

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Anja Batel

**ULOGA PROTEINA SPARTAN U STRESU ENDOPLAZMATSKOG RETIKULUMA
I RAZVOJU HEPATOCELULARNOG KARCINOMA**

Doktorski rad

Split, 2024.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u sklopu Istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga proteina Spartan u DNA replikaciji – SprtnRep“ (HRZZ IP-06-2016) te Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (ESF DOK-2018-01).

VODITELJ RADA: prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Histoni i DNA oštećenje	2
1.1.1. Kromatin	2
1.1.2. Metode izolacije histona	4
1.2. SPRTN i razvoj hepatocelularnog karcinoma	5
1.1.3. Popravak DNA-proteinskih kroslinkova	5
1.1.4. Rak jetre	6
1.1.5. Stres endoplazmatskog retikuluma	6
1.1.6. Metabolizam lipida u stresu ER-a	8
2. HIPOTEZA I CILJEVI	10
2.1. Hipoteza	11
2.2. Ciljevi istraživanja	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	13
3.1.1. Ispitanici	13
3.1.2. Uzorci tkiva	14
3.1.3. Drugi biološki materijali	16
3.1.4. Aparati	16
3.1.5. Osnovne kemikalije	16
3.1.6. Osnovne puferske otopine	17
3.1.7. Enzimi i biljezi	18
3.1.8. Proteazni inhibitori	18
3.1.9. Kompleti (engl. kits)	19
3.1.10. Početnice	19
3.1.11. Protutijela	21
3.1.12. Plazmidi	23
3.2. Protokoli istraživanja	23
3.2.1. Testiranje i optimizacija nove metode izolacije histona	23
3.2.3. Protokol studije na staničnoj liniji HepG2	24
3.2.3. Protokol studije na tkivima jetri pacijenata	25
3.3. Metode	26
3.3.1. Stanične kulture	26

3.3.2. Prikupljanje tkiva jetre	26
3.3.3. Utišavanje gena malom interferirajućom RNA	27
3.3.4. Tretmani stanica.....	27
3.3.5. Sinkronizacija stanica	28
3.3.6. Protočna citometrija	28
3.3.7. Tretman RNazom, DNazom i proteinazom K	28
3.3.8. Izolacija histona drugim metodama	29
3.3.9. Elektroforeza u agaroznom gelu	29
3.3.10. Western blot	29
3.3.11. Bojenje Coomassie bojom	30
3.3.12. Izolacija RNA, DNA i proteina	30
3.3.13. Priprema cDNA i metoda RT-qPCR.....	31
3.3.14. TCGA baza podataka.....	32
3.3.15. RNA sekvenciranje	32
3.3.16. PCR amplifikacija i analiza sekvenci.....	32
3.3.17. Histološka analiza	33
3.3.18. Alkalni komet test	33
3.3.19. Kariotipizacija.....	34
3.3.20. RT ² Profiler PCR Array	34
3.3.21. Imunofluorescencija.....	35
3.3.22. Rekombinantni proteini	35
3.3.23. Pull down	36
3.3.24. Izolacija proteinskih agregata	36
3.3.25. Integritet RNA	37
3.3.26. Masena spektrometrija	37
3.3.27. Analiza rezultata masene spektrometrije	37
3.3.28. Masena spektrometrija - dostupni podaci	38
3.3.29. Novi protokol izolacije histona	38
3.3.30. Statistički postupci	39
4. REZULTATI.....	41
4.1. Testiranje kompozicija pufera i uvjeta protokola	42
4.2. Detekcija histona	44
4.3. Detekcija histona u različitim staničnim linijama i tkivima	48

4.4. Detekcija histona kroz različite faze staničnog ciklusa	49
4.5. Utjecaj utišavanja ekspresije NPAT gena na količinu histona	53
4.6. Detekcija histona u HeLa stanicama s različitim oštećenjima DNA.....	54
4.7. SPRTN je uključen u odgovor stanice na stres ER-a	56
4.8. Analiza ekspresije gena i razine proteina u HepG2 stanicama tijekom stresa ER-a	58
4.9. Promjena ekspresije gena SPRTN i gena uključenih u UPR u HCC-u.....	63
4.10. Uloga SPRTN-a u prevenciji oštećenja DNA tijekom stresa ER-a.....	68
4.11. Promjene gena uključenih u signalizaciju oštećenja DNA u HCC-u.....	70
4.12. Sekvenciranje gena SPRTN u uzorcima HCC-a	74
4.13. SPRTN utječe na agregaciju proteina i degradaciju RNA tijekom stresa ER-a.	75
5. RASPRAVA	77
5.1. Novi protokol izolacije histona iz nukleosoma	78
5.2. Uloga proteina SPRTN u stres endoplazmatskog retikuluma	81
6. ZAKLJUČCI.....	86
6.1. Izolacija histona	87
6.2. Stres endoplazmatskog retikuluma u stanicama hepatocelularnog karcinoma	87
7. LITERATURA	88
8. SAŽETAK	97
9. SUMMARY	99
10. ŽIVOTOPIS	101

POPIS KRATICA

ATF4 – *Activating Transcription Factor 4*

ATF6 – *Activating Transcription Factor 6*

BAX – *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*

BLM – *BLM RecQ Like Helicase*

CDC25A – *cell division cycle 25A*

CDC25AC – *cell division cycle 25C*

cDNA – *complementary DNA, komplementarna DNA*

CHEK1 – *Checkpoint Kinase 1*

CREB3L3 – *Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3*

CYP2E1 – *Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*

DDIT3 – *DNA damage-inducible transcript 3*

DDR – *DNA damage response, odgovor na oštećenje DNA*

DHX9 – *DExH-Box Helicase 9*

DPC – *DNA protein crosslink, protein vezan kovalentnom vezom na DNA*

EIF2AK3 – *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3*

ER – *endoplazmatski retikulum*

ERN1 – *Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1*

FANCI – *Fanconi anemia complementation group J*

GADD45A – *Growth Arrest And DNA Damage Inducible 45 Alpha*

GAPDH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GRP78 – *Glucose-regulated protein 78*

GUSB – *Beta-glucuronidase*

HBV – *hepatitis B virus*

HCC – *hepatocellular carcinoma, hepatocelularni karcinom*

HCV – *hepatitis C virus*

HEK293 – *human embryonic kidney 293*

HeLa – *Henrietta Lacks cells*

HepG2 – *Hepatocellular Carcinoma Cell Line 2*

HERPUD1 – *Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1*

HLB – *histone locus body*, tijelo histonskog lokusa

HRP – *horseradish peroxidase*, peroksidaza iz hrena

HSP90AA1 – *Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1*

HSP90B1 – *Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1*

HSPA5 – *Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5*

IHC – *immunohistochemistry*, imunohistokemija

IRE1 α – *Inositol-requiring enzyme 1*

mRNA – *messenger RNA*, glasnička RNA

MS – masena spektrometrija

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NPAT – *Nuclear Protein, Coactivator Of Histone Transcription*

NTHL1 – *Nth Like DNA Glycosylase 1*

PARP1 – *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR – *Polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PERK – *Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PPP1R15A – *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A*

RPM – *rotations per minute*, rotacija u minuti

RPS23 – *Ribosomal Protein S23*

RT-qPCR – *Reverse transcription quantitative PCR*, kvantitativni PCR

SFRS4 – *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 4*

siRNA – *small interfering RNA*, mala interferirajuća RNA

SPRTN – *SprT-like N-terminal domain*

SREBP1 – *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*

TACE – *transarterijska kemoembolizacija*

TCCSUP – *Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder Superficial*

TCGA – *The cancer genome atlas*

TG – tapsigargin

TN – tunikamicin

TNM – *tumour, node and metastasis*, klasifikacija tumora (tumor, limfni čvor i metastaze)

U2OS – *Uppsala University Osteosarcoma*

UPR – *unfolded protein response*, odgovor na pogrešno smotane proteine

VCP – *Valosin-containing protein*

WB – *western blot*

XBP1 – *X-box binding protein 1*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EMEM - *Eagle's Minimum Essential Medium*

FA – formaldehid

DMSO – dimetilsulfoksid

SDS-PAGE – *sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

CBB – *Coomassie brilliant blue*

FC – *fold change*, promjena ekspresije

HKG – *housekeeping gene*, referentni gen

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

GST – *glutathione S-transferase*

RIPA – *radio-immunoprecipitation assay*

UV – *Ultraviolet*

SNP – *single nucleotide polymorphism*

rRNA – *ribosomal RNA*, ribosomalna RNA

RIN – *RNA integrity number*

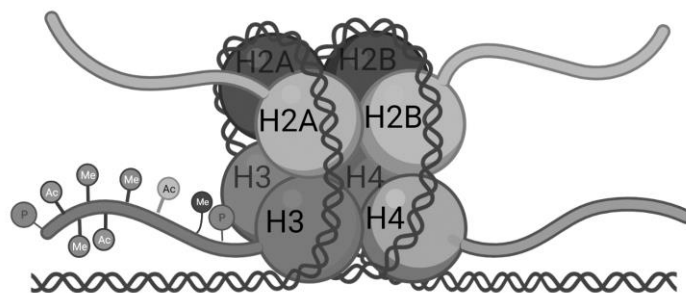
1. UVOD

Ova doktorska disertacija objedinjuje dva znanstvena rada, jedan iz područja istraživanja histona (1.1.), a drugi iz područja istraživanja nastanka raka jetre (1.2.). Prvo istraživanje rezultiralo je stvaranjem nove metode izolacije histona koja pruža dodatne mogućnosti u području istraživanja kromatina, dok je drugim istraživanjem otkrivena nova uloga proteina SPRTN u stanici.

1.1. Histoni i DNA oštećenje (*Studija 1*)

1.1.1. Kromatin

Kromatin je dinamična struktura uključena u regulaciju različitih staničnih procesa (1). Podvrgava se strukturnim reorganizacijama tijekom napredovanja staničnog ciklusa, replikacije DNA, transkripcije, popravka DNA i rekombinacije (1). Glavni ponavljajući element kromatinske strukture u eukariotskoj stanici je nukleosom. Nukleosom nastaje namatanjem DNA oko histona (2). Jezgru nukleosoma čini osam histona, tj. po dvije kopije četiri kanonska tipa histona; H1A, H2B, H3 i H4 (Slika 1). Kanonski histoni jezgre predstavljaju jednu od evolucijski najočuvanijih skupina proteina (2).



Slika 1. Oktet histona koji grade nukleosom s posttranslacijskim modifikacijama u području repa histona H3. Shema napravljena u [BioRender.com](https://www.biorender.com).

U nekim slučajevima, specijalizirane varijante histona zamjenjuju kanonske histone. Kanonski histoni se ugrađuju tijekom replikacije DNA, dok se druge varijante histona ugrađuju u nukleosom neovisno o replikaciji (3). Histoni H2B i H4 imaju manje varijanti u usporedbi s histonima H2A i H3 (4). Histonske varijante imaju različite uloge na kromatinu: mijenjaju fizička svojstva nukleosoma, pomažu u formiranju proteinskih kompleksa povezanih s kromatinom i nose različite posttranslacijske modifikacije (5). Postoji veliki broj varijanti

histona koje imaju specijalizirane stanične uloge poput popravka DNA, segregacije kromosoma, inicijacije transkripcije i sl (6).

Domene „repova“ histona čine između 25 i 30% mase pojedinog histona te strše izvan nukleosoma, omogućavajući tako interakciju s drugim proteinima. Domene „repova“ histona su područja podložna brojnim modifikacijama uključujući fosforilaciju, ubikvitinaciju, sumoilaciju, acetilaciju i metilaciju. Navedene posttranslacijske modifikacije na histonima čine histonski kod. Histonski kod očitavaju kromatinski, nehistskih proteini i on može odrediti biološki ishod putem promjena u strukturi kromatina ili regrutacijom i interakcijom s drugim proteinima (7). Histonski kod je izuzetno kompleksan i još uvijek nedovoljno razjašnjen. Na primjer, fosforilacija serina 10 u repu histona H3 ima dvostruku ulogu; ključna je za kondenzaciju kromosoma tijekom mitoze i mejoze, ali i za opuštanje kromatina prilikom aktivacije transkripcije (8).

Proteinski dio kromatina sastoji se od histona i nehistskih proteina (9). Nehistski proteini sudjeluju u regulaciji ekspresije gena (10), popravku DNA i kondenzaciji kromatina putem posttranslacijskih modifikacija histona. Interakcija histona i nehistskih proteina s DNA vrlo je kompleksna i strogo regulirana (11) .

Većina staničnog kromatina je u obliku heterokromatina, kondenzirane kromatinske strukture koja je transkripcijski manje aktivna i nalazi se uglavnom u pericentričnim regijama i telomerama. Drugi tip kromatina je eukromatin; to je manje kondenzirana, otvorenija, transkripcijski aktivna forma kromatina prisutna u područjima koja su bogata genima. Otvorenija struktura kromatina omogućava pristup transkripcijskoj mašineriji. Treći specijalizirani tip kromatina prisutan je u centromerama gdje je kanonski histon H3 zamijenjen njegovom varijantom CENP-A. Histonske varijante su specifične za određeni tip kromatina. Osim po kondenziranosti i sastavu histona, tipovi kromatina se također razlikuju u svojoj lokalizaciji unutar jezgre. Heterokromatin se uglavnom nalazi prema periferiji jezgre i u regijama oko jezgrice (12).

Epigenetika je područje koje proučava promjene u aktivnosti gena koje ne uključuju promjene u osnovnom genetskom kodu. Središnji element epigenetike su histoni i njihove posttranslacijske modifikacije (PTM) koje igraju ključnu ulogu u regulaciji strukture i dinamike kromatina. PTM-e funkcioniraju kao pristaništa za specifične proteinske efekte, često nazivane 'čitačima'. Kada se vežu, čitači imaju sposobnost regrutiranja ili stabiliziranja različitih jezgrinih signalizacijskih komponenti na specifičnim genetskim lokacijama. Ova

interakcija je instrumentalna u posredovanju niza procesa koji se odvijaju na DNA, uključujući transkripciju gena, rekombinaciju, replikaciju i popravak DNA (13).

Povezujući histon H1 veže se za DNA na nukleosomu te time stabilizira strukturu i održava pravilan razmaka između nukleosoma (13). Brzo se izmjenjuje na eukromatinu, otprilike svake 4 minute (13). Geni jezgrenih kanoničnih histona organizirani su u klasterima u brojnim kopijama bez introna. Oni kodiraju za jedine do sada poznate mRNA koje nisu poliadenilirane. Histonske mRNA završavaju petljom koja se formira endonukleolitičkim prekrajanjem njihove pre-mRNA. Ekspresija histona strogo je regulirana, ovisi o staničnom ciklusu te je vremenski usklađena s replikacijom DNA (14). Prema trenutnom modelu biosinteze histona koji ovise o replikaciji, njihova ekspresija gena usko je povezana s replikacijom DNA i događa se samo tijekom S faze staničnog ciklusa, nakon početka sinteze DNA. Međutim, postoji nekoliko ključnih faktora biosinteze histona čiju ekspresiju reguliraju E2F ili CDK2, što ukazuje na mogućnost da ovi procesi počinju mnogo prije S faze. Prema novijim istraživanjima biosinteza histona započinje u G1 fazi, a u S fazi dolazi do naglog povećanja sinteze histona. Time se osigurava da je početni mali broj histona dostupan pri početku replikacije DNA, a većina histona je neophodna tek u S fazi (15). Različiti faktori su ključni za transkripciju gena histona i procesiranje njihove pre-mRNA. Oni se nalaze u poddomeni jezgre poznatoj kao tijelo histonskog lokusa (*histone locus body*, HLB), gdje se odvija transkripcija gena histona (14). Protein NPAT je glavni faktor koji se veže na klaster gene histona i aktivira njihovu transkripciju (16). NPAT je supstrat za ciklin E/Cdk2 i nalazi se u HLB-ima vezanim uz klaster histonskih gena na kromosomu 1 i 6 (17).

1.1.2. Metode izolacije histona

Većina metoda za izolaciju histona oslanja se na prekidanje ionskih interakcija između histona i DNA. Glavne metode izolacije histona koriste jake kiseline ili visoke koncentracije soli. Izolacija u kiselim uvjetima je moguća jer su histoni izrazito bazični proteini. Metoda izolacije kiselinom djelomično neutralizira fosfate unutar DNA, što rezultira denaturiranim histonima. Također, neke postranslacijske modifikacije histona, poput fosforilacije, u takvim su uvjetima nestabilne te se izgube. Velike koncentracije soli održavaju uvjete visoke ionske jakosti što omogućava zadržavanje nenedenaturirane forme histona pri neutralnom pH. Upotrebom različitih koncentracija otopina soli moguće je razdvojiti različite tipove histona od DNA. Jedan od glavnih izazova ove metode je dugotrajna izloženost histona endogenim proteazama, što može narušiti kvalitetu i smanjiti prinos histona (18).

Izolacija kompleksne strukture nukleosoma ima iznimnu važnost u istraživanju zdravlja stanica, oštećenja DNA, regulacije staničnog ciklusa te kontroliranja procesa popravka ili replikacije DNA. Tehnike izolacije kromatina opisane u literaturi do sada mogu pružiti samo djelomične odgovore na istraživačke potrebe jer nisu dovoljno specifične da izoliraju histone iz nukleosoma niti mogu očuvati histonske posttranslacijske modifikacije. Postoji jasna potreba za unaprjeđenjem tehnika specifične izolacije histona iz nukleosoma.

1.2. SPRTN i razvoj hepatocelularnog karcinoma (*Studija 2*)

1.1.3. Popravak DNA-proteinskih kroslinkova

DNA-protein kroslink (*DNA-protein crosslink*, DPC) je lezija DNA uzrokovana kovalentnim vezanjem proteina na DNA. DPC-ovi nastaju endogeno, djelovanjem produkata staničnog metabolizma poput reaktivnih kisikovih vrsta ili egzogeno, uslijed djelovanja kemikalija poput formaldehida, UV svjetla ili ionizirajućeg zračenja. Histoni, najzastupljeniji proteini na kromatinu, jedna su od najčešćih vrsta DPC-ova. DPC-ovi mogu blokirati replikacijsku vilicu, dovesti do defekta u G2/M kontrolnoj točki, lomova DNA i premještanja dijelova kromosoma, što vodi do nestabilnosti genoma i potencijalno razvoja raka. Način popravka ovih čestih DNA oštećenja tek je nedavno otkriven (19). Uloga cink-metaloproteaze Spartan (SPRTN) u proteolitičkom uklanjanju DPC-ova otkrivena je nakon što su pronađeni pacijenti s bialelnom mutacijom u genu *SPRTN*. Takvi pacijenti imaju nestabilan genom, ubrzano stare i rano razvijaju hepatocelularni karcinom (HCC) (20). Navedeni simptomi objedinjeni su u progeroidnom sindromu Ruijs-Aalfs (21). Ruijs-Aalfs sindrom je autosomno recesivna monogenska bolest i do sada je dijagnosticiran kod tri pacijenta (22).

Nedavno je otkriveno da je popravak DPC-ova proces koji se odvija u 2 koraka. U prvom koraku SPRTN proteolitički cijepa DPC-ove, a u drugom mehanizmi popravka DNA popravljaju oštećene bazne parove (23). Nije razjašnjeno zašto se karcinogeneza primarno odvija u jetri kod pacijenata s naslijeđenim mutacijama u genu *SPRTN*. Do sada je samo jedna publikacija povezala SPRTN s Ruijs-Aalfs sindromom i HCC-om (22). Točan molekularni mehanizam kako SPRTN dovodi do malignih promjena u jetri još treba razjasniti.

1.1.4. Rak jetre

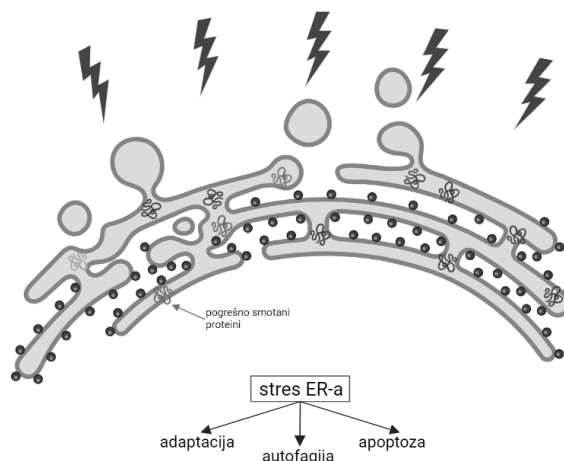
Hepatocelularni karcinom je najčešći oblik primarnog raka jetre. To je treći vodeći uzrok smrti povezane s rakom u svijetu (24). Trenutno petogodišnje preživljenje pacijenata s HCC-om je 20% (25). Glavni faktori rizika za razvoj HCC-a su kronične infekcije virusom hepatitisa B i C, kronična pretjerana konzumacija alkohola, nealkoholna masna bolest jetre, dijabetes tipa II i pretilost (26). Navedeni čimbenici doprinose kroničnoj upali, nekrozi i regeneraciji što za posljedicu ima nestabilnost kromosoma. HCC se često razvija u uvjetima kronične ozljede i upale koji promoviraju oštećenje DNA i nastanak kromosomskih aberacija. Odgovor na oštećenje DNA (*DNA damage response*, DDR) aktivira se zbog različitih lezija DNA, koordinira popravak DNA i određuje sudbinu stanice tj., hoće li se zaustaviti stanični ciklus ili će stanica ići u apoptozu. Čimbenici rizika za razvoj HCC-a mogu uzrokovati promjene u DDR-u. Neriješeno oštećenje DNA u hepatocitima može potencijalno pridonijeti razvoju hepatokarcinogeneze (27). Mutacije nastale uslijed oštećenja DNA mogu destabilizirati strukturu kodiranih proteina te rezultirati agregacijom i razgradnjom proteina (28). Iako se mnogo pažnje usmjerilo na istraživanje HCC-a, patogeneza njegova nastanka je prilično nejasna (29).

1.1.5. Stres endoplazmatskog retikuluma

U jetri se odvija metabolizam ugljikohidrata, masti i proteina (30). Zbog svog iznimno velikog metabolizma, jetra je osjetljiva na stres endoplazmatskog retikuluma (ER-a) (31). Visoki metabolički zahtjevi, hipoksija i acidoza u tumorskom tkivu narušavaju homeostazu kalcija i lipida i dovode do nakupljanja pogrešno smotanih proteina (Slika 2). Prekomjerno nakupljanje pogrešno smotanih proteina u ER-u ili deplecija kalcija dovode do stanja stresa ER-a (32). Povećana globalna transkripcija i translacija u tumorskim stanicama dalje doprinosi stresu ER-a (33).

Stres ER-a je povezan s razvojem različitih vrsta malignoma i uključuje aktivaciju triju različitih puteva koji zajedno čine odgovor na pogrešno smotane proteine (*unfolded protein response*, UPR). Tumorske stanice mogu iskoristiti UPR za pojačani rast i otpornost na kemoterapeutike (34).

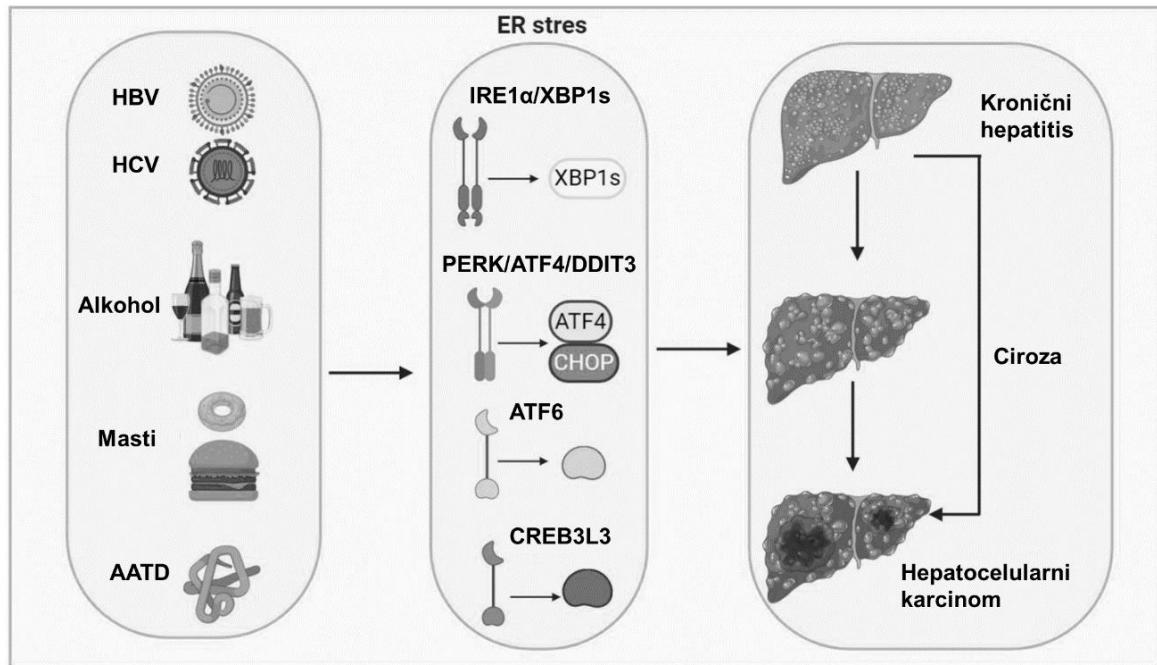
- veliki metabolički zahtjevi
- reaktivne kisikove vrste
- visoka stopa transkripcije i translacije



Slika 2. Glavni stanično-intrizični metabolički uzroci stresa ER-a u tumorskim stanicama. Ovisno o vrsti stanica i razmjerima stresa ER-a, stanica se može adaptirati i ponovno uspostaviti homeostazu ER-a, aktivirati autofagiju ili apoptozu. Shema napravljena u [BioRender.com](https://www.biorender.com) prema Chen i sur. (33).

Nakupljanje pogrešno smotanih proteina aktivira UPR (35–37). Aktivacijom UPR-a, stanica pokušava pojačati kapacitet ER-a za smatanje proteina, degradirati pogrešno smotane proteine i smanjiti transkripciju novih proteina. Aktivacijom transmembranskih proteina koji služe kao senzori stresa započinje UPR, a ti proteini u konačnici djeluju kao transkripcijskih faktori (31). Jaki akutni ili produljeni stres ER-a dovodi do hiperaktivacije UPR-a i do apoptoze. Tri glavna proteinska senzora asocirana s membranom ER-a uključena su u UPR: *inozitol-requiring enzyme 1 alfa* (IRE1 α /ERN1), *protein kinase R-like ER kinase* (PERK/EIF2AK3) i *activating transcription factor 6* (ATF6) (37). Šaperon *glucose-regulated protein 78* (GRP78, poznat i kao *heat shock protein family A member 5*, HSPA5), veže se na senzore na membrani ER-a u uvjetima bez stresa i time ih inaktivira. Kao odgovor na stres ER-a, GRP78 se odvaja od senzora na membrani i veže pogrešno smotane proteine u lumenu ER-a, čime aktivira signalnu kaskadu putem različitih transkripcijskih faktora (31,32,35). Transkripcijski faktori se transliraju (ATF4), cijepaju (ATF6 α) ili se njihova mRNA dodatno prekraja (*X-box binding protein 1*, XBP1), a zatim se lokaliziraju u jezgri kako bi aktivirali specifične gene koji sudjeluju u uklanjanju pogrešno smotanih proteina bilo ponovnim pokušajem smatanja, degradacijom, ili apoptozom (npr. *C/EBP homologous protein*, CHOP/DDIT3) (36,38).

Povećani stres ER-a može biti mehanizam tumorigeneze u HCC-u (39) (Slika 3). Utvrđeno je da je razina GRP78 povišena u različitim ljudskim karcinomima, uključujući HCC (40).



Slika 3. Vanjski uzroci stresa ER-a i njihova poveznica s razvojem HCC-a. Uzroci stresa ER-a su: virusne infekcije, konzumacija alkohola, visokokalorična dijeta i alfa1-antitripsin deficijencija. Oni zajedno sa steatozom jetre uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta što vodi do oksidativnog stresa, upale, genomske nestabilnosti, ciroze i HCC-a. Preuzeto i prilagođeno prema Wei i sur. (31).

Tunikamicin (TN) i tapsigargin (TG) su kemikalije koje se standardno koriste u laboratorijima kao aktivatori stresa ER-a. TN inhibira N-glikozilaciju proteina u ER-u i djeluje sporije od TG-a (41). TG iscrpljuje kalcij iz lumena ER-a, blokira njegov ponovni unos i dovodi do brzog poremećaja u smatanju proteina (42,43). Obe kemikalije dovode do nakupljanja nepravilnih proteina rezultirajući aktivacijom UPR-a, ali putem različitih mehanizama (44).

1.1.6. Metabolizam lipida u stresu ER-a

Metabolizam lipida isprepleten je s UPR-om. SREBP1, transkripcijski faktor smješten u membrani ER-a, regulira ekspresiju gena uključenih u metabolizmu lipida. Snažno je reduciran u HCC-u i doprinosi karcinogenezi jetre putem poremećaja metabolizma lipida u

hepatocitima (45). Inhibicija GRP78 dovodi do nakupljanja masnih kiselina u stanicama smanjenjem razine transkripta *SREBP1* i inhibicijom transporta masnih kiselina u mitohondrije (46). Put UPR-a posredovan PERK-om antagonizira aktivaciju SREBP1 i smanjuje sintezu kolesterola (47). *Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1* (CYP2E1) je monooksigenaza uključena u metabolizam lijekova i lipida, koja se uglavnom eksprimira u hepatocitima. Može aktivirati različite toksine i prokarcinogene, što dovodi do stvaranja reaktivnijih, toksičnih produkata s karcinogenim potencijalom (48). Pretjerana konzumacija alkohola povećava ekspresiju *CYP2E1* i uzrokuje oštećenje jetre stvaranjem toksičnog acetaldehida i reaktivnih kisikovih vrsta (49). Ekspresija CYP2E1 je općenito niska u HCC-u i povezana je sa slabijim stopama preživljavanja (50).

Veza između stresa ER-a i patogeneze HCC-a je dobro poznata (38), a iako je dokazano da je mutacija u genu *SPRTN* odgovorna za nastanak HCC-a kod pacijenata s Ruijs-Aalfs sindromom, sam mehanizam patogeneze još uvijek nije poznat.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza

- I. Novi protokol koji koristi blage uvjete za izolaciju histona omogućit će istraživanje posttranslacijskih modifikacija histona koji čine nukleosom.
- II. Protein SPRTN ima važnu ulogu u regulaciji staničnog odgovora na pogrešno smotane proteine.

2.2. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj prvog dijela istraživanja (*Studija 1*) je razviti novu metodu za izolaciju histona iz nukleosoma. Protokol treba biti: (i) specifičan za izolaciju histona uz što manje onečišćenje drugim proteinima; (ii) primjenjiv na različite vrste stanice i tkiva i (iii) dovoljno osjetljiv za detekciju promjena u određenim histonskim varijantama i modifikacijama.

Glavni cilj drugog dijela istraživanja (*Studija 2*) je odrediti ulogu proteina SPRTN u staničnom odgovoru na stres endoplazmatskog retikuluma i posljedično, u razvoju hepatocelularnog karcinoma. Istražit će se interaktori proteina SPRTN koji su uključeni u odgovor stanice na pogrešno smotane proteine. Utvrdit će se i promjene u ekspresiji proteina SPRTN i proteina uključenih u stres ER-a na uzorcima tkiva pacijenata s hepatocelularnim karcinomom. Istraživanje će se proširiti na HepG2 staničnu liniju porijeklom iz hepatocelularnog karcinoma, u kojoj će se manipulacijom razine proteina SPRTN i izazivanjem stresa ER-a testirati stanični odgovor.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Odjeljak materijali i metode napisan je zajedno za studiju 1 i studiju 2 s obzirom da se dosta metoda preklapa u obje studije.

