

Epigenetske promjene u mišjim modelima Ruijs-Aalfsovog sindroma i raka mokraćnog mjehura

Bošković, Maria

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:438147>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

MARIA BOŠKOVIĆ

**EPIGENETSKE PROMJENE U MIŠJIM MODELIMA
RUIJS-AALFSOVOG SINDROMA I RAKA
MOKRAĆNOG MJEHURA**

DOKTORSKI RAD

Split, 2022.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je provedeno uz potporu projekata Hrvatske zaklade za znanost, „Uloga upale u razvoju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura – iBC“ (šifra projekta IP-2014-09-1904), „Uloga mikrobiote u razvoju raka mokraćnog mjehura – μ BC“ (šifra projekta IP-2020-02-8921) i projekta Zaklade Adris „Kako SPRTN uzrokuje rak jetre?“.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Janoš Terzić

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Epigenetika	2
1.1.1. Mehanizmi epigenetske regulacije	2
1.2. Ruijs-Aalfs sindrom	4
1.2.1. SPRTN i Wss1	6
1.3. DPC (engl. <i>DNA-protein crosslink</i>)	6
1.3.1. DPC popravak i regulacija proteina SPRTN	7
1.4. Rak mokraćnog mjehura	9
1.4.1. Model za istraživanje raka mokraćnog mjehura	10
1.5. Epigenetika raka i starenja	10
2. HIPOTEZA I CILJEVI	13
2.1. Hipoteza	14
2.2. Ciljevi	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	16
3.1.1. Pokusne životinje	16
3.1.2. Drugi biološki materijali	17
3.1.3. Aparati	17
3.1.4. Oprema za miševе	18
3.1.5. Osnovne kemikalije	18
3.1.6. Puferske otopine	19
3.1.7. Enzimi i biljezi	20
3.1.8. Proteazni inhibitori	20
3.1.9. Korišteni kompleti (engl. <i>kits</i>)	21
3.1.10. Protutijela	21
3.1.11. Plazmidi	22
3.2.1. Tretman životinja N-butil-N-(4 hidroksibutil)-nitrozaminom (BBN) i studija na raku mokraćnog mjehura	23
3.2.2. Izolacija mišjih embrionalnih fibroblasta križanjem Spartan heterozigotnih jedinki	24
3.2.3. Pokus starenja Sprtn ^{+/+} , Sprtn ^{+/ki} i Sprtn ^{ki/ki} miševa	24
3.3. Metode	25
3.3.1. Histološka analiza	25
3.3.2. Imunohistokemija	25
3.3.3. Izolacija RNA i proteina iz tkiva	26

3.3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i agarozna gel elektroforeza za genotipizaciju Sprtn miševa	27
3.3.5. SDS PAGE i <i>western blot</i>	27
3.3.6. Southern <i>blot</i>	28
3.3.7. Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR	28
3.3.8. Sekvenciranje RNA	29
3.3.9. Transformacija bakterijskih stanica i izolacija plazmidne DNA	30
3.3.10. Transfekcija stanica	30
3.3.11. Imunoprecipitacija	31
3.3.12. Analize metiloma DNA	31
3.3.13. Pirosekvenciranje	33
3.3.14. Sekvenciranje ATAC (engl. <i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing</i>)	36
3.3.15. Statistički postupci	36
4. REZULTATI	39
4.1. Epigenetske promjene u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma	40
4.1.1. Karakterizacija mišjeg modela s Ruijs-Aalfsovim sindromom	40
4.1.2. Pronalazak novih interaktora proteina SPRTN	41
4.1.3. Analiza metiloma jetre	43
4.1.4. Potvrđivanje rezultata analize metiloma jetre	45
4.1.5. Analiza transkriptoma jetre	46
4.1.6. Potvrđivanje rezultata lipidnog metabolizma proizašlih iz analize transkriptoma	49
4.1.7. Poremećaji kromatina	50
4.1.8. Kromatinske promjene u primarnim mišjim embrionalnim fibroblastima Sprtn ^{ki/ki}	52
4.2. Epigenetske razlike između neinvazivnog i invazivnog raka mokraćnog mjehura	54
4.2.1. Indukcija tumora mokraćnog mjehura u miševa i probir uzoraka	54
4.2.2. Profiliranje metiloma raka mokraćnog mjehura	55
4.2.3. Mjerenje ukupnog genskog izražaja zloćudnih tumora mokraćnog mjehura	57
4.2.4. Analiza odnosa metiloma i transkriptoma u raku mokraćnog mjehura	58
4.2.5. Potvrđivanje metilacije i ekspresije odabranih kandidat gena	61
5. RASPRAVA	64
5.1. Abnormalnosti u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma	65
5.2. Metilomske i transkriptomске promjene u mišjem modelu raka mokraćnog mjehura	68
6. ZAKLJUČCI	71
6.1. Studija Ruijs-Aalfsovog sindroma	72
6.2. Metilom i transkriptomom tumora mokraćnog mjehura	72
7. LITERATURA	73
8. SAŽETAK	82

9. SUMMARY	84
10. ŽIVOTOPIS	86

POPIS OZNAKA I KRATICA

5mC	5 metil citozin
ACRC	<i>Acidic Repeat-Containing Protein</i>
BBN	N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin
BR	<i>Basic region</i>
CASP7	<i>Caspase-7</i>
CCNG1	<i>Cyclin-G1</i>
CIDEA	<i>Cell Death-Inducing DNA Fragmentation Factor-Alpha-Like Effector A</i>
CpG	citozin na kojeg je fosfodieterskom vezom vezan gvanin
CYP	<i>Cytochrome</i>
DDX24	<i>DEAD-Box Helicase 24</i>
DEG	diferencijalno eksprimiran gen
DMP	diferencijalno metilirana proba
DMPK	<i>DM1 Protein Kinase</i>
DMR	diferencijalno metilirana regija
DNMT1	<i>DNA Methyltransferase 1</i>
DNMT3A	<i>DNA Methyltransferase 3A</i>
DNMT3B	<i>DNA Methyltransferase 3B</i>
DPC	<i>DNA protein crosslink</i> , protein vezan kovalentnom vezom na DNA
DPYSL2	<i>Dihydropyrimidinase Like 2</i>
DVC1	<i>DNA damage-targeting VCP p97 adaptor C1orf124</i>
EDA2R	<i>Ectodysplasin A2 Receptor</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GATA6	<i>GATA Binding Protein 6</i>
HA	Hemaglutinin
ITIH5	<i>Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 5</i>
kb	kilobaza
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
MEF	mišji embrionalni fibroblasti
MIR143-145	<i>MicroRNA 143-145</i>
MMP12	<i>Matrix Metalloproteinases 12</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> , glasnička RNA
MYLK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i>
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i> , nekodirajuća molekula RNA
p97/VCP	<i>P97/Valosin Containing Protein</i>
PAX6	<i>Paired Box 6</i>
pb	par baza
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> , analiza glavnih komponenti
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCP4L1	<i>Purkinje Cell Protein 4 Like 1</i>
PIP	<i>PIP box</i> , <i>PCNA interacting motif</i>

PITX2	<i>Paired Like Homeodomain 2</i>
PLIN-2	<i>Perilipin 2/ADRP</i>
PPHLN1	<i>Periphilin 1</i>
PRDM10	<i>PR/SET Domain 10</i>
PRELP	<i>Proline And Arginine Rich End Leucine Rich Repeat Protein</i>
PRRC2B	<i>Proline Rich Coiled-Coil 2B</i>
PRUNE1	<i>Prune Exopolyphosphatase 1</i>
RBMS3	<i>RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 3</i>
RUNX1	<i>RUNX Family Transcription Factor 1</i>
SERPINB2	<i>Serpin Family B Member 2</i>
SHP	<i>SHP box, p97/VCP interacting motif</i>
SIM	<i>SUMO-interacting motif</i>
SOX5	<i>SRY-Box Transcription Factor 5</i>
SPRTN	<i>SprT-like N-terminal domain</i>
STN1	<i>STN1 Subunit Of CST Complex</i>
TET	<i>Ten Eleven Translocation</i>
UBZ	<i>Ubiquitin binding domain</i>
UHRF1	<i>Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains 1</i>
USP7	<i>Ubiquitin Specific Protease 7</i>
Wss1	<i>Weak Suppressor of Smt3-1</i>
XIST RNA	<i>X inactive specific transcript RNA</i>
ZBD	<i>Zinc Binding Domain</i>
ZMAT3	<i>Zinc Finger Matrin-Type 3</i>

1. UVOD

U ovoj su disertaciji proučavana dva, medicinski važna, entiteta i to: a. sindrom ubrzanog starenja praćen razvojem hepatocelularnog karcinoma, Ruijs-Aalfs sindrom te b. zloćudni tumori mokraćnog mjehura. Primarno su proučavani epigenetski aspekti navedenih stanja, a proučavanja su provedena na animalnim modelima. Ostvareni rezultati daju zanimljiv uvid u mehanizme razvoja navedenih bolesti, te mogu biti osnova važnih budućih istraživanja kao i polazište novih prognostičkih, dijagnostičkih ali i terapijskih mjera.

1.1. Epigenetika

Naziv „epigenetika“ prvi je upotrijebio Conrad Waddington 1942. godine kako bi objasnio urođene promjene različitih staničnih fenotipova, a koji su neovisni o promjenama u sekvenci DNA [1,2]. Različiti su načini epigenetske regulacije te uključuju: i. metilaciju DNA, ii. modifikacije histona, proteina koji su u bliskom kontaktu s DNA, te iii. učinke nekodirajućih molekula RNA koje sudjeluju u regulaciji ekspresije (izražaj, transkripcija) gena [3]. Epigenetika se može definirati kao nasljedne informacije, koje se prenose mitozom ili mejozom, a koje ne uzrokuju promjenu nukleotidne sekvence u molekuli DNA [1]. Epigenetske promjene kao i regulacija transkripcije gena ključni su mehanizmi određivanja stanične fiziologije i staničnog identiteta, tj. omogućuju razlikovanje, npr. mišićne od živčane stanice [4]. Također, epigenetske karakteristike se mijenjaju sa starenjem. Sve se više ističe važnost epigenetske deregulacije u nastanku i progresiji zloćudnih tumora, te se od nedavno epigenetske promjene svrstavaju među ključna obilježja (engl. *hallmarks*) zloćudnih tumora [5]. Na epigenetske promjene mogu utjecati egzogeni i endogeni čimbenici. Svakako je potrebno naglasiti da su epigenetske promjene reverzibilne što ih čini važnom polugom u razvoju novih preventivnih i terapijskih mjera, te su u tom smislu velika očekivanja od budućih epigenetskih istraživanja.

1.1.1. Mehanizmi epigenetske regulacije

Epigenetička informacija regulirana je s tri osnovna mehanizma: metilacijom DNA, modifikacijama histona i nekodirajućim molekulama RNA. Epigenetičke modifikacije dovode do novačenja različitih proteina na DNA, poput molekula transkripcijske mašinerije, što utječe na izražaj gena i reorganizaciju kromatina. Ti su mehanizmi ključni za održavanje stanja matičnosti stanica, diferencijaciju stanica, regulaciju izražaja gena, zaštitu od egzogenih gena i za embrionalni razvoj [6].

Metilacija DNA

U genomu sisavaca najprisutnija epigenetička modifikacija je metilacija DNA na dinukleotidima CpG, odnosno kovalentna adicija metilne skupine na peti atom ugljika na citozinu (5mC) iza kojeg slijedi gvanin (p iz CpG označava fosfat iz fosfodiesterske veze, okosnice lanca DNA) [7]. Genomska područja bogata ovim dinukleotidima nazivaju se otoci CpG, a najčešće se nalaze u promotorskim regijama gena gdje imaju ključnu ulogu u kontroli genske aktivnosti posredstvom metilacije DNA. Promjene metilacije DNA pokreću reorganizaciju strukture kromatina što posljedično dovodi do promjene dostupnosti gena za transkripciju i samim time utječe na njegov izražaj. Zbog toga je metilacija DNA davno prepoznata kao ključni stanični mehanizam u embriogenezi kao i u razvoju mnogih bolesti [7].

