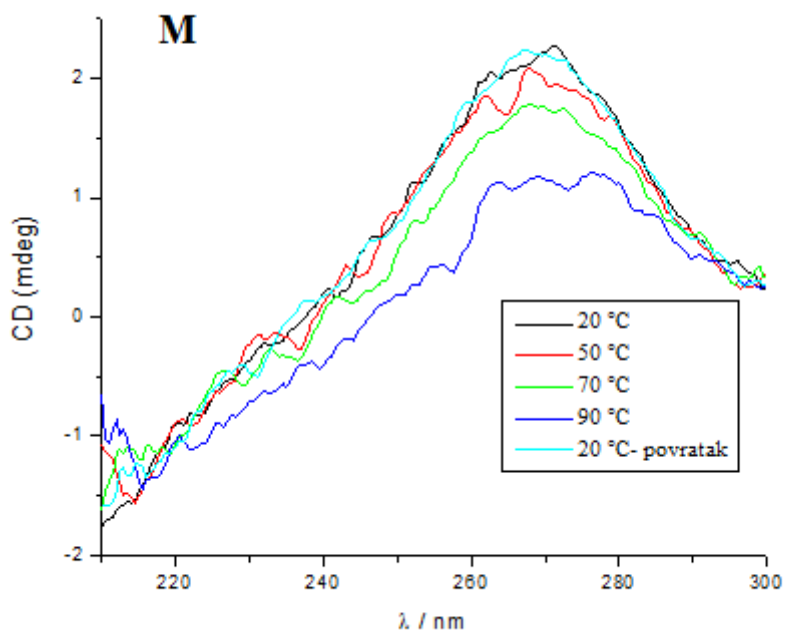


Slika 38. Usporedba apsorpcijskih spektara otopina RNA divljeg tipa (crno) i RNA sa mutacijom (crveno).

Usporedbom CD spektara najvećih koncentracija otopina mRNA divljeg tipa (W) i mutanta (M) vidljive su razlike između intenziteta CD signala iako su koncentracije otopina gotovo jednake što je vidljivo usporedbom apsorpcijskih spektara otopina u UV području (slika 38). Intenzitet CD signala RNA sa mutacijom pri 270 nm je puno veći od intenziteta CD signala za RNA divljeg tipa pri istoj valnoj duljini (slika 37). Uz to, CD signal molekule RNA divljeg tipa ispod 220 nm raste dok signal molekule RNA sa mutacijom nastavlja padati. Ove razlike intenziteta CD signala upućuju na određene razlike u sekundarnoj strukturi između mRNA divljeg tipa i mRNA koja kodira za mutiranu verziju proteina SAHH Y328D.



Slika 39. CD spektar otopina mRNA proteina SAHH divljeg tipa koncentracije $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ pri različitim temperaturama.



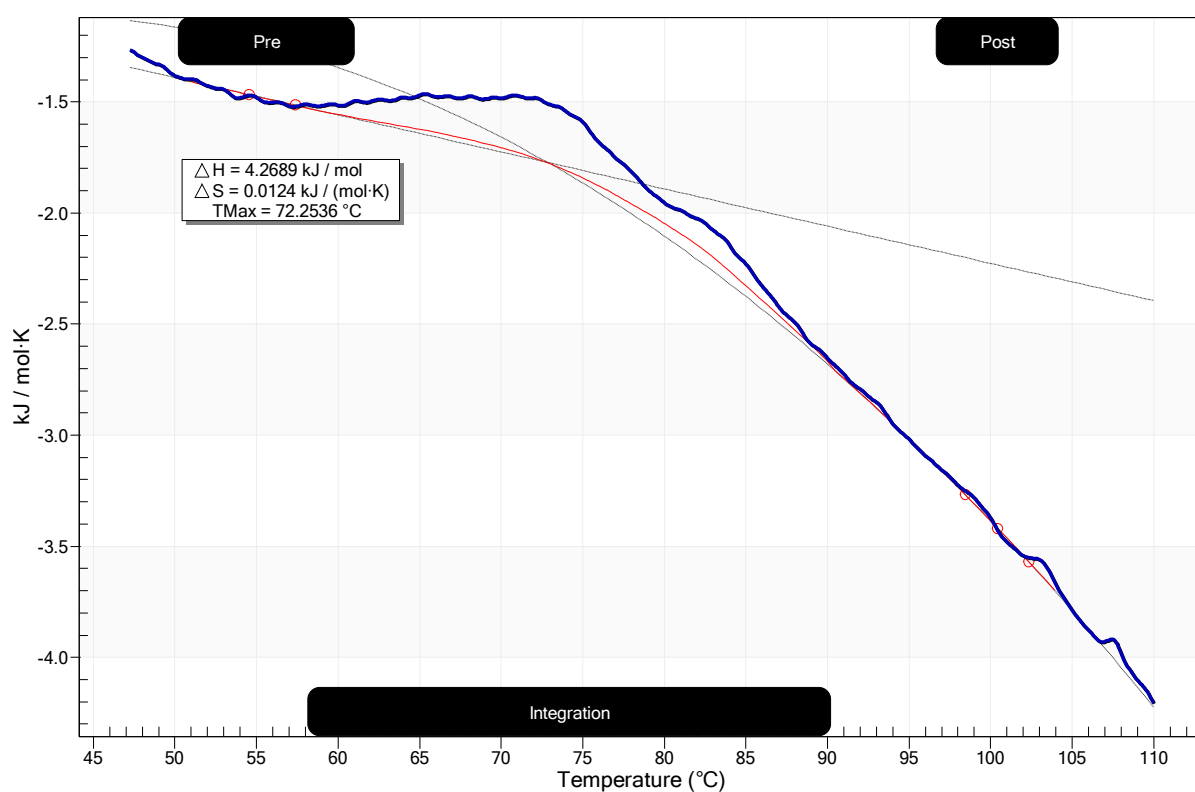
Slika 40. CD spektar otopina mRNA proteina SAHH koja kodira za verziju Y328D koncentracije $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ pri različitim temperaturama.

CD spektri uzoraka snimljeni pri različitim temperaturama pokazuju smanjenje intenziteta signala povećanjem temperature. Povratom na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ intenzitet signala raste, vraćajući se na početne vrijednosti (slika 39 i 40).