3.1.1. Ispitanici

Sakupljanje uzoraka jetrenog tkiva provelo se na Odjelu za kirurgiju Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu. Ispitanici su upoznati s ciljem istraživanja tj. analizom genske ekspresije u uzorcima tkiva jetre te su dali svoj pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Prikupili smo uzorke 21 pacijenata s dijagnozom HCC-a kojima je inducirana transplantacija jetre. Broj dostupnih uzoraka tkiva pacijenata ograničen je opisanom dijagnozom i odrednicama za transplantacijsku terapiju. Obrada pacijenata kao i svi pripremni postupci slijedili su uobičajene kliničke procedure na Odjelu za kirurgiju KB Merkur u Zagrebu. Za potrebe istraživanja kirurg je, temeljem patohistološkog nalaza, utvrdio gradus i stadij tumora, te je li u podlozi nastanka bolesti alkoholna ciroza ili infekcija hepatitisom B ili C.

Kriteriji uključivanja: Klinička indikacija za transplantaciju jetre kod pacijenata s dijagnozom hepatocelularnog karcinoma jetre uz postojeću alkoholnu degeneraciju jetre (steatoza, fibroza ili ciroza) ili kronična infekcija virusom hepatitisa B ili C; te pristanak pacijenta na sudjelovanje u istraživanju.

Kriterij isključivanja: Dijagnoza hepatocelularnog karcinoma u pacijenata koji nemaju virusni hepatitis ili alkoholnu cirozu; sekundarni tumori jetre ili drugi tipovi tumora jetre koji nisu hepatocelularni karcinom. Probir je provodio kirurg.

Tijekom operacije transplantacije jetre, oštećena jetra pacijenta se eksplantira, te se zamjenjuje zdravom jetrom odabranog donora. Pri tome se jetra pacijenta baca kao biološki otpadni materijal. U ovoj studiji uzimali smo uzorke tkiva oštećene jetre pacijenata; jedan uzorak iz tumorskog žarišta (T), a drugi uzorak iz okolnog, tumorom nezahvaćenog tkiva jetre (NT). Uzorci su bili veličine između 0.5 i 1 cm³, te su se odmah po uzorkovanju uronili u otopinu RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific). Nakon sakupljanja uzorci su pohranjeni u hladnjaku (+ 4°C) te transportirani do Laboratorija za istraživanje raka pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Svaki uzorak smo podijelili na dva dijela; iz jednog dijela smo izolirali RNA, DNA i proteine, a drugi dio smo uklopili u parafinske blokove za potrebe imunohistokemijske analize.

3.1.2. Uzorci tkiva

U ovom istraživanju je sudjelovao dvadeset i jedan pacijent koje je podvrgnut presađivanju jetre zbog HCC-a. Pacijenti su iz Hrvatske, 6 žena i 15 muškaraca, u dobi od 57 do 76 godina, s različitim kliničkim dijagnozama i stadijima raka. Uzorci karcinoma prikupljeni su između studenog 2020. i siječnja 2022. Kliničke i patološke karakteristike ovih pacijenata sažete su u tablici 1. Stadij karcinoma je ocijenjen prema TNM klasifikaciji od strane obučениh patologa. TNM sustav klasifikacije koristi se za opisivanje karcinoma ocjenom veličine primarnog tumora i vaskularne invazije (T), brojem metastaza u limfnim čvorovima (N) i prisutnosti udaljenih metastaza (M) (51). Regionalni limfni čvorovi ili nisu bili zahvaćeni (N0) ili se nisu mogli procijeniti (Nx). U niti jednom od pacijenata u ovom istraživanju nisu otkrivene udaljene metastaze. Histološka ocjena karcinoma koristi 4-stupanjski sustav koji opisuje razinu diferencijacije stanica, krećući od dobro diferenciranih (1) do nediferenciranih (4) (52). Približno polovica pacijenata primala je liječenje transarterijskom kemoembolizacijom (TACE). Informirani pismeni pristanak za prikupljanje uzoraka jetre dobiven je od svakog pacijenta prije operacije. Protokol istraživanja odobrila je Medicinska etička komisija Sveučilišta u Splitu, Medicinskog fakulteta (003-08/20-03/0005) i Kliničke bolnice Merkur, Zagreb (0311-7732-3), u skladu s Helsinškom deklaracijom (53).

Tablica 1. Kliničke i patološke karakteristike pacijenata s HCC-om.

Oznaka uzorka	Spol	Dob (god)	Etiologija ciroze jetre	Histološki gradus	TNM klasifikacija	Anamneza	TACE
HCC1	Ž	75	KRG	1	pT1b pN0 pMx	AH	-
HCC2	Ž	64	PBC	2, 3	pT2 pNx pMx	LC, SP	-
HCC3	M	62	ALD	1	pT1b pN0 pMx	LC, Kolecistolitijaza, DM II, pretilost, KOPB	-
HCC4	M	66	ALD	1	ypT1a ypN0	LC, PTST, tuberkuloza	+

HCC5	Ž	76	KRG	1	pT1b pNx pMx	LC, astma, DM II, hipersplenizam	-
HCC6	M	64	ALD	1	pT2 pNx pMx	LC, AH	+
HCC7	M	67	ALD	2	pT1b pN0 pMx	LC, DM II, miokardialni infarkt, AH, hipersplenizam	-
HCC8	M	67	ALD	2, 3	pT2 pN0 pMx	DM II, CMV	-
HCC9	M	61	ALD	1, 2	pT2 pN0 pMx	LC, SP	+
HCC10	M	57	ALD	2	ypT1a ypNx	LC, AH	+
HCC11	M	72	KRG	1, 3	pT2 pN0 pMx	LC, ICC	-
HCC12	M	68	ALD	1	pT2 pNx pMx	CC	-
HCC13	M	66	COM	2, 3	ypT3 ypN0 ypMx	AH, DM II	+
HCC14	M	62	ALD	2	pT2 pN0 pMx	LC, portalna hipertenzija	-
HCC15	M	67	HBV	1	pT1 pN0 pMx	AH, HBV	+
HCC16	Ž	66	HCV	1	pT2 pN0 pMx	LC, DM II, HCV	-
HCC17	M	70	COM	2	pT2 pNx pMx	LC, DM II, AH	+
HCC18	M	74	NFLD and HBV	1, 2	pT2 pN0 pMx	HBV	+
HCC19	Ž	73	PBC	2	pT1b pN0 pMx	LC, HBV, DM II, AH, CC	+
HCC20	Ž	64	KRG	1	pT2 pN0 pMx	LC, HCV, SP	-
HCC21	M	70	KRG	2	pT2 pNx pMx	DM II, LC, AH, fibrilacija atrijsa	-

Kratice: Ž, ženski; M, muški; KRG, kriptogeni; PBC, primarni bilijarni kolangitis; ALD, alkoholna bolest jetre; COM, kompenzirana ciroza jetre; HBV, hepatitis B virus; HCV,

hepatitis C virus; NFLD, bolest nealkoholne masne jetre; LC, ciroza jetre; AH, arterijska hipertenzija; DM II, dijabetes melitus tip 2; PTSP, posttraumatski stresni poremećaj; CMV, citomegalovirus; ICC, intrahepatični kolangiokarcinom; CC, kronični kolecistitis; SP, splenomegalija.

3.1.3. Drugi biološki materijali

Za naša istraživanja, osim tkiva jetre, korištene su i različite komercijalno dostupne stanične linije: HeLa, HepG2, HEK293, U2OS, T24 i TCCSUP.

3.1.4. Aparati

Aparatura za elektroforezu Mini Protean 3 (Bio-Rad), Aparatura za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad), Aparatura za izlivanje gelova (Bio-Rad), Centrifuga Biofuge primo R (Heraeus), Centrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific), Svjetlosni i fluorescentni mikroskop Olympus BX43 mikroskop (Olympus Corporation), Inkubator Heraeus Hera Cell 150 (Thermo Scientific), Esco laminar flow cabinet (Esco Scientific), Economy Incubator with fan Size 1 (Gallenkamp), NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), PCR uređaji Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific) i Eppendorf Mastercycler Personal (Sigma), Real Time PCR uređaj BioRad CFX96 Real-Time System (C1000 231 Touch Thermal Cycle) (Bio-Rad), Mikrotom (RM2125 RTS) (Leica), Roteks General rotator STR4 (Stuart), Spektrofotometar DU 530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter), Protočni citometar BD Accuri C6 (BD Biosciences), Sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), Termoblok Thermo Shaker Incubator Thriller (Prelab), Uređaj za western blot analizu gelova Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad), UV transiluminator (Elchrom Scientific AG), Vage (Mettler Toledo), Vibracijska miješalica BioVortex V1 (Biosan).

3.1.5. Osnovne kemikalije

Agar (Roth), agaroz (Sigma), akril amid (AppliChem), albumin govedeg seruma (BSA) (Roth), amonijev persulfat (APS) (Sigma), bakto tripton (Fluka), boja za praćenje elektroforeze Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega), brom fenol plavo (Kemika), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma), ekstrakt kvasca (Fluka), eozin (Merck), etanol (J.T. Baker), etidijev bromid (10 ng/ml) (Sigma), etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) (Roth), etilenglikol-bis (β -

aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraoctena kiselina (EGTA) (Roth), Eukitt Quick-hardening mounting medium (Sigma), fenol crveno (Sigma), glicerol (Fagron), glicin (Roth), hematoxylin (Sigma), histanol (Biognost), kalcijev klorid (Kemika), kalijev dihidrogenfosfat (Kemika), kalijev klorid (Kemika), kloroform (Kemika), klorovodična kiselina (Kemika), ksilol (Biognost ili Sigma), Luminol western blotting reagent (Solution A i Solution B) (Santa Cruz Biotechnology), metanol (Sigma), mlijeko u prahu (Roth), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (Roth), natrijev azid (Kemika), natrijev citrat (Sigma), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Roth), natrijev fluorid (Fluka), natrijev klorid (Kemika), octena kiselina (Kemika), paraformaldehid (Sigma), piperazin-N, N'-bis(2-etansumporna kiselina) (PIPES) (Roth), Ponceau S (Roth), tripsin-EDTA (Sigma), Tris (Sigma), Triton-X-100 (Roth), Tween 20 (Roth), voda bez nukleaza (Invitrogen), vodikov peroksid (Kemika), β -merkaptioetanol (Fluka), 2-propanol (Sigma), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska 19 kiselina (HEPES) (Roth), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

3.1.6. Osnovne puferske otopine

- Pufer za pripremu kompetentnih bakterijskih stanica: pH 7 (60 mM CaCl_2 , 15% glicerol, 10 mM PIPES)
- 1X TAE pufer pripremljen iz matične otopine 50X TAE pufera: pH 8 (2 M Tris, 5,7% ledene octene kiseline, 100 mM EDTA)
- 1X pufer za SDS PAGE (engl. *running buffer*) pripremljen iz matične otopine 10X: 250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS.
- 1X pufer za prijenos (engl. *transfer buffer*) na membranu za *western blot* (WB) pripremljen iz matične otopine 10X: 250 mM Tris, 2 M glicin, 20% v/v metanol.
- Pufer za blokiranje TBS-BSA za WB: 5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS-u, pH 7,4.
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje za WB: 0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8.
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje za WB: 1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8.
- 1X PBS napravljen iz 10X matične otopine: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4 .
- 1X TBS pufer pripremljen iz matične otopine 10X: 500 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5.

- Pufer za lizu stanica: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1,5 mM MgCl₂, DNaza 1:1000, 150X PMSF, 100X koktel proteinaznih inhibitora, 5 mM NEM, pH 7,5.
- Pufer za ispiranje u imunoprecipitaciji: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, pH 7.
- 4% paraformaldehid u 1X PBS pH 7,4
- RIPA pufer: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0,5% DOC, 0,1% SDS, pH 7,4.
- 2X pufer za nanošenje proteinskih uzoraka (Laemmli pufer): 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 5,6% SDS, 0,01% bromfenol plavo u ddH₂O uz dodatak 5% β-merkaptoetanol.
- Citratni pufer za otkrivanje antigena za IHC: 10 mM C₆H₅Na₃O₇, 0,05% Tween 20, pH 6.
- EDTA pufer za otkrivanje antigena za IHC: 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 8.
- Blokirajuća otopina za IHC: 1X TBS, 0,025% Tween 20, 1% BSA.
- Pufer za ispiranje za IHC: 1X TBS, 0,025% Tween 20.
- 5%-tna otopina mlijeka u prahu pripravljena u 1X TBS puferu
- Ponceau S otopina: 10% v/v koncentrirana octena kiselina, 0,5% v/v Ponceau S u ddH₂O.

3.1.7. Enzimi i biljezi

DNA polimeraza Taq (Thermo Fisher Scientific); RNaza A (Roche); DNaza (Roche); Dab - 3,3'-diaminobenzidin (Dako); DNA biljeg 1 kb DNA Step Ladder (Promega); DNA biljeg 100 bp DNA Step Ladder (Promega); proteinaza K 100 mg/ml (Roth); proteinski biljeg Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

3.1.8. Proteazni inhibitori

Aprotinin (koncentracija matične otopine 10 mg/ml) (Sigma); fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (koncentracija matične otopine 100 mM) (Roth); leupeptin (koncentracija matične otopine 1 mg/ml) (Roche); natrijev ortovanadat (koncentracija matične otopine 1 M) (Sigma); Complete Tablets EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Roche); PhosStop EASYpack (Roche).

3.1.9. Kompleti (engl. kits)

- komplet za transfekciju *Lipofectamine RNAiMAX* (Life Technologies).
- komplet za RT-qPCR: *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) i *Power SYBER Green PCR MasterMix* (Bio-Rad).
- komplet za analizu genske ekspresije određenog panela gena *RT² Profiler PCR Array*.
- kompleti za izolaciju i pročišćavanje plazmidne DNA: *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) i *QIAfilter Midi Kit for purification of ultrapure, transfection grade plasmid DNA* (Qiagen).

3.1.10. Početnice

RT-qPCR početnice su dizajnirane u *on-line* alatu *Primer designing tool-NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i naručene od *Microsynth-a* (Tablica 2).

Tablica 2. Lista početnica za RT-qPCR.

<u>gen</u>	<u>Lijeva početnica 5' - 3'</u>	<u>Desna početnica 5' - 3'</u>	<u>Produkt (pb)</u>
ATF4	CCTCCAACAACAGCAAGGAGGA	CAGAAGGTCATCTGGCATGGT	131
ATF6	AACCCGTATTCTTCAGGGTGC	ACTCCCTGAGTTCCTGCTGATA	103
BAX	AGGGTGGTTGGGGGCTG	AAAGATGGTCACGGTCTGCC	114
BLM	GAGTCTGCGTGCGAGGATTA	TGTTCTGGCTGAGTGACGTT	79
CDC25A	CAGGGTCTGGGCAGTGATTAT	AGCTGGACTACATCCCAACAG	198
CDC25C	GACGTTGGCCTACCCAGTC	AAAACAAAACCTAGCTCAAGCC	169
CHEK1	TCTCAGACTTTGGCTTGGA	TGGTCCCATGGCAATTCTCC	193
CREB3L3	TAAGTACGAGGAGCGAGTGC	AGTGCAAGCTGACATCCGAG	127
CYP2E1	AAGCAACCCGAGACACCATT	ACACACTCGTTTTCTGTGG	200
DDIT3/CHOP	TTGCCTTCTCCTTCGGGAC	TGATTCTTCTTTCATTCCAGG	132

EIF2AK3/PERK	GAACCAGACGATGAGACAGAG	GGATGACACCAAGGAACCG	150
ERN1/IRE1	CGGCCTCGGGATTTTTGGAA	CCTGCAGGACTGGATCTTCT	146
FANCI/BRIP1	TCTGGAGTTGGTGAAGACAGTCA	CCACGACAAACTGCTACCAGGA	141
GADD45A	AGAGCAGAAGACCGAAAGGATG	TACACCCCGACAGTGATCGT	96
GRP78/HSPA5	GACCACCTACTCTGCGTCG	GACGTTCCCTTCAGGAGTG	116
GUSB	CTCATTGGGAATTTTGCCGAT	CCGAGTGAAGATCCC CTTTTTA	107
HERPUD1	ACAAGGTGGCCCTATTGTGG	CCCAACGTGATGCAGGTACA	175
HSP90AA1	CCCAGAGTGCTGAATACCCG	TAACAGGTGCCCTGCTTCTC	99
HSP90B1/GRP94	CTGTATTCAGGCCCTTCCCG	CACCACAGCCTTTTCAATCTTGT	184
NTHL1	TGTGTCAGGCATTGCAGTGGA	AGAGTCCATTGATCTCGTGCC	149
RPS23	TGGAGGTGCTTCTCATGCAA	AATGGCAGAATTTGGCTGTTTG	76
PPP1R15A	GGCCAGAAAGGTGCGCTT	GCTGCGATCCCGAGCAAG	115
SFRS4	GCTCACAAGGGACGCAAAAA	TCGAGAGCGAGACCTTGAAT	189
SPRTN	CACTAATGTGCTATGTCAGCCAGT C	GCACCCTGAGACACAAAACATC	151
SREBP1c/SREBF 1c	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC	80
*XBP1-spl	GCTGAGTCCGCAGCAGGT	CTGGGTCCAAGTTGTCCAGAAT	130

Početnice za umnažanje pojedinog egzona gena *SPRTN* su dizajnirane u *on-line* alatu *Primer designing tool-NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i naručene od *Microsynth-a* (Tablica 3).

Tablica 3. Lista početnica za sekvenciranje egzona gena *SPRTN*.

	<u>Lijeva početnica 5` - 3`</u>	<u>Desna početnica 5` - 3`</u>	<u>Produkt (pb)</u>
Promotor + egzon 1	ATTCTCTCCGGGTCTCACG	CAGGTCCAAAACCAGACTCC	996
egzon 2	AAGGACTTGGGCATATTTGG	CATACAGGCGAATTCACAGC	241
egzon 3	GAAGCCTGTGATACAGAAAAGG	TTGCTTCTCTAGGCCTCTCG	376
egzon 4	TTGTCCTCTAATCCCATGTGC	GACTTCTACACCAGAAACGATCC	644
egzon 5	GCCTTGTTGTTGGTCTTTGG	TCCTGACTGGCTGACATAGC	1080

3.1.11. Protutijela

Popis svih korištenih protutijela za *western blot* metodu nalazi se u tablici 4.

Tablica 4. Lista protutijela.

<u>Protutijelo</u>	<u>Proizvođač</u>	<u>Kat.br</u>	<u>razrjeđenje</u>	<u>veličina (kDa)</u>	<u>Monoklonalno/ poliklonalno i vrsta</u>
β -Actin	Sigma	A5316	1:1000	42	mono/miš
α -Tubulin	Sigma	T5168	1:1000	50	mono/miš
Histone H2A (internal)	St John's Laboratory	STJ96865	1:500	15	poli/kunić
Histone H2B (A-6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-515808	1:1000	18	mono/ miš

Histone H3 (1G1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-517576	1:1000	15	mono/ miš
Histone H4 [IGX4696H]	Abcam	ab213291	1:2500	14	mono/ljudski
Phospho-Histone H2A.X (Ser139)	Cell Signaling	9718S	1:1000	15	mono/kunić
Phospho-Histone H3	Cell Signaling	9701	1:1000	17	poli/kunić
DHX9 (B-9)	Santa Cruz Biotechnology	sc-137232	1:1000	130	mono/ miš
HSPA5/GRP78	Proteintech	11587-1-AP	1:1000	78	poli/kunić
PCNA (PC10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-56	1:500	36	mono/ miš
VCP [5]	Novus	NB100-1557	1:1000	97	poli/kunić
Vinculin	Sigma	V9264	1:1000	116	mono/ miš
ATF4 (B-3)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-390063	1:1,000	52	mono/ miš
ATF6- α (F-7)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-166659	1:1,000	50	mono/ miš
DDIT3	Cell Signaling	L63F7	1:1,000	27	mono/ miš
GADD153 (B-3)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7351	1:500	26	mono/ miš
CYP2E1	Proteintech	19937-1-AP	1:10,000	57	poli/kunić
GAPDH	Proteintech	10494-1	1:2,000	36	poli/kunić
SPRTN	Atlas antibodies	HPA025073	1:1,000	55	poli/kunić
SREBP-1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-365513	1:1,000	125	mono/ miš

XBP1s	Proteintech	24868-1-AP	1:1,000	60	poli/kunić
PARP1	Cell Signaling	9542S	1:1,500	116, 89	poli/kunić
Goat anti-Rabbit IgG F(ab') ₂ Secondary Antibody, HRP	Invitrogen	31461	1:5,000	/	koza
Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP secondary antibody	Dako Agilent	P044701-2	1:10,000	/	koza

3.1.12. Plazmidi

Korišteni plazmidi dobiveni su metodama restrikcije i ligacije te mjesnom specifičnom mutagenезom pomoću PCR-a. Sekvenca je potvrđena sekvenciranjem dijela plazmida i cijelog inserta u *Microsynth* (Švicarska).

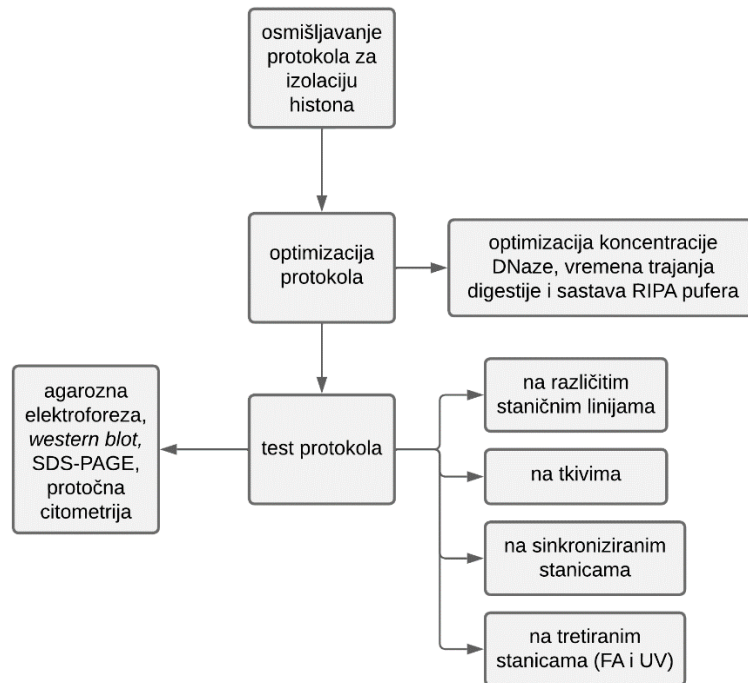
Korišteni su sljedeći plazmidi: pGEX4T1-SPRTN FL (full length, cijeli protein); pGEX4T1-SPRTN N-term (N-terminalna polovica proteina); pGEX4T1-SPRTN C-term (C-terminalna polovica proteina) i pGEX4T1-empty (kontrolni plazmid).

3.2. Protokoli istraživanja

3.2.1. Testiranje i optimizacija nove metode izolacije histona – studija 1

Osmišljen je protokol za izolaciju histona iz nukleosoma u uvjetima fiziološkog pH koji omogućava zadržavanje epigenetskih oznaka na histonima. Optimizirani su uvjeti digestije (vrijeme trajanja i temperatura) te koncentracija DNaze, optimalni za cijepanje DNA na fragmente veličine 200-ak parova baza, što odgovara veličini DNA koja je omotana oko histonskog oktamera. Tretmanima RNazom i proteinazom K potvrđen je sastav pojedine frakcije dobivene novim protokolom. Western blot metodom prikazan je sastav proteina u pojedinoj frakciji i potvrđeno je da se svi histoni nalaze u željenoj frakciji. Metoda je testirana na 6 različitih staničnih linija, kao i na tkivu jetre i slezene miša. Ovim protokolom detektirane su razlike u sastavu nukleosoma, kao i u epigenetskim oznakama pojedinih histona u uzorcima koji su sinkronizirani u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Masenom spektrometrijom potvrđen je proteinski sastav izoliranih frakcija. Kontroliranjem aktivatora ekspresije histona (NPAT) moguće je utjecati na razinu histona u stanici i promjene proučavati ovim protokolom.

Tretiranjem stanica formaldehidom ili izlaganjem UV zračenju dolazi do određenih promjena na histonima koji signaliziraju oštećenje DNA, što je također potvrđeno ovim protokolom. Dijagram tijeka ovog istraživanja prikazan je na slici 4.

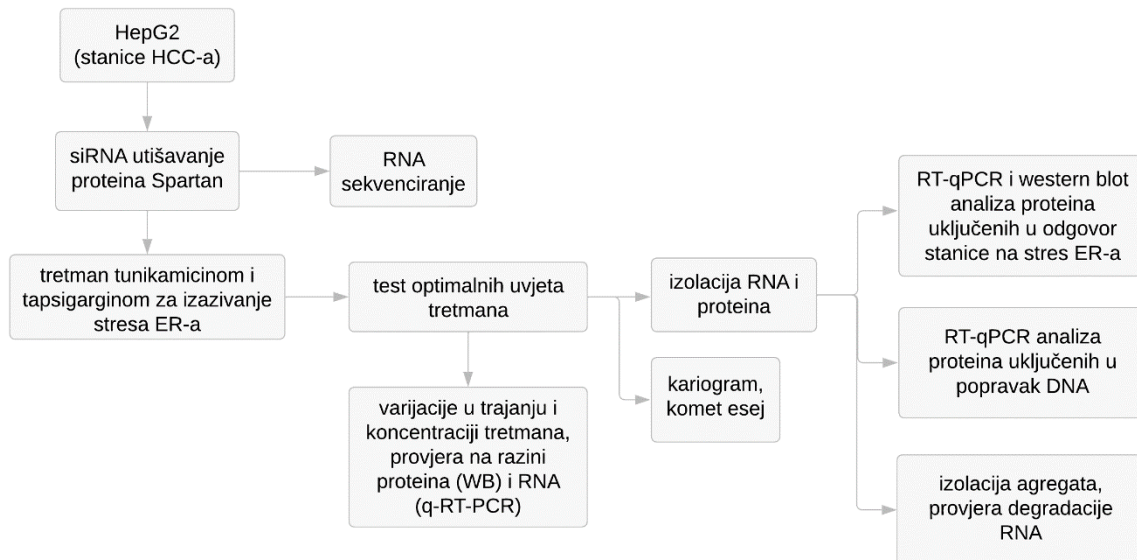


Slika 4. Dijagram tijeka izolacije histona.

3.2.2. Protokol studije na staničnoj liniji HepG2 – studija 2

Za ovaj dio istraživanja korištene su HepG2 stanice koje potječu od hepatocelularnog karcinoma. Odabrane su jetrene stanice zato što su mutacije u *SPRTN* genu povezane s ranim razvojem raka jetre (22). U stanicama je utišana ekspresija gena *SPRTN* pomoću male interferirajuće RNA. Iz navedenih stanica je izolirana ukupna stanična RNA i sekvencirana. RT-qPCR metodom potvrđeno je utišavanje gena *SPRTN*. Dodatno, nakon utišavanja, stanice su tretirane tunikamicinom i tapsigarginom, kemikalijama koje izazivaju stres ER-a. Utišane i tretirane stanice korištene su za otkrivanje uloge proteina SPRTN u stresu ER-a. Iz navedenih stanica izolirana je ukupna RNA i iz nje je sintetizirana cDNA koja se potom koristila u RT-qPCR reakciji. RT-qPCR metodom je u stanicama pod akutnim stresom ER-a i bez proteina SPRTN analizirana ekspresija gena uključenih u odgovor na pogrešno smotane proteine (UPR), kao i gena odgovornih za popravak DNA. Osim RNA, izolirani su i ukupni stanični proteini koji su analizirani pomoću western blot metode. Tom metodom se ispitala promjena razine proteina uključenih u UPR i u signalizaciju popravka DNA kao posljedica utišavanja proteina

SPRTN i stresa ER-a. Komet testom se odredila količina DNA lomova, a određen je i mitotski indeks u navedenim stanicama. Ukupna izolirana RNA korištena je i za provjeru stupnja degradacije RNA. Provedena je i analiza proteinskih agregata na navedenim uzorcima. Dijagram tijeka ovog istraživanja prikazan je na slici 5.

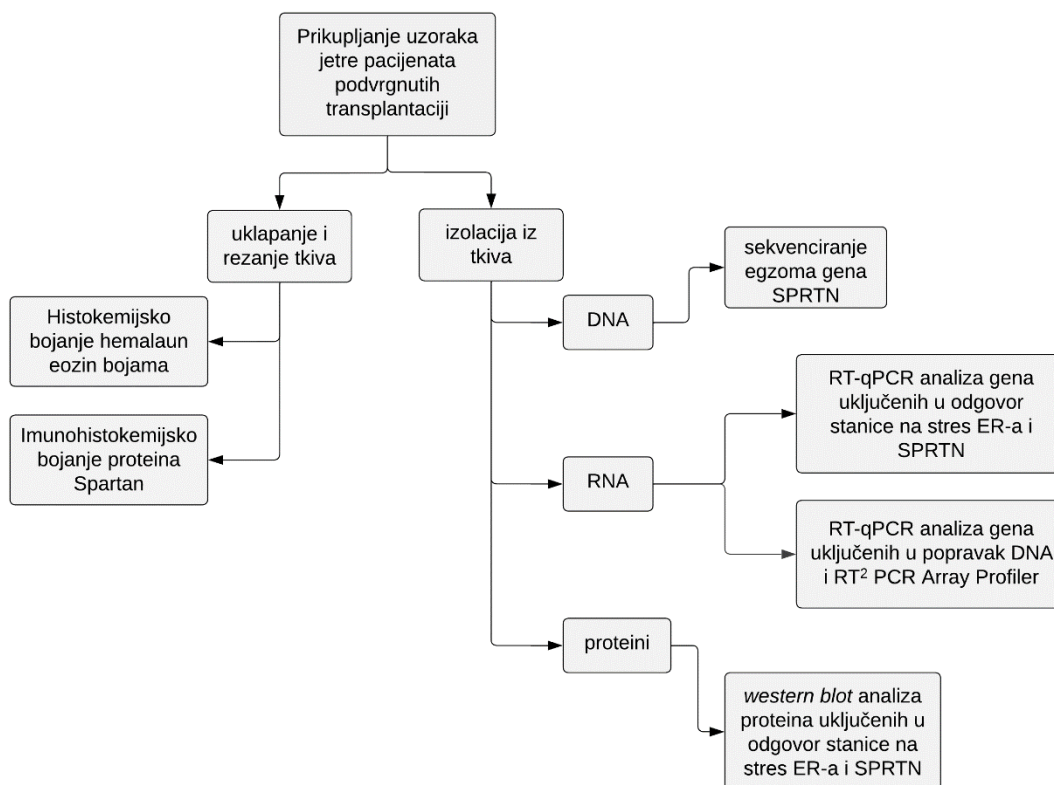


Slika 5. Dijagram tijeka studije na staničnim linijama.

3.2.3. Protokol studije na tkivima jetri pacijenata – studija 2

Prikupljeni su uzorci tkiva jetre pacijenata koji su podvrgnuti transplantaciji jetre. Iz jetre pojedinog pacijente prikupljen je jedan uzorak iz tumorskog središta (T), a drugi iz okolnog, tumorom-nezahvaćenog dijela jetre (NT). Iz tkiva su izolirani DNA, RNA i proteini, a dio tkiva je uklopljen u parafin za histološke analize. Analizirana je razlika u ekspresiji gena *SPRTN* i gena koji pripadaju UPR-u između T i NT tkiva. Osim UPR-a, kao i na stanicama, provjerena je i ekspresija gena uključenih u signalizaciju popravka DNA. Rezultati ekspresije gena uspoređeni su s rezultatima dostupnim u bazama podataka za HCC.

Na histološkoj razini, metodom imunohistokemije, analizirana je lokalizacija proteina *SPRTN*. Istražena je i razlika u razini proteina *SPRTN* i proteina iz UPR-a između tumorskog i okolnog netumorskog tkiva. PCR reakcijom umnoženi su egzoni gena *SPRTN* iz izolirane DNA i sekvencirani kako bi se istražilo postojanje mutacija u genu *SPRTN* i utvrdilo postoje li razlike u odnosu na uzorke iz zdrave populacije dostupne u bazama podataka. Dijagram tijeka ovog istraživanja prikazan je na slici 6.



Slika 6. Dijagram tijeka studije na uzorcima tkiva jetre.

