Utjecaj proteina Spartan na ekspresiju gena uključenih u popravak DNA

Ančić, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:268210

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Anja Ančić

Utjecaj proteina Spartan na ekspresiju gena uključenih u popravak DNA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka na Zavodu za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Marinović Terzić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj proteina Spartan na ekspresiju gena uključenih u popravak DNA

Anja Ančić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Popravak DNA oštećenja je nužan za održavanje stabilnosti genoma i visoke vjernosti replikacije genoma. Homologna rekombinacija, nehomologno sparivanje krajeva i popravak krivo sparenih baza su glavni mehanizmi popravka oštećenja DNA koji doprinose očuvanju genoma. Zbog stalne izloženosti ljudskog genoma štetnim tvarima iz okoliša i nusproduktima staničnog metabolizma, važno je pravilno djelovanje navedenih mehanizama. Ukoliko oštećenja ostanu nepopravljena mogu inducirati apoptozu, kromosomske aberacije, uzrokovati anomalije u razvoju, maligne bolesti i preuranjeno starenje (progeriju). Spartan je protein koji sudjeluje u održavanju stabilnosti genoma i pomoću metaloproteazne domene uklanja proteine kovalentno vezane za DNA, jednu od najčešćih tipova DNA lezija. Mutacije u genu *SPRTN* kod ljudi uzrokuju preuranjeno starenje i razvoj hepatocelularnog karcinoma u adolescentnoj dobi. Oštećenja u obliku kovalentno vezanih proteina na DNA se nakupljaju i u drugim vrstama stanica, ali specifično jetrene stanice razvijaju karcinom, što znači da ostale vrste stanica kompenziraju nedostatak proteina Spartan. U ovom radu istraživano je utječe li smanjenje količine ili poremećaj funkcije proteina Spartan na ekspresiju gena čiji proteini sudjeluju u različitim putevima popravka oštećenja DNA. Mjerenjem ekspresije gena lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu uočili smo da postoji ovisnost ekspresije gena uključenih u popravak DNA o funkciji i ekspresiji gena *SPRTN*.

(38 stranica, 11 slika, 10 tablica, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: lezije DNA, popravak DNA, genska ekspresija, siRNA, RT-PCR

Voditeljica: dr. sc. Ivana Marinović Terzić, izv. prof.

Suvoditeljica: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.
dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.
dr. sc. Ivana Šola, doc.

Zamjena: dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.

Rad prihvaćen: 06. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Influence of Spartan protein on DNA repair genes expression

Anja Ančić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

DNA repair is crucial for maintaining genome stability and high fidelity replication. Homologous recombination, non-homologous end joining and mismatch repair are the main repair mechanisms of DNA damage that contribute to the maintenance of the genome. Due to constant exposure of human genome to harmful agents from the environment and byproducts of cell metabolism, the proper functioning of these mechanisms is important. If the damage remains unrepaired, it can induce apoptosis, chromosomal aberrations, developmental anomalies, malignancy and premature aging. Spartan is protein involved in maintaining the genome stability and with metalloprotease domain removes crosslinked proteins from DNA, one of the most common types of DNA lesions. Mutations in the *SPRTN* gene in humans cause premature aging and hepatocellular carcinoma. Crosslinked proteins also accumulate on DNA in other cell types, but specifically liver cells develop cancer, which suggests that other types of cells compensate for the lack of Spartan protein. This paper investigated effects of the amount reduction or function disorder of the Spartan protein on the expression of genes whose proteins participate in various repair pathways of DNA damage. Measuring the expression of genes with quantitative realtime polymerase chain reaction, we have observed that correlation between expression of genes involved in DNA repair and *SPRTN* exist.

(38 pages, 11 figures, 10 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: DNA lesions, DNA repair, gene expression, siRNA, RT-PCR

Supervisor: Dr. Ivana Marinović Terzić, Assoc. Prof.

Co-supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.
Dr. Ivana Šola, Asst. Prof.
Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.

Substitution: Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.

Thesis accepted: July 06, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Mehanizmi popravka 1
1.1.1. Popravak krivo sparenih baza 2
1.1.2. Homologna rekombinacija 3
1.1.3. Nehomologno sparivanje krajeva 4
1.2. Lezije DNA 5
1.3. Spartan 7
1.4. Sindrom Ruijs-Aalfs 7
1.5. Ciljevi istraživanja 10
2. MATERIJALI I METODE 11
2.1. MATERIJALI 11
2.1.1. Početnice 11
2.1.2. Plazmidi 12
2.1.3. siRNA 12
2.1.4. Instrumenti 12
2.2 METODE 14
2.2.1. Kultura stanica 14
2.2.2. Privremeno utišavanje genske ekspresije pomoću siRNA 14
2.2.3. Transfekcija stanica plazmidnom DNA 15
2.2.4. Tretman stanica za izazivanje oštećenja DNA 15
2.2.5. Izolacija RNA 16
2.2.6. Reverzna transkripcija 17
2.2.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (od eng. quantitative realtime polymerase chain reaction, qPCR) 18
2.2.8. Agarozna gel elektroforeza 20
2.2.9. Izolacija proteina 21
2.2.10. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE) 21
2.2.11. Prijenos proteina na membranu (Western blot) 22
2.2.12. Statistički postupci 23

3. REZULTATI 24
3.1. Provjera početnica 24
3.2. Agarozna gel elektroforeza DNA 25
3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) 26
3.3. *Western blot* analiza 29
4. RASPRAVA 31
5. ZAKLJUČAK 35
6. LITERATURA 36

1. UVOD

1.1. Mehanizmi popravka

Ljudski genom je neprekidno izložen utjecaju različitih štetnih tvari nastalih u stanici i izvan stanice. Takva izloženost rezultira svakodnevnim stvaranjem desetaka tisuća lezija DNA u organizmu, među kojima su najštetniji dvolančani lomovi DNA, DSB (od eng. *double strand breaks*). Nastanak DSB može biti posredovan endogenim izvorima poput izloženosti reaktivnim spojevima kisika nastalim staničnim metabolizmom i pogreškama u replikaciji te egzogenim izvorima koji uključuju ionizirajuće zračenje i kemoterapeutike. DSB također nastaju tijekom rekombinacije V(D)J za vrijeme razvoja limfocita T i B. Nepopravljeni ili krivo popravljeni DSB mogu rezultirati starenjem, induciranom apoptozom ili kromosomskim aberacijama koje uključuju translokacije i delecije što može dovesti do gubitka heterozigotnosti. Takve kromosomske aberacije su povezane s nestabilnošću genoma i mogu dovesti do karcinogeneze, stoga je od velike važnosti za stanicu da posjeduje mehanizme za brz popravak dvolančanih lomova (Davis & Chen, 2013).

Popravak DNA se najčešće kategorizira u 4 različita tipa: popravak izrezivanjem baze (od eng. *base excision repair*, BER), popravak izrezivanjem nukleotida (od eng. *nucleotide excision repair*, NER), popravak krivo sparenih baza (od eng. *mismatch repair*, MMR) i popravak dvolančanih lomova (od eng. *double strand break repair*, DSBR). BER, NER i MMR dijele sličan mehanizam popravka koji uključuje prepoznavanje lezije jednog lanca molekule DNA i izrezivanje. Lezije mogu biti označene kovalentnim modificiranjem baza, što prepoznaju BER i NER ili nemodificirane krivo sparene baze, koje prepoznaje MMR. Nakon izrezivanja, ova tri mehanizma popravka zahtijevaju ponovnu sintezu DNA koja će nadoknaditi uklonjene nukleotide te ligaciju kako bi se zalijepila novosintetizirana, umetnuta molekula DNA. DSBR se postiže homolognom rekombinacijom ili nehomolognim sparivanjem krajeva (Yang, 2008) te translezijskim popravkom DNA. Nehomologna rekombinacija je aktivna kroz sve faze staničnog ciklusa, dok je homologna rekombinacija aktivna samo kada je stanica u kasnoj S i G2 fazi staničnog ciklusa, odnosno kada je homologna sekvenca sestrinske kromatide dostupna (Takahashi i sur., 2016). Ukoliko se ne popravi, dvolančani lom DNA može dovesti do delecija i gubitka genomskog materijala, što može uzrokovati zastoj staničnog ciklusa, indukciju apoptoze, karcinogenezu i staničnu smrt u mitozi. Popravak dvolančanog loma može dovesti do translokacija, inverzija ili stvaranja pogrešaka (mutacija) u DNA kodu, što može uzrokovati poremećaje staničnih funkcija i karcinogenezu (Rothkamm i sur., 2003). Mutacije u

genima za ključne enzime popravka DNA u germinativnoj liniji uzrokuju prijevremeno starenje i predispoziciju za razvoj malignih tumora (Stingele i sur., 2016).

Osim spomenutih načina popravaka DNA opisani su i popravci translezijskom sintezom (TLS) te popravak uklanjanja kovalentno povezanih proteina sa DNA. Translezijska sinteza uključuje polimeraze niske vjernosti koje će nastaviti replikaciju DNA preko oštećenja DNA i najčešće dovesti do stvaranja pogreška. Iako je mehanizam TLS važan za preživljavanje stanice s oštećenom DNA, on mora biti precizno reguliran jer je potencijalno mutagen. Spartan se veže na mjesta oštećenja DNA preko ubikvitinirane PCNA (od eng. *proliferating cell nuclear antigen*) i važan je u sprječavanju mutacija povezanih s mehanizmom TLS (Kim i sur., 2013).

1.1.1. Popravak krivo sparenih baza

Krivo sparene baze DNA popravljaju se putem popravka krivo sparenih baza (od eng. *mismatch repair*, MMR). MMR prepoznaje pogreške u sparivanjima DNA baza nastale normalnim unutarstaničnim metabolizmom (npr. oksidativni stres) i fizikalnim i kemijskim oštećenjima iz vanjskog okoliša (Kunkel & Erie, 2005). Popravak krivo sparenih baza osigurava vjernu replikaciju DNA, aktivira stanični odgovor na određena oštećenja DNA i uključen je u razvoj imunološke raznolikosti (Warren i sur., 2007).

MMR je u sprezi s replikacijom i sastoji se od četiri glavna koraka: detekcija krivo sparene baze, identifikacija novosintetiziranog lanca s krivo ugrađenim nukleotidom, endo- i egzonukleolitičko uklanjanje dijela novosintetiziranog lanca i sinteza i ligacija ispravne sekvence DNA (Tham i sur., 2016).

Popravak započinje vezanjem kompleksa MSH2-MSH6 ili MSH2-MSH3 na krivo sparenu bazu (Kunkel & Erie, 2005). Kompleks MSH2-MSH6 pretežno prepoznaje pogrešno sparene baze i pogreške nastale insercijom ili delecijom nukleotida kod kojih jedan lanac sadrži 1 ili 2 nesparena nukleotida. MSH2-MSH3 kompleks prepoznaje pogreške nastale insercijom ili delecijom od 2 do 10 nukleotida i uglavnom ne prepoznaje po 1 krivo sparenu bazu (Modrich, 2006). Kompleks MLH1-PMS2 se veže na kompleks MSH2-MSH6 ili MSH2-MSH3 i koordinira događaje od prepoznavanja krivo sparene baze do popravka DNA (Kunkel & Erie, 2005).

MMR je također uključen u procesiranje O^6-metilgvanina (O^6-meGua) i 6-metiltiogvanina (me6-TG), DNA adukata nastalih zbog metilacijskih tvari i tiopurina. Parove

baza s O^6-meGua ili me6-TG prepoznaje kompleks MSH2-MSH6. Ovakve lezije se ne popravljaju, nego uzrokuju staničnu smrt (Blasi i sur., 2006).

Posljedice inaktivacije proteina uključenih u MMR su: povećana stopa točkastih mutacija, inicijacija i promoviranje karcinogeneze i nestabilnost mikrosatelita. Nestabilni mikrosateliti se koriste kao biomarker za gubitak aktivnosti proteina uključenih u MMR u tumorskim stanicama (Kunkel & Erie, 2005).

Stanice s poremećenim MMR putem su jako otporne na metilacijske agense i kod njih je teško izazvati smrt pomoću metilacijskih agensa. Ovaj fenotip otpornosti na metilaciju otkriven je u stanicama bez MSH2, MLH1, MSH6 ili PMS2 (Blasi i sur., 2006). Inaktivacija MMR-a dovodi do replikacijskih i rekombinacijskih pogrešaka. Kod ljudi, mutacije u dva gena MMR, *MSH2* i *MLH1* uzrokuju nastajanje nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma. Greške u putu MMR su pronađene u 15-25% sporadničnih tumora u raznim tkivima (Elliott & Jasin, 2001; Warren i sur., 2007).

1.1.2. Homologna rekombinacija

Homologna rekombinacija (HR) je proces prisutan u svim oblicima života koji omogućava popravak visoke točnosti ovisan o kalupu DNA (Li & Heyer, 2008). HR koristi visoku razinu homologije između sestrinskih kromatida, pomoću koje vjerno obnavlja sekvencu DNA na mjestu loma (Rothkamm i sur., 2003). Uz očuvanje stabilnosti genoma, HR ima važnu ulogu i u replikaciji genoma.