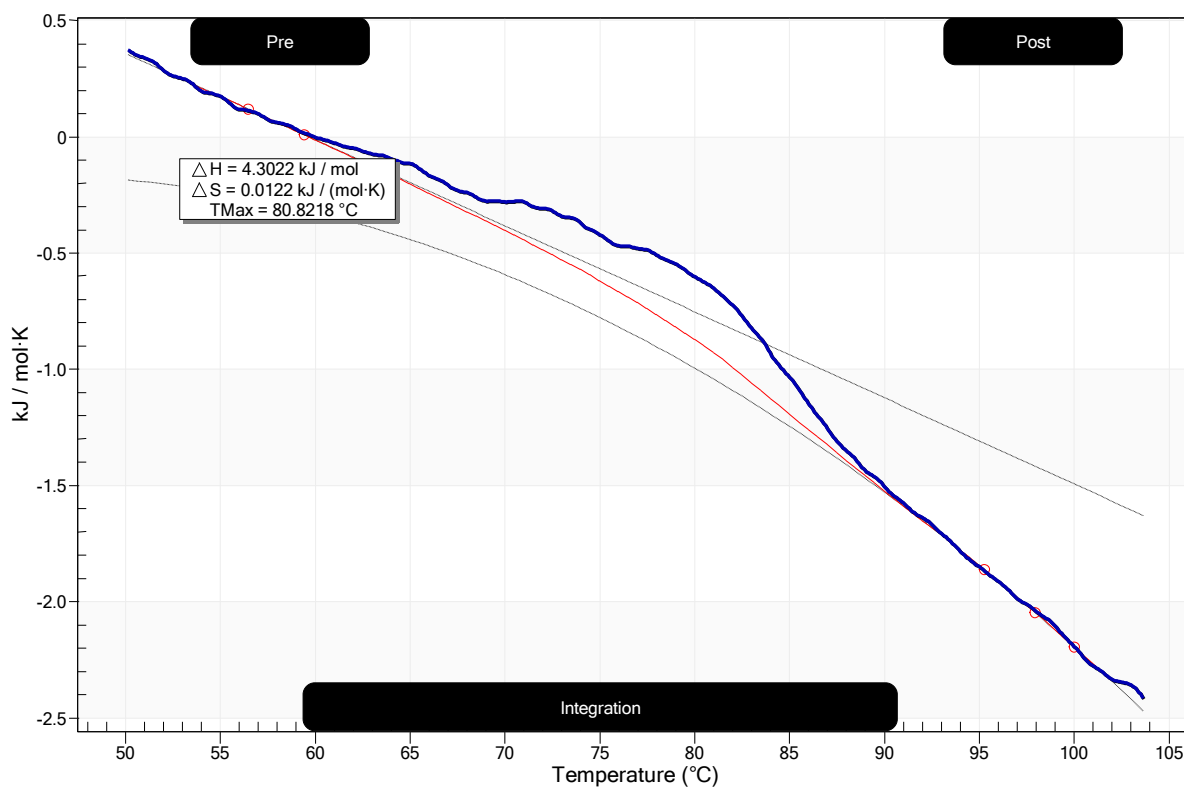
Analiza termičke stabilnosti molekula RNA također je ispitana diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom (DSC). Snimljeni su termogrami uzorka mRNA divljeg tipa (slika 41), mutirane mRNA (slika 42) i referentnog uzorka koji je sadržavao samo pufer za strukturiranje RNA. Na temelju dobivenih podataka izračunata je energija razmatanja pojedinih verzija mRNA (ΔH) i temperatura mekšanja (T_m).

Tablica 12. Izračunate vrijednosti energije razmatanja (ΔH) i temperatura mekšanja (T_m).

	ΔH (kJ mol ⁻¹)	T_m (°C)
mRNA divljeg tipa (W)	4,27	72,25
mRNA sa mutacijom (M)	4,30	80,82



Slika 41. Odsječak termograma razmatanja mRNA proteina SAHH divljeg tipa.



Slika 42. Odsječak termograma razmatanja mRNA koja kodira za verziju proteina SAHH Y328D.

Na termogramima oba uzorka nisu vidljivi oštri pikovi koji bi označavali prijelaz između dva stanja već razmatanje molekula RNA traje dugo, unutar šireg temperaturnog područja između 55-100 °C, formirajući razvučenu krivulju kao rezultat prijelaza molekule mRNA između više prijelaznih stanja.

4.9. Analiza proteina koji vežu mRNA

Identifikacija proteina koji vežu molekule mRNA proteina SAHH divljeg tipa (mRNA_WT), molekule mRNA koje kodiraju za verziju proteina SAHH Y328D (mRNA_Y328D) i proteina koji se nespecifično vežu na sama magnetska zrnca (negativna kontrola(-)) provedena je masenom spektrometrijom. Sveukupno, identificirano je 825 proteina na temelju jednog ili više specifičnih peptida prisutnih u barem jednom od uzoraka.

Dobiven set podataka obrađen je izračunom omjera intenziteta (I) za pojedini protein koji veže mutirana mRNA i mRNA divljeg tipa ($\log_2(I_{MUT}/I_{WT})$). Svi proteini koji su imali navedeni omjer <2 odbačeni su te je rezultirajući set podataka dodatno obrađen isključenjem proteina kojima je izmjeren intenzitet >0 u uzorku negativne kontrole. Kao zadnji uvjet, proteini vezani na mutiranu mRNA morali su biti identificirani na temelju >10 specifičnih peptida. Nakon provedene obrade dobiven je set podataka od 38 proteina.

Tablica 13. Rezultati statističke obrade identificiranih proteina koje vežu mRNA.

