

# Stanični mehanizmi uklanjanja mRNA i proteina SAHH kod pacijenata s nedostatnom aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze

---

Rokić, Filip

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:246003>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**

Repository / Repozitorij:



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



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Filip Rokić

**STANIČNI MEHANIZMI UKLANJANJA  
mRNA I PROTEINA SAHH KOD  
PACIJENATA S NEDOSTATNOM  
AKTIVNOSTI S-  
ADENOZILHOMOCISTEIN HIDROLAZE**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2024.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA

Filip Rokić

**STANIČNI MEHANIZMI UKLANJANJA  
mRNA I PROTEINA SAHH KOD  
PACIJENATA S NEDOSTATNOM  
AKTIVNOSTI S-  
ADENOZILHOMOCISTEIN HIDROLAZE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Oliver Vugrek  
Ko-mentor: Prof. dr. sc. Igor Jurak

Rijeka, 2024.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG  
DEVELOPMENT

Filip Rokić

**CELLULAR MECHANISMS INVOLVED  
IN TURNOVER OF PATHOGENIC AHCY  
TRANSCRIPTS AND PROTEIN  
IDENTIFIED IN AHCY DEFICIENCY  
PATIENTS**

DOCTORAL THESIS

Mentor: Oliver Vugrek, Ph.D.; Professor  
Co-mentor: Igor Jurak, Ph.D.; Professor

Rijeka, 2024.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Oliver Vugrek

Ko-mentor rada: Prof. dr. sc. Igor Jurak

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Sveučilištu u Rijeci, Fakultet  
biotehnologije i razvoja lijekova, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Ivan Gudelj (predsjednik Povjerenstva)
2. Prof. dr. sc. Tihomir Balog
3. Doc. dr. sc. Neda Slade

## ZAHVALE

*Izrada ove doktorske disertacije bila je izazovno i dugotrajno putovanje koje ne bi bilo moguće bez pomoći i podrške mnogih pojedinaca.*

*Veliko hvala mentoru, dr. sc. Oliveru Vugreku, na ukazanom povjerenju i stručnom vodstvu tijekom mog rada u laboratoriju. Njegovo znanje, predanost i entuzijizam neprestano me je motiviralo i omogućilo mi da uspješno završim ovo istraživanje.*

*Hvala i članovima povjerenstva, dr. sc. Ivanu Gudelju, dr. sc. Tihomiru Balogu i dr. sc. Nedi Slade te komentoru dr. sc. Igoru Juraku, na njihovim dragocjenim savjetima i konstruktivnim kritikama koje su značajno unaprijedile kvalitetu ove disertacije.*

*Zahvaljujem se i svim svojim kolegama, posebice Robertu, Jeleni, Maji, Jurici, Ivani i Marini, na svojoj pomoći, savjetima i diskusijama koje su eksperimentalni dio ovog istraživanja učinile puno lakšim i ugodnijim.*

*Neizmjereno sam zahvalan i svojim prijateljima, Miji, Davoru, Jakovu, Marku, Relji, Lovri i Dori, kao i cijeloj obitelji, svim brezarima, noni Nevenki i dragoj Gabi, a posebice mami Katiji i bratu Gordanu, na podršci i razumijevanju tijekom mog obrazovanja i u životu općenito.*

*Na kraju, hvala mojoj dragoj Lindi. Tvoja bezuvjetna potpora i ljubav nepresušani su izvor snage i motivacije za naše daljnje životne uspjehe.*

Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije izrađen je u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković i financiran je projektom InnoMol („*Enhancement of the Innovation Potential in SEE through new Molecular Solutions in Research and Development*“) od strane Europske komisije i projektom Hrvatske zaklade za znanosti, HRZZ („*Molekularni aspekti patogenih procesa u AHCY deficijenciji*“) pod vodstvom dr.sc. Olivera Vugreka.

# SAŽETAK

## Uvod i cilj

Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) je rijetka nasljedna bolest ciklusa metionina uzrokovana točkastim mutacijama u genu *SAHH*. SAHH služi za uklanjanje S-adenozilhomocisteina (SAH), nusprodukta i snažnog inhibitora brojnih staničnih metiltransferaza, čime SAHH igra ključnu ulogu u održavanju staničnog metilacijskog potencijala. Smanjena aktivnost ovog esencijalnog enzima rezultira značajnim biokemijskim poremećajima kod ljudi, uzrokujući multisistemsku bolest karakteriziranu neurorazvojnim zastojem, miopatijom i disfunkcijom jetre. Do danas je opisano svega 16 pacijenata s različitim težinama bolesti, od kasne kliničke manifestacije do smrtnih ishoda tijekom dojenačke dobi. Trenutni terapijski pristup uključuje dijetalnu restrikciju unosa metionina koja pokazuje kliničku korist kod nekih bolesnika, iako varirajuće učinkovitosti. Prethodne studije pokazale su da je razina inaktivacije enzima povezana s težinom bolesti i potencijalno, s ishodom terapije. Cilj ovog doktorskog rada je istražiti funkcionalne posljedice tri varijante gena *SAHH* (p.W112\*, p.Y143C, p.Y328D) koje su otkrivene kod dva pacijenta s izrazito teškom biokemijskom i kliničkom prezentacijom nedostatne aktivnosti SAHH-a do danas opisane u literaturi. Naglasak ove studije je na učincima mutacija na gensku ekspresiju i staničnim mehanizmima u pozadini značajnog nedostatka proteina SAHH, pružajući molekularne uvide koji mogu pomoći u razvoju i promjeni novih terapijskih strategija u budućnosti.

## Materijali i metode

U sklopu ove studije proveli smo sveobuhvatne analize razina mutiranih transkriptata i proteina SAHH u fibroblastima pacijenata i ekspresijskim sustavima *in vitro*. Rekombinantni plazmidi koji sadrže mutirane cDNA pripremljeni su u svrhu izvanstanične ekspresije proteina i pripreme ljudskih staničnih modela (Hek293, HepG2, SW480) putem lentivirusne transdukcije. Biblioteke cDNA konstruirane su iz ukupne RNA izolirane iz stanica pacijenata i staničnih modela HepG2 za interno sekvenciranje transkriptoma (mRNAseq). Bioinformatička analiza korištena je za kvantificiranje ekspresije pojedinih alela *SAHH* u fibroblastima pacijenata. Diferencijalna analiza ekspresije, funkcionalna anotacija i analiza genske ontologije (GO) provedene su kako bi se identificirali geni s promijenjenom ekspresijom u modelima HepG2. Razine mutiranih proteina analizirane su nakon tretmana ljudskih staničnih modela inhibitorom proteasoma MG-132. Na kraju, provedena je računalna analiza *in silico* kako bi se predvidjeli učinci pogrešnih mutacija na stabilnost proteina.



## Rezultati

Analiza ekspresije proteina kombiniranih heterozigotnih fibroblasta (W112\*/Y143C i Y328D/Y143C) otkrila je smanjene razine SAHH-a kod oba pacijenta. Uz to, stanice koje sadrže preuranjeni stop-kodon (PTC) pokazale su i smanjene razine transkripata. Rekombinantni mutanti SAHH uspješno su sintetizirani korištenjem izvanstaničnog ekspresijskog sustava *in vitro*, bez razlika u prinosu između varijanti. Analiza staničnih modela sa stabilnom ekspresijom proteina pokazala je izrazito nisku ekspresiju SAHH-a s mutacijama W112\* i Y328D, za razliku od normalnih razina varijante SAHH-Y143C. Sekvenciranje transkriptoma otkrilo je neuravnoteženu ekspresiju alela kod jednog pacijenta zbog potpunog nedostatka transkripata koji sadrže PTC. U staničnim modelima HepG2, identificirano je 58 diferencijalno eksprimiranih gena koji su prvenstveno povezani s regulacijom ekspresije gena i biosintezom staničnih makromolekula. Detaljna analiza istaknula je E3-ubikvitinsku ligazu TRIM33 kao potencijalnog regulatornog faktora uključenog u nedostatak proteina SAHH-Y328D. Inhibicija proteasoma povećala je ekspresiju varijante SAHH-Y328D u svim pripremljenim staničnim modelima. Dodatno, konfokalna mikroskopija otkrila je izraženu tendenciju ovog mutanta za nakupljanje unutar stanice. Konačno, analiza *in silico* potvrdila je da aminokiselinska supstitucija Y328D značajno remeti stabilnost SAHH-a zbog značajnih strukturnih promjena u hidrofobnoj jezgri proteina.

## Zaključci

Značajno smanjene razina mRNA i proteina SAHH primijećene u stanicama pacijenata mogu pridonositi težini fenotipa nedostatne aktivnosti SAHH-a. Prema dobivenim rezultatima, mutacije Y328D i W112\* primarni su čimbenici koji pridonose nedostatku ekspresije proteina uočene kod pacijenata. Značajni nedostatak SAHH-a rezultat je stanične regulacije genske ekspresije mehanizmima NMD i UPS. TRIM33 je predložen kao potencijalni regulator pojačane proteasomske degradacije mutanta SAHH-Y328D.

**Ključne riječi:** Nedostatna aktivnost SAHH-a, mutacije, genska ekspresija, NMD, UPS

Ova doktorska disertacija sadrži 130 stranica, 35 slika, 12 tablica i 187 literaturnih navoda.

## SUMMARY

### Introduction and aims

S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency is a rare hereditary disease of methionine cycle caused by point mutations in the *AHCY* gene. AHCY functions as a disposal route for S-adenosylhomocysteine (SAH), a byproduct and strong inhibitor of numerous cellular methyltransferases, thus AHCY plays a pivotal role in maintaining cellular methylation potential. Reduced activity of this essential enzyme results in significant biochemical aberrations in humans, leading to a multisystemic disorder characterized by neurodevelopmental delay, myopathy and liver dysfunction. To date, only 16 patients have been reported with diverse disease severity, ranging from late clinical onset to fatal outcomes during infancy. Current therapeutic approach involves dietary methionine restriction which demonstrates clinical benefits in some patients, albeit with varying efficacy. Previous studies have shown that the magnitude of mutational impact is associated with clinical presentation of the disease and possibly therapy outcome. The aim of this doctoral thesis is to investigate functional consequences of three *AHCY* variants (p.W112\*, p.Y143C, p.Y328D) discovered in two patients with extremely severe biochemical and clinical manifestations of AHCY deficiency reported so far. This study focuses on differential expression effects of these mutations and their underlying mechanisms involved in aberrant AHCY turnover, providing molecular insights that can help guide the development and application of novel therapeutic strategies in the future.

### Materials and methods

In this study, we performed comprehensive analyses of mutant *AHCY* transcript and protein levels in patient fibroblasts and *in vitro* expression systems. Recombinant plasmids harboring mutant cDNAs were prepared for cell-free protein expression and the preparation of human cell models (Hek293T, HepG2, SW480) via lentiviral transduction. cDNA libraries were constructed from total RNA isolated from patient-derived cells and HepG2 models for in-house transcriptome sequencing (mRNAseq). Bioinformatic analysis was employed to quantify the expression of individual *AHCY* alleles in patient fibroblasts. Differential expression analysis, functional annotation and gene ontology (GO) analysis were performed to identify genes with altered expression in HepG2 models. Mutant protein levels were analyzed following treatment of human cell models with proteasome inhibitor MG-132. Lastly, *in silico* computational analysis was performed to predict the effects of missense mutations on protein stability.

## Results

Protein expression analysis of compound heterozygote fibroblasts (W112\*/Y143C and Y328D/Y143C) revealed reduced AHCY levels in both patients. Additionally, cells harboring premature termination codon (PTC) also displayed reduced transcript levels. Recombinant AHCY mutants were successfully synthesized using *in vitro* cell free expression system, without any discrepancies in yield across all variants. Analysis of stably expressing human cell models showed markedly lower expression of AHCY harboring W112\* and Y328D mutation, contrasting normal levels of Y143C variant. Transcriptome sequencing revealed an allelic imbalance in one patient due to complete absence of transcripts containing PTC. In HepG2 cell models, 58 differentially expressed genes were identified that are primarily associated with gene expression regulation and biosynthesis of cellular macromolecules. Detailed analysis highlighted ubiquitin ligase TRIM33 as a potential regulator involved in aberrant turnover of AHCY-Y328D mutant. Proteasome inhibition increased expression of Y328D variant across all prepared human cell models. Moreover, microscopy revealed pronounced tendency of this mutant protein to aggregate within the cell. Finally, *in silico* analysis confirmed that Y328D substitution significantly disrupts AHCY stability due to structural changes in protein's hydrophobic core.

## Conclusion

Considerable decrease of mRNA and protein levels observed in patient-derived cells may contribute to the severity of AHCY deficiency phenotype. According to the results obtained, Y328D and W112\* mutations are primary factors contributing to the loss of protein expression observed in the respective patients. Aberrant AHCY turnover is the result of cellular regulation of gene expression through NMD and UPS mechanisms. TRIM33 is suggested to have a regulatory role in proteasomal degradation of AHCY-Y328D mutant.

**Keywords:** AHCY deficiency, mutations, gene expression, NMD, UPS

This doctoral thesis contains 130 pages, 35 images, 12 tables and 187 literature references.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Metabolizam jednog ugljika i ciklus metionina</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH)</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Mehanizam hidrolize S-adenozilhomocisteina .....	3
1.2.2. Evolucijska i strukturna očuvanost SAHH .....	4
1.2.3. Trodimenzionalna struktura SAHH .....	5
<b>1.3. Biološke uloge SAHH</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. SAHH i stanična metilacija.....	7
1.3.2. Uloga SAHH u tumorima .....	9
<b>1.4. Nedostatna aktivnost SAHH-a</b> .....	<b>10</b>
1.4.1. Terapijski pristup .....	12
<b>1.5. Genetska raznolikost i podjela genetskih varijanti</b> .....	<b>13</b>
1.5.1. Varijante gena <i>SAHH</i> .....	14
1.5.2. Funkcionalne analize proteina SAHH.....	15
<b>1.6. Stanični mehanizmi kontrole kvalitete genske ekspresije</b> .....	<b>18</b>
1.6.1. Mehanizmi kontrole kvalitete transkriptoma .....	19
1.6.1.1. Degradacija mRNA s besmislenom mutacijom (mehanizam NMD) .....	19
1.6.1.2. Degradacija mRNA bez stop-kodona (mehanizam NSD).....	21
1.6.1.4. Degradacija mRNA uslijed zastoja ribosoma (mehanizam NGD).....	21
1.6.2. Mehanizmi kontrole kvalitete proteoma .....	22
1.6.2.1. Ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) .....	22
1.6.2.2. Autofagija .....	24
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>26</b>
3.1.1. Oligonukleotidi .....	26
3.1.2. Protutijela .....	27
3.1.3. Antibiotici .....	27
3.1.4. Bakterijski sojevi.....	27
3.1.5. Stanične linije.....	28
3.1.6. Plazmidni vektori .....	28
<b>3.2. Metode</b> .....	<b>33</b>
3.2.1. Kloniranje kodirajućih sljedova gena <i>SAHH</i> .....	33
3.2.1.1. Umnažanje cDNA metodom PCR.....	33
3.2.1.2. Elektroforeza u agaroznom gelu.....	34
3.2.1.3. Pročišćavanje produkata PCR-reakcije .....	35
3.2.1.4. Dvostruka razgradnja restrikcijskim endonukleazama.....	35
3.2.1.5. Određivanje koncentracije DNA i RNA u otopinama.....	36
3.2.1.6. Ligacija cDNA <i>SAHH</i> i plazmidne okosnice .....	36
3.2.1.7. Kemijska transformacija bakterija.....	36
3.2.1.8. Selekcija i uzgoj bakterija .....	37
3.2.1.9. Izolacija plazmida iz bakterijskih kultura.....	38
3.2.1.10. Sangerova metoda sekvenciranja .....	38
3.2.2. Ciljana mutageneza .....	39
3.2.3. Transkripcija i translacija <i>in vitro</i> .....	40
3.2.4. Određivanje ekspresije gena <i>SAHH</i> kvantitativnim PCR-om.....	41
3.2.4.1. Izolacija ukupne RNA iz staničnih kultura .....	42
3.2.4.2. Kvantitativni PCR uz reverznu transkripciju .....	43
3.2.5. Rad sa staničnim kulturama .....	44
3.2.5.1. Uzgoj stanica u kulturi.....	44
3.2.5.2. Test MTT za određivanje stanične vijabilnosti .....	46

3.2.5.3.	Transfekcija stanične linije 293T za proizvodnju lentivirusa.....	47
3.2.5.4.	Određivanje multipliciteta infekcije .....	49
3.2.5.5.	Transdukcija staničnih linija lentivirusima .....	50
3.2.5.6.	Tretmani staničnih modela inhibitorom proteasoma MG-132 .....	51
3.2.5.7.	Fiksacija i priprema staničnih preparata za mikroskopiju .....	51
3.2.6.	Svjetlosna i konfokalna mikroskopija .....	52
3.2.7.	Metode rada s proteinima.....	52
3.2.7.1.	Priprema staničnih lizata .....	52
3.2.7.2.	Određivanje koncentracije proteina.....	53
3.2.7.3.	Elektroforeza u SDS-polikrilamidnom gelu (SDS-PAGE) .....	53
3.2.7.4.	Metoda western blot .....	55
3.2.8.	Određivanje sljedova nukleinskih kiselina-metode sekvenciranja .....	56
3.2.8.1.	Sekvenciranje transkriptoma (mRNaseq).....	59
3.2.8.2.	Provjera kvalitete ukupne RNA.....	59
3.2.8.3.	Priprema biblioteka cDNA za sekvenciranje transkriptoma .....	60
3.2.8.4.	Provjera kvalitete biblioteka cDNA i sekvenciranje na platformi Illumina .....	62
3.2.9.	Bioinformatička obrada i analiza NGS-podataka .....	63
3.2.9.1.	Provjera kvalitete sirovih podataka sekvenciranja .....	63
3.2.9.2.	Poravnanje sekvenci na referentni genom i kvantifikacija transkripata .....	64
3.2.9.3.	Određivanje diferencijalno eksprimiranih gena .....	64
3.2.9.4.	Interpretacija diferencijalno eksprimiranih gena analizom genske ontologije.....	65
3.2.9.5.	Određivanje ekspresije specifičnog alela .....	66
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ekspresija transkripata i proteina SAHH u fibroblastima pacijenata .....</b>	<b>67</b>
4.1.1.	Analiza ekspresije gena <i>SAHH</i> kvantitativnim PCR-om .....	67
4.1.2.	Analiza ekspresije proteina SAHH metodom western blot.....	68
<b>4.2.</b>	<b>Ekspresija rekombinantnih proteina SAHH <i>in vitro</i> .....</b>	<b>70</b>
4.2.1.	Priprema rekombinantnih vektora za transkripciju i translaciju <i>in vitro</i> .....	70
4.2.2.	Analiza ekspresije rekombinantnih proteina SAHH <i>in vitro</i> .....	72
<b>4.3.</b>	<b>Stanični modeli sa stabilnom ekspresijom proteina EGFP-SAHH .....</b>	<b>74</b>
4.3.1.	Proizvodnja lentivirusa i transdukcija stanica.....	74
4.3.2.	Analiza staničnih modela koji eksprimiraju proteine EGFP-SAHH .....	76
<b>4.4.</b>	<b>Analiza transkriptomskih podataka (mRNaseq).....</b>	<b>81</b>
4.4.1.	Kontrola kvalitete sekvenciranja transkriptoma.....	82
4.4.2.	Analiza diferencijalno eksprimiranih gena .....	85
4.4.3.	Genska ontologija promijenjenih gena u staničnim modelima HepG2 .....	88
4.4.4.	Ekspresija pojedinog alela <i>SAHH</i> u fibroblastima pacijenata.....	90
<b>4.5.</b>	<b>Utjecaj inhibicije UPS-a na razine proteina SAHH-Y328D.....</b>	<b>93</b>
<b>4.6.</b>	<b>Analiza stabilnosti mutiranih proteina SAHH <i>in silico</i> .....</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>98</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>POPIS KRATICA.....</b>	<b>126</b>
<b>9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>127</b>

# 1. UVOD

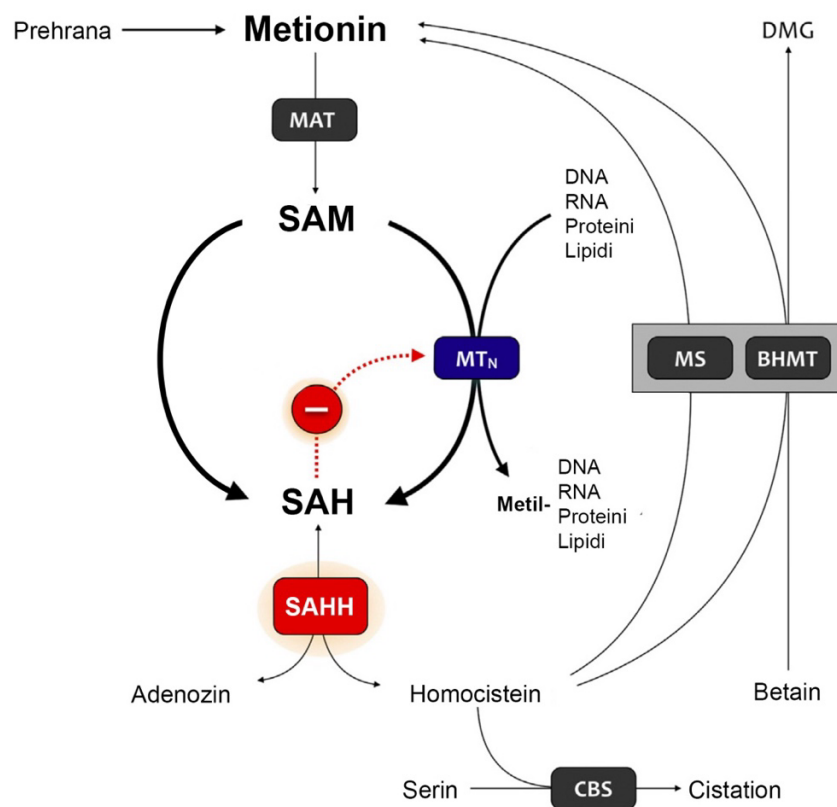
## 1.1. Metabolizam jednog ugljika i ciklus metionina

Metionin je esencijalna aminokiselina koja se u organizam unosi prehranom, a metabolički put metionina dio je šireg metaboličkog ciklusa koji se naziva metabolizam jednog ugljika (engl. *one-carbon metabolism*) [1]. Metabolizam jednog ugljika obuhvaća mrežu međusobno povezanih metaboličkih puteva koji prenose organske skupine s jednim ugljikovim atomom između različitih metabolita te time osiguravaju i održavaju staničnu homeostazu [2]. Neprestani izvor i cirkulacija, najčešće metilnih ( $\text{CH}_3$ -), metilenskih ( $-\text{CH}_2-$ ) i formilnih ( $-\text{CHO}$ ) funkcionalnih skupina, unutar kompleksne mreže biokemijskih reakcija folatnog, metioninskog i transulfuracijskog ciklusa, nužni su za odvijanje esencijalnih fizioloških procesa kao što su biosinteza aminokiselina i nukleotida, održavanje staničnog redoks potencijala i regulacija genske ekspresije [3]. Metabolizam jednog ugljika ovisan je o nekoliko kofaktora i supstrata koji se unose u organizam putem prehrane, a uključuju vitamine B9, B2, B6, B12, kolin, betain i već spomenutu aminokiselinu metionin [4].

Ciklus metionina (Slika 1.) započinje adenilacijom metionina i njegovim prevođenjem u S-adenozilmetionin (SAM). Reakcija je katalizirana metionin adenziltransferazom (MAT), a njezin produkt SAM je univerzalni donator metilne skupine i drugi najzastupljeniji enzimski kofaktor u prirodi nakon ATP-a [5]. Prijenos metilne skupine sa SAM-a na biološke makromolekule (DNA, RNA, proteini) kataliziran je mnogobrojnim staničnim metiltransferazama (MT), pri čemu SAM prelazi u S-adenozilhomocistein (SAH) [6]. SAH je produkt transmetilacijskih reakcija i kompetitivni inhibitor SAM-ovisnih metiltransferaza [7,8], a razgrađuje se djelovanjem S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) koja katalizira hidrolizu SAH na adozin i homocistein [9]. Homocistein je metabolit koji povezuje ciklus metionina s ostalim metaboličkim putevima metabolizma jednog ugljika, folatnim i transulfuracijskim ciklusom. Remetilacija homocisteina u metionin, čime se zaokružuje ciklus metionina, omogućena je demetilacijom 5-metiltetrahydrofolata (5-mTHF), konačnog reduciranog oblika folne kiseline koji nastaje redukcijom tetrahydrofolata (THF), jednog od centralnih metabolita folatnog ciklusa [3,10]. Reakcija demetilacije 5-mTHF i prijenosa metilne skupine na homocistein, katalizirana je metionin sintetazom (MS) u reakciji koja koristi kobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) kao kofaktor [11]. Paralelni metabolički put remetilacije homocisteina uključuje prijenos metilne skupine s betaina, djelovanjem betain homocistein S-metiltransferaze (BHMT) pri čemu nastaje metionin i dimetil glicin (DMG) [12]. Ukoliko su

stanične potrebe za metioninom i folatom zadovoljene, visoke razine SAM-a alosterički aktiviraju cistationin  $\beta$ -sintetazu (CBS), prvi enzim transulfuracijskog puta, potičući pretvorbu homocisteina u cistation [13]. Cistation se u reakciji kataliziranoj cistation  $\gamma$ -ligazom (CTH) prevodi u cistein, prekursor za sintezu glutationa, glavnog antioksidansa koji održava stanični redoks potencijal [10].

Jedna od ključnih uloga ciklusa metionina u sklopu metabolizma jednog ugljika je sinteza SAM-a, metabolita koji služi kao glavni izvor metilnih skupina ( $\text{CH}_3$ -) u reakcijama metilacije raznolikih staničnih substrata kao što su DNA, RNA, proteini (histoni), lipidi i ostali metaboliti [6]. SAH nastaje kao produkt transmetilacijskih reakcija, a zbog svoje strukturne sličnosti sa SAM-om, posjeduje visoki afinitet za vezno mjesto supstrata svih SAM-ovisnih metiltransferaza, čime inhibira njihovu aktivnost [8,14]. Njegovo efikasno uklanjanje djelovanjem enzima SAHH ključno je za održavanje staničnog metilacijskog potencijala i odvijanje esencijalnih staničnih procesa koji ovise o metilaciji [15].



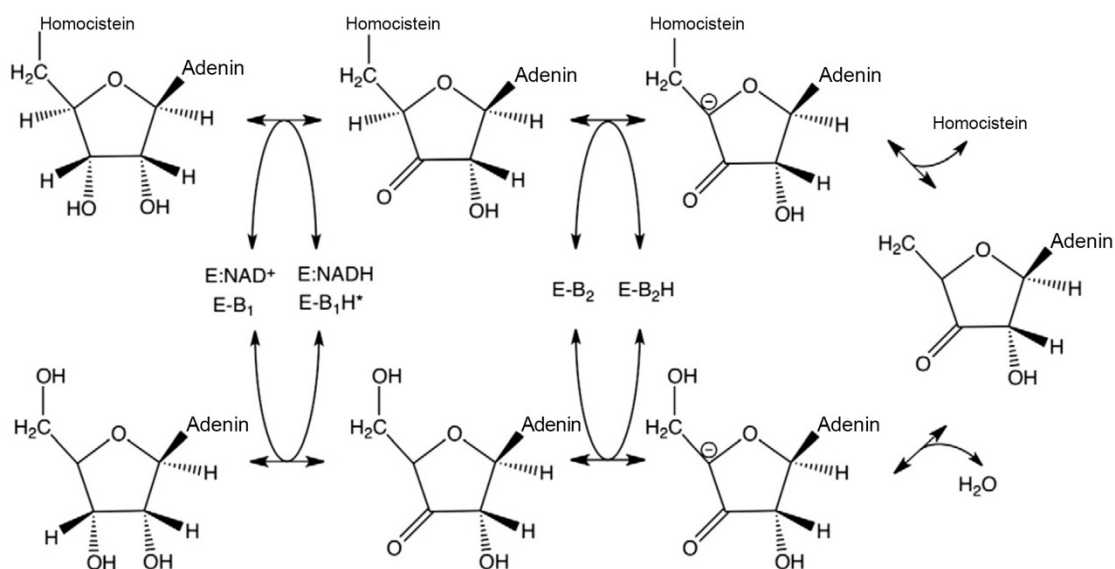
**Slika 1. Ciklus metionina.** Reakcije sinteze metabolita metionina SAM-a i SAH-a uz pridružene reakcije remetilacije homocisteina kroz folatni ciklus i prevođenja homocisteina u cistation transulfuracijskim ciklusom. Oznake: MAT= metionin adenziltransferaza, SAM= S-adenozilmetionin,  $\text{MT}_N$ = stanične metiltransferaze, SAH= S-adenozilhomocistein, SAHH= S-adenozilhomocistein hidrolaza CBS= cistation  $\beta$ -sintetaza, MS= metionin sintetaza, BHMT= betain homocistein S-metiltransferaza, DMG= dimetil glicin. Preuzeto i prilagođeno iz [16].

## 1.2. S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH)

SAHH je metabolički enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju hidrolize SAH-a na adenzin i homocistein. Aktivnost ovog proteina prvi put je opisana 1949. godine, kao enzima koji u uvjetima *in vitro* sintetizira SAH iz adenzina i homocisteina [17]. Kasnije je ustanovljeno da ravnoteža reakcije pri fiziološkim uvjetima ipak teče u smjeru hidrolize, zbog učinkovitog staničnog uklanjanja produkata reakcije, adenzina i homocisteina [7].

### 1.2.1. Mehanizam hidrolize S-adenozilhomocisteina

Katalitički mehanizam reakcije (Slika 2.) je prvi put opisan 1979. godine [18]. Započinje oksidacijom 3'-OH skupine adenzinskog ogranka molekule SAH pomoću kofaktora  $\text{NAD}^+$  i prevođenjem početnog supstrata u 3' keto derivat. Oksidacijom 3'-OH skupine potiče se uklanjanje 4' protona, čime nastaje 4' karboanionski intermedijer koji uzrokuje  $\beta$ -eliminaciju 5' supstituenta, homocisteina. Michaelovom adicijom jedne molekule vode na dvostruku vezu između  $\text{C4'}$  i  $\text{C5'}$  ugljikovih atoma pentoznog prstena i redukcijom 3' keto skupine pomoću  $\text{NADH}$ , u konačnici nastaje drugi produkt reakcije, adenzin [19,20]. SAHH je jedini poznati enzim kod sisavaca koji provodi ovu reakciju, što ga čini ključnim enzimom ciklusa metionina koji regulira razine metabolita SAH i SAM u stanici, a njegova aktivnost posljedično utječe na ukupnu staničnu metilaciju [9].



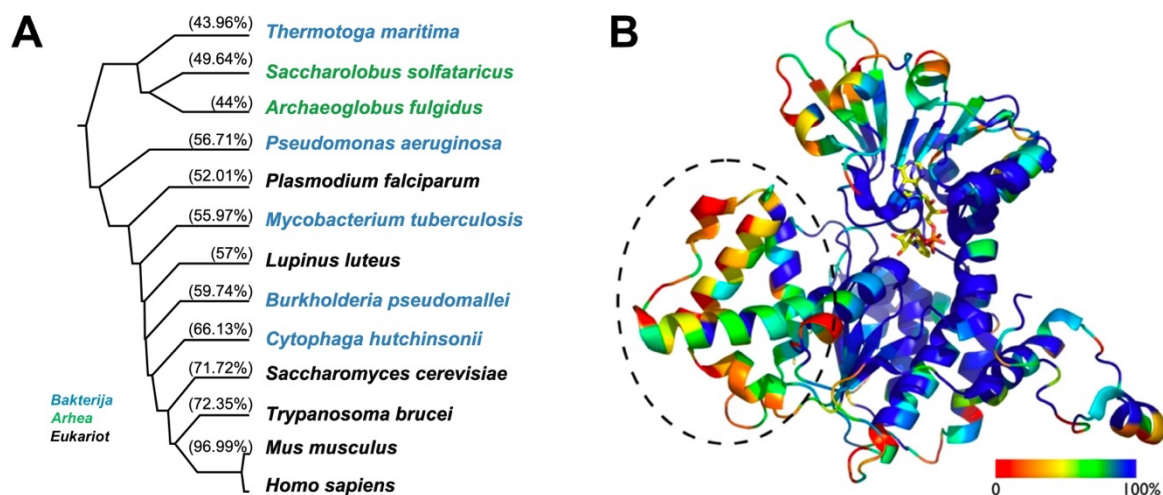
**Slika 2. Katalitički mehanizam enzima SAHH.** Mehanizam reakcije hidrolize SAH-a na adenzin i homocistein. Oznake:  $\text{E:NAD}^+/\text{E:NADH}$ = kofaktor vezan na enzim SAHH,  $\text{E-B}_{1/2}/\text{E-B}_{1/2}\text{H}$ = protonirani/deprotonirani bazični ogranci aminokiselina SAHH-a. Preuzeto i prilagođeno iz [21].



### 1.2.2. Evolucijska i strukturna očuvanost SAHH

SAHH je izuzetno konzervirani protein prisutan u svim domenama života, arhejama, bakterijama i eukariotima [21]. Filogenetske analize pokazuju da je SAHH eukariota i arheja evoluirao iz zajedničkog pretka, a u bakterije je prešao horizontalnim prijenosom gena [22]. Za razliku od sisavaca, bakterije posjeduju dodatni gen za metionil-tioadenozin/S-adenozilhomocistein (MTA/SAH) nukleozidazu, alternativni enzim koji uklanja SAH [23].

Rekonstrukcijom evolucije proteina SAHH, utvrđene su dvije glavne razlike u primarnoj strukturi proteina koji potječu iz različitih organizama [24]. Prva razlika uključuje dodatnih 40 aminokiselina u katalitičkoj domeni SAHH-a bakterija i nekolicine eukariota, pretežno biljaka, koje nisu prisutne kod većine eukariota i arheja. Funkcija im je zasada nepoznata, no pretpostavlja se da imaju ulogu u interakciji SAHH-a s drugim proteinima te u njegovoj staničnoj lokalizaciji kod biljaka [25]. Druga razlika uključuje kraći slijed od 8 aminokiselina u C-terminalnoj domeni proteina, koji nije prisutan kod arheja te služi za stabilizaciju interakcije SAHH-a i kofaktora NAD<sup>+</sup> kod eukariota i bakterija [20]. SAHH se nalazi u 100 najviše konzerviranih eukariotskih proteina, uz proteine koji su esencijalni za odvijanje osnovnih staničnih procesa kao što su RNA polimeraza II, ATPaza, GAPDH, ribosomalni proteini itd., a usporedbom SAHH-a iz kvasca i čovjeka, utvrđeno je poklapanje čak 70 % primarnog aminokiselinskog slijeda (Slika 3.) [26].



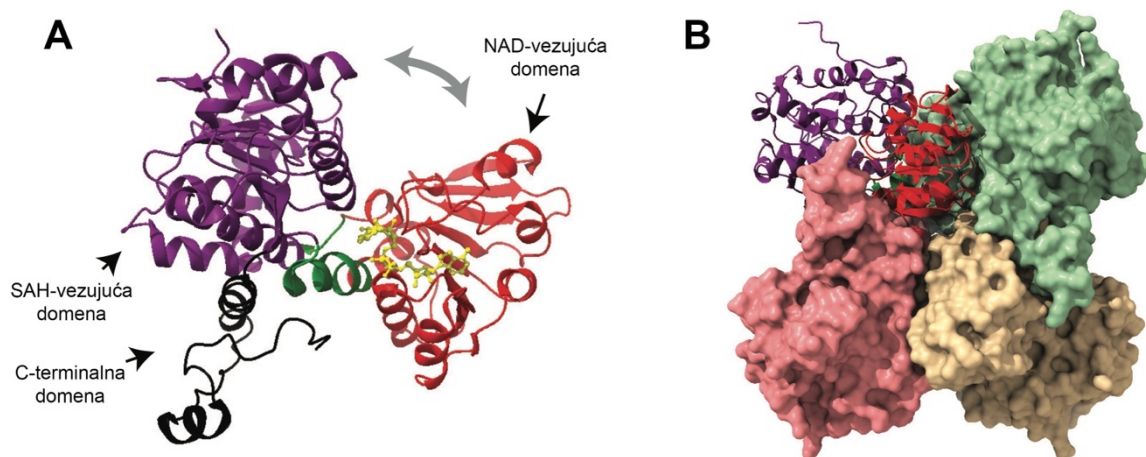
**Slika 3. Evolucijska i strukturna očuvanost enzima SAHH.** (A) Filogenetska analiza aminokiselinskih sekvenci proteina SAHH različitih organizama. Postoci predstavljaju podudarnost sa slijedom ljudskog SAHH-a (UniProt ID: P23526). Preuzeto i prilagođeno iz [24]. (B) Konzerviranost 160 različitih aminokiselinskih sljedova SAHH-a različitih organizama mapirana na strukturu monomera iz organizma *P. falciparum* i kodirana bojama (plava= potpuno poklapanje, crvena= najniži stupanj preklapanja). Crni isprekidani krug označava 40 aminokiselina dugu regiju katalitičke domene koja nije prisutna kod većine eukariotskih SAHH-a. Preuzeto iz [21].

### 1.2.3. Trodimenzionalna struktura SAHH

Prva trodimenzionalna struktura proteina SAHH izoliranog iz jetre štakora određena je 1999. godine metodom difrakcije X-zraka [27]. Nedugo nakon toga, objavljena je i kristalna struktura ljudskog SAHH-a s ligandima  $\text{NAD}^+$  i analogom adenzina [9]. Danas su poznate trodimenzionalne strukture SAHH-a iz mnogobrojnih organizama, od bakterija (*M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* itd.), patogenih eukariota (*P. falciparum*, *T. brucei* itd.) te eukariota, od biljaka do sisavaca (miš, čovjek, štakor itd.) [28].

Iako postoje razlike u primarnom slijedu proteina ovisno o promatranom organizmu, njihove trodimenzionalne strukture pokazuju da se u gotovo svim organizmima SAHH pojavljuje u obliku homotetramera [9,20,27]. Svaka podjedinica sastoji se od tri glavne domene; katalitička domena koja veže supstrat (SAH-vezujuća domena), domena koja veže kofaktor ( $\text{NAD}$ -vezujuća domena) i C-terminalna domena (Slika 4. A). Svaki monomer veže jednu molekulu supstrata ili produkta (SAH, tj. adenzin) i jednu nekovalentno vezanu molekulu kofaktora  $\text{NAD}^+$ . C-terminalne domene svake podjedinice služe za njihovu međusobnu interakciju, pri čemu domena jedne podjedinice sudjeluje u vezanju i stabilizaciji kofaktora druge podjedinice [20]. Istraživanjima u kojima je korištena metoda ciljane mutageneze, pokazano je da 426. lizin C-terminalne domene ima vrlo bitnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti enzima kao i u stabilizaciji njegove kvaterne strukture [29]. Sekundarne strukture dviju glavnih domena,  $\text{NAD}$ - i SAH-vezujućih domena, sastoje se od serije ponavljajućih  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -ploča, formirajući sekundarnu super-strukturu poznatu pod nazivom Rossmanov nabor (engl. *Rossmann fold*) [9]. Rossmanov nabor jedna je od najzastupljenijih super-sekundarnih struktura u prirodi, karakteristična za mnogobrojne proteine koji vežu nukleotide kao što su  $\text{NAD}$ -ovisne dehidrogenaze, enzimi koji pokazuju najveću strukturnu sličnost sa SAHH-om [30]. Smatra se da ova superstruktura spada u skupinu najstarijih sekundarnih motiva pradavnih proteinskih arhitektura [31]. Kvaterna struktura SAHH-a uključuje centar tetramera koji se sastoji od  $\text{NAD}$ -vezujućih domena različitih podjedinica, dok se SAH-vezujuće domene nalaze na njegovoj površini (Slika 4. B). S obzirom na prostornu udaljenost između ovih domena, na temelju strukturnih analiza i računalnog modeliranja poznatih struktura s i bez supstrata odnosno inhibitora, pokazano je da SAHH zauzima dvije različite konformacije; otvorenu (bez vezanog supstrata) i zatvorenu (s vezanim supstratom). Uslijed vezanja supstrata dolazi do konformacijskih promjena pri čemu se katalitička domena rotira za  $18^\circ$  oko spojnice dviju glavnih domena, pozicionirajući supstrat u blizini kofaktora, čime se omogućava početak njegove hidrolize odnosno reakcije oksidacije uz pomoć  $\text{NAD}^+$  [32].

Aminokiseline katalitičkog centra enzima uključuju konzervirane ogranke K185, D189, E155, D130 i H54 koji direktno sudjeluju u mehanizmu reakcije, a njihova izmjena drastično smanjuje aktivnost ljudskog enzima SAHH [19].



**Slika 4. Trodimenzionalna struktura monomera i tetramera proteina SAHH. (A)** Otvorena konformacija monomera ljudskog SAHH-a (PDB:4YVF) s vezanim kofaktorom NAD<sup>+</sup> (žuto). Tri glavne domene monomera označene su različitim bojama; SAH-vezujuća domena (ljubičasto), NAD-vezujuća domena (crveno) i C-terminalna domena (crno). Siva strelica označava konformacijsku tranziciju iz otvorene u zatvorenu konformaciju uslijed vezanja supstrata. **(B)** Zatvorena konformacija homotetramera SAHH. Preuzeto i prilagođeno iz [24].

### 1.3. Biološke uloge SAHH

Visoka evolucijska i strukturna očuvanost SAHH-a i njegova uloga u metabolizmu metionina ukazuju na univerzalnu zadaću ovog enzima u održavanju stanične homeostaze. SAHH se danas smatra esencijalnim enzimom čija aktivnost predstavlja kritičan parametar za funkciju stanice i normalan razvoj organizama [24]. Njegova esencijalna priroda potvrđena je mnogobrojnim studijama u kojima je pokazano da delecije gena *SAHH* i uvođenje mutacija s gubitkom funkcije (LoF, od engl. *loss of function mutations*) uzrokuju embrionalnu smrt miša [33,34], biljaka [35] i riba [36]. Također, farmakološka i genska inhibicija aktivnosti SAHH-a pokazuje negativan efekt na rast i razvoj biljaka te uzrokuje promjene globalnih metilacijskih profila DNA uz promjene u ekspresiji gena ključnih za normalni razvoj biljaka [37–39]. Kod miša, tretmani embrija kemijskim inhibitorima SAHH-a uzrokuju poremećaje u embriogenezi, smanjuju proliferaciju mišjih embrionalnih matičnih stanica (mESC) [40] i potiču njihovu spontanu diferencijaciju [41].

### 1.3.1. SAHH i stanična metilacija

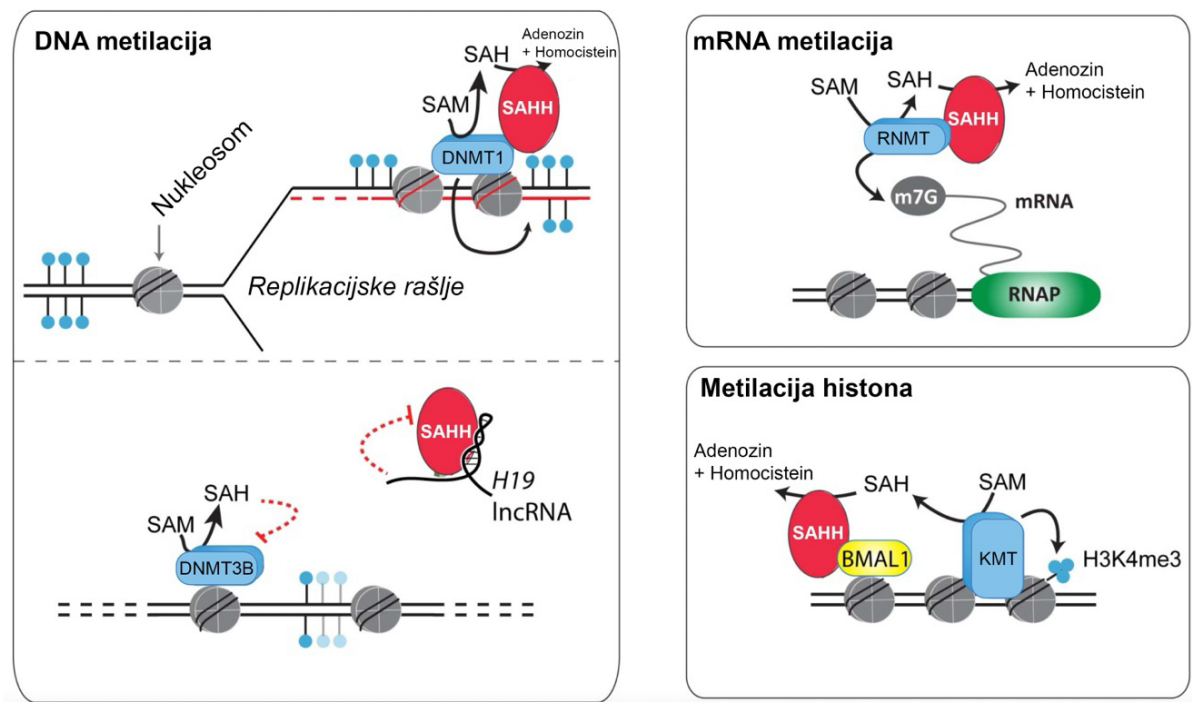
Uloga SAHH-a kao indirektnog, ali esencijalnog regulatora stanične metilacije, usmjerila je mnoga istraživanja ka boljem razumijevanju molekularne povezanosti SAHH-a i raznovrsnih staničnih metiltransferaza (MT), enzima koji kataliziraju ovu univerzalnu modifikaciju bioloških makromolekula. Smatra se da između 0,6-1,6 % ljudskih gena kodira za neku vrstu SAM-ovisnih metiltransferaza [42] koje se svrstavaju u tri osnovne kategorije ovisno o njihovim supstratima (DNA, RNA i proteini).

Obitelj DNA-metiltransferaza (DNMT1, DNMT3A i DNMT3B) odgovorne su za metilaciju genoma, jedne od najviše istražene epigenetske modifikacije sisavaca koja ima ključnu ulogu u njihovom razvoju i diferencijaciji stanica [43]. Ustanovljeno je da je SAHH direktan interakcijski partner metiltransferaze DNMT1 (Slika 5.), enzima koji održava globalni metilacijski profil prilikom replikacije molekule DNA, a njegova aktivnost je povećana u prisutnosti SAHH u uvjetima *in vitro* [44]. Metilacija DNA *de novo* katalizirana je metiltransferazama DNMT3A i DNMT3B, a aktivnost DNMT3B regulirana je putem, tzv. H19/SAHH-regulatorne petlje [45,46]. Duga nekodirajuća RNA (lncRNA, od engl. *long non-coding RNA*) H19 poznati je regulator ranog embrionalnog razvoja [47] i diferencijacije skeletnih mišica [48], a direktnim vezanjem na protein SAHH inhibira njegovu katalitičku aktivnost (Slika 5.) što posljedično uzrokuje globalne promjene u metilaciji staničnog genoma [46].

Druga skupina enzima, RNA-metiltransferaze, izuzetno su osjetljive na promjene u omjerima metabolita SAM-a i SAH-a [7] te je nekoliko studija potvrdilo povezanost aktivnosti SAHH-a i RNA-gvanin-7-metiltransferaze (RNMT) [49,50]. Ovaj enzim odgovoran je za metilaciju modificiranog gvanina na 5' kraju eukariotskih primarnih transkripata (preRNA), formirajući 7-metilgvanozin (m7G) ili tzv. 5' mRNA-kapu (Slika 5. B), koja ima ključnu ulogu u stabilizaciji transkripata, regulaciji njihovog nuklearnog transporta i u inicijaciji translacije [51]. Indirektan utjecaj SAHH-a na stabilnost i ekspresiju molekula RNA objašnjava već dugo poznati snažan antiviralni karakter farkamoloških inhibitora SAHH-a kod infekcije organizama RNA-virusima [52–56]. Smatra se da mehanizam njihovog antiviralnog djelovanja uključuje akumulaciju SAH-a i direktnu inhibiciju SAM-ovisnih RNA-metiltransferaza koje su esencijalne za virusnu replikaciju i širenje infekcije [56,57].

Uz metilaciju nukleinskih kiselina, metilacija aminokiselina jedna je od glavnih posttranslacijskih modifikacija proteina, a od posebnog je značaja metilacija aminokiselinskih ogranaka histona, lizina i arginina. Kovalentne modifikacije histona, kao što su fosforilacija,

acetilacija, ubikvitinacija i metilacija, utječu na kompaktnost kromatinskih struktura te time reguliraju ključne stanične procese kao što su replikacija, popravak i transkripcija molekula DNA [58]. Lizin metiltransferaze (KMT) kataliziraju mono-, di- i tri- metilaciju lizina, a do danas su najviše istražene metilacije specifičnih lizina histona H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79) te njihov funkcionalni utjecaj na strukturu kromatina i gensku ekspresiju [59]. Nedavno je utvrđeno da je na specifičnim kromatinskim pozicijama SAHH nalazi u direktnoj interakciji s transkripcijskim faktorom BMAL1, pozitivnim regulatorom transkripcije oscilatornih gena koji sudjeluju u održavanju cirkadijalnog ritma kod sisavaca [60]. Također je ustanovljeno da inhibicija SAHH-a smanjuje razine trimetilacije 4. lizina histona H3 (H3K4me3), epigenetske modifikacije koja potiče aktivnu transkripciju gena [61]. S mehanističkog stajališta, smatra se da interakcija SAHH-a i BMAL1-a osigurava lokalno uklanjanje SAH-a i pravilnu aktivnost metiltransferaze MML1, odgovornu za trimetilaciju histonske oznake H3K4 te time povezuje aktivnost SAHH-a i regulaciju ritmične transkripcije cirkadijalnih gena (Slika 5. C).



**Slika 5. Mehanizmi regulacije metilacije bioloških makromolekula djelovanjem SAHH-a.** (A) Utjecaj SAHH-a na metilaciju DNA *de novo* (dolje) i na kopiranje postojećih metilacijskih profila prilikom replikacije DNA (gore). (B) Metilacija molekula RNA prilikom posttranskripcijskog dodavanja 5' mRNA-kape. (C) Trimetilacija H3K4 pomoću lizin-metiltransferaze MML1 (KMT) i aktivacija transkripcije pomoću transkripcijskog faktora BMAL1 vezanog na SAHH. Preuzeto i prilagođeno iz [24].

### 1.3.2. Uloga SAHH u tumorima

Epigenetska kontrola genske ekspresije jedan je od glavnih mehanizama uspostavljanja jedinstvenih staničnih karakteristika (fenotipova) tijekom njihove diferencijacije, proliferacije i adaptacije na vanjske podražaje [62]. Značajna perturbacija metilacijskih profila DNA i histona, fenomen poznat kao epigenetsko reprogramiranje, također je jedno od glavnih obilježja tumorigeneze. Abnormalna metilacija uzrokuje promjene u ekspresiji gena pri čemu se aktiviraju inače utišani onkogeni, a inaktiviraju tumor supresori i geni odgovorni za popravak DNA. Epigenetsko reprogramiranje inicira i propagira zloćudnu transformaciju normalnih stanica te rezultira ispoljavanjem tumorskog fenotipa stanica kao što je replikacijska besmrtnost, nekontrolirani rast, povećana invazivnost, promjene staničnog metabolizma itd. [63].

S obzirom na to da SAHH regulira aktivnost mnogobrojnih metiltransferaza te time utječe na globalnu staničnu metilaciju, početkom 21. stoljeća započela su istraživanja funkcionalnih uloga SAHH-a u tumorima. Prva ispitivanja ekspresije gena *SAHH* u različitim tumorskim tkivima (bubreg, kolon, koža, gušterača itd.), utvrdile su njegovu značajno nižu ekspresiju u odnosu na zdravo tkivo, sugerirajući njegovu tumor supresorsku ulogu [64]. No, u narednim studijama utvrđeno je da je aktivnost SAHH-a bitna za održavanje tumorskih obilježja određenih vrsta stanica. Utvrđeno je da inhibicija aktivnosti SAHH-a u staničnim linijama karcinoma dojke uzrokuje smanjenu invazivnost i migraciju stanica [65,66] dok u neuroblastomima, inhibicija SAHH-a rezultira pojačanom apoptozom stanica [67,68]. Uz to, ispitivanjem promjena staničnog metabolizma tumorskih inicirajućih stanica (TICs, od engl. *tumor-initiating cells*) karcinoma pluća, utvrđena je značajna aktivacija ciklusa metionina predvođena povećanom ekspresijom metionin-adenoziltransferaze 2A (MAT2A), enzima koji prevodi metionin u SAM, a inhibicija SAHH-a uzrokovala je smanjene sposobnosti formiranja kolonija ovih stanica [69]. Navedena istraživanja ukazuju da određeni tumori posjeduju povećane potrebe za protokom metilne skupine u stanicama te da su njihova tumorska svojstva ovisna o enzimima i supstratima koji to omogućuju. Temeljem navedenih istraživanja, moguće je pretpostaviti da inhibicija SAHH-a posjeduje još neistraženi terapijski potencijal pri liječenju određenih vrsta tumora.