Istaknutu ulogu u HR i održavanju stabilnosti genoma imaju tumor-supresorski proteini BRCA1 i BRCA2 (Li & Heyer, 2008). Mutacije u zametnoj lozi u genima *BRCA1* i *BRCA2* uzrokuju razvoj nasljednog tipa raka dojke i ovarija. U stanicama pacijenata oboljelih od nasljednog tipa raka dojke s mutacijama u genima *BRCA1* ili *BRCA2* uočeno je nakupljanje genskih aberacija zbog čega se smatra da navedeni geni imaju važnu ulogu u očuvanju stabilnosti genoma. Takve stanice su preosjetljive na tvari štetne za DNA i pokazuju genomsku nestabilnost. BRCA1 potiče preživljavanje stanica kao odgovor na genotoksični stres. BRCA1 ima ulogu i u kontroli staničnog ciklusa, signalizaciji oštećenja i popravku DNA. BRCA2 ima ključnu ulogu u inicijaciji popravka DNA (Sy i sur., 2009). BRCA1 i BRCA2 kolokaliziraju s Rad51 *in vivo*. Homozigotni gubitak *BRCA1* ili *BRCA2* je letalan u ranom razvoju embrija, a stanice bez *BRCA1* i *BRCA2* razvijaju spontane kromosomske aberacije (Khanna & Jackson, 2001).

Protein koji je također povezan s HR kod sisavaca je ATM serin/treonin kinaza kontrolne točke. ATM je uključen u aktivaciju rekombinacijskog puta popravka. U stanicama bez ATM-a, nema mejotske rekombinacije koja se odvija putem HR. Uz pomoć MRE11, RAD50 i NBS1, ATM fosforilira histon H2AX i time signalizira lokaciju DSB proteinima uključenim u aktiviranje HR. Isto tako aktivira c-Abl tirozin kinazu koja modulira aktivnost Rad51 u odgovoru na oštećenje DNA. Postoji mogućnost da ATM omogućava HR mijenjanjem strukture kromatina jer može utjecati na proteine koji mijenjaju acetilacijsko stanje histona ili remodeliraju kromatin drugim mehanizmima (Khanna & Jackson, 2001). Mutacije u genu ATM kod ljudi uzrokuj Teleangiektatičnu ataksiju, progresivnu neurodegenerativnu bolest karakteriziranu poremećenom koordinacijom, teleangijektazijama u koži i oku te razvojem karcinoma (McKinnon, 2004).

1.1.3. Nehomologno sparivanje krajeva

Nehomologno sparivanje krajeva (od eng. *non-homologous end joining*, NHEJ) je način popravka dvolančanih lomova DNA koji ima potencijal za religaciju bilo kakve vrste DNA završetaka i ne zahtijeva homolognu sekvencu kao kalup za popravak lezije DNA, te stoga NHEJ nije ograničen na određenu fazu staničnog ciklusa (Davis & Chen, 2013). U NHEJ sudjeluju heterodimer Ku70-Ku80 (XRCC5-XRCC6), XRCC4, DNA Ligaza 4 te DNA-ovisna protein kinaza DNA-PK_{CS} (od eng. *DNA-dependent protein kinase*) (Rothkamm i sur., 2003).

Opći mehanizam djelovanja NHEJ puta sastoji se od sljedećih koraka: (I) prepoznavanje kraja DNA, sastavljanje i stabilizacija kompleksa NHEJ na dvolančanom lomu DNA; (II) premošćivanje i stabilizacija krajeva DNA; (III) procesiranje krajeva DNA; (IV) ligacija krajeva i uklanjanje kompleksa NHEJ (Davis & Chen, 2013).

Kompleks Ku70-Ku80/DNA-PK_{CS} se aktivira prepoznavanjem DSB. Pretpostavlja se da kompleks ima primarnu ulogu u prepoznavanju DSB, slaganju i aktivaciji ostalih komponenti NHEJ. Inaktivacija Ku70 ili Ku80 u mišjim modelima dovodi do retardacije rasta, preosjetljivosti na ionizirajuće zračenje i teške kombinirane imunodeficijencije zbog narušene V(D)J rekombinacije (Khanna & Jackson, 2001).

NHEJ ima važnu ulogu i u somatskoj rekombinaciji kod namjerno uvedenih lomova DNA tijekom V(D)J rekombinacije (Dai i sur., 2003). Rekombinaza VDJ je enzim specifičan za limfocitne stanice koji posreduje u V(D)J rekombinaciji i sastoji se od proteina RAG1 i RAG2 (od eng. *the recombination-activating gene*) (Abbas i sur., 2012). RAG1 i RAG2 proteini

uvode DSB između sekvence signala za rekombinaciju i segmenta koji kodira za receptor antigena (Dai i sur., 2003). Za ponovno spajanje krajeva DNA potrebni su proteini iz NHEJ puta, točnije ligaza pomoću koje nastaje rekombinirani ekson V(D)J (Abbas i sur., 2012).

1.2. Lezije DNA

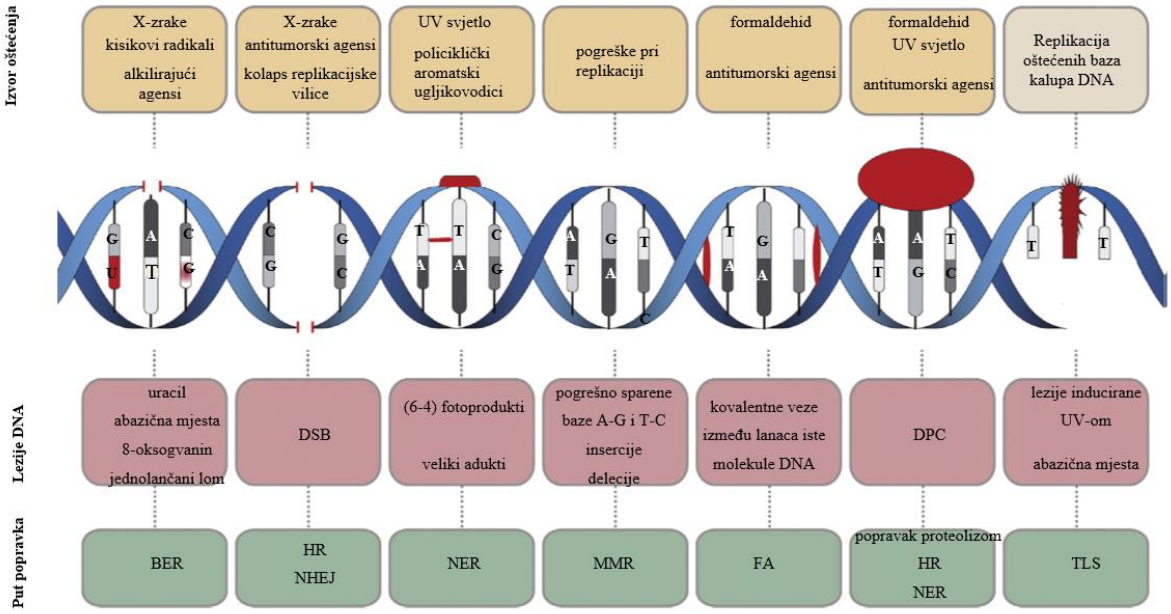
Lezije DNA su jako raznolike i uključuju fotoprodukte inducirane UV-om, inter- i intra-lančane kovalentne veze, abazična mjesta, oksidativna oštećenja, velike kemijske lezije, jednolančane i dvolančane lomove (Jackson & Bartek, 2010). Takve lezije se popravljaju specifičnim i dobro razjašnjenim mehanizmima (slika 1). No, za određeni tip lezije - kovalentno vezan protein na molekulu DNA (od eng. *DNA-protein crosslinks*, DPC), specifičan mehanizam popravka ostaje nerazjašnjen unatoč tome što su navedene lezije izrazito toksične jer blokiraju replikaciju i transkripciju (Stingele i sur., 2016).

Kovalentne veze DNA i proteina nastaju kovalentnim vezanjem proteina na dušičnu bazu, šećer ili prekinutu fosfodiestersku vezu u okosnici DNA (Vaz i sur., 2016). DPC mogu nastati pod utjecajem egzogenih agensa, poput ionizirajućeg zračenja, UV svjetla, određenih metalnih iona i kemoterapeutika na bazi platine. DPC mogu nastati i zbog endogenih reaktivnih metabolita poput formaldehida i acetaldehida. Formaldehid nastaje unutar kromatina kao nusprodukt demetilacije histona. Nadalje, abazična mjesta posjeduju aldehidnu skupinu koja reagira s proteinima nukleosoma, formirajući DPC. DCP također nastaju enzimatski, zadržavanjem inače prijelaznih kovalentno vezanih reakcijskih međuprodukata enzima poput topoizomeraze 1 i 2 (TOP1 i TOP2) (Stingele i sur., 2016). Bilo koji protein u blizini DNA može formirati DPC u prisutnosti komponente koja uzrokuje stvaranje križnih veza poput formaldehida (Vaz i sur., 2016).

Od dvije navedene grupe DPC: neenzimatski DPC (tip 1) – koji uključuje bilo koji protein koji se nalazi u blizini DNA u trenutku izlaganja endogenim ili egzogenim tvarima koje potiču stvaranje DPC i specifični enzimatski DPC (tip 2) – kojeg mogu činiti kompleksi topoizomeraze 1 i 2, DNA polimeraza β i poli(ADP-riboza) polimeraza 1 (PARP1). Pod fiziološkim uvjetima najčešći DPC su tip 1 i uvijek uključuju neprekinute lance DNA. DPC koji pripadaju tipu 2 čine proteini kovalentno vezani na mjesto loma okosnice DNA. TOP1 se veže na 3´ kraj jednolančanog loma DNA, TOP2 na 5´ kraj dvolančanog loma DNA, a PARP1 na 3` kraj jednolančanog loma DNA koji je nastao zbog pogreške u popravku DNA (Vaz i sur., 2017).

DPC su jako složene lezije. Složenost je rezultat postojanja različitih načina stvaranja kovalentnih veza, u smislu veličine i fizikalno-kemijskih svojstava proteina, tipa kovalentne veze (vezan na jedan ili oba lanca DNA) i broja kovalentnih veza (utječe na stabilnost i strukturu DPC). Analizom spektra masa DPC identificirani su brojni proteini koji se vežu na DNA uključujući histone, transkripcijske faktore, proteine koji sudjeluju u replikaciji i popravku DNA, kao i oni proteini koji se inače ne vežu na DNA (Vaz i sur., 2017).

Ako se ne poprave, DNA lezije uzrokuju nestabilnost genoma i staničnu smrti (Vaz i sur., 2016). Polimeraze visoke stope vjernosti ne mogu u aktivno mjesto smjestiti oštećene baze, stoga nepopravljene lezije DNA mogu biti uzrok zaustavljanja replikacijskih vilica, dvolančanih lomova i stanične smrti (Maskey i sur., 2014). Malo se zna o tome kako stanice uklanjaju DPC i popravljaju lezije nastale zbog DPC-a (Vaz i sur., 2016).

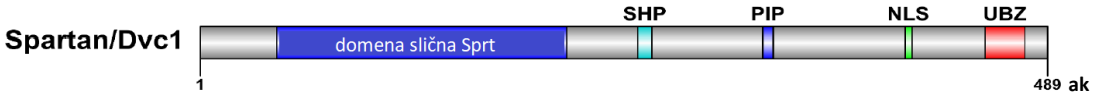


Slika 1. Shematski prikaz različitih lezija DNA i odgovarajućih puteva popravka DNA. BER, popravak izrezivanjem baze; DSB, dvolančani lom; HR, homologna rekombinacija; NHEJ, nehomologno spairivanje krajeva; NER, popravak izrezivanjem nukleotida; MMR, popravak krivo sparenih baza; FA, Fanconijeva anemija; DPC, kovalentne veze između DNA i proteina; TLS, translezijska sinteza (preuzeto i prilagođeno prema: Vaz i sur., 2017).

1.3. Spartan

Nedavno je u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* otkriven mehanizam popravka DPC-a putem metaloproteaze Wss1. U viših eukariota SPRTN (također poznat kao *C1orf124* i DVC1) pokazuje sličnu organizaciju domena i zajedničko evolucijsko podrijetlo s Wss1 (Stingele i sur., 2014). SPRTN je DNA ovisna proteaza koja štiti proliferirajuće stanice sisavaca od toksičnosti DPC-a. On se udružuje s replikacijskim kompleksom i uklanja nastale DPC tijekom sinteze DNA (Vaz i sur., 2016). SPRTN sadrži nekoliko domena; metaloproteaznu domenu sličnu SprT (*SprT-like domain*), SHP i regiju PIP (*PIP box*) i ubikvitin vezujuću domenu s motivom cinkovih prstiju (*ubiquitin binding zinc finger domain*, UBZ) (slika 2). Vezanje proteina SPRTN na PCNA preko regije PIP i ubikvitina preko domene UBZ je ključno za dovođenje SPRTN na oštećenja DNA inducirana UV zračenjem (Lopez-Mosqueda i sur., 2016). C-terminalne domene Spartana imaju ulogu u translezijskoj sintezi DNA, a domena SprT koja se nalazi na N-terminalnom kraju je važna za metaloproteaznu aktivnost (Vaz i sur., 2016).