3.3. Metode

3.3.1. Stanične kulture

HepG2 stanice uzgajane su u *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (Sigma), a sve ostale vrste korištenih staničnih linija (HeLa, HEK293, U2OS, T24 i TCCSUP) uzgajane su u hranjivom mediju *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (DMEM) (Sigma). Oba medija suplementirana su dodatkom 10% goveđeg seruma (Capricorn) i kombinacijom antibiotika penicilin-streptomycin (100 Units/L) (Capricorn), što se kasnije u tekstu referira kao kompletan medij. Stanice su održavane u inkubatorima za uzgoj stanica na 37 °C u zraku s 5% CO₂.

3.3.2. Prikupljanje tkiva jetre

Dva uzorka jetrenog tkiva prikupljena su od svakog pacijenta tijekom postupka transplantacije jetre. Tkivo HCC-a uzorkovano je iz središta lezije, dok je uzorak kontrolnog tkiva uzorkovan iz okolnog jetrenog tkiva koje nije pogođeno rakom. Histološka analiza kliničkog patologa potvrdila je da su uzorci dobivenog tkiva HCC. Tkiva su odmah pohranjena

u otopinu RNALater (Thermo Fisher Scientific) i čuvana na temperaturi od +4 °C do disekcije. Tkiva su zatim disecirana, pri čemu je jedan dio uklopljen u parafin za analizu metodom imunohistokemije, a manji komadi tkiva korišteni su za izolaciju DNA, RNA i proteina.

3.3.3. Utišavanje gena malom interferirajućom RNA

Utišavanje gena NPAT

HeLa stanice su tretirane kontrolnom malom interferirajućom RNA (*small interfering RNA*, siRNA) (siRNA-ctrl: 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G-3', Eurofins) ili siRNA specifičnom za NPAT (siRNA-NPAT-1: 5'-GTTATCATTGCATTATGAT-3, Integrated DNA Technologies). siRNA sekvenca korištena za utišavanje *NPAT* gena dostupna je u *GenBank* bazi pod sljedećim kodom: FW918262.1. Za transfekciju je korišten *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača s konačnom koncentracijom siRNA od 40 nM tijekom 72 sata.

Utišavanje gena SPRTN

Za smanjenje ekspresije gena *SPRTN*, HepG2 stanice su uzgajane u potpunom mediju i tretirane kontrolnim siRNA (siRNA-ctrl: 5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G-3', Eurofins) ili siRNA specifičnom za *SPRTN* (siRNA-SPRTN-1: 5'-GUC AGG AAG UUC UGG UUA A-UA-3', *Microsynth*). Sekvenca siRNA-SPRTN-1 se veže na 3'-UTR *SPRTN* mRNA (19,78). Za transfekciju je korišten *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača s konačnom koncentracijom siRNA od 40 nM tijekom 72 sata.

3.3.4. Tretmani stanica

Tretman formaldehidom

HeLa stanice su tretirane formaldehidom otopljenim u 1X PBS (FA) u konačnoj koncentraciji od 400 mM. FA je dodan u kompletni DMEM medij. Stanice su inkubirane u otopini FA tijekom 1 ili 2 sata, isprane 1X PBS-om, tretirane tripsinom i sakupljene.

Tretman UV zračenjem

HeLa stanice su pripremljene za tretman UV zračenjem uklanjanjem medija i ispiranjem s 1X PBS. Petrijeva zdjelica (bez poklopca) sa stanicama je stavljena u *Crosslinker (Uvitec CL-508.G)* i izložena UV zračenju od 15 J/m². Nakon tretmana, stanice su inkubirane u staničnom

inkubatoru u potpunom DMEM mediju tijekom 15 ili 45 minuta. Nakon inkubacije, stanice su isprane 1X PBS-om, tretirane tripsinom i sakupljene.

Tretman tunikamicinom i tapsigarginom

HepG2 stanice su transfecirane sa siRNA (kako je opisano prethodno) i tretirane TN-om ili TG-om. Četrdeset osam sati nakon transfekcije, stanice su tretirane s DMSO (kontrola), 1 μ M TN-om ili 1 μ M TG-om (oba otopljena u DMSO) tijekom 18 sati, osim ako nije drugačije naznačeno. Stanice su isprane 1X PBS-om, tretirane tripsinom i sakupljene, centrifugirane 3 minute pri 400 \times g, ponovno isprane u 1X PBS-u, centrifugirane 3 minute pri 400 \times g, te je stanični pelet pohranjen na -20 °C. Uzorci pripremljeni na ovaj način korišteni su za *western blot*, RT-qPCR, imunofluorescenciju, provjeru kvalitete RNA i izolaciju proteinskih agregata.

3.3.5. Sinkronizacija stanica

HeLa stanice su tretirane kemikalijama Ro-3306 (Cayman Chemical Company, 15149), 2,3-DCPE (Cayman Chemical Company, 10005229) ili mimosinom (Cayman Chemical Company, 14337) u konačnim koncentracijama od 9, 2 i 400 mM, redom. Stanice su inkubirane s pojedinim kemikalijama 16 sati u potpunom DMEM mediju. Nakon 16 sati, stanice su isprane 1X PBS-om, tretirane tripsinom i prikupljene. Ovako pripremljeni uzorci su korišteni za protočnu citometriju, izolaciju histona i masenu spektrometriju.

3.3.6. Protočna citometrija

Protočna citometrija je provedena na HeLa stanicama prema protokolu *Propidium Iodide Flow Cytometry Kit* (Abcam ab139418). Ukratko, stanice su tripsinizirane i sakupljene, fiksirane i resuspendirane u 66% etanolu. Stanice su centrifugirane na sobnoj temperaturi (500 \times g, 5 min), supernatant je uklonjen, a stanični peleti su isprani 1X PBS-om. Propidium jodid je dodan stanicama i inkubiran u mraku 30 minuta. Nakon toga, stanice su analizirane na *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer*.

3.3.7. Tretman RNazom, DNazom i proteinazom K

Za uklanjanje kontaminirajuće RNA, uzorci svih frakcija sakupljenih iz protokola izolacije histona tretirani su RNazom A (Roche, 10109142001) u konačnoj koncentraciji od 0,2 mg/mL 30 minuta na 37 °C. U svrhu uklanjanja DNA, uzorci su tretirani DNazom (Sigma CAS 9025-65-4) u konačnoj koncentraciji od 200 U/mL, 60 minuta na 37 °C. Za digestiju proteina

vezanih za DNA, kao što su histoni, nakon tretmana RNazom A, dodana je Proteinaza K (Carl Roth, 7528.1) u konačnoj koncentraciji od 0,2 mg/mL, 40 minuta na 65 °C.

3.3.8. Izolacija histona drugim metodama

Kako bismo usporedili osjetljivost i specifičnost naše metode ekstrakcije histona s dvije često korištene metode ekstrakcije histona - izolacija kiselinom i izolacija visokom koncentracijom soli, istovremeno smo proveli izolaciju prema sva tri protokola. Protokoli za spomenute dvije metode izolacije preuzeti su iz "Nature protocols" (18), a postupak je proveden kako je već opisano.

3.3.9. Elektroforeza u agaroznom gelu

Standardni 2%-tni agarozni gelovi pripremljeni su otapanjem 1 g praha agaroze (UltraPure™ agarose 16500 Invitrogen) u 50 mL 1X TAE pufera (40 mM Tris, 2 mM EDTA, 20 mM octena kiselina, pH 8). Etidij bromid (0,2 mg/mL) dodan je djelomično ohlađenoj, otopljenoj agarози. Uzorci (frakcije prikupljene iz protokola) su pomiješani s bojom za DNA (2,5 mg/mL bromofenol plavo (Sigma B5525), 2,5 mg/mL ksilen cijanol (Sigma X4216), 30% glicerol). *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific SM0241) korišten je kao marker veličine od 100 do 1000 pb. Elektroforeza je napravljena u električnom polju jakosti napona od 100 V tijekom sat vremena. Fragmenti DNA vizualizirani su pomoću sustava za slikanje Uvidoc HD6 (UVITEC Cambridge).

3.3.10. Western blot

Sakupljene stanične frakcije ili izolirani proteini iz tkiva ili stanica inkubirani su u Laemmli puferu na 95 °C 5 minuta, zatim su nanjeni na 10%-tne ili 15%-tne poliakrilamidne gelove (ovisno o veličini proteina) i razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE (*sodium dodecil sulfate*, SDS) – *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) u 1X puferu za SDS-PAGE (25 mM Tris, 200 mM glicin, 0,1% SDS) pri stalnoj struji od 30 mA 70 minuta u Power Pac 300 (Bio-Rad). *Protein Marker VI* (10-245) (AppliChem, A8889) je korišten kao marker veličine proteina. Elektrotransfer proteina na nitroceluloznu membranu pora veličine 0,45 µm (GVS) izvršen je u spremniku *Mini Trans-Blot VR cell* (Bio-Rad) pri 200 mA 90 minuta u 1X puferu za prijenos proteina (25 mM Tris, 200 mM glicin, 20% metanol). Nakon transfera, proteini su vizualizirani bojenjem 0,5%-tnom otopinom Ponceau S boje u 10% octene kiseline (Fluka Product Number: 81460). Membrane su blokirane u TBS-BSA puferu (1X TBS, 5% BSA, 0,1%

natrijev azid, fenol crvena boja) 1 sat. Membrane su dalje inkubirane preko noći u otopinama primarnih protutijela, navedenim u Tablici 4, razrijeđenim u TBS-BSA puferu. Zatim su inkubirane 45 minuta na sobnoj temperaturi u otopinama sekundarnih protutijela (Tablica 4), razrijeđenim u puferu (5% mlijeko i 1X TBS) u omjeru 1:5000. Između inkubacije s primarnim i sekundarnim protutijelima i nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelima, membrane su ispirane u 1X TBST (1X TBS, 0,05% Tween-20 (Sigma Aldrich P1379)). Proteini su detektirani upotrebom kemiluminescentnog supstrata (Lumigen ECL Ultra Solution A i B) na sustavu za slikanje ChemiDoc XRS+ (Bio-rad) sa softverom Image Lab™ V6.0.

3.3.11. Bojenje Coomassie bojom

Nakon elektroforeze opisane u odjeljku Western blot, po potrebi gelovi su obojeni Coomassie brilliant blue (CBB) bojom (15% v/v etanol, 17% v/v octena kiselina, 0,25% Coomassie brilliant blue boja), te odbojani korištenjem otopine za odbojavanje (50% metanol, 10% octena kiselina) tijekom najmanje 20 minuta.

3.3.12. Izolacija RNA, DNA i proteina

Tekući dušik je korišten za zamrzavanje tkiva, a za mljevenje tkiva korišten je BioSpec uređaj za mljevenje tkiva (Cole Palmer, Primotronic). Smrvljeno tkivo je prikupljeno u epruvete s 1 ml *TRIzol* reagensa (Thermo Fisher Scientific). Izolacija RNA i DNA provedena je prema "*Eksperimentalnom protokolu za izolaciju DNA*", prema uputama proizvođača. RNA je otopljena u 20-50 µl vode bez nukleaza (Fluka), a DNA u 20-50 µl 0,5 M NaOH. Koncentracije RNA i DNA su izmjerene NanoDrop spektrofotometrom. Osim toga, DNA je nanescena na agarozni gel radi provjere čistoće i količine uzorka. RNA iz HepG2 stanica izolirana je istim protokolom.

Izolacija proteina izvedena je kako je opisano ranije (54) s nekoliko modifikacija: proteini su pročišćeni izopropanolom umjesto etanolom, zatim su oprani dva puta u etanolu umjesto u 0,3 M guanidin hidrokloridu. Proteinski pelet je resuspendiran u 200 µl pufera za lizu (20 mM EDTA, 140 mM NaCl, 5% natrijev dodecilsulfat (SDS), 100 mM Tris pH 8) suplementiranim 50 mM natrijevim fluoridom, 1 mM aktiviranim natrijevim ortovanadatom, Roche kompletnim inhibitorima proteaza i Roche PhosSTOP inhibitorima fosfataza). Uzorci su inkubirani na 50 °C 4 sata, zatim centrifugirani pri 16 000 × g 20 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatanti proteinskih lizata prebačeni su u novu epruvetu, pomiješani s 6X Laemmli puferom i zagrijani na 95 °C 5 minuta.

Za izolaciju proteina iz HepG2 stanica, peletirane stanice su resuspendirane u RIPA puferu (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% deoksikolat (DOC), 0,1% SDS, pH 7,4) suplementiranim DNazom I (20 U/mL), 5 mM MgCl₂, 1X koktelom inhibitora proteaza i 1 mM natrijevim ortovanadatom. Suspenzija je inkubirana 15 minuta na 37 °C, zatim pomiješana s 6X Laemmli puferom i zagrijana na 95 °C 5 minuta.

3.3.13. Priprema cDNA i metoda RT-qPCR

RT-qPCR na uzorcima iz stanica

RNA je izolirana iz HeLa stanica koristeći TRIzol Reagent (Invitrogen), prema uputama proizvođača. Reverzna transkripcija je izvedena s 1 µg ukupne RNA prema uputama proizvođača s *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Konačnih 20 µl cDNA-a je razrijeđeno sa 180 µl vode bez nukleaza. Svaka RT-qPCR reakcija je pripremljena s 3,75 µl vode bez nukleaza, 7,5 µl 2X *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, 1725121), 0,75 µl lijeve i 0,75 µl desne početnice (10 mM; Microsynth) i 3 µl razrijeđene cDNA. Popis dizajniranih i validiranih početnica korištenih za RT-qPCR nalazi se u Tablici 2. RT-qPCR metoda je napravljena na uređaju *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) u sljedećim uvjetima: početni korak je inkubacija na 95 °C 3 minute, slijedi 40 ciklusa izmijene dvaju uvjeta inkubacije; 95 °C 10 sekundi i 60 °C 30 sekundi. Nakon faze amplifikacije, određena je i krivulja taljenja (*melt curve*). Ekspresija svih testiranih gena na uzorcima iz stanica je normalizirana na ekspresiju *RPS23* gena. RT-qPCR rezultati su prikazani kao faktor promjene ekspresije (*fold change*, FC), izračunat pomoću $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode. RT-qPCR podaci su analizirani u CFX Maestro softveru. Log₂(FC) vrijednosti iznad 1 i ispod -1 smatrane su značajnima. Svaki uzorak je mjereno u tehničkom duplikatu i tri biološke replike.

RT-qPCR na uzorcima iz tkiva jetre

Izolirana RNA (5 µg) iz uzoraka tkiva jetre tretirana je s *DNA-free DNA Removal Kit* (Thermo Fisher Scientific) da bi se uklonila genomska DNA. Koncentracija RNA je izmjerena pomoću NanoDrop uređaja, a 1 µg pročišćene RNA je korišten za pripremu cDNA-a pomoću *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Sljedeći koraci su jednaki kao i za uzroke RNA izolirane iz stanica, opisani prethodno.

Za normalizaciju ekspresije gena potrebni su referentni geni (*housekeeping gene*, HKG). Testirano je pet potencijalnih referentnih gena: 18S rRNA, SFRS4, GUSB, RPLP0 i POLR2H (podaci nisu prikazani). Kao najstabilniji geni s najmanje razlika u ekspresiji između tumorskog tkiva i okolnog netumorskog tkiva pokazali su se GUSB i SFRS4. Ova dva gena su

kasnije korištena kao HKG za sve RT-qPCR eksperimente na uzorcima HCC-a. Svaki uzorak je mjeran u tehničkom duplikatu i tri biološke replike.

3.3.14. TCGA baza podataka

Podacima iz *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) pristupljeno je 14. veljače 2023. godine putem UCSC Xena preglednika (<https://xenabrowser.net/datapages/>). Podaci RNA sekvenciranja iz GDC (*Genomic Data Commons*) TCGA Liver Cancer (LIHC) skupa podataka, zajedno s kliničkim podacima, izvezeni su i dalje obrađeni prema DESeq2 protokolu. Rezultati dobiveni analizom diferencijalne ekspresije gena između uzoraka tumora i okolnog netumorskog tkiva prikazani su kao \log_2FC vrijednosti s prilagođenom p-vrijednosti za pojedini gen.

3.3.15. RNA sekvenciranje

Ukupna RNA izolirana je iz SPRTN-deficijentnih HepG2 stanica kao što je opisano prethodno u odjeljku „Izolacija RNA, DNA i proteina“. Kvaliteta RNA provjerena je na 1% agaroznom gelu s natrijevim hipokloritom (55). Uzorci su poslani u *Novogene* za pripremu biblioteke mRNA te su sekvencirani dubinom i pokrivenošću od 40M parova očitavanja po uzorku. Sva analiza podataka provedena je u *Novogene*-u. Prije analize diferencijalne ekspresije gena, brojanje očitavanja za svaku sekvenciranu biblioteku prilagođeno je programom edgeR putem normalizacijskog faktora za skaliranje. Analiza diferencijalne ekspresije između dva uvjeta provedena je pomoću R paketa DEGseq. P-vrijednosti su prilagođene metodom Benjamini i Hochberg. Uzorci s p-vrijednošću nižom od 0,005 (alfa) te vrijednostima $\log_2(FC)$ manjim od -1 ili većim od 1 smatrani su značajno promijenjenima.

3.3.16. PCR amplifikacija i analiza sekvenci

Izolirana genomska DNA (100 ng) iz odabranih uzoraka jetrenog tkiva (ukupno 21 uzorak) korištena je za PCR reakcije s početnicama za svaki *SPRTN* egzon i MegaFi polimerazom (5 U/ μ l; Applied Biological Materials) prema uputama proizvođača. Pet parova početnica je dizajnirano za amplifikaciju promotorske regije i egzona gena *SPRTN*. Sekvence početnica su prikazane u Tablici 3. Korišteni termociklički uvjeti su: 1) početna denaturacija na 98 °C 1 minuta i 2) 35 ciklusa od tri koraka: denaturacija na 98 °C 30 sekundi, prijanjanje početnica na temperaturama između 51 i 60 °C 30 sekundi i umnažanje na 72 °C 40 sekundi. PCR produkti su razdvojeni na 2% agaroznom gelu. Nakon što su dobiveni zadovoljavajući uzorci, isti su sekvencirani (*Microsynth*, Švicarska) koristeći jednu od PCR početnica.

Sekvence su analizirane kako bi se utvrdila prisutnost mutacija i varijacija u usporedbi s referentnom sekvencom NG_042052.1 RefSeqGene (NIH, NCBI).

3.3.17. Histološka analiza

Tkiva su fiksirana u 4% paraformaldehidu (PFA) pH 7,4 tijekom 2,5 dana (70 sati), zatim su dehidrirana u seriji etanola (po 1 sat u 80, 90, 95 i 100% etanolu), te ostavljena preko noći u 100% etanolu. Pročišćena su od alkohola u tri serije ksilola (Honeywell) po 1 sat. Tkiva su dva puta inkubirana po 1 sat u parafinu na 60 °C, a zatim uklopljena u parafin. Tkiva su izrezana na mikrotomu RM2125 RTS (Leica) debljine 4-5 µm. Ovako narezana tkiva su deparafinizirana, rehidrirana i obojena hematoksilinom (Sigma) i eozinom (Merck) 10 minuta.

Za imunohistokemiju, rezovi tkiva na mikroskopskim staklima su deparafinizirani i rehidrirani dva puta po 5 minuta u ksileni i etanolu (95 i 100%), svaki po 10 minuta. Za otkrivanje epitopa preparati su inkubirani 30 min na 95-98°C u kuhalu na pari u EDTA puferu (1 mM EDTA pH 8.0, 0.05% Tween 20). Zatim je endogena peroksidaza uklonjena inkubacijom tkiva u 3% H₂O₂ 10 minuta. Stakalca su isprana vodom i TBST puferom (1X TBS, 0.05% Tween). Uzorci su blokirani 1 sat na sobnoj temperaturi u 15% BSA otopljenom u TBST puferu. Rezovi su inkubirani u primarnom SPRTN protutijelu (proizvedeno interno, prethodno objavljeno (23), razrijeđeno 1:1000 u blokirajućem puferu) na 4 °C preko noći. Nakon tri ispiranja s TBST puferom, dodano je anti-kunić sekundarno protutijelo konjugirano s HRP-om, razrijeđeno 1:500 u blokirajućem puferu i inkubirano na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon tri ispiranja s TBST puferom primijenjen je DAB+ supstratni kromogeni sustav (K3468; Dako, Agilent Technologies). Nakon 10 min stakalca su uronjena u vodu (nakon što se procijenilo da se boja dovoljno razvila). Uzorci su obojeni hematoksilinom tijekom 10 sekundi, nakon čega su dehidrirani etanolom i isprani ksilenom. Na rezove je dodan medij za uklapanje *Eukitt Quick media* (03989, Sigma-Aldrich) i pokrovno stakalce. Kao kontrola za pozadinsko bojenje, korišteni su rezovi tkiva bez primarnog protutijela, tretirani samo sekundarnim protutijelom i DAB-om. Fotografije su snimljene pomoću mikroskopa Olympus BX43 (Olympus Corporation) opremljenog Nikon DS-Fi3 kamerom i NIS Elements softverom.

3.3.18. Alkalni komet test

Za vizualizaciju oštećenja DNA uzrokovanog utišavanjem SPRTN-a i/ili indukcijom stresa ER-a, proveden je alkalni komet test. HeLa stanice su utišane sa siRNA-ctrl ili siRNA-SPRTN-1 kako je već opisano. Dvadeset četiri sata nakon utišavanja stanice su tretirane 1 µM TN-om (Sigma) tijekom 24 sata. Nakon tretmana, stanice su tripsinizirane, prikupljene i

resuspendirane u 1X PBS. Stanice su pomiješane s 2%-tnom agarozom niskog tališta (Zellx biochem; ZXB-06-137-50) i postavljene na mikroskopska stakalca prekrivena s 1%-tnom agarozom. Deset minuta nakon polimerizacije na ledu, provedena je liza stanica u gelu preko noći na 4 °C puferom za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 10% DMSO) suplementiranim proteinazom K (Carl Roth). Nakon lize, stakalca su isprana hladnim 1X PBS-om i inkubirana 15 minuta u 300 mM NaOH i 1 mM EDTA kako bi se izazvala denaturacija DNA. Elektroforeza je provedena u istom puferu pri 300 A (~25V) 20 minuta. Uzorci su neutralizirani 50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 minuta, a zatim 15 minuta bojani bojom DAPI (Sigma-Aldrich). Stakalca su isprana 50 mM Tris-HCl pH 7,5, a zatim pregledana na mikroskopu Olympus CHX41 (Olympus Corporation).

3.3.19. Kariotipizacija

Metafazne ploče i bojanje po Giemsi pripremljeni su standardnim postupcima. Ukratko, HepG2 stanice su utišane sa siRNA-ctrl ili siRNA-SPRTN-1. Treći dan nakon utišavanja, stanice su tretirane 0,2 nM TG (Abcam), 0,2 μM TN ili ostavljene netretirane. Dvadeset četiri sata nakon tretmana, stanice su tretirane 0,1 μg/ml kolcemidom (Euroclone) 2 sata. Stanice su prikupljene i izložene hipotoničnom bubrenju u 0,4% KCl 20 minuta na 37 °C, fiksirane u hladnom fiksativu (75% metanol, 25% octena kiselina) 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane pri 1000 × g 10 minuta. Inkubacija u fiksativu i centrifugiranje su ponovljeni tri puta. Tri do četiri kapi suspenzije jezgara su nanese na vlažna, čista mikroskopska stakalca i ostavljene da se osuše na zraku. Slajdovi su kratko uronjeni u tripsin 5 sekundi, isprani u PBS-u, osušeni na zraku i obojeni Giemsa bojom. Analiza je izvedena na epifluorescentnom mikroskopu Axio Imager 2 (Zeiss, Jena, Njemačka), a slike su snimljene pomoću Ikaros softvera (Metasystems, Altlussheim, Njemačka).

3.3.20. *RT² Profiler PCR Array*

cDNA dobivena iz jetrenog tkiva (opisano prethodno u odjeljku "Priprema cDNA") korištena je za analizu ekspresije gena na *RT² Profiler PCR array*-u s 84 ljudska gena uključena u signalizaciju oštećenja DNA (Qiagen, PAHS-029ZA). Uzorci su pripremljeni prema protokolu proizvođača; cDNA je pomiješana s *RT² SYBR Green Mastermix* (Qiagen) i vodom bez nukleaza. Uzorci su nanese na ploče *RT² Profiler PCR array*-a i pokrenut je uređaj za RT-qPCR *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad).

3.3.21. Imunofluorescencija

Imunofluorescencija je izvedena na HepG2 stanicama uzgojenim u potpunom mediju na sterilnim stakalcima. Nakon tretmana (opisano prethodno u odjeljcima "Utišavanje gena malom interferirajućom RNA" i "Tretmani stanica"), stanice su isprane u 1X PBS-u i fiksirane u 2% PFA tijekom 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon tri ispiranja 1X PBS-om, stanice su permeabilizirane s 0,15% Triton X-100 20 min na sobnoj temperaturi. Stakalca su isprana 3 puta 1X PBS-om i blokirana u 3% BSA otopljenim u 1X PBS-u 20 min. Inkubirana su 3 sata s primarnim protutijelom DDIT3 razrijeđenim 1:1000 u 3% blokirajućem puferu, a zatim isprana 3 puta 1X PBS-om. Sekundarno protutijelo (AlexaFluor 488 obilježeno, magareće anti mišje IgG (H + L), A21206 Thermo Fisher Scientific) razrijeđeno u blokirajućem puferu, inkubirano je na stakalcima 1 sat u mraku. Nakon 3 ispiranja 1X PBS-om, nanesen je medij za uklapanje (Mowiol) s DAPI bojom (Sigma-Aldrich). Slike su dobivene pomoću mikroskopa Olympus CHX41 (Olympus Corporation).

3.3.22. Rekombinantni proteini

Za ekspresiju plazmida pGEX4T1 koji kodiraju GST-fuzirane humane SPRTN proteine, korišteni je bakterijski soj *E. coli* BL21 (DE3). Ekspimirani proteini su: cijeli SPRTN (1-489 ak., *full length*, GST-FL); samo N-terminalni dio SPRTN-a (1-247 ak., GST-N term); samo C-terminalni dio SPRTN-a (248-489 ak., GST-C term) i sam GST kao kontrola (prazni vektor). Bakterije su transformirane metodom toplinskog šoka i nasadene na petrijeve posude s LB agarom s ampicilinom (100 µg/mL). Nakon transformacije, pojedine kolonije su uzgojene u prekonočnoj kulturi u LB mediju (1% tripton, 0,5% ekstrakt kvasca, 1% NaCl) s dodatkom ampicilina (100 µg/mL) u inkubatoru na 37 °C uz miješanje (220 rpm). Sljedeći dan, bakterije su namnožene u većem volumenu LB medija uz dodatak 2 µM ZnCl₂ i ampicilina (100 µg/mL) na 37 °C 2 sata. Ekspresija proteina je inducirana 1 mM IPTG-om tijekom 4 sata, nakon čega su bakterije centrifugirane na 3000 × g 20 minuta. Bakterijski peleti su lizirani u GST puferu 1 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) s dodatkom 1 mM PMSF, 2 µg/ml lizozima (Sigma), 1% Triton X-100, 5 µg/ml DNaze (Sigma) i 25 mM MgCl₂, 15 minuta na 37 °C te potom 15 minuta na ledu. Nakon liziranja, uzorci su centrifugirani na 12,000 × g 40 minuta. GST-tagirani proteini su pročišćeni pomoću glutation sefarnih kuglica (17-0756-01, Sigma). Uzorci su rotirani 2 sata pri 4 °C, nakon čega su kuglice s vezanim proteinima centrifugirane, 3 puta oprane GST puferom 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2% Triton) i resuspendirane u GST puferu 3 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) s 0,1% NaN₃.

3.3.23. Pull down

HeLa stanice su lizirane u TNE puferu (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40) s dodatkom benzonaze (Sigma), 20 mM MgCl₂, koktelom inhibitora proteaza (Roche) i 1 mM natrijevim ortovanadatom na 37 °C 15 minuta, nakon čega su centrifugirane pri 16,000 × g 15 minuta. Jedan dio uzorka je sačuvan kao stanični lizat (kao kontrola početnog uzorka), dok je preostali dio ravnomjerno podijeljen u 4 tubice koje su sadržavale pročišćene, GST-tagirane SPRTN proteine ili kuglice s praznim vektorom. Volumen lizata je prilagođen do 500 µL s TNE puferom koji je dodatno sadržavao koktel inhibitora proteaza, 1 mM natrij ortovanadat i 5 mM NEM. Uzorci su miješani rotacijom 1 sat na 4 °C, nakon čega su kuglice oprane TNE puferom. Rekombinantni proteini i interaktori su razdvojeni od kuglica zagrijavanjem u 2X Laemmli puferu 5 minuta na 95 °C.

3.3.24. Izolacija proteinskih agregata

Izolacija proteinskih agregata provedena je prema prethodno opisanim postupcima (56,57). HepG2 stanice su lizirane na ledu 5 minuta u puferu za lizu (50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM saharoza, 12,5 mM MgCl₂, 100 mM kalijev acetat, 2 mM PMSF, 1X inhibitori proteaza, 1% Triton-X). Dio lizata je odvojen za ukupnu frakciju proteina i skuhan u 2X Laemmli puferu. Preostali dio lizata centrifugiran je na 20,000 × g 20 minuta na 4 °C. Nakon centrifugiranja i uklanjanja supernatanta, prethodni korak je ponovljen još jednom na peletu. Dobiveni pelet je otopljen u puferu (50 mM HEPES pH 7,5, 1,6 M saharoza, 100 mM kalijev acetat, 1% Triton-X-100, 1 mM PMSF) i ultracentrifugiran na 130,000 × g 1 sat na 4 °C. Supernatant je uklonjen, a pelet je ponovno otopljen i ponovljeno je ultracentrifugiranje. Nakon resuspendiranja u 50 mM HEPES pH 7,5, 1M NaCl, 20 mM MgCl₂, 30 mM Ca²⁺, 100 U/ml DNaze I i 1X inhibitora proteaza, pelet je inkubiran na 37 °C 30 minuta i na 4 °C preko noći. Sljedeći dan, uzorci su ultracentrifugirani na 130,000 × g 1 sata na 4 °C. Ponovljeno je resuspendiranje peleta (u istom puferu kao i prethodni korak, ali bez inkubacije), a zatim ultracentrifugiranje kao što je prethodno opisano. U posljednjem ciklusu resuspendiranja peleta koristile su se inzulinske igle i šprice za otapanje peleta u 50 mM HEPES i 0,5% sarkozil, nakon čega je inkubiran na ledu uz miješanje 1 sat i ultracentrifugiran na 112,000 × g 45 minuta na 4 °C. Ovaj zadnji korak je ponovljen, ali bez inkubacije na ledu. Konačni pelet, koji predstavlja netopivu frakciju proteina, resuspendiran je u Laemmli puferu. Sva centrifugiranja izvedena su na Sorval MTX ultracentrifugi s rotorom S140-AT fiksnog kuta (Thermo Fisher Scientific) i u tubicama od polialomera debljine stjenki 11 × 34 mm (Science Services).

3.3.25. Integritet RNA

Koncentracija i kvaliteta RNA dobivena iz SPRTN-depletiranih i TN/TG tretiranih HepG2 stanica (opisano prethodno u odjeljcima "Utišavanje gena malom interferirajućom RNA" i "Tretmani stanica") određena je pomoću *Agilent RNA 6000 Eukaryotic Nano Kit-a* i *Agilent 2000 Bioanalyzer* instrumenta. Mjerenje je provedeno prema uputama proizvođača.

3.3.26. Masena spektrometrija

Uzorci su pripremljeni obradom HeLa stanica kako je opisano u odjeljku o sinkronizaciji stanica. Uzorci su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom, a digestija gela napravljena je pomoću tripsina ili Arg/C, kako je prethodno opisano (58). Izolirani peptidi su očišćeni pomoću C18 StageTips stupaca (59) i podvrgnuti LC-MS/MS analizi. LC-MS/MS analize izvedene su na Easy-nLC 1200 UHPLC uređaju (Thermo Fisher Scientific) spojenom na QExactive HF Orbitrap maseni spektrometar (Thermo Fisher Scientific), kako je opisano drugdje (60). Peptidi su eluirani tijekom 60-minutnog segmentiranog gradijenta pri brzini protoka od 200 nl/min, pri čemu je odabrano 20 najintenzivnijih vrhova za fragmentaciju s HCD-om.

