

Uloga p97/VCP AAA ATPaze u popravku unakrsnog vezanja DNA i proteina

Dakić, Valentin

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:726279>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Valentin Dakić

**ULOGA p97/VCP AAA ATPaze U
POPRAVKU UNAKRSNOG VEZANJA DNA I
PROTEINA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u istraživačkoj grupi za DNA popravak u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Marte Popović i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Nives Ivić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Razumijevanje popravka unakrsnog vezanja DNA-protein in vivo koristeći zebricu kao istraživački model* (HRZZ-UIP-2017-05-5258, voditeljica projekta: dr. sc. Marta Popović).

Zahvale

Na prvome mjestu, veliku zahvalnost dugujem mentorici dr. sc. Marti Popović. Hvala Vam što ste mi omogućili da se upoznam sa svijetom znanosti i biokemije, kao i na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovog zanimljivog rada. Hvala Vam i na svim smjernicama, savjetima, uloženom trudu i velikoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela te pisanja rada, zadržavajući stalno pozitivan stav.

Posebno hvala i svim ostalim članovima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na svojoj pruženoj pomoći tijekom mog boravka na LME-u, izrazito ugodnoj atmosferi, korisnim savjetima u vezi eksperimenata i odgovorima na sva moja pitanja.

Veliko hvala dr. sc. Nives Ivić na usmjeravanju i poticanju samostalnosti u istraživačkom radu. Hvala Vam na zaraznom entuzijazmu i prijateljskoj atmosferi zbog kojih se sve činilo puno lakše.

Najiskrenije hvala nastavnici doc. dr. sc. Morani Dulić na velikoj pomoći oko formalne strane diplomskog ispita i savjetima u vezi pismenog dijela rada.

Hvala svim prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studentske dane, studiranje učinili lakšim i zajednički provedeno vrijeme nezaboravnim.

Neizmjereno se zahvaljujem i svojoj obitelji, mami Mirki, tati Ivi i bratu Gabrielu, na svemu što su mi omogućili tijekom školovanja, što su uvijek vjerovali u mene i bili ogromna podrška. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Oštećenja DNA.....	3
2.2. Popravak DNA.....	6
2.3. Unakrsno vezanje DNA i proteina.....	8
2.4. Popravak unakrsnog vezanja DNA i proteina.....	12
2.4.1. Hidroliza kovalentne veze između DNA i proteina.....	13
2.4.2. Popravak ovisan o nukleazama.....	14
2.4.3. Popravak ovisan o proteolizi.....	15
2.5. ATPaza p97/VCP.....	19
2.5.1. Struktura i mehanizam djelovanja p97.....	19
2.5.2. Stanična uloga p97.....	21
2.5.3. Uloga p97 u popravku unakrsnog vezanja DNA i proteina.....	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Materijali.....	24
3.1.1. Standardne kemikalije.....	24
3.1.2. Boje.....	24
3.1.3. Markeri veličine.....	24
3.1.4. Nukleinske kiseline i nukleotidi.....	25
3.1.5. Enzimi.....	25
3.1.6. Kromatografska punila, kolone i membrane.....	25
3.1.7. Komercijalni kompleti.....	25
3.1.8. Instrumenti.....	25
3.1.9. Plazmidni vektori i soj bakterije Escherichia coli.....	26
3.1.10. Puferi korišteni tijekom metoda rada s proteinima i nukleinskim kiselinama.....	27
3.2. Metode rada s bakterijama.....	29
3.2.1. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija.....	29
3.2.2. Transformacija bakterija i postav noćne kulture.....	29

3.2.3. Uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije proteina.....	30
3.2.4. Homogeniziranje stanica.....	31
3.3. Metode rada s proteinima.....	31
3.3.1. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima.....	31
3.3.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata.....	32
3.3.3. Dijaliza i proteolitičko odcjepljivanje afinitetnog privjeska s fuzijskog proteina.....	34
3.3.4. Ultrafiltracija.....	35
3.3.5. Gel-filtracija.....	35
3.3.6. Određivanje koncentracije proteina.....	36
3.4. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	36
3.4.1. Izolacija ukupne RNA.....	36
3.4.2. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina.....	40
3.4.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu.....	40
3.4.4. Reverzna transkripcija.....	42
3.4.5. Pronalazak sekvenci gena i dizajn početnica.....	42
3.4.6. Lančana reakcija polimerazom.....	43
3.4.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom.....	45
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	49
4.1. Heterologna nadekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina.....	49
4.1.1. p97 WT.....	49
4.1.2. SPRTN WT i SPRTN E112A.....	52
4.1.3. Koncentracije i masa proteina.....	54
4.2. Kvantifikacija ekspresije gena p97 i SPRTN na razini mRNA u tkivima domaćeg miša i ribe zebrice.....	56
4.2.1. Analiza izolirane ukupne RNA.....	57
4.2.2. Povjera kvalitete cDNA, podobnosti referentnih gena i dizajniranih početnica.....	63
4.2.3. Testiranje efikasnosti rada početnica.....	68
4.2.4. Analiza ekspresije gena u tkivima domaćeg miša, ribe zebrice i čovjeka.....	72
4.2.4.1. Ekspresija gena u domaćem mišu i usporedba s čovjekom.....	75
4.2.4.2. Ekspresija gena u ribi zebrici i usporedba s čovjekom.....	78
4.2.4.3. Usporedba ekspresije gena u domaćem mišu i ribi zebrici.....	82
§ 5. ZAKLJUČAK	86
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	88
§ 7. ŽIVOTOPIS	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ULOGA p97/VCP AAA ATPaze U POPRAVKU UNAKRSNOG VEZANJA DNA I PROTEINA

Valentin Dakić

Unakrsna veza između DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC) je tip oštećenja DNA koje nastaje kao posljedica stvaranja ireverzibilne kovalentne veze između DNA i proteina u prisutnosti endogenog ili egzogenog DPC-inducirajućeg agensa. Nemogućnost popravka DPC-a uzrokuje genomsku nestabilnost i teške posljedice za organizam, uključujući preuranjeno starenje, neurodegeneraciju i pojavu tumora. ATPaza p97 tvori kompleks s glavnim čimbenikom popravka DPC-a, SPRTN metaloproteazom. Međutim, uloga p97 u ovom putu DNA popravka nije poznata, te je stoga cilj ovog rada istražiti sudjeluje li i na koji način p97 u popravku DPC-a i u kakvom je odnosu sa SPRTN proteazom. U tu su svrhu prekomjerno eksprimirani i pročišćeni humani proteini p97 i njegov interaktor SPRTN radi kasnije strukturne i biokemijske analize njihovog kompleksa krio-elektronskom mikroskopijom. Provedena je i analiza ekspresije p97 i SPRTN gena (na razini mRNA) u tkivima dvaju modelnih organizama, ribe zebrice (*Danio rerio*) i domaćeg miša (*Mus musculus*), kako bi se usporedio ekspresijski profil p97 i SPRTN gena kroz tkiva te među organizmima.

(96 stranica + 14 stranica, 17 slika, 17 tablica, 151 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ATPaza p97/VCP, ekspresija gena, izolacija proteina, izolacija ukupne RNA, kvantitativni PCR, metaloproteaza SPRTN, unakrsna veza DNA-protein

Mentor: dr. sc. Marta Popović

Neposredni voditelj: dr. sc. Nives Ivić

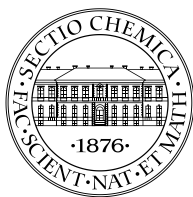
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 22. prosinca 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THE ROLE OF p97/VCP AAA ATPase IN THE REPAIR OF DNA-PROTEIN CROSSLINKS

Valentin Dakić

DNA-protein crosslink (DPC) is a type of DNA damage that occurs as a result of the formation of an irreversible covalent bond between DNA and protein in the presence of an endogenous or exogenous DPC-inducing agent. The inability to repair DPCs causes genomic instability and severe consequences for the organism, including premature aging, neurodegeneration, and tumor appearance. ATPase p97 forms a complex with the major DPC repair factor, SPRTN metalloprotease. However, the role of p97 in this pathway of DNA repair is unknown, and therefore the aim of this thesis is to get closer to answering whether and in what way p97 participates in DPC repair and what is its relation to SPRTN protease. For this purpose, human proteins p97 and its interactor SPRTN were overexpressed and purified for subsequent structural and biochemical analysis of their complex by cryo-electron microscopy. Expression analysis of *p97* and *SPRTN* genes (at the mRNA level) in the tissues of two model organisms, zebrafish (*Danio rerio*) and mice (*Mus musculus*) was performed to compare the expression profile of *p97* and *SPRTN* genes across tissues and organisms.

(96 + 14 pages, 17 figures, 17 tables, 151 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ATPase p97/VCP, DNA-protein crosslink, gene expression, protein isolation, quantitative PCR, SPRTN metalloprotease, total RNA isolation

Mentor: Dr. Marta Popović, Research Associate

Assistant mentor: Dr. Nives Ivić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: December 22th, 2020

§ 1. UVOD

Svaka stanica u ljudskom tijelu svakodnevno pretrpi i do desetke tisuća oštećenja DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA).^{1,2} Ta su oštećenja vrlo raznolika: oksidativna i bazna oštećenja, pogrešno sparane baze, abazična mjesta, insercije, delecije, jednolančani i dvolančani DNA lomovi, unakrsno vezanje DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC), DNA-DNA umreženja. Abazična mjesta i DPC predstavljaju najčešće tipove oštećenja DNA, dok su najtoksičnija dvostruki DNA lomovi.^{2,3} S obzirom da DNA sadrži genomski zapis stanice, iznimno je bitno za funkcioniranje organizma da se DNA održava netaknutom. DNA se oslanja isključivo na popravak postojećih molekula, a do duplikacije (replikacije) dolazi samo prilikom diobe stanice.¹

DPC nastaje kao posljedica stvaranja ireverzibilne kovalentne veze između DNA i proteina u prisutnosti endogenog ili egzogenog DPC-inducirajućeg agensa. Endogeni izvori oštećenja mogu biti promjene u DNA strukturi i nusprodukti staničnog metabolizma, poput oksidativnih radikala i aldehida, dok su primjeri egzogenih izvora oštećenja ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje te kemijski agensi poput kamptotecina, mitomicina C i etopozida. DPC je jedno od najčešćih oštećenja DNA te predstavlja fizičku prepreku za sve procese u kojima sudjeluje DNA (transakcije): replikaciju, transkripciju, rekombinaciju i popravak. Nemogućnost popravka DPC-a uzrokuje genomsku nestabilnost i teške posljedice za organizam, uključujući preuranjeno starenje, neurodegeneraciju i pojavu tumora.³ Unatoč visokoj učestalosti DPC-a, malo se zna o mehanizmu njihova popravka, jer se sve donedavno DPC popravak nije smatrao zasebnim mehanizmom popravka DNA. Tijekom 2014. i 2016. godine nekoliko je grupa identificiralo stanične enzime, DNA-ovisne metaloproteaze Wss1 (engl. *Weak suppressor of SMT3 protein*) u kvascu i SPRTN-a (DVC1/C1orf124) u višim eukariotima, koji proteolizom ireverzibilno kovalentno zarobljenog proteina iniciraju popravak oštećenja. Otkriće proteolizno-ovisnog popravka DPC-a dovelo je do prepoznavanja DPC popravka kao zasebnog mehanizma popravka oštećenja DNA. Međutim, trenutno nisu poznati drugi faktori koji sudjeluju u popravku, mehanizam njihova djelovanja *in vitro* i *in vivo*, te regulacija ovog tipa popravka DNA.⁴

p97/VCP (engl. *valosin-containing protein*) je adenozin-trifosfataza (engl. *adenosine triphosphatase*, ATPaza) homoheksamerne strukture povezana s različitim staničnim

aktivnostima (engl. *ATPase associated with diverse cellular activities*, AAA) i sposobna je vezati veliki broj različitih interaktora i enzima koji određuju njezinu supstratnu specifičnost i usmjeravaju enzimski kompleks na različita mjesta u stanici.⁵ Budući da SPRTN interagira s ATPazom p97⁶, moguće je da i p97 sudjeluje u popravku DPC-a u stanici. Međutim, uloga p97 u popravku DPC-a nije karakterizirana, te je stoga cilj ovog diplomskog rada približiti se odgovoru na pitanja sudjeluje li i na koji način p97 u popravku DPC-a, odnosno u kakvom je odnosu sa metaloproteazom SPRTN koja je glavni čimbenik popravka DPC-a.

U tu su svrhu heterologno nadekspimirani i pročišćeni humani proteini p97 (divlji tip) i njegov interaktor SPRTN (divlji tip i katalitički mutant) iz bakterije *Escherichia coli* soja *Rosetta (DE3)* radi kasnije strukturne i biokemijske analize njihovog kompleksa krio-elektronskom mikroskopijom. Metoda uključuje IPTG-induciranu (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) prekomjernu ekspresiju navedenih proteina označenih heksahistidinskim (His) privjeskom u bakterijskim stanicama koristeći inducibilni *lacUV5* promotor, te pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA (engl. *nickel-nitrilotriacetic acid*) agarozu i gel-filtracijom. Također, provedena je analiza ekspresije transkripata gena *p97* i *SPRTN* u tkivima dva modelna organizma, ribe zebrice (*Danio rerio*) i domaćeg miša (*Mus musculus*), kako bi se usporedio ekspresijski profil gena *p97* i *SPRTN* kroz tkiva te među organizmima. Ovaj pristup obuhvaća izolaciju i pročišćavanje ukupne ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) iz tkiva navedenih organizama, reverznu transkripciju (RT), kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) te analizu relativne ekspresije gena *Q-Gene* metodom.⁷

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oštećenja DNA

DNA sadrži svu genetsku informaciju koja je stanici i organizmu potrebna za jedinstvenost, rast, preživljavanje i diobu. Osnovna građevna jedinica DNA je nukleotid, a svaka molekula nukleotida sastavljena je od dušične baze, šećera deoksiriboze i negativno nabijene fosfatne skupine. Dušične baze dijele se na purinske (adenin i gvanin) i pirimidinske (citozin i timin u DNA, odnosno uracil u RNA).³

DNA je biološka molekula koja se oslanja isključivo na popravak postojećih molekula, a do duplikacije (replikacije) dolazi samo prilikom diobe stanice. DNA akumulira štetu tijekom života i predstavljena je jednom kopijom u većini stanica. DNA može nakupiti brojna oštećenja, ali se mora održavati netaknutom kako bi stanica pravilno funkcionirala.¹ Svaka od približno 10^{13} stanica u ljudskom tijelu pretrpi i do desetke tisuća oštećenja DNA dnevno.^{1,2} Baze u DNA vrlo su osjetljive na kemijske modifikacije, što pogoduje nastanku oštećenja. Tome doprinosi i činjenica da se DNA nalazi u izrazito reaktivnom okruženju – vodenoj otopini. U slučaju da se oštećenja pretvore u mutacije kao posljedica pogreške u popravku ili replikaciji, promjene su trajne i imaju kontinuirani učinak, čak i u stanicama potomaka. Gubitak integriteta DNA dovodi do različitih oštećenja stanične fiziologije, a posljedično i do bolesti poput raka, dijabetesa, ubrzanog starenja, neurodegeneracije ili stanične smrti. Jedna od posljedica mutacija je i gubitak gena za suzbijanje tumora i nepravilna aktivacija onkogeni, što može pokrenuti nekontroliranu staničnu proliferaciju i razvoj malignih stanica. Nestabilnost genoma obilježje je svih oblika tumora. Dodatnoj kompleksnosti pridonose epigenomske promjene DNA koje također mogu doprinijeti nastanku raka.^{2,3}

Cjelovitost DNA može biti ugrožena na tri načina.¹ Prvo, spontane reakcije svojstvene kemijskoj prirodi DNA u vodenoj otopini stvaraju abazična ili AP (apurinska/apirimidinska) mjesta ili uzrokuju hidrolitičku deaminaciju baza (gvanin → ksantin, adenin → hipoksantin, citozin → uracil, 5-metilcitozin → timin).^{1,8} AP mjesto u DNA ne sadrži purinsku/pirimidinsku bazu, a nastaju kada se deoksiriboza odvoji od dušične baze, prekidajući (intrinzično nestabilnu) N-glikozidnu vezu između njih. To se može dogoditi zbog povišene temperature, kao rezultat

kemijske aktivnosti, zračenjem ili zbog aktivnosti enzima (DNA-glikozilaze, AP-endonukleaze).⁹⁻¹¹ Moguće su i spontane pogreške tijekom replikacije i popravka DNA kao što su npr. krivo sparane baze povremeno uvedene tijekom replikacije DNA i prekidi lanca DNA uzrokovani pogreškom u radu DNA-topoizomeraze 1 i 2 (TOP1 i 2).² Uz navedeno, hidrolitičke reakcije i neenzimske metilacije (N3-metilcitozin, N3-metiladenin, N7-metilgvanin, 6-O-metilgvanin) dnevno stvaraju tisuće oštećenja DNA po stanici.^{2,8} S-Adenozil-metionin (SAM), koji se koristi kao metilni donor metiltransferazama tijekom normalnih reakcija metilacije, glavni je uzročnik metilacije baza.^{8,12} Drugo, vlastiti metabolizam stanice stvara reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*; ROS) i dušika (engl. *reactive nitrogen species*; RNS), produkte peroksidacije lipida, endogene alkilirajuće agense, estrogen i metabolite kolesterola, te reaktivne karbonilne vrste, od kojih svi mogu oštetiti DNA (endogeni izvori oštećenja).¹ ROS i RNS nastaju tijekom mnogih metaboličkih procesa, ali i tijekom izlaganja UV, X i γ -zrakama. Reaktivne vrste imaju dvojak ulogu jer mogu biti i korisni i štetni za biološke sustave. Korisni učinci reaktivnih vrsta zaista su brojni (potiču pravilan rast i razvoj stanica, staničnu signalizaciju, popravak staničnih oštećenja, staničnu proliferaciju, angiogenezu, protuupalni učinak, itd.), ali u visokim koncentracijama mogu uzrokovati oštećenja staničnih struktura, uključujući lipide i membrane, proteine i nukleinske kiseline.¹³ ROS i RNS mogu stvoriti više vrsta jednolančanih lomova (engl. *single strand break*; SSB) i oksidativnih oštećenja (najčešće 8-oksogvanin) u DNA.^{1,14} Slobodni radikali iz vodikovog peroksida, koji je fiziološki relevantan izvor ROS-a, uzrokuju jednolančane i dvolančane lomove (engl. *double strand break*; DSB).¹⁵ SSB može nastati izravno, raspadom oksidiranog šećera ili neizravno tijekom popravka oksidiranih baza, AP mjesta i baza koje su oštećene ili promijenjene na druge načine. SSB se može pojaviti i kao rezultat pogreške u radu enzima kao što je TOP1.¹⁵ Kada se dva SSB-a pojave u neposrednoj blizini ili kada replikacijska mašinerija naiđe na SSB ili neka druga oštećenja, može doći do nastanka DSB-a.² Treće, DNA oštećuju egzogeni fizikalni i kemijski agensi kao što su zračenje (UV, X, γ , radioaktivno), visoka temperatura, okolišne kemikalije, kemoterapeutici i virusi.^{1,16}

Najčešći egzogeni uzrok oštećenja DNA je ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*, UV) zračenje. Iako ozonski sloj apsorbira najopasniji dio UV spektra (UV-C), zaostalo UV-A i UV-B zračenje na jakoj sunčevoj svjetlosti može izazvati i do 100 000 oštećenja po izloženoj stanici u jednom satu.² Dvije glavne klase mutagenih oštećenja DNA uzrokovane UV zračenjem su ciklobutan-pirimidinski dimeri (CPD) i 6-4 fotoprodukti (6-4PP, adukti pirimidina) i njegovi izomeri.¹⁷

Ionizirajuće zračenje također stvara različite oblike oštećenja DNA, od kojih je najštetniji DSB, jer ne ostavlja cjelovitim komplementarni lanac koji bi se mogao koristiti kao predložak za popravak, što DSB, u odnosu na ostale do sad opisane lezije, čini kompliciranijim za popraviti. DSB se precizno popravlja mehanizmom homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination*, HR) koja se temelji na razmjeni nukleotidnih sekvenci (engl. *crossing over*) između dva slična ili identična dijela DNA (kromosomi parnjaci).¹⁸ Manje precizni mehanizmi popravka DSB-a uključuju povezivanje nehomolognih krajeva (engl. *non homologous end joining*, NHEJ) i povezivanje krajeva temeljeno na mikrohomologiji (engl. *microhomology-mediated end joining*, MMEJ).^{18,19} Ako se DSB ne popravi na vrijeme, u konačnici može doći do stanične smrti. Uzrok DSB-a, osim ionizirajućeg zračenja, mogu biti radiomimetički lijekovi koji napadaju radikale deoksiriboze.¹⁸ Osim toga, DSB može nastati i u stanicama tretiranim inhibitorima enzima TOP2 (detaljnije u odjeljku 2.3.), kao i tijekom replikacije DNA ako ista već sadrži SSB nastao nekim drugim načinom. SSB tijekom replikacije nastaje uobičajenim enzimskim djelovanjem nukleaza tijekom V(D)J rekombinacije specifične za limfocite T i B.¹⁸ Na krajevima kromosoma, DSB-ovi su povezani sa starenjem ljudskih stanica jer su ti krajevi izloženi kada telomere postanu kritično kratke tijekom replikativnog starenja. DSB se ne javlja tako često kao ostale navedene lezije, ali zahtjeva kompleksne i energetski zahtjevne mehanizme popravka i vrlo je toksičan ako se ne popravi bez greške (engl. *error-free*)^{18,20}

Opisana oštećenja DNA proučavana su od 1950-ih godina, a mehanizmi popravka tih oštećenja istraženi su u velikoj mjeri. Važnost ovih istraživanja potvrdila je i Nobelova nagrada za kemiju koju su 2015. godine dobili T. E. Lindahl, P. L. Modrich i A. Sancar za otkrivanje višestrukih mehanizama popravka oštećenja DNA: fotoreaktivacije, popravka krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR), popravka izrezivanjem baze (engl. *base excision repair*, BER) i popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER).²¹ Nedavno, 2016. godine, otkriven je novi, specifični put DNA popravka kod sisavaca za do tada slabo istraživani tip oštećenja, unakrsno vezanje između DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC).²²⁻²⁴ DPC nastaje ireverzibilnim kovalentnim vezanjem proteina na dušičnu bazu, šećer ili prekinutu fosfodietersku vezu u okosnici DNA. DPC može nastati pod utjecajem egzogenih agensa, poput ionizirajućeg i UV zračenja, određenih metalnih iona i kemoterapeutika na bazi platine, kao i djelovanjem endogenih reaktivnih metabolita poput formaldehida i acetaldehida.^{3,22} Ova vrsta oštećenja istražuje se u sklopu projekta u čijem obimu je izrađen i ovaj diplomski rad, te će o njoj više riječi biti u sljedećim odjeljcima.

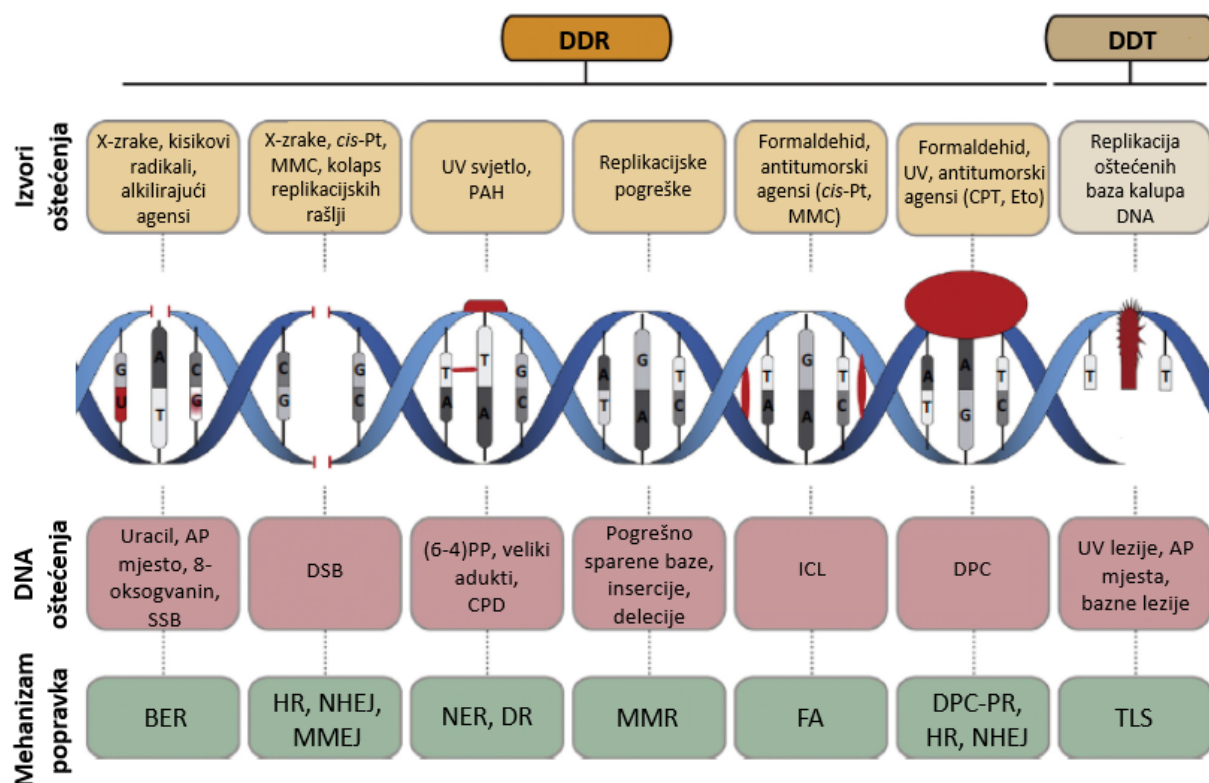
Osim DPC-a, može se javiti i DNA-DNA umreženje unutar istog lanca (engl. *DNA intrastrand crosslink*) ili između dvaju lanaca DNA (engl. *DNA interstrand crosslink*; ICL). DNA umreženje nastaje kada različiti egzogeni (kemoterapijski lijekovi) ili endogeni agensi (prirodni produkti metabolizma) reagiraju s dva nukleotida DNA, tvoreći ireverzibilnu kovalentnu vezu između njih. Takvi adukti ometaju replikaciju i transkripciju DNA, te ako se ne poprave, vode do stanične smrti. Kemoterapija koja se temelji na ICL-u jedan je od najčešće korištenih oblika liječenja karcinoma, posebno leukemije.^{25,26} Slično DPC-u, određeni toksični spojevi kojima je čovjek svakodnevno izložen, poput policikličkih aromatskih ugljikovodika (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH), sposobni su formirati adukte s DNA i uzrokovati oksidativna oštećenja.²⁷

2.2. Popravak DNA

Oštećenje DNA može inducirati nekoliko staničnih odgovora koji omogućuju stanici da eliminiira ili se izbori s oštećenjem. Te reakcije na oštećenje DNA uključuju: (i) uklanjanje oštećenja DNA i obnovu kontinuiteta DNA dupleksa, (ii) aktivaciju kontrolne točke oštećenja DNA, koja zaustavlja napredovanje staničnog ciklusa kako bi se omogućio popravak i sprječavanje prijenosa oštećenih ili nepotpuno repliciranih kromosoma, (iii) transkripcijski odgovor, koji uzrokuje promjene u profilu transkripcije koje mogu biti korisne za stanicu, i (iv) apoptozu (programirani proces smrti stanice), kojom se eliminiraju teško oštećene ili jako deregulirane stanice. Dakle, oštećenja DNA aktiviraju odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA damage response*; DDR) koji uključuje različite mehanizme popravka.^{3,28} Mehanizmi popravka DNA obuhvaćaju: izravni popravak (engl. *direct repair*, DR) ili fotoreaktivaciju, popravak izrezivanjem baze (BER), popravak izrezivanjem nukleotida (NER), popravak krivo sparenih baza (MMR), popravak dvolančanog loma koji obuhvaća homolognu rekombinaciju (HR), povezivanje nehomolognih krajeva (NHEJ), povezivanje krajeva temeljeno na mikrohomologiji (MMEJ) te popravak umreženja dvaju lanaca DNA (engl. *ICL repair*, ICLR), koji se još naziva Fanconi anemija put popravka (FA). Unakrsno vezanje DNA i proteina dominantno se uklanja popravkom ovisnim o proteolizi (engl. *DPC proteolysis repair*, DPC-PR).^{3,22-24,29,30} Popravak DPC-a detaljnije je opisan u odjeljku 2.4. BER, NER i MMR dijele sličan princip mehanizama popravka koji uključuju prepoznavanje oštećenja jednog lanca DNA i izrezivanje oštećenja.³¹ DNA označena kovalentnim modifikacijama baza aktivira BER ili NER, a nemodificirane krivo sparene baze aktiviraju MMR. Nakon izrezivanja, ova tri

mehanizma popravka zahtijevaju ponovnu sintezu DNA koja će nadoknaditi uklonjene nukleotide te ligaciju kako bi se povezala novosintetizirana DNA.³¹

Neke vrste oštećenja DNA mogu ostati nedetektirana, pa se tada nakupljaju te mogu uzrokovati povećanu stopu mutacija.¹ Mehanizam koji zaobilazi nepopravljena oštećenja tijekom DNA replikacije, kako ne bi došlo do nastanka DSB-a, predstavlja toleranciju na oštećenje DNA (engl. *DNA damage tolerance*, DDT). Tako se omogućava da replikacijska mašinerija napreduje i ostavlja oštećenja koja se kasnije popravljaju putem postreplikativnog popravka.³ Eukariotske stanice posjeduju dvije strategije DDT-a: (i) rekombinacijski ovisan (precizni) način koji koristi homologni predložak, i (ii) translezijsku sintezu DNA (engl. *translesion synthesis*, TLS) unutar koje specijalizirane DNA-polimeraze (TLS-polimeraze) zaobilaze takva oštećenja DNA tijekom replikacije. TLS-polimeraze su sklone pogreškama pa je TLS potencijalno mutagen.^{3,32}



Slika 1. Shematski prikaz najčešćih oštećenja DNA, njihovih uzroka i odgovarajućih puteva popravka.

Oznake: (6-4)PP – 6-4 fotoprodukt, BER – popravak izrezivanjem baze, *cis*-Pt – *cis*-diamindikloroplatina(II) (cisplatina), CPD – ciklobutan-pirimidinski dimer, CPT – kamptotecin, DPC – unakrsno vezanje DNA i proteina, DPC-PR – popravak DPC-a ovisan o proteolizi, DDR – odgovor na oštećenje DNA, DDT – tolerancija na oštećenje DNA, DSB – dvolančani lom DNA, Eto – etopozid, FA – Fanconi anemija, HR – homologna rekombinacija, ICL – kovalentno vezanje dvaju lanaca DNA, MMC – mitomicin C, MMEJ – povezivanje krajeva temeljeno na mikrohomologiji, MMR – popravak krivo sparenih baza, NER – popravak izrezivanjem nukleotida, NHEJ – povezivanje nehomolognih krajeva, SSB – jednolančani lom DNA, TLS – translezijska sinteza DNA (preuzeto i prilagođeno prema referenci 3).

2.3. Unakrsno vezanje DNA i proteina

Genomska DNA povezana je s različitim proteinima koji su uključeni u njezino smatanje i transakcije (replikacija, transkripcija, rekombinacija i popravak). Povezanost DNA i proteina je reverzibilna, a kada je potrebno, proteini disociraju ili se premještaju duž lanca DNA, ostavljajući otvoren nukleotidni slijed dostupan za odgovarajuću transakciju. Ovaj postupak osigurava transkripciju i propagaciju genetskih informacija. Međutim, izlaganje stanica genotoksičnim agensima može uzrokovati da proteini postanu ireverzibilno kovalentno vezani za DNA, stvarajući unakrsne veze između DNA i proteina (DPC).³³ Proteini koji su ireverzibilno kovalentno vezani na DNA predstavljaju specifični tip masivnog oštećenja DNA, koja predstavlja fizičku prepreku za nastavak DNA transakcija. Ako se ne popravi, DPC među ostalim uzrokuje zaustavljanje replikacijske mašinerije (replisoma), što posljedično može dovesti do dvostrukog loma DNA, koji predstavlja najcitotoksičnije oštećenje DNA.³ Kao što je već spomenuto, unakrsno vezanje DNA i proteina može biti uzrokovano raznim egzogenim agensima, poput ionizirajućeg i UV zračenja, određenih metalnih iona i kemoterapeutika na bazi platine kao što su cisplatina i derivati. DPC mogu inducirati i endogeno proizvedeni reaktivni metaboliti poput formaldehida ili acetaldehida³⁴ te promjene u DNA uzvojnici kao što su npr. AP mjesta i 8-oksogvanin.³

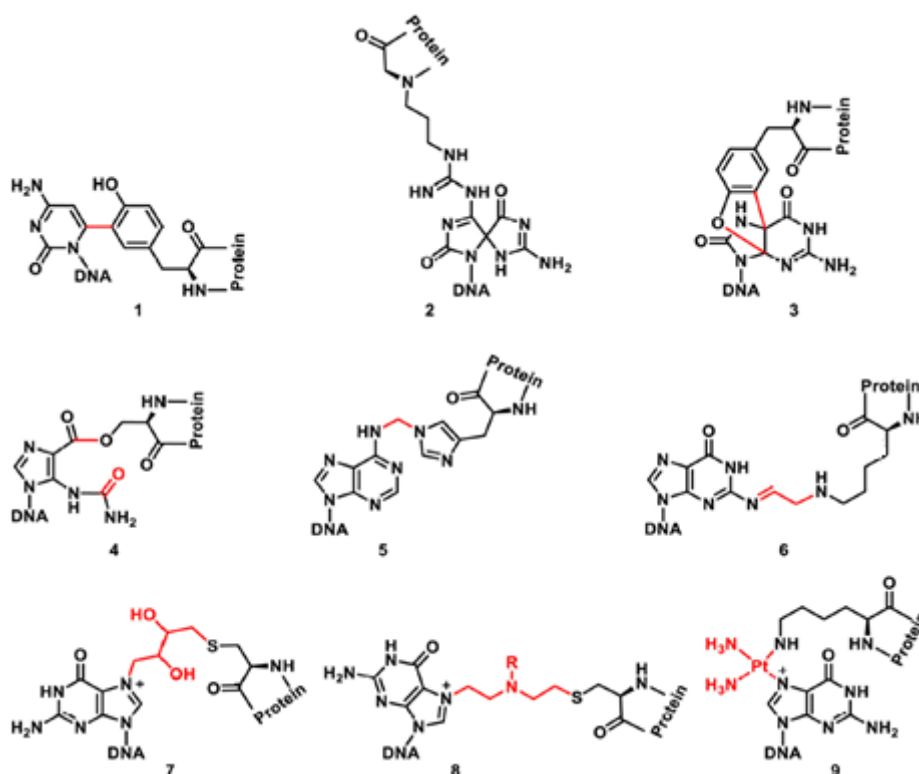
Aldehidi, reaktivne kisikove i dušikove vrste te promjene u DNA uzvojnici među najčešćim su endogenim izvorima DPC-ova.^{3,35} Aldehidi nastaju kao nusprodukti u staničnim metaboličkim putevima, uključujući demetilaciju histona, popravak tipa AlkB, metabolizam aminokiselina i peroksidaciju lipida. Izmjerena koncentracija endogenog formaldehida u ljudskoj plazmi iznosi i do 100 μM , a u nekim tkivima može doseći i do 400 μM .³ Slično tome, ROS i RNS su metabolički suprodukti staničnog disanja, imunoloških odgovora i upale. Dok aldehidi, ROS i NO-sintaze mogu izazvati vezanje bilo kojeg proteina u blizini DNA, promjene DNA uzvojnice, kao što su AP mjesta i oksanini (gvaninska oštećenja izazvana dušikovim oksidom), uzrokuju ireverzibilno kovalentno vezanje histona, DNA-glikozilaze, DNA-polimeraze β i proteina visoke mobilnosti (engl. *high mobility protein*, HMG).³ Aldehidi reagiraju s proteinima u blizini DNA, što rezultira stvaranjem DPC-a i baznih adukata, te u manjoj mjeri intra- i interlančanih kovalentnih veza, jednolančanih i dvolančanih lomova DNA.^{36,37} Aldehidi reagiraju s bočnim ograncima lizina, cisteina i histidina tvoreći proteinske adukate, koji zatim reagiraju s amino skupinom baze DNA, što rezultira ireverzibilnom kovalentnom vezom promjenjive stabilnosti. Ciljna mjesta za vezanje proteina na molekuli

DNA uključuju N-7 gvanina, C-5 metilnu skupinu timina i egzocikličke amino skupine citozina, gvanina i adenina, čime se dodatno proširuje složenost i raznolikost ireverzibilnih kovalentnih veza. ROS i RNS mogu reagirati s DNA (gvanin, citozin i timin) i/ili proteinima (bočni ogranci lizina i tirozina), rezultirajući stvaranjem slobodnih radikala ili elektrofilnih oštećenja koji zatim mogu reagirati s drugom molekulom proteina i DNA, stvarajući tako DPC.^{35,38}

Izloženost prijelaznim metalnim ionima kao što su krom i nikal može uzrokovati stvaranje DPC-a u stanicama. Cr(VI) se transportira u stanice putem nespecifičnog nosača aniona, gdje se može lako reducirati u Cr(III). Cr(III) tvori koordinacijske komplekse s fosfatnim skupinama i gvaninskim bazama DNA, nakon čega slijedi vezanje proteina s aminokiselinskim bočnim ograncima te nastajanje DPC-a. Osim toga, Cr(VI)/Cr(III) redoks-proces proizvodi ROS, koji može pridonijeti stvaranju DPC-a mehanizmom slobodnih radikala.³⁵

Terapije za liječenje raka, uključujući ionizirajuće zračenje i antikancerogene lijekove, kao i izlaganje UV zračenju, glavni su egzogeni čimbenici koji izazivaju DPC. Ionizirajuće zračenje izravno inducira DPC ozračivanjem molekule DNA, što stvara nestabilne DNA kationske radikale, ili neizravno, prijenosom energije zračenja na molekule vode, što zauzvrat povećava lokalne koncentracije ROS-a. Antikancerogeni lijekovi poput mitomicina C, platinskih spojeva (npr. cisplatina), dušikovih derivata, inhibitora DNMT-a (5-aza-dC), TOP1 i 2 (kamptotecin i etopozid), kao i PARP-a (olaparib), uzrokuju DPC-ove kroz specifične mehanizme.^{3,29} UV zračenje pobuđuje baze DNA, najčešće timidine koji se zbog toga ireverzibilno kovalentno vežu na aminokiseline, posebno cistein, lizin, fenilalanin, triptofan i tirozin.³

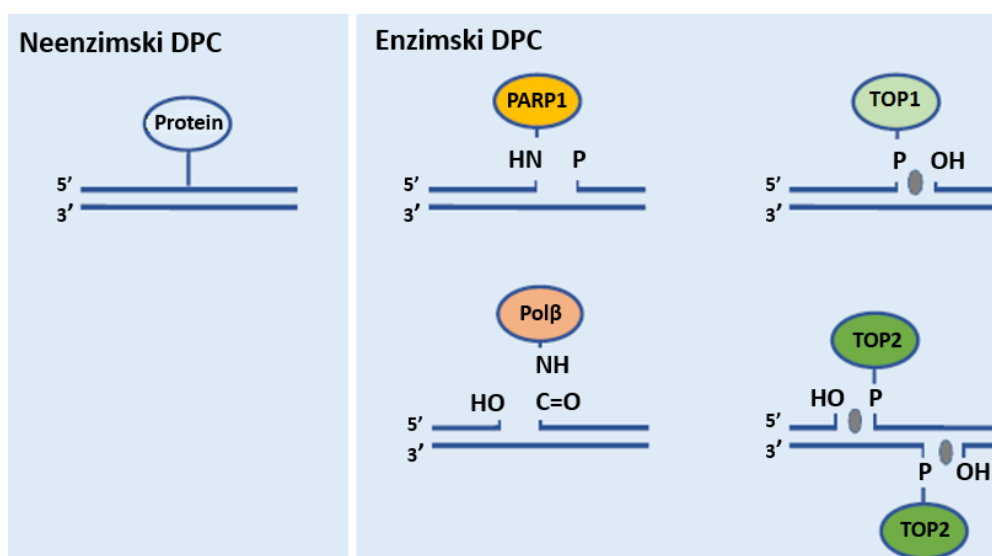
DPC je veoma složeno oštećenje DNA. Ta složenost je rezultat raznolikosti nastalih formi u pogledu fizikalno-kemijskih svojstava proteina (veličina, oblik, konformacija, naboj, stupanj nereda), vrste i broja ireverzibilnih kovalentnih veza (slika 2) te vremenske raspodjele pojave DPC-a (ovisnost o staničnom ciklusu). DPC se može podijeliti u dvije temeljne skupine: neenzimske i enzimске DPC-ove. Opći, neenzimski DPC uključuje bilo koji protein koji se nalazi u blizini DNA prilikom izloženosti različitim endogenim ili egzogenim agensima. Dokaz toga je analiza DPC-a masenom spektrometrijom, koja je identificirala brojne proteine vezane na DNA, uključujući histone, transkripcijske faktore, proteine zaslužne za popravak i replikaciju DNA, kao i proteine koji se inače ne vežu na DNA.³ S obzirom na veliku količinu histona u neposrednoj blizini DNA, nije iznenađujuće da su upravo oni među najzastupljenijim DPC-ovima.³³



Slika 2. Kemijske strukture unakrsnih veza DNA i proteina induciranih reaktivnim kisikovim vrstama (1–3), reaktivnim dušikovim vrstama (4), formaldehidom (5), akroleinom (6), 1,2,3,4-diepoksi-butanom (7), dušikovim derivatima (8) i cisplatinom (9) (preuzeto i prilagođeno prema referenci 35).