Hipometilacija promotora često rezultira povećanom aktivnošću gena dok hipermetilacija dovodi do smanjene aktivnosti gena ili njegovog utišavanja [8]. Održavanje metilacijskog profila u ponavljajućim sekvencama DNA važno je za genomsku stabilnost zbog supresije premještanja transpozonskih i retrotranspozonskih elemenata širom genoma [9]. Regulacija ove modifikacije može se podijeliti u tri faze: uspostavljanje metilacijskog obrasca (*de novo* metilacija DNA), održavanje metilacijskog obrasca i uklanjanje metilne skupine, odnosno demetilacija [9]. Enzimi čija je uloga uspostavljanje i održavanje metilacijskog uzorka unutar dinukleotida CpG nazivaju se DNA metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferase*, DNMT). Kod sisavaca su opisane dvije katalitički aktivne DNA metiltransferaze, DNMT3A i DNMT3B, koje su bitne za uspostavljanje metilacije DNA u ranom embrionalnom razvoju te na taj način reguliraju tkivno-specifično prepisivanje gena i diferencijaciju stanica [10]. Tijekom mitotičke diobe, stanice kćeri nasljeđuju metilacijski status od stanice majke kroz aktivnost održavateljske metiltransferaze 1 (DNMT1), tj. E3 ubikvitin ligaza UHRF1 regrutira DNMT1, koja prema obrascu metilacije starog lanca, uvodi metilacijsku oznaku na novosintetizirani lanac DNA [11]. Metilna skupina na citozinu može se ukloniti pasivno (npr. tijekom vala embrionalnog reprogramiranja) ili kroz aktivnu demetilaciju pomoću enzima TET (engl. *Ten-eleven translocation*) [12].

Posttranslacijske modifikacije histona

DNA eukariota je „upakirana“ u strukturu kromatina pomoću histonskih i nehistskih proteina. Osnovna građevna jedinica kromatina je nukleosom, a čini ga lanac DNA duljine 147 parova baza (pb) omotan oko histonskog oktamera, proteinskog kompleksa kojeg čini H3-H4 dimer okružen tetramerom sastavljenom od dva H2A-H2B kompleksa [13]. Posttranslacijske modifikacije N- i C- terminalnih repova histona rezultiraju njihovim promjenama koje, uz

ostale epigenetičke mehanizme, sudjeluju u uspostavljanju i održavanju genskog izražaja. Histoni mogu biti promijenjeni posttranslacijskim modifikacijama kao što su metilacija, acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, ADP-ribozilacija i brojne druge [14]. Kroz kovalentne modifikacije histoni usmjeravaju različite stanične procese, poput transkripcije, replikacije DNA ili popravka DNA, a kombinacije različitih modifikacija na histonima nazivamo „histonskim kodom“ [13].

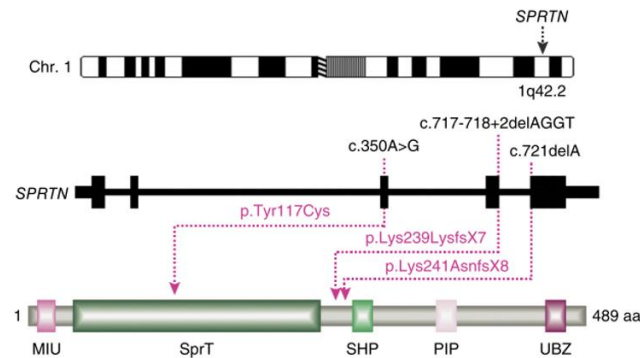
Nekodirajuće molekule RNA

Male nekodirajuće molekule RNA (engl. *non-coding* RNA, ncRNA) dio su regulacije brojnih staničnih procesa, pa tako i onih vezanih za inicijaciju i progresiju tumora [15]. Radi se o molekulama mikroRNA (ili miRNA) sastavljenim od oko 21 nukleotida koje sprječavaju translaciju glasničke RNA (engl. *messenger* RNA, mRNA) u protein, vezujući se na sebi komplementarne sljedove u molekuli mRNA što rezultira njihovom razgradnjom [16]. Postoje i molekule ncRNA sastavljene od više nukleotida tzv. lncRNA (engl. *long non-coding* RNA) koje sudjeluju u kromatinskom remodeliranju. Primjerice, u embrionalnom razvoju ženki sisavaca nekodirajuća RNA XIST (engl. *X inactive specific transcript*), vezanjem na kromatin predstavlja okidač za inaktivaciju jednog kromosoma X što je signal za uvođenje specifičnih histonskih modifikacija nakon čega slijedi završno zaključavanje metilacijom DNA [17]. Dinamična izmjena reverzibilnih kemijskih oznaka u strukturi molekula ncRNA utječe na njihovu funkciju i aktivnost te predstavlja model posttranskripcijskog regulatornog mehanizma [15].

1.2. Ruijs-Aalfs sindrom

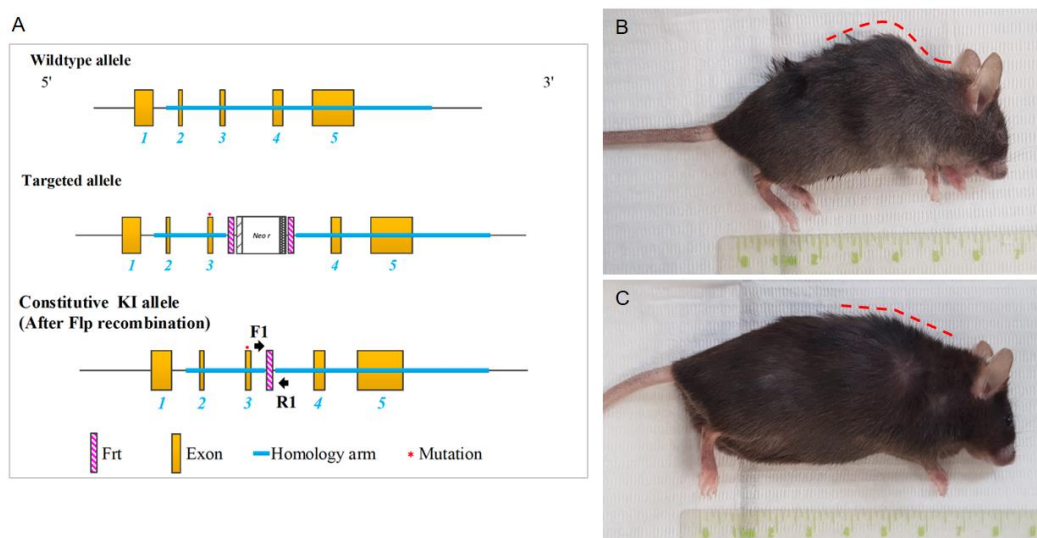
Ruijs-Aalfs sindrom je rijetka autosomno recesivna bolest uzrokovana mutacijom u genu *SPRTN* [18]. Svi poznati pacijenti pokazivali su genomsku nestabilnost, ubrzano starenje (sijedenje kose, tjelesno propadanje, katarakta, kifoza) te su u adolescentskoj dobi razvili hepatocelularni karcinom [19]. Jedan od pacijenata je imao homozigotnu deleciju jednog baznog para na početku petog egzona što je rezultiralo s pomakom okvira čitanja, uvođenjem preranog stop kodona i delecijom C-terminalnog dijela proteina SPRTN (ovaj alel je nazvan *SPRTN-ΔC*) (Slika 1). Ostala dva pacijenta bili su heterozigoti s mutacijom sličnoj alelu *SPRTN-ΔC*, ali uzrok nastale promjene je pomak okvira čitanja na četvrtom egzonu. Promjena na drugom alelu tih pacijenata bila je točkasta mutacija koja je rezultirala supstitucijom

aminokiseline tirozin (Tyr, Y) u cistein (Cys, C) na poziciji 117 u metaloproteaznoj domeni proteina SPRTN (ovaj je alel označavan sa *SPRTN-Y117C*) (Slika 1) [19].



Slika 1. **Genomska lokalizacija i struktura proteina SPRTN.** *SPRTN* se kod ljudi nalazi na kromosomu 1, a sam gen se sastoji od pet egzona (označeni kao pravokutnici na središnjoj shemi). Ljubičaste strelice pokazuju poziciju mutacija u genu te lokaciju tih promjena na razini proteina. Proteinski dijagram prikazuje funkcionalne domene proteina SPRTN (MIU, SprT, SHP, PIP i UBZ). Preuzeto i prilagođeno prema Lessel i sur. [19].

SPRTN je jedini poznati gen koji je uzročno povezan s rakom jetre, što je otkrila naša istraživačka grupa [19]. Kako bi detaljno istražili ulogu proteina *SPRTN*, miševima smo uveli supstitucijsku mutaciju pronađenu kod Ruijs-Aalfs pacijenata (miševi *Sprtn^{ki/ki}*) nakon čega su razvili kliničku sliku kakva je prisutna i u ljudi. Radi se o homozigotnoj mutaciji na poziciji Y118C koja odgovara alelu *SPRTN-Y117C* pronađenom kod Ruijs-Aalfs pacijenata (Slika 2). Kod sisavaca *SPRTN* je nužan za staničnu vijabilnost pa je embrij miša s delecijom gena *Sprtn* (*Sprtn^{-/-}*) embrionalno letalan [18].



Slika 2. **Model za Ruijs-Aalfsov sindrom.** (A) *Sprtn-Y118C* mutacija u genomu miša odgovara humanom *SPRTN-Y117C* alelu. Uvedena mutacija dovodi do razvoja Ruijs-Aalfs progeroidnog

fenotipa (nedostatak oka, kifoza, sijedenje, manji su i lakši) kod miševa *Sprtn*^{ki/ki} (B) u usporedbi s jednako starom kontrolom, *Sprtn*^{+/+} (C). Na slici B i C su prikazane ženke stare 22 mjeseca.

1.2.1. SPRTN i Wss1

Bioinformatičkim pristupom analize sličnosti sekvence i organizacije domena, istraživači su pronašli da je metaloproteaza Wss1 (engl. *Weak Suppressor of Smt3-1*) iz pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* funkcionalni ortolog gena *SPRTN* u višim eukariotima (engl. *SprT-like N-terminal domain*), također spominjan i kao *DVCI* (engl. *DNA damage-targeting VCP p97 adaptor C1orf124*) [20]. SPRTN i Wss1 sadrže proteazne domene s konzerviranim HEXXH aktivnim mjestom, motivom odgovornim za interakciju proteina sa segregazom p97/Cdc48, a u viših eukariota s p97/VCP [21]. Obje metaloproteaze sadrže SUMO-interakcijski motiv (SIM) i ubikvitin-vezujuću domenu (UBZ). Za SPRTN je karakteristično i vezno mjesto za PCNA (engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) nazvano PCNA-interakcijski motiv (engl. *PIP box*), a domena preko koje stupa u interakciju s ATPazom p97/VCP naziva se regija SHP (engl. *SHP box*) [22].

Humani SPRTN sastoji se od 489 aminokiselina što odgovara masi od 55 kDa, s N-terminalnom proteaznom domenom (SprT) nakon koje slijedi cink-vezujuća domena (engl. *Zinc binding domain*, ZBD), bazična regija (engl. *Basic region*, BR) i C-terminalni rep koji nosi protein-protein interakcijske domene SHP, PIP i UBZ (Slika 1) [23]. Domene ZBD i BR su DNA-vezujuće domene koje vežu jednolančanu i dvolančanu DNA [24].

Osim što dijele organizaciju domena, SPRTN i Wss1 proteaze imaju jednaku ulogu *in vivo* i sličnu aktivnost *in vitro* [25] te su esencijalne za zaštitu integriteta genoma u različitim vrstama. Naime, obje proteaze dio su popravka DNA nazvanog DPC popravak (engl. *DNA-protein crosslink repair*) u kojemu se uklanjanju proteini koji su kovalentno vezani na DNA, a kako bi se mogli pravilno odvijati osnovni stanični procesi – replikacija DNA, transkripcija, vezanje proteina za DNA kao i ostale vrste popravka DNA [25].