Redni broj	Ime gena koji kodira za protein	Broj specifičnih peptida identificiranih u uzorku sa mutiranom mRNA	I_{WT}	I_{MUT}	$I_{(-)}$	$\log_2(I_{MUT}/I_{WT})$
1.	DDX5	19	0	926170000	0	0
2.	KARS	20	0	545590000	0	0
3.	PABPC1	21	0	444960000	0	0
4.	PARP1	18	0	443040000	0	0
5.	LRPPRC	21	0	356690000	0	0
6.	EIF2S3	14	0	320710000	0	0
7.	EPRS	17	0	303590000	0	0
8.	DARS	13	0	253630000	0	0
9.	SND1	13	0	232970000	0	0
10.	EIF5B	16	0	230080000	0	0
11.	CAPRIN1	11	0	229560000	0	0
12.	HNRNPM	18	0	219970000	0	0
13.	DDX17	17	0	215040000	0	0
14.	SUPT16H	15	0	202370000	0	0
15.	DDX21	11	0	158160000	0	0
16.	RRBP1	17	0	151030000	0	0
17.	MYO1C	13	0	148810000	0	0
18.	ZC3HAV1	13	0	135680000	0	0
19.	PABPC4	16	0	123610000	0	0
20.	TOP2A	12	0	102230000	0	0
21.	DDX23	11	0	96695000	0	0
22.	SF3B2	11	0	94058000	0	0
23.	PRKDC	13	0	76190000	0	0
24.	HNRNPM	11	0	2891200	0	0
25.	RPS4X	11	1619400	881350000	0	9,08811186
26.	SYNCRIP	11	2547800	387450000	0	7,248614302
27.	HNRNPU	13	5660700	833720000	0	7,202438667

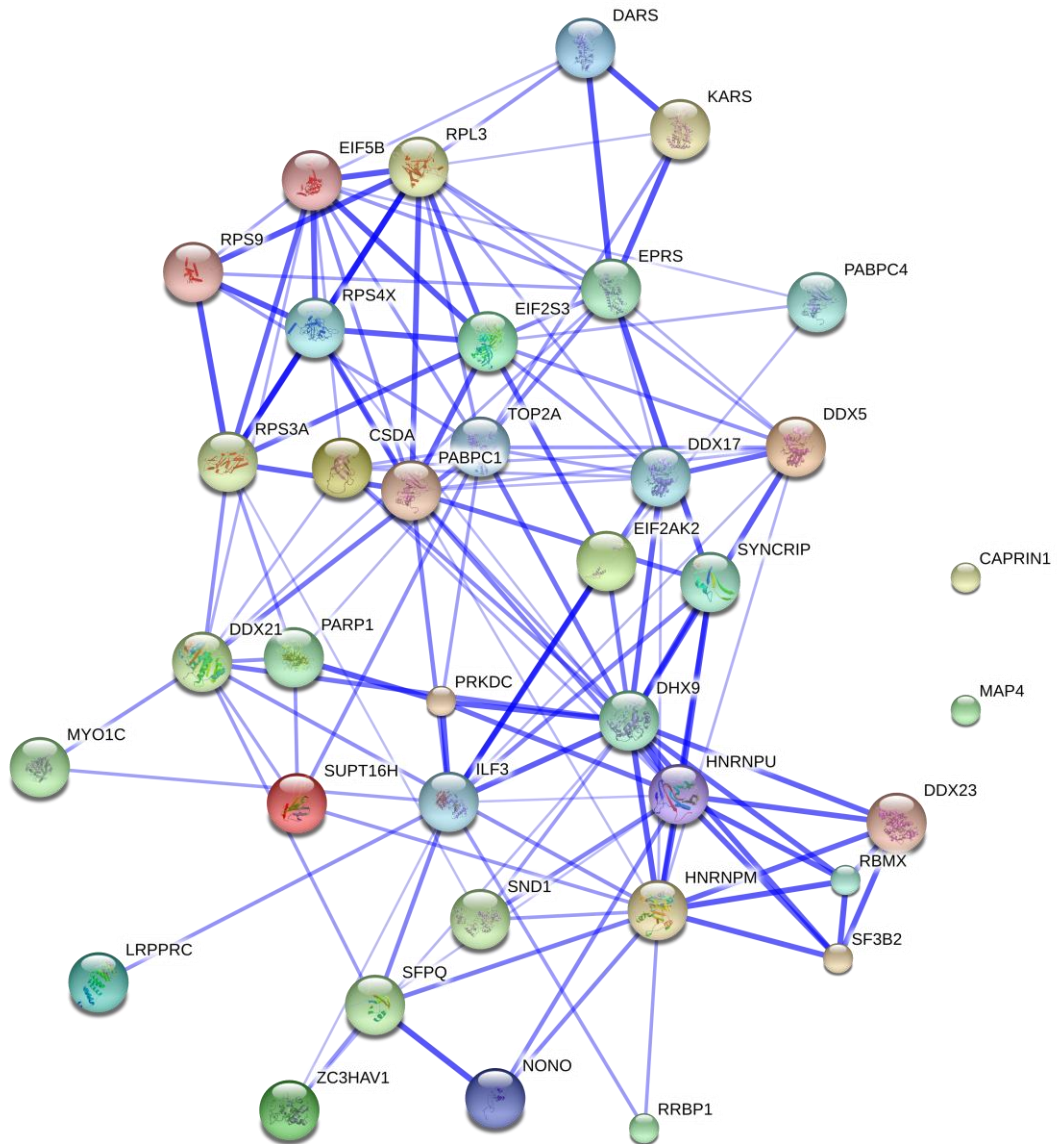
28.	DHX9	27	7479800	988020000	0	7,045396741
29.	RPS3A	12	7768900	798610000	0	6,683636985
30.	RPL3	11	4768200	354590000	0	6,21656329
31.	SFPQ	19	32608000	1841000000	0	5,81911986
32.	RPS9	14	21607000	1011600000	0	5,548996355
33.	NONO	19	55880000	1908900000	0	5,094265696
34.	ILF3	17	30800000	901030000	0	4,870572886
35.	MAP4	16	7299100	203520000	0	4,801308179
36.	EIF2AK2	14	32786000	376390000	0	3,521076495
37.	YBX3	12	7682300	75172000	0	3,29058518
38.	RBMX	12	34297000	233440000	0	2,766897496

Nakon obrade podataka, dobiven set proteina analiziran je „*PANTHER Overrepresentation*“ testom pretragom baze podataka Gene Ontology⁷⁰. Ova analiza pretražuje zadani set proteina te pokazuje njegovo „obogaćenje“ (eng. *enrichment*) za određeni biološki proces. Rezultati analize obogaćenosti seta analiziranih proteina za određeni biološki proces pokazuju prevladavanje proteina koji sudjeluju u raznim staničnim procesima koji uključuju RNA. Neki od njih s faktorom obogaćenja >5 s potencijalnim utjecajem na degradaciju RNA navedeni su u tablici 13.