3.3.27. Analiza rezultata masene spektrometrije

Analiza podataka dobivena masenom spektrometrijom uključuje sljedeće korake: (1) vizualizacija preklapanja ukupnog broja identificiranih proteina između tri faze staničnog ciklusa pomoću Vennovih dijagrama, (2) funkcionalna anotacija identificiranih proteina i vizualizacija njihove distribucije po kategorijama (kružni dijagrami za ukupnu distribuciju i složeni stupčasti grafikoni za odvojene faze staničnog ciklusa) i (3) analiza statističke razlike između tri faze staničnog ciklusa u funkcionalnoj anotaciji identificiranih proteina. Funkcionalna anotacija proteina temelji se na podacima iz studije Kustatscher i sur. (63), gdje su ručno anotirali listu od 7635 proteina kao "Kromatin" i "Ne-kromatin". Proteini kromatina dodatno su kategorizirani u nekoliko podkategorija koje smo grupirali u "Povezani s kromatinom" (remodeliranje i sastavljanje kromatina, struktura i organizacija kromatina), "Povezani s DNA" (modifikacija DNA, popravak DNA, replikacija DNA), "Povezani s histonima" (modifikacija histona, histoni i varijante histona) i "Povezani s transkripcijom" (procesiranje pre-mRNA, procesiranje pre-rRNA, prekrajanje RNA, transkripcijski faktori). Proteini koji se ne svrstavaju u nijednu od ovih kategorija, zajedno s 57 proteina koji nisu pronađeni na popisu Kustatscher i sur., nazvani su "Nekarakterizirani". Trideset i sedam proteina s višestrukim kategorijama anotacija (npr. jedan identifikacijski broj proteina anotiran

kao "Kromatin", dok drugi identifikacijski broj istog proteina pripada kategoriji "Ne-kromatin") isključeni su iz daljnjih izračuna. Kao drugu podkategoriju, dodatno smo analizirali distribuciju tipova histona.

3.3.28. Masena spektrometrija - dostupni podaci

Podaci o svim interaktorima proteina SPRTN preuzeti su iz baze podataka *BioGRID*; datum pristupa 21.11.2022 (64). Popis gena koji su uključeni u odgovor na nepravilno smatanje proteina preuzet je iz baze podataka *Reactome*; identifikator R-HSA-381119, datum pristupa 21.11.2022 (65). Popisi proteina su uspoređeni, a proteini koji se podudaraju su dio prethodno objavljenih rezultata masene spektrometrije (66).

3.3.29. Novi protokol izolacije histona

Protokol je optimiziran za 10^6 HeLa stanica koje pružaju dovoljnu količinu materijala za nizvodne analize (npr. *western blot*). Postupak se može prilagoditi za veće količine stanica. Detaljan protokol:

Prikupljanje stanica:

1. Tripsinizirati stanice iz stanične kulture i sakupiti ih u mikrotubice. Centrifugirati mikrotubice pri $300 \times g$ 5 minuta i odbaciti supernatant.
2. Oprati stanični pelet 1X PBS-om. Ponoviti centrifugiranje pri $300 \times g$ 5 minuta i odbaciti supernatant. Stanični pelet se može zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i postupak se može nastaviti kasnije.

Hipotonično bubrenje stanica:

3. Suplementirati hipotonični pufer (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2) s 1 mM DTT-om, 1X koktelom inhibitora proteaza i 1 mM natrijevim ortovanadatom za inaktivaciju širokog spektra proteaza i fosfataza. DTT i inhibitore dodati neposredno prije uporabe i držati pufer na ledu (18).
4. Re-suspendirati stanični pelet u 200 μl suplementiranog hipotoničkog pufera i inkubirati 30 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ s miješanjem na rotoru. Centrifugirati jezgre pri $10,000 \times g$ na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minuta. Hipotonični pufer omogućuje bubrenje stanica i pucanje stanične membrane.
5. Sakupiti supernatant (to je citoplazmatska frakcija). Nastaviti s metodom *western blot*; zagrijati uzorak u Laemmli puferu ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 minuta) ili spemiti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kasniju analizu.

Liza jezgara:

6. Suplementirati RIPA pufer DNazom (20 U/mL), 5 mM MgCl₂, 1X koktelom inhibitora proteaza i 1 mM natrijevim ortovanadatom. Dodati suplemente neposredno prije uporabe i držati pufer na ledu.
7. Re-suspendirati pelet jezgara u 100 µl suplementiranog RIPA pufera i inkubirati na ledu 15 minuta. RIPA pufer lizira jezgre i otapa proteine.
8. Peletirati fragmente DNA, lipide i stanične ostatke centrifugiranjem pri 12,000 × g na 4 °C 10 minuta. Fragmenti kromatinske DNA neće se otopiti u RIPA puferu.
9. Sakupiti supernatant (to je nukleoplazmatska frakcija). Nastaviti s metodom *western blot*: zagrijati uzorak u Laemmli puferu (95 °C 5 minuta) ili spremati na -20 °C za kasniju analizu.

Purifikacija histona:

10. Re-suspendirati pelet u 100 µl 1X TE pufera. DNA iz kromatinskih fragmenata i vezani histoni će se otopiti u TE puferu, ali lipidi i stanični ostatci će ostati netopivi.
11. Peletirati stanične ostatke centrifugiranjem pri 5,000 × g na 4 °C 10 minuta.
12. Pelet iz ovog koraka je rezidualna frakcija. Nastaviti s metodom *western blot*: zagrijati uzorak u Laemmli puferu (95 °C 5 minuta) ili spremati na -20 °C za kasniju analizu.
13. Prebaciti supernatant u novu mikrotubicu (ovo je histonska frakcija). Nastaviti s metodom *western blot*: zagrijati uzorak u Laemmli puferu (95 °C 5 minuta) ili spremati na -20 °C za kasniju analizu.

3.3.30. Statistički postupci

Kvantifikacija proteinske ekspresije na *western blotu* napravljena je u *Image Lab* programu. Analiza rezultata RT-qPCR-a napravljena je u *CFX Maestro v2.3* i *Excel* programu. Toplinske mape (engl. *heatmaps*) generirane su u programu *R v4.0.0* pomoću paketa *ggplot2 v3.3.5*. Rezultati genske ekspresije panela gena analizirani su u *Qiagen*-ovom online alatu *RT² Profiler PCR Data Analysis*. Uzorci RNA su analizirani u *2100 Expert Software* (Agilent). Podaci masene spektrometrije su obrađeni pomoću MaxQuant softverskog paketa v1.6.7.0. (61) s omogućenom iBAQ analizom. Pretražena je UniProt baza podataka (96.817 unosa) koristeći Andromeda pretraživač (62). Za analizu rezultata masene spektrometrije iz tri faze staničnog ciklusa primijenjen je hi-kvadrat ili Fisherov test pomoću *R v4.0.0* programa (<https://www.R-project.org>).

Ekspерименти који су укључивали три или више skupina s jednom varijablom analizirani su pomoću jednosmjernog (*one-way*) ANOVA testa. Post hoc analiza je izvedena korištenjem Tukeyevog testa za usporedbu između bilo koje dvije skupine. Za eksperimente s više varijabli korišten je dvosmjerni (*two-way*) ANOVA test. Post hoc analiza provedena je pomoću

Dunnettovog ili Sidakovog testa za višestruku usporedbu. Slike komet eseja analizirane su u *ImageJ*-u pomoću *OpenComet* programa. Kometi bez vidljivih jezgara (apoptotske stanice) nisu uključeni u izračun. Statistička analiza komet testa provedena je u GraphPad Prismu koristeći Brown-Forsytheov ANOVA test za asimetrične (ne-Gaussove) podatke. Za višestruke usporedbe korišten je Dunnettov T3 test za višestruku usporedbu. Samo rezultati s izračunatom p vrijednošću manjom od 0,05 ($p < 0,05$) smatrani su značajnima u svim provedenim analizama. Simboli za različite razine značajnosti su sljedeći: nije značajno (ns) za $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ i **** $p < 0,00001$. Svi podaci izmjenjenih varijabli izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Veličina uzorka bila je $n \geq 3$, uključujući biološke i/ili tehničke replikate.

4. REZULTATI

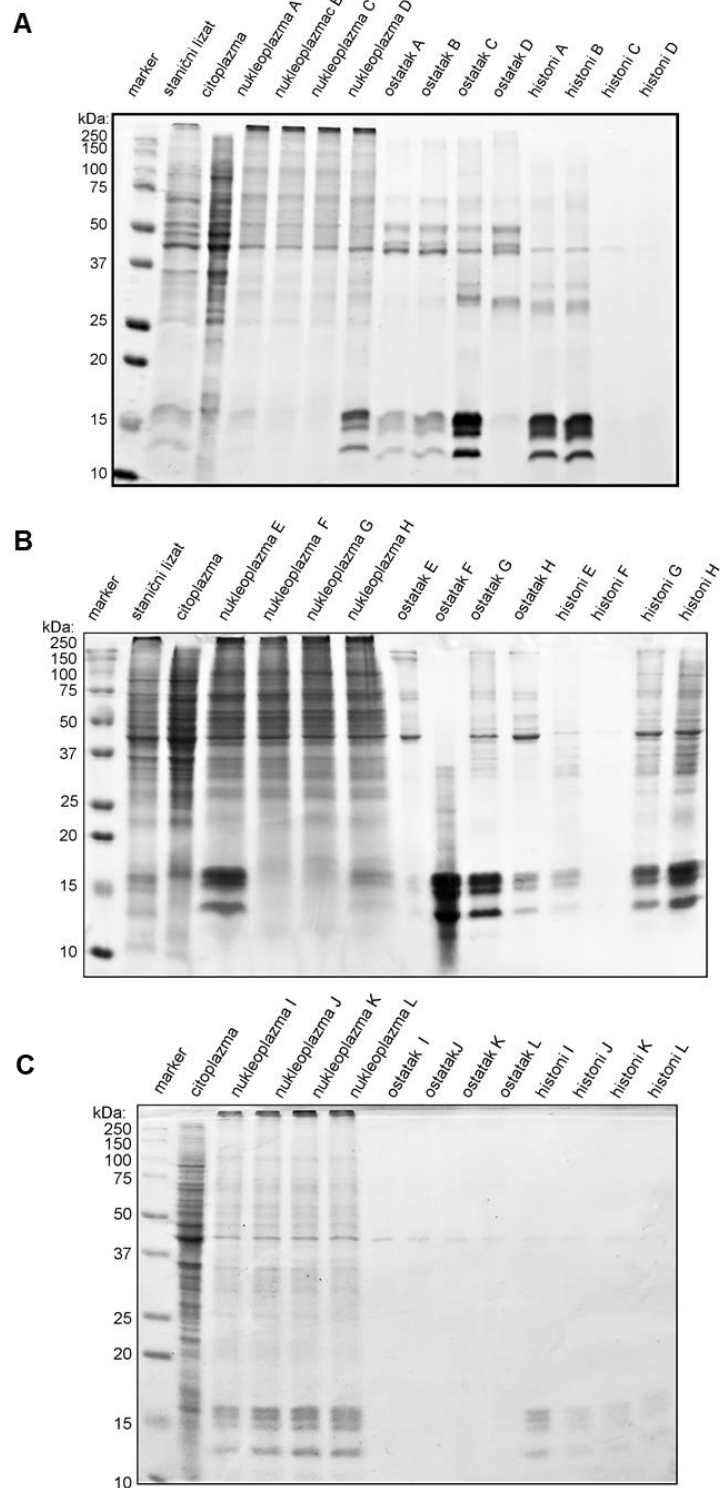
Studija 1

4.1. Testiranje kompozicija pufera i uvjeta protokola

Pri osmišljavanju novog protokola izolacije histona testirano je mnogo različitih uvjeta i različitih kompozicija pufera. Na slici 7A prikazani su rezultati testiranja nekoliko različitih uvjeta na HeLa stanicama: RIPA pufer sa ili bez EDTA, sa ili bez DNaze, te inkubacija na ledu ili na 37 °C 30 minuta. Supernatant prikupljen nakon lize u hipotoničnom puferu (iz koraka 5 odjeljka 3.3.29. *Novi protokol izolacije histona*) podijeljen je u 4 tubice i tretiran RIPA puferima s različitim sastavima ili inkubiran u različitim uvjetima. Nema razlike u učinkovitosti izolacije između RIPA pufera s EDTA (uvjet A) i RIPA pufera bez EDTA (uvjet B). Jednake količine proteina izolirane su u svakoj frakciji s oba pufera (Slika 7A, uvjeti A i B). U uzorku tretiranom RIPA puferom bez DNaze, cijela histonska frakcija ostala je (precipitirala) unutar frakcije „ostatak“, a u histonskoj frakciji nisu detektirani proteini (Slika 7A, uvjet C). Promjena uvjeta inkubacije s 15 minuta na ledu na 30 minuta na 37 °C rezultirala je zadržavanjem svih histona u nukleoplazmatskoj frakciji (Slika 7A, uvjet D). Zagrijavanje RIPA pufera na 37 °C poremetilo je izolaciju histona. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da DNaza treba biti prisutna u RIPA puferu kako bi se DNA i vezani proteini učinkovito odvojili. EDTA, međutim, nije nužan u formulaciji RIPA pufera, a optimalna inkubacija se provodi na ledu.

Različite koncentracije DNaze su također testirane (Slika 7B). Supernatant prikupljen nakon lize u hipotoničnom puferu (iz koraka 5) podijeljen je u 4 tubice i tretiran RIPA puferom s različitim koncentracijama DNaze: 200 U/mL, 20 U/mL, 2 U/mL ili bez DNaze. U uvjetu E, korištenje najviše koncentracije DNaze (200 U/mL) rezultiralo je time da je većina histona zaostala u nukleoplazmatskoj frakciji (Slika 7B, uvjet E), dok je manji dio bio u histonskoj frakciji. Uzorak bez DNaze (uvjet F), korišten kao replika iz prethodnog eksperimenta, potvrdio je da su svi histoni precipitirali u frakciji 'ostatak', ostavljajući histonsku frakciju praznom (Slika 7B, uvjet F). Razrjeđenjem DNaze na 2 U/mL (uvjet G), u usporedbi s uvjetom E, primijećeni su različiti obrasci raspodjele histona. Histoni nisu bili detektirani u nukleoplazmatskoj frakciji, većina je zaostala u frakciji „ostatak“, a manji dio je detektiran u histonskoj frakciji (Slika 7B, uvjet G). Koncentracija DNaze od 20 U/mL (uvjet H) omogućila je najveći prinos histona u histonskoj frakciji (Slika 7B, uvjet H). Na temelju navedenih rezultata, optimalna koncentracija DNaze je između 2 i 200 U/mL. Odabrana je koncentracija od 20 U/mL (uvjet H) za sve daljnje analize.

Da bi se smanjile moguće varijacije u koraku inkubacije uzoraka na ledu testirana su različita vremena inkubacije uzoraka u RIPA puferu na 37 °C: 2, 5, 10 i 30 minuta. Testirani uvjeti nisu smanjili količinu histona u nukleoplazmatskoj frakciji (Slika 7C). Čak je i 2 minute na 37 °C bilo dovoljno da većina histona zaostane u nukleoplazmatskoj frakciji.



Slika 7. Testiranje i optimizacija sastava pufera i uvjeta novog protokola na HeLa stanicama.

- A. Sve frakcije dobivene novim protokolom izolacije histona nakon testiranja četiri različite verzije sastava ili uvjeta RIPA pufera razdvojene su na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojanjem. Oznake A-D odgovaraju (A) RIPA puferu sa svim dodacima (kako je opisano u koraku 6 protokola); (B) RIPA puferu bez EDTA; (C) RIPA puferu bez DNaze; (D) RIPA puferu sa svim dodacima (kako je opisano u koraku 6 protokola) inkubiranim 30 min na 37 °C. Uzorci A, B i C inkubirani su 15 min na ledu.
- B. Sve frakcije dobivene novim protokolom izolacije histona nakon testiranja četiri različite koncentracije DNaze razdvojene su na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojanjem. Oznake E-H odgovaraju (E) koncentraciji DNaze od 200 U/mL; (F) uzorku bez DNaze; (G) koncentraciji DNaze od 2 U/mL; (H) koncentraciji DNaze od 20 U/mL.
- C. Sve frakcije dobivene novim protokolom izolacije histona, nakon testiranja četiri različita vremenska intervala inkubacije u RIPA puferu na 37 °C, razdvojeni su na 15% SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojanjem. Oznake I-L odgovaraju vremenu inkubacije od (I) 2 min; (J) 5 min; (K) 10 min; (L) 30 min.

4.2. Detekcija histona

Koristeći SDS-PAGE elektroforezu, razdvojili smo sve frakcije izolirane prema našem protokolu iz HeLa stanica, osim supernatanta iz koraka ispiranja. CBB bojanjem detektirani su svi proteini u svakoj frakciji i procijenjeno je koja frakcija sadrži histone. Citoplazmatska frakcija na slici 8A sadrži mnogo proteina različitih veličina, sličnog obrasca kao i stanični lizat. Frakcija „ostatak“ sadrži jako malo proteina, ona uglavnom sadržava lipide i ostatke stanica. S druge strane, histonska frakcija obogaćena je proteinima veličine između 14 i 18 kDa, što odgovara veličini histona.

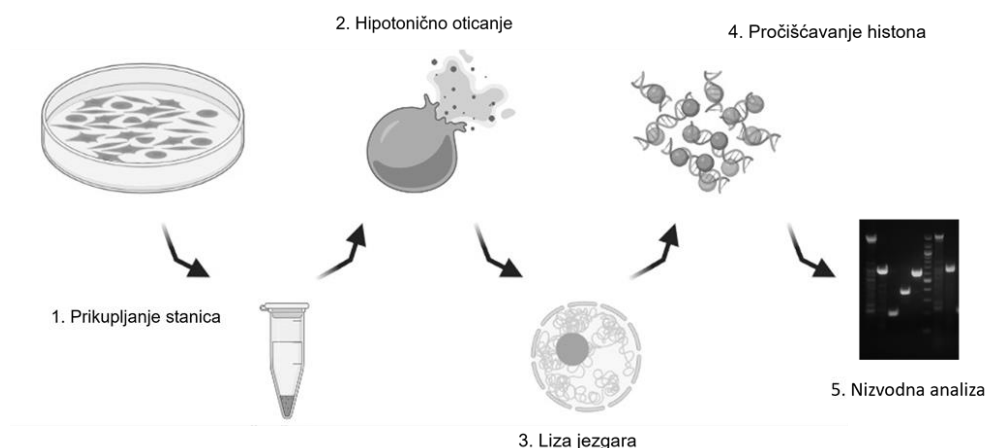
Da bi se utvrdilo koja frakcija sadrži fragmente DNA, sve frakcije su tretirane RNazom A ili RNazom A i proteinazom K, te su zajedno s netretiranim uzorcima analizirane na agaroznom gelu (Slika 8B). Nakon elektroforeze, primijenjeno je bojanje etidij bromidom koji boja nukleinske kiseline. Tretman RNazom A uzrokuje gubitak većine signala prisutnih u netretiranim citoplazmatskim i nukleoplazmatskim frakcijama (Slika 8B, jažice 6-9), što dokazuje da su te frakcije bogate RNA, ali ne i DNA molekulama. I DNA i RNA su prisutne u frakciji „ostatak“, dok histonska frakcija sadrži samo DNA. Detektirana DNA nije migrirala

kroz gel, već je ostala na početku jažice što sugerira da je ta DNA vezana s proteinima koji joj onemogućavaju prolazak kroz agarozni gel. Provođenjem dodatnog tretmana proteinazom K (Slika 8B, jažice 10-13), potvrdilo je da je izolirana DNA u kompleksu s proteinima. Slab DNA signal u citoplazmatskoj frakciji (Slika 8B, jažica 10) vjerojatno dolazi od izvankromosomskih, mitohondrijskih DNA molekula. Većina izolirane DNA nalazi se u histonskoj frakciji.

S obzirom da fragmenti DNA u histonskoj frakciji mogu potencijalno ometati neke nizvodne analize, ispitali smo mogućnost uklanjanja DNA iz ove frakcije (Slika 8C). Uvjeti testirani na histonskim frakcijama su: 1) bez digestije; 2) digestija DNazom; 3) digestija proteinazom K, i 4) digestija DNazom nakon digestije proteinazom K. Rezultati digestija su analizirani na agaroznom gelu i obojeni etidij bromidom. Nakon tretmana DNazom, u uzorku je ostalo nešto rezidualne DNA koja nije migrirala kroz agarozni gel tijekom elektroforeze. Moguće objašnjenje zaostajanja DNA nakon tretmana DNazom je da je ova rezidualna DNA omotana oko nukleosoma i stoga nije dostupna za digestiju. Ako je to slučaj, tretman proteinazom K bi trebao ukloniti sve proteine (histone) u uzorku i omogućiti DNazi da pristupi DNA. Naši rezultati potvrđuju ovu hipotezu - tretman s proteinazom K, a potom DNazom, uklonio je svu DNA iz uzorka. Ovi rezultati sugeriraju da se DNA može samo djelomično ukloniti iz uzoraka histona DNazom (Slika 8C). Analizirali smo netretiranu i DNazom tretiranu histonsku frakciju koristeći SDS-PAGE elektroforezu i CBB bojanje. Nisu primijećene razlike među uzorcima, sugerirajući da DNaza ne mijenja sastav ili kvalitetu izoliranih histona (Slika 8D).

Da bi se potvrdilo da su histoni doista izolirani u histonskoj frakciji, provedena je *western blot* metoda analize (WB) s protutijelima za detekciju humanih histona H2A, H2B, H3 i H4. Rezultati WB analize (Slika 8E), potvrdili su prisutnost histona u histonskoj frakciji. Analizirali smo i druge proteine koji se vezuju za DNA, uključujući proliferirajući stanični nuklearni antigen (PCNA) i VCP (p97) koji se vezuje na mjesta oštećenja DNA. Kao kontrolu, analizirali smo i nekoliko proteina za koje literatura navodi da se ne vežu na DNA niti na histone; Vinkulin, HSPA5 i α -Tubulin. Rezultati su prikazani na slici 8E. Signal za sve navedene proteine detektiran je samo u ukupnom lizatu i citoplazmatskoj frakciji. Izuzetak je aktin, koji je pozitivan u svim frakcijama, ali s vrlo slabim intenzitetom u histonskoj frakciji.

Nova metoda je uspoređena s dvije najčešće korištene metode izolacije histona; izolacija u kiselim uvjetima i izolacija u puferu s visokom koncentracijom soli. Za sva tri protokola, upotrijebljena je jednaka količina početnog materijala (2×10^6 HeLa stanica). Talozi iz sva tri protokola otopljeni su (ili koncentrirani, u slučaju metode visoke koncentracije soli) u istom

G

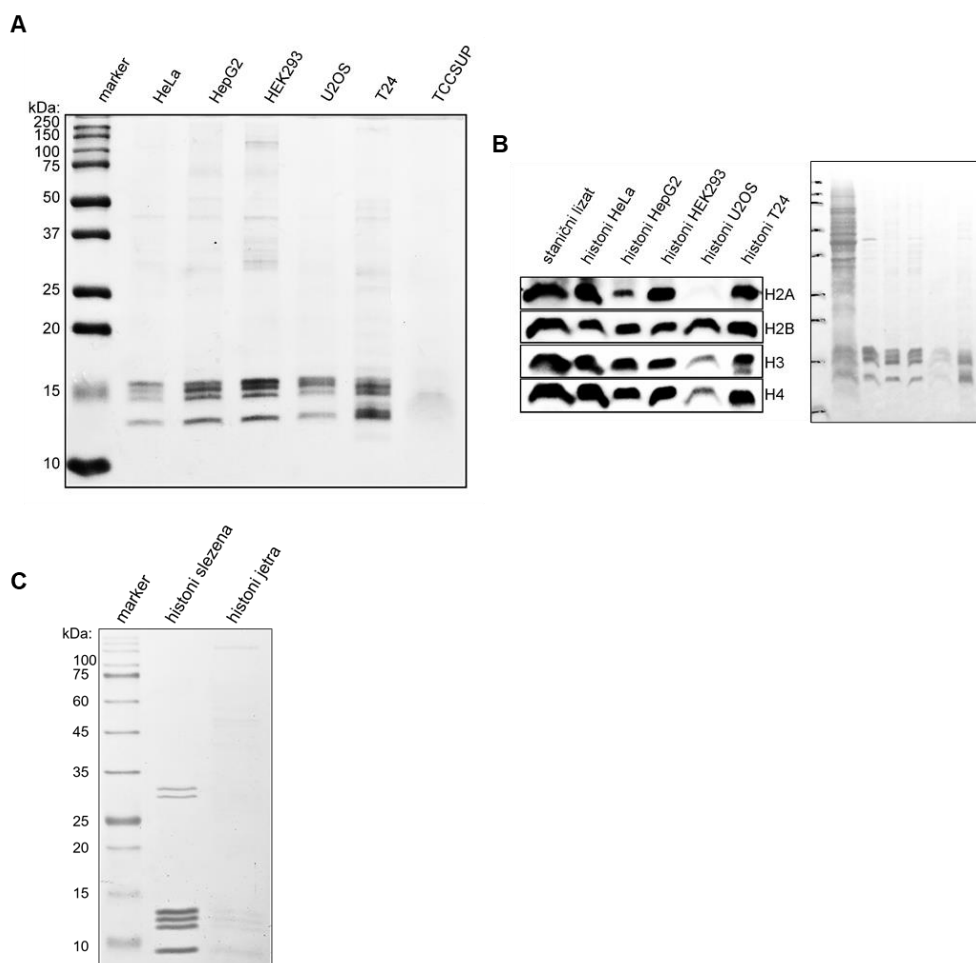
Slika 8. Analiza svih frakcija dobivenih novim protokolom izolacije histona na HeLa stanicama.

- A. Sve frakcije dobivene našim protokolom i ukupni lizat stanica razdvojeni su na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirani CBB bojenjem. Jednake količine svake frakcije, uključujući lizat, stavljeni su na gel.
- B. Netretirane frakcije, tretirane 0,2 mg/ml RNazom ili kombinacijom RNaze i 0,2 mg/ml Proteinaze K (Prot. K) razdvojene su elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu i tretirane etidij bromidom za detekciju fragmenata DNA.
- C. Uzorci netretirane histonske frakcije i histonske frakcije nakon digestije DNazom i/ili proteinazom K razdvojeni na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirani CBB bojenjem.
- D. Usporedba netretirane histonske frakcije s uzorcima tretiranim DNazom, razdvojeni na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirani CBB bojenjem.
- E. *Western blot* analiza svih frakcija i lizata na histone, nehistske kromosomske proteine koji se vežu za DNA i proteine koji nemaju funkciju vezanja na DNA na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu (lijevo). Ponceau S bojenje nitrocelulozne membrane korištene za ovaj *western blot* (desno). HSPA5 je korišten kao negativna kontrola. VIN: Vinkulin; TUB: α -Tubulin; ACT: aktin.
- F. Frakcije histona dobivene trima različitim protokolima za izolaciju histona razdvojene su na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojenjem. Na gel su stavljeni jednake količine frakcija histona dobivenih izolacijom kiselinom i našeg protokola, a četiri puta više frakcije histona dobivene izolacijom velikom koncentracijom soli.
- G. Grafički prikaz glavnih koraka protokola izolacije histona.

4.3. Detekcija histona u različitim staničnim linijama i tkivima

Protokol za izolaciju histona je optimiziran na HeLa stanicama (stanična linija porijeklom iz karcinoma cerviksa). Željeli smo provjeriti je li naš protokol primjenjiv i na druge stanične linije različitog podrijetla: HepG2 (karcinom jetre), HEK293 (embrionalne bubrežne stanice), U2OS (osteosarkom), T24 i TCCSUP (obje linije su razvijene iz karcinoma mokraćnog mjehura). Za sve testirane stanične linije, osim za TCCSUP, protokol je pokazao konzistentnu učinkovitost, kako je prikazano CBB bojanjem (Slika 9A). WB analiza histona provedena je na izoliranim frakcijama histona iz HeLa, HepG2, HEK293, U2OS i T24 stanica (Slika 9B). Za TCCSUP stanice potrebna je dodatna optimizacija protokola.

Kako bi se testirala primjenjivost protokola za izolaciju histona na tkiva, prikupljeno je svježe tkivo slezene i jetre miševa C57BL/6J soja. Tkivo je prvo obrađeno kako bi se dobile stanice. Iz tako pripremljenih stanica, izolirani su histoni novim protokolom bez dodatnih modifikacija (Slika 9C). Izolacija histona iz slezene bila je uspješnija od izolacije iz jetre. Iako svaka vrsta tkiva zahtjeva optimizaciju protokola za dobivanje stanica, nakon izdvajanja stanica moguće je izolirati histone iz tkiva korištenjem našeg novog protokola.



Slika 9. Frakcije histona dobivene novim protokolom na različitim staničnim linijama.

- A. Frakcije histona dobivene iz šest često korištenih staničnih linija, razdvojene na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojenjem.
- B. *Western blot* analiza histona H2A, H2B, H3 i H4 u frakcijama histona iz šest staničnih linija i stanični lizat iz HeLa stanica, razdvojeni na 15% SDS-poliakrilamidnom gelu (lijevo). Ponceau S bojenje nitrocelulozne membrane korištene za ovaj *western blot* (desno).
- C. Frakcije histona dobivene iz mišjeg tkiva slezene i jetre, razdvojene na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu, vizualizirane CBB bojenjem.

4.4. Detekcija histona kroz različite faze staničnog ciklusa

Istražili smo sposobnost novog protokola za izolaciju histona iz stanica u različitim fazama staničnog ciklusa i testirali njegovu osjetljivost u otkrivanju razlika u sastavu i količini histona. HeLa stanice su sinkronizirane kemikalijama za sinkronizaciju u određenim fazama staničnog ciklusa: mimosin (G1 faza) (67), 2,3-DCPE (S faza) (68) i Ro-3306 (G2 faza) (69). Na slici 10A prikazani su rezultati izolacije histona novim protokolom iz navedenih uzoraka gdje je vidljivo kako ukupna količina histona u izoliranim frakcijama raste tijekom napredovanja staničnog ciklusa, od faze G1 do faze G2.