1.3. DPC (engl. *DNA-protein crosslink*)

Interakcije između DNA i proteina važne su za brojne stanične procese, kao što su dioba stanica, transkripcija i replikacija DNA. Ove su interakcije uglavnom prolazne, no ponekad proteini mogu ostati trajno vezani za DNA [26]. Takve lezije, tzv. adukti DPC (engl. *DNA-protein crosslink*), remete pravilno stanično funkcioniranje ako se ne uklone. Uz to, nakupljanje

DPC-ijeva ima citotoksični učinak pa su stanice razvile mehanizme popravka kojima razrješavaju takve vrste oštećenja [27].

Adukti DPC mogu se podijeliti na enzimatske i ne-enzimatske. Enzimatski DPC-ijevi nastaju aktivnošću specifičnih proteina koji stvaraju kovalentne posrednike na DNA kao dio svog katalitičkog djelovanja. Takve DPC-ijeve najčešće uzrokuju topoizomerase, polimeraze, metiltransferaze, glikozilaze DNA ili apurinske i apirimidinske liaze [26]. Ne-enzimatski adukti nastaju uslijed izlaganja radijaciji i različitim toksičnim agensima (poglavito aldehydima) koji u trenutku izloženosti uzrokuju kovalentno vezanje nespecifičnih proteina koji su se našli u blizini DNA. Obje vrste DPC-ijeva mogu biti inducirane različitim endogenim i egzogenim agensima, uključujući kemoterapeutike u široj upotrebi (kamptotecin, etoposid, 5-aza-2'-deoksicitidin, cisplatin, oxaliplatin, karboplatin), ionizirajuće zračenje i UV zračenje [28]. Jedan od najpotentnijih induktora DPC-ijeva je formaldehid, kemijski spoj prisutan u okolišu i produkt endogenih staničnih procesa nakon lipidne peroksidacije te demetilacije DNA, RNA i histona [28]. Formaldehid će prouzročiti kovalentno vezanje svih proteina u blizini DNA u trenutku izloženosti koje stanica treba razriješiti za daljnje pravilno funkcioniranje.

1.3.1. DPC popravak i regulacija proteina SPRTN

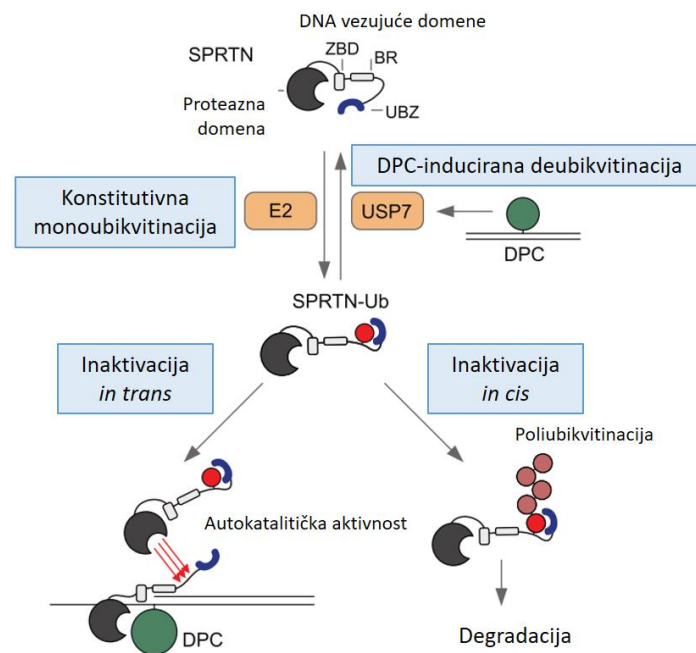
Sve tri komponente DPC – DNA, protein i kovalentna veza – mogu biti signal za inicijaciju popravka, ali za uspješno razrješavanje takvih adukata potrebna je kombinirana aktivnost više mehanizama djelujući na svaku pojedinu komponentu DPC-ija [29]. Princip popravka i način na koji će se odviti uvelike ovisi o prirodi nastalog kompleksa, ali i o proteolitičkoj razgradnji proteinske komponente, kao ključnog događaja tijekom popravka [23]. Osnovni mehanizmi popravka DPC-ijeva su: 1. proteoliza, 2. popravak koji prati replikaciju (engl. *replication-coupled DPC repair*) 3. hidroliza i 4. nukleolitičko cijepanje [23].

SPRTN sudjeluje u popravku DPC-ijeva proteolizom. Poznati pripadnici proteolitičkog puta uklanjanja DPC-ijeva, uz SPRTN, su proteasomi i proteaza ACRC (engl. *Acidic Repeat-Containing Protein*) [26]. Točan mehanizam kojim SPRTN rješava lezije DPC još se istražuje, ali ono što se do sada zna jest to da je SPRTN aktivan u prisustvu DNA, a njegova aktivacija zahtjeva obje DNA vezujuće domene (ZBD i BR). Za aktivaciju proteina SPRTN potrebne su strukture DNA koje imaju jedno- i dvo- lančane karakteristike, točnije jedno- i dvo- lančane spojnice DNA ili strukturu DNA mjehurića [24]. SPRTN posjeduje autokatalitičku aktivnost *in trans* što inaktivira enzim i uklanja ga s kromatina (Slika 3) [23]. Negativno je reguliran ubikvitinom na dva načina (Slika 3). Naime, u stanici je 30-50% proteina SPRTN konstitutivno

monoubikvitinirano, što pojačava njegovu inaktivaciju *in trans* potičući autokatalitičku aktivnost proteina [30]. Nadalje, ova modifikacija uzrokuje inaktivaciju *in cis* dajući signal za SPRTN poliubikvitinaciju, tako navodeći protein na proteasomalnu razgradnju [31].

Nakon signalizacije za DPC popravak USP7 (engl. *Ubiquitin Specific Protease 7*, poznat i kao HAUSP) deubikvitinira SPRTN čime blokira negativnu autoregulaciju omogućujući proteolitičku aktivnost proteina SPRTN u DPC popravku (Slika 3) [31]. Nakon proteolize, DPC-ijevi nisu kompletno uklonjeni s lanca DNA jer ostaju kovalentno vezani peptidi koji su dalje procesirani putem drugih mehanizama DPC popravka, npr. nukleolitičkim cijepanjem ili hidrolizom [26].

Nepotpun ili defektan popravak DPC rezultira povećanom osjetljivošću na agense koji potiču stvaranje kovalentnih veza, poremećenom replikacijom i transkripcijom DNA te abnormalnostima staničnoga ciklusa, što uzrokuje genomsku nestabilnost i potiče karcinogenezu kod ljudi i miševa [18,19,28].



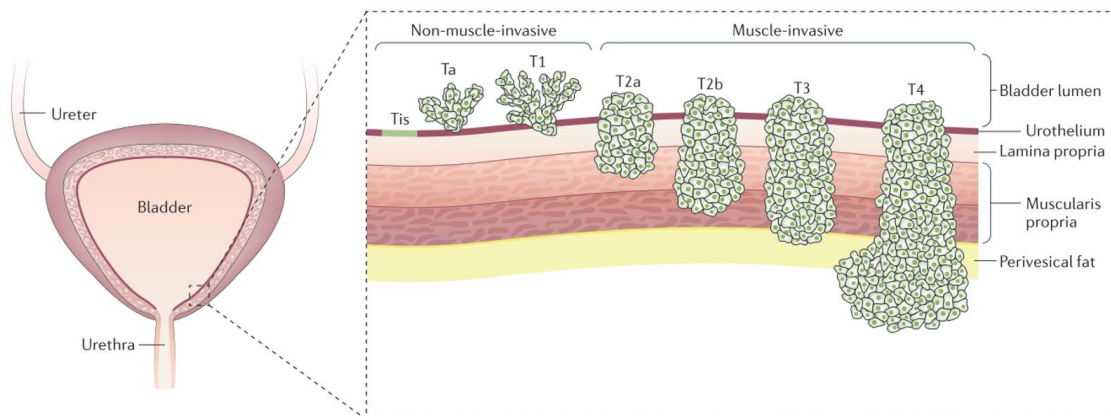
Slika 3. Regulacija proteina SPRTN monoubikvitinacijom i deubikvitinazom USP7. Dio proteina SPRTN je konstitutivno monoubikvitinirano na C-terminalnom dijelu domene UBZ. Monoubikvitinacija vodi do inaktivacije enzima autokatalitičkom razgradnjom proteina (*in trans*) odnosno proteasomalnom razgradnjom (*in cis*). Nakon signalizacije DPC, USP7 sprječava inhibitornu aktivnost proteina SPRTN putem deubikvitinacije.

ZBD, cink-vezujuća domena; BR, bazična regija; UBZ, ubikvitin-vezujuća domena; E2, ubikvitin konjugirajući enzim; USP7, ubikvitin specifična proteaza 7; DPC, protein vezan kovalentnom vezom na DNA; SPRTN-Ub, monoubikvitinirani SPRTN. Preuzeto i prilagođeno od Zhao i sur. [31].

1.4. Rak mokraćnog mjehura

Rak ili zloćudni tumor mokraćnog mjehura zauzima deveto mjesto po učestalosti među malignim bolestima u svijetu, s tri puta češćom incidencijom u muškaraca [32]. Najčešći simptom je bezbolna mikroskopski ili makroskopski vidljiva hematurija (krv u urinu) [33]. Makro-hematurija povezuje se s odmaklim stadijem bolesti, dok pacijenti s mikro-hematurijom često nisu otkriveni na vrijeme zbog manjka preventivnih pregleda za ovaj oblik raka. Osim hematurije simptomi su teškoće s mokrenjem, često mokrenje ili učestala potreba za mokrenjem [33].

Većina karcinoma mokraćnog mjehura potječe iz prijelaznog epitela (urotela) koji gradi unutarnji lumen mjehura (Slika 4). Približno 75% novo dijagnosticiranih pacijenata ima mišićno neinvazivan tumor, a 25% novih slučajeva bude otkriveno u mišićno invazivnom stadiju [33]. Tumori koji prodru u mišićni sloj mjehura (*m. detrusor*) klasificiraju se kao mišićno invazivni tumori mokraćnog mjehura te imaju puno veću vjerojatnost za metastaziranje u limfne čvorove ili druge organe (Slika 4) [34]. Iako se većina pacijenta otkrije u mišićno neinvazivnom stadiju bolesti, rak mokraćnog mjehura često recidivira i tada se pretežito javlja u agresivnijem obliku tj. kao rak koji se iz epitela širi na mišićni sloj mokraćnog mjehura što zahtjeva cjeloživotno liječenje.



Slika 4. **Oblici i stadiji tumora mokraćnog mjehura.** Stadiji tumora prema TNM (engl. *Tumor, Node, Metastasis*) klasifikaciji. *Carcinoma in situ* (Tis prema TNM) je ograničen na sluznicu mjehura (urotel), a papilarni tumori (Ta i T1) prodiru u laminu propriu (vezivni sloj) – klasificirani su kao mišićno neinvazivni tumori mokraćnog mjehura (engl. *Non-muscle-invasive*). Tumori koji su prodrli u mišićni sloj, početno invazivni (T2a) ili duboko invazivni (T2b), klasificirani su kao mišićno invazivni rak mokraćnog mjehura (engl. *Muscle-invasive*), kao i tumori koji su prešli u perivezikalno tkivo (T3) ili dobili metastatski potencijal za invaziju u okolne organe (T4). Preuzeto i prilagođeno prema Sanli i sur. [35].

Čimbenici rizika za razvoj raka mokraćnog mjehura obuhvaćaju konzumaciju zagađene vode i hrane (npr. kontaminiranu arsenom), infestaciju parazitom *Schistosoma haematobium*, izloženost aromatskim aminima i izlaganje štetnim tvarima na radnom mjestu, dok je vodeći čimbenik rizika za razvoj ove bolesti izlaganje karcinogenima iz duhanskog dima [36]. Smatra se da je pušenje odgovorno za polovicu svih slučajeva, s potrebnim vremenskim odmakom od 20 do 30 godina od izlaganja do dijagnoze [37].

Mortalitet od raka mokraćnog mjehura ne opada zbog nedostataka adekvatne terapije za bolest u uznapredovanom stadiju te se smatra da će se u budućnosti broj slučajeva udvostručiti, jer se radi o bolesti koja se dijagnosticira iznad 65. godine života, a životni vijek se produžio [33].