SPRTN je važan protein u razvoju, miševi bez gena *SPRTN* umiru vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja. Stanice koje ne eksprimiraju SPRTN su osjetljive na formaldehid jer on inducira stvaranje DPC-a (Lopez-Mosqueda i sur., 2016).



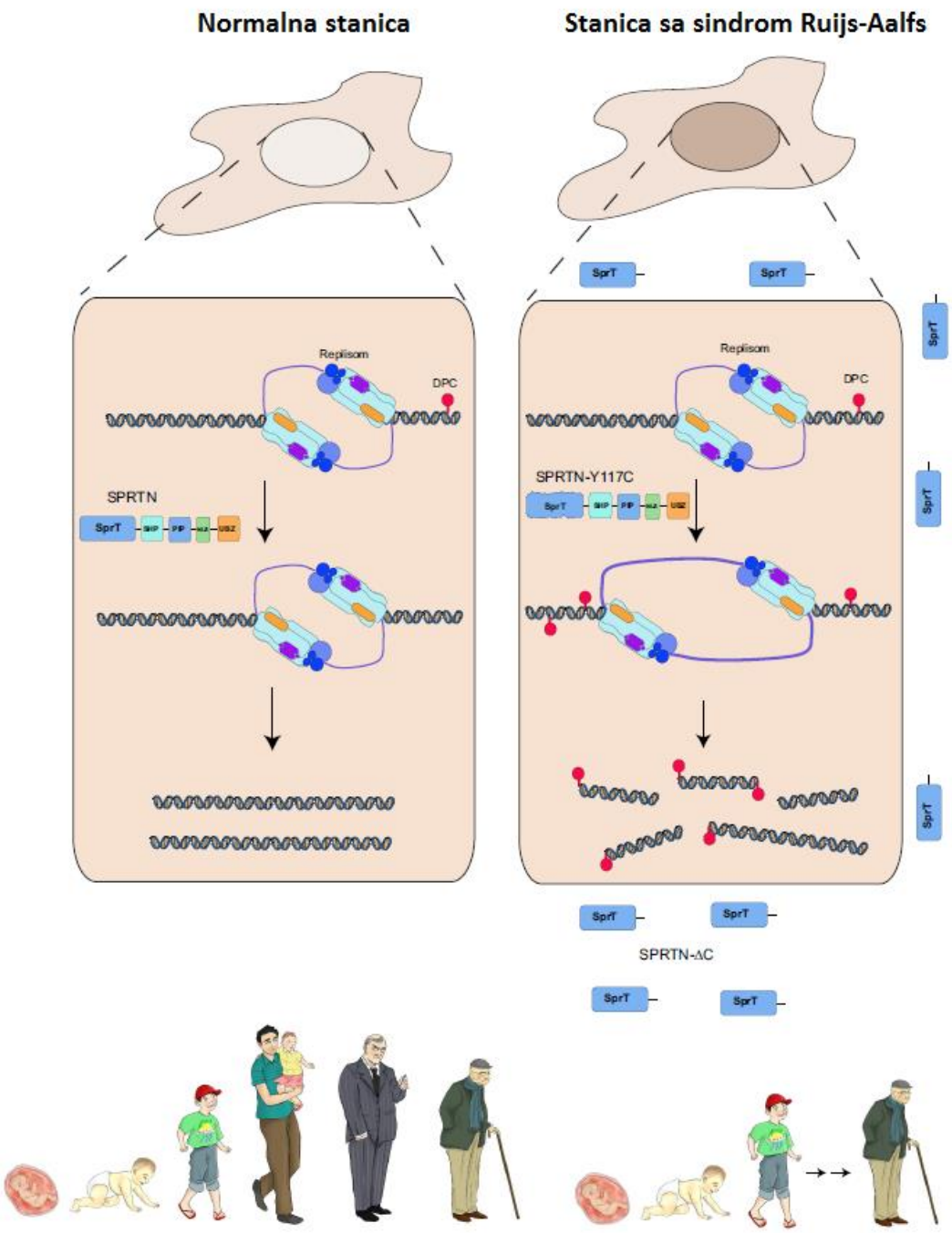
Slika 2. Organizacija domena proteina Spartan. SHP, vezno mjesto za p97 segregazu; PIP vezno mjesto za PCNA; NLS, jezgrin lokalizacijski signal; UBZ, ubikvitin vezujuća domena s motivom cinkovih prstiju (preuzeto i prilagođeno prema: Lopez-Mosqueda i sur., 2016).

1.4. Sindrom Ruijs-Aalfs

Sindrom Ruijs-Aalfs (od eng. *Ruijs-Aalfs syndrome*, RJALS) je segmentalni progeroidni sindrom kojeg uzrokuju mutacije u genu *SPRTN* (Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Segmentalni progeroidni sindromi su rijetke monogenske bolesti koje uzrokuju fiziološke simptome preuranjenog starenja. Stanice pacijenata sa segmentalnim progeroidnim sindromom pokazuju genomsku nestabilnost i povećani rizik nastanka različitih tumora (Hiom, 2014). U

zametnoj liniji kod tri pacijenta iz dvije nepovezane obitelji s dijagnosticiranim sindromom Ruijs-Aalfs identificirane su mutacije u genu *SPRTN*. Kod jednog je pronađena homozigotna točkasta mutacija koja rezultira preuranjenim stop kodonom i gubitkom polovice proteina SPRTN na karboksi-kraju (SPRTN-ΔC). Druga dva pacijenta su naslijedili bialelne mutacije takve da je mutacija na jednom alelu točkasta mutacija slična kao kod SPRTN-ΔC, a na drugom alelu mutacija uzrokuje supstituciju tirozina cisteinom na poziciji 117 (SPRTN-Y117C), koji je lokaliziran u metaloproteaznoj domeni SprT. SPRTN-ΔC nema ključni jezgrin lokalizacijski signal na karboksi-kraju zbog čega ne može ući u jezgru, a ni ubikvitin vezujuću domenu koja se nalazi na karboksi-kraju. Ovakvi mutantni proteini pokazuju djelomični gubitak proteolitičke aktivnost. Unatoč navedenim nedostacima, SPRTN-ΔC zadržava dovoljno proteolitičke aktivnosti da održi život. Vjerojatno je da SPRTN-ΔC ulazi u jezgru tijekom profaze, kada dolazi do raspada jezgrine ovojnice (Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Mutanta SPRTN-Y117C nije u stanju kompenzirati nedostatak funkcije SPRTN-ΔC mutante, čime ukazuje na veliku važnost funkcije domene SprT lokalizirane na aminoterminalnom kraju proteina.

Pojedinci s ovim mutacijama pokazuju značajke ubrzanog starenja, a u ranoj adolescentnoj dobi razvijaju hepatocelularni karcinom (Lopez-Mosqueda i sur., 2016). Stanice pacijenata s RJALS pokazuju povećan replikacijski stres DNA, usporenu replikaciju i povećan broj zaustavljenih replikacijskih vilica i dvostrukih lomova DNA (slika 3) (Vaz i sur., 2016).



Slika 3. Model uklanjanja DPC-a pomoću proteina SPRTN. U odsutnosti proteina SPRTN, kao u pacijenata s RJALS, DPC-ovi se ne uklanjaju i ometaju replikaciju i transkripciju DNA. DPC dovode do nestabilnosti genoma, tumorigeneze i pridonose ubrzanom starenju (preuzeto i prilagođeno prema: Lopez-Mosqueda i sur., 2016).

1.5. Ciljevi istraživanja

Spartan je prva opisana metaloproteaza sisavaca s potvrđenom ulogom u uklanjanju kovalentno povezanih kompleksa proteina na DNA. Bialelne mutacije u genu *SPRTN* uzrok su nastanka ubrzanog starenja (progerije) i razvoja hepatocelularnog karcinoma u adolescentnoj dobi. Iako se povećan broj dvolančanih lomova DNA i poremećaji u DNA replikaciji mogu opaziti u različitim stanicama pacijenata s bialelnom mutacijom u genu *SPRTN*, upravo jetrene stanice razvijaju karcinom, pa se postavlja pitanje na koji način ostale stanice organizma kompenziraju nedostatak funkcije proteina Spartan.

Protein Spartan je u stanicama izražen u relativno maloj količini, koja je dostatna (optimalna) za obnašanje funkcija tog proteina. Naša je hipoteza da smanjenje količine ili poremećaj funkcije proteina Spartan izaziva porast ekspresije drugih gena povezanih s različitim oblicima popravka DNA, te na taj način djelomičnu kompenzaciju ili pokušaj kompenzacije nedostatka funkcije proteina Spartan. Pretpostavljamo da bi upravo ovakav kompenzacijski porast ekspresije drugih gena povezanih s popravkom DNA mogao biti dostatan za sprječavanje karcinogeneze „ne-jetrenih“ stanica.

Cilj ovog rada je istražiti postoje li promjene u ekspresiji gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u popravku različitih vrsta oštećenja DNA, u ovisnosti o količini izraženog proteina Spartan u stanici, u uvjetima s i bez oštećenja DNA.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

U tablicama 1, 2 i 3 prikazane su početnice, plazmidi i siRNA korišteni u ovom istraživanju.

2.1.1. Početnice

Početnice korištene u ovom istraživanju dizajnirane su pomoću alata za izradu početnica *Realtime PCR Tool* dostupnog na Internetu (Tablica 1). Alat se nalazi na stranicama tvrtke *Integrated DNA Technologies* (https://eu.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/).

Tablica 1. Prikaz svih početnica korištenih u ovom istraživanju.

Ime gena	**Naziv početnice**	**Početnica**
Spartan	hSPRTN-F	5'CGA TCA TGC CCA GGA GTC3'
	hSPRTN-R	5'AAC ACA TTC CAC CCT TCC C3'
RPS23	hRPS23-F	5'TGG AGG TGC TTC TCA TGC AA3'
	hRPS23-R	5'AAT GGC AGA ATT TGG CTG TTT G3'
ATM	hATM-RT-F	5'AAT TCT AGT GCC AGT CAG AGC3'
	hATM-RT-R	5'GGA ATC AGG GCT TTT GGA AAG3'
Ku80	hXRCC6-RT-F	5'TCC TTA TTT TGT GGC TTT GGT G3'
	hXRCC6-RT-R	5'ACG ATA GCC TTC ATC TTG CC3'
Ku70	hXRCC5-RT-R	5'TGG AAG TGT GAA TCC TGC TG3'
	hXRCC5-RT-R	5'TCC AAA AAC TGT TCG ATG TGA3'
MLH1	hMLH1-RT-F	5'AAC CCC AGA AAG AGA CAT CG3'
	hMLH1-RT-R	5'ACG AAG GAG TGG TTA TGC3'
MSH6	hMSH6-RT-F	5'CGG AGG GAT GTA TCA TTG AAG G3'
	hMSH6-RT-R	5'AAT TAC TGG GCG ACA CAT AGG3'
BRCA1	hBRCA1-RT-F	5'ATC TGG GTG TGA GAG TGA AAC3'
	hBRCA1-RT-R	5'GAA GGG TAG CTG TTA GAA GGC3'
BRCA2	hBRCA2-RT-F	5'TTCATGGAGCAGAACTGGTG3'
	hBRCA2-RT-R	5'AGGAAAAGGTCTAGGGTCAGG3'
MSH2	hMSH2-RT-F	5'AAAGGGAGAGCAGATGAATAGTG3'
	hMSH2-RT-R	5'TGATTACCGCAGACAGTGATG3'
TOP1	hTOP1-RT-F	5'GACCACCTCCACAACGATTC3'
	hTOP1-RT-R	5'TTCTTGTGTTCTTTGTGCCG3'

2.1.2. Plazmidi

Tablica 2. Plazmidi korišteni u ovom istraživanju.

Plazmid	**Opis**
pcDNA 3.1 + *empty*	Prazan vektor
pcDNA 3.1 + *SPRTN*-wt	Plazmid s divljim tipom gena SPRTN (*SPRTN*-wt)
pcDNA 3.1 + SPRTNΔMPD	Plazmid s genom *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni (SPRTNΔMPD)

Plazmid korišten za kloniranje gena *SPRTN* je pcDNA3.1+ (*Invitrogen*), veličine 5,4 kbp koji se eksprimira u stanicama sisavaca preko promotora pCMV. Korištena sekvenca za kloniranje gena SPRTN-wt predstavlja najdulju transkripcijsku varijantu ("a") preuzetu iz NCBI baze podataka *Nucleotide* pod pristupnim brojem NM_032018.6 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_032018.6). Mutacija u metaloproteaznoj domeni gena (SPRTNΔMPD) koja je korištena u radu je delecijska mutacija del322-352 s posljedičnim gubitkom aminokiselina od 108 do 118 u proteinu Spartan (Δ108-118).