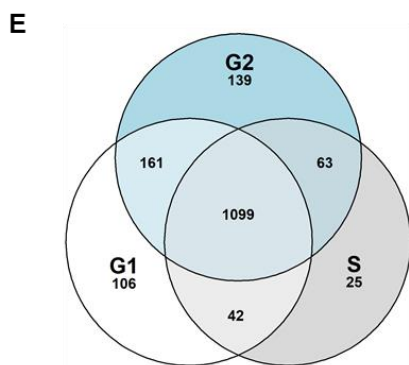
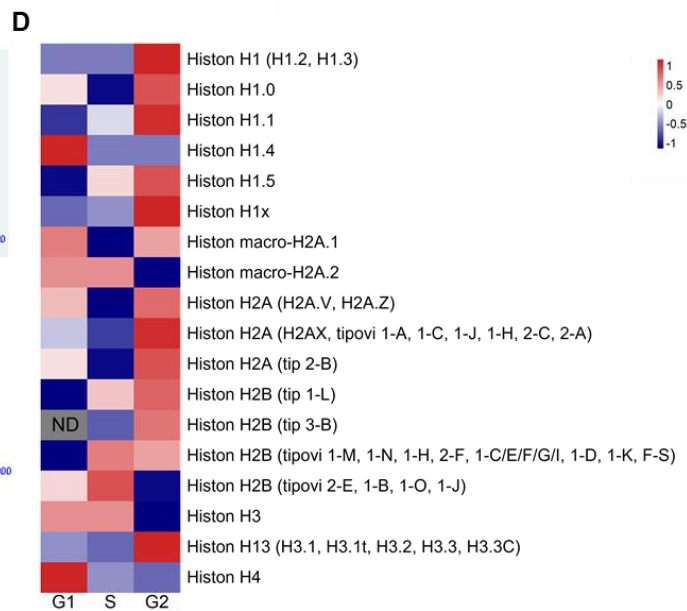
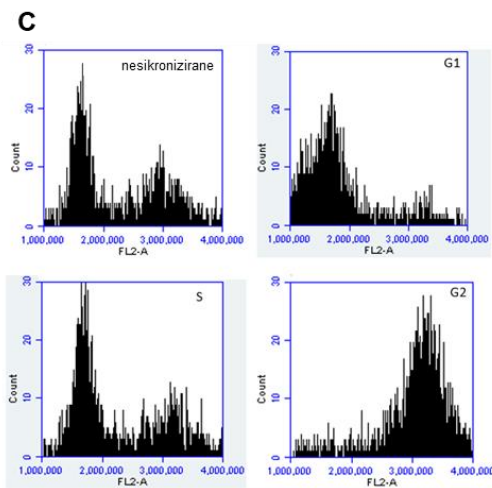
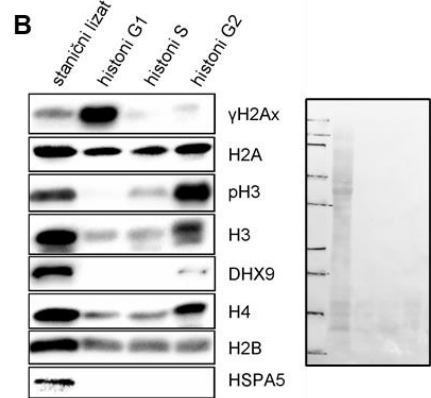
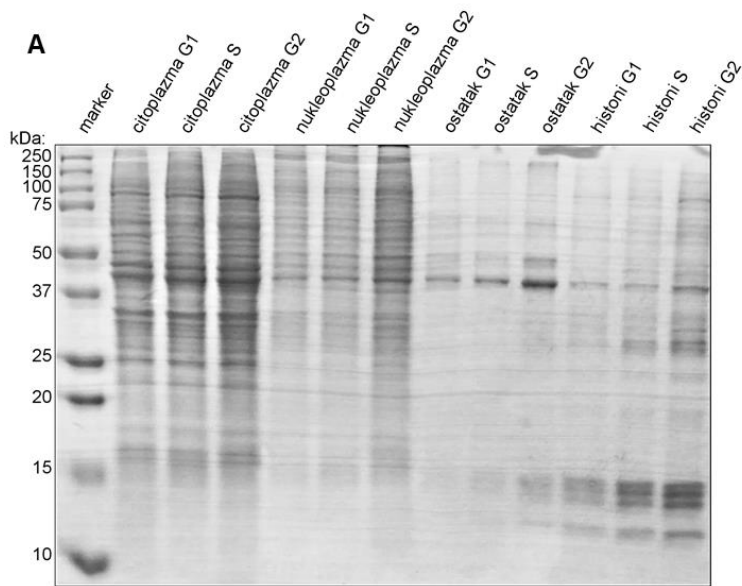
Promjene u količini i posttranslacijskim modifikacijama pojedinih histona između faza G1, S i G2 detektirane su WB metodom. Histonske frakcije iz stanica zaustavljenih u fazama G1, S ili G2 testirane su na γ H2AX, fosfo-H3, H2A, H2B, H3 i H4. Osim histona, testiran je i jedan nehistski protein koji se veže za DNA, DHX9 (Slika 10B).

Učinkovitost sinkronizacije provjerena je bojanjem propidijevim jodidom i protočnom citometrijom na sinkroniziranim i nesinkroniziranim stanicama. Rezultati protočne citometrije, koji pokazuju uspješnu sinkronizaciju stanica u navedenim fazama staničnog ciklusa, prikazani su na slici 10C.

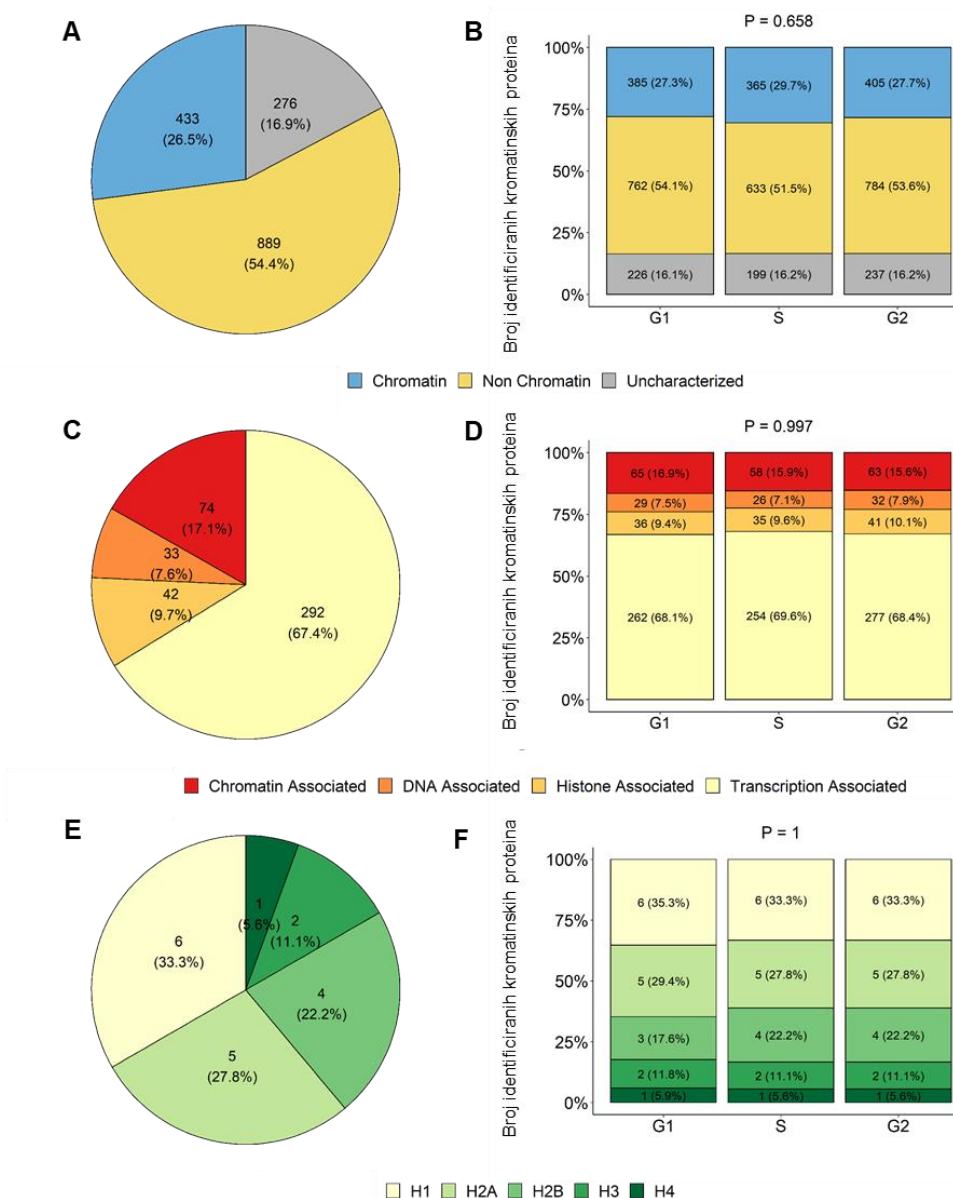
Nadalje, analiza masene spektrometrije (MS) provedena je na frakcijama histona dobivenim iz sinkroniziranih HeLa stanica. Ukupno je identificirano 1686 proteina. Nakon isključivanja duplikata na temelju imena proteina i gena, dalje je analizirano 1635 proteina. Analiza MS rezultata otkrila je razlike u sastavu histona tijekom staničnog ciklusa (Slika 10D). Broj proteina

specifičnih za određene faze, kao i onih koji se preklapaju između dvije faze staničnog ciklusa, prikazan je na slici 10E.

Proteini detektirani MS-om raspodijeljeni su prema njihovoj funkcionalnoj anotaciji. Prema rezultatima 26,5% detektiranih proteina u histonskim frakcijama povezano je s kromatinom, 54,4% nepovezano s kromatinom, a 16,9% detektiranih proteina je nekarakterizirano (Slika 10F). Ovi rezultati potvrđuju specifičnost i osjetljivost izolacije histona novom metodom.



F



Slika 10. Analiza frakcija histona iz HeLa stanica sinkroniziranih u fazama G1, S ili G2 staničnog ciklusa.

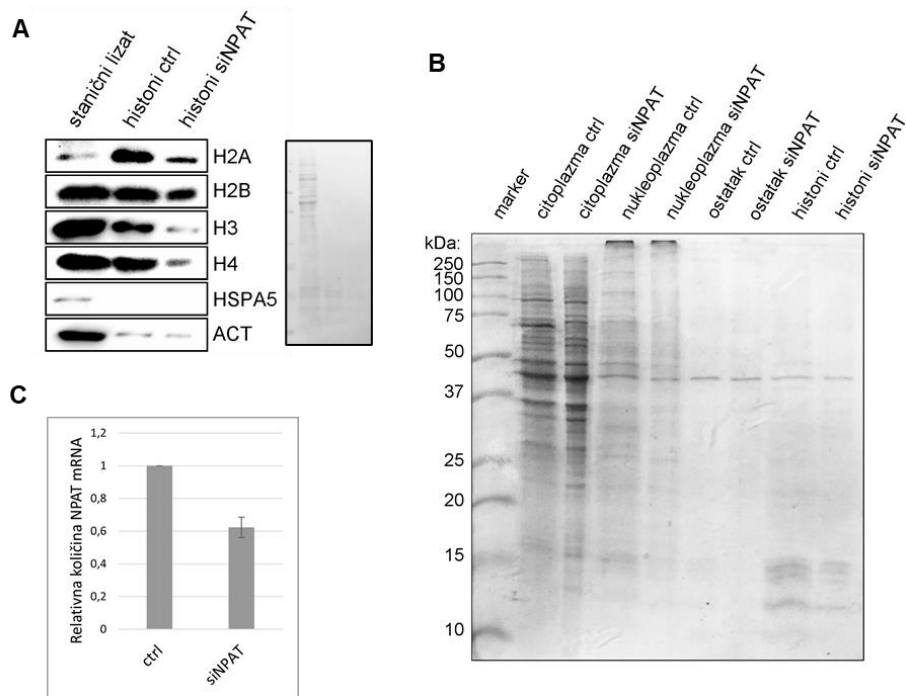
- A. Frakcije dobivene iz sinkroniziranih stanica u fazama G1, S i G2 staničnog ciklusa razdvojene su na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojenjem.
- B. *Western blot* analiza histona i njihovih varijanti u frakcijama histona iz HeLa stanica sinkroniziranih u fazama G1, S ili G2 te lizat iz nesinkroniziranih HeLa stanica na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu. Ponceau S bojenje nitrocelulozne

membrane korištene za ovaj *western blot* desno. HSPA5 je korišten kao negativna kontrola.

- C. Histogrami protočne citometrije. Detekcija količine DNA u sinkroniziranim HeLa stanicama bojenjem propidij jodidom (PI).
- D. Toplinska karta koja prikazuje promjene u ekspresiji različitih varijanti histona kroz faze G1, S i G2 staničnog ciklusa dobivena analizom masene spektrometrije. ND; nije detektiran.
- E. Vennov dijagram koji prikazuje preklapanje detektiranih proteina između faza G1, S i G2 staničnog ciklusa dobivenih analizom masene spektrometrije.
- F. Raspodjela detektiranih proteina prema njihovoj funkcionalnoj anotaciji. Protein se smatra identificiranim ako je detektiran u barem jednom replikatu po fazi staničnog ciklusa. a) Ukupna raspodjela na temelju kategorizacije proteina kao kromatinskih, ne-kromatinskih ili nepoznatih; b) Isto kao i pod a), ali podijeljeno po fazama staničnog ciklusa; c) Podkategorizacija kromatinskih proteina u kromatinski povezane, DNA povezane, histonski povezane i transkripcijski povezane; d) Isto kao i pod c), ali podijeljeno po fazama staničnog ciklusa; e) Raspodjela vrsta histona; f) Isto kao i pod e), ali podijeljeno po fazama staničnog ciklusa. p-vrijednosti u grafikonima B, D i E dobivene su pomoću χ^2 -testa ili Fisherovog testa.

4.5. Utjecaj utišavanja ekspresije NPAT gena na količinu histona

Literatura pokazuje da inhibicija ekspresije *NPAT* gena smanjuje ekspresiju histonskih gena u staničnim kulturama (70). U cilju ispitivanja osjetljivosti našeg novog protokola na detekciju takvih promjena, proveden je eksperiment u kojem su HeLa stanice transfecirane siRNA specifičnom za *NPAT* gen. Transfekcija je rezultirala smanjenjem ekspresije *NPAT*-a za 40%, što je potvrđeno metodom qRT-PCR (Slika 11C). Protokol izolacije histona primijenjen je na netretiranim stanicama i transfeciranim stanicama. Analiza WB-a (Slika 11A) i CBB bojanja (Slika 11B) pokazala je smanjenje razine histona H2A, H2B, H3 i H4 u uzorcima gdje je smanjena ekspresije *NPAT*-a.



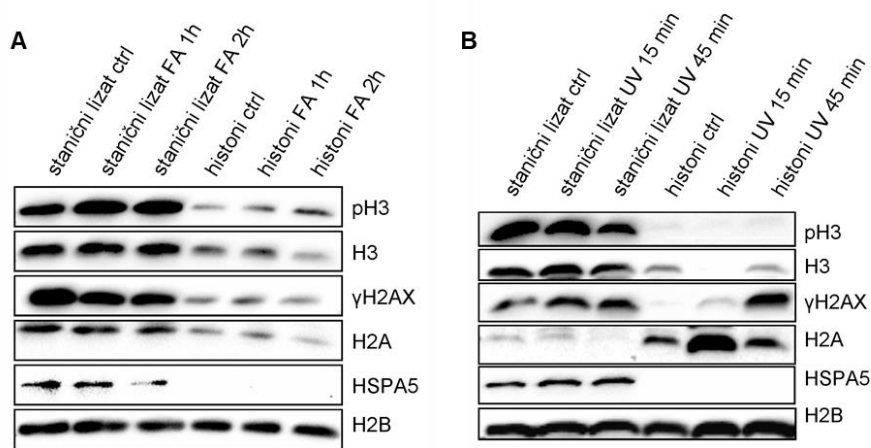
Slika 11. Ekspresija histona u HeLa stanicama sa smanjenom ekspresijom NPAT-a.

- A. *Western blot* analiza histona H2A, H2B, H3 i H4 u frakcijama histona i staničnog lizata iz netretiranih ili NPAT-specifičnom siRNA tretiranih HeLa stanica na 15% SDS-poliakrilamidnom gelu (lijevo). Ponceau S bojenje nitrocelulozne membrane korištene za ovaj *western blot* desno. HSPA5 je korišten kao negativna kontrola. Aktin je korišten kao kontrola količine proteina.
- B. Sve frakcije dobivene našim protokolom izolacije histona iz netretiranih ili NPAT-specifičnom siRNA tretiranih HeLa stanica razdvojene na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu i vizualizirane CBB bojenjem.
- C. Relativna količina NPAT mRNA u netretiranim ili NPAT-specifičnom siRNA tretiranim HeLa stanicama dobivena qRT-PCR metodom s NPAT-specifičnim početnicama.

4.6. Detekcija histona u HeLa stanicama s različitim oštećenjima DNA

Cilj nam je bio istražiti može li novi protokol detektirati promjene u prisutnosti histonskih varijanti uključenih u signalni put oštećenja DNA. HeLa stanice su tretirane formaldehidom (FA) ili izložene UV svjetlu, nakon čega su izolirani histoni. γ H2AX i fosfo-H3 analizirani su WB-om, a rezultati su prikazani na slici 12A za FA i 12B za UV tretman. U FA-tretiranim uzorcima, najveća razlika u obrascu ekspresije u usporedbi s netretiranim uzorcima pokazana

je za fosfo-H3. Njegova razina se povećala s duljinom izlaganja FA. Nakon UV tretmana, najizraženije promjene su primijećene u količini H2A i njegove varijante γ H2AX. Količina proteina γ H2AX raste s duljinom inkubacije nakon tretmana. Osim toga, uočena je i promjena u količini H3 koji se gubi 15 minuta nakon UV tretmana, ali se ponovno pojavljuje nakon 45 minuta. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da je novi protokol prikladan za detekciju različitih varijanti histona koje nastaju kao odgovor na različita oštećenja DNA.



Slika 12. Analiza frakcija histona iz HeLa stanica tretiranih FA ili UV-om.

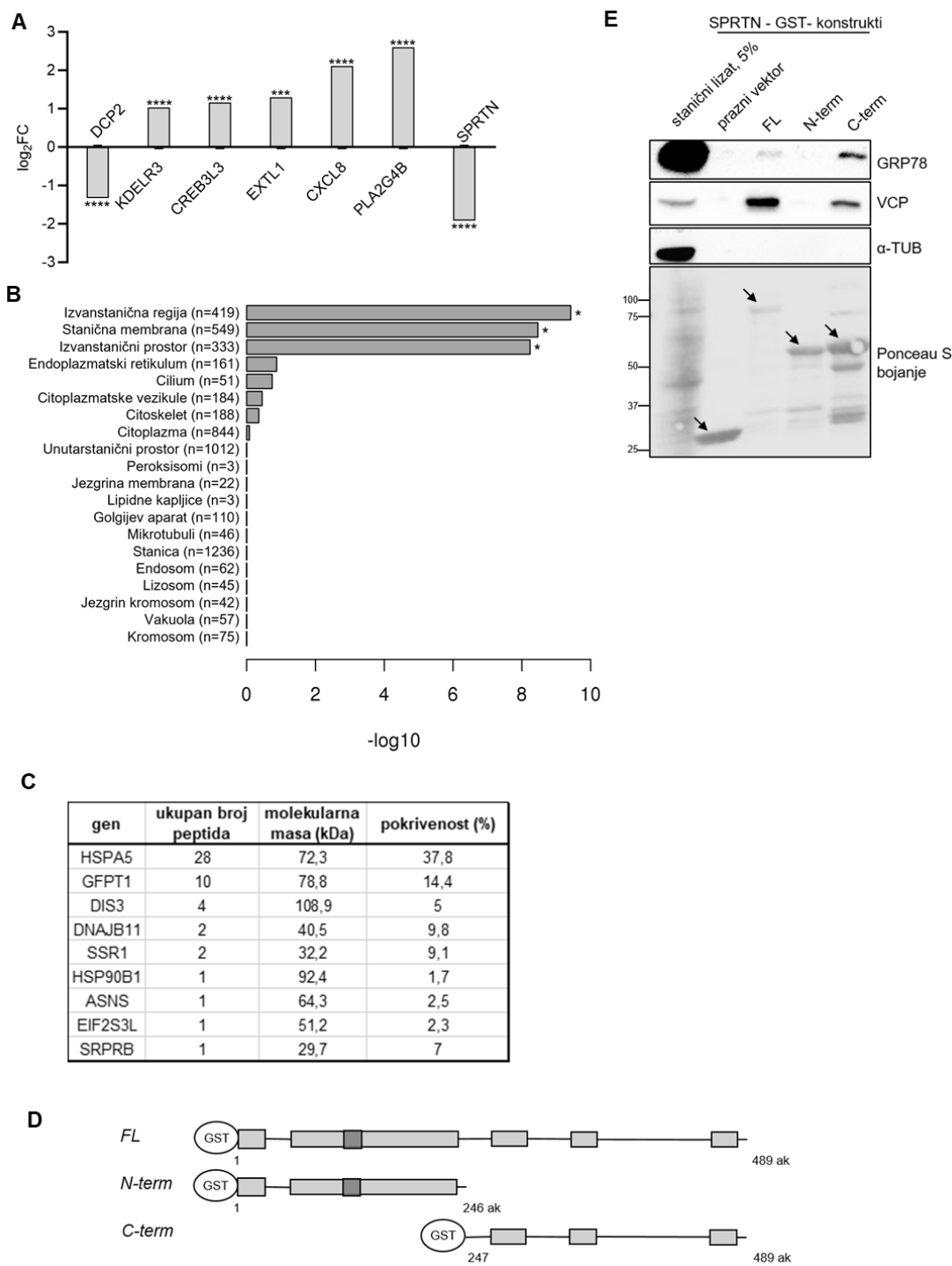
- A. *Western blot* analiza histona i njihovih varijanti u histonskim frakcijama i odgovarajućim staničnim lizatima izoliranim iz HeLa stanica tretiranih 400 mM FA tijekom 1 i 2 sata na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu.
- B. *Western blot* analiza histona i njihovih varijanti u histonskim frakcijama i odgovarajućim staničnim lizatima izoliranim iz HeLa stanica tretiranih UV zračenjem od 15 J/m² s vremenom oporavka od 15 i 45 minuta na 15%-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu. HSPA5 je korišten kao negativna kontrola. H2B je korišten kao kontrola količine proteina.

Studija 2

4.7. SPRTN je uključen u odgovor stanice na stres ER-a

Sekvencirana je ukupna mRNA iz *SPRTN*-depletiranih HepG2 stanica s ciljem proučavanja globalnih promjena u ekspresiji gena uzrokovanih smanjenjem razine *SPRTN*-a. Uočeno je da smanjenje *SPRTN*-a uzrokuje promjene u ekspresiji nekoliko gena povezanih s UPR-om, pretežito povećanje ekspresije tih gena (Slika 13A). Analizom gena na razini ontologije utvrđeno je da se endoplazmatski retikulum (ER) nalazi među prvih pet staničnih komponenti po broju diferencijalno eksprimiranih gena (Slika 13B).

Analizom prethodno objavljenih rezultata tandemne afinitetne purifikacije (pročišćavanje kompleksa prema afinitetu vezanja) *SPRTN*-a i masene spektrometrije (66) identificirano je devet proteina povezanih s UPR-om koji su potencijalni interaktori proteina *SPRTN* (Slika 13C). GRP78 je protein s najvećim brojem detektiranih jedinstvenih peptida, stoga je prvo testirana njegova interakcija s proteinom *SPRTN*. Da bi se istražila moguća interakcija između *SPRTN*-a i GRP78, proveden je *pull-down* s GST-označenim *SPRTN*-om u punoj dužini (*full length*, FL) i GST-označenim N-terminalnim i C-terminalnim segmentima *SPRTN*-a (Slike 13D i 13E). Tubulin (TUB) je korišten kao negativna kontrola, a VCP je korišten kao pozitivna kontrola jer je on otprije poznati interaktor proteina *SPRTN* (72). Utvrđeno je da je GRP78 novi interaktor proteina *SPRTN* i da se interakcija odvija preko C-terminalne polovice *SPRTN*-a. Navedeni početni rezultat usmjerili su daljnji eksperimentalni pristup na istraživanje potencijalne uloge *SPRTN*-a u odgovoru na stres ER-a.



Slika 13. SPRTN je uključen u odgovor stanice na stres ER-a.

- A. Rezultati sekvenciranja RNA za gene uključene u UPR put kod kojih je došlo do promjene ekspresije uslijed utišavanja gena *SPRTN*. Stupci predstavljaju \log_2FC vrijednosti promjene ekspresije između RNA izolirane iz *SPRTN*-deficijentnih

HepG2 stanica, u usporedbi s kontrolnim (netretiranim) stanicama. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

- B. Rezultati sekvenciranja RNA iz SPRTN-depletiranih HepG2 stanica za 20 najznačajnije obogaćenih staničnih komponenti (*cellular compartment*, CC) dobivene analizom obogaćenja gena prema *Gene Ontology* (GO). X-os predstavlja značajnost obogaćenja, a Y-os predstavlja GO pojmove za klasu CC.
- C. Popis proteina uključenih u UPR iz prethodno objavljene analize masene spektrometrije napravljene na proteinu SPRTN.
- D. Shema koja prikazuje rekombinantne SPRTN proteine: cijeli protein (full-length, FL), N-terminus polovica proteina (N-term) i C-terminus polovica proteina (C-term).
- E. *Western blot* analiza pull-down eksperimenata na SPRTN–GST konstruktima; cijeli protein (full-length, FL), N-terminus polovica proteina (N-term) i C-terminus polovica proteina (C-term) SPRTN. VCP je korišten kao pozitivna kontrola, a α -TUB kao negativna kontrola. Ponceau S bojenje je korišteno kao kontrola količine proteinskog uzorka. Strelice označavaju proteinske vrpce koje odgovaraju GST konstruktima.

4.8. Analiza ekspresije gena i razine proteina u HepG2 stanicama tijekom stresa ER-a

Da bismo testirali ima li SPRTN ulogu u odgovoru stanice na stres ER-a, u staničnoj kulturi su testirani uvjeti indukcije stresa ER-a kao i utjecaj utišavanja *SPRTN*-a na stanice koje su pod akutnim stresom ER-a. Korištene su HepG2 stanice jer potječu iz HCC-a, u njima se može inducirati stres ER-a kao i kontrolirati razina proteina SPRTN (povećati transfekcijom plazmidom koji nosi gen *SPRTN* ili smanjiti transfekcijom malom interferirajućom RNA specifičnom za *SPRTN*). Stanice su tretirane različitim koncentracijama tunikamicina (TN) i trajanjima tretmana, kako bi se pronašli optimalni uvjeti za indukciju stresa ER-a; dovoljni da izazovu akutni odgovor stanice u vidu aktivacije UPR-a, ali ne i da izazovu apoptozu stanica. Povećanje koncentracije TN-a i vremena trajanja tretmana dovelo je do povećanja ekspresije GRP78, glavnog markera stresa ER-a, što je pokazano putem WB i RT-qPCR analize (Slike 14A, 14B i 14C). TN koncentracije 1 μ M doveo je do snažnog povećanja ekspresije GRP78, na razini mRNA i na proteinskoj razini, ali nije uzrokovao smrt stanica. Zanimljivo je da je utjecaj tretmana TN-om također vidljiv na proteinu SPRTN, ali u suprotnom smjeru smanjujući

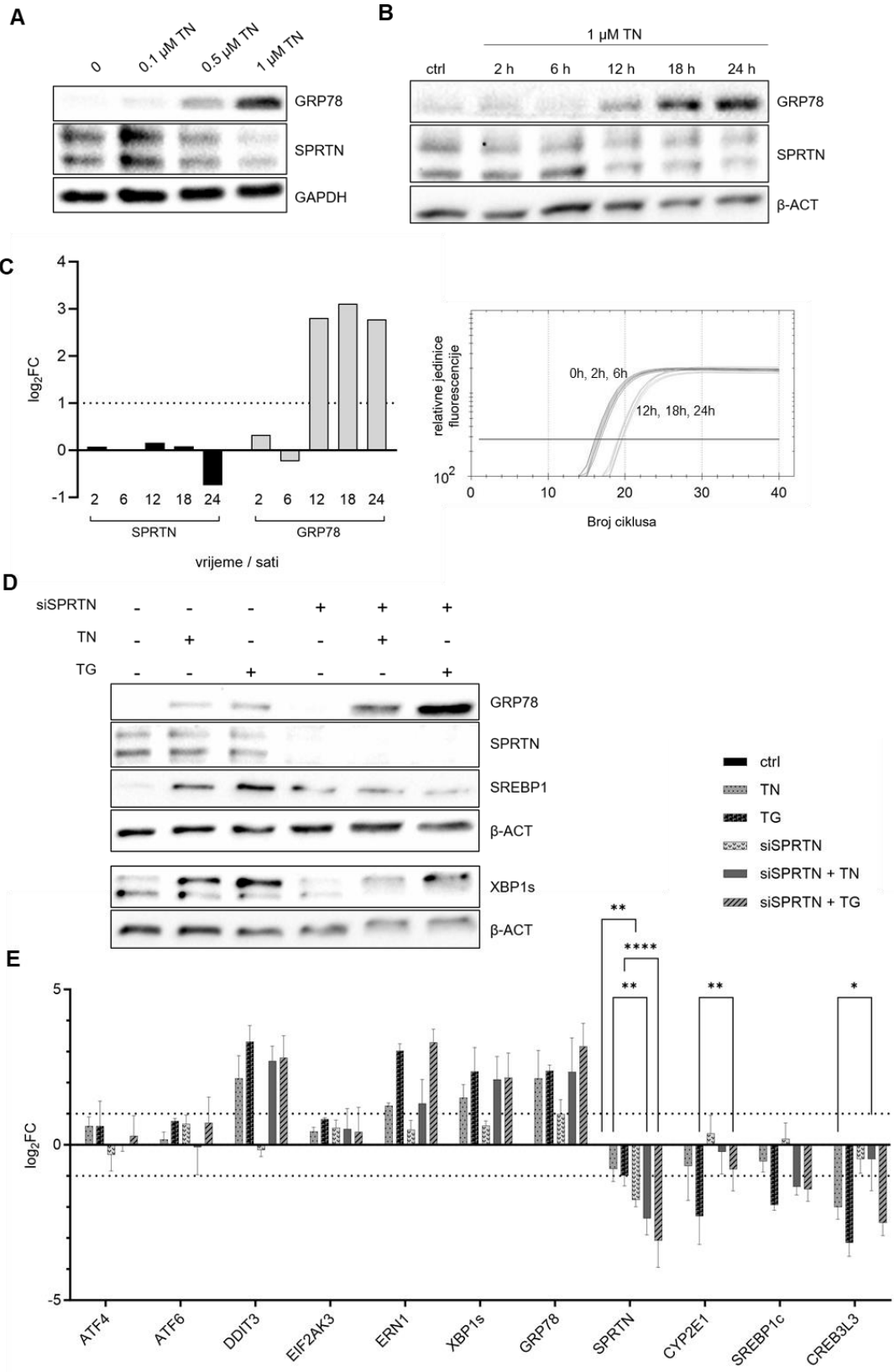
njegovu razinu. To upućuje na inverznu proporcionalnost između *SPRTN*-a i *GRP78* tijekom stresa ER-a. Slične promjene u ekspresiji gena *GRP78* vidljive su i u rezultatima RT-qPCR analize, pri čemu je izražena razlika između 6 i 12 sati trajanja tretmana TN-om (Slika 14C). U vremenskim točkama nakon 12 sati nije dolazilo do dodatnog povećanja ekspresije *GRP78*. Na temelju tih rezultata TN u koncentraciji od 1 μ M, primijenjen 18 sati, odabran je kao optimalan uvjet za indukciju UPR-a u daljnjim eksperimentima.

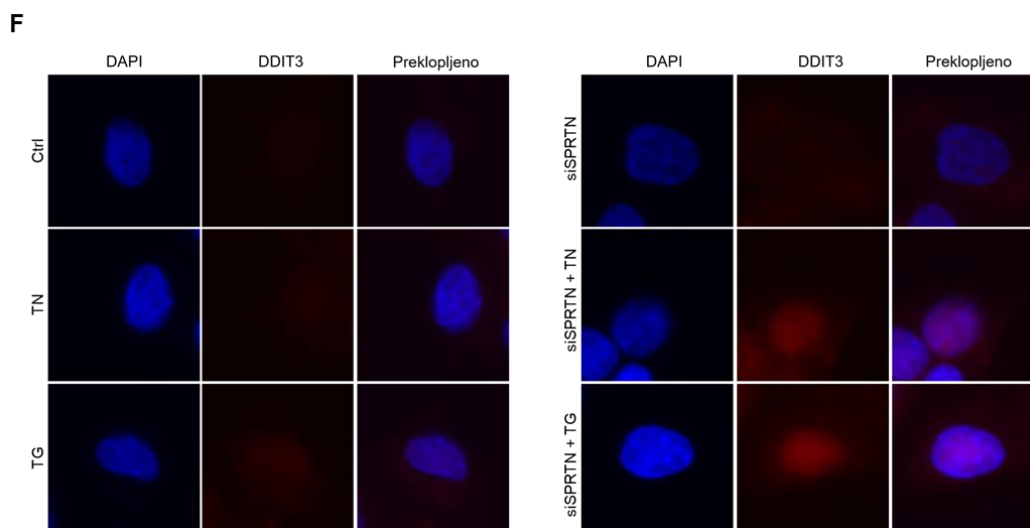
Efikasnost deplecije *SPRTN*-a u HepG2 stanicama potvrđena je WB-om (Slika 14D) i RT-qPCR-om (Slika 14E). Kombinacija tretmana utišavanja gena *SPRTN* i induciranja stresa ER-a, bilo TN-om ili TG-om, utjecala je na *GRP78* mnogo snažnije nego sam tretman induciranja stresa ER-a, tj. uzrokovala je jako povećanje razine proteina *GRP78* (Slika 14D). Navedena kombinacija tretmana utjecala je i na smanjenje razine proteina *SREBP1* i *XBP1s* u usporedbi s pojedinačnim tretmanom samo s TN-om ili TG-om. Pokazano je da uzorci bez indukcije stresa ER-a, ali s depletiranim *SPRTN*-om, pokazuju povećanje razine proteina *SREBP1* i smanjenje razine proteina *XBP1s* (Slika 14D).