Primjeri specifičnog, enzimskog DPC-a su ireverzibilni kovalentni kompleksi DNA-topoizomeraza tipa 1 i 2 i DNA (engl. *topoisomerase 1 / 2 DNA covalent complex*, TOP1-cc i TOP2-cc), adukti DNA i DNA-polimeraze β (Pol β), DNA-metiltransferaze (DNMT) i poli(ADP-ribozil)-polimeraze 1 i 2 (PARP1 i PARP2).^{3,39} Tijekom svojih enzimskih ciklusa, spomenuti enzimi se reverzibilno vežu na DNA u svrhu obavljanja zadane funkcije. Međutim, korištenjem antikancerogenih lijekova kao što su kamptotecin (CPT), etopozid (Eto) i 5-aza-2'-deoksicitidin (5-aza-dC), formiraju se TOP1-cc, TOP2-cc i DNMT-DNA adukti, tj. kovalentne veze DNA i enzima postaju ireverzibilne.³ Novija istraživanja su pokazala da nekoliko spojeva koji su razvijeni kao katalitički inhibitori također induciraju unakrsno vezanje PARP1 i PARP2 na DNA.^{29,39} U fiziološkim uvjetima, najzastupljeniji su neenzimski DPC-ovi, a uglavnom uključuju proteine vezane na cjelovitu DNA, uz iznimku enzima DNMT, koji se isto veže na cjelovitu DNA.^{40,41} Kod enzimskog DPC-a postoji više različitih načina vezanja: TOP1 i PARP1 se vežu na 3'-kraj jednolančano prekinute DNA, Pol β se veže na 5'-kraj jednolančano prekinute DNA, a TOP2 na oba 5'-kraja dvolančano prekinute DNA (slika 3).⁴²⁻⁴⁴ Postoji i

vezanje nalik DPC-u koje nastaje kada se protein toliko stabilno, ali nekovalentno veže na DNA da se zapravo ponaša kao stvarni DPC.²⁹

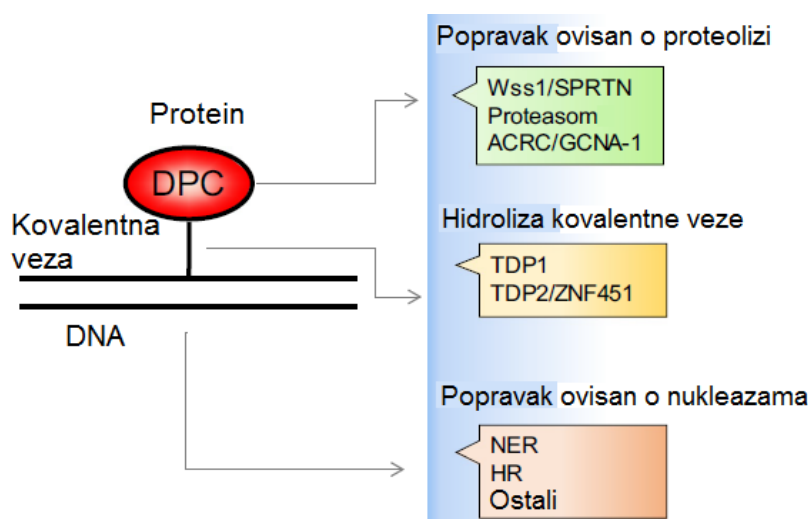


Slika 3. Shematski prikaz tipova DPC-a. Oznake: DPC – unakrsno vezanje DNA i proteina, PARP1 – poli(ADP-ribozil)-polimeraza 1, Polβ – DNA-polimeraza β, TOP1 – DNA-topoizomeraza 1, TOP2 – DNA-topoizomeraza 2 (preuzeto i prilagođeno prema referenci 44).

TOP1-cc i TOP2-cc spadaju među najčešće enzimске DPC-ove. Ti enzimi upravljaju topološkim stanjem DNA u stanici tako što cijepaju jedan lanac DNA i provlače dio DNA kroz taj lom (TOP1) ili cijepaju oba lanca DNA i provlače drugi dvostruki segment DNA kroz taj lom (TOP2).⁴⁵ Mehanizam je sljedeći: bočni ogranak katalitičkog tirozina u DNA-topoizomerazi postaje prolazno kovalentno vezan na fosfat DNA na 3' (TOP1) ili 5'-kraju DNA (TOP2) kao rezultat nukleofilnog napada tirozina na fosfodietersku vezu. Ovaj nestabilni reakcijski intermedijer inače normalno disocira, a DNA-topoizomeraza povezuje dva razdvojena kraja DNA. Međutim, prilikom svog normalnog djelovanja, kamptotecin (TOP1) i etopozid (TOP2) vežu se u katalitičko mjesto na sučelju enzim-DNA, sprječavajući religaciju i ostavljajući enzim ireverzibilno kovalentno vezanim za DNA.⁴⁶ DNA-topoizomeraze mogu također ostati vezane na DNA tijekom svojih enzimskih ciklusa, ako su u blizini oksidativnih radikala ili ako naiđu na velike adukte, ribonukleotide ili AP mjesta.³ S obzirom na veliku potražnju za relaksacijom DNA od strane DNA-topoizomeraza tijekom DNA transakcija, broj DNA-topoizomeraza vezanih za DNA je velik. Nedavno je potvrđeno da je učestalost endogenih TOP2-cc-ova mnogo veća nego što se smatralo i da oni uzrokuju tešku genomsku nestabilnost ako se ne poprave.^{47,48}

2.4. Popravak unakrsnog vezanja DNA i proteina

DPC je poslije AP mjesta najčešće oštećenje DNA, a zbog svoje veličine i raznolikosti veoma je izazovno za popravak.^{3,30} Sve donedavno, mehanizmi kojima se popravljaju DPC-ovi u višestaničnim životinjama bili su nepoznati.³ Istraživanje u ovom području dugo je bilo otežano zbog nemogućnosti kemijskog definiranja DPC-a u netaknutim stanicama i tkivima. Stanice obično otkrivaju raznolika oštećenja DNA pomoću specifičnih senzora, i to s visokim afinitetom i preciznošću. Raznolikost DPC-a, odnosno činjenica da bilo koji nuklearni protein potencijalno može biti povezan s DNA, čini takav specifični pristup malo vjerojatnim. Unatoč raznolikosti uključenih proteina i DNA topologije (SSB, DSB, AP mjesta, DNA:RNA hibridi, itd.), DPC uvijek sadrži tri komponente koje se mogu koristiti kao ciljevi za popravak.²⁹ Prva komponenta je DNA, te se protein vezan na DNA u DPC-u može ukloniti nukleazama koje izrezuju dio DNA s umreženim proteinom.²⁹ Druga komponenta, ona proteinska, može se razgraditi pomoću SPRTN i Wss1 proteaza ili potencijalno proteasomom.²⁹ Iako su središnje komponente DPC-a proteini, mehanizmi koji proteolitički uklanjaju DPC otkriveni su tek nedavno te nisu u potpunosti razjašnjeni.⁴⁹ Treća komponenta DPC-a, ireverzibilna kovalentna veza između DNA i proteina, može se izravno hidrolizirati kako bi se uklonio peptidni fragment preostao nakon proteolize i oslobodila DNA (slika 4).²⁹



Slika 4. Shematski prikaz tipova popravaka DPC oštećenja. Oznake: DPC – unakrsno vezanje DNA i proteina, HR – homologna rekombinacija, NER – popravak izrezivanjem nukleotida, TDP1 i 2 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and 2*) – tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1 i 2, ZNF451 (engl. *zinc finger protein 451*) – SUMO (engl. *small ubiquitin-like modifier*)-ligaza, Wss1 (engl. *weak suppressor of SMT3 protein*)/SPRTN, ACRC (engl. *acidic repeat containing protein*)/GCNA-1 (engl. *germ cell nuclear antigen 1*) – metaloproteaze (preuzeto i prilagođeno prema referenci 44).

2.4.1. Hidroliza kovalentne veze između DNA i proteina

Kemijske strukture unakrsnih veza DNA i proteina vrlo su raznolike, što onemogućava uključivanje specifičnog enzima u uklanjanje svake pojedine ireverzibilne kovalentne veze (slika 3). Međutim, neke vrste DPC-a javljaju se često, a stanice su posljedično razvile specifične enzime kako bi ih uklonile. Takvi su enzimi tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1 i 2 (TDP1 i TDP2), koji mogu hidrolizom specifično ukloniti ireverzibilnu kovalentnu vezu između DNA i TOP1, odnosno TOP2, ali uglavnom uz prethodnu proteolizu TOP1 i TOP2 proteinskog dijela DPC-a putem SPRTN proteaze.^{22,44}

TDP1 hidrolizira ireverzibilnu kovalentnu vezu na 3'-kraju DNA.⁵⁰ Navedeni enzim ne samo da može hidrolizirati 3'-tirozin, već je aktivan i u širokom rasponu drugih 3'-DNA-adukata, poput onih nastalih oksidativnim oštećenjem DNA.⁴⁴ TDP1 djeluje kao monomer i procesira supstrate formiranjem prolaznih kovalentnih intermedijera. Nakon hidrolize uz TDP1, DNA ima 3'-fosfatni kraj koji se uklanja bifunkcionalnom polinukleotid-kinazom/fosfatazom (engl. *bifunctional polynucleotide kinase/phosphatase*, PNKP) kako bi nastao 3'-hidroksilni kraj potreban za produženje lanca DNA-polimerazom.^{44,51} TDP1 također može ukloniti 5'-fosfotirozilne veze, ali mnogo neučinkovitije od TDP2, što indicira da bi TDP1 mogao djelovati kao rezervna opcija za uklanjanje TOP2-cc-a. Mutacije u katalitičkoj domeni TDP1 dovode do nakupljanja intermedijera TDP1-DNA i posljedično do rijetke autosomno recesivne neurodegenerativne bolesti, spinocerebralne ataksije s aksonskom neuropatijom.⁵²

Funkcija TDP2 u popravku DPC-a otkrivena je prilikom identifikacije supresora osjetljivosti na kamptotecin u *tdp1*- i *rad1*-deficijentnim stanicama kvasca s ekspresijom ljudskih cDNA.⁵³ TDP2 pokazuje izrazitu aktivnost prema 5'-fosfotirozilnim krajevima DNA, a TDP2-deficijentne stanice osjetljive su na liječenje TOP2 inhibitorima. Za razliku od TDP1, TDP2 ima usku supstratnu specifičnost i ne tvori prolazne kovalentne intermedijere, a za njegovu katalitičku aktivnost potrebna su dva dvovalentna metala (Mg^{2+} i Mn^{2+}). TDP2, kao i TDP1, sadržava 3'-fosfodiesteraznu aktivnost, ali je višestruko slabija nego kod TDP1. TDP2 stvara 5'-fosfatne krajeve DNA koji se mogu izravno procesirati DNA-ligazama.⁵¹ Homozigotne mutacije *tdp2* gena povezane su s autosomno recesivnom spinocerebralnom ataksijom 23.⁵⁴ Nedavno je pokazano da SUMO-ligaza ZNF451 može posredovati uklanjanjem TOP2-cc-a pomoću TDP2. ZNF451 se izravno veže na SUMOilirani TOP2-cc, što pojačava hidrolitičku aktivnost TDP2 i potiče njegovo regrutiranje na mjesta oštećenja.⁵⁵ Slično kao i popravak DPC-a mehanizmom NER (više u odjeljku 2.4.2.), TDP1 i TDP2 ograničeni su

dostupnošću supstrata koje ireverzibilno kovalentno vezani proteini mogu učiniti nedostupnima zbog svoje veličine. TDP1 i TDP2 ne mogu ukloniti netaknute TOP1-cc-ove, odnosno TOP2-cc-ove, već im je potrebno prethodno hidrolitičko skraćivanje proteina proteazama, uz potencijalnu iznimku u slučaju ZNF451 i TDP2⁵⁵ koji uklanjaju TOP2-cc *in vitro* bez SPRTN proteaze.^{3,22-24,29,55}

2.4.2. Popravak ovisan o nukleazama

Kanonski putevi popravka oštećenja DNA, homologna rekombinacija (HR) i popravak izrezivanjem nukleotida (NER), sudjeluju i u popravku (ili toleranciji) unakrsnog vezanja DNA i proteina.^{34,49} Prvi uvid u njihovu uključenost došao je iz ranih genetskih istraživanja bakterije *Escherichia coli*. Karakterizirajući preživljavanje i mutagene učinke DPC-inducirajućih agensa kao što su formaldehid i 5-aza-dC, otkriveno je da su UvrA i RecA mutanti, koji su zbog navedenih mutacija deficitarni u NER-u, odnosno HR-u, osjetljivi na liječenje formaldehidom.⁵⁶ Međutim, RecA, ali ne i UvrA mutanti, osjetljivi su na liječenje 5-aza-dC-om.⁵⁷

Mehanizam NER-a kod prokariota odvija se na sljedeći način: kompleks (UvrA)₂ prepoznaje oštećenu DNA i zaustavlja se, a to aktivira UvrB-ovisnu helikazu koja počinje odmatati/zapetljivati DNA, čime se omogućava UvrB proteinu prepoznavanje oštećenja. Veza između UvrB i oštećenja dovodi do konformacijske promjene koja slabi (UvrA)₂:UvrB kompleks, te dolazi do disocijacije (UvrA)₂. Otpuštanje (UvrA)₂ dovodi do izomerizacije i smanjenja stabilnosti UvrB:DNA kompleksa, što omogućava vezanje UvrC proteina koji započinje izrezivanje oba lanca DNA i uklanjanje proteina.⁵⁸ Mehanizam NER-a kod eukariota vrlo je sličan onome kod prokariota, ali se razlikuje po vrsti i broju proteina koji su uključeni u sam proces.⁵⁸ Ograničenje NER-a u uklanjanju velikih proteina prisutno je zbog nemogućnosti regrutacije Uvr proteina na mjesto oštećenja zbog steričkih smetnji.^{44,59} Kod prokariota, NER uklanja proteine manje od 12 do 14 kDa⁶⁰, dok je kod eukariota *in vitro* pokazano da može ukloniti proteine veličine do 11 kDa.⁶¹ Budući da je veličina umreženog proteina u NER-ovisnom DPC popravku ograničena, uključenost samo NER-a u popravku DPC-a nije vjerojatna, već je najvjerojatnije potrebna prethodna proteolitička obrada umreženih proteina.^{44,61}

Nedavno su tri istraživačke grupe pokazale ulogu nukleaze MRE11 u popravku TOP2-cc-a⁶²⁻⁶⁴, te su pretpostavili potencijalnu ulogu iste u uklanjanju i drugih tipova DPC-a.⁶⁵ Proteinski

adukti povezani s 3' ili 5'-krajem DSB-a snažno stimuliraju endonukleaznu aktivnost MRN-kompleksa (Mre11:Rad50:Nbs1), a Mre11 je ključna za cijepanje DNA. Endonukleolitički rez koji pokreće popravak može se pojaviti na lancu koji sadrži DPC ili na komplementarnom lancu. Prekinuti lanac se izrezuje u smjeru 3' → 5', nakon čega slijedi drugi endonukleolitički rez na komplementarnom lancu. Mehanizam je koordiniran, a početni rez snažno potiče endonukleolitičko cijepanje komplementarnog lanca. Dakle, MRN-kompleks uklanja DNA s vezanim proteinom čime se stvara klasični DSB, koji se može popraviti kanonskim mehanizmima.²⁹ Popravak TOP-cc-a izazvanog antitumorskim agensima u T4 bakteriofazima ovisi o gp46/47 (engl. *gene products 46 and 47*) kompleksu (homologu MR-a).⁶⁶ Također, *E. coli* SbcCD-kompleks (homolog MR-a) može nukleolitički obraditi krajeve DNA vezane na protein, a Mre11-deficijentni sojevi kvasca vrlo su osjetljivi na liječenje TOP inhibitorima.^{67,68} Pored toga, DSB-ovi s proteinima vezanim za 5'-krajeve koje je stvorio Spo11 (reagira poput TOP2) tijekom mejotičke rekombinacije, endonukleolitički se odcjepljuju kompleksom Mre11:Rad50:Xrs2 (homolog MRN-a). Nadalje, biokemijska analiza ekstrakta *Xenopus* jajašaca pokazala je suradnju MRN kompleksa, proteina CtIP i BRCA1 u uklanjanju TOP2-cc-a i naknadnom izrezivanju krajeva DSB-a. U skladu s tim promatranjima, MRN kompleks također olakšava uklanjanje TOP2-cc-a kod sisavaca.⁶⁹ Međutim, delecija gena *mre11* u stanicama sisavaca ne povećava ukupni broj DPC-ova formiranih *in vivo*, što indicira da Mre11 nema centralnu ulogu u DPC popravku.²²

2.4.3. Popravak ovisan o proteolizi

Proteoliza ireverzibilno kovalentno vezanih proteina izvorno se pripisivala proteasomu.⁴⁴ 26S proteasom je glavna proteolitička mašinerija za reguliranu razgradnju proteina u eukariotskim stanicama. Sastoji se od jedne 20S podjedinice (jezgre) i dvije regulatorne 19S podjedinice. Jezgra je šuplja i tako omogućava razgradnju proteina, a otvori na krajevima jezgre omogućuju ulazak ciljnom proteinu. Svaki kraj jezgre povezan je s regulatornom podjedinicom koja sadrži više ATPaznih mjesta i mjesta za vezanje ubikvitina. Regulatorne podjedinice prepoznaju poliubikvitilirane proteine i prenose ih u katalitičku jezgru u svrhu razgradnje. Postoje indirektno indikacije da proteasom sudjeluje u razgradnji DPC-a, a to su ubikvitilacija TOP1-cc-a nakon tretiranja eukariotskih stanica inhibitorima TOP1, kao i ometanje proteolize TOP1-cc-a nakon inhibicije aktivnosti proteasoma pomoću MG132 i laktacistina.⁷⁰ Nadalje, razgradnja TOP1-cc-a je blokirana kada je E1-ubikvitin aktivirajući eznim inaktiviran, a

primijećena je i proteasom-ovisna razgradnja TOP2-cc-a te formaldehidom induciranih DPC-ova.⁷⁰ Međutim, nedostatak citosolnih ATP-ovisnih proteaza u bakterijama, koje su homolog eukariotskih proteasoma, ne utječe na preživljavanje stanica nakon tretmana formaldehidom ili 5-aza-dC-om, što znači da ATP-ovisne proteaze ne sudjeluju u DPC popravku kod bakterija.⁷¹ Također, inhibicija aktivnosti proteasoma u ekstraktu *Xenopus* jajašaca nema učinak na uklanjanje DPC-a, ali se dodatkom ubikvitin-vinil sulfona, inhibitora enzima deubikvitilacije, blokira razgradnja proteina u DPC-u.⁷² Dodatak slobodnog ubikvitina u reakciju obnavlja mogućnost razgradnje proteina. Stoga se čini da je za popravak DPC-a potrebna prisutnost slobodnog ubikvitina, ali ne i aktivnost deubikvitilacijskih enzima i/ili proteasoma. Ovi kontradiktorni zaključci mogu biti posljedica upotrebe inhibitora proteasoma, koji ne samo da inhibiraju aktivnost proteasoma, već i iscrpljuju slobodne ubikvitine, kao i dNTP rezervoar u stanici te time vjerojatno utječu na replikaciju, transkripciju te aktivnost proteasoma.⁴⁴ Novija istraživanja su pokazala da razgradnja poliubikvitiliranih DPC-ova posredovana proteasomom zahtijeva djelovanje E3-ligaze TRAIP⁷³, međutim nije jasno da li proteasomalna razgradnja nastupa nakon SPRTN-ovisne proteolize. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila točna uloga i mehanizam djelovanja proteasoma u popravku DPC-a.⁴⁴

Posljednjih godina identificiran je specifični proteolitički put s pronalaskom proteina Wss1 u kvascu i SPRTN-a (DVC1/C1orf124) u višim eukariotima.²²⁻²⁴ Ovaj put uključuje izravnu proteolizu proteina koji su ireverzibilno kovalentno zarobljeni na lancu DNA. Prva je identificirana DNA-ovisna metaloproteaza Wss1, a najprije se povezivala sa SUMO-putem u kvascu.^{44,74} Funkcija Wss1 u popravku DPC-a otkrivena je u TDP1-deficijentnim stanicama kvasca.⁷⁵ Kodelecija *wss1* i *tdp1* gena dovodi do izuzetno sporog rasta stanica kvasca i preosjetljivosti na liječenje CPT-om, induktorom TOP1-cc-a, što se može ublažiti delecijom *top1* gena.⁷⁵ Također, Wss1-deficijentne stanice osjetljive su na formaldehid, modelni DPC induktor.⁴⁴ Uz to, pokazano je da Wss1 surađuje s Cdc48 (p97/VCP u višim eukariotama) u obradi genotoksičnih SUMO-konjugata (više u odjeljku 2.5.3.).⁷⁵ SUMOilacija supstrata na oštećenim mjestima DNA potrebna je za regrutaciju Wss1, a presudna je i za njegovu funkciju u popravku DPC-a u kvascu. Otkriveno je da delecija gena *wss1* čini stanice kvasca osjetljivim na tretman hidroksiurejom, inhibitorom replikacije, a delecija još jednog gena kvaščeve proteaze, *ddi1*, čini stanice još osjetljivijim na ovaj tretman.⁷⁶ Ddi1 (Ddi1 i Ddi2 u sisavcima) je nedavno otkrivena aspartat proteaza u kvascu, koja uz proteasom djeluje kao alternativa Wss1 u popravku DPC-a.⁷⁷

Bioinformatička analiza, koja se temelji na sličnosti sekvenci i organizaciji domena, pokazala je da su Wss1 i SPRTN funkcionalni homolozi, dok je pitanje genetske ortologije još uvijek nerazjašnjeno.^{3,78} Oba proteina sadrže metaloproteaznu domenu (WLM u Wss1, domena slična SprT u SPRTN-u) s konzerviranim HEXXH (X – bilo koja aminokiselina) aktivnim mjestom, VCP-interakcijski motiv (VIM) u Wss1, odnosno SHP (engl. *suppressor of high-copy PPI*) motiv odgovoran za interakciju s ATPazom p97 (više u odjeljku 2.5.3.) i SUMO-interakcijski motiv (SIM) u Wss1, odnosno ubikvitin-interakcijsku domenu (engl. *ubiquitin-binding zinc finger*, UBZ) u SPRTN-u. Za razliku od Wss1, SPRTN sadrži i cink-vezujuću domenu (engl. *zinc binding domain*, ZBD) u C-terminalnom dijelu koja predstavlja DNA-vezujuću domenu i ograničava pristup aktivnom mjestu.⁷⁹ SPRTN je proteaza aktivna u S-fazi staničnog ciklusa, a kako se većina DPC-a uklanja tijekom S-faze, SPRTN predstavlja centralnog čimbenika u uklanjanju ovih oštećenja u višim eukarotima.²² Zato ovaj enzim sadrži i PCNA-interakcijski motiv (PIP) koji usmjerava njegovo vezanje na PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*), centralni dio replisoma. To omogućava SPRTN-u da putuje zajedno s replisomom i uklanja zarobljene proteine²², iako je sposoban uklanjati DPC-ove i u odsutnosti replisoma.⁷³ SPRTN tijekom replikacije DNA djeluje paralelno s proteasomom. Prije otkrića njegove funkcije u popravku DPC-a, SPRTN je okarakteriziran kao protein koji djeluje na PCNA uključen u TLS.⁸⁰ Lokalizacija SPRTN-a na replisomu zahtijeva i UBZ i PIP motiv. SPRTN veže ubikvitilirane supstrate putem UBZ domene, ali može djelovati i na neubikvitilirane DPC-ove, najčešće putem monoubikvitilirane PCNA. Ubikvitilirana PCNA također nije nužna za regrutaciju SPRTN-a, sugerirajući da SPRTN može prepoznati druge, zasad nepoznate ubikvitilirane interaktore.⁶ Proteasomalna degradacija DPC-a zahtijeva ubikvitilaciju zarobljenog proteina, a uklanjanje DPC-a pomoću SPRTN-a neovisno je o ubikvitilaciji proteina.⁸¹ Značajno je da mutacije u SPRTN-u uzrokuju Ruijs-Aalfsov sindrom, humani autosomno recesivni poremećaj karakteriziran genomskom nestabilnošću, preuranjenim starenjem i ranom pojavom hepatocelularnog karcinoma.^{3,82} *In vivo* studije pokazuju da su stanice s nedostatkom SPRTN-a osjetljive na liječenje DPC-inducirajućim agensima, defektne su u uklanjanju DPC-a, akumuliraju DPC-ove, te pokazuju povećanu mutagenozu tijekom replikacije DNA.⁸³

Proteazna aktivnost SPRTN-a usko je povezana s vezanjem na DNA, posttranslacijskim modifikacijama, autoproteolizom i regulacijom staničnog ciklusa.³⁰ SPRTN se pretežno eksprimira tijekom S i G2-faze, a razgrađuje se u G1-fazi putem APC/Cdh1.²² DNA služi kao

platforma (engl. *scaffold*) koja dovodi proteazu u neposrednu blizinu njegovog supstrata te time omogućava proteolizu.²² Strukturna analiza je pokazala da su katalitička središta Wss1 i SPRTN izložena otapalu i da nemaju supstrat-vezujući rascjep, što može objasniti nedostatak specifičnosti ovih proteaza.²³ Tako ove proteaze mogu razgraditi histone, DNA-topoizomerase, HMG-proteine, ali i sami sebe na DNA-ovisan način.²² Regulacija SPRTN proteaze trenutno je predmet istraživanja mnogih laboratorija. Zasad je poznato da se monoubikvitilirani SPRTN ne veže na kromatin, dok stvaranje DPC-a potiče njegovu deubikvitilaciju, te se u formi bez ubikvitina SPRTN veže na kromatin.⁸⁴ Drugi predloženi mehanizam regulacije je autoproteoliza. Pokazano je da SPRTN proteolitički cijepa druge molekule SPRTN-a u bližoj okolini nakon vezanja na DNA na više mjesta u C-terminalnom dijelu.²² Ostatak SPRTN-a kojeg čine SprT domena i dio N-terminusa slabije se veže na DNA te je djelomično proteolitički aktivan.²² Intrigantno je da je autoproteoliza očitija nakon tretmana s manjom količinom formaldehida u usporedbi s tretmanom većom količinom ovog DPC induktora.²³ Suprotno tome, deubikvitilacija se inducira linearnim odgovorom na dozu. Visoke razine DPC-a zahtijevaju sav slobodni SPRTN za popravak, i samim time je primijećena niska razina autoproteolize. Manja količina formaldehida aktivira popravak, ali također rezultira autoproteolizom prilagođavajući količinu aktivnog enzima količini DPC-a za koju je potreban popravak.²³ Nedavno je otkrivena i regulacija SPRTN-a pomoću fosforilacije, odnosno na temelju unakrsne aktivacije SPRTN-CHK1 (engl. *Checkpoint Kinase 1*).⁸⁵ Tijekom replikacije DNA, SPRTN cijepa kinazu CHK1, čime ju uklanja s kromatina i aktivira. Aktivirana kinaza tada je sposobna fosforilirati C-terminalni kraj SPRTN-a, promičući njegovu regrutaciju na kromatin i uklanjanje DPC-a.⁸⁵

ACRC/GCNA-1 (engl. *acidic repeat containing protein*, sinonim *germ cell nuclear antigen 1*) je nedavno otkrivena potencijalna proteaza koja također sadrži SprT domenu s HEXXH aktivnim mjestom, a povezana je s popravkom DPC-a.³⁰ ACRC je filogenetski blizak SPRTN-u, a 3D strukturni modeli pokazuju visoku sličnost proteazne jezgre i bliže okoline (SprT domena).³⁰ ACRC je proučavan u spolnim stanicama gdje putem svojih SUMO-interakcijskih motiva ostvaruje interakciju sa SUMO-lancem te na taj način dolazi na mjesta oštećenja.⁸⁶ Mnogo pojedinosti vezanih uz ovaj protein još je nepoznato te se istražuje.³⁰

Nakon proteolitičke razgradnje, vezani protein se ne uklanja u potpunosti s lanca DNA. Preostali vezani proteinski ili peptidni fragment potrebno je ukloniti drugim mehanizmima koji su trenutno predmet intenzivnih istraživanja. Mogući put daljnjeg popravka je NER, dok kod

TOP1 i TOP2-cc-a djeluje TDP1/TDP2-ovisna hidroliza. Uz to, konjugat peptid-DNA može se zaobići TLS-om.⁴⁴ Kako stanice biraju pojedini put popravka DPC-a i kako ti putevi međusobno surađuju tek se treba razjasniti. S obzirom na njegovu kritičnu ulogu u fiziološkom okruženju, popravak DPC-a je potencijalno bitan u liječenju raka, posebno u kombinaciji s inhibicijom drugih puteva popravaka i/ili kontrolnih točaka staničnog ciklusa.⁴⁴

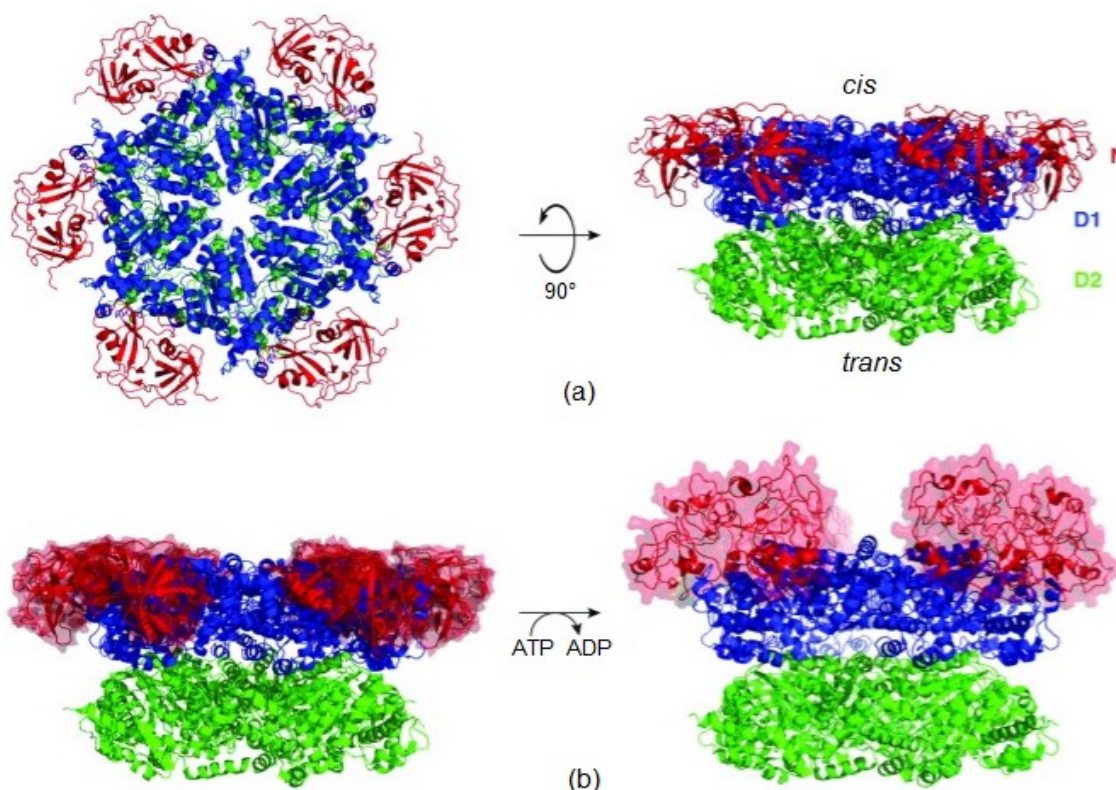
2.5. ATPaza p97/VCP

p97/VCP (engl. *valosin-containing protein*) u višim eukariotima, odnosno Cdc48 (engl. *cell division cycle protein 48*) u kvascu su adenozin-trifosfataze (ATPaze) koje pripadaju obitelji ATPaza povezanih s različitim staničnim aktivnostima (engl. *ATPases associated with diverse cellular activities*, AAA).⁵ ATPaze su klasa enzima koji kataliziraju hidrolitičku razgradnju ATP-a u ADP i slobodni fosfatni ion ili obrnutu reakciju. Reakcija defosforilacije oslobađa energiju koju enzim (u većini slučajeva) koristi za pokretanje drugih kemijskih reakcija koje se inače ne bi dogodile (nespontane kemijske reakcije). Taj se postupak široko koristi u svim poznatim oblicima života.⁸⁷

2.5.1. Struktura i mehanizam djelovanja p97

Mnogi AAA proteini tvore homoheksamere s jednom ili dvije prstenaste strukture ATPaznih domena (ATPaze tipa I, odnosno II). p97 je ATPaza tipa II, a svaki se monomer sastoji od N-terminalne domene, dvije tandemske ATPazne domene (D1 i D2) i fleksibilnog C-terminalnog kraja.⁸⁸ N i D1, odnosno D1 i D2 domene međusobno su odvojene kratkim polipeptidnim linkerom.⁸⁹ N domena u višem i C kraj u manjem opsegu, zaslužni su za interakciju s brojnim interaktorskim proteinima i enzimima. D1 i D2 domene vrlo su slične u aminokiselinskom slijedu i strukturi, ali njihove su funkcije različite. Naprimjer, za nastanak p97 heksamera potrebna je samo D1, ali ne i D2 domena.^{90,91} Nadalje, vezanje ATP-a na D1 domenu nužno je za vezanje istog na D2 domenu, a vezanje i hidroliza ATP-a u D2 potrebna je za njegovu hidrolizu u D1.⁹² U fiziološkim uvjetima, šest p97 monomera tvori bačvastu strukturu u kojoj D1 i D2 domene čine dva koncentrična, naslagana prstena sa središnjom porom. D1 prsten je veći od D2 prstena. Stečena energija vezanja i hidrolize ATP-a inducira niz konformacijskih promjena koje omogućuju procesiranje supstrata. Trenutna saznanja pokazuju da hidroliza ATP-a u D1 prstenu pomiče N domene locirane na *cis*-strani dvostrukog prstena iz tzv. „*up*“

konformacije u ATP-veznom stanju u položaj koplanaran s D1 prstenom u ADP-veznom stanju formirajući „down“ konformaciju (slika 5).⁹⁰



Slika 5. Struktura ATPaze p97. (a) p97 je homoheksamer, a svaka monomerna podjedinica sadrži N-terminalnu domenu (N), dvije ATPazne domene (D1 i D2) i kratki C-terminalni kraj. N-terminalna (D1) strana središnje pore naziva se *cis*-strana, a C-terminalna (D2) strana je *trans*-strana. (b) N domene u ADP-veznom stanju zauzimaju položaj koplanaran s D1 prstenom formirajući „down“ konformaciju (lijevo), a vezanje ATP-a uzrokuje kretanje N domena u tzv. „up“ konformaciju (desno) (preuzeto i prilagođeno prema referenci 93).