1.4.1. Model za istraživanje raka mokraćnog mjehura

U pred kliničkim istraživanjima, za indukciju raka mokraćnog mjehura najčešće se koristi nitrozamin BBN (*N*-butil-*N*-(4-hidroksibutil)-nitrozamin), karcinogen koji u visokoj mjeri uzrokuje invazivne tumore mokraćnog mjehura kod miševa [38]. BBN je metabolit *N*-nitrozo-di-*N*-butilamina, sastavnog dijela duhanskog dima [39]. Budući da je pušenje odgovorno za više od pola dijagnosticiranih tumora mokraćnog mjehura [40], a BBN ciljano uzrokuje tumore mjehura kod miševa s najvećim mutagenim efektom na urotel [39], ovaj spoj je gotovo idealan za istraživanje nastanka i progresije ove bolesti. Uz to, BBN inducira promjene koje molekularno i histološki nalikuju humanom mišićnom invazivnom raku mokraćnog mjehura [41]. Karcinogeni učinak BBN-a leži u oštećenju DNA alkilacijom i nakupljanjem mutacija koje vode do invazivnog tumora mokraćnog mjehura [38].

Miševima se BBN daje putem vode za piće u koncentraciji između 0,05% i 0,1% [38]. Nakon dva tjedna tretmana životinje postupno razviju degenerativnu atipiju, displaziju te upalu koja se progresivno smanjuje u narednim tjednima tretmana do početka razvoja primarnog *carcinoma in situ*. Nakon 12 tjedana tretmana BBN se zamjenjuje vodom još osam tjedana (ukupno trajanje tretmana 20 tjedana) nakon čega dio miševa razvije invazivne karcinome mokraćnog mjehura, što se manifestira kao invazija urotelnih stanica u mišićni sloj mjehura [37,41].

1.5. Epigenetika raka i starenja

Poznato je da su epigenetički mehanizmi „senzori“ izloženosti i „medijatori“ staničnog odgovora na endogene i okolišne čimbenike [6,42]. U skladu s ovom tvrdnjom, narušavanje regulacije epigenoma prate promjene u izražaju gena, što je u podlozi biologije starenja te

nastanka i progresije tumora [43], stoga se epigenetika sve više uključuje u područja istraživanja raka i starenja.

U procesu karcinogeneze nakupljaju se genetičke i epigenetičke promjene koje dovode do narušavanja homeostatske ravnoteže između proliferacije stanica i stanične smrti [44]. Događaji poput utišavanja tumor supresorskih gena, aktivacije onkogeni ili poremećaja u mehanizmu popravka DNA mogu biti potaknuti ne samo genetičkim promjenama, već i epigenetskom deregulacijom [44]. Za maligne stanice je karakteristična globalna hipometilacija u otocima CpG, genomskim regijama bogatim dinukleotidima CG koji su u sisavaca najzastupljeniji u promotorima gena (~70%) [45], stoga ove promjene imaju direktan utjecaj na izražaj gena. Više neovisnih studija je pokazalo da epigenetsko reprogramiranje (metilacija DNA) počinje u ranom stadiju tumorigeneze [37,46,47]. Razvojem novih tehnologija možemo detektirati epigenetske promjene na početku razvoja bolesti budući da tumorske stanice podliježu procesima oslobađanja tumorske DNA u tjelesne tekućine, što pruža mogućnost detekcije tih promjena iz uzoraka prikupljenih tekućinskom biopsijom [48].

Starenje je multifaktorijski biološki proces opadanja fizioloških funkcija što dovodi do povećane podložnosti za razvoj kroničnih bolesti poput raka, metaboličkih, kardiovaskularnih, muskuloskeletalnih i neurodegenerativnih bolesti [43]. U osnovne osobine starenja (engl. *hallmarks of aging*) uvršteno je devet karakteristika: genomska nestabilnost, skraćivanje telomera, gubitak proteostaze, smanjenje sposobnosti stanica na prilagođavanje svoga metabolizma količini dostupnih hranjivih tvari (engl. *deregulated nutrient-sensing*), disfunkcija mitohondrija, stanična senescencija, iscrpljivanje matičnih stanica, promijenjena međustanična komunikacija i epigenetska deregulacija [49]. Obzirom da su epigenetske promjene reverzibilne i da se starenjem mijenjaju, znanstvenici ulažu sve veće napore za razumijevanje epigenetskih promjena u starenju [50–52]. U tom kontekstu, trenutno je najveći fokus na promjenama metilacije DNA prilikom starenja [53,54]. Tijekom životnog vijeka događaju se dinamične izmjene metilnih skupina na dinukleotidima CpG (pomoću enzima iz obitelji DNMT i TET) jer metilom (epigenom) posreduje interakciju između genoma i okoliša [54]. Stoga su promjene u metilomu rezultat okolišnih čimbenika i životnog stila. Štoviše, integritet metiloma je usko povezan sa zdravim starenjem, a promjena metilacijskog obrasca povezana je i s bolestima vezanima za starenje, uključujući Alzheimerovu bolest, kardiovaskularne bolesti i rak [53].

Na prvi pogled rak i starenje mogu izgledati kao dva potpuno različita procesa s obzirom da je rak posljedica aberantnog povećanja stanične sposobnosti, dok je starenje okarakterizirano kao gubitak stanične sposobnosti za izvršavanje svoje funkcije (engl. *loss of fitness*) [49]. Međutim, u osnovi se s vremenom nakupljaju stanična oštećenja u procesu starenja, ali i u

stanicama raka, te na taj način stanica može dobiti tumorigeni potencijal [49]. Nadalje, nekoliko patoloških procesa povezanih sa starenjem, poput ateroskleroze ili upale, prate nekontrolirani stanični rast ili hipereaktivnost stanica [55]. Epigenetske promjene važan su element patogenosti u oba slučaja [5,49], a njihova reverzibilnost pruža mogućnost razvoja novih pristupa u liječenju i prevenciji raka te razumijevanju biologije starenja s mogućnošću intervencije na sam proces, pa tako i na progeroidne sindrome.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza

Epigenetske promjene su važan element patogeneze Ruijs-Aalfsovog sindroma i invazivnosti tumora mokraćnog mjehura.

Specifičnije definirano:

- I. Zbog fenotipa Ruijs-Aalfsovog sindroma pretpostavljen je poremećaj metilacije i strukture kromatina, uslijed nepravilne interakcije proteina SPRTN s DNMT1 i UHRF1.
- II. Budući da su promjene u metilaciji DNA ključno obilježje zloćudnih tumora, pretpostavljamo da postoje epigenetske promjene na početku invazivnosti tumora mokraćnog mjehura.

2.2. Ciljevi

Našim istraživanjima želimo utvrditi:

- I. Epigenetske promjene u Ruijs-Aalfsovom sindromu.

Profilirajući epigenom miševa $Sprtn^{ki/ki}$ analizom metiloma DNA uz određivanje otvorenih regija kromatina za detekciju transkripcijski aktivnih područja u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma. Cilj ovih istraživanja je pronaći deregulirane (epi)genomske regije čije promjene sudjeluju u razvoju ovog sindroma. Utvrditi interakciju proteina SPRTN s regulatorima epigenetske informacije (metilacije DNA), primarno s DNMT1.

- II. Epigenetske razlike između neinvazivnog i invazivnog raka mokraćnog mjehura.

Odrediti metilomske DNA promjene u neinvazivnom i invazivnom tumoru mokraćnog mjehura miša te utvrditi odraz tih promjena na ekspresiju gena. Svrha ovih eksperimenata je pronalazak mogućih biomarkera za praćenje bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusne životinje

Miševi (lat. *Mus musculus*) su održavani u standardnim uvjetima nastambe; 12-satni ciklus svjetla i tame s kontroliranom sobnom temperaturom (21-24°C) i vlagom od 55% (+/- 20%). Hrana, voda i stelja za miševe je sterilizirana γ -zračenjem, odnosno autoklaviranjem. Životinjama se mijenjala voda i stelja jednom tjedno. Miševi su imali stalni pristup hrani i vodi *ad libitum* te su uzgajani u nastambi za životinje Medicinskog fakulteta u Splitu. Životinje su certificirane kao SPF (engl. *specific pathogen free*), odnosno nije dokazana prisutnost patogenih mikrobnih sojeva koji bi mogli utjecati na zdravlje životinja i rezultate istraživanja.

Za pokuse vezane za studiju epigenetskih promjena u Ruijs-Aalfsovom sindromu, korišteni su miševi soja C57BL/6J s uvedenom mutacijom u genu *Sprtn*. Radi se o homozigotnoj mutaciji na poziciji Y118C gena *Sprtn* koja odgovara mutaciji Y117C pronađenoj kod Ruijs-Aalfs pacijenata. Transgenični, tzv. *knock-in* *Sprtn* miševi ($Sprtn^{ki/ki}$) nabavljeni su od firme Cyagen Biosciences Inc. U pokusima su korištene jedinke oba spola, starosti od 15,5 dana embrionalnog razvoja do 130 tjedana starosti. Uz $Sprtn^{ki/ki}$, koristili smo heterozigotne jedinke ($Sprtn^{+/ki}$) te soj miševa divljeg tipa ($Sprtn^{+/+}$) kao kontrole. Tjelesna masa im je varirala, ovisno o genotipu i starosti životinja, između 10 g i 40 g. Dio miševa $Sprtn^{ki/ki}$ je embrionalno letalan pa broj životinja u ispitivanim skupinama ovisi o zastupljenosti genotipova u heterozigotnom križanju. Životinje smo prilikom odvajanja od majke (21. dan starosti) označavali na uški. Nakon prikupljanja komadića uške ili vrha repa biopsijom, slijedila je izolacija DNA i genotipizacija korištenjem lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR).

U istraživanjima epigenetskih promjena raka mokraćnog mjehura koristili smo standardne laboratorijske miševe divljeg tipa, soja C57BL/6J, naručene od firme Jackson Laboratory. U ovom pokusu korišteni su mužjaci jer je rak mokraćnog mjehura tri puta češći u muškaraca [35]. Starost životinja korištenih u ove svrhe je od šest do osam tjedana, tjelesne mase između 20 g i 25 g. Kako bi inducirali rak mokraćnog mjehura miševi su bili tretirani 12 tjedana N-butyl-N-(4 hidroksibutil)-nitrozaminom (BBN-om) putem vode za piće, nakon čega su pili autoklaviranu vodu dodatnih osam tjedana (ukupno trajanje tretmana je 20 tjedana). Za to vrijeme je kontrolna skupina uzimala autoklaviranu vodu.

Za pokuse na miševima ishodovana su potrebna etička odobrenja (broj dozvola: 525-10/0255-14-4 i 525-10/0543-20-3 te 525-10/0255-15-5 i 525-10/0543-21-4).

3.1.2. Drugi biološki materijali

Za pokuse na stanicama korišteni su primarni mišji embrionalni fibroblasti (engl. *mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) generirani od embrija starih 15,5 dana te stanična linija HeLa (imortalizirane stanice adenokarcinoma vrata maternice). Stanice su održavane u inkubatorima predviđenima za uzgoj stanica na temperaturi 37°C u zraku koji sadrži 5% CO₂. Mišji embrionalni fibroblasti kultivirani su u hranjivom mediju *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (DMEM) (Sigma) s dodatkom 10% goveđeg seruma (Capricorn), 100 mM natrij piruvata (Sigma), 200 mM L-glutamata (Gibco) i penicilina (10⁷ Units/L) – streptomicina (10000 mg/L) (Capricorn). Stanična linija HeLa održavana je u DMEM-u suplementiranom s 10% goveđeg seruma i mješavinom antibiotika penicilin (10⁷ Units/L) – streptomycin (10000 mg/L).

U svrhu umnažanja plazmidne DNA korištene su bakterije *Escherichia coli* soj DH5α (F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1). Bakterije su umnažane u LB (engl. *Luria-Bertani broth*) mediju. Za uzgoj bakterija *E. coli* korištene su tekuća (1% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl) i kruta (1% bakto tripton, 0.5% ekstrakt kvasca, 0.5% NaCl, 0.5% agar) sterilizirana hranjiva podloga LB. Podloge su sterilizirane autoklaviranjem, u trajanju od 20 min na 121°C. U podlogu LB koja se je koristila za selekciju transformiranih bakterija, dodan je ampicilin (Roth) konačne koncentracije 50 mg/ml jer je transformacija napravljena plazmidom s ampicilnskom rezistencijom.