2.1.3. siRNA

Tablica 3. siRNA korištena u ovom istraživanju.

Ime siRNA	**Slijed nukleotida**	**Tm (°C)**	**Proizvođač**
siRNA Spartan	5'GUCAGGAAGUUCUGGU3'	54,0	*Eurofins Genomics*

2.1.4. Instrumenti

- Centrifuga – Thermo Scientific Heraeus Fresco 17
- Svjetlosni mikroskop – Olympus CKX41
- Uređaj za mjerenje koncentracije RNA – Thermo Scientific Nanodrop 1000
- qRT-PCR uređaj– 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems
- PCR uređaj – Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler type 5020
- Uređaj za vodoravnu elektroforezu u agaroznom gelu – BioRad Power Pac 300
- Uređaj za okomitu elektroforezu Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell - BioRad
- UV lampa – uvitec CL-508.G
- Analitička vaga – Mettler Toledo AB 104
- Spektrofotometar – HiPO bioSan Microplate Photometer MPP-96
- Inkubator za uzgoj stanica

- Digestor s laminarnim protokom zraka i Ulpa filterom za rad sa staničnim kulturama
- Druga pomoćna laboratorijska oprema

2.2 METODE

2.2.1. Kultura stanica

Stanice koje pripadaju staničnoj liniji HEK293 (od eng. *human embryonic kidney*) su uzgajane u uvjetima *in vitro*, u inkubatoru za staničnu kulturu, u atmosferi s 5% CO_2 i na temperaturi od 37°C. Korišten je hranjivi medij DMEM (od eng. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*BioWhittaker*®) obogaćen s 4,5 g/L glukoze, L-glutaminom, 10% seruma goveđeg fetusa (od eng. *fetal bovine serum*, FBS) (*PAA Laboratories Inc*) i antibioticima penicilinom (100 U/mL, *GIBCO*) i streptomicinom (100 µg/L, *GIBCO*). Stanice su održavane u kulturi pasažiranjem svaka tri dana.

2.2.2. Privremeno utišavanje genske ekspresije pomoću siRNA

Za privremeno utišavanje gena pomoću siRNA korišten je prilagođeni protokol Lipofectamine® RNAiMAX dostupan na stranicama tvrtke Thermo Fisher (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf). siRNA je pripremljena prema uputama proizvođača. Pripravljen je 1x siRNA pufer razrjeđenjem siMAX pufera 5x (30 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$; pH = 7,3) te je liofilizirana siRNA otopljena u koncentraciji od 100 µM. Od siRNA koncentracije 100 µM uzet je alikvot 40 µL u koji je dodano 160 µL x1 siRNA pufera da bi se dobila radna otopina siRNA koncentracije 20 µM. Radne otopine se čuvaju na -20°C.

Korištene su HEK293 stanice nasađene u petrijeve zdjelice za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm, konfluentnosti 90%. Stanicama je uklonjen medij, isprane su PBS-om (od eng. *Phosphate-Buffered Saline*) (10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) i podignute s podloge 1%-tnom otopinom tripsina (*BioWhittaker*®). Djelovanje tripsina je inhibirano dodatkom medija DMEM s 10% FBS-a bez antibiotika.

Pripremljena je reakcijska smjesa za utišavanje od 1,5 mL Opti-MEM^{TM}-a (*Gibco^{TM}*), 15 µL siRNA i 15 µL transfekcijskog reagensa Lipofectamine® RNAiMAX (*Invitrogen*) i inkubirana na sobnoj temperaturi 15 min. U novu petrijevu zdjelicu za uzgoj kulture stanica promjera 10 cm, dodano je sljedećim rasporedom: 1,5 mL transfekcijske smjese, 0,5 mL stanične suspenzije i 5,5 mL medija DMEM s 10% FBS-a bez antibiotika. Stanice je potrebno inkubirati 48-72h da bi efekt bio uočljiv.

Jedan dan nakon siRNA utišavanja, stanice su pasažirane iz 10 centimetarske petrijeve zdjelica u tri petrijeve zdjelice promjera 6 cm, radi daljnjih tretmana.

2.2.3. Transfekcija stanica plazmidnom DNA

Dva dana nakon utišavanja pomoću siRNA, stanice su 70% konfluentne. Za transfekciju stanica korišten je *Xfect™ Transfection Reagent* protokol. Za transfekciju je potrebno 5 µg plazmidne DNA. Plazmidna DNA je pripremljena u epruvetama za centrifugiranje s Xfect™ reakcijskim puferom (Clontech) prema tablici 4 i vorteksirana. Xfect™ polimer (Clontech) je dobro vorteksiran. U pripremljenu smjesu plazmidne DNA dodano je 4,5 µL polimera i inkubirano 10 min na sobnoj temperaturi.

Stanicama koje su utišane pomoću siRNA je uklonjen stari medij i dodano je 2 mL medija DMEM s 10% FBS-a i bez antibiotika. Nakon inkubacije, sav sadržaj epruveta za centrifugiranje je nakapan na ploče (promijenjena je boja medija). Stanice su inkubirane u inkubatoru preko noći. Dan nakon transfekcije stanice su isprane PBS-om, uklonjen je stari medij, dodan je suplementirani DMEM medij i vraćene su u inkubator. Najveća ekspresija se očekuje 48 h nakon transfekcije. Stanice su transfecirane s jednom od tri vrste plazmida (tablica 4).

Tablica 4. Izračun korišten kod pripreme plazmidne DNA.

Plazmid (pcDNA3.1+)	**Koncentracija plazmida (mg/µL)**	**Volumen plazmidne DNA (µL)**	**Volumen Xfect reakcijskog pufera (µL)**
Prazni vektor	1	15	585
SPRTN-wt	0,35	43	557
SPRTNΔMPD	0,35	43	557

2.2.4. Tretman stanica za izazivanje oštećenja DNA

Transfecirane stanice, kao i kontrolne stanice koje nisu transfecirane, tretirane su otopinom formaldehida (36%-tni, T.T.T.), utraljubičastim svjetlom (UV-om) ili su bez tretmana.

1. **Tretman formaldehidom:**

Pripremljena je 100 mM radna otopina formaldehida u DMEM mediju s 10% FBS-a. U petrijeve zdjelice promjera 6 centimetara sa stanicama u volumenu od 5 ml, dodano je 200 µL radne otopine formaldehida te su stanice inkubirane u 4 mM otopini formaldehida u inkubatoru tijekom 2 sata. Nakon inkubacije, stanice su odignute od podloge i skupljene u epruvete za centrifugiranje. Epruvete su centrifugirane (5 min, 800 g), medij je uklonjen nakon čega je slijedila izolacija RNA.

2. **Tretman UV svjetlom:**

Stanicama određenim za tretman UV zračenjem je odsisan medij, isprane su PBS-om i stavljene su pod UV lampu (20 J/m^2, 50 sek, 40 $\mu W/cm^2$, prema $P_{(W)} = E_{(J)} / t_{(s)}$). Nakon tretmana stanicama je dodano 3 mL suplementiranog medija DMEM i inkubirane su 2 sata u inkubatoru. Nakon inkubacije, stanice su odignute od podloge i skupljene u epruvete za centrifugiranje. Epruvete su centrifugirane (5 min, 800 g), medij je uklonjen nakon čega je slijedila izolacija RNA.

3. **0 (bez tretmana):**

Stanice bez tretmana su odignute od podloge i skupljene u epruvete za centrifugiranje. Epruvete su centrifugirane (5 min, 800 g), medij je uklonjen nakon čega je slijedila izolacija RNA.

2.2.5. Izolacija RNA

RNA je izolirana korištenjem *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Na stanični talog dodano je 200 µL QIAzol reagensa, resuspendirano pipetom i inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi. Dodano je 40 µL kloroforma (J.T.Baker), vorteksirano 15 sek, inkubirano 3 min na sobnoj temperaturi i centrifugirano 15 min na 12 000 g i 4°C. Gornja faza je prebačena u *DNA/RNA free* epruvetu za centrifugiranje. Dodano je 100 µL izopropanola (Kemika), vorteksirano, inkubirano na sobnoj temperaturi 10 min i centrifugirano 10 min na 12 000 g i 4°C. Supernatant je odsisan i centrifugiran, na talog je dodano 200 µL 75%-tnog etanola (Sigma Aldrich) i centrifugirano 5 min na 7 500 g i 4°C. Supernatant je odsisan, talog je osušen na zraku i otopljen u 20 µL vode (*AccuGENE Molecular Biology Water*, Lonza). Svim uzorcima je izmjerena koncentracija RNA i uzorci su pohranjeni na -80°C.

2.2.6. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju korišten je *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Reagensi kompleta su otapani na ledu. U epruvete za PCR je pripremljeno po 1 µg RNA u vodi, ukupnog volumena 10 µL (tablica 5). Pripremljena je reakcijska smjesa za sve uzorke koja se sastoji od pufera, smjese dNTP, početnica od nasumičnih heksamera, reverzne transkriptaze, vode i inhibitora RNAze (tablica 6). Po 10 µL mješavine odmjereno je u svaku epruvetu za PCR s RNA, tako da je ukupni volumen u epruveti 20 µL. Program za reverznu transkripciju je namješten na PCR uređaju prema tablici 7.

Tablica 5. Volumen RNA i vode za uzorke korištene za reverznu transkripciju, primjer.

uzorak	V uzorka / µL	V vode / µL
1.1 a	1,26	8,74
1.1 b	11,24	0,00
1.1 c	2,31	7,69
1.2 a	0,93	9,07
1.2 b	7,25	2,75
1.2 c	1,73	8,27
1.3 a	1,97	8,03
1.3 b	1,48	8,52
1.3 c	1,12	8,88
2.1 a	2,09	7,91
2.1 b	3,36	6,64
2.1 c	1,79	8,21
2.2 a	2,16	7,84
2.2 b	10,64	0,00
2.2 c	1,68	8,32
2.3 a	3,05	6,95
2.3 b	10,31	0,00
2.3 c	3,57	6,43
3.1 a	2,10	7,90
3.1 b	7,30	2,70
3.1 c	1,03	8,97

3.2 a	3,33	6,67
3.2 b	7,69	2,31
3.2 c	2,13	7,87
3.3 a	2,92	7,08
3.3 b	6,41	3,59
3.3 c	1,85	8,15
kontrola 1	1,33	8,67
kontrola 2	0,70	9,30
kontrola 3	3,97	6,03

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

sastav	**V reakcija / µL**
10X RT pufer	2
25X smjesa dNTP (100 mM)	0,8
10X početnice	2
MultiScribe^{TM} reverzna transkriptaza	1
voda bez nukleaza	3,2
RNaza inhibitor	1

Tablica 7. Program za reverznu transkripciju za PCR uređaj.

	Korak 1	**Korak 2**	**Korak 3**	**Korak 4**
Temperatura / °C	25	37	85	4
Vrijeme / min	10	120	5	∞

2.2.7. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (od eng. quantitative realtime polymerase chain reaction, qPCR)

Analizom podataka dobivenih kvantitativnim PCR-a može se odrediti relativna ekspresija gena. Pri svakom ciklusu, nakon umnažanja specifičnog dijela određenog početnicama, dolazi do proporcionalnog pojačanja fluorescencijskog signala boje *SYBR Green*

koja se koristi za obilježavanje produkata reakcije. Fluorescentna boja se veže za dvolančanu DNA pri čemu se emitira fluorescencija (Ristov i sur., 2007). cDNA dobivena nakon reverzne transkripcije je razrijeđena 10 puta; u 20 µL cDNA dodano je 180 µL *RNase free* vode. Pripremljeno je 12 različitih reakcijskih smjesa za sve uzorke prema tablici 8. Svi uzorci i mikrotitarska pločica za PCR se drže na ledu. U jažice na mikrotitarskoj pločici za PCR je naneseno po 12 µL reakcijske smjese i 3 µL razrijeđene cDNA. Svi uzorci su rađeni u duplikatima za svaki par početnica posebno. Nakon što su svi uzorci ispipetirani u jažice na mikrotitarskoj pločici za PCR, pločica je centrifugirana i stavljena u qPCR uređaj na program prema tablici 9.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za qPCR za svaki od 12 gena.

Sastav	**Volumen 1 reakcije / µL**
Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) – sadrži pufer, SYBR Green i smjesu dNTP-ova	7,5
Uzvodna početnica (10 µM)	0,75
Nizvodna početnica (10 µM)	0,75
Voda	3
cDNA	3

Tablica 9. PCR program za lančanu reakciju u stvarnom vremenu.