p97 može procesirati širok raspon poliubikvitiliranih supstrata povezanih s veznim partnerima ili integriranih u membrane. ATPaza može vezati razne interaktorske proteine koji određuju njezinu supstratnu specifičnost, usmjeravaju enzimski kompleks na različita stanična mjesta ili modificiraju ubikvitilirani lanac vezan za supstrat. Jedan od najzastupljenijih i najbolje proučenih interaktora je heterodimerni kompleks Ufd1:Npl4 (UN), koji omogućava p97 da procesira supstrate s Lys⁴⁸-vezanim ubikvitinskim lancima, iako se prepoznaju i drugi složeniji lanci. Supstrat se najprije regrutira do ATPaznog kompleksa vezanjem poliubikvitiliranog lanca na UN interaktor. Za učinkovito vezanje potrebno je najmanje pet molekula ubikvitina. UN interaktor ima nekoliko veznih mjesta za ubikvitine: dva na vrhu središnjeg tornja Npl4 te još dva mjesta u UT3 domeni Ufd1. Jedna se molekula ubikvitina nakon vezanja za p97 odmotava,

veže za očuvanu sekvencu Npl4 i ubacuje u središnju poru enzimskog kompleksa. Odmatanje tog ubikvitina pokreće se njegovim vezanjem za p97 i ne zahtijeva vezanje ili hidrolizu ATP-a. UN interaktor može vezati molekule ubikvitina, ali bez prisutnosti p97 ne može ih odmotati. Ako je supstrat izravno povezan s odmotanim ubikvitinom, sljedeći će se translocirati kroz središnju poru i odmotati. U suprotnom, ako je lanac duži od pet ubikvitina, p97 će sukcesivno odmotavati molekule ubikvitina dok na red ne dođe supstrat.⁵ Dakle, inicijacija translokacije ne mora nužno početi s ubikvitinom vezanim za supstrat. Koristeći ubikvitin kao univerzalni pokretački signal za translokaciju, p97 postiže široku supstratnu specifičnost. Vezanje ubikvitinskog lanca stimulira ATPaznu aktivnost u D2 domenama, a posljedično i pomicanje polipeptida kroz središnju poru, odmatajući supstrat. D2 domene sadrže petlje s očuvanim aromatskim aminokiselinama potrebnim za translokaciju polipeptida. Petlje pora su raspoređene u spiralno-stepenastom obliku, a djeluju kao "transportna traka" koja povlači polipeptid. Povlačenje se pokreće rotacijskim mehanizmom vezanja ATP-a, hidrolize i oslobađanja nukleotida u šest D2 domena. D1 domene nemaju aromatske ostatke u svojim petljama, a da bi došlo do odmatanja supstrata, nužne su samo vezati, ali ne i hidrolizirati ATP.⁵ Uloga D1 prstena u obradi supstrata zahtijeva daljnje istraživanje. D1 domene kontroliraju položaj N domena, a D1 prsten također uspostavlja početni kontakt s N terminalnim segmentom ubikvitina. Za oslobađanje odmotanog ubikvitiliranog supstrata iz kompleksa potrebno je uklanjanje preostalog netaknutog ubikvitiliranog lanca pomoću deubikvitinaze nakon hidrolize ATP-a u D1 domeni.⁵ Važnost ovog mehanizma vidljiva je u ljudskoj patologiji povezanoj s mutacijama p97, uključujući neurodegenerativne poremećaje, onkogenezu i preuranjeno starenje.⁹⁴

2.5.2. Stanična uloga p97

p97 je jedan od najzastupljenijih staničnih proteina u eukariotima (otprilike 1 % ukupnih staničnih proteina), što upućuje na njegove brojne stanične uloge, a one najznačajnije su sljedeće: razgradnja proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom (ER), mitohondrijem, ribosomom i kromatinom, uklanjanje agregiranih proteina, post-mitotička formacija ER-a i Golgijevog aparata (GA), endocitoza, regulacija staničnog ciklusa, biogeneza kapljica lipida, odgovor na oštećenje DNA, translezijska sinteza DNA i autofagija. Ova funkcionalna raznolikost p97 ostvaruje se kroz njegovu interakciju s brojnim proteinima.^{95,96} Poznato je preko 30 interaktora koji određuju supstratnu specifičnost i usmjeravaju p97 prema različitim

staničnim lokacijama, ali precizne uloge većine interaktora još su uvijek slabo razumljive.^{93,96} Svi interaktori karakterizirani su p97-interakcijskim motivima, a većina i s ubikvitin-interakcijskim domenama (neki sa SUMO-interakcijskim motivima).⁹⁶ To omogućava p97 da na temelju svoje ATPazne aktivnosti procesira mnoge ubikvitilirane (i SUMOilirane) proteine i tako djeluje kao središnji regulator mnogih ubikvitin-ovisnih staničnih procesa.^{94,97} p97 često djeluje uzvodno od 26S proteasoma. Proteasomskim supstratima općenito trebaju i poliubikvitilirani lanac i fleksibilni polipeptidni segment. Suprotno tome, kako bi započeo obradu supstrata, p97 treba samo poliubikvitilirani lanac.⁵

Primarna stanična uloga p97 povezana je s razdvajanjem nefunkcionalnih proteina od njihovih veznih partnera ili velikih staničnih struktura kao što su membrane ili kromatin (segregaza). Najbolje okarakterizirana uloga p97 je posredovanje procesima kontrole kvalitete proteina kako bi se održala njihova homeostaza. Razgradnja proteina povezana s endoplazmatskim retikulumom iz sekretornog puta eliminira nefunkcionalne proteine koji se u citoplazmi razgrađuju pomoću proteasoma, a uloga p97 u tom procesu je uklanjanje proteina označenih za razgradnju iz membrana prije same proteasomalne razgradnje.⁹⁰ p97 također može osloboditi nekoliko ER-membranski vezanih transkripcijskih faktora koji se potom transportiraju u jezgru kako bi utjecali na ekspresiju gena. p97 može olakšati i razgradnju povezanu s mitohondrijem, uklanjanjem nefunkcionalnih proteina iz vanjske membrane mitohondrija.⁹⁰ Osim toga, p97 uklanja i neispravne produkte translacije zaustavljene na ribosomu u procesu razgradnje povezane s ribosomom.⁹⁰ Oslobađanjem proteina vezanih za kromatin na način analogan onome kod ER-a, p97 može posredovati nizom nuklearnih procesa poznatih kao razgradnja povezana s kromatinom. Identificirani su brojni nuklearni supstrati p97 (CMG, Ku70, Ku80, Aurora-B, TOP1, GINS, itd.) koji ga povezuju s različitim nuklearnim putevima, od replikacije DNA i kontrole ekspresije gena do odgovora na oštećenje DNA.^{90,94}

Osim segregazne aktivnosti, p97 može djelovati i kao šaperon za transport polipeptida do proteasoma radi razgradnje ili sprječavanja nepoželjne agregacije proteina. Uz to, p97 olakšava uklanjanje netranslatirajućih glasničkih ribonukleoproteinskih kompleksa nepoznatim mehanizmom.⁹⁰ p97 također može kontrolirati stabilnost određenih regulatora stresa, a nedavno je pokazano da kontrolira i regulaciju glutamin-sintetaze, kao i vrijeme poluraspada nekoliko supstrata ubikvitin-ligaze obitelji kulin. U mitotičkim stanicama, p97 može regulirati fuziju vezikula na kraju mitoze kada treba preoblikovati GA i ER. Ovaj postupak uključuje interaktore p47 i p37 te deubikvitinazu VCIP135.⁹⁰ p97 potencijalno regulira receptorski posredovanu

endocitozu, budući da klatrin i EEA1, proteini važni za nastanak i fuziju vezikula, ostvaruju interakciju s p97.⁹⁰ Precizna funkcija p97 u endocitozi tek se treba razjasniti, a smatra se da je slična njegovoj funkciji u autofagiji, o kojoj se također malo zna. Uz vezikularni, p97 može kontrolirati i nevezikularni transport proteina, budući da je nedavno pokazano da kompleks p97:UBXN₁₀ posreduje transportom proteina u cilije u svrhu kontrole ciliogeneze. Nadalje, p97 regulira NFκB signalizaciju kontrolirajući stabilnost malog inhibitornog proteina IκB u kanonskom NFκB putu ili olakšavajući obradu podjedinice p100 u alternativnom NFκB aktivacijskom putu. p97 regulira stabilnost RIG-1, senzora virusne RNA u urođenom imunitetu, kao i aktivnost adipozne triglicerid-lipaze (ATGL), enzima koji kontrolira biogenezu kapljica lipida.⁹⁰ Najnovije otkrivena uloga p97 vezana je uz regulaciju aktina i pokretljivosti stanica.⁹⁸

2.5.3. Uloga p97 u popravku unakrsnog vezanja DNA i proteina

O ulozi ATPaze p97 u popravku DPC-a zna se veoma malo. Istraživanja u kvascu su pokazala da je metaloproteaza Wss1, u kombinaciji s Cdc48, uključena u uklanjanje toksičnih DPC-ova (TOP1-cc) tijekom replikacije DNA.⁷⁵ Uz to, kompleks Cdc48:Wss1 povezuje se s Cdc48-interaktorom Doa1, što uzrokuje njihovo regrutiranje na SUMOilirane kromatinske supstrate nakon oštećenja DNA, koje može biti DPC ili nekovalentno vezani protein. To posljedično aktivira intrinzičnu E3-SUMO ligaznu aktivnost Wss1 koja katalizira produženje SUMO-lanca, a zatim i uklanja SUMOilirane supstrate.⁹⁹ Međutim, enzim(i) koji uklanja(ju) DPC-ove u višestaničnim životinjama tijekom replikacije DNA još uvijek nije/nisu identificiran(i). Kao što je već spomenuto, SPRTN i Wss1 posjeduju sličnu strukturu proteolitičke jezgre. Oba enzima sadrže p97-interakcijsku domenu: SHP u SPRTN-u, VIM u Wss1. Za razliku od SPRTN-a, koji sadrži dvije ubikvitin-interakcijske domene (UBZ) i PIP motiv važan za njegovo regrutiranje na mjesta zaustavljenog replisoma, Wss1 sadrži dva SUMO-interakcijska motiva (SIM). Stoga preostaje za istražiti je li p97 kroz interakciju sa SPRTN-om i/ili nekim drugim interaktorom važan za uklanjanje DPC-a tijekom i izvan replikacije DNA u višestaničnim organizmima.⁹⁶ Na tragu odgovora na ovo pitanje, nedavno je pokazano da p97 igra ključnu ulogu u popravku TOP1-cc-a.¹⁰⁰ TDP1 može procesirati samo mali peptidni fragment TOP1-cc-a, stoga prije njegovog djelovanja, 90 kDa veliki protein TOP1 mora se proteolitički obraditi. Interaktor TEX264 prepoznaje i nemoificirani i SUMOilirani TOP1, te započinje popravak oštećenja regrutiranjem p97 i SPRTN-a kroz stvaranje kompleksa TEX264:p97:SPRTN.¹⁰⁰

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Becton, Dickinson and Company*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid (*Sigma*), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris) (*Sigma*), amonijev persulfat (APS) (*Carl Roth*), ampicilin (*Sigma*), baktotripton (*Becton, Dickinson and Company*), cinkov klorid (*Kemika*), 1,4-ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), ekstrakt kvasca (*Becton, Dickinson and Company*), etanol (*Kemika, Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), glicin (*Kemika*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Carl Roth*), imidazol (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Ambion*), kanamicin (*Sigma*), kloramfenikol (*Sigma*), kloroform (*Kemika*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), β -merkaptetoetanol (*Sigma*), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (*Carl Roth*), natrijev dodecil sulfat (SDS) (*Merck*), natrijev hidrogenfosfat (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), „RNase away“ reagens (*Thermo Scientific*), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*), ultračista voda (*Invitrogen, Molecular Bioproducts, Thermo Scientific*).

3.1.2. Boje

6 \times DNA Gel Loading Dye (*Thermo Scientific*), bromfenol plavo (*Kemika*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Bio-Rad*), GelStar Nucleic Acid Gel Stain (*Lonza*).

3.1.3. Markeri veličine

GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (*Thermo Scientific*) za agaroznu gel-elektroforezu, Precision Plus Protein Standards Unstained (*Bio-Rad*) za poliakrilamidnu gel-elektroforezu.

3.1.4. Nukleinske kiseline i nukleotidi

dNTP smjesa (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Thermo Scientific*), oligonukleotidi korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimerazom naručeni od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*).

3.1.5. Enzimi

DNaza I s odgovarajućim 10× inkubacijskim puferom (*Sigma*), proteinaza K s odgovarajućim puferom (*Alfa Aesar*), *Taq*-DNA-polimeraza s odgovarajućim 10× *Taq* standardnim puferom (*Thermo Scientific*), TEV proteaza (*Sigma*).

3.1.6. Kromatografska punila, kolone i membrane

Centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Millipore*), kolona za afinitetnu kromatografiju *Pierce* (*Thermo Scientific*), kolona za gel-filtraciju *HiLoad 16/600 Superdex 200* (*GE Healthcare*), Ni-NTA agaroza (*Protino*).

3.1.7. Komercijalni kompleti

Direct-zol RNA Miniprep Plus (*Zymo Research*), *Monarch Total RNA Miniprep Kit* (*NEB*) i *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*) za izolaciju ukupne RNA, *Monarch RNA Cleanup Kit* (*NEB*) za pročišćavanje izolirane RNA, *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit* (*NEB*) za sintezu cDNA reverznom transkripcijom, *GoTaq qPCR Master Mix* (*Promega*) i *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) za qPCR analizu.

3.1.8. Instrumenti

Analitička vaga *BP6100 Basic Plus Balance* (*Sartorius*), aparatura za SDS-PAGE *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (*Bio-Rad*), autoklav *LS-75-HG* (*Bari*), centrifuge *MPW-223e* (*ProfiLab24*) i *Universal 32R* (*Hettich*), elektroforetski sustav *Biometra Compact XS/S* (*Analytic Jena*), elektroporacijski sustav *Gene Pulser Xcell* (*Bio-Rad*), fotometar *OD600 DiluPhotometer* (*AlphaMetrix Biotech*), homogenizator *Ultra-Turrax T25* (*IKA – Janke & Kunkel*), PCR-uređaj *T100 Thermal Cycler* (*Bio-Rad*), spektrofotometar *BioSpec-nano* (*Shimadzu*), sustav za slikanje gelova *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*), termoblok *Thermomixer 5436* (*Eppendorf*), tresilica *Bio RS-24 Mini-rotator* (*Biosan*), uređaj za brzu preparativnu tekućinsku kromatografiju *ÄKTA pure* (*Cytiva*), uređaj za filtraciju (*Nalgene*),

uređaj za qPCR 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), vakuum pumpa (LABOPORT), visokotlačni homogenizator Emulsiflex C3 (Avestin).

3.1.9. Plazmidni vektori i soj bakterije *Escherichia coli*

pET-24d(+) je dio serije pET vektora, nosi N-terminalnu sekvencu T7-privjeska zajedno s opcionalnom C-terminalnom sekvencom heksahistidinskog privjeska ((His)₆). Taj se vektor razlikuje od pET-21a - d(+) samo po selektivnom markeru (kanamicin – pET-24a - d(+), ampicilin – pET-21a - d(+)). Izvorište replikacije fl orijentirano je tako da infekcija fagom pomoćnikom proizvodi virione koji sadrže jednolančanu DNA koja odgovara kodirajućem lancu. Stoga bi se jednolančano sekvenciranje trebalo izvoditi pomoću T7 terminatorske početnice. pET-24d(+) vektor je u odnosu na pET-24a(+) kraći za 3 pb uz izostanak *Nde* I restrikcijskog mjesta.¹⁰¹ Navedeni vektor služi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*, te se često koristi za stvaranje rekombinantnih proteina s C-terminalnim (His)₆-privjeskom. Tako fuzionirani proteini mogu se efikasno pročistiti afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima. Dio plazmida čini nukleotidna sekvenca koja odgovara aminokiselinskom slijedu kojeg prepoznaje TEV (engl. *tobacco etch virus*) proteaza (ENLYFQG, cijepa iza glutamina (Q)). Na taj se način može efikasno ukloniti (His)₆-privjesak proteina.¹⁰² U ovom je radu za prekomjernu ekspresiju korišten modificirani pET-24d(+) vektor s (His)₆-privjeskom na N-kraju, nakon kojeg slijede TEV-sekvencija i sekvenca divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) humanog (*Homo sapiens*, *Hs*) proteina p97.

pNIC-Zb je plazmidni vektor koji kodira N-terminalnu (His)₆-Zb-TEV aminokiselinsku sekvencu, a sadrži i negativni selekcijski marker SacB (produkt luči enzim levansukrazu koji čini rast bakterija osjetljivim na saharozu). Zb-privjesak (engl. *Z-basic tag*) predstavlja Z-domena stafilokoknog proteina A dizajniranu da sadrži pozitivni naboj, što je korisno za purifikaciju fuzijskih proteina kromatografijom kationske izmjene. Kao i plazmid pET-24d(+), pNIC-Zb sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin. Oba plazmida sadrže i sekvencu *rop* koja kodira protein Rop (engl. *repressor of primer*), a njegova je uloga održavanje plazmida na malom broju kopija.¹⁰³ Plazmid se također koristi za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina, a u ovom je radu korišten za prekomjernu ekspresiju humanih proteina SPRTN WT i SPRTN E112A katalitičkog mutanta. Oba korištena plazmida (pET-24d(+)) i pNIC-Zb dobivena su s ukloniranim genima i kao takvi su korišteni u daljnjem postupku.

Rosetta (DE3) (Novagen/Merck) je derivat soja *BL21 (DE3)* bakterije *E. coli* dizajniran da pojačava ekspresiju eukariotskih proteina. Ovaj soj nosi plazmid (pRARE Cam^R) koji kodira molekule tRNA s kodonima slabo zastupljenima u bakteriji *E. coli*, a to su: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA. Na taj način sojevi *Rosetta* omogućuju "univerzalnu" translaciju koja je inače ograničena upotrebom kodona *E. coli*. *BL21 DE3* ukazuje da se radi o soju koji nema gene *ompT* i *lon* zbog čega nema ekspresije OmpT i Lon proteaza, što soj čini pogodnim za prekomjernu ekspresiju proteina zbog smanjene proteolitičke razgradnje proteina eksprimiranih u stanici. Bakterija u genomu sadrži gen za T7-RNA-polimerazu koji se nalazi pod kontrolom inducibilnog *lacUV5* promotora čija se ekspresija može inducirati IPTG-om.¹⁰⁴

3.1.10. Puferi korišteni tijekom metoda rada s proteinima i nukleinskim kiselinama

Tablica 1. Sastav pufera A.

Sastojci		Koncentracija	
p97 WT	SPRTN WT i E112A	p97 WT	SPRTN WT i E112A
NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ (pH = 8,0)	HEPES (pH = 7,5)	50 mmol/L	50 mmol/L
NaCl		500 mmol/L	
Imidazol (pH = 8,0)		20 mmol/L	
MgCl ₂		2 mmol/L	1 mmol/L
Glicerol		10 % (v/v)	
β -merkaptoetanol		200 μ L/L	
PMSF		0,1 mmol/L	

Sastavi pufera B i C identični su sastavu pufera A, a jedina je razlika koncentracija imidazola (40 mmol/L u puferu B, 300 mmol/L u puferu C) i izostanak PMSF-a.

Tablica 2. Sastav pufera za SDS-PAGE.

Sastojci	Koncentracija
Glicin	14,4 g/L
Tris-HCl (pH = 8,3)	3,0 g/L
SDS	1 g/L

Tablica 3. Sastav pufera za SDS-PAGE uzorke (4× Laemmlijev pufer).

Sastojci	Koncentracija
Tris-HCl (pH = 6,8)	200 mmol/L
Glicerol	40 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
β -merkaptioetanol	40 μ L/mL
Bromfenol plavo	0,02 % (w/v)

Tablica 4. Sastav pufera za dijalizu.

Sastojci		Koncentracija	
p97 WT	SPRTN WT i E112A	p97 WT	SPRTN WT i E112A
HEPES (pH = 7,5)		20 mmol/L	50 mmol/L
NaCl		150 mmol/L	500 mmol/L
Glicerol		/	5 % (v/v)
DTT		1 mmol/L	

Tablica 5. Sastav pufera za gel-filtraciju.

Sastojci	Koncentracija
HEPES (pH = 7,5)	50 mmol/L
NaCl	500 mmol/L
Glicerol	5 % (v/v)
DTT	1 mmol/L

Tablica 6. Sastav TAE pufera (50×).

Sastojci	Koncentracija
Tris (pH = 8,5)	242 g/L
Octena kiselina	57,1 mL/L
EDTA	37,2 g/L

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija

Tekući hranjivi medij Luria-Bertani (LB) pripremljen je otapanjem ekstrakta kvasca (konačne koncentracije 5 g/L), baktotriptonu (konačne koncentracije 10 g/L) i natrijevog klorida (konačne koncentracije 10 g/L) u destiliranoj vodi. Otopina je potom sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C i 2,6 bar u trajanju od 20 minuta te je pohranjena na 4 °C.

Kruta hranjiva LB podloga pripremljena je na isti način kao i tekući medij, osim što je dodatno otopljen i agar (konačne koncentracije 15 g/L). Nakon autoklaviranja, u ohlađenu LB podlogu dodana je sterilna otopina antibiotika (ampicilin do konačne koncentracije 100 µg/mL ili kanamicin do 50 µg/mL). Tako pripremljena otopina izlivena je prije skrućivanja u plastične sterilne Petrijeve zdjelice uz jednoliko prekrivanje dna pazeći da ne nastanu mjehurići zraka.

3.2.2. Transformacija bakterija i postav noćne kulture

Elektroporacija je metoda transformacije kojom se strana DNA unosi u bakterijsku stanicu, a temelji se na korištenju kratkih električnih pulseva visokog napona koji stvaraju pore u staničnoj stijenci bakterija i time povećavaju permeabilnost stijenke čime se omogućava ulazak strane DNA. Na ovaj je način transformiran soj *Rosetta (DE3)* bakterije *E. coli* rekombinantnim plazmidima pET-24d(+)-(His)₆-TEV-*Hs* p97 WT, pNIC-(His)₆-Zb-TEV-*Hs* SPRTN WT i pNIC-(His)₆-Zb-TEV-*Hs* SPRTN E112A.

Budući da je elektroporacija efikasnija na nižim temperaturama, elektrokivete i držač za elektrokivete prethodno su ohlađeni na -20 °C. Alikvot od 50 µL elektrokompetentnih stanica čuvan u hladnjaku na -80 °C otopljen je na ledu te je dodano 50 ng rekombinantnog plazmida. Zatim je tako pripravljena suspenzija prebačena u ohlađenu elektrokivetu te je primijenjen električni puls. Nakon elektroporacije, u stanice je radi oporavka dodano 0,5 mL LB medija, a sadržaj je inkubiran 1 sat u tresilici (600 rpm) na 37 °C. 100 µL transformiranih bakterija dodano je u 5 mL LB medija s dodanim antibioticima kanamicinom (konačne koncentracije 25 µg/mL) i kloramfenikolom (konačne koncentracije 34 µg/mL) te su ostavljene rasti preko noći na 37 °C u tresilici (225 rpm) kako bi se dobila prekonoćna zasićena kultura stanica. Budući da plazmidi nose gen za rezistenciju na antibiotik, u hranjivom su mediju narasle samo one bakterije koje su uspješno transformirane odgovarajućim rekombinantnim plazmidnim vektorom.

3.2.3. Uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije proteina

5 mL svježe prekonoćne kulture pomiješano je s 0,5 L LB medija (1:100) kojem su prethodno dodani antibiotici kanamicin (konačne koncentracije 25 µg/mL) i kloramfenikol (konačne koncentracije 34 µg/mL) te etanol (konačne koncentracije 2 % (v/v)). Bacterije su uzgajane oko 2,5 sata na 37 °C u tresilici (160 rpm) do vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm (OD₆₀₀) između 0,4 i 0,6, koja je mjerena pomoću uređaja *OD600 DiluPhotometer (AlphaMetrix Biotech)*. Temperatura je zatim spuštена na 18 °C i nakon 20 minuta je dodan IPTG (konačne koncentracije 0,8 mmol/L). Inducirane bakterijske stanice ostavljene su prekonoćno u tresilici (160 rpm) na 18 °C kako bi došlo do prekomjerne ekspresije humanog proteina p97 WT.

Kodirajući slijed od interesa ugrađen je u višestruko mjesto za kloniranje vektora pET-24d(+) između T7 promotora i T7 terminatora transkripcije. Za T7 promotor specifično se veže T7-RNA-polimeraza koja je monomerni enzim i vrlo je procesivna. Gen za T7-RNA-polimerazu ugrađen je u genom bakterije *E. coli* i nalazi se pod kontrolom *lac* promotora i *lac* operatora. Bakterijska RNA-polimeraza veže se za *lac* promotor. *Lac* operator, koji se nalazi i u vektoru pET, omogućava vezanje *lac* represora i time se osigurava vrlo niska razina ekspresije T7-RNA-polimeraze i ciljnog proteina u uvjetima kada induktor IPTG nije prisutan. Dodatkom IPTG-a, on se veže za *lac* represor koji potom disocira s *lac* operatora. Bakterijska RNA-polimeraza tada može transkribirati gen za T7-RNA-polimerazu, a ona može transkribirati ciljani slijed u vektoru. Soj *Rosetta (DE3)* bakterije *E. coli* može sadržavati i plazmide pLysS ili pLysE. Oni sadrže kodirajuće sljedove za lizozim faga T7, koji inaktivira T7-RNA-polimerazu vezanjem za nju. Tako se dodatno sprječava ekspresija ciljnog proteina u uvjetima prije indukcije. Nakon dodatka IPTG-a nastaje veća količina enzima T7-RNA-polimeraze te se inhibitorski učinak T7-lizozima nadvladava. Ovo je posebno bitno ako je protein od interesa toksičan za stanicu domaćina.¹⁰⁵

Na vrlo sličan način inducirana je prekomjerna ekspresija humanih proteina SPRTN WT i SPRTN E112A. 2 L steriliziranog LB medija, kojem su prethodno dodani antibiotici kanamicin (konačne koncentracije 25 µg/mL) i kloramfenikol (konačne koncentracije 34 µg/mL), etanol (konačne koncentracije 2 % (v/v)) i Zn²⁺ ioni (konačne koncentracije 0,1 mmol/L), pomiješano je s 20 mL prekonoćne kulture s pNIC-Zb rekombinantnim plazmidom (1:100). Ostatak protokola je identičan onome za p97 WT protein. Ekspresijski sustav u pNIC-Zb vektoru funkcionira na isti način kao i u pET-24d(+) vektoru.

3.2.4. Homogeniziranje stanica

Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijskih stanica, u svrhu izolacija proteina p97 WT, SPRTN WT i SPRTN E112A, stanice su oborene centrifugiranjem 10 minuta pri 4000 rpm na 4 °C. Supernatant je od taloga stanica odvojen dekantiranjem, talog je ispran destiliranom vodom i resuspendiran u prethodno pripremljenom i ohlađenom puferu A (tablica 1) (najprije u manjoj količini, a zatim u 40 mL u slučaju p97 WT, odnosno u 150 mL u slučaju SPRTN WT i SPRTN E112A), kojem je neposredno prije upotrebe dodan PMSF. Prije resuspendiranja, mala količina uzorka taloga stanica pohranjena je za analizu metodom SDS-PAGE (odjeljak 3.3.2.). Potpuna homogenizacija suspenzije stanica postignuta je propuštanjem kroz injekcijsku špricu. Stanice su lizirane trostrukim propuštanjem sadržaja kroz visokotlačni homogenizator *Emulsiflex C3 (Avestin)*. Princip rada homogenizatora je sljedeći: instrument upumpava uzorak kroz ventil s malim otvorom. Uzorak prelazi s vrlo visokog tlaka na ulaznoj strani do atmosferskog tlaka na izlaznoj strani ventila. Ova ekstremna promjena tlaka stvara vrlo jake posmične sile na uzorku pri izlasku iz ventila, što za posljedicu ima pucanje membrana stanica. Nakon lize stanica, provedeno je centrifugiranje 20 minuta pri 12 000 rpm na 4 °C. Supernatant je sadržavao topljive proteine od interesa (proteinski ekstrakt), dok su u talogu zaostale nelizirane bakterijske stanice, zajedno s netopljivim i agregiranim proteinima te genetskim materijalom. Mala količina uzoraka supernatanta i taloga pohranjena je za kasniju analizu koja uključuje SDS-PAGE metodu.

3.3. Metode rada s proteinima

3.3.1. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu

Nadeksprimirani proteini p97 WT, SPRTN WT i SPRTN E112A pročišćeni su afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionom iz supernatanta dobivenog centrifugiranjem staničnog lizata. Korištena metoda temelji se na interakciji dušikovih atoma iz bočnog ogranka histidina i Ni²⁺ iona vezanog na stacionarnu fazu kolone (Ni-NTA agarozu). Nitrilotriocetna kiselina je tetradentatni kelirajući agens koji stvara 4 koordinativne veze s ionom Ni²⁺, dok dva koordinacijska mjesta u oktaedarskoj koordinacijskoj sferi Ni²⁺ iona ostaju slobodna te se na njih mogu vezati dušici iz imidazolnih skupina histidina. Kako bi se omogućilo pročišćavanje proteina od interesa, genetskim inženjeringom dodani su nukleotidi koji kodiraju 6 uzastopnih

histidina na C- i/ili N-terminalnom kraju proteina. Za ispiranje proteina vezanih na imobilizirani Ni^{2+} ion korišten je pufer s visokom koncentracijom slobodnog imidazola (pufer C) koji kompetira za vezanje na Ni^{2+} ion i na taj način ispire protein s kolone. Mililitar smole može vezati 5-10 mg fuzijskog proteina.¹⁰⁶

Pročišćavanje proteina rađeno je u ledenici na 4 °C. Supernatant je u plastičnoj tubi volumena 50 mL (*Falcon*) pomiješan s 1 mL Ni-NTA agaroze prethodno ekvilibrirane u puferu A (tablica 1) te je smjesa inkubirana 20 minuta. Smola je oborena centrifugiranjem 3 minute pri $5000 \times g$ na 4 °C. Mala količina uzorka nevezane frakcije pohranjena je za analizu metodom SDS-PAGE (odjeljak 3.3.2.). Smola je tri puta isprana puferom A, a zatim je prenesena u kolonu *Pierce (Thermo Scientific)*. Pufer A osigurava optimalne uvjete za učinkovitu interakciju proteina od interesa s ligandom i zadržava ga na koloni dok se sve ostale molekule ispiru. PMSF u puferu A inhibira moguće zaostale serinske proteaze na stacionarnoj fazi prije dodatka proteina od interesa i tako ga štiti od razgradnje tijekom pročišćavanja. Ispiranje je nastavljeno s puferom B (tablica 1, tekst ispod), tako da je 1 mL smole ispran s 4 mL pufera B. Mala količina uzorka nakon ispiranja puferom B pohranjena je za analizu metodom SDS-PAGE. Pufer B služi za uklanjanje neželjenih proteina i drugih molekula, tako što narušava njihove slabije interakcije sa stacionarnom fazom. Fuzijski protein s (His)₆-privjeskom posjeduje puno veći afinitet prema stacionarnoj fazi i zato ostaje vezan. Posljednje ispiranje je provedeno s 5 mL pufera C (tablica 1, tekst ispod) po 1 mL smole u slučaju p97 WT, odnosno s 10 mL u slučaju SPRTN WT i SPRTN E112A. Mala količina uzorka nakon ispiranja puferom C pohranjena je za analizu metodom SDS-PAGE. Pufer C za razliku od pufera B sadrži imidazol u koncentraciji dovoljnoj da efikasno naruši interakcije između proteina od interesa i Ni-NTA agaroze. Merkaptoetanol u navedenim puferima, zbog svog niskog redoks-potencijala i koncentracije u kojoj je dodan, služi kao inhibitor oksidacije proteina i tako sprječava agregaciju ili povezivanje proteina putem disulfidnih mostova. PMSF i β -merkaptoetanol su zbog svoje nestabilnosti dodani neposredno prije upotrebe. Kolona s Ni-NTA agarozom na kraju je postupka isprana s 5 mL imidazola, tri puta s ultračistom vodom i 20 % (v/v) etanolom u kojem se Ni-NTA agarozna i čuva.

3.3.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz prisutnost natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) široko je raširena metoda za

analizu proteina molekulske mase od 5 do 250 kDa. SDS-PAGE se može koristiti za provjeru ekspresije određenog proteina u stanici, određivanje molekulske mase proteina (uz poznatu kvaternu strukturu proteina) ili provjeru čistoće proteina. Budući da je ovo elektroforetska metoda, uzorak koji se želi analizirati stavlja se u vanjsko električno polje, i zbog naboja samih molekula koje se analiziraju, uzorak će se kretati prema pozitivnoj ili negativnoj elektrodi. U slučaju proteina, gibanje molekula u vanjskom električnom polju ovisi o ukupnom naboju, molekulskoj masi i obliku proteina. Natrijev dodecil sulfat je anionski deterdžent koji se veže na proteine i denaturira ih. Jedna molekula SDS-a veže se na dvije aminokiseline. Zbog velikog broja molekula SDS-a koje se vežu na protein, nastajanjem kompleksa SDS-protein, intrinzični naboj proteina postaje zanemariv. Zbog repulzivnih elektrostatskih interakcija između anionskih skupina SDS-a, protein u kompleksu sa SDS-om poprima izduženu konformaciju, stoga svi proteini imaju jednak omjer mase i naboja. Jednak omjer mase i naboja i posljedično izdužena konformacija proteina u prisutnosti SDS-a omogućavaju razdvajanje proteina pomoću SDS-PAGE metode isključivo na temelju molekulske mase proteina. Gel, kao i kod agarozne gel-elektroforeze (odjeljak 3.4.3.), ima ulogu molekuskog sita i omogućava fino razdvajanje proteina širokog raspona molekulskih masa. Za potrebe razdvajanja proteina metodom SDS-PAGE pripremljen je dvokomponentni poliakrilamidni gel. Gornji dio gela, tzv. gel za sabijanje omogućava sabijanje uzorka u usku prugu na granici s drugim gelom, tzv. gelom za razdvajanje u kojem se odvija razdvajanje proteina prema njihovoj molekulskoj masi.¹⁰⁶

Tablica 7. Sastav poliakrilamidnih gelova korištenih za razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE.

Tip gela	Sastav
Gel za sabijanje	3,9 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), Tris-HCl (125 mmol/L) (pH = 6,8), SDS (1 g/L), APS (0,7 µg/mL), 0,05 % (v/v) TEMED
Gel za razdvajanje	12 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), Tris-HCl (375 mmol/L) (pH = 8,8), SDS (1 g/L), APS (0,7 µg/mL), 0,05 % (v/v) TEMED

APS i TEMED dodani su neposredno prije izlijevanja gela kako ne bi došlo do prijevremene polimerizacije. APS služi kao inicijator, a TEMED kao katalizator reakcije polimerizacije. Nakon izlijevanja gela za razdvajanje, na vrh je dodana voda kako bi se onemogućila interakcija s atmosferskim kisikom koji inhibira polimerizaciju, a ujedno je i poravnat gornji rub gela. Nakon što je gel za razdvajanje polimerizirao (40 min), voda je izlivena, dodana je smjesa za

gel za sabijanje te je umetnut češalj za formiranje jažica. Prikupljeni uzorci za analizu pomiješani su s puferom za SDS-PAGE uzorke (tablica 3) (15 μ L uzorka + 5 μ L pufera za SDS-PAGE uzorke) te su zagrijavani 5 minuta na 98 °C kako bi se postigla denaturacija proteina. Za elektroforezu je korišten uređaj *Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)* ispunjen puferom za SDS-PAGE (tablica 2). Elektroforeza je rađena na sobnoj temperaturi, prvo 15 minuta uz napon od 120 V u svrhu sabijanja proteina, a zatim 45 minuta uz napon od 180 V radi razdvajanja proteina. Uzorci su potom vizualizirani bojanjem gela za razdvajanje u otopini boje *Coomassie Brilliant Blue R-250* sastava: metanol (10 % (v/v)), etanol (45 % (v/v)), *Coomassie Brilliant Blue R-250* ($\gamma = 2,5$ g/L). To je postignuto inkubacijom gela u navedenoj boji uz protresanje 20 minuta, nakon čega je nespecifično vezana boja uklonjena u kipućoj destiliranoj vodi.

3.3.3. Dijaliza i proteolitičko odcjepljivanje afinitetnog privjeska s fuzijskog proteina

Afinitetni privjesci su postali osnovni alati za proizvodnju rekombinantnih proteina. Osim što olakšavaju detekciju i pročišćavanje njihovih fuzijskih partnera, mogu imati i pogodan utjecaj na prinos proteina od interesa, a u nekim slučajevima povećati njihovu topljivost, pa čak i promovirati njihovo pravilno smatanje. Unatoč ovim važnim prednostima, svaki afinitetni privjesak, bio on veliki ili mali, može utjecati na strukturu i funkciju svog fuzijskog partnera. Iz tog je razloga potrebno provesti pouzdanu metodu uklanjanja afinitetnog privjeska. Jedna od takvih metoda je proteolitičko uklanjanje afinitetnog privjeska pomoću TEV proteaze.¹⁰⁷

(His)₆-privjesak s proteina p97 WT, odnosno (His)₆-Zb-privjesak s proteina SPRTN WT i SPRTN E112A uklonjeni su na način da je proteinima podvrgnutima dijalizi u puferu za dijalizu (tablica 4) dodana TEV proteaza. Kada eksperimenti uključuju proteine i nukleinske kiseline, često je potrebno eliminirati molekule male molekulske mase u otopini koje su neželjene za daljnje eksperimentalne postupke, a svojom pojavom mogu utjecati na uzorak. Upravo je to, uz promjenu pufera, svrha provođenja dijalize. Neželjene molekule unutar otopine uzorka difundiraju kroz polupropusnu membranu u pufersku otopinu (dijalizat) i postiže se ravnoteža preko cijelog volumena otopine, učinkovito smanjujući koncentraciju tih molekula unutar vrećice s uzorkom. Budući da velike molekule (proteini) ne mogu proći kroz pore membrane, one ostaju unutar membrane.

Smjese su inkubirane prekoonoćno na 4 °C uz miješanje pomoću magneta. 10 mL otopine proteina SPRTN WT i SPRTN E112A, te 2 mL otopine proteina p97 WT inkubirano je uz dodatak TEV proteaze (1:100), a 3 mL otopine proteina p97 WT bez dodatka enzima. Odvajanje

afinitetnog privjeska od proteina p97 provjereno je metodom SDS-PAGE na način opisan u odjeljku 3.3.2.

3.3.4. Ultrafiltracija

Izolirani proteini ukoncentrirani su procesom ultrafiltracije nakon provedene dijalize i uklanjanja afinitetnih privjesaka. Za ultrafiltraciju su korišteni centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore)* koji imaju pore kroz koje mogu proći proteini manji od 30 kDa, a iznad membrane se zadržavaju ciljni proteini s molekulskom masom većom od 30 kDa. Otopine proteina centrifugirane su više puta 1 minutu pri $5000 \times g$ na 4°C kako bi se volumen otopine smanjio do željene razine.