RT-qPCR analiza ekspresije odabranih gena provedena je na istim uzorcima kao i WB; HepG2 *SPRTN*-depletirane stanice tretirane TN-om ili TG-om, uz odgovarajuće kontrolne skupine (Slika 14E). Primijećeno je da i sama deplecija *SPRTN*-a rezultira povećanjem ekspresije gena *GRP78* i *XBP1s*, što na proteinskoj razini nije zapaženo (prikazano na slici 14D). Pokazano je ukupno povećanje ekspresije gena UPR-a; *DDIT3*, *ERN1*, *XBP1s* i *GRP78*, dok je ekspresija gena *CREB3L3* smanjena u svim testiranim uvjetima. Uočeno je i da ostali testirani geni metabolizma lipida, *CYP2E1* i *SREBP1*, kao i *SPRTN*, imaju smanjenu ekspresiju tijekom akutnog stresa ER-a (Slika 14E). Ovi rezultati dodatno potvrđuju da stres ER-a dovodi do iscrpljivanja *SPRTN*-a. Dodatno, deplecija *SPRTN*-a uzrokovala je značajan porast ekspresije gena *CYP2E1* u uzorcima tretiranim TG-om.

Kako bi se vizualno prikazao utjecaj *SPRTN*-a na UPR, primijenjena je i metoda imunofluorescencije na stanicama koje su jednako tretirane kao i za prethodno navedene metode WB i RT-qPCR (deplecija *SPRTN* i 1 μ M TN/TG 18h). Za ovu analizu korišten je marker aktivacije UPR-a, *DDIT3* (Slika 14F). U netretiranim stanicama, *DDIT3* nije detektiran. Ekspresija *DDIT3* inducirana je kod oba tretmana, TN-om i TG-om. Međutim, deplecija *SPRTN*-a pojačala je učinak na ekspresiju *DDIT3* u oba tretmana (TN-om i TG-om), čime je dodatno potvrđena uloga *SPRTN*-a u aktivaciji odgovora na stres ER-a.

Sveukupno, rezultati RT-qPCR analize potvrđuju važnost *SPRTN*-a u mehanizmu odgovora na stres ER-a. Deplecija *SPRTN*-a uzrokovala je povećanje ekspresije većine testiranih gena povezanih s UPR-om. Na temelju ovih nalaza, može se zaključiti da stanice s depletiranim *SPRTN*-om pokazuju veću osjetljivost na stres ER-a, što rezultira povećanjem ekspresije gena UPR-a.





Slika 14. Analiza ekspresije gena i razine proteina u HepG2 stanicama tijekom stresa ER-a.

- Western blot* (WB) analiza proteina GRP78 i SPRTN u HepG2 stanicama tretiranim 0,1, 0,5 i 1 μM TN tijekom 18 h. GAPDH je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka. "0" uzorak je tretiran kemikalijom DMSO.
- WB analiza proteina GRP78 i SPRTN u HepG2 stanicama tretiranim 1 μM TN tijekom 2, 6, 12, 18 i 24 h. β -ACT je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka. "ctrl" uzorak je tretiran kemikalijom DMSO.
- Ekspresija gena *GRP78* i *SPRTN* u HepG2 stanicama tretiranim s 1 μM TN tijekom 2, 6, 12, 18 i 24 h, analizirana RT-qPCR metodom, prikazana kao $\log_2\text{FC}$ vrijednosti (lijevo). Graf amplifikacije *GRP78* (desno). Svjetlije linije predstavljaju vremenske točke 0, 2 i 6 sati; tamnije linije predstavljaju vremenske točke 12, 18 i 24 sata.
- WB analiza proteina GRP78, SPRTN, SREBP1 i XBP1 u HepG2 stanicama tretiranim siRNA-SPRTN i/ili TN (1 μM , 18 h) ili TG (1 μM , 18 h). Rezultati su dobiveni iz dvije membrane, β -ACT je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka i detektiran je na obje membrane.
- Ekspresija gena UPR-a i metabolizma lipida u HepG2 stanicama tretiranim siRNA-SPRTN i/ili TN (1 μM , 18 h) ili TG (1 μM , 18 h), analizirana RT-qPCR metodom i prikazana kao $\log_2\text{FC}$ vrijednosti. FC vrijednosti su izračunate koristeći netretirani uzorak (siRNA-ctrl + DMSO) kao kontrolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. P vrijednosti dvosmjernog (two-way) ANOVA testa ukazuju na statističku značajnost: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ i *** $p < 0.0001$. $n = 3$ biološke replike.

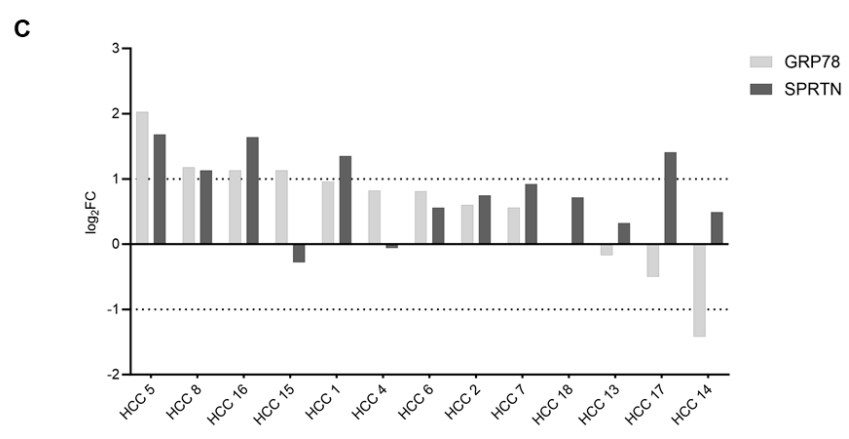
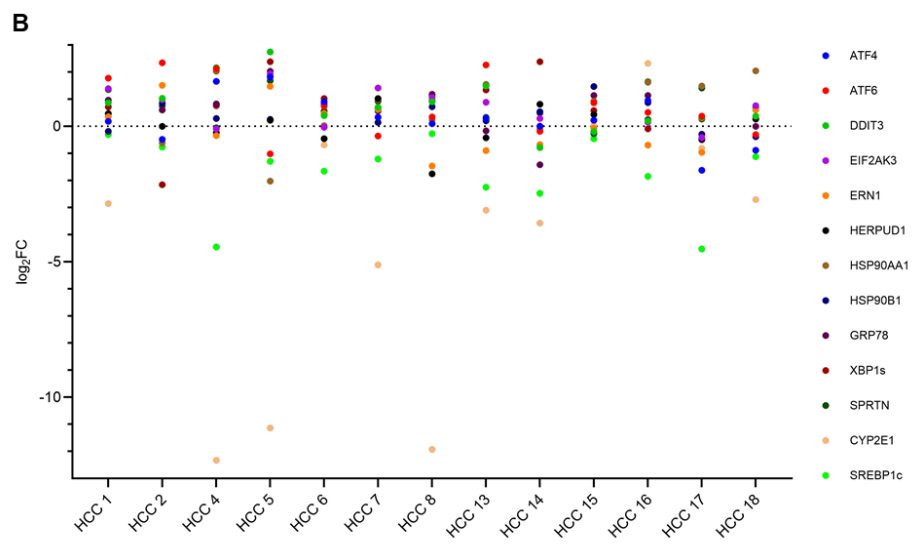
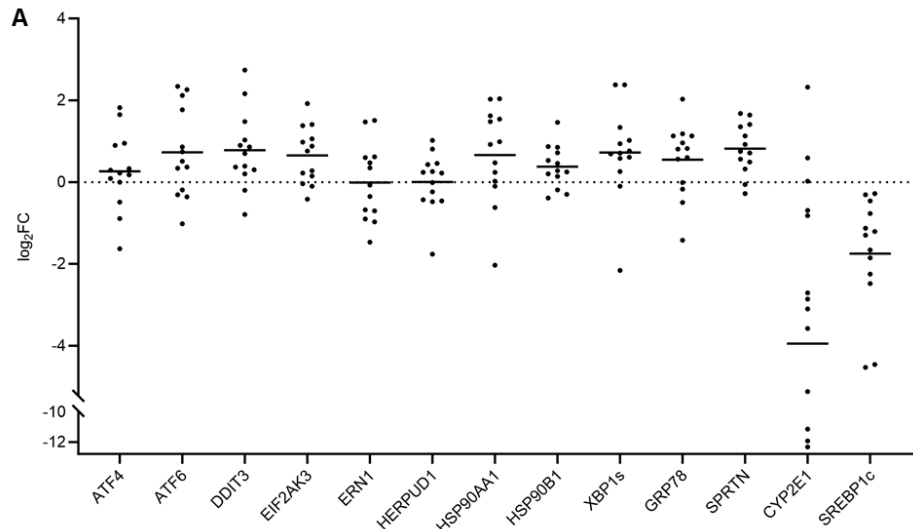
4.9. Promjena ekspresije gena *SPRTN* i gena uključenih u UPR u HCC-u

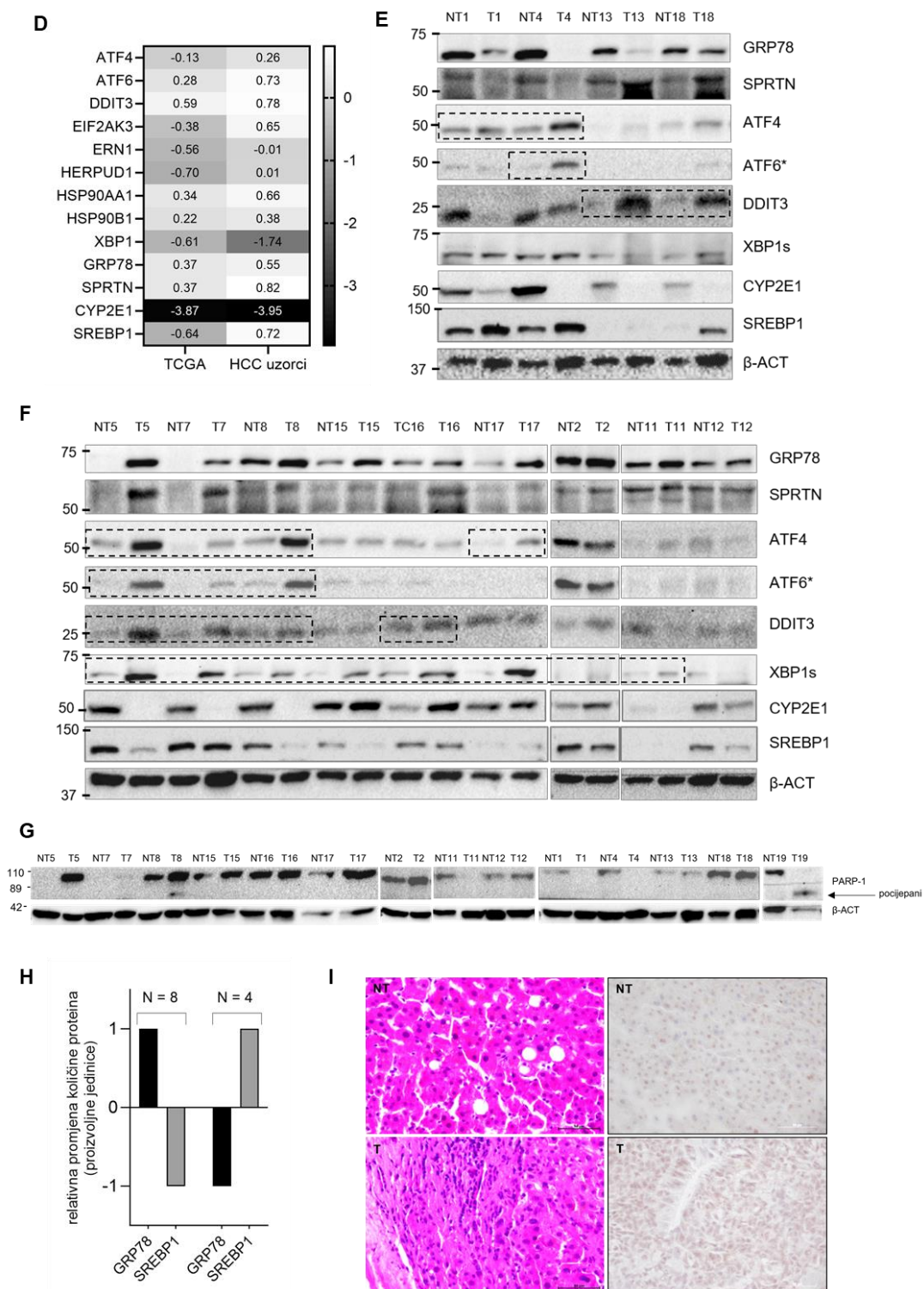
Nakon što smo potvrdili na staničnoj liniji HepG2 da *SPRTN* ima utjecaj na stres ER-a, kao i da stres ER-a utječe na *SPRTN*, željeli smo provjeriti dolazi li do promjena *SPRTN*-a i UPR-a u tkivu jetre oboljelih od hepatocelularnog karcinoma (HCC). U 21 uparenom uzorku HCC-a provedena je analiza ekspresije gena *SPRTN* i gena povezanih s odgovorom na stres ER-a koristeći RT-qPCR metodu. Konačna analiza je provedena na 13 uzoraka HCC-a koji su ispunili kriterije visoke kvalitete izolirane RNA i minimalne varijacije referentnih gena između tumorskog i okolnog netumorskog tkiva. Geni *ATF4*, *ATF6*, *DDIT3*, *EIF2AK3*, *ERN1*, *HERPUD1*, *GRP78*, *HSP90B1* i *XBP1* odabrani su kao predstavnici tri glavne grane signalnog puta UPR-a. S druge strane, *CYP2E1* i *SREBP1c* odabrani su kao ključni faktori u metabolizmu hepatocita. Rezultati RT-qPCR analize pokazali su općenito povećanje ekspresije gena koji kodiraju za UPR proteine, uključujući i *SPRTN*, u uzorcima HCC-a. Dok je genima uključenim u metabolizam hepatocita, *CYP2E1* i *SREBP1*, izrazito smanjena ekspresija (Slika 15A i 15B). Zbog porasta *SPRTN*-a i *GRP78*-a u većini testiranih uzoraka, uspoređena je razina ekspresije u svakom uzorku (Slika 15C). Iako nije uočena značajna korelacija između razine ekspresije *SPRTN*-a i *GRP78*-a, to sugerira da u stanicama HCC-a postoje različiti mehanizmi regulacije ekspresije ova dva gena. S obzirom na mali broj dostupnih uzoraka, rezultati RT-qPCR-a uspoređeni su s objavljenim rezultatima sekvenciranja RNA iz uzoraka HCC-a iz *TCGA* baze podataka (469 uzoraka). Na slici 15D prikazana je usporedba prosječnih vrijednosti za svaki testirani UPR gen između *TCGA* baze podataka i naših uzoraka HCC-a, pri čemu rezultati pokazuju konzistentnost.

Razine proteina povezanih s UPR-om i metabolizmom hepatocita u uzorcima HCC-a analizirane su WB metodom. Testirani su proteini UPR-a (*GRP78*, *ATF4*, *ATF6*, *DDIT3*, *XBP1* i *SPRTN*) i proteini povezani s metabolizmom hepatocita (*SREBP1* i *CYP2E1*). Prilikom analize razine *GRP78*, uzorci su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na pad (Slika 15E) ili rast proteinske razine *GRP78* u tumorskom u usporedbi s okolnim netumorskim tkivom (Slika 15F). U većini uzoraka HCC-a zabilježene su povišene razine *GRP78*, zajedno s povećanim razinama *SPRTN*-a. Također, u većini uzoraka HCC-a zabilježene su i povećane razine jednog ili više proteina UPR-a (*ATF4*, *ATF6*, *DDIT3* ili *XBP1*s). Dio uzoraka HCC-a nije pokazivao povišene razine *GRP78*, no činjenica da je barem jedan od ostalih proteina UPR-a pokazao povećanu ekspresiju upućuje na moguću nekonvencionalnu aktivaciju odgovora na stres ER-a. U uzorcima HCC-a analizirana je i razina cijepanja PARP-1, markera apoptoze. Samo je jedan uzorak bio pozitivan na cijepanje i on je izbačen iz daljnje analize (Slika 15G).

Razine proteina metaboličkih markera CYP2E1 i/ili SREBP1 promijenjene su u većini testiranih uzoraka HCC-a, što ukazuje na poremećenu metaboličku regulaciju i implicira potencijalno uključenje u karcinogenezu. U većini tumorskih uzoraka primijećena je smanjena razina proteina SREBP1. Kada je uspoređena razina proteina GRP78 i SREBP1, pokazalo se da rezultati obrnuto koreliraju, što je vrlo zanimljivo (Slika 15H).

Histološka analiza provedena je da bi se ispitale razlike u strukturi tkiva između tumorskog i okolnog netumorskog tkiva. Bojenje hematoksilin-eozinom otkrilo je da tumorske stanice imaju više jezgara i nejasne granice stanica. Normalna struktura jetre je promijenjena u okolnom tkivu vjerojatno zbog kronične upale i masne degeneracije. Te promjene uključuju smanjenu gustoću jezgri, povećani sadržaj citoplazme u stanici i povećane stanice (Slika 15I lijevi panel). Promjene u staničnoj lokalizaciji i razini proteina SPRTN otkrivene su imunohistokemijskim bojanjem tkiva (Slika 15I desni panel). U tumorskim stanicama, SPRTN je lokaliziran u jezgrama i citoplazmi, s prevladavajućom citoplazmatskom lokalizacijom, dok je u okolnom netumorskom tkivu većinom prisutan u jezgrama. Ovi rezultati ukazuju na moguću translokaciju SPRTN-a iz jezgre u ER kao odgovor na stres ER-a.





Slika 15. U tkivu HCC-a dolazi do promjene ekspresije gena *SPRTN* i gena uključenih u UPR.

A. Rezultati RT-qPCR metode prikazani kao vrijednosti \log_2FC koji prikazuju razinu ekspresije gena *SPRTN*, UPR-a i metabolizma lipida između tumorskog tkiva u

- usporedbi s okolnim netumorskim tkivom. Pojedina točka na grafu predstavlja uzorke jednog pacijenta. Crte označavaju srednju vrijednost \log_2FC za pojedini gen.
- B. Drugi prikaz rezultata navedenih pod A. Svaki stupac na grafu predstavlja uzorke jednog pacijenta, a svaka točka unutar stupca predstavlja jedan gen.
- C. Rezultati navedeni pod A za gene *GRP78* i *SPRTN* iz svih uzorka HCC-a, poredani prema smanjenju vrijednosti \log_2FC za *GRP78*.
- D. Toplinska karta koja prikazuje usporedbu ekspresije gena UPR-a između uzoraka HCC-a i *TCGA* baze podataka. Prosječne \log_2FC vrijednosti su uspoređene između rezultata RT-qPCR i *TCGA* baze podataka. Svjetlije nijanse sugeriraju povećanje, a tamnije smanjenje ekspresije prikazanih gena.
- E. *Western blot* (WB) analiza UPR proteina i proteina metabolizma lipida u uzorcima HCC-a sa smanjenom razinom *GRP78* u tumorskom tkivu u usporedbi s okolnim netumorskim tkivom. NT - uzorci iz okolnog netumorskog tkiva, T - uzorci iz tumorskog tkiva. Brojevi nakon NT ili T označavaju pojedine uzorke HCC-a, kako je opisano u Tablici 1. Pravokutnici označavaju porast odgovarajućeg proteina u tumorskom tkivu. β -AKTIN je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka. * označava pocijepani fragment ATF6.
- F. WB analiza UPR proteina i proteina metabolizma lipida u uzorcima HCC-a s povećanom razinom *GRP78* u tumorskom tkivu u usporedbi s okolnim netumorskim tkivom. NT - uzorci iz okolnog netumorskog tkiva, T - uzorci iz tumorskog tkiva. Brojevi nakon NT ili T označavaju pojedine uzorke HCC-a, kako je opisano u Tablici 1. Pravokutnici označavaju porast odgovarajućeg proteina u tumorskom tkivu. β -AKTIN je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka. * označava pocijepani fragment ATF6. Slika je sastavljena od tri nitrocelulozne membrane.
- G. WB analiza PARP-1 proteina u uzorcima HCC-a. NT - uzorci iz okolnog netumorskog tkiva, T - uzorci iz tumorskog tkiva. Strelica označava pocijepani fragment PARP-1. β -AKTIN je korišten kao kontrola količine proteinskog uzorka.
- H. Grafički prikaz odnosa između razine proteina *GRP78* i *SREBP1* u uzorcima HCC-a, analizirane WB-om, na temelju podataka prikazanih na 15E i 15F.
- I. Histološko bojanje HE bojom (lijevo) i imunohistokemijsko bojanje *SPRTN* protutijelom (desno) tumorskog (T) i okolnog netumorskog tkiva (NT) reprezentativnog uzorka.

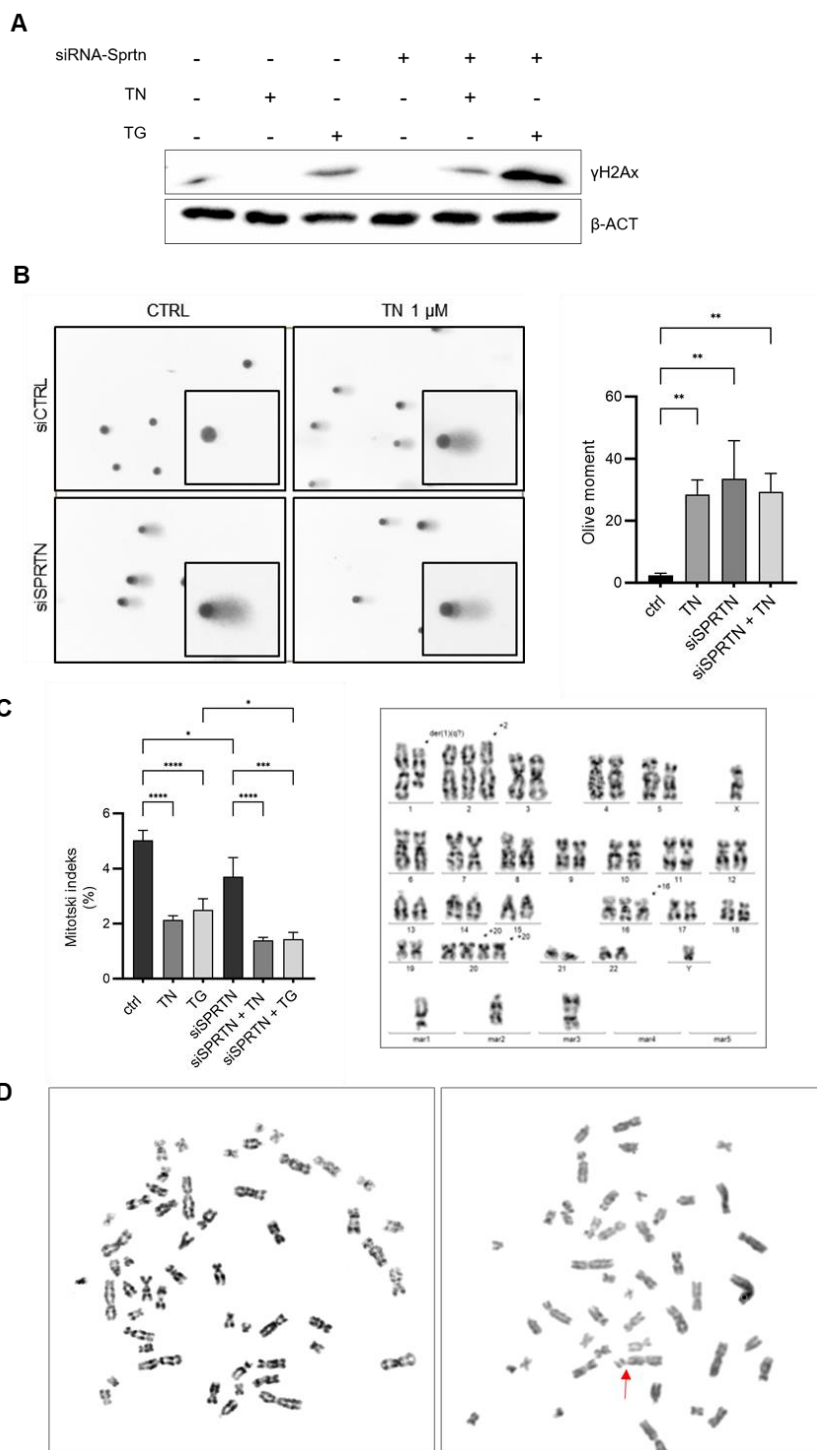
4.10. Uloga SPRTN-a u prevenciji oštećenja DNA tijekom stresa ER-a

Provedena je WB analiza proteina γ H2AX na SPRTN-depletiranim HepG2 stanicama tretiranim 1 μ M TN-om ili TG-om, s ciljem procjene intenziteta aktivacije puta oštećenja DNA tijekom indukcije stresa ER-a. γ H2AX je fosforilirani histon H2AX koji služi kao rani stanični marker jednolančanih i dvolančanih lomova DNA (75). Rezultati, prikazani na slici 16A, pokazuju da stres ER-a uzrokuje aktivaciju γ H2AX te da je efekt izraženiji ako je u stanicama istovremeno utišan *SPRTN*.

Kako bi se dodatno razumio utjecaj stresa ER-a i smanjenja SPRTN-a na integritet DNA, izveden je komet test. Tretman 1 μ M TN-om 24 sata primijenjen je na SPRTN-depletirane HeLa stanice, a analiza je provedena zajedno s odgovarajućim kontrolama. Upotrebom softvera *OpenComet*, izračunat je *Olive moment*, mjera oštećenja DNA u pojedinim stanicama (76). Iz prikazanih rezultata na slici 16B, može se zaključiti da stres ER-a uzrokuje značajno oštećenje DNA, što je u skladu s rezultatima prikazanim na slici 16A. Stres ER-a uzrokuje sličan stupanj oštećenja DNA kao i samo utišavanje gena *SPRTN*. Kombinacija utišavanja i stresa ER-a nije uzrokovala veće oštećenje od ovih tretmana pojedinačno. Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da oštećenja DNA nastala tijekom ER stresa proizlaze iz putova za popravak DNA koji ovise o *SPRTN*-u.

S ciljem ispitivanja utjecaja SPRTN-a na kariotipske promjene i stanični ciklus, provedena je kariotipizacija SPRTN-depletiranih i TN/TG tretiranih HepG2 stanica. Primjer kariograma HepG2 stanica prikazan je na slici 16C, desni panel. Analizom mitotskog indeksa ustanovljeno je da je udio stanica u mitozu smanjen u stanicama s utišanim *SPRTN*-om, kao i nakon pojedinačnih tretmana TN ili TG. Najizraženiji efekt je zabilježen kada je smanjenje *SPRTN*-a kombinirano s indukcijom stresa ER-a, što je rezultiralo najvećim smanjenjem broja stanica u mitozu (Slika 16C, lijevi panel).

Da bi se provjerilo javljaju li se kromatidni lomovi uslijed utišavanja gena *SPRTN*, analizirani su metafazni kromosomi, a primjer je prikazan na slici 16D. Broj lomova je mal i bez značajnih razlika među uzorcima. Ovi rezultati sugeriraju da je sposobnost stanica da odgovore na stres ER-a znatno smanjena ukoliko u stanicama nedostaje SPRTN proteaza.



Slika 16. SPRTN je bitan u prevenciji oštećenja DNA tijekom stresa ER-a.

- A. *Western blot* analiza γ H2AX proteina u HepG2 stanicama tretiranim siRNA-SPRTN i/ili TN (1 μ M, 18 h) ili TG (1 μ M, 18 h).
- B. Reprezentativni kometi dobiveni alkalnim komet-testom na SPRTN-depletiranim i/ili TN (1 μ M, 24 h) ili TG (1 μ M, 24 h) tretiranim HeLa stanicama (lijevo). Statistička analiza alkalnog komet-testa pomoću Olive momenta (desno). Rezultati

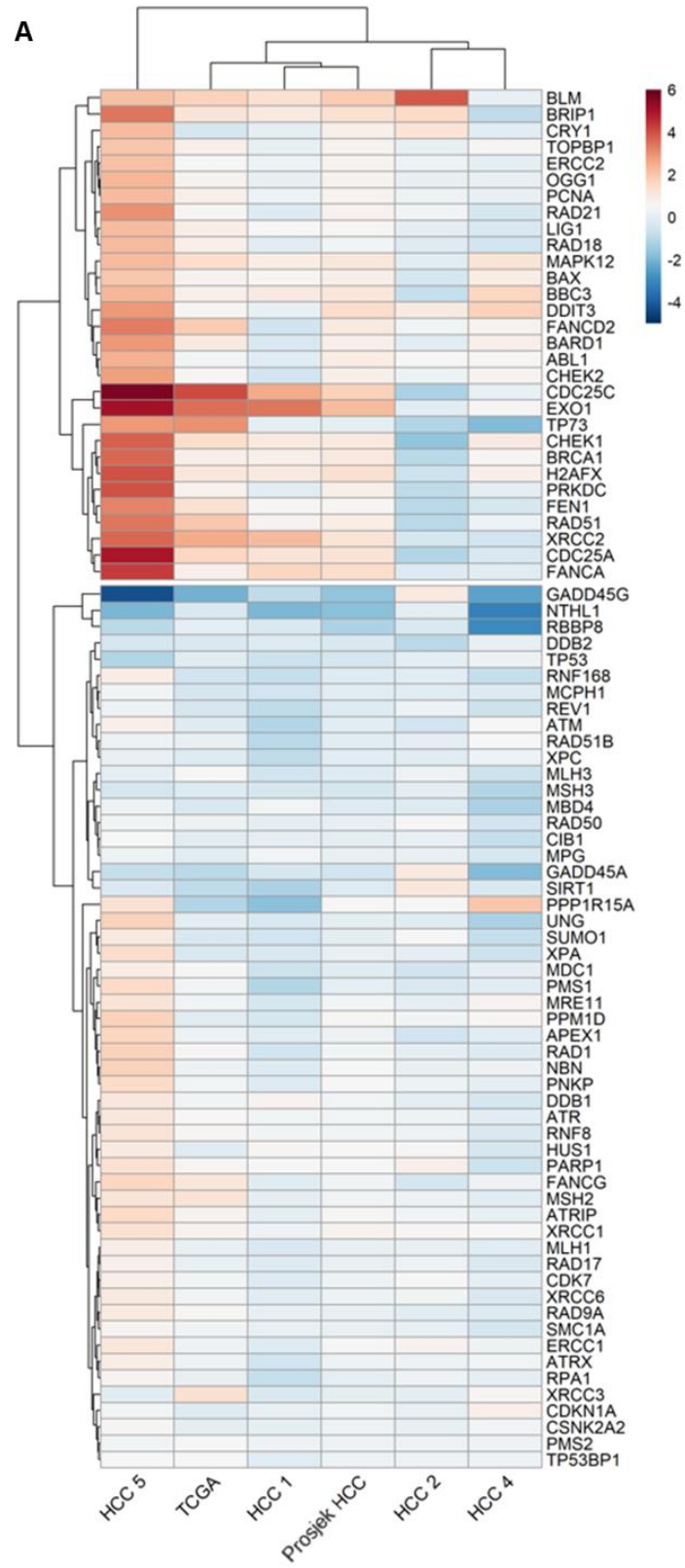
- su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. P vrijednosti jednosmjernog (one-way) ANOVA testa ukazuju na statističku značajnost: ** $p < 0.001$. $n = 3$ biološke replike.
- C. Statistička analiza mitotskog indeksa SPRTN depletiranih i/ili TN (0.2 μ M, 24 h) ili TG (0.2 nM, 24 h) tretiranih HepG2 stanica (lijevo). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. P vrijednosti jednosmjernog (one-way) ANOVA testa ukazuju na statističku značajnost: * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, i **** $p < 0.00001$. $n = 3$ biološke replike. Reprezentativni kariogram HepG2 stanica (desno).
- D. Reprezentativna slika analize kromatinskih lomova u netretiranim (lijevo) i SPRTN-depletiranih HepG2 stanica (desno). Strelica označava lom kromosoma.