	Korak 1 - Aktivacija	**Korak 2 – Početna denaturacija**	**Korak 3 (x 40 ciklusa)**		**Disocijacijska krivulja**
			Denaturacija	**Vezanje početnica**	
Temperatura / °C	50	95	95	60	95/60/95/60
Vrijeme / min	2	10	0,25	1	0,25/1/0,5/0,25

2.2.7.1. Provjera kvalitete početnica

Prije eksperimenta qPCR s cDNA dobivenom iz izolirane RNA iz tretiranih stanica, napravljena je provjera kvalitete i specifičnosti početnica. Jedan uzorak cDNA je pripremljen

u 4 različita razrjeđenja (1:1, 1:5, 1:25 i 1:125). Dvanaest različitih reakcijskih smjesa je pripremljeno za svaki par početnica (tablica 8), kao i kod 2.2.7. U jažice na pločicu za PCR je naneseno po 12 µL reakcijske smjese i 3 µL razrijeđene cDNA različitih koncentracija. Nakon što su svi uzorci ispipetirani u jažice na pločici za PCR, ploča je centrifugirana i stavljena u qPCR uređaj. Na uređaju je postavljen program prema tablici 9.

2.2.7.2. Obrada rezultata dobivenih pomoću qRT-PCR

Podaci koji se dobiju qRT-PCR su C_T vrijednosti (od eng. *cycle treshold*) koje predstavljaju broj ciklusa potrebnih za povećanje fluorescencije iznad određenog postavljenog praga, što je u direktnoj korelaciji s količinom nastalog DNA produkta za svaki pojedini uzorak. Izračunavanje promjene genske ekspresije (od eng. *fold change, Fc*) slijedi prema formuli:

$$Fc = 2^{\wedge (\text{Ct unutarnje kontrole - Ct ispitivanog gena) uzorka}} / 2^{\wedge (\text{Ct unutarnje kontrole - Ct ispitivanog gena) kontrole}}$$

gdje se kao Ct vrijednosti koriste srednje vrijednosti za tražene gene (svi uzorci su u duplikatima), a kao unutarnja kontrola koristi se gen RPS23. Gen RPS23 se vrlo stabilno eksprimira u humanim stanicama, zbog čega je pogodan za korištenje kao kontrolni (*housekeeping*) gen u analizi promjene ekspresije gena. Na svakoj mikrotitarskoj pločici za qPCR nalaze se i kontrole tretmana koje se također računaju prema navedenoj formuli. U ovom istraživanju kontrole su stanice HEK293 bez tretmana, tretirane UV zračenjem ili formaldehidom, ovisno o uzorcima koji se mjere.

2.2.8. Agarozna gel elektroforeza

Pripremljen je 2,5%-tni agarozni gel otapanjem agaroze (SeaKem LE Agarose, Lonza) u 1x TAE puferu (4 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM octena kiselina, pH 8) u mikrovalnoj pećnici. Djelomično ohlađenoj otopini dodan je etidijev bromid (Carl Roth GmbH) do konačne koncentracije 0,5 µg/mL. Otopina je prebačena u kalup s češljićem i ostavljena 15 min na sobnoj temperaturi dok se formira gel.

Odabran je jedan od duplikata svih uzoraka u testu za provjeru početnica nakon qPCR-a (12 uzoraka). Deset µL uzorka je pomiješano s 2 µL 6x DNA pufera za nanošenje uzoraka

(2,5 mg/mL bromfenol plavo, 2,5 mg/mL ksilen cijanol, 50% glicerol). U prvu jažicu na gelu je naneseno 5 µL markera od 100 pb (*TriDye 100 bp DNA Ladder,* New England BioLabs), u ostale jažice naneseni su uzorci. Elektroforeza je pokrenuta u uređaju za vodoravnu elektroforezu u 1x TAE puferu, 30 min na 100 V. Nakon završene elektroforeze, gel je osvijetljen UV lampom i fotografiran kamerom.

2.2.9. Izolacija proteina

Talog stanica liziran je u puferu za staničnu lizu (RIPA pufer: 1% Triton X-100, 0,5 % DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, pH 8), uz dodatak mješavine proteaznih inhibitora (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche), 1 mM PMSF, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM natrijev ortovanadat, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 mg/L DNAze) 20 min na ledu. Ukupni proteini su razdvojeni centrifugiranjem 20 min 4700 g na 4°C. Nakon centrifugiranja 50 µl suspenzije pipetirane bez doticanja taloga pomiješano je s 12 µL 6x pufera za denaturaciju (375 mM Tris pH 6.8, 12% (w/v) SDS, 47% (v/v) glicerol, 0,06% bromfenola plavog, 10% (v/v) β-merkaptoetanol) (*Laemmli sample buffer*). Proteini su denaturirani u termobloku *Thriller Peqlab* (VWR) 5 minuta na 95 °C.

2.2.10. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Najprije je pripremljen 8%-tni gel za razdvajanje proteina (tablica 10) volumena 5 ml, debljine 1 mm. Otopina gela izlivena je između dvije staklene ploče. Na gel je nanesen izopropanol i gel je ostavljen 20 min na sobnoj temperaturi da polimerizira. Nakon polimerizacije izopropanol je uklonjen, pripremljen je 4%-tni gel za sabijanje proteina (tablica 10) volumena 1 ml, otopina je izlivena na gel za razdvajanje i umetnut je „češljić“ s 10 jažica. Nakon polimerizacije gela, složena je aparatura za proteinsku elektroforezu te je nanesen pufer za elektroforezu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS). U prvu jažicu na gelu nanesen je proteinski marker (*Protein Marker VI (10-245) prestained*, AppliChem). U sljedeće 4 jažice naneseni su stanični lizati u volumenu ovisnom o koncentraciji proteina u pojedinom uzorku. Koncentracija proteina je određena spektrofotometrijski pomoću kompleta *Pierce BCA Protein*

Assay Kit (Thermo Scientific). Elektroforeza se odvija 80 min na 100 V. Za elektroforezu je korišten sustav *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad).

Tablica 10. Sastav gela za razdvajanje i gela za sabijanje.

Gel za razdvajanje		**Gel za sabijanje**	
Sastav	**Volumen/ µL**	**Sastav**	**Volumen/ µL**
ddH_2O	2750	ddH_2O	620
Pufer za razdvajanje x 4 (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS)	1250	Pufer za sabijanje x 4 (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS)	250
40% akrilamid/0,8% bisakrilamid	1000	40% akrilamid/0,8% bisakrilamid	120
10% APS	25	10% APS	6
TEMED	10	TEMED	4

2.2.11. Prijenos proteina na membranu (Western blot)

Prijenos proteina sa gela na nitroceluloznu membranu *Nitrocellulose Transfer Membrane* (GVS North America) je obavljen u puferu za prijenos (25 mM Tris, 200 mM glicin, 20% (v/v) metanol u ddH_2O, pH 8,3) 90 min na 200 mA.

Membrana je, nakon prijenosa, obojena bojom *Ponceau S* kako bi se odredila uspješnost prijenosa. Membrana je inkubirana preko noći na 4°C u TBS-BSA puferu za blokiranje (5% BSA, 0,1% Na-azid, fenol crveno u 1x TBS-u, pH 7,4 u ddH_2O). Nakon blokiranja, membrana je inkubirana u otopini poliklonalnog zečjeg primarnog antitijela na Spartan (vlastita izrada), razrijeđenom (1:1000) u TBS-BSA puferu, 2 h na sobnoj temperaturi uz njihanje. Nakon inkubacije, membrana je isprana 3 puta u 1x TBS 0.05% Tween puferu za ispiranje po 5 min. Nakon ispiranja, membrana je inkubirana u sekundarnom antitijelu *HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse secondary antibody* (Dako) razrijeđenom 1:6000 u 5%-tnoj otopini mlijeka u prahu (*Milchpulver Blotting grade*, Carl Roth GmbH) pripremljenoj u 1x TBS puferu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5), a zatim isprana 5 puta tijekom 30 min u puferu za ispiranje.

Proteini na membrani su detektirani kemiluminiscentno pomoću reagensa za detekciju *ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology). Na membranu je

dodana smjesa otopine A i B luminola za detekciju iz navedenog kompleta. Ekspozicija je trajala 5 minuta. Membrana je analizirana aparatom *ChemiDoc Imaging system XRS+* (Biorad).

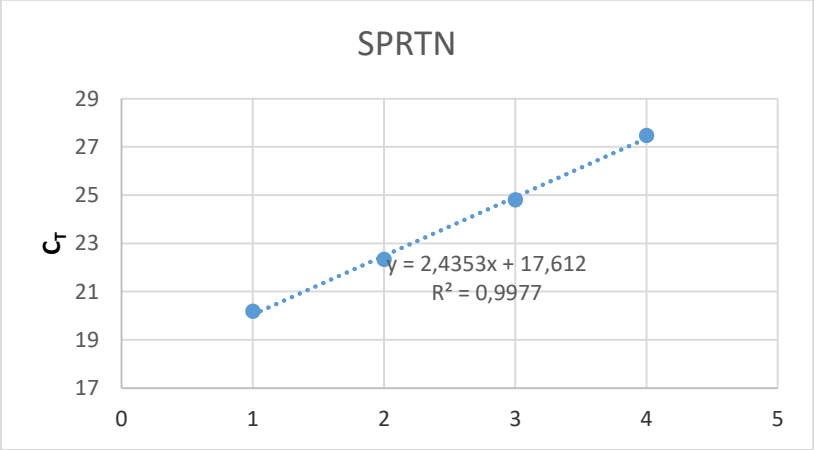
2.2.12. Statistički postupci

Promjene u ekspresiji ciljnih gena analizirane su pomoću MedCalc programa za statističku analizu, primjenom neparametrijskih statističkih testova (Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney U test), te parametrijskih statističkih testova (ANOVA analiza varijance i T-test za nezavisne uzorke). Statistički značajnost je određena prema p vrijednost manjoj od 5% ($p< 0,05$).

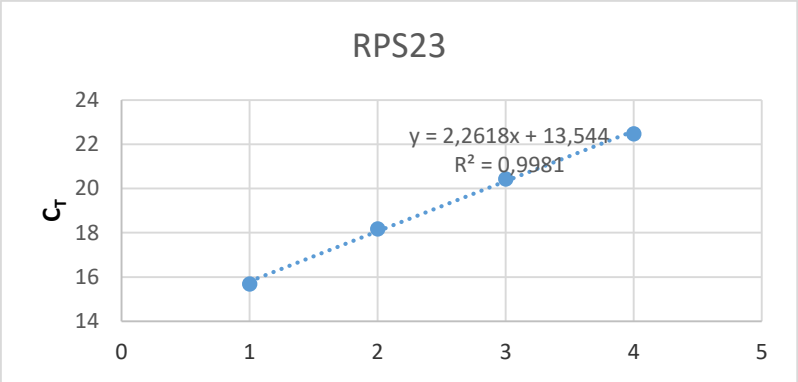
3. REZULTATI

3.1. Provjera početnica

Na slikama 4 i 5 grafički su prikazani rezultati provjere učinkovitosti umnažanja početnica dobiveni kvantitativnim PCR-om. Četiri točke na grafu predstavljaju izmjerenu C_T vrijednost pri četiri različita razrjeđenja istog uzorka DNA te je kroz njih određen pravac linearne regresije. Za određivanje učinkovitosti umnažanja početnica potrebno je vrijednosti nagiba pravca linearne regresije uvrstiti u formulu: $E=5^{(-1/nagib)}$, gdje broj 5 predstavlja serijska razrjeđenja 1:5. Efikasnost početnica koje umnažaju gen *SPRTN* iznosi 93,65%, a za *RPS23* 103,7%. Očekivana vrijednost koeficijenta determinacije R^2 koji govori o reprezentativnosti modela je između 0,9 i 1. Model je reprezentativniji što je vrijednost R^2 bliža broju 1. Iz vrijednosti R^2 prikazanih na grafu vidljivo je da se dobivene vrijednosti nalaze na očekivanom pravcu. Prikazani su grafički rezultati početnica koje umnažaju gene *SPRTN* i *RPS23*, a isto je napravljeno za sve korištene početnice i dobivene vrijednosti R^2 kreću se između 0,98 i 1, a efikasnost između 93 i 120%.



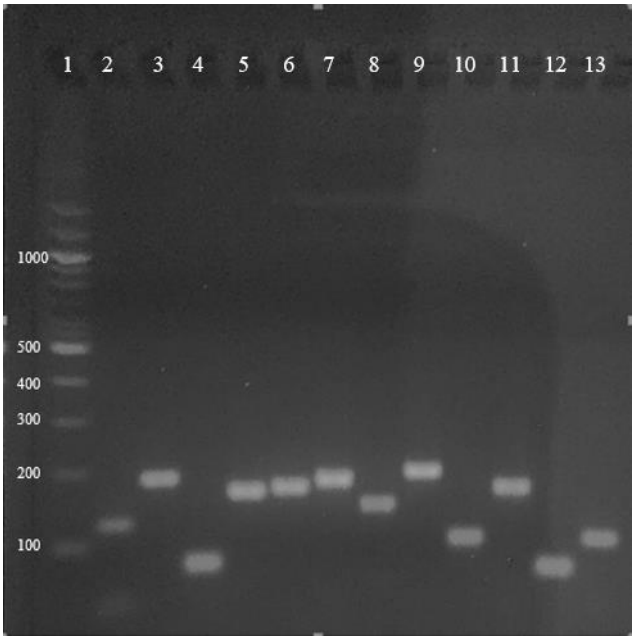
Slika 4. Grafički prikaz rezultata dobivenih qPCR-om za provjeru efikasnosti umnažanja početnica za gen *SPRTN*. Graf je nacrtan u programu Excel.