3.3.5. Gel-filtracija

Gel-filtracija ili kromatografija isključenjem (engl. *size-exclusion chromatography*) je vrsta tekućinske kromatografije kojom se molekule ili kompleksi molekula razdvajaju na temelju njihove veličine i oblika. Metoda se naziva gel-filtracija kada je stacionarna faza hidrofilna, a mobilna faza vodena. Stacionarnu fazu čini inertno punilo (gel) čije granule sadrže pore različitih dimenzija. Tijekom prolaska tekuće faze (uzorka) kroz kolonu, molekule koje su veće od pora ne mogu ući u njih već prolaze kroz prostor između čestica gela, dok manje molekule ulaze u pore, prave veći put i zaostaju za većim molekulama. Pri tome, što je molekula manja, to se dulje zadržava u porama gela i putuje sporije. Gel-filtracijom moguće je odrediti i relativnu molekulsku masu (M_r) neke molekule usporedbom sa standardima poznate molekulske mase.¹⁰⁸

U ovom je radu gel-filtracija korištena kao drugi korak pročišćavanja, nakon afinitetne kromatografije, kako bi se otklonile zaostale nečistoće. Upotrebljena je *HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare)* kolona spojena na sustav za brzu kromatografiju proteina u tekućem mediju (engl. *fast protein liquid chromatography*, FPLC) proizvođača *ÄKTA pure (Cytiva)*, koji omogućava automatizirano potiskivanje tekuće faze kroz kolonu pri zadanoj brzini protoka i tlaku, te skupljanje uzoraka zadanog volumena. Kolona je najprije isprana sa 130 mL ultračiste vode pri protoku 0,8 mL/min, a zatim je ekvilibrirana sa 130 mL pufera za gel-elektroforezu (tablica 5). Voda i pufer su prije nanošenja na kolonu filtrirani i degazirani pomoću uređaja za filtraciju (*Nalgene*) i vakuum pumpe (*LABOPORT*) kroz membranu s porama veličine 0,45 μm . Uzorak je prije pročišćavanja centrifugiran 5 min na 13 000 rpm kako bi se otklonili precipitati i veći agregati. Koncentracija uzorka prije nanošenja na kolonu bila je

5,0 mg/mL. Prije početka gel-filtracije, sustav je ohlađen na 4 °C. Uzorak je nanesen na kolonu, te je kromatografija provedena propuštanjem pufera kroz kolonu pri protoku od 0,8 mL/min pri čemu je praćena apsorbancija pri 280 nm. Prikupljane su frakcije volumena 2 mL. Kolona je nakon korištenja očišćena prvo s ultračistom vodom, a zatim je pospremljena u 20 % (v/v) etanolu. Frakcije najbogatije proteinima analizirane su SDS-PAGE metodom, te su one zadovoljavajuće čistoće spojene i ukoncentrirane ultrafiltracijom na opisani način.

3.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija pročišćenih i ukoncentriranih proteina određena je spektrofotometrijski na uređaju *BioSpec-nano* (*Shimadzu*) mjerenjem apsorbancije pri 280 nm (A_{280}). Pri toj valnoj duljini najviše apsorbiraju aromatske aminokiseline proteina. Uređaj je najprije nuliran puferom u kojem je pročišćen protein te je potom nanoseno 2 μ L svakog uzorka. Molarni ekstincijski koeficijenti (ϵ) i molekulska masa proteina procijenjeni su pomoću *ExpASy – ProtParam tool* bioinformatičkog portala nakon unosa aminokiselinske sekvence, a molarna koncentracija proteina (c) izračunata je na temelju Beer-Lambertovog zakona:

$$A_{280} = c \cdot \epsilon \cdot b,$$

gdje b označava duljinu puta zrake svjetlosti ($b = 1$ cm).

Otopine s proteinima su alikvotizirane, naglo smrznute u tekućem dušiku i spremljene u hladnjak na -80 °C.

3.4. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.4.1. Izolacija ukupne RNA

RNA je vrlo nestabilna molekula podložna raspadu. Sastoji se od riboznih jedinica s visoko reaktivnom C2'-hidroksilnom skupinom. To čini RNA kemijski labilnijom od DNA. RNA je također sklona termičkoj degradaciji. Očuvanje integriteta RNA stoga je glavni preduvjet za pouzdanu analizu ekspresije gena. Stabilizacija RNA u biološkim uzorcima je neophodna jer se u slučaju pogrešnog uzorkovanja događaju prividne promjene u ekspresiji gena zbog specifične i nespecifične razgradnje RNA, kao i zbog indukcije transkripcije.^{109,110} Druga stvar

koja otežava izolaciju RNA je prisutnost RNaza, nukleaza koje kataliziraju razgradnju molekula RNA. Određene RNaze mogu biti izuzetno izdržljive i njihova inaktivacija je teška u usporedbi s DNazom. Ovi enzimi su evoluirali tako da imaju brojne izvanstanične funkcije u različitim organizmima. Ljudsko tijelo koristi RNaze za obranu od mikroorganizama izlučujući ove enzime u tekućinama kao što su suze, slina i znoj.¹¹¹ Zato su prije provedbe protokola izolacije RNA sve radne površine, laboratorijsko posuđe i zaštitne rukavice podrobno prebrisani 70 % (v/v) etanolom i reagensom za eliminaciju RNaza („*RNase away*“), a pojedini koraci rađeni što je brže moguće. Provedena su 4 različita pristupa: izolacija ukupne RNA koristeći komercijalne komplete *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*, *Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research)* i *Monarch RNA Miniprep Kit (NEB)*, te izolacija ukupne RNA pomoću TRizola po *Ambion* protokolu.

RNeasy Mini Kit (Qiagen): Smrznuta tkiva domaćeg miša čuvana u spremniku s tekućim dušikom usitnjena su na ledu i izvagana na analitičkoj vagi kako se dopuštena masa tkiva od 30 mg ne bi prekoračila zbog moguće nepotpune lize stanica tkiva. Netom prije korištenja pomiješano je 10 µL β-merkaptoetanol na 1 mL komercijalnog *RTL* pufera (nepoznat sastav), te je svakom izvaganom tkivu dodano 600 µL takve smjese. Tkiva su mehanički homogenizirana 3 puta u trajanju od 10 sekundi na 13 500 rpm, a homogenizator je očišćen svaki put tijekom prelaska na drugo tkivo koristeći destiliranu vodu i 70 % (v/v) etanol. Lizat je centrifugiran 3 minute pri 14 000 × g na 23 °C, a supernatant odvojen od taloga. 1 volumen 70 % (v/v) etanola dodan je supernatantu te je sadržaj dobro promiješan. Genomska je DNA (gDNA) uklonjena koristeći gDNA eliminatorske kolone i/ili DNazu I. DNaza I je endonukleaza koja nespecifično cijepa fosfodietersku vezu u molekuli DNA, a služi za uklanjanje DNA prilikom izolacije ukupne RNA ili proteina. To je učinjeno prenošenjem uzorka na kolonu s kolekcijском tubicom uz centrifugiranje 15 sekundi pri 9500 × g na sobnoj temperaturi, a nevezana je frakcija bačena. Sva daljnja centrifugiranja provedena su na identičan način. Za neke je izolacije proveden korak dodatka 80 µL otopine DNaze I (10 µL DNaze I (2,7 U/µL) + 70 µL 10× inkubacijskog pufera (sastav: 400 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 60 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L CaCl₂, pH = 7,9)) uz inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Standardni protokol je nastavljen dodatkom 700 µL komercijalnog *RWI* pufera (nepoznat sastav) na kolonu i centrifugiranjem uz bacanje nevezane frakcije. Ukoliko je korištena DNaza I, ispiranje s *RWI* puferom je izostavljeno. 500 µL komercijalnog *RPE* pufera (nepoznat sastav) (prethodno pomiješan s 4 volumena 96 % (v/v) etanola) dodano je na kolonu

uz centrifugiranje i bacanje nevezane frakcije. Posljednji korak je ponovljen uz centrifugiranje u trajanju od 2 minute. Kolona stavljena u novu kolekcijsku tubicu centrifugirana je 1 minutu pri $14\ 000 \times g$ zbog eliminacije zaostalog *RPE* pufera ili nevezane frakcije („suho“ centrifugiranje). Izolirana je RNA eluirana s kolone u novu kolekcijsku tubicu dodatkom 30 μL ultračiste vode (*DNase and RNase free, Invitrogen*) uz inkubaciju 2 minute na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem 1 minutu pri $9500 \times g$. Nakon određivanja koncentracije spektrofotometrijski koristeći *BioSpec-nano* (*Shimadzu*) (odjeljak 3.4.2.), RNA je alikvotirana i spremljena u hladnjak na $-80\ ^\circ\text{C}$.

Direct-zol RNA Miniprep Plus (*Zymo Research*): Liza stanica tkiva provedena je na vrlo sličan način kao i u prethodnom slučaju. Maksimalna dopuštena masa tkiva iznosila je 50 mg, uz izuzetak jetre (20 mg) jer se radi o tkivu visokog prinosa. Svakom uzorku dodano je 600 μL TRIZola, nakon čega je slijedila homogenizacija i centrifugiranje na prethodno opisani način. TRIZol je monofazna otopina fenola i gvanidinijevog tiocijanata koja inhibira aktivnost RNaza i omogućava izolaciju RNA. Odvojenom supernatantu dodan je 1 volumen 96 % (v/v) etanola uz jako miješanje. Sadržaj je prenesen na kolonu s kolekcijskom tubicom i centrifugiran 30 sekundi pri $12\ 000 \times g$, a nevezana je frakcija bačena. Genomska je DNA eliminirana dodatkom 80 μL otopine DNaze I na kolonu pripremljene miješanjem 5 μL DNaze I (6 U/ μL) i 75 μL 10 \times inkubacijskog pufera, a inkubacija je trajala 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je na kolonu nanoseno 400 μL komercijalnog *Direct-zol RNA Pre Wash* pufera (nepoznat sastav) uz centrifugiranje identično prethodnom. Korak je ponovljen. Dodano je 700 μL komercijalnog pufera za ispiranje (nepoznat sastav) i sadržaj je centrifugiran 2 minute na $13\ 000 \times g$. Kolona je prenesena u novu kolekcijsku tubicu te je dodano 50 μL ultračiste vode radi elucije RNA. Nakon inkubacije u trajanju od 2 minute, provedeno je centrifugiranje 30 sekundi pri $13\ 000 \times g$. Nakon određivanja koncentracije spektrofotometrijski koristeći *BioSpec-nano* (*Shimadzu*) (odjeljak 3.4.2.), izolirana je RNA alikvotirana i spremljena u hladnjak na $-80\ ^\circ\text{C}$.

Monarch Total RNA Miniprep Kit (*NEB*): Nakon odvage tkiva (maksimalna dopuštena masa iznosila je 50 mg) dodano je 600 μL komercijalnog 1 \times DNA/RNA zaštitnog reagensa (nepoznat sastav) i sadržaj je homogeniziran na opisani način. Potom je dodano 60 μL komercijalnog proteinaza K pufera (nepoznat sastav) i 30 μL proteinaze K (20 mg/mL). Proteinaza K je serinska proteaza široke supstratne specifičnosti koja katalizira proteolitičku razgradnju proteina. Dodatak ovog enzima inaktivira nukleaze koje bi u suprotnom mogle razgraditi DNA

ili RNA, a ujedno uklanja neželjene proteine tijekom izolacije nukleinskih kiselina, u ovome slučaju RNA. Smjesa je vorteksirana i inkubirana 5 minuta na 55 °C. Nakon centrifugiranja 2 minute pri $13\ 000 \times g$ na sobnoj temperaturi, supernatant je odvojen i dodan mu je 1 volumen komercijalnog pufera za lizu (nepoznat sastav). Sva daljnja centrifugiranja provedena su na isti način. Uzorci su preneseni na gDNA eliminatorske kolone s kolekcijskim tubicama uz centrifugiranje 1 minutu, a u nevezanu je frakciju dodan 1 volumen 96 % (v/v) etanola. Sadržaj je promiješan pipetiranjem i prenesen na RNA purifikacijsku kolonu s kolekcijskom tubicom. Centrifugiranje je ponovljeno, a nevezana je frakcija bačena. Na kolonu je potom dodano 500 μL komercijalnog pufera za ispiranje RNA (nepoznat sastav) uz centrifugiranje te je nevezana frakcija bačena. Moguća zaostala gDNA eliminirana je dodatkom 80 μL otopine DNaze I na kolonu pripremljene miješanjem 5 μL DNaze I (6 U/ μL) i 75 μL 10 \times inkubacijskog pufera. Nakon 15-minutne inkubacije na sobnoj temperaturi, dodano je 500 μL komercijalnog *RNA Priming* pufera (nepoznat sastav) te je provedeno centrifugiranje i bacanje nevezane frakcije. Opet je dodano 500 μL pufera za ispiranje RNA uz centrifugiranje i bacanje nevezane frakcije. Prethodni je korak ponovljen uz centrifugiranje u trajanju od 2 minute. Kolona je prenesena u novu tubicu uz „suho“ centrifugiranje. RNA je eluirana u novu tubicu s 30 μL ultračiste vode uz inkubaciju 2 minute na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem na opisani način. Svi koraci centrifugiranja provedeni su na $13\ 000 \times g$. Nakon određivanja koncentracije spektrofotometrijski koristeći *BioSpec-nano* (Shimadzu) (odjeljak 3.4.2.), izolirana je RNA alikvotirana i spremljena u hladnjak na -80 °C.

TRIZol metoda (*Ambion*): Nakon odvage tkiva (ciljana masa iznosila je 50 mg) i homogenizacije sa 700 μL TRIZola, lizat je inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. 0,14 μL kloroforma dodano je u lizat uz jako miješanje u trajanju od 15 sekundi i inkubaciju sadržaja u trajanju od 3 minute. Provedeno je centrifugiranje 15 minuta pri $12\ 000 \times g$ na 4 °C. U ovoj je fazi homogenat separiran na gornju, vodenu fazu koja sadrži RNA, interfazu s DNA i donju, organsku fazu s proteinima. Vodena faza je odvojena pipetiranjem i prenesena u novu tubicu. RNA je precipitirana dodatkom 350 μL izopropanola, inkubacijom 10 minuta i centrifugiranjem 10 minuta pri $12\ 000 \times g$ na 4 °C. Supernatant je uklonjen, a talog RNA je ispran sa 700 μL 75 % (v/v) etanola te je sadržaj vorteksiran. Nakon centrifugiranja 5 minuta pri $7500 \times g$ na 4 °C i uklanjanja supernatanta, talog je osušen 10 minuta pomoću termobloka zagrijanog na 37 °C. Osušeni je talog resuspendiran u 50 μL ultračiste vode. Masena koncentracija izolirane RNA određena je spektrofotometrijski koristeći *BioSpec-nano*

(Shimadzu) (odjeljak 3.4.2.), te je pročišćena od kontaminacije gDNA inkubacijom s DNazom I. To je učinjeno tako što je pomiješano: 8 µg RNA, 1 µL DNaze I (2 U/µL), 10 µL inkubacijskog pufera (10×) i ultračista voda do 100 µL. Smjesa je inkubirana 30 minuta na 37 °C, a potom 10 minuta na 75 °C.

RNA je pročišćena prema *Monarch RNA Cleanup Kit* protokolu. Dodana su 2 volumena komercijalnog *RNA Cleanup Binding* pufera (nepoznat sastav), a nakon toga 1 volumen 96 % (v/v) etanola. Sadržaj je promiješan pipetiranjem i prenesen na kolonu s kolekcijском tubicom. Slijedilo je centrifugiranje 1 minutu pri $12\,000 \times g$ na 23 °C, a nevezana je frakcija bačena. Sva daljnja centrifugiranja provedena su na isti način. Na kolonu je nanoseno 500 µL komercijalnog *RNA Cleanup Wash* pufera (nepoznat sastav) uz centrifugiranje. Korak je ponovljen. Kolona je stavljena u novu tubicu uz „suho“ centrifugiranje. RNA je eluirana u novu tubicu s 20 µL ultračiste vode uz inkubaciju 2 minute na sobnoj temperaturi i centrifugiranjem. Nakon određivanja koncentracije, izolirana je RNA alikvotirana i spremljena u hladnjak na -80 °C.

3.4.2. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracija RNA u uzorku određena je spektrofotometrijski na uređaju *BioSpec-nano* (Shimadzu). Na uređaj koji je prethodno nuliran ultračistom vodom, nanoseno je 1 µL uzorka te je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm određena koncentracija RNA. Postupak je identičan i za DNA. Nukleinske kiseline snažno apsorbiraju UV svjetlost valnih duljina 260 nm zbog rezonancijske strukture purinske i pirimidinske baze. Uređaj mjeri apsorbanciju i na valnim duljinama od 230 i 280 nm kako bi se odredila čistoća uzorka. Nukleinske kiseline i proteini imaju maksimum apsorbancije na 260 i 280 nm, što znači da omjer A_{260}/A_{280} predstavlja onečišćenje nukleinskih kiselina proteinima. Omjer od oko 1,8 prihvatljiv je za DNA, a oko 2,0 za RNA.¹¹² Slično tome, apsorbancija na 230 nm koristi se kao mjera ostalih onečišćenja. Omjer A_{260}/A_{230} za nukleinske kiseline veći je od omjera A_{260}/A_{280} . Očekivane vrijednosti su u rasponu od 1,8 do 2,3.¹¹²

3.4.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu

Agarozna gel-elektroforeza korištena je za razdvajanje DNA i RNA fragmenata različite veličine i procjenu njihove veličine te analizu produkata lančane reakcije polimerazom (odjeljak 3.4.6.), odnosno izolacije ukupne RNA. Svaka fosfatna skupina u molekuli DNA ima naboj -1, stoga će omjer naboja i mase u bilo kojoj molekuli DNA biti jednak i iznositi će -2 po

paru nukleotida pri pH vrijednosti 7. Zbog ukupnog negativnog naboja, DNA će se kretati prema pozitivnom električnom polu tijekom elektroforeze. Brzina kretanja molekula u elektroforezi ovisi o veličini i obliku molekule. Budući da je omjer naboja i mase jednak za svaku molekulu DNA neovisno o veličini molekule, moguće je linearne fragmente različitih duljina razdvajati u električnom polju isključivo na temelju razlike u masi, tj. veličini. Metoda omogućava razdvajanje fragmenata DNA u rasponu od 100 do 20 000 pb. Molekule jednake molekulske mase gibat će se različito ovisno o formi, pa će se tako superzavijene molekule gibati najbrže, linearne nešto sporije, a relaksirane cirkularne molekule najsporije. Elektroforezom na agaroznom gelu razdvajaju se fragmenti DNA korištenjem vanjskog električnog polja, a agarozni gel služi kao molekulsko sito kojim se osigurava da se veće molekule gibaju sporije. Agaroz je linearni polimer D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Ovisno o apsolutnoj i relativnoj veličini fragmenata može se pripremiti agarozni gel s različitim udjelom agaroze. Kretanje molekula RNA kroz agarozni gel temelji se na istim principima uz pojedine razlike: RNA je za razliku od DNA jednolančana molekula sklona stvaranju sekundarnih struktura, što sprječava njezinu migraciju strogo u skladu s veličinom. Stoga je za procjenu veličine fragmenata RNA eksperiment poželjno provesti u denaturirajućim uvjetima.¹⁰⁶

1 % (w/v) agarozni gel za analizu RNA pripremljen je otapanjem 1 g agaroze u 100 mL TAE pufera (1×) (tablica 6), a elektroforeza je provedena u nativnim uvjetima. Smjesa TAE pufera i krute agaroze otopljena je u Erlenmeyerovoj tikvici pomoću mikrovalne pećnice ($P = 600 \text{ W}$). Smjesa je uz prekide zagrijavana do vrenja dok uz povremeno miješanje nije postignuta homogena agarozna smjesa. Nakon što je tikvica dovoljno ohlađena da se njezino dno moglo dotaknuti golom rukom, dodano je 0,5 μL *GelStar* boje, koja se koristi za detekciju nukleinskih kiselina (jednolančane ili dvolančane DNA te RNA) na temelju fluorescencije samo u slučaju kada je vezana na njih (nevezana boja ne fluorescira). *GelStar* boja predstavlja prikladnu i manje opasnu alternativu etidij-bromidu. Otopina je zatim jednolično izlivena u kalup te je postavljen češalj za formiranje jažica. Zaostali mjehurići zraka uklonjeni su vrhom nastavka za mikropipetu. Gel je ostavljen polimerizirati 30-ak minuta, a potom je pažljivo izvađen češalj. Stvrdnuti gel je prenesen u kadicu za elektroforezu te je uronjen u 400 mL TAE pufera (1×). Elektroforeza je provedena pri naponu od 100/120 V na sobnoj temperaturi u trajanju 30-40 minuta koristeći uređaj za horizontalnu elektroforezu *Biometra Compact XS/S (Analytic Jena)*. Kao standard veličine korišten je *GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use* (0,5 μL). Uzorci

za elektroforezu pripremljeni su miješanjem određene količine uzorka s *DNA Gel Loading Dye* (6×) na način da se boja razrijedi 6 puta. Jednaka količina svih uzoraka stavljena je u jažice gela. Nukleinske kiseline u gelu vizualizirane su slikanjem gela pomoću uređaja *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)*.

3.4.4. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT) je proces nastanka jednolančane komplementarne DNA (cDNA) s mRNA kalupa. Provođenjem PCR-a koji umnaža dio gena od interesa na cDNA kalupu može se indirektno kvantificirati ekspresija istog gena. Reverzna transkripcija je nemoguća bez enzima reverzne transkriptaze, RNA-ovisne DNA-polimeraze koja transkribira jednolančanu RNA u jednolančanu DNA. Enzim zahtijeva kratki DNA oligonukleotid (početnicu) komplementaran molekuli RNA kao početno mjesto sinteze novog lanca. Nakon raspada RNA, enzim je sposoban sintetizirati drugi lanac DNA komplementaran nastaloj cDNA (DNA-ovisna DNA-polimeraza).¹¹³

Za provedbu reverzne transkripcije korišten je komercijalno dostupan komplet *ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB)* koji kombinira rekombinantnu M-MuLV reverznu transkriptazu sa smanjenom RNaza H aktivnošću i povećanom termostabilnošću, te murinski inhibitor RNaze. 1 µg RNA pomiješan je s 2 µL početnica (nasumični heksameri), 10 µL enzimske mješavine i ultračistom vodom do 20 µL. Nasumični heksameri su smjesa svih mogućih kombinacija sekvenci duljine šest nukleotida koje se mogu nasumično vezati s mRNA i pokrenuti reverznu transkripciju kompletne RNA smjese. Sadržaj je inkubiran 5 minuta na 25 °C, a potom 1 sat na 42 °C. Budući da je dodan 1 µg RNA, a volumen smjese je iznosio 20 µL, masena koncentracija nastale cDNA iznosi 50 ng/µL. Ovaj podatak je bitan za provedbu qPCR eksperimenta (odjeljak 3.4.7.). cDNA je alikvotirana i spremljena u hladnjak na -20 °C.

3.4.5. Pronalazak sekvenci gena i dizajn početnica

Sekvence mišjih gena od interesa, *p97*, *SPRTN-a*, *18S rRNA* i *EEF2*, pronađene su u *NCBI* (engl. *national center for biotechnology information*) bazi podataka.¹¹⁴ Kodirajuće sekvence navedenih gena (engl. *coding DNA sequence*, CDS), kao i dizajnirane početnice (engl. *primer*), unesene su u *BioEdit* program (za poravnavanje i analizu sljedova nukleinskih kiselina) radi daljnje pohrane i analize. Početnice za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa qPCR analizom (odjeljak 3.4.7.) dizajnirane su pomoću *NCBI – Primer-BLAST* alata za dizajn

početnica uz pridržavanje svih standardnih pravila za dizajn početnica: duljina početnice 18-25 nukleotida, postotak GC sadržaja 40-60 % uz završetak početnice s gvaninom ili citozinom, 2 gvanina ili citozina u zadnjih 5 nukleotida na 3'-kraju početnice, bez uzastopnog ponavljanja istog nukleotida ili dinukleotida (4 ili manje u slijedu), bez sekundarnih struktura, bez autokomplementarnosti (manje od 4 baze u slijedu), bez komplementarnosti s drugom početnicom (manje od 4 baze u slijedu), temperatura mekšanja početnice (engl. *primer melting temperature*, T_m) mora biti između 55 i 72 °C, razlika između T_m uzvodne i nizvodne početnice može iznositi najviše 5 °C, udaljenost između 2 početnice u ciljnom slijedu mora biti manja od 2000 nukleotida.¹¹⁵ Vjerojatnost stvaranja sekundarnih struktura provjerena je pomoću *PrimerSelect* programa. Postupak dizajna izvršen je uz dva dodatna uvjeta: (i) granica između dva egzona u mRNA gena morala je biti dio PCR produkta kako bi se osigurala specifičnost amplifikacije s cDNA i, (ii) duljina PCR produkta bila je 85-115 parova baza (pb). Na ovaj način je povećana učinkovitost amplifikacije traženog PCR produkta, a veća učinkovitost znači manje varijacija prilikom navedenog procesa, veću preciznost i specifičnost amplifikacije. Početnice su naručene od komercijalnog dobavljača, tvrtke *Macrogen*.

Tablica 8. Nukleotidni slijedovi dizajniranih početnica specifičnih za kvantifikaciju ekspresije gena od interesa u domaćem mišu, duljine PCR produkata i temperature taljenja (engl. *primer melting temperature*, T_m) uzvodnih (engl. *forward*, F) i nizvodnih (engl. *reverse*, R) početnica.

Naziv gena	Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Duljina PCR produkta	T_m / °C
<i>p97</i>	p97 F	5' TGA GAG CAA CCT TCG TAA AGC 3'	110 pb	59,7
	p97 R	5' CCC CAT GAG TTT TCT CTC TTT TGG 3'		61,3
<i>SPRTN</i>	SPRTN F	5' CAT AAC GGT CTA CCA CAC TTT CC 3'	117 pb	60,3
	SPRTN R	5' GTG GCA CGC TTC ACA TAG C 3'		58
<i>18S rRNA</i>	18S rRNA F	5' GAT GGT AGT CGC CGT GCC TA 3'	108 pb	60,7
	18S rRNA R	5' CCT GCT GCC TTC CTT GGA 3'		59,8
<i>EEF2</i>	EEF2 F	5' TCC CCA TCA AGA AAT CTG ACC C 3'	104 pb	59,8
	EEF2 R	5' CAG CCG GTT GTG CTT ATT GG 3'		59,8

3.4.6. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda za brzo *in vitro* umnažanje određenog segmenta molekule DNA. Reakcija se provodi uzastopnim

ponavljanjem tri koraka, a broj ponavljanja najčešće iznosi 30-35 puta. Tri ponavljajuća koraka PCR-a su: (i) toplinska denaturacija koja uzrokuje razdvajanje lanaca dvolančane DNA molekule, (ii) sparivanje (prianjanje) oligonukleotidnih početnica i molekule DNA (kalupa), pri čemu početnice omeđuju nukleotidni slijed koji se želi umnožiti i, (iii) sinteza komplementarnih lanaca pomoću termostabilne DNA-polimeraze. Korak početne denaturacije vremenski je duži od denaturacije u ponavljajućim koracima jer je vrlo važno da u prvom koraku kalup potpuno denaturira. Završna elongacija također je duža od elongacije u ponavljajućim koracima kako bi se osigurala potpuna sinteza novonastalih DNA fragmenata. Teorijski se u svakom ciklusu PCR-a broj molekula DNA povećava dva puta, stoga bi nakon n ponovljenih ciklusa u reakcijskoj smjesi trebalo biti 2^n puta više željenog segmenta DNA u odnosu na početnu količinu. Svaka reakcijska smjesa za PCR sadržava sljedeće komponente: kalup (gDNA, cDNA, fragment DNA ili plazmid), dNTP smjesu, početnice, termostabilnu DNA-polimerazu i pripadajući pufer. Metoda zahtijeva uređaj koji omogućava brze izmjene temperature i preciznu regulaciju iste.¹⁰⁶ Korišten je gradijentni PCR uređaj *T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)*.

PCR je rađen u svrhu provjere uspješnosti reverzne transkripcije i kvalitete sintetizirane cDNA, rada dizajniranih početnica i podobnosti referentnih (engl. *housekeeping*) gena. Proveden je *NEB*-ov protokol za *Taq*-DNA-polimerazu sa standardnim *Taq* puferom. *Taq*-DNA-polimeraza je vrsta termostabilne DNA-polimeraze iz bakterije *Thermus aquaticus*, a karakterizira ju relativno niska vjernost replikacije zbog nedostatka 3' → 5' egzonukleazne aktivnosti (izrezivanje krivo ugrađenih nukleotida na 3'-kraju novog lanca tijekom elongacije). Volumen pojedine reakcije iznosio je 15 μL, a smjesa je sadržavala: standardni 1× *Taq* pufer (sastav: 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L MgCl₂, pH = 8,3), dNTP smjesu (konačne koncentracije 0,2 mmol/L), uzvodnu početnicu (konačne koncentracije 0,2 μmol/L), nizvodnu početnicu (konačne koncentracije 0,2 μmol/L), *Taq*-DNA-polimerazu (konačne koncentracije 0,025 U/μL), 10 ng cDNA i ultračistu vodu do 15 μL. Temperature mekšanja početnica određene su pomoću *NEB* T_m kalkulatora.¹¹⁶ Uspješnost PCR-a provjeravana je agaroznom gel-elektroforezom.

Tablica 9. Postav PCR-a za *Taq*-DNA-polimerazu sa standardnim *Taq* puferom koristeći *NEB*-ov protokol.

Korak	$T / ^\circ\text{C}$	Trajanje / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	0,5	1
Denaturacija	95	0,5	30
Sparivanje početnica	53 ili 55*	1	30
Elongacija	68	0,5	30
Završna elongacija	68	5	1
Hlađenje	10	∞	1

*Temperatura sparivanja početnica (engl. *primer annealing temperature, Ta*) ovisi o temperaturi mekšanja početnica, a jednaka je temperaturi mekšanja početnice s nižom temperaturom mekšanja u paru početnica umanjena za 5 °C.

3.4.7. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction, qPCR*) ili PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) laboratorijska je metoda koja se temelji na istim principima kao i klasična lančana reakcija polimerazom, ali dodatno omogućava kvantifikaciju početne količine DNA u uzorku prikupljanjem podataka pomoću fluorescencijskih boja ili proba. Porast fluorescencije koji se mjeri tijekom PCR ciklusa razmjeran je količini dobivene DNA tijekom svakog ciklusa (u stvarnom vremenu), a visoka osjetljivost metode posljedica je upravo mjerenja fluorescencije. Uvođenje simultanog sustava za amplifikaciju i detekciju PCR produkta tijekom vremena najveća je prednost u odnosu na klasični PCR.¹¹⁷

Dva glavna pristupa za praćenje fluorescencije temelje se na korištenju SYBR Green I boje i probe TaqMan. SYBR Green I veže se isključivo na dvolančanu DNA, a za to postoje dva načina: interkalacija između parova baza i vezanje izvana na manji udio molekule DNA (preferentno na AT parove baza). Slobodna boja u otopini ne fluorescira, već tek nakon vezanja. Proba TaqMan je oligonukleotid specifičan za gen od interesa koji na 5'-kraju ima fluorofor, a na 3'-kraju utišivač fluorescencije. Kad je proba u netaknutom stanju, zbog blizine utišivača, fluorofor ne emitira signal. Proba se dizajnira tako da se komplementarno veže na ciljni gen između para početnica specifičnih za taj gen. Kako *Taq*-DNA-polimeraza produljuje početnice,

dolazi do probe te uklanja fluorofor s probe jer posjeduje 5' → 3' egzonukleaznu aktivnost. Odvajanjem fluorofora dolazi i do odstranjivanja ostatka probe s DNA te se produljenje lanca nastavlja. Zbog međusobnog udaljavanja fluorofora i utišivača dolazi do emitiranja fluorescencijskog signala. Što je više nastalog produkta, to je signal jači jer je više odvojenog fluorofora.^{117,118}

Sam proces qPCR-a može se podijeliti u 3 faze. Prva faza je tzv. lag faza, kod koje fluorescencija ne prelazi fluorescenciju bazne linije (engl. *baseline*). Bazna fluorescencija je posljedica postojanja pasivne fluorescencijske boje u qPCR reakcijskoj smjesi, a njezina je fluorescencija tijekom cijelog ciklusa PCR-a konstantna. Druga faza započinje kada fluorescencija umnažanja PCR produkta prijeđe fluorescenciju bazne linije te označava početak eksponencijalnog umnažanja DNA. Treću fazu čine linearna faza i faza platoa kada jedan ili više reaktanata bude potrošen. Ovom se metodom pretpostavlja da je količina PCR produkta tijekom eksponencijalne faze proporcionalna početnoj količini kalupa. Tako se određuje proizvoljna vrijednost granične fluorescencije u eksponencijalnoj fazi (eng. *threshold*). U trenutku kada fluorescencija prijeđe graničnu fluorescenciju, definira se broj qPCR ciklusa pri kojem se dostiže granična vrijednost fluorescencije (engl. *cycle threshold*, *C_t*). Što je *C_t* vrijednost manja, to je početna količina kalupa veća jer je granična razina fluorescencije postignuta prije, odnosno postojala je veća količina postojećeg kalupa (više kopija gena od interesa).¹¹⁸

qPCR je pouzdana i precizna metoda za apsolutnu ili relativnu kvantifikaciju molekula DNA. Apsolutnom kvantifikacijom može se precizno odrediti broj kopija DNA u nekom uzorku uspoređujući fluorescenciju sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću serijskih razrjeđenja standarda poznatih koncentracija. Relativna kvantifikacija, provedena u sklopu ovog diplomskog rada, služi za analizu relativne promjene u količini DNA, tj. za usporedbu ekspresije između različitih uzoraka od interesa. Kako bi se rezultati dobiveni iz dva različita uzorka mogli uspoređivati, dobivene vrijednosti prethodno se trebaju normalizirati. Normalizacija je potrebna jer su moguće brojne eksperimentalne varijabilnosti tijekom pripreme i analize uzoraka. U tu se svrhu koristi endogena kontrola, gen čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojima je proveden eksperiment (engl. *housekeeping gene*, HKG), tj. čija je ekspresija jednaka ili vrlo slična u svim istraživanim uzorcima. Osim pronalaska prikladnog HKG-a, bitno je i da efikasnost amplifikacije PCR produkta za gen od interesa i HKG bude jednaka ili slična.^{117,118}

Za kvantifikaciju ekspresije gena koristi se reverzna transkripcija u sprezi s kvantitativnim PCR-om (RT-qPCR), a može se izvoditi u jednom ili dva koraka. Kod RT-qPCR-a u jednom koraku, u istoj se epruveti odvijaju reakcije reverzne transkripcije i umnažanja DNA PCR-om. Ovaj način smanjuje eksperimentalne varijacije, ali se dobivena cDNA ne može iznova analizirati. Kod RT-qPCR-a u dva koraka, provedenog u sklopu ovog rada, najprije se u jednoj epruveti provede reakcija reverzne transkripcije te se dobivena cDNA u novoj epruveti analizira qPCR-om. RT-qPCR-om u dva koraka dobivena se cDNA može analizirati više puta, ali se povećava mogućnost kontaminacije DNA, što je u ovom slučaju izbjegnuto jer su korišteni alikvoti cDNA. Za reakciju su potrebne vrlo male količine RNA, što omogućava upotrebu ove metode i u slučajevima kada je na raspolaganju vrlo mala količina početnog uzorka.^{117,118}

qPCR je korišten u svrhu testiranja efikasnosti rada dizajniranih početnica (amplifikacije PCR produkta) i relativne kvantifikacije ciljanih gena na razini mRNA u tkivima domaćeg miša (*Mus musculus*, *Mm*) i ribe zebrice (*Danio rerio*, *Dr*). Pripreme reakcijskih smjesa za qPCR analizu provedene su na sobnoj temperaturi u kabinetu za sterilni rad s laminarnim protokom zraka prethodno izloženom UV svjetlosti radi sterilizacije radnog prostora, a reakcijske smjese su pipetirane u jažice optičkih stripova (8×) ili optičkih mikrotitarskih pločica (96×), ovisno o broju uzoraka. Volumen pojedine reakcije iznosio je 10 µL, a smjesa je sadržavala: 5 µL *SYBR Green PCR Master Mix*-a (1×), 0,5 µL uzvodne početnice (konačne koncentracije 0,3 µmol/L), 0,5 µL nizvodne početnice (konačne koncentracije 0,3 µmol/L), 1,5 µL cDNA i 2,5 µL ultračiste vode. Masa cDNA u reakcijskoj smjesi iznosila je 10 ng (6,67 ng/µL) u slučaju kvantifikacije gena, a u slučaju testiranja efikasnosti rada početnica pripremljeno je 7 serijskih razrjeđenja cDNA sljedećih masenih koncentracija: 6,67 ng/µL, 3,33 ng/µL, 1,67 ng/µL, 0,67 ng/µL, 0,2 ng/µL, 0,067 ng/µL i 0,02 ng/µL. Masena koncentracija izvorne cDNA iznosila je 50 ng/µL. Osim *SYBR Green PCR Master Mix*-a (2×), korišten je i *GoTaq qPCR Master Mix* (2×). U tom je slučaju volumen ultračiste vode po reakciji iznosio 2,4 µL jer je odvojeno dodavan 0,1 µL pasivne fluorescencijske boje CXR (engl. *Carboxy-X-Rhodamine*), identične ROX referentnoj boji u *SYBR Green PCR Master Mix*-u. Konačna koncentracija CXR boje u reakciji iznosila je 0,3 µmol/L. *GoTaq qPCR Master Mix* umjesto SYBR Green I boje koristi BRYT Green boju, koja djeluje na identičan način i ima slična spektralna svojstva. Navedeni komercijalni *Master Mix*-ovi, osim fluorescencijske boje i pasivne reference (kod *GoTaq qPCR Master Mix*-a dodaje se odvojeno), sastoje se od dNTP smjese i termostabilne *Taq*-DNA-polimeraze visoke vjernosti s odgovarajućim puferom. Kao i kod običnog PCR-a, radi jednostavnosti i uštede vremena,

priređivan je qPCR *Master Mix* sa svim navedenim komponentama osim cDNA. Tijekom svakog qPCR eksperimenta, u jažice su pipetirani triplicati pojedine cDNA, kao i negativna kontrola, koja predstavlja reakcijsku smjesu bez kalupa (engl. *no template control*, NTC). Pripremljeni uzorci u stripovima zatvorenim kapicama ili mikrotitarskoj pločici zalijepljenoj prozirnrom folijom centrifugirani su 5 minuta pri $500 \times g$ na $23 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se osiguralo da dio smjese nije ostao uz rubove jažica. Mjerenje je provedeno na uređaju *7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* nakon podešavanja parametara mjerenja. Efikasnost rada početnica (E) izračunata je uz pomoć programa *Microsoft Office Excel 2013* na temelju formule:

$$E (\%) = \left(10^{\frac{-1}{a}} - 1\right) \cdot 100 \text{ ili } E = 10^{\frac{-1}{a}} - 1,$$

gdje a predstavlja koeficijent smjera pravca linearne regresije.