3.1.3. 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 Fisher Scientific), inkubator Economy Incubator with fan Size 1 (Gallenkamp), inkubator Heraeus Hera Cell 150 (Thermo Fisher Scientific), inkubator Memmert (Memmert), NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen), PCR uređaji Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) i Eppendorf Mastercycler Personal (Sigma), Real Time PCR uređaj BioRad CFX96 Real-Time System (C1000 231 Touch Thermal Cycle) (Bio-Rad), homogenizator za tkiva Precellys Minilys (Bertin Instruments), homogenizator za tkiva BioPulverizer (BioSpec), mikrotom RM2125 RTS (Leica), roteks general rotator STR4 (Stuart), sonikator SONOPULS HD 2200 (Bandelin), spektrofotometar DU 530 Life Science

UV/VIS Spectrophotometer (Beckman Coulter), sustav za prijenos proteina Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), svjetlosni i fluorescentni mikroskop Olympus BX43 mikroskop (Olympus Corporation), termoblok Termo Shaker Incubator Thriller (Preqlab), uređaj za imunoblot dokumentaciju i analizu gelova Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad), UV transiluminator (Elchrom Scientific AG), vage (Mettler Toledo), vibracijska miješalica BioVortex V1 (Biosan), vodena kupelj (Precisdig Selecta), PyroMark Q96ID instrument (Qiagen), Tecan liquid handling robot (Tecan Trading AG), iScan system (Illumina), NextSeq 500 sequencer (Illumina), Bioanalyzer (Agilent), TapeStation (Agilent).

3.1.4. Oprema za miševе

Hrana za miševе ozračena γ -zračenjem 4RF25 CS (PF1609) (Mucedola), stelja SCOBIS UNO (PF3907) (Mucedola), IVC kavezi 1284L (Techniplast), N-butil-N-(4-hidroksibutil)-nitrozamin (TCI Europe), Xylazin (Alfasan), Ketamin (Narkamon) (Bioveta).

3.1.5. Osnovne kemikalije

Agar (Roth), agarozа (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'-tetrametiletildiamin (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 oslobođena od nukleaza (Invitrogen), vodikov peroksid (Kemika), β -merkptoetanol (Fluka), 2-propanol (Sigma), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska

kiselina (HEPES) (Roth), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,5 µg/ml), OCT medij (Thermo Fisher Scientific).

3.1.6. Puferske otopine

- Digestijski pufer za lizu repa i uške miševa pH 8 (40 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 0.4% NP-40, 0.4% Tween 20)
- Digestijski pufer za izolaciju DNA iz tkiva uklopljenog u parafinsku kocku pH 8,5 (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20)
- Pufer za pripremu kompetentnih bakterijskih stanica pH 7 (60 mM CaCl₂, 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 pH 7,4 (5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS-u)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za sabijanje pH 6,8 za WB (0.5 M Tris, 0.4% SDS)
- 4X Tris-HCl/SDS pufer za razdvajanje pH 8,8 za WB (1.5 M Tris, 0.4% SDS)
- 1X PBS napravljen iz 10X matične otopine (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 2 mM KH₂PO₄)
- 1X TBS pufer pripremljen iz matične otopine pH 7,5 10X (500 mM Tris, 1.5 M NaCl)
- Pufer za lizu stanica pH 7,5 (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)
- Pufer za ispiranje u imunoprecipitaciji pH 7 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA)
- 4% paraformaldehid u 1X PBS pH 7,4
- RIPA pufer pH 7,4 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS)
- 2X i 6X 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-merkaptoetanolu)

- Denaturacijska otopina za Southern blot (SB) (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)
- Neutralizacijska otopina za SB pH 7,5 (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl)
- 1X SSC pufer za SB pripremljen iz matične otopine 20X SSC pufera pH 7 (3 M NaCl, 0.3 M Na₃C₆H₅O₇)
- Citratni pufer za otkrivanje antigena pH 6 za imunohistokemiju (IHC) (10 mM C₆H₅Na₃O₇, 0.05% Tween 20)
- EDTA pufer za otkrivanje antigena pH 8 za IHC (1 mM EDTA, 0.05% Tween 20)
- Blokirajuća otopina za IHC (1X TBS, 0.025% Tween 20, 1% BSA)
- Pufer za ispiranje za IHC (1X TBS, 0.025% Tween 20)
- Omni-ATAC pufer za lizu stanica pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂)
- 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); Tn5 transpozaza (Illumina); 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. Korišteni kompleti (engl. *kits*)

- Komplet za transfekciju *Xfect* (Clontech)
- Komplet za transfekciju *Lipofectamine RNAiMAX* (Life Technologies)
- Kompleti za qPCR:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Power SYBER Green PCR MasterMix (Bio-Rad)

- Kompleti za izolaciju i pročišćavanje plazmidne DNA:

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

QIAfilter Midi Kit for purification of ultrapure, transfection grade plasmid DNA

(Qiagen)

- Komplet za izolaciju DNA iz tkiva *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen)
- Komplet za kvantifikaciju ukupnih proteina *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific)
- Komplet za određivanje duljine telomera *TeloTAGGG Telomere Length Assay* (Roche)
- Komplet za bisulfitnu konverziju DNA *EZ DNA Methylation kit* (Zymo Research)
- Komplet za reducirano reprezentativno bisulfitno sekvenciranje *Premium RRBS Kit* (Diagenode)
- Komplet za pirosekvenciranje *PyroMark Gold reagent kit* (Qiagen)

3.1.10. Protutijela

a) Primarna protutijela

Anti-Perilipin-2/ADFP poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Novus Biologicals)

Anti-Cidea poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Novus Biologicals)

Anti-SPRTN poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Aviva Systems Biology)

Anti-SPRTN poliklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Atlas Antibodies)

Anti-DNMT3A (D23G1) monoklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Cell Signaling)

Anti-DNMT3B (D7O7O) monoklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Cell Signaling)

Anti-DNMT1 (60B1220.1) monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Abcam)

Anti-UHRF1 (D6G8E) monoklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Cell Signaling)

Anti-HA-Tag (C29F4) monoklonalno protutijelo proizvedeno u kuniću (Cell Signaling)

Anti- β -Actin monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma)

Anti- α -Tubulin monoklonalno protutijelo proizvedeno u mišu (Sigma)

b) Sekundarna protutijela

Goat Anti-Mouse IgG (H+L)/HRP (Bio-Rad, 1:10000)

Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP (Dako, 1:6000)

3.1.11. Plazmidi

Korišteni plazmidi dobiveni su metodama restrikcije i ligacije te mjesnom specifičnom mutagenезom pomoću PCR-a kako bi se na točno određenoj poziciji uvela mutacija u *SPRTN* genu. Sekvenca je potvrđena sekvenciranjem dijela plazmida i cijelog inserta u Microsynth (Švicarska).

Korišteni su sljedeći plazmidi:

pcDNA3.1-HA-SPRTN (divlji tip);

pcDNA3.1-HA-SPRTN Y117C;

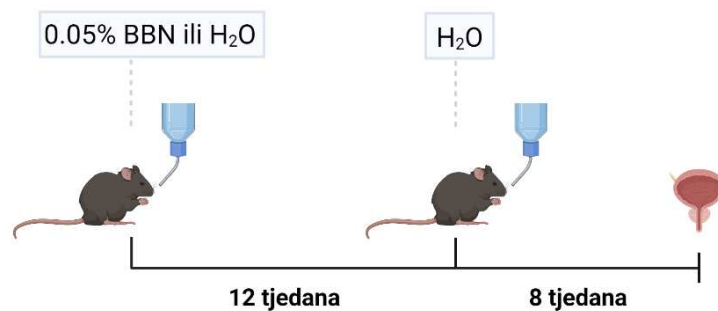
pcDNA3.1-HA-SPRTN Δ C;

pcDNA3.1-HA-*empty* (kontrolni plazmid s hemaglutininom).

3.2. Protokoli istraživanja

3.2.1. Tretman životinja N-butil-N-(4 hidroksibutil)-nitrozaminom (BBN) i studija na raku mokraćnog mjehura

Miševi stari šest do osam tjedana nasumično su razvrstani u skupine; tretirane BBN-om i kontrolnu skupinu. Životinje su dobivale BBN u autoklaviranoj vodi za piće koja je sadržavala 0,05% BBN-a (v/v) (Slika 5). Tretirani miševi su bili izloženi 12 tjedana nakon čega je otopina s karcinogenom zamijenjena autoklaviranom vodom dodatnih osam tjedana (tzv. pokus dugotrajne izloženosti). Za vrijeme trajanja tretmana (20 tjedana), kontrolne skupine su pile autoklaviranu vodu [38]. Po završetku eksperimenta miševi su žrtvovani, a mokraćni mjehur je izrezan medijalno u približno iste polovice. Jedna polovica je sačuvana u tekućem dušiku za molekularna testiranja, dok je druga polovica mokraćnog mjehura uklopljena u parafinsku kocku za histološke analize.



Slika 5. Shematski prikaz tretmana životinja BBN-om i njihovih kontrola.

Temeljem patološke obrade mokraćni mjehuri su razvrstani u invazivnu ili neinvazivnu skupinu ovisno o stadiju invazivnosti tumora, te u kontrolnu skupinu koju su činili netretirani miševi iste starosti. Tkivo mokraćnog mjehura namijenjeno za molekularne analize usitnjeno je (homogenizirano) nakon čega je dio korišten za izolaciju ukupne RNA, a dobivena RNA je poslana na sekvenciranje ili je korištena za mjerenje izražaja gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR). Iz drugog dijela homogeniziranog tkiva izolirana je DNA za mjerenje globalnih metilomskim promjena metodom *Infinium Mouse Methylation BeadChip*, te za određivanje stupnja metilacije diferencijalno metiliranih regija pojedinih lokusa metodom pirosekvenciranja.

3.2.2. Izolacija mišjih embrionalnih fibroblasta križanjem Spartan heterozigotnih jedinki

Za pokus izolacije mišjih embrionalnih fibroblasta žrtvovane su dvije trudne ženke heterozigotnog genotipa ($\text{Sprtn}^{+/ki}$). Tijek pokusa bio je sljedeći: dvije ženke i jednog mužjaka (svi $\text{Sprtn}^{+/ki}$ genotipa) ostavili smo preko noći u zajedničkom kavezu te od sutradan provjeravali prisustvo vaginalnog plaka (kao indikatora parenja i oplodnje) dok nije bio uočen. Mužjaka smo maknuli iz kaveza, a ženke koje su imale plak izvagali smo taj dan, potom deseti i trinaesti dan od određenog E0,5 da utvrdimo dobivanje na težini kao dodatnu potvrdu trudnoće uz praćenje vizualnih znakova (zaobljenje abdomena i gniježđenje). Izolacija mišjih embrionalnih fibroblasta napravljena je 15,5 dana embrionalnog razvoja (E15,5). Prilikom žrtvovanja, trudnim ženkama je injicirano 100 mg/kg ketamina (Bioveta) i 10 mg/kg xylazina (Alfasan) intraperitonealno. Intraperitonealno injiciranje provedeno je nakon obuzdavanja životinje držanjem za rep i hvatanjem za kožu vrata i ramena, a lijekovi su se aplicirali u donji desni kvadrant abdomena miša, iglom veličine 25G. Neposredno prije primjene, ketamin i xylazin su razrijeđeni u fiziološkoj otopini u omjeru 1:0,5:8,5. Prije injiciranja, miševi su bili izvagani te im je aplicirano 0,1 ml pripremljene otopine na 10 g tjelesne mase. Nakon što se utvrdilo da životinje ne osjećaju ništa, podražavanjem rožnice oka i pritiskom na šapicu, pristupilo se abdominalnoj inciziji te je napravljena punkcija krvi iz srca nakon čega je induciran pneumotoraks (radi usmrćivanja), a prije početka vađenja embrija. Mišji embrionalni fibroblasti su izolirani prema objavljenom protokolu [56] te su korišteni za određivanje otvorenih regija kromatina metodom sekvenciranja ATAC (engl. *Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing*).