Tablica 14. Rezultati pretrage baze podataka Gene Ontology za određeni biološki proces.

Biološki proces	Proteini	p-vrijednost
Regulacija stabilnosti mRNA	YBX3, PABPC1, SYNCRIP, DHX9, HNRNPU	2.39E-05
Razmatanje sekundarne strukture RNA	DDX17, DDX5, DDX21, DDX23	8.86E-03
Regulacija replikacije virusnog genoma	DDX5, ILF3, ZC3HAV1, EIF2AK2, TOP2A	1.33E-03
Negativna regulacija translacije	SYNCRIP, ILF3, EIF2AK2, EPRS, CAPRIN1	4.32E-03
Izrezivanje RNA	SFPQ, RBMX, SF3B2, PABPC1, SYNCRIP, DDX5, HNRNPM, DHX9, NONO, DDX23, HNRNPU	9.33E-08
Degradacija RNA sa preuranjenim STOP-kodonom	RPL3, PABPC1, RPS4X, RPS3A, RPS9	1.78E-02

Za dobiven set proteina također su provjerene i njihove međusobne interakcije pomoću *String*⁷¹ baze podataka. Ovaj programski alat omogućuje analizu proteinskih interakcija za zadan set proteina na temelju različitih dokaza kao što su genomska okolina, funkcija gena koji kodiraju za zadane proteine, njihova koekspresija te naravno eksperimentalno dokazane interakcije.



Slika 43. Shematski prikaz analize interakcija proteina dobiven programskim alatom *String*⁷¹. Debljina plavih linija pokazuje razinu pouzdanosti interakcija između pojedinih proteina od najdeblje tj. najpouzdanije do najtanje.

5. Rasprava

PCR reakcijom *in vitro* mutageneze uvedena je točkasta mutacija u nukleotidni slijed molekule cDNA proteina SAHH ukloniranog u pOTB7 plazmid (Slika 13). Restriksijskom analizom i određivanjem nukleotidnog slijeda potvrđena je uspješnost uvođenja željene mutacije. Nakon sinteze prikladnog kalupa, provedena je reakcija *in vitro* transkripcije za sintezu molekula mRNA proteina SAHH divljeg tipa i mutirane verzije proteina SAHH_Y328D. Obje molekule dobivene su u gotovo istim količinama što potvrđuju izmjerene koncentracije otopina. Također veličina dobivenih molekula je jednaka (2,2 kb) što je vidljivo prema provedenoj gel-elektroforeza dobivenih produkata na agaroznom gelu (slika 31).

CD i DSC eksperimentima ispitane su razlike između sekundarnih struktura i termičke stabilnosti molekula mRNA_SAHH i mRNA_SAHH_Y328D. Rezultati CD analize pokazuju veći intenzitet CD signala za mRNA proteina SAHH_Y328D u odnosu na mRNA divljeg tipa (Slika 36). Ova razlika može se pripisati razlikama u sekundarnim strukturama između promatranih molekula mRNA. DSC eksperimentima analizirana je temperaturna stabilnost molekula mRNA, određivanjem točnih vrijednosti pripadajućih temperatura mekšanja koje su iznosile $T_m(\text{mRNA_SAHH_Y328D})=80,72$ °C i $T_m(\text{mRNA_SAHH_WT})=72,25$ °C. Razlike u izračunatim temperaturama mekšanja upućuju na veću temperaturnu stabilnost mutirane verzije mRNA u odnosu na molekulu mRNA divljeg tipa što je u skladu sa rezultatima CD analize. Čvršća sekundarna struktura mutirane mRNA mogla bi imati negativan utjecaj na translaciju ovakvog transkripta unutar stanice što bi rezultiralo aktivacijom nekog mehanizma njegove degradacije (2.4.3.3.).

Za identifikaciju proteina koji sudjeluju u prepoznavanju mutirane molekule mRNA sa čvršćom sekundarnom strukturom, analizirane su smjese proteina koji vežu mRNA divljeg tipa i mutiranu mRNA spektrometrijom masa. Dobiveni podaci pokazuju prevladavanje RNA-vezujućih proteina što je i očekivano, te se ova činjenica može iskoristiti kao potvrda provedene metode izdvajanja proteina sa magnetskim zrcima. Obradom rezultata uz relativno stroge uvjete probira proteina koji vežu samo mutiranu mRNA, identificirano je 38 različitih proteina koji zadovoljavaju zadane kriterije. Ovakva razlika definitivno upućuje na različito procesiranje mutiranog transkripta unutar stanice u odnosu na mRNA proteina SAHH divljeg tipa, upitno je samo na koji točno način. Pregledom bioloških funkcija ovih 38 proteina vidljivo je da su neki od njih uključeni u mehanizam degradacije transkripata koji sadrže preuranjeni STOP-kodon (RPL3, PABPC1, RPS4X, RPS4X, RPS3A, RPS9). Također identificirano je nekoliko RNA-helikaza koji sudjeluju u razmatanju sekundarnih struktura molekula RNA (DDX17, DDX5, DDX21, DDX23). Kako bi dobili širi uvid u moguće mehanizme degradacije koji se aktiviraju u stanicama pacijenta sa navedenom mutacijom potrebno je proširiti zadane uvjete probira identificiranih proteina te pretražiti rezultate za specifične, dobro istražene proteine koji imaju ključnu ulogu pri prepoznavanju i degradaciji transkripata sa greškom. Upf i Smg proteini najbitniji su faktori pri aktivaciji degradacijskog mehanizma transkripata sa preuranjenim STOP-kodonom (NMD). Njihova uloga uključuje interakciju sa samom molekulom mRNA čime ju obilježavaju za daljnju razgradnju. Iako je