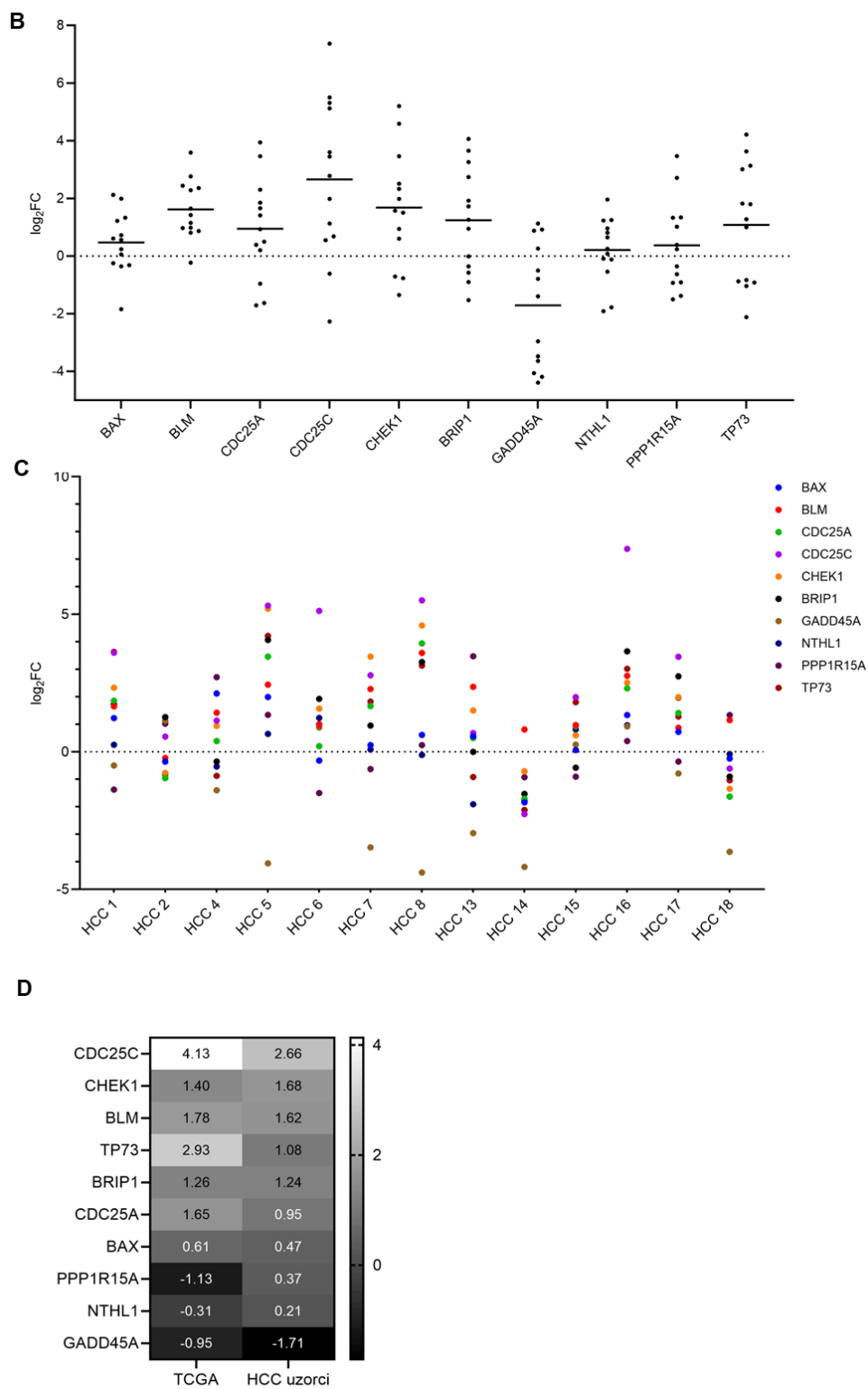
4.11. Promjene gena uključenih u signalizaciju oštećenja DNA u HCC-u

Primarna funkcija koja se pripisuje proteinu SPRTN je uloga u popravku oštećenja DNA, tj. DPC-ova (77,78). U našim prethodnim pokusima pokazali smo utjecaj SPRTN-a na odgovor u stresu ER-a, stoga smo željeli u uzorcima HCC-a provjeriti ekspresiju i drugih gena uključenih u signalizaciju oštećenja i popravka DNA.

Kao pilot studiju, testirali smo promjene ekspresije različitih gena koji kodiraju proteine za popravak DNA u četiri nasumično odabrana HCC uzorka, između tumorskog i okolnog netumorskog tkiva. Upotrebljen je panel s 84 gena koji su uključeni u signalizaciju oštećenja DNA (*RT² Profiler PCR Array*). Uočeno je da je ekspresija gena u jednom uzorku (HCC 5) značajno drugačija od ostalih uzoraka. Uz rezultate 4 uzorka HCC-a, na toplinskoj mapi prikazan je i prosjek rezultata RNA sekvenciranja HCC-a iz TCGA baze podataka (Slika 17A). Prosjek rezultata četiri analizirana HCC uzorka uspoređen je s rezultatima RNA sekvenciranja HCC-a dostupnim u TCGA bazi podataka. Kada su uspoređeni prosječni rezultati \log_2FC vrijednosti za sve uzorke, utvrđeno je da je ekspresija svih testiranih gena (osim *GADD45A*) porasla u HCC-u, što je u skladu s TCGA bazom podataka (Slika 17D). Ekspresija većine gena koji su dio popravka DNA-a ostala je nepromijenjena u tumorskim tkivima u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Geni s najnižom ekspresijom su *GADD45G*, *NTHL1*, *RBBP8* i *GADD45A*, dok su *BLM*, *CDC25A*, *EXO1* i *CDC25C* geni s najvećom ekspresijom. Uzroci HCC-a su biološki heterogeni i za ovu analizu je korišten jako mali broj uzoraka. Iz tog razloga, za daljnju analizu odabrano je 8 od ukupno 84 gena koji su pokazali značajne promjene u barem tri od četiri testirana uzorka HCC-a. Odabrani su geni *BLM*, *BRIP1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CHEK1*, *NTHL1*, *PPP1R15A* i *TP73*. Dodatno su uključena u analizu dva proapoptotička gena,

BAX i *GADD45A*, zbog njihove uloge u UPR-u (79,80). Ekspresija ovih 10 gena testirana je u svim parovima uzoraka HCC-a, a rezultati su prikazani na slikama 17B i 17C. Unatoč očekivanim biološkim varijacijama među uzorcima, većina testiranih gena pokazala je generalno povećanje ekspresije. *CDC25C*, koji pokazuje najveći porast ekspresije u tumorskom u odnosu na okolno netumorsko tkivo, prethodno je opisan kao biomarker HCC-a (81). Drugi najveći porast ekspresije zabilježen je kod gena *CHEK1*. Najveće smanjenje ekspresije je vidljivo kod *GADD45A*. Ovi rezultati sugeriraju da se ekspresije određenih gena za popravak DNA mijenjaju u uzorcima HCC-a.





Slika 17. Promjene gena uključenih u signalizaciju oštećenja DNA u uzorcima HCC-a.

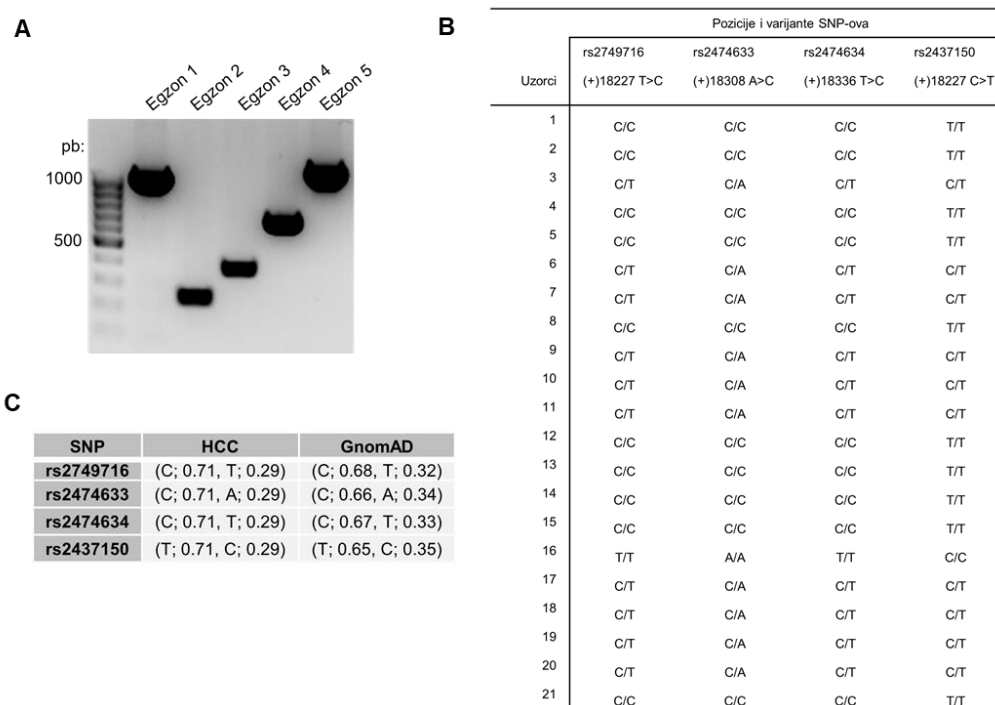
- A. Toplinska mapa koja prikazuje ekspresiju 84 gena uključenih u signalni put oštećenja DNA u 4 uzorka HCC-a i uzoraka dobivenih iz TCGA baze podataka. Ekspresija gena je testirana na pločama s ugrađenim početnicama (*RT² Profiler PCR*)

Array). Prosječne \log_2FC vrijednosti iz RT-qPCR analize su uspoređene s podacima iz TCGA baze podataka.

- B. Razina ekspresije gena signalnog puta oštećenja DNA analizirana RT-qPCR metodom na uzorcima HCC-a, usporedba između tumorskog i okolnog netumorskog tkiva. Svaki simbol točke predstavlja jedan uzorak HCC-a. Crte označavaju srednju vrijednost \log_2FC za svaki gen.
- C. Drugačiji prikaz rezultata navedenih pod B. Svaki stupac na grafu predstavlja jednog pacijenta, a svaka točka unutar stupca predstavlja jedan gen.
- D. Toplinska karta koja prikazuje usporedbu ekspresije gena signalnog puta oštećenja DNA između uzoraka HCC-a i uzoraka iz TCGA baze podataka. Prosječne \log_2FC vrijednosti su uspoređene između rezultata RT-qPCR analize i TCGA baze podataka. Svjetlije nijanse sugeriraju povećanje, a tamnije smanjenje ekspresije prikazanih gena.

4.12. Sekvenciranje gena SPRTN u uzorcima HCC-a

Uzorci tkiva jetre prikupljeni su od pacijenata s HCC-om kako bi se istražila potencijalna uloga stresa ER-a u razvoju bolesti i njegova povezanost sa SPRTN-om. Na 21 uzorku HCC-a i pripadajućem okolnom netumorskom tkivu provedeno je sekvenciranje egzona *SPRTN*. Napravljena je PCR amplifikacija egzona i susjednih intronskih dijelova s dizajniranim početnicama za pojedini egzon (Slika 18A). Analizom rezultata Sanger sekvenciranja nisu otkrivene mutacije u egzonima *SPRTN*-a, ali su detektirani pojedini nukleotidni polimorfizmi (*single nucleotide polymorphism*, SNP), opisani na slici 18B. Diskrepancija je uočena kod četiri povezana SNP-a (rs2749716; rs2474633; rs2474634 i rs2437150) smještena u intronu 3 i na početku egzona 5 gena *SPRTN* usporedbom s podacima iz baze *Genome Aggregation Database* (GnomAD). Nisu pronađene značajne razlike u distribuciji varijanti SNP-ova, moguće zbog male veličine uzorka (Slika 18C).



Slika 18. Sekvenciranje gena *SPRTN* u uzorcima HCC-a.

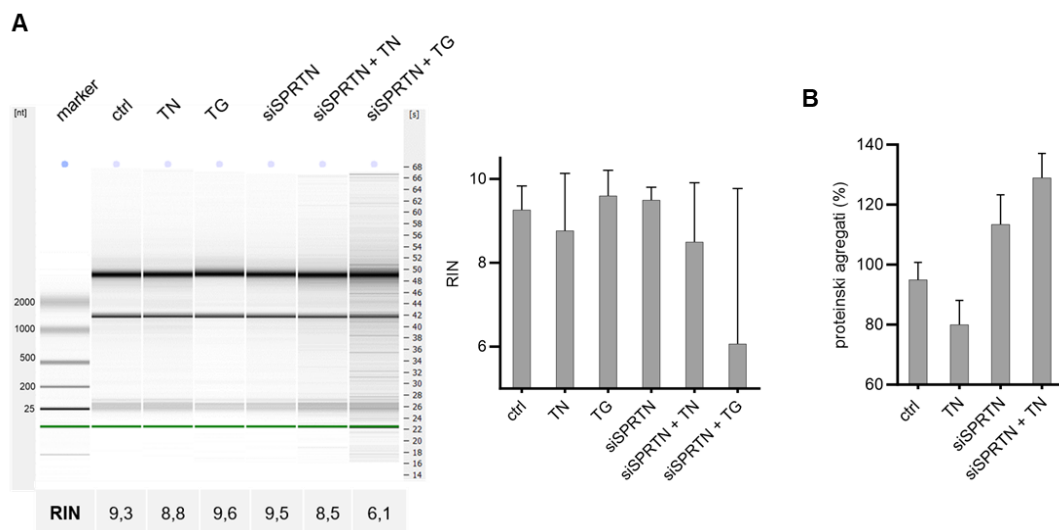
- Reprezentativni uzorak PCR produkata za pojedini egzon gena *SPRTN* u uzorku HCC (T1) na 2%-tnom agaroznom gelu. Veličina DNA markera je 100-1000 bp.
- Tablica sa SNP varijantama za svaki sekvencirani uzorak HCC-a.
- Usporedba frekvencija četiri SNP alela analizirana u genu *SPRTN* (intron 3 i egzon 5) između uzoraka HCC-a i GnomAD baze podataka.

4.13. *SPRTN* utječe na agregaciju proteina i degradaciju RNA tijekom stresa ER-a.

Degradacija RNA može biti izazvana stresom ER-a (84), stoga smo željeli provjeriti utjecaj *SPRTN*-a na degradaciju RNA tijekom stresa ER-a. Analiza degradacije provedena je na istim uzorcima RNA koji su korišteni za RT-qPCR analizu na slici 14E. Na slici 19A prikazan je elektroferogram analiziran aparatom *Agilent Bioanalyzer*. Tipični indikator degradacije RNA je prisutnost dodatnih vrpca veličine između 28S i 18S rRNA, kao i ispod 18S rRNA (84). Ove dodatne vrpce posebno su uočljive u posljednjem uzorku u kojem je TG tretman kombiniran s utišavanjem *SPRTN*-a. Ni smanjenje *SPRTN*-a, ni sami stres ER-a nisu potaknuli degradaciju RNA, ali kombinirani učinak smanjenja količine *SPRTN* i stresa ER-a narušio je integritet RNA. Kao referenca za degradaciju RNA koristio se broj integriteta RNA (*RNA integrity number*, RIN) (85). RIN vrijednosti potvrđuju učinak kombinacije smanjenja *SPRTN*-a i stresa ER-a na integritet RNA. Uzorci s najnižim RIN vrijednostima istovremeno

su i uzorci s karakterističnim signalima za degradaciju RNA (Slika 19A). Rezultati sugeriraju da stres ER-a postaje štetniji za stanice kada je u stanicama smanjena razina proteina SPRTN.

Na podjednako tretiranim stanicama provedena je i analiza netopljivih proteinskih agregata. Utvrđeno je da smanjenje SPRTN-a, bilo samostalno ili u kombinaciji s TN tretmanom, povećava količinu netopljivih proteinskih agregata, a kombinacijom oba tretmana dobije se najjači učinak (Slika 19B). Rezultati upućuju na to da je UPR manje učinkovit u rješavanju nefunkcionalnih ili nepravilno smotanih proteina kada je količina SPRTN-a u stanici reducirana, potvrđujući važnu ulogu *SPRTN*-a u odgovoru na stres ER-a.



Slika 19. SPRTN utječe na agregaciju proteina i degradaciju RNA tijekom stresa ER-a.

- A. Reprezentativni prikaz ukupne izolirane RNA iz SPRTN depletiranih i/ili TN (1 μ M, 18 h) ili TG (1 μ M, 18 h) tretiranih HepG2 stanica dobiven analizom na *Agilent Bioanalyzer* uređaju. Prosječne RIN vrijednosti su prikazane ispod slike gela (lijevo). Grafički prikaz RIN vrijednosti (desno). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n = 3 biološke replike.
- B. Grafički prikaz relativne količine agregiranih proteina iz SPRTN depletiranih i/ili TN (1 μ M, 18 h) tretiranih HepG2 stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD, n = 2 biološke replike.

5. RASPRAVA

Studija 1

5.1. Novi protokol izolacije histona iz nukleosoma

Histoni su neophodni za pakiranje DNA u kromatin, a važni su i za regulaciju ekspresije gena, replikaciju DNA te odgovor na oštećenje DNA. Stoga je proučavanje histona i histonskih modifikacija ključni element u istraživanju prethodno spomenutih staničnih procesa. Međutim, dostupne objavljene metode za izolaciju histona su jako ograničene. Na primjer, proučavanje epigenetskih promjena zahtijeva protokol koji može očuvati modifikacije na repovima histona, zbog čega grubi uvjeti za izolaciju histona nisu pogodni za takve eksperimente. Isto tako, proučavanje promjena u sastavu histona i njihovih modifikacija induciranih nakon odgovora na oštećenje DNA zahtijeva brzi protokol izolacije i blagi sastav pufera. Uobičajene tehnike za izolaciju histona koriste jake kiseline ili visoku koncentraciju soli u sastavu pufera. Iako je ovo prihvatljivo za neke aplikacije, takvi uvjeti onemogućuju istraživanje histonskih modifikacija koje su nestabilne u kiselom okruženju. Osim toga, visoka koncentracija soli obično ometa mnoge daljnje analize. Kada smo pokušavali pripremiti histone za daljnju analizu, susreli smo se s prethodno navedenim problemima. Iz tog razloga odlučili smo uspostaviti novi protokol za izolaciju histona koji će očuvati epigenetske promjene, a istovremeno biti dovoljno selektivan i osjetljiv za robusnu analizu.

Testirali smo različite uvjete našeg protokola, uključujući prisutnost EDTA, različite koncentracije DNaze te različite uvjete inkubacije. EDTA, koji pomaže u smanjenju razine proteaza i aktivnosti DNaze keliranjem dvovalentnih metalnih iona (86) očekivano bi trebao utjecati na kvalitetu izoliranih frakcija. Unatoč očekivanjima da će stanične frakcije izolirane RIPA puferom bez EDTA sadržavati veću razinu degradiranih proteina, nismo primijetili nikakvu razliku u aktivnosti pufera s dodatkom EDTA ili bez njega. Tijekom testiranja našeg protokola otkrili smo da je ključni korak u izolaciji histona optimizacija uvjeta DNaze. Previsoka koncentracija DNaze uzrokuje da većina histona zaostaje u nukleoplazmatskoj frakciji, dok vrlo niska koncentracija DNaze ili njen potpuni izostanak, rezultira zadržavanjem većine histona u frakciji ostatak. Također smo primijetili da inkubacija pufera s DNazom na 37 °C uzrokuje zadržavanje histona u nukleoplazmatskoj frakciji već pri jako kratkom vremenu inkubacije od 2 min.

Nismo uspjeli potpuno ukloniti DNA iz izoliranih uzoraka histona tretmanom DNaze niti taloženjem etanolom. Zaostala je određena količina DNA koja bi mogla ometati neke daljnje analize i primjene. S druge strane, tretman proteinazom K na našim izolatima uklonio je sve

proteinske komponente s nukleosomne DNA što omogućuje još jednu primjenu našeg protokola - analizu nukleosomne DNA (npr. preferencija mjesta vezanja histona, duljina nukleosomne DNA, gustoća nukleosoma i sl). Ova potencijalna primjena nije bila primarna svrha našeg protokola, ali bi mogla biti korisna za spomenute analize.

Da bismo mogli usporediti specifičnost i osjetljivost različitih metoda izolacije histona, izolirali smo histone pomoću sve tri metode istodobno – kiselinom, visokom koncentracijom soli te našim novim protokolom. Protokol s kiselinama zahtijeva rad u kemijskom digestoru zbog upotrebe sumporne i trikloroctene kiseline. Konačni pelet je prilično teško otopiti u vodi. Postoje dva koraka u protokolu gdje se inkubacija može izvesti za 30 minuta ili preko noći, što znači da se protokol može produžiti na tri dana. Ipak, za potrebe usporedbe, izveli smo ga u jednom danu. Naši rezultati sugeriraju da metoda s kiselinom daje sličan prinos histona kao naša metoda, ali smanjenu specifičnost. Treba napomenuti da nismo testirali verziju protokola koja traje tri dana, stoga je moguće da bi se specifičnost povećala s produljenim vremenom izolacije. S druge strane, metoda izolacije visokom koncentracijom soli proizvela je znatno manji prinos iz iste količine stanica, u usporedbi s ostalim dvjema metodama. Ova metoda je najduža od sve tri i zahtijeva pripremu četiri različita pufera. Korak dijalize oduzima znatno vremena, tijekom kojeg su proteini izloženi puferu koji ne sadrži inhibitore proteaza ili fosfataza. Naša nova metoda ima najkraće vrijeme izolacije u usporedbi s ostalim testiranim protokolima.

Histonsku frakciju smo analizirali na prisutnost nekoliko jezgrinih proteina *western blot* tehnikom i osim histona, samo aktin je bio prisutan u izoliranoj frakciji. Aktin se stoga može koristiti kao kontrola količine proteina za sve frakcije u WB metodi. Naš protokol je uspješno testiran na nekoliko često korištenih staničnih linija. Od šest testiranih linija, visokokvalitetni izolati dobiveni su iz pet (HeLa, HepG2, U2OS, HEK293 i T24) dok je jedna stanična linija pokazala (TCCSUP) slabije rezultate. Također smo testirali izolaciju iz dva svježja uzorka mišjeg tkiva (slezene i jetre). Izolacija histona bila je vrlo učinkovita i specifična iz slezene, ali lošija iz uzorka jetrenog tkiva. Pretpostavljamo da razlika u učinkovitosti dolazi najvjerojatnije zbog protokola razdvajanja stanica iz tkiva koji prethodi izolaciji histona. Ključni korak u protokolu za razdvajanje stanica iz tkiva je digestija različitim enzimima kao što su tripsin, kolagenaza ili dispaza. Izbor odgovarajućeg enzima treba biti specifičan za sastav izvanstaničnog matriksa odabranog tkiva. No, mi smo koristili enzim tripsin kojeg smo imali dostupnog za eksperimentalni rad koji nije najbolje prilagođen izvanstaničnom matriksu jetrenog tkiva.

Fosforilacija histona H3 na serinu 10 povezana je s kondenzacijom kromatina i mejozom te se može koristiti kao marker G2 i M faze (87). Nismo sinkronizirali stanice u M fazi staničnog ciklusa jer se one odvajaju od površine posudice za uzgoj tijekom diobe, što otežava manipulaciju i kontrolu tretmana stanica. Ukupna količina staničnih komponenti, uključujući DNA i histone, udvostručuje se u G2 fazi prije mitoze. To znači da G2 faza ima približno dvostruku količinu histona u usporedbi s G1 fazom. Naš protokol omogućuje detekciju razlika u količini izoliranih proteina u različitim fazama staničnog ciklusa, ali isto tako i detekciju razlika u sastavu histona koja se uočava između faza ciklusa, poglavito u omjerima histona H2 i H3 odnosno H4.

Utišavanje *NPAT*-a za posljedicu ima smanjenje ekspresije histona što je vidljivo s našim protokolom. Naši rezultati su u skladu s objavljenim literaturnim podacima koji povezuju utjecaj gena *NPAT* na ekspresiju histona (70).

Ovisno o uvjetima u stanici kao što su napredovanje kroz stanični ciklus, oštećenje DNA ili popravak DNA, varijante histona u nukleosomima mogu se mijenjati (6). UV zračenje, različite kemikalije ili određeni endogeni procesi mogu inducirati dvolančane lomove DNA, što dovodi do brze fosforilacije γ -serina u varijanti histona H2AX (88). S našim protokolom vidljivo je povećanje razine fosfo-H3 s povećanjem duljine izlaganja formaldehidu, što je u skladu s literaturom (71). Ovaj protokol omogućava praćenje promjena u histonskim modifikacijama kao posljedicu specifičnih oštećenja DNA, čime se potvrđuje selektivnost i osjetljivost naše metode.

Naš novi protokol je jednostavan, ekonomičan, zahtijeva samo nekoliko sati, a ne treba posebno specijalizirane laboratorijske reagense ili opremu. Testirali smo ga na različitim tipovima stanica koje se često koriste u staničnoj kulturi, kao i na tkivima. Ovaj protokol omogućava karakterizaciju promjena u ekspresiji histona kroz različite faze staničnog ciklusa i u različitim uvjetima oštećenja DNA. Također, pruža priliku za proučavanje promjena u sastavu i količini histona koje induciraju aktivatori ili represori aktivnosti transkripcije gena histona. Uzorci dobiveni pomoću ovog protokola mogu se koristiti u različitim eksperimentalnim tehnikama, uključujući western blot i masenu spektrometriju, kao i za analizu nukleosomne DNA.

Studija 2

5.2. Uloga proteina SPRTN u stres endoplazmatskog retikuluma

U okviru ovog istraživanja, predlažemo ulogu proteina SPRTN u regulaciji odgovora na stres ER-a u hepatocelularnom karcinomu (HCC). Početna hipoteza proizašla je iz podataka dobivenih sekvenciranjem RNA, koji su pokazali promjene u razinama ekspresije gena uključenih u regulaciju UPR-a (*unfolded protein response*). Dodatno, analiza masene spektrometrije ukazala je na interakciju između SPRTN-a i više proteina povezanih s UPR-om među kojima je najistaknutiji bio GRP78, poznat kao ključni regulator stresa ER-a (89). Koristeći *pull-down* eksperimente na SPRTN proteinu, potvrdili smo preliminarne nalaze i pokazali da se interakcija između SPRTN-a i GRP78 proteina odvija na C-terminalnoj polovici SPRTN-a. Otkriće ove interakcije sugerira moguću novu funkciju SPRTN-a, što nas je potaknulo da dalje istražimo ulogu SPRTN-a u odgovoru na stres ER-a.

Ekperimentalni rad se temeljio na staničnoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2, kako bismo testirali akutnu reakciju na tretmane koji izazivaju ER stres. HepG2 stanice su tretirane malom interferirajućom RNA (*siRNA*) koja onemogućava translaciju proteina SPRTN i kemikalijama TN i TG koje uzrokuju nakupljanje pogrešno smotanih proteina i stres ER-a. Razina GRP78 u netretiranim stanicama obično je vrlo niska, no različiti stresni podražaji, kao što su TN i TG, mogu potaknuti njegovu ekspresiju (90). U našem istraživanju pokazali smo da tretmani TN-om i TG-om rezultiraju smanjenjem ekspresije proteina SPRTN, dok paralelno induciraju ekspresiju GRP78. Kombinacija utišavanja *SPRTN*-a i tretmana TN-om ili TG-om dovodi do značajnijih promjena u ekspresiji i proteinskim razinama analiziranih UPR gena, nego što to čine samostalni tretmani TN-om, TG-om ili samo utišavanje *SPRTN*-a. Tijekom ER stresa, smanjena ekspresija *SPRTN*-a rezultira povećanjem razine proteina GRP78 i smanjenjem razine proteina XBP1, sugerirajući da su stanice s utišanim *SPRTN*-om osjetljivije na stres ER-a.

Na razini mRNA, utišavanje *SPRTN*-a inducira povećanje ekspresije *GRP78* i *XBP1s*, uz istovremeno smanjenje ekspresije *ATF4*. Utišavanje *SPRTN*-a utječe na *CYP2E1* tako što umanjuje njegovu reakciju na tretmane koji induciraju stres ER-a. *CREB3L3* je faktor u razvoju HCC-a (73) i dio metabolizma lipida (74), stoga je uključen u analizu nakon što su rezultati sekvenciranja RNA pokazali da deplecija *SPRTN*-a dovodi do promjena u ekspresiji *CREB3L3*. Utišavanje *SPRTN*-a, kao i tretmani TN ili TG, rezultiraju smanjenom ekspresijom *CREB3L3*

što je u skladu s literaturom koja opisuje snažno smanjenje ekspresije u stanicama HCC-a (91). Ovi rezultati impliciraju da je metabolizam lipida poremećen u uvjetima stresa ER-a ako je *SPRTN* utišan.

DDIT3 je multifunkcionalni transkripcijski faktor koji regulira UPR i posreduje u apoptozi. Akumulacija ovog faktora u jezgri pokazatelj je aktiviranog stresa ER-a i UPR-a (92). Imunofluorescencijsko bojanje u HepG2 stanicama koje su izložene stresu ER-a pokazalo je povećanu akumulaciju DDIT3 u jezgri u stanicama s utišanim *SPRTN*-om. To potvrđuje važnu ulogu *SPRTN*-a u regulaciji UPR-a.

Nasljedne bialelne mutacije u genu *SPRTN* dovode do razvoja HCC-a (22). Budući da je UPR prepoznat kao jedan od mehanizama tumorigeneze HCC-a (39) željeli smo istražiti promjene u genima UPR-a i *SPRTN* genu u uzorcima HCC-a prikupljenim u Hrvatskoj. Sekvencirali smo egzone gena *SPRTN* u uzorcima HCC-a, kao i u pripadajućem okolnom netumorskom tkivu s ciljem otkrivanja mogućih mutacija. Nismo pronašli mutacije, niti smo uočili značajne razlike u distribuciji SNP-ova, što implicira da mutacije u *SPRTN*-u nisu primarni uzrok razvoja HCC-a kod analiziranih pacijenata.

Koristeći metodu RT-qPCR, detektirali smo razine ekspresije *SPRTN*-a i nekoliko gena povezanih s UPR-om u uzorcima HCC-a. Rezultati su pokazali da su ti geni generalno pojačano eksprimirani u uzorcima HCC-a u usporedbi s okolnim tkivom. S druge strane, pokazalo se da su regulatori metabolizma lipida u hepatocitima drastično smanjeni. Ekspresija *SREBP1c* je smanjena u svim testiranim uzorcima, što je povezano sa sporim napredovanjem HCC-a (45). Zanimljivo je da su u svakom uzorku promjene u razinama ekspresije *GRP78* i *SREBP1c* bile suprotne. Također, u uzorcima HCC-a je primijećeno snažno smanjenje ekspresije gena *CYP2E1*, što je u skladu s postojećom literaturom (50). *CYP2E1* je minimalno eksprimiran u većini testiranih uzoraka HCC-a, što se podudara s literaturom u kojoj se spominje da je dominantno eksprimiran u zdravom jetrenom tkivu (10).

UPR i metabolizam lipida su dva povezana puta u hepatocitima. Smanjenje *GRP78* dovodi do nakupljanja masnih kiselina u stanicama, što sugerira da je *SREBP1* pod kontrolom *GRP78*. Osim toga, inhibicija *EIF2AK3* dovodi do smanjenja ekspresije nekoliko gena koji su pod kontrolom *SREBP1* (46). Ovi rezultati ukazuju na to da su regulacija *SPRTN*-a, UPR gena i metabolizma lipida promijenjeni u HCC-u.