Dobiveni rezultati u svrhu relativne kvantifikacije gena obrađeni su *Q-Gene* metodom⁷ pomoću formule koja se temelji na srednjoj vrijednosti normalizirane ekspresije gena (engl. *Mean Normalized Expression*, MNE):

$$MNE = [E(HKG)^{\overline{C_T(HKG)}} / E(gen)^{\overline{C_T(gen)}}],$$

gdje je: $\overline{C_T(HKG)}$ – srednja C_T vrijednost referentnog gena za cjelokupno mjerenje (za sva tkiva), $\overline{C_T(gen)}$ – srednja C_T vrijednost promatranog gena za određeno tkivo, $E(HKG)$ – efikasnost rada početnica specifičnih za kvantifikaciju referentnog gena i $E(gen)$ – efikasnost rada početnica specifičnih za ekspresiju gena od interesa. Ekspresija gena u tkivima domaćeg miša i ribe zebrice analizirana je i grafički prikazana pomoću *Microsoft Office Excel 2013* i *GraphPad Prism 8* programa.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

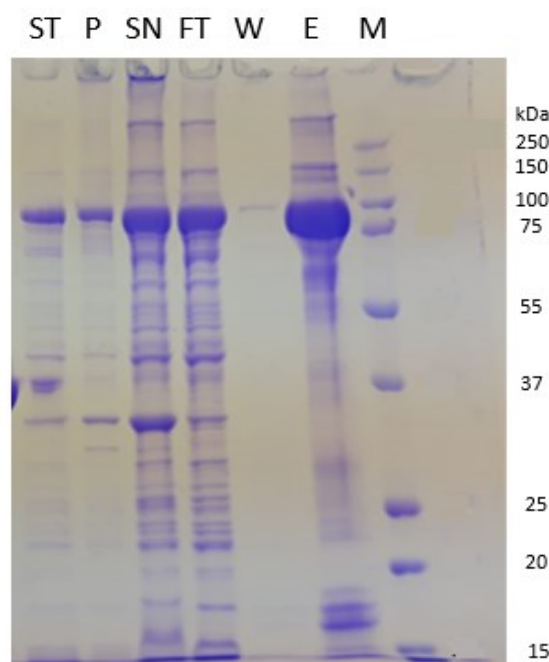
4.1. Heterologna nadekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina

Humani proteini p97 WT, SPRTN WT i SPRTN E112A izolirani su u svrhu kasnijeg dobivanja kompleksa SPRTN:p97 radi njegove strukturne i biokemijske karakterizacije. Iako se zna da kompleks SPRTN:p97 postoji u stanic⁶ i vjerojatno ima ključnu ulogu u protealizo-ovisnom popravku DPC-a u višim eukariotima, nije poznato na koji način ovi proteini interagiraju. Osim toga, trenutno nije poznata niti regulacija cijelog mehanizma, kao ni ostali faktori koji sudjeluju u popravku, a gotovo ništa nije poznato o mehanizmu popravka DPC-a *in vivo*. Struktura proteina p97 je poznata⁹³, a SPRTN-ova djelomično (dio katalitičke domene SprT).⁷⁹ Za uvid u strukturu koristit će se krio-elektronska mikroskopija. Radi se o relativno novoj metodi koja se koristi u strukturnoj biologiji za određivanje 3D struktura makromolekula, pri čemu se uzorak smrzava na temperaturu tekućeg dušika, a tako niska temperatura omogućava očuvanje nativne strukture biomolekula. Glavne prednosti su što ne zahtijeva prethodnu kristalizaciju makromolekule ili kompleksa radi strukturne analize i što su analizi krio-elektronskom mikroskopijom dostupni uzorci koje je teško prirediti u velikim količinama potrebnim za kristalizaciju.¹¹⁹

4.1.1. p97 WT

Protein p97 WT je prekomjerno eksprimiran i izoliran iz soja *Rosetta (DE3)* bakterije *E. coli* transformacijom rekombinantnim plazmidom pET-24d(+)-(His)₆-TEV-*Hs* p97 WT s kanamicinskom rezistencijom. Nakon prekonoćnog uzgoja, u hranjivom mediju narasle su samo one bakterije koje su uspješno transformirane spomenutim rekombinantnim plazmidnim vektorom. Kodirajući slijed za protein ukloniran je u višestruko mjesto za kloniranje pod kontrolom inducibilnog *lacUV5* promotora, stoga je prekomjerna ekspresija proteina inducirana IPTG-om. Inducirane i prekonoćno uzgojene bakterijske stanice oborene su centrifugiranjem i resuspendirane u puferu A. Lizirane stanice su centrifugirane i topljiva frakcija je odvojena od taloga. Protein je pročišćen afinitetnom kromatografijom na koloni s Ni-NTA agarozom kao stacionarnom fazom, a tijekom dijalize proteolitički je uklonjen (His)₆-privjesak enzimom

TEV. Prilikom izvođenja ovih koraka, skupljene su male frakcije uzoraka radi analize metodom SDS-PAGE u svrhu provjere uspješnosti prekomjerne ekspresije i pročišćavanja proteina, kao i uklanjanja afinitetnog privjeska. Rezultati su prikazani na slikama 6 i 7.

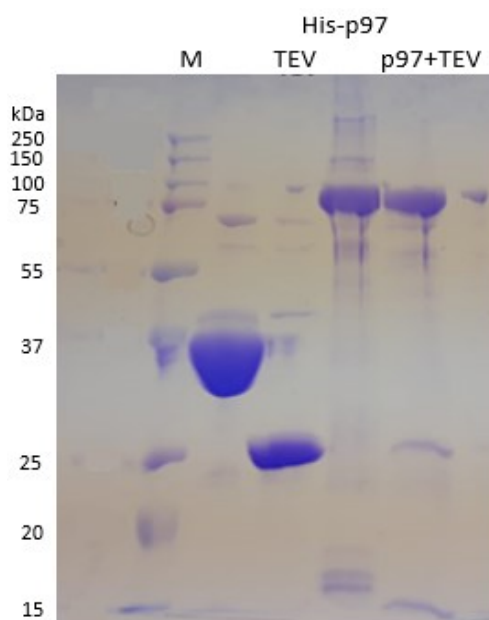


Slika 6. Poliakrilamidni gel nakon provedene metode SDS-PAGE tijekom izolacije proteina p97 WT na uzorcima: bakterijskih stanica nakon indukcije IPTG-om – ST, taloga nakon centrifugiranja liziranih stanica – P, supernatanta nakon centrifugiranja liziranih stanica – SN, nevezane frakcije nakon inkubacije s puferom A – FT, frakcije nakon ispiranja puferom B – W, frakcije nakon ispiranja puferom C – E i markera molekulske mase *Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad)* – M.

Iz ovih se rezultata može zaključiti da je protein p97 WT uspješno prekomjerno ekspimiran i pročišćen, ali i da uvjete pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu treba dodatno optimizirati kako bi se postigla efikasnija izolacija proteina i bolja čistoća. U bakterijskim stanicama nakon indukcije IPTG-om (ST) očekivano su bili prisutni svi proteini, a najviše prekomjerno ekspimirani p97 WT, ali njihove su linije slabog intenziteta budući da se radilo o vrlo malom uzorku stanica. To je potvrda da su transformacija bakterije rekombinantnim plazmidom s ugrađenim kodirajućim slijedom za p97 WT i indukcija prekomjerne ekspresije proteina IPTG-om uistinu bile uspješne. U talogu nakon centrifugiranja liziranih stanica (P) bili su prisutni svi netopljivi proteini, a najviše prekomjerno ekspimirani p97 WT. Intenziteti linija su slabiji u odnosu na ST. Ovakav rezultat je posljedica nepotpune lize stanica, a ne može se isključiti niti prelazak dijela proteina u netopljiva inkluzijska tijela. U supernatantu nakon centrifugiranja liziranih stanica (SN) bili su prisutni svi topljivi proteini,

a najviše prekomjerno eksprimirani p97 WT. Velika količina proteina (His)₆-p97 WT, nakon dodatka Ni-NTA agaroze, ostala je nevezana (FT), što je posljedica korištenja nedovoljne količine smole. Nevezana frakcija nakon inkubacije s puferom A u idealnom slučaju mora sadržavati sve proteine osim proteina od interesa s afinitetnim privjeskom. Ispiranje puferom B (W) bilo je neefikasno te nije uklonilo nespecifično vezane proteine s Ni-NTA agaroze zbog preniske koncentracije imidazola u puferu. Ispiranje puferom C (E) uklonilo je s Ni-NTA agaroze veliku količinu proteina p97 WT. Uz traženi protein, eluirani su i drugi nespecifično vezani proteini. U idealnom slučaju svi ostali vezani proteini do ovoga koraka već su trebali biti uklonjeni, tako da dodatak pufera C eluira samo protein od interesa s afinitetnim privjeskom. Dakle, za učinkovitije pročišćavanje proteina p97 WT trebalo bi koristiti veću količinu smole i veću koncentraciju imidazola u puferu B. U svim frakcijama, linija prekomjerno eksprimiranog proteina nalazi se na poziciji koja je nešto ispod pozicije koja odgovara molekulskoj masi od 100 kDa, što je u skladu s molekulskom masom monomera proteina p97 WT ($M_r = 89$ kDa).

Budući da je dobiveni protein sadržavao heksahistidinski privjesak, njegovo uklanjanje postignuto je prilikom dijalize inkubacijom s enzimom TEV, koji prepoznaje karakterističnu aminokiselinsku sekvencu između afinitetnog privjeska i sekvence proteina, te ju proteolitički cijepa. Rezultat je provjeren metodom SDS-PAGE i prikazan na slici 7.



Slika 7. Poliakrilamidni gel nakon provedene metode SDS-PAGE tijekom izolacije proteina p97 WT na uzorcima: markera molekulske mase *Precision Plus Protein Standards Unstained* (Bio-Rad) – M, enzima TEV – TEV, pročišćenog proteina p97 WT s afinitetnim privjeskom – His-p97 i smjese proteina p97 WT i TEV nakon provedene dijalize – p97 + TEV.

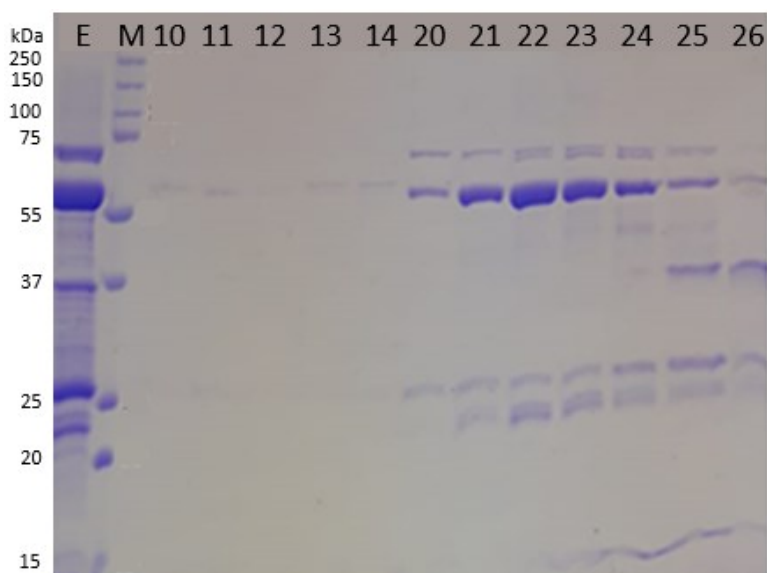
Slika gela potvrđuje uspješnu izolaciju proteina p97 WT, ali se iz nje ne može sa sigurnošću potvrditi uspješnost djelovanja enzima TEV i cijepanje (His)₆-privjeska, iako se kod uzorka "p97 + TEV" može primijetiti da se linija nalazi minimalno ispod one za uzorak "His-p97". Također, u slučaju uzorka "p97 + TEV", na poziciji koja odgovara molekulknoj masi od 15 kDa prisutna je linija koja može odgovarati zaostalom odcjepljenom peptidu, budući da navedena linija izostaje u slučaju uzorka "His-p97", a metodom SDS-PAGE ne mogu se odrediti molekulske mase tako malih fragmenata. Linija koja predstavlja enzim TEV ($M_r = 27$ kDa) nalazi se na očekivanom mjestu, odnosno odmah iznad pozicije koja odgovara molekulknoj masi od 25 kDa. Zaključno, razlog za ovakav rezultat je gotovo identična molekulska masa proteina p97 WT i (His)₆-p97 WT (razlika oko 1,7 kDa), kao i dodatak prevelike količine uzoraka na gel. Na taj se način onemogućava razlikovanje linija na gelu.

4.1.2. *SPRTN WT i SPRTN E112A*

Proteini SPRTN WT i SPRTN E112A prekomjerno su eksprimirani i pročišćeni na vrlo sličan način kao i protein p97 WT. Korišteni su rekombinantni plazmidi pNIC-(His)₆-Zb-TEV-*Hs* SPRTN WT i pNIC-(His)₆-Zb-TEV-*Hs* SPRTN E112A s kanamicinskom rezistencijom. Kodirajući sljedovi za proteine uklonirani su u višestruko mjesto za kloniranje navedenog vektora pod kontrolom inducibilnog *lacUV5* promotora, stoga je prekomjerna ekspresija proteina također inducirana IPTG-om. Navedeni proteini, za razliku od p97 WT, dodatno su pročišćeni metodom gel-filtracije kako bi se uklonili neželjeni zaostali proteini i degradacijski produkti SPRTN-a. Uspješnost pročišćavanja proteina procijenjena je metodom SDS-PAGE, a rezultat je prikazan na slici 8.



(a)



(b)

Slika 8. Poliakrilamidni gel nakon provedene metode SDS-PAGE tijekom izolacije proteina (a) SPRTN WT i (b) SPRTN E112A na uzorcima: frakcije nakon ispiranja puferom C – E, markera molekulske mase *Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad)* – M i frakcija sakupljenih tijekom gel-filtracije – 11, 19-27, 30 i 31 (a) / 10-14, 20-26 (b).

I SPRTN WT i SPRTN E112A u elucijskoj frakciji (E) sadržavali su ostale, nespecifično vezane proteine. Stoga je dodatno pročišćavanje tih proteina bilo neophodno. Nakon provedene gel-filtracije proteina, na temelju slike 8, spojene su i ukoncentrirane frakcije 21, 22 i 23 za oba proteina, te se može zaključiti da su proteini SPRTN WT i SPRTN E112A uspješno

prekomjerno eksprimirani i pročišćeni. Kao i kod proteina p97 WT, uvjete pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu treba dodatno optimizirati. U oba slučaja, netom iznad pozicije koja odgovara molekulskoj masi od 55 kDa prisutna je linija koja odgovara proteinima SPRTN WT i SPRTN E112A. Molekulska masa navedenih proteina iznosi 55 kDa.

Pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu nije dalo proteine željene čistoće jer se u uzorcima elucijskih frakcija, u oba slučaja, uz liniju koja odgovara ciljnom proteinu (iznad 55 kDa) pojavljuju i druge linije pri različitim molekulskim masama koje odgovaraju proteinskim onečišćenjima. Kako ciljni proteini nisu bili zadovoljavajuće čistoće, provedena je gel-filtracija, a pojedine su frakcije skupljene i analizirane metodom SDS-PAGE. Za oba proteina, frakcije 21, 22 i 23 bile su najbogatije odgovarajućim proteinom, uz minimalnu prisutnost nečistoća. Proteinska onečišćenja su identična za WT protein i katalitički mutant, a nalaze se ispod pozicije koja odgovara molekulskoj masi od 75 kDa i iznad pozicija koje odgovaraju molekulskim masama od 20 i 25 kDa. Dakle, niti jedna metoda pročišćavanja proteina nije idealna. Na temelju slike gela nakon provedene SDS-PAGE ne može se točno definirati onečišćenje, ali se može pretpostaviti njezino porijeklo. Gornja linija najvjerojatnije predstavlja nepocijepani fuzijski protein (His)₆-Zb-TEV-SPRTN WT (slika 8a), odnosno (His)₆-Zb-TEV-SPRTN E112A (slika 8b), što znači da djelovanje TEV proteaze nije bilo idealno, te je stoga ostalo ponešto nepocijepanog fuzijskog WT proteina/katalitičkog mutanta. Linija iznad pozicije koja odgovara molekulskoj masi od 25 kDa predstavlja TEV proteazu, a linije ispod nje predstavljaju fragmente proteina SPRTN WT/SPRTN E112A najvjerojatnije nastale kao posljedica raspada navedenih intrinzično nestabilnih proteina i/ili zbog cijepanja tih proteina proteazama iz *E. coli* (u stanici ili tijekom pročišćavanja), a sve zbog neuređene strukture (C-kraja) SPRTN-a. U slučaju WT proteina, ne može se isključiti niti već zabilježeno autoproteolitičko djelovanje DNA-ovisne metaloproteaze SPRTN.²²

4.1.3. Koncentracije i masa proteina

Pročišćeni proteini ukoncentrirani su pomoću centrikona *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (Millipore), a nakon toga su određene molarna i masena koncentracija te masa proteina. Određivanje molarne koncentracije proteina opisano je u odjeljku 3.3.6. Masena koncentracija (γ) određena je iz molarne koncentracije (c) i molarne mase proteina (M) prema formuli:

$$\gamma = c \cdot M.$$

Masa proteina (m) izračunata je iz masene koncentracije i volumena otopine proteina (V) prema formuli:

$$m = \gamma \cdot V.$$

Tablica 10. Koncentracije (molarna (c) i masena (γ)) i masa (m) izoliranih proteina uz ostale podatke bitne za njihov izračun: molekulska masa (M_r), apsorbanacija (A_{280}), ekstincijski koeficijent (ϵ). Navedeni su i početni volumeni bakterijske kulture (V_{kulture}) te dobiveni finalni volumeni otopine proteina (V_{otopine}).

Protein	M_r	A_{280}	$V_{\text{kulture}} / \text{L}$	$V_{\text{otopine}} / \text{mL}$	$\epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$c / \text{mol L}^{-1}$	$\gamma / \text{g L}^{-1}$	m / mg
p97 WT	89 321,8	1,6	0,5	0,5	36 000	$4,44 \times 10^{-5}$	3,97	1,99
(His) ₆ -p97 WT	92 198,9	2,3	0,5	0,15	39 000	$5,90 \times 10^{-5}$	5,44	0,82
SPRTN WT	55 133,8	2,0	2	0,45	69 000	$2,90 \times 10^{-5}$	1,60	0,72
SPRTN E112A	55 075,8	1,0	2	0,45	69 000	$1,45 \times 10^{-5}$	0,80	0,36

Iz rezultata prekomjerne ekspresije i pročišćavanja proteina sumiranih u tablici 10 može se doći do više zaključaka. Humani p97 WT je potencijalno stabilniji protein i manje podložan agregaciji u obliku netopljivih inkluzijskih tijela u odnosu na humane proteine SPRTN WT i SPRTN E112A. Takav zaključak vidljiv je iz činjenice da je iz 0,5 L početne bakterijske kulture dobiveno gotovo 3 mg proteina p97 WT (1,99 mg p97 WT + 0,82 mg (His)₆-p97 WT), dok je iz čak 2 L bakterijske kulture dobiveno samo 0,72 mg proteina SPRTN WT, a katalitičkog mutanta E112A duplo manje (0,36 mg). Zbog toga se može pretpostaviti i da katalitička mutacija u SPRTN-u čini taj protein još nestabilnijim i kompliciranijim za izolirati u odnosu na WT SPRTN. Ipak, za sigurnu potvrdu ovih pretpostavki trebalo bi utvrditi ekspresijske razine gena ovih proteina koje bi u tome slučaju trebale biti podjednake jačine.

Nastali agregati se ne vide slikama gelova jer je njihova molekulska masa puno veća od one koja se može vidjeti na gelu (250 kDa). SPRTN je velikim dijelom neuređene strukture, čime je također podložniji raspadu i proteolitičkoj razgradnji proteazama iz bakterije *E. coli*, a ne može se isključiti niti autoproteolitičko djelovanje (u slučaju WT proteina) DNA-ovisne

metaloproteaze SPRTN (slika 8a i b). U prilog nestabilnosti proteina SPRTN ide i činjenica da je njegov ekspresijski vektor ciljano dizajniran da nastane fuzijski protein SPRTN-a i Zb-privjeska, koji stabilizira protein, povećava njegovu topljivost i ima pogodan utjecaj na njegov prinos u usporedbi s proteinom bez tog privjeska.¹²⁰ Valja napomenuti kako se ovdje radi o prekomjernoj ekspresiji eukariotskih proteina u stanici domaćinu koji je prokariot (*E. coli*). Glavni nedostaci prokariotskih stanica su izostanak nekih posttranslacijskih modifikacija bitnih za pravilno smatanje i stabilnost proteina te proizvodnja neaktivnih proteina uslijed krivog smatanja i stvaranja inkluzijskih tijela. Nije lako osigurati da prokariotski domaćin proizvodi potpuno funkcionalan eukariotski protein.

4.2. Kvantifikacija ekspresije gena *p97* i *SPRTN* na razini mRNA u tkivima domaćeg miša i ribe zebrice

Ekspresija gena je proces u kojem se informacije kodirane u genu koriste za sintezu funkcionalnog genskog proizvoda. Budući da se geni transkribiraju u RNA, koja se potom prevodi (translatira) u protein ili služi kao funkcionalni krajnji produkt (nekodirajuće RNA molekule: ribosomska RNA (rRNA), transportna RNA (tRNA), mala nuklearna RNA (engl. *small nuclear RNA*, snRNA), mala interferirajuća RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) i ostale), razine transkripata RNA (molekule RNA nastale ekspresijom gena) obično se izjednačavaju s mjerom ekspresije gena.¹²¹ Dakle, analiza ekspresije gena obično kvantificira razine glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) kao prvi korak prema ekspresiji proteina. mRNA je kodirajuća RNA molekula koja prenosi genetski kod iz DNA u staničnoj jezgri do ribosoma, organela u citoplazmi zaslužnog za biosintezu proteina.¹²¹

Povezivanje ekspresije specifičnih gena s biološkim procesom ili fenotipom pomaže u razumijevanju funkcije gena, bioloških puteva i gena koji reguliraju razvoj, ponašanje stanica, staničnu signalizaciju i bolest. Specifični obrasci ekspresije gena ("genski potpisi") povezani s biološkim stanjem mogu poslužiti kao biomarkeri za to stanje, te se mogu koristiti u identifikaciji, dijagnozi i procjeni uspješnosti liječenja. Također, utvrđivanje promjena u ekspresiji gena koje proizlaze iz određenih okolišnih i fizičkih čimbenika može pomoći u otkrivanju konačnih učinaka tih čimbenika. Nadalje, analiza promjena genskih ekspresija može doprinijeti razumijevanju utjecaja postojećih lijekova na organizam, kao i olakšati istraživanja i razvoj novih lijekova.¹²¹

Kvantifikacija ekspresije gena na razini mRNA uključuje izolaciju netaknute frakcije RNA iz uzoraka, njihovu imobilizaciju, detekciju, prijevod u komplementarnu DNA i na kraju kvantifikaciju RNA transkripta od interesa. Jedna od najčešće korištenih metoda za analizu ekspresije gena na razini mRNA je reverzna transkripcija u sprezi s kvantitativnim PCR-om (RT-qPCR).¹²¹ Tom su metodom kvantificirani geni *p97* i *SPRTN* u tkivima domaćeg miša (*Mus musculus*, *Mm*), te geni *p97a* i *p97b* u tkivima ribe zebrice (*Danio rerio*, *Dr*). Ekspresija gena *SPRTN* u ribi zebrici prethodno je kvantificirana od strane Christine Supine, mag. biol. mol., te je uspoređena s ostalim rezultatima dobivenim u sklopu ovog istraživanja.

Zebrica pripada porodici šarana (*Cyprinidae*). To je najveća porodica slatkovodnih riba s preko 3000 poznatih vrsta unutar 371 roda.¹²² Smatra se da su za tako golemu raznolikost presudne bile duplikacije cijelog genoma (engl. *whole-genome duplication*, WGD) tijekom evolucije. Ove vrste riba imale su jedan WGD više u odnosu na ostale kralježnjake. WGD je presudan za stvaranje složenosti te pruža ogromnu mogućnost za evolucijsku prilagodbu i inovacije.^{123,124} Pretpostavlja se da su istim procesom nastali i zebričini *p97a* i *p97b* geni. Takvi se geni zovu paralozi, a predstavljaju homologne gene unutar istog organizma nastale duplikacijom gena i pod utjecajem evolucijskih sila (nisu identične kopije). Nakon duplikacije, paralozi se mogu zadržati u genomu, a neke se kopije mogu i izgubiti. To može generirati složene obrasce prisutnosti/odsutnosti različitih paraloga koji mogu otežati interpretaciju filogenetskih stabala.¹²⁵ Zadržani paralozi mogu raspodijeliti funkciju gena predaka ili razviti različite funkcije, a najizgledniji ishod je nefunkcionalizacija jednog dupliciranog gena. Duplicirani su geni isprva identični, ali ovisno o tipu mutacija kroz koje geni potom prolaze, dolazi do jednog od navedenih ishoda.¹²³

4.2.1. Analiza izolirane ukupne RNA

Ukupna RNA izolirana je iz prethodno seciranih tkiva ženke i mužjaka domaćeg miša (*Mus musculus*, *Mm*) starosti 4 mjeseca. Svrha izolacije bila je kvantifikacija i usporedba ekspresije *p97* i *SPRTN* gena (na razini mRNA) u tkivima ženke i mužjaka domaćeg miša, a vezana procedura opisana je u odjeljku 3.4. Tkiva od interesa bila su ona iz sljedećih organa: mozak, jetra, bubreg, crijevo, jajnik i testis. RNA je za svako tkivo izolirana iz 3 različite jedinke ženke i mužjaka miša (biološki triplikati). Za kvantifikaciju *p97a* i *p97b* gena u ribi zebrici korišteni su uzorci cDNA ranije pripremljeni u laboratoriju, što je uvelike skratilo vrijeme cjelokupne

analize. Za zebricu su proučavana ista tkiva kao i kod miša, a dodatno je analizirana ekspresija navedenih gena u oku i škragama. Tijekom izolacije RNA iz tkiva zebrice, u svim slučajevima bila su uzeta tri tkiva za jedan izolat jer je količina pojedinačnog tkiva bila preniska (ispod 1 mg) za uspješnu izolaciju.

Masena koncentracija izolirane RNA i njezina čistoća određena je spektrofotometrijski pomoću uređaja *BioSpec-nano* (*Shimadzu*). Čistoću uzorka, kao što je opisano u odjeljku 3.4.2., određuju omjeri apsorbanacija pri 260 i 280 nm, te omjeri pri 260 i 230 nm. RNA se smatra čistom ukoliko omjer A_{260}/A_{280} iznosi oko 2 ili više. Za omjer A_{260}/A_{230} uobičajeno je da iznosi između 1,8 i 2,3, dok niža vrijednost ukazuje na prisutnost soli, polisaharida, peptida, fenola i drugih tvari koje apsorbiraju pri 230 nm. Pokazalo se da je razlog povećane apsorbanacije pri 230 nm gotovo uvijek zagađenje gvanidinijevim tiocijanom (sva četiri korištena protokola sadrže pufer s takvom soli) koji se uobičajeno nalazi u sastavu pufera za ekstrakciju RNA, a pokazuje snažnu apsorpciju u području između 220 nm i 230 nm.¹²⁶

Kvaliteta izolirane i pročišćene RNA provjeravana je mjerenjem koncentracije i opisanih omjera apsorbanacije pomoću uređaja *BioSpec-nano* (*Shimadzu*) (tablice 11 i 12), elektroforetskom analizom na 1 %-tnom agaroznom gelu (slika 9) te ekspresijom referentnih gena u pojedinom uzorku cDNA pomoću qPCR analize (tablica 13). Glavni pokazatelj dobre izolacije ukupne RNA pomoću elektroforetske analize su dvije izrazito jasne linije koje potječu od 28S i 18S rRNA, koja je najzastupljenija RNA u stanici. Ako je omjer linija 28S i 18S rRNA otprilike jednak 2, a ispod njih je vidljiva dodatna linija (ponekad) koja potječe od 5,8S rRNA, te nema drugih linija, izolacija RNA može se smatrati gotovo idealnom. U slučaju kad nema jasno odvojenih linija 28S i 18S rRNA ili je prisutan njihov razmaz (engl. *smear*), može se pretpostaviti degradacija ukupne RNA nastala ili tijekom nanošenja na gel i tijekom same elektroforeze ili ranije tijekom izolacije. Linija ili razmaz iznad linije 28S rRNA predstavlja genomsku DNA (gDNA) zaostalu prilikom izolacije RNA.

Tablica 11. Masena koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA iz promatranih tkiva ženke domaćeg miša. Izolacija ukupne RNA pomoću kolone (ženka 1) provedena je prema *Qiagen RNeasy Mini Kit* protokolu, TRIZol metoda (ženka 2) prema *Ambion* protokolu, a izolacija kombinacijom kolone i TRIZola (ženka 3) prema *Zymo Research Direct-zol RNA Miniprep Plus* protokolu (*TRIZol metoda, ***NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit*, ****Qiagen RNeasy Mini Kit*).

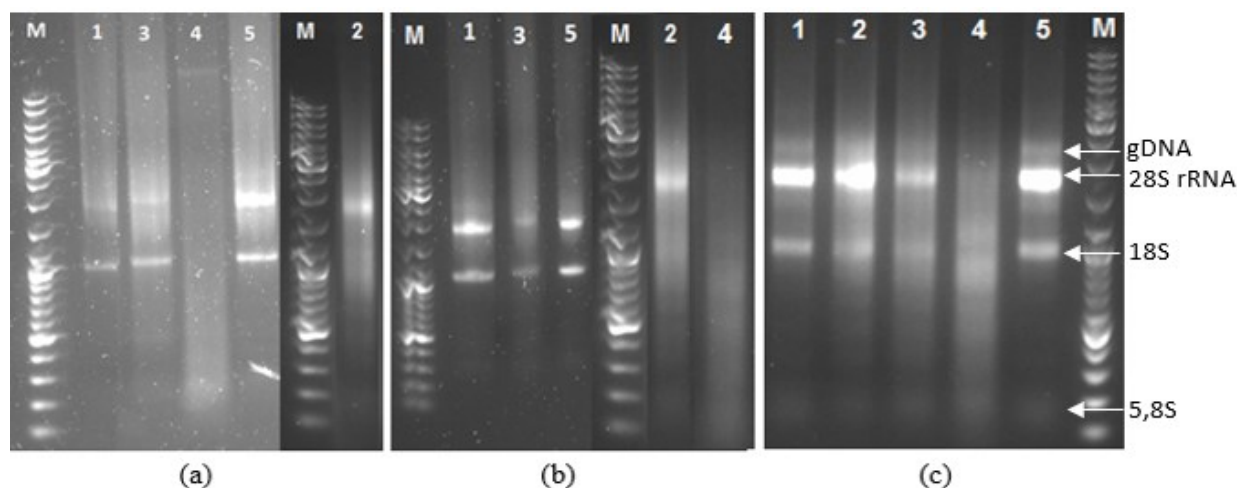
Ženka 1 – Izolacija ukupne RNA pomoću kolone					
Tkivo	<i>m</i> tkivo / mg	Eliminacija gDNA	γ (RNA) / ng μL^{-1}	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
Mozak	11	gDNA kolona	133	2,0	1,8
Jetra*	49	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	310	2,1	1,9
Bubreg	12	gDNA kolona	192	2,0	1,9
Crijevo	11	gDNA kolona	201	2,1	2,3
Jajnik	10	gDNA kolona + DNaza I	205	1,8	1,0
Ženka 2 – Izolacija ukupne RNA TRIZol metodom					
Mozak	112	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	308	2,1	2,0
Jetra	58	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	268	2,1	1,9
Bubreg	53	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	279	2,1	2,2
Crijevo	55	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	203	2,1	2,0
Jajnik	4	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	262	2,1	2,0
Ženka 3 – Izolacija ukupne RNA kombinacijom kolone i TRIZola					
Mozak	53	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	248	2,1	1,8
Jetra	16	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	116	2,0	0,7
Bubreg	48	DNaza I + <i>RNA Cleanup</i>	340	2,0	1,2
Crijevo**	31	gDNA kolona + DNaza I	1038	2,2	2,1
Jajnik***	13	gDNA kolona	36	2,2	0,9

Tablica 12. Masena koncentracija i čistoća izolirane ukupne RNA iz promatranih tkiva mužjaka domaćeg miša. Izolacija ukupne RNA pomoću kolone (mužjak 1 i 2) provedena je prema *Qiagen RNeasy Mini Kit* protokolu, a izolacija kombinacijom proteolize i kolone (mužjak 3) prema *NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit* protokolu (**NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit*).

Mužjak 1 – Izolacija ukupne RNA pomoću kolone					
Tkivo	<i>m</i> tkivo / mg	Eliminacija gDNA	γ (RNA) / ng μL^{-1}	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
Mozak	31	gDNA kolona	100	2,1	1,7
Jetra*	51	gDNA kolona + DNaza I	1513	1,9	1,8
Bubreg	33	gDNA kolona	516	2,1	1,0
Crijevo	29	gDNA kolona	554	2,1	2,1
Testis	22	gDNA kolona	678	2,1	2,1
Mužjak 2 – Izolacija ukupne RNA pomoću kolone					
Mozak	13	gDNA kolona	178	2,1	1,7
Jetra*	47	gDNA kolona + DNaza I	1302	2,2	2,2
Bubreg	11	gDNA kolona	97	2,1	1,3
Crijevo*	36	gDNA kolona + DNaza I	872	2,2	2,2
Testis	10	gDNA kolona	89	2,1	1,7
Mužjak 3 – Izolacija ukupne RNA kombinacijom proteolize i kolone					
Mozak	44	gDNA kolona + DNaza I	320	2,1	2,3
Jetra	10	gDNA kolona + DNaza I	480	2,1	2,0
Bubreg	30	gDNA kolona + DNaza I	788	2,1	2,3
Crijevo	28	gDNA kolona + DNaza I	943	2,2	2,3
Testis	19	gDNA kolona + DNaza I	355	2,1	2,0

Iz tablica 11 i 12 može se zaključiti da je izolacija ukupne RNA, u pogledu prinosa i čistoće, bila uspješna za sva tkiva domaćeg miša, osim za jajnik ženke 3 jer dobivena masena koncentracija nije bila dovoljna za provođenje reverzne transkripcije (minimalna koncentracija 90 ng/ μL). Omjeri A₂₆₀/A₂₈₀ i A₂₆₀/A₂₃₀ pokazuju da izolirana RNA nije kontaminirana proteinima (iznimke su jajnik ženke 1 i jetra mužjaka 1), ali da su u određenim uzorcima prisutna onečišćenja koja apsorbiraju pri 230 nm (soli, polisaharidi, peptidi, fenol i druga). Prinos i čistoća izolirane ukupne RNA primarno ovise o primijenjenom protokolu. Sva četiri protokola dala su zadovoljavajuće rezultate, a najuspješnijim se pokazao *NEB Monarch Total*

RNA Miniprep Kit protokol. Nakon njega po uspješnosti izolacije slijede TRIzol metoda (Ambion) i Qiagen RNeasy Mini Kit protokol, te kao najslabiji izbor Zymo Research Direct-zol RNA Miniprep Plus protokol.



Slika 9. 1 %-tni agarozni gelovi nakon provedene elektroforeze uzoraka ukupne RNA izolirane iz tkiva domaćeg miša: (a) mužjaka 1 (izolacija ukupne RNA pomoću kolone), (b) mužjaka 2 (izolacija ukupne RNA pomoću kolone) i (c) mužjaka 3 (izolacija ukupne RNA kombinacijom proteolize i kolone). Oznake: M – DNA standard, 1 – mozak, 2 – jetra, 3 – bubreg, 4 – crijevo, 5 – testis.

RNA izolirana iz crijeva pokazuje značajnu degradaciju specifičnu samo za to tkivo, što je vjerojatno posljedica nešto dugotrajnije sekcije (nije rađena u sklopu ovog rada) crijeva u odnosu na ostala tkiva. Naime, crijevo se moralo ispirati fiziološkom otopinom kako bi se odstranio feces, a ujedno je moguća i kontaminacija genetskim materijalom mikrobioma crijeva. Kvaliteta izolirane RNA primarno ovisi o brzini sekcije tkiva i pripreme uzoraka (homogenizacija), držanju tkiva i tubica na ledu, te primijenjenom protokolu (svi su testirani i dizajnirani od strane proizvođača da funkcioniraju uspješno, ali ipak postoje razlike u kvaliteti). Kod nekih uzoraka vidljivo je onečišćenje genomskom DNA u obliku linija ili razmaza iznad linije za 28S rRNA. Ipak, genomaska DNA nije predstavljala problem jer su gen-specifične početnice dizajnirane na način da sjedaju na granicu između dva egzona, što eliminira amplifikaciju genomске DNA, a favorizira amplifikaciju cDNA. Kod većine uzoraka vidljive su dvije linije koje odgovaraju 28S i 18S rRNA, ali je samo u nekim uzorcima taj omjer otprilike jednak 2. Takav rezultat posljedica je djelomične degradacije RNA nastale navjerojatnije prije ili tijekom agarozne gel-elektroforeze zbog prisutnosti RNaza i/ili visokog napona koji je suviše zagrijao gel i TAE pufer. Linija koja odgovara 5,8S rRNA prisutna je u polovičnom broju

uzoraka. Ta je linija inače slabije vidljiva, te je potrebno nanijeti puno veću količinu ukupne RNA u jažicu kako bi ista bila vidljiva. To nije rađeno jer ne bi ostalo dovoljno RNA za reverznu transkripciju. Zaključno, za provjeru kvalitete izolirane ukupne RNA agaroznom gel-elektroforezom potrebno je dodatno optimizirati postupak kako bi se izbjegao njezin raspad prilikom provođenja elektroforeze. Ipak, linije na gelu su za većinu uzoraka jasne i nisu previše razvučene, što ukazuje na to da je RNA uglavnom ostala očuvana, pa su stoga svi uzorci korišteni za daljnji postupak sinteze cDNA reverznom transkripcijom, te je na svakoj cDNA najprije provedena kvantifikacija ekspresije referentnog gena qPCR-om. Vrlo slični rezultati elektroforetske analize dobiveni su i za ženku 1, 2 i 3 (nije prikazano).

Kao glavna potvrda da je izolacija ukupne RNA bila uspješna, odnosno da je razlog za djelomičnu degradaciju RNA bila elektroforeza, predstavlja qPCR analiza ekspresije referentnog gena *18S rRNA* (tablica 13).

Tablica 13. Rezultati i analiza nakon provedenog qPCR-a na svim uzorcima cDNA iz tkiva ženki (a) i mužjaka miša (b) koristeći početnice specifične za kvantifikaciju ekspresije *18S rRNA* gena. NTC (engl. *non template control*) predstavlja reakcijsku smjesu bez kalupa, C_T broj ciklusa pri kojem se dostiže granična vrijednost fluorescencije, SD standardnu devijaciju, a % SD postotak standardne devijacije.