Slika 5. Grafički prikaz rezultata dobivenih qPCR-om za provjeru efikasnosti umnažanja početnica za gen *RPS23*. Graf je nacrtan u programu Excel.

3.2. Agarozna gel elektroforeza DNA

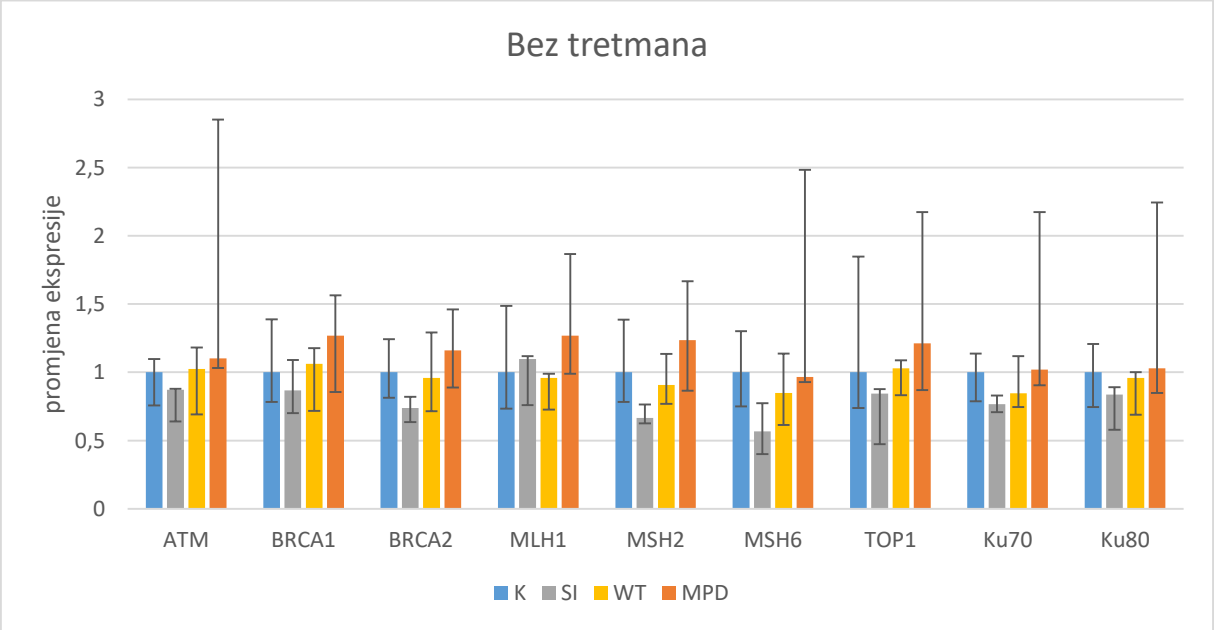
Dodatno smo efikasnost umnažanja početnicama provjerili nanošenjem produkata qPCR-a iz nasumično odabrane mikrotitarske pločice nakon mjerenja na uređaju za kvantitativni PCR s uzorcima DNA iz stanica koje nisu tretirane. Produkti iz pločice nakon qPCR-a su analizirani na agaroznom gelu (slika 6). Na gelu se jasno vide vrpce, jedna u svakoj jažici. Slika gela potvrđuje da je u reakciji qPCR-a došlo do umnažanja samo jednog amplikona, odnosno, da nisu nastali dodatni produkti. Početnice su dizajnirane tako da umnažaju amplikone veličine između 75 i 200 pb.



Slika 6. Agarozni gel (2,5%-tni) s qPCR produktima umnažanja svih testiranih gena. U prvoj jažici se nalazi marker (100 pb), a u ostalim jažicama su geni umnoženi u reakcijama qPCR-a redom: TOP1, MLH1,MSH2, MSH6, ATM, BRCA1, BRCA2, SPRTN, Ku70, Ku80 i RPS23.

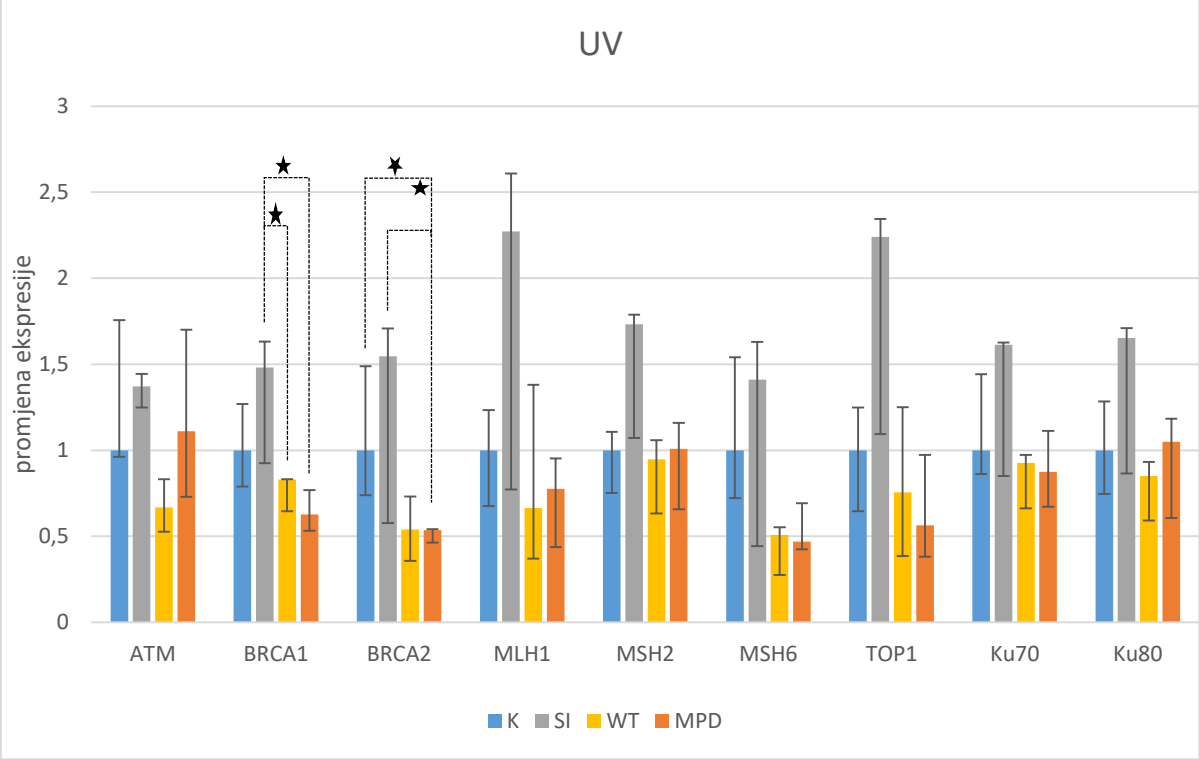
3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR)

Rezultati dobiveni metodom kvantitativnog PCR-a prikazani su grafički na slikama 7, 8 i 9, ovisno o tretmanu stanica. Prvi graf su stanice bez tretmana oštećenja DNA. Na drugom grafu su stanice tretirane UV zračenjem da bi se izazvalo oštećenje DNA, a na trećem su stanice tretirane formaldehidom da bi se izazvalo oštećenje DNA. Na sva tri grafa prikazane su promjene ekspresije pojedinog gena u četiri različite grupe uzoraka dobivenih iz HEK293 stanica: (1) kontrolne stanice bez tretmana (*K*); (2) stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane „praznim" plazmidnim vektorom (*SI*); (3) stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN* (*WT*); (4) stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni (*MPD*). Dio stanica je nakon transfekcije izložen djelovanju UV zračenja (stanice uključuju 4 navedene grupe). Stanice su inkubirane 2 h nakon tretmana da bi se pokušale oporaviti nakon čega su prikupljene i dalje analizirane. Drugi dio stanica je izložen djelovanju formaldehida tijekom 2 h (stanice uključuju 4 navedene grupe). Nakon 2 h, formaldehid je uklonjen, a stanice su prikupljene i dalje analizirane. Svaki od opisanih pokusa napravljen je u tri ponavljanja, a svaki uzorak analiziran je u duplikatu.

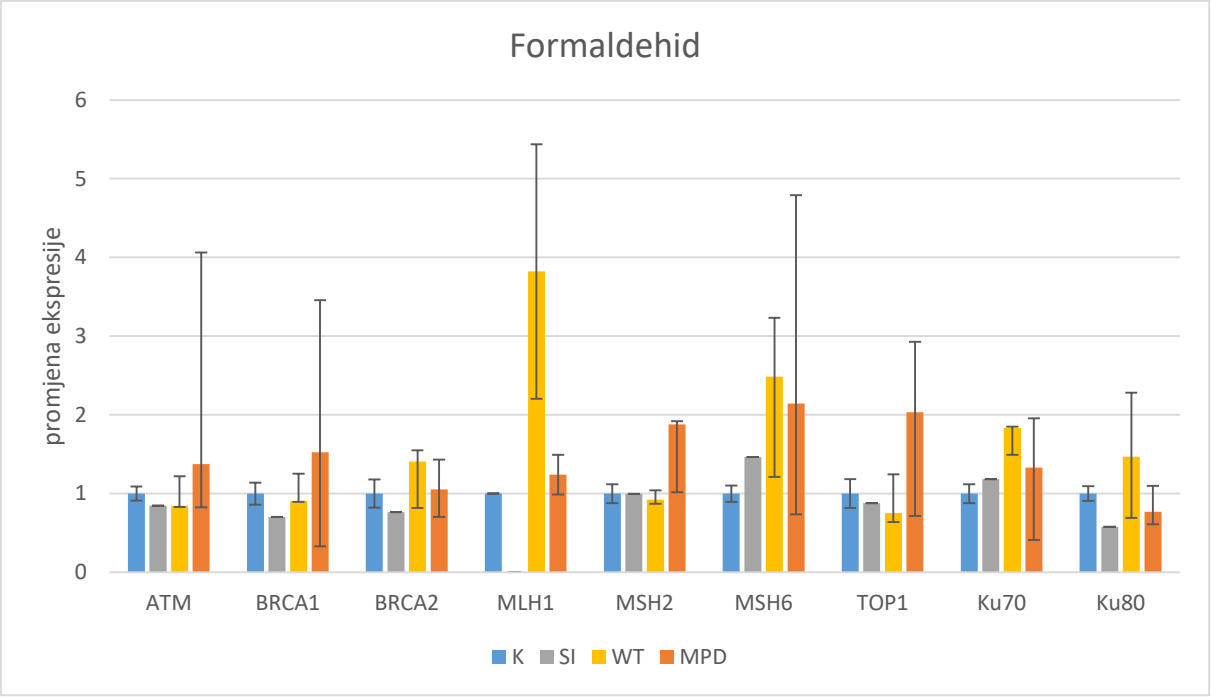


Slika 7. Grafički prikaz promjene ekspresije pojedinog gena u četiri različite grupe uzoraka iz stanica bez tretmana oštećenja DNA. Graf predstavlja medijan +/- maksimalna i minimalna vrijednost 3 mjerenja za svaki uzorak. Statistička značajnost određena je testovima Kruskal-Wallis, te Mann Whitney U test. K, kontrolne stanice bez tretmana; SI, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane „praznim" plazmidnim vektorom; WT, stanice s