3.2.3. Pokus starenja $\text{Sprtn}^{+/+}$, $\text{Sprtn}^{+/ki}$ i $\text{Sprtn}^{ki/ki}$ miševa

Miševi su ostavljeni da prirodno stare. Prilikom odvajanja od majke (21. dan starosti) označeni su na uški i genotipizirani. Žrtvovanje je bilo u različitim točkama starosti i to u: jedan, tri, šest, devet, 12, 15, 18, 21, 23, 26 i 29 mjeseci starosti. Prilikom žrtvovanja miševi su bili injicirani s 100 mg/kg ketamina i 10 mg/kg xylazina intraperitonealno nakon obuzdavanja životinje držanjem repa i hvatanjem za kožu vrata i ramena. Anestetici su aplicirani u donji desni kvadrant abdomena miša, kako je već opisano. Nakon anesteziranja i utvrđivanja da životinje ne osjećaju ništa napravljena je kardiopunkcija i prikupljanje krvi, a po završenom prikupljanju krvi induciran je pneumotoraks. Nakon žrtvovanja, prikupili smo različite biološke uzorke (jetra, koža, mozak, mišić, pluća).

Na sakupljenim uzorcima napravljeno je hemalaun-eozin i DAPI bojanje, imunohistokemija, izolacija bioloških molekula (DNA, RNA i proteina) iz kojih je određen sveukupni metilacijski status, validacija stupnja metilacijske promjene pojedinih lokusa pirosekvenciranjem, sekvenciranje RNA, validacija ukupnog genskog izražaja metodom qPCR, te mjerenje količine proteina u tkivu SDS *PAGE* i *western blot* analizom.

3.3. Metode

3.3.1. Histološka analiza

Tkiva su fiksirana u 4% paraformaldehidu pH 7,4 (mokraćni mjehur 24 sata, jetra 48 sati), a potom dehidrirana u seriji etanola (jedan sat, uz dvije izmjene, u 75%, 90%, 95% i 100%) i pročišćena od alkohola u tri serije ksilola. U trajanju od sat vremena tkiva su pročišćena od ksilola u prvom parafinu, nakon čega su prebačena u drugi te su uklopljena u treći parafin. Tkiva su izrezana na mikrotomu RM2125 RTS (Leica) debljine 4-5 μm te su dalje korištena za bojanje hemalaun-eozinom, bojanje fluorescentnom bojom DAPI i imunohistokemijske analize. Histopatološka analiza tkiva napravljena je „dvostruko slijepom“ analizom istraživača i patologa. Fotografije su snimljene na mikroskopu Olympus BX43 (Olympus Corporation).

3.3.2. Imunohistokemija

Deparafinizacija i rehidracija preparata napravljena je na sljedeći način: dva puta po 5 minuta (min) ispiranjem u ksilolu za uklanjanje parafina, te postupnom rehidracijom počevši s dva puta po 10 min u 100% etanolu te dva puta po 10 min u 95% etanolu. Preparati su završno isprani u deioniziranoj vodi (ddH₂O) tri puta po 5 min. Za otkrivanje epitopa mikroskopska stakalca su inkubirana 30 min na 95-98°C u kuhlalu na paru u citratnom ili EDTA puferu (pufer je odabran ovisno o uputi proizvođača protutijela). Nakon kuhanja, preparati su ostavljeni 15 min na sobnoj temperaturi na postupnom hlađenju. Stakalca su isprana u ddH₂O te je oko tkivnih rezova napravljen krug hidrofobnim flomasterom (Daido Sangyo Co., Ltd), radi sprječavanja miješanja protutijela među rezovima na istom stakalcu. Vodikov peroksid u koncentraciji od 3% dodan je na tkiva za utišavanje endogene peroksidaze u trajanju od 10 min. Stakalca su isprana dva puta po 5 min u ddH₂O, a onda 5 min u puferu za ispiranje (1X TBS, 0.025% Tween 20). Na svaki pojedini rez dodana je blokirajuća otopina (1%-tni serum goveđeg albumina otopljen u puferu za ispiranje) te je uslijedila inkubacija jedan sat. Primarna su protutijela razrijeđena u svježoj blokirajućoj otopini u koncentraciji koja je predložena od strane

proizvođača, te je dodano po 50 µl pripremljene otopine na svaki pojedini rez tkiva. Tako pripremljeni preparati inkubirani su preko noći na 4°C. Sutradan je primarno protutijelo uklonjeno, a stakalca su isprana tri puta u puferu za ispiranje po 5 min. Dodano je odgovarajuće sekundarno protutijelo u koncentraciji 1:300 (razrijeđeno u svježoj blokirajućoj otopini) te su tako pripremljeni preparati inkubirani jedan sat na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije stakalca su isprana tri puta u puferu za ispiranje i jednom u ddH₂O po 5 min. Uklonjen je višak vode vakuum sisaljkom te je svaki rez prekriven s 50 µl supstrata 3,3'-diaminobenzidina pripremljenog u odgovarajućem puferu prema uputi proizvođača (Dako). Pomoću svjetlosnog mikroskopa nadzirano je razvijanje boje te je enzimska reakcija prekinuta nakon 15-45 min ispiranjem u ddH₂O. Preparati su uronjeni u hemalaun tri sekunde, isprani u vodi a onda dehidrirani: dva puta po 1 min u 95% etanolu, dva puta po 1 min u 100% etanolu i završno dva puta po 1 min u ksilolu. Na rezove je dodan medij za preklapanje s pokrovnim stakalcem.

Kvantifikacija lipidnih kapljica napravljena je pomoću anti-Perilipin-2/ADFP na deset reprezentativnih fotografija po rezu tkiva (po uzorku) određivanjem promjera deset najvećih lipidnih kapljica u vidnom polju. Promjer je izmjerjen korištenjem programa ImageJ [57], a srednja vrijednost je uvrštena u analizu.

3.3.3. Izolacija RNA i proteina iz tkiva

Odmah nakon prikupljanja bioloških materijala, tkiva namijenjena za analizu DNA, RNA i proteina smrznuta su u tekućem dušiku i tako čuvana do korištenja. Za homogenizaciju tkiva korišteni su homogenizatori *Precellys Minilys* (Bertin Instruments) ili *BioPulverizer* (BioSpec).

Izolacija RNA napravljena je korištenjem *QIAzol lysis reagent* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Količina i čistoća uzoraka RNA utvrđene su korištenjem omjera 260/280 i 260/230 pomoću uređaja Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Tkiva namijenjena za izolaciju proteina homogenizirana su u 300 µl RIPA pufera pH 7,4 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS) s dodatkom koktela proteaznih inhibitora, korištenjem homogenizatora *Precellys Minilys* [dva puta po 30 sekundi na 5000 rpm (engl. *revolutions per minute*), a između dvije homogenizacije uzorci su hlađeni na ledu 10 sekundi]. Nakon homogenizacije uslijedilo je centrifugiranje 10 min, 10 000 rpm, 4°C. Supernatant s proteinima je prebačen u novu mikrotubicu te je inkubiran na klackalici dva sata pri 4°C. Nakon toga je uslijedilo finalno centrifugiranje 15 min, 10 000 rpm, 4°C. Ukupni proteinski lizat prebačen je u novu mikrotubicu na koji je dodano 6X

Laemmlli pufera te su proteini denaturirani na temperaturi od 95°C, 5 min. Tako pripremljeni proteini bili su spremni za *western blot* analizu.

3.3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR) i agarozna gel elektroforeza za genotipizaciju Sprtn miševa

Biopsije uške ili repa miševa korištene su za genotipizaciju. Komadići tkiva su lizirani preko noći na 55°C u 100 µl digestijskog pufera za lizu (40 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 0.4% NP-40, 0.4% Tween 20, pH 8) sa svježe dodanom proteinazom K (20 mg/ml). Sutradan je proteinaza K inaktivirana inkubacijom uzoraka kroz 10 min na 95°C.

Za PCR je korišteno 1.5 µl DNA, uz to je reakcijska smjesa sadržavala 9.4 µl H₂O, 1.5 µl 10x PCR pufera, 0.3 µl dNTP (40 mM), po 0.5 µl 10 µM Sprtn početnica (Fw; 5'-TCTAGGTGGAGTGGCTAAGGAGC-3' i Rev; 5'-TTCTGGATATAGGCATGACCCCT-3') i 0.1 µl Taq polimeraze (Thermo Fisher Scientific). Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 15 µl. Korišteni program za amplifikaciju je sljedeći: početna denaturacija na 94°C 5 min, nakon toga 38 ciklusa denaturacije na 94°C 30 sekundi (sek), vezanja početnica na 60°C 35 sek i elongacije na 72°C 1 min, te jedan ciklus završne elongacije na 72°C 10 min. Produkti dobiveni PCR-om analizirani su na 1%-tnom agaroznom gelu (90V, 45 min). Očekivani ampikon za genotip divljeg tipa Sprtn^{+/+} je 225 parova baza (pb), a za mutantu Sprtn^{ki/ki} je 365 pb dok heterozigotna jedinka Sprtn^{+/ki} ima PCR produkte na 225 i 365 pb.

3.3.5. SDS PAGE i *western blot*

Proteini su analizirani prema standardnom protokolu za SDS PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) i *western blot* [58]. Korišteni su 17% i 4% poliakrilamidni gradijentni gelovi. Nakon razdvajanja proteina u poliakrilamidnom gelu napravljen je transfer proteina na nitroceluloznu membranu (GE Healthcare), a detekcija ciljnih proteina izvršena je primarnim protutijelima razrijeđenim u TBS-BSA puferu pH 7,4 (5% BSA, 0.1% Na-azid, fenol crveno u sterilnom 1X TBS) u koncentraciji predloženoj od strane proizvođača (3.1.10.). Proteinske vrpce detektirane su korištenjem odgovarajućih sekundarnih protutijela konjugiranih s peroksidazom iz hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) razrijeđenih u 5%-tnoj otopini mlijeka u prahu (Roth). Napravljena je kemiluminiscencijska detekcija proteina u uređaju za imunoblot detekciju *Chemi Doc XRS* programom Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad).

3.3.6. Southern blot

Southern *blot* analiza je napravljena za potrebe studije na Ruijs-Aalfs sindromu, u svrhu detekcije duljine telomera miševa.

Genomska DNA izolirana je iz tkiva jetre miševa starih 23 mjeseca pomoću kompleta za izolaciju DNA iz tkiva *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). Digestija s restriktivnim endonukleazama *HinfI* i *RsaI*, odvajanje DNA fragmenta na agaroznom gelu, *Southern* transfer na najlonsku membranu (Roche), hibridizacija s telomernim probama označenih digoksigeninom (DIG) te inkubacija s anti-DIG-alkalnom fosfatazom napravljena je prema uputama proizvođača kompleta za određivanje duljine telomera *TeloTAGGG Telomere Length Assay* (Roche). Rezultati su očitani kemiluminiscencijom, a analiza duljine telomera određena je relativnom kvantifikacijom pomoću programa Image Lab 6.0.1 uspoređujući duljinu telomernih fragmenta prema molekularnoj duljini standarda (DNA biljega). U analizu su uvršteni Sprtn^{+/+} (n=1) i Sprtn^{+/-} (n=3), kao kontrolni uzorci, te DNA izolirana iz tkiva Sprtn^{ki/ki} miševa (n=5), kao ispitivani uzorci.

3.3.7. Reverzna transkripcija i kvantitativni PCR

Kvantitativni PCR (qPCR) proveden je u cilju određivanja aktivnosti gena odnosno relativne količine izražaja gena. Analiza je provedena na jednom mikrogramu RNA i reverzno transkribirana u cDNA pomoću *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Reakcija je izvedena korištenjem *Power SYBER Green PCR MasterMix* (Bio-Rad) na *Real Time PCR uređaj BioRad CFX96 Real-Time System (C1000 231 Touch Thermal Cycle)* (Bio-Rad). Korišteni su sljedeći temperaturni uvjeti: 50°C 2 min, 95°C tijekom 10 min, zatim 40 ciklusa amplifikacije (95°C tijekom 15 sek, 60°C tijekom 1 min s očitanjem fluorescencije) te završna analiza krivulje taljenja. Promjena izražaja svakog gena izračunata je metodom $\Delta\Delta Ct$ na sljedeći način: ΔCt [izračunato kao Ct (gen od interesa) - Ct (referentna kontrola)] svakog uzorka iz ispitivane grupe oduzet je od prosječnog ΔCt svih kontrolnih uzoraka da bi se dobila $\Delta\Delta Ct$, i srednja vrijednost $-\Delta\Delta Ct$ u svih ispitivanih uzoraka upotrijebljena je kao mjera promjene izražaja gena. Sve su reakcije izvedene u duplikatima. Svaka reakcija uključivala je kontrolni gen kao referentnu kontrolu (unutarnju kontrolu koja se ne mijenja među genotipovima i tretmanima). Beta aktin je korišten kao kontrolni gen prikazanih qPCR rezultata.