#### 1.4. Nedostatna aktivnost SAHH-a

Ključna uloga SAHH-a u normalnom razvoju ljudskog organizma potvrđena je otkrićem rijetke bolesti koja se naziva nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze (engl. *AHCY deficiency*). Rijetke bolesti su progresivna, često kronična i potencijalno letalna oboljenja koja zahvaćaju relativno mali postotak populacije u odnosu na ostale bolesti. Prema službenoj definiciji EU, bolesti se kategoriziraju kao rijetke ukoliko zahvaćaju ne više od jedne osobe na 2000 stanovnika [70]. Iako se njihova učestalost na individualnoj razini ne čini velika, procjenjuje se da otprilike 5 % svjetske populacije boluje od neke vrste rijetke bolesti [71]. Na temelju podataka iz javne baze Orphanet [72], do danas se preko 6000 različitih oboljenja definira kao rijetke bolesti, a većina njih uzrokovana je nasljednim genetskim varijacijama jednog ili više gena.

Nedostatna aktivnost SAHH-a (Orphanet ID: 8868) je rijetko metaboličko oboljenje uzrokovano mutacijama u genu *SAHH* koje rezultiraju inaktivacijom katalitičke sposobnosti enzima [73]. Prvi slučaj ovog oboljenja otkriven je 2004. godine kod hrvatskog pacijenta u dobi od 12 mjeseci, a glavni klinički simptomi uključivali su poremećaje u funkciji jetre, smanjen tonus mišića i zastoj u psihomotornom razvoju. [74] Najznačajnije promjene biokemijskih parametara bile su povišene razine metionina, aminotransferaza i kreatinkinaza (CK), uz iznenađujuće drastično povećanje metabolita SAH-a ( $150 \times$ ) i SAM-a ( $30 \times$ ) u odnosu na referentne vrijednosti. Biokemijska slika pacijenta nije se poklapala niti s jednim dotada poznatim oboljenjem, a karakteristično smanjenje omjera metabolita metionina SAM:SAH, upućivalo je na nepravilnu aktivnost enzima SAHH. Mjerenjem enzimatske aktivnosti utvrđeno je svega 3 % (hepatociti) odnosno 5-10 % (fibroblasti) aktivnosti SAHH-a u odnosu na kontrolne vrijednosti, a pretpostavljena dijagnoza u konačnici je potvrđena određivanjem nukleotidnog slijeda gena *SAHH* pacijenta i njegovih roditelja. Genetičkom analizom utvrđene su dvije različite mutacije na 4. eksonu kodirajućeg slijeda gena. Besmislena (engl. *nonsense*) mutacija c.336G>A, p.W112\*, koja uzrokuje preuranjeni terminacijski odnosno stop-kodon (PTC, od engl. *premature termination codon*), naslijeđena je od majke. Drugi alel gena *SAHH* koji potječe od oca, sadrži pogrešnu mutaciju koja izmjenjuje 143. aminokiselinu proteina iz tirozina u cistein, c.428A>G, p.Y143C. Terapijski pristup temeljio se na restriktivnoj metioninskoj dijeti uz suplementaciju fosfotidilkolina i kreatina. Modifikacija prehrane rezultirala je djelomičnim smanjenjem razina metionina, SAM-a i SAH-a, a normalizacija biokemijskih parametara bila je popraćena blagim poboljšanjem tonusa mišića i psihomotornog razvoja pacijenta.

Do danas je u literaturi opisano sveukupno 16 pacijenata s poremećajem nedostatne aktivnosti SAHH-a (Tablica 1.). Kompleksana patofiziologija ove rijetke bolesti vidljiva je na temelju širokog spektra kliničkih simptoma koji zahvaćaju različite organe i tkiva, pretežito jetru, mišiće i mozak. Kod većine pacijenata, no ne isključivo, simptomi se manifestiraju već pri rođenju, a u određenim slučajevima rezultiraju smrtnim ishodom (Tablica 1.- Pacijent 5,6,14,15,16). Glavna klinička obilježja obuhvaćaju kombinaciju mišićnih poremećaja (hipotonija, miopatija, skaropenija, hiporefleksija), neurorazvojnih poremećaja (hipomijelinizacija, mikrocefalija, zastoj psihomotornog razvoja) i disfunkciju jetre (blagi hepatitis, fibroza, hepatocelularni karcinom) [75]. Karakteristični biokemijski poremećaji uključuju hipermetionemiju (visoke razine metionina), povećane razine kreatin kinaze (CK) i metabolita SAM-a i SAH-a [76]. Težine kliničkih slika i biokemijskih poremećaja razlikuju se od pacijenta do pacijenta, a pretpostavlja se da ovise o funkcionalnom utjecaju mutacija gena *SAHH* odnosno o stupnju narušavanja aktivnosti i/ili ekspresije proteina [77].

**Tablica 1. Popis do danas opisanih slučajeva nedostatne aktivnosti SAHH-a s pridruženim dijagnostičkim, biokemijskim, genetskim i terapijskim parametrima.** Koncentracije metabolita SAM-a i SAH-a izražene su u odnosu na srednje vrijednosti referentnih raspona koncentracija (/ = nije dokumentirano ili mjereno).

Pacijent (referenca)	Postavljena dijagnoza (dob)	Biokemijski parametri		Genotip	Primjena terapije
		SAM	SAH		
1 [74]	12 mjeseci	30×	150×	W112*/Y143C	+
2 [78]	1 mjesec	1,6×	5×	W112*/Y143C	+
3 [79]	26 godina	20×	28×	A89V/Y143C	+
4 [80]	1 mjesec	1,8×	6,5×	W112*/Y143C	+
5 [81]	posthumno (novorođenče)	20×	80×	R49C/D86G	+
6 [82]	posthumno (novorođenče)	/	/	R49C/D86G	-
7 [83]	4,5 godine	20×	80×	R49C/G71S	+
8 [16]	8 mjeseci	55×	250×	Y328D/Y143C	+
9 [77]	posthumno (32 godine)	/	/	R49H/R49H	-
10 [77]	7 godina	40×	140×	R49H/R49H	+
11 [77]	posthumno (35 godina)	/	/	R49H/R49H	-
12 [77]	posthumno (17 godina)	/	/	R49H/R49H	-
13 [84]	2 dana	/	/	A89V/Y143C	-
14 [85]	posthumno (novorođenče)	/	/	Y328D/E108K	-
15 [75]	posthumno (novorođenče)	/	/	T57I/V217M	-
16 [76]	4 mjeseca (preminuo)	80×	160×	A48T/R36W	+



### 1.4.1. Terapijski pristup

Gotovo dva desetljeća nakon otkrića prvog pacijenta, preporučena terapija ostaje ista, restrikcija unosa metionina u svrhu smanjenja njegove koncentracije ispod 10  $\mu\text{mol/L}$ . Primarni cilj terapije je pokušaj normalizacije razina SAH-a, za koji se pretpostavlja da je glavni patološki čimbenik ovog oboljenja [86]. No, otkrićem novih slučajeva oboljenja te praćenjem ishoda terapije na većem uzroku pacijenata, pokazalo se da je njezina efikasnost varijabilna [76]. Do danas je sveukupno 9 pacijenata (Tablica 1.) podvrgnuto modifikaciji prehrane nakon postavljanja dijagnoze. Kod svih pacijenata, restriktivna dijeta imala je pozitivan učinak na povišene razine metionina, no snižavanje razina metabolita SAH-a i SAM-a evidentirano je kod svega nekoliko pacijenata. Usprkos smanjenju, ovi biokemijski parametri ostali su još uvijek značajno povišeni u odnosu na kontrolne vrijednosti. S kliničkog aspekta, blaga poboljšanja neuroloških simptoma i mišićnog tkiva primjećena su kod nekolicine pacijenata, no kod većine njih, neurorazvojni zastoj i disfunkcija jetre ostali su zamjetni, dok su dva pacijenta preminula unatoč vrlo ranoj primjeni terapije (Tablica 1.- Pacijent 5 i 16). Smatra se da ishodi terapije ovise o težini kliničke slike i dobi pacijenta u trenutku njezine primjene, a multisistemske karakteristike ovog oboljenja i potencijalna manifestacija bolesti *in utero* predstavljaju glavne prepreke u efikasnom liječenju ove rijetke bolesti [86].

Jedini alternativni terapijski pristup do danas je primijenjen u slučaju 8. pacijenta. Uključivao je transplataciju jetre kao glavnog metaboličkog organa ključnog za održavanje sistemskog omjera SAM:SAH u cijelom organizmu [16]. Pacijent je već pri samom rođenju pokazivao izrazito tešku kliničku sliku s cijelim nizom razvojnih i funkcionalnih poremećaja jetre, mozga i mišića. Razine metionina, SAM-a, a posebice SAH-a, bile su drastično povećane. Čak 250 puta veća koncentracija SAH-a izmjerena je u krvi pacijenta, što je dosada najveće zabilježeno povećanje ovog metabolita u literaturi (Tablica 1.). Preporučena dijetalna terapija primjenjena je vrlo brzo nakon postavljanja dijagnoze, no njezin učinak pokazao se nezadovoljavajući, stoga je predložena parcijalna transplantacija jetre kao alternativni pristup u pokušaju normalizacije povišenih biokemijskih parametara. Šest mjeseci nakon operativnog zahvata, ustanovljeno je značajno smanjenje razina metionina, SAM-a i SAH-a, uz primjetno poboljšanje ukupnih razvojnih sposobnosti pacijenta. Ovaj slučaj, zajedno s rastućim brojem novih pacijenata, jasno ukazuje na potrebu za boljim razumijevanjem patologije ovog poremećaja i primjenom novih, ciljanih terapija koje su u posljednjem desetljeću značajno uznapredovale, a neke se već aktivno koriste u liječenju drugih, bolje okarakteriziranih genetskih oboljenja [87–89].

## 1.5. Genetska raznolikost i podjela genetskih varijanti

Razvojem naprednih genomskih tehnologija u posljednjih 20 godina otkrivena je neočekivano visoka razina genetske raznolikosti unutar ljudske populacije. Genetske varijacije definiraju se kao promjene u primarnom slijedu molekule DNA koje mogu nastati spontano (*de novo*) ili su naslijeđene od roditelja. Dosadašnjim istraživanjima i usporedbama cjelokupnih genoma pojedinaca, ustanovljena je varijabilnost od otprilike 1 % ukupnog genoma između svakog čovjeka [90]. Genetske varijacije dijele se u više skupina, a uključuju varijante jednog nukleotida (SNV, od engl. *single nucleotide variant*), manje insercije i delecije (engl. *indels*) te veće strukturne varijante kao što su varijacije u broju kopija gena (CNVs, od engl. *copy number variants*) uz inverzije i translokacije većih dijelova kromosoma. Genetska raznolikost osnova je za odvijanje fundamentalnih evolucijskih procesa, čime se osigurava preživljenje živih organizama i očuvanje cjelokupnih vrsti. No, osim što predstavljaju glavni razlog fenotipske raznolikosti živog svijeta, genetske varijante mogu (in)direktno narušiti normalni razvoj i zdravlje cjelokupnog organizma te uzrokovati raznolika oboljenja.

SNV-ovi najviše doprinose genetskoj raznolikosti ljudske populacije, a nazivaju se i polimorfizmi jednog nukleotida (SNPs, od engl. *single nucleotide polymorphisms*) ukoliko je određena varijanta prisutna u više od 1 % populacije. S druge strane, osim tzv. čestih polimorfizama, razlikujemo i rijetke varijante čija je učestalost u populaciji manja od 1 %. [91] Varijante koje se nalaze unutar kodirajućeg slijeda gena i uzrokuju promjene aminokiselinskog slijeda ubrajaju se u skupinu, tzv. nesinonimnih (engl. *nonsynonymous*) nukleotidnih supstitucija, odnosno mutacija. Besmislene mutacije podskupina su nesinonimnih mutacija koje uzrokuju najdrastičnije promjene proteinskih sljedova. Ova vrsta mutacija uzrokuje PTC koji u konačnici rezultira skraćenim, vrlo često nefunkcionalnim proteinskim produktom. Druga skupina nesinonimnih mutacija uključuje pogrešne (engl. *missense*) mutacije koje uzrokuju izmjenu jedne aminokiseline u drugu aminokiselinu s potencijalno različitim fizikalno-kemijskim svojstvima (engl. *radical aminoacid change*). Pogrešne mutacije posljedično mogu imati drastičan utjecaj na fiziološke karakteristike proteina, modificirajući njihovu stabilnost, aktivnost, lokalizaciju, smatanje, inter- i intra- molekulske interakcije itd. [92]. Očiti potencijal nesinonimnih mutacija na izmjene fenotipa produbljuje potrebu za razumijevanjem njihovih funkcionalnih posljedica, posebice u kontekstu rijetkih bolesti i tumora, poremećaja koji su često uzrokovani genetskim čimbenicima.

### 1.5.1. Varijante gena *SAHH*

Ljudski gen koji kodira za protein SAHH (Ensembl ID :ENSG00000101444.13) nalazi se na 20. kromosomu na poziciji 20q11.22, prema aktualnoj verziji referentnog ljudskog genoma-GRCh38.p14/hg38. Kanonski transkript (Ensembl ID: ENST00000217426.7) sadrži 2154 parova baza, a sastoji se od 10 eksona koji kodiraju za 432 aminokiseline proteina SAHH prosječne molekulske mase od 47,7 kDa (UniProt ID: P23526).

Prema podacima javne baze genetskih varijanti dbSNP (izdanje 156), do danas je identificirano preko 500 različitih pogrešnih mutacija gena *SAHH* [93]. Nagli napredak tehnologija sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, od engl. *next-generation sequencing*), omogućio je generiranje velike količine genomskih podataka kao što su cjelokupni ljudski genomi i eksomi. Ovi podaci omogućili su uspostavu velikih referentnih populacijskih baza, kao što je gnomAD, koja sadrži podatke o učestalosti pojedinih genetskih varijanti u ljudskoj populaciji [94]. Baza gnomAD trenutno obuhvaća preko 15,000 ljudskih genoma i više od 125,000 eksoma (izdanje 2) te se neprestano proširuje. Općenito, referentne populacijske baze značajno unapređuju biološku interpretaciju genetskih varijanti i pomažu u identifikaciji i razlučivanju rijetkih, većinom patogenih, od čestih, nerijetko benignih varijanti [95].

Do danas je poznato sveukupno 13. različitih mutacija za koje se smatra da predstavljaju genetsku osnovu autosomno recesivnog poremećaja nedostatne aktivnosti SAHH-a (Tablica 2.). Pretpostavljeni patogeni karakter ovih mutacija temelji se na podudarnosti kliničkih i biokemijskih poremećaja oboljenja, teorijskog znanja o metaboličkim posljedicama disfunkcije SAHH-a i heterozigotnih genotipova koji su detektirani kod pacijenata (poglavlje 1.4.). Učestalost ovih mutacija u ljudskoj populaciji izuzetno je niska (<0,01 %), stoga se ubrajaju u skupinu izuzetno rijetkih varijanti koje u pravilu češće utječu na fenotip i imaju veću vjerojatnost izazivanja bolesti od manje rijetkih odnosno čestih varijanti [96,97]. Gotovo sve do danas poznate mutacije kodirajućeg slijeda gena *SAHH* spadaju u skupinu pogrešnih mutacija, uz dodatak jedne besmislene mutacije, p.W112\* (Tablica 2.). Prema bazi podataka kliničkog značaja varijanti ClinVar [98], trenutno se samo nekolicina mutacija nedvojbeno kategorizira kao patogene varijante (Tablica 2.). Preostale mutacije ili još nisu evidentirane u samoj bazi, zbog sve brže detekcije novih pacijenata i mutacija NGS-om, ili se još uvijek ubrajaju u skupinu tzv. varijanti nepoznatog značaja (VUS, od engl. *variants of uncertain significance*), primarno zbog nedostatka eksperimentalnih dokaza o njihovom (štetnom) funkcionalnom utjecaju.

**Tablica 2. Podaci o mutacijama koje uzrokuju oboljenje nedostatne aktivnosti SAHH-a.** Mutacije su poredane prema redoslijedu njihovog otkrića. Referentni i alternativni nukleotid (A,T,C,G) navedeni su za pojedinu mutaciju uz njihove pozicije unutar kanonskog transkripta gena *SAHH* (referentni genom GRCh37/hg19). Podaci o učestalosti mutacija izvedeni su iz baze gnomAD (izdanje 2.1.1). Klinički značaj izvedeni su iz baze ClinVar (podaci prikupljeni 17.08.2023.). Oznake i kratice: VUS= varijanta nepoznatog značaja, /= varijanta i/ili podatak nije evidentiran u bazi, \*= stop-kodon.

Redni broj	Aminokiselinska izmjena	Nukleotidna izmjena	dbSNP ID	Učestalost	Klinički značaj
1.	p.W112*	c.336G>A	rs121918607	/	Patogena
2.	p.Y143C	c.428A>G	rs121918608	$8,5 \times 10^{-5}$	Patogena
3.	p.A89V	c.266C>T	rs755222515	$1,6 \times 10^{-5}$	VUS
4.	p.R49C	c.145C>T	rs369428934	$2,8 \times 10^{-5}$	Patogena
5.	p.D86G	c.257A>G	rs773162208	$3,9 \times 10^{-5}$	Patogena
6.	p.G71S	c.211G>A	/	/	/
7.	p.Y328D	c.982T>G	rs748855369	$2,0 \times 10^{-5}$	VUS
8.	p.R49H	c.146G>A	rs563484762	$8,5 \times 10^{-5}$	/
9.	p.E108K	c.322G>A	rs1180386561	$8,5 \times 10^{-5}$	/
10.	p.T57I	c.170C>T	/	/	/
11.	p.V217M	c.649G>A	/	/	/
12.	p.A48T	c.142G>A	rs1279429799	$4,0 \times 10^{-6}$	VUS
13.	p.R36W	c.106C>T	/	/	/

### 1.5.2. Funkcionalne analize proteina SAHH

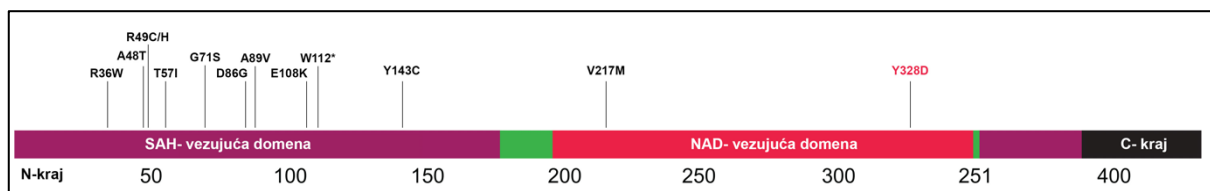
Funkcionalne analize temeljna su istraživanja molekularne biologije, biokemije i genetike, znanstvenih disciplina koje se bave proučavanjem uloga gena i proteina u biološkim sustavima. Ispitivanja fizioloških obilježja proteina poput strukture, enzimske aktivnosti, lokalizacije i međumolekulskih interakcija, pružaju uvid u njihovu biološku funkciju i ulogu unutar kompleksnih staničnih procesa. Danas se primjenjuju raznoliki metodološki pristupi u istraživanju funkcije gena i/ili proteina kao što su bioinformatičke *in silico* (prediktivne) metode, fluorescentna mikroskopija, imunoprecipitacija, kromatografija, masena spektrometrija, klasične metode rekombinantne DNA, testovi enzimske aktivnosti *in vitro* te novije metode visoke protočnosti (transkriptomika, metabolomika, proteomika itd.) [99]. Funkcionalne analize proteina od posebne su važnosti za razumijevanje molekularnih

posljedica genetskih mutacija. Samo jedna promjena aminokiseline može značajno destabilizirati nativnu strukturu proteina, poremetiti njegovu fiziološku ulogu i esencijalne stanične procese te time narušiti ljudsko zdravlje. Ispitivanja funkcionalnih utjecaja pogrešnih mutacija od posebnog su interesa jer predstavljaju ključnu kariku u razumijevanju povezanosti proteinskih struktura i njihove specifične funkcije. Također pomažu u razjašnjavanju temeljnih uzroka genetskih bolesti što unaprjeđuje kliničke ishode liječenja.

Laboratorij za naprednu genomiku (LNG) Instituta Ruđer Bošković sudjelovao je u otkriću prvog slučaja genetskog poremećaja nedostatne aktivnosti SAHH-a, a poseban doprinos imao je u analizi gena *SAHH* i identifikaciji prvih patogenih mutacija (p.W112\* i p.Y143C) [74]. U suradnji s ostalim stručnjacima, ekspertiza LNG-a u tehnikama rekombinantne DNA i heterologne ekspresije proteina, omogućila je prvu eksperimentalnu potvrdu o štetnom utjecaju mutacija na aktivnost ovog esencijalnog enzima [100]. Narednim otkrićima novih pacijenata i mutacija započet je sada već dugogodišnji niz proučavanja njihovog utjecaja na stabilnost i aktivnost SAHH-a u sklopu djelovanja LNG-a [81,83,101]. Uz to, primjenom novih metodoloških pristupa u analizi SAHH-a (stanični ekspresijski sustavi i visokoprotokne „omics“ metode) proširena su saznanja o njegovoj unutarstaničnoj lokalizaciji, interakcijama protein-protein i ulogama u esencijalnim staničnim procesima [102–104]. S kliničkog aspekta, analize mutiranih proteina *in vitro* pokazale su da stupanj inaktivacije proteina SAHH ovisi o razlikama fizikalno-kemijskih svojstva originalne i izmijenjene aminokiseline te je predložena korelacija težine biokemijskih i kliničkih poremećaja i genotipa [73]. Kod pacijenata koji imaju snažno ili potpuno inaktivirajuće mutacije (R49C- 7 % ili D86G- 15 %) bolest se u pravilu manifestira u vrlo ranoj dobi s potencijalno smrtnim ishodom, a karakterizirana je značajnim zastojem u razvoju i drastično povećanim razinama metabolita SAM-a i SAH-a (Tablica 1. Pacijent 1,2,4,5,6 i 7). S druge strane, pacijenti sa srednje ili slabo inaktivirajućim mutacijama (Y143C-25 %, A89V-23 %, R49H- pretpostavlja se slaba inaktivacija), tek su u odrasloj dobi počeli su pokazivati određene simptome bolesti (Tablica 1. Pacijent 3, 9, 11, 12).

Prije gotovo 10 godina, otkriven je pacijent s kombinacijom već poznate mutacije p.Y143C, identificirane kod prvog pacijenta, i nove pogrešne mutacije p.Y328D (Tablica 1.- Pacijent 8.) [16]. Osim jedne zajedničke mutacije (p.Y143C), ovi pacijenti imali su vrlo sličnu kliničku manifestaciju bolesti, karakteriziranu teškim multisistemskim poremećajima i do danas najvišim izmjerenim razinama metabolita SAM-a i SAH-a (Tablica 1.). Na temelju predložene korelacije genotipa i fenotipa bolesti, pretpostavljeno je da novotkrivena mutacija p.Y328D uzrokuje potpunu inaktivaciju proteina SAHH u mjeri koja je slična funkcionalnom

utjecaju besmislene mutacije p.W112\*, koja uzrokuje PTC. Besmislene mutacije općenito dovode do potpunog nedostatka funkcionalnog genskog produkta te su glavni uzrok mnogih nasljednih genetskih poremećaja poput cistične fibroze,  $\beta$ -talasemije i Duchenneove mišićne distrofije [105]. S jedne strane, preuranjena terminacija translacije zbog PTC-a rezultira sintezom skraćenih vrlo često nefunkcionalnih proteina. Uz to, na posttranskripcijskoj razini genske ekspresije, transkripti s PTC-om aktivno se uklanjaju kontrolnim mehanizmom NMD (od engl. *nonsense-mediated decay*), čime stanica već prije same translacije onemogućuje sintezu potencijalno štetnih proteina [106]. Novotkrivena mutacija p.Y328D ne uzrokuje PTC, već izmjenjuje 328. aromatski tirozin u negativno nabijeni aspartat, stoga molekularna osnova teškog fenotipa bolesti ovog pacijenta ostaje nejasna. Zanimljivo je da je većina ostalih pogrešnih mutacija grupirana unutar prvih 150 aminokiselina katalitičke domene proteina SAHH, dok se mutacija p.Y328D nalazi puno bliže C-kraju, u domeni koja veže kofaktor  $\text{NAD}^+$ , za koju je poznato da izgrađuje središte tetramerna SAHH-a (Slika 6.) [30]. Također je zanimljivo da unatoč višestrukim pokušajima, ekspresija rekombinantnog proteina s mutacijom p.Y328D u prokariotskim ekspresijskim sustavima nije bila uspješna te je rezultirala formiranjem netopljivih inkluzijskih tijela [104]. Kako bi se razjasnile molekularne poveznice između teškog kliničkog fenotipa i genotipa gena *SAHH*, glavni cilj ovog istraživanja je analizirati ekspresiju mutiranih gena na razini transkripata i proteina te istražiti molekularne mehanizme u pozadini pretpostavljenog potpunog nedostatka mutiranih genskih produkata. U sklopu ove disertacije, analizirati će se ekspresija tri mutacije; p.W112\*, p.Y328D i p.Y143C, kako bi se sveobuhvatno ispitaao genotip pacijenata koji boluju od težih oblika nedostatne aktivnosti SAHH-a. Pretpostavljeno uklanjanje transkripata s mutacijom p.W112\* po prvi put će se ispitati ovim istraživanjem, a glavni fokus je ispitivanje utjecaja pogrešne mutacije p.Y328D, za koju se pretpostavlja da dovodi do posttranslacijskog uklanjanja mutiranog proteina. Potrebu za razumijevanjem njezinog funkcionalnog utjecaja dodatno osnažuje otkriće novog pacijenta s mutacijom p.Y328D, koji je, nažalost, preminuo zbog zatajenja vitalnih organa samo 7 dana nakon rođenja [85].

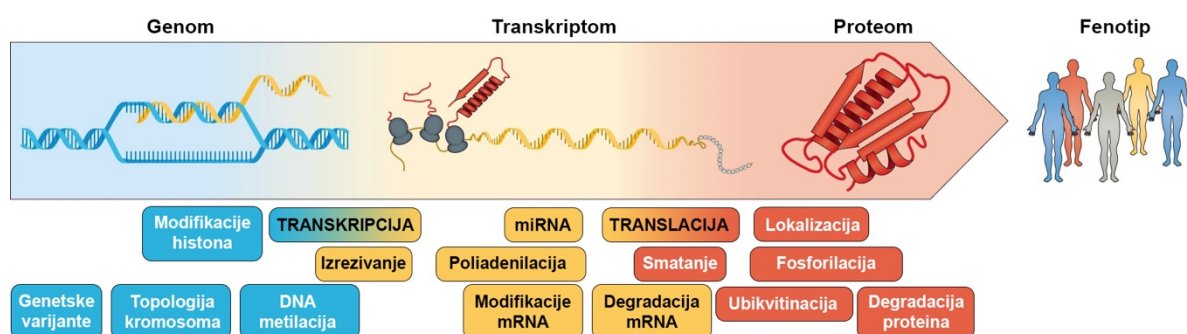


**Slika 6. Shematski prikaz primarnog slijeda proteina SAHH i pozicija poznatih patogenih mutacija.** Glavne proteinske domene označene su različitim bojama. Patogene mutacije označene su u odnosu na njihovu poziciju unutar aminokiselinskog slijeda proteina. Preuzeto i prilagođeno iz [24].

## 1.6. Stanični mehanizmi kontrole kvalitete genske ekspresije

Prijenos genske upute s molekula DNA (gena) u funkcionalne genske produkte naziva se genska ekspresija, a predstavlja temeljni mehanizam prevođenja genotipa u vidljiva obilježja organizma odnosno fenotip. Dva osnovna koraka genske ekspresije su sinteza molekula RNA (transkripcija) i sinteza proteina (translacija), no cjelokupni proces uključuje i njihovu kontroliranu razgradnju uz niz kompleksnih regulatornih mehanizama (Slika 7.) koji stanici omogućuju modulaciju ekspresije gena ovisno o njezinim potrebama [107].

Konačni produkti genske ekspresije najčešće su proteini, najzastupljenije biološke makromolekule poznate po svojoj strukturnoj raznolikosti koja im omogućuje obavljanje mnogobrojnih funkcija u stanici kao što su strukturiranje, kataliza, transport, skladištenje, signalizacija itd. Osiguravanje funkcionalnosti svih staničnih proteina (proteoma), ključno je za vijabilnost stanice i zdravlje cjelokupnog organizma. U svrhu očuvanja funkcionalnog transkriptoma i proteoma, stanice su razvile višestruke kontrolne mehanizme kojima nadgledaju kvalitetu cjelokupnog procesa genske ekspresije na više razina. Kontrola kvalitete staničnog transkriptoma provodi se mehanizmima nadzora molekula mRNA (engl. *mRNA surveillance*) dok se održavanje kvalitete proteoma odvija pomoću ubikvitin-proteasomskog sustava (UPS, od engl. *ubiquitin-proteasome system*) i autofagije [108,109].



**Slika 7. Shematski prikaz prevođenja genotipa u fenotip.** Temeljni mehanizmi genske ekspresije (transkripcija i translacija) s pridruženim regulatornim i kontrolnim mehanizmima koji moduliraju razine genskih produkata označeni su različitim bojama ovisno o razini na kojoj utječu na gensku ekspresiju. Preuzeto i prilagođeno iz [107].

### 1.6.1. Mehanizmi kontrole kvalitete transkriptoma

Metabolizam eukariotskih mRNA započinje njihovom sintezom u jezgri, prepisivanjem genske informacije pohranjene u molekuli DNA uz pomoć RNA-polimeraze II. Novosintetizirani primarni transkripti (pre-mRNA) dodatno se modificiraju kroz tri osnovna koraka njihove dorade; izrezivanjem introna (engl. *splicing*), dodavanjem 5'-kape i 3'-poliadenilacijskog signala (poli (A) rep). Ove modifikacije nužne su za stabilizaciju transkripata, njihov transport u citoplazmu i translaciju u konačne produkte genske ekspresije, proteine. Iako vrlo efikasni, navedeni mehanizmi nisu savršeni te nerijetko dolazi do sinteze pogrešnih transkripata koji nisu funkcionalni ili uzrokuju sintezu mutiranih, često štetnih proteina.

U staničnoj jezgri provodi se kontrola kvalitete genske ekspresije već na transkripcijskoj razini. Ovi mehanizmi primarno prepoznaju krivo doradene i nestabilne transkripte, zadržavaju ih u jezgri i usmjeravaju u kanonske degradacijske puteve, najčešće 3' → 5' eksonukleaznom razgradnjom eksosomima ili 5' → 3' razgradnjom eksoribonukleazom XRN1 [110]. S druge strane, transkripti s manjim greškama, najčešće točkastim mutacijama koje su prepisane s genoma ili su pak nastale pogreškama u transkripciji, uspješno se transportiraju u citoplazmu, a prepoznaju se tijekom prvog translacijskog ciklusa na ribosomima [111]. Tri osnovna posttranslacijska mehanizma kontrole kvalitete transkripata uključuju; degradaciju mRNA s besmislenom mutacijom (NMD, od engl. *nonsense-mediated decay*), degradaciju mRNA bez stop-kodona (NSD, od engl. *nonstop decay*) i degradaciju mRNA uslijed zastoja ribosoma (NGD, od engl. *no-go decay*).

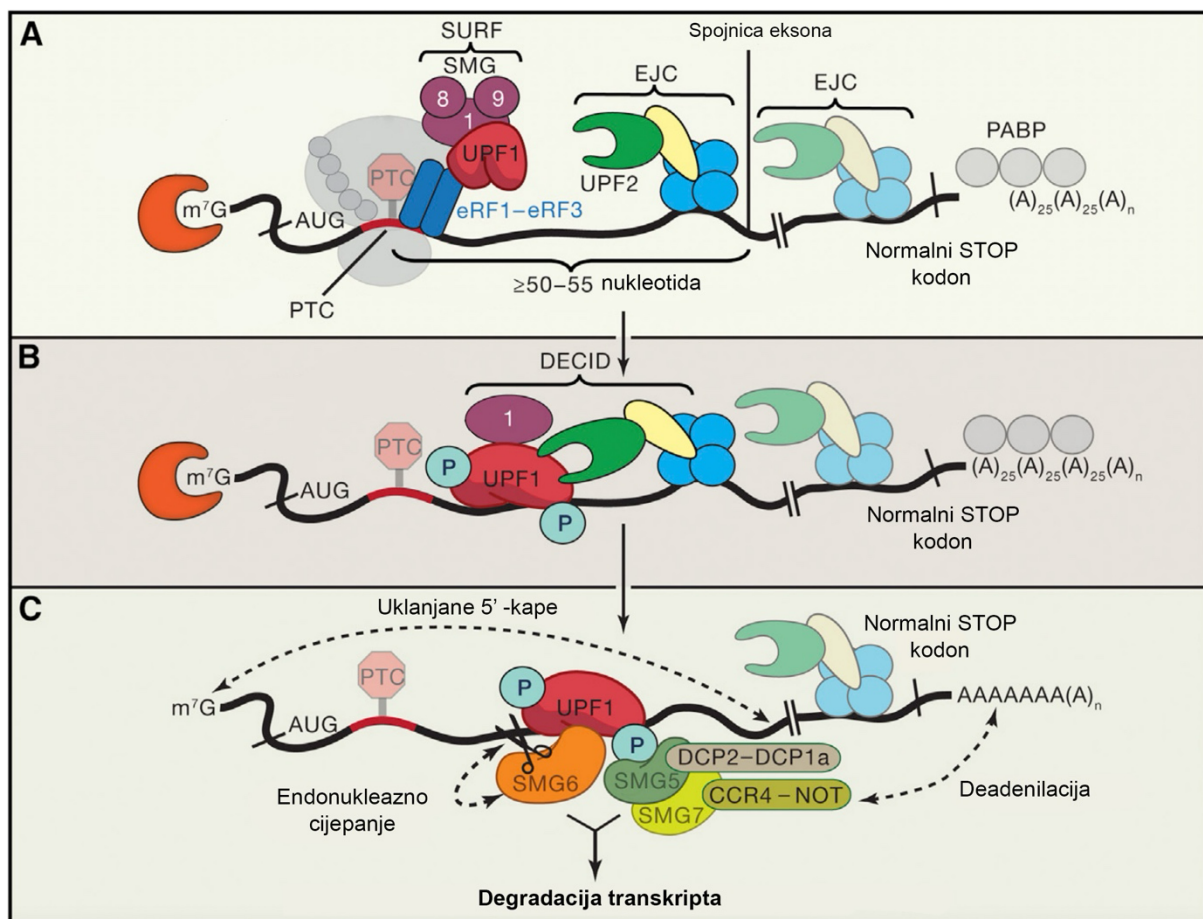
#### 1.6.1.1. Degradacija mRNA s besmislenom mutacijom (mehanizam NMD)

Inicijalno otkriven u kvascu *S. cerevisiae* [112] i modelnom organizmu *C. elegans* [112], a kasnije potvrđen u gotovo svim organizmima, od kvasca do sisavaca [113,114], NMD je zasigurno najviše istražen mehanizam kontrole kvalitete mRNA do danas, a odgovoran je za prepoznavanje i degradaciju transkripata koji sadrže PTC.

Kod eukariota, prepoznavanje PTC-a provodi se pomoću dva predložena modela; EJC-ovisnog i 3' UTR modela [111]. Model EJC (od engl. *exon-junction complex*) temelji se na prepoznavanju PTC-a koji se nalazi minimalno 50-55 nukleotida uzvodno od spojnice dva eksona (engl. *exon-exon junction*). Posttranskripcijskim izrezivanjem introna u jezgri dolazi do spajanja dva susjedna eksona i uzastopnog vezanja EJC-a koji služi kao molekularna oznaka spojnice eksona [115]. Tijekom prvog translacijskog ciklusa, stop-kodon uzrokuje zastoj translacijske mašinerije i ribosoma, a prisutnost nizvodnog EJC-a signalizira da se radi o PTC-



u nakon čega se pokreće aktivacijska kaskada mehanizma NMD (Slika 8 A). Aktivacija započinje formiranjem i vezanjem tzv. kompleksa SURF u blizini PTC-a. Kompleks SURF ključan je za odvijanje NMD-a, a sastoji se od terminacijskih faktora eRF1 i eRF3, kinaze SMG1, represora kinaze SMG8 i SMG9 te ATP-ovisne RNA-helikaze UPF1. Blizina kompleksa SURF i nizvodnog EJC-a pogoduje interakciji proteina UPF1 i UPF2, a ova interakcija aktivira helikaznu aktivnosti faktora UPF1 koji potiče odmatanje molekule RNA, disocijaciju represora SMG8 i SMG9 i fosforilaciju UPF1-a pomoću kinaze SMG1. Rezultirajući kompleks poznat je pod nazivom DECID (od engl. *decay-inducing complex*) (Slika 8. B). Fosforilacija UPF1-a predstavlja temeljni aktivacijski signal NMD-a. Omogućuje interakciju UPF1-a s faktorom eRF3 koja dovodi do terminacije translacije. Uz to, fosforilacija UPF1-a pokreće i degradacijsku mašineriju, predvođenu vezanjem endonukleaze SMG6 i ostalih degradacijskih faktora koji destabiliziraju transkript i u konačnici uzrokuju njegovu razgradnju u smjeru 5' → 3' i 3' → 5' (Slika 8 C.) [116].



**Slika 8. Aktivacija i provedba NMD-a putem EJC-ovisnog modela. (A)** Prepoznavanje PTC-a pomoću kompleksa SURF. **(B)** Fosforilacija UPF1-a i formiranje kompleksa DECID. **(C)** Terminacija translacije i degradacija transkripta s PTC-om. Oznake: m<sup>7</sup>G= 7-metilgvanozin, AUG= start-kodon, PTC= preuranjeni stop-kodon, eRF1/eRF3= terminacijski faktori, P= fosfatna skupina. Preuzeto i prilagođeno iz [116].

Iako je model EJC dobro istražen kod sisavaca, visoka aktivnost NMD-a u organizmima koji posjeduju vrlo malo introna, kao što je *S. cerevisiae*, ukazuje na postojanje alternativnih mehanizama aktivacije NMD-a, koji su neovisni o EJC-u. Drugi, manje istraženi model, temelji se na produženju dijela transkripta 3' UTR (od engl. *untranslated region*) zbog PTC-a. Smatra se da nakupljanje UPF1-a na 3' UTR-u uzrokuje kompeticiju između proteina UPF1 i PABP za vezanje terminacijskih faktora eRF1 i eRF3, čime se potiče preuranjena terminacija translacije i degradacija transkripta s PTC-om [117,118].

#### 1.6.1.2. Degradacija mRNA bez stop-kodona (mehanizam NSD)

Mehanizam NSD otkriven je 2002. godine u kvascu, a iste godine potvrđen je kod sisavaca [119,120]. Odgovoran je za degradaciju transkripata bez stop-kodona, koji najčešće nastaju nepravilnom poliadenilacijom ili endonukleaznim cijepanjem otvorenog okvira čitanja (ORF, od engl. *open reading frame*) transkripta [121]. Nedostatak stop-kodona dovodi do translacije poli-(A) repa 3'-kraja transkripta, uzrokujući zastoj ribosoma pri čemu dolazi do vezanja proteina Ski7, glavnog faktora mehanizma NSD, u prazno A-mjesto ribosoma. Ski7 ubraja se u skupinu adaptorskih proteina i strukturno je vrlo sličan terminacijskom faktoru eRF3, stoga njegovo vezanje u A-mjesto dovodi do disocijacije ribosoma. Ski7 također služi kao adaptor za eksosome, eksonukleazne komplekse koji razgrađuju transkript u smjeru 3' → 5'.

#### 1.6.1.4. Degradacija mRNA uslijed zastoja ribosoma (mehanizam NGD)

Posljednji u nizu, mehanizam NGD, identificiran je u kvascu, insektima i sisavcima [122–124]. Glavno obilježje ovog mehanizma je zastoj translacijsko elongacijskog kompleksa zbog stabilnih sekundarnih struktura transkripta ili prisutnosti rijetkih kodona koji uzrokuju prazno A-mjesto ribosoma [121]. Ključni regulatori ovog mehanizma uključuju proteine Dom34 (Pelota kod sisavaca) i Hbs1. Slično kao i prethodno spomenuti regulator NSD-a, Ski7, ovi proteini strukturno nalikuju terminacijskim faktorima eRF1 i eRF3. Strukturnim analizama pokazano je da se vežu u A-mjesto ribosoma i potiču razgradnju transkripta, iako točan mehanizam nije još razjašnjen. Nedavno je pokazano da je efikasnost NGD-a proporcionalna gustoći zastalih ribosoma, a pretpostavlja se da njihovi sudari aktiviraju zasada još nepoznate endonukleaze koje cijepaju transkript i omogućuju njegovu razgradnju [125].

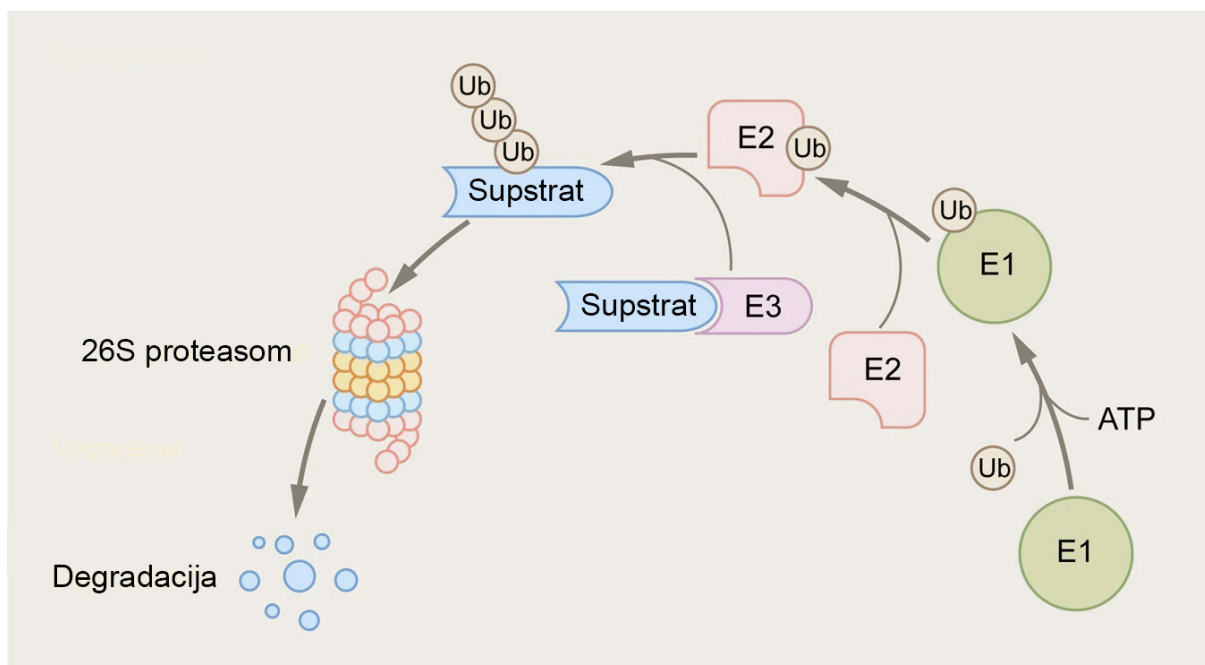
## 1.6.2. Mehanizmi kontrole kvalitete proteoma

Proteini su temeljne građevne jedinice stanice i zasigurno najznačajnije biološke makromolekule. Održavanje ravnoteže staničnog proteoma, poznato pod nazivom proteostaza, od temeljne je važnosti za vijabilnost stanice i zdravlje cjelokupnog organizma. S obzirom na to da je biološka funkcija proteina definirana njihovom trodimenzionalnom strukturom, krivo smotani i nefunkcionalni proteini narušavaju staničnu proteostazu i dovode do patoloških stanja kod čovjeka. Danas je poznato da je upravo nakupljanje krivo smotanih proteina molekularna osnova mnogih metaboličkih oboljenja, raka, a posebice neurodegenerativnih poremećaja (Alzheimer, Parkinson, Huntington, Amiotrofične lateralne skleroze itd.) [109]. Centralnu ulogu u kontroli kvalitete proteoma imaju molekularni šaperoni, raznolika skupina proteina koja sudjeluje i potpomaže u smatanju proteina, njihovom prometovanju kroz stanicu i usmjeravanju u degradacijske puteve [126]. Dva najčešća mehanizma degradacije proteina uključuju UPS i autofagiju, a njihova glavna razlika je veličina staničnih supstrata koje ovi sustavi razgrađuju.

### 1.6.2.1. Ubikvitin-proteasomski sustav (UPS)

UPS je najpoznatiji degradacijski mehanizam koji osigurava ciljanu i kontroliranu razgradnju većine staničnih proteina (> 80 %) [127]. Također je odgovoran za uklanjanje krivo smotanih i oštećenih proteina, čime predstavlja temeljni mehanizam održavanja kvalitete staničnog proteoma [128,129]. Selektivna degradacija proteina UPS-om uključuje dva osnovna procesa; obilježavanje proteina predodređenih za razgradnju ubikvitinom te njihovo proteolitičko cijepanje katalizirano proteasomom 26S [130]. Proteasom je veliki proteinski kompleks koji se sastoji od dvije podjedinice; ATP-ovisne regulatorne kape 19S i proteolitičke jezgre 20S. Regulatorna podjedinica primarno služi za prepoznavanje ubikvitiniranih proteina i njihovo usmjeravanje u proteolitički centar proteasoma koji katalizira njihovu razgradnju na kratke peptide [131,132]. Prije same razgradnje, proteini se kovalentno modificiraju ubikvitinom, visoko konzerviranim polipeptidom koji se sastoji od 76 aminokiselina. Ubikvitinacija proteina odvija se putem reakcijske kaskade koja uključuje tri skupine enzima; E1- enzimi za aktivaciju ubikvitina, E2- enzimi za prijenos i konjugaciju ubikvitina i E3- ubikvitinske ligaze [128]. Kaskada započinje aktivacijom C-terminalnog glicina ubikvitina uz pomoć ATP-a i enzima E1. Aktivirani ubikvitin zatim se prenosi pomoću enzima E2 do proteinskog supstrata vezanog na enzim E3. Konačno, E3-ubikvitinska ligaza katalizira stvaranje izopeptidne veze između aktiviranog C-terminalnog glicina ubikvitina i bočne amino-skupine lizina supstrata (Slika 9.)

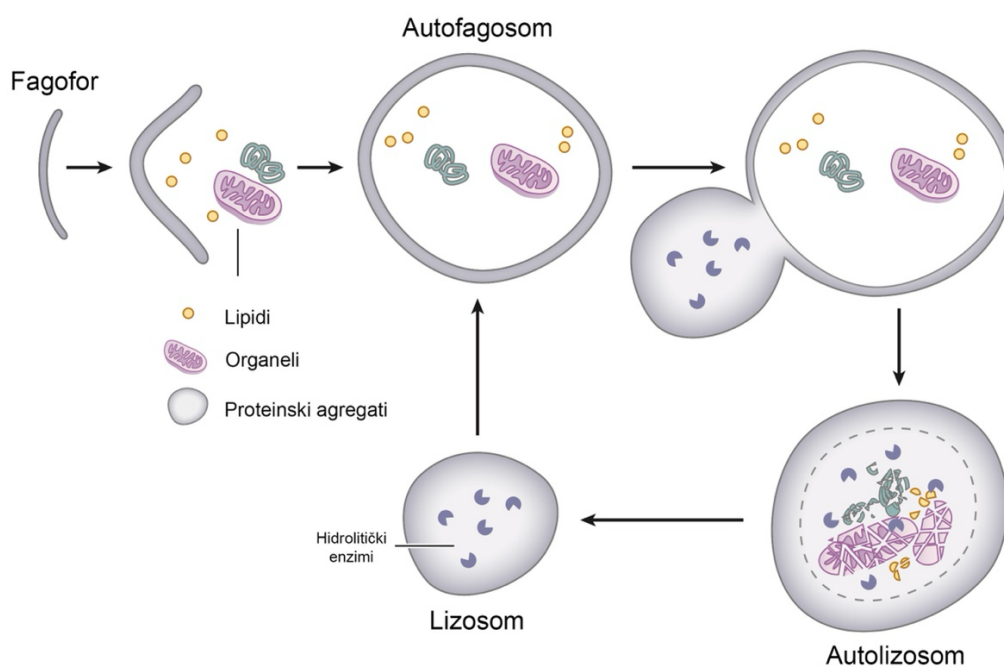
[129]. Enzimi E3 ključna su karika ove kaskade, s obzirom na to da direktnim vezanjem na supstrat reguliraju specifičnost i efikasnost ubikvitinacije, a time i cjelokupnog degradacijskog mehanizma. Esencijalna uloga enzima E3 odražava se i u njihovoj raznolikosti u odnosu na ostale dvije skupine proteina. Do danas je poznato preko 600 različitih E3-ubikvitinskih ligaza, za razliku od svega 50-ak enzima E2 i samo 2 enzima E1 kod čovjeka [128,133]. Zbog njihove izuzetne raznolikosti, E3-ubikvitinske ligaze dijele se u nekoliko skupina na temelju njihovih strukturnih i funkcionalnih razlika. Dvije najpoznatije skupine uključuju E3-ligaze HECT (od engl. *Homologus to E6AP C-Terminus*) i RING (od engl. *Really Interesting New Gene*). Ubikvitinacija proteina općenito, u kontekstu njihove posttranslacijske modifikacije, također je izuzetno funkcionalno i strukturno raznolika. Naime, osim dodatka jednog ubikvitina (monoubikvitinacija), njihovom uzastopnom konjugacijom preko vlastitih lizinskih ogranaka (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63) mogu nastati raznoliki (linearni i razgranati) poliubikvitinski lanci [134]. Danas je poznato da različite poliubikvitinske strukture imaju specifične funkcionalne uloge u različitim staničnim procesima kao što su stanična signalizacija, transport proteina, popravak DNA, kontrola staničnog ciklusa te već spomenuta degradacija proteina [134,135]. Najviše istraženi i najčešći oblik povezivanja ubikvitina u lance je preko 48. lizina (K48) koji je odgovoran upravo za obilježavanje degradacijskih supstrata za razgradnju 26S-proteasomom [130].



**Slika 9. Reakcijska kaskada UPS-a.** Oznake: E1= enzim za aktivaciju ubikvitina, Ub= ubikvitin, ATP= adenzin-trifosfat, E2= enzim za prijenos i konjugaciju ubikvitina, E3= ubikvitinska ligaza. Preuzeto i prilagođeno iz [136].

### 1.6.2.2. Autofagija

Za razliku od UPS-a kojim se razgrađuju manji, kratkoživući proteini, autofagija je zadužena za uklanjanje nepoželjnog staničnog materijala čija veličina prelazi prostorni kapacitet proteasoma, kao što su proteinski agregati, oštećeni i nefunkcionalni organeli te patogeni organizmi [137]. Autofagija obuhvaća proces dopremanja i razgradnje staničnog materijala pomoću lizosoma, citoplazmatskog organela koji u lumenu sadrži preko 60 različitih hidrolitičkih enzima (proteaze, nukleaze, lipaze itd.) [138]. Glavni regulatori autofagije uključuju 16-20 konzerviranih proteina ATG (od engl. *autophagy related genes*) koji su nužni za odvijanje cjelokupnog procesa, od formiranja autofagosoma do njegovog spajanja s lizosomom [139]. Danas su poznata tri osnovna tipa autofagije kod sisavaca; makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima (CMA, od engl. *chaperone-mediated autophagy*). Iako je degradacija lizosomima zajedničko obilježje svih vrsta autofagije, njihova osnovna razlika je u načinu dopremanja materijala koji je potrebno razgraditi. Makroautofagija je do danas najbolje istražena, a karakterizira ju stvaranje membranske strukture koja se naziva fagofor. Sazrijevanje fagofora dovodi do zarobljavanja citoplazmatskog sadržaja i formiranja autofagosoma, koji se u konačnici stapa s lizosomom, gdje se zarobljeni stanični materijal razgrađuje i reciklira (Slika 10.) [137]. U početku se smatralo da je autofagija mehanizam prilagodbe na stanični stres, no danas je poznato da se odvija i pri fiziološkim uvjetima te da sudjeluje u održavanju stanične homeostaze i prevenciji bolesti kao što su tumori, kronične upale i neurodegenerativne bolesti [140,141].



**Slika 10. Prikaz osnovnih koraka makroautofagije.** Preuzeto i prilagođeno iz [137].

## 2. CILJEVI I HIPOTEZA

Glavni cilj doktorske disertacije je istražiti učinak mutacija p.Y328D, p.W112\* i p.Y143C na ekspresiju gena *SAHH* i razjasniti molekularne mehanizme u pozadini dva teška slučaja nedostatne aktivnosti SAHH-a. Poznavanje funkcionalnih utjecaja mutacija od temeljne je važnosti za razumijevanje njihovog kliničkog značaja te doprinosi poboljšanju dijagnostičkih i prognostičkih postupaka za buduće pacijente. Razjašnjavanje molekularnih procesa u pozadini oboljenja otvara vrata razvoju i primjeni ciljanih terapijskih pristupa.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Analizirati ekspresiju SAHH-a na razini transkripata i proteina u fibroblastima prvog (W112\*/Y143C) i osmog (Y328D/Y143C) pacijenata.
2. Provesti izvanstaničnu ekspresiju rekombinantnih proteina SAHH *in vitro* i analizirati prinos različitih mutanata.
3. Pripremiti i analizirati stanične modele stanica Hek293, HepG2 i SW480 sa stabilnom ekspresijom mutiranih proteina EGFP-SAHH -WT/W112\*/Y328D/Y143C.
4. Sekvencirati transkriptome (mRNAseq) fibroblasta pacijenata i potvrditi nedostatak transkripata s mutacijom W112\* kvantifikacijom ekspresije pojedinog alela.
5. Analizom diferencijalno eksprimiranih gena u staničnim modelima pokušati razjasniti temeljni mehanizam odgovoran za nedostatak ekspresije proteina SAHH-Y328D.
6. Potvrditi pojačano uklanjanje proteina SAHH-Y328D kemijskom inhibicijom pretpostavljenog mehanizma uporabom pripremljenih staničnih modela.
7. Analizom stabilnosti mutiranih proteina *in silico* ispitati utjecaj mutacije Y328D na strukturni integritet proteina SAHH.