	Ženka 1					Ženka 2					Ženka 3					
Tkivo	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Jajnik	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Jajnik	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	NTC	
C_T , 1	14,48	14,17	13,84	13,77	14,27	13,83	13,55	13,81	13,80	13,45	13,70	14,18	13,70	24,36	/	
C_T , 2	14,46	13,86	13,76	13,80	14,17	13,48	13,49	13,83	13,65	13,46	13,67	14,21	13,54	24,29	35,33	
C_T , 3	14,61	13,80	13,79	13,92	14,19	13,54	13,50	13,83	13,64	13,44	13,67	14,32	13,12	24,40	34,94	
\bar{C}_T	14,52	13,94	13,80	13,83	14,21	13,62	13,51	13,82	13,70	13,45	13,68	14,24	13,45	24,35	35,14	
SD*	0,08	0,20	0,04	0,08	0,05	0,19	0,03	0,01	0,09	0,01	0,02	0,07	0,30	0,06	0,28	
% SD**	0,56	1,42	0,29	0,57	0,37	1,37	0,24	0,08	0,65	0,07	0,13	0,52	2,23	0,23	0,78	

$$* SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (C_{T,i} - \bar{C}_T)^2}$$

$$** \% SD = \frac{SD}{\bar{C}_T} \cdot 100$$

(a)

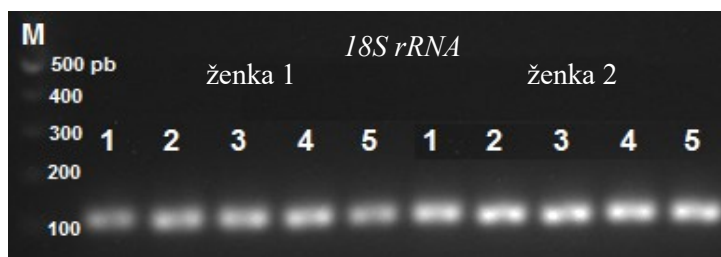
	Mužjak 1					Mužjak 2					Mužjak 3					
Tkivo	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Testis	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Testis	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Testis	NTC
C_T , 1	13,14	11,57	12,61	12,76	12,78	13,03	11,82	13,22	11,86	13,28	13,00	13,01	13,14	13,13	13,64	33,15
C_T , 2	13,02	11,58	12,65	12,80	12,80	13,04	11,88	13,22	11,86	13,28	13,11	13,10	13,13	13,13	13,63	32,92
\bar{C}_T	13,08	11,57	12,63	12,78	12,79	13,04	11,85	13,22	11,86	13,28	13,05	13,06	13,14	13,13	13,64	33,03
SD	0,09	0,00	0,03	0,03	0,02	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,07	0,06	0,01	0,01	0,01	0,17
% SD	0,66	0,04	0,24	0,25	0,14	0,04	0,35	0,03	0,02	0,01	0,57	0,49	0,04	0,04	0,05	0,50

(b)

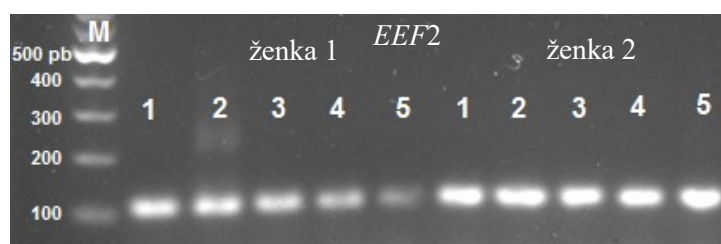
18S rRNA kao referentni gen mora biti podjednako eksprimiran u svim promatranim uzorcima, a na temelju qPCR rezultata sumiranih tablicama 13a i 13b vidljivo je da on to i jest (više u odjeljku 4.2.2.). Jedina iznimka je uzorak cDNA iz crijeva ženke 3 ($\overline{C_T} = 24,35 \pm 0,06$) zbog već spomenutog raspada. Iako je elektroforetska analiza pokazala značajan raspad RNA iz crijeva i neidealnu izolaciju u nekim od ostalih tkiva, qPCR analiza na svježije sintetiziranoj cDNA dala je suprotne rezultate, što znači da je izolacija ukupne RNA doista bila uspješna, te da je degradacija RNA u gelu vjerojatno posljedica grešaka pri izvedbi agarozne gel-elektroforeze (predugo držanje RNA uzoraka na sobnoj temperaturi prije nanošenja na gel, predugo trajanje elektroforeze, previsoka voltaža i zagrijavanje pufera, prisutnost RNaza iz okoline, itd.).

4.2.2. Povjera kvalitete cDNA, podobnosti referentnih gena i dizajniranih početnica

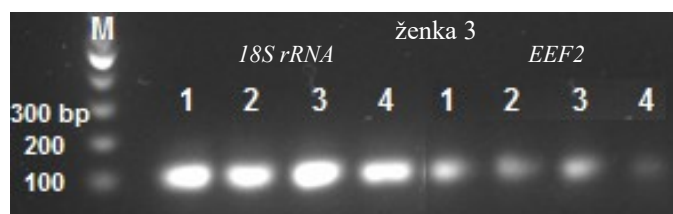
Uspješnost reverzne transkripcije i kvalitete sintetizirane cDNA za uzorke ženke provjerena je običnim (slika 11), a potom i kvantitativnim PCR-om (tablica 13a). Uzorci mužjaka direktno su provjereni kvantitativnim PCR-om (tablica 13b). Paralelno je ispitan odabir *18S rRNA* i *EEF2* (engl. *eukaryotic elongation factor 2*) gena kao potencijalnih referentnih gena za domaćeg miša. Referentni geni su primjeri regija u genomu koje su vrlo konzervirane, uglavnom zbog njihove uloge u održavanju osnovnih staničnih funkcija.¹²⁷ Njihova se ekspresija ne mijenja značajno u zadanim uvjetima, u ovome slučaju u tkivima ženke i mužjaka domaćeg miša. Ograničenja sadašnjeg popisa referentnih gena nastaju zbog različitog definiranja samog pojma referentnog gena u istraživanju, ali i zbog činjenice da su identificirani u studijama koje uključuju relativno malu raznolikost vrsta tkiva i stanica, kao i nisko uzorkovanje, što može uvesti lažno pozitivne rezultate.¹²⁸ Teško je pronaći idealni referentni gen jer se ekspresija većine gena razlikuje ovisno o promatranom tkivu.¹²⁸ U eksperimentalnim istraživanjima na miševima, *18S rRNA* (uz *GAPDH* (gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza) i β -*aktin*) jedan je od najčešće korištenih referentnih gena, te je stoga izabran kao kandidat i u ovome radu (*GAPDH* i β -*aktin* pokazuju veće ekspresijske razlike među tkivima miša).¹²⁹ Kao drugi kandidat izabran je *EEF2*, budući da su određena istraživanja na miševima pokazala malu varijabilnost tog gena u zadanim uvjetima pojedinih istraživanja.^{130,131}



(a)



(b)



(c)

Slika 11. 1,5 %-tni agarozni gelovi nakon provedenog PCR-a i elektroforeze na uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom ukupne RNA izolirane iz tkiva domaćeg miša ženke 1, 2 i 3 koristeći početnice specifične za kvantifikaciju *18S rRNA* (a) i (c) te *EEF2* gena (b) i (c). Oznake: M – DNA standard, 1 – mozak, 2 – jetra, 3 – bubreg, 4 – crijevo, 5 – jajnik.

Provjera PCR produkata agaroznom gel-elektroforezom potvrdila je da početnice za ekspresiju *18S rRNA* i *EEF2* gena rade specifično jer se na gelu pojavljuje samo jedna linija očekivane veličine (oko 100 pb), kao i da je postupak reverzne transkripcije bio uspješan. Uvid u slike gelova daje naznaku da je *18S rRNA* podoban referentni gen (endogena kontrola). Sve dobivene linije otprilike su jednakog intenziteta i vrlo su intenzivne, što potencijalno znači da je taj gen jako i podjednako eksprimiran u svim tkivima, a to su karakteristike dobrog referentnog gena. Ekspresija *EEF2* gena u tkivima ženke 2 izgleda jednoliko i dosta intenzivnije u odnosu na ostala tkiva, a u tkivima ženke 1 i 3 vidljiva je razlika u ekspresiji (moguća posljedica tehničke pogreške). To ukazuje da *EEF2* najvjerojatnije nije podoban referentni gen, no za sigurnu potvrdu ovih indikacija provedena je analiza qPCR-om (tablice 13 i 14).

Tablica 14. Rezultati i analiza nakon provedenog qPCR-a na svim uzorcima cDNA iz tkiva ženki miša koristeći početnice specifične za kvantifikaciju ekspresije *EEF2* gena. NTC (engl. *non template control*) predstavlja reakcijsku smjesu bez kalupa, C_T broj ciklusa pri kojem se dostiže granična vrijednost fluorescencije, SD standardnu devijaciju, a % SD postotak standardne devijacije.

	Ženka 1					Ženka 2					Ženka 3					
Tkivo	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Jajnik	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	Jajnik	Mozak	Jetra	Bubreg	Crijevo	NTC	
C_T , 1	20,14	22,11	21,39	24,66	24,07	18,69	20,26	20,51	22,26	18,12	19,80	20,59	19,46	31,47	/	
C_T , 2	20,21	22,02	21,32	24,78	24,21	18,51	20,19	20,52	22,37	18,21	19,86	20,48	19,50	32,01	35,70	
C_T , 3	20,25	21,78	21,26	24,67	24,32	18,47	20,19	20,53	22,56	18,11	19,94	20,51	19,76	31,04	/	
$\overline{C_T}$	20,20	21,97	21,32	24,70	24,20	18,56	20,21	20,52	22,40	18,15	19,87	20,53	19,57	31,51	35,70	
SD	0,06	0,17	0,07	0,07	0,13	0,12	0,04	0,01	0,15	0,06	0,07	0,06	0,16	0,49	/	
% SD	0,28	0,78	0,31	0,27	0,52	0,63	0,20	0,05	0,68	0,30	0,35	0,28	0,83	1,54	/	

Analiza qPCR-om dala je sigurnu potvrdu da je *18S rRNA* jednoliko eksprimiran u svim tkivima i stoga je taj gen podoban referentni gen za kvantifikaciju ekspresije gena u tkivima domaćeg miša. Srednje C_T vrijednosti ($\overline{C_T}$) dobivene za sva tkiva vrlo su ujednačene i ne razlikuju se značajno (ukupna $\overline{C_T}$ svih uzoraka ženki (osim crijeva ženke 3) iznosi $13,83 \pm 0,33$, a mužjaka $12,81 \pm 0,59$). Isto ne vrijedi za *EEF2* (testiran samo na uzorcima ženki), gdje se javljaju puno veće oscilacije u $\overline{C_T}$ vrijednostima. Iznimka u oba slučaja je uzorak cDNA dobiven iz crijeva ženke 3, koji pokazuje mnogo veću $\overline{C_T}$ vrijednost u odnosu na ostale uzorke. Takav je rezultat posljedica već spomenutog raspada RNA specifičnog za crijevo ženke 3. Zanimajući taj uzorak, maksimalna razlika između dvije $\overline{C_T}$ vrijednosti za *18S rRNA* iznosi 1,07 ciklusa u slučaju ženke, odnosno 2,07 ciklusa u slučaju mužjaka, potvrđujući izbor *18S rRNA* kao referentnog gena za domaćeg miša. Kod *EEF2* ta je razlika 6,55 ciklusa. Jednolike $\overline{C_T}$ vrijednosti u slučaju *18S rRNA* također su potvrda da je izolacija ukupne RNA bila uspješna, odnosno da nema značajnijeg raspada (osim crijeva ženke 3). Uspoređujući rezultate iz tablica 13 i 14 jasno je kako je ekspresija *18S rRNA* mnogo veća u svim tkivima od *EEF2* gena (ukupna $\overline{C_T}$ vrijednost svih uzoraka ženki (osim crijeva ženke 3) iznosi $20,94 \pm 1,96$), što je i očekivan rezultat s obzirom na to da je *18S rRNA* jedan od najzastupljenijih nekodirajućih transkripata u mišu.¹³²

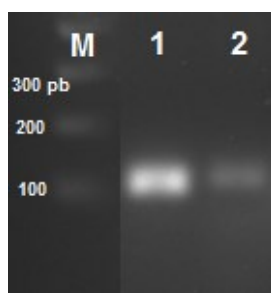
Može se primijetiti kako C_T vrijednosti između istovrsnih tkiva različitih jedinki (biološki replikati) variraju mnogo više nego pojedinačne C_T vrijednosti triplikata istog uzorka (tehnoški replikati), što je i očekivano. Budući da je *18S rRNA* referentni gen, varijacije između bioloških replikata su minimalne, dok su za *EEF2*, koji se nije pokazao kao dobar

referentni gen, veće (za neka su tkiva varijacije veće, a za druga manje, odnosno minimalne). Ova je pojava posljedica interindividualne biološke varijacije u ekspresiji gena (detaljnije u odjeljku 4.2.4.3.).

U slučaju *18S rRNA*, ukupne $\overline{C_T}$ vrijednosti za ženku, odnosno mušjaka i NTC razlikuju se za otprilike 20 ciklusa, što predstavlja minimalno dozvoljenu razliku, a kod *EEF2* kontaminirana je samo jedna negativna kontrola. Zato se može smatrati da uzorci nisu kontaminirani prilikom izvođenja qPCR eksperimenta.

Standardna devijacija tehničkih replikata, odnosno mjera raspršenosti skupa podataka, za sva je mjerenja zadovoljavajuća i značajno ispod gornje dopuštene granice (1,00 %), pa je zaključeno da su $\overline{C_T}$ vrijednosti svih uzoraka reprezentativne.

Kako bi se utvrdilo jesu li početnice za kvantifikaciju ekspresije *p97* i *SPRTN* gena specifične, proveden je testni PCR prema postupku opisanom u odjeljku 3.4.6.



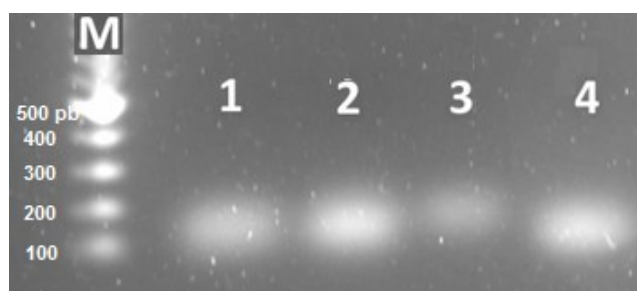
Slika 12. 1,8 %-tni agarozni gel nakon provedenog PCR-a i elektroforeze na odabranim uzorcima cDNA (*p97* – jetra ženke 2, *SPRTN* – mozak ženke 1) dobivenim reverznom transkripcijom ukupne RNA izolirane iz tkiva domaćeg miša koristeći početnice specifične za kvantifikaciju ekspresije *p97* i *SPRTN* gena. Oznake: M – DNA standard, 1 – *p97*, 2 – *SPRTN*.

PCR-om je dobiven samo jedan produkt veličine koja odgovara teoretskoj, a to znači da su početnice specifične i ne tvore sekundarne strukture. Različiti intenziteti linija indiciraju različitu razinu ekspresije navedenih gena (slika 12). *p97* je jače eksprimiran od *SPRTN* gena, što je slučaj i kod čovjeka.^{133,134}

Početnice za kvantifikaciju ekspresije *p97a* i *p97b* gena u tkivima ženke i mušjaka ribe zebrice prethodno su verificirane da su specifične (izvan okvira ovog diplomskog rada).

Tablica 15. Početnice za qPCR analizu ekspresije *p97a* i *p97b* gena te referentnog gena *EF1 α* (engl. *elongation factor 1-alpha*) ribe zebrice.

Naziv gena	Naziv početnice	Nukleotidni slijed početnice	Duljina PCR produkta	$T_m / ^\circ\text{C}$
<i>p97a</i>	p97a F1	5' ATA TGG CTT CGG GTG GAG AA 3'	85 pb	58
	p97a R1	5' ACA ATC AAC CTA TTT GGC CTG T 3'		56
<i>p97a</i>	p97a F2	5' TTG CAC CCA AAC GAG AGA AG 3'	96 pb	58
	p97a R2	5' CAT GAG CCC TTT GCT TGA GT 3'		58
<i>p97b</i>	p97b F1	5' TCT CAC AGA CGG AAA GCC AT 3'	94 pb	58
	p97b R1	5' TCG GTC GAA TCT TCT GTT TCA A 3'		56
<i>p97b</i>	p97b F2	5' TGA CGT ATT TCT GAA GCC GT 3'	102 pb	56
	p97b R2	5' ACT TTA AAC TCC ACC GCT CT 3'		56
<i>EF1α</i>	EF1 α F	5' CCT GGG AGT GAA ACA GCT GAT C 3'	99 pb	60
	EF1 α R	5' GCT GAC TTC CTT GGT GAT TTC C 3'		60



Slika 13. 1,2 %-tni agarozni gel nakon provedenog PCR-a i elektroforeze na uzorku cDNA iz mozga ženke 1 ribe zebrice koristeći početnice specifične za kvantifikaciju ekspresije *p97a* i *p97b* gena. Oznake: M – DNA standard, 1 – *p97a* F1 + *p97a* R1, 2 – *p97a* F2 + *p97a* R2, 3 – *p97b* F1 + *p97b* R1, 4 – *p97b* F2 + *p97b* R2.

Testni PCR je proveden prema postupku opisanom u odjeljku 3.4.6. Dobiven je jedan PCR produkt očekivane veličine, što znači da su početnice specifične. Početnice za kvantifikaciju ekspresije referentnog gena ribe zebrice (*EF1 α*) nisu testirane jer su specifične i efikasne.¹³⁵

Linije na gelu su razvučene zbog provođenja elektroforeze koristeći 1,2 %-tni agarozni gel. Koncentracija gela utječe na razlučivost odvajanja fragmenata DNA. Agarozni se gel sastoji od mikroskopskih pora kroz koje molekule putuju, a postoji obrnuti odnos između veličine pora agaroznog gela i koncentracije – veličina pora se smanjuje kako gustoća agaroznih vlakana raste. Visoka koncentracija gela poboljšava odvajanje manjih molekula DNA, dok smanjenje

koncentracije gela omogućava odvajanje velikih molekula DNA. Stoga je za bolju razlučivost linija na gelu elektroforezu trebalo provesti u koncentriranijem gelu (2 %), budući da su fragmenti DNA mali (oko 100 pb).

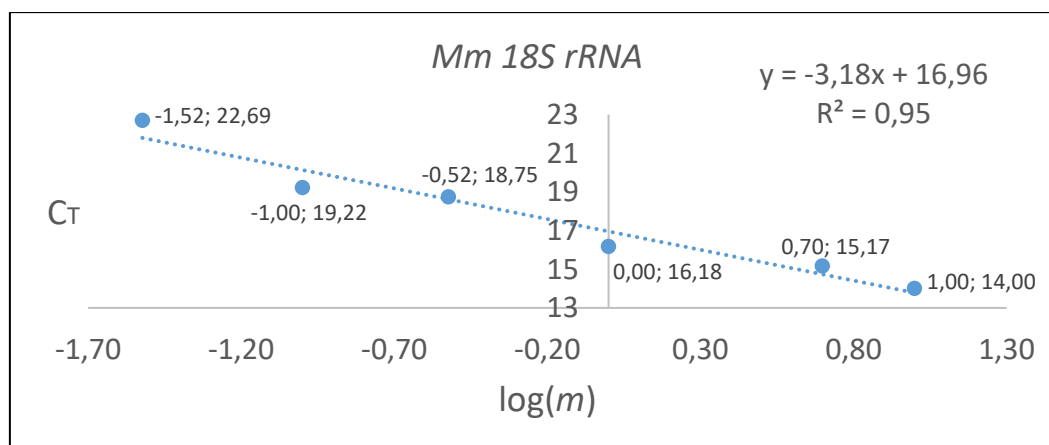
4.2.3. Testiranje efikasnosti rada početnica

U idealnom slučaju, broj molekula ciljne sekvence udvostruči se tijekom svakog replikacijskog ciklusa PCR-a, što odgovara 100 %-tnoj efikasnosti amplifikacije. Slično tome, ako je broj repliciranih molekula manji od dvostrukog, efikasnost je manja od 100 %. Mogući razlozi za suboptimalnu efikasnost su loš dizajn početnica i/ili uvjeti PCR reakcije. Efikasnost amplifikacije može naizgled biti i iznad 100 %, a javlja se zbog inhibicije DNA-polimeraze.¹³⁶ Inhibitori DNA-polimeraze uključuju heparin, hemoglobin, polisaharide, etanol, fenol i SDS. Ova pojava izravna pravac efikasnosti amplifikacije, što rezultira manjim nagibom i prividnom efikasnošću većom od 100 %.¹³⁶

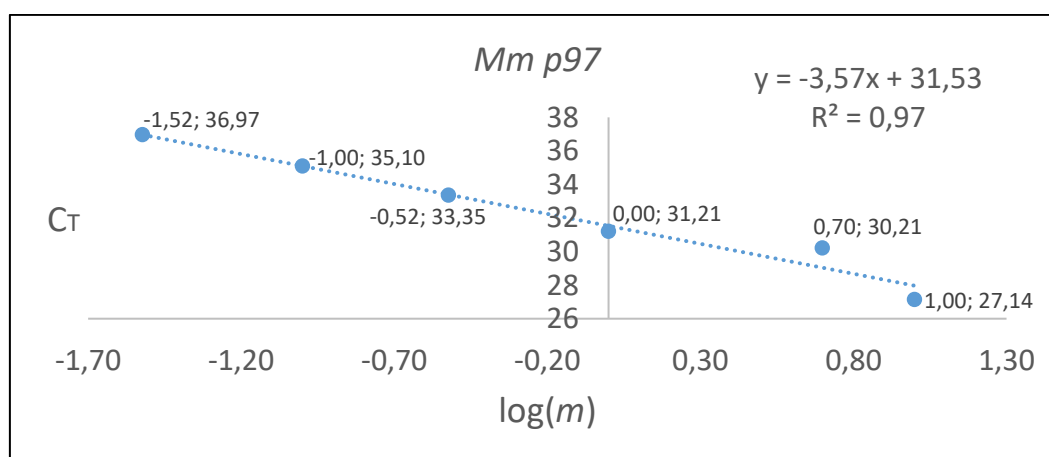
Kako bi se kvantifikacija ekspresije gena od interesa mogla provesti pouzdano, te kako bi se usporedila ekspresija različitih gena, efikasnost rada početnica trebala bi biti unutar raspona od 90 do 110 %. Test je proveden za sve dizajnirane početnice za gene miša (*18S rRNA*, *p97*, *SPRTN*) i gene zebrice (*EF1a*, *p97a*, *p97b*) na način opisan u odjeljku 3.4.7. Pojedinačne C_T vrijednosti razrjeđenja uzorka cDNA dobivene qPCR eksperimentom prikazane su kao $\overline{C_T}$ vrijednosti u ovisnosti o logaritmu mase dodane cDNA, a potom je određen pravac linearne regresije. Rezultati su sažeti u tablici 16, a na slici 14 prikazane su standardne krivulje efikasnosti rada svih testiranih početnica.

Tablica 16. Efikasnosti rada početnica (E) nakon provedenog qPCR-a na odabranim uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom ukupne RNA izolirane iz tkiva domaćeg miša i ribe zebrica. Navedeni su i pripadajući koeficijenti smjera pravca (a), odsječci na y-osi (b) i korelacijski koeficijenti (R) (*p. p. – par početnica).

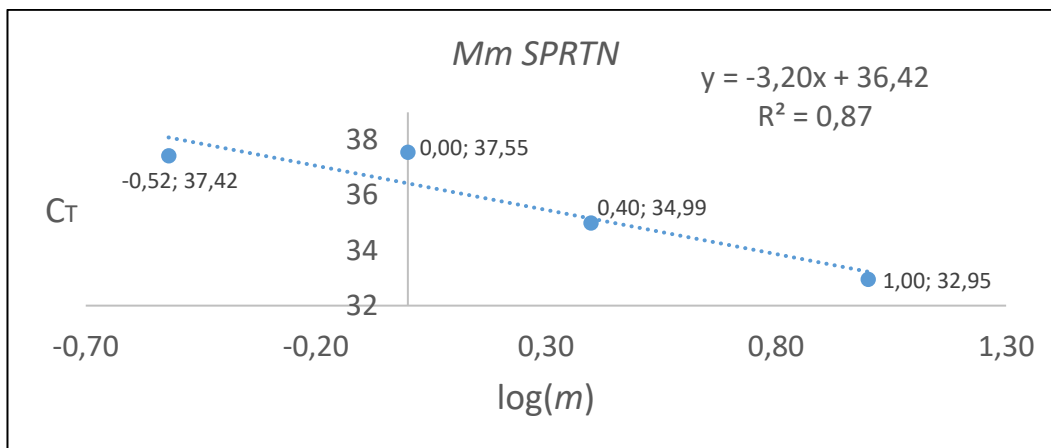
Naziv gena	Organizam	a	b	R ²	E	E / %
<i>18S rRNA</i>	Domaći miš	-3,18	16,96	0,95	2,06	106
<i>p97</i>	Domaći miš	-3,57	31,53	0,97	1,91	91
<i>SPRTN</i>	Domaći miš	-3,20	36,42	0,87	2,06	106
<i>EF1α</i>	Zebrica	-3,24	19,84	0,99	2,04	104
<i>p97a</i> (1. p. p.)*	Zebrica	-3,20	32,01	0,99	2,05	105
<i>p97a</i> (2. p. p.)	Zebrica	-2,62	30,75	0,99	2,41	141
<i>p97b</i> (1. p. p.)	Zebrica	-3,27	28,39	0,99	2,02	102
<i>p97b</i> (2. p. p.)	Zebrica	-4,62	34,21	0,99	1,65	65



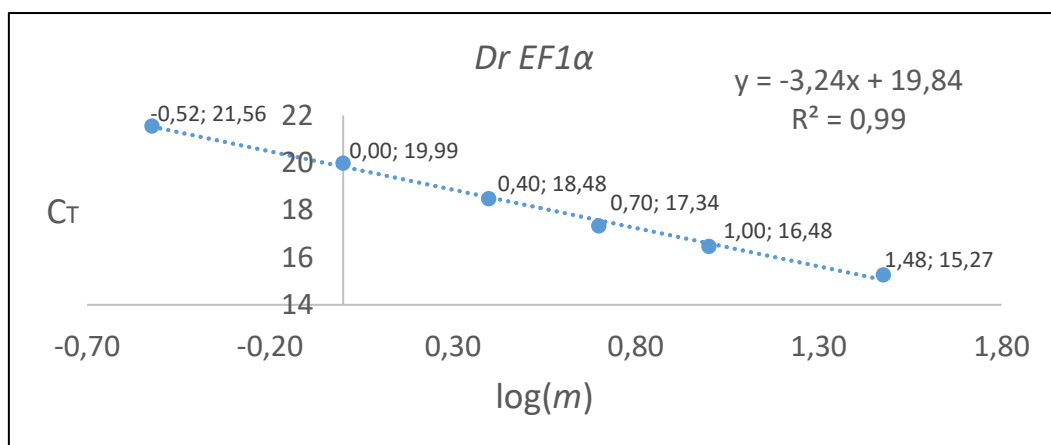
(a)



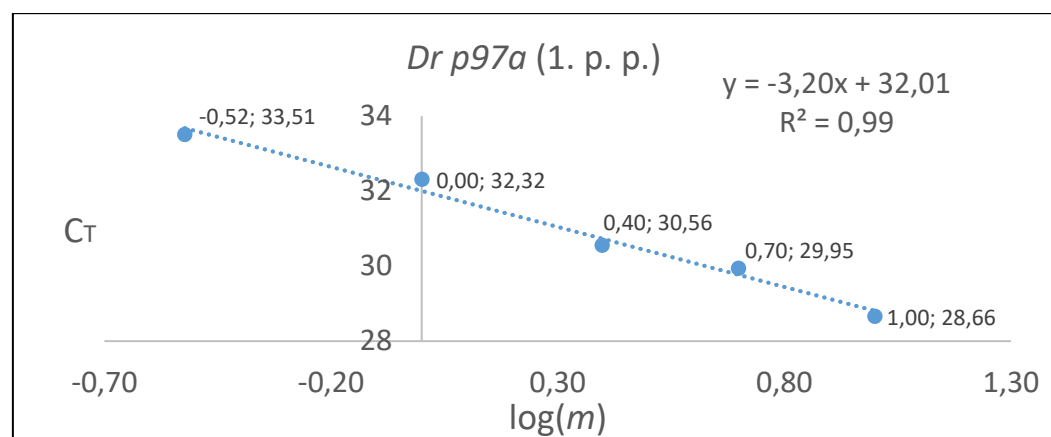
(b)



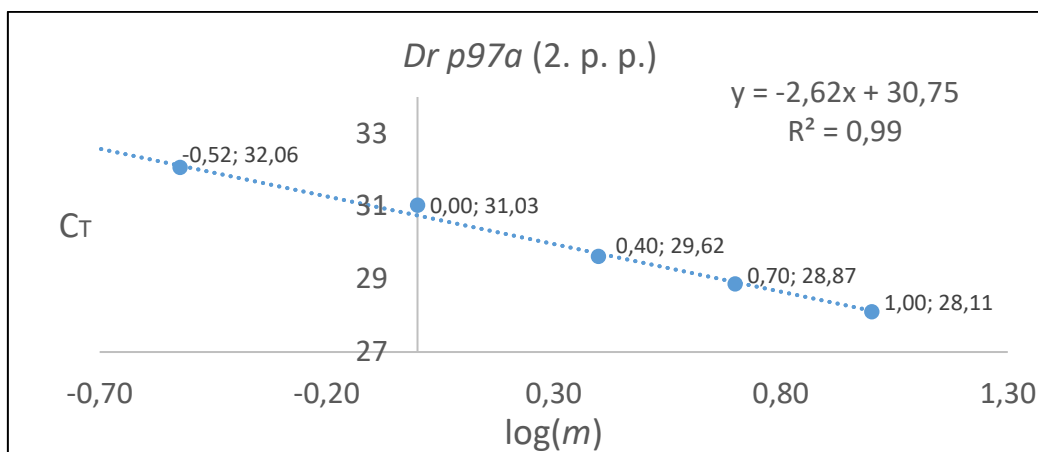
(c)



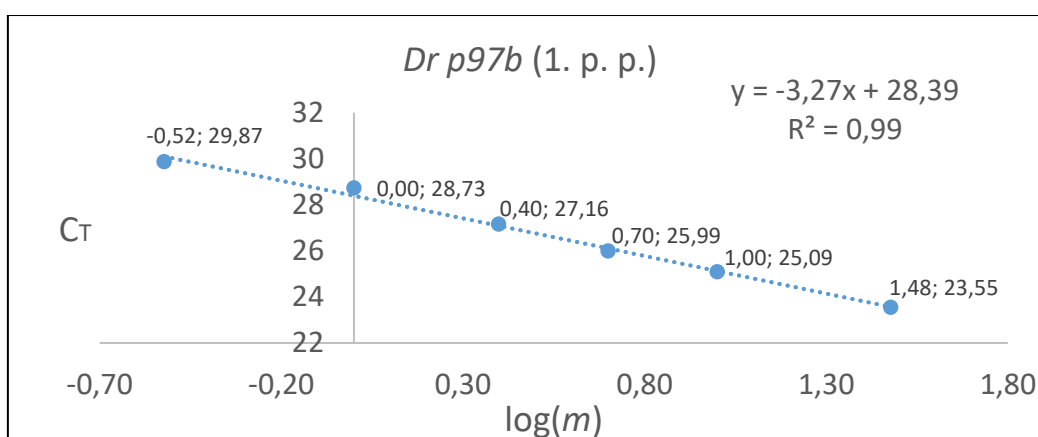
(d)



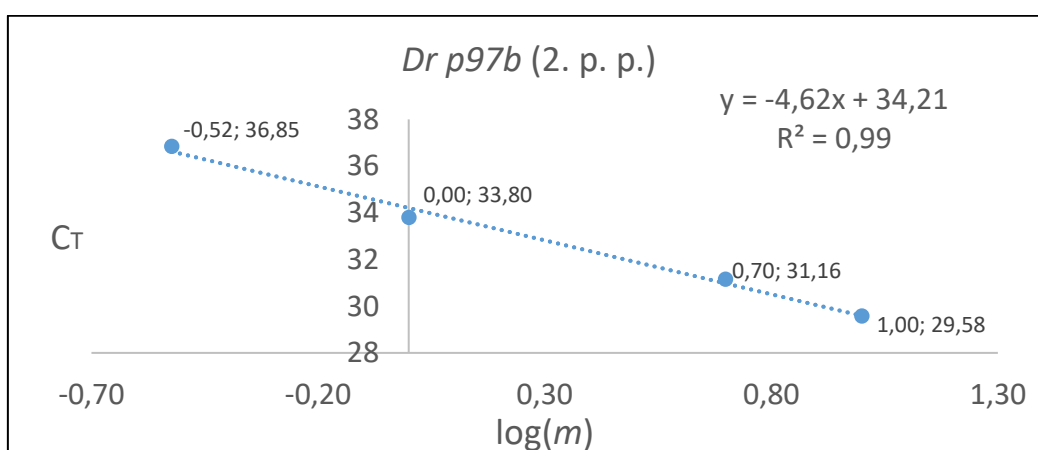
(e)



(f)



(g)



(h)

Slika 14. Standardna krivulja efikasnosti rada početnica specifičnih za kvantifikaciju ekspresije gena: (a) *Mm 18S rRNA*, (b) *Mm p97*, (c) *Mm SPRTN*, (d) *Dr EF1 α* , (e) *Dr p97a* (1. par početnica), (f) *Dr p97a* (2. par početnica), (g) *Dr p97b* (1. par početnica) i (h) *Dr p97b* (2. par početnica). Graf prikazuje srednje C_T vrijednosti (na y-osi) u ovisnosti o logaritmu mase cDNA ($\log(m)$ na x-osi), a kroz točke je provučen pravac linearne regresije.

Rezultati pokazuju kako su sve dizajnirane početnice, osim drugog para početnica (2. p. p.) za kvantifikaciju ekspresije *p97a* i *p97b* gena (tablica 16, slike 14f i h), u optimalnom rasponu efikasnosti amplifikacije PCR produkta (90 - 110 %), te se mogu koristiti za kvantifikaciju ekspresije gena u tkivima domaćeg miša, odnosno ribe zebrice. Na temelju ovih rezultata, ekspresija navedenih gena u domaćem mišu i zebrici može se pouzdano kvantificirati.

Razlog za slabiju linearnost, odnosno povezanost između varijabli (R^2) u slučaju *SPRTN* gena (tablica 16, slika 14c) vjerojatno leži u tome što qPCR instrument ima manju preciznost u određivanju C_T vrijednosti kada je gen slabo eksprimiran, kao što je slučaj sa *SPRTN* genom ($\overline{C_T}$ vrijednosti u rasponu od 33 do 38).

4.2.4. Analiza ekspresije gena u tkivima domaćeg miša, ribe zebrice i čovjeka

Upravo su domaći miš i riba zebrica korišteni kao modelni organizmi jer su mnoge značajke ovih organizama slične ljudskoj, a njihov je genom dobro poznat. Svrha korištenja modelnih organizama je među ostalim bolje razumijevanje nastajanja i tijeka raznih ljudskih bolesti, bez stvaranja rizika za čovjeka. Osim toga, mogu pomoći u razvijanju potencijalnih dijagnostičkih testova, tretmana i lijekova, koji se kasnije ispituju u kliničkim istraživanjima.¹³⁷

Miš je pogodan modelni organizam iz više razloga: jeftin je, blage naravi, mali, relativno jednostavno se uzgaja i održava te se dobro prilagođava novom okruženju, a ono što je najbitnije, genetika, anatomija i fiziologija miša veoma su slične ljudskoj.¹³⁸ Genom miša i čovjeka podudara se čak 97,5%.^{138,139}

Iako se čovjek čini izuzetno različitim od ribe zebrice, sličnost je zapravo velika. Ove dvije vrste dijele 70 % zajedničkih gena, a čak 84 % gena čovjeka povezanih s bolestima imaju svoje ortologe u zebrici.¹⁴⁰ Mnogi geni i esencijalni metabolički putevi vrlo su očuvani između čovjeka i zebrice. Kao kralježnjak, zebrica ima identične glavne organe i tkiva kao i čovjek, uz izuzetak pluća, prostate, maternice i mliječne žlijezde. Iako su miševi evolucijski sličniji ljudima jer su sisavci, zebrice imaju nekoliko prednosti u odnosu na njih. Osnovna je prednost u tome što su odrasle jedinke male i više vole biti smještene u velikim skupinama. Kao rezultat toga, oni zahtijevaju mnogo manje prostora i jeftiniji su za održavanje od miševa. Nadalje, odrasle se jedinke lako uzgajaju, a u mrijestu jedna ženka može producirati i do 500 jajašaca, dok miševi obično proizvode leglo od jednog do 10 mladunaca, a tijekom svog života imaju približno tri legla.¹⁴¹ Embriji zebrice polažu se i oploduju izvana, što omogućava: *in vitro*

oplođnju, mikroinjektiranje oplođenih jajašaca s DNA ili RNA u svrhu genetskih izmjena i jednostavno praćenje razvoja embrija zbog njihove transparentnosti. Rad s miševima na ovaj način mnogo je složeniji. Međutim, ljudske bolesti uzrokovane genima koji ne postoje u zebrici zahtijevaju drugačiji životinjski model. Uz to, zebrice nisu korisni modeli za ljudske bolesti koje se uglavnom odvijaju u tipu tkiva ili dijelu tijela koje zebrice nemaju (prostata, mliječne žlijezde, maternica i pluća).^{141,142}

Ekspresija (na razini mRNA) *p97* i *SPRTN* gena u tkivima ženke i mužjaka domaćeg miša, te *p97a*, *p97b* i *SPRTN* gena u tkivima ženke i mužjaka ribe zebrice kvantificirana je, a rezultati su grafički prikazani na način opisan u odjeljku 3.4.7. Ekspresija istraživanih gena izražena je kao srednja vrijednost normalizirane ekspresije gena (engl. *Mean Normalized Expression*, MNE) za biološke triplikate promatranih tkiva, a za svaku MNE vrijednost prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM) prema formuli:

$$\text{SEM} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{N}}$$

gdje SD predstavlja standardnu devijaciju, a N broj mjerenja (biološki triplikati: N = 3). Ekspresija gena normalizirana je s obzirom na referentne gene, *18S rRNA* kod miša te *EF1 α* kod zebrice.