Dizajniranje početnica napravljeno je pomoći alata za izradu početnica Primer-BLAST ili Integrated DNA Technologies. Kako bi se provjerila učinkovitost početnica, korištena su

serijska razrjeđenja poznate cDNA koncentracije (četiri serijska razrjeđenja po 5x, prva koncentracija 5x osnovne koncentracije koja se koristi za mjerenje), početnice s učinkovitošću od 90% do 110% su korištene u eksperimentima (Tablica 1).

Tablica 1. Lista početnica korištenih za qPCR analizu.

Gen	Počelnice (5'-3')
Dmpk_F	CCCCTTTACACCAGACTTCG
Dmpk_R	ATGTCTTCCTGCATGTCTGAC
Itih5_F	TGCTTTAACATCGACGGAGAG
Itih5_R	GGTGATGGTGCGGAAGTAG
Mmp12_F	CTTAACCCCAGCACATTTTCG
Mmp12_R	GTGACAGCATCAAAACTCAAGC
Mylk_F	TTGTGGCTCCTGAAGTGATC
Mylk_R	TGAAGTGACGTTGGCTAAGG
Pitx2_F	CAGAGGACTCATTTCAGTAGCC
Pitx2_R	CGGCGATTCTTGAACCAAAC
Prelp_F	GGGAGGAACAGAAGAGTGC
Prelp_R	GTTTTGGTCTTGTCTGGTTGG
Serpib2_F	CCCGAAGGTTCTGTAGATGAAG
Serpib2_R	CTGGACAGGTATGCTCTCATG
Actb_F	CACTGTTCGAGTCGCGTCC
Actb_R	TCATCCATGGCGAACTGGTG

* F označava *forward* početnicu, a R *reverse*.

3.3.8. Sekvenciranje RNA

Analiza ukupnog genskog izražaja napravljena je korištenjem mRNA koja je izolirana iz tkiva miševa mokraćnog mjehura i jetre. Priprema biblioteke cDNA i sekvenciranje RNA izvršeni su u suradnji s tvrtkom Novogene: mRNA je pročišćena od ukupne RNA pomoću poli-T oligo vezanih magnetskih zrnaca, a sekvenciranje je izvedeno korištenjem uređaja Illumina HiSeq2000 (Illumina). Prosječna duljina očitavanja bila je 150 pb te je generirano 40 milijuna čitanja po uzorku. Za studiju proučavanja raka mokraćnog mjehura napravljeno je sekvenciranje RNA i to invazivnih (n=2) i neinvazivnih (n=3) tumora mokraćnog mjehura induciranih BBN-om te kontrola (n=3), tj. zdravih mjehura miševa koji nisu bili tretirani. Za studiju na Ruijs-Aalfsovom sindromu analiziran je sveukupni transkriptomski izražaj mutante *Sprtn^{ki/ki}* (n=3) i divljeg tipa, *Sprtn^{+/+}* (n=2).

3.3.9. Transformacija bakterijskih stanica i izolacija plazmidne DNA

Za postupak umnažanja plazmidne DNA korištene kompetentne bakterije *E. Coli*, soja DH5 α , transformirane su sa željenim plazmidima, metodom toplinskog šoka opisanoj u Metode u molekularnoj biologiji [58]. Bakterije transformirane određenim vektorima nasijane su na LB hranjivu podlogu s ampicilinom (Roth). Transformirane bakterije korištene su za umnažanje plazmidne DNA potrebne za daljnju transfekciju stanica u kulturi. Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija korišteni su komercijalno dostupni kompleti *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* i *QIAfilter Plasmid Purification Kit (Midi)* (Qiagen), a postupci izolacije su napravljeni slijedeći upute proizvođača. Količina i kvaliteta izdvojene plazmidne DNA određena je mjerenjem apsorbancije pri 260 nm i 280 nm na spektrofotometru NanoDrop 2000.

3.3.10. Transfekcija stanica

Svi eksperimenti na staničnim linijama napravljeni su u minimalno tri biološka i tri tehnička replikata. Sve transfekcije napravljene su na stanicama između pasaže 3 i 18.

a) Prekomjerni izražaj gena za testiranje proteinskih interaktora metodom imunoprecipitacije

Stanice HeLa uzgojene su u 6 cm Petrijevim zdjelicama za uzgoj i održavanje stanica. Kada su postigle optimalnu gustoću između 50-70% stanice su transfecirane sa SPRTN varijantama obilježenim hemaglutininom (HA) pomoću *Xfect* transfekcijskog reagensa (Clontech). Korišteno je 10 μ g plazmidne DNA za svaku varijantu (HA- divlji tip, Y117C i Δ C) i kontrolni plazmid (HA-*empty*). Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice su isprane u 1X PBS puferu i odlijepljene, prebačene u mikrotubice i dalje procesirane prema opisanom protokolu za imunoprecipitaciju.

b) RNA interferencija (engl. *small interfering RNA*, siRNA)

Utišavanje endogenog proteina SPRTN izvedeno je korištenjem transfekcijskog reagensa *Lipofectamine RNAiMAX Reagent* (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača. HeLa stanice su transfecirane s 20 nM siSPRTN (5'-GUCAGGAAGUUCUGGUUAA-dTdT-3') ili s transfekcijskom smjesom bez siSPRTN kao kontrolom. Stanice su analizirane 72 sata nakon transfekcije SDS PAGE i *western blot* analizom za potvrdu uspješnosti utišavanja i relativnu kvantifikaciju izražaja proteina.

3.3.11. Imunoprecipitacija

Metoda imunoprecipitacije (IP) korištena je za ispitivanje proteinskih interakcija s proteinom SPRTN. Stanice su transfecirane kako je već opisano, uklonjen je stanični medij vakuom sisaljkom te su stanice isprane dva puta s 6 ml hladnog 1X PBS pufera. Nakon ispiranja na stanice je dodano 300 μ l pufera za lizu (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 μ g/mL DNAza, 1 mM PMSF, 100x koktel proteinaznih inhibitora, 5 mM NEM) te su sakupljene u mikrotubice i inkubirane na ledu 30 min. Po isteku inkubacije uslijedilo je centrifugiranje 15 min, 7 000 rpm, 4°C. Supernatant je prebačen u novu mikrotubicu, od čega je 10% izdvojeno za provjeru ukupnog proteinskog izražaja, a ostatak suspenzije je pripremljen za IP inkubacijom preko noći s Protein G agaroznim kuglicama (Roche) i protutijelom za ispitivani antigen. Smjesa za IP inkubirana je preko noći na 4°C uz rotaciju. Sutradan je nastavljeno s centrifugiranjem od 2 min, 1 500 rpm, 4°C. Iz supernatanta je izdvojeno 100 μ l tzv. post-IP ukupnog staničnog lizata, za provjeru količine ispitivanog antigena koji nije imunoprecipitirao s protutijelima. Ostatak supernatanta je aspiriran vakuom sisaljkom, a precipitirani proteini s protutijelom i agaroznim kuglicama su resuspendirani u Laemmlu puferu s dodatkom svježeg 5%-tnog β -merkaptoetanolu. Proteinske suspenzije s Laemmlu puferom denaturirane su 5 min na 95°C. Tako pripremljeni uzorci podvrgnuti su SDS PAGE i *western blot* analizi.

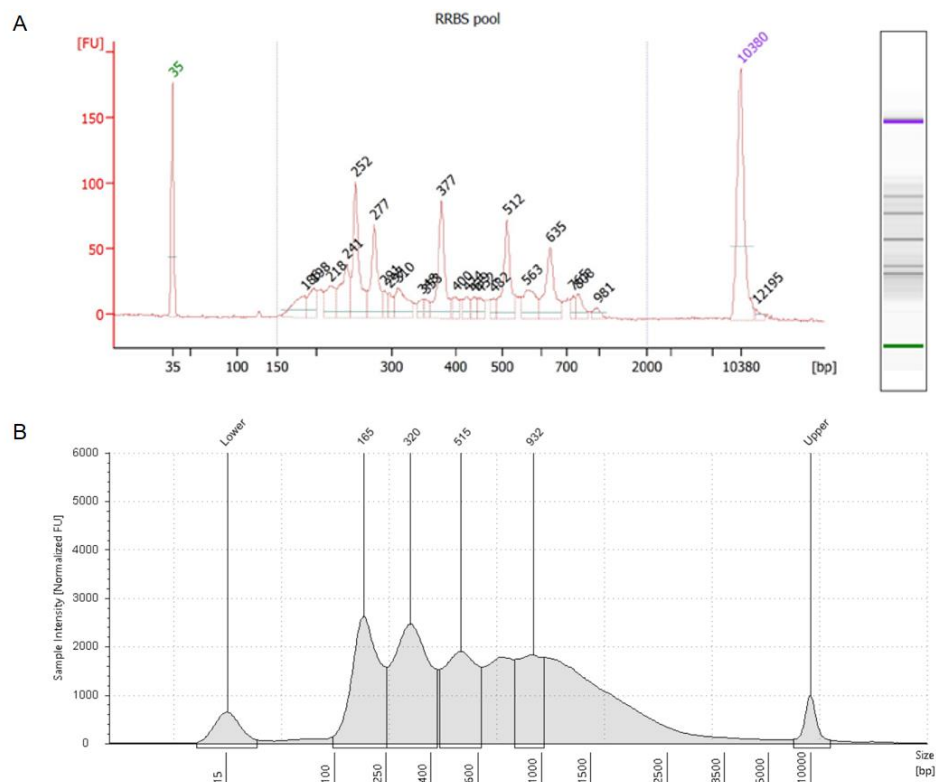
3.3.12. Analize metiloma DNA

DNA je izolirana iz tkiva miševa korištenjem kompleta *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Količina izolirane DNA izmjerena je korištenjem uređaja Qubit (Invitrogen).

a) Reducirano reprezentativno bisulfitno sekvenciranje (engl. *Reduced Representation Bisulfite Sequencing, RRBS*)

Reduciranim reprezentativnim bisulfitnim sekvenciranjem napravljena je analiza metiloma jetre miševa Sprtn^{ki/ki} (n=6) i miševa divljeg tipa, Sprtn^{+/+} (n=5). Radi se o varijanti cjelogenomskog bisulfitnog sekvenciranja, u kojoj se selektivno sekvenciraju regije bogate otocima CpG. Uzorci za RRBS pripremljeni su korištenjem komercijalno dostupnog kita *Premium RRBS Kit* (Diagenode) počevši s enzimatskom digestijom DNA sa *MspI*, koji prepoznaje palindrom CC GG. Uslijedila je priprema krajeva pocijepanih fragmenta s dodavanjem adaptora i selekcija odgovarajuće veličine fragmenta pomoću SPRI magnetnih

kuglica. Pomoću metode qPCR napravljena je kvantifikacija svakog pojedinog uzorka, te slijedeći Diagenode upute napravljen je izračun volumena koji je potreban za pripremu smjese svih uzoraka koji će u konačnici sadržavati jednaku koncentraciju od svakog uzorka. Smjesa uzoraka je podvrgnuta bisulfitnoj konverziji zajedno s pozitivnim i negativnim *spike-in* kontrolama (za provjeru učinkovitosti bisulfitne konverzije). Završno je napravljena amplifikacija uzoraka metodom qPCR, pročišćavanje i kontrola kvalitete pripremljene knjižnice. Koncentracija je determinirana pomoću uređaja Qubit, a profil i molarnost knjižnice provjereni su na uređaju 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) korištenjem *High Sensitivity DNA Assay* (Slika 6A). Sekvenciranje je izvršeno pomoću uređaja NextSeq 500/550 (Illumina) i rezultiralo je s prosječno 33 milijuna očitavanja po uzorku i Q vrijednošću iznad 30.