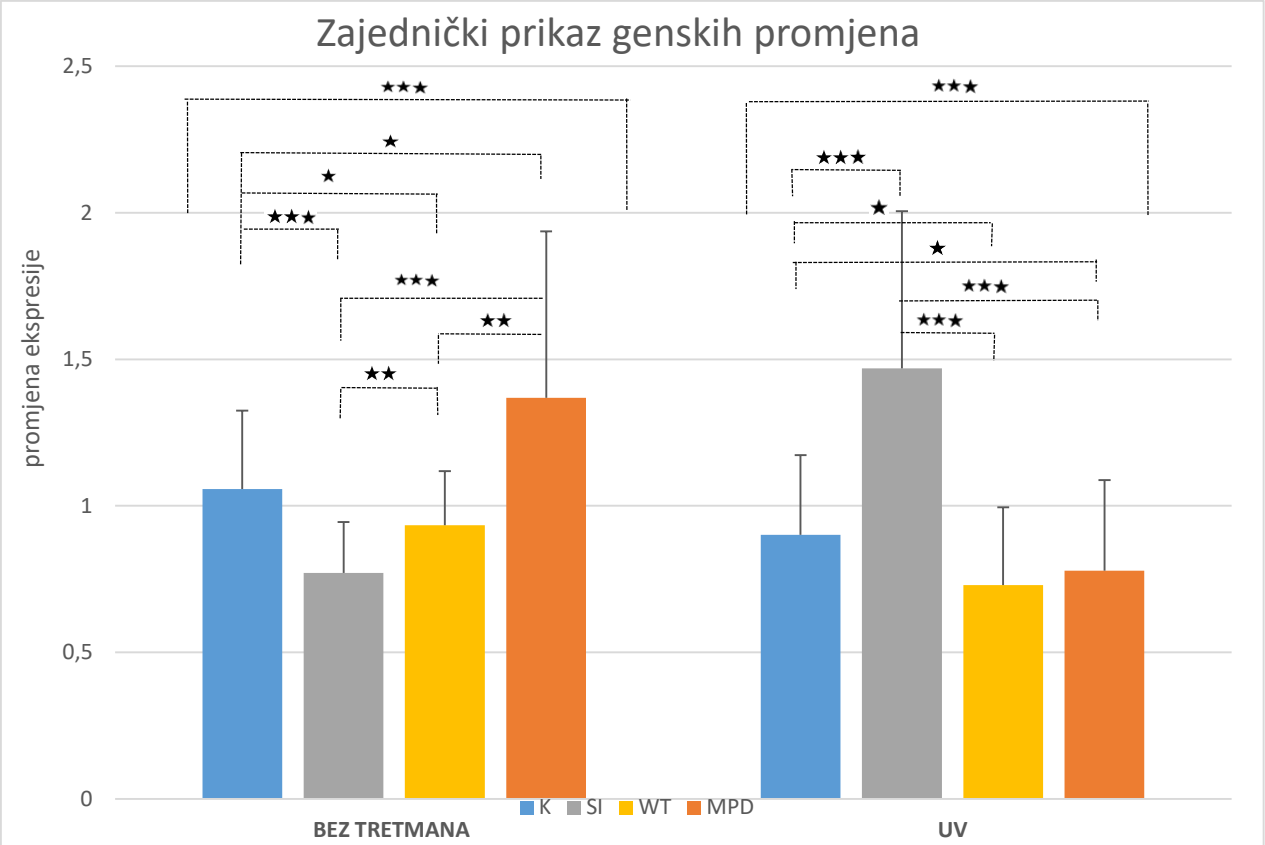
utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN*; MPD stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni.



Slika 8. Grafički prikaz promjene ekspresije pojedinog gena u četiri različite grupe uzoraka dobivene iz stanica tretiranih UV-om. Graf predstavlja medijan +/- maksimalna i minimalna vrijednost 3 mjerenja za svaki uzorak. Statistička značajnost određena je testovima Kruskal-Wallis, te Mann Whitney U test (★- $p < 0,05$). K, kontrolne stanice bez tretmana; SI, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane „praznim" plazmidnim vektorom; WT, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN*; MPD stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni.



Slika 9. Grafički prikaz promjene ekspresije pojedinog gena u četiri različite grupe uzoraka dobivenih iz stanica tretiranih formaldehidom. Graf predstavlja medijan +/- maksimalna i minimalna vrijednost 3 mjerenja za svaki uzorak. Statistička značajnost određena je testovima Kruskal-Wallis, te Mann Whitney U test. K, kontrolne stanice bez tretmana; SI, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane „praznim" plazmidnim vektorom; WT, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN*; MPD stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni.



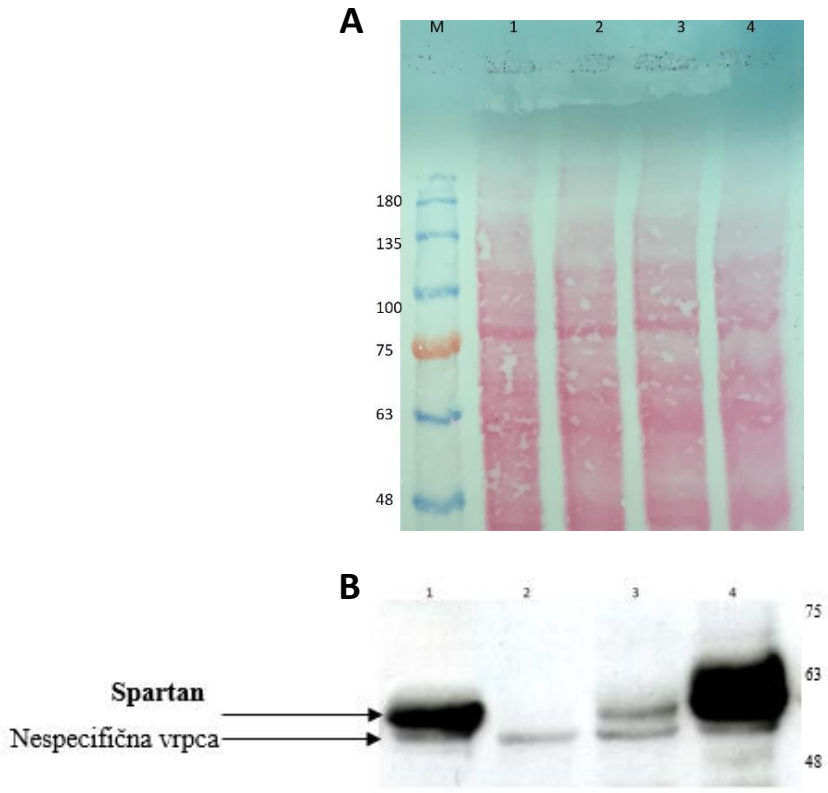
Slika 10. Grafički prikaz promjene ekspresije svih promatranih gena između četiri različita tipa stanica (K, SI, WT, MPD) bez tretmana oštećenja DNA i stanica koje su tretirane UV-om. Statistička značajnost određena je testom ANOVA, te T-testom za nezavisne uzorke. Graf predstavlja srednju vrijednost + standardnu devijaciju (★ - $p < 0,05$; ★★ - $p < 0,01$; ★★★ - $p < 0,001$). K, kontrolne stanice bez tretmana; SI, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane „praznim" plazmidnim vektorom; WT, stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN*; MPD stanice s utišanim genom *SPRTN* transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni.

3.3. *Western blot* analiza

U svrhu potvrde uspješnosti utišavanja gena *SPRTN*, detektiran je protein Spartan u izolatu 4 grupe stanica bez tretmana postupkom *Western blot* analize. Uspješnost prijenosa proteina na nitrocelulozu membranu nakon elektroforeze u poliakrilamidnom gelu, provjerena je bojanjem bojom *Ponceau S*. Bojanje je reverzibilno, navedena boja se veže na sve proteine na membrani, a uklanja se ispiranjem u otopini TBS-Tween. Na slici 11 A je fotografija membrane nakon bojanja bojom *Ponceau S*. Analizirano je 40 μg ukupnih proteina po uzorku.

Proteini su analizirani u četiri uzorka. Prvi uzorak je izoliran iz stanica u kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s

mutacijom u metaloproteaznoj domeni (*MPD*). Drugi uzorak proteina je izoliran iz stanica kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane „praznim“ plazmidom (*SI*). Treći uzorak sadrži proteine izolirane iz stanica kojima geni nisu utišani i nisu transfecirane plazmidima (*K*). Četvrti uzorak su proteini izolirani iz stanica kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN* (*WT*). Na membrani na slici 11 B se jasno vide očekivane vrpce proteina Spartan (55 kDa) u jažicama 1, 3 i 4. U jažici broj 2 se ne vidi vrpca koja bi odgovarala proteinu Spartan zbog utišavanja gena *SPRTN*. Najšira vrpca je vidljiva u jažici broj 4 kao posljedica prekomjerne ekspresije egzogenog gena *SPRTN* uslijed transfekcije plazmidnom DNA. Pojava nespecifične vrpce posljedica je korištenja poliklonskog antitijela na Spartan koje se u manjoj mjeri nespecifično veže i za neke druge proteine.



Slika 11. A) Bojanje *Ponceau S* bojom. Marker 100 pb (jažica M), proteini iz stanica u kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni (jažica 1); proteini izolirani iz stanica kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane „praznim“ plazmidom (jažica 2); proteini izolirani iz stanica kojima geni nisu utišani i nisu transfecirane plazmidima (jažica 3); proteini izolirani iz stanica kojima je prethodno utišan gen *SPRTN* i koje su transfecirane plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN* (jažica 4). **B)** Analiza izoliranih proteina metodom *Western blot.* Jednak raspored uzoraka u jažicama 1-4 kao i pod **A)**.

4. RASPRAVA

Apurinska/apirimidinska (AP) mjesta su oštećenja DNA koja ukoliko se ne poprave mogu biti mutagena i citotoksična. AP lezije su elektrofilne pa se kemijska reakcija može dogoditi sa susjednom dušičnom bazom i/ili proteinom tj., formirat će se kovalentne veze između dva lanca DNA i/ili će nastati DPC. Većina nukleosoma koji sadrže lezije u obliku AP mjesta akumuliraju DPC. Preko 10 000 AP mjesta nastaje u ljudskom genomu svaki dan, stoga ne iznenađuje da su DPC jedna od najčešćih lezija DNA. Iako su to česte lezije DNA, mehanizmi njihova popravka su slabo istraživani i stoga se malo zna o njima (Sczepanski i sur., 2010).

Prijašnja istraživanja o mehanizmima popravka DPC su se fokusirala primarno na dva puta popravka DNA, NER i HR kao mehanizme koji uklanjaju DPC i štite stanice od citotoksičnosti koju uzrokuje DPC. Kod bakterija je pronađeno da NER uklanja i popravlja male DPC (manje od 16 kDa), a veći DPC se popravljaju pomoću HR. Kod kvasca NER je uključen u popravak DPC koji nastaju nakon akutnog izlaganja visokim dozama formaldehida, a HR popravlja DPC nastale nakon kroničnog izlaganja niskim dozama formaldehida. Tek nedavno je otkrivena proteaza Spartan koja ima sposobnost ukloniti DPC neovisno o veličini ili načinu nastanka (Stingele i sur., 2015).

Mutacije u *SPRTN* su povezane s ranim razvojem hepatocelularnog karcinoma i značajkama progerije. Spartan omogućuje replikaciju DNA na koju su kovalentno vezani proteini. Pročišćeni Spartan ima DNA-ovisnu proteaznu aktivnost i degradira određene proteine vezane na DNA (Mórocz i sur., 2017).

Pacijenti s kserodermom pigmentosum (nose mutacije u različitim NER faktorima) su osjetljivi na različite agense koji uzrokuju nastajanje DPC. Međutim, analiza NER u stanicama sisavaca *in vitro* i *in vivo* je pokazala da NER može ukloniti kovalentno vezane proteine, ali samo ako su manji od 16 kDa. Za razliku od NER, uključenost HR u popravak DPC dokazana je indirektno kod bakterija i kvasca i nedavno u metazoa stoga je još uvijek teško razumjeti je li HR direktno uključen u popravak DPC (Vaz i sur., 2017).

Nedavna istraživanja su pokazala da se većina DPC uklanja specifično tijekom S faze. Spartan kao dio replisoma sprječava zaustavljanje replikacijske vilice i nastajanje DSB uzrokovano akumulacijom DPC i štiti replikativne stanice od toksičnosti DPC. Ipak točna organizacija popravka DPC proteolizom je još nepoznata, točnije koji faktori djeluju nizvodno od Spartan i uklanjaju ostatke peptida nakon proteolize i događa li se to samo u S fazi. Također, nije poznato kako je proteaza Spartan regulirana i koji su ostali faktori uključeni u popravak

DPC ovisan o Spartanu. Ne možemo isključiti da se popravak DPC također događa u stanicama izvan S-faze, pogotovo u neproliferativnim stanicama poput neurona gdje bi akumulacija DPC predstavljala opasnost za transkripciju (Vaz i sur., 2017).

U ovom istraživanju kvantitativnim PCR-om smo promatrali promjene ekspresije gena koji sudjeluju u različitim putevima popravka DNA između stanica bez tretmana, stanica koje su tretirane UV-om i stanica koje su tretirane formaldehidom. U svakom od navedenih pokusa, napravljene su četiri različite grupe stanica. Prve su kontrolne stanice – HEK293 stanice (K), drugima je utišan gen *SPRTN* (SI), trećima je utišan gen *SPRTN* i transfecirane su plazmidom koji nosi divlji tip gena *SPRTN* (WT), a četvrtima je utišan gen *SPRTN* i transfecirane su plazmidom koji nosi gen *SPRTN* s mutacijom u metaloproteaznoj domeni (MPD), koja bi trebala smanjiti proteolitičku aktivnost metaloproteazne domene.