zasada nepoznat točan mehanizam prepoznavanja transkripta sa preuranjenim STOP-kodonom od strane ovih proteina, pokazalo se da terminacijski kompleks eRF1-eRF3 te PABC (eng. *poliA-binding protein*) protein imaju ulogu u ovom mehanizmu degradacije⁷². Ukoliko transkript ne sadrži STOP-kodon, u stanici se aktivira tzv. "non-stop" mehanizam degradacije (NSD). Ovaj mehanizam najviše je istražen kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te je utvrđeno da protein Ski7 ima ključnu ulogu u ovom mehanizmu degradacije. Proteini kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Hbs1 i Dom34 su homolozi terminacijskih faktora eRF3 odnosno eRF1 te je *in vitro* eksperimentima pokazano da skupa s proteinom Rli1 potiču disocijaciju ribosoma koji je zastao na 3' kraju molekule mRNA zbog nedostatka njezinog STOP-kodona⁷³. Treći, najmanje istražen mehanizam degradacije nedavno je otkriven također kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uvođenjem stabilne RNA uvojnice u sekundarnu strukturu *PGK1* mRNA koja inhibira elongaciju translacije te potiče endonukleazno cijepanje i ubranu degradaciju transkripta. Istraživanja pokazuju da i u ovom mehanizmu Hbs1-Dom34 kompleks ima ulogu u endonukleaznom cijepanju transkripta te poticanju razgradnje dobivenih fragmenata u 5' → 3' smjeru eksosomom.

Pretragom rezultata koji su dobiveni MS analizom, pronađeni su proteini koji vežu samo mutiranu mRNA i imaju bitnu ulogu u prethodno spomenutim mehanizmima degradacije, UPF1, UPF2 i HBS1L. Ovi proteini identificirani su na temelju 1 (UPF2) ili 2 (UPF1, HBS1L) specifična peptidna slijeda stoga nisu bili direktno uključeni u rezultate nakon strogog probira identificiranih proteina (Tablica 14). Također, identificirani su i već spomenuti ribosomski proteini RPS3A i RPS9 koji stupaju u interakciju sa Dom34-Hbs1 kompleksom i sudjeluju u aktivaciji mehanizma degradacije mRNA zbog zastajanja ribosoma⁷⁴. S obzirom na kompleksnost različitih mehanizama degradacije transkripta te njihove nedovoljne istraženosti jasno je da nije moguće jednoznačno definirati pripadnost nekih proteina određenom mehanizmu degradacije. Za pretpostaviti je da su ti stanični mehanizmi isprepleteni te isti protein sudjeluje u više različitih mehanizama uklanjanja transkripata sa greškom.

Prikupljeni rezultati ukazuju da kod pacijenta koji sadrži mutaciju 328. kodona u genu za protein SAHH, dolazi do sinteze mutiranog transkripta stabilnije sekundarne strukture zbog koje stanica aktivira mehanizam njegove degradacije. Na temelju identificiranih proteina koji vežu mutiranu molekulu mRNA moguće je pretpostaviti da se radi o NMD mehanizmu zbog prisutstva UPF1 i UPF2 proteina ili NSD/NGD mehanizmu zbog prisutstva HBS1L proteina. Rezultati analize stabilnosti mutirane molekule mRNA koji su pokazali njezinu veću stabilnost od mRNA proteina SAHH divljeg tipa, upućuju da se najvjerojatnije radi o mehanizmu NGD s obzirom na pretpostavku da je glavni uzrok zastajanja ribosoma tijekom translacije čvršća odnosno stabilnija struktura mRNA proteina SAHH_Y328D. Za dokazivanje pretpostavljenog mehanizma degradacije potrebna su dodatna istraživanja koja bi među ostalim, uključivala utišavanje ekspresije gena za protein Hbs1 kao poznatog aktivatora predloženog mehanizma degradacije te određivanje utjecaja utišavanja tog gena na količinu mRNA proteina SAHH u stanicama pacijenta koji sadrži istraživanu mutaciju.

6. Zaključci

- metodom cirkularnog dikroizma (CD) utvrđena je razlika u sekundarnim strukturama između mRNA koja kodira za protein SAHH divljeg tipa i mRNA koja kodira za varijantu proteina SAHH_Y328D
- diferencijalno skenirajućom kalorimetrijom (DSC) potvrđena je veća stabilnost molekule mRNA koja kodira za mutiranu verziju proteina SAHH_Y328D u odnosu na mRNA koja kodira za SAHH divljeg tipa
- određene su vrijednosti temperatura mekšanja koje su iznosile $T_m = 80,72$ °C za mutiranu mRNA i $T_m = 72,25$ °C za mRNA divljeg tipa
- izdvojeni su proteini iz staničnog lizata HepG2 stanica koji vežu mRNA koja kodira za protein SAHH divljeg tipa i SAHH_Y328D pomoću magnetskih zrnca sa konjugiranim streptavidinom
- na temelju identificiranih proteina spektrometrijom masa, pretpostavljen je najvjerojatniji mehanizam degradacije mRNA koja kodira za verziju proteina SAHH_Y328D koji uključuje degradaciju uslijed zastajanja ribosoma tijekom translacije zbog čvrste sekundarne strukture mutiranog transkripta