Proteinske razine UPR-a bile su samo djelomično korelirane s primijećenim promjenama u *mRNA*. Ova diskrepancija može se objasniti mogućom post-transkripcijskom regulacijom proteina, kao što je opisano za GRP78 (93). Post-transkripcijska regulacija omogućava translaciju proteina ključnih za preživljavanje stanica kada je globalna translacija smanjena, kao što je slučaj tijekom ER stresa. Ovo je omogućeno putem unutarne sekvence za ulazak u ribosom, što znači da čak i male količine mRNA mogu rezultirati značajnim povećanjem proteinske razine (90). Svi ispitani uzorci HCC-a pokazali su promjene u razinama barem jednog od testiranih proteina povezanih s UPR-om ili regulatora metabolizma lipida, što sugerira njihovu moguću ulogu u procesu tumorigeneze.

U uzorcima HCC-a zabilježili smo pojačanu ekspresiju *SPRTN*-a, kako na razini *mRNA* tako i na razini proteina. Uvidom u *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) bazu podataka, koja obuhvaća preko 400 uzoraka HCC-a, potvrdili smo da su promjene u razinama ekspresije *SPRTN*-a i odabranih gena UPR-a slične onima koje smo zabilježili, što pruža dodatnu potvrdu naših nalaza. Uz zabilježene promjene u razinama ekspresije, primijetili smo i promjene u lokalizaciji *SPRTN* proteina u tkivu HCC-a. U netumorskim uzorcima jetrenog tkiva, *SPRTN* je primarno lociran u jezgri, gdje ima ključnu funkciju uklanjanja DNA-protein kroslinkova. Nasuprot tome, u uzorcima HCC-a, detektirali smo *SPRTN* u citoplazmi i ER-u. Ovi rezultati upućuju na potencijalnu dodatnu ulogu proteaze *SPRTN*, koja bi mogla biti uključena u odgovor na stres ER-a. Vrlo je vjerojatno da je UPR već izmijenjen u HCC-u, a za to postoje dva moguća razloga. Prvi razlog bi mogao biti kroničan ili dugotrajan stres ER-a prisutan u HCC-u. U usporedbi s akutnim stresom, odgovor na kronični stres može koristiti različite ili čak suprotne molekularne mehanizme, što je zapaženo u drugim biološkim modelima, poput kronične infekcije. To bi moglo objasniti nekonzistentne promjene razine *mRNA* i proteina koje smo mi, ali i drugi, primijetili u različitim uzorcima HCC-a. Drugi mogući razlog mogao bi biti genetska predispozicija određenih osoba za neadekvatan odgovor na stres ER-a, što ih čini sklonijima razvoju HCC-a. Te osobe ne reagiraju adekvatno na stres ER-a, što se manifestira kroz nekonzistentne promjene u razinama *mRNA* i proteina povezanih s UPR-om.

ER stres može izazvati oštećenje kromatina. Primjerice, pokazano je da tretman TN-om potiče proteasomalnu degradaciju Rad51, ključnog proteina u putu homolognog popravka DNA, čime se smanjuje sposobnost popravka DNA (94). Da bismo ispitali utjecaj stresa ER-a na integritet DNA, proveli smo analize kariotipizacije i komet test. U komet testu, utišavanje *SPRTN*-a rezultiralo je lomovima DNA, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (22). Slične promjene opažene su i nakon tretmana TN-om, ukazujući na to da stres ER-a i UPR mogu

uzrokovati oštećenje DNA. Činjenica da kombinacija utišavanja *SPRTN*-a i tretmana TN-om nije rezultirala većim oštećenjem DNA nego samo utišavanje *SPRTN*-a, sugerira da oštećenje DNA uzrokovano stresom ER-a većinom proizlazi iz smanjenja *SPRTN*-ovisnih puteva popravka DNA. Kariotipizacijom smo pokazali da tretmani TN-om i TG-om, induciraju oštećenje DNA što rezultira smanjenom razinom mitoze. Ovo usporavanje napredovanja kroz stanični ciklus je očekivano u uvjetima smanjenog popravka DNA. U *SPRTN*-utišanim stanicama, popravak DPC-ova je smanjen, a oštećenja DNA se akumuliraju (23). U ovom radu pokazujemo da utišavanje *SPRTN*-a dovodi do smanjenja mitotskog indeksa, posebno u stanicama tretiranim TN-om i TG-om. Ovaj rezultat potvrđuje da UPR, koji smanjuje razinu *SPRTN* proteina, može uzrokovati kašnjenja u mitotskom napredovanju putem umanjene funkcije *SPRTN*-a. Ovaj efekt se dodatno pojačava u stanicama s utišanim *SPRTN*-om.

Da bismo procijenili oštećenje DNA, analizirali smo ekspresiju 84 gena koji sudjeluju u signalizaciji oštećenja DNA u četiri nasumično odabrana uzorka HCC-a te njihovih okolnih netumorskih tkiva. Budući da je većina gena u testiranim uzorcima pokazala slične razine ekspresije u oba uparena uzorka, moguće je da su se ovi geni već modificirali u kronično promijenjenim stanicama jetre. Među 84 testirana gena, oni koji su pokazali najznačajnije promjene bili su uglavnom povećane ekspresije u uzorcima tumora, s nekoliko iznimaka, poput *GADD45A*. Drugi najveći porast ekspresije, nakon *CDC25C*, zabilježen je kod gena *CHEK1* koji se inače prekomjerno eksprimira u tkivima HCC-a i povezan je s lošom prognozom (82). *GADD45A* je gen s najvećim smanjenjem, što je također u skladu s literaturom (83). Ova otkrića su u skladu s rezultatima iz *TCGA* baze podataka.

Novija istraživanja su pokazala da TN i TG kompromitiraju integritet RNA (84). Međutim, mi nismo uočili takav učinak u HepG2 stanicama koje su bile tretirane isključivo TN-om ili TG-om. Ova diskrepancija bi se mogla pripisati većim koncentracijama TN-a i TG-a (i do 10 puta) korištenim u navedenom istraživanju i/ili specifičnom tipu stanica korištenih u tom radu. Ipak, uočili smo degradaciju RNA u uzorcima gdje je je kombinirano utišavanje *SPRTN*-a s TN-om i, posebno, TG tretmanom.

ER stres može potaknuti formiranje proteinskih agregata unutar ER-a (36). Primijetili smo povećanu akumulaciju proteinskih agregata u stanicama kod kojih je *SPRTN* utišan. Kada je kombinirano utišavanje *SPRTN*-a s TN tretmanom, akumulacija proteina bila je još veća. Degradacija RNA, u kombinaciji s akumulacijom proteinskih agregata, pruža dodatne uvide u ulogu *SPRTN*-a u regulaciji ER stresa.

Većina naših eksperimenata na stanicama provodi se u uvjetima gdje je *SPRTN* utišan pomoću *siRNA*. Tipično, utišavanje *siRNA* rezultira smanjenjem ekspresije gena za 80%, ostavljajući dio proteina još uvijek aktivan u stanicama. Potpuno uklanjanje *SPRTN*-a iz stanica nije moguće jer stanice ne mogu preživjeti takvu promjenu. Prema tome, može se pretpostaviti da bi učinak na odgovor stresa ER-a koji smo primijetili u stanicama sa smanjenim *SPRTN*-om bio još izraženiji kada bi u stanicama postojalo manje ili nimalo *SPRTN* proteina.

Naši eksperimenti pokazuju važnu ulogu *SPRTN*-a u odgovoru stanice na stres ER-a. *SPRTN* interagira s *GRP78*, ranim detektorom ER stresa. Stanice s depletiranim *SPRTN*-om su osjetljivije na stres ER-a, što je vidljivo kroz povećanje *GRP78* i akumulaciju *DDIT3*. Kada je *SPRTN* depletiran, ER stres postaje štetniji za stanice, što se očituje kroz povećanje γ H2AX-a, smanjenje mitotskog indeksa i akumulaciju proteinskih agregata. Mehanizam iza DNA oštećenja uzrokovanog UPR-om vjerojatno je posredovan *SPRTN*-om, na što ukazuju rezultati komet testa. Pokazali smo da u uzorcima HCC-a *SPRTN* lokalizira u ER-u i citoplazmi. Na temelju ovih dokaza, predlažemo novu funkciju proteaze *SPRTN* – posredovanje u uklanjanju proteinskih agregata i povratku homeostaze ER-a.

Predlažemo da *SPRTN* prioritizira uklanjanje agregata iz ER-a koji, ako se ne riješe, mogu uzrokovati apozozu, odgađajući istovremeno obradu DPC-ova. Ovaj mehanizam zaustavlja stanicu u napredovanju kroz stanični ciklus i diobu, sve dok se oštećenje DNA ne popravi. Ukoliko stres ER-a predugo potraje, angažirajući dostupni *SPRTN* i sprječavajući pravovremeni popravak DNA, mogao bi dovesti do nestabilnosti DNA, mutageneze i u konačnici do razvoja raka.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Izolacija histona – Studija 1

- a) Novi protokol je brz, jednostavan i koristi standardne kemikalije.
- b) Zahvaljujući blagim uvjetima ekstrakcije, moguće je proučavati epigenetske promjene histona kao i utjecaj aktivatora transkripcije histona.
- c) Ovaj protokol se može koristiti na različitim staničnim linijama, kao i na mišjim tkivima.
- d) Moguće je pratiti promjene histona kroz faze staničnog ciklusa i kod različitih oštećenja DNA.
- e) Protokol je optimiziran tako da su moguće različite nizvodne aplikacije na dobivenim frakcijama poput western blot metode, agarozne gel elektroforeze ili masene spektrometrije.
- f) Osim proteinske komponente nukleosoma, moguće je istraživati i DNA komponentu, tj nukleosomalnu DNA.

6.2. Stres endoplazmatskog retikuluma u stanicama hepatocelularnog karcinoma – Studija 2

- g) SPRTN se pretežno nakuplja u citoplazmi i ER-u u uzorcima HCC-a, za razliku od nuklearne lokalizacije u kontrolnim stanicama.
- h) SPRTN stupa u interakciju s UPR senzorom GRP78.
- i) Utišavanje proteina SPRTN povećava razinu GRP78 i dovodi do akumulacije DDIT3 u TN i TG tretiranim stanicama.
- j) Utišavanje proteina SPRTN utječe na ekspresiju određenih gena uključenih u odgovor na pogrešno smotane proteine; jednako tako i stres endoplazmatskog retikuluma utječe na ekspresiju gena *SPRTN*.
- k) Deplecija SPRTN-a povećava osjetljivost na oštećenje DNA izazvano ER-stresom i nakupljanje proteinskih agregata.
- l) Kod hepatocelularnog karcinoma dolazi do porasta ekspresije gena *SPRTN* i gena uključenih u odgovor na pogrešno smotane proteine.
- m) U uzorcima hepatocelularnog karcinoma povećana je razina ekspresije gena uključenih u popravak DNA. Nisu pronađene mutacije u genu *SPRTN*, kao ni razlika u distribuciji SNPova između uzoraka DNA izoliranih iz tkiva hepatocelularnog karcinoma i opće populacije.

7. LITERATURA

1. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:172–83.
2. van Holde KE. The Proteins of Chromatin. I. Histones. In: *Chromatin*. New York: Springer; 1989. p. 69–180.
3. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: The industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:437–47.
4. Campos EI, Reinberg D. Histones: Annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 2009;43:559–99.
5. Martire S, Banaszynski LA. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:522–41.
6. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants at a glance. *J Cell Sci* 2021;134:1–10.
7. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41–5.
8. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics* 2004;20:214–20.
9. van Holde KE. The Proteins of Chromatin. II. Nonhistone Chromosomal Proteins. In: *Chromatin*. New York: Springer; 1989. p. 181–218.
10. Stein GS, Hunter G, Lavie L. Non histone chromosomal proteins. Evidence for their role in mediating the binding of histones to deoxyribonucleic acid during the cell cycle. *Biochemical Journal* 1974;139:71–6.
11. Chen Y, Zhu WG. Biological function and regulation of histone and non-histone lysine methylation in response to DNA damage. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016;48:603–16.
12. Morrison O, Thakur J. Molecular complexes at euchromatin, heterochromatin and centromeric chromatin. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–28.
13. Crane-Robinson C. Linker histones: History and current perspectives. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2016;1859:431–5.
14. Duronio RJ, Marzluff WF. Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the Histone Locus Body. *RNA Biol* 2017;14:726–38.
15. Armstrong C, Spencer SL. Replication-dependent histone biosynthesis is coupled to cell-cycle commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021;118:1–8.

16. Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Gregory Matera A, Fletcher JA, et al. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev* 2000;14:2283–97.
17. Wei Y, Jin J, Harper JW. The Cyclin E/Cdk2 Substrate and Cajal Body Component p220 NPAT Activates Histone Transcription through a Novel LisH-Like Domain . *Mol Cell Biol* 2003;23:3669–80.
18. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2007;2:1445–57.
19. Vaz B, Popovic M, Newman JA, Fielden J, Aitkenhead H, Halder S, et al. Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair. *Mol Cell* 2016;64:704–19.
20. Maskey RS, Flatten KS, Sieben CJ, Peterson KL, Baker DJ, Nam HJ, et al. Spartan deficiency causes accumulation of Topoisomerase 1 cleavage complexes and tumorigenesis. *Nucleic Acids Res* 2017;45:4564–76.
21. Ruijs MWG, van Andel RNJ, Oshima J, Madan K, Nieuwint AWM, Aalfs CM. Atypical progeroid syndrome: An unknown helicase gene defect? *Am J Med Genet* 2003;116A:295–9.
22. Lessel D, Vaz B, Halder S, Lockhart PJ, Marinovic-Terzic I, Lopez-Mosqueda J, et al. Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat Genet* 2014;46:1239–44.
23. Glumac M, Polović M, Batel A, Gelemanović A, Maček B, Velić A, et al. SPRTN-dependent DPC degradation precedes repair of damaged DNA : a proof of concept revealed by the STAR assay *Nucleic Acids Res.* 2023;51:1–18.
24. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557–76.
25. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;72:7–33.
26. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2021;73:4–13.
27. Yang SF, Chang CW, Wei RJ, Shiue YL, Wang SN, Yeh YT. Involvement of DNA damage response pathways in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2014;2014:1-18.
28. Xie JL, Jarosz DF. Mutations, protein homeostasis, and epigenetic control of genome integrity. *DNA Repair (Amst)* 2018;71:23–32.

29. Ogunwobi OO, Harricharran T, Huaman J, Galuza A, Odumuwagon O, Tan Y, et al. Mechanisms of hepatocellular carcinoma progression. *World J Gastroenterol* 2019;25:2279–93.
30. Guyton AC, Hall JE. The liver as an organ. In: *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 859–64.
31. Wei J, Fang D. Endoplasmic reticulum stress signaling and the pathogenesis of hepatocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–15.
32. Liu X, Green RM. Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. *Liver Res* 2019;3:55–64.
33. Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2021;21:71–88.
34. Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, Agellon LB. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front Oncol* 2015;5:1–8.
35. Bhattarai KR, Riaz TA, Kim HR, Chae HJ. The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling. *Exp Mol Med* 2021;53:151–67.
36. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 2018;69:169–81.
37. Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress: a key player in human disease. *FEBS Journal* 2019;286:228–31.
38. Pavlović N, Heindryckx F. Targeting ER stress in the hepatic tumor microenvironment. *FEBS Journal* 2021;289:7163–76.
39. Vandewynckel YP, Laukens D, Bogaerts E, Paridaens A, Van den Bussche A, Verhelst X, et al. Modulation of the unfolded protein response impedes tumor cell adaptation to proteotoxic stress: a PERK for hepatocellular carcinoma therapy. *Hepatol Int* 2015;9:93–104.
40. Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Laboratory Investigation* 2008;88:375–86.
41. Wu J, Chen S, Liu H, Zhang Z, Ni Z, Chen J, et al. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2018;37:1–12.
42. Jaskulska A, Janecka AE, Gach-Janczak K. Thapsigargin—from traditional medicine to anticancer drug. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–12.

43. Sehgal P, Szalai P, Olesen C, Praetorius HA, Nissen P, Christensen SB, et al. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca²⁺ depletion and the unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry* 2017;292:19656–73.
44. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 2006;4:2024–41.
45. Moslehi A, Hamidi-Zad Z. Role of SREBPs in liver diseases: A mini-review. *J Clin Transl Hepatol* 2018;6:332–8.
46. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Clarke PAG, Cruz MI, Zwart A, Wärrri A, et al. Endoplasmic reticulum stress protein GRP78 modulates lipid metabolism to control drug sensitivity and antitumor immunity in breast cancer. *Cancer Res* 2016;76:5657–70.
47. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519–29.
48. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 2008;44:723–38.
49. Mahli A, Thasler WE, Patsenker E, Müller S, Stickel F, Müller M, et al. Identification of cytochrome CYP2E1 as critical mediator of synergistic effects of alcohol and cellular lipid accumulation in hepatocytes in vitro. *Oncotarget* 2015;6:41464–78.
50. Ren X, Ji Y, Jiang X, Qi X. Downregulation of CYP2A6 and CYP2C8 in Tumor Tissues Is Linked to Worse Overall Survival and Recurrence-Free Survival from Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int* 2018;2018:1-9.
51. Subramaniam S, Kelley RK, Venook AP. A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems. Vol. 2, *Chinese Clinical Oncology*. AME Publishing Company; 2013.
52. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2014. p. 15955–64.
53. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ* 2008;86:650–2.
54. Kopec AM, Rivera PD, Lacagnina MJ, Hanamsagar R, Bilbo SD. Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue. *J Neurosci Methods* 2017;280:64–76.
55. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *National Institutes Health* 2012;33:366–9.

56. Leliveld SR, Bader V, Hendriks P, Prikulis I, Sajnani G, Requena JR, et al. Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease. *Journal of Neuroscience* 2008;28:3839–45.
57. Zaharija B, Odorčić M, Hart A, Samardžija B, Marreiros R, Prikulis I, et al. TRIOBP-1 Protein Aggregation Exists in Both Major Depressive Disorder and Schizophrenia, and Can Occur through Two Distinct Regions of the Protein. *Int J Mol Sci* 2022;23: 1–19.
58. Borchert N, Dieterich C, Krug K, Schütz W, Jung S, Nordheim A, et al. Proteogenomics of *Pristionchus pacificus* reveals distinct proteome structure of nematode models. *Genome Res* 2010;20:837–46.
59. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2007;2:1896–906.
60. Schmitt M, Sinnberg T, Nalpas NC, Maass A, Schitteck B, Macek B. Quantitative proteomics links the intermediate filament nestin to resistance to targeted BRAF inhibition in melanoma cells. *Molecular and Cellular Proteomics* 2019;18:1096–109.
61. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008;26:1367–72.
62. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 2011;10:1794–805.
63. Kustatscher G, Hégarat N, Wills KLH, Furlan C, Bukowski-Wills JC, Hochegger H, et al. Proteomics of a fuzzy organelle: Interphase chromatin. *EMBO Journal* 2014;33:648–64.
64. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Science* 2021;30:187–200.
65. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, Milacic M, Rothfels K, Senff-Ribeiro A, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res* 2022;50:D687–92.
66. Perry M, Biegert M, Kollala SS, Mallard H, Su G, Kodavati M, et al. USP11 mediates repair of DNA–protein cross-links by deubiquitinating SPRTN metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry* 2021;296:100396.
67. Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Experimental Cell Research* 1999;247:148–59.

68. Bai B, Shan L, Wang J, Hu J, Zheng W, Lv Y, et al. Small molecule 2,3-DCPE induces S phase arrest by activating the ATM/ATR-Chk1-Cdc25A signaling pathway in DLD-1 colon cancer cells. *Oncology Letters* 2020;20:1–7.
69. Ma HT, Poon RYC. Synchronization of HeLa Cells. In: *Methods in Molecular Biology* 2011. p. 301–11.
70. Gao G, Bracken AP, Burkard K, Pasini D, Classon M, Attwooll C, et al. NPAT Expression Is Regulated by E2F and Is Essential for Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23:2821–33.
71. Yoshida I, Ibuki Y. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2014;770:9–18.
72. Kröning A, van den Boom J, Kracht M, Kueck AF, Meyer H. Ubiquitin-directed AAA+ ATPase p97/VCP unfolds stable proteins crosslinked to DNA for proteolysis by SPRTN. *Journal of Biological Chemistry* 2022;298:101976.
73. Sun R, Xu Y, Zhang H, Yang Q, Wang K, Shi Y, et al. Mechanistic Modeling of Gene Regulation and Metabolism Identifies Potential Targets for Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Genetics* 2020;11:1–16.
74. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nature Medicine* 2011;17:812–5.
75. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010;24:679–86.
76. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol [Internet]* 2014;2:457–65.
77. Lopez-Mosqueda J, Maddi K, Prgomet S, Kalayil S, Marinovic-Terzic I, Terzic J, et al. SPRTN is a mammalian DNA-binding metalloprotease that resolves DNA-protein crosslinks. *eLife* 2016;5:1–19.
78. Stinglele J, Bellelli R, Alte F, Hewitt G, Sarek G, Maslen SL, et al. Mechanism and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair by the DNA-Dependent Metalloprotease SPRTN. *Mol Cell* 2016;64:688–703.
79. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science* 2006;312:572–6.
80. Bartoszewski R, Gebert M, Janaszak-Jasiecka A, Cabaj A, Króliczewski J, Bartoszevska S, et al. Genome-wide mRNA profiling identifies RCAN1 and

- GADD45A as regulators of the transitional switch from survival to apoptosis during ER stress. *FEBS Journal* 2020;287:2923–47.
81. Xun R, Lu H, Wang X. Identification of CDC25C as a Potential Biomarker in Hepatocellular Carcinoma Using Bioinformatics Analysis. *Technology in Cancer Research and Treatment* 2020;19:1–10.
 82. Hong J, Hu K, Yuan Y, Sang Y, Bu Q, Chen G, et al. CHK1 targets spleen tyrosine kinase (L) for proteolysis in hepatocellular carcinoma 2012;122:2165–75.
 83. Gramantieri L, Chieco P, Giovannini C, Lacchini M, Treré D, Grazi GL, et al. GADD45- α expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma: Relationship with DNA repair and proliferation. *Human Pathology* 2005;36:1154–62.
 84. Butler P, Pascheto I, Lizzi M, Onge RS, Lanner C, Guo B, et al. RNA disruption is a widespread phenomenon associated with stress - induced cell death in tumour cells. *Scientific Reports* 2023;13:1–16.
 85. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 2006;7:1–14.
 86. Barra GB, Santa Rita TH, Vasques J de A, Chianca CF, Nery LFA, Costa SSS. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clinical Biochemistry* 2015;48:976–81.
 87. Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, David Allis C. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 1999;97:99–109.
 88. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002;12:162–169.
 89. Chen WT, Zhu G, Pfaffenbach K, Kanel G, Stiles B, Lee AS. GRP78 as a regulator of liver steatosis and cancer progression mediated by loss of the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 2014;33:4997–5005.
 90. Casas C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Frontiers in Neuroscience* 2017;11:1–15.
 91. Chin KT, Zhou HJ, Wong CM, Lee JMF, Chan CP, Qiang BQ, et al. The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Research* 2005;33:1859–73.
 92. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:45495–502.

93. Jaud M, Philippe C, Di Bella D, Tang W, Pyronnet S, Laurell H, et al. Translational Regulations in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Cancers. *Cells* 2020;9:1–28.
94. Yamamori T, Meike S, Nagane M, Yasui H, Inanami O. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS Letters* 2013;587:3348–53.

8. SAŽETAK

Studija 1 - Histoni igraju ključnu ulogu u regulaciji strukture i funkcije kromatina unutar nukleosoma. Sudjeluju u transkripciji, popravku i replikaciji DNA. U ovom istraživanju predstavljamo brzu, efikasnu i svestranu metodu za izolaciju nukleosomalnih histona iz stanica i tkiva, eliminirajući potrebu za kiselinama ili visokom koncentracijom soli koje se često koriste u drugim tehnikama izolacije. Naš protokol koristi lako dostupne i uobičajene laboratorijske kemikalije te ne zahtijeva skupocjenu aparaturu. Testiranje protokola na šest staničnih linija i dva tipa životinjskog tkiva pokazalo je da blagi uvjeti ekstrakcije konzerviraju epigenetske promjene na histonima, omogućujući daljnje analize varijanti histona i posttranslacijskih modifikacija histona. Pokazali smo da je naš protokol učinkovit za identificiranje promjena u transkripcijskoj aktivnosti gena za histone u različitim fazama staničnog ciklusa i pri oštećenju DNA. Izolirane histonske frakcije mogu se koristiti za daljnje analize, uključujući elektroforezu, imunodetekciju ili masenu spektrometriju. Naša metoda za izolaciju nukleosomalnih histona je osjetljiva, specifična i pogodna za različite daljnje primjene.

Studija 2 - Razvoj hepatocelularnog karcinoma (HCC) uključuje brojne stanične procese, među kojima je i stres endoplazmatskog retikuluma (ER). ER stres nastaje zbog nakupljanja pogrešno smotanih proteina, što dovodi do aktivacije puta odgovora na pogrešno smotane proteine (UPR) čiji je cilj ponovna uspostava homeostaze ER-a. Trenutno je bialelna mutacija u genu *SPRTN* jedini prepoznati genetski faktor povezan s ranim razvojem HCC-a. Mehanizam kojim mutacije *SPRTN*-a dovode do HCC-a još uvijek je nejasan. Protein SPRTN sudjeluje u popravku DNA oštećenja uzrokovanih kovalentnim vezanjem DNA i proteina (DPC). Koliko nam je poznato, uloga SPRTN-a u odgovoru na ER stres nije istražena. Naša studija istraživala je ulogu SPRTN-a u odgovoru na ER stres i njegov značaj u napredovanju HCC-a. Ustanovili smo da se u uzorcima HCC-a događaju promjene u *SPRTN*-u te genima i proteinima povezanim s UPR-om. Otkrili smo da SPRTN interagira s UPR senzorom GRP78. Stanice s utišanim *SPRTN*-om su osjetljivije na ER stres i na oštećenje DNA izazvano UPR-om, što naglašava ključnu ulogu SPRTN-a u upravljanju ER stresom. Ova nova funkcija proteaze SPRTN mogla bi pomoći u razumijevanju mehanizama razvoja HCC-a.

9. SUMMARY

Study 1 - Histones play a critical role in regulating chromatin structure and function within nucleosomes. They participate in DNA transcription, repair, and replication. We present a rapid, efficient, and versatile method for isolating nucleosomal histones from mammalian cells and tissues, eliminating the need for acidic or high-salt conditions commonly used in other isolation techniques. Our protocol employs readily available and affordable laboratory chemicals and simple equipment. Evaluation of the protocol on six cell lines and two animal tissue samples demonstrated that the gentle extraction conditions preserved the delicate epigenetic changes in histones, allowing for downstream analyses of histone variants and posttranslational modifications. We have demonstrated that our procedure is effective for identifying alterations in the transcriptional activity of histone genes in various stages of the cell cycle, and as a consequence of DNA damage. The isolated histone fractions can be utilized for various applications, including electrophoresis, immunoblotting, and mass spectrometry. Therefore, our proposed method for nucleosomal histone isolation is sensitive, specific, and suitable for diverse downstream applications.

Study 2 - The development of hepatocellular carcinoma (HCC) involves numerous cellular processes, among which is endoplasmic reticulum (ER) stress. ER stress occurs due to a build-up of incorrectly folded or unfolded proteins, leading to the activation of the unfolded protein response (UPR) pathway which aims to re-establish ER homeostasis. Currently, a biallelic mutation in the *SPRTN* gene is the sole recognized single-gene mutation associated with early-onset HCC. The mechanism by which *SPRTN* mutations lead to HCC is unclear. The *SPRTN* protein participates in the repair of DNA damage from DNA-protein crosslinks (DPC). To our knowledge, *SPRTN*'s role in the ER stress response has not yet been investigated. Our study focused on the involvement of *SPRTN* in the ER stress response and its significance in the progression of HCC. We detected alterations in *SPRTN* and UPR-related genes and proteins in HCC samples. We found that *SPRTN* interacts with the UPR sensor GRP78. *SPRTN*-depleted cells are more susceptible to ER stress and UPR-induced DNA damage, emphasizing *SPRTN*'s vital role in managing ER stress. This novel function of *SPRTN* protease could help elucidate mechanisms of HCC development.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anja Batel

Datum rođenja: 04.05.1993.

E-mail: anja.batel@mefst.hr

ORCID: 0000-0001-9079-6118

RADNO ISKUSTVO

09/2017 – 10/2023 Asistentica na HRZZ projektu "Uloga proteina SPRTN u replikaciji DNA", Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

06/2016 - 05/2017 Asistent u farmakovigilanciji i regulativi

OBRAZOVANJE

2017 – danas Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Poslijediplomski studij "TRIBE - Translacijska istraživanja u biomedicini"

09/2015 – 10/2017 Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Diplomski studij molekularne biologije

09/2012 – 09/2015 Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Preddiplomski studij molekularne biologije

09/2008 – 09/2012 Opća gimnazija fra Andrije Kačića Miošića, Makarska

Jezici: hrvatski, engleski, njemački

Organizacijske vještine:

- Organizacijski odbor konferencije Mutimir 2021 – danas
- Organizacijski odbor Znanstvenog piknika 2016 – danas
- Organizacijski odbor Inspire Me konferencije 2017. - 2020.
- Organizacijski odbor „Tenth ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine“, Dubrovnik 2017.

Konferencije i seminari:

- The Ecsite Conference Valetta, Malta 2023
- The European Science Engagement Conference Bolzano, Italy 2023
- Mutimir conference – Stubičke toplice, Croatia 2022
- CARNET users conference – CUC Šibenik, Croatia 2022

- International Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology HDBMB22 Brela, Croatia 2022 (poster presentation)
- The European Science Engagement Conference Cork, Ireland 2022
- The Ecsite Conference Heilbronn, Germany 2022
- Summer School of Science Communication Split, Croatia 2021
- The 45th FEBS Virtual Congress, online 2021 (poster presentation)
- 20th FEBS Young Scientists' Forum, online 2021 (poster presentation)
- Education workshop - Better skills for better jobs, online 2020
- Science communication training, British Council Split, Croatia 2019
- Advances in biomedical Research III, Split, Croatia 2019
- 2nd Frankfurt Conference on Quality Control and 8th International p63/p73 Workshop 2018
- Apply Science to Your Everyday Work, Labtim Split, Croatia 2018

Publikacije:

- Direct and cost-effective method for histone isolation from cultured mammalian cells, Prep Biochem Biotechnol, 2023 (<https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2166958>) – first author
- SPRTN is involved in hepatocellular carcinoma development through the ER stress response, Cancer Gene Ther, 2023 (<https://doi.org/10.1038/s41417-023-00708-w>) – first author
- SPRTN-dependent DPC degradation precedes repair of damaged DNA: a proof of concept revealed by the STAR assay, Nucleic Acids Res, 2023 (<https://doi.org/10.1093/nar/gkad022>)

Održana znanstveno-popularna predavanja:

- predavanje – „Ovo je Sparta(n)“ u sklopu PhD Café doktoranada Hrvatske zaklade za znanost, Split, 2022.
- predavanje – “Možemo li mijenjati gene?”, Split, 2019
- predavanje – “Što radi molekularni biolog?”, Makarska, 2018

Certifikat:

- Tečaj za osposobljavanje za rad s eksperimentalnim životinjama – LabAnim, Zagreb, 2017.

Udruge:

- predsjednica Instituta za popularizaciju znanosti 2020 – 2022
- predsjednica Kluba mladih Split 2020 – 2022
- član udruge: Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Penkala, Start-up, Profesor Baltazar.

Ostalo:

- Studentski predstavnik u Vijeću Biološkog odsjeka 2015. – 2017.
- Praksa u laboratoriju Molekularne genetike na Zavodu za molekularnu biologiju, PMF Zagreb 2016.
- Predstavljanje Biološkog odsjeka PMF-a Zagreb na Smotri Sveučilišta, Zagreb (2015. i 2016.)
- Praksa u tvrtki BioGnost, Zagreb 2015.
- Demonstrator na kolegiju Praktikum organske kemije 2013. i na kolegiju Molekularna genetika 2016.