Istraživanje je osmišljeno kao pilot studija procjene utjecaja količine proteina Spartan na ekspresiju odabranih gena uključenih u osnovne mehanizme popravka DNA. Geni koje smo u ovom radu istraživali sudjeluju u putevima homologne rekombinacije i nehomolognog sparivanja krajeva (BRCA1, BRCA2, ATM, Ku70 i Ku80) te popravku krivo sparenih baza (MSH2, MSH6 i MLH1), a u istraživanje je uključen i gen za Topoizomerazu 1 (Top1), protein koji reže jedan od lanaca DNA i time smanjuje napetost DNA zavojnice tijekom prepisivanja DNA ili replikacije, a koja često sudjeluje u formiranju endogeno izazvanih DPC.

S obzirom na vrlo mali broj uzoraka u svakoj od ispitivanih grupa (tri ponavljanja) napravili smo statističku analizu koristeći neparametrijske statističke testove. U ispitivanim uzorcima iz stanica bez tretmana za oštećenje DNA nismo pronašli statistički značajne promjene ekspresije gena između četiri tipa stanica. Međutim, u usporedbi s kontrolnim uzorcima, kod svakog od promatranih gena (izuzev MLH1) uočili smo istovjetan trend smanjenja ekspresije gena nakon utišavanja gena *SPRTN* (SI), normaliziranja genske ekspresije nakon transfekcije divljeg tipa Spartan proteina (WT), te povećanja genske ekspresije ukoliko je transfeciran Spartan s oštećenom funkcijom metaloproteazne domene (MPD). Zbog takvog uočenog obrasca promjene genske ekspresije, odlučili smo usporediti sve testirane genske ekspresije pojedinih grupa uzoraka zajedno. Pri tom testiranju, zbog značajno većeg broja mjerenih uzoraka primijenili smo parametrijske statističke testove (ANOVA i T-test za neovisne uzorke). Rezultati ovakvog testiranja potvrdili su postojanje razlika između svih testiranih grupa uzoraka, potvrđujući da su uočeni trendovi promjene genske ekspresije pojedinih gena uključenih u popravak DNA u ovisnosti o utjecaju proteina Spartan – stvarni.

Utjecaj postojanja i funkcije proteina Spartan na gensku ekspresiju gena uključenih u popravak DNA ukazuje na važnu ulogu proteina Spartan na očuvanje integriteta DNA. Pri

smanjenju fiziološke količine proteina Spartan uslijed siRNA utišavanja, smanjuje se i ekspresija ispitivanih gena, ukazujući na postojanje pozitivne sprege između funkcije Spartan proteina i regulacije ekspresije drugih gena uključenih u popravak DNA (slika 8). Ovu hipotezu potvrđuje i opažanje da kada u stanicama s utišanim Spartanom transfeciramo divlji tip tog proteina, i time kompenziramo izazvani nedostatak endogenog proteina, normalizira se ekspresija drugih gena uključenih u popravak DNA. No, ukoliko transfecirani Spartan nije proteolitički aktivan (mutantni protein bez aktivnosti MPD domene) ova fina regulacija bude poremećena, te dolazi do pojačane ekspresije testiranih gena, premda ničim nije izazivano povećano oštećenje DNA. Na koji način i s kojim ciljem se odvija ovakva regulacija genske ekspresije putem utjecaja funkcije proteina Spartan nije poznato i svakako zahtjeva daljnja istraživanja.

Kod uzoraka dobivenih iz stanica tretiranih ultraljubičastim svjetlom (UV-B + UV-C), koji izaziva stvaranje pirimidinskih dimera, te DSB kao rezultat neuspješnog popravka ovakvih oštećenja (Greinert i sur., 2012), neparametrijski statistički testovi pokazali su razlike genske ekspresije između grupa uzoraka čak i na vrlo malom broju mjerenih uzoraka, i to za gene BRCA1 i BRCA2. Ali, i kod svih drugih testiranih gena može se uočiti isti obrazac promjene genske ekspresije, takav da je kod uzoraka s utišanim genom *SPRTN* (SI) genska ekspresija testiranih gena povećana u odnosu na kontrolne uzorke. Takva promjena ponovno ukazuje na poremećenu regulaciju genske ekspresije u nedostatku funkcije proteina Spartan, ali sada u slučaju prepoznavanja DNA oštećenja nastalog uslijed djelovanja UV zračenja. Ova promjena genske ekspresije poništava se povećanom ekspresijom proteina Spartan divljeg tipa, ali i mutantne forme MPD proteina. Uočljiv je izostanak razlike utjecaja divljeg tipa proteina Spartan i njegove mutantne forme bez proteolitičke aktivnosti MPD domene. Razlog za takvo opažanje možda se krije u tome što je Spartan važan i za popravak lomova DNA, no za takav tip popravka nije potrebna proteolitička aktivnost metaloproteazne domene Spartana, već je njegova uloga u popravku ostvarena drugačijim djelovanjem.

U uzorcima stanica tretiranih formaldehidom izmjerena su velika odstupanja vrijednosti. Nije vidljiva razlika s obzirom na gensku ekspresiju u statističkim testovima, premda neki od gena pokazuju trend promjene genske ekspresije sličan onom opaženom u uzorcima bez DNA oštećenja. Snažno toksično djelovanje formaldehida na DNA vjerojatno je uzrokovalo vrlo velike promjene u genskoj ekspresiji, koje su utjecajnije od fine regulacije ostvarene djelovanjem proteina Spartan. Stoga, utjecaj formaldehida i stvaranja DPC treba testirati nakon kraćeg djelovanja formaldehida i/ili sa subletalnim koncentracijama kako bi se mogao procijeniti utjecaj proteina Spartan.

Budući da se u ovom istraživanju radilo o pilot studiji, u našem slijedećem istraživanju planiramo ponoviti ovo testiranje s većim brojem ispitivanih uzoraka i ponavljanja, te uključiti u istraživanje još neke gene koje u ovom istraživanju nismo bili u mogućnosti istražiti.

5. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje ukazuje na postojanje ovisnosti ekspresije gena uključenih u popravak DNA o funkciji i ekspresiji gena *SPRTN*. Ovakva regulacija genske ekspresije djelovanjem proteina Spartan ovisi o prisutnosti proteina Spartan, ali i o proteolitičkoj aktivnosti metaloproteazne domene i može se uočiti u stanicama bez egzogenog oštećenja DNA. Protein Spartan s oštećenom funkcijom metaloproteazne domene značajno više pojačava ekspresiju testiranih gena, ukazujući na poremećaj spomenute regulacije zbog nedostatka proteolitičke aktivnosti proteina Spartan.

Nakon akumulacije oštećenja DNA izazvanih UV zračenjem, odnosno u uvjetima pojačane aktivacije mehanizama za popravak takvih DNA oštećenja, stanice sa smanjenom ekspresijom SPRTN pokazuju značajno povećanje ekspresije gena uključenih u popravak DNA u odnosu na kontrolne stanice s prisutnim endogenim Spartanom, te na stanice transfecirane divljim tipom proteina Spartan. To ponovno ukazuje na poremećaj regulacije i kontrole ekspresije gena uključenih u popravak DNA u stanicama bez dostatne količine proteina Spartan.

6. LITERATURA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2012): Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier Health Sciences, Missouri.

Blasi, M. F., Ventura, I., Aquilina, G., Degan, P., Bertario, L., Bassi, C., … Bignami, M. (2006): A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. Cancer Research **66**: 9036-9044.

Dai, Y., Kysela, B., Hanakahi, L. A., Manolis, K., Riballo, E., Stumm, M., … Jeggo, P. A. (2003): Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 2462-2467.

Davis, A., & Chen, D. (2013): DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. Translational Cancer Research **2**: 130-143.

Elliott, B., & Jasin, M. (2001): Repair of Double-Strand Breaks by Homologous Recombination in Mismatch Repair-Defective Mammalian Cells. Molecular and Cellular Biology **21**: 2671-2682.

Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C., & Rapp, A. (2012): UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. Nucleic Acids Research **40**: 10263-10273.

Hiom, K. (2014): SPRTN is a new player in an old story. Nature Genetics **46:** 1155-1157.

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2010): The DNA-damage response in human biology and disease. Nature **461**: 1071-1078.

Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nature Genetics **27**: 247-254.

Kim, M. S., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Pang, Y. P., & Machida, Y. J. (2013): Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. Nucleic Acids Research **41:** 1661-1668.

Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2005): Dna Mismatch Repair. Annual Review of Biochemistry **74**: 681-710.

Li, X., & Heyer, W. D. (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. Cell Research **18**: 99-113.

Lopez-Mosqueda, J., Maddi, K., Prgomet, S., Kalayil, S., Marinovic-Terzic, I., Terzic, J., & Dikic, I. (2016): SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. eLife **5**: 1-19.

Maskey, R. S., Kim, M. S., Baker, D. J., Childs, B., Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., … Machida, Y. J. (2014): Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. Nature Communications **5**:5744.

McKinnon, P. J. (2004): ATM and ataxia telangiectasia. EMBO Reports **5**: 772-776.

Modrich, P. (2006): Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. Journal of Biological Chemistry **281**: 30305-30309.

Mórocz, M., Zsigmond, E., Tóth, R., Enyedi, M. Z., Pintér, L., & Haracska, L. (2017): DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA. Nucleic Acids Research **45**: 3172-3188.

Ristov, A. A., Brozović, A., Mađarić, B. B., Ćetković, H., Hranilović, D., Bosnar, M. H., Hećimović, S. K., Radan, N .M., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007): Metode u Molekularnoj Biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., Kru, I., & Lo, M. (2003): Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. Molecular and Cellular Biology **23**: 5706-5715.

Sczepanski, J. T., Wong, R. S., McKnight, J. N., Bowman, G. D., & Greenberg, M. M. (2010): Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle. Proceedings of the National Academy of Sciences **107**: 22475-22480.

Stingele, J., Bellelli, R., Alte, F., Hewitt, G., Sarek, G., Maslen, S. L., … Boulton, S. J. (2016): Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. Molecular Cell **64**: 688-703.

Stingele, J., Habermann, B., & Jentsch, S. (2015): DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. Trends in Biochemical Sciences **40**: 67-71.

Stingele, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G., & Jentsch, S. (2014): A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. Cell **158**: 327-338.

Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y., & Chen, J. (2009): PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**: 7155-7160.

Takahashi, A., Mori, E., Nakagawa, Y., Kajihara, A., Kirita, T., Pittman, D. L., … Ohnishi, T. (2016): Homologous recombination preferentially repairs heat-induced DNA double-strand breaks in mammalian cells. International Journal of Hyperthermia **33**: 336-342.

Tham, K. C., Kanaar, R., & Lebbink, J. H. G. (2016): Mismatch repair and homeologous recombination. DNA Repair **38**: 75-83.

Vaz, B., Popovic, M., Newman, J. A., Fielden, J., Aitkenhead, H., Halder, S., … Ramadan, K. (2016): Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. Molecular Cell **64**: 704-719.

Vaz, B., Popovic, M., & Ramadan, K. (2017): DNA-Protein Crosslink Proteolysis Repair. Trends in Biochemical Sciences, xx, 1-13.

Warren, J. J., Pohlhaus, T. J., Changela, A., Iyer, R. R., Modrich, P. L., & Beese, L. S. (2007): Structure of the Human MutSα DNA Lesion Recognition Complex. Molecular Cell **26**: 579-592.

Yang, W. (2008): Structure and mechanism for DNA lesion recognition. Cell Research **18**: 184-197.

ŽIVOTOPIS

Ime: Anja Ančić
Adresa: Kipara Meštrovića 14, 21300 Makarska
Mobitel: 099 595 0650
e-mail adresa: anja.ancic@gmail.com
Datum rođenja: 04.05.1993.

Obrazovanje:

2015. – 2017. Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

2012. – 2015. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

Iskustvo:

Lipanj 2016. – travanj 2017. Asistent u farmakovigilanciji i regulativi
Ewopharma d.o.o. (Zadarska 80, 10 000 Zagreb)
2016. – praksa u laboratoriju Molekularne genetike na Zavodu za molekularnu biologiju (CRISPR-Cas na *E.coli*; utjecaj različitih razina ekspresije Cas proteina na popravak UV oštećenja)
2016. – demonstratorica na kolegiju Molekularna genetika
2013. – demonstratorica na kolegiju Praktikum organske kemije

Projekti i ostalo:

2017. – Organizacijski odbor „Znanstveni piknik 2017“
2016. – Studentski koordinator za „Noć biologije 2016“ na PMF-u
2016. – Smotra Sveučilišta u Zagrebu
2016. – voditelj radionice 'Stanica' na manifestaciji „Dan za znanost“ u Koprivnici
2016. – Organizacijski odbor „Znanstveni piknik 2016“
2015. – Organizacijski odbor za prvi „Simpozij Studenata Bioloških Usmjerenja“ 2015.g
2015. – volontirala na „Znanstvenom pikniku 2015“
2015. – volontirala u tvrtki Biognost (1 semestar)
2015. – voditelj radionice 'Genetika evolucije' na „Otvorenim danima IRB-a“
2016. – Smotra Sveučilišta u Zagrebu
2014 – voditelj radionice 'Krv nije voda' na manifestaciji „Dan za znanost“ u Koprivnici
2013. i 2014. g. – voditelj radionica „Noći biologije“, PMF