Za sve promatrane gene u mišu i zebrici određene su ekspresijske granice prema sljedećim pravilima: gen je nisko ekspimiran ako je MNE $\cdot 10^6$ manja ili jednaka 30 (odgovara C_T vrijednosti većoj ili jednakoj 30), gen je umjereno ekspimiran ako je MNE $\cdot 10^6$ između 31 i 170 (odgovara C_T vrijednosti između 27,5 i 30), gen je umjereno visoko ekspimiran ako je MNE $\cdot 10^6$ između 171 i 665 (odgovara C_T vrijednosti između 25,5 i 27,5), gen je visoko ekspimiran ako je MNE $\cdot 10^6$ između 666 i 7355 (odgovara C_T vrijednosti između 22 i 25,5), gen je jako visoko ekspimiran ako je MNE $\cdot 10^6$ veća ili jednaka 7356 (odgovara C_T vrijednosti manjoj ili jednakoj 22).¹⁴³ Ekspresijske granice izračunate su korištenjem srednje vrijednosti efikasnosti rada početnica (E) svih promatranih gena u mišu i zebrici, srednje vrijednosti efikasnosti rada početnica referentnih gena *18S rRNA* i *EF1 α* i srednje C_T vrijednosti navedenih referentnih gena.

Budući da su podaci o ekspresiji (na razini mRNA) *p97* i *SPRTN* gena u tkivima čovjeka (*Homo sapiens*, *Hs*) literaturno poznati^{133,134}, rezultati su sumirani i uspoređeni s ekspresijom navedenih gena u domaćem mišu (odjeljci 4.2.4.1. i 4.2.4.3.) i ribi zebrici (odjeljci 4.2.4.2. i

4.2.4.3.). Za razliku od ovog rada, analiza iz literature nije provedena posebno na tkivima ženskog, odnosno muškog spola, pa se stoga ne može usporediti ekspresija humanih gena između istovrsnih tkiva ženskog i muškog spola, već samo između spolnih tkiva ženke i mužjaka (jajnik i testis). Također, mjera za kvantifikaciju ekspresije gena korištena u slučaju čovjeka razlikuje se od one korištene u svrhu ovog istraživanja (MNE), što onemogućava usporedbu apsolutnih vrijednosti ekspresije ortolognih gena u istovrsnim tkivima čovjeka i miša/zebrice. Zbog toga su analizirane ekspresijske razlike ciljanih gena između različitih tkiva čovjeka (koja su promatrana i u mišu te zebrici), te su uspoređene s poretkom i razlikama u ekspresiji gena u tkivima miša i zebrice.

Ekspresijski podatci za čovjeka analizirani su i uspoređeni pomoću *Human Protein Atlas* (HPA) portala. Za određivanje ekspresijskih razina gena korištena su tri skupa podataka: HPA, *The Genotype-Tissue Expression* (GTEx) i *Functional Annotation of the Mammalian genome* (FANTOM5). Za svaki od tri skupa podataka korištena je TPM (engl. *transcript per kilobase million*) vrijednost svih pojedinačnih uzoraka tkiva. Kako bi se mogli kombinirati, skupovi podataka normalizirani su na način da su sve TPM vrijednosti pojedinačnog uzorka skalirane na zbroj od 1 000 000 TPM (pTPM). Nadalje, sve TPM vrijednosti uzoraka unutar svakog skupa podataka su TMM (engl. *trimmed mean of M-values*) normalizirane, nakon čega je slijedilo skaliranje gena prema Paretu unutar svakog skupa podataka. Podatci iz skupova podataka zatim su integrirani korištenjem paketa *Limma*. Dobivene vrijednosti ekspresije gena, označene kao normalizirana ekspresija (NX), izračunate su za svaki gen u svakom uzorku. Dakle, NX vrijednosti dobivene su kombiniranjem podataka iz tri navedena skupa podataka.¹³³

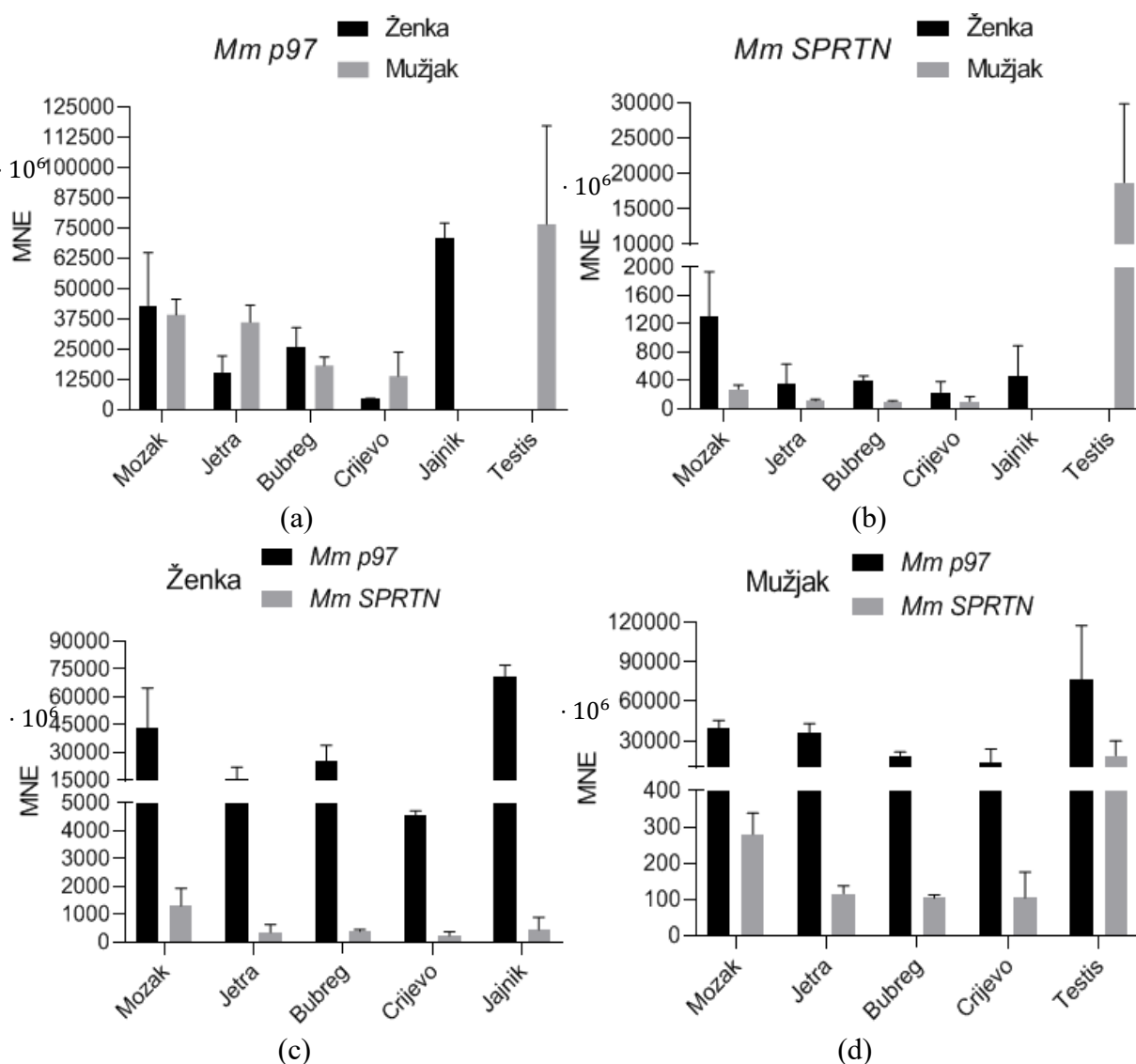
Hs p97 je podjednako i visoko eksprimiran u svim promatranim tkivima, a takav je rezultat u skladu s njegovom esencijalnom i širokom ulogom u organizmu (odjeljak 2.5.2.). Navedeni je gen najviše eksprimiran u jetri, a potom, s većim odmakom i međusobno vrlo sličnom razinom ekspresije, slijede: bubreg (2,11 puta manja ekspresija nego u jetri), crijevo (2,41 puta manja nego u jetri), testis (2,48 puta manja nego u jetri), jajnik (2,54 puta manja nego u jetri), mozak (2,82 puta manja nego u jetri) i oko (2,99 puta manja nego u jetri). Ekspresija *p97* u spolnim tkivima čovjeka gotovo je identična (1,02 puta veća u testisu nego u jajniku).

Daleko najviša razina ekspresije *Hs SPRTN*-a prisutna je u testisu. Kod ostalih je tkiva prisutna značajno manja ekspresija *SPRTN*-a u usporedbi s onom u testisu, ali je međusobno vrlo ujednačena: 2,43 puta manja u jetri, 2,56 puta u mozgu, 2,88 puta u bubregu, 3,24 puta u

jajniku, 3,28 puta u oku i 3,43 puta u crijevu. Uspoređujući spolna tkiva, ekspresija *SPRTN*-a je 3,24 puta veća u testisu u odnosu na jajnik, što je značajna razlika u usporedbi s *p97*.

Budući da je *p97* jedan od najzastupljenijih proteina u stanici⁹⁵, očekivano je da je *Hs p97* više eksprimiran u svim tkivima u odnosu na *Hs SPRTN*, a razlike su sljedeće: 6,6 puta u jetri, 3,87 puta u crijevu, 3,72 puta u bubregu, 3,47 puta u jajniku, 2,99 puta u oku, 2,47 puta u mozgu, te 1,1 puta u testisu.

4.2.4.1. Ekspresija gena u domaćem mišu i usporedba s čovjekom



Slika 15. Grafički prikaz relativne ekspresije gena (na razini mRNA) izražene kao MNE (engl. Mean Normalized Expression) za: (a) *p97* u tkivima ženke i mužjaka miša (*Mus musculus*, *Mm*), (b) *SPRTN* u tkivima ženke i mužjaka miša, (c) *p97* i *SPRTN* u tkivima ženke miša i (d) *p97* i *SPRTN* u tkivima mužjaka miša.

Rezultati pokazuju kako je *p97* (slika 15a) visoko i podjednako eksprimiran u svim tkivima ženke i mužjaka miša, što je i u skladu s njegovom ekspresijom u čovjeku^{133,134}, kao i esencijalnom ulogom u organizmu.^{90,94-97} *Mm p97* je najviše eksprimiran u spolnom tkivu, a nakon njih, s podjednakom razinom ekspresije i za ženku i za mužjaka, slijedi njegova ekspresija u mozgu (1,6 puta manja u odnosu na jajnik u slučaju ženke, odnosno 2 puta manja u odnosu na testis u slučaju mužjaka). Kod mužjaka je prisutna gotovo identična razina ekspresije *p97* u jetri u odnosu na mozak (1,1 puta manja nego u mozgu), a potom slijedi bubreg (2,1 puta manja nego u mozgu). Najslabija ekspresija i za ženku i za mužjaka prisutna je u crijevu (2,8 puta manja nego u mozgu mužjaka, odnosno 9,5 puta manja nego u mozgu ženke). Kod ženke je nakon mozga ekspresija *p97* najveća u bubregu (1,7 puta manja nego u mozgu), a potom u jetri (2,8 puta manja nego u mozgu).

Ekspresija *p97* (slika 15a) ne pokazuje veće spolne razlike. Razlika između spolnih tkiva (jajnik i testis) i istovrsnih tkiva ženke i mužjaka (mozak, jetra, bubreg i crijevo) vrlo je mala. *p97* je gotovo jednako eksprimiran u jajniku i testisu miša (1,1 puta veća ekspresija u testisu u odnosu na jajnik), kao i u mozgu ženke i mužjaka (1,1 puta veća ekspresija u ženki). Za bubreg vrijedi sličan rezultat, uz 1,4 puta veću ekspresiju u ženki. Najveće su razlike prisutne u jetri i crijevu. U jetri mužjaka, *p97* je 2,3 puta više eksprimiran nego u ženki, a omjer u tkivima crijeva iznosi 3,0 u korist mužjaka. Zaključno, većih razlika u ekspresiji *p97* između istovrsnih tkiva ženke i mužjaka nema.

Poredak ekspresije *p97* u promatranim tkivima čovjeka i miša se razlikuje. *Hs p97* je daleko najviše eksprimiran u jetri, a *Mm p97* u spolnom tkivu (jajnik/testis). U slučaju čovjeka nakon jetre slijede: bubreg, crijevo, testis/jajnik (identična ekspresija) i mozak, a u slučaju miša nakon spolnog tkiva slijede (tkivo mužjaka/tkivo ženke): mozak/mozak, jetra/bubreg, bubreg/jetra i crijevo/crijevo. Kod čovjeka ekspresija *p97* između navedenih tkiva duplo manje varira (razlika između jetre i mozga je 2,8 puta) nego ekspresija *p97* u istim tkivima kod miša (razlika između testisa i crijeva je 5,5 puta). Oba su gena podjednako eksprimirana u spolnom tkivu (jajnik i testis).

Daleko najviša razina ekspresije *Mm SPRTN* gena (slika 15b) prisutna je u testisu. Kod ostalih tkiva mužjaka prisutna je značajno manja ekspresija *SPRTN*-a u usporedbi s onom u testisu: 67 puta u mozgu, 160 puta u jetri, 178 puta u crijevu i 180 puta u bubregu. Ekspresija *SPRTN*-a u mozgu mužjaka, drugom najzastupljenijem tkivu, više od dva puta je veća u odnosu na minimalne i gotovo identične vrijednosti u jetri (2,4 puta manja u odnosu na mozak), crijevu

(2,7 puta manja u odnosu na mozak) i bubregu (2,7 puta manja u odnosu na mozak). Ekspresija *SPRTN*-a u slučaju ženke pokazuje najviše vrijednosti u mozgu, a potom s više od tri puta manjom i međusobno sličnom razinom ekspresije, slijede jajnik (2,9 puta manja u odnosu na mozak), bubreg (3,3 puta manja u odnosu na mozak) i jetra (3,7 puta manja u odnosu na mozak). Ekspresija *SPRTN*-a najslabija je u crijevu ženke (5,5 puta manja u odnosu na mozak).

U usporedbi s *p97* genom, ekspresija *SPRTN*-a (slika 15b) pokazuje veće razlike između spolnih tkiva (jajnik i testis) i istovrsnih tkiva ženke i mužjaka (mozak, jetra, bubreg i crijevo). U testisu je ekspresija 41 puta veća nego u jajniku. U mozgu ženke *SPRTN* je 4,7 puta više ekspimiran nego u mozgu mužjaka. *SPRTN* je 3,9 puta više ekspimiran u bubregu ženke, 3 puta više u jetri ženke, te 2,3 puta više u crijevu ženke u usporedbi s istim tkivima mužjaka.

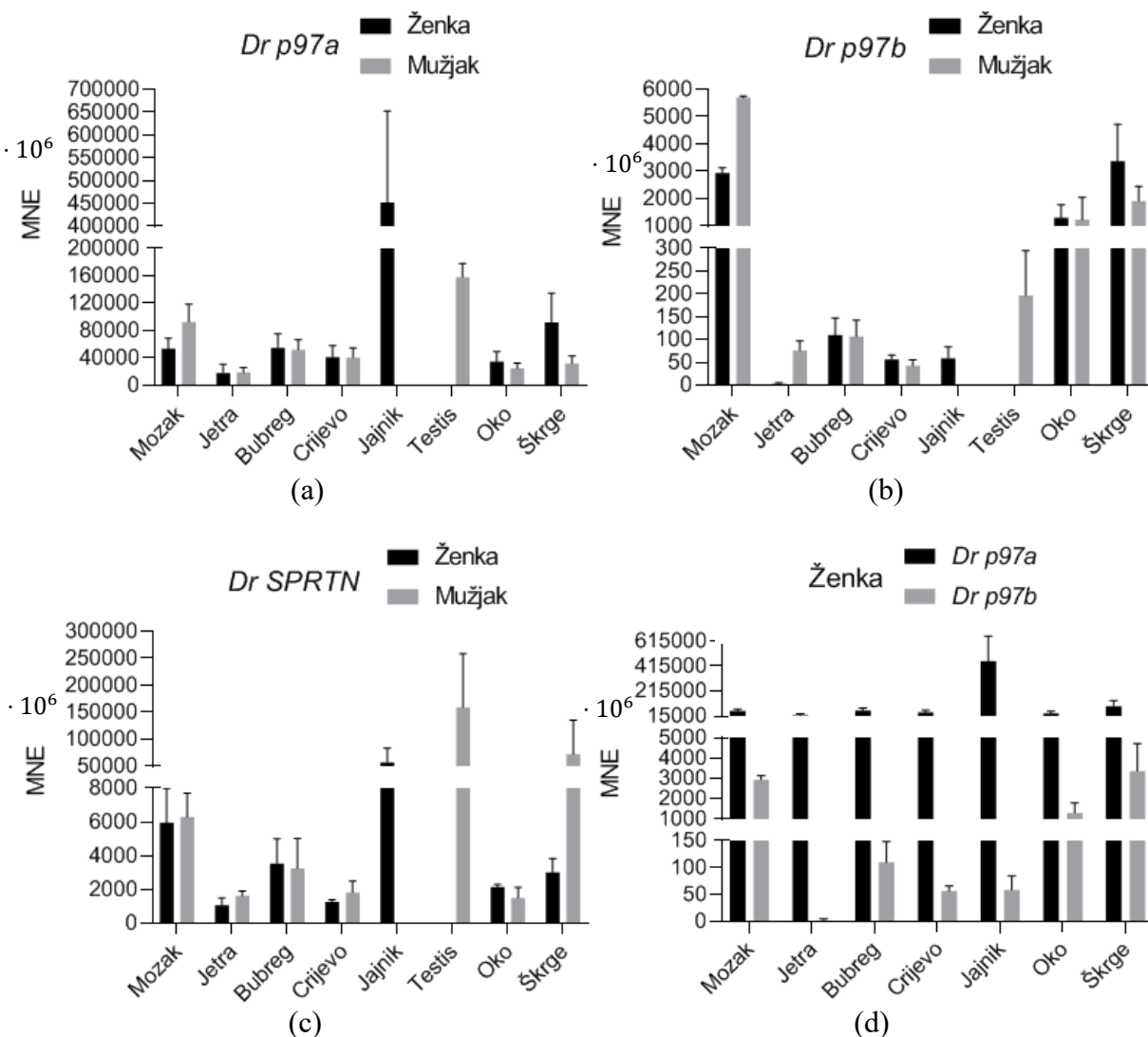
Kao i u slučaju *p97*, poredak ekspresije *SPRTN*-a u tkivima čovjeka i miša se razlikuje. U slučaju čovjeka poredak je sljedeći (od najveće ekspresije prema najmanjoj): testis, jetra, mozak, bubreg, jajnik i crijevo, dok je u slučaju miša situacija sljedeća (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/mozak, mozak/jajnik, jetra/bubreg/, crijevo/jetra, bubreg/crijevo. Zajedničko ovim ortolozima je vrlo visoka razina ekspresije (pogotovo kod miša) u testisu u usporedbi s jajnikom (3,2 puta veća ekspresija u slučaju čovjeka, odnosno 41 puta u slučaju miša) i ostalim tkivima. Kod čovjeka ekspresija *SPRTN*-a između navedenih tkiva puno manje varira (razlika između testisa i crijeva je 3,4 puta) nego ekspresija *SPRTN*-a u istim tkivima kod miša (razlika između testisa i bubrega je 180 puta).

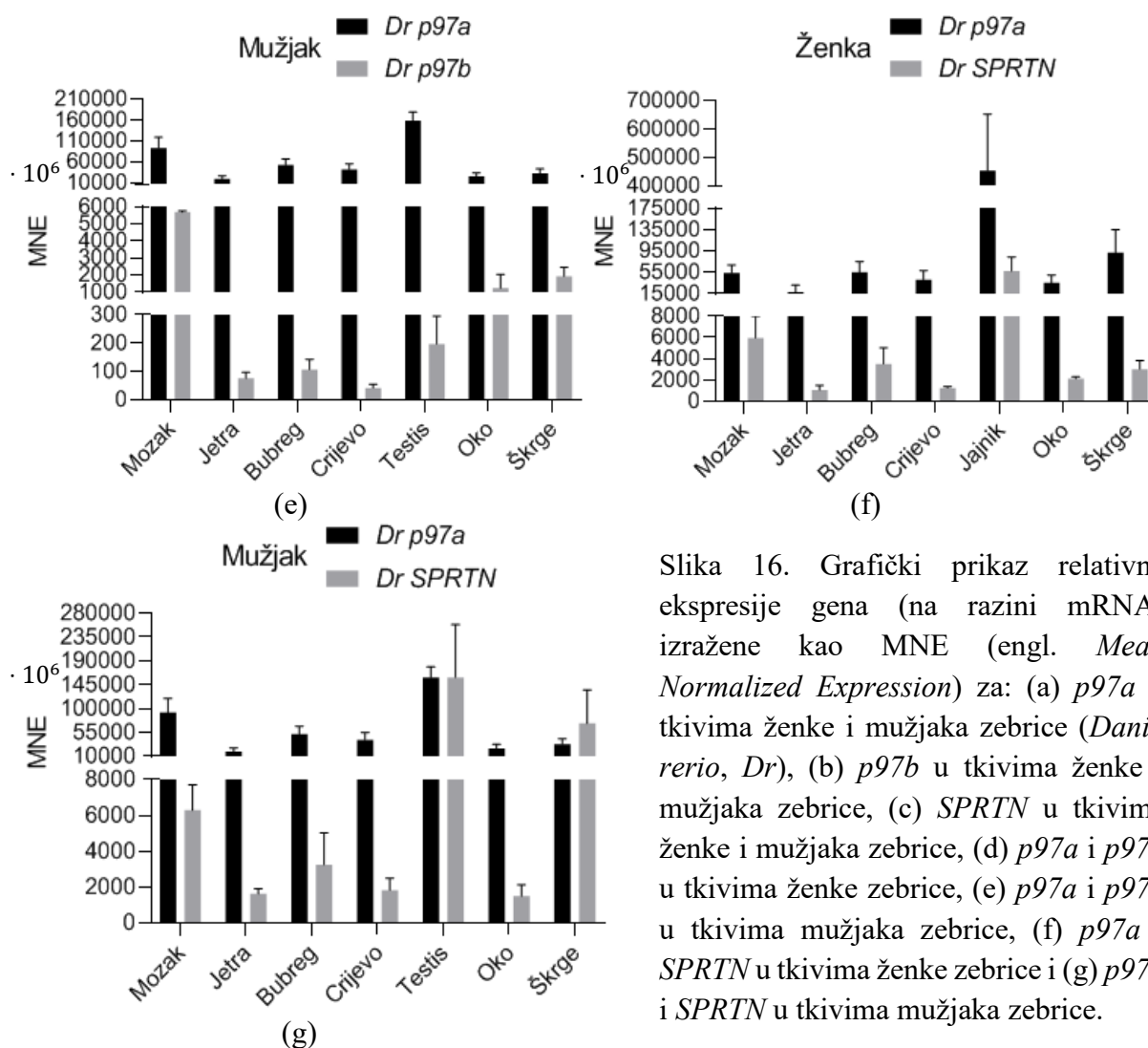
Mm p97 je višestruko ekspimiraniji u odnosu na *Mm SPRTN* (slike 15c i d), što je i očekivano s obzirom na ekspresijske podatke poznate za čovjeka.^{133,134} Razlika u ekspresiji između ovih dvaju gena u tkivima ženke kreću se od 19 puta veće ekspresije *p97* u crijevu do 154 puta u jajniku. Razlika za mozak iznosi 33 puta u korist *p97*, za jetru 44 puta, te za bubreg 64 puta. Kod mužjaka razlike variraju još više i kreću se od samo 4 puta slabije ekspresije *SPRTN*-a u testisu, pa sve do 310 puta u jetri. U crijevu je ta razlika 132 puta u korist *p97*, mozgu 140 puta, a u bubregu 175 puta. Uvidom u rezultate prikazane na slikama 15a i 15b i MNE vrijednosti za jajnik i testis, može se primijetiti razlika koja postoji u tim tkivima. Razlika u ekspresiji *p97* i *SPRTN*-a u jajniku je čak 154 puta, a u testisu samo 4 puta. To je posljedica veoma niske ekspresije *SPRTN*-a u jajniku, dok je ekspresija *p97* u jajniku i testisu, te *SPRTN*-a u testisu, uspoređujući s ostalim tkivima, najveća.

Kao što je već spomenuto, *p97* je više ekspimiran u svim tkivima čovjeka u odnosu na *SPRTN*, ali su razlike puno manje nego u mišu (od 310 puta u jetri do 4 puta u testisu) te se

kreću od 6,6 puta veće ekspresije *p97* u jetri čovjeka do 1,1 puta u testisu čovjeka. Zajedničko za oba organizma je da je najmanja razlika u ekspresiji *p97* i *SPRTN*-a prisutna u testisu (4 puta u mišu, odnosno 1,1 puta u čovjeku).

4.2.4.2. Ekspresija gena u ribi zebrici i usporedba s čovjekom





Slika 16. Grafički prikaz relativne ekspresije gena (na razini mRNA) izražene kao MNE (engl. *Mean Normalized Expression*) za: (a) *p97a* u tkivima ženke i mušjaka zebrice (*Danio rerio*, *Dr*), (b) *p97b* u tkivima ženke i mušjaka zebrice, (c) *SPRTN* u tkivima ženke i mušjaka zebrice, (d) *p97a* i *p97b* u tkivima ženke zebrice, (e) *p97a* i *p97b* u tkivima mušjaka zebrice, (f) *p97a* i *SPRTN* u tkivima ženke zebrice i (g) *p97a* i *SPRTN* u tkivima mušjaka zebrice.

Uspoređujući s ostalim promatranim tkivima, *p97a* (slika 16a) nadmoćno je eksprimiran u spolnim tkivima, a jajnik pokazuje 2,9 puta veću razinu ekspresije od one u testisu. Škrge su u slučaju ženke sekundarno tkivo ekspresije navedenog gena (4,9 puta manja ekspresija nego u jajniku), a potom slijede: bubreg (8,2 puta manja nego u jajniku), mozak (8,4 puta manja nego u jajniku), crijevo (11 puta manja nego u jajniku), oko (13 puta manja nego u jajniku), te jetra (25,6 puta manja nego u jajniku) kao tkivo s najnižom razinom ekspresije. Mušjak pokazuje sličan slijed razine ekspresije kao i ženka, te nakon testisa slijede: mozak (1,7 puta manja nego u testisu), bubreg (3 puta manja nego u testisu), crijevo (3,8 puta manja nego u testisu), škrge (4,9 puta manja nego u testisu), oko (6,3 puta manja nego u testisu) i na kraju jetra (8,3 puta manja nego u testisu).

Između istovrsnih tkiva ženke i mušjaka (mozak, jetra, bubreg, crijevo, oko i škrge) također nema prevelikih razlika u ekspresiji *p97a* (slika 16a). Osim spolnih tkiva (razlika 2,9 puta u

korist jajnika u odnosu na testis), najveća nepododuranja prisutna su u škragama i mozgu. U škragama mužjaka ekspresija je 2,8 puta veća nego u ženki, a u mozgu mužjaka 1,7 puta veća nego u ženki. Još manje, gotovo zanemarive razlike u ekspresiji prisutne su u oku (1,4 puta veća ekspresija u ženki), bubregu (1,1 puta veća ekspresija u ženki) i jetri (1,1 puta veća ekspresija u mužjaku). Ekspresija *p97a* gena u potpunosti je identična u crijevu ženke i mužjaka. Ekspresijski podatci *p97a* gena ne postoje za zebricu niti ostale ribe, pa se stoga rezultati ne mogu usporediti s ostalim istraživanjima.

Kao i u slučaju ekspresije *p97* i *SPRTN*-a u mišu i čovjeku, poredak ekspresije *p97* u promatranim tkivima čovjeka i zebrice također se razlikuje. *Hs p97* najviše je eksprimiran u jetri, a potom slijede: bubreg, crijevo, testis/jajnik (identična ekspresija), mozak i oko. Kod zebrice je poredak (od najveće ekspresije prema najmanjoj) sljedeći (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/jajnik, mozak/bubreg, bubreg/mozak, crijevo/crijevo, oko/oko, jetra/jetra. Kod čovjeka ekspresija *p97* između navedenih tkiva puno manje varira (razlika između jetre i mozga je 2,8 puta) nego ekspresija *p97* u istim tkivima kod zebrice (razlika između jajnika i jetre je 26 puta). Dok je *Hs p97* podjednako eksprimiran u spolnim tkivima ženke i mužjaka (jajnik i testis), ekspresija *Dr p97a* u istim tkivima značajno je različita (2,9 puta veća u jajniku).

Za razliku od *p97a*, njegov paralog *p97b* (slika 16b) veoma je nisko eksprimiran u spolnim tkivima (u usporedbi s ekspresijom *p97b* u ostalim tkivima). *p97b* je najviše eksprimiran u mozgu, škragama (3 puta manja ekspresija nego u mozgu) i oku (4,6 puta manja nego u mozgu) u slučaju mužjaka, odnosno škragama, mozgu (1,1 puta manja nego u škragama) i oku (2,6 puta manja nego u škragama) u slučaju ženke. Nakon njih, s ogromnom razlikom u ekspresiji, slijede testis (28,9 puta manja nego u mozgu), bubreg (53,5 puta manja nego u mozgu), jetra (75,4 puta manja nego u mozgu) i crijevo (134 puta manja nego u mozgu) kod mužjaka, odnosno bubreg (30,7 puta manja nego u škragama), jajnik (57,3 puta manja nego u škragama), crijevo (59,7 puta manja nego u škragama) i jetra (gotovo nepostojeća ekspresija, MNE = 2,5) (1344 puta manja nego u škragama) kod ženke.

Promatrajući spolna tkiva (jajnik i testis), *p97b* (slika 16b) je 3,4 puta više eksprimiran u testisu u odnosu na jajnik. Daleko najveća razlika u ekspresiji *p97b* između istovrsnih tkiva ženke i mužjaka (mozak, jetra, bubreg, crijevo, oko i škrge) prisutna je u jetri (30,2 puta u korist mužjaka). Puno manja razlika u ekspresiji prisutna je u mozgu (1,9 puta u korist mužjaka), a u preostalim tkivima razlike na stranu ženke su sljedeće: škrge (1,8 puta), crijevo (1,3 puta) i oko (1,1 puta). U bubregu ženke i mužjaka nema razlike u ekspresiji.

Razlika u ekspresiji paralognih gena *p97a* i *p97b* (slike 16d i e) je ogromna. Uspoređujući njihovu ekspresiju u tkivima ženke, razlika u korist *p97a* je sljedeća: 7706 puta veća ekspresija u jajniku, 7065 puta u jetri, 731 puta u crijevu, 502 puta u bubregu, 27 puta u oku i škragama, te 18 puta u mozgu. U slučaju mužjaka razlike su manje: 970 puta veća ekspresija *p97a* u crijevu, 804 puta u testisu, 488 puta u bubregu, 252 puta u jetri, 20 puta u oku, 17 puta u škragama, te 16 puta u mozgu. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako brojne stanične funkcije *p97* proteina (odjeljak 2.5.2.) u zebrici primarno obavlja protein *p97a*, a ne *p97b*.

Najviša razina ekspresije *Dr SPRTN*-a (slika 16c) u oba spola prisutna je, kao i kod *Dr p97a*, u spolnim tkivima (testis i jajnik). Ekspresija u svim ostalim tkivima ženke višestruko je manja, a redom slijede: mozak (9,6 puta manja ekspresija nego u jajniku), bubreg (16,2 puta manja nego u jajniku), škrge (18,8 puta manja nego u jajniku), oko (26,6 puta manja nego u jajniku), crijevo (45,2 puta manja nego u jajniku) i jetra (53 puta manja nego u jajniku). Ekspresija u škragama (2,2 puta manja nego u testisu) mužjaka usporediva je s onom u jajniku i testisu. Mnogo niže MNE vrijednosti kod mužjaka, u usporedbi s testisom i škragama, zastupljene su u: mozgu (25,2 puta manja nego u testisu), bubregu (48,9 puta manja nego u testisu), crijevu (87,3 puta manja nego u testisu), jetri (98 puta manja nego u testisu) i oku (106 puta manja nego u testisu).

Uspoređujući ekspresiju *SPRTN*-a (slika 16c) u istovrsnim tkivima ženke i mužjaka (mozak, jetra, bubreg, crijevo, oko i škrge), kao i spolnim tkivima (jajnik i testis), razlike u omjerima MNE vrijednosti vrlo su male, po uzoru na *p97a* i *p97b* gene. Jedino odstupanje postoji u škragama, gdje omjer MNE vrijednosti iznosi 23,8 u korist mužjaka (slika 16c). Ekspresija u testisu je 2,8 puta veća nego u jajniku. Minimalne razlike u ekspresiji prisutne su u: jetri (1,5 puta veća ekspresija u mužjaku), oku (1,4 puta veća ekspresija u ženki) crijevu, (1,4 puta veća ekspresija u mužjaku), mozgu (1,1 puta veća ekspresija u mužjaku) i bubregu (1,1 puta veća ekspresija u ženki).

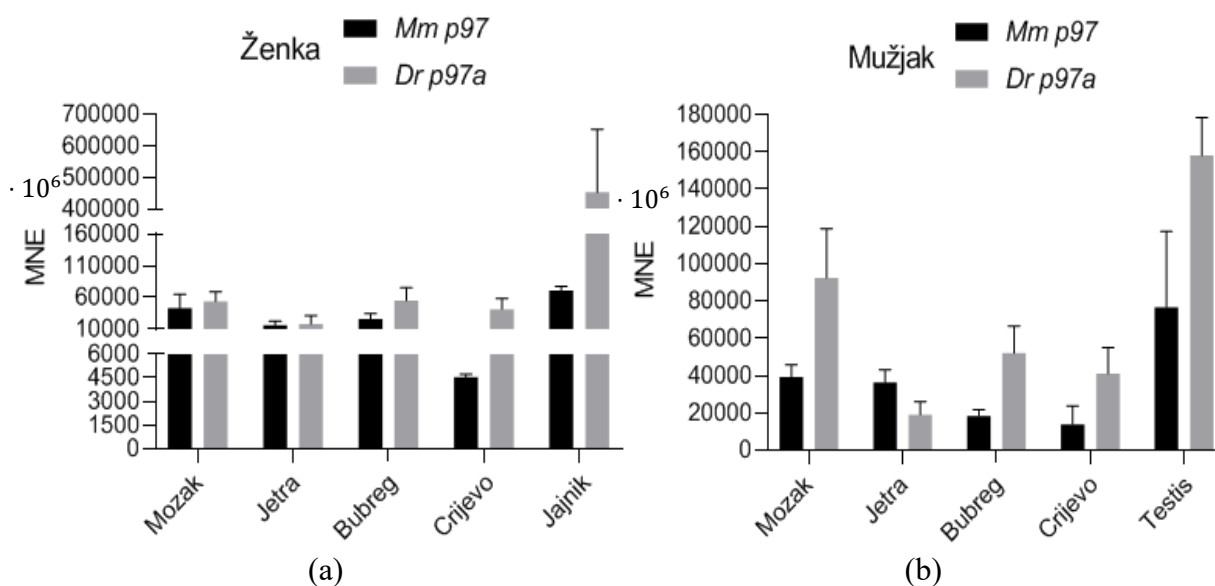
Kao i u slučaju prethodnih usporedbi ekspresije gena u tkivima čovjeka i miša/zebrice, poredak ekspresije *SPRTN*-a u tkivima čovjeka i zebrice se razlikuje. U slučaju čovjeka poredak je sljedeći (od najveće ekspresije prema najmanjoj): testis, jetra, mozak, bubreg, jajnik, oko i crijevo, dok je u slučaju zebrice situacija sljedeća (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/jajnik, mozak/mozak, bubreg/bubreg, crijevo/oko, jetra/crijevo, oko/jetra (od najveće ekspresije prema najmanjoj). Oba ortologa su više eksprimirana u testisu u usporedbi s jajnikom (3,2 puta veća ekspresija u slučaju čovjeka, odnosno 2,8 puta veća u slučaju miša) i ostalim tkivima. Također,

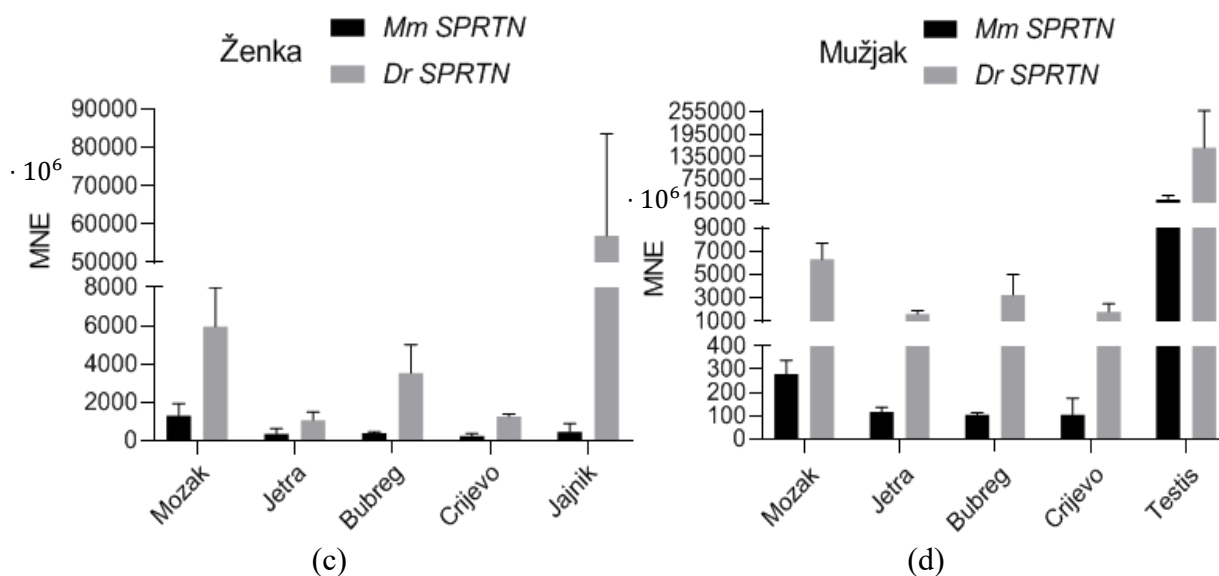
u usporedbi s čovjekom, ekspresija *Mm SPRTN*-a u jajniku značajno je veća u odnosu na ostala tkiva ženke. Po uzoru na prethodne slučajeve, kod čovjeka ekspresija *SPRTN*-a između navedenih tkiva puno manje varira (razlika između testisa i crijeva je 3,4 puta) nego ekspresija *SPRTN*-a u istim tkivima kod miša (razlika između testisa i oka je 106 puta).