**Hipoteza istraživanja:** Mutacije povezane s teško bolesnim pacijentima uzrokuju aktivaciju kontrolnih mehanizama genske ekspresije koji rezultiraju staničnim uklanjanjem mutiranih genskih produkata i smanjenjem opće razine proteina SAHH u eukariotskim stanicama.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Oligonukleotidi

Za provedbu ciljane mutageneze, kvantitativnog PCR-a i kloniranja kodirajućih sljedova proteina SAHH u plazmidne vektore, oligonukleotidi su korišteni kao početnice za reakcije lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*). Njihova sinteza i pročišćavanje provedeno je od strane dobavljača, tvrtke Macrogen. Pročišćeni oligonukleotidi dostavljeni su u liofiliziranom obliku nakon čega su otopljeni u prikladnom volumenu ultračiste vode (mqH<sub>2</sub>O, od engl. *Milli-Q water*) u svrhu pripreme izvornih otopina početnica koncentracije 100 μM.

**Tablica 3. Popis korištenih oligonukleotida.** Usmjerenje početnice naznačeno je slovom F (od engl. *forward*) za nizvodne početnice, i R (od engl. *reverse*) za uzvodne početnice. Crvenom bojom označeni su nukleotidi koji se izmjenjuju u sklopu ciljane mutageneze. Oznaka „FAM“ predstavlja fluorofor (6-karbonsifluorescein) na 5'-kraju hidrolizirajuće probe.

Naziv početnice	Nukleotidni slijed, 5' → 3'	Svrha
IVT-SAHH-NdeI-F	CGACCATATGTCTGACAAACTGCC	Kloniranje cDNA SAHH WT u plazmid pT7CFE1-NFtag
IVT-SAHH-BglII-R	AGTCAGATCTTCAGTAGCGGTAG	
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Provjera kloniranja plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
SAHH-W112*-F	GAGGAGTACCTGTGATGCATTGAGCAG	Ciljana mutageneza c.336G>A, p.W112*
SAHH-W112*-R	CTGCTCAATGCATCACAGGTA CTCTC	
SAHH-Y328D-F	AGGTGGACCGGATCGGTTGAAGAATG	Ciljana mutageneza c.982T>G, p.Y328D
SAHH-Y328D-R	GCGGCTTGATGTTACCTTCTCCAC	
SAHH-Y143C-F	CATCCACACCAAGTCCCGCAGCTTCTG	Ciljana mutageneza c.428A>G,p.Y143C
SAHH-Y143C-R	AGGTTGGTGAGGTCGCCCCGTCG	
pLJM-SAHH-EcoRI-F	GCTGAATTCTTCTGACAAACTGCC	Kloniranje cDNA SAHH u lentivirusni plazmid pLJM-EGFP
pLJM-SAHH-EcoRI-R	ACTGGAATTCTCAGTAGCGGTAG	
ACTN-F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	Komplet početnica i probe za RT-qPCR β-aktina
ACTN-R	GCAATTTGCGGTGGACGAT	
ACTN-P	(FAM)AGGAGTATGACGAGTCCGGCCCC	

### 3.1.2. Protutijela

Protutijela su korištena su za analizu ekspresije proteina metodom western blot. Protutijela su razrijeđena u puferu za blokiranje (5 %-tno mlijeko u TBS-T-u) prema Tablici 4.

**Tablica 4. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela.** Sekundarna protutijela obilježena su peroksidazom iz hrena (HRP, od engl. *horseradish peroxidase*).

Naziv	Porijeklo	Razrijeđenje	Proizvođač
protu-SAHH	Zec	1:5 000	Abcam (ab134966)
protu-GAPDH	Zec	1:10 000	Abcam (ab16891)
protu-FLAG	Zec	1:1 000	Abcam (ab205606)
protu-p53	Miš	1:2 000	Santa Cruz (sc-126)
protuzec-HRP	Koza	1:5 000	Abcam (ab205718)
protumiš-HRP	Rekombinantni	1:5 000	Santa Cruz (sc-525409)

### 3.1.3. Antibiotici

Antibiotici su korišteni za probir bakterijskih i eukariotskih stanica koje su uspješno unijele željenu plazmidnu DNA kod transformacijskih i transdukcijskih eksperimenata. Korišteni su sljedeći antibiotici:

- **Ampicilin**- probir pozitivnih bakterijskih klonova kod kloniranja i umnažanja plazmida pT7CFE-NFTag iz stanica *NEB 5-alpha Competent E. coli* i plazmida pLJM-EGFP-SAHH iz stanica *NEB Stable Competent E. coli*;
- **Tetraciklin**- probir pozitivnih bakterijskih klonova kod kloniranja i umnažanja plazmida pLJM-EGFP-SAHH iz stanica *NEB Stable Competent E. coli*;
- **Puromicin**- probir pozitivnih eukariotskih stanica nakon transdukcije staničnih linija lentivirusima.

### 3.1.4. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi *E. coli* korišteni su za umnažanje i izolaciju plazmidna.

- **NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)** (New England Biolabs, SAD)- *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA gln Φ80Δ(lacZ)M15 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*;
- **NEB® Stable Competent E. coli** (New England Biolabs)- *F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzzf:Tn10 (TetR)/Δ(ara-leu) 7697 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 (StrR) rph spoTI Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*.



### 3.1.5. Stanične linije

Fibroblasti osmog pacijenta s karakterističnom mutacijom c.982T>G, p.Y328D dobiveni su u suradnji s dr. sc. Harvey Mudd (National Institute of Mental Health, Laboratory of Molecular Biology, Bethesda, SAD) i Kevin A. Strauss, MD (Clinic for Special Children, Strasburg, SAD). Pripadajući kontrolni fibroblasti zdrave osobe istog spola i slične dobi kao pacijent dobiveni su od dr. sc. Ksenije Fumić (Klinički bolnički centar, Zagreb, Hrvatska).

Fibroblasti prvog pacijenta s karakterističnom mutacijom c.336G>A, p.W112\* i prikladni kontrolni fibroblasti zdrave osobe prikupljeni su u suradnji s prof. dr. sc. Ivo Barić (Klinički bolnički centar, Zagreb) u sklopu dijagnostičkih obrada provedenih tijekom otkrića oboljenja 2004. godine.

Za izradu modelnih staničnih sustava koji stabilno ekspimiraju mutirane proteine SAHH korištene su sljedeće linije;

- **293T** (CRL-3216, ATCC)- derivat stanične linije ljudskih embrionalnih stanica bubrega (Hek293) s ugrađenim SV40 T-antigenom;
- **Hek293** (CRL-1573, ATCC)- stanična linija ljudskih embrionalnih stanica bubrega imortalizirana ugradnjom fragmenata DNA adenovirusa 5 (Ad5) u genom stanice;
- **HepG2** (HB-8065, ATCC)- stanična linija ljudskog hepatocelularnog karcinoma;
- **SW480** (CCL-228, ATCC)- stanična linija ljudskog kolorektalnog karcinoma.

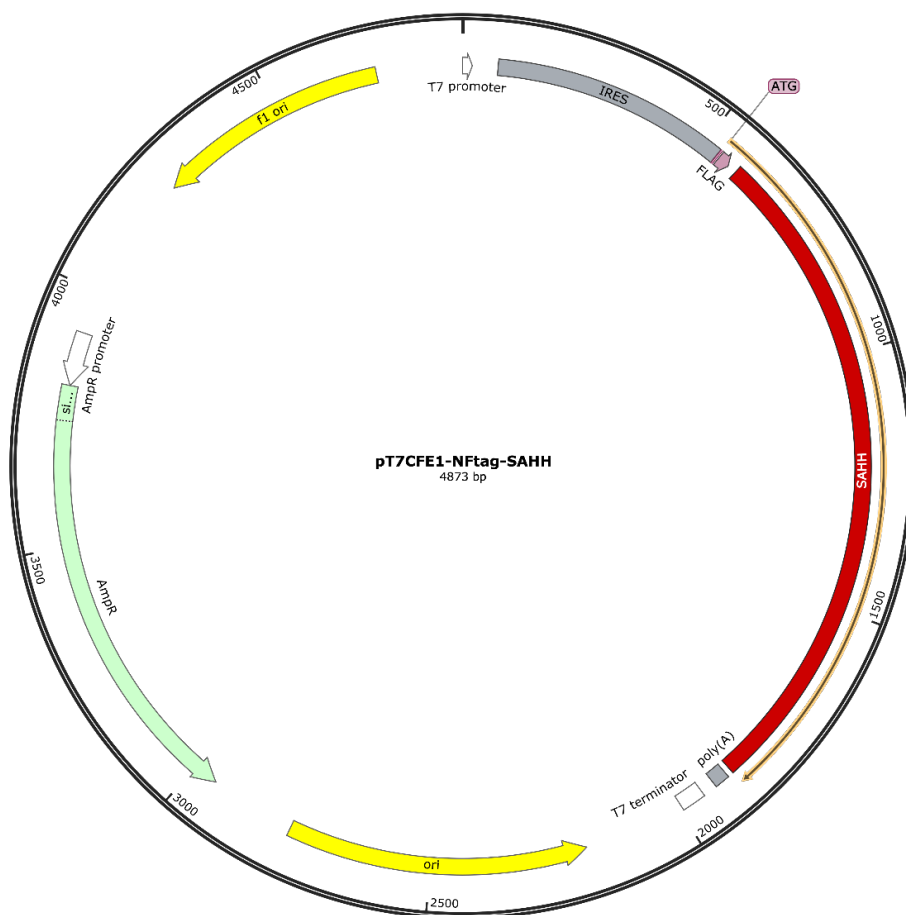
### 3.1.6. Plazmidni vektori

Plazmidi, male cirkularne molekule DNA, korišteni su kao vektori za prijenos kodirajućeg slijeda *SAHH* u eukariotske stanice i kao kalup za provođenje reakcija transkripcije i translacije *in vitro*. Svaki vektor, uz željeni insert, sastoji se od okosnice (engl. *backbone*) DNA koja sadrži dodatne funkcionalne nukleotidne sljedove prikladne primjeni plazmidnog vektora kao npr. izvorište replikacije, promotorske sekvence kod ekspresijskih vektora, slijed koji kodira za antibiotsku rezistenciju, polipeptidne biljege na N- ili C- kraju transgena itd. U nastavku su navedene okosnice plazmidnih vektora korištene u ovom istraživanju:

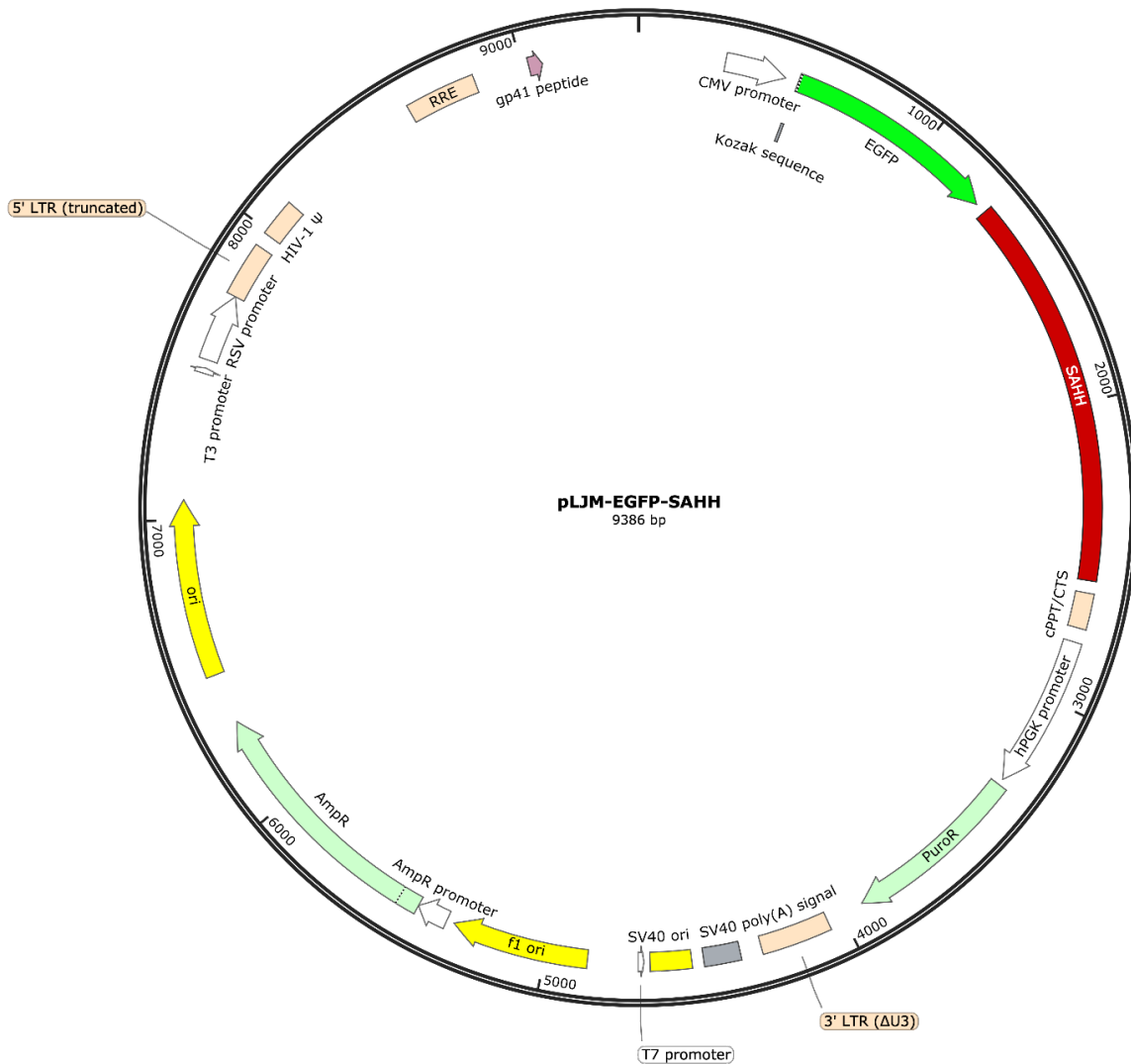
- **pT7CFE1-NFtag** (Thermo Fisher Scientific, SAD)- ekspresijski vektor prikladan za uzastopno provođenje reakcija *in vitro*-transkripcije i translacije cDNA SAHH s karakterističnim polipeptidnim biljekom FLAG na N- kraju za detekciju sintetiziranog proteina (Slika 11.);
- **pLJM-EGFP** (AddGene\_19319)- lentivirusni plazmid za prijenos cDNA SAHH u lentivirusne čestice i eukariotske stanice (Slika 12.). Karakteristične sekvence dugih

terminalnih ponavljanja (LTR, od engl. *long terminal repeats*) omogućuju integraciju dijela nukleotidnog slijeda plazmida u genom stanice domaćina. Ubraja se u treću generaciju lentivirusnih prijenosnih vektora i zahtjeva dodatne pomoćne plazmide za proizvodnju funkcionalnih lentivirusa;

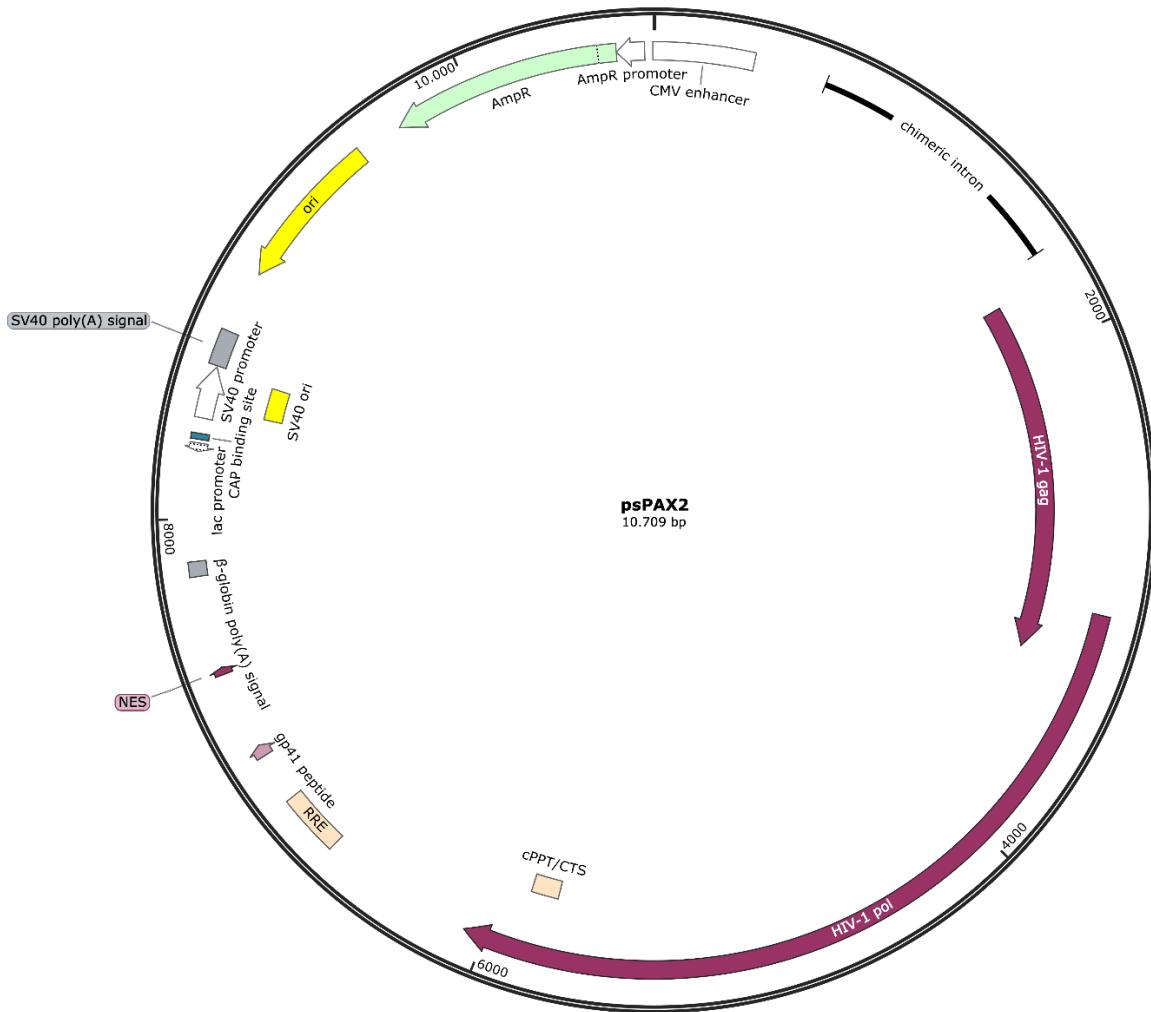
- **psPAX2** (AddGene\_12260)- lentivirusni pakirajući plazmid druge generacije koji sadrži nukleotidne sljedove virusa HIV-1 koji kodiraju za proteine potrebne za strukturiranje i replikaciju lentivirusa (Slika 13.);
- **pMD2.G** (AddGene\_12259)- lentivirusni plazmid koji sadrži kodirajuće sljedove sastavnih dijelova virusne ovojnice koji omogućuju njezinu fuziju s membranom stanice domaćina (Slika 14.).



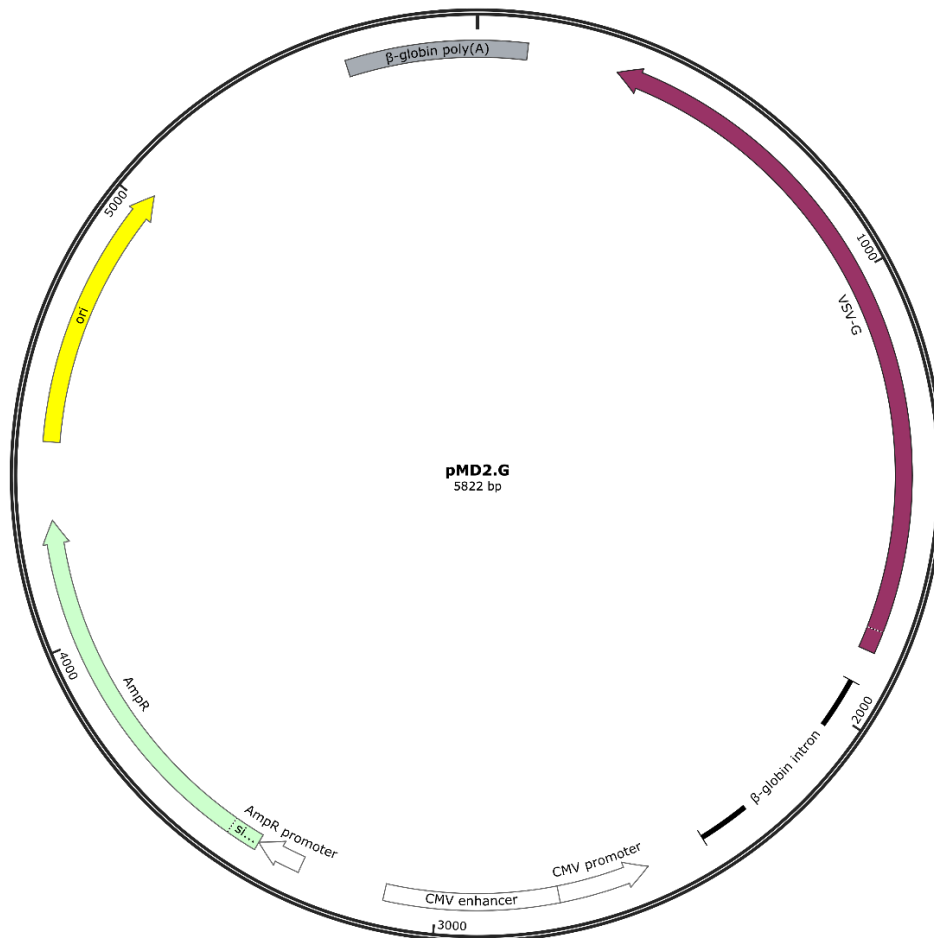
**Slika 11. Mapa rekombinantnog plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH.** Veličina plazmida iznosi 4873 parova baza. Geni i funkcionalni nukleotidni sljedovi: **SAHH**, cDNA proteina SAHH (crveno); **FLAG**, peptidni biljeg (svjetlo ljubičasto); **IRES**, unutarnje mjesto ulaska u ribosom (sivo); **T7 promoter**, promotorski slijed RNA polimeraze T7 bakteriofaga (bijelo); **T7 terminator**, slijed završetka transkripcije (bijelo); **ori/f1 ori**, izvorište replikacije bakteriofaga f1 (žuto); **AmpR**, rezistencija na antibiotik ampicilin (svijetlo zeleno). Mapa je konstruirana koristeći programski alat SnapGene 6.0.



**Slika 12. Mapa rekombinantnog lentivirusnog plazmida pLJM-EGFP-SAHH.** Veličina plazmida iznosi 9386 parova baza. Značajni geni i funkcionalni nukleotidni sljedovi: **SAHH**, cDNA proteina SAHH (crveno); **EGFP**, zeleni fluorescentni protein (zeleno); **CMV promoter**, promotorski slijed ljudskog citomegalovirusa (bijelo); **hPGK promoter**, promotorski slijed ljudske fosfoglicerat kinaze (bijelo); **cPPT/CTS**, centralni polipurinski slijed/centralni terminacijski slijed (svijetlo narančasto); **ori/f1 ori/SV40 ori**, izvorište replikacije/bakteriofaga f1/virusa Simian virus 40 (SV40) (žuto); **5' LTR/3' LTR**, dugačka terminalna ponavljanja 5'/3' (svijetlo narančasto); **SV40 poly(A) signal**, poliadenilacijski i terminacijski slijed virusa SV40 (sivo); **AmpR/PuroR** rezistencija na antibiotik ampicilin/puromicin (svijetlo zeleno). Mapa je konstruirana koristeći programski alat SnapGene 6.0.



**Slika 13. Mapa pomoćnog lentivirusnog plazmida psPAX2.** Veličina plazmida 10709 parova baza. Značajni geni i funkcionalni nukleotidni sljedovi: **HIV-1 gag**, kodirajući sljed proteina Gag virusa HIV-1 (ljubičasto); **HIV-1 pol**, kodirajući sljed proteina Pol virusa HIV-1 (ljubičasto); **SV40 promotor**, promotorski sljed virusa SV40 (bijelo); **SV40 poly(A) signal**, poliadenilacijski i terminacijski sljed virusa SV40 (sivo); **cPPT/CTS**, centralni polipurinski sljed/centralni terminacijski sljed (svijetlo narančasto); **ori/SV40 ori**, izvorište replikacije/izvorište replikacije virusa SV40 (žuto); **AmpR** rezistencija na antibiotik ampicilin (svijetlo zeleno). Mapa je konstruirana koristeći programski alat SnapGene 6.0.



**Slika 14. Mapa pomoćnog lentivirusnog plazmida pMD2.G.** Veličina plazmida iznosi 5822 parova baza. Značajni geni i funkcionalni nukleotidni sljedovi: **VSV-G**, kodirajući slijed glikoproteina G virusa vezikularnog stomatitisa (ljubičasto); **CMV promoter**, promotorski slijed ljudskog citomegalovirusa (bijelo); **ori**, izvorište replikacije (žuto);  **$\beta$ -globin poly(A) signal**, poliadenilacijski slijed ljudskog proteina  $\beta$ -globin (sivo);  **$\beta$ -globin intron**, skraćeni intron ljudskog proteina  $\beta$ -globin (crno); **AmpR**, rezistencija na antibiotik ampicilin (svijetlo zeleno). Mapa je konstruirana koristeći programski alat SnapGene 6.0.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Kloniranje kodirajućih sljedova gena *SAHH*

Kodirajući sljedovi gena *SAHH* (cDNA, od engl. *complementary DNA*) klonirani su u plazmidni vektor pT7CFE1-NFtag za provedbu transkripcije i translacije *in vitro*, dok je za potrebe generiranja staničnih modelnih sustava, cDNA *SAHH* klonirana u lentivirusni vektor pLJM-EGFP. Kloniranje je provedeno klasičnim pristupom umnažanja odsječka DNA PCR-om uz oligonukleotidne početnice koje sadrže prikladna restrikcijska mjesta. Bakterijske stanice *E. coli* korištene su za umnažanje i izolaciju rekombinantnih plazmida, a uspješnost kloniranja potvrđena je sekvenciranjem po Sangeru.

Početni korak ovog istraživanja bio je umnažanje cDNA *SAHH* divljeg tipa te kloniranje u plazmidnu okosnicu pT7CFE1-NFtag. Rezultirajući rekombinantni plazmid pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT zatim se koristio kao DNA-kalup za uvođenje istraživanih mutacija metodom ciljane mutageneze (engl. *site-directed mutagenesis*). Nakon potvrde uspješnog uvođenja mutacija, cjelokupni postupak kloniranja ponovljen je za unos mutiranih kodirajućih sljedova u drugu plazmidnu okosnicu, pLJM-EGFP. Ovaj vektor korišten je pri proizvodnji funkcionalnih lentivirusa za generiranje staničnih modela koji konstitutivno ekspimiraju mutirane proteine SAHH.

#### 3.2.1.1. Umnažanje cDNA metodom PCR

cDNA *SAHH* divljeg tipa umnožena je PCR-om iz ishodišnog plazmida pOTB7-cDNA-SAHH-WT (Laboratorij za naprednu genomiku, IRB, Hrvatska) uz početnice IVT-SAHH-NdeI-F i IVT-SAHH-BglII-R (Tablica 3.). Uz sljedove komplementarne plazmidnom kalupu, početnice dodatno sadrže i restrikcijska mjesta koje prepoznaje i cijepa restrikcijska endonukleaza NdeI odnosno BglII. Početnice su dizajnirane da ne dolazi do promjene okvira čitanja cDNA *SAHH* nakon ligacije u plazmid pT7CFE1-NFtag tj. start-kodon i peptidni biljeg FLAG ostaju u istom okviru čitanja kao cDNA *SAHH*. Reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem 12,5  $\mu\text{L}$  *Q5 High-Fidelity 2 $\times$  Master Mix* (New England Biolabs), 1,25  $\mu\text{L}$  svake početnice ishodišne koncentracije 10  $\mu\text{M}$ , 10 ng plazmida pOTB7-cDNA-SAHH-WT koji služi kao DNA-kalup i mqH<sub>2</sub>O do 25 $\mu\text{L}$ . PCR je proveden u uređaju *Biometra Thermocycler TProfessional Basis* (Analytik Jena, Njemačka) prema temperaturnom programu navedenom u Tablici 4. Nakon PCR-a, 3  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese analizirano je elektroforezom u agaroznom gelu kako je opisano u sljedećem poglavlju (3.2.1.2.).

**Tablica 5. Temperaturni program umnažanja cDNA SAHH divljeg tipa.**

	Temperatura/°C	Vrijeme /s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	10	40
Sparivanje početnica	65*	15	40
Produljenje	72	60	40
Završno produljenje	72	120	1

\*- temperatura sparivanja određena je korištenjem mrežnog alata *NEB Tm Calculator*.

### 3.2.1.2. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu jedna je od osnovnih molekularno-bioloških metoda koja se koristi za analizu nukleinskih kiselina. Omogućuje razdvajanje i identifikaciju molekula na temelju njihove mase i strukture, a temelji se na različitom vremenu migracije molekula kroz pore agaroznog gela uz primjenu električnog polja. Veličina pora uvjetovana je koncentracijom agaroze prilikom pripreve gela, čime se omogućuje kontrola raspona promatranih molekularnih masa molekula DNA i RNA.

U sklopu ovog istraživanja, elektroforeza u agaroznom gelu koristila se za kvalitativnu analizu produkata reakcija PCR-a i izoliranih plazmida. 1%-tni agarozni gelovi pripremaju se otapanjem 1g agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u 100 mL 1 × TAE pufera (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH=8,3) uz zagrijavanje smjese u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Nakon kratkog hlađenja, u smjesu se dodaje etidijev bromid (Sigma-Aldrich) do konačne koncentracije 0,5 µg/mL nakon čega se smjesa izlije u odgovarajući kalup uz dodatak plastičnih češljica za formiranje jažica. Ohlađeni polimerizirani gelovi uranjaju se u aparaturu za horizontalnu elektroforezu *Wide Mini-Sub Cell GT Cell* (Bio-Rad Laboratories, SAD) koja se prethodno napuni puferom 1 × TAE, a analizirani uzorci otpipetiraju se u jažice gela. Prije nanošenja, alikvot analiziranog uzorka pomiješa se sa bojom *Gel Loading Dye Purple* (6 ×) (New England Biolabs) koja omogućuje pojednostavljeno nanošenje uzorka u pojedinačnu jažicu i lakše praćenje tijekom elektroforeze. Veličine analiziranih molekula DNA određuju se pomoću 1 µL markera molekularnih masa *Quick-Load 2-Log DNA Ladder* (New England Biolabs) koji se nanosi u prvu jažicu gela. Elektroforeza se provodi 20 min pri naponu od 120 V. Vizualizacija molekula DNA provodi se pobudom interkaliranog etidijevog bromida osvjetljavanjem gelova UV-svjetlom transiluminatora pri valnoj duljini od 312 nm.

### 3.2.1.3. Pročišćavanje produkata PCR-reakcije

Pročišćavanje nukleinskih kiselina iz reakcijskih smjesa provodi se u svrhu izdvajanja molekula DNA i/ili RNA od preostalih komponenti kao što su oligonukleotidi, enzimi, soli i slobodni nukleotidi koji mogu imati negativni učinak na daljnje eksperimente. Danas se najčešće primjenjuju dva glavna pristupa; pročišćavanje nukleinskih kiselina njihovim selektivnim vezanjem na silika membrane komercijalno dostupnih kolonica (engl. *spin column-based purification*) i noviji pristup pročišćavanja nukleinskih kiselina pomoću magnetskih čestica (engl. *magnetic bead-based purification*).

Za provedbu kloniranja cDNA *SAHH* u plazmidni vektor pT7CFE1-NFtag, umnoženi kodirajući slijed nakon analize gel-elektroforezom pročišćen je korištenjem komercijalnog kompleta *DNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research, SAD) prema uputama proizvođača uz dodatak DNA-vezujućeg pufera (engl. *DNA Binding Buffer*) u omjeru 5:1 u odnosu na volumen reakcijske smjese. Ukoliko se provodi pročišćavanje fragmenata DNA koji su veći od 2000 baznih parova, kao što su plazmidne okosnice, DNA-vezujući pufer dodaje se u omjeru 2:1 u odnosu na volumen reakcijske smjese. Nakon pročišćavanja, produkt PCR-a eluiran je u 15  $\mu\text{L}$  mqH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.4. Dvostruka razgradnja restrikcijskim endonukleazama

Pročišćeni PCR-produkt (cDNA *SAHH*) i okosnica plazmida pT7CFE1-NFtag podvrgnuti su dvostrukoj razgradnji restrikcijskim enzimima NdeI i BglII u svrhu stvaranja kompatibilnih ljepljivih krajeva (engl. *sticky ends*) fragmenata koji omogućuju ispravnu ligaciju produkta i plazmida.

Dvije odvojene reakcijske smjese pripremljene su miješanjem 15  $\mu\text{L}$  pročišćenog PCR-produkta ili 0,5  $\mu\text{g}$  plazmidne okosnice pT7CFE1-NFtag, 1  $\mu\text{L}$  restrikcijske endonukleaze NdeI (New England Biolabs), 1  $\mu\text{L}$  restrikcijske endonukleaze BglII (New England Biolabs), 2  $\mu\text{L}$  pufera za razgradnju *NEBuffer 3.1* (New England Biolabs) i mqH<sub>2</sub>O do 20  $\mu\text{L}$ . Pripremljene reakcijske smjese inkubirane su 1 h pri 37 °C, nakon čega je provedena elektroforeza na agaroznom gelu (poglavlje 3.2.1.2.) u svrhu provjere uspješne razgradnje plazmidne okosnice pT7CFE1-NFtag. Razgrađeni PCR-produkt i plazmidna okosnica zatim su pročišćeni korištenjem kompleta *DNA Clean & Concentrator-5* (Zymo Research) prema uputama proizvođača (poglavlje 3.2.1.3.). Pročišćeni PCR-produkt i plazmid eluirani su u 20  $\mu\text{L}$  mqH<sub>2</sub>O te im je izmjerena koncentracija kako je opisano u sljedećem poglavlju (3.2.1.5.).



### 3.2.1.5. Određivanje koncentracije DNA i RNA u otopinama

U toku provođenja ovog istraživanja, koncentracije nukleinskih kiselina određivane su fluorimetrijskom metodom koja se temelji na vezanju fluorescentnih reagensa na analit od interesa (DNA, RNA ili proteini) uslijed čega dolazi do emisije zračenja proporcionalnog koncentraciji analita u otopini. Prednost ove metode nad klasičnim određivanjem koncentracije UV-spektrofotometrom je njezina selektivnost, koja je uvjetovana uporabom specifičnih fluorescentnih reagensa koji se selektivno vežu samo na mjereni analit, zanemarujući utjecaj ostalih molekula u otopini na intenzitet mjerenog zračenja.

Koncentracije dvolančanih molekula DNA mjerene su korištenjem komercijalnog kompleta *Qubit dsDNA HS Assay kit* na uređaju *Qubit 3.0 Fluorometer*, dok su koncentracije RNA određene korištenjem kompleta *Qubit RNA HS Assay kit* (sve Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. Mjerni volumen uzorka prilikom svakog mjerenja iznosio je 1  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.1.6. Ligacija cDNA SAHH i plazmidne okosnice

Ligacija razgrađene plazmidne okosnice pT7CFE1-NFtag i cDNA *SAHH* divljeg tipa provedena je miješanjem 50 ng plazmida i 93 ng PCR-produkta (5:1 omjer insert:vektor) uz dodatak 2  $\mu\text{L}$  *T4 DNA Ligase Buffer* (10  $\times$ ) (New England Biolabs), 1  $\mu\text{L}$  *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs) i  $\text{mqH}_2\text{O}$  do 20  $\mu\text{L}$ . Reakcijska smjesa inkubirana je pri 16  $^\circ\text{C}$  preko noći nakon čega je provedena toplinska inaktivacija enzima inkubacijom 10 min pri 65  $^\circ\text{C}$ .

### 3.2.1.7. Kemijska transformacija bakterija

Transformacija bakterija odnosno unos strane DNA u bakterijsku stanicu jedna je od osnovnih molekularno-bioloških metoda koja se primjenjuje za jednostavno umnažanje i dugotrajno skladištenje rekombinantnih plazmida. Dvije osnovne metode transformacije bakterija uključuju kemijsku transformaciju temperaturnim šokom (engl. *heat shock*) i elektroporaciju. Metode se temelje na primjeni kratkog toplinskog ili električnog pulsa kako bi se povećala permeabilnost stanične membrane čime se omogućuje unos velikih izvanstaničnih molekula, kao što je DNA, u stanicu.

U svrhu selekcije i umnažanja rekombinantnog plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT, koji je konstruiran ligacijom cDNA *SAHH* i plazmidne okosnice, alikvot ligacijske smjese direktno je transformiran u bakterije metodom temperaturnog šoka. Otopljeni alikvot kemijski

kompetentnih bakterija *NEB<sup>®</sup> 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)* (New England Biolabs) volumena 50 µL pomiješa se s 5 µL ligacijske smjese te se smjesa ostavi 30 min na ledu. Nakon inkubacije na ledu, smjesa se inkubira 30 s pri 42 °C u svrhu otvaranja membranskih pora bakterijskih stanica uslijed nagle promjene temperature. Nakon toga, smjesa se inkubira na ledu dodatnih 5 min. Kemijski transformirane bakterije resuspendiraju se u 950 µL hranjivog medija SOC (New England Biolabs) prethodno ugrijanog na 37 °C te se suspenzija inkubira u tresilici 1 h pri 37 °C uz rotaciju od 250 rpm-a u svrhu oporavka bakterijskih stanica nakon transformacije.

#### 3.2.1.8. Selekcija i uzgoj bakterija

Prekonoćna selekcija svježe transformiranih bakterija provodi se na krutim hranjivim podlogama uz dodatak prikladnih antibiotika. Rast na selektivnim podlogama omogućen je samo za bakterijske klonove koji su uspješno transformirani plazmidnim konstruktima jer sadrže gen za rezistenciju na odabrani antibiotik. Nakon selekcije na krutoj podlozi, pojedinačne kolonije bakterijskih klonova uzgajaju se u tekućem hranjivom mediju LB volumena 3-5 mL u svrhu njihovog umnažanja i izolacije transformiranih plazmida.

Kemijski transformirane bakterije nasadene su na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB prethodno pripremljenu izljevanjem vruće smjese agara koncentracije 12,5 g/L (Sigma-Aldrich) i tekućeg LB-medija (10 g/L tripton, 5 g/L kvašičev ekstrakt i 10 g/L NaCl) uz dodatak ampicilina (Carl Roth, Njemačka) konačne koncentracije 100 µg/mL u plastične Petrijeve zdjelice. Postupak nasađivanja bakterija provodi se ravnomjernim razmazivanjem 200 µL transformacijske smjese sterilnim staklenim štapićem na površinu krute hranjive podloge do trenutka potpunog upijanja tekuće faze smjese u samu podlogu. Ploče s nasadenim bakterijama inkubirane su preko noći pri 37 °C. Nakon rasta na selektivnim podlogama, osam različitih bakterijskih klonova preneseno je u 3 mL tekućeg hranjivog LB-medija sterilnim nastavkom uz dodatak ampicilina konačne koncentracije 100 µg/mL, nakon čega je suspenzija inkubirana preko noći u rotacijskoj tresilici pri 37 °C i 250 rpm-a.

### 3.2.1.9. Izolacija plazmida iz bakterijskih kultura

Izolacija rekombinantnih plazmida iz manjih volumena prekonoćnih bakterijskih kultura provedena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research) prema uputama proizvođača. Prije same izolacije, bakterijske kulture prenesene su u tubice volumena 1,5 mL i centrifugirane 30 s pri  $12,000 \times g$  u svrhu taloženja bakterijskih stanica, odnosno odvajanja stanica od tekućeg LB-medija. Postupak je još jednom ponovljen kako bi se sve bakterijske stanice iz prekonoćnih kultura istaložile. Istaložene stanice resuspendirane su u 600  $\mu\text{L}$   $\text{mqH}_2\text{O}$  nakon čega je provedeno pročišćavanje plazmida prethodno navedenim komercijalnim kompletom. Pročišćeni rekombinantni plazmidi eluirani su u 30  $\mu\text{L}$   $\text{mqH}_2\text{O}$  nakon čega je provjerena uspješnost izolacije nanošenjem 2  $\mu\text{L}$  svakog izoliranog plazmida u agarozni gel i provođenjem elektroforeze kako je opisano u poglavlju 3.2.1.2.

Za izolaciju plazmida iz većih volumena prekonoćnih bakterijskih kultura od 100 mL, korišten je komercijalni komplet *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega, SAD) prema preporukama proizvođača. Pročišćeni plazmidi eluirani su u 500  $\mu\text{L}$   $\text{mqH}_2\text{O}$  nakon čega su analizirani elektroforezom u agaroznom gelu te im je izmjerena koncentracija.

### 3.2.1.10. Sangerova metoda sekvenciranja

Za konačnu potvrdu ispravnog kloniranja cDNA *SAHH* u plazmidnu okosnicu pT7CFE1-NFtag, određeni su točni nukleotidni sljedovi izoliranih rekombinantnih plazmida metodom sekvenciranja po Sangeru. Sekvenciranje je provedeno u servisu Macrogen (Nizozemska) uz prethodnu pripremu alikvota plazmida približne koncentracije 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  volumena 20  $\mu\text{L}$ . Svakom izoliranom plazmidu određen je nukleotidni slijed u dvije odvojene reakcije sekvenciranja uz uporabu dvije različite (uzvodne i nizvodne) oligonuleotidne početnice koje sadrže sljedove T7-promotora i T7-terminatora (Tablica 3.). Ovim pristupom odredio se cjelokupni kodirajući slijed *SAHH* unutar rekombinantnog plazmida, od start- do stop-kodona, kako bi se sa sigurnošću potvrdio ispravni okvir čitanja inserta te osigurala potpuna ispravnost nukleotidnog slijeda klonirane cDNA *SAHH*.

### 3.2.2. Ciljana mutageneza

Nakon uspješnog kloniranja cDNA *SAHH* divljeg tipa u plazmidni vektor pT7CFE1-NFtag, rekombinantni plazmid pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT koristio se kao kalup za uvođenje točkastih mutacija u kodirajući slijed metodom ciljane mutageneze. Za svaku istraživanu mutaciju, dizajnirani su specifični parovi početnica (Tablica 3.) koji omogućuju umnažanje cjelokupnog plazmidnog kalupa PCR-om i istovremenu izmjenu jednog nukleotida na odabranoj poziciji kodirajućeg slijeda. Karakteristika ove metode je dizajn i uporaba jedne ili više specifičnih početnica koje nisu u potpunosti komplementarne kalupu DNA, već na poziciji željene mutacije sadrže izmijenjeni nukleotid, dok nizvodni i uzvodni sljedovi početnica omogućuju komplementaciju s kalupom te umnažanje preostalog slijeda plazmida polimerazom visoke vjernosti. Reakcijske smjese ciljane mutageneze zatim su podvrgnute restriktivnoj razgradnji enzimom DpnI u svrhu uklanjanja početnog kalupa DNA iz smjese. Aktivnost ove restriktivne endonukleaze uvjetovana je metilacijskim statusom nukleotida, pri čemu DpnI prepoznaje i cijepa samo metiliranu dvolančanu molekulu DNA te time omogućuje selektivnu razgradnju nemutiranog kalupa DNA koji je zaostao u reakcijskoj smjesti.

Reakcijske smjese za ciljanu mutagenezu pripremljene su miješanjem 12,5  $\mu\text{L}$  *Q5 High-Fidelity 2  $\times$  Master Mix* (New England Biolabs), 1,25  $\mu\text{L}$  svake početnice koncentracije 10  $\mu\text{M}$ , 20 ng plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT i mqH<sub>2</sub>O do 25  $\mu\text{L}$ . Sveukupno je pripremljeno 4 reakcijske smjese, po jedna reakcija za svaku točkastu mutaciju i dodatna reakcija negativne kontrole odnosno reakcija bez kalupa DNA.

**Tablica 6. Temperaturni program korišten za metodu ciljane mutageneze.**

	Temperatura/°C	Vrijeme /s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	10	35
Sparivanje početnica	55*	15	35
Produljenje	72	120	35
Završno produljenje	72	120	1

\*- temperatura sparivanja određena je korištenjem mrežnog alata *NEB Tm Calculator*.

Produkti PCR-reakcija analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu. Alikvoti reakcijskih smjesa volumena 5  $\mu$ L nanoseni su u jažice 1 %-tnog agaroznog gela. Elektroforeza je provedena 20 min pri naponu od 120 V. Razgradnja nemutiranog kalupa DNA provedena je miješanjem 15  $\mu$ L reakcijske smjese ciljane mutageneze, 2  $\mu$ L pufera *CutSmart Buffer* (New England Biolabs), 1  $\mu$ L restrikcijskog enzima DpnI (New England Biolabs) i mqH<sub>2</sub>O do 20  $\mu$ L. Reakcije su inkubirane preko noći pri 37 °C. Nakon razgradnje, alikvot smjese volumena 5  $\mu$ L direktno je transformiran u bakterijske stanice *NEB*<sup>®</sup> *5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)* (New England Biolabs) metodom temperaturnog šoka kako je opisano u poglavlju 3.2.1.7. Alikvoti transformiranih bakterija od 200  $\mu$ L nasađeni su na krute LB-podloge s ampicilinom te su inkubirane pri 37 °C preko noći. Nakon prekonoćnog rasta na selektivnim podlogama, osam nasumično odabranih bakterijskih klonova sa svake ploče preneseno je sterilnim nastavkom u 3 mL tekućeg LB-medija uz dodatak ampicilina. Bakterijske suspenzije zatim su inkubirane preko noći u tresilici pri 37 °C i 250 rpm-a. Iz prekonoćnih bakterijskih kultura izolirani su plazmidi koristeći komercijalni kit *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research) prema uputama proizvođača. Elektroforezom na agaroznom gelu analizirane su molekulske mase izoliranih plazmida nanošenjem 2  $\mu$ L svakog uzorka na gel i provođenjem elektroforeze 20 min pri 120 V. Dva klona svakog mutiranog plazmida, čije su veličine odgovarale očekivanim vrijednostima, pripremljeni su za određivanje nukleotidnog slijeda sekvenciranjem po Sangeru kako je opisano u poglavlju 3.2.1.10. Elektroferogrami rezultata sekvenciranja analizirani su pomoću programskog alata *SnapGene 6.0*.

### **3.2.3. Transkripcija i translacija *in vitro***

Za provedbu reakcija transkripcije i uzastopne translacije mutiranih cDNA *SAHH in vitro*, korišten je komercijalno dostupni komplet *1-Step Human Coupled IVT Kit – DNA* (Thermo Fisher Scientific). Odabrani ekspresijski sustav karakteriziran je upotrebom cjelokupnog lizata stanica HeLa (stanična linija ljudskog raka vrata maternice) kao glavnog supstrata reakcije, s obzirom na to da sadrži sve stanične komponente potrebne za sintezu proteina, kao što su ribosomi, inicijacijski i elongacijski faktori te molekule tRNA. Sinteza molekula mRNA i njihova uzastopna translacija uvjetovana je dodatkom prikladnog ekspresijskog vektora koji sadrži kodirajući slijed analiziranog proteina kao što su prethodno konstruirani plazmidi pT7CFE1-NFtag-SAHH (Slika 11.). Ovaj ekspresijski vektor sadrži pomoćne nukleotidne sljedove kao što su T7-promotor, T7-terminator, slijed za inicijaciju translacije (IRES, od engl. *internal ribosome entry site*) i mRNA-stabilizirajući poliadenilacijski slijed, koji zajedno

omogućuju transkripciju i uzastopnu translaciju istraživanih proteina. Uz to, plazmid pT7CFE1-NFtag sadrži i nukleotidni slijed umjetnog oktapeptida FLAG (primarna struktura-DYKDDDDK) na N-kraju proteina, koji služi za visoko specifičnu detekciju sintetiziranog proteina iz reakcijske smjese.

Reakcije transkripcije i translacije *in vitro* pripremljene su miješanjem 12,5  $\mu$ L lizata stanica HeLa, 2,5  $\mu$ L smjese pomoćnih proteina (engl. *Accessory Proteins*), 5  $\mu$ L reakcijske smjese (engl. *Reaction Mix*) (sve Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu$ g plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT/W112\*/Y328D,Y143C i mqH<sub>2</sub>O do 25  $\mu$ L. Dodatno je pripremljena i reakcija negativne kontrole bez dodatka plazmida u smjesu. Reakcijske smjese inkubirane su 6 h pri 30 °C nakon čega je alikvot volumena 5  $\mu$ L (25% svake reakcijske smjese) iskorišten za analizu prinosa mutiranih proteina SAHH metodom western blot.

#### **3.2.4. Određivanje ekspresije gena *SAHH* kvantitativnim PCR-om**

Kvantitativni PCR (qPCR, od engl. *quantitative PCR*) je glavna molekularno-biološka metoda kvantitativne analize genske ekspresije. Metoda se temelji na prevođenju molekula RNA u cDNA te njihovom uzastopnom umnažanju PCR-om uz upotrebu fluorescentnih reagensa koji interakcijom s produktima reakcije emitiraju zračenje karakteristične valne duljine. Mjerenjem intenziteta fluorescencije moguće je detektirati i odrediti točan broj kopija analiziranog odsječka nakon svakog amplifikacijskog ciklusa, zbog čega se ovaj metoda naziva i kvantitativni PCR u stvarnom vremenu. Najčešće korišteni fluorescentni reagensi za qPCR uključuju fluorofore kao npr. *SYBR Green*, koji interkalacijom u velike utore molekule DNA emitiraju karakteristično fluorescentno zračenje. Ova vrsta reagensa interagira sa svim dvolančanim molekulama DNA koje mogu biti prisutne u reakcijskoj smjesi, uključujući i nespecifične PCR-produkte te dimere primera, što utječe na specifičnost fluorescentnog signala. Drugi pristup uključuje upotrebu specifičnih hidrolizirajućih proba, tzv. *TaqMan* probe. Riječ je o fluorescentno obilježenim oligonukleotidima koji emitiraju zračenje samo uslijed njihove hidrolize s lanca molekule DNA koji sadrži komplementarni nukleotidni slijed, čime se osigurava visoka specifičnost izlaznog fluorescentnog signala.

Za potrebe ovo istraživanja, kvantitativnim PCR-om analizirana je ekspresija gena *SAHH* u fibroblastima pacijenata i u staničnim modelima korištenjem kompleta *TaqMan Gene Expression Assay* koji uključuje komercijalnu smjesu početnica za umnažanje određenog odsječka gena *SAHH* i specifičnu probu komplementarnu odsječku koji se umnaža (Hs04183463\_g1, Thermo Fisher Scientific). Za normalizaciju i međusobnu usporedbu

ekspresije gena *SAHH* različitih uzoraka, određena je i ekspresija endogene kontrole, gena koji kodira za protein  $\beta$ -aktin (*ACTB*). Normalizacija je provedena očitanjem ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi zadani prag (Ct, od engl. *cycle threshold*) za gen *SAHH* i *ACTB* u istom uzorku prema formuli:

$$\Delta Ct(SAHH) = Ct(SAHH) - Ct(b - aktin)$$

Oligonukleotidne početnice i nukleotidni slijed probe za određivanje ekspresije endogene kontrole navedeni su u Tablici 3. Relativna promjena ekspresije gena *SAHH* između dva analizirana uzorka izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

pri čemu je

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(SAHH, uzorakX) - \Delta Ct(SAHH, uzorakY)$$

Razine ekspresije gena *SAHH* kod pacijenata određene su u odnosu na zdrave kontrole, dok je pri analizi staničnih modela određena razlika ekspresije fuzijskog proteina EGFP-SAHH divljeg tipa u odnosu na ekspresiju mutanata EGFP-SAHH-W112\*, EGFP-SAHH-Y328D i EGFP-SAHH-Y143C.

#### 3.2.4.1. Izolacija ukupne RNA iz staničnih kultura

Izolacija i pročišćavanje ukupne RNA iz fibroblasta i staničnih modela odrađena je korištenjem komercijalno dostupnog kompleta *Quick-RNA MiniPrep Kit* (Zymo Research). Prije izolacije RNA, alikvoti stanica centrifugirani su 2 min pri  $300 \times g$  u svrhu njihovog taloženja. Supernatant je odvojen, dok je zaostali talog resuspendiran u 300  $\mu$ L RNA-puferu za lizu (Zymo Research), nakon čega je proveden postupak pročišćavanja prema uputama proizvođača, koji uključuje i tretman DNazom I u svrhu uklanjanja zaostalih molekula DNA tijekom izolacije RNA.

### 3.2.4.2. Kvantitativni PCR uz reverznu transkripciju

Nakon izolacije ukupne RNA, qPCR-om uz reverznu transkripciju (RT-qPCR, od engl. *reverse transcription-qPCR*) analizirana je relativna ekspresija gena *SAHH* u fibroblastima pacijenata, kontrolnim fibroblastima te u staničnim modelnim sustavima stanica Hek293, HepG2 i SW480 koje stabilno ekspimiraju različite rekombinantne proteine SAHH (EGFP-SAHH-WT, -W112\*, -Y328D i -Y143C). Fluorescentni reagensi korišteni u ovoj analizi uključivali su hidrolizirajuću probu specifičnu za gen *SAHH* uz probu za kontrolni gen *ACTB*. Reverzna transkripcija i uzastopno umnažanje sintetiziranog cDNA-kalupa iz uzoraka ukupne RNA provedeno je u jednom koraku (engl. *one-step RT-qPCR*).

Korištenjem komercijalno dostupnih reagensa *Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit* pripremljene su reakcijske smjese miješanjem 5  $\mu\text{L}$  *Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix* (2  $\times$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  *Luna WarmStart<sup>®</sup> RT Enzyme Mix* (20  $\times$ ) (sve New England Biolabs), 0,5  $\mu\text{L}$  smjese početnica i probe, 1  $\mu\text{L}$  uzorka ukupne RNA i m $\text{qH}_2\text{O}$  do 10  $\mu\text{L}$ . Reakcijske smjese pripremljene su u triplikatu za svaki analizirani gen, *SAHH* i *ACTB*. Sveukupno je pripremljeno 6 reakcijskih smjesa za svaki analizirani uzorak ukupne RNA, uz dodatak duplikata reakcija negativne kontrole bez dodatka RNA. Reakcije RT-qPCR-a provedene su u uređaju *StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) prema uvjetima prikazanim u Tablici 6.

**Tablica 7. Temperaturni program određivanja ekspresije gena *SAHH* metodom RT-qPCR.**

	Temperatura/°C	Vrijeme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	55	10 min	1
Početna denaturacija	95	20 s	1
Denaturacija	95	1 s*	40
Sparivanje početnica i produljenje	60	20 s*	40

\*- reakcije su provedene pod uvjetima brze promjene temperature (engl. *fast cycling conditions*)



### 3.2.5. Rad sa staničnim kulturama

Stanične linije 293T, Hek293, HepG2 i SW480 korištene su za konstrukciju staničnih modelnih sustava koji stabilno ekspimiraju istraživane mutirane proteine SAHH. Uzgoj primarnih kultura fibroblasta i konstruiranih staničnih modela, njihovo presađivanje, mikroskopsko praćenje rasta, tretmani kemijskim reagensima, priprema za mikroskopiju i liza stanica za izolaciju proteina i/ili RNA provodilo se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima. Stanične kulture uzgajale su se u inkubatoru *Heracell™ VIOS 160i* (Thermo Fisher Scientific) u atmosferi zasićenoj vodenom parom uz prisutstvo 5% ugljikovog (IV) oksida (CO<sub>2</sub>) pri 37 °C.

#### 3.2.5.1. Uzgoj stanica u kulturi

Stanične kulture uzgajane su pričvršćene na površinu sterilnih plastičnih posuda uz dodatak tekućeg hranjivog medija DMEM (od engl. *Dulbeccos's Modified Eagle's Medium -high glucose*) nadopunjenim sa 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS, od engl. *fetal bovine serum*), 100 µg/mL antibiotika penicilina i streptomicina te 2 mM L-glutaminom (sve Sigma-Aldrich). Za potrebe ovog istraživanja korištene su plastične posude različitih dimenzija i formata ovisno o broju stanica potrebnom za provedbu različitih eksperimenata (Tablica 8.).

**Tablica 8. Dimenzije sterilnih plastičnih posuda za uzgoj staničnih kultura.**

Plastične boce s filter čepom	Primjena
T25	Uzgoj svježe otopljenih staničnih linija
T75	Redovito održavanje staničnih kultura
Plastične Petrijeve posude	
10 cm	Transfekcija stanične linije 293T za proizvodnju lentivirusa
Plastične ploče s bunarićima	
6 bunarića	Kemijski tretmani staničnih linija za izolaciju i analizu proteina
24 bunarića	Priprema stanica za mikroskopiju
96 bunarića	Test MTT za određivanje stanične vijabilnosti

Uvođenje stanica u kulturu odmrzavanjem iz tekućeg dušika početni je korak rada sa staničnim linijama. Prethodno zagrijani hranjivi medij volumena 5 mL pomiješa se sa zaleđenim alikvotom stanica u svrhu otapanja tj. prevođenja suspenzije u tekuću fazu. Otopljena suspenzija stanica centrifugira se 3 min pri  $300 \times g$ . Supernatant se odvoji, dok se zaostali talog stanica resuspendira u 5 mL svježeg medija DMEM te se prebaci u sterilnu plastičnu bocu T25 (Techno Plastic Products, Švicarska) za prekonocni rast u inkubatoru.

Nakon otapanja, stanice se održavaju u kulturi pravovremenim presađivanjem i dodatkom svježeg hranjivog medija, obično svaka 3-4 dana, ovisno o staničnoj liniji. Rast stanica svakodnevno se prati svjetlosnim mikroskopom pomoću kojeg se procjenjuje postotak površine koju zauzimaju stanice u odnosu na ukupnu površinu posude tj. konfluentnost. Ukoliko konfluentnost određene kulture prijeđe 90 %, stanice se presade te im se promijeni hranjivi medij. Presađivanje stanica započinje uklanjanjem hranjivog medija i ispiranjem stanica fosfatnim puferom DPBS (od engl. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich). Na isprane stanice doda se 1 mL otopine tripsina (Sigma-Aldrich) te se plastična posuda prebaci u stanični inkubator 5 min. Nakon tripsinizacije tj. odvajanja stanica od podloge, stanice se resuspendiraju u 4 mL svježeg medija, a 1/8 volumena stanične suspenzije ostavi se u plastičnoj posudi uz dodatak svježeg hranjivog medija za daljnji rast.

Određivanje točnog broja stanica provodi se prilikom njihovog nasađivanja za provedbu daljnjih eksperimenata (Tablica 8.), prije izolacije proteina i/ili RNA te kod zamrzavanja stanica. Nakon odvajanja od površine, stanice se resuspendiraju u svježem hranjivom mediju te se alikvot stanične suspenzije volumena 100  $\mu$ L odvoji za brojanje stanica na uređaju *Z2 Particle Counter* (Beckman Coulter, SAD) prema uputama proizvođača. Alikvot suspenzije koji sadrži potreban broj stanica odvoji se i centrifugira 3 min pri  $300 \times g$ . Istaložene stanice resuspendiraju se u odgovarajućem volumenu svježeg medija za daljnji rast ili se iskoriste za izolaciju proteina i/ili RNA.

Za njihovu dugotrajnu pohranu, 2 milijuna stanica istaloži se centrifugiranjem nakon čega se resuspendiraju u 1 mL medija za zamrzavanje koji se pripremi dodavanjem 5 % (v/v) DMSO-a (Sigma-Aldrich) u svježi hranjivi medij. Suspenzija se prebaci u kriotubice i pohrani pri  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  u posudi za zamrzavanje *Nalgene® Mr. Frosty* (Thermo Fisher Scientific). Nakon 24 h, kriotubice se pohranjuju u spremnik s tekućim dušikom u svrhu dugotrajnog skladištenja.

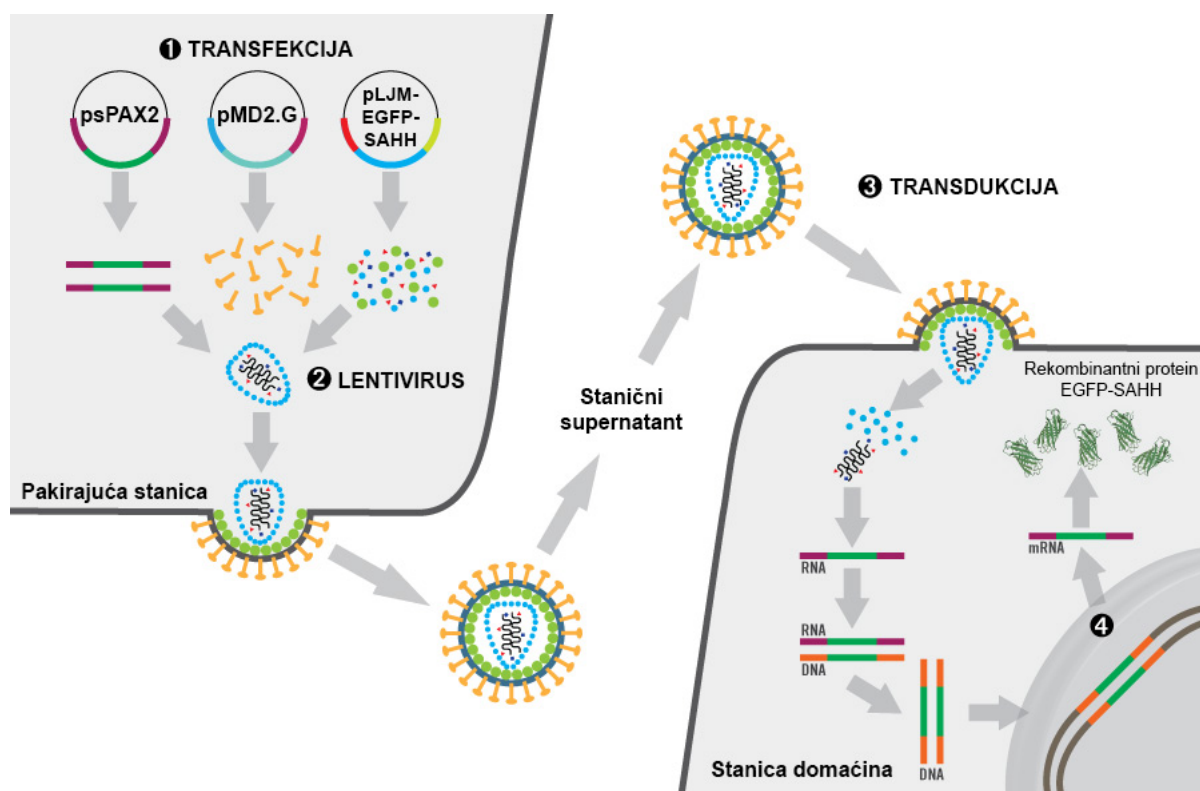
### 3.2.5.2. Test MTT za određivanje stanične vijabilnosti

Pri provedbi ovog istraživanja, MTT-testom određena je citotoksičnost puromicina, polibrena i inhibitora proteasoma (MG-132), kemijskih spojeva kojima su tretirane stanice. Uz to, ova metoda korištena je za određivanje broja virusnih čestica u odnosu na broj inficiranih stanica (MOI, od engl. *multiplicity of infection*) pri provedbi transdukcijskih eksperimenata (opisano u poglavlju 3.2.5.4). Metoda se temelji na redukciji žutog 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijevog bromida (MTT) u ljubičaste kristale formazana djelovanjem sukcinat-dehidrogenaze, enzima koji djeluje samo u metabolički aktivnim odnosno živim stanicama. Kvantifikacija nastalih kristala formazana provodi se spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 570 nm nakon njihovog otapanja u dimetil sulfoksidu (DMSO), a koncentracija formazana proporcionalna je broju preživjelih stanica nakon tretmana.

Prikladne koncentracije puromicina, polibrena i MG-132 (sve Sigma-Aldrich) određene su testiranjem različitih koncentracijskih raspona; 0-5 µg/mL za puromicin, 0-20 µg/mL za polibren i 0-25 µM otopine inhibitora proteasoma MG-132. Vremenski period određivanja stanične vijabilnosti ovisio je o ispitivanom spoju i dizajnu eksperimenta, pa je tako za puromicin preživljenje stanica određeno 3 dana nakon tretmana, dok je za polibren i MG-132 preživljenje određeno nakon 24 h. Dan prije tretmana, u plastične ploče s 96 bunarića nasadi se 3000 stanica u 200 µL hranjivog medija u svaki bunarić. Svaka koncentracija testirana je u triplikatu kao i kontrolni uzorci netretiranih stanica te uzorci slijepe probe, otopine hranjivog medija i MTT-a bez stanica. Nakon prekonoćne inkubacije, stanicama se promjeni medij uz dodatak kemijskog spoja određene koncentracije te se stanice uzgajaju u inkubatoru 1-3 dana, ovisno o testiranom spoju. Tretiranim stanicama odlije se hranjivi medij i doda 40 µL otopine MTT-a koncentracije 5 mg/mL te se stanice inkubiraju 4 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, kristali formazana otope se dodatkom 170 µL DMSO-a uz blago miješanje na tresilici u trajanju od 5 min. Apsorbancija otopina formazana izmjerena je na spektrofotometru *Multiskan EX* (Thermo Fisher Scientific) pri valnoj duljini od 570 nm.

### 3.2.5.3. Transfekcija stanične linije 293T za proizvodnju lentivirusa

Lentivirusne čestice korištene su u ovom radu kao vektorski sustavi za prijenos i ugradnju strane DNA (transgena) pri izradi staničnih modelnih sustava. Zbog svojih bioloških karakteristika, lentivirusi omogućuju brz i efikasan unos stranog genetičkog materijala u eukariotsku stanicu i stabilnu ugradnju transgena u genom domaćina. Za razliku od adenovirusnih vektora (AAVs), lentivirusi omogućuju genetičku modifikaciju terminalno diferenciranih stanica kao što su neuroni te vrlo efikasan prijenos i integraciju stranog genetičkog materijala u stanice primarnih kultura i sustave *in vivo*. Funkcionalni lentivirusni proizvode se kotransfekcijom lentivirusnog plazmida koji sadrži istraživani transgen i pomoćnih plazmida u tzv. „pakirajuću“ staničnu liniju. Danas se u svrhu proizvodnje lentivirusa najčešće koristi stanična linija 293T i njezine izvedenice, npr. 293FT, koje zbog svojih svojstvenih genetičkih karakteristika omogućuju proizvodnju visokog titra lentivirusa.



**Slika 15. Shematski prikaz cjelokupnog procesa izrade staničnih modelnih sustava pomoću lentivirusa.** Transfekcija lentivirusnih plazmida u pakirajuću staničnu liniju (1) dovodi do proizvodnje funkcionalnih lentivirusa koji sadrže upakirani transgen (2). Stanične linije u koje se unosi transgen inficiraju se lentivirusima u procesu transdukcije (3) nakon čega dolazi do ugradnje transgena u genom domaćina (4). Stabilna integracija transgena dovodi do njegove konstitutivne ekspresije u stanicama.

Za potrebe ovog istraživanja, konstruirani su lentivirusni plazmidi za prijenos i ugradnju 4 transgena koji kodiraju za različite proteine SAHH; EGFP-SAHH-WT, EGFP-SAHH-W112\*, EGFP-SAHH-Y143C i EGFP-SAHH-Y328D. Njihovi kodirajući sljedovi klonirani su u prikladnu lentivirusnu plazmidnu okosnicu pLJM-EGFP, dok su pomoćni plazmidi psPAX2 (Slika 13.) i pMD2.G (Slika 14.), koji sadrže gene za strukturne i funkcionalne proteine samog virusa, pribavljeni putem repozitorija plasmida Addgene. U svrhu provođenja eksperimenata negativne kontrole, dodatno su generirani lentivirusi koji ne sadrže kodirajući slijed odnosno, pri transfekciji je korištena prazna plazmidna okosnica pLJM-EGFP bez cDNA *SAHH*.

Transfekcija stanične linije 293T provedena je uporabom komercijalnog reagensa *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher Scientific). U Petrijevu posudu promjera 10 cm, nasadi se  $4 \times 10^6$  stanica u 10 mL hranjivog medija te se stanice inkubiraju preko noći pri 37 °C. Sljedeći dan, pripremi se transfekcijska smjesa lentivirusnih plazmida miješanjem 7,8 µg plazmida pLJM-EGFP-SAHH, 8,1 µg plazmida psPAX2, 2,1 µg plazmida pMD2.G, 36 µL P3000 reagensa (Thermo Fisher Scientific) i 500 µL *Opti-MEM Reduced Serum Medium* (Thermo Fisher Scientific). Odvojeno se pripremi smjesa transfekcijskog reagensa miješanjem 42 µL *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher Scientific) i 500 µL Opti-MEM-a. Dvije smjese međusobno se pomiješaju i inkubiraju 15 min pri sobnoj temperaturi. Konačna transfekcijska smjesa nanese se na stanice u hranjivom mediju koje se zatim prenesu u inkubator na prekonoćni rast. Dan nakon transfekcije, stanicama se promjeni hranjivi medij dodatkom 6 mL svježeg DMEM-medija te se stanice ponovno inkubiraju preko noći. Sljedeći dan, odvoji se hranjivi medij od stanica i filtrira korištenjem 0,45 µm filtera od polietar-sulfona (PES) u svrhu odvajanja lentirusa od zaostalih staničnih ostataka. Pročišćeni lentivirusni supernatant prebaci se u sterilnu plastičnu tubu i privremeno skladišti pri 4 °C, dok se transficiranim stanicama doda novih 6 mL hranjivog medija koje se ponovno inkubiraju preko noći pri 37 °C. Treći dan nakon transfekcije, ponovni se postupak prikupljanja i filtriranja hranjivog medija u kojem su rasle transficirane stanice te se konačni lentivirusni supernatant alikvotira u kriotubice i skladišti pri -80 °C.

#### 3.2.5.4. Određivanje multipliciteta infekcije

Kvantifikacija proizvedenih lentivirusa provedena je određivanjem udjela uspješno inficiranih stanica u odnosu na iskorišteni volumen lentivirusnog supernatanta. Ovim eksperimentom, za određeni raspon volumena supernatanta, određen je MOI pomoću kojeg je moguće izračunati koncentraciju virusnih čestica prije same infekcije. Glavni cilj ove kvantifikacije je optimizacija uvjeta transdukcije staničnih linija Hek293, HepG2 i SW480 pri kojima je drastično smanjena vjerojatnost infekcije jedne stanice s više od jedne viruse čestice. Ovim pristupom izbjegava se višestruka integracija transgena unutar genoma jedne stanice, koja može značajno utjecati na analizu ekspresije transgena i provedbu daljnjih eksperimenata.

MOI je određen infekcijom Hek293 stanica za sve 4 vrste proizvedenih lentivirusa s obzirom na to da svaka vrsta nosi različito mutirane cDNA *SAHH*. U plastičnoj ploči s 12 bunarića, nasadi se  $0,2 \times 10^6$  stanica po bunariću u 500  $\mu$ L hranjivog medija DMEM-a uz dodatak polibrena konačne koncentracije 8  $\mu$ g/mL. Sveukupno je ispitano 5 različitih volumena lentivirusnog supernatanta, 0, 25, 50, 75 i 100  $\mu$ L, stoga je za svaku vrstu lentivirusa nasadeno 5 bunarića. U svaki bunarić doda se određeni volumen lentivirusa i nadopuni hranjivim medijem do 1 mL. Ploča sa stanicama zatim se centrifugira 2 h pri  $1000 \times g$  i 33 °C. Nakon ovog procesa, poznatog pod nazivom „spinfekcija“, ploče se vrate u inkubator na prekonoćni rast. Sljedeći dan, stanicama se ukloni medij i isperu se tri puta fosfatnim puferom DPBS (Sigma-Aldrich). Isprane stanice odvoje se od površine tripsinizacijom te se izbroje u svrhu odvajanja  $2,4 \times 10^4$  stanica za određivanje preživljenja nakon infekcije lentivirusima MTT-om. Odvojene stanice resuspendiraju se u 1,2 mL hranjivog medija i nasade se u ploče s 96 bunarića. Za svaki ispitivani volumen lentivirusa, nasadeno je sveukupno 6 bunarića od čega je u pola dodan selektivni antibiotik puromicin konačne koncentracije 1,5  $\mu$ g/mL. Nasadene stanice rasle su u inkubatoru 3 dana nakon čega je MTT-testom (poglavlje 3.2.5.2.) određen MOI za svaki ispitivani volumen lentivirusa računanjem omjera preživjelih stanica nakon selekcije u odnosu na ukupan broj nasadenih stanica tj. stanica koje nisu tretirane puromicinom.

### 3.2.5.5. Transdukcija staničnih linija lentivirusima

Transdukcija je proces horizontalnog prijenosa genetičkog materijala u eukariotske ili prokariotske stanice upotrebom virusnih vektora. Za razliku od klasične transfekcije, virusna transdukcija je izrazito efikasna i omogućuje visoku stopu (95-100 %) modifikacije staničnih kultura bez značajnih utjecaja na njihovu vijabilnost. Određeni virusni vektori, kao što su lentivirusi, koji se temelje na virusu humane imunodeficijencije (HIV, od engl. *human immunodeficiency virus*), integracijom strane DNA u genom stanice omogućuju brzu i tehnički jednostavnu konstrukciju staničnih modela koji stabilno ekspimiraju transgen odnosno protein od interesa. Virusni vektori se zbog svojih karakterističnih svojstva danas široko primjenjuju u proizvodnji cjepiva i kod aplikacije genske terapije *in vitro* i *in vivo*.

Modelni sustavi staničnih linija Hek293, HepG2 i SW480 proizvedeni su transdukcijom lentivirusima koji prenose mutirane cDNA SAHH fuzionirane sa zelenim fluorescentnim proteinom (EGFP, od engl. *enhanced green fluorescent protein*) na N-kraju. Svaka stanična linija inficirana je pojedinom vrstom lentirusa pri čemu je odabran omjer virusa i stanica (MOI) manji od 0,3 kako bi se osigurala maksimalno jedna integracija transgena po uspješno inficiranoj stanici. S obzirom na njihov suvišak, neinficirane stanice selektirane su puromicinom, antibiotikom čiji je gen za rezistenciju također kodiran odsječkom DNA kojeg prenose lentivirusi (plazmid pLJM-EGFP). Transdukcija je provedena u plastičnim posudama s 6 bunarića pri čemu je u svaki bunarić nasađeno  $0,4 \times 10^6$  stanica u 2 mL hranjivog medija DMEM-a uz dodatak polibrena konačne koncentracije 8  $\mu\text{g/mL}$  i 75  $\mu\text{L}$  pojedinog lentivirusnog supernatanta. Dodatno su nasađena još dva bunarića stanica, jedan za potrebe praćenja antibiotske selekcije, u koji nisu dodani virusi, a medij je sadržavao puromicin (pozitivna kontrola selekcije) i drugi, nasađen u mediju koji sadrži samo polibren bez dodatka virusa i antibiotika (negativna kontrola transdukcije). Stanice su zatim centrifugirane 2 h pri  $1000 \times g$  i  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  nakon čega su prebačene u inkubator na prekonoćni rast. Sljedeći dan, medij se ukloni i doda se svježi hranjivi medij uz dodatak puromicina konačne koncentracije 2,0  $\mu\text{g/mL}$  te se stanice vrate u inkubator. Tijekom trajanja antibiotske selekcije, svakodnevno se prati rast odnosno odumiranje stanica usporedbom konfluentnosti između uzoraka inficiranih i neinficiranih stanica u selektivnom mediju. U trenutku kada sve stanice uzorka pozitivne kontrole odumru, selekcija inficiranih stanica smatra se dovršenom, a preživjele stanice presađuju se u plastične posude T25 za daljnji rast. Stanice su selektirane sveukupno 5 dana u hranjivom mediju s puromicinom.

### 3.2.5.6. Tretmani staničnih modela inhibitorom proteasoma MG-132

Inhibicija aktivnosti proteasoma staničnih modela Hek293, HepG2 i SW480, koji stabilno eksprimiraju fuzijski protein EGFP-SAHH-Y328D, provedena je tretmanom stanica kemijskim spojem MG-132 (Sigma-Aldrich). Promjene razina ekspresije mutiranog proteina analizirane su metodom western blot nakon tretmana stanica s dvije različite koncentracije inhibitora u trajanju od 24 h.

U plastične ploče s 6 bunarića nasadeno je  $1,0 \times 10^6$  stanica u 2 mL hranjivog medija uz dodatak otopine MG-132 konačnih koncentracija 0, 1 i 2 nM. 24 h nakon početka tretmana, stanicama se ukloni hranjivi medij, isperu se DPBS-om te im se doda 300  $\mu$ L tripsina nakon čega se inkubiraju 5 min pri 37 °C. Nakon odvajanja stanica od površine, doda se 600  $\mu$ L hranjivog medija te se suspenzija stanica prebaci u plastične tubice. Svakom uzorku odredi se točan broj stanica u svrhu odvajanja  $0,6 \times 10^6$  stanica za izolaciju i analizu proteina western blotom.

### 3.2.5.7. Fiksacija i priprema staničnih preparata za mikroskopiju

Stanični preparati za mikroskopiju pripremljeni su nasadivanjem stanica u plastične ploče s 24 bunarića uz prethodno postavljanje kružnih pokrovnih stakalaca promjera 12 mm (Lab Logistics Group, Njemačka) na dno bunarića. Pokrovna stakalca steriliziraju se 70 %-tnim etanolom 15 min nakon čega se sterilnom pincetom pažljivo postave na dno pojedinog bunarića te se isperu 3 puta otopinom fosfatnog pufera DPBS. U bunariće se nasadi  $8,0 \times 10^4$  stanica u 1 mL hranjivog medija te se ostave u inkubatoru za prekončni rast. Sljedeći dan, stanicama se ukloni medij, isperu se DPBS-om i inkubiraju 10 min u mraku u 200  $\mu$ L 4%-tne otopine formaldehida (Sigma-Aldrich) u svrhu fiksacije stanica. Nakon fiksacije, stanice se isperu 3 puta DPBS-om nakon čega se stakalca s pričvršćenim stanicama pažljivo izvade pomoću sterilne igle i pincete. Stakalca se zatim postave na predmetna stakalca na koje se prethodno nanese mala količina otopine sa uklapanje *ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI* (Thermo Fisher Scientific) koja sadrži fluorescentnu boju za obilježavanje DNA odnosno jezgre stanica (DAPI). Stanični preparati suše se uronjeni u otopinu za uklapanje pri sobnoj temperaturi u mraku preko noći, nakon čega se pohranjuju pri 4 °C u prikladne spremnike za predmetna stakalca.



### 3.2.6. Svjetlosna i konfokalna mikroskopija

Za redovitu provjeru rasta, morfologije i procjenu konfluentnosti staničnih kultura, tijekom provedbe ovog istraživanja koristio se svjetlosni mikroskop *Olympus CKX41* (Olympus, Japan). Fluorescentne mikroskopske snimke staničnih preparata snimljene su pretražnim konfokalnim mikroskopom *Leica SP8 X FLIM* (Leica Microsystems, Njemačka) koji je opremljen objektivom *HC PL APO CS2 63 × /1.40* s uljnom inverzijom, laserskom diodom na 405 nm i superkontinuiranim pobudnim laserom emisijskog područja 470-700 nm. Tijekom snimanja staničnih preparata, valna duljina pobude fluorescentnog signala EGFP iznosila je 488 nm, a emitirano zračenje snimano je u rasponu od 500-550 nm. Za pobudu signala DAPI-a korišteno je zračenje valne duljine 405 nm, a emitirano zračenje detektirano je u rasponu od 430-550 nm. Snimanje konfokalnim mikroskopom provedeno je u jedinici za mikroskopiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković.

### 3.2.7. Metode rada s proteinima

Lizati staničnih modela, fibroblasta pacijenata i proteinski produkti reakcija translacije i transkripcije *in vitro* korišteni su ovom istraživanju za analizu ekspresije proteina metodom western blot. Izolacija proteina provodila se na ledu u kabinetu za sterilan rad, a korištena centrifuga i ultrazvučna kupelj prethodno su ohlađene na 4 °C. Uzorci proteina skladištili su se pri -80 °C tijekom cijele provedbe istraživanja.

#### 3.2.7.1. Priprema staničnih lizata

Uzorci lizata proteina istih staničnih linija izolirani su uz prethodno brojanje i odvajanje jednakog broja stanica u svrhu smanjenja odstupanja u ukupnoj količini izoliranih proteina svakog uzorka. Za validaciju generiranih staničnih modela Hek293, HepG2 i SW480, proteini su izolirani iz ukupno  $2 \times 10^6$  stanica. Uzorci proteina iz stanica tretiranih spojem MG-132, dobiveni su izolacijom iz  $0,6 \times 10^6$  stanica, dok su lizati fibroblasta pacijenata izolirani direktno iz zamrznutog alikvota nepoznatog broja stanica.

Nakon odvajanja stanica za izolaciju proteina, stanice se istalože centrifugiranjem 3 min pri  $300 \times g$ . Supernatant se odvoji pažljivim odlijevanjem, a talog stanica resuspendira se u 500  $\mu$ L DPBS-a nakon čega se ponovno centrifugira na istim postavkama u svrhu dodatnog ispiranja stanica. Istaložene stanice se odvoje i resuspendiraju u 300  $\mu$ L prethodno pripremljenog pufera za lizu RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,1 % SDS, 0,5 % natrijev deoksikolat (DOC), 1 % NP-40), koji dodano sadrži inhibitore proteaza *cOmplete™ Mini*

*Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich) i inhibitor fosfataza natrijev ortovanadat  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Thermo Fisher Scientific) konačne koncentracije 1 mM. Stanice se zatim inkubiraju 15 min na ledu, nakon čega se soniciraju pomoću ultrazvučne kupelji *Bioruptor Plus* (Hologic Diagenode, SAD) u trajanju od 10 ciklusa od kojih se svaki ciklus sastoji od 30 s sonikacije i 10 s pauze. Uzorci se nakon sonikacije centrifugiraju 15 min pri  $16\,000 \times g$  nakon čega se 250  $\mu\text{L}$  supernatanta prebaci u novu tubicu i pohrani pri  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.7.2. Određivanje koncentracije proteina

Komercijalni komplet *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) korišten je za izračun relativnih koncentracija proteina analiziranih uzoraka. Metoda se temelji na redukciji bakrovih iona u prisutnosti proteina i uzastopnom formiranju ljubičastih otopina kompleksa  $\text{Cu}^+$  iona i bicinkonične kiseline (BCA, od engl. *bicinchoninic acid*). Apsorbancija rezultirajućih otopina direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u mjernom uzorku.

Određivanje koncentracije proteina provedeno je prema preporukama proizvođača bez pripreme standardnih otopina za konstrukciju standardne krivulje. S obzirom na to da su proteini međusobno uspoređenih uzoraka izolirani iz istog broja stanica, omjer njihovih apsorbancija bio je dovoljan za provedbu daljnjih analiza, bez upotrebe standardnih otopina albumina goveđeg seruma (BSA, od engl. *bovine serum albumin*). Izmjerena razlika u apsorbancijama korigirana je prilagodbom volumena pojedinog uzoraka pri provedbi elektroforeze na SDS-poliakrilamidnom gelu.

Svakom uzorku proteina izmjerena je apsorbancija u triplikatu miješanjem 10  $\mu\text{L}$  uzorka i 200  $\mu\text{L}$  radne otopine (omjer uzorka i radne otopine 1:20) u plastičnim pločama s 96 bunarića uz dodatak duplikata uzorka slijepe probe, tj. radne otopine bez uzorka proteina. Sadržaj ploča dodatno se promiješa 3 min na tresilici nakon čega se inkubira 30 min pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, ploča se ohladi na sobnu temperaturu te se izmjeri apsorbancija otopina pri valnoj duljini od 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča *Multiskan EX*.

### 3.2.7.3. Elektroforeza u SDS-polikrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a široko je korištena metoda analize proteina koja omogućuje njihovo razdvajanje na temelju molekulskih masa. Natrijev dodecil-sulfat (SDS, od engl. *sodium dodecyl sulfate*) spada u skupinu anionskih detergenata, kemijskih spojeva koji narušavaju nekovalentne interakcije između polipeptidnih lanaca proteina i uzrokuju denaturaciju njihove tercijarne strukture. Uz to, vezanje molekula SDS-a na protein

maskira njegov naboj zbog prisutnosti mnogobrojnih negativno nabijenih sulfatnih skupina detergenta. Zbog ove činjenice, denaturirani se proteini prolaskom kroz pore poliakrilamidnog gela pod utjecajem električnog polja razdvajaju se isključivo na temelju molekulskih masa njihovih monomernih podjedinica.

Razdvajanje proteina elektroforezom provedeno je upotrebom 10 % i 12 %-tnih poliakrilamidnih gelova debljine 1,0 mm koji su prethodno pripremljeni pomoću sustava *Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module* (Bio-Rad, SAD). Gelovi za razdvajanje pripremljeni su miješanjem reagensa navedenih u Tablici 9., nakon čega je smjesa nanosena u sustav za izlijevanje uz dodatak 1 mL izopropanola na gornji rub gela u svrhu prevencije inhibicije polimerizacije kisikom iz zraka. Nakon 30 min, na polimerizirani gel za razdvajanje doda se smjesa 5 %-tnog gela za sabijanje te se na vrh gela umetnu plastični češljčići koji služe kao kalup za formiranje jažica za nanošenje uzorka.

**Tablica 9. Sastav smjesa za pripremu 10 %-tnih i 12 %-tnih poliakrilamidnih gelova za SDS-PAGE.**

Komponenta smjese	Gel za sabijanje	Gel za razdvajanje	
	5 %	10 %	12 %
mqH <sub>2</sub> O	2,7 mL	4,0 mL	3,3 mL
30 % akrilamida/bisakrilamida	670 µL	3,3 mL	4,0 mL
1,0 M Tris pH 6,8	500 µL		
1,5 M Tris pH 8,8		2,5 mL	2,5 mL
10 % SDS	40 µL	100 µL	100 µL
10 % APS	40 µL	100 µL	100 µL
TEMED	4 µL	4 µL	4 µL
<b>Ukupni volumen*</b>	<b>4 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>10 mL</b>

\*- navedeni volumeni dovoljni su za izlijevanje dva poliakrilamidna gela.

Uzorci proteina pripremljeni su miješanjem određenog volumena uzorka i pufera za nanošenje proteina na gel (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % (v/v) β-merkaptetanol, 8 % (v/v) SDS, 40 % (v/v) glicerol, 0,04 % (w/v) bromofenol plavo) nakon čega su inkubirani 5 min pri 95 °C u svrhu denaturacije proteina. Pripremljeni uzorci nanoseni su u jažice gela uronjenog u kadnicu za vertikalnu elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad) napunjenu puferom za SDS-PAGE (25 mM Tris, 200 mM glicin, 0,1 % (v/v) SDS, pH 8,3). Uz uzorke proteina, u prvu jažicu gela nanese se 2 µL markera molekulskih masa *PageRule Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza se provodi pri naponu od 140 V do početka izlaska boje iz gela.

#### 3.2.7.4. Metoda western blot

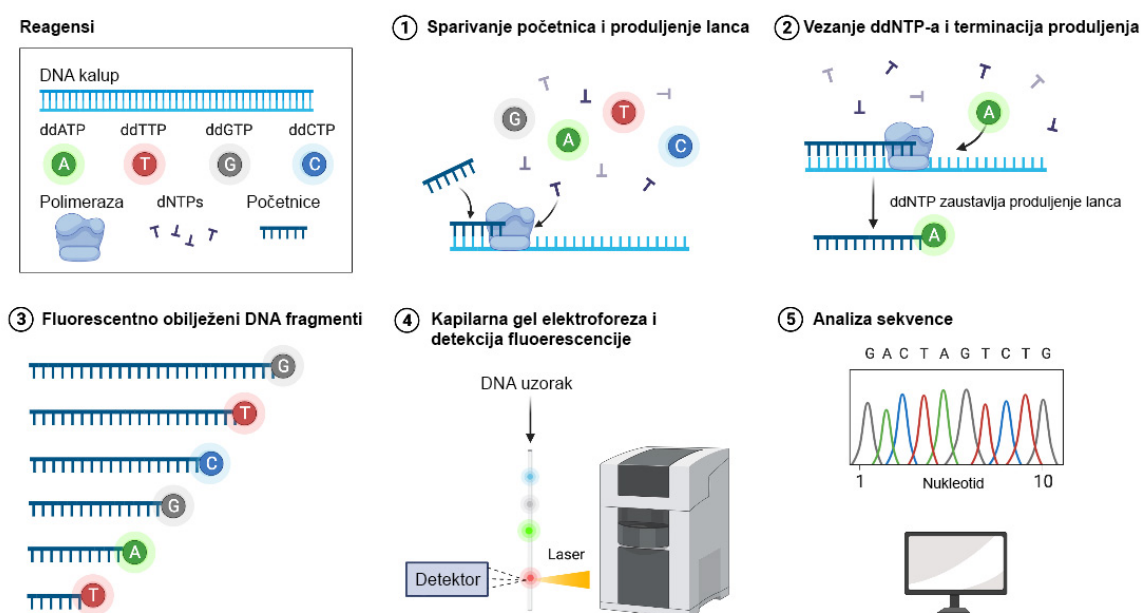
Western blot je osnovna laboratorijska tehnika detekcije specifičnih proteina iz kompleksne proteinske smjese. Temelji se na uporabi protutijela koji specifično prepoznaju i vežu protein od interesa, što u konačnici omogućuje njihovu selektivnu detekciju i kvantifikaciju. Cjelokupna metoda sastoji se od niza koraka koji redom uključuju; razdvajanje proteina SDS-gel elektroforezom, njihov prijenos na membranu od nitroceluloze ili polivinilidenfluorida (PVDF), blokiranje membrane u svrhu prevencije nespecifičnog vezanja protutijela, inkubacije membrane primarnim, a nakon toga sekundarnim protutijelom te u konačnici vizualizacije i kvantifikacije proteina radioaktivnim, fluorescentnim ili kemiluminescentnim metodama detekcije.

Pri provedbi ovog istraživanja, metoda western blot koristila se za analizu ekspresije proteina SAHH u fibroblastima pacijenata i za provjeru ekspresije mutiranih proteina SAHH u staničnim modelnim sustavima Hek293, HepG2 i SW480. Prinosi reakcija transkripcije i translacije *in vitro* također su analizirani western blotom, kao i promjene u količini proteina SAHH nakon tretmana staničnih modela inhibitorom proteasoma.

Nakon njihovog razdvajanja elektroforezom SDS-PAGE, proteini su preneseni na PVDF-membranu koristeći *Trans-Blot Turbo Mini 0,2 μm PVDF Transfer Pack* i sustav za prijenos *Trans-Blot Turbo Transfer System* (sve Bio-Rad) prema preporukama proizvođača. Postavke sustava podešene su na brzi prijenos proteina standardnog raspona molekulskih masa (10-180 kDa) pri konstantnoj jakosti struje od 1,3 A i maksimalnom naponu od 25 V u trajanju od 14 min. Provjera uspješnosti prijenosa proteina provedena je inkubacijom membrane u otopini za bojanje amido crno (0,1 % (w/v) Amido crno 10B (Kemika, Hrvatska), 10 % (v/v) ledena octena kiselina, 45 % (v/v) metanol) u trajanju od 5 min nakon čega je boja uklonjena otopinom za odbojavanje (7,5 % (v/v) ledena octena kiselina, 20 % (v/v) metanol). Membrana je zatim blokirana inkubacijom u puferu za blokiranje (5 %-tno mlijeko u puferu TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20)) 1 h na tresilici pri sobnoj temperaturi. Tijekom blokiranja membrane, pripremljene su otopine primarnih protutijela razrijeđenih u puferu za blokiranje prema Tablici 4. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u otopinama primarnih protutijela preko noći pri 4 °C. Sljedeći dan, membrane su isprane tri puta u trajanju od 10 min inkubacijom u puferu TBS-T na tresilici, nakon čega se membrana inkubira u otopini odgovarajućeg sekundarnog protutijela 1 h pri sobnoj temperaturi.

### 3.2.8. Određivanje sljedova nukleinskih kiselina-metode sekvenciranja

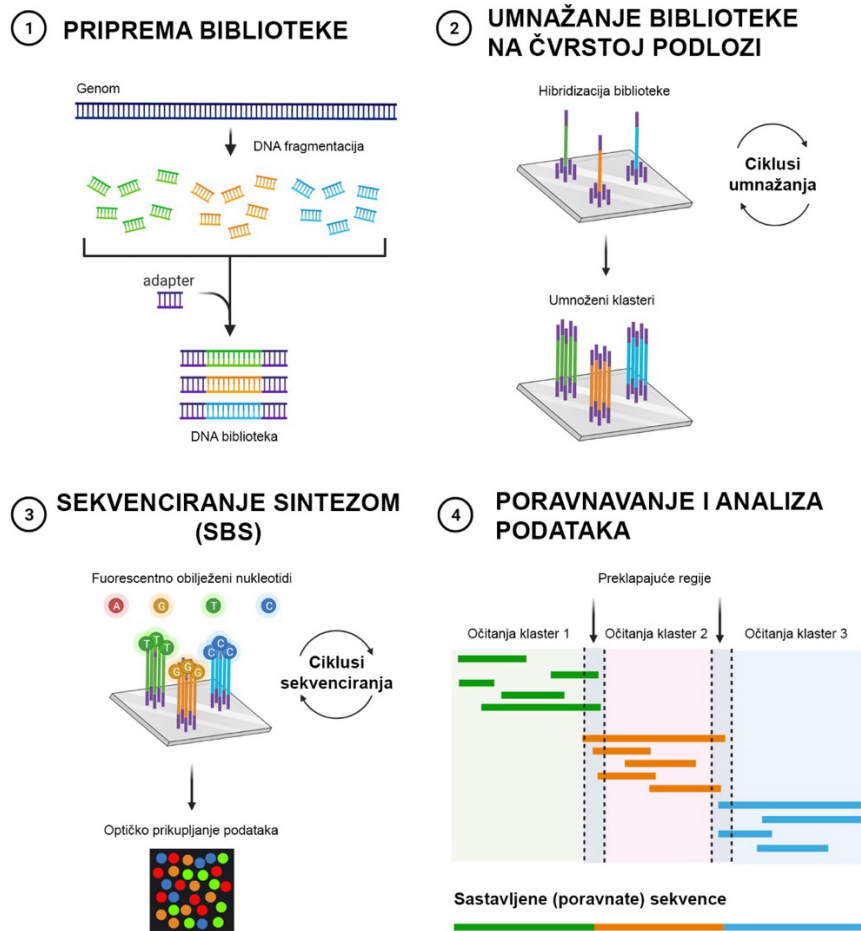
Sekvenciranje je postupak određivanja osnovnog nukleotidnog slijeda molekule DNA. Prve metode sekvenciranja razvijene su 1970-ih godina i obilježavaju jednu od glavnih prekretnica u razvoju modernih molekularnih znanosti. Godine 1977. Sanger i suradnici razvijaju danas široko poznatu Sangerovu dideoksi-metodu koja se uz Maxam-Gilbertovu metodu kemijskog cijepanja ubraja u prvu generaciju tehnika sekvenciranja. Novi materijali i metodološki pristupi razvijeni u narednom desetljeću, posebice fluorescentno obilježeni nukleotidi i kapilarna gel elektroforeza, iskorišteni su za značajno unaprjeđenje točnosti i automatizaciju cjelokupne Sangerove metode, omogućavajući učinkovito i isplativo sekvenciranje fragmenata DNA od 50-1000 parova baza. Najveće dostignuće Sangerove metode postignuto je početkom 21. stoljeća, kada je nakon više od deset godina napora uspješno dovršen projekt sekvenciranja i mapiranja prvog humanog referentnog genoma (HGP, od engl. *human genom project*) upravo zahvaljujući primjeni ove metode. Gotovo 50 godina nakon njezinog otkrića, Sangerova metoda sekvenciranja i danas se široko koristi za rutinsko određivanje nukleotidnih sljedova pojedinačnih gena i/ili manjih fragmenata DNA za potrebe medicinske dijagnostike i znanstvenih istraživanja.



**Slika 16. Osnovni koraci prve generacije sekvenciranja Sangerovom metodom.** Na rastući polinukleotidni lanac ugrađuju se standardni nukleotidi (1) sve do trenutka ugradnje modificiranih nukleotida koji onemogućuju daljnji rast lanca (2). Produkti reakcije sekvenciranja su fluorescentno obilježeni fragmenti DNA različite veličine (3) koji se kapilarnom gel elektroforezom odvajaju na temelju mase uz detekciju (4). Konačni rezultat sekvenciranja je elektroferogram koji prikazuje redoslijed karakterističnih fluorescentnih signala pojedinog nukleotida unutar polinukleotidnog lanca molekule DNA (5).

Prve generacije metoda sekvenciranja, iako uspješno primijenjene u sklopu projekta prvog humanog referentnog genoma, nisu bile prikladne za brzo i učinkovito sekvenciranje velikih genoma složenih organizama. Dugotrajnost i neisplativost očitavanja i mapiranja pojedinačnih fragmenata potaknulo je razvoj novih inovativnih tehnoloških rješenja. Početkom 21. stoljeća, kroz primjenu nanotehnologije, razvijena je metodologija paralelnog sekvenciranja milijuna kratkih odsječaka DNA u realnom vremenu (engl. *massive parallel sequencing*). Ovaj visoko protočni pristup iskorišten je kao temelj za razvoj NGS-a, a njihova praktična implementacija omogućila je sekvenciranje cjelokupnih genoma u svega jednom danu te je obilježila početak revolucije genomskih istraživanja i personalizirane medicine.

Platforme Illumina, Roche454, SOLiD i Ion Torrent ubrajaju se u drugu generaciju tehnika koje se primarno odlikuju izuzetnom protočnošću sekvenciranja (engl. *high-throughput sequencing*) koja omogućuje paralelnu provedbu i precizno detektiranje stotina milijuna reakcija sekvenciranja istovremeno. Strategije umnažanja fragmenata DNA i detekcije njihovih nukleotidnih sljedova razlikuju se ovisno o platformi. Dva glavna pristupa generiranja klonalne populacije odsječaka DNA uključuju umnažanje na kuglicama emulzijskim PCR-om (engl. *bead-based amplification*) i umnažanje na čvrstoj podlozi (engl. *solid-phase bridge amplification*). Samo određivanje slijedova umnoženih odsječaka provodi se sekvenciranjem ligacijom (SBL, od engl. *sequencing by ligation*) ili sekvenciranjem sintezom (SBS, od engl. *sequencing by synthesis*). Sekvenciranje sintezom uključuje tri različita mehanizma ovisno o platformi; ciklička reverzibilna terminacija (Illumina), pirosekvenciranje (Roche454) i detekcija oslobođenih protona (Ion Torrent). Neovisno o platformi, sve metode druge generacije temelje se na sekvenciranju kratkih odsječaka DNA veličina 35-700 parova baza, generirajući velike količine kratkih očitavanja čija analiza često zahtijeva složenu obradu prikladnim bioinformatičkim alatima prije same interpretacije rezultata. Danas se metode NGS-a široko primjenjuju za detekciju SNP-ova, bilo određene ciljne regije ili na razini cijelog genoma, zatim sekvenciranje bakterijskih i manjih eukariotskih genoma *de novo*, sekvenciranje cjelokupnih transkriptoma (RNAseq), profiliranje epigenoma i kromatinskih struktura, analizu metagenoma itd. Neovisno o njihovoj primjeni, NGS-metode druge generacije otvorile su vrata brzog, preciznog i isplativog generiranja goleme količine genomskih podataka te su danas neophodan alat moderne znanosti i medicine 21. stoljeća.



**Slika 17. Osnovni koraci sekvenciranja metodom druge generacije na Illumina platformi.** Biblioteke za sekvenciranje pripremaju se fragmentacijom molekula DNA uz ligaciju adaptera (1) u svrhu hibridizacije i umnažanja fragmenata na čvrstoj podlozi (2). Sintezom drugog lanca određuju se sljedovi fragmenata kroz detekciju karakterističnih fluorescentnih signala nukleotida nakon svakog ciklusa njihove ugradnje (3). Kratka očitavanja analiziraju u svrhu sastavljanja kontinuirane sekvence početne molekule DNA (4).

Tehnologije sekvenciranja druge generacije sa sobom donose i određene nedostatke, tj. ograničenja prilikom istraživanja kompleksnih dijelova genoma koji potencijalno sadrže ključne informacije za dešifriranje njihovih evolucijskih, funkcionalnih i bioloških uloga. Točno mapiranje kratkih očitavanja za regije genoma s dugim ponavljajućim sljedovima, strukturnim varijacijama (duplikacije, inverzije, translokacije) i sekvenciranje velikih genoma *de novo* predstavljaju izazove pri analizi podataka dobivenih metodama sekvenciranja kratkih očitavanja (SRS, od engl. *short-read sequencing*). Također, priprema biblioteka obuhvaća umnažanje odsječaka PCR-om, što može dovesti do potencijalne sistematske pogreške, tj. pristranosti (engl. *bias*) prilikom analize rezultata, npr. kod analize udjela baza GC unutar sekvenci, njihove duljine, neravnomjerne pokrivenosti određenih regija genoma, pogrešnog određivanja nukleotida itd.

Nedavno su razvijeni novi pristupi koji omogućuju sekvenciranje velikih odsječaka DNA (LRS, od engl. *long-read sequencing*). LRS smatraju se trećom generacijom metoda sekvenciranja, a uključuju dvije glavne tehnologije; sekvenciranje nanoporama (ONT, od engl. *Oxford nanopore sequencing*) i sekvenciranje jedne molekule u realnom vremenu (SMRT, od engl. *PacBio single-molecule real-time sequencing*). Ovim metodama moguće je generirati kontinuirana očitavanja fragmenata DNA većih od 10 000 parova baza direktnim sekvenciranjem native DNA molekule, bez potrebe njezinog umnažanja PCR-om. Duga očitavanja također uvelike unaprjeđuju točnost njihovog mapiranja, posebice pri analizi ponavljajućih dijelova genoma, velikih strukturnih varijacija, izoformi transkriptata i kod sastavljanja genoma *de novo*. Metode druge generacije trenutno još uvijek posjeduju veću točnost očitavanja pojedinih nukleotida (engl. *base-call accuracy*), veću protočnost i nižu cijenu, stoga su još uvijek zlatni standard genomskih istraživanja i medicinske dijagnostike posebice za analizu i detekciju SNP-ova, varijacija u broju kopija odnosno CNV-ova te manjih insercija i delecija. Oba pristupa sekvenciranja sadrže svoje prednosti i nedostatke, a kombinacija ovih dviju tehnologija danas se smatra najboljim rješenjem za sveobuhvatnu analizu i istraživanje kompleksnih genoma i njihovih struktura.

#### 3.2.8.1. Sekvenciranje transkriptoma (mRNAseq)

Metode NGS-a omogućuju analizu ekspresije gena na razini cijelog genoma te analizu transkriptoma u svrhu istraživanja staničnih procesa, fiziologije i aktivnosti. U sklopu ovog istraživanja, sekvencirani su transkriptomi fibroblasta pacijenata i zdravih kontrola u svrhu analize ekspresije pojedinog alela gena *SAHH* (ASE, od engl. *allele-specific expression*) i validacije rezultata RT-qPCR analize ekspresije gena *SAHH*. Transkriptomi staničnih modela HepG2 sekvencirani su s ciljem identifikacije gena i/ili staničnih mehanizama koji objašnjavaju potencijalne razlike u ekspresiji mutiranih proteina SAHH. Sekvenciranje i analiza transkriptoma NGS-om uključuje niz koraka, od početne provjere kvalitete uzorka RNA, pripreme biblioteka, reakcije sekvenciranja te obrade, analize i interpretacije rezultata.

#### 3.2.8.2. Provjera kvalitete ukupne RNA

Kvantifikacija izolirane ukupne RNA provedena je na fluorimetru *Qubit 3.0* (poglavlje 3.1.2.5.). Kvalitativna analiza, odnosno stupanj degradacije RNA, napravljena je uporabom komercijalnog kompleta *RNA Nano 6000* (Agilent Technologies, SAD) i uređaja *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Ovaj sustav omogućuje razdvajanje i analizu fragmenata RNA

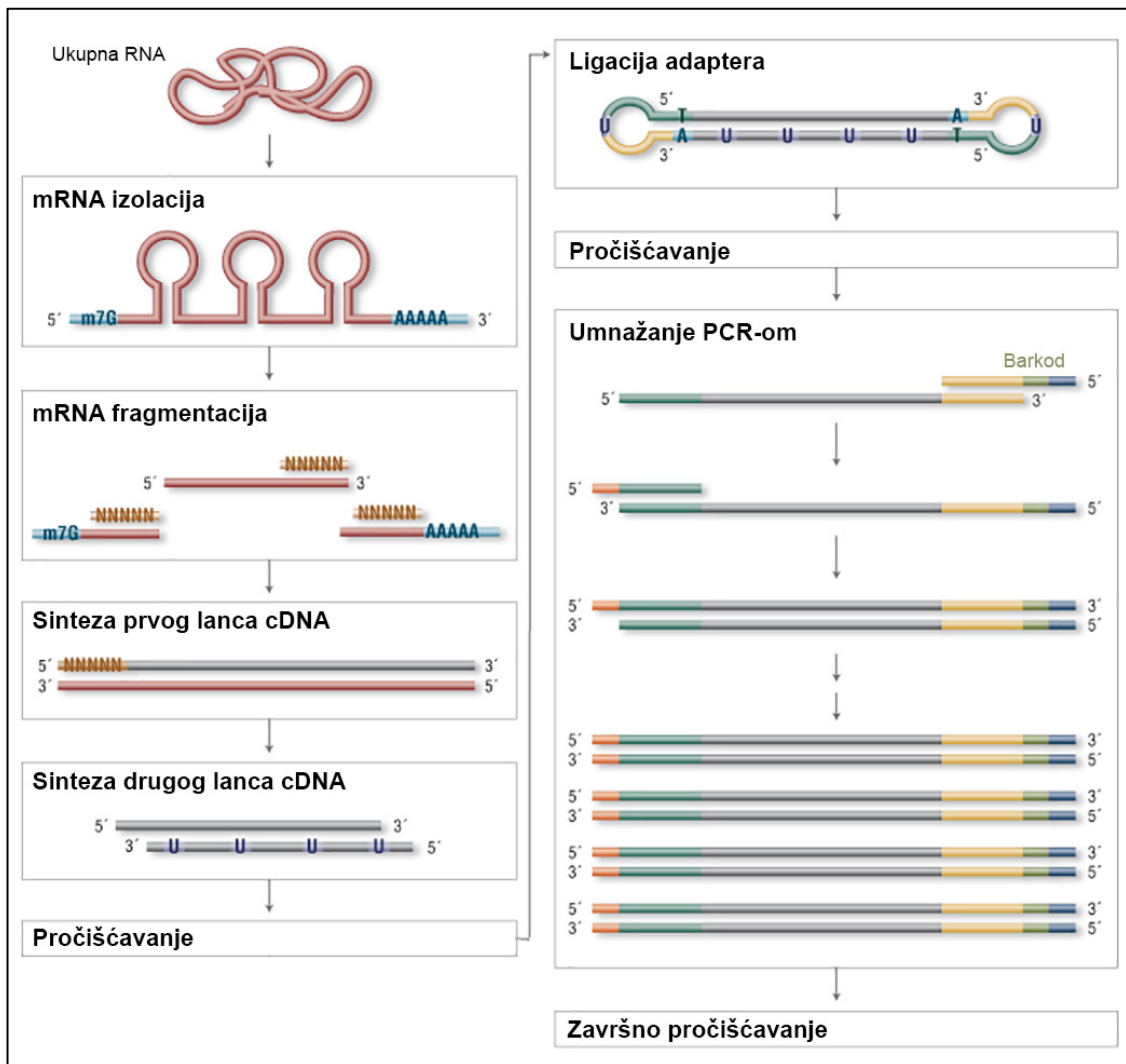


prisutnih u određenom uzorku uz procjenu, tj. kvantifikaciju stupnja degradiranosti izraženog preko RIN-vrijednosti (od engl. *RNA integrity number*). RIN-vrijednost određenog uzorka definira se u rasponu od 1-10, a računa se usporedbom intenziteta fluorescencije rRNA fragmenata 18S i 28S. RIN-vrijednost od 10 označava 100 %-tnu intaktnost fragmenata, dok niža RIN-vrijednost, npr. 3, ukazuje da je 30 % molekula RNA intaktno, dok je preostalih 70 % u nekoj mjeri degradirano. Jedan od početnih koraka pripreme transkriptomskih biblioteka uključuje obogaćenje (engl. *enrichment*) uporabom početnica oligo dT u svrhu izdvajanja molekula mRNA koje posjeduju sljedove poliA. Uzorci koji posjeduju RIN-vrijednost < 7 nisu prikladni za pripremu biblioteka ovim pristupom, stoga je provjera integriteta RNA ključan korak za uspješnu pripremu biblioteka i sekvenciranje transkriptoma.

Priprema čipa za analizu uzoraka kompletom *RNA Nano 6000* (Agilent Technologies) provedena je prema preporukama proizvođača. Ukratko, alikvot gela za elektroforezu centrifugira se u prikladnoj kolonici s filterom 10 min pri  $1500 \times g$ . Filtrirani alikvot gela volumena 65  $\mu\text{L}$  pomiješa se s 1  $\mu\text{L}$  fluorescentne boje, dodatno se promiješa na tresilici i ponovno centrifugira 10 min pri  $13\,000 \times g$  u svrhu taloženja krupnih čestica gela. Pripremljena smjesa gela i boje otpipetira se u prikladne jažice čipa, dok se u preostale jažice nanese 5  $\mu\text{L}$  markera *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent Technologies) i 1  $\mu\text{L}$  ispitivanog uzorka RNA. Dodatno se u zasebnu jažicu uz 5  $\mu\text{L}$  markera nanese 1  $\mu\text{L}$  standarda *RNA 6000 Ladder* (Agilent Technologies). Pripremljeni čip promiješa se na tresilici *IKA MS3 basic* (IKA, Njemačka) 1 min pri 2400 rpm. Čip se zatim postavi u uređaj *Bioanalyzer 2100* i analizira pomoću programskog alata uz odabir opcije za analizu ukupne eukariotske RNA (engl. *Total Eukaryote RNA Nano*). Nakon završetka analize, ukoliko su uzorci i čip prikladno pripremljeni, sustav automatski određuje RIN-vrijednost svakog uzorka, uz mogućnost vizualizacije fragmenata RNA.

### 3.2.8.3. Priprema biblioteka cDNA za sekvenciranje transkriptoma

Biblioteka za sekvenciranje transkriptoma staničnih modela HepG2 i fibroblasta pacijenata pripremljene su koristeći komercijalni komplet *NEB Ultra II Directional RNA Library Prep for Illumina* (New England Biolabs). Uzorci ukupne RNA zahtijevaju prethodnu obradu kako bi se omogućilo uspješno sekvenciranje na platformama Illumina. Osnovni koraci pripreme biblioteka cDNA iz uzoraka ukupne RNA uključuju obogaćenje mRNA, njihovu fragmentaciju, sintezu cDNA, ligaciju adaptera te konačno umnažanje PCR-metodom uz dodavanje barkodova (Slika 18.).



Slika 18. Osnovni koraci pripreme biblioteka za sekvenciranje transkriptoma (mRNAseq). Preuzeto i prilagođeno iz [142].

Uzorci ukupne RNA staničnih modela HepG2, koji stabilno eksprimiraju protein EGFP-SAHH divljeg tipa odnosno mutirani oblik EGFP-SAHH-Y328D, korišteni su za pripremu transkriptomskih biblioteka u duplikatima. Biblioteke transkriptoma fibroblasta 1. i 8. pacijenta uz pripadajuće zdrave kontrole pripremljene su u triplikatima prema uputama proizvođača. Svaka biblioteka pripremljena je iz 800 ng početnog uzorka ukupne RNA.

Prvi korak pripreme uključuje izolaciju mRNA pomoću početnica oligo dT koje su imobilizirane na magnetskim česticama. Nakon izolacije, mRNA se eluira s magneta i fragmentira inkubacijom 15 min pri 95 °C kako bi konačna veličina fragmenata iznosila otprilike 200 parova baza. Fragmenti mRNA zatim se prevedu u jednolančane sljedove cDNA pomoću nasumičnih heksamera i reverzne transkriptaze. Drugi lanac cDNA sintetizira se inkubacijom u trajanju od 1 h pri 16 °C uz uporabu dUTP-a (deoksiuridin-trifosfata) umjesto dTTP-a (deoksitimidin-trifosfata). Ovaj pristup pripreme mRNA-biblioteka omogućuje

određivanje orijentacije pojedinog transkripta odnosno zadržava informaciju s kojeg lanca DNA on potječe (engl. *stranded mRNAseq*) prilikom analize podataka. Dvolančani fragmenti cDNA pročišće se iz reakcijske smjese magnetskim česticama te im se modificiraju tupi krajevi dodavanjem jednog adenzina na 3' kraj svakog fragmenta. Sljedeći korak pripreme biblioteka uključuje ligaciju specifičnih adaptorskih sekvenci na krajeve fragmentata cDNA koji omogućuju njihovu imobilizaciju na čvrstu podlogu (engl. *flow-cell*) platforme za sekvenciranje Illumina. Prema preporukama proizvođača, adapteri su prije dodatka u reakcijsku smjesu razrijeđeni 5 puta. Produkti reakcije ligacije pročišćeni su uz pomoć magnetskih čestica, a zatim su umnoženi PCR-om. Tijekom umnažanja, uporabom specifičnih početnica, svaka biblioteka obilježava se karakterističnim barkodom (engl. *index*), tj. slijedom od 6-8 točno definiranih nukleotida koji označavaju kojem izvornom uzorku očitani fragment pripada. Na kraju, umnožene i obilježene biblioteke pročišće se pomoću magnetskih kuglica nakon čega se provjeri kvaliteta njihove cjelokupne pripreme.

#### 3.2.8.4. Provjera kvalitete biblioteka cDNA i sekvenciranje na platformi Illumina

Kvaliteta pripremljenih biblioteka provjerena je pomoću uređaja *Bioanalyzer 2100* uz uporabu komercijalno dostupnog kompleta *High Sensitivity DNA* (Agilent Technologies) prema preporukama proizvođača. Promatrani parametri uključivali su prisutnost nečistoća (adapter dimera, dimera početnica) i distribuciju veličine fragmenata. S obzirom na utvrđenu prisutnost neželjenih fragmenata dimera adaptera između 87-139 parova baza, kvantificirani su samo fragmenti biblioteka veličina između 200-1000 parova baza. Biblioteke su zatim normalizirane na koncentraciju od 3 nM te su pomiješane u jednakim volumnim omjerima (5 $\mu$ L). Konačna smjesta biblioteka (engl. *library pool*) dodatno je pročišćena pomoću *AMPure XP* (Beckman Coulter) magnetskih kuglica uz korištenje volumnog omjera otopina/magnetske kuglice 0,9 u svrhu uklanjanja zaostalih dimera adaptera.

Prije samog sekvenciranja, uzorak biblioteka denaturiran je mješanjem 20  $\mu$ L otopine koncentracije 1 nM i 20  $\mu$ L 0,2 M otopine NaOH, nakon čega je razrijeđen na konačnu koncentraciju od 1,4 pM. Sekvenciranje biblioteka provedeno je na platformi za sekvenciranje *NextSeq 550* uz uporabu komercijalnog kompleta kemikalija za sekvenciranje *NextSeq550 150 Cycles HIGH Reagents* i odgovarajuće pločice za sekvenciranje *NextSeq 550 HIGH Output Flow Cell* (sve Illumina, SAD). Protokol sekvenciranja postavljen je na 76 ciklusa očitavanja oba kraja fragmenata, tzv. sekvenciranje uparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*).

### 3.2.9. Bioinformatička obrada i analiza NGS-podataka

Podaci dobiveni sekvenciranjem NGS-metodama uključuju velike količine neobrađenih (sirovih) sekvenci odnosno kratkih očitavanja duljine 75-150 parova baza. Njihova bioinformatička obrada ovisi o eksperimentalnom pristupu i vrsti podataka, a dijeli se na tri glavne razine; primarnu, sekundarnu i tercijarnu analizu.

Primarna analiza obično se provodi automatski, tijekom samog sekvenciranja, a specifična je za pojedinu NGS-platformu. Uključuje detekciju i analizu izlaznog signala sekvenciranja, određivanje nukleotida, tj. pojedine baze (engl. *base calling*) i rangiranje kvalitete očitavanja svake baze (engl. *base quality scoring*). Svi elementi i parametri primarne analize zapisani su u izlaznom formatu podataka, tzv. datoteci FastQ, a služe za provjeru ukupne kvalitete podataka odnosno točnosti same reakcije sekvenciranja prije daljnje analize. Sekundarna analiza obuhvaća mapiranje, tj. poravnanje (engl. *alignment*) sekvenci na referentni genom i detekciju strukturnih varijanti (SNP-ovi, insercije, delecije itd.), dok se za analizu transkriptoma dodatno provodi identifikacija i kvantifikacija pojedinih transkripata. Tercijarna analiza najčešće uključuje anotaciju i biološku interpretaciju rezultata sekvenciranja, ovisno o svrsi provedenog eksperimenta. Za profiliranje globalne genske ekspresije, tercijarna analiza obuhvaća diferencijalnu ekspresiju gena i njihovu funkcionalnu interpretaciju, najčešće analizom genske ontologije (GO).

U sklopu ovog istraživanja, sekundarna i tercijarna analiza transkriptoma fibroblasta pacijenata i staničnih modela HepG2 provedena je u suradnji kolegama iz Odjela za Bioinformatiku Max Planck Instituta za Biologiju Starenja u Kölnu u Njemačkoj.

#### 3.2.9.1. Provjera kvalitete sirovih podataka sekvenciranja

Prije obrade i analize izlaznih podataka, uspješnost cjelokupnog sekvenciranja provjerena je procjenom njihove kvalitete uporabom programskog alata FastQC [143]. Ovaj alat pruža mogućnost detaljnog uvida u različite parametre pojedine datoteke FastQ kako bi se procijenila ukupna kvaliteta neobrađenih sekvenci svakog uzorka u svrhu osiguravanja uspješne provedbe daljnje analize. Alat FastQC sastoji se od nekoliko modula koji određuju i vizualiziraju različite parametre kao što su vrijednost kvalitete pojedinog nukleotida (Phred-vrijednost 30- Q30), zastupljenost svakog nukleotida (A, T, C, G), udio GC u sekvenci, udio N-očitavanja u sekvenci, udio dupliciranih sekvenci i izračun prekomjerno zastupljenih sekvenci. Ukoliko neki od ovih parametara nije unutar očekivanih granica vrijednosti, dodatnom obradom podataka kao što je odrezivanje dijelova sekvenci (engl. *trimming*) ili filtriranje, tj. uklanjanje nekvalitetnih

sekvenci, moguće je povećati ukupnu kvalitetu podataka. U sklopu ovog istraživanja, analiza neobrađenih sekvenci alatom FastQC pokazala je visoku kvalitetu dobivenih podataka, stoga za daljnju analizu nije bila potrebna njihova dodatna obrada.

### 3.2.9.2. Poravnanje sekvenci na referentni genom i kvantifikacija transkripata

Neobrađene sekvence poravnate su na humani referentni genom GRCh38 (Ensembl 105/h38) pomoću programskog alata Kallisto [144] (izdanje 0.46.1). Prije samog poravnanja, sekvence transkripata rRNA uklonjene su iz datoteke koja sadrži cjelokupni referentni genom kako bi se poboljšala točnost mapiranja te identifikacije i kvantifikacije transkripata. Alatom Kallisto provedeno je poravnanje sekvenci i uzastopna kvantifikacija transkripata nakon čega je provedena statistička obrada i provjera kvalitete poravnatih sekvenci programskim alatima featureCounts [145] i MultiQC [146]. Ovi alati, slično kao i FastQC, omogućuju vizualizaciju i usporedbu statističkih parametara neobrađenih sekvenci i njihovih poravnanja za sve analizirane uzorke odjednom, pružajući jednostavan i brz uvid u kvalitetu provedenih analiza. Za vizualizaciju datoteka koje sadrže poravnate sekvence na referentni humani genom, korišten je programski alat *Integrative Genomics Viewer* (izdanje 2.14.0) [147].

### 3.2.9.3. Određivanje diferencijalno eksprimiranih gena

Nakon poravnanja sekvenci i kvantifikacije ekspresije gena, provedena je analiza diferencijalne ekspresije programskim alatom DESeq2 (izdanje 1.24.0) [148]. DESeq2 omogućuje kvantitativnu usporedbu ekspresije gena uporabom više različitih statističkih metoda koje, normaliziraju ekspresijske vrijednosti gena, kvantificiraju promjene u ekspresiji između uzoraka, procjenjuju statističku značajnost izračunatih promjena i modeliraju varijabilnost podataka kako bi se dodatno korigirali izračunati parametri. Promjene ekspresije na logaritamskoj skali ( $\log_2FC$ , od engl. *logarithmic fold change*) računaju se generaliziranim linearnim modelom (GLM, od engl. *generalized linear model*) koji uspoređuje kvantificirane ekspresijske vrijednosti nekog gena između dva uzorka. Waldovim testom, koji testira nultu hipotezu koja glasi da nema promjena u ekspresiji nekog gena između dva promatrana uzorka, računa se statistička značajnost svake izračunate promjene odnosno njezina  $p$ -vrijednost. Korekcijom  $p$ -vrijednosti za višestruko testiranje Benjamin-Hochergovim postupkom, određuju se vrijednosti prilagođene statističke značajnost (padj, od engl. *adjusted p-value*) koje opisuju stopu lažnog otkrića (FDR, od engl. *false discovery rate*) za svaku izračunatu promjenu ekspresije. Konačni cilj ove analize je generiranje liste gena s pridruženom razlikom u

ekspresiji ( $\log_2FC$ ) između dva uzorka uz njihovo rangiranje na temelju prilagođene statističke značajnosti (pajd). Ovakav prikaz rezultata analize naziva se lista diferencijalno eksprimiranih gena.

Za potrebe ovog istraživanja, određeni su diferencijalno eksprimirani geni između staničnih modela HepG2-EGFP-SAHH-WT i HepG2-EGFP-SAHH-Y328D. Također su određeni i diferencijalno eksprimirani geni u uzorcima fibroblasta pacijenata njihovom usporedbom s prikladnim kontrolnim uzorcima.

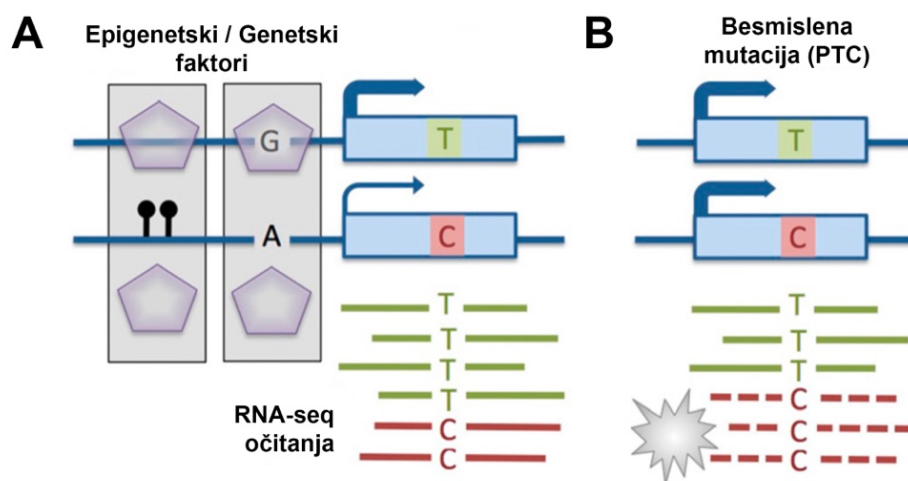
#### 3.2.9.4. Interpretacija diferencijalno eksprimiranih gena analizom genske ontologije

Genska ontologija (GO, od engl. *gene ontology*) je standardizirani sustav anotacije i kategorizacije gena koji se temelji na trenutno dostupnim znanstvenim spoznajama o njihovoj funkciji. Baza podataka GO (engl. *The Gene Ontology Resource*) najveći je izvor sistematiziranih informacija o funkciji gena, a trenutno sadrži preko 42 000 definiranih GO-pojmova koji predstavljaju osnovnu jedinicu funkcionalne anotacije gena [149]. GO-pojmovi podijeljeni su u tri osnovne kategorije: molekularna funkcija, stanična lokalizacija i biološki procesi unutar kojih genski produkti provode svoju funkciju. Analiza genske ontologije omogućuje funkcionalnu anotaciju liste gena kroz obogaćenost (engl. *enrichment*) odnosno njihovo grupiranje na temelju dodijeljenih GO-pojmova uz izračun statističke značajnosti pripadnosti unesene liste određenom pojmu, tj. grupi pojmova unutar odabrane kategorije. Analiza zastupljenosti pojmova genske ontologije pomaže u interpretaciji podataka dobivenih visokoprotocnim, „omics“ metodama te je danas najčešće korištena metoda u analizi podataka dobivenih mRNAseq-om u svrhu funkcionalne interpretacije diferencijalno eksprimiranih gena i njihovog biološkog značaja.

U ovom istraživanju, analiza genske ontologije napravljena je u suradnji s kolegama iz Odjela za Bioinformatiku Max Planck Instituta za Biologiju Starenja u Kölnu, pomoću automatiziranog sustava bioinformatičkih algoritama (engl. *pipeline*) za analizu podataka dobivenih mRNAseq-om. Funkcionalna anotacija gena, izračun zastupljenosti GO-pojmova te njihova statistička značajnost napravljena je pomoću mrežnog alata DAVID [150]. Prekomjerno zastupljeni GO pojmovi s p-vrijednosti manjom od 0,05 smatrani su statistički značajni, a rezultati su vizualizirani pomoću mrežnog alata Flaski.

### 3.2.9.5. Određivanje ekspresije specifičnog alela

Ekspresija specifičnog alela je biološki fenomen koji opisuje neuravnoteženu ekspresiju dvije kopije istog gena u diploidnim organizmima. Najčešće nastaje zbog mutacija kodirajućih sljedova gena, njihovih regulatornih elemenata (promotori, pojačivači itd.) ili epigenetskih modifikacija koje utječu na regulaciju i razinu ekspresije samo jednog alela (Slika 19.). Određivanje ekspresije specifičnog alela provodi se bioinformatičkim alatima koji detektiraju neuravnoteženu ekspresiju kroz analizu podataka dobivenih mRNAseq-om. Preduvjet za kvantifikaciju ekspresije pojedinog alela ovim pristupom je prisutnost barem SNP-a unutar analiziranog gena, s obzirom na to da se na temelju alternativnih i referentnih nukleotida na poziciji SNP-a može odrediti alelnu porijeklo očitavanja. Odstupanja distribucije očitavanja od očekivane vrijednosti (1:1 tj. 50%) ukazuju na neuravnoteženu ekspresiju alela, a statistička značajnost odstupanja određuje se pomoću neparametarskih statističkih testova. Rezultati se u konačnici vizualiziraju unutar šireg raspona analiziranog gena, s ciljem detekcije sistemskih grešaka koje mogu proizaći iz različitih koraka tijekom sekvenciranja NGS-metodama (priprema biblioteka, poravnanje sekvenci, identifikacija polimorfizama itd.).



**Slika 19. Detekcija neuravnotežene ekspresije alela.** A) Epigenetske modifikacije i genetske varijante regulatornih elemenata utječu na distribuciju očitavanja. B) Besmislene mutacije dovode do degradacije mutiranih transkripata i potpunog nedostatka očitavanja. Preuzeto i prilagođeno iz [151].

U sklopu ovog istraživanja, određena je ekspresija specifičnog alela gena *SAHH* u uzorcima fibroblasta 1. i 8. pacijenta i kontrolnih uzoraka pomoću programskog paketa AllelicImbalance (izdanje 1.38) [152] u programu R (izdanje 3.8.0.). Distribucija referentnih i alternativnih nukleotida, tj. očitavanja, vizualizirana je na pozicijama mutacija p.W112\* (rs121918607), p.Y143C (rs121918608) i p.Y328D (rs748855369). Statistička značajnost odstupanja od očekivane distribucije izračunata je testom hi-kvadrat.

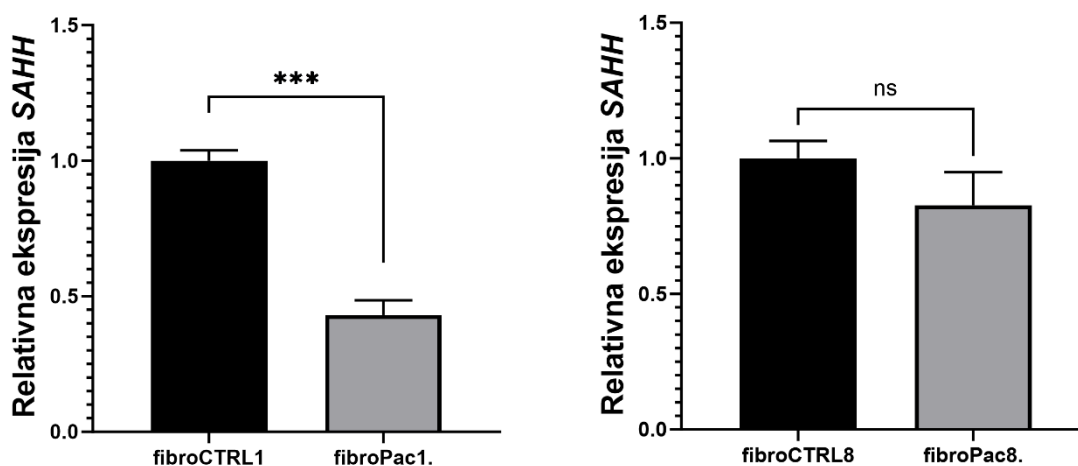
## 4. REZULTATI

### 4.1. Ekspresija transkripata i proteina SAHH u fibroblastima pacijenata

Na početku istraživanja, analizirana je ekspresija gena *SAHH* u fibroblastima pacijenata na razini transkripata i proteina. Na temelju prethodno poznatog genotipa, analizirani pacijenti spadaju u skupinu, tzv. kombiniranih heterozigota (engl. *compound heterozygote*), odnosno imaju dva različito mutirana alela *SAHH*. Iako nisu rodbinski povezani, mutacija Y143C im je zajednička, dok je druga svojstvena pojedinom pacijentu. Besmislena mutacija W112\* karakteristična je za prvog pacijenta, dok je pogrešna mutacija Y328D karakteristična osmom pacijentu.

#### 4.1.1. Analiza ekspresije gena *SAHH* kvantitativnim PCR-om

Ekspresija gena *SAHH* određena je iz uzoraka ukupne RNA kvantitativnim PCR-om uz reverznu transkripciju u jednom koraku uz uporabu hidrolizirajućih proba. U svrhu normalizacije podataka, dodatno je izmjerena i ekspresija kontrolnog gena *ACTB* za svaki mjereni uzorak u triplicatu. Relativna ekspresija gena *SAHH* u fibroblastima pacijenata određena je u odnosu na kontrolne fibroblaste zdravih pojedinaca prikladne dobi i spola.



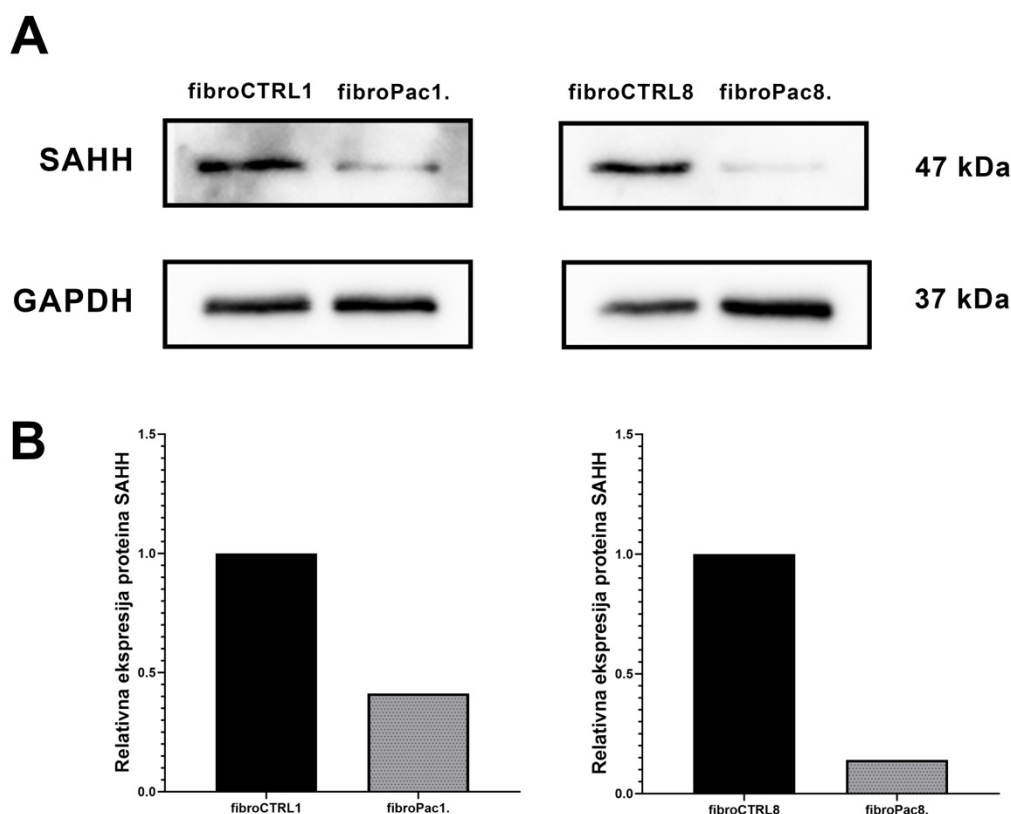
**Slika 20.** Ekspresija gena *SAHH* na razini transkripata u fibroblastima pacijenata. Relativna ekspresija gena *SAHH* izražena je u odnosu na kontrolne uzorke zdravih pojedinaca (1,0). Ekspresija gena *SAHH* normalizirana je u odnosu na ekspresiju endogene kontrole, gena *ACTB*. Statistička analiza i grafički prikaz napravljeni su u programu GraphPad Prism (izdanje 9.5.0). Standardne devijacije prikazane su vertikalnim linijama na svakom stupcu. Zvezdice (\*\*\*) označavaju vrijednost  $p < 0,001$ , oznaka „ns“ označava nedostatak statistički značajne razlike,  $n=3$ .



Rezultati dobiveni metodom RT-qPCR pokazuju da se u stanicama 1. pacijenta (fibroPac1.) nalazi dvostruko manja količina transkripata ( $43\% \pm 5,5$ ) u odnosu na kontrolni uzorak, dok kod 8. pacijenta (fibroPac8.), nije utvrđena razlika u ekspresiji gena *SAHH* (Slika 20.). Iz rezultata je moguće zaključiti da mutacije Y328D i Y143C nemaju značajan utjecaj na razine transkripata u stanici, za razliku od mutacije W112\*, koja ih narušava. Bitno je napomenuti da odabranim eksperimentalnim pristupom nije moguće nedvojbeno utvrditi da je isključivo mutacija W112\* uzrok utvrđenih promjena u ekspresiji. Naime, iako činjenice da ova mutacija uvodi PTC i da u stanicama nedostaje točno pola transkripata, snažno impliciraju da dolazi do njihove posttranskripcije degradacije mehanizmom NMD, nemoguće je isključiti doprinose ostalih staničnih regulatornih elemenata i procesa koji kontroliraju ukupnu aktivnost određenog gena i samu učinkovitost transkripcijskog mehanizma (epigenetske modifikacije, remodeliranje kromatina, transkripcijski faktori). Uz to, metodom RT-qPCR izmjerena je ukupna količina transkripata prisutnih u stanici, stoga ovim eksperimentalnim pristupom nije moguće kvantificirati ekspresiju specifičnog alela, tj. utvrditi koju točno mutaciju izmjereni transkripti sadrže, što bi značajno olakšalo interpretaciju dobivenih rezultata.

#### **4.1.2. Analiza ekspresije proteina SAHH metodom western blot**

Nakon analize ekspresije gena *SAHH* na razini transkripata, analizirana je ukupna količina proteina SAHH metodom western blot. Nativni SAHH iz staničnih lizata fibroblasta pacijenata i zdravih kontrola detektiran je uporabom monoklonskog protutijela protu-SAHH (Tablica 4.). Dodatno je u svakom uzorku kvantificirana ekspresija proteina gliceraldehid-3fosfata dehidrogenaze (GAPDH) kao kontrolnog proteina u svrhu normalizacije ekspresijskih vrijednosti. Zbog izuzetno ograničene količine staničnih lizata fibroblasta pacijenata, analiza ekspresije proteina SAHH nije ponovljena više puta.



**Slika 21. Ekspresija proteina SAHH u fibroblastima pacijenata s nedostatnom aktivnosti SAHH-a.** (A) Analiza ekspresije proteina SAHH i kontrolnog proteina GAPDH metodom western blot u stanicama fibroblasta 1. pacijenata (fibroPac1.), 8. pacijenta (fibroPac8.) i zdravim kontrolnim fibroblastima (fibroCTRL1 i fibroCTRL8). (B) Grafički prikaz relativne ekspresije SAHH-a u fibroblastima 1. pacijenta (fibroPac1.) i fibroblastima 8. pacijenta (fibroPac8.) u odnosu na kontrolne uzorke napravljen je pomoću programa GrapPad Prism (izdanje 9.5.0). Relativna ekspresija pojedinog uzorka stanica pacijenata određena je u odnosu na prikladan kontrolni uzorak (fibroCTRL1 i fibroCTRL8).

Rezultati analize metodom western blot ukazuju na značajno nižu količinu proteina SAHH u stanicama oba pacijenta u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 21. A). Kvantifikacijom rezultata može se utvrditi da fibroblasti 1. pacijenta (fibroPac1.) sadrže 41% kontrolnih vrijednosti proteina SAHH, dok su razine proteina u stanicama 8. pacijenta (fibroPac8.) još niže, svega 14% normalnih vrijednosti (Slika 21. B). U slučaju 1. pacijenta, podudarnost razina transkriptata (43% kontrolnih vrijednosti) i proteina SAHH (41% kontrolnih vrijednosti) je očekivana, s obzirom na to da je stopa sinteze proteina u stanici ograničena raspoloživim transkriptima. U slučaju 8. pacijenta, izmjerena je značajno smanjena razina proteina SAHH ali ne i odgovarajućih transkriptata, stoga je moguće pretpostaviti da mutacija Y328D negativno utječe na ekspresiju SAHH na posttranslacijskoj razini.

Zaključno, analize ekspresije SAHH u kliničkim uzorcima pacijenata pokazale su značajno smanjenu ekspresiju gena *SAHH* koja predstavlja temeljnu molekularnu karakteristiku nedostatne aktivnosti SAHH-a u oba promatrana slučaja. Kod 1. pacijenta, poremećaji u genskoj ekspresiji nastupaju već na transkripcijskoj ili posttranskripcijskoj razini, rezultirajući duplo manjom količinom mRNA gena *SAHH* u stanicama. Kod 8. pacijenta, poremećaji nastupaju pri višim razinama genske ekspresije, translacijskim ili posttranslacijskim razinama, zbog uočenog nedostatka proteina SAHH bez promjena u količini transkripata. Daljim analizama pojedinačnih mutiranih proteina SAHH u staničnim modelima i ekspresijskim sustavima *in vitro*, odrediti će se koje točno mutacije negativno utječu na ekspresiju gena *SAHH* kod pacijenta, na kojim razinama genske ekspresije dolazi do njihove (negativne) regulacije te koji su mehanizmi odgovorni za opažene fenomene.

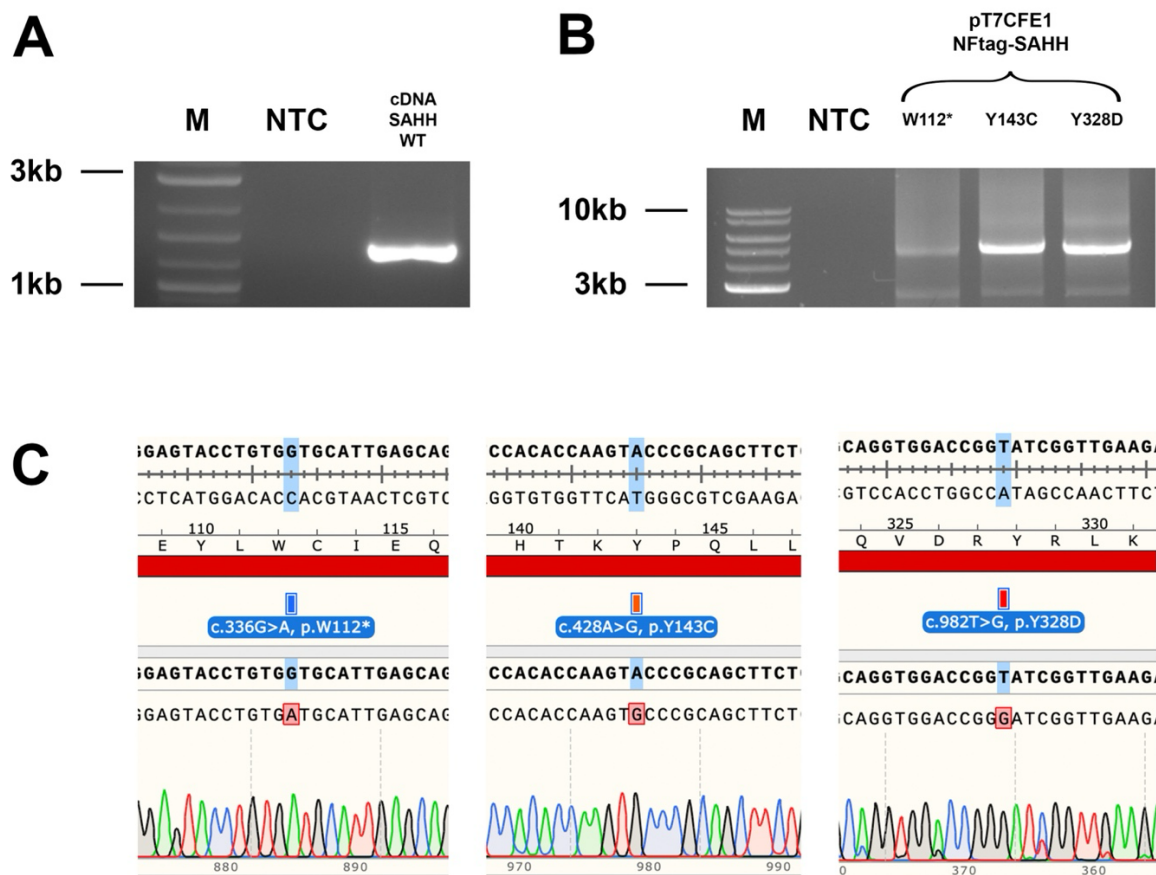
## **4.2. Ekspresija rekombinantnih proteina SAHH *in vitro***

Karakterizacija pojedinačnih utjecaja mutacija W112\*, Y143C i Y328D provedena je analizom ekspresije rekombinantnih gena *SAHH* u uvjetima *in vitro*. Uporabom izvanstaničnih ekspresijskih sustava moguće je ispitati utjecaj mutacija na učinkovitost temeljnih ekspresijskih mehanizama, transkripcije i translacije, zanemarujući utjecaj regulatornih i kontrolnih mehanizama koji djeluju u realnom staničnom okruženju. Primarni cilj ove analize bio je ispitati uzrokuju li neke od mutacija zastoj translacijske mašinerije tijekom sinteze rekombinantnih proteina, što bi ukazivalo na poteškoće u procesiranju mutiranih transkripata i potencijalnu aktivaciju degradacijskih mehanizama zbog zastoja ribosoma. Odabrani ekspresijski sustav *in vitro* temelji se na uporabi staničnog lizata humanih stanica HeLa, koji osigurava kompletnu eukariotsku transkripcijsku i translacijsku mašineriju potrebnu za sintezu proteina izvan stanice.

### **4.2.1. Priprema rekombinantnih vektora za transkripciju i translaciju *in vitro***

Prije sinteze mutiranih proteina *in vitro*, pripremljeni su rekombinantni plazmidni pT7CFE1-NFtag s mutiranim sljedovima cDNA SAHH-a koji služe kao DNA-kalup za ekspresiju rekombinantnih proteina. Odabrana plazmidna okosnica omogućuje sintezu proteina koji sadrže dodatni peptidni biljeg FLAG na N-kraju proteina. Uporaba visoko specifičnog protutijela protu-FLAG pri analizi rezultata western blot-om, osigurava detekciju i kvantifikaciju samo rekombinantnih proteina SAHH iz reakcijske smjese, zanemarujući SAHH divljeg tipa koji potječe iz stanica HeLa.

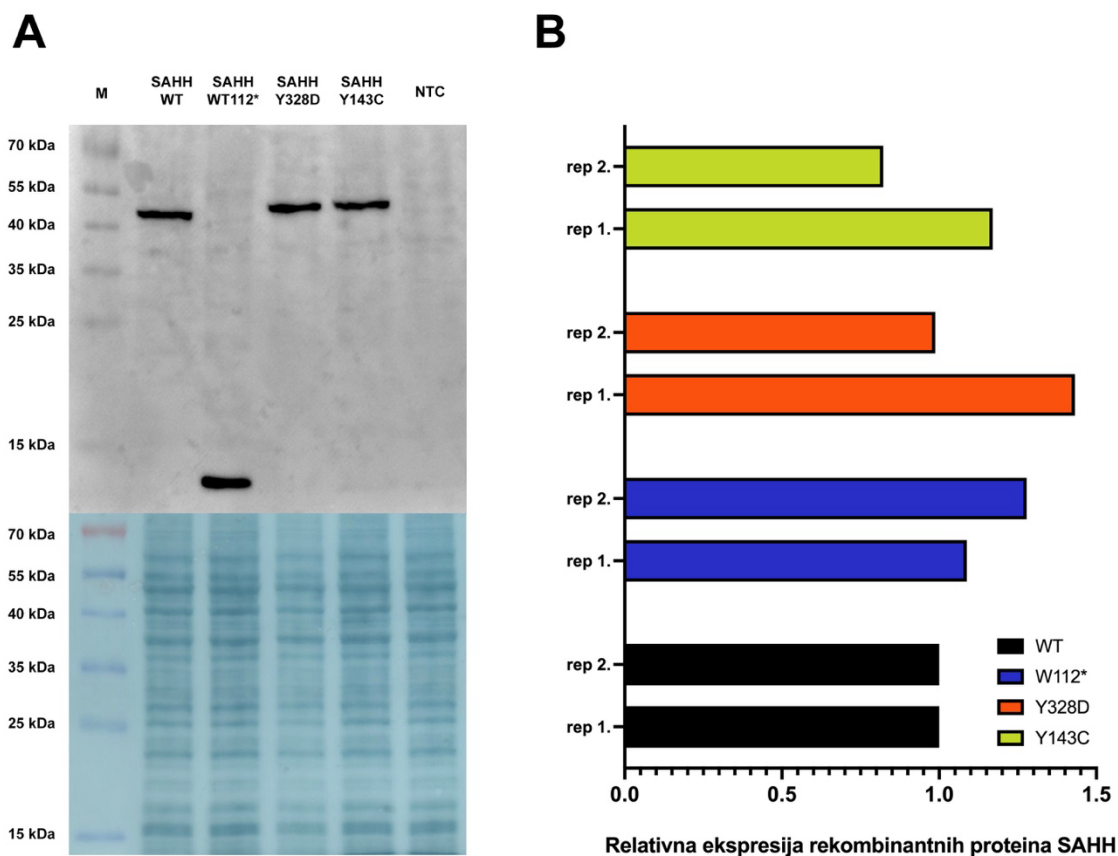
Priprema rekombinantnih vektora provedena je u dva osnovna koraka. Prvi korak obuhvaćao je kloniranje kodirajućeg slijeda proteina SAHH divljeg tipa (WT) u plazmidnu okosnicu pT7CFE1-NFtag, nakon čega je rekombinantni vektor pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT korišten kao kalup za uvođenje mutacija W112\*, Y143C i Y328D. Priprema plazmida uključivala je različite metode manipulacije molekula DNA i analize rezultata (poglavlje 3.2.1. i 3.2.2.), primarno agaroznom gel elektroforezom i određivanjem nukleotidnih sljedova Sangerovom metodom. Ukratko, cDNA proteina SAHH umnožena je PCR-om nakon čega je produkt odgovarajuće veličine od približno 1296 parova baza (Slika 22. A) tretiran prikladnim restrikcijskim enzimima, ligiran s plazmidnom okosnicom i transformiran u bakterije. Izoliranom rekombinantnom plazmidu određen je nukleotidni slijed Sangerovim sekvenciranjem u svrhu potvrde ispravnog okvira čitanja start-kodona, biljega FLAG i cDNA proteina SAHH divljeg tipa. Ciljana mutageneza provedena je umnažanjem cjelokupnog plazmida uz prikladne početnice koje uvode željene nukleotidne izmjene. Produkti reakcije PCR-a veličine 5 kb, koji odgovaraju veličini cjelokupnog plazmida (Slika 22. B), razgrađeni su enzimom DpnI i transformirani u bakterije. Sangerovim sekvenciranjem potvrđeno je uvođenje željenih mutacija u kodirajuće sljedove SAHH (Slika 22. C).



**Slika 22. Priprema rekombinantnih vektora pT7CFE1-NFtag-SAHH za ekspresiju rekombinantnih proteina SAHH *in vitro*.** (A) Produkt PCR-reakcije umnažanja kodirajućeg slijeda proteina SAHH divljeg tipa (WT). (B) Produkti PCR-reakcija umnažanja plazmida pT7CFE1-NFtag-SAHH-WT u svrhu uvođenja mutacija (ciljana mutageneza). (C) Elektroferogrami dobiveni Sangerovom metodom određivanja nukleotidnih sljedova mutiranih plazmida (ispod) poravnati sa slijedom početnog plazmida (iznad) pomoću programa SnapGene (izdanje 6.0). Crvenom kućicom označeni su izmijenjeni nukleotidi za svaku uvedenu mutaciju. Oznake: M= Marker *Quick-Load 1kb Plus DNA Ladder*, NTC= reakcija negativne kontrola (PCR-smjesa bez kalupa DNA).

#### 4.2.2. Analiza ekspresije rekombinantnih proteina SAHH *in vitro*

Nakon pripreme plazmidnih kalupa DNA, provedena je sinteza rekombinantnih proteina SAHH u jednom koraku *in vitro*. Konačni produkti reakcija analizirani su western blotom uz uporabu protutijela protu-FLAG za specifičnu kvantifikaciju samo rekombinantnih proteina SAHH iz reakcijskih smjesa. Relativna ekspresija mutiranih proteina određena je u odnosu na ekspresiju SAHH divljeg tipa. Normalizacija ekspresije provedena je na temelju signala ukupnih proteina obojanih nakon transfera na membranu.



**Slika 23. Ekspresija rekombinantnih proteina SAHH *in vitro*.** (A) Analiza produkata reakcija transkripcije i translacije *in vitro* metodom western blot uz korištenje protutijela protu-FLAG (iznad) i ukupni proteini reakcijskih smjesa obilježeni bojom Amido crno nakon transfera proteina na membranu (ispod). (B) Grafički prikaz relativne ekspresije rekombinantnih proteina SAHH s mutacijama (W112\*, Y143C i Y328D) u odnosu na SAHH divljeg tipa (WT). Podaci su normalizirani na temelju signala obojanih ukupnih proteina (Amido crno). Grafički prikaz napravljen je u programu GraphPad Prism (izdanje 9.5.0). Oznake rep 1. i rep 2. označavaju rezultate dva neovisno sprovedena eksperimenta.

Rezultati analize western blotom pokazuju uspješnu sintezu svih rekombinantnih proteina SAHH *in vitro* (Slika 23. A). Očekivani proteinski produkti identificirani su pri veličinama od 47 kDa u reakcijama sinteze SAHH divljeg tipa (SAHH-WT) i mutanata s izmijenjenim aminokiselinama (SAHH-Y328D, SAHH-Y143C). Ekspresija rekombinantnog gena SAHH s PTC-om očekivano rezultira sintezom znatno kraćeg proteina molekulske mase između 15 i 10 kDa. Kvantifikacijom rezultata nije utvrđena značajna razlika u efikasnosti sinteze mutiranih proteina SAHH *in vitro* (Slika 23. B). Približno jednaki prinosi mutiranih proteina i proteina divljeg tipa pokazuju da istraživane mutacije ne narušavaju procesiranje mutiranih genskih produkata tijekom njihove transkripcije i translacije *in vitro*. Čak i u slučaju

mutanta s PTC-om (SAHH-W112\*), proteinski produkt prisutan je u jednakoj količini kao i ostali proteini, iako je znatno manje veličine. Ovi rezultati ukazuju da u se u stanicama pacijenata ekspresija gena *SAHH* dodatno regulira posttranskripcijskim i posttranslacijskim mehanizmima kontrole kvalitete genske ekspresije.

### **4.3. Stanični modeli sa stabilnom ekspresijom proteina EGFP-SAHH**

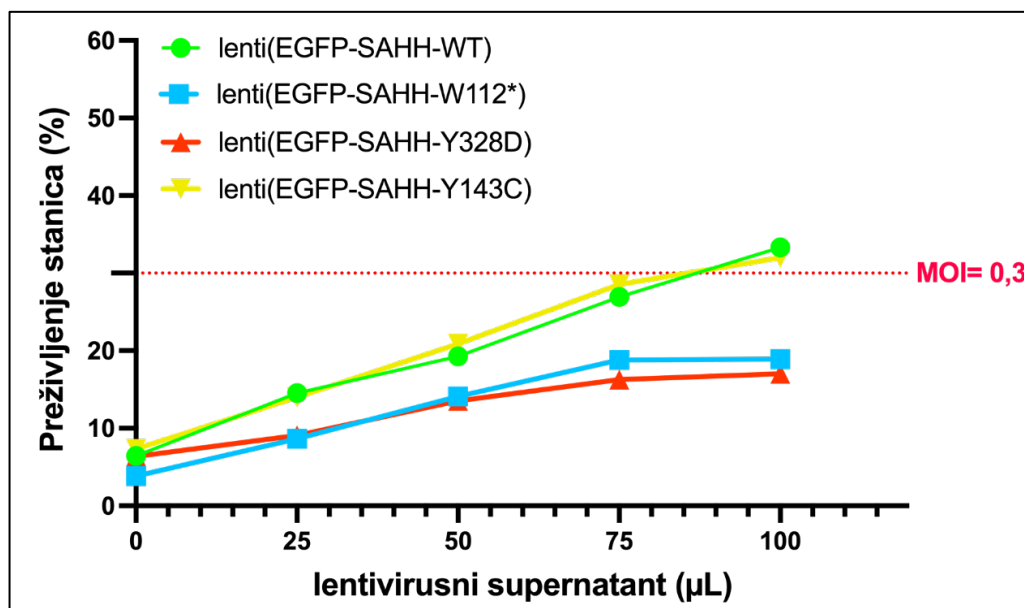
Za daljnju karakterizaciju istraživanih mutacija i ispitivanje njihovog utjecaja na ekspresiju gena *SAHH* obuhvaćajući širi, stanični kontekst, konstruirani su modelni sustavi staničnih linija Hek293, HepG2 i SW480 koji stabilno ekspimiraju mutirane proteine EGFP-SAHH. Stanični modeli omogućuju istraživanja cjelokupne dinamike genske ekspresije koja osim transkripcije i translacije uključuje i mnogobrojne regulatorne mehanizme. Uspostava i validacija staničnih modela koji uz endogeni, dodatno ekspimiraju i rekombinantni protein SAHH koji sadrži fuzionirani zeleni fluorescentni protein (EGFP), provedena je kako bi se potvrdila prethodna opažanja da je ekspresija određenih mutiranih gena *SAHH* dodatno regulirana na posttranskripcijskim i posttranslacijskim razinama. Analizom ekspresije pojedinačnog rekombinantnog proteina SAHH u zasebnom staničnom modelu, pokušalo se razlučiti točno koja mutacija, u kojoj mjeri te na kojoj razini genske ekspresije doprinosi smanjenju ukupne količine proteina SAHH u stanicama pacijenata.

#### **4.3.1. Proizvodnja lentivirusa i transdukcija stanica**

Stanični modeli pripremljeni su unosom cDNA proteina SAHH u eukariotske stanice pomoću lentivirusa. Unos stranog genetičkog materijala lentivirusima odabran je zbog izuzetno učinkovitog pakiranja, prijenosa i integracije rekombinantnih gena u stanice domaćina. Lentivirusi stoga omogućuju jednostavnu genetičku manipulaciju različitih staničnih linija istovremeno i njihov brzi probir u svrhu generiranja stanica sa stabilnom ekspresijom rekombinantnih mutiranih proteina EGFP-SAHH.

Funkcionalni lentivirusi generirani su kotransfekcijom tri različita plazmidna vektora u pakirajuću staničnu liniju 293T. Prije početka rada sa stanicama, prethodno pripremljeni cDNA sljedovi SAHH divljeg tipa i mutanata, klonirani su u prijenosni lentivirusni vektor pLJM-EGFP. Odabrani lentivirusni vektor omogućuje pakiranje slijeda cDNA u lentiviruse koji ga potom prenose i ugrađuju u genom ciljane stanice. Uz to, korišteni vektor omogućuje fuziju proteina od interesa s proteinom EGFP na svom N-kraju, kako bi se njegova ekspresija u stanicama mogla dodatno analizirati fluorescentnom mikroskopijom. Nakon kotransfekcije

pripremljenih prijenosnih (pLJM-EGFP-SAHH-WT/W112\*/Y143C/Y328D) i pomoćnih plazmida (psPAX2 i p.MD2G) u pakirajuće stanice 293T, generirani lentivirusi kvantificirani su određivanjem MOI-a nakon tretmana  $0,2 \times 10^6$  stanica Hek293 zadanim volumenima svakog lentivirusnog supernatanta (0-100  $\mu\text{L}$ ) (Slika 24.). Testom MTT određeno je preživljenje stanica nakon njihove infekcije i selekcije koje odgovara postotku uspješno inficiranih stanica. Iz dobivenih rezultata određen je volumen svakog lentivirusnog supernatanta potreban da maksimalno 30 % ciljnih stanica (MOI= 0,3) uspješno ugradi strani genetički materijal. Za infekciju stanica Hek293, HepG2 i SW480, iskorišteno je 150  $\mu\text{L}$  lentivirusnog supernatanta s obzirom na to da je inficirano duplo više stanica ( $0,4 \times 10^6$ ) u odnosu na broj stanica korišten pri određivanju MOI-a ( $0,2 \times 10^6$ ). Suvišak stanica (omjer virusi:stanice= 1:3) osigurao je interakciju jedne stanice s maksimalno jednim virusom, odnosno značajno je smanjio vjerojatnost višestruke ugradnje rekombinantnog gena u isti genom. Ekspresija više od jedne kopije transgena po stanici utječe na homogenost konačne populacije stanica i nije poželjna za daljnju analizu ekspresije istraživanih rekombinantnih proteina SAHH u staničnim modelima.



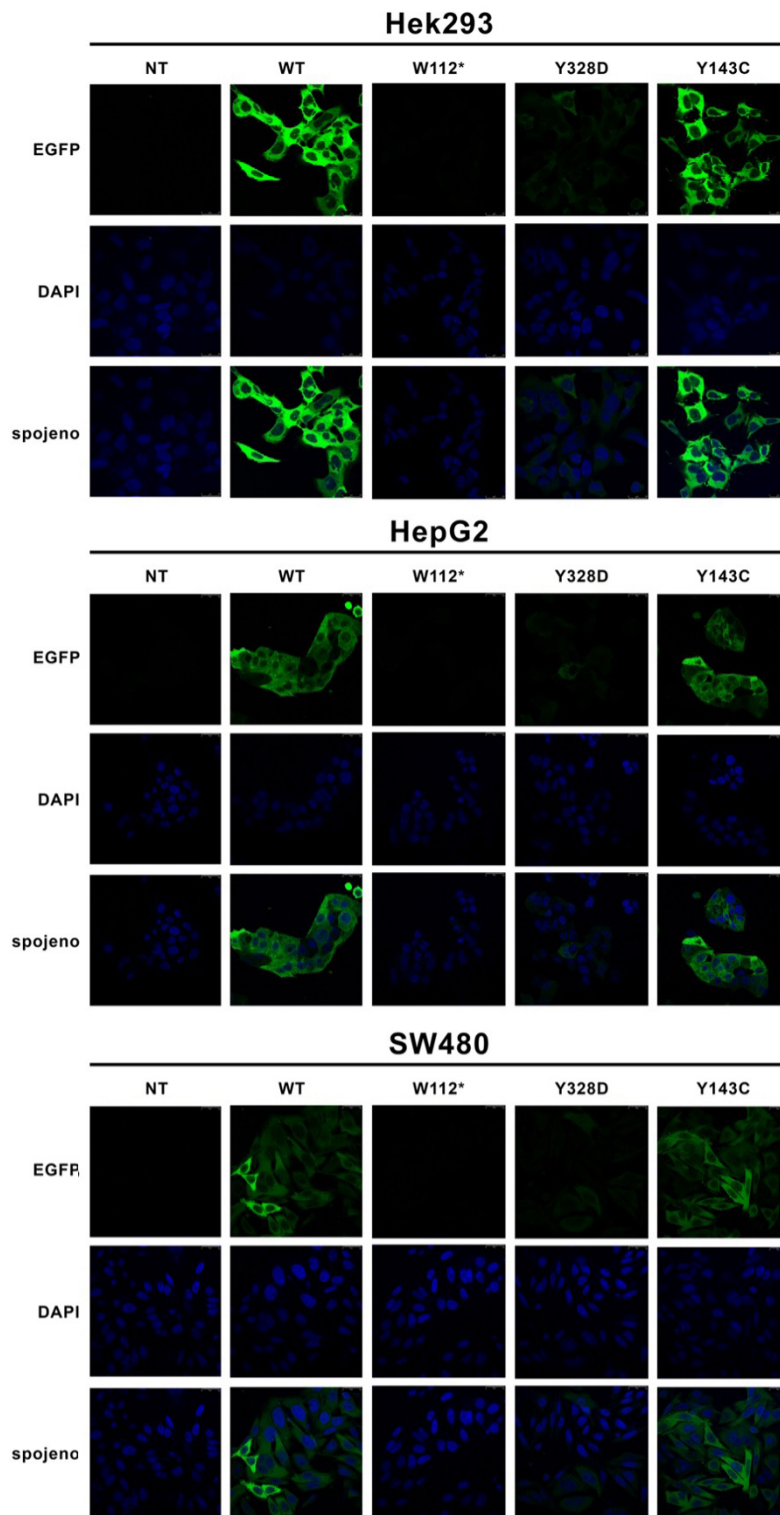
**Slika 24. Udio uspješno inficiranih stanica Hek293 u odnosu na volumen lentivirusnog supernatanta.** Testom MTT određen je postotak preživljenja od ukupno  $0,2 \times 10^6$  stanica Hek293 nakon njihove infekcije i selekcije lentivirusima koji prenose različite rekombinantne gene za fuzijske proteine SAHH; EGFP-SAHH-WT (zeleno), EGFP-SAHH-W112\* (plavo), EGFP-SAHH-Y328D (crveno), EGFP-SAHH-Y143C (žuto). Crvenom isprekidanom horizontalnom linijom označena je gornja granica preživljenja koja odgovara željenom MOI-u od 0,3.



#### 4.3.2. Analiza staničnih modela koji eksprimiraju proteine EGFP-SAHH

Pripremljenim staničnim modelima analizirana je ekspresija rekombinantnih gena *SAHH* na razini proteina i transkripata. Bitno je napomenuti da su pri konstrukciji staničnih modela, u lentivirusni plazmid pLJM-EGFP klonirani samo različito mutirani sljedovi cDNA gena *SAHH*, bez introna, koji se nalaze pod kontrolom iste promotorske sekvence (promotor CMV). Ovim eksperimentalnim pristupom, potencijalne promjene u staničnoj ekspresiji mogu se nedvojbeno pripisati isključivo utjecaju točkastih mutacija kao jedine razlike između analiziranih rekombinantnih gena *SAHH*.

Kvalitativna analiza ekspresije rekombinantnih proteina EGFP-SAHH-WT/W112\*/Y143C/Y328D u različitim staničnim linijama (Hek293, HepG2 i SW480) provedena je fluorescentnom konfokalnom mikroskopijom. Dodatno su analizirane i stanice svake linije koje nisu bile tretirane virusima (NT), kao uzorak negativne kontrole. Stanični preparati snimljeni su uz pobudu zelenog fluorescentnog proteina (EGFP) koji potječe od rekombinantnog proteina EGFP-SAHH te plavog signala (DAPI) koji potječe od naknadno obojanih jezgara stanica. Analiza stanica konfokalnom mikroskopijom pokazuje jasnu razliku u intenzitetu zelenog fluorescentnog signala između stanica koje eksprimiraju mutirane proteine EGFP-SAHH-W112\* i EGFP-SAHH-Y328D u odnosu na divlji tip proteina (WT), dok ekspresija mutiranog proteina EGFP-SAHH-Y143C izgleda jednaka onomu divljeg tipa (Slika 25.). Zeleni signal skraćenog proteina EGFP-SAHH-W112\* potpuno je odsutan u stanicama te one nalikuju kontrolnim netretiranim stanicama (NT). Signal proteina EGFP-SAHH-Y328D, iako prisutan u određenoj mjeri, značajno je niži od intenziteta proteina EGFP koji je fuzioniran na SAHH divljeg tipa i SAHH s mutacijom Y143C. Ovi rezultati jasno pokazuju da mutacija Y328D ima značajno negativan utjecaj na ekspresiju proteina SAHH u eukariotskim stanicama, dok mutacija W112\* uzrokuje kompletan nedostatak odgovarajućeg mutiranog proteina. S druge strane, mutacija Y143C ne uzrokuje promjene u staničnoj ekspresiji rekombinantnog proteina SAHH. Također, utvrđene ekspresijske promjene vidljive su u svakoj analiziranoj staničnoj liniji (Hek293, HepG2, SW480), što ukazuje na to da stanična regulacija ovih mutanata nije tkivno specifična.

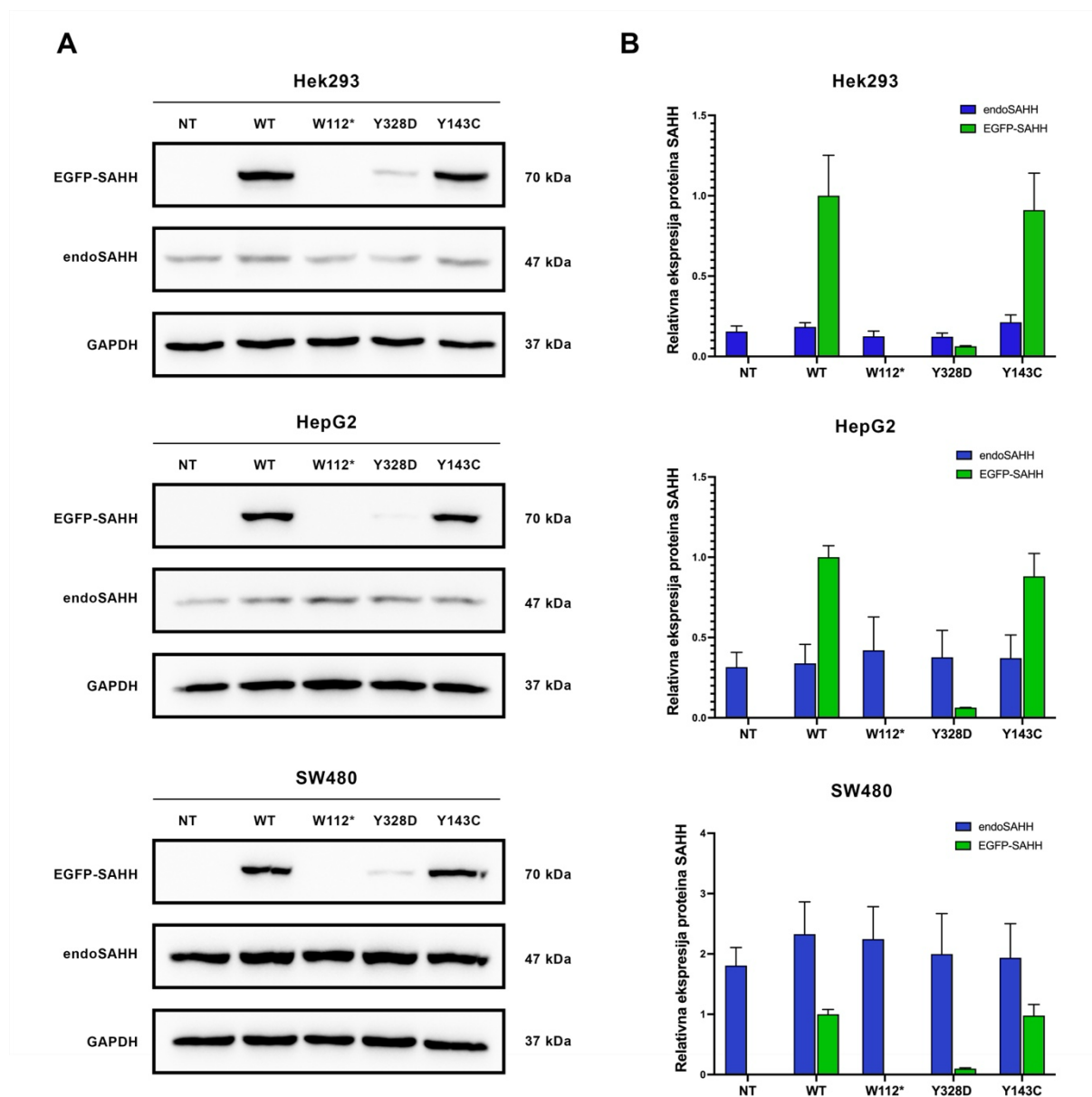


**Slika 25. Ekspresija rekombinantnih proteina EGFP-SAHH u staničnim linijama Hek293, HepG2 i SW480 analizirana konfokalnom mikroskopijom.** Zeleni signal (EGFP) potječe od fuzijskih proteina EGFP-SAHH divljeg tipa (WT) i mutanata (W112\*, Y143C, Y328D) koji se stabilno ekspimiraju u različitim staničnim linijama (Hek293, HepG2, SW480). Plavi signal (DAPI) potječe od obojanih staničnih jezgri. Za svaki preparat, minimalno 15 stanica snimljeno je odjednom u jednom vidnom polju. Oznaka (NT) označava netretirane stanice koje ne ekspimiraju rekombinantne proteine SAHH.

Kako bi se kvantificirale razlike u ekspresiji rekombinantnih mutiranih proteina SAHH, provedena je analiza lizata staničnih modela (Hek293, HepG2 i SW480) western blotom uz uporabu protutijela protu-SAHH i protu-GAPDH za normalizaciju signala. S obzirom na prisutnost dva oblika proteina SAHH, koji se razlikuju na temelju molekulskih masa, uporaba protutijela protu-SAHH omogućila je selektivnu kvantifikaciju ekspresije endogenog SAHH divljeg tipa pri 47 kDa i rekombinantnog fuzijskog proteina (EGFP-SAHH) pri 70 kDa. Kvantifikacijom i usporedbom signala pri većim molekulskim masama za svaku staničnu liniju, određena je relativna ekspresija rekombinantnih proteina EGFP-SAHH-Y328D i EGFP-SAHH-Y143C u odnosu na divlji tip proteina EGFP-SAHH-WT.

Dobiveni rezultati potvrđuju znatno nižu ekspresiju rekombinantnog proteina SAHH-Y328D za čak 86-92% u odnosu na divlji tip (WT), ovisno o promatranoj staničnoj liniji, dok ekspresija mutanta SAHH-Y143C nije značajno promijenjena (Slika 26.). Proteinska vrpca skraćenog proteina EGFP-SAHH-W112\* nije identificirana niti u jednoj staničnoj liniji, što je i očekivano s obzirom na to da zeleni signal EGFP-a nije detektiran pri analizi ovog mutanta konfokalnom mikroskopijom. Razine endogenog SAHH-a divljeg tipa (endoSAHH) jednake su u svim pripremljenim staničnim modelima unutar iste stanične linije, ukazujući na to da ekspresija rekombinantnih mutiranih proteina ne remeti normalnu ekspresiju nativnog SAHH-a koji potječe iz izvornih stanica.

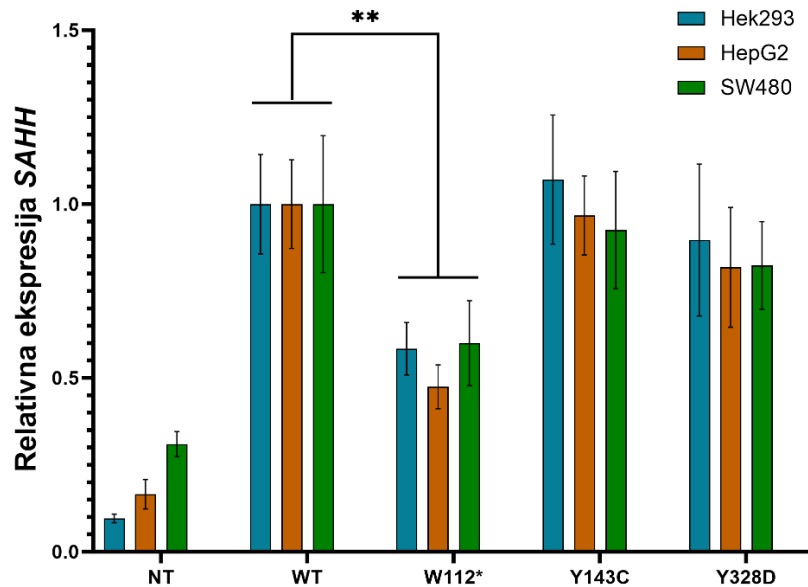
Zaključno, na temelju analiza ekspresije rekombinantnih proteina SAHH u staničnim modelima konfokalnom mikroskopijom i metodom western blot, potvrđen je negativan utjecaj mutacija W112\* i Y328D na ekspresiju rekombinantnih proteina SAHH u eukariotskim stanicama. Potpuni nedostatak mutanta EGFP-SAHH-W112\* i izrazito niska ekspresija mutanta EGFP-SAHH-Y328D, u skladu je s pretpostavkom da su upravo ove dvije mutacije odgovorne za smanjenu ekspresiju gena *SAHH* kod istraživanih pacijenata te da mutacija Y143C ne doprinosi opaženom smanjenju ukupne količine proteina SAHH kod pacijenata.



**Slika 26. Ekspresija mutiranih proteina SAHH u staničnim linijama Hek293, HepG2 i SW480 analizirana metodom western blot. (A)** Ekspozirane membrane nakon detekcije endogenog (endoSAHH) i rekombinantnog proteina SAHH (EGFP-SAHH) korištenjem protutijela protu-SAHH. Ekspresija endogene kontrole (GAPDH) detektirana je protutijelom protu-GAPDH. **(B)** Grafički prikaz relativne ekspresije endogenog SAHH (endoSAHH) i rekombinantnih proteina SAHH (EGFP-SAHH) s mutacijama W112\*, Y143C i Y328D u odnosu na rekombinantni protein divljeg tipa (WT). Ekspresijske vrijednosti SAHH-a normalizirane su na temelju ekspresije GAPDH-a za svaki analizirani uzorak. Statistička analiza i grafički prikaz napravljeni su u programu GraphPad Prism (izdanje 9.5.0). Standardne devijacije prikazane su vertikalnim linijama na svakom stupcu, n=3.

Nakon analize ekspresije na proteinskoj razini, provjerena je ekspresija gena *SAHH* na razini transkripata kako bi se utvrdilo jesu li smanjene razine proteina EGFP-SAHH-W112\* i EGFP-SAHH-Y328D rezultat nedostatka transkripata u stanicama ili su posljedica posttranslacijske regulacije genske ekspresije. Metodom RT-qPCR uz upotrebu hidrolizirajućih proba analizirana je ukupna ekspresija gena *SAHH* u straničnim modelima koja obuhvaća rekombinantne i endogene transkripte. Dodatno su analizirane i netretirane stanice (NT) koje eksprimiraju samo endogene transkripte, kako bi se utvrdio njihov doprinos izmjerenoj ukupnoj ekspresiji *SAHH*-a u staničnim modelima. S obzirom na to da su stanični modeli pripremljeni iz iste ishodišne populacije stanica Hek293, HepG2 odnosno SW480, pretpostavlja se da je razina ekspresije endogenog SAHH-a jednaka u svim analiziranim stanicama iste linije. Za normalizaciju ekspresijskih podataka, svakom analiziranom uzorku određena je ekspresija kontrolnog gena *ACTB*.

Rezultati analize pokazuju da, neovisno o staničnoj liniji, ne postoji statistički značajna razlika u količini transkripata s mutacijama Y328D i Y143C u odnosu na divlji tip (WT) (Slika 27). S druge strane, razine transkripata s mutacijom W112\* smanjene su za otprilike 50 % u odnosu na divlji tip (WT), no još uvijek su značajno više od razina endogenog SAHH-a u netretiranim stanicama (NT), što ukazuje na to da ne dolazi do potpunog uklanjanja ovih transkripata u pripremljenim staničnim modelima. Unatoč tome, razine transkripata s mutacijom W112\* značajno su smanjene u svim analiziranim stanicama, stoga je moguće zaključiti da su ovi transkripti dodatno regulirani posttranskripcijski. S druge strane, unatoč izuzetno niskoj ekspresiji proteina s mutacijom Y328D, količine odgovarajućih transkripata nisu značajno smanjene u odnosu na divlji tip. Uzimajući u obzir sve dosadašnje analize ekspresije gena *SAHH* s mutacijom Y328D, moguće je zaključiti da je ekspresija ovog mutanta stanično regulirana na posttranslacijskoj razini genske ekspresije.



**Slika 27. Ekspresija rekombinantnih gena *SAHH* u staničnim linijama Hek293, HepG2 i SW480 analizirana metodom RT-qPCR.** Relativna ekspresija gena *SAHH* s mutacijama W112\*, Y143C, Y328D u odnosu na ekspresiju divljeg tipa (WT) (1,0). Podaci su normalizirani u odnosu na ekspresiju gena *ACTB*. Statistička analiza i grafički prikaz napravljeni su u programu GraphPad Prism (izdanje 9.5.0). Oznaka „NT“ predstavlja ekspresiju endogenog *SAHH*-a iz netretiranih stanica. Standardne devijacije prikazane su vertikalnim linijama na svakom stupcu. Zvezdice (\*\*) označavaju vrijednost  $p < 0,01$ ,  $n=3$ .

#### 4.4. Analiza transkriptomskih podataka (mRNAseq)

Kako bi se razjasnili stanični mehanizmi koji reguliraju ekspresiju mutanata W112\* i Y328D te dovode do drastičnog smanjenja proteina SAHH u eukariotskim stanicama, sekvencirani su transkriptomi kliničkih uzoraka pacijenata i staničnih modela. Transkriptomski podaci fibroblasta iskorišteni su za kvantifikaciju ekspresije pojedinog alela *SAHH* kako bi se potvrdila pretpostavljena selektivna degradacija samo transkripata s mutacijom W112\* u slučaju prvog pacijenta. S druge strane, profiliranjem globalne transkripcijske aktivnosti staničnog modela HepG2, ispitana je aktivacija specifičnih gena i/ili staničnih puteva koji sudjeluju u posttranslacijskom uklanjanju proteina SAHH-Y328D, specifičnog za osmog pacijenta. Stanični modeli HepG2 izvedeni su iz stanica jetrenog porijekla, stoga su odabrani kao najprikladniji model za analizu transkriptoma, s obzirom na to da je jetra organ u kojemu se odvija većina transmetilacijskih reakcija koje su regulirane pomoću enzima SAHH. Također, uzimajući u obzir klinički kontekst, disfunkcija jetre predstavlja jedan od karakterističnih kliničkih simptoma nedostatne aktivnosti SAHH-a, naglašavajući ključnu ulogu njegove pravile aktivnosti i regulacije u hepatocitima odnosno jetrenim stanicama.

#### 4.4.1. Kontrola kvalitete sekvenciranja transkriptoma

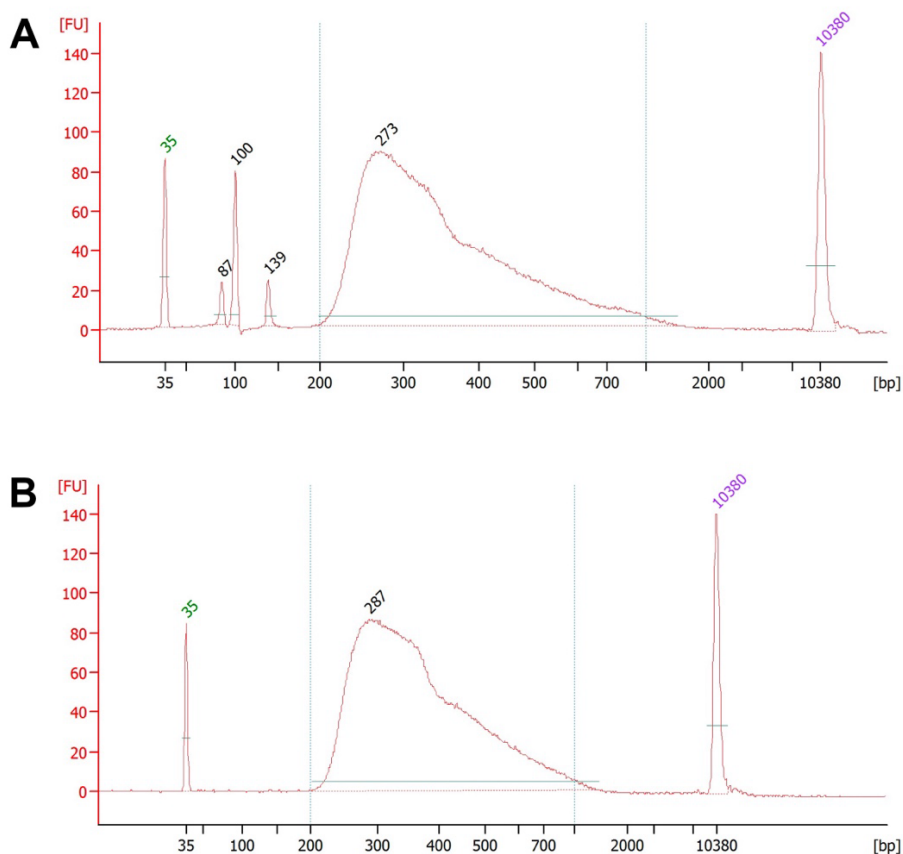
Kako bi se osigurala pouzdanost podataka dobivenih mRNAseq-om, prije njihove biološke interpretacije provjeren je cjelokupni postupak sekvenciranja transkriptoma NGS-metodom. Kontrola kvalitete provedena je analizom rezultata osnovnih koraka koji uključuju izolaciju ukupne RNA, pripremu biblioteka cDNA, reakciju sekvenciranja te osnovnu bioinformatičku obradu podataka. Fibroblasti pacijenata i zdravih kontrola sekvencirani su u triplikatu, a stanični modeli HepG2 u duplikatu. Ukupno je sekvencirano 16 uzoraka, što predstavlja maksimalni kapacitet platforme Illumina NextSeq 550.

Analiza integriteta izoliranih molekula RNA prvi je kontrolni korak koji osigurava uspješnu pripremu biblioteka cDNA. Intaktnost, odnosno stupanj degradacije svakog uzorka, određen je pomoću uređaja *Bioanalyzer 2100*, a izražen je pomoću RIN-vrijednosti. Rezultati kontrole kvalitete početnog materijala pokazuju nisku razinu degradacije RNA za većinu uzoraka (RIN 7-10), osim u slučaju fibroblasta 1. pacijenta (1. replika- RIN= 3,6 i 3. replika- RIN= 5,6) (Tablica 10.). Unatoč višoj razini degradacije od preporučene (RIN < 7), najvjerojatnije zbog dugogodišnjeg skladištenja stanica, ovi uzorci RNA ipak su iskorišteni za pripremu biblioteka zbog vrlo ograničene količine kliničkog materijala pacijenta.

**Tablica 10. Sažetak rezultata kontrole kvalitete sekvenciranja transkriptoma NGS-metodom.**

Uzorak	RIN-vrijednost	Ukupna očitavanja (N)	Udio baza sa Q30 (%)	Poravnata očitavanja (%)	Očitavanja poravnata na transkripte (%)
fibroPac1.- n1	3,6	$76,4 \times 10^6$	95,6	95,2	78,4
fibroPac1.- n2	7,3	$59,0 \times 10^6$	96,7	97,2	80,2
fibroPac1.- n3	5,6	$77,9 \times 10^6$	95,5	95,4	79,5
fibroCTRL1 -n1	8,2	$58,7 \times 10^6$	94,8	97,7	79,4
fibroCTRL1 -n2	8,6	$78,7 \times 10^6$	95,3	98,2	80,5
fibroCTRL1 -n3	7,7	$59,2 \times 10^6$	95,6	98,2	80,6
fibroPac8.- n1	9,4	$52,9 \times 10^6$	86,8	97,3	89,4
fibroPac8.- n2	9,7	$50,5 \times 10^6$	81,5	97,9	89,6
fibroPac8.- n3	9,1	$42,4 \times 10^6$	88,0	98,3	89,1
fibroCTRL8 -n1	9,7	$42,6 \times 10^6$	87,3	96,9	88,9
fibroCTRL8 -n2	9,1	$37,3 \times 10^6$	88,2	90,0	83,0
fibroCTRL8 -n3	9,3	$49,6 \times 10^6$	88,8	97,6	89,6
HepG2_WT- n1	10	$32,7 \times 10^6$	95,7	99,3	91,7
HepG2_WT- n2	9,6	$33,9 \times 10^6$	95,6	99,1	91,6
HepG2_Y328D- n1	9,6	$35,1 \times 10^6$	95,5	94,5	88,5
HepG2_Y328D- n2	9,9	$30,8 \times 10^6$	95,7	99,0	91,0

Nakon provjere početnog materijala, uslijedila je priprema biblioteka cDNA koje su prikladne za sekvenciranje na platformama Illumina. Cjelokupni postupak sastoji se od niza enzimatskih reakcija i koraka pročišćavanja koji u konačnici rezultiraju skupom fragmenata DNA koji su komplementarni početnim molekulama mRNA. Analiza kvalitete biblioteka provedena je korištenjem uređaja *Bioanalyzer 2100* u svrhu provjere distribucije veličina konačnih fragmenata cDNA i njihove čistoće. Rezultati analize pokazuju očekivanu distribuciju fragmenata DNA, između 200-1000 parova baza, no identificirani su i dodatni pikovi pri 87, 100 i 139 parova baza, koji predstavljaju neželjene nečistoće (dimeri početnica i adaptera) (Slika 28. A). Kako bi se uklonile nečistoće, biblioteke su dodatno pročišćene u svrhu optimizacije reakcije sekvenciranja i povećanja njezinog prinosa, a ponovljena analiza kvalitete biblioteka pokazala je uspješno uklanjanje nečistoća bez utjecaja na distribuciju i količinu fragmenata koji pripadaju bibliotekama cDNA (Slika 28 B).



**Slika 28. Primjer rezultata kontrole kvalitete biblioteka cDNA Bioanalyzer-om.** Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije- FU (y-os) u odnosu na veličine fragmenata DNA- bp (x-os). Pikovi pri 35 parova baza (zeleno) i 10380 parova baza (ljubičasto) predstavljaju donji i gornji unutarnji standard (marker). Vrpca između 200-1000 parova baza (plave linije) predstavlja fragmente biblioteke. **(A)** Biblioteka cDNA nakon jednog pročišćavanja. **(B)** Biblioteka cDNA nakon dvostrukog pročišćavanja.



Pripremljene biblioteke cDNA sekvencirane su na platformi Illumina NextSeq 550 pri čemu je ukupni prinos sekvenciranja iznosio  $856,7 \times 10^6$  očitavanja (sekvenci) prosječne duljine 76 parova baza. Njihova automatizirana preraspodjela rezultirala je između 31-79 milijuna očitavanja po uzorku (Tablica 10.), što je zadovoljavajući broj za analizu diferencijalne ekspresije gena i kvantifikaciju ekspresije pojedinog alela. Kvaliteta očitavanja provjerena je analizom njihovih kumulativnih Phred-vrijednosti korištenjem bioinformatičkog alata FastQC. Phred-vrijednost je standardna mjera kvalitete podataka dobivenih NGS-om koja označava vjerojatnost da je pojedina baza ispravno očitana. Najčešće se koristi Phred-vrijednost 30 (Q30), koja označava 99,9 %-tnu vjerojatnost da je baza točno određena. Dobiveni rezultati pokazuju da, ovisno o promatranom uzorku, između 82-97 % očitanih baza ima Phred-vrijednost Q30 (Tablica 10.), odnosno da su dobivena očitavanja visoko pouzdana i zadovoljavaju kriterije za daljnje (sekundarne) bioinformatičke analize.

Kako bi se utvrdilo kojim transkriptima odnosno genima generirana očitavanja pripadaju, provedeno je njihovo poravnanje na referentni ljudski genom GRCh38 pomoću bioinformatičkog alata Kallisto. Rezultati i statistika poravnanja analizirani su alatima featureCounts i MultiQC. Glavni parametar pomoću kojeg je procijenjena kvaliteta poravnanja bio je udio očitavanja koji su uspješno poravnati na referentni genom (Tablica 10.). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je više od 90 % ukupnih očitavanja svih uzoraka uspješno poravnato na ljudski genom GRCh38. Uz to, od ukupnog broja poravnatih očitavanja, između 78% i 92 % mapirano je na kodirajuće regije gena, ovisno o promatranom uzorku, stoga je moguće zaključiti da dobiveni podaci većinom pripadaju sljedovima molekula mRNA. Nakon uspješnog poravnanja, alatom Kallisto kvantificirana su očitavanja na razini pojedinih gena odnosno transkripata, a rezultirajuća matrica služi kao osnova za daljnju analizu diferencijalne ekspresije gena između uzoraka.

Zaključno, svi ključni parametri kontrole kvalitete sekvenciranja NGS-metodom nalaze se unutar očekivanog raspona vrijednosti, ukazujući na visoku pouzdanost podataka te uspješno sekvenciranje staničnih transkriptoma.

#### 4.4.2. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena

U cilju identifikacije gena povezanih s niskom ekspresijom mutiranog proteina SAHH-Y328D i razjašnjavanja molekularnih mehanizama odgovornih za nedostatak ovog proteina u stanicama, provedena je analiza diferencijalne ekspresije između staničnih modela HepG2 s ekspresijom proteina SAHH-Y328D i divljeg tipa proteina (SAHH-WT). Također je analizirana diferencijalna ekspresija između fibroblasta pacijenata i pripadajućih zdravih kontrola. Geni s promijenjenom ekspresijom određeni su pomoću alata DESeq2, a ukoliko je njihova prilagođena p-vrijednost (padj) iznosila manje od 0,05, okarakterizirani su kao statistički značajni, neovisno o vrijednosti same promjene ( $\log_2FC$ ).

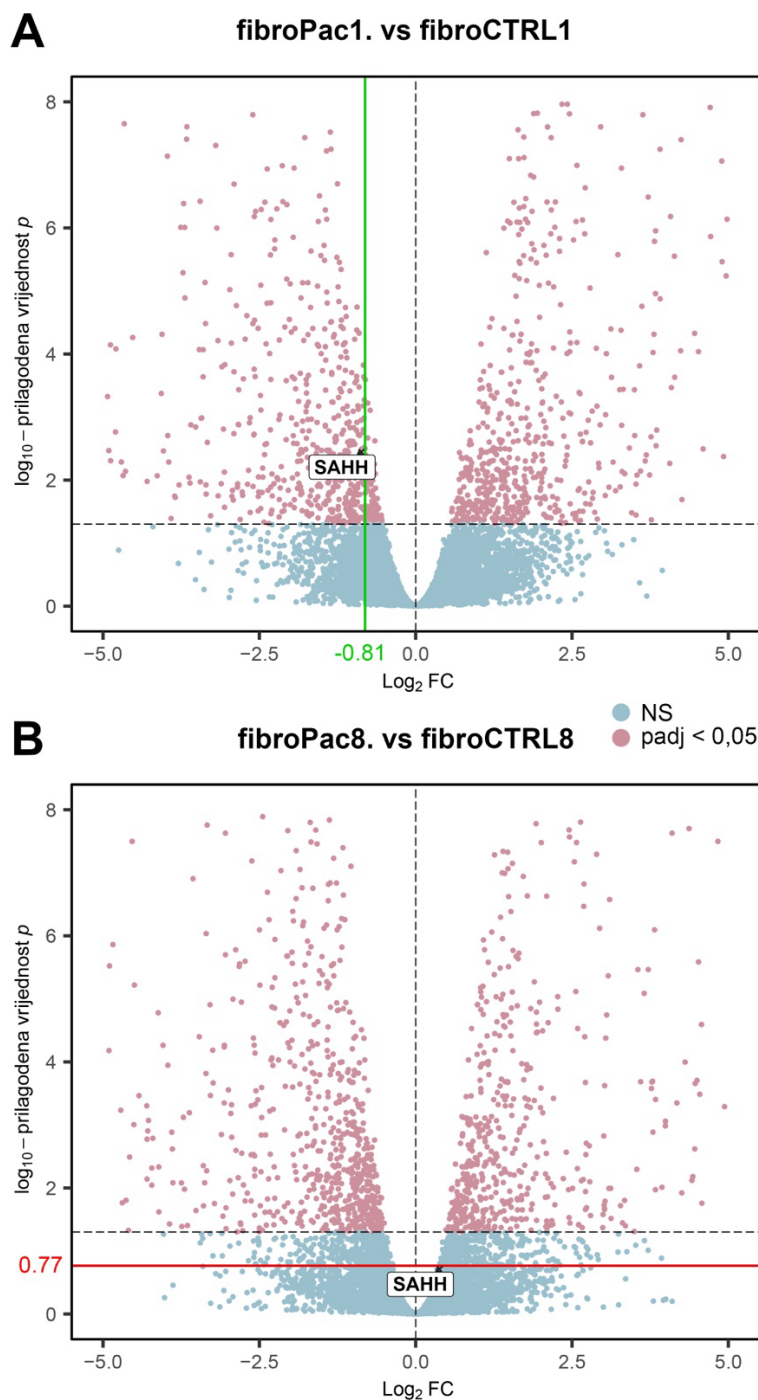
Rezultati diferencijalne ekspresije u staničnim modelima HepG2 pokazuju da sveukupno 58 gena ima promijenjenu ekspresiju u stanicama koje eksprimiraju protein SAHH-Y328D u odnosu na stanice s divljim tipom proteina (SAHH-WT). Od ukupnog broja, 48 gena kodira za proteine (Tablica 11.), dok ostatak većinom pripada genima koji kodiraju za duge nekodirajuće RNA (lncRNA). Za 35 gena, vrijednost  $\log_2FC$  je pozitivna, što označava povećanu ekspresiju u stanicama koje eksprimiraju mutirani protein SAHH-Y328D, dok 13 gena ima negativnu odnosno smanjenu ekspresiju. Dvostruko veći broj gena s pozitivnom promjenom ukazuje na aktivaciju dodatnih regulatornih mehanizama uslijed ekspresije mutiranog proteina SAHH-Y328D, u odnosu na divlji tip.

**Tablica 11. Popis diferencijalno eksprimiranih gena između staničnih modela HepG2 (SAHH WT u odnosu na SAHH Y328D) koji kodiraju za proteine.** Geni su poredani na temelju vrijednosti izračunatih promjena ( $\log_2FC$ ), počevši od najveće. Crveno su obilježeni geni s povećanom ekspresijom, a plavom sa smanjenom ekspresijom. Genima bez službenog simbola navedeni su identifikatori iz baze Ensembl (ID).

Broj	Gen/Ensembl ID	Log <sub>2</sub> FC	padj	Broj	Gen/Ensembl ID	Log <sub>2</sub> FC	padj
1.	ENSG00000268083	6,79	$1,21 \times 10^{-2}$	25.	UBN1	0,95	$4,40 \times 10^{-2}$
2.	ENSG00000254692	5,99	$4,88 \times 10^{-2}$	26.	PABPC4	0,94	$1,65 \times 10^{-2}$
3.	FLRT2	4,71	$2,32 \times 10^{-2}$	27.	TCOF1	0,90	$6,78 \times 10^{-3}$
4.	ENSG00000257524	3,84	$3,88 \times 10^{-9}$	28.	RPL5	0,88	$5,25 \times 10^{-3}$
5.	EIF3CL	2,67	$3,50 \times 10^{-16}$	29.	YAF2	0,86	$4,40 \times 10^{-2}$
6.	SLC4A7	1,68	$1,92 \times 10^{-4}$	30.	SEC62	0,86	$1,66 \times 10^{-2}$
7.	ZBTB20	1,39	$6,37 \times 10^{-3}$	31.	NUP85	0,85	$2,86 \times 10^{-2}$
8.	AAK1	1,38	$5,50 \times 10^{-3}$	32.	SRRM2	0,76	$4,74 \times 10^{-2}$
9.	BAZ2A	1,36	$6,37 \times 10^{-4}$	33.	PPIG	0,75	$2,92 \times 10^{-2}$
10.	BBX	1,35	$4,08 \times 10^{-3}$	34.	ARPC1A	0,69	$3,80 \times 10^{-2}$
11.	TRIM33	1,24	$4,14 \times 10^{-3}$	35.	RPS28	0,68	$1,67 \times 10^{-2}$
12.	PPP1R12A	1,23	$5,50 \times 10^{-3}$	36.	FMCI	-9,86	$7,99 \times 10^{-7}$

13	AKAP13	1,20	$2,52 \times 10^{-2}$	37.	HNRNPUL2	-9,53	$2,58 \times 10^{-6}$
14.	SON	1,19	$4,29 \times 10^{-3}$	38.	ABCF2-H2BE1	-8,39	$1,96 \times 10^{-4}$
15.	ANKRD17	1,18	$5,25 \times 10^{-3}$	39.	CFAP298	-1,78	$5,80 \times 10^{-3}$
16.	UPF2	1,18	$6,78 \times 10^{-3}$	40.	ENSG00000258790	-1,37	$1,75 \times 10^{-2}$
17.	AHI1	1,16	$2,52 \times 10^{-2}$	41.	WTIP	-1,24	$1,51 \times 10^{-2}$
18.	NUCKS1	1,16	$1,39 \times 10^{-5}$	42.	ENSG00000256500	-1,22	$2,52 \times 10^{-2}$
19.	RPL9	1,15	$6,16 \times 10^{-3}$	43.	ORC4	-1,15	$8,58 \times 10^{-4}$
20.	FGF23	1,12	$5,50 \times 10^{-3}$	44.	MATR3	-1,13	$1,66 \times 10^{-2}$
21.	ARID4A	1,11	$1,51 \times 10^{-2}$	45.	MADD	-1,01	$2,57 \times 10^{-2}$
22.	NUP214	1,10	$1,35 \times 10^{-2}$	46.	NKDI	-0,91	$1,42 \times 10^{-3}$
23.	ENSG00000259132	1,04	$4,69 \times 10^{-2}$	47.	KCMF1	-0,76	$4,53 \times 10^{-2}$
24.	CHD6	0,97	$5,40 \times 10^{-3}$	48.	TLN1	-0,76	$4,95 \times 10^{-2}$

Analiza diferencijalne ekspresije gena između fibroblasta pacijenata i pripadajućih zdravih kontrola rezultirala je puno većim brojem gena s promijenjenom ekspresijom. Sveukupno 1280 gena ima promijenjenu ekspresiju u fibroblastima 1. pacijenta u odnosu na zdrave kontrole, odnosno 1355 u fibroblastima 8. pacijenta. Veliki broj diferencijalno eksprimiranih gena u ovim uzorcima ne iznenađuje. Naime, poznato je da nedostatak aktivnosti SAHH-a dovodi do globalnih promjena metilacijskih profila DNA, koje mogu značajno utjecati na transkripcijsku aktivnost na razini cijelog genoma [153]. Zbog veličine i kompleksnosti dobivenog skupa podataka te pretpostavke da su izračunate promjene većinom posljedica poremećene stanične metilacije uslijed nedostatka SAHH-a, analiza diferencijalne ekspresije kliničkih uzoraka u sklopu ove disertacije provedena je u svrhu validacije prethodno utvrđenih promjena u ukupnoj ekspresiji gena *SAHH* kod istraživanih pacijenata (poglavlje 4.1.1.). Dobiveni rezultati vizualizirani su u obliku, tzv. vulkan grafa (engl. *volcano plot*) za fibroblaste 1. pacijenta (Slika 29. A) i 8. pacijenta (Slika 29. B). Iz navedenih rezultata vidljiva je statistički značajna ( $\text{padj} = 3,1 \times 10^{-3}$ ) niža ekspresija gena *SAHH* u fibroblastima 1. pacijenta za 43 % ( $\log_2\text{FC} = -0,81$ ), što je u skladu s prethodnim rezultatima dobivenim metodom RT-qPCR (poglavlje 4.1.1.). U slučaju 8. pacijenta, izračunata promjena nije statistički značajna, jer njezina prilagođena p-vrijednost iznosi 0,17 ( $-\log(\text{padj}) = 0,77$ ), što je manje od postavljene stope lažnog otkrića od 0,05 odnosno 5 %. Stoga je moguće zaključiti da nema promjene u ekspresiji gena *SAHH* kod ovog pacijenta, što je također u skladu s prethodnim rezultatima.

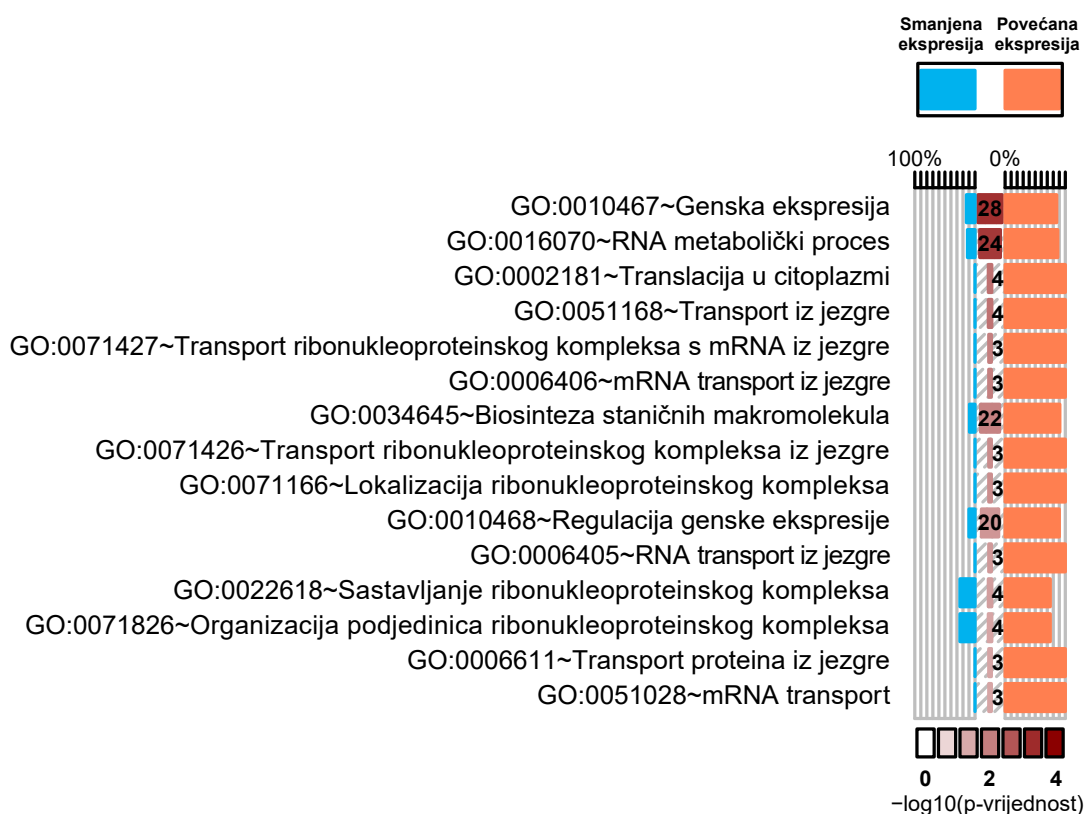


**Slika 29. Diferencijalno eksprimirani geni u fibroblastima pacijenata prikazani u obliku vulkan grafa.** Grafički prikaz prilagođene p-vrijednosti na logaritamskoj skali (y-os) i promjena ekspresije  $\text{Log}_2\text{FC}$  (x-os). Isprekidana horizontalna linija označava postavljenu graničnu vrijednost  $\text{padj} = 0,05$ . Plave točke označavaju gene čija promjena nije statistički značajna (NS), dok crvene točke označavaju statistički značajne gene ( $\text{padj} < 0,05$ ). Strelica obilježava poziciju gena *SAHH* unutar grafičkog prikaza. (A) Diferencijalno eksprimirani geni u fibroblastima 1. pacijenta (fibroPac1.) u odnosu na zdrave kontrole (fibroCTRL1). Zelena vertikalna linija označava izračunatu statistički značajnu promjenu ekspresije gena *SAHH* koja iznosi -0,81. (B) Diferencijalno eksprimirani geni u fibroblastima 8. pacijenta (fibroPac8.) u odnosu na zdrave kontrole (fibroCTRL8). Crvena horizontalna linija označava prilagođenu p-vrijednost za gen *SAHH*.

#### 4.4.3. Genska ontologija promijenjenih gena u staničnim modelima HepG2

U svrhu biološke interpretacije diferencijalno eksprimiranih gena u staničnim modelima HepG2, provedena je anotacija njihove genske ontologije (GO). Svakom genu sa promijenjenom ekspresijom dodijeljeni su GO-pojmovi koji opisuju njegovu molekularnu funkciju, pripadnost određenom biološkom procesu i staničnu lokalizaciju. Analiza obogaćenosti GO-pojmova napravljena je pomoću bioinformatičkog alata DAVID, a prekomjerno zastupljeni pojmovi s p-vrijednosti manjom od 0,05 smatrani su značajnima. Zbog relativnog niskog broja diferencijalno eksprimiranih gena s pridruženim GO-pojmovima (n=46), kategorija „Biološki procesi“ rezultirala je najvećim brojem obogaćenih pojmova koji su statistički značajni, stoga su rezultati ove kategorije detaljnije analizirani.

Rezultati analize pokazuju da je sveukupno 15 različitih termina genske ontologije statistički značajno obogaćeno u kategoriji „Biološki procesi“ (Slika 30.).



**Slika 30. Biološki procesi u kojima sudjeluju diferencijalno eksprimirani geni u staničnim modelima HepG2 (WT vs Y328D).** Grafički prikaz obogaćenih GO-pojmova u kategoriji „Biološki procesi“. Srednji stupac predstavlja broj diferencijalno eksprimiranih gena koji pripadaju pojedinom GO-pojmu, a gradijent pozadinske smeđe boje označava statističku značajnost (p-vrijednost) na logaritamskoj skali. Narančasti stupci označavaju postotak gena s povećanom ekspresijom, a plavi stupci postotak gena sa smanjenom ekspresijom unutar svakog pojma.

Na temelju p-vrijednosti, dva najviše rangirana procesa su „Genska ekspresija“ (GO:0010467,  $p= 6,0 \times 10^{-4}$ ) i „RNA metabolički proces“ (GO:0016070,  $p= 7,7 \times 10^{-4}$ ), koji ujedno uključuju i najveći broj promijenjenih gena (28 odnosno 24). Osim njih, još dva značajno obogaćena GO-biološka procesa obuhvaćaju gotovo 50 % gena s promijenjenom ekspresijom, a to su „Biosinteza staničnih makromolekula“ (GO:0034645,  $p= 1,1 \times 10^{-2}$ ) i „Regulacija genske ekspresije“ (GO:0010468,  $p= 2,3 \times 10^{-2}$ ). Iz rezultata je također vidljivo da više od 80 % gena unutar prethodno navedena četiri GO-pojma ima pozitivnu promjenu u razini ekspresije, ukazujući na pojačanu aktivnost ovih bioloških procesa u stanicama koje ekspimiraju mutirani protein SAHH-Y328D. Detaljnijim pregledom pojedinačnih gena, moguće je utvrditi da je 16 gena uključeno u sva četiri prethodno navedena GO-procesa, a to su: *NUCKS1*, *BAZ2A*, *YAF2*, *AH11*, *FGF23*, *TCOF1*, *PABPC4*, *ARID4A*, *CHD6*, *NUP85*, *BBX*, *TRIM33*, *PPP1R12A*, *RPL5*, *ZBTB20* i *WTIP*. U kontekstu ovog istraživanja, posebno je zanimljiva povećana ekspresija gena *TRIM33* (od engl. *Tripartite Motif Containing 33*), čiji proteinski produkt spada u skupinu E3-ubikvitinskih ligaza (UniProt ID: Q9UPN9). Funkcionalna klasifikacija ovog gena, temeljena na dodijeljenih GO-pojmovima u kategoriji „Molekularna funkcija“, obuhvaća „Ubikvitin-transferazna aktivnost“ (GO:0004842) i „Protein-vezujući“ (GO:0005515).

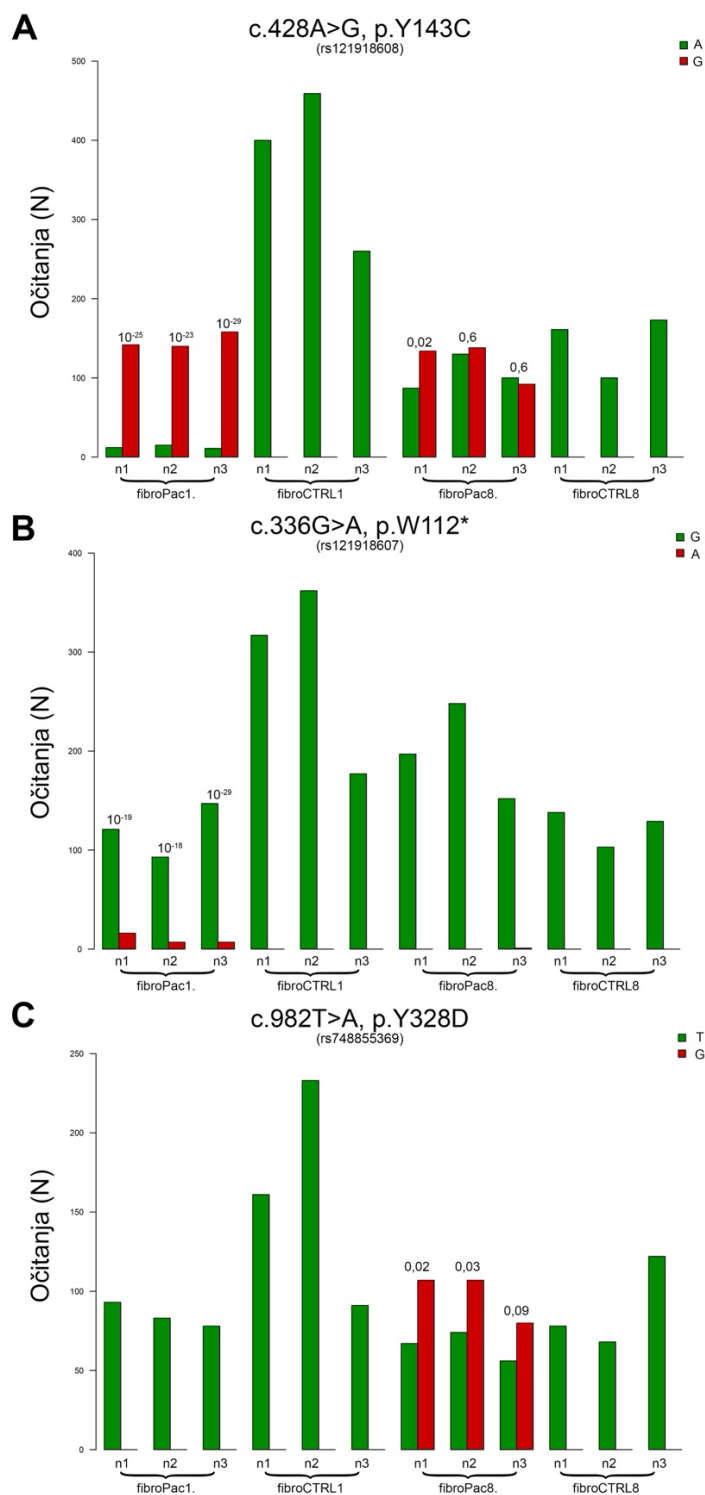
Zaključno, analiza biološkog značaja skupa gena s promijenjenom ekspresijom u staničnim modelima HepG2 (WT u odnosu na Y328D) očekivano ukazuje na pojačanu transkripcijsku aktivnost gena koji su uključeni u procese genske ekspresije i njezine regulacije. Funkcionalna anotacija pojedinačnih diferencijalno ekspimiranih gena otkriva povećanu ekspresiju gena *TRIM33* koji kodira za E3-ubikvitinsku ligazu, sugerirajući povećanu ubikvitinaciju proteina SAHH-Y328D u odnosu na divlji tip.

#### 4.4.4. Ekspresija pojedinog alela *SAHH* u fibroblastima pacijenata

Kako bi se precizno odredila distribucija transkripata koji potječu s različitih alela *SAHH*, s ciljem potvrde staničnog uklanjanja transkripata s mutacijom W112\* kod prvog pacijenta, analizirana je ekspresija specifičnog alela (ASE) u uzorcima fibroblasta pacijenata i zdravih kontrola pomoću bioinformatičkog alata AllelicImbalance. Očitavanja poravnata na referentni genom omogućila su identifikaciju SNP-ova kroz detekciju pozicija unutar kodirajućeg slijeda gena *SAHH* na kojoj su očitani različiti nukleotidi. Kvantifikacijom referentnih i alternativnih očitavanja na pozicijama istraživanih mutacija (p.W112\*, p.Y328D, p.Y143C), određeno je postoje li statistički značajna odstupanja od njihovog očekivanog jednakog omjera (1:1). Ukoliko je p-vrijednost iznosila manje od 0,05, nejednaka distribucija očitavanja ukazivala je na neuravnoteženu ekspresiju alela.

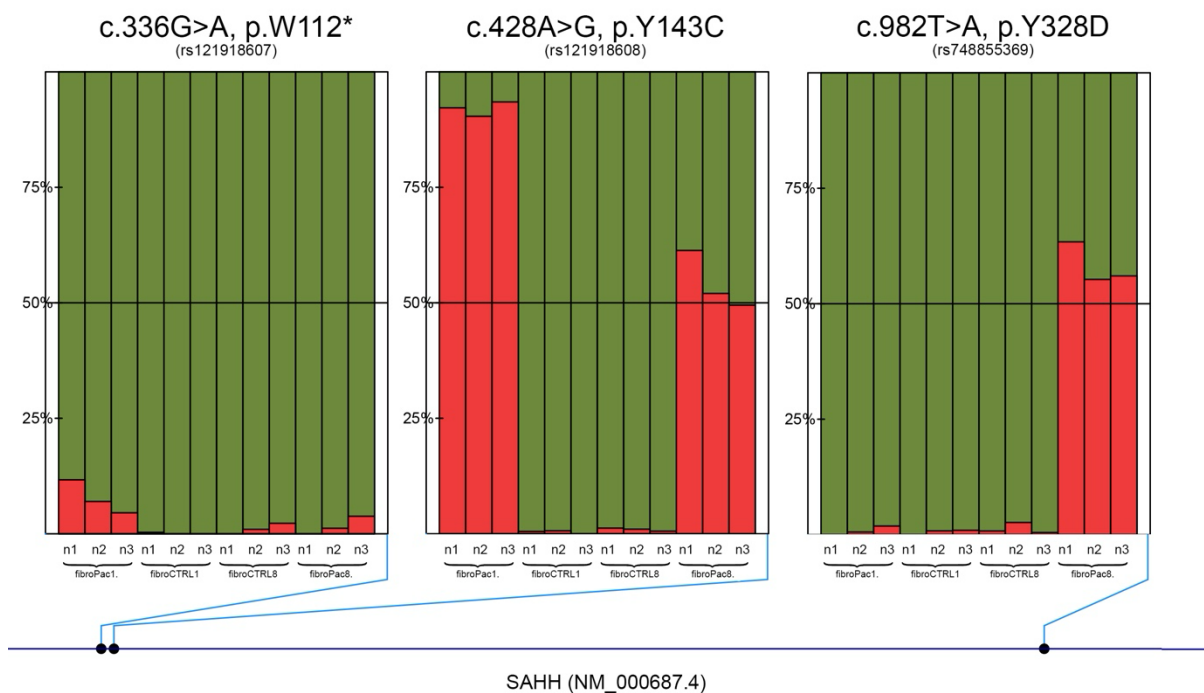
U prvom koraku, identifikacija SNP-ova rezultirala je detekcijom svih očekivanih izmjena nukleotida u uzorcima pacijenata. Alternativni nukleotidi SNP-a c.428A>G, p.Y143C (rs121918608) detektirani su kod oba pacijenta (Slika 31. A). Mutacija c.336G>A, p.W112\* (rs121918607) detektirana je samo kod prvog pacijenta (Slika 31. B), dok je mutacija c.982T>G, p.Y328D (rs748855369) identificirana samo u uzorcima osmog pacijenta (Slika 31. C). Broj očitavanja u svim analiziranim uzorcima i pozicijama iznosi minimalno 100, što ukazuje na njihovu dobru pokrivenost (engl. *coverage*) i pouzdanost analize.

Kod prvog pacijenta, rezultati kvantifikacije jasno pokazuju značajno manji broj očitavanja s alternativnim adeninom (A), koji uzrokuje PTC, u odnosu na referentni gvanin (G) (Slika 31. B). Samo 5-9 % očitavanja na poziciji mutacije p.W112\* sadrži adenin (Slika 32.), ovisno o promatranoj replici. Očekivano, nedostatak transkripata s PTC-om odražava se na omjer očitavanja na poziciji druge mutacije koju sadrži ovaj pacijent (Slika 31 A). Na poziciji mutacije p.Y143C (rs121918608), većinom su detektirana očitavanja s alternativnim gvaninom (G), dok je referentnih adenina (A) prisutno manje od 9% (Slika 32.). Ova odstupanja u svim analiziranim uzorcima okarakterizirana su kao statistički značajna ( $p \ll 0,05$ ) odnosno predstavljaju biološki relevantnu neuravnoteženu ekspresiju između alela *SAHH* u uzorcima prvog pacijenta. S druge strane, kod osmog pacijenta, kvantifikacija očitavanja s alternativnim i referentnim nukleotidima na pozicijama mutacija p.Y143C (rs121918608) i p.Y328D (rs748855369) ne pokazuje značajne razlike u njihovoj distribuciji (Slika 31. A i C i Slika 32.). Izračunate p-vrijednosti većinom su niže od 0,05 (replike n2 i n3) ili su izuzetno blizu granične vrijednosti (replika n1,  $p=0,02$ ), stoga utvrđene razlike nisu smatrane statistički značajnima.



**Slika 31. Broj očitavanja s alternativnim i referentnim nukleotidom na pozicijama istraživanih mutacija gena *SAHH* u uzorcima fibroblasta pacijenata i zdravih kontrola.** Očitavanja s referentnim nukleotidom prikazana su zelenim stupcima. Crveni stupci predstavljaju broj očitavanja s alternativnim nukleotidom. Brojevi iznad stupaca predstavljaju statističku značajnost (p-vrijednost) distribucije očitavanja. P-vrijednosti manje od 0,05 smatraju se statistički značajnima. (A) c.428A>G, p.Y143C; (B) c.336G>A, p.W112\*; (C) c.982T>G, p.Y328D.





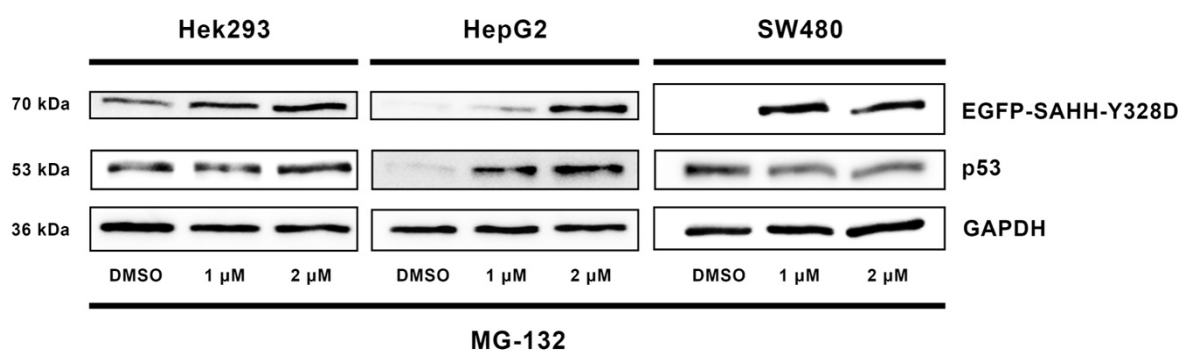
**Slika 32. Udio očitavanja s alternativnim i referentnim nukleotidom na pozicijama istraživanih mutacija gena *SAHH* u uzorcima fibroblasta pacijenata i zdravih kontrola.** Zelena boja predstavlja postotak (%) očitavanja s referentnim nukleotidom, dok je crvenom bojom prikazan postotak alternativnih očitavanja. Donji dio slike predstavlja relativnu poziciju svih analiziranih mutacija unutar nukleotidnog slijeda kanonskog transkripta *SAHH* (NCBI ID: NM\_000687.4).

Zaključno, bioinformatička analiza ekspresije pojedinog alela, temeljena na transkriptomskim podacima dobivenim NGS-om, otkriva neuravnoteženu ekspresiju alela *SAHH* i gotovo potpuni nedostatak transkripata s mutacijom p.W112\* u uzorcima prvog pacijenta. Kod osmog pacijenta, vidljiv je očekivani omjer alternativnih i referentnih očitavanja na pozicijama mutacija p.Y143C i p.Y328D, stoga u tim uzorcima nije utvrđena neuravnotežena ekspresija alela. Na temelju rezultata ove analize, može se nedvojbeno zaključiti da je dvostruko niža ekspresija gena *SAHH* kod prvog pacijenta rezultat selektivnog uklanjanja transkripata sa PTC-om, dok transkripti koji potječu s drugog alela i nose mutaciju p.Y143C, ostaju intaktni.

#### 4.5. Utjecaj inhibicije UPS-a na razine proteina SAHH-Y328D

Za konačnu potvrdu mehanizma odgovornog za nedostatak proteina SAHH-Y328D u eukariotskim stanicama, provedena je inhibicija UPS-a u staničnim modelima koji ekspimiraju istraživani protein. Selektivna inhibicija proteolitičke aktivnosti proteasoma 26S postignuta je tretmanom stanica kemijskim spojem MG-132, nakon čega je razina mutiranog proteina SAHH analizirana western blotom i konfokalnom mikroskopijom. Dodatno je analiziran i protein p53, poznati supstrat UPS-a, kao pozitivna kontrola inhibicije proteasoma.

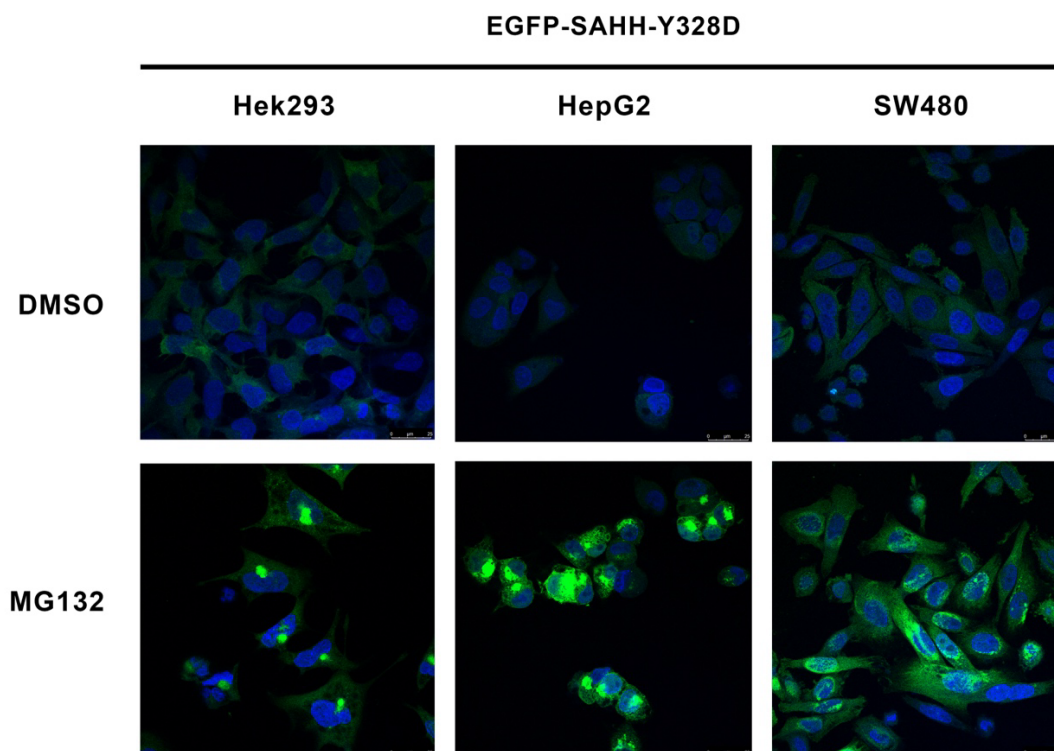
Dobiveni rezultati pokazuju povećane razine proteina SAHH-Y328D u svim staničnim modelima nakon tretmana u usporedbi s kontrolnim stanicama (DMSO) (Slika 33.). Najveće razlike vidljive su u stanicama SW480, dok su u staničnim modelima Hek293, promjene u ekspresiji mutanta najniže. Uz to, povećane razine proteina p53, koje potvrđuju uspješnu inhibiciju proteasoma, vidljive su samo u HepG2 stanicama. Moguće objašnjenje leži u činjenici da mutacije u proteinu p53 onemogućuju njegovu normalnu razgradnju UPS-om. S obzirom na to da su tretmani provedeni u staničnim linijama tumorskog podrijetla, moguće je da je protein p53 mutiran u stanicama Hek293 i SW480, zbog čega nije uočen porast u količini ovog proteina nakon inhibicije UPS-a. Unatoč tome, vidljiv porast proteina p53 u stanicama HepG2 ukazuje na uspješnu inhibiciju proteasoma, a jasno povećanje količine proteina SAHH-Y328D u svim analiziranim staničnim modelima potvrđuje pretpostavku da se ovaj mutant posttranslacijski uklanja putem UPS-a.



**Slika 33. Ekspresija proteina SAHH-Y328D u staničnim modelima nakon inhibicije proteasoma.** Analiza ekspresije proteina EGFP-SAHH-Y328D, p53 i GAPDH nakon 24 h tretmana stanica spojem MG-132 koncentracije 1 nM i 2 nM metodom western blot. Kontrolne stanice tretirane su samo otapalom u kojem je otopljen inhibitor MG-132 (DMSO). Za kontrolu nanošenja uzoraka korištena je ekspresija proteina GAPDH.

Utjecaj inhibicije proteasoma na staničnu ekspresiju proteina EGFP-SAHH-Y328D također je analiziran i konfokalnom mikroskopijom. Preparati stanica tretiranih s 1 nM otopinom MG-132 i netretiranih staničnih modela snimljeni su uz pobudu zelenog fluorescentnog proteina (EGFP). Prilikom snimanja, količina prikupljenog fluorescentnog signala (engl. *gain*) postavljena je na fiksnu vrijednost kako bi mikroskopske snimke iste stanične linije mogle biti međusobno uspoređene.

Iz rezultata je vidljivo očekivano povećanje intenziteta zelenog signala u svim tretiranim stanicama (Slika 34.), što je u skladu s prethodnim rezultatima analize western blotom. Zanimljivo je da za razliku od kontrolnih stanica, u kojima je slabi zeleni signal homogeno raspoređen u citoplazmi, u tretiranim stanicama dolazi do pojave diskretnih klastera zelenog svjetla velikog intenziteta. Ovi rezultati sugeriraju da povećana stanična ekspresija proteina SAHH-Y328D, uslijed inhibicije UPS-a, rezultira njegovim nakupljanjem odnosno formiranjem proteinskih agregata. Ovaj rezultat pruža dublji uvid u to kako mutacija Y328D utječe na strukturu i stabilnost proteina SAHH u staničnom okruženju te dodatno pojašnjava specifičnosti ekspresije ovog mutanta i njegove posttranslacijske regulacije putem UPS-a.



**Slika 34. Nakupljanje proteina SAHH-Y328D u eukariotskim stanicama nakon inhibicije proteasoma.** Analiza količine proteina EGFP-SAHH-Y328D konfokalnom mikroskopijom nakon tretmana stanica Hek293, HepG2 i SW480 1 nM otopinom MG-132. Prikazane su spojene slike plavog (DAPI) i zelenog (EGFP) signala. Kontrole stanice tretirane otapalom (DMSO).

#### 4.6. Analiza stabilnosti mutiranih proteina SAHH *in silico*

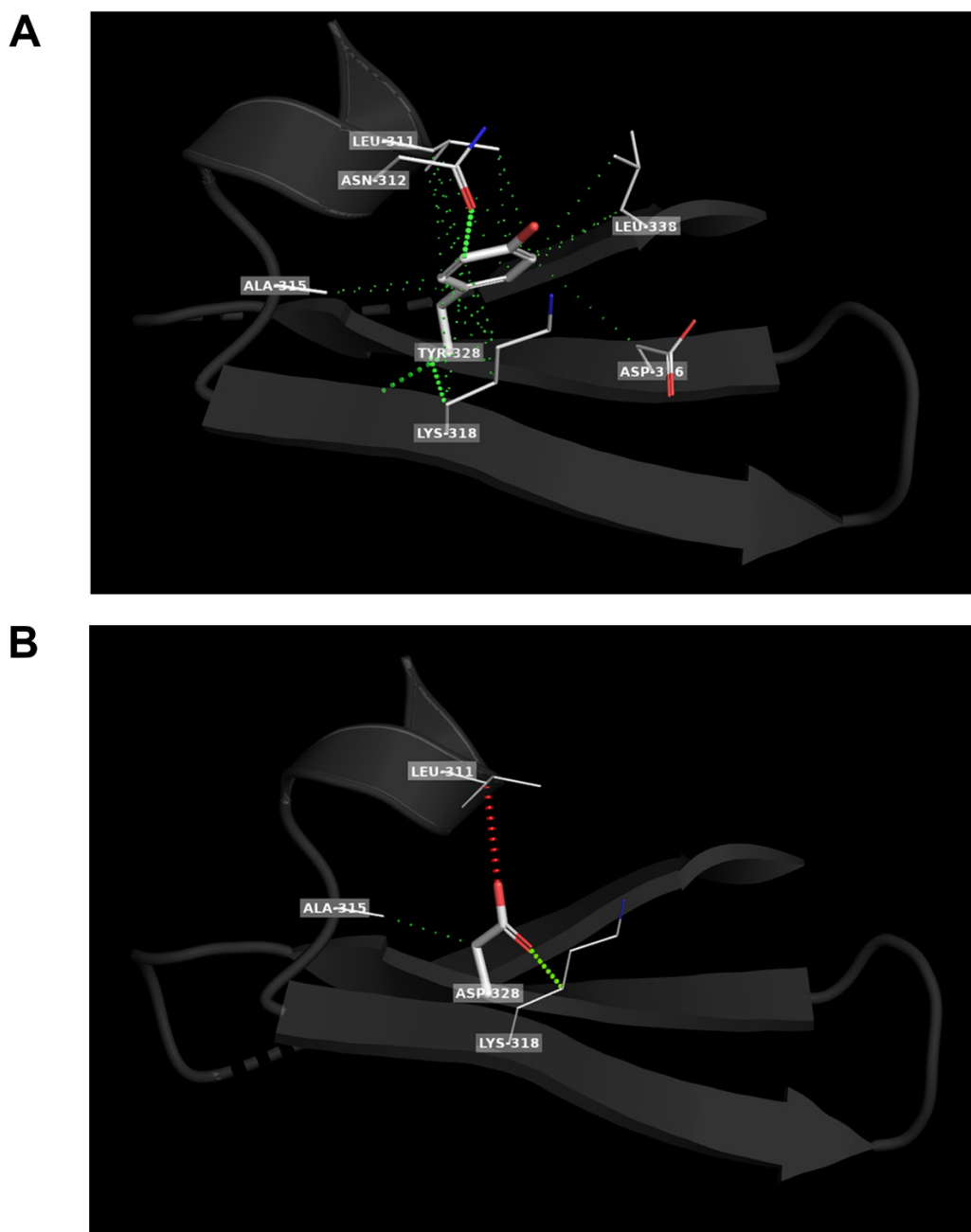
S ciljem boljeg razumijevanja zašto protein SAHH-Y328D pokazuje pojačanu tendenciju agregacije u staničnom okruženju, provedeno je računalno predviđanje stabilnosti mutiranog proteina pomoću mrežnog alata DynaMut2 [154]. Ovaj alat primjenjuje prediktivne modele za procjenu utjecaja aminokiselinskih izmjena na niz strukturnih obilježja proteina, uključujući kontakte i okolinu aminokiselinskih ogranaka, međuatomske interakcije, njihovu prirodu itd. Konačan rezultat je izračun promjene Gibbsove slobodne energije smatanja ( $\Delta G_{\text{smatanje}}$ ) između proteina divljeg tipa i mutiranog proteina ( $\Delta\Delta G$ ), koji opisuje karakter i intenzitet promjena stabilnosti proteina uslijed uvođenja mutacije. Modeliranje je provedeno korištenjem poznate strukture ljudskog proteina SAHH (PDB: 4YVF). Analiza je napravljena za svih 12 besmislenih mutacija (Tablica 2.), koje dovode do bolesti nedostatne aktivnosti SAHH-a, kako bi se utjecaj istraživane mutacije sagledao u kontekstu svih ostalih mutacija.

Na temelju dobivenih rezultata, za 11 mutacija predviđen je destabilizirajući efekt s obzirom na to da im je pripadajuća vrijednost  $\Delta\Delta G$  negativnog predznaka, dok jedino mutacija E108K uzrokuje povećanje stabilnosti proteina (Tablica 12). Vrijednosti promjena Gibbsove slobodne energije za većinu aminokiselinskih izmjena iznosi između -1 i -2 kcal/mol, dok mutacija Y328D dovodi do promjene od čak -3,41 kcal/mol, što pokazuje da je njezin destabilizirajući efekt puno izraženiji od ostalih pogrešnih mutacija koje uzrokuju bolest.

**Tablica 12. Predviđanje promjena stabilnosti *in silico* za mutirane proteine SAHH koji uzrokuju bolest.** Mutacije su poredane na temelju apsolutnih vrijednosti  $\Delta\Delta G$  počevši od najveće.

Broj	Mutacija	Utjecaj na stabilnost	$\Delta\Delta G/ \text{kcalmol}^{-1}$
1.	Y328D	Destabilizirajući	-3,41
2.	V217M	Destabilizirajući	-1,75
3.	R36W	Destabilizirajući	-1,72
4.	R49C	Destabilizirajući	-1,66
5.	Y143C	Destabilizirajući	-1,41
6.	G71S	Destabilizirajući	-1,37
7.	A48T	Destabilizirajući	-1,35
8.	R49H	Destabilizirajući	-1,15
9.	A89V	Destabilizirajući	-1,06
10.	D86G	Destabilizirajući	-0,56
11.	T57I	Destabilizirajući	-0,18
12.	E108K	Stabilizirajući	0,08

Imajući u vidu inherentne razlike u fizikalno-kemijskim svojstvima između bočnih ogranaka tirozina i aspartata, vizualizirana je lokalna struktura 328. tirozina (Y) divljeg tipa proteina i modeliranog mutanta s aspartatom (D) (Slika 35.). Uspoređene su njihove interakcije s prostorno bliskim aminokiselinama kako bi se bolje razumjeli strukturni temelji drastične promjene Gibbsove slobodne energije uzrokovane ovom supstitucijom.



**Slika 35. Trodimenzionalna struktura ljudskog proteina SAHH i intramolekulske interakcije 328. aminokiseline.** Tanke isprekidane zelene linije predstavljaju privlačne nepolarne interakcije, dok deblje isprekidane linije označavaju vodikove veze. Crvene isprekidane linije predstavljaju odbojne sile. Strukture su vizualizirane pomoću programa PyMOL (izdanje 2.5.5.). (A) SAHH-WT; (B) SAHH-Y328D.

Na temelju poznate 3D-strukture ljudskog SAHH (PDB: 4YVF), 328. tirozin ubraja se u skupinu, tzv. zakopanih aminokiselina (engl. *buried residue*) s obzirom na to da se nalazi u unutrašnjosti proteina i nije izložena otapalu. Iz priložene strukture divljeg tipa proteina (Slika 35. A), vidljivo je da aromatski bočni ogranak tirozina ostvaruje mnogobrojne privlačne interakcije s prostorno bliskim aminokiselinama. Većina njih je nepolarnog odnosno hidrofobnog karaktera, uključujući interakciju s 311. i 338. leucinom, 315. alaninom, 318. lizinom te jednu vodikovu vezu s 312. aspartatom. Izmjenom tirozina u aspartat, aminokiselinu koja sadrži negativno nabijeni bočni ogranak, dolazi do gubitka većine hidrofobnih interakcija sa susjednim nepolarnim aminokiselinama, a jedine privlačne sile ostvaruje s 318. lizinom (vodikova veza) i 315. alaninom (nepolarna interakcija). Uz to, zbog nepovoljne prostorne orijentacije bočnog ogranka 328. aspartata, dolazi do pojave steričkih smetnji odnosno odbojnih sila između negativno nabijenog atoma kisika i nepolarnog alifatskog ogranka 311. leucina (Slika 35. B).

Zaključno, analiza stabilnosti mutiranih proteina SAHH *in silico* karakterizira mutaciju Y328D kao izuzetno destabilizirajuću. Pripadajuća promjena Gibbsove slobodne energije smatanja iznosi -3,41 kcal/mol, što je značajno više od ostalih mutacija čije su vrijednosti  $\Delta\Delta G$  manje od -2 kcal/mol. Vizualizirane trodimenzionalne strukture ukazuju na nedostatak nepolarnih privlačnih sila u hidrofobnoj jezgri proteina uslijed izmjene 328. aromatskog tirozina u negativno nabijeni aspartat.

## 5. RASPRAVA

Rijetke bolesti obuhvaćaju raznoliku skupinu medicinskih poremećaja karakteriziranih niskom prevalencijom u populaciji. Iako pojedinačno rijetke, kolektivno ova skupina oboljenja pogađa milijune ljudi diljem svijeta. Rijetke bolesti predstavljaju jedinstvene izazove u pogledu njihove dijagnoze, liječenja i medicinske skrbi, upravo zbog svoje rijetke pojavnosti te širokog spektra kliničkih simptoma. Unatoč raznolikosti u njihovoj kliničkoj manifestaciji, većina rijetkih bolesti su teške, kronične, često degenerativne i smrtonosne te nerijetko predstavljaju cjeloživotni teret za pacijente, zdravstveni sustav i društvo općenito. Danas se preko 6000 različitih dijagnoza pripisuje rijetkim bolestima, a procjenjuje se da je preko dvije trećine uzrokovano genetskim čimbenicima [71]. Zahvaljujući rutinskoj primjeni metoda sekvenciranja sljedeće generacije u medicinskoj dijagnostici, u posljednjem desetljeću postignut je značajan napredak u razumijevanju genetskih osnova rijetkih bolesti i njihovom ranom otkrivanju. Unatoč napredcima u dijagnostici, terapijski pristupi za više od 95% rijetkih bolesti još uvijek se temelje na liječenju i ublažavanju simptoma, a ne njihovog uzroka [155]. Stoga su temeljna znanstvena istraživanja od presudne važnosti za razumijevanje molekularnih karakteristika rijetkih poremećaja, pružajući ključne znanstvene spoznaje koje otvaraju vrata razvoju ciljanih terapijskih pristupa i personaliziranoj medicini.

Jedno takvo istraživanje provedeno je u sklopu ove disertacije, s ciljem razjašnjavanja ekspresijskih učinaka mutacija u genu *SAHH* i molekularnih mehanizama u pozadini težih oblika nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze. Do danas su zabilježena samo 16 slučajeva ovog rijetkog metaboličkog poremećaja uzrokovanog genetskim varijantama koje dovode do inaktivacije enzima SAHH [16,74–85]. Smanjena aktivnost ovog enzima narušava homeostazu ciklusa metionina i općeg metilacijskog potencijala stanice, što u konačnici dovodi do kompleksnih patofizioloških promjena u ljudskom organizmu. Iako težina kliničkih simptoma varira među pacijentima, trenutno je jedini preporučeni terapijski pristup usredotočen na smanjenje akumulacije metioninskih metabolita, indirektnih posljedica štetnih mutacija [86]. Funkcionalne analize rekombinantnih proteina SAHH provode se u Laboratoriju za naprednu genomiku (LNG) od samog otkrića bolesti [81,100,101,156] te su pokazale povezanost kliničkih slika pacijenata s inaktivacijskim učinkom mutacija [73]. Ova disertacija nastavak je dugogodišnjeg rada LNG-a u istraživanju molekularnih karakteristika različitih slučajeva nedostatne aktivnosti SAHH-a, a potaknuto je otkrićem osmog pacijenta koji je već pri rođenju imao najizraženije biokemijske poremećaje do danas opisane u literaturi [16]. S obzirom na to da se standardni terapijski pristup nije pokazao učinkovitim, ovaj slučaj istaknuo

je nedostatke preporučene terapije i potrebu za promicanjem paradigme liječenja uzroka, a ne samo simptoma bolesti.

U skladu s ustanovljenim korelacijama kliničkih slika i genotipa, postavili smo hipotezu da mutacije karakteristične teško bolesnim pacijentima ne utječu samo na aktivnost enzima, već uzrokuju smanjenu ekspresiju, odnosno nedostatak proteina u stanicama, što pridonosi jačini fenotipa bolesti i potencijalno utječe na terapijske ishode. Naglasak istraživanja bio je na učinku pogrešne mutacije Y328D, otkrivene kod prethodno spomenutog pacijenta te na identifikaciji molekularnih mehanizmima odgovornih za nedostatak mutiranog proteina u eukariotskim stanicama. Također je ispitana i druga mutacija ovog pacijenta, Y143C, koja je prethodno otkrivena u kombinaciji s besmislenom mutacijom W112\* kod prvog slučaja ovo oboljenja [74]. Zbog velikih podudarnosti kliničkih i biokemijskih poremećaja s osmim pacijentom, uz sličnosti njihovih genotipova, prvi pacijent također je uključen u istraživanje. Važno je napomenuti da su prethodni pokušaji funkcionalnih analiza rekombinantnih proteina SAHH s mutacijama W112\* i Y328D bili neuspješni, zbog onemogućene proizvodnje ovih mutanata u prokariotskim ekspresijskim sustavima [100,104]. Iako bakterijske stanice nisu idealni sustavi za proizvodnju eukariotskih proteina, potpuno bezuspješna heterologna ekspresija ovih mutanata, za razliku od drugih mutacija, implicirala je njihov svojstven funkcionalni odnosno ekspresijski utjecaj. Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je ispitati ekspresijske učinke mutacija W112\*, Y143C i Y328D u eukariotskim sustavima te razjasniti stanične mehanizme u pozadini teških oblika nedostatne aktivnosti SAHH-a za koje smo pretpostavili da, s jedne strane, doprinose ozbiljnosti simptoma, dok s druge, mogu predstavljati perspektivne terapijske mete.

U prvom djelu istraživanja istražili smo utjecaj mutacija na razine transkripata i proteina SAHH u fibroblastima pacijenata, izvanstaničnom sustavu *in vitro* i staničnim modelima. Zahvaljujući sudjelovanju članova LNG-a u opisivanju većine dosadašnjih slučajeva oboljenja, primarne stanice pacijenata bile su dostupne za njihovu neposrednu analizu u sklopu ovog istraživanja. Bitno je napomenuti da je limitiranost kliničkog materijala zasigurno jedna od glavnih prepreka ovog istraživanja, ali i istraživanja rijetkih bolesti općenito. Naime, nedostatak kliničkih uzoraka često ograničava opseg istraživanja i raznolikost eksperimentalnih pristupa, što u konačnici dovodi do sporijih napredaka u razumijevanju molekularnih specifičnosti rijetkih oboljenja. Ova činjenica posebno je izražena kod nedostatne aktivnosti SAHH-a, od koje boluje izuzetno mali broj pacijenata u svijetu, a neki od njih su, nažalost, već i preminuli. Stoga ovo istraživanje predstavlja vrijedan doprinos u polju rijetkih bolesti, posebice u istraživanju ovog izuzetno rijetkog poremećaja, budući da uključuje izravnu



analizu primarnih stanica pacijenata. Iako su u određenim dijelovima ovog istraživanja analizirani fibroblasti pacijenata, odabir metodoloških pristupa uvelike je ovisio o količini potrebnog materijala, a određene analize nisu mogle biti ponovljene. Zbog ograničenja rada s primarnim stanicama i nemogućnosti njihove beskonačne propagacije, dio istraživanja temeljio se na analizi ekspresije rekombinantnih proteina SAHH u sustavima *in vitro*, uključujući i stanične modele stanica Hek293, HepG2, SW480. Drugi dio istraživanja oslanjao se na visoku protočnost i niske količine početnog materijala potrebnog za sekvenciranje metodama NGS-a te prilagodljivost bioinformatičkih analiza u obradi transkriptomskih podataka (mRNAseq). Sekvenciranjem transkriptoma detaljnije su istraženi molekularni mehanizmi u pozadini negativnih ekspresijskih učinaka mutacija W112\* i Y328D, koji su utvrđeni u prvom dijelu istraživanja, a potvrda pretpostavljenog mehanizma degradacije proteina SAHH-Y328D provedena je uporabom pripremljenih staničnih modela. U konačnici se računalnom (*in silico*) analizom stabilnosti ovog mutiranog proteina produbilo razumijevanje specifičnog ekspresijskog utjecaja pogrešne mutacije Y328D u kontekstu promjena u strukturi proteina.

Na početku istraživanja, analizirana je ekspresija SAHH u fibroblastima pacijenata RT-qPCR-om i western blotom kako bi se dobio cjeloviti uvid u temeljne ekspresijske parametre mutiranih gena *SAHH* u njihovom nativnom genomskom kontekstu. Analize su pokazale nedostatak transkripata i proteina SAHH za otprilike 50 % kod prvog pacijenta (Slika 20.), kojeg karakterizira besmislena mutacija W112\*. Polovično smanjenje ekspresije *SAHH* sugeriralo je dodatnu (negativnu) regulaciju jednog od alela *SAHH* već na transkripcijskoj razini, a pretpostavljeno je da se u pozadini nedostatka mRNA nalazi mehanizam degradacije transkripata s besmislenim mutacijama (NMD). Bitno je naglasiti da su za metodu RT-qPCR korištene univerzalne hidrolizirajuće probe za gen *SAHH*, koje nisu pogodne za detekciju specifičnih mutacija, stoga u ovom dijelu istraživanja nismo bili u mogućnosti jednoznačno utvrditi koju točno mutaciju sadrže izmjereni transkripti odnosno nedostaju li upravo oni s besmislenom. Ipak, analizom proteina western blotom uočena je proteinska vrpca pri nativnim molekulskim masama proteina SAHH (Slika 21.), što pokazuje da detektirani protein vjerojatno sadrži mutaciju Y143C, a ne W112\*, koja značajno skraćuje protein. Uzimajući u obzir i jasnu korelaciju smanjenih razina transkripata i proteina, pretpostavili smo da je narušena ekspresija proteina vjerojatno posljedica nedostatka transkripata s besmislenom mutacijom. Općenito je ova vrsta mutacija jedan od glavnih genetskih čimbenika u etiologiji mnogih rijetkih bolesti. Stanično uklanjanje transkripata s PTC-om i narušavanje proizvodnje proteina univerzalan je biološki fenomen neovisan o funkciji samog proteina. Na primjer, cistična fibroza jedna je od najpoznatijih rijetkih bolesti uzrokovana mutacijama u genu *CFTR*

koja izaziva ozbiljne respiratorne i probavne poremećaje s potencijalno letalnim ishodom. Do danas je potvrđeno preko 700 mutacija koje uzrokuju bolest, a besmislene mutacije G542\*, N1303\*, W1282\*, R553\* nalaze se u 10 najučestalijih u populaciji [157]. Hamosh i suradnici već su 1992. godine ustanovili povezanost mutacija G542\* i W1282\* i nedostatka transkripata *CFTR*-a u primarnim epitelnim stanicama [158], a u staničnim modelima bronhijalnih epitelnih stanica 16HBE, pokazano je da su transkripti s ovim mutacijama supstrati degradacijskog mehanizma NMD [159,160]. Nadalje, Duchenneova i Beckerova mišićna distrofija predstavljaju najčešće genetske poremećaje mišićnog sustava, karakterizirane progresivnom degeneracijom i slabostima mišića. Nedavna analiza jedne od najobuhvatnijih kohorta pacijenata pokazala je da su besmislene mutacije najčešća vrsta mutacija koje uzrokuju teški fenotip bolesti, uz velike delecije cjelokupnih eksona [161]. Generalno se procjenjuje da su besmislene mutacije odgovorne za više od 10 % nasljednih genetskih poremećaja [162], a često su povezane s lošijim kliničkim ishodima, kao što je i slučaj prvog pacijenta s nedostatnom aktivnosti SAHH-a. Unatoč snažnim indikacijama, ograničenja odabranog metodološkog pristupa pri kvantifikaciji ekspresije gena onemogućila su jednoznačno definiranje uzroka utvrđenih ekspresijskih promjena. Potvrda selektivnog nedostatka transkripata s mutacijom p.W112\* odnosno mehanizma NMD provedena je u daljnjem dijelu istraživanja sekvenciranjem transkriptoma stanica pacijenta (mRNAseq). Ovom metodom određen je točan nukleotidni slijed svakog detektiranog transkripata, uključujući i *SAHH* mRNA, čime se omogućila kvantifikacija ekspresije ne samo gena već pojedinih alela.

Nedostatak proteina također je potvrđen i u fibroblastima osmog pacijenta ( $\approx 15$  % kontrolnih vrijednosti) (Slika 21.), no bez promjena u razinama transkripata (Slika 20.), sugerirajući da je gen *SAHH* u ovom slučaju dodatno reguliran pri višim, proteinskim razinama genske ekspresije. Iako dobiveni rezultati podupiru pretpostavku o negativnom ekspresijskom učinku istraživanih mutacija, tako značajno smanjenje proteina za čak 85% bilo je neočekivano. Naime, uzimajući u obzir rezultate analize uzoraka prvog pacijenta (W112\*/Y143C) i činjenicu da se rekombinantni protein SAHH-Y143C može uspješno proizvesti u bakterijskim sustavima, može se pretpostaviti da je mutacija Y328D primarni uzrok smanjene ekspresije kod osmog pacijenta (Y328D/Y143C). Nedostatak više od 50 % proteina implicira negativan ekspresijski učinak i druge mutacije, Y143C, koji nije zabilježen kod prvog pacijenta. Sinergistički učinak mutacije Y328D u kombinaciji s Y143C može pružiti biološko objašnjenje nižih razina proteina SAHH od očekivanih, no bitno je napomenuti da je analiza količine proteina western blot-om uspješno provedena samo jednom, zbog prethodno

spomenute ograničene količine kliničkog materijala. Nedostatak statističke obrade podataka dovodi u pitanje samu preciznost izmjerenih promjena, a njihova interpretacija dodatno je otežana kompleksnošću heterozigotnih genotipova pacijenata i ekspresije gena u realnim biološkim sustavima. Iako analize kliničkih uzoraka daju vrijedan uvid u kumulativne ekspresijske učinke istraživanih mutacija, o njihovim pojedinačnim doprinosima na temelju ovih rezultata moguće je samo nagađati. Stoga smo u nastavku istraživanja proveli eksperimente temeljene na tehnikama rekombinantne DNA i ekspresiji pojedinih mutanata SAHH-a u eukariotskim sustavima *in vitro* kako bi se raščlanili pojedinačni efekti istraživanih mutacija.

Izvanstanični ekspresijski sustavi *in vitro* već su više od 50 godina neizostavni alat sintetske biologije i molekularnih znanosti općenito. Zasnivani na aktivaciji transkripcije i translacije uporabom čistih staničnih ekstrakata, ovi pojednostavljeni sustavi genske ekspresije omogućuju brzu sintezu proteina izvan kompleksnog staničnog okruženja. U našem istraživanju, ekspresijom rekombinantnih gena *SAHH* (cDNA) *in vitro* ispitali smo procesuiranje mutiranih gena, odnosno transkripata, usmjeravajući se na učinkovitost dva fundamentalna mehanizama genske ekspresije, transkripciju i translaciju. Primarni cilj bio je utvrditi narušavaju li mutacije W112\*, Y143C i Y328D efikasnost transkripcijske i translacijske mašinerije tijekom izvanstanične sinteze proteina. Naime, zastoj i kolizija ribosoma uzrokovani strukturnim anomalijama (mutiranih) mRNA usporile bi mehanizam translacije i smanjili prinos mutiranih proteina, a opažanje ovih fenomena predstavljalo bi temeljni aktivacijski signal mehanizama kontrole genske ekspresije NGD i NSD [121,125]. Međutim, western blot-om nisu utvrđene značajne razlike između prinosa različitih mutanata i divljeg tipa proteina (Slika 23.), sugerirajući da su ekspresijski učinci mutacija ovisni o staničnom kontekstu, koji uključuje dodatne mehanizme izvan same transkripcije i translacije. Zanimljivo je da smo korištenjem izvanstaničnog sustava *in vitro* temeljenog na staničnom lizatu humanih stanica HeLa, uspješno proizveli i mutanta Y328D, koji se nije mogao eksprimirati uporabom bakterijskih stanica u prijašnjim istraživanjima [104]. Ovi rezultati pokazuju da je nedostatke heterolognih ekspresijskih sustava moguće nadomjestiti korištenjem odabranog *in vitro* sustava, a ovaj alternativni metodološki pristup u proizvodnji proteina SAHH-Y328D otvara vrata budućim studijama ispitivanja njegove enzimatske aktivnosti. Iako je primarni fokus našeg istraživanja razjašnjavanje ekspresijskih učinaka mutacija i pozadinskih mehanizama, razumijevanje u kojoj mjeri mutacija Y328D utječe na samu hidrolitičku aktivnost SAHH-a predstavlja sljedeću važnu kariku u razvoju i primjeni efikasnijih strategija liječenja.

Dobro je poznato da je prevođenje genetičke upute u živim organizmima puno složeniji proces od same transkripcije DNA i translacije mRNA te uključuje i niz regulatornih i kontrolnih mehanizama koji djeluju na različitim razinama ekspresije gena. Kako bi ispitali njihovu ulogu u regulaciji ekspresije rekombinantnih gena *SAHH* u staničnom okruženju, konstruirali smo stanične modelne sustave s konstitutivnom ekspresijom mutiranih proteina. Modelni sustavi općenito predstavljaju nezaobilaznu kariku u proučavanju patofizioloških mehanizama rijetkih bolesti te služe kao temeljna platforma za pronalazak i testiranje potencijalnih terapija. Iako niti jedan model ne može u potpunosti replicirati kompleksnost realnih bioloških sustava, posebice ljudskog organizma, stanični modeli *in vitro* korisni su za preliminarnu validaciju hipoteza i istraživanja osnovnih bioloških procesa. Naše modelne sustave pripremili smo lentivirusnom transdukcijom tumorskih staničnih linija stanica Hek293, HepG2 i SW480 kako bi proučili ekspresiju rekombinantnih gena unutar istovjetne genomske okoline. Time smo eliminirali utjecaje ostalih regulatornih čimbenika, što nam je omogućilo da se usredotočimo na ispitivanje samo ekspresijskih efekata pojedinih mutacija. Iako stanice tumorskog podrijetla rijetko odražavaju fiziologiju normalnih stanica, posebice u kontekstu stanične signalizacije i metaboličkih procesa, kombinacijom više različitih staničnih linija potvrdili smo univerzalnost negativnih učinaka mutacija i samu reproducibilnost rezultata. Naime, western blot-om utvrđena je drastično niža ekspresija proteina SAHH-Y328D (8-14 % kontrolnih vrijednosti) i potpuni nedostatak mutanta SAHH-W112\*, za razliku od SAHH-Y143C, neovisno o tipu stanica (Slika 26.). Ovi rezultati potvrđeni su i analizom stanica konfokalnom mikroskopijom (Slika 25.), budući da su rekombinantni geni uneseni vektorima koji omogućuju fuziju istraživanih proteina sa zelenim fluorescentnim proteinom (EGFP). Time smo pokazali da je negativan učinak mutacija W112\* i Y328D zaista ovisan o staničnom kontekstu, no nije tkivno specifičan, već se odražava na razini temeljnih staničnih procesa, kao što je kontrola kvalitete genske ekspresije. Ovi rezultati podupiru našu hipotezu o narušenoj proizvodnji proteina uzrokovanu mutacijama koje su svojstvene teško bolesnim pacijentima (W112\* i Y328D), a ne zajedničkom mutacijom (Y143C).

Zbog uočenog potpunog nedostatka ekspresije proteina SAHH-W112\*, očekivali smo i nedostatak odgovarajućih transkripta zbog njihove pretpostavljene degradacije. Međutim, RT-qPCR-om nije utvrđeno potpuno uklanjanje transkripata s mutacijom W112\*, već je u svim staničnim modelima izmjereno smanjenje na otprilike 50 % kontrolnih vrijednosti (Slika 27.). Moguće je da je sam metodološki pristup korišten pri konstrukciji staničnih modela limitirao njihovu sposobnost adekvatnog modeliranja mehanizma NMD. Naime, transducirani rekombinantni geni *SAHH* nalaze se pod kontrolom umjetnog promotora citomegalovirusa

(CMV), koji inducira ekspresiju gena na razine koje premašuju endogene ekspresijske profile humanih stanica [163], što je vidljivo i iz naših rezultata. Uz to, Sato i suradnici nedavno su pokazali interstaničnu varijabilnost efikasnosti mehanizma NMD u stanicama Hek293 i U2OS, a čak su identificirali i subpopulacije stanica s potpunim izostankom degradacije transkripata s PTC-om (engl. *NMD escape*) [164]. Neprirodno visoka ekspresija defektnih transkripata, koja premašuje stanične kapacitete njihovog uklanjanja, u kombinaciji s podbacivanjem samog mehanizma NMD u pojedinim modelnim stanicama, moglo bi objasniti naše rezultate. Osim toga, jedan od glavnih mehanizama staničnog prepoznavanja PTC-ova i aktivacije degradacijskog puta NMD ovisan je o EJC-kompleksima. Ovaj proteinski kompleks veže se na zrele transkripte nakon izrezivanja introna, no pri konstrukciji naših staničnih modela koristili smo samo sljedove cDNA, koji nisu supstrati EJC-ovisnog prepoznavanja PTC-ova. Iako očigledno zadržavaju djelomičnu sposobnost degradacije besmislenih transkripata, vjerojatno alternativnim mehanizmima prepoznavanja PTC-ova, nedostaci pripremljenih staničnih modela smanjuju relevantnost njihove uporabe u daljnjim istraživanjima, posebice u istraživanju novih lijekova. Zbog toga je u budućnosti nužno razviti prikladnije stanične modele za istraživanje mehanizma NMD u kontekstu nedostatne aktivnosti SAHH-a, koristeći modernije tehnike kao što je CRISPR-Cas. Primjena ove tehnologije omogućila bi direktnu manipulaciju izvornog genetskog materijala stanice, bez integracije neprirodnih genetskih elemenata u eukariotske genome. CRISPR-Cas danas se široko primjenjuje u razvoju poboljšanih staničnih modela za istraživanja mehanizama bolesti i testiranje lijekova unutar prirodnog genomskog konteksta koji je biološki relevantan.

Druga mutacija koja smanjuje ekspresiju proteina Y328D, očekivano ne mijenja količine transkripata (Slika 27.), što pokazuje da se njezin štetan učinak primarno reflektira na proteinskoj razini. Imajući u vidu karakter ove mutacije, supstitucije aminokiselina mogu imati široki spektar posljedica na osnovna fiziološka svojstva proteina, uključujući i njegovu stabilnost. Stabilnost proteina odnosi se na njegovu sposobnost održavanja native strukture pri fiziološkim uvjetima i usko je povezana s procesom smatanja. Istraživanja povezanosti patogenih mutacija i proteinskih struktura pokazala su da čak 80 % pogrešnih mutacija destabilizira proteine [165], mijenjajući različite energetske i entropijske faktore ključne za strukturni integritet i ispravno smatanje proteina [166]. Nadalje, destabilizacija i nepravilno smatanje proteina potvrđeni su u pozadini mnogih genetskih poremećaja, kao što su nasljedni oblici Alzheimerove [167], Parkinsonove [168] i prionskih bolesti [169]. Gotovo potpuni nedostatak proteina SAHH-Y328D u našim modelima upućuje upravo na ovaj učestali mutacijski efekt dobro okarakteriziran kod drugih bolesti, iako do sada nije zabilježen kod

nedostatne aktivnosti SAHH-a. Ukoliko je proces smatanja značajno narušen, često dolazi do nakupljanja defektnih proteina koji formiraju netopljive agregate i dodatno potiču patogenezu bolesti, što je slučaj kod prethodno navedenih neurodegenerativnih poremećaja. Međutim, analiza naših staničnih modela mikroskopijom nije pokazala nakupljanje proteina SAHH-Y328D u stanicama (Slika 25.), što implicira efikasan stanični odgovor u uklanjanju ovog proteina. Poznavajući da se održavanje stanične proteostaze postiže djelovanjem specijaliziranih sustava za razgradnju proteina (autofagija i UPS), u nastavku istraživanja usmjerili smo se na njihovu identifikaciju i potvrdu uporabom pripremljenih staničnih modela.

Metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) danas se koriste u gotovo svim pogledima biomedicinskih istraživanja, od temeljnih genetskih studija do kliničke dijagnostike i personalizirane medicine. Laboratorij za naprednu genomiku, u kojem je izrađena ova disertacija, među pionirima je u implementaciji ove tehnologije na našim prostorima i već gotovo 10 godina uspješno primjenjuje NGS u sklopu različitih projekata, uključujući i istraživanje nedostatne aktivnosti SAHH-a. U našim prijašnjim studijama, metodom NGS-a po prvi smo put analizirali transkriptome izvornih stanica pacijenta s nedostatnom aktivnosti SAHH-a, fokusirajući se na poveznice s drugim patološkim stanjima i otkrivanju potencijalnih biomarkera [104]. Nadalje, u istraživanjima promjena u regulaciji staničnog ciklusa stanica hepatocelularnog karcinoma HepG2 s utišanom ekspresijom SAHH-a, sekvenciranje transkriptoma omogućilo nam je potvrdu aktivacije signalnih puteva povezanih sa zastojem staničnog ciklusa i oštećenjem DNA [102]. Nedavno smo sličan metodološki pristup iskoristili za analizu ekspresije gena povezanih s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom i proliferacijom stanica kolorektalnog karcinoma SW480 uslijed smanjene ekspresije SAHH-a [170]. U sklopu ove disertacije, pripremom biblioteka i sekvenciranjem primarnih stanica pacijenata obogatili smo postojeći skup globalnih ekspresijskih profila ovog izuzetno rijetkog oboljenja i metilacijskih poremećaja općenito. Iako cjelovita analiza diferencijalno eksprimiranih puteva nije bila fokus ove disertacije, bioinformatičku obradu podataka dobivenih NGS-om prilagodili smo specifičnim ciljevima našeg istraživanja. Naime, standardna analiza diferencijalne ekspresije omogućila nam je potvrdu duplo niže ekspresije *SAHH* utvrđene kod prvog pacijenta RT-qPCR-om, a dodatnom analizom ekspresije specifičnog alela (ASE) specijalnim bioinformatičkim alatima otkrili smo neuravnoteženu ekspresiju između alela. Ispitivanje ovog fenomena danas se široko primjenjuje u detekciji regulatornih varijanti koje utječu na gensku ekspresiju, kao što su besmislene mutacije. Istraživanje povezanosti genetskih varijanti identificiranih kroz projekt 1000 genoma (1KG) i transkriptomskih profila limfoblastoidne stanične linije (LCL) pokazalo je značajna odstupanja broja NGS-očitavanja s besmislenim

mutacijama, za razliku od onih sa sinonimnim varijantama, pokazujući da je degradaciju transkripata s PTC-om moguće indirektno detektirati pomoću mRNAseq-a [171]. Slična analiza proširenog skupa podataka od čak 462 različitih ispitanika također je potvrdila isti efekt učestalog nedostatka očitavanja alternativnih (stop) alela na heterozigotnim pozicijama besmislenih mutacija [172]. Isti pristup iskoristili smo i u našoj analizi podataka dobivenih mRNAseq-om. Kvantifikacijom referentnih i alternativnih očitavanja na pozicijama istraživanih mutacija (W112\*, Y143C i Y328D) utvrdili smo izraženi manjak sekvenci s besmislenom mutacijom W112\* (5-9 %) u uzorcima prvog pacijenta, dok je distribucija očitavanja kod osmog pacijenta pokazala očekivani omjer od približno 50 % za svaki heterozigotni lokus (Slika 32.). Time smo potvrdili da u primarnim stanicama pacijenta dolazi do selektivnog uklanjanja samo transkripata s besmislenom mutacijom, implicirajući aktivaciju mehanizma NMD-a, što je u skladu s našom hipotezom. Važno je istaknuti da sekvenciranjem transkriptoma odnosno kodirajućih sljedova gena, nismo mogli istražiti prisutnost drugih varijanti u nekodirajućim dijelovima, koje također mogu značajno modulirati aktivnost alela s PTC-om, kao što su mutacije u promotorskim sljedovima ili u mjestima izrezivanja introna. Sekvenciranjem cijelog genoma u budućim istraživanjima dobio bi se uvid i u ove ključne regulatorne elemente i njihove potencijalne varijacije, čime bi se upotpunili dobiveni rezultati i dodatno potkrijepili naši zaključci. Unatoč tome, sagledavajući sve dobivene rezultate ekspresijskih učinaka mutacija W112\* i Y143C, možemo zaključiti da besmislena mutacija W112\* ima presudan utjecaj na jačinu fenotipa bolesti kod prvog pacijenta. Naše istraživanje pokazalo je da mutacija W112\* narušava ukupnu ekspresiju gena *SAHH* zbog efikasnog stanično uklanjanja defektnih transkripata mehanizmom NMD, što u konačnici rezultira značajnim nedostatkom proteina u eukariotskim stanicama. U kontekstu bioloških sustava, za očekivati je da potpuni nedostatak esencijalnog proteina kao što je SAHH ima puno teže posljedice na ključne stanične procese i normalnu funkciju stanice, za razliku od mutacija koje rezultiraju smanjenom, ali djelomično očuvanom funkcijom. Ovaj biološki koncept objašnjava kako dokazani potpuno inaktivacijski učinak mutacije W112\* (engl. *complete loss-of-function mutation*) dovodi do tako značajne neravnoteže metioninskih metabolita SAM i SAH već u ranoj životnoj dobi pacijenta te posljedično, teškog fenotipa nedostatne aktivnosti SAHH-a.

Sagledavajući rezultate našeg istraživanja u pogledu novih terapija koje bi mogle kompenzirati utvrđeni ekspresijski učinak mutacije W112\*, u budućnosti je potrebno razmotriti strategiju promicanja iščitavanja preuranjenih stop-kodona (engl. *PTC readthrough*) [173]. Ovaj inovativni pristup temelji se na spojevima koji potiču zaobilazanje terminacije translacije uzrokovane PTC-om i imaju potencijal povratiti ekspresiju proteina u stanicama te

ublažiti kliničku prezentaciju bolesti. Određeni spojevi, kao što su aminoglikozidni antibiotici i njihovi derivati, već su pokazali sposobnost povećanja proizvodnje funkcionalnih proteina kod poremećaja uzrokovanih besmislenim mutacijama, kao što su rak dojke [174], cistična fibroza [175] i retinis pigmentosa [176]. Osim aminoglikozida, mala molekula pod nazivom ataluren ističe se po svojoj izuzetnoj sposobnosti indukcije ribosomalnog iščitavanja PTC-ova [177]. Nedavna klinička studija utvrdila je učinkovitost ovog spoja u ublažavanju fenotipa Duchennove mišićne distrofije uzrokovane besmislenim mutacijama [178], čime je ataluren postao prvi lijek ove vrste odobren za kliničku upotrebu. Iako su dodatna ispitivanja učinkovitosti ovih spojeva u kontekstu razmatranog slučaja nedostatne aktivnosti SAHH-a neophodna, spoznaje proizašle našim istraživanjem doprinose temeljnom razumijevanju mehanizma mutacije W112\* i budućem napretku personalizirane skrbi za ovu skupinu pacijenata.

Za razliku od besmislene mutacije, čiji smo funkcionalni učinak detektirali direktno iz transkriptomskih profila stanica pacijenta, posljedice pogrešne mutacije Y328D detaljnije smo proučili indirektno, analizom diferencijalno eksprimiranih gena. Pretpostavili smo da varijacije u genskoj aktivnosti između stanica koje eksprimiraju mutirani i divlji tip proteina mogu dati uvid u mehanizme adaptacije stanice na ekspresiju mutanta SAHH-Y328D te time pridonijeti identifikaciji specifičnih gena i mehanizama odgovornih za nedostatak ovog proteina. Međutim, diferencijalni ekspresijski profil primarnih stanica pacijenta, koji uključuje čak 1355 gena, predstavljao je složen skup podataka posebno izazovan za interpretaciju u kontekstu naših specifičnih ciljeva. Naime, utvrđivanje kauzalnosti promjena aktivnosti velikog broja gena posebno je otežano kod ovog oboljenja jer je prethodnim istraživanjima pokazano da sam nedostatak aktivnosti SAHH-a dovodi do promjena u metilaciji staničnog genoma kod pacijenata [153]. Stoga, kako bi eliminirali nespecifične promjene u genskoj aktivnosti zbog općeg poremećaja metilacijskog ciklusa u primarnim stanicama, analizirali smo transkriptome staničnih modela HepG2. Stanice hepatocelularnog karcinoma odabrane su kao najrelevantniji modelni sustav, s obzirom na to da su poremećaji jetre jedna od glavnih odrednica nedostatne aktivnosti SAHH-a, posebice u slučaju pacijenta sa istraživanom mutacijom Y328D. Za razliku od fibroblasta, stanični modeli karakterizirani su uniformnom genskom osnovom, s iznimkom ekspresije različitih rekombinantnih gena *SAHH* (WT i Y328D). Ovo obilježje omogućilo nam je postavljanje naglaska transkriptomске analize na identifikaciji gena koji su odgovorni za nedostatak ekspresije proteina s mutacijom Y328D. Analiza je rezultirala s ukupno 48 diferencijalno eksprimiranih gena koji kodiraju za proteine (Tablica 11.), koji očekivano većinom sudjeluju u procesima genske ekspresije, njene



regulacije te procesuiranja i sinteze staničnih makromolekula (Slika 30.). Pregledom njihovih bioloških uloga, otkrili smo prekomjernu ekspresiju gena *TRIM33* ( $\log_2FC=1,23$ , pad  $j < 0,05$ ), čiji se proteinski produkt ubraja u skupinu E3-ubikvitinskih ligaza. Ova obitelj enzima je ključna komponenta reakcijske kaskade koja obilježava stanične proteine ubikvitinom, usmjeravajući ih za degradaciju putem UPS-a [127]. Anotacijom ljudskih gena koji sadrže karakteristične sljedove katalitičkih domena ligaza E3, Li i suradnici identificirali su preko 600 različitih gena koji kodiraju za ovu vrstu proteina [133]. Budući da direktno interagiraju sa supstratima, iznimna raznolikost ovih enzima naglašava njihovu centralnu ulogu u određivanju specifičnosti cjelokupnog UPS-a, osiguravajući stanici fleksibilan i dinamični sustav regulacije širokog spektra proteina. Važno je napomenuti da je u nekoliko prijašnjih studija protein TRIM33 (poznat i kao TIF1 $\gamma$  i Ectodermis) identificiran kao regulator različitih staničnih proteina. Dupont i suradnici pokazali su da prekomjerna ekspresija TRIM33 smanjuje endogene razine proteina Smad4 u stanicama 293T, a ovaj efekt moguće je povratiti tretmanom stanica s MG-132, inhibitorom proteasoma 26S [179]. Xue i suradnici sličnim su pristupom pokazali da TRIM33 utječe na razine  $\beta$ -katenina u stanicama U87 i SW480, a eksperimentima inhibicije proteasoma utvrdili su da je i ova regulacija posredovana UPS-om [180]. Još jedna nedavna studija ustanovila je da TRIM33 potiče ubikvitinaciju i degradaciju transkripcijskog faktora E2f4 [181], proširujući spektar njegovih poznatih interakcijskih partnera i regulatornih supstrata. U okviru rezultata našeg istraživanja, prekomjerna ekspresija *TRIM33* u staničnim modelima HepG2 sugerira da bi mutant SAHH-Y328D mogao biti novootkrivena regulatorna meta ove E3-ubikvitinske ligaze. Dobiveni rezultati otvaraju put za buduće funkcionalne studije pomoću kojih bi se potvrdila pretpostavljena regulatorna uloga proteina TRIM33, uključujući i analize proteinskih interakcija metodom koimunoprecipitacije (Co-IP) ili afinitetnim povlačenjem proteinskih kompleksa (engl. *protein pull-down assay*). Ovim analizama ne samo da bi se ispitala direktna interakcija između ova dva proteina, već bi se mogli detektirati i drugi interakcijski partneri specifični za mutanta SAHH-Y328D. Buduće proučavanje interakcija protein-protein od interesa je za detaljnije razumijevanje staničnog prepoznavanja ovog mutanta, čime bi se proširile mogućnosti za preciznu modulaciju njegove ekspresije u terapijske svrhe.

Detekcijom prekomjerne ekspresije E3-ubikvitinske ligaze TRIM33, pretpostavili smo da se u pozadini nedostataka proteina SAHH-Y328D nalazi njegova pojačana degradacija UPS-om. Kako je ranije navedeno, pogrešne mutacije nerijetko dovode do destabilizacije i nepravilnog smatanja proteina, a njihovo ciljano uklanjanje predstavlja ključni obrambeni

mehanizam stanice protiv štetnih posljedica defektnih proteina. Iako UPS ima primarno zaštitnu ulogu u održavanju stanične homeostaze, u kontekstu genetskih poremećaja može predstavljati temeljni mehanizam bolesti. Ward i suradnici pokazali su da mutacija  $\Delta F508$ , koja je odgovorna za više od 70 % slučajeva cistične fibroze, remeti pravilno smatanje proteina CFTR, što rezultira njegovom brzom degradacijom UPS-om [182], iako sama mutacija ne narušava fiziološku aktivnost proteina [183]. Ovakav učinak pokazan je i za protein CFTR s pogrešnom mutacijom N1303K, koja se također povezuje s teškim fenotipom cistične fibroze [184]. Nadalje, rijetki poremećaji metabolizma fenilalanina (fenilketonurija) i tirozina (tirozinemija tipa 1) uzrokovani su mutacijama u genima *PAH* odnosno *FAH*, a određene pogrešne mutacije također dovode do proteasomske degradacije proteina fenilalanin hidrosilaze (PAH) [185] i fumarilacetoacetat hidrolaze (FAH) [185]. U okviru našeg istraživanja, po prvi puta smo pokazali da i kod nedostatne aktivnosti SAHH-a, jedna pogrešna mutacija (Y328D) značajno narušava samu proizvodnju proteina. Naime, povećanje razina proteina SAHH-Y328D nakon selektivne inhibicije proteasoma 26S u našim staničnim modelima (Slika 33.), podupire hipotezu o posttranslacijskoj degradaciji ovog mutanta UPS-om. Uz to, konfokalnom mikroskopijom ustanovili smo tendenciju njegovog unutarstaničnog nakupljanja pri povišenim koncentracijama (Slika 35.), sugerirajući značajne strukturne anomalije izazvane supstitucijom 328. tirozina u aspartat. Ove rezultate dodatno smo potkrijepili analizom energijskih i strukturnih promjena izazvanih navedenom aminokiselinskom izmjenom *in silico* (Tablica 12.), otkrivajući značajan nedostatak privlačnih interakcija unutar hidrofobnog centra proteina (Slika 36.). Zbog kritične uloge hidrofobnih jezgara u pravilnom smatanju i održavanju nativnih struktura proteina, rezultati našeg istraživanja impliciraju nepremostive strukturne anomalije uzrokovane mutacijom Y328D. Ova oštećenja značajno destabiliziraju protein i potencijalno kompromitiraju njegovo pravilno smatanje, što rezultira njegovim proteasomskim uklanjanjem kako bi se izbjeglo formiranje unutarstaničnih proteinskih agregata te očuvala stanična homeostaza. Posljedično dolazi do gotovo potpunog nedostatka ekspresije ovog esencijalnog enzima u eukariotskim stanicama, što doprinosi patogenezi nedostatne aktivnosti SAHH-a. Dokazani ekspresijski utjecaj mutacije Y328D stoga pruža objašnjenje drastične neravnoteže metioninskih metabolita SAM i SAH zabilježene kod pacijenta s ovom mutacijom te razjašnjava molekularnu pozadinu teškog fenotipa bolesti kod ovog slučaja oboljenja.

Na temelju razjašnjenih mehanizama u pozadini specifičnog učinka pogrešne mutacije Y328D, buduća istraživanja mogla bi se usmjeriti na strategije povećanja stabilnosti

mutiranog proteina. U tom kontekstu, potrebno je istražiti primjenu molekularnih šaperona, specijaliziranih proteina koji pomažu u procesu smatanja i stabilizaciji drugih staničnih proteina. Farmakološka indukcija ekspresije endogenih šaperona, kao što su proteini toplinskog šoka (HSP, od engl. *heat-shock proteins*), već se pokazala se kao uspješan pristup u stabilizaciji mutiranih proteina povezanih s bolestima kao što su spinocerebralna ataksia [186] i fenilketonurija [187]. Osim toga, primjena malih molekula, takozvanih farmakoloških šaperona, koji specifično vežu i stabiliziraju proteine, danas je jedna od glavnih strategija liječenja bolesti uzrokovanih pogrešnim mutacijama koje destabiliziraju proteine [89]. Pronalazak učinkovitog načina povećanja stabilnosti proteina SAHH, u kombinaciji s preciznom modulacijom proteasomske aktivnosti, predstavljalo bi nove personalizirane strategije liječenja nedostatne aktivnosti SAHH-a uzrokovane mutacijom Y328D, ali i ostalih mutacija za koje se budućim studijama pokaže da značajno utječu na stabilnost i ekspresiju ovog proteina. U konačnici, integrirajući rezultate ovog i predloženih budućih istraživanja, otvara se mogućnost poboljšanja kvalitete života pacijenata koji boluju od ove rijetke bolesti te trenutno imaju ograničene opcije liječenja.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U fibroblastima prvog (W112\*/Y143C) i osmog (Y328D/Y143C) pacijenta smanjene su razine proteina SAHH, dok su kod prvog pacijenta smanjene i razine mRNA gena *SAHH*.
2. Rekombinante proteine SAHH s mutacijama W112\*, Y143C, Y328D moguće je sintetizirati *in vitro* bez razlika u prinosu između mutanata uporabom izvanstaničnog ekspresijskog sustava koji se temelji na uporabi lizata humanih stanica.
3. Stanični modeli ljudskih stanica Hek293, HepG2 i SW480 koji stabilno eksprimiraju rekombinantne proteine SAHH s mutacijama W112\*, Y143C, Y328D i divljeg tipa (WT) uspješno su pripremljeni lentivirusnom transdukcijom transgena.
4. Mutacije W112\* i Y328D uzrokuju smanjenu ekspresiju rekombinantnog proteina SAHH u svim pripremljenim staničnim modelima, dok mutacija Y143C ne uzrokuje promjene u ekspresiji proteina u odnosu na divlji tip.
5. Mutacija W112\* dovodi do smanjenja, ali ne i potpunog nedostatka ekspresije rekombinantnog gena *SAHH*, dok mutacije Y328D i Y143C ne uzrokuju promjene u razinama mRNA.
6. U fibroblastima prvog pacijenta (W112\*/Y143C) postoji neuravnotežena ekspresija alela *SAHH* zbog nedostatka transkripata s besmislenom mutacijom W112\*, sugerirajući njihovu degradaciju NMD-om.
7. U staničnim modelima HepG2 koji stabilno eksprimiraju protein SAHH-Y328D identificirano je 48 gena s promijenjenom ekspresijom u odnosu na stanice koje eksprimiraju divlji tip rekombinantnog proteina SAHH.
8. Diferencijalno eksprimirani geni u staničnim modelu HepG2 većinom sudjeluju u procesima genske ekspresije, regulaciji genske ekspresije i u biosintezi staničnih makromolekula, a E3-ubikvitinska ligaza TRIM33 potencijalni je regulator ekspresije proteina SAHH-Y328D.
9. Inhibicija proteasomske aktivnosti u staničnim modelima uzrokuje povećanje razina proteina SAHH-Y328D i njegovo unutarstanično nakupljanje.
10. Računalna predviđanja karakteriziraju mutaciju Y328D kao izrazito destabilizirajuću zbog gubitka mnogih privlačnih (nepolarnih) interakcija unutar hidrofobnog centra proteina SAHH uslijed izmjene 328. tirozina u aspartat.

## 7. LITERATURA

- [1] Suh, E., Choi, S.W., Friso, S., in: *Molecular Basis of Nutrition and Aging: A Volume in the Molecular Nutrition Series*, Elsevier Inc., **2016**, pp. 513–522.
- [2] Xu, J., Sinclair, K.D., One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. *Reprod Fertil Dev* **2015**, 27, 667–676.
- [3] Clare, C.E., Brassington, A.H., Kwong, W.Y., Sinclair, K.D., One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2019**, 7, 263–287.
- [4] Mason, J.B., Biomarkers of Nutrient Exposure and Status in One-Carbon (Methyl) Metabolism. *J Nutr* **2003**, 133, 941S-947S.
- [5] Cantoni, G.L., Biological Methylation: Selected Aspects. *Annu Rev Biochem* **1975**, 44, 435–451.
- [6] Parkhitko, A.A., Jouandin, P., Mohr, S.E., Perrimon, N., Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell* **2019**, 18.
- [7] Clarke Steven, B.K., in: Carmel Ralph JDW (Ed.), *Homocysteine in Health and Disease*, **2001**.
- [8] Zhang, J., Zheng, Y.G., SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases. *ACS Chem Biol* **2016**, 11, 583–597.
- [9] Turner, M.A., Yuan, C.S., Borchardt, R.T., Hershfield, M.S., et al., Structure determination of selenomethionyl S-adenosylhomocysteine hydrolase using data at a single wavelength. *Nat Struct Mol Biol* **1998**, 5, 369–76.
- [10] Ducker, G.S., Rabinowitz, J.D., One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* **2017**, 25, 27–42.
- [11] Froese, D.S., Fowler, B., Baumgartner, M.R., Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis* **2019**, 42, 673–685.
- [12] Li, F., Feng, Q., Lee, C., Wang, S., et al., Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: Common gene sequence variation and functional characterization. *Mol Genet Metab* **2008**, 94, 326–335.
- [13] Selhub, J., Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* **1999**, 19, 217–246.
- [14] Richon, V.M., Johnston, D., Sneeringer, C.J., Jin, L., et al., Chemogenetic Analysis of Human Protein Methyltransferases. *Chem Biol Drug Des* **2011**, 78, 199–210.

- [15] Petrossian, T.C., Clarke, S.G., Uncovering the human methyltransferasome. *Molecular and Cellular Proteomics* **2011**, 10.
- [16] Strauss, K.A., Ferreira, C., Bottiglieri, T., Zhao, X., et al., Liver transplantation for treatment of severe S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* **2015**, 116, 44–52.
- [17] de la Haba, G., Cantoni, G.L., The Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-l-homocysteine from Adenosine and Homocysteine. *Journal of Biological Chemistry* **1959**, 234, 603–608.
- [18] Palmer, J.L., Abeles, R.H., The Mechanism of Action of S-adenosylhomocysteinase. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, 254, 1217–1226.
- [19] Yamada, T., Takata, Y., Komoto, J., Gomi, T., et al., Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase: Roles of His 54, Asp130, Glu155, Lys185, and Asp189. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**, 37, 2417–2435.
- [20] Kusakabe, Y., Ishihara, M., Umeda, T., Kuroda, D., et al., Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Sci Rep* **2015**, 5.
- [21] Tehlivets, O., Malanovic, N., Visram, M., Pavkov-Keller, T., Keller, W., S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: Yeast as a model system. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2013**, 1832, 204–215.
- [22] Stępkowski, T., Brzeziński, K., Legocki, A.B., Jaskólski, M., Béna, G., Bayesian phylogenetic analysis reveals two-domain topology of S-adenosylhomocysteine hydrolase protein sequences. *Mol Phylogenet Evol* **2005**, 34, 15–28.
- [23] Parveen, N., Cornell, K.A., Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol Microbiol* **2011**, 79, 7–20.
- [24] Vizán, P., Di Croce, L., Aranda, S., Functional and Pathological Roles of AHCY. *Front Cell Dev Biol* **2021**, 9.
- [25] Lee, S., Doxey, A.C., McConkey, B.J., Moffatt, B.A., Nuclear Targeting of Methyl-Recycling Enzymes in Arabidopsis thaliana Is Mediated by Specific Protein Interactions. *Mol Plant* **2012**, 5, 231–248.
- [26] Mushegian, A.R., Garey, J.R., Martin, J., Liu, L.X., Large-Scale Taxonomic Profiling of Eukaryotic Model Organisms: A Comparison of Orthologous Proteins Encoded by the Human, Fly, Nematode, and Yeast Genomes. *Genome Res* **1998**, 590–598.
- [27] Hu, Y., Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., et al., Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* **1999**, 38, 8323–8333.

- [28] Brzezinski, K., S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: A structural perspective on the enzyme with two rossmann-fold domains. *Biomolecules* **2020**, 10, 1–14.
- [29] Ault-Riché, D.B., Yuan, C.S., Borchardt, R.T., A single mutation at lysine 426 of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase inactivates the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 31472–31478.
- [30] Turner, M. a, Yang, X., Yin, D., Kuczera, K., et al., Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* **2000**, 33, 101–125.
- [31] Hanukoglu, I., Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2015**, 43, 206–209.
- [32] Yang, X., Hu, Y., Yin, D.H., Turner, M.A., et al., Catalytic strategy of S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase: Transition-state stabilization and the avoidance of abortive reactions. *Biochemistry* **2003**, 42, 1900–1909.
- [33] Miller, M.W., Duhl, D.M.J., Winkes, B.M., Arredondo-Vega1, F., et al., The mouse lethal nonagouti (ax) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcy) gene. *EMBO J* **1994**, 1, 1806–1816.
- [34] Dickinson, M.E., Flenniken, A.M., Ji, X., Teboul, L., et al., High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* **2016**, 537, 508–514.
- [35] Furner, I.J., Sheikh, M.A., Collett, C.E., Gene Silencing and Homology-Dependent Gene Silencing in Arabidopsis: Genetic Modifiers and DNA Methylation. *Genetics* **1998**, 149, 651–662.
- [36] Yee, N.S., Lorent, K., Pack, M., Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol* **2005**, 284, 84–101.
- [37] Li, X., Huang, L., Hong, Y., Zhang, Y., et al., Co-silencing of tomato S-adenosylhomocysteine hydrolase genes confers increased immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 and enhanced tolerance to drought stress. *Front Plant Sci* **2015**, 6.
- [38] Fulneček, J., Matyášek, R., Votruba, I., Holý, A., et al., Inhibition of SAH-hydrolase activity during seed germination leads to deregulation of flowering genes and altered flower morphology in tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* **2011**, 285, 225–236.
- [39] Rocha, P.S.C.F., Sheikh, M., Melchiorre, R., Fagard, M., et al., The arabidopsis HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell* **2005**, 17, 404–417.

- [40] Aranda, S., Alcaine-Colet, A., Blanco, E., Borràs, E., et al., Chromatin capture links the metabolic enzyme AHCY to stem cell proliferation. *Sci. Adv* **2019**, 5.
- [41] Zhu, Q., Cheng, X., Cheng, Y., Chen, J., et al., O-GlcNAcylation regulates the methionine cycle to promote pluripotency of stem cells. *PNAS* **2020**, 117, 7755–7763.
- [42] Katz, J.E., Dlakić, M., Clarke, S., Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* **2003**, 2, 525–540.
- [43] Abdelraheem, E., Thair, B., Varela, R.F., Jockmann, E., et al., Methyltransferases: Functions and Applications. *ChemBioChem* **2022**, 23.
- [44] Ponnaluri, V.K.C., Estève, P.O., Ruse, C.I., Pradhan, S., S-adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance. *J Mol Biol* **2018**, 430, 2051–2065.
- [45] Deng, J., Mueller, M., Geng, T., Shen, Y., et al., H19 lncRNA alters methylation and expression of hnf4 $\alpha$  in the liver of metformin-exposed fetuses. *Cell Death Dis* **2017**, 8.
- [46] Zhou, J., Yang, L., Zhong, T., Mueller, M., et al., H19 lncRNA alters DNA methylation genome wide by regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Nat Commun* **2015**, 6.
- [47] Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., et al., H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, 110, 20693–20698.
- [48] Dey, B.K., Pfeifer, K., Dutta, A., The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev* **2014**, 28, 491–501.
- [49] Fernandez-Sanchez, M.E., Gonatopoulos-Pournatzis, T., Preston, G., Lawlor, M.A., Cowling, V.H., S -Adenosyl Homocysteine Hydrolase Is Required for Myc-Induced mRNA Cap Methylation, Protein Synthesis, and Cell Proliferation . *Mol Cell Biol* **2009**, 29, 6182–6191.
- [50] Radomski, N., Barreto, G., Kaufmann, C., Yokoska, ichi, et al., Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus laevis* with mRNA(guanine-7-) methyltransferase: implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. *Biochimica et Biophysica Acta* **2022**, 1590, 93–102.
- [51] Ramanathan, A., Robb, G.B., Chan, S.H., mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* **2016**, 44, 7511–7526.



- [52] De Fazio, G., Alba, A.P.C., Vicente, M., De Clercq, E., Antiviral activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against plant viruses. *Antiviral Res* **1990**, 13, 219–226.
- [53] Yoon, J.S., Kim, G., Jarhad, D.B., Kim, H.R., et al., Design, Synthesis, and Anti-RNA Virus Activity of 6'-Fluorinated-Aristeromycin Analogues. *J Med Chem* **2019**, 62, 6346–6362.
- [54] Backlund, P.S., Carotti, D., Cantoni, G.L., Effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on RNA methylation and synthesis. *Eur J Biochem* **1986**, 160, 245–251.
- [55] Shin, Y.S., Jarhad, D.B., Jang, M.H., Kovacicova, K., et al., Identification of 6'- $\beta$ -fluoro-homoaristeromycin as a potent inhibitor of chikungunya virus replication. *Eur J Med Chem* **2020**, 187.
- [56] de Clercq, E., John Montgomery's Legacy: Carbocyclic adenosine analogues as SAH hydrolase inhibitors with broad-spectrum antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, 24, 1395–1415.
- [57] Leyssen, P., de Clercq, E., Neyts, J., Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res* **2008**, 78, 9–25.
- [58] Greer, E.L., Shi, Y., Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **2012**, 13, 343–357.
- [59] Husmann, D., Gozani, O., Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol* **2019**, 26, 880–889.
- [60] Magdalen Greco, C., Cervantes, M., Fustin, J.-M., Ito, K., et al., S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase links methionine metabolism to the circadian clock and chromatin remodeling. *Sci. Adv* **2020**, 6, 5629–5645.
- [61] Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., et al., Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **2004**, 6, 73–77.
- [62] Jaenisch, R., Bird, A., Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **2003**, 33, 245–254.
- [63] Costa, P.M. da S., Sales, S.L.A., Pinheiro, D.P., Pontes, L.Q., et al., Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. *Front Cell Dev Biol* **2023**, 11.
- [64] Leal, J.F., Ferrer, I., Blanco-Aparicio, C., Hernández-Losa, J., et al., S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis* **2008**, 29, 2089–2095.

- [65] Park, S.J., Kong, H.K., Kim, Y.S., Lee, Y.S., Park, J.H., Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase decreases cell mobility and cell proliferation through cell cycle arrest. *American Journal of Cancer Resilience* **2015**, 5, 2127–2138.
- [66] Kim, J.H., Kim, J.H., Kim, S.C., Yi, Y.S., et al., Adenosine dialdehyde suppresses MMP-9-mediated invasion of cancer cells by blocking the Ras/Raf-1/ERK/AP-1 signaling pathway. *Biochem Pharmacol* **2013**, 86, 1285–1300.
- [67] Westermann, F., Muth, D., Benner, A., Bauer, T., et al., Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biol* **2008**, 9.
- [68] Chayka, O., D'Acunto, C.W., Middleton, O., Arab, M., Sala, A., Identification and pharmacological inactivation of the MYCN gene network as a therapeutic strategy for neuroblastic tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290, 2198–2212.
- [69] Wang, Z., Yip, L.Y., Lee, J.H.J., Wu, Z., et al., Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nat Med* **2019**, 25, 825–837.
- [70] European Union. Regulation (EC) N°141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. 2000. **1999**.
- [71] Nguengang Wakap, S., Lambert, D.M., Olry, A., Rodwell, C., et al., Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics* **2020**, 28, 165–173.
- [72] <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> n.d.
- [73] Belužić, R., Vugrek, O., S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: A Natural Model System for Methylation Research. *Medical Sciences* **2010**, 35, 77–92.
- [74] Baric, I., Fumic, K., Glenn, B., Cuk, M., et al., S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 4234–9.
- [75] Bas, H., Cilingir, O., Tekin, N., Saylisoy, S., et al., A Turkish patient with novel AHCY variants and presumed diagnosis of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Am J Med Genet A* **2020**, 182, 740–745.
- [76] Huang, Y., Chang, R., Abdenur, J.E., The biochemical profile and dietary management in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab Rep* **2022**, 32.
- [77] Stender, S., Chakrabarti, R.S., Xing, C., Gotway, G., et al., Adult-onset liver disease and hepatocellular carcinoma in S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency. *Mol Genet Metab* **2015**, 116, 269–274.

- [78] Barić, I., Ćuk, M., Fumić, K., Vugrek, O., et al., S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis* **2005**, 28, 885–902.
- [79] Buist, N.R.M., Glenn, B., Vugrek, O., Wagner, C., et al., S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a 26-year-old man. *J Inherit Metab Dis* **2006**, 29, 538–545.
- [80] Ćuk, M., Lovrić, M., Fumić, K., The fourth S-adenosylhomocysteine hydrolase deficient patient: Further evidence of congenital myopathy. *Clin Chem Lab Med* **2007**, 45, A43.
- [81] Vugrek, O., Belužić, R., Nakić, N., S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency: Two novel mutations with lethal outcome. *Hum Mutat* **2009**, 30.
- [82] Grubbs, R., Vugrek, O., Deisch, J., Wagner, C., et al., S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: Two siblings with fetal hydrops and fatal outcomes. *J Inherit Metab Dis* **2010**, 33, 705–713.
- [83] Honzík, T., Magner, M., Krijt, J., Sokolová, J., et al., Clinical picture of S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency resembles phosphomannomutase 2 deficiency. *Mol Genet Metab* **2012**, 107, 611–613.
- [84] Vivante, A., Ityel, H., Pode-Shakked, B., Chen, J., et al., Exome sequencing in Jewish and Arab patients with rhabdomyolysis reveals single-gene etiology in 43% of cases. *Pediatric Nephrology* **2017**, 32, 2273–2282.
- [85] Judkins, A.J., Macqueen, B.C., Christensen, R.D., Comstock, J., et al., Non-Immune Hydrops, Hypotonia, Encephalopathy, and Liver Failure with Novel Compound Heterozygous AHCY Mutations. *Neonatology* **2018**, 114, 337–340.
- [86] Barić, I., Stauffer, C., Augoustides-Savvopoulou, P., Chien, Y.H., et al., Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis* **2017**, 40, 5–20.
- [87] Han, Q., Fu, H., Chu, X., Wen, R., et al., Research advances in treatment methods and drug development for rare diseases. *Front Pharmacol* **2022**, 13.
- [88] Wagner, R.N., Wießner, M., Friedrich, A., Zandanell, J., et al., Emerging Personalized Opportunities for Enhancing Translational Readthrough in Rare Genetic Diseases and Beyond. *Int J Mol Sci* **2023**, 24.
- [89] Liguori, L., Monticelli, M., Allocca, M., Mele, B.H., et al., Pharmacological chaperones: A therapeutic approach for diseases caused by destabilizing missense mutations. *Int J Mol Sci* **2020**, 21.
- [90] Trost, B., Loureiro, L.O., Scherer, S.W., Discovery of genomic variation across a generation. *Hum Mol Genet* **2021**, 30, R174–R186.

- [91] Hap Map Consortium, The International HapMap Project, The International HapMap Consortium\*. *Nature* **2003**, 426, 789–796.
- [92] Zhang, Z., Miteva, M.A., Wang, L., Alexov, E., Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med* **2012**, 2012.
- [93] Sherry, S.T., Ward, M.-H., Kholodov, M., Baker, J., et al., dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* **2001**, 29, 308–311.
- [94] <https://gnomad.broadinstitute.org> n.d.
- [95] Gudmundsson, S., Singer-Berk, M., Watts, N.A., Phu, W., et al., Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Hum Mutat* **2022**, 43, 1012–1030.
- [96] Goswami, C., Chattopadhyay, A., Chuang, E.Y., Rare variants: data types and analysis strategies. *Ann Transl Med* **2021**, 9, 961–961.
- [97] Momozawa, Y., Mizukami, K., Unique roles of rare variants in the genetics of complex diseases in humans. *J Hum Genet* **2021**, 66, 11–23.
- [98] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> n.d.
- [99] Alberts, B., J.A., L.J., Johnson, A., Lewis, J., *Molecular Biology of the Cell. Analyzing Protein Structure and Function.*, Garland Science, New York **2002**.
- [100] Belužić, R., Cuk, M., Pavkov, T., Fumić, K., et al., A single mutation at Tyr143 of human S-adenosylhomocysteine hydrolase renders the enzyme thermosensitive and affects the oxidation state of bound cofactor nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem J* **2006**, 400, 245–53.
- [101] Belužić, R., Čuk, M., Pavkov, T., Barić, I., Vugrek, O., S-Adenosylhomocysteine hydrolase (AdoHcyase) deficiency: Enzymatic capabilities of human AdoHcyase are highly effected by changes to codon 89 and its surrounding residues. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, 368, 30–36.
- [102] Belužić, L., Grbeša, I., Belužić, R., Park, J.H., et al., Knock-down of AHCY and depletion of adenosine induces DNA damage and cell cycle arrest. *Sci Rep* **2018**, 8.
- [103] Grbeša, I., Kalo, A., Belužić, R., Kovačević, L., et al., Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein. *Eur J Cell Biol* **2017**, 96, 579–590.
- [104] Belužić L., Nedostatak S-Adenoziilhomocistein Hidrolaze: Molekularni Mehanizmi Novog Oboljenja. University of Rijeka, **2017**.
- [105] Martins-Dias, P., Romão, L., Nonsense suppression therapies in human genetic diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2021**, 78, 4677–4701.

- [106] Lykke-Andersen, S., Jensen, T.H., Nonsense-mediated mRNA decay: An intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, 16, 665–677.
- [107] Buccitelli, C., Selbach, M., mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* **2020**, 21, 630–644.
- [108] Fasken, M.B., Corbett, A.H., Process or perish: Quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, 12, 482–488.
- [109] Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., Frydman, J., Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, 3, 1–14.
- [110] Garneau, N.L., Wilusz, J., Wilusz, C.J., The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, 8, 113–126.
- [111] Shoemaker, C.J., Green, R., Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* **2012**, 19, 594–601.
- [112] Pulak, R., Anderson, P., mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* stag genes. *Genes and Development* **1993**, 7, 1885–1897.
- [113] Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Saulière, J., et al., mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **2007**, 581, 2845–2853.
- [114] Schoenberg, D.R., Maquat, L.E., Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **2012**, 13, 246–259.
- [115] Lejeune, F., Nonsense-Mediated mRNA Decay, a Finely Regulated Mechanism. *Biomedicines* **2022**, 10.
- [116] Popp, M.W., Maquat, L.E., Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell* **2016**, 165, 1319–1322.
- [117] Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., Mühlemann, O., Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol* **2008**, 6, 849–859.
- [118] Singh, G., Rebbapragada, I., Lykke-Andersen, J., A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* **2008**, 6, 860–871.
- [119] van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., Parker, R., Exosome-Mediated Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon. *Science (1979)* **2002**, 295, 2262–2264.

- [120] Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A.L., et al., An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science (1979)* **2002**, 295, 2258–2261.
- [121] Karamyshev, A.L., Karamysheva, Z.N., Lost in translation: Ribosome-associated mRNA and protein quality controls. *Front Genet* **2018**, 9.
- [122] Doma, M.K., Parker, R., Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **2006**, 440, 561–564.
- [123] Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T. V., Pisarev, A. V., Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO Journal* **2011**, 30, 1804–1817.
- [124] Passos, D.O., Doma, M.K., Shoemaker, C.J., Muhlrads, D., et al., Analysis of Dom34 and Its Function in No-Go Decay. *Mol Biol Cell* **2009**, 20, 3025–3032.
- [125] Simms, C.L., Yan, L.L., Zaher, H.S., Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Mol Cell* **2017**, 68, 361-373.e5.
- [126] Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U., Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *Journal of Cell Biology* **2018**, 217, 51–63.
- [127] Yang, Q., Zhao, J., Chen, D., Wang, Y., E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Molecular Biomedicine* **2021**, 2.
- [128] Pohl, C., Dikic, I., Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science (1979)* **2019**, 366, 818–822.
- [129] Schwartz, A.L., Ciechanover, A., Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: Implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2009**, 49, 73–96.
- [130] Hershko, A., Ciechanover, A., The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem* **1998**, 67, 425–79.
- [131] Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annu Rev Biochem* **1999**, 68, 1015–1068.
- [132] Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L., Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **1996**, 65, 801–847.
- [133] Li, W., Bengtson H., M., Ulbrich, A., Matsuda, A., et al., Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLoS One* **2008**, 3, 1–14.
- [134] Swatek, K.N., Komander, D., Ubiquitin modifications. *Cell Res* **2016**, 26, 399–422.

- [135] Damgaard, R.B., The ubiquitin system: from cell signaling to disease biology and new therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* **2021**, 28, 423–426.
- [136] Magori, S., Citovsky, V., Hijacking of the host SCF ubiquitin ligase machinery by plant pathogens. *Front Plant Sci* **2011**, 2.
- [137] Dikic, I., Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86, 193–224.
- [138] Trivedi, P.C., Bartlett, J.J., Pulinilkunnil, T., Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* **2020**, 9.
- [139] Levine, B., Kroemer, G., Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **2019**, 176, 11–42.
- [140] Kundu, M., Thompson, C.B., Autophagy: Basic principles and relevance to disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2008**, 3, 427–455.
- [141] Santana-Codina, N., Mancias, J.D., Kimmelman, A.C., The role of autophagy in cancer. *Annu Rev Cancer Biol* **2017**, 1, 19–39.
- [142] <https://www.neb.com/en/products/next-generation-sequencing-library-preparation/library-preparation-for-illumina/rna-library-prep-for-illumina/rna-library-prep-for-illumina> n.d.
- [143] S. Andrews, FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online] **2010**.
- [144] Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L., Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* **2016**, 34, 525–527.
- [145] Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, 30, 923–930.
- [146] Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källér, M., MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **2016**, 32, 3047–3048.
- [147] Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P., Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **2013**, 14, 178–192.
- [148] Love, M.I., Huber, W., Anders, S., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, 15.
- [149] <https://geneontology.org><https://geneontology.org> n.d.
- [150] <https://david.ncifcrf.gov> n.d.

- [151] Castel, S.E., Levy-Moonshine, A., Mohammadi, P., Banks, E., Lappalainen, T., Tools and best practices for data processing in allelic expression analysis. *Genome Biol* **2015**, 16.
- [152] Gådín, J.R., van't Hooft, F.M., Eriksson, P., Folkersen, L., AllelicImbalance: An R/ bioconductor package for detecting, managing, and visualizing allele expression imbalance data from RNA sequencing. *BMC Bioinformatics* **2015**, 16.
- [153] Motzek, A., Knežević, J., Switzeny, O.J., Cooper, A., et al., Abnormal hypermethylation at imprinting control regions in patients with S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) deficiency. *PLoS One* **2016**, 11.
- [154] Rodrigues, C.H.M., Pires, D.E.V., Ascher, D.B., DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Science* **2021**, 30, 60–69.
- [155] Fermaglich, L.J., Miller, K.L., A comprehensive study of the rare diseases and conditions targeted by orphan drug designations and approvals over the forty years of the Orphan Drug Act. *Orphanet J Rare Dis* **2023**, 18.
- [156] Fumić, K., Belužić, R., Čuk, M., Pavkov, T., et al., Functional analysis of human S-adenosylhomocysteine hydrolase isoforms SAHH-2 and SAHH-3. *European Journal of Human Genetics* **2007**, 15, 347–351.
- [157] <http://cftr2.org> n.d.
- [158] Hamosh, A., Rosenstein, B.J., Cutting, G.R., CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* **1992**, 1, 542–544.
- [159] Valley, H.C., Bukis, K.M., Bell, A., Cheng, Y., et al., Isogenic cell models of cystic fibrosis-causing variants in natively expressing pulmonary epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis* **2019**, 18, 476–483.
- [160] Sanderlin, E.J., Keenan, M.M., Mense, M., Revenko, A.S., et al., CFTR mRNAs with nonsense codons are degraded by the SMG6-mediated endonucleolytic decay pathway. *Nat Commun* **2022**, 13, 2344.
- [161] Bladen, C.L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M.E., et al., The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* **2015**, 36, 395–402.
- [162] Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N., Chuzhanova, N.A., A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* **2008**, 29, 1037–1047.



- [163] Qin, J.Y., Zhang, L., Clift, K.L., Hular, I., et al., Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* **2010**, 5.
- [164] Sato, H., Singer, R.H., Cellular variability of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Commun* **2021**, 12.
- [165] Wang, Z., Moulton, J., SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat* **2001**, 17, 263–270.
- [166] Yue, P., Li, Z., Moulton, J., Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol* **2005**, 353, 459–473.
- [167] Grant, M.A., Lazo, N.D., Lomakin, A., Condron, M.M., et al., *Familial Alzheimer's disease mutations alter the stability of the amyloid-protein monomer folding nucleus*, vol. 104, **2007**.
- [168] Lin, W., Kang, U.J., Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *J Neurochem* **2008**, 106, 464–474.
- [169] Jetha, N.N., Semenchenko, V., Wishart, D.S., Cashman, N.R., Marziali, A., Nanopore Analysis of Wild-Type and Mutant Prion Protein (PrPC): Single Molecule Discrimination and PrPC Kinetics. *PLoS One* **2013**, 8.
- [170] Pavičić, I., Rokić, F., Vugrek, O., Effects of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Downregulation on Wnt Signaling Pathway in SW480 Cells. *Int J Mol Sci* **2023**, 24.
- [171] Montgomery, S.B., Lappalainen, T., Gutierrez-Arcelus, M., Dermitzakis, E.T., Rare and common regulatory variation in Population-Scale sequenced human genomes. *PLoS Genet* **2011**, 7.
- [172] Lappalainen, T., Sammeth, M., Friedländer, M.R., 'T Hoen, P.A.C., et al., Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature* **2013**, 501, 506–511.
- [173] Spelier, S., van Doorn, E.P.M., van der Ent, C.K., Beekman, J.M., Koppens, M.A.J., Readthrough compounds for nonsense mutations: bridging the translational gap. *Trends Mol Med* **2023**, 29, 297–314.
- [174] Abreu, R.B.V., Gomes, T.T., Nepomuceno, T.C., Li, X., et al., Functional Restoration of BRCA1 Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Induced Readthrough. *Front Pharmacol* **2022**, 13.
- [175] de Poel, E., Spelier, S., Suen, S.W.F., Kruisselbrink, E., et al., Functional Restoration of CFTR Nonsense Mutations in Intestinal Organoids. *Journal of Cystic Fibrosis* **2022**, 21, 246–253.

- [176] Beryozkin, A., Samanta, A., Gopalakrishnan, P., Khateb, S., et al., Translational Read-Through Drugs (TRIDs) Are Able to Restore Protein Expression and Ciliogenesis in Fibroblasts of Patients with Retinitis Pigmentosa Caused by a Premature Termination Codon in FAM161A. *Int J Mol Sci* **2022**, 23.
- [177] Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., et al., PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **2007**, 447, 87–91.
- [178] McDonald, C.M., Muntoni, F., Penematsa, V., Jiang, J., et al., Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *J Comp Eff Res* **2022**, 11, 139–155.
- [179] Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., et al., Germ-layer specification and control of cell growth by ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* **2005**, 121, 87–99.
- [180] Xue, J., Chen, Y., Wu, Y., Wang, Z., et al., Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear  $\beta$ -catenin degradation. *Nat Commun* **2015**, 6.
- [181] Rousseau, V., Einig, E., Jin, C., Horn, J., et al., Trim33 masks a non-transcriptional function of E2f4 in replication fork progression. *Nat Commun* **2023**, 14.
- [182] Ward, C.L., Omura, S., Kopito, R.R., Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **1995**, 83, 121–127.
- [183] Li, C., Ramjeeasingh, M., Reyes, E., Jensen, T., et al., The cystic fibrosis mutation ( $\Delta$ F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat Genet* **1993**, 3, 311–316.
- [184] Rapino, D., Sabirzhanova, I., Lopes-Pacheco, M., Grover, R., et al., Rescue of NBD2 mutants N1303K and S1235R of CFTR by small-molecule correctors and transcomplementation. *PLoS One* **2015**, 10.
- [185] Pecimonova, M., Kluckova, D., Csicsay, F., Reblova, K., et al., Structural and functional impact of seven missense variants of phenylalanine hydroxylase. *Genes (Basel)* **2019**, 10.
- [186] Cummings, C.J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., et al., Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* **2001**, 10, 1511–1518.
- [187] Leandro, J., Simonsen, N., Saraste, J., Leandro, P., Flatmark, T., Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2011**, 1812, 106–120.

## 8. POPIS KRATICA

ASE- alel specifična ekspresija (engl. *allele-specific expression*)

cDNA- komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. *complementary DNA*)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

EJC- proteinski kompleks na spojnici eksona (engl. *exon-junction complex*)

GO-genska ontologija

LNG- Laboratorij za naprednu genomiku

log<sub>2</sub>FC-logaritamska promjena ekspresije gena

mqH<sub>2</sub>O-ultra-čista voda, tip 1 voda (engl. *Milli-Q water*)

mRNA- glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

mRNAseq- sekvenciranje mRNA

NGS- sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

NMD- mehanizam degradacije besmislenih transkripata (engl. *nonsense mediated decay*)

PCR- lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PTC- preuranjeni stop-kodon (engl. *premature termination codon*)

RIN- engl. *RNA Integrity Number*

RNA- ribonukleinska kiselina

RT-qPCR- kvantitativni PCR uz reverznu transkripciju (engl. *reverse transcription-PCR*)

SAH- S-adenozilhomocistein

SAM- S-adenozilmetionin

SAHH- S-adenozilhomocistein hidrolaza

SNP- polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*)

UPS- ubikvitin-proteasomski sustav (engl. *ubiquitin-proteasome system*)

## **9. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Filip Rokić

Adresa: Fra Filipa Grabovca 13, 10000 Zagreb

Mob: (+385)98 354 870

E-mail: frokic@irb.hr

Datum i mjesto rođenja: 02/02/1991 u Rijeci

Državljanstvo: hrvatsko

### **RADNO ISKUSTVO**

- 2018. – 2024.: Asistent u Laboratoriju za naprednu genomiku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

- 2016. – 2018.: Stručni suradnik u Laboratoriju za naprednu genomiku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

### **OBRAZOVANJE**

- 2016.– danas: Poslijediplomski studij "Medicinska kemija", Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

- 2013.– 2016.: Diplomski studij kemije, smjer Biokemija i Analitička kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

- 2009.– 2013.: Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### **OSPOSOBLJAVANJE**

- 2024. Trening "Eppendorf EpMotion 5075 Liquid Handling System", IRB, Zagreb

- 2022.- Usavršavanje CeGaT, Tübingen, Germany. Priprema biblioteka, sekvenciranje i analiza 50 hrvatskih cjelokupnih genoma (WGS). Financirano: Centar kompetencije u molekularnoj dijagnostici (CEKOM).
- 2021. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka
- 2017. Radionica “NGS Technology in Clinical Diagnostics”, KBC Zagreb, Zagreb
- 2016. Radionica “Uvod u HPC i cloud računarstvo”, IRB, Zagreb
- 2015. Trening “Illumina NextSeq500 & MiniSeq Systems”, IRB, Zagreb

## KONGRESI I KONFERENCIJE

- 2022. Kongres “HDBMB22: From Science to Knowledge”, poster: “Functional characterization of newly discovered truncating mutation of S-adenosylhomocysteine hydrolase”, “Signaling pathways changes caused by S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in MCF7 cells” i “Elucidating post-transcriptional modifications of latent HSV-1 transcripts”, Brela, Hrvatska
- 2018. Kongres “FEBS3+: From Molecules to Living Systems”, usmena prezentacija: “Understanding mRNA degradation caused by missense mutation in AHCY deficiency”, Siófok, Mađarska
- 2018. Kongres “Power of Viruses 2018”, poster: "Comprehensive analysis of herpes simplex virus 1 encoded miRNAs and host miRNAs during productive and latent infection - the need for a revision", Poreč, Hrvatska

## PUBLIKACIJE

1. Planinić, A., Begovac, J., **Rokić, F.**, Šimičić, P., Oroz, M., Jakovac, K., Vugrek, O., Zidovec-Lepej, S. “Characterization of Human Immunodeficiency Virus-1 Transmission Clusters and Transmitted Drug-Resistant Mutations in Croatia from 2019 to 2022”. *Viruses* 2023, 15, 2408.

2. Pavičić I., **Rokić F.**, Vugrek O. "Effects of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Downregulation on Wnt Signaling Pathway in SW480 Cells". *Int J Mol Sci.* 2023 Nov 8;24(22):16102.
3. Lukšić, F., Mijakovac, A., Josipović, G., Vičić Bočkor, V., Krištić, J., Cindrić, A., Vinicki, M., **Rokić, F.**, Vugrek, O., Lauc, G., et al. "Long-Term Culturing of FreeStyle 293-F Cells Affects Immunoglobulin G Glycome Composition." *Biomolecules* 2023, 13, 1245.
4. Logara Klarić M., Žunić L., Marić T., Trgovec-Greif L., **Rokić F.**, Merkler A., Belužić R., Vugrek, O., Katušić Bojanac A., & Barbalić, M. "Gene panel analysis of literature-based infertility genes in Sertoli cell-only syndrome patients." *Genetics & Applications*, 2023, 7(1), 20–26.
5. Zubković A., Gomes C., Parchure A., Cesarec M., Ferenčić A., **Rokić F.**, Jakovac H., Whitford A.L., Dochnal S.A., Cliffe A.R., Cuculić D., Gallo A., Vugrek O., Hackenberg M., Jurak I. "HSV-1 miRNAs are post-transcriptionally edited in latently infected human ganglia." *J Virol.* 2023 Oct 31;97(10),
6. Zubković A., Žarak I., Ratkaj I., **Rokić F.**, Jekić M., Pribanić Matešić M., Lebrón R., Gómez-Martín C., Lisnić B., Lisnić V.J., Jonjić S., Pan D., Vugrek O., Hackenberg M., Jurak I. "The Virus-Induced Upregulation of the miR-183/96/182 Cluster and the FoxO Family Protein Members Are Not Required for Efficient Replication of HSV-1". *Viruses.* 2022 Jul 28;14(8):1661
7. Alm E., Broberg E.K., Connor T., Hodcroft E.B., Komissarov A.B., Maurer-Stroh S., Melidou A., Neher R.A., O'Toole A., Pereyaslov D., **The WHO European Region sequencing laboratories and GISAID EpiCoV group:** "Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020". *Euro Surveill.* (2020) 25(32):2001410.
8. **Rokić F.**, Trgovec Greif L., Sučić N., Čemeljić N., Cekinović Grbeša Đ., Svedružić Ž., Rukavina T., Vugrek O., Jurak I. "Diverse SARS CoV 2 variants preceded the initial COVID 19 outbreak in Croatia". *Archives of Virology* (2021) 166:1735–1739.
9. Sukser V., **Rokić F.**, Barbarić L., Korolija M.: "Assessment of Illumina® Human mtDNA Genome assay: workflow evaluation with development of analysis and interpretation guidelines". *International journal of legal medicine*, 135 (2021), 1161-1178
10. Dumić Kumbat K., Antičević D., Petrinović- Dorešić J., Žigman T., Žarković K., **Rokić F.**, Vugrek O. "Lowe syndrome - Old and new evidence of secondary mitochondrial dysfunction". *European journal of medical genetics*, 63 (2020), 10; 104022, 4

11. M. Oroz; J. Begovac; A. Planinić; **F. Rokić**; M. Lunar; M. Zorec, M. Tomaž; R. Beluzić; P. Korać; O. Vugrek; M. Poljak-Lepej, S. Židovec: “Analysis of HIV-1 diversity, primary drug resistance and transmission networks in Croatia”. *Scientific Reports*, 9 (2019), 1; 17307,
12. L. Belužić, I. Grbeša, R. Belužić, J. H. Park, H. K. Kong, N. Kopjar, G. Espadas, E. Sabidó, A. Lepur, **F. Rokić**, I. Jerić, L. Brkljačić, O. Vugrek: “Knock down of AHCY activity and depletion of adenosine induces DNA damage and cell cycle arrest”. *Sci. Rep.* (2018) 18;8(1):14012
13. M. Cokarić-Brdovčak, A. Zubković, A. Ferenčić, I. Šoša, V. Stemberga, D. Cuculić, **F. Rokić**, O. Vugrek, M. Hackenberg, I. Jurak: „Herpes simplex virus 1 miRNA sequence variations in latently infected human trigeminal ganglia“. *Virus Res.* (2018) 2;256, 90-95
14. I. Grbeša, A. Kalo, R. Belužić, L. Kovačević, A. Lepur, **F. Rokić**, H. Hochberg, I. Kanter, V. Simunović, P. M. Muñoz-Torres, Y. Shav-Tal, O. Vugrek: “Mutations in S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) affect its nucleocytoplasmic distribution and capability to interact with S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1 protein”. *EJCB*, (2017) **96**, 579-590
15. P. M. Muñoz-Torres, **F. Rokić**, R. Belužić, I. Grbeša, O. Vugrek: “msBiodat Analysis Tool, Big data analysis for high-throughput experiments”. *BioData Mining*, (2016) 9:26