7. Literaturna vrela

1. S. E. Cantoni, G. L., *The Formation of S-adenosylhomocysteine in Enzymatic Transmethylation Reactions*, *J. Am. Chem. Soc.* **776** (1954) 4744.
2. A. W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, J. Micklefield, *S-Adenosyl-Methionine-Dependent Methyltransferases: Highly Versatile Enzymes in Biocatalysis, Biosynthesis and Other Biotechnological Applications*, *ChemBioChem* **13** (2012) 2642–2655.
3. D. W. Marion, W. E. Cornatzer, J. A. Duerre, *S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine Metabolism in Isolate Rat Liver*, *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 10822–10827.
4. I. Baric, K. Fumic, B. Glenn, M. Cuk, A. Schulze, J. D. Finkelstein, S. J. James, V. Mejaski-Bosnjak, L. Pazanin, I. P. Pogribny, M. Rados, V. Sarnavka, M. Scukanec-Spoljar, R. H. Allen, S. Stabler, L. Uzelac, O. Vugrek, C. Wagner, S. Zeisel, S. H. Mudd, *S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 4234–9.
5. R. Grubbs, O. Vugrek, J. Deisch, C. Wagner, S. Stabler, R. Allen, I. Barić, M. Rados, S. H. Mudd, *S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: Two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes*, *J. Inherit. Metab. Dis.* **33** (2010) 705–713.
6. S. H. M. N.R.M. Buist, B. Glenn, O. Vugrek, C. Wagner, S. Stabler, R.H. Allen, I. Pogribny, A. Schulze, S.H. Zeisel, I. Barić, *S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man*, *J. Inherit. Metab. Dis.* **29** (2006) 538–545.
7. S. H. M. Barić, I. M. Čuk, K. Fumić, Vugrek O., R.H. Allen, B. Glenn, M. Maradin, L. Pažanin, I. Pogribny, M. Radoš, V. Sarnavk, A. Schulze, S. Stabler, C. Wagner, S.H. Zeisel, *S-Adenosylhomocysteine hidrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy*, *J. Inherit. Metab. Dis.* **28** (2005) 885–902.
8. K. A. Strauss, C. Ferreira, T. Bottiglieri, X. Zhao, E. Arning, S. Zhang, S. H. Zeisel, M. L. Escolar, N. Presnick, E. G. Puffenberger, O. Vugrek, L. Kovacevic, C. Wagner, G. V. Mazariegos, S. H. Mudd, K. Soltys, *Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency*, *Mol. Genet. Metab.* **116** (2015) 44–52.
9. R. Parker, U. Sheth, *P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation*, *Mol. Cell* **25** (2007) 635–646.
10. K. E. Baker, R. Parker, *Nonsense-mediated mRNA decay: Terminating erroneous gene expression*, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16** (2004) 293–299.
11. D. J. Obbard, K. H. J. Gordon, A. H. Buck, F. M. Jiggins, *The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **364** (2009) 99–115.
12. A. Eulalio, E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, E. Izaurralde, *Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation*, *RNA* **15** (2009) 21–32.
13. G. de la Haba, G. L. Cantoni, *The Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-L-homocysteine from Adenosine and Homocysteine*, *J. Biol. Chem.* **234** (1959) 603–608.
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

16. A. H. Palmer, L, *Mechanism Formation for Enzymatic Thioether Formation*, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 5817–5819.
17. M. a Turner, X. Yang, D. Yin, K. Kuczera, R. T. Borchardt, P. L. Howell, *Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase.*, *Cell Biochem. Biophys.* **33** (2000) 101–125.
18. M. A. Turner, C. S. Yuan, R. T. Borchardt, M. S. Hershfield, G. D. Smith, P. L. Howell, *Structure determination of selenomethionyl S-adenosylhomocysteine hydrolase using data at a single wavelength.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5** (1998) 369–76.
19. T. Yamada, Y. Takata, J. Komoto, T. Gomi, H. Ogawa, M. Fujioka, F. Takusagawa, *Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase: Roles of His 54, Asp130, Glu155, Lys185, and Aspl89*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37** (2005) 2417–2435.
20. Y. Hu, J. Komoto, Y. Huang, T. Gomi, H. Ogawa, Y. Takata, M. Fujioka, F. Takusagawa, *Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver*, *Biochemistry* **38** (1999) 8323–8333.
21. J. Komoto, Y. Huang, T. Gomi, H. Ogawa, Y. Takata, M. Fujioka, F. Takusagawa, *Effects of site-directed mutagenesis on structure and function of recombinant rat liver S-adenosylhomocysteine hydrolase. Crystal structure of D244E mutant enzyme*, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 32147–32156.
22. K. B. S. Clarke, *Homocysteine in health and disease*, Cambridge University Press, (2001) 63–78.
23. A. L. Lehninger, *Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function*, Worth Publishers, New York (1972).
24. R. H. A. J. L. Palmer, *The Mechanism of Action of S-Adenosylhomocysteinase*, *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 1217–1226.
25. Y. Takata, T. Yamada, Y. Huang, J. Komoto, T. Gomi, H. Ogawa, M. Fujioka, F. Takusagawa, *Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase*, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 22670–22676.
26. M. Briske-Anderson, J. a Duerre, *S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver*, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 1631–1635.
27. R. Beluzić, M. Cuk, T. Pavkov, K. Fumić, I. Barić, S. H. Mudd, I. Jurak, O. Vugrek, *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.* **400** (2006) 245–53.
28. R. Beluzić, M. Čuk, T. Pavkov, I. Barić, O. Vugrek, *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.* **368** (2008) 30–36.
29. O. Vugrek, R. Beluzić, N. Nakić, *S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: Two novel mutations with lethal outcome*, *Hum. Mutat.* **30** (2009).
30. T. Honzík, M. Magner, J. Krijt, J. Sokolová, O. Vugrek, R. Beluzić, I. Barić, H. Hansikova, M. Elleder, K. Veselá, L. Bauerová, N. Ondrušková, P. Ješina, J. Zeman, V. Kožich, *Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency*, *Mol. Genet. Metab.* **107** (2012) 611–613.
31. N. L. Garneau, J. Wilusz, C. J. Wilusz, *The highways and byways of mRNA decay.*,