Razlika u ekspresiji *Dr p97a* i *Dr SPRTN*-a (slike 16f i g) mnogo je manja u usporedbi s razlikom između *p97a* i *p97b*. U tkivima ženke ekspresija *p97a* veća je u odnosu na *SPRTN*: 33 puta u crijevu, 30 puta u škragama, 16 puta u jetri, bubregu i oku, 9 puta u mozgu, te 8 puta u jajniku. Kod mušjaka se čak javlja 2,2 puta veća ekspresija *SPRTN*-a u škragama, a u testisu nema razlike u ekspresiji između *p97a* i *SPRTN*-a. U ostalim tkivima mušjaka ekspresija *p97a* je veća: 23 puta u crijevu, 17 puta u oku, 16 puta u bubregu, 15 puta u mozgu, te 12 puta u jetri.

Kao što je već spomenuto, *p97* je više eksprimiran u svim tkivima čovjeka u odnosu na *SPRTN*, ali su razlike manje nego u zebrici (od 23 puta u crijevu do podjednake ekspresije u testisu) te se kreću od 6,6 puta veće ekspresije *p97* u jetri čovjeka do 1,1 puta u testisu čovjeka. Zajedničko za oba organizma je međusobno podjednaka razina ekspresije *p97* i *SPRTN*-a u testisu.

4.2.4.3. Usporedba ekspresije gena u domaćem mišu i ribi zebrici





Slika 17. Grafički prikaz relativne ekspresije gena (na razini mRNA) izražene kao MNE (engl. *Mean Normalized Expression*) za: (a) *Mus musculus* (domaći miš), *Mm p97* i *Danio rerio* (zebrica), *Dr p97a* u tkivima ženke, (b) *Mm p97* i *Dr p97a* u tkivima mužjaka, (c) *Mm SPRTN* i *Dr SPRTN* u tkivima ženke i (d) *Mm SPRTN* i *Dr SPRTN* u tkivima mužjaka.

Kao posljednji dio analize provedena je usporedba ekspresije ortolognih gena *p97* (*Mm p97* i *Dr p97a*) i *SPRTN*-a (*Mm SPRTN* i *Dr SPRTN*) u domaćem mišu i ribi zebri. Na razini organizma, oba su gena više ekspimirana u zebri nego u mišu: *Dr p97a* 2,9 puta više od *Mm p97* (slike 17 a i b), a *Dr SPRTN* čak 10,9 puta više od *Mm SPRTN*-a (slike 17 c i d) (omjeri su dobiveni na način da je zbroj srednjih MNE vrijednosti promatranog gena (prikazani na grafovima iznad) za sva tkiva ženke i mužjaka podijeljen s istim zbrojem za drugi promatrani gen). Uspoređujući spolove, *Dr p97a* je 3,9 puta više ekspimiran od *Mm p97* u ženki, odnosno 2 puta više u mužjaku. U slučaju *SPRTN*-a razlika je još izraženija: u ženki je *Dr SPRTN* 25,6 puta više ekspimiran od *Mm SPRTN*-a, a u mužjaku je razlika manja i iznosi 8,9 puta (omjeri su dobiveni na način da je zbroj srednjih MNE vrijednosti promatranog gena (prikazani na grafovima iznad) za sva tkiva ženke/mužjaka podijeljen s istim zbrojem za drugi promatrani gen u istom spolu).

Također, u svim promatranim tkivima mužjaka i ženke, *Dr p97a* je više ekspimiran od *Mm p97*, a isto vrijedi i za *Dr SPRTN* u odnosu na *Mm SPRTN*. Jedina je iznimka jetra mužjaka, gdje je prisutna 1,9 puta veća ekspresija *Mm p97*. U slučaju *p97*, vrijednosti se kreću od 1,1 puta veće ekspresije u jetri ženke do 12,4 puta u crijevu ženke, a za *SPRTN* od 3 puta veće ekspresije u jetri ženke do 124 puta u jajniku. Dakle, razlike u ekspresiji između ova dva gena manje variraju u muškim tkivima.

Poredak ekspresije *p97* u tkivima (od najveće ekspresije prema najmanjoj) u mišu je sljedeći (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/jajnik, mozak/mozak, jetra/bubreg, bubreg/jetra, crijevo/crijevo, a u slučaju zebrice: testis/jajnik, mozak/bubreg, bubreg/mozak, crijevo/crijevo, jetra/jetra. Poredak ekspresije *SPRTN*-a u tkivima (od najveće ekspresije prema najmanjoj) u mišu je sljedeći (tkivo mužjaka/tkivo ženke): testis/mozak, mozak/jajnik, jetra/bubreg/, crijevo/jetra, bubreg/crijevo, a u slučaju zebrice: testis/jajnik, mozak/mozak, bubreg/bubreg, crijevo/crijevo, jetra/jetra. Poredak ekspresije (po tkivima) pojedinog gena u različitom spolu istog organizma vrlo je sličan, a poredak *Dr SPRTN*-a je identičan. Veća odstupanja u poretku prisutna su samo u slučaju *Mm SPRTN*-a. Sličnost u poretku ekspresije ortolognih gena u istom spolu miša i zebrice postoji, ali je manja nego u slučaju gena u različitom spolu istog organizma, dok za ortologe gene čovjeka i miša/zebrice nema poklapanja. Promatrajući različite gene (*p97* i *SPRTN*) u istom spolu miša ili zebrice, poredak je vrlo sličan, dok kod čovjeka to nije slučaj.

Tablica 17. Ekspresijske razine *p97* i *SPRTN* gena u tkivima ženke (Ž) i mužjaka (M) domaćeg miša (*Mus musculus*, *Mm*) i ribe zebrice (*Danio rerio*, *Dr*). Oznake: N – niska razina ekspresije, U – umjerena razina ekspresije, UV – umjereno visoka razina ekspresije, V – visoka razina ekspresije, JV – jako visoka razina ekspresije.

	<i>Mm p97</i>		<i>Mm SPRTN</i>		<i>Dr p97a</i>		<i>Dr p97b</i>		<i>Dr SPRTN</i>	
	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M
Mozak	JV	JV	V	UV	JV	JV	V	V	V	V
Jetra	JV	JV	UV	U	JV	JV	N	U	V	V
Bubreg	JV	JV	UV	U	JV	JV	U	U	V	V
Crijevo	V	JV	UV	U	JV	JV	U	U	V	V
Testis		JV		JV		JV		UV		JV
Jajnik	JV		UV		JV		U		JV	
Oko					JV	JV	V	V	V	V
Škrge					JV	JV	V	V	V	JV

p97 je u oba organizma očekivano eksprimiran na jako visokoj razini (osim *Mm p97* u crijevu ženke), što je u skladu s njegovom esencijalnom i širokom ulogom u tim organizmima.^{91,95–98} *Dr p97b* je eksprimiran na visokoj razini u mozgu, oku i škragama, dok je u ostalim tkivima eksprimiran umjereno (jedino u testisu umjereno visoko, a u jetri ženke nisko). Kao što je već spomenuto, njegova je ekspresija u usporedbi s paralogom *Dr p97a* zanemariva. *SPRTN* je u tkivima miša i zebrice većinom eksprimiran na umjereno visokoj i visokoj razini. Testis je u

slučaju miša jedino tkivo gdje je *SPRTN* eksprimiran na jako visokoj razini, dok su to u slučaju zebrice jajnik, testis i škrge mužjaka. Umjerena ekspresija *Mm SPRTN*-a prisutna je u jetri, bubregu i crijevu mužjaka.

Standardna pogreška aritmetičke sredine (SEM) je mjera pogreške uzorkovanja koja omogućava sastavljanje intervala pouzdanosti u kojem će se vjerojatno nalaziti srednja vrijednost populacije. Drugim riječima, SEM je pokazatelj preciznosti aritmetičke sredine.¹⁴⁴ Promatrajući grafove na slikama 15, 16 i 17, može se primijetiti kako SEM vrijednosti između tkiva značajno variraju. Tkiva s velikim SEM vrijednostima za oba promatrana gena u slučaju miša su: mozak, jetra i crijevo ženke, crijevo mužjaka i testis, a u slučaju zebrice: jetra, bubreg i škrge ženke, bubreg mužjaka, jajnik i testis. Standardne devijacije iz tablica 13 i 14, u usporedbi sa standardnim pogreškama na slikama 15, 16 i 17, vrlo su niske i konstantne. Valja napomenuti kako su standardne devijacije određene za tehnološke, a standardne pogreške za biološke replikate. Tehnološki replikati su ponavljanja istog uzorka, a biološki replikati su različiti uzorci koji pripadaju istoj skupini, te su stoga podložniji varijacijama. Kao što je već spomenuto u odlomku 4.2.2., takav je rezultat posljedica interindividualne biološke varijacije (varijacija između različitih jedinki iste vrste) u ekspresiji gena. Biološka varijacija je istinska varijacija među različitim uzorcima unutar iste skupine.¹⁴⁵

Konkretno, istraživanja na miševima su pokazala da je u svim proučavanim tkivima prisutna interindividualna biološka varijacija u ekspresiji određenog broja gena, a ekspresijske razine nekoliko gena značajno su varirale u više od jednog tkiva.^{146,147} Ova pojava može biti posljedica brojnih faktora: razlika u imunološkom statusu, hormonskoj regulaciji i metabolizmu između jedinki, načinu uzorkovanja životinjama i tkivima, kompleksnosti tkiva (sastoji se od nekoliko različitih tipova stanica koji mogu biti prisutni u različitim omjerima između jedinki), stohaističkim biokemijskim događajima u organizmu, spolu, starosti, prisutnosti bolesti, utjecaju okoline, fizičkih i fizioloških razlika, razlika u prehrani i genetici te epigenetskoj regulaciji.^{146,147} Čak i ako su miševi genetski identični, istog spola i starosti, smješteni u istim uvjetima i hranjeni isto, nastat će razlike u ekspresiji istih gena u tim jedinkama.¹⁴⁶ Interindividualne biološke varijacije u ekspresiji gena pojavljuju se i u drugim organizmima, uključujući kvasac¹⁴⁸, muhe¹⁴⁹, ribe^{143,150} i čovjeka^{146,151}. Zaključno, rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja koja pokazuju da je za određene gene (među kojima su i *p97* te *SPRTN*) moguće postojanje značajnih ekspresijskih razlika u nekim tkivima između različitih jedinki iste vrste zbog navedenih faktora.

§ 5. ZAKLJUČAK

Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina

- Humani proteini p97 WT, SPRTN WT i SPRTN E112A uspješno su heterologno nadeksprimirani i pročišćeni iz bakterije *Escherichia coli* soja *Rosetta (DE3)* koristeći IPTG-inducibilni *lacUV5* promotor.
- Uvjete pročišćavanja navedenih proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu potrebno je dodatno optimizirati kako bi se postigla njihova efikasnija izolacija iz stanica.
- p97 WT je potencijalno stabilniji protein, manje podložan raspadu i agregaciji u obliku netopljivih inkluzijskih tijela u odnosu na proteine SPRTN WT i SPRTN E112A.
- SPRTN je DNA-ovisna metaloproteaza sklona raspadu zbog svoje neuređene strukture i autoproteolitičkog djelovanja.
- Katalitička mutacija (E112A) potencijalno čini SPRTN još nestabilnijim i kompliciranijim za izolirati u odnosu na WT SPRTN.

Kvantifikacija ekspresije gena od interesa na razini mRNA u tkivima domaćeg miša (*Mm*) i ribe zebrice (*Dr*)

- U pogledu prinosa i čistoće, izolacija ukupne RNA kao ključni korak cijelog procesa kvantifikacije ekspresije gena, bila je uspješna za sva tkiva domaćeg miša, uz iznimku izolacije ukupne RNA iz jajnika ženke 3.
- Prinos i čistoća izolirane ukupne RNA variraju ovisno o primijenjenom protokolu.
- Korištena su četiri različita protokola izolacije ukupne RNA, a svi su dali zadovoljavajuće rezultate. Najuspješnijim se pokazao *NEB Monarch Total RNA Miniprep Kit* protokol. Nakon njega po uspješnosti slijede *TRizol* metoda i *Qiagen RNeasy Mini Kit* protokol, te na kraju *Zymo Research Direct-zol RNA Miniprep Plus* protokol.
- Kvaliteta izolirane RNA primarno ovisi o brzini sekcije tkiva i pripreme uzoraka (homogenizacija), držanju tkiva i tubica na ledu, te primijenjenom protokolu. Ukupna RNA iz crijeva ženke 3 domaćeg miša pokazala je raspad, a razlog za to je način uzorkovanja crijevom prilikom sekcije tkiva (nije rađena u sklopu ovog rada). Kvaliteta izolirane ukupne RNA iz ostalih tkiva pokazala se prihvatljivom.

- Provjeru kvalitete izolirane ukupne RNA agaroznom gel-elektroforezom potrebno je dodatno optimizirati kako bi se izbjegao njezin raspad prilikom provođenja elektroforeze.
- *18S rRNA* je za razliku od *EEF2* podoban referentni gen za kvantifikaciju gena od interesa u domaćem mišu.
- Dizajnirane početnice rade specifično i u traženom su rasponu efikasnosti amplifikacije PCR produkta (90 - 110 %), te se stoga mogu koristiti za kvantifikaciju ekspresije gena u tkivima domaćeg miša, odnosno ribe zebrice.
- *Mm p97* i *Dr p97* geni u svim su tkivima ženke i mužjaka eksprimirani na jako visokoj razini (osim *Mm p97* u crijevu ženke – visoka razina), a *Mm SPRTN* i *Dr SPRTN* uglavnom na umjereno visokoj i visokoj razini (jako visoka razina jedino u testisu miša, odnosno testisu, jajniku i škragama mužjaka zebrice). Umjerena ekspresija *Mm SPRTN*-a prisutna je u jetri, bubregu i crijevu mužjaka. *Dr p97b* je eksprimiran na visokoj razini u mozgu, oku i škragama, dok je u ostalim tkivima eksprimiran umjereno (jedino u testisu umjereno visoko, a u jetri ženke nisko).
- *Mm p97*, *Dr p97a*, *Mm SPRTN* i *Dr SPRTN* geni dominantno su eksprimirani u spolnim tkivima (jajnik i testis), a jedina je iznimka ekspresija *Mm SPRTN* gena u jajniku. *Dr p97b* najviše je eksprimiran u mozgu i škragama, ali značajno manje u odnosu na ostale gene.
- Promatrajući navedene gene zasebno, u većini slučajeva nema velikih razlika u njihovoj ekspresiji između istovrsnih tkiva ženke i mužjaka, kao niti između spolnih tkiva ženke i mužjaka domaćeg miša i ribe zebrice (iznimka je *Mm SPRTN*).
- *Mm p97* je u većini tkiva višestruko puta eksprimiraniji od *Mm SPRTN*-a, kao i *Dr p97a* od *Dr SPRTN*-a, a pogotovo od svog paralognog gena *Dr p97b*.
- Uspoređujući ekspresiju ortolognih gena u tkivima domaćeg miša i ribe zebrice, *Dr p97a* je eksprimiraniji od *Mm p97*, a isto vrijedi i za *Dr SPRTN* u odnosu na *Mm SPRTN*.
- Tkivni poredak ekspresije gena u različitom spolu istog organizma uglavnom je vrlo sličan. Sličnost u tkivnom poretku ekspresije ortolognih gena u istom spolu miša i zebrice postoji, ali je manja nego u slučaju gena u različitom spolu istog organizma, dok za ortologne gene čovjeka i miša/zebrice nema poklapanja. Promatrajući različite gene (*p97* i *SPRTN*) u istom spolu miša/zebrice, ekspresijski poredak je vrlo sličan, dok kod čovjeka to nije slučaj.
- Rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja koja pokazuju da je za određene gene (među kojima su i *p97* te *SPRTN*) između različitih jedinki iste vrste moguće postojanje značajnih ekspresijskih razlika u nekim tkivima.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. J. H. J. Hoeijmakers, *N. Engl. J. Med.* **361** (2009) 1475–1485.
2. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **461** (2009) 1071–1078.
3. B. Vaz, M. Popović, K. Ramadan, *Trends Biochem. Sci.* **42** (2017) 483–495.
4. Laboratorij za molekularnu ekotoksikologiju, IRB,
<https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-istrazivanje-mora-i-okolisa/Laboratorij-za-molekularnu-ekotoksikologiju> (datum pristupa: 6. studenog 2020.)
5. E. C. Twomey, T. E. Wales, N. O. Bodnar, Z. Ji, S. B. Ficarro, J. A. Marto, J. R. Engen, T. A. Rapoport, *Science* **365** (2019) 462.
6. A. Mosbech, I. Gibbs-Seymour, K. Kagias, T. Thorslund, P. Beli, L. Povlsen, S. Vincents Nielsen, S. Smedegaard, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 1084–1092.
7. P. Y. Muller, H. Janovjak, A. R. Miserez, Z. Dobbie, *BioTechniques* **32** (2002) 1372–1379.
8. N. Chatterjee, G. Walker, *Environ. Mol. Mutagen.* **58** (2017) 1–29.
9. S. N. Khodyreva, R. Prasad, E. S. Ilina, M. V. Sukhanova, M. M. Kutuzov, Y. Liu, E. W. Hou, S. H. Wilson, O. I. Lavrik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 22090–22095.
10. M. Talpaert-Borle, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **181** (1987) 45–56.
11. T. Lindahl, *Nature* **362** (1993) 709–715.
12. B. Rydberg, T. Lindahl, *EMBO J.* **1** (1982) 211–216.
13. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izaković, M. Mazur, *Chem. Biol. Interact.* **160** (2006) 1–40.
14. M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, *FASEB J.* **17** (2003) 1195–1214.
15. K. W. Caldecott, *Nat. Rev. Genet.* **9** (2008) 619–631.
16. S. Maynard, E. F. Fang, M. Scheibye-Knudsen, D. L. Croteau, V. A. Bohr, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5** (2015) 1–18.
17. R. P. Sinha, D. P. Häder, *Photochem. Photobiol. Sci.* **1** (2002) 225–236.
18. S. E. Polo, S. P. Jackson, *Genes Dev.* **25** (2011) 409–433.
19. W. J. Cannan, D. S. Pederson, *J. Cell. Physiol.* **231** (2016) 3–14.
20. R. R. White, J. Vijg, *Mol. Cell* **63** (2016) 729–738.

21. The Nobel Prize in Chemistry 2015 – Advanced information, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2015/advanced-information/> (datum pristupa: 6. studenog 2020.)
22. B. Vaz, M. Popović, J. A. Newman, J. Fielden, *Mol. Cell* **64** (2016) 704–719.
23. J. Stingele, R. Bellelli, F. Alte, G. Hewitt, G. Sarek, *Mol. Cell* **64** (2016) 688–703.
24. J. Lopez-Mosqueda, K. Maddi, S. Prgomet, S. Kalayil, I. Marinović-Terzić, J. Terzić, I. Đikić, *Elife* **5** (2016) 1–19.
25. A. J. Deans, S. C. West, *Nat. Rev. Cancer* **11** (2011) 467–480.
26. P. A. Muniandy, J. Liu, A. Majumdar, S. T. Liu, M. M. Seidman, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45** (2010) 23–49.
27. B. Munoz, A. Albores, *DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms and Markers*, InTech, 2011, str. 126.
28. A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kacmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.* **73** (2004) 39–85.
29. J. Stingele, R. Bellelli, S. J. Boulton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** (2017) 563–573.
30. J. Fielden, A. Ruggiano, M. Popović, K. Ramadan, *DNA Repair (Amst)* **71** (2018) 198–204.
31. W. Yang, *Cell Res.* **18** (2008) 184–197.
32. D. Branzei, I. Psakhye, *Curr. Opin. Cell Biol.* **40** (2016) 137–144.
33. H. Ide, T. Nakano, M. I. Shoulkamy, A. M. H. Salem, *Formation, Repair and Biological Effects of DNA – Protein Cross-Link Damage, Advances in DNA Repair*, InTech, 2015, str. 44–46.
34. T. Nakano, X. Xu, A. M. H. Salem, M. I. Shoulkamy, H. Ide, *Free Radic. Biol. Med.* **107** (2017) 136–145.
35. N. Y. Tretyakova, A. Groehler, S. Ji, *Acc. Chem. Res.* **48** (2016) 1631–1644.
36. S. Barker, M. Weinfeld, D. Murray, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **589** (2005) 111–135.
37. M. Costa, A. Zhitkovich, M. Harris, D. Paustenbach, M. Gargas, *J. Toxicol. Environ. Health* **50** (1997) 433–449.
38. N. Y. Tretyakova, E. D. Michaelson-Richie, T. B. Gherezghiher, J. Kurtz, X. Ming, S. Wickramaratne, M. Champion, S. Kanugula, A. E. Pegg, C. Campbell, *Biochemistry* **52** (2013) 3171–3181.
39. J. Murai, S. Huang, B. Das, A. Renaud, Y. Zhang, J. H. Doroshov, J. Ji, S. Takeda, Y.

- Pommier, *Cancer Res.* **72** (2012) 5588–5599.
40. L. Hacker, A. Dorn, H. Puchta, *Elsevier B. V.* **87** (2020) 102787.
 41. L. Schermelleh, F. Spada, H. P. Easwaran, K. Zolghadr, J. B. Margot, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, *Nat. Methods* **2** (2005) 751–756.
 42. R. Prasad, J. K. Horton, P. D. Chastain, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 6337–6351.
 43. H. Ide, M. I. Shoulkamy, T. Nakano, M. Miyamoto-Matsubara, A. M. H. Salem, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **711** (2011) 113–122.
 44. H. Zhang, Y. Xiong, J. Chen, *Cell Biosci.* **10** (2020)
 45. J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.* **70** (2001) 369–413.
 46. Y. Pommier, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2894–2902.
 47. N. N. Hoa, T. Shimizu, Z. W. Zhou, Z. Q. Wang, *Mol. Cell* **64** (2016) 580–592.
 48. M. E. Ashour, R. Atteya, S. F. El-Khamisy, *Nat. Rev. Cancer* **15** (2015) 137–151.
 49. J. Stingele, S. Jentsch, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (2015) 455–460.
 50. J. J. Pouliot, K. C. Yao, C. A. Robertson, H. A. Nash, *Science* **286** (1999) 552–555.
 51. Y. Pommier, S. N. Huang, R. Gao, B. B. Das, J. Murai, C. Marchand, *DNA Repair (Amst)* **19** (2014) 114–129.
 52. H. Interthal, H. J. Chen, T. E. Kehl-Fie, J. Zotzmann, J. B. Leppard, J. J. Champoux, *EMBO J.* **24** (2005) 2224–2233.
 53. F. C. Ledesma, S. F. El-Khamisy, M. C. Zuma, K. Osborn, K. W. Caldecott, *Nature* **461** (2009) 674–678.
 54. F. Gomez-Herreros, J. H. M. Schuurs-Hoeijmakers, M. McCormack, M. T. Grealley, S. Rulten, R. Romero-Granados, E. Chaila, *Nat. Genet.* **46** (2014) 516–521.
 55. M. J. Schellenberg, J. A. Lieberman, A. Herrero-Ruiz, L. R. Butler, J. G. Williams, A. M. Munoz-Cabello, G. A. Mueller, R. E. London, F. Cortes-Ledesma, R. S. Williams, *Science* **357** (2017) 1412–1416.
 56. K. Takahashi, T. Morita, Y. Kawazoe, *Mutat. Res. Toxicol.* **156** (1985) 153–161.
 57. D. Lal, S. Som, S. Friedman, *Mutat. Res. DNA Repair Reports* **193** (1988) 229–236.
 58. C. Petit, A. Sancar, *Biochimie* **81** (1999) 15–25.
 59. B. de Graaf, A. Clore, A. K. McCullough, *DNA Repair (Amst)* **8** (2009) 1207–1214.
 60. T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi, M. Matsubara, Y. Horikawa, H. Terato, A. M. Salem, S. Izumi, S. P. Pack, K. Makino, *Mol. Cell* **28** (2007) 147–158.
 61. T. Nakano, A. Katafuchi, M. Matsubara, H. Terato, T. Tsuboi, T. Masuda, T.

- Tatsumoto, S. P. Pack, K. Makino, D. L. Croteau, B. Van Houten, K. Iijima, H. Tauchi, H. Ide, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 27065–27076.
62. N. N. Hoa, T. Shimizu, Z. W. Zhou, Z. Q. Wang, R. A. Deshpande, T. T. Paull, S. Akter, M. Tsuda, R. Furuta, K. Tsutsui, S. Takeda, H. Sasanuma, *Mol. Cell* **3** (2016) 580–592.
63. K. C. Lee, K. Padget, H. Curtis, I. G. Cowell, D. Moiani, Z. Sondka, N. J. Morris, G. H. Jackson, S. J. Cockell, J. A. Tainer, C. A. Austin, *Biol. Open* **1** (2012) 863–873.
64. A. Stepanov, K. Nitiss, J. L. Nitiss, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **64** (2004)
65. M. de Jager, M. L. G. Dronkert, M. Modesti, C. E. M. Beerens, R. Kanaar, D. C. van Gent, *Nucleic Acids Res.* **15** (2009) 1317–1325.
66. D. L. Woodwort, K. N. Kreuzer, *Genetics* **143** (1996) 1081–1090.
67. J. C. Connelly, E. S. de Leau, D. R. F. Leach, *DNA Repair (Amst)* **2** (2003) 795–807.
68. M. Malik, J. L. Nitiss, *Eukaryot. Cell* **3** (2004) 82–90.
69. T. Aparicio, R. Baer, M. Gottesman, J. Gautier, *J. Cell Biol.* **212** (2016) 399–408.
70. C. P. Lin, Y. Ban, Y. L. Lyu, S. D. Desai, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 21074–21083.
71. T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi, M. Matsubara, Y. Horikawa, H. Terato, A. M. H. Salem, S. Izumi, S. P. Pack, K. Makino, H. Ide, *Mol. Cell* **28** (2007) 147–158.
72. J. P. Duxin, J. M. Dewar, H. Yardimci, J. C. Walter, *Cell* **159** (2014) 346–357.
73. N. B. Larsen, A. O. Gao, J. L. Sparks, I. Gallina, R. A. Wu, N. Mann, M. Raschle, J. C. Walter, J. P. Duxin, *Mol. Cell* **73** (2019) 574–588.
74. J. R. Mullen, C. F. Chen, S. J. Brill, *Mol. Cell Biol.* **30** (2010) 3737–3748.
75. J. Stingele, M. S. Schwarz, N. Bloemeke, P. G. Wolf, S. Jentsch, *Cell* **158** (2014) 327–338.
76. M. Svoboda, J. Konvalinka, J. F. Trempe, K. Grantz Saskova, *DNA Repair (Amst)* **80** (2019) 45–51.
77. N. Serbyn, A. Noireterre, I. Bagdiul, M. Plank, A. H. Michel, R. Loewith, B. Kornmann, F. Stutz, *Mol. Cell* **77** (2020) 1066–1079.
78. J. Stingele, B. Habermann, S. Jentsch, *Trends Biochem. Sci.* **40** (2015) 67–71.
79. F. Li, J. E. Raczynska, Z. Chen, H. Yu, *Cell Reports* **26** (2019) 3336–3346.
80. S. Juhasz, D. Balogh, I. Hajdu, P. Burkovics, M. A. Villamil, Z. Zhuang, L. Haracska, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 10795–10808.
81. H. K. Reinking, K. Hofmann, J. Stingele, *DNA Repair (Amst)* **88** (2020) 102822.

82. D. Lessel, B. Vaz, S. Halder, P. J. Lockhart, I. Marinović-Terzić J. Lopez-Mosqueda, M. Philipp, K. Ramadan, I. Đikić, *Nat. Genet.* **46** (2014) 1239–1244.
83. R. S. Maskey, K. S. Flatten, C. J. Sieben, K. L. Peterson, D. J. Baker, H. J. Nam, M. S. Kim, T. C. Smyrk, Y. Kojima, Y. Machida, A. Santiago, J. M. Van Deursen, S. H. Kaufmann, Y. J. Machida, *Nucleic Acids Res.* **45** (2017) 4564–4576.
84. J. Huang, Q. Zhou, M. Gao, S. Nowsheen, F. Zhao, W. Kim, Q. Zhu, Y. Kojima, P. Yin, Y. Zhang, G. Guo, X. Tu, M. Deng, K. Luo, B. Qin, Y. Machida, Z. Lou, *Mol. Cell* **79** (2020) 1–12.
85. S. Halder, I. Torrecilla, M. D. Burkhalter, M. Popović, J. Fielden, B. Vaz, J. Oehler, D. Pilger, D. Lessel, K. Wiseman, A. Narayan Singh, I. Vendrell, R. Fischer, M. Philipp, K. Ramadan, *Nat. Commun.* **10** (2019) 3142.
86. N. Borgermann, L. Ackermann, P. Schwertman, I. A. Hendriks, K. Thijssen, J. C. Y. Liu, H. Lans, M. L. Nielsen, N. Mailand, *EMBO J.* **38** (2019) 1–17.
87. Mechanism of ATPase, News Medical, <https://www.news-medical.net/life-sciences/Mechanism-of-ATPase.aspx> (datum pristupa: 26. listopada 2020.)
88. N. O. Bodnar, T. A. Rapoport, *Cell* **169** (2017) 722–735.
89. S. Banerjee, A. Bartesaghi, A. Merk, P. Rao, S. L. Bulfer, Y. Yan, N. Green, B. Mroczkowski, R. J. Neitz, P. Wipf, V. Falconieri, R. J. Deshaies, J. L. S. Milne, D. Huryn, M. Arkin, S. Subramaniam, *Science* **351** (2016) 871–875.
90. Y. Ye, W. K. Tang, T. Zhang, D. Xia, *Front. Mol. Biosci.* **4** (2017) 1–20.
91. S. Nishikori, M. Esaki, K. Yamanaka, S. Sugimoto, T. Ogura, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 15815–15820.
92. Q. Wang, C. Song, C. C. H. Li, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **300** (2003) 253–260.
93. N. O. Bodnar, T. A. Rapoport, *F1000 Faculty Rev.* **6** (2017) 1–10.
94. A. Franz, L. Ackermann, T. Hoppe, *Front. Genet.* **7** (2016) 1–14.
95. L. T. M. Le, W. Kang, J. Y. Kim, O. T. T. Le, S. Y. Lee, J. K. Yang, *PLOS One* **11** (2016) 1–15.
96. K. Ramadan, S. Halder, K. Wiseman, B. Vaz, *Chromosoma* **126** (2016) 17–32.
97. A. Mosbech, I. Gibbs-Seymour, K. Kagias, T. Thorslund, P. Beli, L. Povlsen, S. Vincents Nielsen, S. Smedegaard, G. Sedgwick, C. Lukas, R. Hartmann-Petersen, J. Lukas, C. Choudhary, R. Pocock, S. Bekker-Jensen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 1084–1092.
98. Z. J. Khong, S. K. Lai, C. G. Koh, S. Geifman-Shochat, H. Y. Li, *Oncotarget* **11** (2020)

- 74–85.
99. M. Y. Balakirev, J. E. Mullally, A. Favier, N. Assard, E. Sulpice, D. F. Lindsey, A. V. Rulina, X. Gidrol, K. D. Wilkinson, *eLife* **4** (2015).
100. J. Fielden, K. Wiseman, I. Torrecilla, S. Li, S. Hume, S. C. Chiang, A. Ruggiano, A. Narayan Singh, R. Freire, S. Hassanieh, E. Domingo, I. Vendrell, R. Fischer, B. M. Kessler, T. S. Maughan, S. F. El-Khamisy, K. Ramadan, *Nat. Commun.* **11** (2020) 1–16.
101. pET-24(+) Vector, Novagen,
https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/strains_vectors/vectors/pdf/pET-24_map.pdf (datum pristupa: 15. rujna 2020.)
102. pET System Manual, Novagen,
<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf> (datum pristupa: 15. rujna 2020.)
103. pNIC-Zb, SnapGene, https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=structural_genomics_vectors&plasmid=pNIC-Zb
(datum pristupa: 15. rujna 2020.)
104. Rosetta (DE3), Novagen,
https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/RosettaDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70954 (datum pristupa: 15. rujna 2020.)
105. V. Dakić, *Od gena do proteina*, Praktikumski izvještaj, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 3, 4.
106. B. Božić, *Kinetička karakterizacija homologno nadeksprimiranih izoleucil-tRNA-sintetaza iz bakterije Bacillus megaterium*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020, str. 34, 38, 46–48.
107. D. S. Waugh, *Protein Expr. Purif.* **80** (2011) 283–293.
108. I. Sućec, *Prekomjerna ekspresija i biokemijska karakterizacija proteina dipeptidil-peptidaze III iz termofilne bakterije Caldithrix abyssi*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 20, 29.
109. D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, J. Wiley & Sons, New York, 2019, str. 85.
110. *RNeasy Mini Handbook* (Fourth Edition), Qiagen, 2006.
111. The Basics: RNase Control, Thermo Fisher Scientific,
<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/ambion-tech-support/nuclease-enzymes/general-articles/the-basics-rnase-control.html>

- (datum pristupa: 2. listopada 2020.)
112. K. Županić, *Kvaliteta molekule RNA izolirane iz uzoraka tkiva karcinoma mokraćnog mjehura uklopljenih u parafinske blokove*, Završni rad, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Sveučilište u Splitu, 2018, str. 10, 11.
 113. Reverse Transcriptase - an overview, ScienceDirect Topics,
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/reverse-transcriptase>
(datum pristupa: 4. listopada 2020.)
 114. National Center for Biotechnology Information,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (datum pristupa: 16. studenog 2020.)
 115. 4 Tips for Efficient Primer Design, Genome Compiler,
<http://www.genomecompiler.com/tips-for-efficient-primer-design/>
(datum pristupa: 16. studenog 2020.)
 116. NEB Tm Calculator, <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>
(datum pristupa: 16. studenog 2020.)
 117. A. Šimić, *Razlike izražaja gena u mokraćnom mjehuru miševa uzgajanih u sterilnom i standardnom okolišu*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 2019, str. 27–30.
 118. J. Baranašić, *Ekspresija gena za biljnu seril-tRNA-sintetazu u uvjetima stresa*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 9–14.
 119. M. Močibob, *Kem. Ind.* **66** (2017) 696–708.
 120. M. Hedhammar, S. Hober, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007) 22–28.
 121. Gene expression analysis, Integrated DNA Technologies,
<https://www.idtdna.com/pages/applications/gene-expression>
(datum pristupa: 10. listopada 2020.)
 122. M. Tan, J. W. Armbruster, *Zootaxa* **4476** (2018) 6–39.
 123. S. M. K. Glasauer, S. C. F. Neuhauss, *Mol. Genet. Genomics* **289** (2014) 1045–1060.
 124. J. Wittbrodt, A. Meyer, M. Scharl, *BioEssays* **20** (1998) 511–515.
 125. Paralogous Gene, SpringerLink,
https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-11274-4_1732
(datum pristupa: 14. listopada 2020.)
 126. A. Mikelić, *Analiza nadekspresorskih linija uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* L.) za auksin-amidohidrolazu *AtILL2**, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet,

- Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 43.
127. Housekeeping Gene - an overview, ScienceDirect Topics,
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/housekeeping-gene>
(datum pristupa: 8. prosinca 2020.)
128. B. W. Hounkpe, F. Chenou, F. Lima, E. V. de Paula, *Nucleic Acids Res.* (2020)
129. A. Ruiz-Villalba, A. Mattiotti, Q. D. Gunst, S. Cano-Ballesteros, M. J. van den Hoff, J. M. Ruijter, *Sci. Rep.* **7** (2017) 24.
130. N. Eissa, H. Hussein, H. Wang, M. F. Rabbi, C. N. Bernstein, J. E. Ghia, *PLOS One* **11** (2016) 1–23.
131. K. E. Kouadjo, Y. Nishida, J. F. Cadrin-Girard, M. Yoshioka, J. St-Amand, *BMC Genomics* **8** (2007) 127.
132. E. Alessio, R. Severino Bonadio, L. Buson, F. Chemello, S. Cagnin, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020)
133. The Human Protein Atlas,
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000010072-SPRTN/summary/rna>
(datum pristupa: 13. studenog 2020.)
134. The Human Protein Atlas,
<https://www.proteinatlas.org/ENSG000000165280-VCP/summary/rna>
(datum pristupa: 13. studenog 2020.)
135. M. Popović, R. Zaja, T. Smital, *Elsevier* **155** (2010) 327–335.
136. Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%, BioSistemika,
<https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>
(datum pristupa: 13. studenog 2020.)
137. Using Research Organisms to Study Health and Disease, NIH,
<https://www.nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/using-research-organisms.aspx>
(datum pristupa: 17. listopada 2020.)
138. Why use the mouse in research?, yourgenome.org,
<https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research>
(datum pristupa: 17. listopada 2020.)
139. R. J. Mural, M. D. Adams, E. W. Myers, H. O. Smith, G. L. Gabor Miklos, R. Wides, A. Halpern, P. W. Li, *Science* **296** (2002) 1661–1671.
140. K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, *Nature* **496** (2013)

- 498–503.
141. Why Use Zebrafish to Study Human Diseases?, NIH,
<https://irp.nih.gov/blog/post/2016/08/why-use-zebrafish-to-study-human-diseases>
(datum pristupa: 18. listopada 2020.)
142. Z. Matić, *Danio rerio*, (F. Hamilton, 1822) - modelni organizam razvojne biologije, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 9.
143. J. Lončar, M. Popović, P. Krznar, R. Zaja, T. Smital, *Sci. Rep.* **6** (2016) 28937.
144. M. L. McHugh, *Biochem. Med.* **18** (2007) 7–13.
145. Precision in qPCR, Thermo Fisher Scientific,
<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html>
(datum pristupa: 22. listopada 2020.)
146. C. C. Pritchard, L. Hsu, J. Delrow, P. S. Nelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2011) 13266–13271.
147. C. C. Pritchard, D. Coil, S. Hawley, L. Hsu, P. S. Nelson, *Genome Biol.* **7** (2006)
148. R. B. Brem, *Science* **296** (2002) 752–755.
149. W. Jin, R. M. Riley, R. D. Wolfinger, K. P. White, G. Passador-Gurgel, G. Gibson, *Nat. Gen.* **29** (2001) 389–495.
150. M. F. Oleksiak, G. A. Churchill, D. L. Crawford, *Nat. Gen.* **32** (2002) 261–266.
151. V. G. Cheung, L. K. Conlin, T. M. Weber, M. Arcaro, K.-Y. Jen, M. Morley, R. S. Spielman, *Nat. Genet.* **33** (2003) 422–425.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Valentin Dakić

Datum rođenja: 17. srpnja 1996.

Mjesto rođenja: Sisak, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Galdovo, Sisak

2011.–2015. Srednja škola Viktorovac, smjer: farmaceutski tehničar, Sisak

2015.–2018. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2018.–2020. Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Nagrade i priznanja

2017. STEM stipendija Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske

2018., 2019. Stipendija Grada Siska

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018., 2019. *Otvoreni dan kemije*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Ostalo

2018. *5. Simpozij studenata kemičara*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2019. *6. Simpozij studenata kemičara*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb