

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MATEO GLUMAC

**ULOGA PROTEAZE SPRTN U POPRAVKU DNA NAKON
OŠTEĆENJA UZROKOVANIH KOVALENTNIM VEZANJEM PROTEINA**

DOKTORSKI RAD

Split, 2023.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MATEO GLUMAC

**ULOGA PROTEAZE SPRTN U POPRAVKU DNA NAKON
OŠTEĆENJA UZROKOVANIH KOVALENTNIM VEZANJEM PROTEINA**

DOKTORSKI RAD

Split, 2023.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Sveučilišta u Splitu u sklopu projekta „Uloga proteina Spartan u DNA replikaciji – SprtnRep“ (Istraživački projekt - IP-06-2016) voditeljice prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić dr. med..

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić dr. med.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| POPIS OZNAKA I KRATICA | 8 |
| 1.UVOD | 12 |
| 1.1. Oštećenje DNA kovalentnim vezanjem proteina | 13 |
| 1.2. Popravak DPC-ova | 14 |
| 1.2.1. Načini popravka DPC-ova | 14 |
| 1.2.2. Prepoznavanje DPC-ova | 17 |
| 1.3. Uloga proteaze SPRTN u popravku DPC-ova | 19 |
| 1.3.1. Struktura i funkcija proteaze SPRTN..... | 19 |
| 1.3.2. Ruijs-Aalfs sindrom | 21 |
| 1.3.1. Regulacija funkcije SPRTN-a | 22 |
| 1.4. Metode za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova | 23 |
| 1.4.1. Indirektne metode..... | 23 |
| 1.4.2. Direktne metode | 24 |
| 2. HIPOTEZE I CILJEVI..... | 25 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 28 |
| 3.1. Materijali | 29 |
| 3.1.1. Kemikalije i reagensi..... | 29 |
| 3.1.2. Male interferirajuće RNA..... | 30 |
| 3.1.3. Lista primarnih protutijela..... | 30 |
| 3.1.4. Lista sekundarnih protutijela..... | 31 |
| 3.1.5. Osnovne otopine korištene u radu..... | 31 |
| 3.1.6. Gelovi za gel elektroforeze | 33 |
| 3.1.7. Biološki materijali | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.1.8. Aparatura..... | 34 |
| 3.2. Metode..... | 34 |
| 3.2.1. Rad s kulturama stanica..... | 34 |
| 3.2.2. Brojanje stanica i određivanje stanične vijabilnosti..... | 35 |
| 3.2.3. DPC izolacija putem STAR eseja | 36 |
| 3.2.4. DPC izolacija putem RADAR eseja..... | 36 |
| 3.2.5. DPC izolacija KCl/SDS precipitacijom | 36 |
| 3.2.6. DNA izolacija..... | 36 |
| 3.2.7. Stanično frakcioniranje | 37 |
| 3.2.8. Kvantifikacija DNA | 37 |
| 3.2.9. Kvantifikacija proteina | 37 |
| 3.2.10. Denaturirajuća elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu..... | 38 |
| 3.2.11. Vizualizacija količine proteina..... | 38 |
| 3.2.12. Imunodetekcija | 38 |
| 3.2.13. Spektrometrija masa..... | 39 |
| 3.2.14. Imunofluorescencija | 39 |
| 3.2.15. Komet esej u denaturirajućim uvjetima | 40 |
| 3.2.16. BrdU komet esej u denaturirajućim uvjetima | 41 |
| 3.2.17. Statistička obrada podataka..... | 41 |
| 4. REZULTATI..... | 43 |
| 4.1. Razvoj STAR eseja | 44 |
| 4.1.1. Izolacija DPC-ova KCl/SDS precipitacijom | 44 |
| 4.1.2. Izolacija DPC-ova RADAR esejom | 45 |
| 4.1.3. Metodologija STAR eseja | 47 |
| 4.1.4. Validacija STAR eseja | 50 |

| | |
|--|----|
| 4.1.5. Analiza specifičnosti DCP izolacije metodom imunodetekcije | 52 |
| 4.1.6. Analiza specifičnosti DPC izolacije spektrometrijom masa | 54 |
| 4.1.7. STAR esej osjetljivo i selektivno izolira DPC-ove različitog porijekla..... | 56 |
| 4.1.8. Usporedba STAR i RADAR eseja na drugoj staničnoj liniji | 57 |
| 4.2. Potvrda proteolitičke degradacije DPC-ova korištenjem STAR eseja – zaostajanje kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA kao rezultat proteolitičke degradacije..... | 59 |
| 4.2.1. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA SDS-PAG elektroforezom | 59 |
| 4.2.2. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA imunodetekcijom | 60 |
| 4.2.3. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA spektrometrijom masa..... | 61 |
| 4.3. Uloga proteaze SPRTN u popravku DNA nakon oštećenja DPC-ovima..... | 63 |
| 4.3.1. Odnos lokalizacije proteaze SPRTN i signalizacije oštećenja DNA | 63 |
| 4.3.2. Utjecaj signalizacije oštećenja DNA na vezanje faktora popravka..... | 64 |
| 4.3.3. Proteolitička degradacija DPC-ova od strane SPRTN-a je ključna za pokretanje signalizacije oštećenja DNA i vezanje faktora popravka DNA | 66 |
| 4.3.4. Smanjenje izražaja SPRTN-a ne utječe na aktivaciju γ H2Ax kod ostalih tipova oštećenja DNA | 68 |
| 4.3.5. Nastanak DPC-ova onemogućava normalnu signalizaciju oštećenja DNA..... | 69 |
| 4.3.5. Nedostatak proteolitičke degradacije DPC-ova onemogućava signalizaciju i popravak lomova DNA na mjestu nastanka DPC-a..... | 70 |
| 4.4. Posljedice nastanka i popravka DPC-ova na staničnu vijabilnost..... | 72 |
| 4.4.1. Nastanak DPC-ova dovodi do usporavanja stanične proliferacije i stanične smrti..... | 72 |
| 4.4.2. Nastanak i popravak DPC-ova dovodi do oštećenja DNA koje usporava prolazak kroz S fazu staničnog ciklusa | 74 |
| 4.4.3. Nedostatak SPRTN-a dovodi do razvijanja oštećenja DNA i izvan S faze | 76 |

| | |
|---|-----|
| 4.5. Dodatni rezultati - Optimizacija metoda primijenjenih u radu..... | 78 |
| 4.5.1. Optimizacija staničnog frakcioniranja..... | 78 |
| 4.5.2. Optimizacija protokola komet eseja za detekciju oštećenja DNA uzrokovanih nastankom DPC-ova..... | 79 |
| 4.5.3. Optimizacija metode imunofluorescencije za specifičnu vizualizaciju nuklearnih signala..... | 80 |
| 5. RASPRAVA..... | 82 |
| 6. ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA..... | 89 |
| 7. LITERATURA..... | 91 |
| 8. SAŽETAK..... | 100 |
| 9. SUMMARY | 102 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 104 |

POPIS OZNAKA I KRATICA

| | |
|-------------|--|
| DNA | Deoksiribonukelinska kiselina |
| DPC | Eng: „ <i>DNA-Protein Crosslink</i> “ Kovalentno vezani protein na DNA molekuli |
| TOPO1 | Topoizomeraza 1 |
| TOPO2 | Topoizomeraza 2 |
| UV zračenje | Ultraljubičasto zračenje |
| PARP1 | Poli-(ADP-riboza) polimeraza 1 |
| DNMT1 | DNA (citozin-5)-metil transferaza 1 |
| wss1 | Eng: „ <i>Weak Suppressor of Smt3</i> “ |
| SPRTN | Eng: „ <i>SprT-Like N-Terminal Domain</i> “ |
| TDP1 | Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 |
| TDP2 | Tirozil-DNA fosfodiesteraza 2 |
| FA | Formaldehid |
| NER | Eng: „ <i>Nucleotide excision repair pathway</i> “ Popravak izrezivanjem nukleotida |
| HR | Homologna rekombinacija |
| MRE11 | Eng: „ <i>Meiotic Recombination 11 Homolog A</i> “ |
| NBS1 | Eng: „ <i>Nibrin</i> “ |
| SUMO | Eng: „ <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> “ |
| PAR | Poli-(ADP-riboza) |
| GCNA | Eng: „ <i>Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase</i> “ |
| FAM111A | Eng: „ <i>Family With Sequence Similarity 111 Member A</i> “ |
| DDI1 | Eng: „ <i>DNA Damage Inducible 1 Homolog 1</i> “ |
| DDI2 | Eng: „ <i>DNA Damage Inducible 1 Homolog 2</i> “ |
| TRAIIP | Eng: „ <i>TRAF Interacting Protein</i> “ |
| RNF4 | Eng: „ <i>Ring Finger Protein 4</i> “ |
| BRCA1 | Eng: „ <i>Breast Cancer gene 1</i> “ |
| PIAS4 | Eng: „ <i>Protein inhibitor of activated STAT</i> “ |
| ZNF451 | Eng: „ <i>Zinc Finger Protein 451</i> “ |
| UBZ | Eng: „ <i>Ubiquitin-binding zinc finger</i> “ |

| | |
|--------|---|
| UBL | Eng: „ <i>Ubiquitin-like</i> “ |
| SIM | Eng: „ <i>SUMO-interacting motif</i> “ |
| ATR | Eng: „ <i>Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related</i> “ |
| ATM | Eng: „ <i>Ataxia telangiectasia–mutated gene</i> “ |
| CHK1 | Eng: „Checkpoint Kinase 1“ |
| CHK2 | Eng: „Checkpoint kinase 2“ |
| H2Ax | Eng: „ <i>H2A histone family member X</i> “ |
| RNA | Ribonukleinska kiselina |
| VCP | Eng: „ <i>Valosin Containing Protein</i> “ |
| PCNA | Eng: „ <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> “ |
| NLS | Eng: „ <i>Nuclear Localization Signal</i> “ |
| UBZ | Eng: „ <i>Ubiquitin-binding Zinc Finger</i> “ |
| ZBD | Eng: „ <i>Zinc-binding Domain</i> “ |
| BR | Eng: „ <i>Basic Region</i> “ |
| VCPIP1 | Eng: „ <i>Valosin Containing Protein Interacting Protein 1</i> “ |
| PCAF | Eng: „ <i>P300/CBP-Associated Factor</i> “ |
| GCN5 | Eng: „ <i>General Control Of Amino Acid Synthesis Protein 5</i> “ |
| UBE2D3 | Eng: „ <i>Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D3</i> “ |
| RAS | Eng: „ <i>Rat sarcoma virus</i> “ |
| FITC | Fluorescein izotiocijanatom |
| ICE | Eng: „ <i>Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA</i> “ |
| RADAR | Eng: „ <i>Rapid Approach to DNA Adduct Recovery</i> “ |
| ARC | Eng: „ <i>Advanced Recovery of K [potassium]-SDS Precipitates</i> “ |
| SDS | Eng: „ <i>Sodium dodecylsulphate</i> “ Natrij dodecilsulfat |
| XPG | Eng: „ <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G</i> “ |
| XPC | Eng: „ <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C</i> “ |
| XRCC3 | Eng: „ <i>X-Ray Repair Cross Complementing 3</i> “ |
| POLH | Eng: „ <i>DNA Polymerase Eta</i> “ |
| TLS | Translezijska sinteza DNA |

| | |
|--------|---|
| SLFN11 | Eng: „ <i>Schlafen Family Member 11</i> “ |
| XPD | Eng: „ <i>Xeroderma Pigmentosum Complementary Group D</i> “ |
| ERCC2 | Eng: „ <i>Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 2</i> “ |
| TEX264 | Eng: „ <i>Testis-Expressed Protein 264</i> “ |
| FANCL | Eng: „ <i>Fanconi Anemia Complementation Group L</i> “ |
| XPC | Eng: „ <i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C</i> “ |
| UHPLC | Eng: „ <i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> “ |
| MS | Spektrometrija masa |
| IF | Imunoflorescencija |

1.1. Oštećenje DNA kovalentnim vezanjem proteina

Genomska DNA (Deoksiribonukelinska kiselina) je pod konstantnim utjecajem brojnih faktora koji mogu dovesti do njenog oštećenja. Oštećenja DNA uključuju brojne tipove DNA lezija kao što su modifikacije baza, apurinska/apirimidinska mjesta, krivo sparivanje baza, lomovi DNA lanaca, unakrsno povezivanje unutar istog ili nasuprotnih DNA lanaca, te unakrsnim povezivanjem DNA lanca i proteina [1,2]. Kovalentno vezanje proteina na molekulu DNA (eng. „*DNA-protein crosslinks*“) (DPC-ovi) predstavlja jedan su od najčešćih tipova oštećenja DNA s pojavnošću od oko 5000 DPC-ova na dan po genomu [3]. Nastaju kao posljedica fizičkih ili kemijskih promjena na proteinu ili samoj molekuli DNA koje uzrokuju nastanak kovalentne veze stvarajući glomazne DNA lezije. Takve lezije interferiraju s metaboličkim procesima molekule DNA uključujući replikaciju i transkripciju [3,4]. Nastanak DPC-ova dovodi do kemijske promjene DNA baze na kojoj se DPC nalazi, što zahtijeva popravak DNA radi očuvanja genomske stabilnosti [5]. DPC-ovi mogu nastati endogeno i egzogeno [6]. Endogeni DPC-ovi uzrokovani su djelovanjem aldehida (najčešće formaldehida) ili nastaju prilikom neuspješno završenih enzimskih reakcija na molekuli DNA (npr. zastoj topoizomeraze 1 i 2) [4,6]. Formaldehid (FA) je čest metabolički produkt u ljudskom tijelu. Nastaje u brojnim metaboličkim procesima poput metabolizma aminokiselina, lipidne peroksidacije i P450 ovisnog procesa demetilacije [7]. Značajan izvor formaldehida u jezgri predstavlja i demetilacija histona, DNA i RNA (ribonukleinska kiselina) te kod nekih tipova popravka DNA [8,9]. Nastale količine FA su iznimno velike, kreću se od 878-1310 mg/kg tjelesne mase s vremenom poluživota od 1-1,5 minuta [7]. Koncentracija FA u krvi iznosi 2.6 mg/L (87 μ M) dok je koncentracija FA u stanicama u fazi mirovanja oko 12 mg/L (400 μ M). Jetra je organ pod najvećim utjecajem FA s oko 11.8 \pm 0.17 mg/kg mase [7]. DPC-ovi mogu nastati i djelovanjem egzogenih čimbenika, poput UV i ionizirajućeg zračenja, reaktivnih kemijskih spojeva ili teških metala [1,6]. DPC-ovi se mogu podijeliti prema načinu nastanka na enzimske DPC-ove (nastaju kao posljedica neuspješno završenih enzimskih reakcija) te na nespecifične DPC-eve (DPC-ovi nastali kao posljedica kemijskih promjena na proteinu ili molekuli DNA) [1,10]. Mogućnost stvaranja DPC-ova djelovanjem egzogenih čimbenika uspješno se primjenjuje u kliničkoj praksi, kao antitumorske terapija, a primjeri takvih lijekova su inhibitori enzima poput topoizomeraze 1 i 2, PARP1 (Poli-(ADP-riboza) polimeraza 1) i DNMT1 (DNA (citozin-5)-metil transferaza 1) [4,6].

Zanimljivo je da su DPC-ovi najmanje istraživani oblik oštećenja DNA iako je njihovo postojanje poznato više od 60 godina [11]. Njihovo intenzivno proučavanje započelo je tek nakon

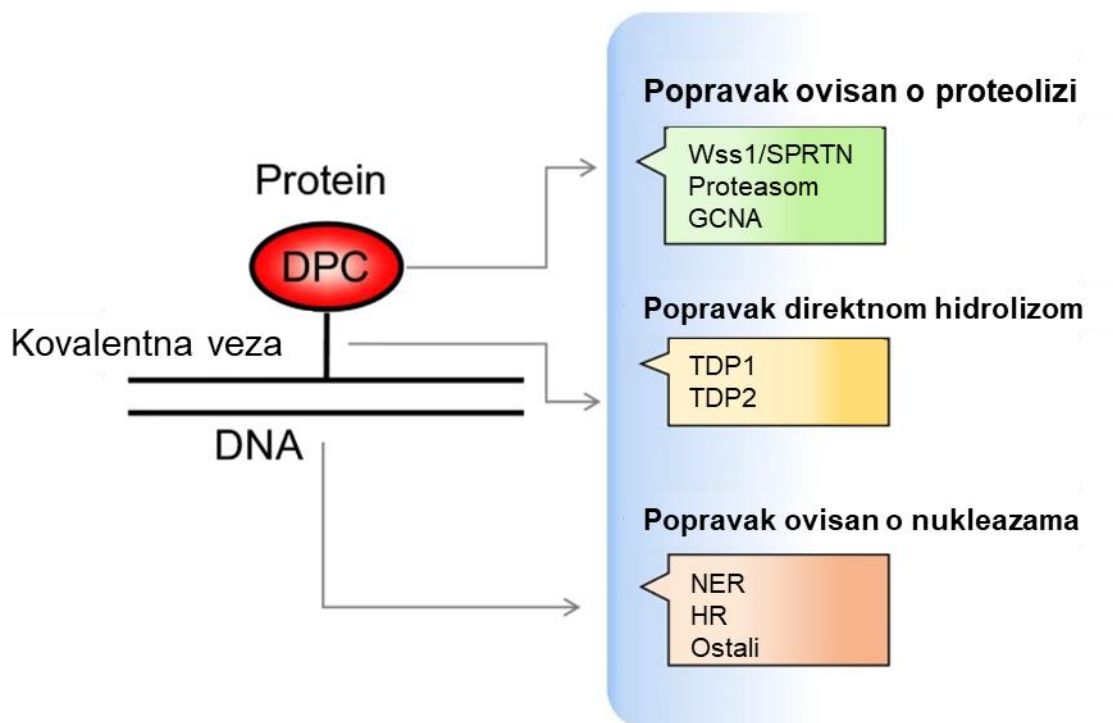
otkrića i opisivanja proteaza ovisnih o DNA (wss1 (Eng: „*Weak Suppressor of Smt3*“) i SPRTN (Eng: „*SprT-Like N-Terminal Domain*“) [12,13] te opisivanja Ruijs-Aalfs sindroma [13]. Neuspjeli popravak DPC-ova dovodi do teških posljedica, koje uključuju genomsku nestabilnost, neurološku degeneraciju, preuranjeno starenje i rak [1].

1.2. Popravak DPC-ova

1.2.1. Načini popravka DPC-ova

Kao odgovor na stvaranje DPC-ova stanice su razvile posebne mehanizme popravka DNA koji uključuju djelovanje tri različita načina popravka:

1. Popravak izravnom hidrolizom kovalentne veze
2. Popravak ovisan o nukleazama
3. Popravak ovisan o proteazama [10].



Slika 1. DPC-ovi se sastoje od proteina kovalentno vezanog na DNA. Mogu biti popravljani različitim mehanizmima popravka. NER i HR su mehanizmi ovisni o nukleazama koji mogu izravno cijepati molekulu DNA. Kemijska veza između TOPO1/TOP2O i DNA može se izravno hidrolizirati pomoću TDP1 i TDP2. Također, proteasom, SPRTN/Wss1 i GCNA povezani su s uklanjanjem kovalentno vezanih proteina ovisnom o proteolizi. Preuzeto i prilagođeno prema Zhang i suradnicima [10].

Ovakva raznolikost u načinima popravka DPC-ova vjerojatno proizlazi iz raznolikosti samih DPC-ova što onemogućuje korištenje samo jednog specijaliziranog enzima za njihov popravak [10]. Ipak, stanice su razvile nekoliko specijaliziranih enzima koji mogu napraviti direktni obrat kemijske reakcije koja je dovela do stvaranja DPC-a. Popravak izravnom hidrolizom kovalentne veze razvijen je za popravak enzimskih DPC-ova nastalih pogreškom pri obavljanju njihove funkcije. Enzimi uključeni u ovaj način popravka su tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (TDP1) i tirozil-DNA fosfodiesteraza 2 (TDP2) koji su uključeni u direktnu hidrolizu kovalentne veze koju stvaraju topoizomeraza 1 (TOPO1) i topoizomeraza 2 (TOPO2). Treba napomenuti da prilikom funkcije topoizomeraza nastaju lomovi DNA lanaca (jednolančani za TOPO1 i dvolančani za TOPO2) koji perzistiraju nakon same hidrolize kovalentne veze i zahtijevaju daljnji popravak [10]. Navedeni enzimi koji uzrokuju direktnu hidrolizu kovalentne veze možda imaju i manje specijalizirane uloge kod popravka DPC-ova. Za TDP1 je pokazana osjetljivost stanica na reagense koji induciraju DPC kao što su formaldehid (FA) ili 5-aza-2'-deoksicitidin što sugerira ulogu TDP1 u popravku i drugih DPC-ova ne samo onih koje stvara TOPO1 [9,14]. Drugi način popravka DPC-ova opisan je kroz ulogu nukleaza u mehanizmu popravka. Ovaj način popravka prvo je demonstriran na modelu *Escherichia coli* gdje je pokazana senzitivnost *uvrA* i *uvrB* mutiranih linija na tretmane formaldehidom. *UvrA* i *uvrB* imaju uloge u popravku izrezivanjem baza (eng: „*nucleotide excision repair pathway*“; NER) i homolognoj rekombinaciji (eng: „*homologous recombination*“, HR). Daljnji eksperimenti su pokazali diferencijalnu ulogu NER i HR u popravku DPC-ova kod bakterija gdje NER sudjeluje u uklanjanju proteina (peptida) do veličine od 12-14 kDa, dok HR nije limitirana veličinom proteina (peptida) [10,15]. Popravak ovisan o nukleazama konzerviran je i kod sisavaca gdje je također pokazana uloga NER-a u popravku DPC-ova sačinjenog od peptida do 8-10 kDa veličine no takva veličina peptida je rijetka kod sisavaca što sugerira postojanje degradacijskog mehanizma kojim bi se veliki proteini degradirali na peptide potrebne veličine koje se dalje može procesirati mehanizmom NER-a [16]. Uloga HR je lošije razjašnjena kod sisavaca. Dokazi uloge HR proizlaze iz povećanja broja dvostrukih lomova DNA nakon indukcije DPC-ova, pojave fokusa RAD51 na kromatinu, te povećane razmjena sestrinskih kromatida, što su sve indikativne promjene prilikom HR [10,17–19]. Također je demonstrirana uloga nukleaznog kompleksa MRN (sastavljenog od proteina MRE11 (Eng: „*Meiotic Recombination 11 Homolog A*“), RAD50 i NBS1 (Eng: „*Meiotic Recombination 11 Homolog A*“)) koji je važan za resekciju molekule DNA i inicijaciju HR. Za razliku od bakterijskog modela u stanicama sisavaca nije uspješno pokazano

procesuiranje većih peptidnih fragmenata HR-om. Također inicijacija HR kod sisavaca zahtijeva postojanje loma molekule DNA u blizini samog DPC-a jer se nukleazni kompleks MRN veže za DNA samo na mjestima lomova DNA gdje dolazi do resekcije krajeva molekule DNA [10]. Mehanizmi nukleaznog popravka DNA koji se aktiviraju uslijed DPC oštećenja međusobno se isključuju, a do danas nije razjašnjeno kako i zašto se pojedina vrsta popravka odabire kod popravka DPC-ova [10]. Moguće je da se pojedini put popravka DNA aktivira ovisno o veličini oštećenog segmenta molekule, o lokaciji oštećenog segmenta ili fazi staničnog ciklusa u kojem se stanica nalazi [3,20,21]. U popravku ovisnom o nukleazama je pokazano sudjelovanje još nekoliko faktora poput XPA (Eng: „*Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A*“) [16,19,22], XPC (Eng: „*Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C*“) [19], XPD (Eng: „*Xeroderma Pigmentosum Complementary Group D*“) (sudjeluje u NER) [5], XPG (Eng: „*Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G*“) (sudjeluje u NER) [23], ERCC2 (Eng: „*Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 2*“) [5,19] i RAD18 (E3 ubikvitin ligaza) [24,25], koji su dio mehanizma NER popravka DNA. Nadalje, pokazano je sudjelovanje XRCC3 (Eng: „*X-Ray Repair Cross Complementing 3*“) [19], SLFN11 (Eng: „*Schlafen Family Member 11*“) (sudjeluje u prepoznavanju oštećenja DNA ispred replikacijskih rašlji) [26] te FANCL (Eng: „*Fanconi Anemia Complementation Group L*“) (sudjeluje u specifičnom tipu HR-a) [27] koji sudjeluju u HR popravku oštećenja DNA. Osim navedenih faktora u popravak DPC-ova sudjeluju faktori poput PCNA (Eng: „*Proliferating Cell Nuclear Antigen*“) (sudjeluje u brojnim tipovima popravka DNA) [24,25], VCP (Eng: „*Valosin Containing Protein*“) (sudjeluje u brojnim tipovima popravka DNA) [24,28,29], POLH (Eng: „*DNA Polymerase Eta*“) (sudjeluje u translezijskoj sintezi DNA (TLS)) [24,25] te TEX264 (Eng: „*Testis-Expressed Protein 264*“) [28]. Samo za XPA i VCP postoje izravni dokazi da nedostatak ovih čimbenika dovodi do nakupljanja DPC-ova dok je za ostale nabrojene čimbenike pokazano da su stanice osjetljivije na indukciju DPC-ova u slučaju nedostatka navedenih čimbenika.

Prema veličini peptidnih fragmenata koje procesuira popravak ovisan o nukleazama može se zaključiti da se proteini prvo proteolitički degradiraju što dovodi do trećega načina popravka DPC-ova. To je popravak ovisan o proteolizi koji je opisan nakon otkrića proteaza čija je funkcija ovisna o vezanju DNA (*wss1* kod kvasaca, *SPRTN* kod ljudi). Uloga takvih proteaza je da degradiraju kovalentno vezani protein oslobađajući molekulu DNA i na taj način osiguravaju odvijanje DNA metaboličkih procesa [10,12,13,30]. Proteaze *wss1* i *SPRTN* najvažnije su opisane proteaze

uključene u popravak DPC-ova kod eukariota. Proteaza wss1 zastupljena je u carstvu gljiva i biljaka, dok je proteaza SPRTN zastupljena u carstvu životinja no obje proteaze pokazuju evolucijsku povezanost [31]. Wss1 i SPRTN su nespecifične proteaze sposobne degradirati bilo koji protein u interakciji s molekulom DNA neovisno o aminokiselinskom slijedu. Takvo ponašanje ima iznimno negativan učinak na funkciju stanica, pa njihova aktivnost mora biti strogo regulirana [3].

Osim wss1 i SPRTN-a, opisano je nekoliko proteaza koje sudjeluju u ovom načinu popravka. Uloga proteasoma u popravku DPC-ova opisana je u nekoliko članaka. Proteasom degradira linearizirane i poliubikvitinirane DPC-ove, što je pokazano na *in vitro* modelu korištenjem ekstrakata jaja *Xenopus levis* [32] te na staničnom modelu korištenjem inhibitora proteasoma MG132 (eng: „*carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal*“) [16,23]. Suprotno ovim rezultatima, drugi članci su demantirali sudjelovanje proteasoma u popravku DPC-ova, navodeći da korištenje inhibitora proteasoma izaziva trošenje zalihe slobodnog ubikvitina koja je potrebna za popravak DPC-ova i time uzrokuju inhibiciju popravka DPC-ova [33]. Također neke studije nisu pokazale da korištenje proteasomalnih inhibitora utječe na popravak DPC-ova [15,34], što u konačnici čini sudjelovanje proteasoma u popravku DPC-ova kontroverznim zaključkom. Druge pokazane proteaze koje sudjeluju u popravku DPC-ova su GCNA (Eng: „*Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase*“), FAM111A (Eng: „*Family With Sequence Similarity 111 Member A*“), DDI1 (Eng: „*DNA Damage Inducible 1 Homolog 1*“) i DDI2 (Eng: „*DNA Damage Inducible 1 Homolog 2*“) [1,4]. GCNA je evolucijski povezana sa SPRTN-om i veže kromatin u M fazi staničnog ciklusa nakon što dođe do otpuštanja SPRTN-a s kromatina i tako štiti DNA od štetnog utjecaja DPC-ova u procesu mitoze [22].

1.2.2. Prepoznavanje DPC-ova

Kovalentno vezani proteini na DNA jako su slični proteinima koji nisu dio DPC lezije pa se otvara pitanje kako dolazi do prepoznavanja DPC-ova i aktivacije njihova popravka. Prvi od dva opisana načina prepoznavanja DPC-ova je njihovo post-translacijsko modificiranje i to u vidu ubikvitinacije, SUMO-ilacije (Eng: „*Small Ubiquitin-like Modifier*“) i PAR-ilacije (Poli-(ADP-riboza) [35]. Ubikvitinacija je prva opisana post-translacijska modifikacija prisutna na DPC-ovima. Opisano je nekoliko ubikvitin ligaza uključenih u popravak DPC-ova uključujući TRAIIP (Eng: „*TRAF Interacting Protein*“), RNF4 (Eng: „*Ring Finger Protein 4*“) i BRCA1 (Eng: „*Breast Cancer gene 1*“) [35]. RNF4 je najbolje istražena ubikvitin ligaza koja veže ubikvitin na prethodno

SUMO-ilirane proteine kao signal za proteasomalnu degradaciju [36]. Otkriće uloge RNF4 dovelo je do istraživanja SUMO-ilacije DPC-ova pa su tako opisane SUMO ligaze uključene u mehanizam popravka DPC-ova, uključujući PIAS4 (Eng: „*Protein inhibitor of activated STAT*“) i ZNF451 (Eng: „*Zinc Finger Protein 451*“) [35]. PIAS4/RNF4 os pokazala se iznimno važnom za popravak DPC-ova, gdje gubitak funkcije PIAS4 sprječava ubikvitinaciju DPC-ova od strane RNF4, što dovodi do inhibicije njihova uklanjanja s DNA [36]. Ovaj opisani signalni put inače vodi na proteasomalnu degradaciju, međutim, uključenost proteasoma u popravak DPC-ova je kontroverzna. Mnoge literature navode proteasom kao jedan od važnijih proteaza uključenih u popravak DPC-ova, dok druga istraživanja demantiraju njegovu uključenost [12,32,34]. Najnovija istraživanja navode PAR-ilaciju kao post-translacijsku modifikaciju koja inhibira degradaciju DPC-ova od strane proteasoma tako da dovodi do uklanjanja ubikvitinskih lanaca s DPC-ova [34]. PAR-ilaciju provode poli(ADP-ribozil) polimeraze od kojih je PARP1 najpoznatija i jedna od dvije poli(ADP-ribozil) polimeraze lokalizirane u jezgri za koju je pokazana uloga u popravku DPC-ova [34,37], iako i sama može stvarati lezije slične DPC-ovima. PARP1 inhibitori često se koriste kao mehanizam indukcije DPC-ova, no uključenost PARP1 u popravak DPC-ova dovodi do problema u interpretaciju rezultata proizašlih iz takvih istraživanja [29,38]. Postojanje ubikvitinacije i SUMO-ilacije samih DPC-ova najbolje je demonstrirana činjenicom da sve proteaze uključene u degradaciju DPC-ova imaju domene ili za prepoznavanje ubikvitina (UBZ domena kod SPRTN-a, UBL domene na DDI1 i DDI2) ili SUMO (SIM domene na *wss1* i GCNA) [4].

Drugi predloženi model prepoznavanja DPC-ova zasnovan je na prepoznavanju topoloških obilježja same molekule DNA. Specifična topologija molekule DNA kod replikacije ili transkripcije promovira popravak samih DPC-ova [21,32,39] dok brojni DPC inducirajući agensi poput topoizomernih inhibitora, UV i ionizirajućega zračenja stvaraju lomove molekule DNA na mjestima ili u blizini nastanka samog DPC-a [40,41]. Važnost topologije molekule DNA u blizini DPC-ova pokazana je na primjeru proteaze SPRTN, koja preferencijalno degradira mete smještene u blizini praznina i lomova molekule DNA, na mjestima mjehura u strukturi i područjima koja sadržavaju dvolančanu i jednolančanu DNA [42].

Osim signala prisutnih na DNA ili samim DPC-ovima, nakon indukcije DPC-ova dokazi do aktivacije nekoliko signalnih kaskada temeljenih na fosforilaciji. Kinaze ATR (Eng: „*Ataxia-*

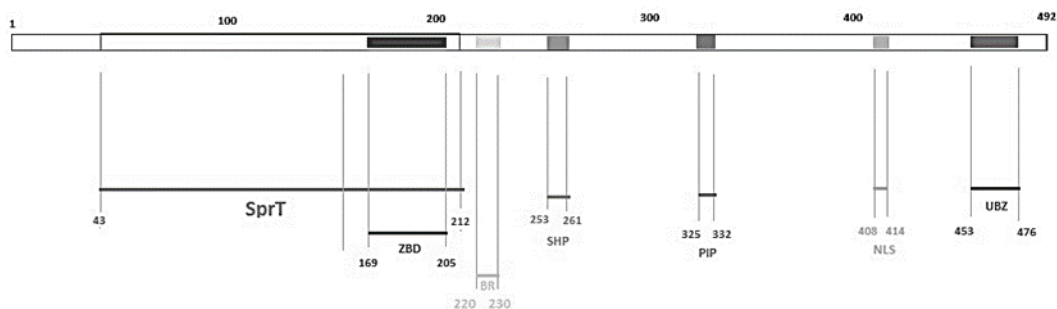
telangiectasia mutated and Rad3-related“) i ATM (Eng: „*Ataxia telangiectasia–mutated gene*“) uključene su u prepoznavanje i signalizaciju brojnih tipova oštećenja DNA [43]. Njihova uloga je prenošenje signala od mjesta oštećenja do faktora nužnih za popravak oštećenja [43–45]. ATM kinaza aktivira se u slučaju ne popravka DPC-ova kao posljedica razvoja lomova DNA te prenosi signal na CHK2 (Eng: „Checkpoint Kinase 2“) kinazu [46]. Aktivnost kinaze ATR pokazana je u vidu popravka DPC-ova kod zapinjanja replikacijskih rašlji na DPC leziji [20]. Nizvodno u ATR signalizaciji pokazano je sudjelovanje CHK1 (Eng: „Checkpoint Kinase 1“) kinaze [20,45]. CHK1 kinaza i SPRTN su interaktori koji međusobno pridonose njihovoj aktivaciji. SPRTN proteolitički uklanja C-terminalnu inhibitorску pojedincu CHK1 proteina, koji zauzvrat fosforilira SPRTN protein, povećavajući njegov afinitet za vezanje DNA [47]. Sudjelovanje navedenih kinaza gotovo uvijek je povezano s fosforilacijom histona H2Ax (Eng: „H2A histone family member X“) na serinu 139 što je fosforilacija poznata kao γ H2Ax [44]. γ H2Ax je aktiviran u slučaju DPC-ova kao posljedica lomova DNA nastalih prilikom urušavanja replikacijskih rašlji [34,46]. Važnost signalizacije preko fosforilacijske kaskade u popravku DPC-ova nije u potpunosti razjašnjena. Iz trenutno objavljenih istraživanja vidljiva je povezanost ove signalizacije s dinamikom post-translacijskih modifikacija na DPC-ovima uključujući povezanost s dinamikom ubikvitinacije, SUMO-ilacije i PAR-ilacije [34,39,46].

1.3. Uloga proteaze SPRTN u popravku DPC-ova

1.3.1. Struktura i funkcija proteaze SPRTN

Gen koji kodira protein SPRTN kod ljudi je smješten na kromosomu 1. Sadrži 5 egzona od kojih su prva 4 relativno kratka (<200 parova baza) dok peti egzon kodira cijelu C terminalnu polovicu SPRTN proteina. Prepisivanjem Sprtn gena nastaju tri različite glasničke RNA molekule (mRNA). Varijanta 1 mRNA kodira SPRTN protein pune veličine, mRNA varijanta 2 nastaje alternativnom regulacijom transkripcije prilikom čega se na egzon četiri nastavlja prepisivanje malog komada introna 4 dok se egzon pet ne prepisuje. mRNA varijanta 3 nastaje alternativnim prekrajanjem mRNA varijante 2, prilikom čega se prekrajanjem gubi egzon 3 koji kodira dio proteina koji sadrži aktivno mjesto u metaloproteaznoj domeni proteina SPRTN. Translacijom SPRTN-ovih mRNA nastaju tri izoforme SPRTN proteina: izoforma a (489 aminokiselina), izoforma b (250 aminokiselina) i izoforma c (207 aminokiselina). Izoforme b i c su potpuno neistražene i funkcija im je nepoznata te ne predstavljaju fokus istraživanja ove disertacije.

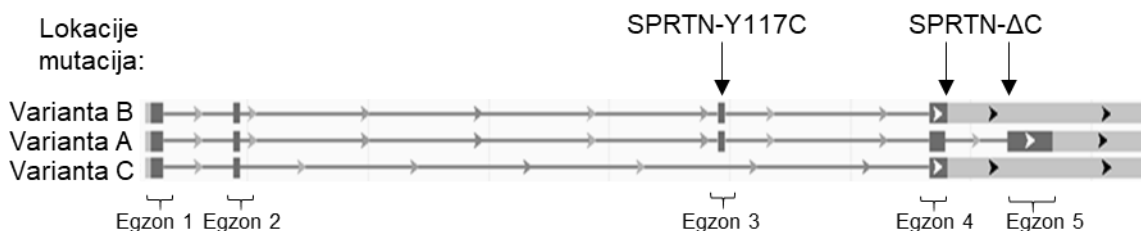
Izoforma a proteina SPRTN istraživana je u ovoj disertaciji kao i u svim referiranim literaturama koje su istraživale SPRTN te će se dalje referirati kao protein SPRTN. Protein SPRTN je građen od nekoliko funkcionalnih domena i interakcijskih motiva uključujući SprT domenu na N polovici proteina (po kojoj je dobio ime) i koja je proteolitički aktivna, te SHP (ili CBS, ovisno o literaturi), koja predstavlja mjesto interakcije s proteinom VCP, zatim PIP koja predstavlja interakcijsko mjesto s proteinom PCNA, te NLS (Eng: „*Nuclear Localization Signal*“) i UBZ (Eng: „*Ubiquitin-binding Zinc Finger*“) domenu, kojom veže ubikvitin, na C polovici proteina [48]. SprT domena je evolucijski očuvana metaloproteazna domena sposobna degradirati aminokiselinske lance neovisno o slijedu aminokiselina koje ga čine pa se smatra nespecifičnom proteaznom domenom. SprT domena je prisutna i kod GCNA, također uključenog u popravak DPC-ova [49]. SprT domena SPRTN-a sadržava dva atoma cinka. Jedan je koordiniran na proteolitički aktivnom mjestu dok je drugi dio ZBD (Eng: „*Zinc-binding Domain*“) domene koja je jedna od dvije domene na SPRTN-u koje vežu molekulu DNA. Druga domena za vezanje DNA je BR (Eng: „*Basic Region*“). Obe DNA vežuće domene nalaze se na N polovici SPRTN proteina. Kombinacijom dvije različite domene za vezanje DNA SPRTN se može vezati na brojne strukture DNA nastale u blizini DPC-ova, tako pospješujući njegovu proteolitičku aktivnost [42]. Ključno za funkciju SPRTN-a kod popravka DPC-ova je mogućnost lokalizacije SPRTN-a u jezgri [13] dok su ostale domene na C polovici SPRTN-a nisu ključne za funkciju SPRTN-a u popravku DPC-ova [50].



Slika 2. Prikaz domena proteina SPRTN.

1.3.2. Ruijs-Aalfs sindrom

Mutacije u *Sprtn* genu dovode do razvoja Ruijs-Aalfs sindroma [50]. Ruijs-Aalfs sindrom je rijetka autosomalno recesivna bolest s karakterističnom kliničkom slikom koja uključuje genomsku nestabilnost, ubrzano starenje (pojava katarakte, ubrzano sijeđenje, mala tjelesna masa, lipodistrofija i kifoza) te razvoj hepatocelularnog karcinoma u adolescentnoj dobi [48]. Kod opisana tri pacijenta s ovim sindromom uočena su dva specifična tipa mutacija u *Sprtn* genu. Prvi tip je pomak okvira čitanja (uzrokovan delecijom) na kraju četvrtog odnosno početku petog egzona, koji uzrokuje preuranjeni STOP kodon, stvarajući SPRTN protein bez C-terminalnog dijela proteina (SPRTN- Δ C). Druga mutacija je točkasta mutacija u kojoj je tirozin 117 zamijenjen cisteinom (SPRTN-Y117C). Ova točkasta mutacija smještena je u blizini aktivnog mjesta SPRTN-a [48]. Zanimljivo, jedan pacijent imao je homozigotnu mutaciju izražavajući SPRTN- Δ C dok je kod druga dva pacijenta utvrđena heterozigotna mutacija oba alela pa su izražavali SPRTN-Y117C i SPRTN- Δ C [48]. SPRTN gen je iznimno važan za staničnu vijabilnost sisavaca što je uočeno na mišjem modelu. Generiranje miševa s delecijom gena za *Sprtn* (*Sprtn*^{-/-}) bilo je neuspješno te se pokazalo da je nedostatak *Sprtn*-a embrionalno letalan [50]. S druge strane, uspješno su generirani hipomorfni miševi (*Sprtn*^{H/H} i *Sprtn*^{H/-}) koji jako dobro oponašaju model Ruijs-Aalfs sindroma [50,51]. Uspoređujući kliničku sliku pacijenata i fenotipova postignutih na mišjem modelu možemo zaključiti da su mutirane varijante SPRTN proteina barem djelomično funkcionalne. Također možemo zaključiti da mutacije same po sebi ne uzrokuju nastanak Ruijs-Aalfs sindroma već smanjena efikasnost u uklanjanju DPC-ova, bilo zbog manje proteazne aktivnosti SPRTN-Y117C mutacije odnosno lokalizacije u citoplazmi kod SPRTN- Δ C, zaključak koji potvrđuje mišji model sa smanjenim izražajem *Sprtn*-a.



Slika 3. Transkripcijske varijante SPRTN gena te lokacije mutacija pronađenih u Ruijs-Aalfs sindromu .

1.3.1. Regulacija funkcije SPRTN-a

SPRTN je nespecifična proteaza sposobna degradirati bilo koji protein u kontaktu s molekulom DNA [3]. Ovakvo ponašanje je zorno prikazano na primjerima dvaju histona: H1 i H3; koje SPRTN efikasno degradira *in vitro* uz prisustvo DNA [13,52]. Kao takav, SPRTN je potencijalno iznimno opasan za funkciju i preživljavanje stanica pa su njegov izražaj, stabilnost i lokalizacija strogo regulirani [3]. Regulacija proteolitičke aktivnosti SPRTN-a kontrolirana je dvjema kontrolnim točkama na osnovi posttranslacijskih modifikacija na SPRTN proteinu, uključujući ubikvitinaciju, acetilaciju i fosforilaciju [3]. Prva kontrolna točka regulira sposobnost SPRTN-a da veže DNA dok druga kontrolna točka regulira stabilnost SPRTN-a vezanog na DNA. Kontrola vezanja SPRTN-a na molekulu DNA primarno je regulirana monoubikvitinacijom SPRTN-a u UBZ domeni [52,53]. Monoubikvitinacija SPRTN-a onemogućava vezanje na molekulu DNA, najvjerojatnije kroz konformacijsku promjenu samog proteina. Deubikvitinaza VCPIP1 (Eng: „*Valosin Containing Protein Interacting Protein 1*“) uklanja monoubikvitinaciju sa SPRTN-a, omogućujući vezanje za DNA [53]. Generirani VCPIP1^{-/-} miševi razvijaju Ruijs-Aalfs sindrom dodatno potvrđujući da su DPC-ovi glavni uzrok ovog sindroma [53]. Ovakva kontrola lokalizacije kroz ubikvitinaciju viđena je i kod drugih proteina. Na primjeru RAS obitelji proteina (Eng: „*Rat sarcoma virus*“) vidljivo je da ubikvitinacija na različitim pozicijama na proteinu regulira mjesto lokalizacije u stanici [54,55]. Nakon deubikvitinacije SPRTN biva acetiliran od strane PCAF (Eng: „*P300/CBP-Associated Factor*“) ili GCN5 (Eng: „*General Control Of Amino Acid Synthesis Protein 5*“) u BR domeni, pospješujući afinitet vezanja DNA. SPRTN također može biti fosforiliran u BR domeni pomoću CHK1 kinaze što također povećava afinitet vezanja DNA [8]. Stabilnost SPRTN-a također je regulirana monoubikvitinacijom UBZ domene, ali za razliku od već opisane monoubikvitinacije, ova se odvija nakon vezanja SPRTN-a na molekulu DNA. Trenutno nije poznata ubikvitin ligaza koja monoubikvitinira SPRTN nakon vezanja DNA, ali je eksperimentalno pokazano da E2 ubikvitin ligaza UBE2D3 (eng: „*Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D3*“) može monoubikvitinirati SPRTN *in vitro* [52]. Monoubikvitinacija SPRTN-a vezanog na DNA dovodi do trans-autoproteolitičke degradacije SPRTN-a, smanjujući količinu SPRTN-a vezanog za kromatin i time smanjujući potencijalnu opasnost od degradacije proteina koji nisu DPC. U slučaju da količina DPC-ova zahtijeva daljnju funkciju SPRTN-a, deubikvitinaze USP7 i USP11 deubikvitiniraju SPRTN, tako ga stabilizirajući, što omogućava zadržavanje veće količine SPRTN-a na kromatinu za popravak DPC-ova [52,56].

1.4. Metode za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova

Kao jedan od razloga koji čine istraživanje ovog tipa oštećenja DNA zahtjevnijim od ostalih zasigurno je nedostatak specifične i osjetljive metode za njihovu izolaciju i kvantifikaciju. To je dovelo do potrebe korištenja velikih doza tretmana za indukciju DPCova u eksperimentima u kojima se izoliraju DPC-ovi, dok se za funkcijske eksperimente koriste znatno manje doze, čineći rezultate ovakvih izolacija manje relevantnim kod objašnjenja ostvarenih rezultata [12,30]. Metode za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova mogu se podijeliti u dvije veće skupine: indirektne metode i direktne metode [57].

1.4.1. Indirektne metode

Indirektne metode za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova određuju udio DPC vezane u ukupnoj količini DNA u uzorku [57]. Kod ovog tipa DPC izolacija genomska DNA se usitnjava različitim metodama nakon čega se razdvaja DNA koja je vezana s DPC i slobodna DNA, na osnovu njihove različite topljivosti. U metode za indirektnu kvantifikaciju spadaju SDS-KCl precipitacija [58] i ARK esej [27]. KCl/SDS precipitacijska metoda za izolaciju DPC-ova je prva razvijena metoda specijalizirana za izolaciju ovog tipa oštećenja DNA. Bazirana je na netopivosti kalij dodecilsulfata u vodenoj otopini. Natrij dodecilsulfat je anionski surfaktant koji ima afinitet vezanja za proteine prilikom čega dovodi do njihove denaturacije. Dodatak KCl dovodi do nastanka kalij dodecil-sulfata, koji precipitira zajedno s proteinima na koje je bio vezan. U provođenju KCl/SDS precipitacijske metode stanice se liziraju te se DNA usitnjava na male fragmente veličine od 20,000 parova baza. Potom se iskorištava sposobnost KCl/SDS otopine da precipitira proteine kako bi razdvojili fragmente DNA koji na sebi sadržavaju kovalentno vezane proteine od onih koji ih ne sadržavaju. Rezultat metode prikazuje se kao udio (%) vezane DNA u ukupnoj količini izolirane DNA [58]. Velika prednost ovih metoda je što ne ovise o visokom stupnju čistoće izolirane DNA. Onečišćenje DNA topljivim proteinima i RNA ne stvara problem kod ovih metoda, jer je jedini mjereni parametar DNA. Velika mana im je nelinearnost signala DNA i kovalentno vezanih proteina, što otežava interpretaciju rezultata. Problemi kod izvođenja ovih tipova DPC izolacije mogu nastati zbog neujednačenog usitnjavanja molekule DNA što može dvojako utjecati na rezultat: veliki i mali fragmenti DNA će se izolirati jednako efikasno ako sadržavaju DPC „napuhujući“ rezultat količine DPC-vezane DNA. S druge strane neujednačenost usitnjavanja između uzoraka može dovesti do netočnih rezultata. Izolati indirektnih metoda se zbog postojanja

onečišćenja slobodnim proteinima (koji nisu DPC-ovi) ne mogu pouzdano koristiti za drugačije načine detekcije i analize DPC-ova, osim kvantifikacije DNA.

1.4.2. Direktne metode

Direktne metode za izolaciju DPC-ova kvantificiraju proteine koji su kovalentno vezani za DNA [57]. U metode za direktnu kvantifikaciju DPC-ova spadaju metoda označavanja radioaktivnim jodom ^{125}I , označavanje fluorescein izotiocijanatom (FITC) [57], ICE esej [59] te RADAR esej [26]. Metoda označavanja radioaktivnim jodom ^{125}I i označavanje FITC-om zasnivaju se na označavanje svih proteina u staničnom lizatu, nakon čega slijedi izolacija DNA/DPC-ova i mjerenje proteinskog signala odgovarajućom metodom. ICE esej koristi gradijent cezija za razdvajanje DNA/DPC-ova od topljivih proteina primjenom ultracentrifugiranja. RADAR esej izolira DPC-ove precipitacijom iz kaotropičnog denaturirajućeg pufera. Izolati ova dva eseja mogu se koristiti za detekciju DPC-ova različitim strategijama poput gel elektroforeze i bojanja proteina ili imunodetekcijom. RADAR esej je relativno nova i najcitiranija metoda za izolaciju DPC-ova. Specijaliziran je za izolaciju enzimskih DPC-ova nastalih korištenjem specifični inhibitora, prvenstveno TOPO1, čija primjena dovodi do stabilizacije prijelaznog kompleksa u kojemu je TOPO1 kovalentno vezana za molekulu DNA stvarajući tako trajni DPC. Kod kvantifikacije DPC-ova izoliranih RADAR esejom najčešće se primjenjuje „*slot-blot*“ tehnika [26,60] koja omogućava skraćivanje vremena potrebno za imunodetekciju. Izolati RADAR eseja također se mogu kvantificirati razdvajanjem na gelu i bojanjem proteina [30,46]. Najveća prednost direktnih metoda za kvantifikaciju DPC-ova je u proporcionalnosti između dobivenog signala i količine DPC-ova. Najveća mana ovih metoda je ovisnost o visokom stupnju čistoće uzorka. Onečišćenje izolata slobodnim proteinima predstavlja najveći izvor onečišćenja izolata i može značajno utjecati na kvalitetu izolata.

2. HIPOTEZE I CILJEVI

Ova disertacija ima dvije osnovne hipoteze:

I. Novom metodom za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova ćemo uspješno detektirati DPC-ove pri fiziološki relevantnim uvjetima, što će omogućiti praćenje dinamike popravka oštećenja DNA.

II. Put popravka DNA nakon oštećenja DPC-ovima sastoji od dva koraka:

- 1) proteoliza DPC lezije ovisna o SPRTNu, pri čemu na molekuli DNA zaostaju degradacijski produkti – peptidi
- 2) uklanjanje zaostalih degradacijskih produkata s molekule DNA preko klasičnih puteva za popravak DNA.

Ciljevi istraživanja:

1. Razvoj metode za izolaciju DPC-ova

Razvojem nove metode želimo dobiti bolji alat za proučavanje popravka DPC oštećenja. Nova metoda mora biti osjetljiva na fiziološki relevantne doze tretmana koji uzrokuju DPC oštećenja, mora biti specifična prema izolaciji DNA s kovalentno vezanim proteinima i u isto vrijeme uklanjati druge, nekovalentno vezane proteine, te selektivna u izolaciju same DNA, bez RNA onečišćenja. Validacija metode će se provesti koristeći nekoliko različitih metoda DPC indukcije (formaldehidom i UV zračenjem za izazivanje neenzimskih DPC-ova, topotekanom za izazivanje topoizomeraza I – DPC-ova, te cis-platinom za izazivanje trostrukih DNA-Pt-proteinskih kompleksa) te izolacijom DPC-ova iz stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a.

2. Koristeći razvijenu metodu definirati ključne korake u popravku DPC-ova

Pratiti ćemo dinamiku popravka DPC-ova za neenzimski i enzimski uzrokovane DPC-ove. Želimo definirati vremenski okvir u kojem dolazi do početka proteolitičke degradacije proteinskog dijela DPC-a. Također, želimo pokazati nakupljanje degradacijskih produkata nastalih proteolitičkom degradacijom te vremenski period njihova uklanjanja.

3. Definirati ulogu proteaze SPRTN te klasičnih puteva popravka DNA u rezoluciji DPC-ova

Nakon definiranja vremenskog okvira početka proteolize te uklanjanja zaostalih degradacijskih produkata, želimo dokazati da je popravak DNA koji se aktivira nakon DPC oštećenja ovisan o proteolizi. Naš cilj je definirati ulogu proteaze SPRTN i nekoliko proteina važnih za popravak DNA nakon oštećenja DPC-ovima. Da bismo dokazali ovisnost popravka DNA o proteolizi želimo definirati signalni put aktiviran nakon proteolize putem kojega dolazi do inicijacije popravka DNA.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i reagensi

Agar (Roth), Agarozna (Sigma), agarozna niske točke tališta (eng. *low-melting point agarose*; Zellx Biochem), akril amid (AppliChem), albumin goveđeg seruma (BSA) (Roth), amonijev persulfat (APS) (Sigma), Benzonaza nukleaza (E1014, Sigma), bezmasno mlijeko u prahu (Roth), boja za praćenje elektroforeze Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega), brom fenol plavo (Kemika), cinkov klorid (Fluka), Coomassie brilijant plavo (Roth), CIS-Diaminoplatina (P4394, Sigma-Aldrich), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0.5 µg/ml), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma), ditiotretitol (DTT) (Sigma), etanol (J.T. Baker), etidijev bromid (10 mg/ml) (Sigma), etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Roth), etilenglikol-bis (β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina (EGTA) (Roth), fenol crveno (Sigma), formaldehid (Merck), glicerol (Fagron), glicin (Roth), goveđi fetalni serum (Sigma-Aldrich), gvanidin hidroklorid (Sigma), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (HEPES) (Roth), histanol (Biognost), kalcijev klorid (Kemika), kalijev dihidrogenfosfat (Kemika), kalijev klorid (Kemika), kalijev hidrogenfosfat (Kemika), klorovodična kiselina (Kemika), koktel proteaznih inhibitora (Complete tablets Easy pack 04693116001, Roche) *p*-kumarinska kiselina (Sigma), Lipofectamine RNAiMAX transfekcijski reagens (Invitrogen 13778-150), Luminol (Sigma), „*Western blotting luminol reagent (Solution A and Solution B)*“ (Santa Cruz Biotechnology), magnezijev klorid (Kemika), medij za uzgoj stanica s visokim udjelom glukoze (*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*)(Sigma), 2-merkaptoetanol (Fluka), metanol (Sigma), Mowiol 4-88 reagens (Merk), N-Etilmaleimid (NEM) (Serva), Nitrocelulozne membrane (GVS), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma), N-lauroilsarkozin (Sigma), natrijev acetat (Kemika), natrijev azid (Kemika), natrijev deoksikolat (DOC) (Sigma), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth), natrijev fluorid (Fluka), natrijev hidroksid (Kemika), natrijev hidrogenfosfat heptahidrat (Kemika), natrijev klorid (Kemika), Nonidet P-40 (Sigma), octena kiselina (Kemika), Opti-MEM (Gibco), penicilin/streptomycin za stanične kulture (Sigma), Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, Pierce), piperazin-N, N'-bis(2-etansumporna kiselina) (PIPES) (Roth), Ponceau S (Roth), 2-propanol (Sigma), proteinaza K (7528, Roth), RNaza A (10109169001, Roche), Saharozna (Kemika), Topotecan hydrochloride hydrate (T2705, Sigma-Aldrich), tripan plavo (Sigma), tripsin-EDTA (Sigma), Triton-X-100 (AppliChem), TRIZMA base (Sigma), TRIzol reagens (Thermo Fisher Scientific), Tween-20 (Sigma), voda oslobođena od nukleaza (Invitrogen),

vodikov peroksid (Fargon), Quant-IT PicoGreen kit za kvantifikaciju dvolančane DNA (Invitrogen), 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma), Quant-IT PicoGreen komercijalni komplet (Thermo Fisher Scientific), proteinski biljeg: PL00002 (Proteintech), DNA biljeg: 100 pb DNA Step Ladder (Promega).

3.1.2. Male interferirajuće RNA

Kontrolna siRNA (siRNA-CTRL): 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G-3' (Eurofins) i siRNA specifična za SPRTN: siRNA-SPRTN, 5'-GUC AGG AAG UUC UGG UUA A-UA-3' (Microsynth).

3.1.3. Lista primarnih protutijela

Tablica 1:

| Naziv | Dobavljač | Identifikacija |
|--------------------------|---------------------------|--------------------|
| H3 | Santa Cruz Biotechnology | sc-517576 |
| NDHII (DDX9) | Santa Cruz Biotechnology | sc-137232 |
| β -Actin (ACTN) | Sigma-Aldrich | A5316-2ML |
| GAPDH | Proteintech | 10494-1-AP |
| p68 RNA helicase (DDX5) | Santa Cruz Biotechnology | scc-365164 |
| Vinkulin | Sigma-Aldrich | V9264 |
| HSP90 | Santa Cruz Biotechnology | sc-69703 |
| α -Tubulin (TUBA) | Sigma-Aldrich | T9026-2ML |
| VCP | Novus Biologicals | NB100-1557 |
| p73 | Cell Signaling Technology | #14620S |
| HDAC1 | Santa Cruz Biotechnology | sc-7872 |
| PARP1 | Cell Signaling Technology | #9542S |
| GRP78 | Proteintech | 11587-1-AP |
| PKM | Cusabio | CSB-PA018072DA01HU |
| XRCC3 | Proteintech | 18494-1-AP |
| TOPO1 | DSHB | CPTC-TOPI-1-S |
| γ H2Ax | Cell Signaling Technology | #9718S |
| ACTN4 | Cusabio | CSB-PA00814A0Rb |
| H3 | Santa Cruz Biotechnology | sc-517576 |
| NDHII (DDX9) | Santa Cruz Biotechnology | sc-137232 |
| β -Actin (ACTN) | Sigma-Aldrich | A5316-2ML |
| GAPDH | Proteintech | 10494-1-AP |
| BrdU (Bu20a) | Cell Signaling Technology | #5292S |
| PCNA | Santa Cruz Biotechnology | sc-56 |
| RANBP2 | Santa Cruz Biotechnology | sc-74518 |

| | | |
|-----------|---------------------------|--------------|
| E2F1 | Santa Cruz Biotechnology | sc-251 |
| Pol II | Santa Cruz Biotechnology | sc-55492 |
| p-ATM | Cusabio | CSB-PA465029 |
| Cyclin A | Santa Cruz Biotechnology | sc-751 |
| Cyclin D1 | Dako | M3642 |
| pH3 (S10) | Cell Signaling Technology | #9701 |

3.1.4. Lista sekundarnih protutijela

Tablica 2:

| Naziv | Dobavljač | Identifikacija |
|--|--------------|----------------|
| Goat anti-Rabbit IgG F(ab') ₂ Secondary Antibody, HRP | Invitrogen | 31461 |
| Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP secondary antibody | Dako Agilent | P044701-2 |
| AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H + L) | Invitrogen | A21206 |

3.1.5. Osnovne otopine korištene u radu

10× PBS puferska otopina (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 2 mM KH₂PO₄)

STAR esej puferske otopine: puferska otopina 1 (50 mM Tris–HCl (pH: 7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS); puferska otopina 2 (6 M guanidin–HCl, 10 mM Tris–HCl (pH: 6.5), 20 mM EDTA, 4% Triton X-100, 0.1% SDS and 1% DDT); puferska otopina 3 (16 mM NaOH u vodi)

RADAR esej pufer za lizu stanica (6M guanidin–HCl, 10mM Tris–HCl (pH6.5), 20mM EDTA, 4% Triton X100, 1% N-lauroilsarkozin, 1% DTT)

Puferi za frakcioniranje stanica: hipotonični pufer (10 mM HEPES (pH: 7.9), 10 mM KCl, 100 mM EDTA, 100 mM EGTA, 1 mM DTT); pufer za lizu jezgara (50 mM Tris–HCl (pH: 7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS); pufer za lizu kromatina (50 mM Tris–HCl (pH: 7.4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 jedinica Benzonaze nukleaze, 1% Triton X-100, 0.5% DOC, 0.1% SDS)

Pufer za pripremu staničnih lizata (RIPA pufer) (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 jedinica Benzonaze nukleaze, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS)

50 × TAE puferska otopina (2 M Tris, 5.7% ledene octene kiseline, 100 mM EDTA pH 8.0 otopljeni u vodi)

4 × Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8 (0.5 M Tris, 0.4% SDS u vodi)

4 × Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8.8 (1.5 M Tris, 0.4% SDS u vodi)

10 × pufer za elektroforezu (250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS otopljeni u vodi)

10 × pufer za prijenos (250 mM Tris, 2 M glicin u vodi)

6 × pufer za nanošenje uzoraka (Laemmli) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 5.6% SDS, 0.01% bromfenol plavo u vodi uz dodatak 9% 2-merkaptoetanol)

Ponceau S otopina (10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0.5% v/v Ponceau S u vodi)

Coomassie brilijant plavo otopina za bojanje proteina (CBB bojanje) (50% v/v metanol, 5% v/v octene kiseline, 0.4g Coomassie brilijant plavo boje u prahu, voda)

Otopina za odbojavanje CBB bojanja (20% v/v metanol, 10% v/v octena kiselina, u vodi)

Otopina za blokiranje membrana za imunodetekciju (TBS-BSA- NaN_3) (5% BSA, 0.1% NaN_3 , fenol crveno u sterilnom 1 × TBS-u, pH 7.4 u vodi)

10 × TBS pufer (500 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5 u vodi)

Otopina za ispiranje membrana (0.05% Tween 20 u 1 × TBSu)

Luminol otopina (2.5 mM luminol (otopljen u DMSO), 0.9 mM p-kumarinska kiselina (otopljena u DMSO), 100 mM Tris-HCl (pH=8.5), otopljeno u vodi)

0.02% otopina vodikovog peroksida (0.02% vodikov peroksid u 100 mM Tris-HCl (pH=8.5))

Otopine za blokiranje (3% BSA napravljena u 1X PBS-u; 5% bezmasno mlijeko u prahu u 1X PBS-u)

Pufer za preekstakciju (10 mM HEPES-KOH pH=7, 300 mM saharoza, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 0.2% Triton X-100 u vodi)

Pufer za fiksaciju stanica (2% paraformaldehida u PBS-u)

Pufer za permeabilizaciju stanica (0.15% Triton X-100 u PBS-u)

Otopina za ispiranje (0.05% Tween 20 u PBS-u)

MOWIOL otopina (2.4g Mowiol 4-88m, 6 g glicerola u 200 mM Tris-HCl (pH=8.5))

Pufer za lizu stanica za Komet esej (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 i 10% DMSO)

Pufer za elektroforezu za Komet esej (300 mM NaOH, 1 mM EDTA u vodi)

Pufer za neutralizaciju za Komet esej (50 mM Tris-HCl (pH=7.5) u vodi)

Etidij bromid otopina za bojanje stakalaca (0.2 mg/mL etidij bromida u TBSu)

DAPI otopina za bojanje stakalaca (100 µg/mL DAPI u TBSu)

Otopina za lizu stanica u KCl/SDS precipitaciji (2% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH=7.5))

Otopina za precipitaciju u KCl/SDS precipitaciji (200 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH=7.5))

3.1.6. Gelovi za gel elektroforeze

Agarozni gelovi za elektroforezu nukleinskih kiselina: gelovi su pripremljeni otapanjem 0.5 ili 1 g agaroze u $1 \times$ TAE puferu uz periodično miješanje i zagrijavanje do vrenja. Nakon hlađenja na temperaturu od 45 °C u gelove je dodan etidij bromid konačne koncentracije 0.2 mg/L. Otopina je izlivena u horizontalnu aparaturu za izlijevanje gelova te je u otopinu postavljen češljic.

SDS-poliakrilamidni gelovi za denaturirajuću elektroforezu proteina pripremljeni su u dva sloja. Donji sloj čini gel za razdvajanje pripremljen miješanjem 8-15% akrilamida (40% originalna koncentracija), $4 \times$ Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8.8, vode, APS-a i TEMED-a. Gornji sloj čini gel za sabijanje sastavljen od 4% akrilamida (40% originalna koncentracija), $4 \times$ Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6.8, vode, APS-a i TEMED-a. U gel za sabijanje umetnut je češljic.

Agarozni gelovi korišteni za uklapanje stanica u komet esej: gel za stvaranje podloge na predmetnom stakalcu napravljen je zagrijavanjem 1% agaroze u vodi. Gel za uklapanje stanica napravljen je otapanjem 2% agaroze niske točke tališta u vodi.

3.1.7. Biološki materijali

Istraživanje je provedeno na staničnim kulturama (Hela, U2OS i HepG2 staničnim linijama) kupljenim od kompanije German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), <https://www.dsmz.de/>).

3.1.8. Aparatura

Aparatura za elektroforezu Mini Protean 3 (Bio-Rad), aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad); aparatura za izlivanje gelova (Bio-Rad); svjetlosni i fluorescentni mikroskopi: Olympus BX43 (Olympus Corporation) i Olympus CHX41 (Olympus Corporation); inkubator za uzgoj stanica Hereaus Hera Cell 150 (Thermo Scientific), spektrofotometar NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific); sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad); termoblokovi: Thermo Shaker Incubator Thriller (Peqlab), Thermo Block TDP-120 (Biosan); uređaj za western blot dokumentaciju i analizu gelova ChemiDoc (Universal Hood II; Bio-Rad Laboratories, Inc.); UV transiluminator (Elchrom Scientific AG); vage (Mettler Toledo), vibracijska miješalica BioVortex V1 (Biosan), centrifuge: Centrifuge 5424 R (Ependorf), Heraus Fresco 17 centrifuge (Thermo Scientific) i multi-spin MSC-6000 (BioSan); pH-metar SevenCompact™ pH/Ion S220 (Mettler-Toledo); ljujalica see-saw rocker SSL4 (Stuart), laminari: ESCO laminar flow cabinet (Esco Scientific) i Fume Cupboard model VC150810ADST (Flores Valles); uređaj UVX digital Radiometer (E29567, UVP); uređaj UV-crosslinker (CL-508.G Crosslinker, Uvitec), spektrofotometar za očitavanje mikrotitarskih pločica (HiPo MPP-96, Biosan i Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, BioTek); UV transiluminator s kamerom Uvidoc HD6 (UVITEC), autoklav 5075 EL-D (Tuttnauer); hemocitometar 0.100 mm Tiefe Depth Profondeur Neubauer improved (Optik Labor); Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Fisher Scientific); QExactive HF Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific).

3.2. Metode

3.2.1. Rad s kulturama stanica

Hela, U2OS i HepG2 stanične linije uzgajane su u DMEM hranjivom mediju s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma i kombinacijom antibiotika penicilin/streptomycin (100 U/L).

Stanice su održavane u inkubatoru za uzgoj stanica na 37 °C u atmosferi s 5% CO₂. Za presađivanje (pasažu) stanica korištenja je otopina Tripsina s EDTA. Za smanjenje izražaja SPRTN gena stanice će biti transfecirane sa siRNA -CTRL ili siRNA-SPRTN korištenjem RNAiMAX transfekcijskog reagensa, prateći upute proizvođača. Za indukciju DPC-ova stanice su tretirane formaldehidom, topotekanom, UV zračenjem, *cis*-platinom ili vodikovim peroksidom. Za tretmane formaldehidom, formaldehid je razrijeđen u sterilnom PBS-u. Stanice su tretirane u koncentracijskom rasponu od 100 do 1600 µM formaldehida s varirajućom duljinom tretmana ovisno o eksperimentu. Za tretmane topotekanom, topotekan hidroklorid je otopljen u DMSO u koncentraciji od 50 mM. Stanice su tretirane s 3-60 µM otopine topotekana s varirajućom duljinom tretmana ovisno o eksperimentu. Tretman UV zračenjem napravljen je *UV-crosslinker*-om tretirajući stanice dozama od 1 do 24 mJ/cm². Za tretmane *cis*-platinom, *cis*-diaminplatina je otopljena u DMSO u koncentraciji od 100 mM. Stanice su tretirane koncentracijama od 50-200 µM u trajanju od 15 minuta. Za tretmane vodikovim peroksidom, vodikov peroksid je razrijeđen u PBS-u do koncentracije od 100 µM. Stanice su tretirane otopinom 100 nM vodikovog peroksida u trajanju od 15, 30 i 60 minuta. Za eksperimente koji uključuju oporavak stanica, stanice su tretirane DPC inducirajućim tretmanom (formaldehid, topotekan ili UV zračenje) određeni vremenski period,, nakon čega je tretman uklonjen, stanice su oprane tri puta PBS-om te im je dodan svježiji medij. Stanice su prikupljene nakon isteka naznačenog vremena oporavka.

3.2.2. Brojanje stanica i određivanje stanične vijabilnosti

Broj stanica prisutan nakon provođenja tretmana utvrđivan je brojanjem stanica pomoću hemocitometra. Nakon provedenog tretmana, medij iznad stanica je prikupljen, stanice su isprane PBS-om (koji je također prikupljen) te su stanice odvojene od podloge dodatkom tripsina. Tripsin je neutraliziran dodatkom medija za uzgoj stanica. Plutajuće stanice i stanice odvojene u ispiranju PBS-om su pribrojene tripsiniziranim stanicama, i razrijeđene u hranjivom mediju. Nakon kratkotrajnog miješanja pipetom izdvojena su dva reprezentativna alikvota (uzorka) iz svakog biološkog replikata. Izuzeti alikvoti su prije brojanja pomiješani s Tripan plavo reagensom u omjeru 10 : 1. Svaki alikvot analiziran je dva puta (četiri puta za svaki biološki replikat). Stanice koje su se obojale plavo smatrane su nevijabilnim (mrtvim).

3.2.3. DPC izolacija putem STAR eseja

STAR esej (eng: „*Superior method for True DNA–protein crosslinks Recovery (STAR) assay*“) je metoda razvijena u sklopu eksperimentalnog rada na kojemu se temelji ova disertacija. Za izolaciju DPC-ova, tretirane i prikupljene stanice su lizirane na ledu u puferu 1 suplementiranim mješavinom proteaznih inhibitora u trajanju od 15 minuta. Stanični lizat centrifugiran je pri $16\,000 \times g$ u trajanju od 15 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri čemu se peletira DNA. Nakon uklanjanja supernatanta, talozi su otopljeni u puferu 2 koji uklanja zaostale proteine s DNA, prilikom čega su jedini zaostali proteini oni kovalentno vezani na molekulu DNA (DPC-ovi). DNA se izolira dodatkom etanola u omjeru 3 : 1 u odnosu na pufer 2. Nakon nekoliko minuta inkubacije na ledu DNA je taložena centrifugiranjem pri $16\,000 \times g$ u trajanju od 15 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant je uklonjen, a talog ispran u 75% etanolu. Centrifugiranje je ponovljeno, supernatant uklonjen, a zaostali etanol uklonjen sušenjem na zraku. Talog je otopljen u puferu 3 koji je nakon otapanja djelomično neutraliziran dodatkom istog volumena 40 mM Tris–HCl (pH=7.5).

3.2.4. DPC izolacija putem RADAR eseja

Izolacija DPC-ova putem RADAR eseje napravljena je kako je opisano u originalnoj publikaciji [26].

3.2.5. DPC izolacija KCl/SDS precipitacijom

Izolacija DPC-ova KCl/SDS precipitacijom napravljena je kako je opisano u publikaciji Borgermann et al. [61] uz minimalne izmjene. Izmjena uključuje smrzavanje uzoraka u tekućem dušiku nakon inicijalne lize stanica, nakon čega su sutradan uzorci naglo odmrznuti na termobloku pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (300 rpm), prije sonikacije. Mjerenje izolirane slobodne i DPC vezane DNA napravljeno je korištenjem Quant-IT PicoGreen komercijalnog kompleta za kvantifikaciju dvolančane DNA prateći upute proizvođača na Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader uređaju za mjerenje fluorescencije na mikrotitarskim pločama.

3.2.6. DNA izolacija

DNA izolacija napravljena je korištenjem komercijalnog reagensa za izolaciju DNA (TRIzol reagens) prateći upute proizvođača. U eksperimentima u kojima se količina uzorka određuje prema količini DNA, DNA je izolirana etanolnom precipitacijom iz kompletnog

staničnog lizata ili pojedine stanične frakcije. Etanolna precipitacija je napravljena dodatkom etanola u omjeru 3 : 1 u odnosu na alikvot kompletnog staničnog lizata ili pojedine stanične frakcije. Nakon nekoliko minuta inkubacije na ledu, DNA je taložena centrifugiranjem pri 16 000 × g u trajanju od 15 minuta na 4 °C. Supernatant je uklonjen, a talog ispran u 75% etanolu. Centrifugiranje je ponovljeno, supernatant uklonjen, a zaostali etanol uklonjen sušenjem na zraku. Talog je otopljen u puferu 3 koji je nakon otapanja djelomično neutraliziran dodatkom istog volumena 40 mM Tris-HCl (pH=7.5).

3.2.7. Stanično frakcioniranje

Stanice su resuspendirane u hipotoničnom puferu koji je suplementaran mješavinom proteaznih i fosfataznih inhibitora. Nakon 15 minuta inkubacije na ledu dodano je 0.6% v/v NP-40. Nakon nježnog miješanja naginjanjem tubice nekoliko puta, jezgre su taložene centrifugiranjem pri 400 × g u trajanju od 5 minuta. Supernatant je prikupljen (citoplazmatska frakcija), a jezgre su resuspendirane u puferu za lizu jezgara koji je suplementiran mješavinom proteaznih i fosfataznih inhibitora te inkubirane 2 minute. Uzorak je centrifugiran pri 16 000 × g u trajanju od 15 minuta na 4 °C. Supernatant je prikupljen (nukleoplazmatska frakcija), a talog je otopljen u puferu za lizu kromatina suplementiranim mješavinom proteaznih i fosfataznih inhibitora i inkubiran na 37 °C u trajanju od 15 minuta. Za eksperimente u kojima je DNA korištena za kontrolu količine, u pufer za lizu kromatina dodana je Benzonaza nukleaza, nakon izuzimanja manjeg alikvota koji će se koristiti za DNA kvantifikaciju.

3.2.8. Kvantifikacija DNA

DNA je kvantificirana korištenjem spektrofotometrije na aparatu NanoDrop 1000. Za eksperimente u kojima količina uzorka određuje prema količini DNA, koncentracija i kvaliteta DNA su dodatno vizualizirani elektroforezom u agaroznom gelu. Uzorci DPC-ova izolirani RADAR esejom su prije kvantifikacije DNA tretirani RNazom A (20 jedinica) na 37 °C tijekom 15 minuta. Svi uzorci za DNA kvantifikaciju prethodno su tretirani Proteinazom K na 55 °C u trajanju od 1 - 2 h te pročišćeni etanolnom precipitacijom.

3.2.9. Kvantifikacija proteina

Proteini su kvantificirani korištenjem komercijalnog kompleta za BCA esej, prateći upute za kvantifikaciju na mikrotitarskoj ploči prema uputama proizvođača. U eksperimentima koji su uključivali kvantifikaciju proteina korištenjem BCA esejja DNA je korištena kao kontrola

nanošenja uzoraka. Nakon provedenog esejja apsorbancija je mjerena pri 562 nm korištenjem spektrofotometra za očitavanje mikrotitarskih pločica (HiPo). Relativna kvantifikacija proteina napravljena je normalizacijom rezultata s apsorbancijom izmjenom u kontrolnim uzorcima.

3.2.10. Denaturirajuća elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Za razdvajanje proteina ovisno o njihovoj veličini korištena je denaturirajuća elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Svi uzorci korišteni za SDS-PAGE su tretirani s 50 jedinica Benzonaza nukleaze uz dodatak 5 mM MgCl₂ na 37 °C u trajanju od 15 minuta, u svrhu uklanjanja DNA koja ometa razdvajanje proteina. Uzorci su pomiješani s 6 × Laemmli puferom i zagrijani na 95 °C u trajanju od 5 minuta, što dovodi do denaturacije proteina. Prilikom elektroforeze DPC izolata, DNA je korištena za normalizaciju rezultata. SDS-PAGE je provedena pri jakosti struje od 35 mA po gelu u trajanju od 75 minuta.

3.2.11. Vizualizacija količine proteina

Za vizualizaciju količine proteina korišteno je CBB bojanje SDS-poliakrilamidnih gelova. Nakon provedene SDS-PAGE kako je prethodno opisano, gelovi su uronjeni u CBB otopinu u trajanju od 10 minuta uz konstantno miješanje. CBB otopina je potom uklonjena, a nevezana CBB boja iz gela je uklonjena otopinom za odbojavanje. U otopinu za odbojavanje je u više navrata dodan i zamijenjen bijeli papirnati ubrus, koji veže višak CBB-a, ubrzavajući postupak odbojavanja. Odbojavanje je završeno kada je gel bezbojan, a proteinske vrpce obojane plavim obojenjem.

3.2.12. Imunodetekcija

Za potrebe imunodetekcije proteini su, nakon razdvajanja SDS-PAGE-om, preneseni iz SDS-poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu. Za to je korišten protokol za elektroforetski transfer u 1 × puferu za prijenos proteina, uz dodatak 20% metanola, pri 200 mM u trajanju od 90 minuta. Uspješnost prijena proteina potvrđena je bojanjem membrana u Ponceau S otopini. Nakon uklanjanja Ponceau S boje, membrane su blokirane otopinom za blokiranje membrana, u minimalnom trajanju od 1 sat. Imunodetekcija započinje uranjanjem membrana u otopinu primarnog protutijela razrijeđenog u otopini za blokiranje membrana, pri tom koristeći razrjeđenja prema uputama proizvođača. Nakon inkubacije uz konstantno ljuhanje u trajanju od minimalno 2 sata, membrane su ispirane 3 puta po 15 minuta u otopini za ispiranje membrana. Membrane su potom uronjene u otopinu sekundarnog protutijela razrijeđenog u otopini za

blokiranje u omjeru 1 : 10 000. Sekundarna protutijela obilježena su peroksidazom iz hrena (eng. Horseradish peroxidaze-HRP) što omogućuje vizualizaciju proteinskih vrpce metodom kemiluminiscencije. Nakon inkubacije od 45 minuta membrane su isprane 3 puta u otopini za ispiranje membrana. Detekcija proteinskih vrpce provedena je na uređaju ChemiDoc. Za razvijanje signala korištena je 1 : 1 smjesa Luminol otopine i 0.02% otopine vodikovog peroksida. Za slabe signale korištene su komercijalne otopine za detekciju „*Western blotting luminol reagent (Solution A and Solution B)*“.

3.2.13. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) provedena je na uzorcima DPC izolata iz netretiranih stanica i stanica tretiranih s 400 μ M otopinom formaldehida u trajanju od 15 minuta, te iz jezgrinih frakcija dobivenih staničnim frakcioniranjem netretiranih stanica. Uzorci su kratko razdvajani metodom SDS-PAGE (dozvoljen je ulazak proteinske fronte do 2 cm duljine gela za razdvajanje), nakon čega su pojedine staze izrezane iz gela. Svaka staza također je prerezana prema bilježu za veličinu proteina na veličini od 60 kDa te je svaki komad gela analiziran odvojeno. Da bi izbjegli mogućnost nenamjerne kontaminacije uzoraka za dokazivanje postojanja degradacijskih fragmenata uzimani su u obzir samo proteini molekulske mase veće od 90 kDa (nalaze se u gornjoj polovici gela). Prisutnost specifičnih peptida ovih izabranih meta u daljnjoj polovici gela ukazuje da se radi o degradacijskim produktima. Za prikaz rezultata izabrano je 10 nuklearnih proteina molekulske mase veće od 90 kDa koji su bili najinduciraniji nakon FA tretmana te TOPO1 protein koji je jedan od najproučavanijih DPC-ova. Na izrezanim komadima poliakrilamidnog gela provedena je digestija tripsinom prema prethodno opisanom postupku [17]. Ekstrahirani peptidi su izolirani korištenjem C18 StageTips kako je prethodno opisano [18] te su podvrgnuti analizi tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Analiza je provedena na uređaju Easy-nLC 1200 UHPLC (Eng: „*Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*“) spregnutim s QExactive HF Orbitrap spektrometrom masa kako je prethodno opisano [19]. Dobiveni spektri masa uspoređeni su s bazom UniProt korištenjem programa za pretraživanje Andromeda [20].

3.2.14. Imunofluorescencija

Za potrebe imunofluorescencije, Hela stanice su uzgajane na pločama za uzgoj stanica u koje su polegnuta sterilizirana stakalca za imunofluorescenciju. Stanice su tretirane s 400 μ M

otopinom formaldehida tijekom 15, 30 i 60 minuta. Stakalca su premještena u pločice s 12 bunarića i oprane PBS-om. Nakon ispiranja provedena je predekstrakcija s dvije uzastopne inkubacije u puferu za predekstrakciju, u trajanju od 5 minuta po inkubaciji, uz povremeno miješanje. Stanice su isprane u PBS-u 3 puta po 5 minuta a nakon toga fiksirane u puferu za fiksaciju u trajanju od 20 minuta uz povremeno miješanje. Fiksirane stanice su isprane 3 puta u PBS-u, nakon čega su permeabilizirane u puferu za permeabilizaciju u trajanju od 20 minuta uz povremeno miješanje. Nakon 3 nova ispiranja u PBS-u, stakalca su blokirana korištenjem otopine za blokiranje, u trajanju od 1 sat. Nakon inkubacije otopina za blokiranje je uklonjena, a na stakalca je nanoseno primarno protutijelo otopljeno u otopini za blokiranje, u kojem je inkubirano 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata stakalca su isprana 3 puta u otopini za ispiranje, nakon čega je na stakalca nanoseno sekundarno protutijelo obilježeno fluoroforom AlexaFluor 488 otopljeno u puferu za blokiranje, u kojem su inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon 4 ispiranja u otopini za ispiranje stakalca su lagano posušena te su postavljena na predmetno stakalce, na koje je prethodno nanoseno 5 μ L MOWIOLa s 0.5 ng/mL DAPI boje za DNA, pazeći pri tom da stakalca orijentiramo stanicama prema dolje. Rezultati imunofluorescencije vizualizirani su na mikroskopu Olympus CHX41.

3.2.15. Komet esej u denaturirajućim uvjetima

Komet esej u denaturirajućim uvjetima korišten je za vizualizaciju oštećenja DNA uzrokovanih DPC-ovima. DPC-ovi su inducirani tretiranjem Hela stanica korištenjem FA ili TOPO tretmana kako je navedeno za pojedini eksperiment. Za pozitivnu kontrolu je korišten tretman UV zračenjem u dozi od 1 mJ/cm². Stanice su nakon provedenih tretmana tripsinizirane, oprane i resuspendirane u PBSu. Suspenzija stanica je pomiješana u omjeru 1 : 1 s agaroznim gelom za uklapanje stanica, ohlađenim na temperaturu od 40 °C. Tako pripremljena smjesa nanosena je u tankom sloju na agarozom presvučeno predmetno stakalce (predmetnicu) i puštena da polimerizira na ledu. Nakon polimerizacije napravljena je liza stanica u gelu korištenjem pufera za lizu stanica za Komet esej. Nakon 1 sat inkubacije na 4 °C predmetnice su isprane u hladnom PBSu prije prekonoćne inkubacije u otopini Proteinaze K na 4 °C. Nakon digestije, predmetnice su inkubirane u puferu za elektroforezu za Komet esej u trajanju od 10 minuta, nakon čega je provedena elektroforeza pri 300 mA (~30V) u trajanju od 20 minuta. Zbog bazičnosti korištenog pufera, predmetnice su neutralizirane otopinom za neutralizaciju, nakon čega su „kometi“ obojeni korištenjem otopine etidij bromida ili DAPI-ja. Predmetnice su ponovno isprane u otopini za

neutralizaciju, nakon čega su posušene. Vizualizacija kometa napravljena je korištenjem mikroskopa Olympus CHX41.

3.2.16. BrdU komet esej u denaturirajućim uvjetima

Prije tretmana, Hela stanice su uzgajane 1 h u kompletnom mediju za uzgajanje stanica uz dodatak 10 μ M BrdU. Stanice su potom tretirane s 400 μ M FA u trajanju od 2 i 5 h. Stanice su potom tripsinizirane, oprane i resuspendirane u PBSu. Suspenzija stanica je pomiješana u omjeru 1 : 1 s agaroznim gelom za uklapanje stanica, ohlađenim na temperaturu od 40 °C. Tako pripremljena smjesa nanosena je u tankom sloju na agarozom presvučenu predmetnicu i puštena da polimerizira na ledu. Nakon polimerizacije napravljena je liza stanica u gelu korištenjem pufera za lizu stanica za Komet esej. Nakon 1 sat inkubacije na 4 °C predmetnice su isprane u hladnom PBS-u prije prekonoćne inkubacije u otopini Proteinaze K na 4 °C. Potom su predmetnice inkubirane u puferu za elektroforezu za Komet esej u trajanju od 10 minuta, nakon čega je provedena elektroforeza pri 300 mA (~30V) u trajanju od 20 minuta. Zbog bazičnosti korištenog pufera, predmetnice su neutralizirane otopinom za neutralizaciju. Potom su predmetnice uronjene u otopinu primarnog protutijela (anti-BrdU) u PBS-u i inkubirane 1 h, nakon čega su isprane tri puta u hladnom PBS-u i inkubirane 1 h u otopini sekundarnog fluorescentnog protutijela AlexaFluor 488. Nakon tri ispiranja hladnim PBS-om napravljeno je bojanje DNA u otopini DAPI-ja. Predmetnice su ponovno isprane u otopini za neutralizaciju, nakon čega su posušene. Vizualizacija kometa napravljena je korištenjem mikroskopa Olympus CHX41.

3.2.17. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je korištenjem programa GraphPad Prism (verzije 9). Prije odabira testa napravljena je provjera raspodjele podataka primjenom Shapiro-Wilk testa za normalnost raspodjele s α -vrijednošću 0,05. Rezultati testa $p > 0,05$ smatrani su normalno raspoređenim. Normalno raspoređene podatke analizirali smo parametrijskim testovima. Eksperimenti koji sadrže tri ili više skupina s jednom varijablom analizirani su one-way ANOVA testom. Post hoc analiza ovih rezultata napravljena je primjenom Tukey-evog ili Dunnet-ovog testa za višestruku komparaciju. Za eksperimente koji sadrže više varijabli primijenjen je two-way ANOVA test. Post hoc analiza ovakvih rezultata napravljena je primjenom Dunnet-ovog ili Sidak-

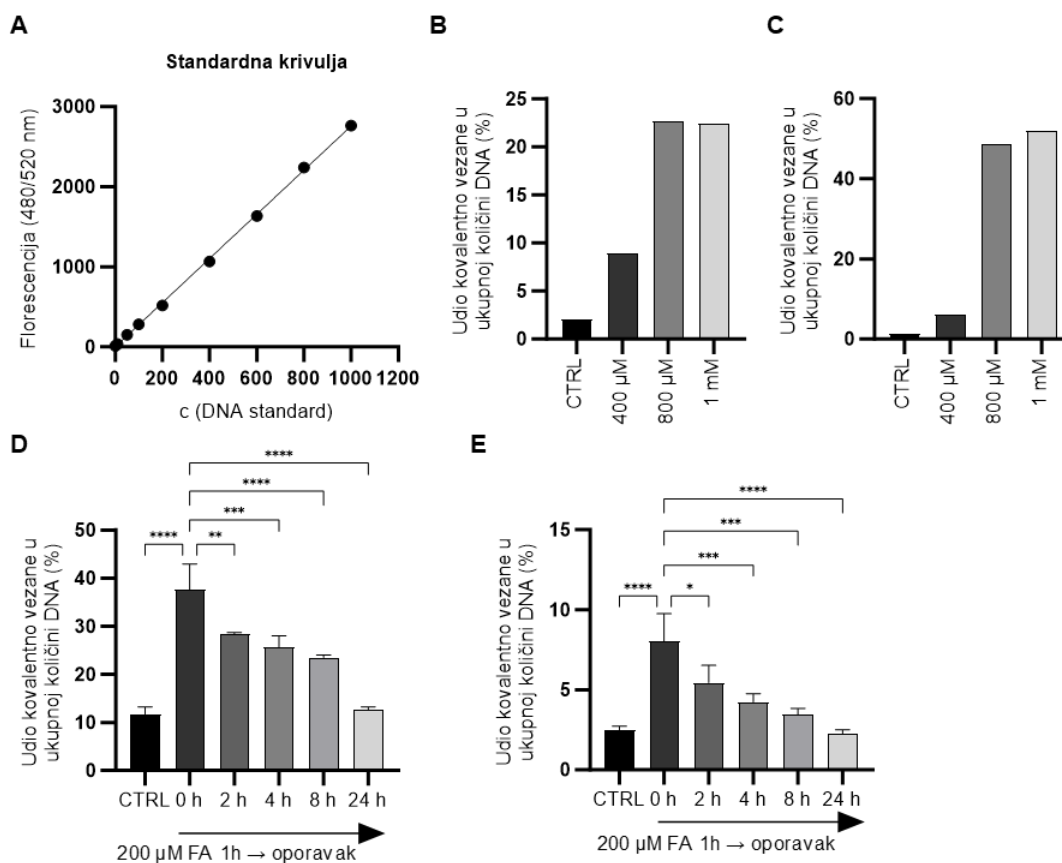
ovog testa za višestruku komparaciju. Rezultati komet eseja imali su iskrivljenu (ne Gaussovu) raspodjelu podataka pa su analizirani Brown-Forsythe-ovim ANOVA testom za iskrivljenu (ne Gaussovu) raspodjelu podataka. Post hoc analiza napravljena je Dunnet-ovim T3 testom za višestruku komparaciju. Samo rezultati s izračunatom vrijednošću vjerojatnosti (p) ispod 0,05 ($p < 0,05$) smatrani su značajnima u bilo kojoj provedenoj analizi. Simboli za različite razine značajnosti testa dodijeljeni su kako slijedi: nije značajno (ns) za $p > 0,05$; * za $p < 0,05$; ** za $p < 0,001$; *** za $p < 0,0001$ i **** za $p < 0,00001$. Svi podaci za mjerene varijable prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD) (Eng: „mean \pm standard deviation“). Eksperimenti na kojima je provedena statistička obrada sadržavali su tri ili više bioloških replikata ($n \geq 3$).

4. REZULTATI

4.1. Razvoj STAR eseja

4.1.1. Izolacija DPC-ova KCl/SDS precipitacijom

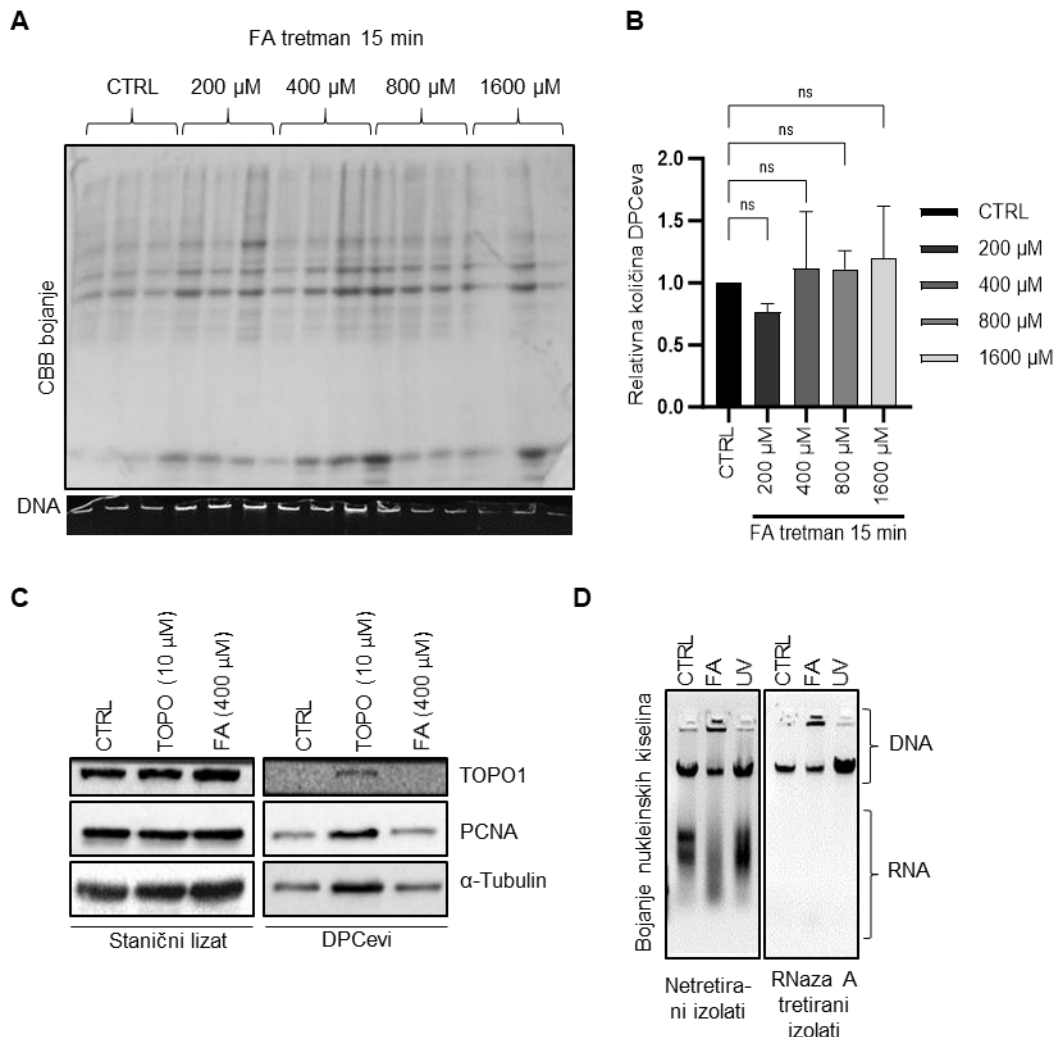
Primjenom KCl/SDS precipitacije demonstrirana je efikasnost ove metode u izolaciji DPC-ova na HepG2 i U2OS stanicama koje smo tretirali rastućom koncentracijom FA 1 h da izazovemo DPC-ove koje smo potom izolirali primjenom ove metode. Mjerena je fluorescencija PicoGreen boje za DNA, a da bi odredili količinu izmjerene DNA napravljena je standardna krivulja (Slika 4 A). Rezultati izolacije DPC-ova na HepG2 staničnoj liniji prikazani su na slici 4 B dok su rezultati izolacije DPC-ova na U2OS dani na slici 4 C. Možemo primijetiti da su rezultati izolacije DPC-ova nerazmjerni između dvije stanične linije. Da bi testirali osjetljivost ove metode HepG2 i U2OS stanice su tretirane s 200 μ M FA 1 h, nakon čega je FA uklonjen i stanicama je omogućeno da se oporave. Nakon izolacije DPC-ova KCl/SDS metodom vidljivo je da su tijekom trajanja oporavka i HepG2 (Slika 4 D) i U2OS (Slika 4 E) stanice uspješno smanjile broj fragmenata DNA koji je na sebi sadržavao kovalentno vezani protein.



Slika 4. Rezultati izolacije DPC-ova KCl/SDS metodom. (A) Standardna krivulja određena mjerenjem fluorescencije poznatih koncentracija DNA pomoću PicoGreen boje pri 520 nm. (B) Udio fragmenata DNA koji sadržavaju kovalentno vezani protein u ukupnoj količini DNA izolirane iz HepG2 stanica tretiranih s 400 μ M FA 1 h. (C) Udio fragmenata DNA koji sadržavaju kovalentno vezani protein u ukupnoj količini DNA izolirane iz HepG2 stanica tretiranih s FA 24 h. (D) Udio fragmenata DNA koji sadržavaju kovalentno vezani protein u ukupnoj količini DNA izolirane iz U2OS stanica tretiranih s 200 μ M FA 1 h nakon čega je FA uklonjen i stanice su se oporavljale naznačeni vremenski period. (E) Udio fragmenata DNA koji sadržavaju kovalentno vezani protein u ukupnoj količini DNA izolirane iz HepG2 stanica tretiranih s 200 μ M FA 1 h nakon čega je FA uklonjen i stanice su se oporavljale naznačeni vremenski period. Statistička analiza napravljena je pomoću statističkih testova One-Way ANOVA i Dunnet-ovim testom, kao *post-hoc* analiza.

4.1.2. Izolacija DPC-ova RADAR esejom

Primjenom RADAR esej demonstrirana je efikasnost ove metode u izolaciji DPC-ova. Hela stanice su tretirane rastućim koncentracijama FA 15 minuta, nakon čega su izolirani DPC-ovi. DPC-ovi su razdvojeni primjenom SDS-PAGE te bojani CBB bojanjem dok je kontrola nanošenja uzorka određena bojanjem DNA etidij bromidom (slika 5 A). Rezultati kolorimetrijske kvantifikacije dani su na slici 5 B. Postoji tendencija povećanja količine proteinskog signala s porastom koncentracije FA, ali ostvareni rezultati nisu statistički značajni. Pošto je RADAR esej primarno imunodetekcijska metoda, Hela stanice su tretirane topotekanom (TOPO) i FA 15 min, nakon čega su DPC-ovi izolirani RADAR metodom te imunodetektirani. Iz rezultata (slika 5 C) imunodetekcije je vidljivo da je RADAR esej uspješno izolirao TOPO1-DPC-ove nastale korištenjem inhibitora, no imunoblot PCNA i α -tubulina pokazuje onečišćenost uzoraka topljivim proteinima koje nismo očekivali u kontrolnom ni TOPO tretiranom uzorku, dok smo očekivali pojavu PCNA u FA tretmanu jer PCNA obavlja funkcije u metabolizmu DNA. Čistoća izolata RADAR esej provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu, nakon čega su nukleinske kiseline bojane etidij bromidom (slika 5 D). Iz rezultata je vidljivo onečišćenje izolata s RNA koje je dokazano obradom izolata RNazom A, nakon čega bojanje RNA nestaje. Možemo zaključiti da RADAR esej izolira DPC-ove, ali da onečišćenje izolata otežava njihovu identifikaciju i kvantifikaciju.

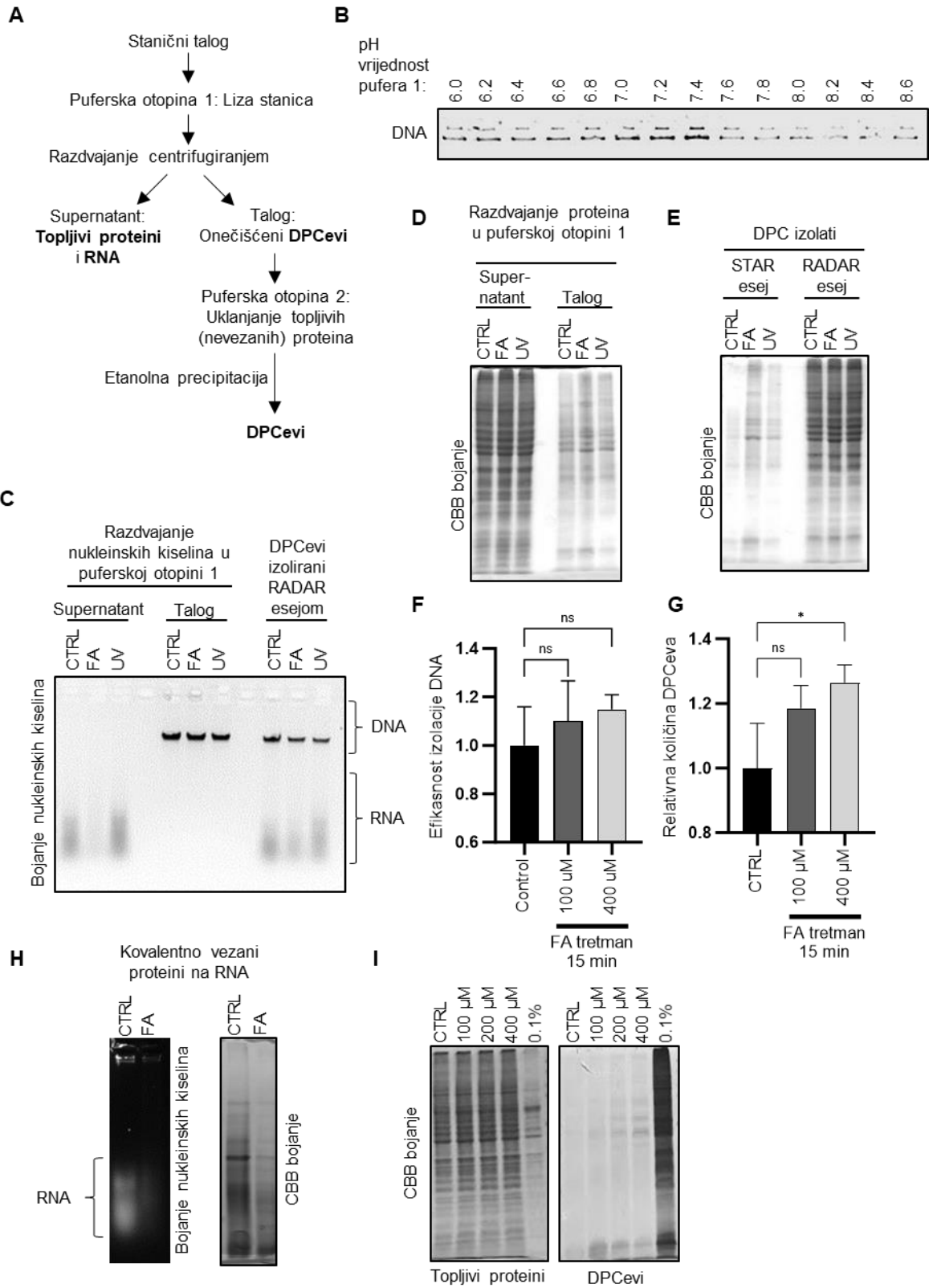


Slika 5. Rezultati izolacije DPC-ova RADAR esejom. (A) DPC-ovi izolirani RADAR esejom iz HeLa stanica tretiranih s 200, 400, 800 i 1600 μM FA 15 min u triplikatu. Kontrola nanošenja uzoraka napravljena je prema količini DNA bojane etidij bromidom. Proteini su vizualizirani CBB bojanjem. (B) Kvantifikacija eksperimenta pod A. Statistička analiza napravljena je pomoću One-Way ANOVA i Dunnet statističkih testova kao post-hoc analiza. (C) Imunodetekcija odabranih proteina na staničnim lizatima i DPC izoliatima dobivenih RADAR esejom iz HeLa stanica tretiranih s 10 μM topotekana (TOPO) i 400 μM FA 15 min. (D) HeLa stanice su tretirane s 400 μM FA 15 min i 2 mJ/cm² UV zračenja nakon čega su izolirani DPC-ovi RADAR esejom. Izolati su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu i bojanjem etidij bromidom. Prisutnost onečišćenja s RNA dokazana je tretmanom RNazom A i ponavljanjem elektroforeze.

4.1.3. Metodologija STAR eseja

Nakon testiranja dvije najcitiranije metode za izolaciju DPC-ova i identifikacije njihovih prednosti i mana odlučili smo osmisliti vlastiti esej za izolaciju DPC-ova. Esej ne smije biti vremenski zahtijevan, mora biti jednostavan za primjenu te izolirati DNA/DPC-ove visoke čistoće, bez topljivih proteina, tako omogućavajući preciznu identifikaciju i kvantifikaciju proteina koji stvaraju DPC-ove, ali i druge analize same molekule DNA. Novi esej, nazvan STAR (eng: „*Superior method for True DNA–protein crosslinks Recovery (STAR) assay*“), osmišljen je kao dvostupanjski postupak gdje se u prvom koraku DNA/DPC-ovi razdvajaju od topljivih proteina i RNA. Drugi korak postupka uklanja sve preostale ne-kovalentno vezane proteine s molekule DNA ostavljajući DPC-ove kao jedini izvor proteina u konačnom izolatu (slika 6 A). Da bismo izbjegli probleme koji se javljaju u RADAR eseju koji proizlaze zbog etanolne precipitacije (precipitiraju i DNA i RNA i proteini) potrebno je osmisliti novi sastav pufera za lizu stanica u kojem DNA/DPC-ovi neće biti topljivi dok RNA i proteini hoće, što bi omogućilo izdvajanje DNA/DPC-ova centrifugiranjem. Prilikom testiranja sastava puferske otopine 1 primijetili smo iznimnu važnost pH vrijednosti pufera. Vrijednost pH od 7.4 jedinice pokazala se najuspješnijom u izolaciji DNA dok čak i manji odmaci u kiselom ili bazičnom smjeru smanjuju efikasnost izolacije DNA (slika 6 B). Da bi potvrdili efikasnost razdvajanja nukleinskih kiselina supernatant i talog dobiveni nakon lize u puferskoj otopini 1 analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu i bojanjem etidij bromidom. Za usporedbu, na gel su naneseni uzorci DPC izolata dobivenih RADAR esejom. Rezultati pokazuju efikasno razdvajanje RNA, koja ostaje u supernatantu, dok se DNA/DPC-ovi talože centrifugiranjem (slika 6 C). DPC-ovi izolirani RADAR esejom sadržavaju DNA i RNA. Uzorci razdvajanja u puferskoj otopini 1 su dalje analizirani pomoću SDS-PAGE i CBB bojanja. Rezultati ukazuju da velika većina proteina ostaje u supernatantu dok talozi sadržavaju podjednaku količinu proteina neovisno o tome da li su stanice bile tretirane ili ne (slika 6 D). To ukazuje da su DNA/DPC izolati onečišćeni proteinima koji su se precipitirali u puferskoj otopini 1. Da bi uklonili ovo onečišćenje primijenjena je puferaska otopina 2 koja je iznimno efikasna u otapanju proteina zbog visokog udjela iona i visokih doza deterdženata. DNA/DPC-ovi su izolirani etanolnom precipitacijom. Ovako dobiveni DPC izolati analizirani su SDS-PAGE-om i CBB bojanjem te uspoređeni s DPC-ovima izoliranima RADAR esejom. Rezultati jasno pokazuju veću ukupnu količinu proteina u svim RADAR izolatima te puno veću osjetljivost STAR eseja prema DPC inducirajućim tretmanima u odnosu na RADAR esej (slika 6 E). Pošto je prethodno zabilježeno da

DPC-ovi smanjuju efikasnost izolacije DNA, iz Hela stanica tretiranih formaldehidom izolirani su DPC-ovi STAR esejom. Rezultati ukazuju da nema značajnog gubitka DNA u ovom rasponu doza FA (slika 6 F). Isti DPC izolati su korišteni za kolorimetrijsku kvantifikaciju proteina. Iz rezultata je vidljiv porast količine proteina ovisno o koncentraciji. Doza od 100 μM nije pokazala značajan rezultat (iako postoji tendencija porasta) dok je 400 μM dala značajan rezultat (slika 6 G). Prilikom tretmana koji uzrokuju nastanak nespecifičnih DPC-ova u stanicama možemo očekivati i kovalentno vezanje proteina na RNA molekule stvarajući RPC-ove (eng: „RNA-protein crosslinks“). Da bi utvrdili može li STAR esej izolirati RPC-ove, RNA je precipitirana etanolom iz puferske otopine 1, nakon čega je pelet podvrgnut istom postupku čišćenja kao i DPC-ovi. Kao što se vidi na slici 6 H, STAR esej protokol se može uspješno modificirati s ciljem izolacije RPC-ova. Visoke doze FA koriste se prilikom fiksacije stanica. Uloga FA je da međusobno „zalijepi“ fizički bliske stanične komponente poput DNA, RNA i proteina, stvarajući stabilan uzorak za daljnju analizu. Da bi vidjeli kao visoke doze FA utječu na DPC izolaciju, Hela stanice su tretirane fiziološki relevantnim dozama (100, 200 i 400 μM) ili visokom dozom (0.1%) FA u trajanju od 15 minuta, nakon čega su DPC-ovi izolirani STAR esejom. Iz rezultata se vidi da fiziološki relevantne doze sadržavaju malu količinu proteina dok 0.1% FA izaziva kovalentno vezivanje velike većine svih proteina u stanicama koji se onda izoliraju kao DPC-ovi (slika 3 I). Ovi rezultati pokazuju da je pri istraživanju DPC-ova vrlo važno primjenjivati samo fiziološki relevantne (realne) doze tretmana te da visoke doze mogu onemogućiti pouzdanu analizu.

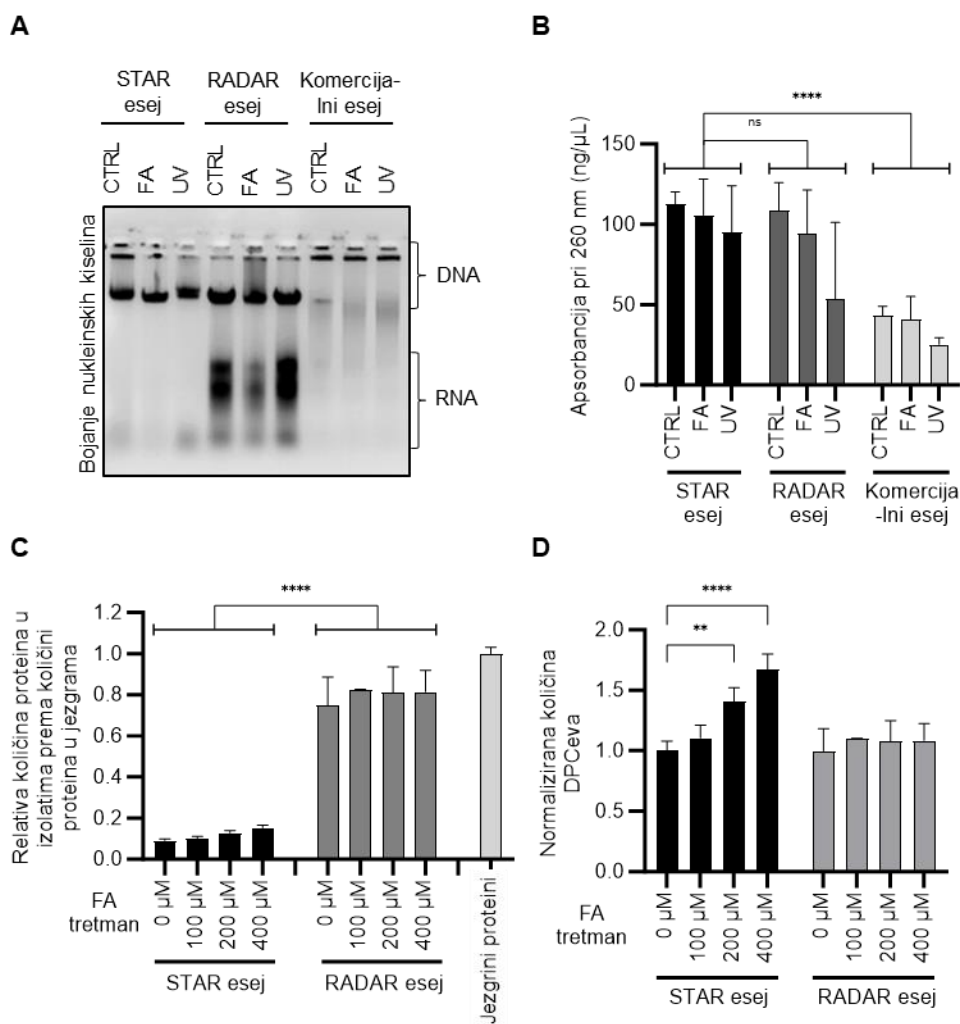


Slika 6. Razvoj STAR eseja za izolaciju DPC-ova. (A) Idejni nacrt STAR eseja čija bi provedba trebala smanjiti količinu onečišćenja u konačnom izolatu te biti kompatibilna sa različitim načinima detekcije prisutnih DPC-ova. (B) Optimizacija pH vrijednosti puferne otopine 1 kojom bi se postiglo maksimalno iskorištenje prilikom izolacije DNA/DPC-ova. (C) Razdvajanje DNA/DPC-ova od RNA u pufernoj otopini 1 kao prvi korak STAR eseja. Hela stanice su tretirane sa FA (400 μ M 15 min) i UV zračenjem (2 mJ/cm², 5 minuta oporavka), lizirane u puferu 1 i centrifugirane. Rezultati razdvajanja analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu i bojanjem etidij bromidom te su uspoređeni sa rezultatima DPC izolata iz RADAR eseja. (D) SDS-PAGE analiza supernatanta i taloga izoliranih puferom otopinom 1 iz slike C. Proteini su vizualizirani CBB bojanjem. (E) SDS-PAGE analiza istih taloga iz puferne otopine 1 nakon pročišćavanja puferom otopinom 2 i etanolnom precipitacijom. Proteini su vizualizirani CBB bojanjem te su uspoređeni sa rezultatima DPC izolata iz RADAR eseja. (F) Analiza efikasnosti DNA izolacije prilikom provedbe STAR eseja. DPC-ovi su izolirani iz Hela stanica tretiranih sa 100 i 400 μ M FA 15 min nakon čega je DNA količina određena kolorimetrijski nakon elektroforeze na agaroznom gelu i bojanja etidij bromidom. (G) Relativna količina DPC-ova u izolatima iz slike F određena kolorimetrijski nakon SDS-PAGE analize i CBB bojanja te normalizacije na DNA količinu. Statistička analiza napravljena je pomoću One-Way ANOVA statističkim testom i Dunnet statističkim testom kao post-hoc analiza. (H) Kovalentno vezani protein na RNA predstavljaju značajan izvor proteinskog onečišćenja. Iz supernatanta nakon pufera 1 etanolnom precipitacijom je izolirana RNA nakon čega je pročišćenja u pufernoj otopini 2 istim postupkom kao i DPC-ovi. Izolirana RNA bojana je etidij bromidom dok su protein vizualizirani CBB bojanjem. (I) Primjena visokih koncentracija FA dovodi do "lijepljenja" staničnih komponenti. Hela stanice tretirane su fiziološki relevantnim koncentracijama FA (100 - 400 μ M) te visokom koncentracijom od 0.1% FA tijekom 15 min nakon čega su STAR esejom izolirani DPC-ovi. Udio kovalentno vezanih proteina na DNA molekuli određen je SDS-PAGE i CBB bojanjem supernatanta iz puferne otopine 1 te DPC izolata.

4.1.4. Validacija STAR eseja

STAR esej osmišljen je kao direktna metoda za izolaciju i identifikaciju DPC-ova. Da bismo validirali rezultate izolacije postignute STAR esejom, metodu smo uspoređivali s najcitiranijom direktnom metodom za izolaciju DPC-ova - RADAR esejom. Prvi korak validacije metode uključuje efikasnost izolacije DNA pošto je to ključni korak kod direktnih metoda za izolaciju DPC-ova. DNA/DPC-ovi su izolirani primjenom STAR eseja, RADAR eseja i komercijalnog eseja za izolaciju DNA iz Hela stanica tretiranih formaldehidom (400 μ M 15 min) i UV zračenjem (2 mJ/cm², 5 minuta oporavka). Rezultati razdvajanja analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu iz kojih vidimo da STAR esej i RADAR esej izoliraju slične količine DNA (slika 7 A), ali DPC-ovi izolirani RADAR esejom osim DNA sadržavaju i RNA. Komercijalni esej je uspješno izolirao DNA bez RNA onečišćenja, ali količina izolirane DNA izgleda znatno manja od izolata STAR i RADAR eseja. Ovaj rezultat je potvrđen nakon

određivanja koncentracije DNA u izolatima i statističke obrade. STAR i RADAR esej jednako efikasno izoliraju DNA te značajno više u odnosu na komercijalni esej za izolaciju DNA (slika 7 B). Nakon provjere efikasnosti izolacije DNA izmjerena je količina proteina koja se nalazi u DPC izolatima STAR i RADAR eseja, izoliranim iz stanica tretiranih rastućom koncentracijom FA, te je uspoređena s ukupnom količinom proteina pronađenih i jezgrama stanica. Iz rezultata je jasno vidljivo da RADAR esej izolati sadržavaju značajno veću količinu proteina u odnosu na STAR esej (slika 7 C). Sadržaj proteina u RADAR esej je usporediv s ukupnom količinom proteina nađenim u jezgrama što ukazuje na onečišćenje DPC izolata proteinima iz drugih izvora (RPC-ovi, topljivi proteini). Nadalje, provjerena je osjetljivost metode na tretman rastućom koncentracijom FA. Rezultati jasno ukazuju da je STAR esej značajno osjetljivija metoda za izolaciju DPC-ova od RADAR eseja prilikom kratkog tretmana fiziološki relevantnim koncentracijama FA (slika 7 D).

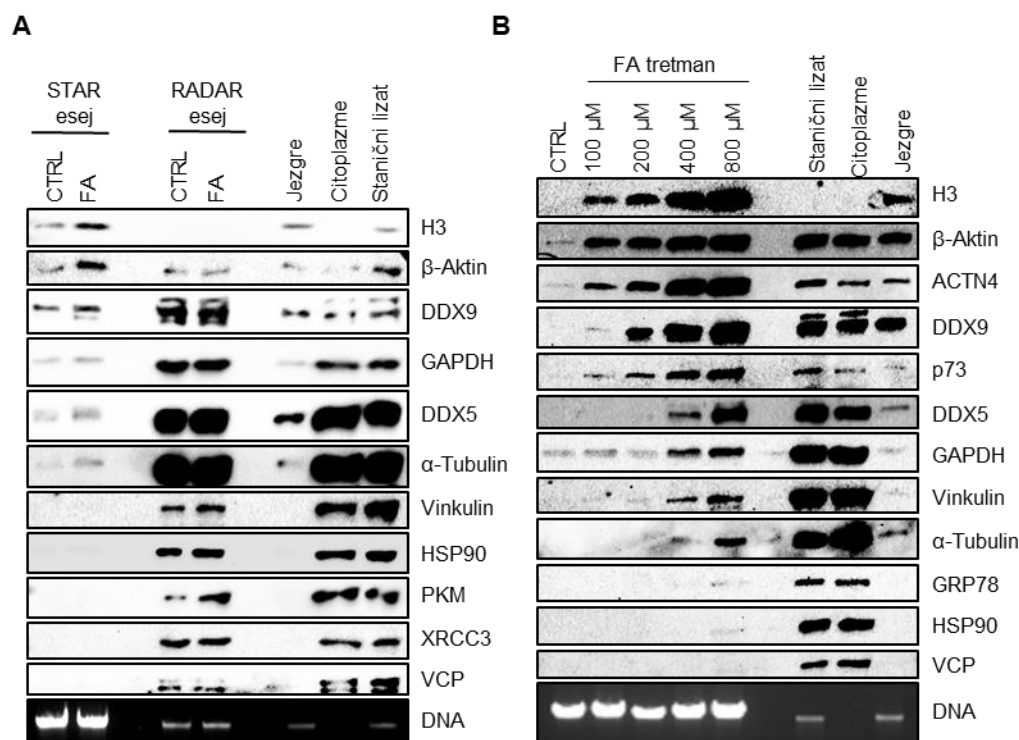


Slika 7. Specifičnost i osjetljivost STAR eseja u izolaciji DPC-ova. (A) Usporedba efikasnosti razdvajanja i izolacije DNA/DPC-ova korištenjem različitih metoda izolacije. DNA/DPC-ovi su izolirani primjenom STAR eseja, RADAR eseja i komercijalnog eseja za izolaciju DNA iz Hela stanica tretiranih sa FA (400 μ M 15 min) i UV zračenjem (2 mJ/cm², 5 minuta oporavka). Rezultati razdvajanja analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu i bojanjem etidij bromidom. (B) Istim eksperimentalnim pristupom kao na slici A, izolirani DNA/DPC-ovi su tretirani RNazom A te je koncentracija DNA izmjerena spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije uzoraka pri 260 nm. Statistička analiza je napravljena Two-way ANOVA testom i Dunnet-ovim testom (eng. "Main column effect") kao post-hoc analiza. (C) Hela stanice tretirane su sa 100, 200 i 400 μ M FA 15 minuta. DPC-ovi su izolirani STAR i RADAR esejima. Za usporedbu napravljena je frakcionacija stanica na citoplazmatsku i jezgrinu frakciju. U eksperimentu je korišten jednak broj stanica u svim izolacijama. Količina izoliranih proteina izmjerena je primjenom BCA eseja. Rezultati su normalizirani prema količini ukupnih proteina pronađenih u jezgri te analizirani Two-way ANOVA testom sa Dunnet-ovim testom (eng. "Main column effect") kao post-hoc analiza. (D) Usporedba osjetljivosti STAR i RADAR eseja nakon normalizacije rezultata iz slike C. Statistička analiza provedena je One-way ANOVA testom i Dunnet-ovim testom kao post-hoc analiza.

4.1.5. Analiza specifičnosti DCP izolacije metodom imunodetekcije

Da bi se protein kovalentno vezao na molekulu DNA mora se nalaziti u njenoj blizini zbog nastanka reaktivnih skupina, bilo na proteinu ili molekuli DNA, koje iznimno brzo reagiraju i stvaraju nove kovalentne veze. Iz ovoga možemo zaključiti da proteini koji se ne nalaze u jezgri ne mogu tvoriti DPC-ove na kromosomskoj DNA. Da bi pokazali specifičnost STAR eseja u izolaciji DPC-ova u odnosu na druge izvore proteina izolirani su DPC-ovi iz kontrolnih i FA tretiranih stanica kao pozitivne kontrole. Za usporedbu napravljena je izolacija korištenjem RADAR eseja. Prisutnost pojedinog proteina u jezgri provjerena je frakcioniranjem stanica na jezgrinu i citoplazmatsku frakciju. Napravljena je imunodetekcija većeg broja proteina. Rezultati pokazuju da STAR esej izolati sadržavaju samo proteine pronađene u jezgrinoj frakciji dok RADAR esej izolati sadržavaju gotovo sve testirane proteine neovisno o njihovoj staničnoj lokalizaciji. Ovi rezultati objašnjavaju prethodno prikazane rezultate (na slikama 5 i 7) i dokazuju onečišćenje RADAR izolata topljivim proteinima (slika 8 A). Također iz istih rezultata STAR eseja jasno se vidi da je tretman s FA (koji izaziva nastanak nespecifičnih DPC-ova) povećava količinu DPC-ova dok se isti efekt vidi kod samo nekoliko imunodetektiranih proteina u RADAR esejima. Da bi pokazali specifičnost i osjetljivost STAR eseja u isto vrijeme DPC-ovi su izolirani iz stanica tretiranih rastućom koncentracijom FA te su uspoređeni s rezultatima frakcioniranja. Rezultati potvrđuju da je prisutnost nekog proteina u jezgri ključna da bi se isti mogao kovalentno vezati za molekulu DNA (slika 8 B). Povećanjem doze FA korištene za tretman stanica dovodi do povećanja

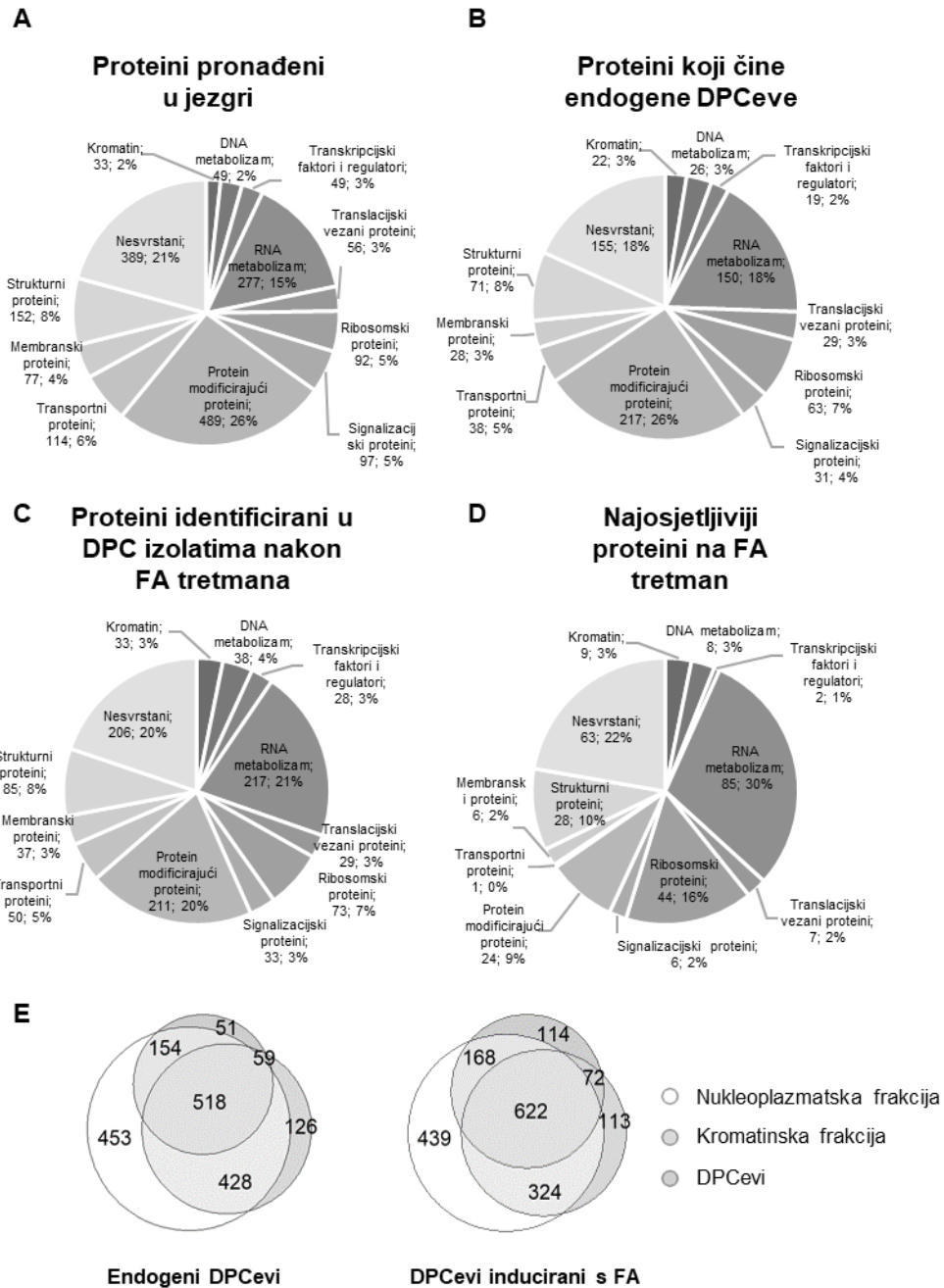
količine imunodetektiranog proteina. Također je vidljivo da se neki proteini počinju kovalentno vezivati pri nižim dozama FA dok se drugi proteini kovalentno vežu samo pri višim dozama FA. Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica toga što se neki proteini nalaze na samoj molekuli DNA pa su podložniji kovalentnom vezivanju pri nižim dozama FA dok drugi proteini u jezgri ne vežu neposredno molekulu DNA pa su fizički udaljeniji te potrebne su veće doze FA za njihovo kovalentno vezanje.



Slika 8. Usporedba specifičnosti izolacije DPC-ova između STAR i RADAR eseja. (A) HeLa stanice tretirane su s 400 μ M FA 15 min nakon čega su iste stanice podijeljene na više dijelova čineći tehničke replikate i osiguravajući isti početni materijal za daljnju analizu. Korišteni su STAR i RADAR eseji za izolaciju DPC-ova nakon čega je napravljena frakcionacija stanica na citoplazmatsku u jezgrinu frakciju te je pripremljen ukupni stanični lizat. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su imunodetekcijom više izabranih proteina koji se razlikuju prema prisutnosti u jezgri. Kontrola nanošenja uzoraka napravljena je prema količini DNA. (B) Evaluacija specifičnosti i osjetljivosti STAR eseja provedena je izolacijom DPC-ova iz HeLa stanica tretiranih rastućim koncentracijama FA tijekom 15 minuta. HeLa stanice su također frakcionirane na citoplazmatsku i jezgrinu frakciju te pripremu ukupnog staničnog lizata. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su imunodetekcijom više izabranih proteina koji se razlikuju prema prisutnosti u jezgri. Kontrola nanošenja uzoraka napravljena je prema količini DNA.

4.1.6. Analiza specifičnosti DPC izolacije spektrometrijom masa

Imunodetekcija nekoliko proteina pokazala je da STAR esej izolira samo one proteine koji su pokazali prisutnost u jezgrama. Pošto nismo mogli imunodetektirati veliki broj proteina, rezultati staničnog frakcioniranja i DPC izolata izoliranih STAR esejom iz kontrolnih i Hela stanica tretiranih s 400 μ M FA 15 min analizirani su pomoću UHPLC-MS tehnike. Korištenje spektrometrije masa omogućilo nam je identifikaciju značajno većeg broja proteina prisutnih u uzorcima čime možemo s puno većom sigurnošću potvrditi specifičnost izolacije DPC-ova putem STAR eseja. Nakon pročišćavanja rezultata, u uzorcima je ukupno identificirano 1921 protein koji su na slici 6 prikazani kategorizirani u 11 većih skupina odabranih prema funkciji proteina. Skupine su definirane: Kromatin, Proteini DNA metabolizma, Transkripcijski faktori i regulatori, RNA metabolizam, Translacijski vezani proteini, Ribosomski proteini, Signalizacijski proteini, Protein modificirajući proteini, Transportni proteini, Membranski proteini, Strukturni proteini te Nesvrstani proteini. Slika 9 A prikazuje kategorizaciju proteina identificiranih u jezgrinoj frakciji dok su rezultati kategorizacije endogenih DPC-ova prikazani na slici 9 B. Uspoređujući ova dva rezultata utvrđena je velika sličnost iako endogene DPC-ove tvori značajno manji broj identificiranih proteina od onih koji se identificirani u jezgrama. Ako s rezultatima endogenih DPC-ova usporedimo rezultate nakon kategorizacije DPC-ova iz FA tretiranih stanica (slika 9 C) možemo vidjeti da su proteini uključeni u razne funkcije DNA i RNA više zastupljeni u odnosu na ostale kategorije. Da bi odredili koji su proteini najosjetljiviji na FA tretman rezultati su posloženi prema iBAQ vrijednostima te su na slici 9 D prikazani proteini koji su najzastupljeniji u FA tretmanu (prvi kvartil). Rezultati ukazuju da su proteini RNA metabolizma i Ribosomski proteini kategorije koje su bile najosjetljivije na FA tretman u odnosu na ostale kategorije. Da bi utvrdili slaganje rezultata između proteina identificiranih u jezgrama te proteina prisutnih u DPC izolatima iz kontrolnih i FA tretiranih stanica napravljeni su Vennovi dijagrami koji uključuju Kromatinsku i Nukleoplazmatsku frakciju (kao jezgrine frakcije) te DPC izolate (slika 9 E). Iz preklapanja ovih skupina ukazuje na iznimnu čistoću DPC izolata izoliranih STAR esejom gdje je odstupanje bilo 2-6% između DPC-ova i jezgrinih frakcija. Također, rezultati ukazuju da se nakon FA tretmana veliki broj proteina koji su prethodno identificirani u Nukleoplazmatskoj i Kromatinskoj frakciji sada identificira i u DPC frakciji, što sugerira da FA potiče stvaranje DPC-ova s proteinima koji u endogenim uvjetima tome nisu bili podložni. Rezultati MS analize potvrđuju iznimnu specifičnost STAR eseja za izolaciju DPC-ova u odnosu na ostale izvore proteina u stanicama.

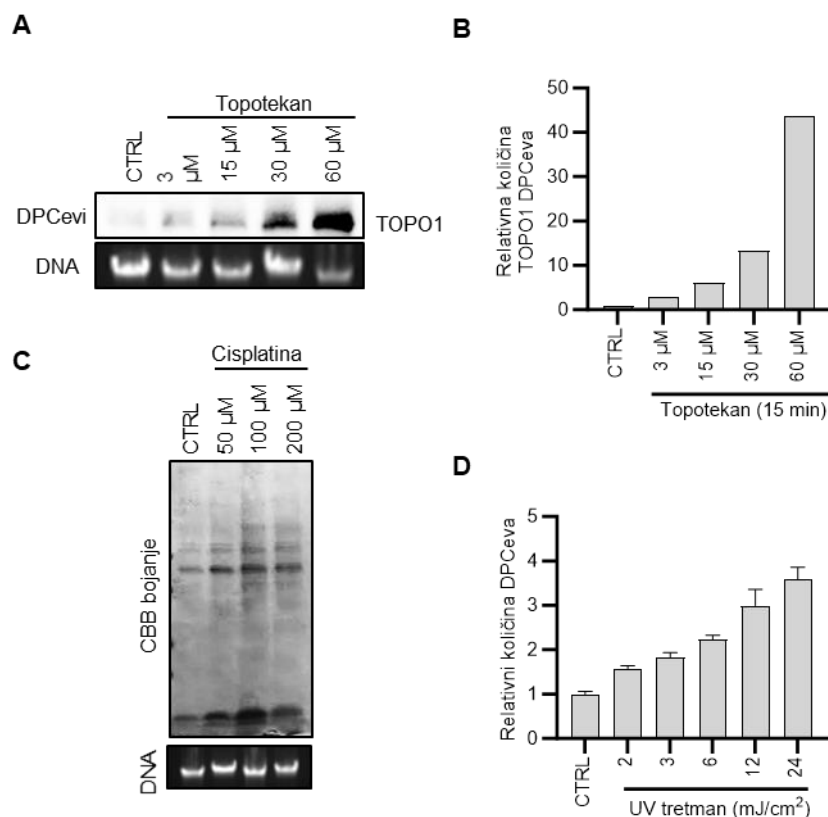


Slika 9. Specifičnost izolacije DPC-ova STAR esejom analizirana spektrometrijom masa (MS). MS analiza je provedena na uzorcima netretiranih i tretiranih Hela stanica (400 μ M FA 15 min) koje su podvrgnute staničnoj frakcionaciji i izolaciji DPC-ova korištenjem protokola za STAR esejom. Identificirani proteini su svrstani u 11 kategorija temeljem njihove funkcije primjenom PANTHER računalnog programa. (A) Kategorizacija proteina identificiranih u jezgrinoj frakciji. (B) Kategorizacija proteina identificiranih u DPC-izolatima iz netretiranih stanica – endogeni DPC-ovi. (C) Kategorizacija proteina identificiranih u DPC-izolatima stanica tretiranih formaldehidom.

(D) Kategorije proteina čija je zastupljenost najviše porasla nakon FA tretmana. (E) Vennovi dijagrami koji prikazuju prisutnost identificiranih proteina u kromatinskoj, nukleoplazmatskoj i DPC-frakciji u netretiranim i formaldehidom tretiranim stanicama.

4.1.7. STAR esej osjetljivo i selektivno izolira DPC-ove različitog porijekla

U prethodnim poglavljima smo demonstrirali osjetljivost STAR eseja prema DPC-ovima uzrokovanim rastućim dozama FA. Da bismo utvrdili osjetljivost izolacije DPC-ova različitog porijekla, tretirali smo stanice različitim reagensima. Korištenjem tretmana topotekanom (TOPO) u rastućim koncentracijama izazvani su enzimski DPC-ovi enzima TOPO1 detektirani metodom imunodetekcije (slika 10 A). Korištenjem kolirimetrije određen je relativna količina TOPO1-DPC-ova normalizirana na količinu DNA. Rezultati ukazuju jasan trend eksponencijalnog rasta količine TOPO1-DPC-ova porastom koncentracije tretmana ukazujući na iznimnu osjetljivost STAR metode prema enzimskim DPC-ovima (slika 10 B). Dalje, stanice su tretirane rastućim koncentracijama cisplatine, koja stvara strukture DNA-Pt-protein, koje se ponašaju kao DPC-ovi. Rezultati ukazuju da STAR esej uspješno i osjetljivo izolira i ovakav tip DPC-ova (slika 10 C). Stanice su također tretirane rastućim dozama UV zračenja koje stvara nespecifične DPC-ove. Rezultati ukazuju da STAR esej uspješno i osjetljivo izolira DPC-ove nastale djelovanjem UV zračenja (slika 10 D).

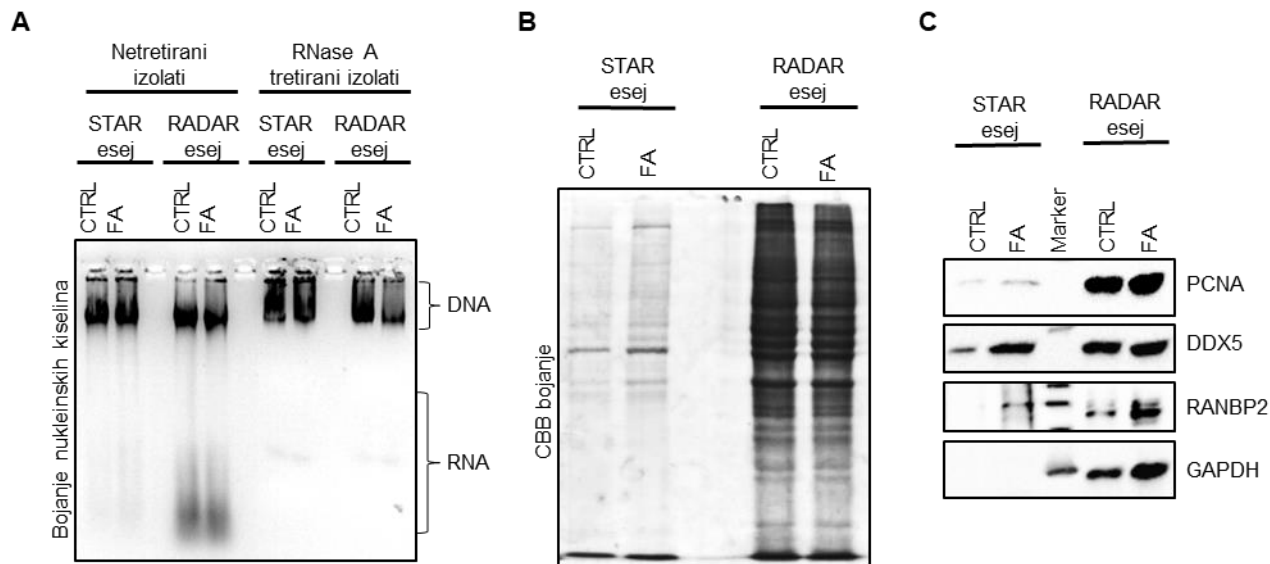


Slika 10. Izolacija DPC-ova različitog porijekla primjenom STAR eseja. (A) HeLa stanice tretirane su rastućim koncentracijama topotekana 15 min nakon čega su primjenom STAR eseja izolirani DPC-ovi. Kovalentno vezanje TOPO1 proteina vizualizirano je imunodetekcijom dok je DNA korištena za kontrolu nanošenja uzorka. (B) Kvantifikacija eksperimenta pod A. (C) DPC-ovi izolirani iz HeLa stanica tretiranih 15 min rastućim koncentracijama cisplatine. DPC-ovi su vizualizirani CBB bojanjem dok je DNA korištena za kontrolu nanošenja uzoraka. (D) Relativna količina DPC-ova iz HeLa stanica tretiranih rastućim dozama UV zračenja. Količina DPC-ova određena je BCA esejom.

4.1.8. Usporedba STAR i RADAR eseja na drugoj staničnoj liniji

Da bi pokazali da je STAR esej efikasan u izolaciji DPC-ova i na drugim staničnim linijama, U2OS stanice tretirane su s 400 μM FA 15 min te su korištene za izolaciju DPC-ova STAR i RADAR esejima. Kao i kod HeLa stanica, izolati DPC-ova STAR eseja ne sadržavaju RNA onečišćenje koje je prisutno u RADAR esejima (slika 11 A). Analiza sadržaja proteina u ovim izolatima SDS-PAGE-om i CBB bojanjem također potvrđuje rezultate ostvarene na HeLa stanicama (slika 11 B). RADAR esej izolati sadržavaju vidno više proteina i ne pokazuju porast na FA tretman dok se porast vidi u DPC izolatima STAR eseja. Nadalje, napravljena je imunodetekcija nekoliko

proteina izabranih prema njihovoj prisutnosti u jezgri. DPC-ovi izolirani RADAR esejom sadržavaju sve imunodetektirane proteine dok DPC-ovi izolirani STAR esejom sadržavaju samo proteine prethodno identificirane u jezgrama (slika 11 C).

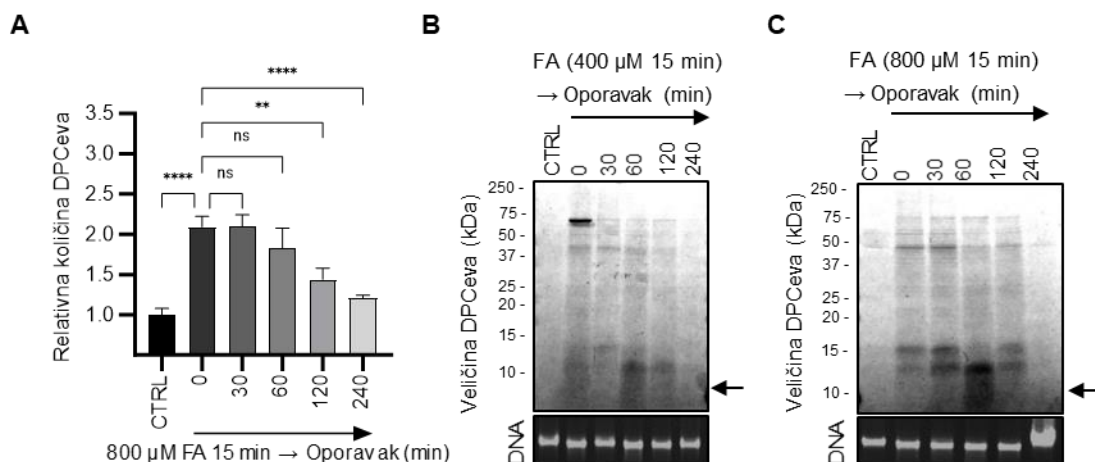


Slika 11. STAR esej uspješno izolira DPC-ove neovisno o staničnoj liniji. U2OS stanice tretirane su s 400 μ M FA 15 min nakon čega su korištene za izolaciju DPC-ova prema protokolima STAR i RADAR esej. (A) Elektroforeza DPC izolata na agaroznom gelu prije i nakon tretmana RNazom A. Nukleinske kiseline bojane su etidij bromidom. (B) SDS-PAGE i CBB bojanje DPC izolata iz istog eksperimenta. (C) Imunodetekcija nekoliko odabranih DPC-ova na istim uzorcima.

4.2. Potvrda proteolitičke degradacije DPC-ova korištenjem STAR eseja – zaostajanje kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA kao rezultat proteolitičke degradacije

4.2.1. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA SDS-PAG elektroforezom

Mehanizam popravka DPC-ova uključuje proteolitičku degradaciju proteinskog dijela DPC lezije. Degradacijom proteina koji tvore DPC-ove teoretski bi na molekuli DNA trebali zaostati kovalentno vezani peptidi nastali kao produkt proteolitičke degradacije. Da bi testirali ovu teoriju Hela stanice smo tretirali formaldehidom 15 min, nakon čega smo ga uklonili te omogućili stanicama određeni vremenski period za popravak DPC-ova. Tretman formaldehidom uspješno je izazvao nastanak DPC-ova, nakon čega su stanice započele smanjivati količinu kovalentno vezanih proteina na DNA, ukazujući na efikasan mehanizam popravka DPC-ova (slika 12 A). Eksperiment je ponovljen s dvije različite doze FA te su DPC izolati analizirani SDS-PAGE i CBB bojanjem. Rezultati ukazuju da nakon početka proteolitičke degradacije dolazi do nakupljanja peptida male molekulske mase koji su i dalje kovalentno vezani na molekulu DNA (slike 12 B i C). Također možemo utvrditi da se ti isti peptidi efikasno uklanjaju s molekule DNA u sljedećim vremenskim intervalima.

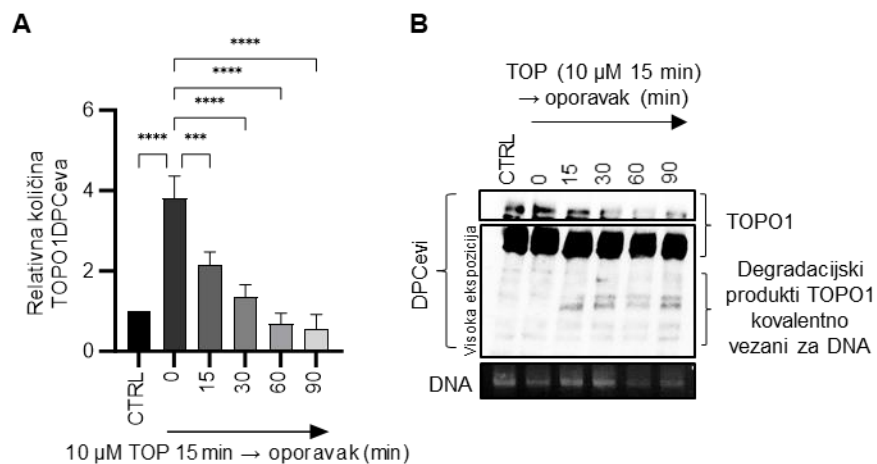


Slika 12. Detekcija kovalentno vezanih peptida na DNA molekuli SDS-PAGE-om nastalih proteolitičkom degradacijom DPC-ova. Hela stanice tretirane su sa 400 i 800 μM FA 15 minuta nakon čega su oporavljane naznačenu vrijeme nakon čega su korištene za izolaciju DPCeva STAR esejom. (A) Dinamika nastanka i poravka DPC-ova nakon FA tretmana. Količina DPC-ova izmjerena je BCA esejom i normalizirana prema količini endogenih DPCeva.

Rezultati su obrađeni One-way ANOVA testom sa post hoc analizom Tukey-jevim testom. (B) SDS-PAGE DPC izolata dobivenih iz stanica tretiranih s 400 μM FA. (C) SDS-PAGE DPC izolata dobivenih iz stanica tretiranih s 800 μM FA. (B i C) Strelica pokazuje nakupljanje peptide male molekulske mase koji su kovalentno vezani za DNA molekulu. Proteini su vizualizirani CBB bojanjem dok je DNA korištena kao kontrola nanošenja uzoraka.

4.2.2. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA imunodetekcijom

Osim popravka nespecifičnih DPC-ova zanimalo nas je da li možemo metodom imunodetekcije pratiti popravak TOPO1-DPC-ova i vidjeti specifične peptide nastale proteolitičkom degradacijom. Stanice smo tretirali topotekanom tijekom 15 min, nakon čega je TOPO uklonjen i stanicama je omogućeno da krenu popravljati DPC-ove. Rezultati ukazuju na efikasnu indukciju TOPO1-DPC-ova, nakon čega slijedi brz i efikasan popravak (slika 13 A). Da bismo utvrdili postojanje degradacijskih fragmenata TOPO1 proteina povećali smo ekspoziciju fotografija imunodetekcije TOPO1 protutijelom iz kojih je jasno vidljiva pojava specifičnih signala TOPO1 manje molekulske mase od proteina u prirodnoj veličini (102 kDa). Pojava ovih signala odgovara vremenskim intervalima u kojima dolazi do smanjivanja signala na veličini od 102 kDa ukazujući na to da se radi o nastajanju degradacijskih produkata (slika 13 B).

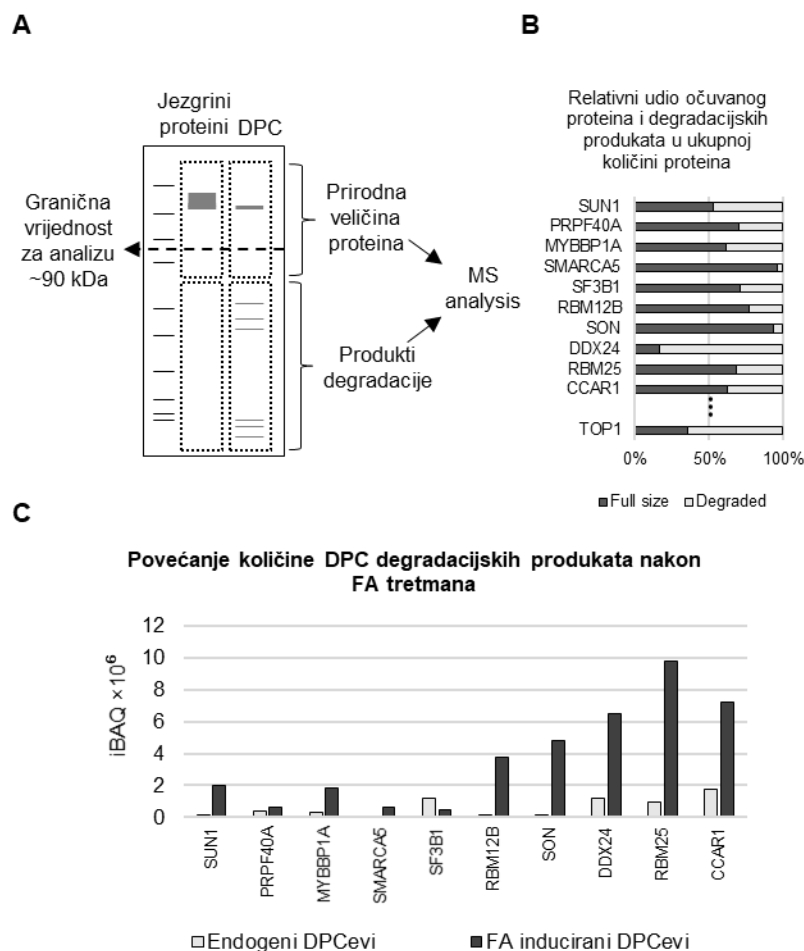


Slika 13. Imunodetekcija kovalentno vezanih peptida na DNA molekuli nastalih proteolitičkom degradacijom DPC-ova. Hela stanice tretirane su s 10 μM TOPO, 15 minuta nakon čega su se oporavljale tijekom naznačenog vremena nakon čega su korištene za izolaciju DPC-ova korištenjem protokola za STAR esej. (A) Dinamika nastanka i popravka DPC-ova nakon TOPO tretmana. Količina DPC-ova određena je imunodetekcijom i normalizirana prema količini endogenih DPC-ova. Rezultati su obrađeni One-way ANOVA testom s post-hoc analizom Dunnettovim testom. (B)

Primjer imunodetekcije TOPO1-DPC-ova. Pri visokoj ekspoziciji vidljiv je nastanak degradacijskih fragmenata TOPO1 proteina koji su kovalentno vezani za DNA molekulu. DNA je korištena kao kontrola nanošenja uzoraka.

4.2.3. Potvrda zaostajanja kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA spektrometrijom masa

Budući da mogućnost imunodetekcije degradacijskih produkata ovisi o tome je li i u koliko mjeri je u peptidnom produktu sadržana struktura imunogena na koje je protutijelo specifično, htjeli smo pokazati postojanje kovalentno vezanih peptida na molekuli DNA UHPLC-MS tehnikom, kako je prikazano na slici 14 A. Rezultati analize spektrometrijom masa jasno ukazuju postojanje specifičnih peptida ovih proteina u donjem dijelu staza koje su sadržavale DPC izolate tako demonstrirajući postojanje peptida male molekulske mase koji su i dalje kovalentno vezani za molekulu DNA (slika 14 B). Da bi dokazali da se ovdje stvarno radi o degradacijskim produktima popravka DPC-ova usporedili smo njihove iBAQ vrijednosti u DPC izolatima kontrolnih stanica i stanica u kojima smo inducirali DPC-ove. Rezultati jasno ukazuju na povećanje iBAQ vrijednosti nakon indukcije dokazujući da se radi specifično o degradacijskim produktima nastalim uslijed proteolitičke degradacije DPC-ova (slika 14 C).

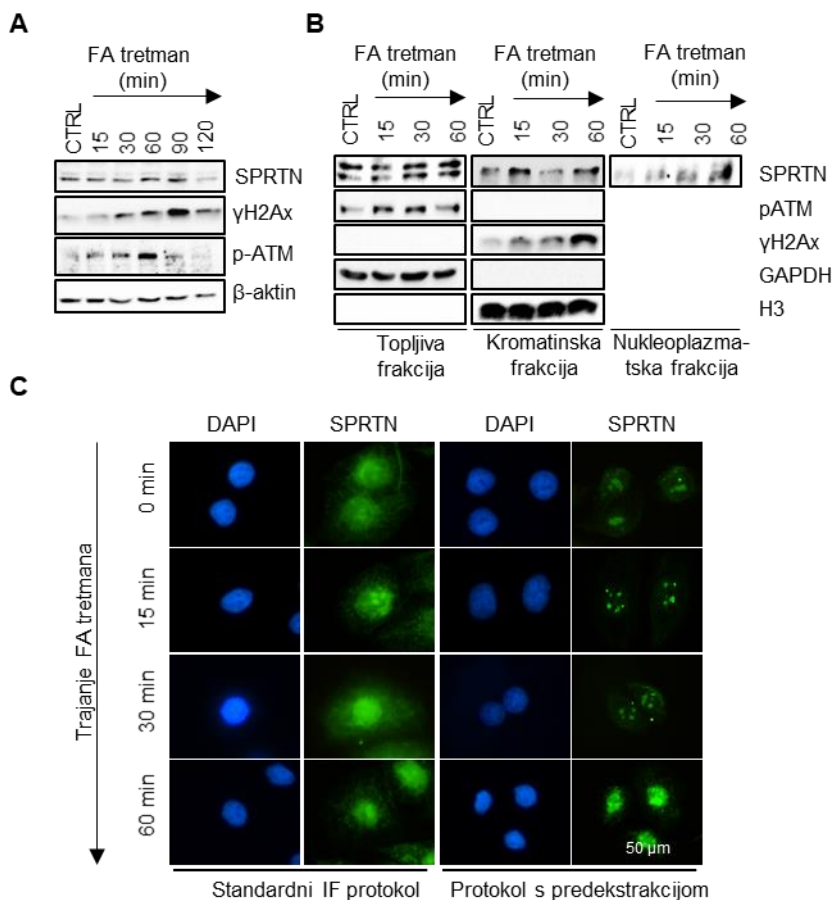


Slika 14. Korištenje spektrometrije masa za detekciju kovalentno vezanih peptida na DNA molekuli nastalih proteolitičkom degradacijom DPC-ova. (A) Prikaz eksperimentalnog pristupa dizajniranog za detekciju kovalentno vezanih peptide na DNA molekuli. Hela stanice tretirane su s 400 μ M FA 15 minuta nakon čega su izolirani DPC-ovi korištenjem protokola za STAR esej. Za usporedbu analizirani su jezgrini protein izolirani frakcionacijom. Uzorci su razdvojeni primjenom SDS-PAGE nakon čega su pojedine staze izrezane iz gela te prerezane na visini koja odgovara veličini proteina od 60 kDa (što je određeno prema proteinskom markeru) te su segmenti gela analizirani zasebno. (B) Izračunavanje relativnog udjela očuvanog proteina i njegovih degradacijskih produkata u ukupnoj količini proteina. Prikazano je 10 najviše induciranih proteina iz sastava DPC-ova (prema iBAQ vrijednostima) s molekulskom masom većom od 90 kDa nakon FA tretmana te TOPO1 DPC koji predstavlja najviše istraživani model DPC-ova. Specifične peptide ovih proteina pronađene u segmentu gela koji sadržava proteine manje od 60 kDa smatrali smo degradacijskim produktima. (C) Usporedba količine (prema iBAQ vrijednostima) degradacijskih produkata DPC-ova prikazanih na slici B prije i nakon FA tretmana.

4.3. Uloga proteaze SPRTN u popravku DNA nakon oštećenja DPC-ovima

4.3.1. Odnos lokalizacije proteaze SPRTN i signalizacije oštećenja DNA

Da bi utvrdili signalni put preko kojeg dolazi do signalizacije oštećenja DNA napravljena je imunodetekcijska analiza staničnih lizata Hela stanica tretiranih s 400 μ M FA u vremenskim točkama od 15 do 120 min. Praćeni signali uključuju fosforilaciju H2Ax proteina na serinu 139 (S139) (poznat kao γ H2Ax) te fosforilaciju ATM proteina na serinu 1981 (S1981) te samu ekspresiju SPRTN proteina. Rezultati imunodetekcije ukazuju na specifičan slijed fosforilacija ATM i H2Ax proteina gdje fosforilacija ATM-a prethodi fosforilaciji H2Ax te je maksimum aktivacije pojedinog signala odmaknut za duljinu tretmana od 30 minuta (slika 15 A). Ekspresija SPRTN proteina također se mijenja. Ekspresija SPRTN proteina prvo opada do 30 minute tretmana, nakon čega snažno raste u sljedećim vremenskim točkama. Da bi stavili u kontekst vezanje SPRTN-a na kromatin i aktivaciju signalizacije oštećenja DNA frakcionirane su Hela stanice koje su tretirane s 400 μ M FA u vremenskim točkama od 15-60 minute. Imunodetektiran je razmještaj SPRTN proteina te γ H2Ax i pATM u topljivoj (citoplazmatska + nukleoplazmatska frakcija) i kromatinskoj frakciji. Rezultati frakcioniranja ukazuju da se protein SPRTN veže na molekulu DNA u dva specifična intervala: 15 minuta nakon tretmana (vidljivo smanjenje količine SPRTN-a u topljivoj frakciji) te u 60 minuti nakon tretmana. Kao i u prethodnom eksperimentu pATM je prethodio γ H2Ax za odmak od 30 minuta (slika 15 B). Ovakvo zanimljiv razmještaj proteina SPRTN na kromatinu sugerira zaista brzo kretanje SPRTN-a iz citoplazme u jezgru. Da bismo pokazali ovo kretanje ponovno su zasebno analizirani uzorci nukleoplazmatske frakcije gdje se jasno vidi kontinuirani porast količine SPRTN-a u ovoj frakciji, potvrđujući ulazak SPRTN-a u jezgru prije vezanja za kromatin. Dodatni dokaz ovog kretanja dobiven je analizom Hela stanica podvrgnutih istom tretmanu i analiziranih metodom imunofluorescencije (IF) po standardnom i protokolu s predekstrakcijom. Rezultati IF-a potvrđuju kretanje SPRTN-a između citoplazme i jezgre, a vezanje SPRTN-a za kromatin je potvrđeno korištenjem protokola s predekstrakcijom (slika 15 C). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da vezanje SPRTN-a na molekulu DNA prethodi fosforilaciji ATM-a, koja prethodi fosforilaciji H2Ax-a, pokazujući moguću ulogu SPRTN-a u aktivaciji ovog signalnog puta.

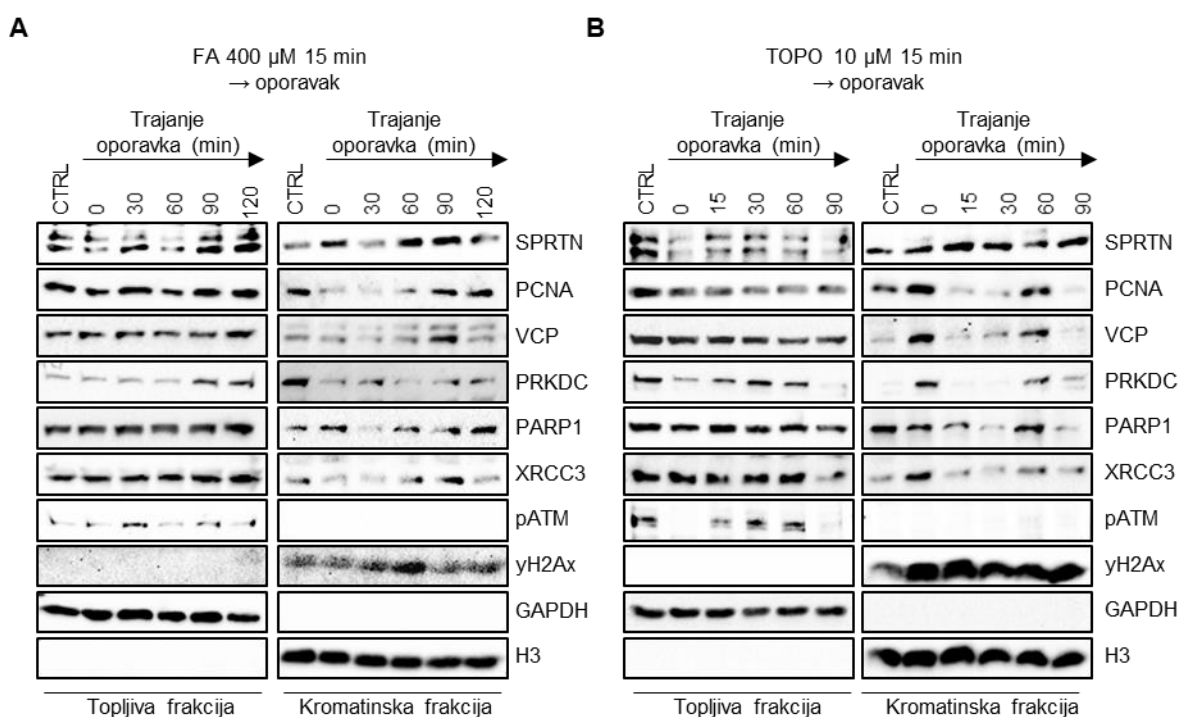


Slika 15. Vežanje SPRTN-a na DNA prethodi aktivaciji signalizacije DNA oštećenja preko ATM i H2Ax proteina. (A) Analiza ekspresije SPRTN-a i fosforilacije ATM i H2Ax proteina na staničnim lizatima HeLa stanica tretiranih s 400 μM FA naznačenu duljinu vremena. β -Aktin je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. (B) Analiza ekspresije SPRTNa i fosforilacije ATM i H2Ax proteina nakon frakcionacije na topljivu, kromatinsku i nukleoplazmatsku frakciju. HeLa stanice tretirane su s 400 μM FA naznačenu duljinu vremena prije daljnje analize. GAPDH je korišten kao marker topljive frakcije dok je H3 korišten kao marker kromatinske frakcije. (C) Rezultati IF pripremljene prema standardnom protokolu i prema protokolu s predekstrakcijom. HeLa stanice su tretiranih s 400 μM FA naznačenu duljinu vremena. Boja DAPI je korištena za bojanje DNA.

4.3.2. Utjecaj signalizacije oštećenja DNA na vežanje faktora popravka

Da bi utvrdili kako se odnose vežanje SPRTN-a na kromatin, signalizacija oštećenja DNA te vežanje faktora popravka DNA napravljeno je frakcioniranje HeLa stanica tretiranih s 400 μM FA ili 10 μM TOPO u trajanju od 15 minuta, nakon čega je omogućeno stanicama da se oporavljaju naznačeni vremenski period. Kao i u prethodnom eksperimentu, SPRTN se vežao na kromatin u dva specifična vremenska perioda nakon FA tretmana te smo reproducirali rezultate signalizacije

oštećenja DNA koji su opisani u prethodnom poglavlju. Vrlo zanimljivi rezultati ostvareni su praćenjem vezanja faktora popravka DNA koji ukazuju da se PCNA, VCP, PARP1 i XRCC3 vežu na kromatin nakon maksimuma fosforilacije H2Ax, sugerirajući da je fosforilacija H2Ax bitna za njihovu lokalizaciju na kromatin (slika 16 A). Tretman topotekanom, za razliku od FA tretmana, pokazuje drugačiji razmještaj SPRTN-a, signalizaciju oštećenja DNA i vezanje faktora za popravak DNA (što je očekivano jer TOPO izaziva lomove DNA). SPRTN se gotovo u potpunosti veže za kromatin te mu ukupna ekspresija opada nakon tretmana s TOPO. γ H2Ax je aktiviran u najranijem testiranom vremenskom intervali te mu signal opada s duljinom oporavka stanica. Faktori popravka DNA se za razliku od FA tretmana vežu u dva karakteristična vremenska perioda: u najranijoj testiranoj vremenskoj točki te nakon 60 minuta oporavka stanica (slika 16 B). Za razliku od FA tretmana, u popravak TOPO1-DPC-ova uključena je DNA ovisna protein kinaza PRKDC koja se veže za kromatin u istim točkama kao i faktori popravka DNA. XRCC3 se za razliku od ostalih faktora za popravak DNA veže samo u najranijoj točki popravka DNA.



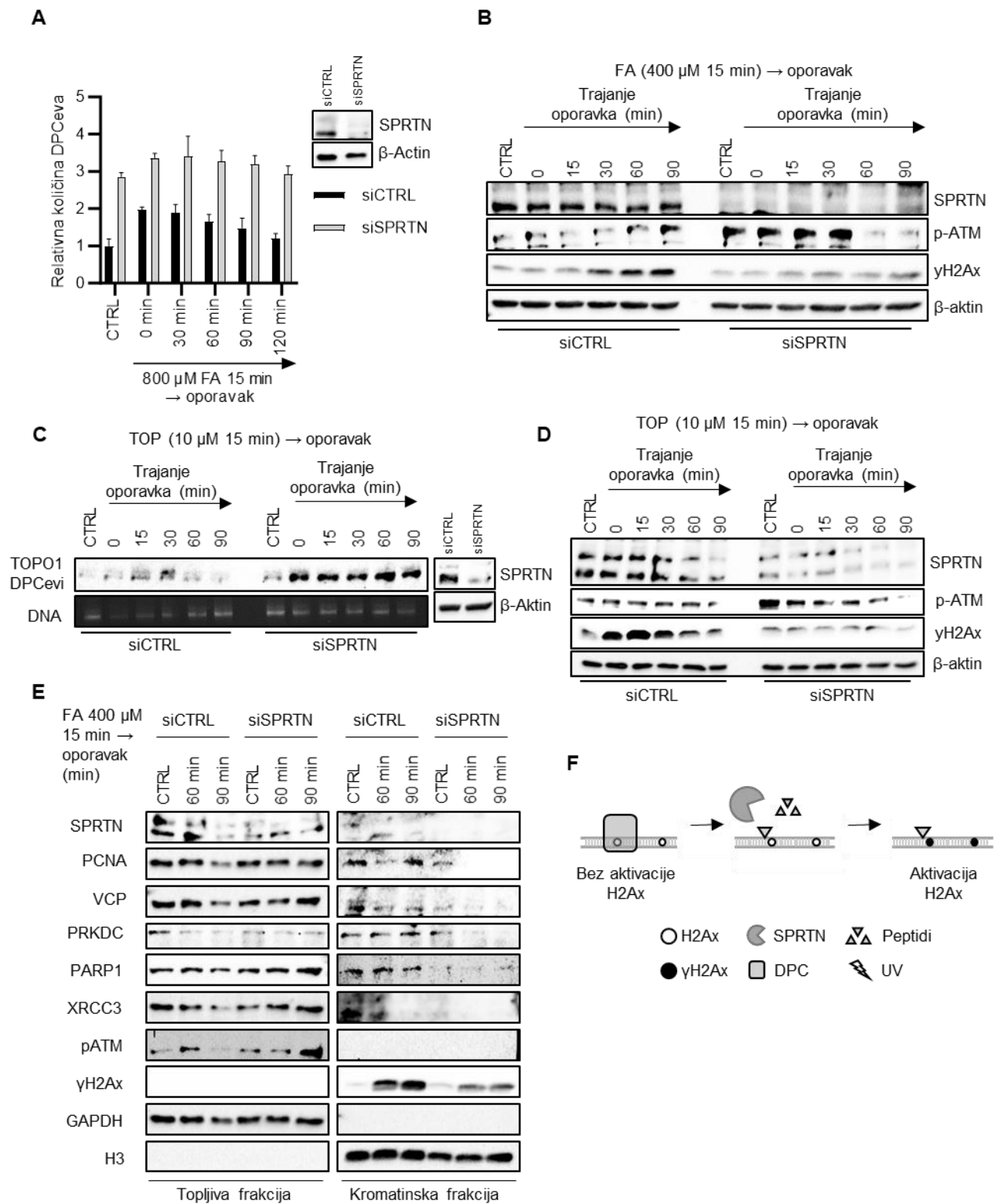
Slika 16. Vremenski presjek lokalizacije SPRTN-a na kromatin, aktivacije signalizacije DNA oštećenja te vezanja faktora za DNA popravak. (A) HeLa stanice tretirane su s 400 μ M FA 15 minuta nakon čega su se oporavljale naznačenu duljinu vremena. Stanice su frakcionirane nakon čega je metodom imunodetekcije određena lokalizacija SPRTN-a na kromatin, aktivacija signalizacije DNA oštećenja te vezanje faktora za DNA popravak. (B) HeLa stanice tretirane su s 10 μ M TOPO 15 minuta nakon čega su se oporavljale naznačenu duljinu vremena. Stanice su frakcionirane nakon

čega je metodom imunodetekcije određena lokalizacija SPRTN-a na kromatin, aktivacije signalizacije DNA oštećenja te vezanja faktora za DNA popravak. GAPDH je korišten kao marker topljive frakcije dok je H3 korišten kao marker kromatinske frakcije.

4.3.3. Proteolitička degradacija DPC-ova od strane SPRTN-a je ključna za pokretanje signalizacije oštećenja DNA i vezanje faktora popravka DNA

Prethodno smo predstavili redosljed događanja vezanih uz signalizaciju oštećenja DNA i vezanje faktora za njen popravak. Da bi utvrdili važnost proteolitičke aktivnosti SPRTN-a za ovaj sustav testirana je efikasnost popravka DPC-ova u Hela stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a. Nakon izazivanja DPC-ova tretmanom FA 15 min stanicama je omogućen oporavak. Rezultati jasno ukazuju da stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a sporije popravljaju izazvane DPC-ove (slika 17 A). Da bi analizirali što se događa sa signalizacijom oštećenja DNA u ovom eksperimentalnom modelu, eksperiment je ponovljen te su izražaj SPRTN-a, γ H2Ax i p-ATM analizirani imunodetekcijom. Rezultati ukazuju da u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a ne dolazi do aktivacije γ H2Ax u jednakom intenzitetu kao u kontrolnim stanicama. ATM je snažno fosforiliran u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a, vjerojatno kao posljedica velike količine DPC-ova (slika 17 B). Da bi utvrdili kako stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a popravljaju enzimski kreirane DPC-ove, stanice su tretirane inhibitorom TOPO 15 minuta, nakon čega im je omogućen oporavak. Rezultati izolacije DPC-ova ukazuju da stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a nisu efikasno popravljale nastale TOPO1-DPC-ove (slika 17 C). Eksperiment je reproduciran te su imunodetektirani izražaj SPRTN-a, γ H2Ax i p-ATM-a. Rezultati ovog eksperimenta potvrđuju rezultate ostvarene tretmanom FA. Stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a nisu u jednakom intenzitetu aktivirale γ H2Ax (slika 17 D). Ovakav rezultat je neočekivan jer u TOPO tretmanu nastaju lomovi DNA, a γ H2Ax je centralni faktor prepoznavanja i popravka lomova DNA. Nemogućnost aktivacije γ H2Ax u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a vjerojatno ima značajan utjecaj na popravak molekule DNA. Da bi utvrdili efikasnost vezanja faktora za popravak DNA na kromatin u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a provedeno je frakcioniranje stanica nakon FA tretmana, nakon čega je stanicama omogućeno da se oporavljaju 60 i 90 minuta. Rezultati frakcioniranja jasno ukazuju da smanjenje izražaja SPRTN-a onemogućava aktivaciju γ H2Ax što dovodi do nemogućnosti vezanja faktora za popravak DNA na kromatin (slika 17 E). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da proteolitička degradacija DPC-

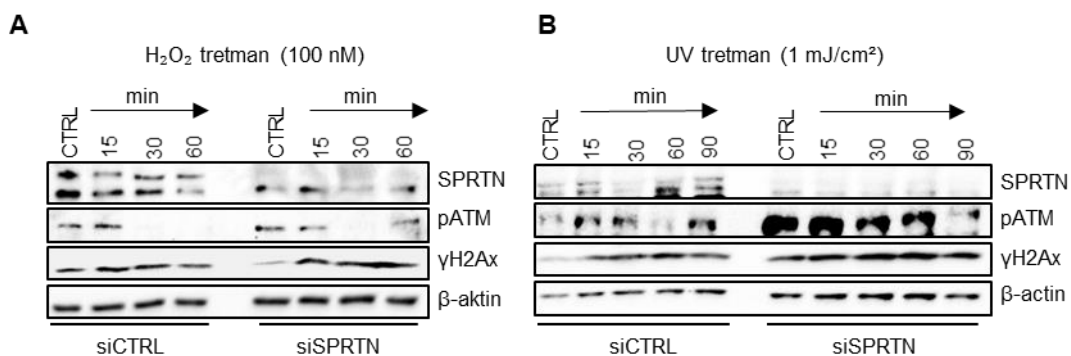
ova prethodi aktivaciji signalizacije oštećenja DNA koja prethodi vezanju faktora za popravak DNA (slika 17 F).



Slika 17. SPRTN proteolitički degradira DPC-ove omogućavajući aktivaciju signalizacije DNA oštećenja i vezanje faktora za DNA popravak. (A) BCA kvantifikacija DPC-ova izoliranih iz kontrolnih i HeLa stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranih s 800 μM FA 15 min nakon čega su se stanice oporavljale naznačeno vrijeme. (B) Imunodetekcija izražaja SPRTN-a i signalizacije DNA oštećenja na kontrolnim i HeLa stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a nakon tretmana s 400 μM FA 15 minuta i oporavka naznačenu duljinu vremena. (C) Imunodetekcija TOPO1 DPC-ova izoliranih iz kontrolnih i HeLa stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a induciranih s 10 μM TOPO 15 minuta nakon čega su se stanice oporavljale naznačeno vrijeme. DNA je korištena za kontrolu nanošenja uzoraka. (D) Imunodetekcija izražaja SPRTN-a i signalizacije DNA oštećenja na kontrolnim i HeLa stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a nakon tretmana s 10 μM TOPO 15 minuta i oporavka naznačenu duljinu vremena. (E) Imunodetekcija signalizacije DNA oštećenja i kromatinske lokalizacije faktora DNA popravka nakon frakcionacije kontrolnih i HeLa stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranih s 400 μM FA 15 min koje su se oporavljale naznačeno vrijeme. (F) Prikaz uloge proteolitičke aktivnosti SPRTN-a na aktivaciju signalizacije DNA oštećenja preko fosforilacije H2Ax proteina.

4.3.4. Smanjenje izražaja SPRTN-a ne utječe na aktivaciju γH2Ax kod ostalih tipova oštećenja DNA

Prethodno smo opisali ulogu SPRTN-a u aktivaciji signalizacije oštećenja DNA. Da bismo dokazali specifičnost ove uloge prema popravku DPC-ova u odnosu na ostale tipove oštećenja DNA, HeLa stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a podvrgnute su tretmanima vodikovim peroksidom (H_2O_2) i UV zračenjem. Rezultati jasno ukazuju da smanjenje ekspresije SPRTN-a ne utječe na aktivaciju γH2Ax kod ovakvih tipova oštećenja DNA (slika 18 A i B) te potvrđuju ulogu SPRTN-a u aktivaciji signalizacije oštećenja DNA nakon indukcije DPC-ovima.

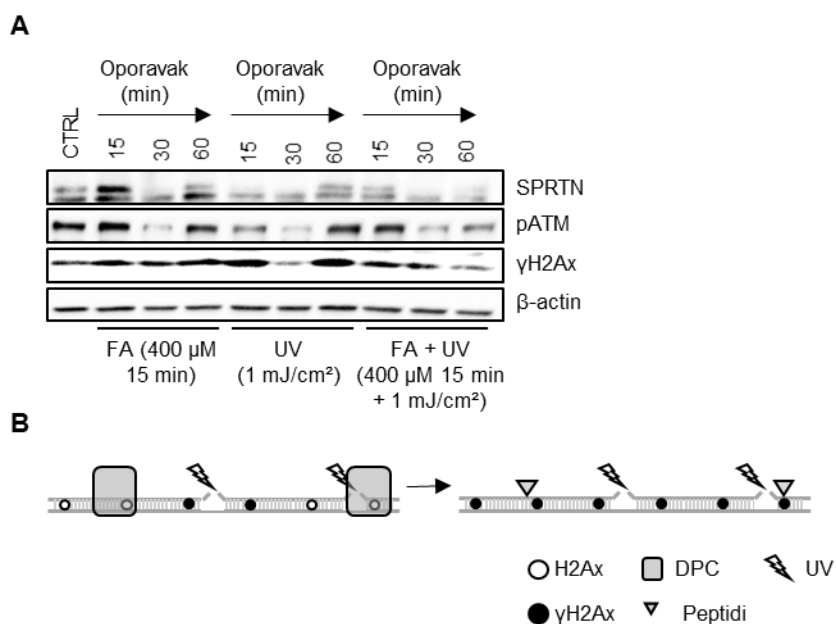


Slika 18. Smanjenje izražaja SPRTN-a ne utječe na aktivaciju γH2Ax kod ostalih tipova DNA oštećenja. (A) Imunodetekcija SPRTN-a i signalizacije DNA oštećenja na staničnim lizatima kontrolnih i HeLa stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranih s 100 nM H_2O_2 naznačenu duljinu vremena. (B) Imunodetekcija SPRTN-a i signalizacije

DNA oštećenja na staničnim lizatima kontrolnih i HeLa stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranih s 1mJ/cm² UV zračenja koje su se oporavljale naznačenu duljinu vremena.

4.3.5. Nastanak DPC-ova onemogućava normalnu signalizaciju oštećenja DNA

Kako bismo razlučili da li smanjena efikasnost aktivacije γ H2Ax proizlazi iz nedostatka proteolitičke aktivnosti SPRTN-a viđene kod stanica s njegovim smanjenim izražajem ili je to posljedica djelovanja DPC-ova, osmislili smo sljedeći eksperiment. HeLa stanice tretirane su formaldehidom kako bi se izazvao nastanak DPC-ova, nakon čega su stanice podvrgnute tretmanu UV zračenjem, kako bi se izazvali lomovi DNA, nakon čega je stanicama omogućen oporavak. Rezultati ukazuju da stanice tretirane UV zračenjem snažnije aktiviraju γ H2Ax te u ranijem vremenskom intervalu u odnosu na FA tretman. Kombinacija FA i UV tretmana ukazuje na smanjenu efikasnost aktivacije γ H2Ax u odnosu na samo UV zračenje (slika 19 A). Ovakav rezultat upućuje na zaključak da sami DPC-ovi ometaju aktivaciju γ H2Ax, najvjerojatnije predstavljajući steričku smetnju kinazama koje fosforiliraju H2Ax. Bez proteolitičke degradacije DPC-ova od strane SPRTN-a prepoznavanje oštećenja DNA koja se nalaze u blizini DPC-ova je onemogućeno (slika 19 B).

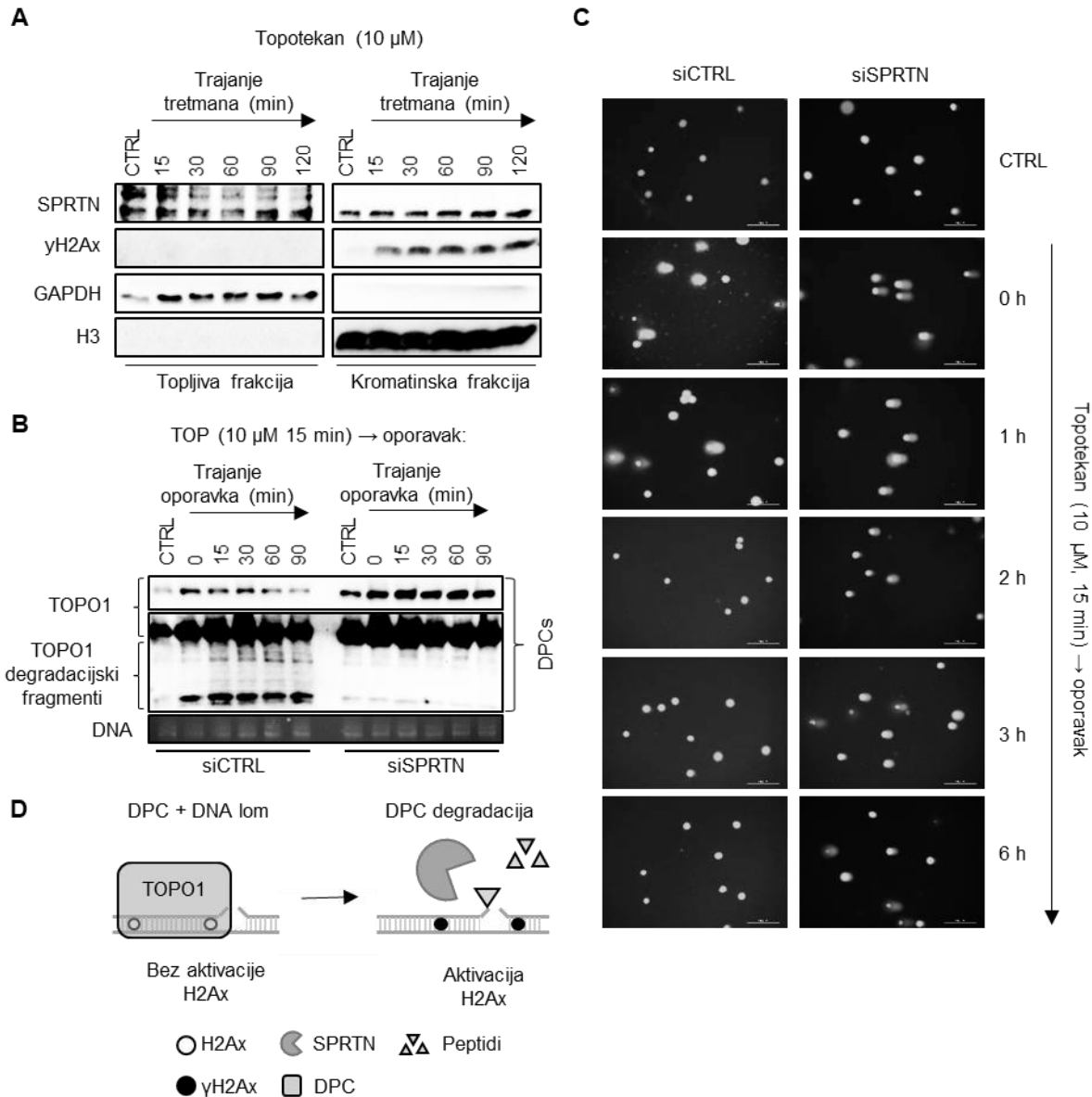


Slika 19. DPC-ovi mogu prikriti druge tipove DNA oštećenja. (A) HeLa stanice su tretirane s 400 μ M FA 15 minuta nakon čega su dodatno tretirane s 1mJ/cm² UV zračenja te su se oporavljale naznačenu duljinu vremena. SPRTN i faktori signalizacije DNA popravka su imunodetektirani na ukupnim staničnim lizatima. (B) Prikaz efekta DPC-ova

na aktivaciju γ H2Ax. DPC-ovi su prostorno velike lezije koje mogu prikriti druge tipove DNA oštećenja, poput DNA lomova, čineći ih nevidljivim faktorima zaduženim za aktivaciju signalizacije DNA oštećenja.

4.3.5. Nedostatak proteolitičke degradacije DPC-ova onemogućava signalizaciju i popravak lomova DNA na mjestu nastanka DPC-a

Tretman stanica inhibitorom TOPO1 predstavlja savršeni model testiranja da li DPC-ovi sterički onemogućavaju prepoznavanje i popravak lomova DNA. Naime, korištenje inhibitora TOPO uzrokuje nastanak jednolančanog loma molekule DNA na mjestu kovalentnog vezivanja TOPO1 proteina. Kako bi utvrdili odnos vezanja SPRTN-a za kromatin i aktivacije γ H2Ax, Hela stanice su izložene djelovanju TOPO naznačeni vremenski period, te su stanice analizirane imunodetekcijom nakon frakcioniranja. Rezultati ukazuju da se γ H2Ax aktivira nakon vezanja SPRTN-a za kromatin (slika 20 A). Važnost proteolitičke aktivnosti SPRTN-a provjeren je korištenjem stanica sa smanjenom ekspresijom SPRTN-a tretiranih topotekanom kojima je omogućen oporavak. U ovakvom modelu jasno je vidljivo da smanjena ekspresija SPRTN-a onemogućava efikasan popravak nastalih TOPO1-DPC-ova. Također je vidljiv nedostatak degradacijskih fragmenata TOPO1 koji su jasno vidljivi u kontrolnim stanicama i prate smanjenje signala koji odgovara punoj veličini TOPO1 proteina sugerirajući nedostatak proteolitičke degradacije DPC-ova (slika 20 B). Da bi utvrdili efikasnost popravka DNA u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranim topotekanom proveden je komet esej. Rezultati ukazuju da kontrolne stanice razvijaju lomove DNA nakon TOPO tretmana, koji se efikasno popravljaju oporavkom stanica u trajanju od 2 h. Stanice sa smanjenim izražajem SPRTN proteina također su razvile lomove DNA nakon TOPO tretmana, ali za razliku od kontrolnih stanica nisu bile efikasne u njihovom popravku, čak ni nakon 6 h oporavka (slika 20 C). Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da je proteolitička degradacija DPC-ova nužna za prepoznavanje i popravak oštećenja DNA (lomova) koji su sterički „skriveni“ ispod samog DPC-a (slika 20 D).

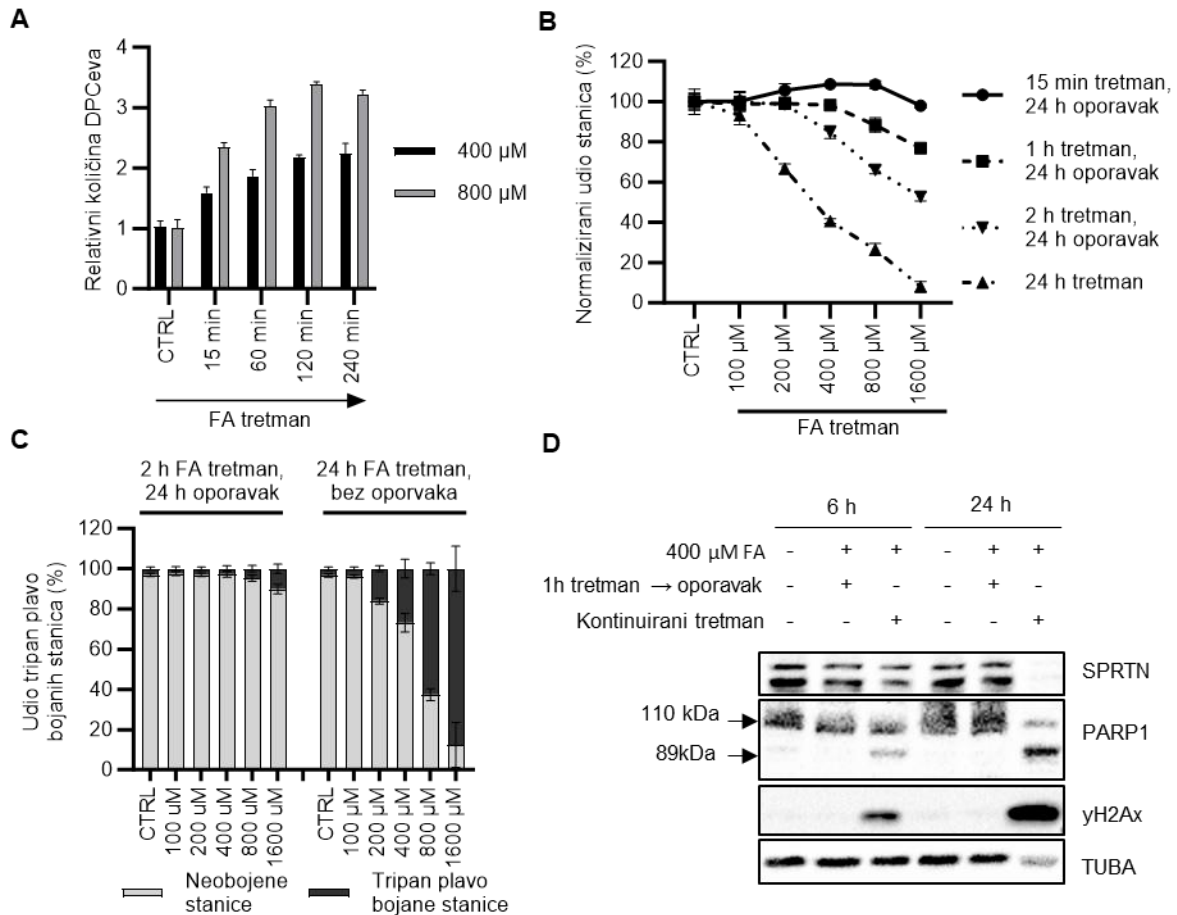


Slika 20. Smanjenje izražaja SPRTN-a onemogućava popravak DNA lomova prikrivenih DPC-ovima. (A) Imunodetekcija lokalizacije SPRTN-a na kromatin i aktivacija γ H2Ax nakon tretmana topotekanom naznačenu duljinu vremena. GAPDH je korišten kao marker topljive frakcije, a H3 kao marker kromatinske frakcije. (B) Imunodetekcija TOPO1 DPC-ova izoliranih iz kontrolnih i Hela stanica sa smanjenim izražajem SPRTN proteina tretiranih s 10 μ M TOPO 15 min koje su se oporavljale naznačenu duljinu vremena. Prisutnost degradacijskih fragmenata DPC-ova vizualizirana je na slici veće ekspozicije. DNA je korištena kao kontrola nanošenja uzoraka. (C) Rezultati komet eseja na kontrolnim i Hela stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN proteina tretiranih s 10 μ M TOPO 15 min koje su se oporavljale naznačenu duljinu vremena. Kometi su vizualizirani DAPI bojanjem. (D) Prikaz važnosti proteolitičke degradacije DPC-ova za aktivaciju signalizacije DNA oštećenja u slučaju nastanka TOPO1-DPC-ova prilikom čega na mjestu nastanka DPC-a nastane i jednostruki lom DNA.

4.4. Posljedice nastanka i popravka DPC-ova na staničnu vijabilnost

4.4.1. Nastanak DPC-ova dovodi do usporavanja stanične proliferacije i stanične smrti

U ovom poglavlju testirano je kako nastanak i popravak DPC-ova utječe na staničnu vijabilnost u vidu stanične proliferacije i aktivacije apoptoze. Utjecaj duljine izlaganja FA tretmanu testiran je na Hela stanicama. Stanice su tretirane s 400 i 800 μM FA u tretmanima duljina od 15 do 240 minuta, nakon čega je izmjerena količina DPC-ova. Rezultati ukazuju da u tretmanima duljine od 120 minuta dolazi do povećanja količine DPC-ova, nakon čega nema daljnje porasta njihove količine, što sugerira nastanak ravnoteže između stvaranja i popravka (slika 21 A). Kako bi se ispitaio utjecaj količine DPC-ova na staničnu proliferaciju napravljeno je brojanje stanica. Stanice su tretirane rastućim koncentracijama FA (100 – 1600 μM) različite duljine vremena (od 15, 60 i 120 min), nakon čega su se oporavljale tijekom 24 h. Rezultati su uspoređeni sa stanicama koje su tretirane istim koncentracijama FA u trajanju od 24 h, bez oporavka. Rezultati brojanja stanica ukazuju da kontinuirani tretman FA jako utječe na staničnu proliferaciju i preživljavanje stanica u dozama većim od 100 μM . Stanice tretirane 2 h pa oporavljane pokazuju smanjenje broja stanica pri 400 μM . Stanice tretirane 1 h pa oporavljane pokazuju smanjenje broja stanica pri 800 μM dok stanice tretirane samo 15 min pa oporavljanje nisu pokazale smanjenje u broju stanica (slika 21 B), iako se DPC-ovi uspješno formiraju u takvom tipu tretmana. Kako bismo utvrdili da li je razlika u broju stanica posljedica smanjene proliferacije ili smrti stanica prilikom brojanja stanica primijenjeno je bojanje stanica tripan plavo bojom, koja boja umiruće i mrtve stanice. Uspoređeni su rezultati tretmana 2 h s 24 h oporavka s rezultatima kontinuiranog tretmana, iz kojih je jasno vidljivo da u tretmanu s popravkom broj tripan plavo bojanih stanica raste tek pri 1600 μM FA, dok kod kontinuirano tretiranih stanica taj broj raste već pri 200 μM (slika 21 C). Ovi rezultati sugeriraju da stanice kojima je omogućen oporavak ne umiru kao posljedica nastanka DPC-ova, već da razlika u broju stanica proizlazi iz smanjene proliferacije. Izostanak odnosno aktivacija stanične smrti u oporavljanim odnosno kontinuirano tretiranim stanicama provjeren je imunodetekcijom cijepanja PARP1 proteina, kao markera aktivacije apoptoze. Rezultati nedvojbeno ukazuju da kontinuirano tretirane stanice aktiviraju apoptozu već nakon 6 h tretmana s 400 μM FA, dok stanice tretirane 1h pa oporavljanje 6 i 24 h ne aktiviraju apoptozu. Aktivaciju apoptoze u kontinuiranom tretmanu prati i aktivacija γH2Ax , što sugerira sve veće nakupljanje nepopravljenih oštećenja DNA što je najvjerojatniji uzrok aktivacije apoptoze (slika 21 D).

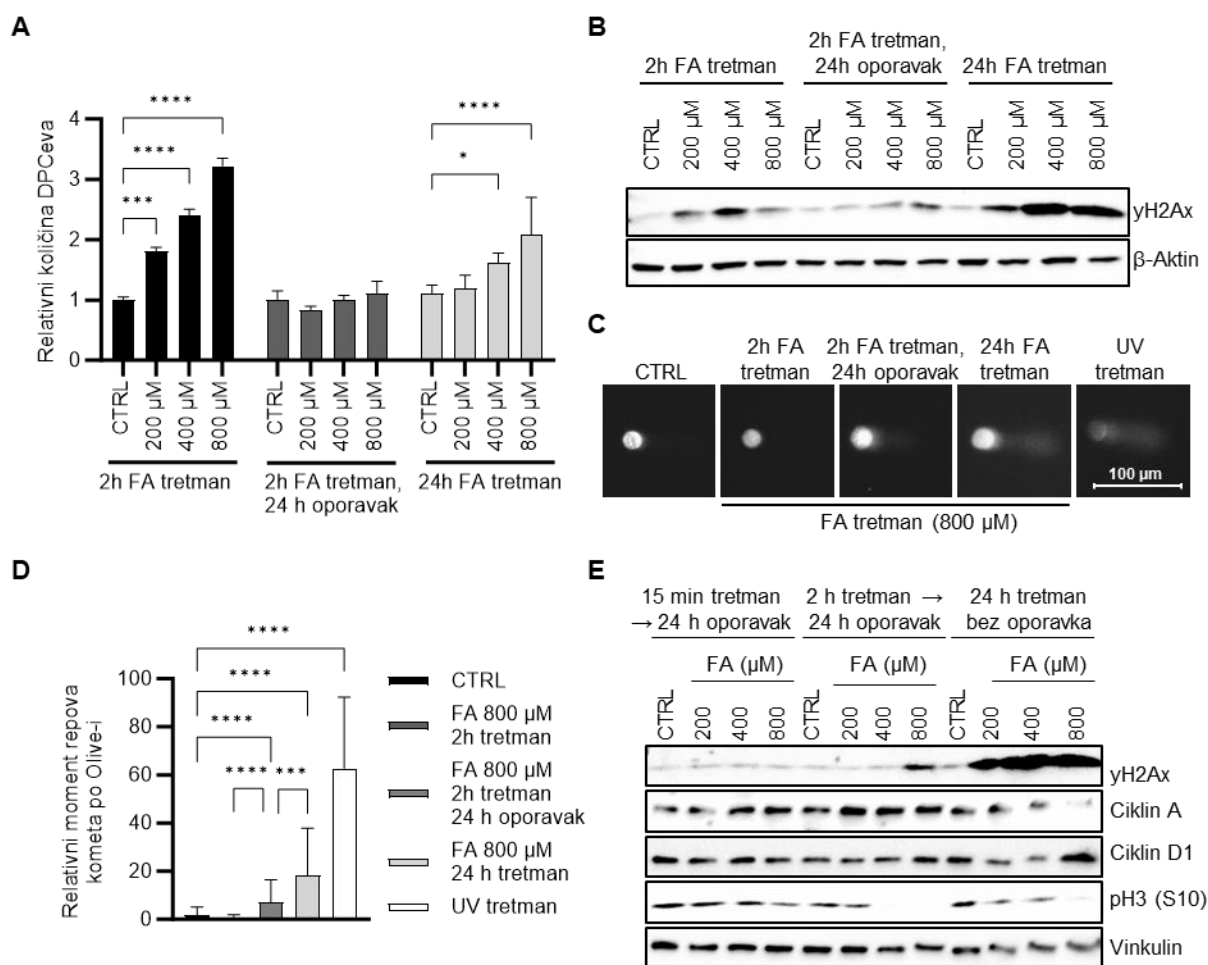


Slika 21. Nastanak DPC-ova dovodi do usporavanja proliferacije i aktivacije apoptoze. (A) BCA kvantifikacija DPC-ova izoliranih iz Hela stanica tretiranih s 400 i 800 μ M FA naznačenu duljinu vremena. (B) Rezultati brojanja stanica nakon normalizacije. Hela stanice su tretirane rastućim koncentracijama FA 15 min, 1 h i 2h nakon čega je FA uklonjen i stanice su se oporavljale 24 h ili su bile kontinuirano tretirane tijekom 24 h. (C) Normalizirani rezultati bojanja bojom tripan plavo Hela stanica tretiranih rastućim koncentracijama FA 2 h uz 24 h oporavka ili 24h kontinuiranog FA tretmana. (D) Imunodetekcija SPRTN-a, markera apoptoze (PARP1) i markera DNA oštećenja (γ H2Ax) na Hela stanicama tretiranim s 400 μ M FA 1 h koje su se oporavljale 6 i 24 h ili su podvrgnute kontinuiranom tretmanu tijekom 6 i 24 h.

4.4.2. Nastanak i popravak DPC-ova dovodi do oštećenja DNA koje usporava prolazak kroz S fazu staničnog ciklusa

Kako bismo utvrdili razlog smanjenja stanične proliferacije kod stanica kojima je omogućen popravak, izolirani su DPC-ovi iz HeLa stanica tretiranih s 200, 400 i 800 μM FA u trajanju od 2 h. Trećini stanica uklonjen je tretman i stanicama je omogućen oporavak, trećina stanica ostavljena je u kontinuiranom tretmanu, a trećina stanica je prikupljena. Nakon završetka eksperimenta izolirani su DPC-ovi. Rezultati ovoga testa ukazuju da stanice tretirane 2 h jasno pokazuju povećanje količine DPC-ova. Stanice koje su tretirane 2 h pa oporavljane 24 h uspješno su popravile sve nastale DPC-ove. Zanimljivo, stanice u 24 h kontinuiranom tretmanu sadržavale su manje DPC-ova od onih u samo 2 h tretmana ukazujući na djelomično efikasan popravak DPC-ova uzimajući u obzir konstantno nastajanje novih (slika 22 A). Sljedeći korak uključivao je ponavljanje istog eksperimentalnog pristupa te analizu aktivacije γH2Ax . γH2Ax je aktiviran nakon 2 h tretmana. U stanicama koje su se oporavljale 24 h aktivacija γH2Ax je oslabila, dok je u stanicama koje su tretirane kontinuirano tijekom 24 h aktivacija γH2Ax bila iznimno snažna (slika 22 B). Rezultati ukazuju da stanice kojima je omogućen popravak nakon indukcije DPC-ova efikasno uklanjaju proteinski dio DPC lezije te popravljaju štetu na molekuli DNA. Stanice u kontinuiranom tretmanu su djelomično uklonile proteinski dio lezije, ali je sama molekula DNA nakupila veliku količinu oštećenja. Da bi potvrdili ovakav rezultat proveden je komet esej koristeći isti eksperimentalni pristup. Komet esej ukazuje da stanice nakon 2 h tretmana s 800 μM FA nisu razvile lomove DNA, dok u 24 h tretmanu jesu. Rezultati komet eseja na 2 h tretiranim i 24 h oporavljanim stanicama sugeriraju postojanje manje količine lomova DNA (slika 22 C i D). Postojanje lomova DNA u oporavljanim stanicama, koje ne sadržavaju proteinske dijelove DPC lezije, potvrđuje da se DPC lezije popravljaju u dva koraka: proteolitička degradacija DPC-a pa popravak same molekule DNA. Kao bismo utvrdili što se događa s progresijom staničnog ciklusa kod stanica kojima smo izazvali manju ili veću količinu DPC-ova pa im omogućili oporavak, HeLa stanice su tretirane s 200, 400 i 800 μM FA 15 i 120 minuta, nakon čega je tretman uklonjen i stanicama je omogućen oporavak u trajanju od 24 h. Za usporedbu su korištene stanice tretirane kontinuirano 24 h. Imunodetektirani su faktori progresije staničnog ciklusa: ciklin A, ciklin D1 i fosforilacija H3 na serinu 10 (S10). Ciklin A osigurava progresiju kroz S fazu staničnog ciklusa, ciklin D1 ulazak u S fazu, dok je H3 fosforiliran prilikom kondenzacije kromatina, u M fazi. Paralelno s faktorima staničnog ciklusa praćena je aktivacija γH2Ax . Rezultati ukazuju da stanice

tretirane inicijalno malom dozom DPC-ova ne pokazuju nikakvu promjenu u progresiji staničnog ciklusa kao ni aktivaciju γ H2Ax. Ovakav rezultat se slaže s rezultatima brojanja stanica. Stanice s većom količinom izazvanih DPC-ova pokazuju povećanje ekspresije ciklina A i ciklina D1, a smanjenje p-H3 što sugerira da se duže vremena zadržavaju u ranijim fazama staničnog ciklusa (kraj G1 i S fazi), a γ H2Ax pokazuje postojanje male količine oštećenja DNA samo pri najvećoj koncentraciji FA. Stanice koje su bile kontinuirano tretirane smanjile su ekspresiju svih faktora staničnog ciklusa uz iznimku povećanja ciklina D1 pri tretmanu s 800 μ M FA, a snažna aktivacija γ H2Ax potvrđuje iznimno veliku količinu oštećenja DNA (slika 22 E).

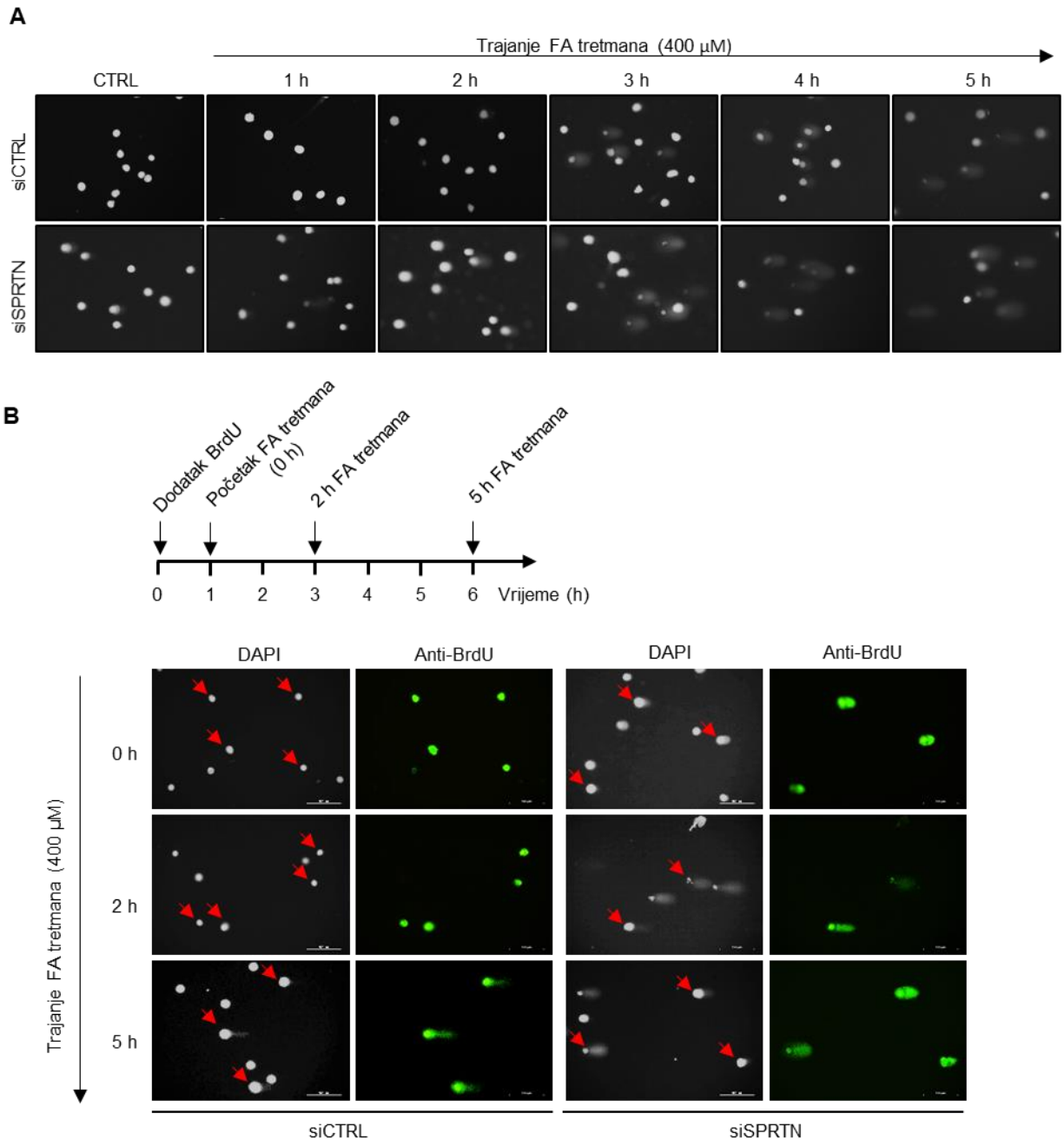


Slika 22. Nastanak i popravak DPC-ova dovodi do DNA oštećenja koje usporava prolazak kroz S fazu staničnog ciklusa. (A) DPC-ovi kvantificirani BCA esejom izolirani iz HeLa stanica tretiranih s 200, 400 ili 800 μ M FA tijekom 2 i 24 h kontinuirano ili tijekom 2 h tretmana uz 24 h oporavka. Statistička analiza napravljena je Two-way ANOVA testom sa Dunnetovim testom kao *post-hoc* analiza. (B) Imunodetekcija aktivacije γ H2Ax u istom eksperimentalnom pristupu kao na slici A. (C) Reprezentativne fotografije komet eseja na HeLa stanicama tretiranim s 800 μ M FA 2 i 24

h ili tretiranim s 800 μ M FA 2h uz oporavak od 24 h. Tretman UV zračenjem je korišten kao pozitivna kontrola. Kometi su vizualizirani bojanjem etidij bromidom. (D) Kvantifikacija eksperimenta pod C. Korištenjem računalne obrade izmjereni su momenti repova kometa po Olive-u. (E) Imunodetekcija aktivacije γ H2Ax te biljega staničnog ciklusa: ciklina A i D1 te fosforilacije H3 na serinu 10. Vinkulin je korišten kao kontrola nanošena uzoraka.

4.4.3. Nedostatak SPRTN-a dovodi do razvijanja oštećenja DNA i izvan S faze

Da bismo utvrdili ulogu SPRTN-a u nastanku oštećenja DNA prilikom FA tretmana, Hela stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretirane su s 400 μ M FA u trajanju od 1 – 5 h pa analizirane komet esejom. Rezultati eseja ukazuju da kontrolne stanice u prvih 2 h tretmana ne sadržavaju lomove DNA, nakon čega oni počnu nastajati. Stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a počele su razvijati lomove DNA već nakon 1 h tretmana te je duljina repova kometa naizgled puno veća u odnosu na repove kontrolnih stanica čak i u duljem trajanju tretmana, sugerirajući da smanjenje izražaja SPRTN-a dovodi do razvoja različitog mehanizma razvoja lomova (slika 23 A). Pitanje koje smo postavili je zašto su samo neke stanice razvile lomove DNA u kontrolnoj populaciji Hela stanica dok su gotovo sve razvile lomove u Hela stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a. Da bismo saznali odgovor na to pitanje napravljen je BrdU komet esej. Modificirana DNA baza dodana je u medij u kojem su uzgajane stanice za eksperiment 1 sat prije tretmana formaldehidom. Stanice u S fazi iskorištavaju BrdU i inkorporiraju je u novo-sintetiziranu molekulu DNA prilikom replikacije DNA. Stanice su potom tretirane formaldehidom tijekom 2 i 5 h, nakon čega je proveden BrdU komet esej. Korištenjem BrdU vizualizirane su stanice u S fazi staničnog ciklusa, dok su sve stanice vizualizirane bojanjem DAPI bojom za DNA. Rezultati BrdU komet eseja pokazuju da su samo stanice koje su ušle u S fazu zadobile lomove DNA u kontrolnim Hela stanicama, što je vidljivo iz preklapanja BrdU kometa s DAPI kometima. S druge strane, stanice sa smanjenom ekspresijom SPRTN-a razvijale su lomove DNA neovisno o S fazi, pa je tako samo dio stanica s DAPI kometima također pozitivan na BrdU bojanje (slika 23 B).



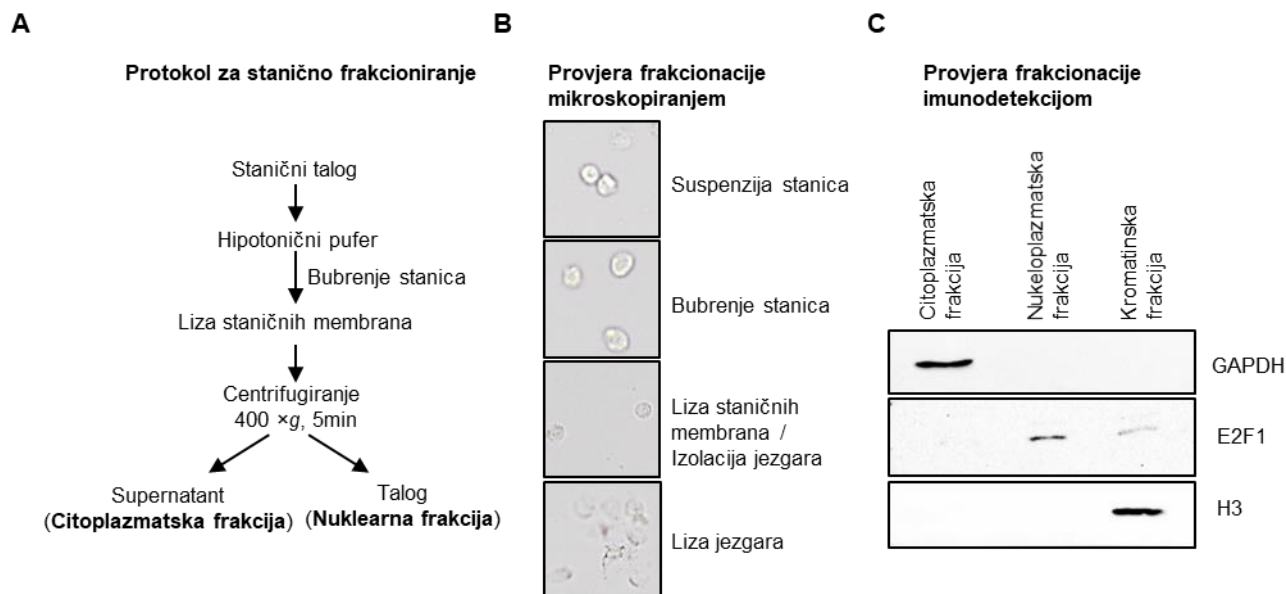
Slika 23. : Smanjenje izražaja SPRTN-a dovodi do razvijanja DNA lomova neovisno o fazi staničnog ciklusa. (A) Rezultati komet eseja na kontrolnim i HeLa stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a tretiranim s 400 μ M FA naznačenu duljinu vremena. Kometi su vizualizirani DAPI bojanjem. (B) Rezultati BrdU komet eseja na kontrolnim i HeLa stanicama sa smanjenim izražajem proteina SPRTN tretiranim s 400 μ M FA naznačenu duljinu vremena. Ugrađivanje BrdU u DNA prilikom DNA replikacije vizualizirano je imunofluorescencijski, dok su kometi vizualizirani DAPI bojanjem. Strelce označavaju stanice pozitivne na BrdU bojanje u ukupnoj populaciji stanica na prikazu.

4.5. Dodatni rezultati - Optimizacija metoda primijenjenih u radu

U ovom poglavlju rezultata predstavljene su optimizacije nekoliko metoda ključnih za provedbu istraživanja. Promjene napravljene na standardnim protokolima bile su nužne da bi se mogle primijeniti za ovakav tip istraživanja. Sve promjene na standardnim protokolima korištenih metoda su validirane i predstavljene u ovom poglavlju.

4.5.1. Optimizacija staničnog frakcioniranja

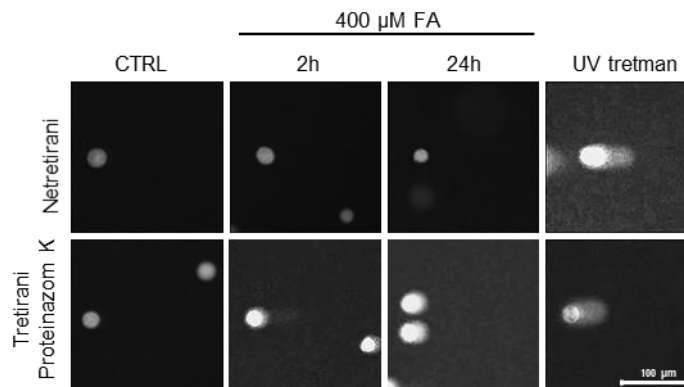
Stanično frakcioniranje predstavlja najpouzdaniju metodu određivanja lokalizacije pojedinog proteina u različitim staničnim odjeljcima. U našem istraživanju je optimiziran protokol prethodno prikazan u publikaciji Barker et al. [62], u kojem je prikazana izolacija jezgara. Ovaj protokol je unaprijeđen tako da omogućava daljnje frakcioniranje jezgara na nukleoplazmatsku i kromatinsku frakciju, što je ključno za praćenje vezivanja faktora popravka DNA na kromatin. Na slici 20 A predstavljen je prikaz metode frakcioniranja iz navedenoga rada. Talog stanica se suspendira u hipotoničnom puferu, nakon čega se stanične membrane probiju djelovanjem blagog deterdženta. Time je omogućena izolacija jezgara, koje ostaju neoštećene. Na ovaj postupak nastavljen je korak frakcioniranja jezgre u puferu s natrij deoksikolatom (DOC), koji omogućava efikasno probijanje jezgrine membrane i izolaciju kromatina. Efikasnost ovog protokola validirana je promatranjem stanica pod svjetlosnim mikroskopom u svakom od koraka ovoga protokola (slika 24 B). Rezultati ukazuju da hipotonični pufer dovodi do bubrenja stanica, a dodatak deterdženta uspješno uklanja staničnu membranu, ostavljajući jezgre koje su probijene u sljedećem koraku, što je jasno vidljivo. Daljnja validacija protokola provedena je imunodetekcijom specifičnih markera za citoplazmatsku (GAPDH), nukleoplazmatsku (E2F1) i kromatinsku (H3) frakciju.



Slika 24. Optimizacija i validacija staničnog frakcioniranja. (A) Nacrt protokola za stanično frakcioniranje. (B) Provjera uspješnosti pojedinog koraka frakcioniranja korištenjem svjetlosnog mikroskopa. (C) Provjera uspješnosti staničnog frakcioniranja imunodetekcijom specifičnih markera za citoplazmatsku (GAPDH), nukleoplazmatsku (E2F1) i kromatinsku (H3) frakciju.

4.5.2. Optimizacija protokola komet eseja za detekciju oštećenja DNA uzrokovanih nastankom DPC-ova

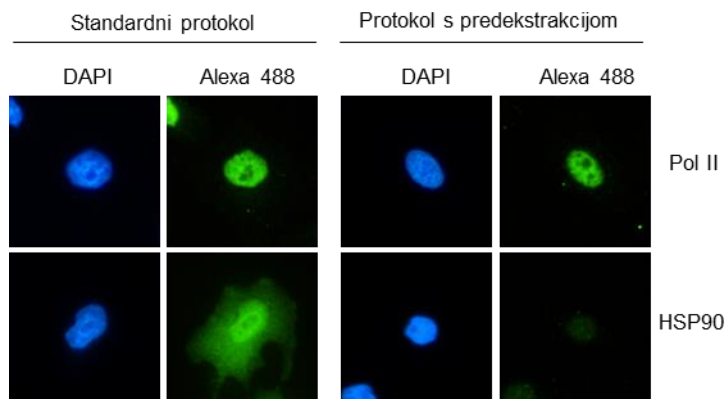
Provođenjem standardnog protokola za komet esej nismo uspješno kvantificirali količinu lomova molekule DNA nakon indukcije DPC-ova, iako su rezultati signalizacije jasno pokazali postojanje oštećenja DNA. Razlog izostanka kretanja oštećene DNA u električnom polju vjerojatno je prisutnost kovalentno vezanih proteina na molekuli DNA. Da bi omogućili kretanje oštećene DNA u uvjetima elektroforeze, proveden je tretman Proteinazom K, kojim su uklonjeni proteini prisutni na DNA molekuli. Ovaj dodani korak omogućio je kvantifikaciju oštećenja DNA uzrokovanih DPC-ovima, kao što je to prikazano na slici 25. Kao što je vidljivo na slici, tretman Proteinazom K nije utjecao na kvantifikaciju oštećenja DNA uzrokovanih UV zračenjem, što je služilo kao pozitivna kontrola nastanka oštećenja DNA. Time smo pokazali da DPC-ovi onemogućavaju kretanje oštećene DNA u uvjetima elektroforeze, što bez optimizacije protokola ne bismo uspjeli.



Slika 25. Optimizacija protokola komet eseja za detekciju DNA oštećenja uzrokovanih nastankom DPC-ova. Hela stanice su tretirane sa 400 μM FA 2 i 24h ili 1 mJ/cm^2 UV zračenja. Udio DNA oštećenja određen je standardnim protokolom za komet esej te protokolom za komet esej s dodatkom Proteinaze K.

4.5.3. Optimizacija metode imunofluorescencije za specifičnu vizualizaciju nuklearnih signala

Metoda imunofluorescencije (IF) je jedna od osnovnih metoda molekularne biologije koja omogućava analizu ekspresije i staničnog razmještaja određenog proteina s razlučivošću od jedne stanice. Standardnim protokolom za IF možemo pratiti ponašanje proteina unutar stanice, ali samo uz pomoć vrhunskih mikroskopa je moguće vidjeti ponašanje proteina unutar jezgre, jer su signali koji pripadaju jezgri zasjenjeni citoplazmatskim signalima. Da bismo omogućili vizualizaciju proteina unutar jezgre optimizirali smo standardni IF protokol, pridodajući mu korak predekstrakcije. Taj postupak uzrokuje permeabilizaciju stanica na stakalcu za IF prije fiksacije uzorka. Permeabilizacijom stanica uklanjaju se citoplazmatski proteini ostavljajući samo proteine smještene u jezgri kao moguće mete za IF. Validacija protokola provedena je na Hela stanicama na kojima su detektirani Pol II protein, koji je smješten u jezgri, te HSP90 protein, koji je smješten u citoplazmi. Jezgre su obojane DAPI-jem. Rezultati jasno ukazuju da postupkom predekstrakcije dolazi do uklanjanja citoplazmatskih signala ostavljajući samo signale iz jezgre, što je zorno prikazano na primjeru bojanja HSP90 proteina (slika 26). Bojanje HSP90 je u potpunosti izgubljeno procesom predekstrakcije zbog njegovog citoplazmatskog razmještaja, dok je bojanje Pol II u potpunosti očuvano procesom predekstrakcije jer je ovaj protein u potpunosti smješten u jezgri.



Slika 26. Usporedba rezultata standardnog protokola za IF i protokola za IF s predekstrakcijom prilikom detekcije proteina koji je smješten u jezgri (Pol II) te proteina koji je smješten u citoplazmi (HSP90). Jezgre su obojane bojom DAPI.

5. RASPRAVA

Kovalentno vezanje proteina na molekulu DNA (eng: „*DNA-protein crosslinks*“; DPC) jedan je od najčešćih tipova oštećenja DNA [3]. Iako je ovaj tip oštećenja DNA otkriven prije više od 60 godina [11], proučavanje se intenziviralo tek u posljednjem desetljeću nakon otkrića i opisivanja proteaza ovisnih o DNA (wss1 i SPRTN) [12,13] te opisivanja Ruijs-Aalfs sindroma [13]. Važan korak za istraživanje DPC-ova predstavlja mogućnost njihove izolacije i kvantifikacije. U ovoj disertaciji opisan je razvoj novog eseja za direktnu izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova nazvan STAR esej (eng: „*Superior method for True DNA–protein crosslinks Recovery (STAR) assay*“). Protokol STAR eseja dizajniran je tako da bude provediv u svakom laboratoriju s minimalno ili bez dodatnih ulaganja. Korištenje dvostupanjskog postupka omogućilo je da STAR esej bude selektivan i osjetljiv za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova, sposoban detektirati neenzimske i enzimске DPC-ove nastale primjenom različitih agensa za indukciju DPCova (FA, UV zračenje, kemoterapeutici). STAR esej kompatibilan je s nekoliko strategija za detekciju DPC-ova, uključujući razdvajanje i bojanje u gelu, BCA esej, imunodetekciju i spektrometriju masa.

Glavna prednost STAR eseja je čistoća DPC izolata. Izolati star eseja sadržavaju oko osam puta manju količinu pozadinskih proteinskih signala uspoređujući s najcitiranijom direktnom metodom za izolaciju DPC-ova, RADAR esejom [27,28,30,34,47,56]. Jedan od najvažnijih izvora proteinske kontaminacije u RADAR esejima su kovalentno vezani proteini na RNA molekulama (eng: „*RNA-protein crosslinks*“, RPC-ovi). Prisutnost RNA u izolatima naglasili su i sami autori RADAR eseja [26]. Kao jednostavno rješenje nameće se uklanjanje RNA dodatkom RNaze, ali ovakav pristup ne rješava problem kontaminacije. Naime, degradacijom RNA dolazi do precipitacije RNA vezujućih proteina pa bi se oni i dalje nalazili u DPC izolatima [63]. Drugi izvor proteinskog onečišćenja je precipitacija manjeg dijela topljivih proteina, što je potvrđeno imunodetekcijom proteina u DPC izolatima RADAR eseja koji nisu interaktori ni DNA ni RNA molekula. Iz naših rezultata možemo zaključiti da je primjena RADAR metode zadovoljavajuća za izolaciju specifičnih enzimskih DPC-ova, dok je kod tretmana koji izazivaju nespecifične DPC-ove ova metoda neadekvatna. Oba navedena izvora proteinskog onečišćenja uspješno su izbjegnuta u prvom koraku STAR eseja. Zbog dizajna protokola STAR eseja, zbog kojeg se RNA i DNA razdvajaju već u prvom koraku, moguće je izolirati i proučavati RPC-ove. RPC-ovi su potpuno neistraženi tip RNA oštećenja [64]. Korištenje STAR eseja za izolaciju RPC-ova omogućio bi otvaranje novog područja istraživanja oštećenja i popravka RNA. Onečišćenje DPC izolata

molekulama RNA manje utječe na indirektno metode u koje ubrajamo ARK esej [27] i KCl-SDS metodu [58]. Ove metode za izolaciju i kvantifikaciju DPC-ova provode indirektnu kvantifikaciju, mjereći količinu DNA koja na sebi sadržava kovalentno vezane proteine. Ukoliko se koristi specifičan marker za DNA, poput boje PicoGreen, kontaminacija s RNA ne utječe na konačan rezultat. Indirektno metode jako su ovisne o tehničkoj provedbi eksperimenta. Najvažniji korak predstavlja usitnjavanje izolirane genomske DNA. Prosječna veličina jedne molekule DNA u ljudskoj stanici je 130×10^6 parova baza [2]. Za izolaciju indirektnim metodama potrebno je postići ujednačenu veličinu DNA fragmenata veličine manje od 20×10^3 parova baza [27,58]. Iz naših rezultata izolacije DPC-ova KCl/SDS precipitacijom možemo zaključiti da metoda omogućava uspješno praćenje DPC popravka, ali ne omogućava praćenje procesa proteolitičke degradacije DPC-ova, budući i prisutnost peptida nastalog degradacijom DPC-ova dovodi do precipitacije fragmenta DNA. Stoga dinamika popravka DPC-ova izgleda sporije nego što je to u stvarnosti. Također, ova metoda nije kompatibilna s niti jednim drugim načinom detekcije ni identifikacije DPC-ova osim kvantifikacije DNA, jer prilikom KCl/SDS precipitacije precipitiraju svi stanični proteini, a ne samo DPC-ovi.

Najvažniji dokaz efikasnosti STAR eseja proizlazi iz validacije na stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN proteina, gdje smo pokazali da smanjenje izražaja SPRTN-a dovodi do nakupljanja endogenih DPC-ova te utječe na sposobnost stanica da popravi oštećenja. Mogućnosti STAR eseja svestranije su od same izolacije DPC-ova. STAR esej pokazao se iznimno uspješnim u izolaciji peptida nastalih proteolizom DPC-ova koji su i dalje kovalentno vezani za molekulu DNA. Ovaj rezultat demonstriran je pomoću nekoliko različitih metoda detekcije, uključujući razdvajanje i bojanje proteina na gelu, imunodetekciju te spektrometriju masa. Postojanje proteolitičkih ostataka prethodno je demonstrirano dvama različitim eksperimentalnim pristupima: korištenjem DPC modela na plazmidu [5,32] i metodom fluorescentnog obilježavanja proteina na genomskoj DNA [15,19]. Uspoređujući STAR esej sa spomenutim pristupima detekcije proteolitičkih ostataka, pokazali smo da je STAR esej značajno jednostavniji i pouzdaniji način za kvantifikaciju i istraživanje. Korištenjem STAR eseja uspješno smo pokazali da je nakupljanje i uklanjanje proteolitičkih ostataka vremenski regulirano, što korelira s rezultatima drugih eksperimentalnih postupaka. Nakupljanje proteolitičkih ostataka započinje nakon lokalizacije SPRTN-a na kromatin, što smo demonstrirali metodama imunofluorescencije i staničnog frakcioniranja. Vezanju SPRTN-a na kromatin prethodila je fosforilacija ATM-a. Važan dokaz o

ulozi fosforilacije ATM-a u vezanju SPRTN-a na kromatin pruža imunodetekcija. Njom smo pokazali da u stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a postoji vrlo jak signal p-ATM, vjerojatno zbog velike „potrebe“ za SPRTN-om. No, zbog smanjenja izražaja SPRTN-a takve stanice nakupljaju endogene DPC-ove. Djelomično objašnjenje zašto dolazi do fosforilacije ATM-a proizlazi iz činjenice da DPC-ovi posljedično dovode do zaustavljanja i urušavanja replikacijskih rašlji [30]. Vjerojatnije je da je fosforilacija ATM-a vezana za signalizaciju oštećenja molekule DNA koje je prikriveno ispod DPC lezije. SPRTN ima specifičan obrazac vezivanja na molekulu DNA, vezujući se prvo u manjoj količini (dovodeći do početka proteolize), nakon čega slijedi fosforilacija ATM-a i snažno vezivanje SPRTN-a na kromatin. Kako nastanak DPC-ova ne uzrokuje oštećenje DNA u vidu lomova lanaca (osim u slučaju DPC-ova nastalih kovalentnim vezivanjem enzima iz skupine topoizomeraza), a glavni razlog fosforilacije ATM-a su lomovi molekule DNA [65], ponašanje ATM-a koje smo opisali vjerojatno je njegova novoopisana uloga. Nizvodno od p-ATM i vezanja SPRTN-a na kromatin je aktivacija γ H2Ax. Kao i p-ATM, γ H2Ax se smatra markerom dvostrukih lomova DNA lanaca, ali pregledom literature pronašli smo veliki broj radova koji povezuju γ H2Ax s drugim vrstama oštećenja i popravka molekule DNA [66–73]. H2Ax može biti aktiviran fosforilacijom od strane brojnih kinaza uključujući ATM i PRKDC koje smo istraživali u ovoj disertaciji [43,44,66,69,74,75]. Kako smo primjenom komet eseja dokazali da u trenucima aktivacije ATM-a i γ H2Ax u stanicama nisu prisutni lomovi DNA lanaca, a aktivaciji γ H2Ax prethodi aktivacija ATM-a, zaključili smo da je ATM jedna od kinaza uključenih u aktivaciju γ H2Ax kod popravka DPC-ova. Osim ATM-a, u popravku DPC-ova izazvanih korištenjem TOPO pronašli smo regrutaciju PRKDC na kromatin, koja prethodi aktivaciji γ H2Ax. TOPO izaziva nastajanje TOPO1-DPCova, kao i jednostruke lomove molekule DNA na mjestima DPC lezije, što je moguće objašnjenje sudjelovanja PRKDC kinaze kod ovog specifičnog tipa DPC-ova. Za PRKDC je prethodno pokazano da igra važnu ulogu kod popravka lomova DNA [75].

SPRTN prisutan u jezgri se brzo veže na kromatin nakon nastanka DPC-ova, započinjući proteolizu. To dovodi do aktivacije signalizacije putem fosforilacije ATM-a. SPRTN se „troši“ prilikom proteolize DPC-ova (auto-proteolizom [52]). Gubitak SPRTN-a u jezgri se nadoknađuje *de novo* sintezom i transportom iz citoplazme u jezgru, nakon čega se velika količina SPRTN-a veže za kromatin i započinje brzu i efikasnu proteolizu DPC-ova. Nakon što proteinski dio DPC lezije bude skraćen na odgovarajuću veličinu da ne ometa kontakt kinaza i H2Ax, dolazi do fosforilacije H2Ax. Signalizacija putem H2Ax dovodi do regrutacije faktora za popravak DNA, a

u ovoj smo disertaciji demonstrirali sudjelovanje PCNA, VCP, XRCC3 i PARP1, koji su već pokazani faktori koji smanjuju toksičnost DPC lezija [15,19,20,24,25,29,34,37,57]. Vezanje ovih faktora popravka DNA precizno korelira s početkom uklanjanja proteolitičkih ostataka DPC-ova s molekule DNA, iz čega možemo zaključiti da su klasični mehanizmi popravka DNA važni za potpuno uklanjanje DPC-ova. Iz rezultata ove studije možemo zaključiti da je popravak DPC-ova dvostupanjski proces, koji uključuje proteolizu proteinskog dijela DPC lezije od strane proteaze SPRTN, što dovodi do zaostajanja peptida kovalentno vezanih za molekulu DNA. Oni se uklanjaju aktivacijom klasičnih mehanizama popravka DNA, vraćajući DNA u izvorni oblik.

Važnost proteolitičke degradacije i uklanjanja DPC-ova naglašena je nastankom iznimno velike genomske nestabilnosti kao rezultat njihova neuklanjanja. Kao rezultat FA tretmana stanica sa smanjenim izražajem SPRTN-a došlo je do nakupljanja oštećenja DNA u vidu lomova DNA, kao što je prethodno demonstrirano [76]. Zanimljiva je i vremenska ovisnost nastanka lomova DNA, gdje kontrolne stanice razvijaju lomove DNA 3 h nakon tretmana formaldehidom, ali samo u određenim stanicama, dok ostale stanice ne razvijaju lomove. Zanimljivo je da je većina DPC-ova djelomično ili većinski proteolitički degradirana, što ukazuje da i sami proteolitički ostatci DPC-ova utječu na razvoj lomova. S druge strane, stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a počinju stvarati lomove DNA odmah nakon tretmana i to više nego kontrolne stanice. Lomovi DNA najvjerojatnije nastaju kao posljedica replikacijskog i transkripcijskog stresa [30]. Primjenom BrdU komet eseja potvrdili smo da kod kontrolnih stanica isključivo stanice u S fazu staničnog ciklusa razvijaju lomove DNA nakon FA tretmana (BrdU pozitivne stanice). Vrlo zanimljiv nalaz bio je na stanicama sa smanjenim izražajem SPRTN-a na kojima su lomovi DNA nastajali u bilo kojoj fazi staničnog ciklusa (odnosno, kometi su prisutni na BrdU pozitivnim i BrdU negativnim stanicama). Rezultati našeg istraživanja, kao i istraživanja drugih skupina [30,76] ukazuju na iznimnu važnost proteolitičke aktivnosti SPRTN-a za popravak molekule DNA na mjestu DPC lezije, radi sprječavanja genomske nestabilnosti.

U daljnjim istraživanjima fokus smo stavili na važnost proteolize DPC-ova na aktivaciju popravka DNA. Stanice sa smanjenim izražajem SPRTN-a nisu u mogućnosti proteolitički degradirati DPC lezije. Ovaj nalaz potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja [27,30,51,77] i dokazuje da je SPRTN najvažnija proteaza uključena u proteolitičku degradaciju DPC-ova. Osim izostanka proteolitičke degradacije, smanjenje izražaja SPRTN-a prevenira aktivaciju γ H2Ax, koja

se događa nakon tretmana stanica DPC-inducirajućim agensima (FA i TOPO), ali ovaj efekt nije vidljiv kod tretmana koji izazivaju druge tipove oštećenja DNA (UV i H₂O₂). Prethodne studije pokazale su da je γ H2Ax važan za aktivaciju i vezanje faktora uključenih u popravak DNA [66–68,70–73,78] što nas je zaintrigiralo i nagnalo na daljnje istraživanje. Eksperimentom u koji smo najprije izazvali DPC-ove tretmanom s FA, a potom lomove DNA UV zračenjem, dokazali smo da su DPC-ovi ti koji inhibiraju aktivaciju popravka DNA, a ne nedostatak SPRTN-a (uzimajući u obzir da nedostatak SPRTN-a dovodi do nakupljanja endogenih DPC-ova). Korištenjem inhibitora TOPO1 proteina koji dovodi do kovalentnog vezivanja TOPO1 proteina na mjestu jednostrukog loma molekule DNA dodatno smo potvrdili rezultate prethodnog eksperimenta. Stanice sa smanjenim izražajem SPRTN nisu proteolitički degradirale TOPO1-DPC lezije, nisu aktivirale γ H2Ax niti su popravljale nastale jednostruke lomove, što smo pokazali primjenom komet eseja. Ovakvi rezultati dokazuju da su DPC-ovi steričke barijere na molekuli DNA, koje onemogućavaju odvijanje bilo kakvih procesa signalizacije oštećenja ili popravka DNA u svojoj blizini. Smanjenje njihove veličine putem proteolitičke degradacije proteinskog dijela DPC lezije je nužno za aktivaciju popravka DNA. Dodatno opažanje je da je moguć nastanak lomova DNA čak i ako su DPC-ovi proteolitički degradirani, dokazujući da i proteolitički ostaci kovalentno vezani za DNA mogu uzrokovati lomove DNA kao i kemijske promjene DNA baze na kojoj je došlo do nastanka DPC-a. Ovu opservaciju moguće je objasniti neravnomjernim rasporedom H2Ax proteina na kromatinu. Histon H2Ax ugrađen je u otprilike 10% svih nukleosoma [77,79], ali je nehomogeno raspoređen u skupinama na kromatinu [79]. Ako u blizini lokacije DPC-a ne nema H2Ax, oštećenje DNA uzrokovano nastankom DPC-a neće biti odmah prepoznato i popravljeno sve dok na njega ne naiđe replikacijska ili transkripcijska mašinerija iako će se uspješno proteolitički degradirati. Ovakav zaključak proizlazi iz rezultata komet eseja na stanicama kojima je omogućen oporavak nakon indukcije DPC-ova, gdje smo pokazali da nakon 24 h oporavka više ne sadržavaju značajnu količinu DPC-ova, ali ipak sadržavaju značajnu količinu lomova DNA i malu, ali vidljivu aktivaciju γ H2Ax. Naša pretpostavka je da zaostali (neuklonjeni) kovalentno vezani peptidi na DNA uzrokuju lomove DNA interferirajući s procesima replikacije i transkripcije [76]. Ovaj zaključak također može objasniti usporavanje stanične proliferacije i akumulacije stanica u S fazi staničnog ciklusa iako su na ovom eksperimentalnom modelu DPC-ovi potpuno proteolitički degradirani. Nastalo oštećenje DNA također utječe na DNA metaboličke procese dovodeći do genomske nestabilnosti viđene u Ruijs-Aalfs sindromu [13].

Zaključno, unaprjeđenje kvalitete i kvantifikacije DPC-ova STAR esejem omogućilo je rasvjetljavanje dinamike DPC popravka. Daljnjim istraživanjem mehanizma popravka demonstrirali smo važnu ulogu proteaze SPRTN u aktivaciji odgovora na oštećenje DNA u prisutnosti DPC-ova. STAR esej omogućiti će daljnji napredak u istraživanju ovog tipa oštećenja DNA, omogućavajući tako proučavanje procesa tumorigeneze, ali i razvoja novih oblika kemoterapeutika baziranih na izazivanju DPC-ova.

6. ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji doveli su do sljedećih zaključaka:

- Novo razvijeni STAR esej je selektivan i osjetljiv esej za izolaciju DPC-ova koji pruža mogućnost izolacije različitih tipova DPC-ova i kompatibilan je s različitim metodama analize proteina
- STAR esej je efikasan u detekciji kovalentno vezanih peptida na DNA nastalih proteolitičkom degradacijom DPC-ova..
- Popravak DPC-ova je dvostupanjski proces koji uključuje proteolitičku degradaciju proteinskog dijela DPC lezije te popravak oštećenja DNA nastalog formiranjem DPC-ova.
- Mehanizam popravka DPC-ova započinje regrutacijom u jezgri prisutnog SPRTN-a na mjesta DPC oštećenja aktivirajući signalizaciju putem kinaze ATM. Aktivacija ATM sudjeluje u inicijaciji translokacije citoplazmatski lokaliziranog SPRTN-a u jezgru omogućujući efikasnu proteolizu DPC-ova.
- DPC-ovi sterički inhibiraju aktivaciju signalizacije oštećenja DNA putem γ H2Ax.
- SPRTN ima ključnu ulogu u aktivaciji signalizacije putem γ H2Ax kod popravka DPC-ova.
- Signalizacija preko γ H2Ax je ključna za inicijaciju popravka oštećenja DNA izazvanog nastankom DPC-ova.
- Peptidni ostatci proteolize DPC-ova mogu uzrokovati genomsku nestabilnost kao i sami DPC-ovi.

7. LITERATURA

1. Wei X, Peng Y, Bryan C, Yang K. Mechanisms of DNA–protein cross-link formation and repair. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2021;1869:1–9.
2. Cooper GM, Haosman RE. Stanica. Peto izdan. Zagreb: Medicinska naklada, Zagreb; 2004.
3. Ruggiano A, Ramadan K. The Trinity of SPRTN Protease Regulation. *Trends Biochem. Sci.* 2021;46:2–4.
4. Ruggiano A, Ramadan K. DNA–protein crosslink proteases in genome stability. *Commun. Biol.* 2021;4:1–11.
5. Chesner LN, Campbell C. A quantitative PCR-based assay reveals that nucleotide excision repair plays a predominant role in the removal of DNA-protein crosslinks from plasmids transfected into mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2018;62:18–27.
6. Klages-Mundt NL, Li L. Formation and repair of DNA-protein crosslink damage. *Sci. China Life Sci.* 2017;60:1065–76.
7. EFSA. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. *EFSA J.* 2014;12:1–11.
8. Halder S, Torrecilla I, Burkhalter MD, Popović M, Fielden J, Vaz B, i ostali. SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nat. Commun.* 2019;10.
9. Nakano T, Shoukamy MI, Tsuda M, Sasanuma H, Hirota K, Takata M, i ostali. Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells. *PLoS One* 2020;15:e0234859.
10. Zhang H, Xiong Y, Chen J. DNA–protein cross-link repair: what do we know now? *Cell Biosci.* 2020;10:1–10.
11. Smith KC. Dose dependent decrease in extractability of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light or with visible light plus dye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1962;8:157–63.
12. Stingle J, Schwarz MS, Bloemeke N, Wolf PG, Jentsch S. A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair. *Cell* 2014;158:327–38.

13. Lopez-Mosqueda J, Maddi K, Prgomet S, Kalayil S, Marinovic-Terzic I, Terzic J, i ostali. SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *Elife* 2016;5:1–19.
14. Lebedeva NA, Rechkunova NI, Endutkin A V., Lavrik OI. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Prevent Suicidal Covalent DNA-Protein Crosslink at Apurinic/Apyrimidinic Site. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;8:1–8.
15. Nakano T, Morishita S, Katafuchi A, Matsubara M, Horikawa Y, Terato H, i ostali. Nucleotide Excision Repair and Homologous Recombination Systems Commit Differentially to the Repair of DNA-Protein Crosslinks. *Mol. Cell* 2007;28:147–58.
16. Zecevic A, Hagan E, Reynolds M, Poage G, Johnston T, Zhitkovich A. XPA impacts formation but not proteasome-sensitive repair of DNA-protein cross-links induced by chromate. *Mutagenesis* 2010;25:381–8.
17. Wong VCL, Cash HL, Morse JL, Lu S, Zhitkovich A. S-phase sensing of DNA-protein crosslinks triggers TopBP1-independent ATR activation and p53-mediated cell death by formaldehyde. *Cell Cycle* 2012;11:2526–37.
18. Chesner LN, Essawy M, Warner C, Campbell C. DNA-protein crosslinks are repaired via homologous recombination in mammalian mitochondria. *DNA Repair (Amst)*. 2021;97:1–11.
19. Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, Terato H, Tsuboi T, Masuda T, i ostali. Homologous Recombination but Not Nucleotide Excision Repair Plays a Pivotal Role in Tolerance of DNA-Protein Cross-links in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 2009;284:27065–76.
20. Wong VCLL, Cash HL, Morse JL, Lu S, Zhitkovich A. S-phase sensing of DNA-protein crosslinks triggers TopBP1-independent ATR activation and p53-mediated cell death by formaldehyde. *Cell Cycle* 2012;11:2526–37.
21. Kühbacher U, Duxin JP. How to fix DNA-protein crosslinks. *DNA Repair (Amst)*. 2020;94:1–14.
22. Pavić CS. The role of ACRC protease and Nucleotide Excision Repair pathway in the repair of DNA-Protein Crosslinks (DPCs). 2023;

23. Baker DJ, Wuenschell G, Xia L, Termini J, Bates SE, Riggs AD, i ostali. Nucleotide Excision Repair Eliminates Unique DNA-Protein Cross-links from Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 2007;282:22592–604.
24. Mosbech A, Gibbs-Seymour I, Kagias K, Thorslund T, Beli P, Povlsen L, i ostali. DVC1 (C1orf124) is a DNA damage–targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19:1084–92.
25. Ghosal G, Leung JWC, Nair BC, Fong KW, Chen J. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *J. Biol. Chem.* 2012;287:34225–33.
26. Kiiianitsa K, Maizels N. A rapid and sensitive assay for DNA–protein covalent complexes in living cells. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e104–e104.
27. Hu Q, Klages-Mundt N, Wang R, Lynn E, Kuma Saha L, Zhang H, i ostali. The ARK Assay Is a Sensitive and Versatile Method for the Global Detection of DNA-Protein Crosslinks. *Cell Rep.* 2020;30:1235-1245.e4.
28. Fielden J, Wiseman K, Torrecilla I, Li S, Hume S, Chiang SC, i ostali. TEX264 coordinates p97- and SPRTN-mediated resolution of topoisomerase 1-DNA adducts. *Nat. Commun.* 2020;11:1–16.
29. Krastev DB, Li S, Sun Y, Wicks AJ, Hoslett G, Weekes D, i ostali. The ubiquitin-dependent ATPase p97 removes cytotoxic trapped PARP1 from chromatin. *Nat. Cell Biol.* 2022;24:62–73.
30. Vaz B, Popovic M, Newman JA, Fielden J, Aitkenhead H, Halder S, i ostali. Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Mol. Cell* 2016;64:704–19.
31. Stingle J, Habermann B, Jentsch S. DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 2015;40:67–71.
32. Larsen NB, Gao AO, Sparks JL, Gallina I, Wu RA, Mann M, i ostali. Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts. *Mol. Cell* 2019;73:574-588.e7.

33. Duxin JP, Dewar JM, Yardimci H, Walter JC. Repair of a DNA-Protein Crosslink by Replication-Coupled Proteolysis. *Cell* 2014;159:346–57.
34. Sun Y, Chen J, Huang S yin N, Su YP, Wang W, Agama K, i ostali. PARylation prevents the proteasomal degradation of topoisomerase I DNA-protein crosslinks and induces their deubiquitylation. *Nat. Commun.* 2021;12:5010.
35. Leng X, Duxin JP. Targeting DNA-Protein Crosslinks via Post-Translational Modifications. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1–14.
36. Sun Y, Miller Jenkins LM, Su YP, Nitiss KC, Nitiss JL, Pommier Y. A conserved SUMO pathway repairs topoisomerase DNA-protein cross-links by engaging ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Sci. Adv.* 2020;6:1–17.
37. Dyrkheeva NS, Malakhova AA, Zakharenko AL, Okorokova LS, Shtokalo DN, Pavlova S V., i ostali. Transcriptomic Analysis of CRISPR/Cas9-Mediated PARP1-Knockout Cells under the Influence of Topotecan and TDP1 Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:5148.
38. Saha LK, Murai Y, Saha S, Jo U, Tsuda M, Takeda S, i ostali. Replication-dependent cytotoxicity and Spartan-mediated repair of trapped PARP1–DNA complexes. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:10493–506.
39. Liu JCY, Kühbacher U, Larsen NB, Borgermann N, Garvanska DH, Hendriks IA, i ostali. Mechanism and function of DNA replication-independent DNA-protein crosslink repair via the SUMO-RNF4 pathway. *EMBO J.* 2021;40:1–21.
40. Sun Y, Nitiss JL, Pommier Y. SUMO: A Swiss Army Knife for Eukaryotic Topoisomerases. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1–13.
41. Stingle J, Bellelli R, Boulton SJ. Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18:563–73.
42. Reinking HK, Kang HS, Götz MJ, Li HY, Kieser A, Zhao S, i ostali. DNA Structure-Specific Cleavage of DNA-Protein Crosslinks by the SPRTN Protease. *Mol. Cell* 2020;80:102-113.e6.
43. Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA

Damage Response. *Mol. Cell* 2017;66:801–17.

44. Menolfi D, Zha S. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases—the lessons from the mouse models: inhibition \neq deletion. *Cell Biosci.* 2020;10:8.
45. Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J.* 2004;23:1178–87.
46. Ruggiano A, Vaz B, Kilgas S, Popović M, Rodriguez-Berriguete G, Singh AN, i ostali. The protease SPRTN and SUMOylation coordinate DNA-protein crosslink repair to prevent genome instability. *Cell Rep.* 2021;37:110080.
47. Halder S, Torrecilla I, Burkhalter MD, Popović M, Fielden J, Vaz B, i ostali. SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication. *Nat. Commun.* 2019;10:1–18.
48. Lessel D, Vaz B, Halder S, Lockhart PJ, Marinovic-Terzic I, Lopez-Mosqueda J, i ostali. Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat. Genet.* 2014;46:1239–44.
49. Dokshin GA, Davis GM, Sawle AD, Eldridge MD, Nicholls PK, Gourley TE, i ostali. GCNA Interacts with Spartan and Topoisomerase II to Regulate Genome Stability. *Dev. Cell* 2020;52:53-68.e6.
50. Maskey RS, Kim MS, Baker DJ, Childs B, Malureanu LA, Jeganathan KB, i ostali. Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nat. Commun.* 2014;5:1–12.
51. Maskey RS, Flatten KS, Sieben CJ, Peterson KL, Baker DJ, Nam HJ, i ostali. Spartan deficiency causes accumulation of Topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:4564–76.
52. Zhao S, Kieser A, Li HYY, Reinking HK, Weickert P, Euteneuer S, i ostali. A ubiquitin switch controls autocatalytic inactivation of the DNA–protein crosslink repair protease SPRTN. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:902–15.
53. Huang J, Zhou Q, Gao M, Nowsheen S, Zhao F, Kim W, i ostali. Tandem Deubiquitination

and Acetylation of SPRTN Promotes DNA-Protein Crosslink Repair and Protects against Aging. *Mol. Cell* 2020;79:824-835.e5.

54. Jura N, Scotto-Lavino E, Sobczyk A, Bar-Sagi D. Differential Modification of Ras Proteins by Ubiquitination. *Mol. Cell* 2006;21:679–87.
55. Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13:39–51.
56. Perry M, Biegert M, Kollala SS, Mallard H, Su G, Kodavati M, i ostali. USP11 mediates repair of DNA–protein cross-links by deubiquitinating SPRTN metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 2021;296:1–16.
57. Ide H, Nakano T, Shoukamy MI, Salem AMH. Formation, Repair, and Biological Effects of DNA–Protein Cross-Link Damage. U: *Advances in DNA Repair*. InTech; 2015. stranica 43–80.
58. Zhitkovich A, Costa M. A simple, sensitive assay to detect DNA–protein crosslinks in intact cells and in vivo. *Carcinogenesis* 1992;13:1485–9.
59. Subramanian D, Furbee CS, Muller MT. ICE Bioassay: Isolating In Vivo Complexes of Enzyme to DNA. U: Osheroff N, Bjornsti M, urednici. *DNA Topoisomerase Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2001. stranica 137–48.
60. Jo U, Murai Y, Agama KK, Sun Y, Saha LK, Yang X, i ostali. TOP1-DNA Trapping by Exatecan and Combination Therapy with ATR Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 2022;21:1090–102.
61. Borgermann N, Ackermann L, Schwertman P, Hendriks IA, Thijssen K, Liu JC, i ostali. SUMO ylation promotes protective responses to DNA -protein crosslinks. *EMBO J.* 2019;
62. Barker S, Murray D, Zheng J, Li L, Weinfeld M. A method for the isolation of covalent DNA–protein crosslinks suitable for proteomics analysis. *Anal. Biochem.* 2005;344:204–15.
63. Aarum J, Cabrera CP, Jones TA, Rajendran S, Adiutori R, Giovannoni G, i ostali. Enzymatic degradation of RNA causes widespread protein aggregation in cell and tissue lysates. *EMBO*

Rep. 2020;21:1–17.

64. Yan LL, Zaher HS. How do cells cope with RNA damage and its consequences? *J. Biol. Chem.* 2019;294:15158–71.
65. So S, Davis AJ, Chen DJ. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *J. Cell Biol.* 2009;187:977–90.
66. Tanaka T, Kurose A, Huang X, Dai W, Darzynkiewicz Z. ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis. *Cell Prolif.* 2006;39:49–60.
67. Cleaver JE, Feeney L, Revet I. Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* 2011;10:3223–4.
68. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucleic Acids* 2010;2010:1–9.
69. An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, et al. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol. Biol.* 2010;11:18.
70. Meador JA, Zhao M, Su Y, Narayan G, Geard CR, Balajee AS. Histone H2AX is a critical factor for cellular protection against DNA alkylating agents. *Oncogene* 2008;27:5662–71.
71. Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103:9891–6.
72. Stope M. Phosphorylation of histone H2A.X as a DNA-associated biomarker (Review). *World Acad. Sci. J.* 2021;3:31.
73. Mao P, Wyrick JJ. Emerging roles for histone modifications in DNA excision repair. *FEMS Yeast Res.* 2016;16:1–8.
74. Cristini A, Park JH, Capranico G, Legube G, Favre G, Sordet O. DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:1161–

- 78.
75. Yue X, Bai C, Xie D, Ma T, Zhou PK. DNA-PKcs: A Multi-Faceted Player in DNA Damage Response. *Front. Genet.* 2020;11.
76. Mórocz M, Zsigmond E, Tóth R, Enyedi MZ, Pintér L, Haracska L. DNA-dependent protease activity of human Spartan facilitates replication of DNA–protein crosslink-containing DNA. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:1–17.
77. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:5678–94.
78. Ai L, Tan T, Tang Y, Yang J, Cui D, Wang R, i ostali. Endogenous formaldehyde is a memory-related molecule in mice and humans. *Commun. Biol.* 2019;2:1–12.
79. Bewersdorf J, Bennett BT, Knight KL. H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103:18137–42.

8. SAŽETAK

DPC-ovi predstavljaju jedan od najčešćih, ali i najmanje istraženih tipova oštećenja DNA. Njihovo istraživanje se intenziviralo tek otkrićem proteaza ovisnih o DNA, zaduženih za njihov popravak, wss1 i SPRTN. Dokazano je da se DPC-ovi popravljaju trima mehanizmima: direktnom hidrolizom kovalentne veze, izrezivanjem oštećenog dijela DNA te proteolitičkom degradacijom proteinskog dijela DPC lezije, čija međuovisnost nije poznata. U ovoj disertaciji predstavljen je razvoj novog eseja za direktnu izolaciju DPC-ova, nazvanog STAR esej, koji uspješno izolira DPC-ove različitog porijekla, pri fiziološki relevantnim uvjetima, a pri tome je dovoljno osjetljiv da omogućava vizualizaciju peptida kovalentno vezanih na DNA nastalih proteolitičkom degradacijom. Primjenom eseja utvrdili smo korake u mehanizmu popravka DPC-ova, koji se prvo proteolitički degradiraju djelovanjem SPRTN-a, prilikom čega na DNA ostaju kovalentno vezani peptidi. Peptidi se potom uklanjaju drugim mehanizmima popravka. Pokazana dinamika popravka korelira sa signalizacijom oštećenja DNA preko ATM/H2Ax osi, što je novoopisana uloga za oba proteina i neovisna je o lomovima DNA. γ H2Ax je ključan za vezanje faktora popravka DNA. Ključan dokaz da je proteolitička degradacija prvi korak popravka DPC-ova proizlazi iz nemogućnosti aktivacije ovog signalnog puta u izostanku proteolize te je pokazano da DPC-ovi mogu inhibirati aktivaciju signalizacije lomova DNA lanaca ukoliko se nalaze u blizini mjesta loma. STAR esej pokazao se iznimno korisnim alatom za proučavanje dinamike nastanka i popravka DPC-ova čime će omogućiti napredak u njihovu proučavanju.

9. SUMMARY

DPCs represent one of the most common and least-researched types of DNA damage. Their research intensified only after the discovery of the DNA-dependent proteases responsible for their repair, namely *wss1* in yeast and *SPRTN* in mammals. It has been proven that DPCs are repaired by three mechanisms: direct hydrolysis of the covalent bond, excision of the damaged part of DNA, and proteolytic degradation of the protein part of the DPC lesion. However, the interdependence of these mechanisms is unknown. This dissertation presents the development of a new assay for the direct isolation of DPCs, called the STAR assay, which successfully isolates DPCs of different origins, under physiologically relevant conditions, while being sensitive enough to enable the visualization of peptides covalently bound to DNA resulting from proteolytic degradation. Using the assay, we determined the steps in the repair mechanism of DPCs, which are first proteolytically degraded by the action of *SPRTN*, during which covalently bound peptides remain on the DNA. Peptides are then removed by other repair mechanisms. The demonstrated dynamics of repair correlates with DNA damage signaling through the ATM/H2Ax axis, which is a newly described role for both proteins and is independent of DNA breaks. γ H2Ax is crucial for binding DNA repair factors. The key evidence that proteolytic degradation is the first step in the repair of DPCs comes from the lack of activation of this signaling pathway in the absence of proteolysis, and it has been shown that DPCs can inhibit the activation of DNA strand break signaling if they are located near the break site. The STAR assay proved to be an extremely useful tool for studying the dynamics of the formation and repair of DPCs, which will enable progress in their study.

10. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime: Mateo Glumac

Datum rođenja: 21.2.1995.

Kontakt: mglumac@mefst.hr,

mateo.glumac.bacola@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5597-7431>

Obrazovanje:

2020. – u tijeku Poslijediplomski doktorski studij: Biologija novotvorina, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska

2016.-2018. Magistar kemije, Sveučilišni diplomski studij organske kemije i biokemije, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Hrvatska

2013.-2016. Sveučilišni prvostupnik kemije, Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Hrvatska

Radno iskustvo:

Doktorand u Laboratoriju za istraživanje raka, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska

Mentor: Ivana Marinović Terzić

Razdoblje: 2019. - 2023.

Poslijediplomski doktorski studij: Biologija novotvorina, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska

Studentski projekti:

2018. Kemija eteričnog ulja mediteranskog bilja, projekt financiran od strane Studentskog zbora Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska; proveden pod potporom Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska

2019. Biokemija eteričnih ulja, projekt financiran od strane Studentskog zbora Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska; proveden pod potporom Kemijsko-tehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska; i Mediteranskog instituta za istraživanje života, Split, Hrvatska

Dodatne obuke:

Intenzivan edukacijski program protočne citometrije (25.-29.4.2022.), Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska

Personalizirana profesionalna edukacija za studente na temu: analiza, identifikacija i kvantifikacija proteina kombiniranom metodom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (24.5.2019.), BICRO BIOCentar, Zagreb, Hrvatska

Program izobrazbe Studentskog poduzetničkog inkubatora (14.4.2019.), Sveučilište u Splitu, Ekonomski fakultet, Split, Hrvatska

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima:

Međunarodni kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju HDBMB22: „From science to knowlage“, Brela, Hrvatska, (28.9.-1.10. 2022.) – postersko izlaganje. Projekt nagrađen stipendijom HDBMBa (<https://congress2022.hdbmb.hr/bursaries/>).

Simpozij mladih znanstvenika, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split, Hrvatska, (2.6.2021.) – usmeno izlaganje

Međunarodni kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju HDBMB2019: „Crossroads in Life Sciences“, Lovran, Hrvatska, (25-28.9.2019.) – postersko izlaganje

Međunarodno studentsko start-up natjecanje u Splitu, Hrvatska, (20. i 21.5.2019.) – usmeno izlaganje

Drugi međunarodni ZORH susret, Split, Hrvatska (26.4.2019.) – pasivno sudjelovanje

26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik, Hrvatska (10. i 11. 4. 2019.) – postersko izlaganje

1. kongres studenata tehnoloških fakulteta, Banja Luka, Bosna i Hercegovina (11.-13.9.2018.) – usmeno izlaganje. Nagrada za usmeno izlaganje i najbolje ocijenjeni znanstveni projekt.

Pohvale i nagrade:

Dekanova pohvalnica Ivani Drventić, Zvonimiru Jaži i Mateu Glumacu za osvajanje nagrade za najbolje ocijenjeni znanstveni projekt na 1. kongresu studenata tehnoloških fakulteta održanom u Banja Luci (11.-13.9.2018.) pod naslovom Kemija eteričnog ulja mediteranskog bilja (15.11.2019.)

Nagrada za najbolji start-up projekt u 2018./2019. godini Studentskog poduzetničkog inkubatora Ekonomskog fakulteta u Splitu, Hrvatska, s timom „Monfrin“.

Dekanova pohvalnica za najbolje ocijenjeni studentski projekt u polju znanost i tehnologija, financiran iz sredstava Studentskog zbora Sveučilišta u Splitu, u akademskog godini 2017./2018. pod naslovom: KEMB – Kemija eteričnog ulja mediteranskog bilja“ (31.9.2018.)

Publikacije:

Carev I, Gelemanovi, A, **Glumac M**, Tutek K, Dželalija M, Paiardidi A, Prosseda G. Centaurea triumfeti essential oil chemical composition, comparative analysis, and antimicrobial activity of selected compounds. Sci Rep 2023, 13, 7475.

Glumac M, Jažo Z, Paštar V, Golemac A, Čikeš Čulić V, Bektić S, Radan M, Carev I. Chemical Profiling and Bioactivity Assessment of Helichrysum italicum (Roth) G. Don. Essential Oil: Exploring Pure Compounds and Synergistic Combinations. Molecules 2023, 28, 5299.

Drventić I, **Glumac M**, Carev I, Kroflić A, Seasonality of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Derivatives in PM2.5 from Ljubljana, Combustion Aerosol Source Apportionment, and Cytotoxicity of Selected Nitrated Polyaromatic Hydrocarbons (NPAHs). Toxics 2023, 11, 518.

Carev I, Ruščić M, **Glumac M**, Politeo O, Siljak-Yakovlev S. Phytochemical and Cytogenetic Study of Two Centaurea Species from Croatia: the Particular Case of Diploid and Tetraploid C. salonitana. Chem. Biodiversity 2023, 20, e202300092.

Glumac M, Polović M, Batel A, Gelemanović A, Maček B, Velić A, Marinović-Terzić I. SPRTN-dependent DPC degradation precedes repair of damaged DNA: a proof of concept revealed by the STAR assay, Nucleic Acids Research, 2023; 51, e35

Glumac M, Čikeš Čulić V, Marinović-Terzić I, Radan M. Mechanism of cis-Nerolidol-Induced Bladder Carcinoma Cell Death. *Cancers* 2023, 15, 981.

Batel A, Polović M, **Glumac M**, Gelemanović A, Šprung M, Marinović Terzić I. Direct and cost-effective method for histone isolation from cultured mammalian cells. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 2023, 1-14.

Jažo Z, **Glumac M**, Drventić I, Žilić L, Dujmović T, Bajić D, Vučemilo M, Ivić E, Bektić S, Anačkov GT, Radan M. The Essential Oil Composition of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Influence of Steam, Hydro and Microwave-Assisted Distillation. *Separations* 2022, 9, 280.