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (2007) 113–126.
32. R. P. S. Jain, *The Discovery and Analysis of P Bodies*, *Adv. Exp. Med. Biol.* **768** (2013) 23–43.
 33. H. Tourrière, K. Chebli, J. Tazi, *mRNA degradation machines in eukaryotic cells*, *Biochimie* **84** (2002) 821–837.
 34. https://en.wikipedia.org/wiki/Five-prime_cap
 35. M. Tucker, M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis, R. Parker, *The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in Saccharomyces cerevisiae*, *Cell* **104** (2001) 377–386.
 36. M. Gao, D. T. Fritz, L. P. Ford, J. Wilusz, *Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro.*, *Mol. Cell* **5** (2000) 479–488.
 37. U. Sheth, R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies.*, *Science* **300** (2003) 805–8.
 38. L. Milligan, C. Torchet, C. Allmang, T. Shipman, D. Tollervey, *A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation.*, *Mol. Cell. Biol.* **25** (2005) 9996–10004.
 39. L. E. Maquat, W. Y. Tarn, O. Isken, *The pioneer round of translation: Features and functions*, *Cell* **142** (2010) 368–374.
 40. Y. Ishigaki, X. Li, G. Serin, L. E. Maquat, *Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20*, *Cell* **106** (2001) 607–617.
 41. F. He, X. Li, P. Spatrick, R. Casillo, S. Dong, A. Jacobson, *Genome-Wide Analysis of mRNAs Regulated by the Nonsense-Mediated and 5' to 3' mRNA Decay Pathways in Yeast*, *Mol. Cell* **12** (2003) 1439–1452.
 42. J. T. Mendell, N. a Sharifi, J. L. Meyers, F. Martinez-Murillo, H. C. Dietz, *Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise.*, *Nat. Genet.* **36** (2004) 1073–1078.
 43. E. Conti, E. Izaurralde, *Nonsense-mediated mRNA decay: Molecular insights and mechanistic variations across species*, *Curr. Opin. Cell Biol.* **17** (2005) 316–325.
 44. A. van Hoof, *Exosome-Mediated Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon*, *Science*. **295** (2002) 2262–2264.
 45. T. Inada, H. Aiba, *Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast.*, *EMBO J.* **24** (2005) 1584–95.
 46. M. K. Doma, R. Parker, *Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation.*, *Nature* **440** (2006) 561–564.
 47. *Expand Long Range*, dNTPack, Roche, 2006
 48. <https://www.neb.com/products/r0176-dpni>
 49. *QIAprep Miniprep Handbook*, 4. izdanje, Qiagen, 2015
 50. *Qubit 3.0 Fluorometer*, Life Technologies, 2015

51. *Thermo Scientific TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit*, Thermo Scientific, 2014
52. D. V. A. A. Ristov, A. Brozović, B. B. Mađarić, H. Četković, D. Hranilović, M. H. Bosnar, S. K. Hećimović, N. M. Radan, S. Mihaljević, N. Slade, *Metode u Molekularnoj Biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb (2007).
53. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20163>
54. J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beechem, R. P. Haugland, *Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: Uses for protein labeling, detection, and isolation*, *Anal. Biochem.* **308** (2002) 343–357.
55. *Pierce™ RNA 3' End Desthiobiotinylation Kit*, Thermo Scientific, 2015
56. D. López-Terrada, S. W. Cheung, M. J. Finegold, B. B. Knowles, *Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line*, *Hum. Pathol.* **40** (2009) 1512–1515.
57. *Pierce™ Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit*, Thermo Scientific, 2015
58. *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System - Instruction Manual*, BioRad, 2010
59. J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčiuk, M. Vorlíčková, *Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA*, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) 1713–1725.
60. R. W. Woody, *Circular dichroism*, *Methods Enzymol.* **246** (1995) 34–71.
61. <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd>
62. C. H. Spink, *Differential Scanning Calorimetry*, *Methods Cell Biol.* **84** (2008) 115–141.
63. D. Robertson, K. P. Murphy, *Protein structure and the energetics of protein stability*, *Chem. Rev.* **97** (1997) 1251–1267.
64. Peter L. P., *Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures*, Wiley, New Jersey (2012)
65. N. Galić, *Spektrometrija masa - za kolegij Instrumentne analitičke metode II*, interna skripta, Zagreb (2004)
66. E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*, Wiley, Chichester (2007)
67. <http://www.dlt.ncssm.edu/tiger/chem1.htm>
68. R. Aebersold, M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics.*, *Nature* **422** (2003) 198–207.
69. *Thermo Scientific TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit*, Thermo Scientific, 2014
70. <http://geneontology.org>
71. <http://string-db.org>
72. J. Lykke-Andersen, E. J. Bennett, *Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways*, *J. Cell Biol.* **204** (2014) 467–476.
73. V. P. Pisareva, M. A. Skabkin, C. U. T. Hellen, T. V Pestova, A. V Pisarev, *Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes.*, *EMBO J.* **30** (2011) 1804–17.

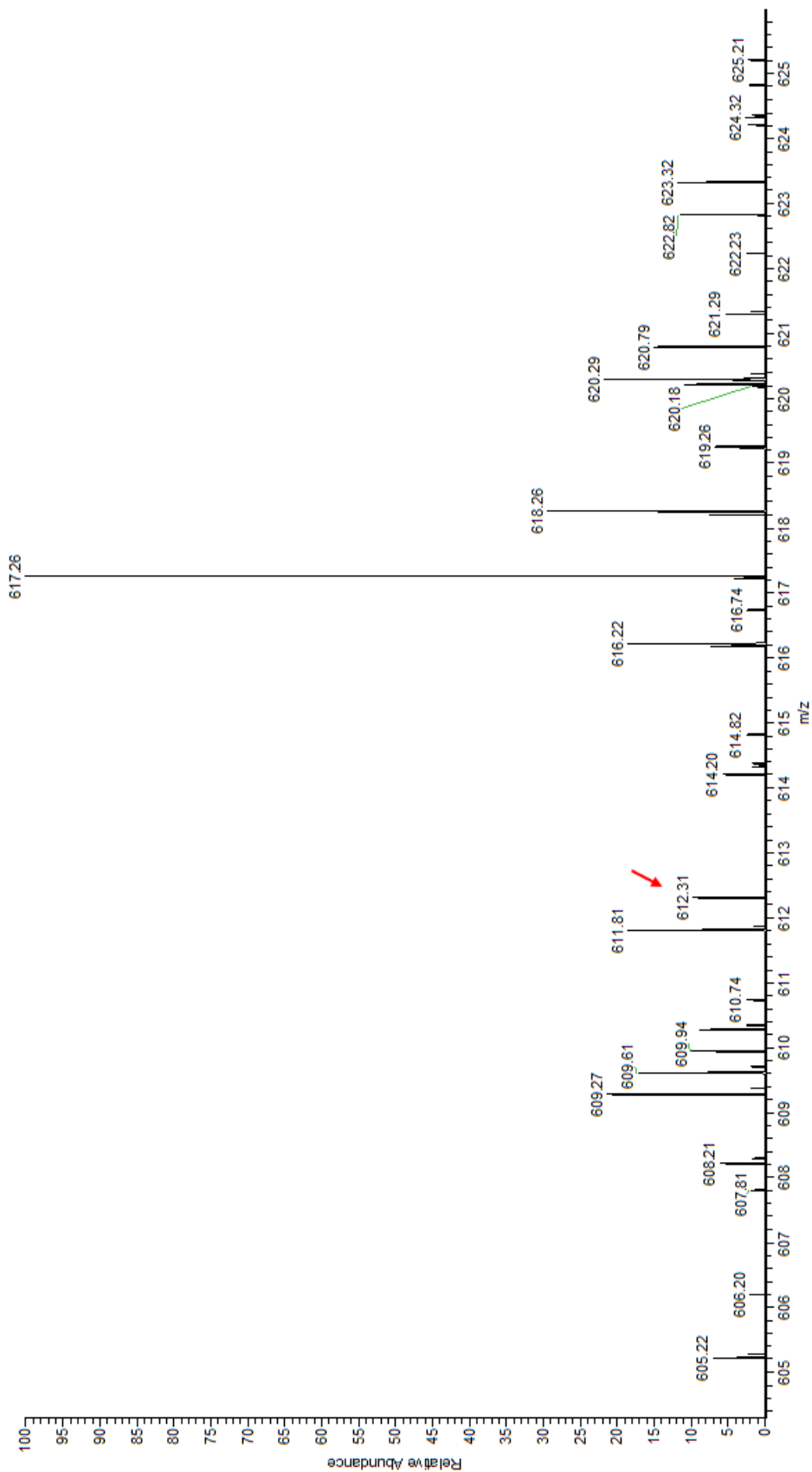
74. T. Becker, J.-P. Armache, A. Jarasch, A. M. Anger, E. Villa, H. Sieber, B. A. Motaal, T. Mielke, O. Berninghausen, R. Beckmann, *Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** (2011) 715–20.

8. Životopis

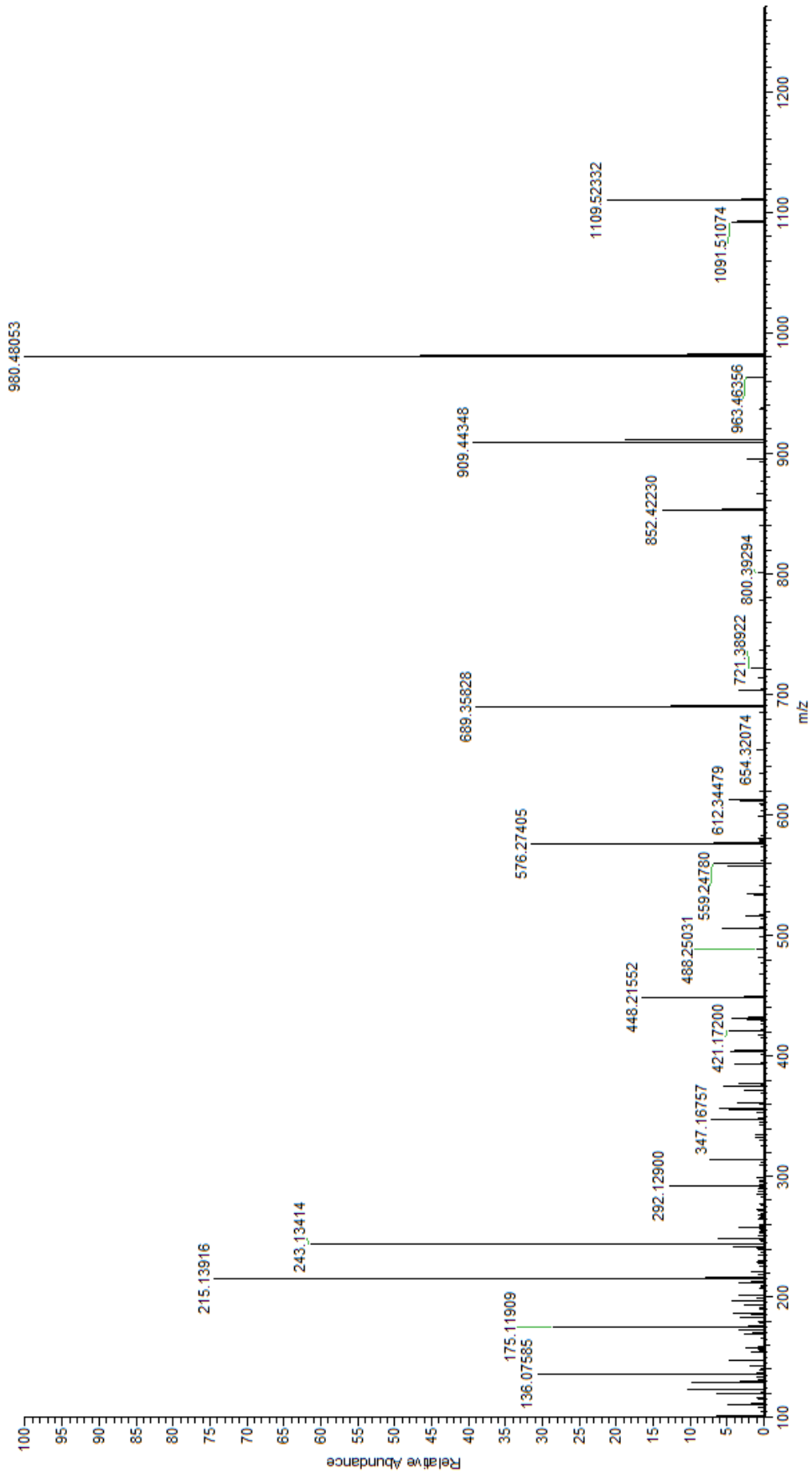
Rođen sam 2. veljače 1991. u Rijeci gdje sam završio osnovnu školu te sam 2005. upisao Prvu Šušračku Hrvatsku Gimnaziju u Rijeci. Nakon mature 2009. upisao sam preddiplomski studij kemije na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu te sam 2013. stekao akademsku titulu prvostupnika kemije. Iste godine upisao sam Diplomski studij kemije, istraživački smjer – biokemija i analitička kemija. Od 2015. godine radim kao instruktor kemije na Visokom učilištu Algebra.

9. Dodaci

a) MS spektar sa peptidnim fagmentom HBS1L (crvena strelica)



b) MS/MS spektar peptidnog fragmenta m/z= 612,31 (HBS1L)



c) MS/MS spektar fragmenta HBS1L s određenim aminokiselinim slijedom