Slika 6. Elektroferogram knjižnica DNA pripremljenih za sekvenciranje. (A) Profil uzoraka (eng. *pool*) namijenjenih za reducirano reprezentativno sekvenciranje analiziran pomoću Bioanalyzer elektroforeze. (B) Reprezentativni prikaz pripremljenih fragmenata za sekvenciranje ATAC analiziran TapeStation uređajem.

b) Cjelogenomska analiza metilacijskog statusa CpG regija pomoću *Infinium Mouse Methylation BeadChip*-a

Ovom metodom se analiziraju cjelogenomske metilomske promjene na razini jednog dinukleotida CpG korištenjem čipa (engl. *BeadChip*) na koji su vezane probe. Radi se o novoj tehnologiji koja istovremeno mjeri promjene na više od 285 000 CpG-ova širom mišjeg genoma. Procesirano je 500 ng DNA za bisulfitnu konverziju pomoću kompleta *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research). Uzeto je 250 ng konvertirane DNA za *Infinium Mouse Methylation BeadChip* (Illumina). Ovom metodom su određene globalne promjene u metilaciji DNA u obje studije; za studiju raka mokraćnog mjehura izmjerene su promjene u invazivnim (n=2) i neinvazivnim (n=3) tumorima mokraćnog mjehura induciranih BBN-om te u kontrolnoj skupini (n=3) koja je obuhvaćala zdrave mjehure miševa koji ujedno nisu bili tretirani. U studiji na Ruijs-Aalfsovom sindromu analizirani su uzorci DNA jetre Sprtn^{+/+} (n=5) i Sprtn^{ki/ki} (n=5) netretiranih miševa.

3.3.13. Pirosekvenciranje

Izolacija DNA iz tkiva jetre i mokraćnog mjehura izvedena je korištenjem kompleta *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača. Izolirana DNA je kvantificirana pomoću Qubit uređaja te je s 500 ng napravljena bisulfitna konverzija s kompletom *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research) prateći upute proizvođača. Genomske regije odabranih gena amplificirane su metodom PCR s prethodno utvrđenim odgovarajućim uvjetima pomoću gradijentnog PCR-a (Tablica 2 i 3). Ukratko, PCR produkt vezan je za streptavidin sefarozne kuglice (Cytiva), ispran u 70% etanolu, denaturiran u 0.2 M NaOH otopini potom ispran u 1 M Tris-HCl otopini pH 7,6. Nakon denaturacije i ispiranja, 0.4 μM početnica za sekvenciranje vezano je za pročišćeni jednolančani PCR produkt te je provedeno pirosekvenciranje pomoću reagensa iz kompleta *PyroMark Gold* (Qiagen) na aparatu *PyroMark Q96ID* (Qiagen). Broj korištenih uzoraka za validaciju pirosekvenciranjem naznačen je u rezultatima.

Tablica 2. Početnice i PCR uvjeti korišteni za pirosekvenciranje u studiji istraživanja raka mokraćnog mjehura.

Lokus	DNA slijed (5'-3')			PCR uvjeti ²	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i> ¹	Početnice za sekvenciranje	A	X
Dmpk	TGGAGATGTTGTAGGTTTTAGG	b-CAACTTTCTTCTAAAACCCCA	TGTTGTAGGTTTAGGAGT TATTTATAGTTTTTTTT	60	50
Itih5	GGAGATGATTTAGTTTGGTAGG	b-TACTCCTAACCCACAATAATC	TTTAGTTTGGTAGGAGTGTT ATATTGTTAGGGATATTT	60	50
Mmp12	TGGTGGGATTAAGTGAGTGTTGAA	b-TCATCACTCATCTCTATACCTCTC	AGTATGAAAGATGAGGAA GGTGAAGTTAAGATTTAT	59	55
Mylk, Rik	TGYGGGAGTTGTAGTTTTGA	b-TATCCCTCACTTAAACCAACTT	TTTTTATTTTTTATTGT GGAGTAATATGTTAAATGT GTTTTAAGTATTIGAAA	58	55
Mylk	GGTGAAGAAGTTTTTTTTGGAATTG	b-CACCCCTCCACCTTTCA	TTTAGAATTTTTTTGGTA AGAGTTGTAGAGGGGAATT AGTAGTAGATAGAAATTGT	59	50
Pitx2	GAAGAGAGAGGGATGAGAG	b-ACTACCAACCATACCTAATTC	TAGAGTTGTGAGATAATG GTTTTATTTGGAGAATTTT	58	50
Prelp	ATGAATTGGGGTTGGGTAAAGT	b-ATCTAATTTCTTCCCCATTCCC	GTAGAGTAAATATTATATTT	60	50
Serpinb2	TGTGTGGGAGGGGTAGA	b-CTTACCCTCTACACAACCTCA	GTATTTTTTGTGTGTTAGT TTTTTAGTGAATTTAGGG	56	50

¹b predstavlja biotiniziranu početnicu

²PCR uvjeti: 94°C 15 min (jedan ciklus); 94°C 30 sek, A°C 30 sek, 72°C 30 sek (X ciklusa); 72°C 5 min (jedan ciklus)

Tablica 3. Početnice i PCR uvjeti korišteni za pirosekvenciranje u studiji na Ruijs-Aalfsovom sindromu.

Oznaka lokusa	DNA slijed (5'-3')			PCR uvjeti ²	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i> ¹	Početnice za sekvenciranje	A	X
Casp7	GTGAGTTATTGTTTGGTTGTTGG	b-TCCCTACTTTCTAACAACCAC	GAAGGTTTGGTTTATATT TTTAGAAGTTTTAGTTTATT	60	50
Dpysl2	GGGAGGGTAGGGTATTATT	b-CCCCTCCAAAAAAACTTTCT	GGGTTATTGYGTGAGA GTAGTTAGYGTATTATTTT GAGGGTTTTAYGGGTTTT	50	50
Gata6 A	GTTGGGGTTGATTATGGGGT	b-TTCTCAAACTCCCTAACCTC	GGGTTAGGGGTGGT	60	50
Gata6 R	GATTAGGGTAATTAAGTTGGGGG	b-AACTTACCTAATATCCATTCRATCCC	ATTTTTATTTTTTTAG	57	55
Ifi27	GTTTGGAGAGAGTTGGGGAAATA	b-CAATTCCTCTCCTCCCTCC	AATTAGAGTGGATTGT GTATAGTGGATTGA	55	50
Mir143-145	GTTGTTGGAGTAGAATTTAGGG	b-CAACAACTCCCTTCCTTAC	GTATTTTAGGTTGGGAGATAGG	57	50
Pcp411	GGGAAAGAAAGGGATTTTTGGAG	b-CCRAAAAACCTATCCTATAATCCC	GGGAGAGGAATTATGGGAATTG	55	50
Pphln1 A1	GGTTTGTTAAGTTTGGGGTA	b-CCCTAACCCCAACTCC	GTAAATTATAGGTGAAA	60	50
Pphln1 A3	TAGGTTAGTTAGGAAGTTTGGG	b-CCACACTAACATTCTCAACAAC	AATAGGTATTTGAGAGA	60	50
Prune1-1	GGTTAGTTTGTGTTGTGGGGG	b-CTCTCAAAACCTCTACAAACACCA	GTTTTAGTTGAAGATTG	58	50
Prune1-3	TGGGGGTAAAGGGTTTTAAAGG	b-CACCTTCACCTACTAAACCATTTC	AAGATGTGTTTATGTT	58	50
RunX1	GATGGGTAGGGTTTTGTTGT	b-CCAAAACTAACTTCAACTCTC	AAAATAGTTTTTATTAGA	55	50
Sox5	GAGGTGTAGAGTGAGGTTAAT	b- ACTAAAAATCCCATCTCCTC	TTTTTTAAATTTTGT TTGGATAAGTAGTATTATA	57	50

¹b predstavlja biotiniziranu početnicu

²PCR uvjeti: 94°C 15 min (jedan ciklus); 94°C 30 sek, A°C 30 sek, 72°C 30 sek (X ciklusa); 72°C 5 min (jedan ciklus)

3.3.14. Sekvenciranje ATAC (engl. *Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing*)

Analiza otvorenih regija kromatina napravljena je korištenjem primarnih mišjih embrionalnih fibroblasta generiranih iz miševa $Sprtn^{+/ki}$ metodom Omni-ATAC (varijantom metode sekvenciranja ATAC). Stanice su sakupljene na prvoj pasaži te su dalje procesirane prema protokolu Corces et al. [59] samo ako su postigle vijabilnost od $\leq 94\%$. Protokol je optimiziran te je analiza provedena na 75 000 stanica, a inkubacija s enzimom transpozaza Tn5 produžena je s predloženih 30 min na 45 min. S ovim uvjetima generirali smo odgovarajuće fragmente za sekvenciranje. Izgled knjižnice za sekvenciranje provjeren je pomoću uređaja TapeStation (Agilent Technologies), a analiziran programom TapeStation Analysis Software 4.1.1. (Agilent Technologies) (Slika 6B). Pripremljene knjižnice su sekvencirane na sekvenceru NextSeq 500 (Illumina). Analiziran je kromatin mišjih embrionalnih fibroblasta, a u ispitivanje smo uključili: dvije $Sprtn^{+/+}$ ženskog genotipa, dva $Sprtn^{+/ki}$ muškog genotipa, dvije $Sprtn^{ki/ki}$ ženskog genotipa te dva $Sprtn^{ki/ki}$ muškog genotipa. Očitavanja u formatu FASTQ analizirana su u FastQC (v0.11.9) za analizu količine i kvalitete podataka, adaptorske sekvence su uklonjene sa Trim Galore cutadapt 0.6.4_dev, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> (pristupljeno 24.9.2019.), a onda mapirani na mm10 genom miša pomoću Burrows-Wheeler *Aligner* (0.7.15) [60]. Dupla očitavanja su označena pomoću *samblaster* (v0.1.24) [61], tako mapirana očitavanja su dalje podvrgnuta ponovljenoj kalibraciji za procjenu kvalitete (engl. *base quality score recalibration*), a *indel* područja su poravnata s alatom GATK (V3.8) [62]. Prosječno očitavanje je bilo 44 milijuna po uzorku. Očitavanja su pobrojana u svakom uzorku i normalizirana sa DESeq2 (engl. *Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution*) normalizacijskom metodom. Rezultati su anotirani prema njihovoj genomskoj lokaciji (500 bp, 2 kb ili 10 kb uzvodno od mjesta početka transkripcije, unutar tijela gena ili/i u preklopljenim egzonima) pomoću GENECODE [63].

3.3.15. Statistički postupci

Statističke analiza qPCR-a napravljena je pomoću GraphPad Prism programa (GraphPad Software). Korišten je student T-test za nezavisne varijable i Mann-Whitney test za određivanje značajnosti u izražaju između kontrolne i ispitivane skupine. Podaci s p-vrijednostima manjim od 0,05 su prihvaćeni kao statistički značajni.

Neobrađeni podatci sekvenciranja RNA usklađeni su s referentnim genomom miša (GRCm39 GCA_000001635_8) te je kvantifikacija izvršena korištenjem *FeatureCounts* algoritma v1.5.0-p3. Diferencijalni izražaj gena analiziran je pomoću paketa DESeq2 v1.340 [64]. Neobrađene vrijednosti prvo su filtrirane da bi se uklonili geni s manje od 10 očitavanja, normalizirani zadanim parametrima DESeq2 i transformirani pomoću VST (engl. *Variance Stabilizing Transformation*) kako bi se ispitalo grupiranje uzoraka putem analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i toplinske karte (engl. *Heatmap*). Granične vrijednosti diferencijalno izraženih gena bile su s FDR (engl. *False Discovery Rate*) p-vrijednosti $< 0,01$ i \log_2 promjene omjera izražaja (engl. *Fold Change*, FC) > 1 .

Neobrađeni podatci reduciranog reprezentativnog bisulfitnog sekvenciranja su analizirani korištenjem programa Merge lines, a za uklanjanje adapterskih sekvenci korišten je Trim Galore (cutadapt 0.6.4_dev, <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> (pristupljeno 24.9.2019.)), BSMAP (poravnavanje očitavanja) te programa RNBeats (za konstrukciju beta mapa) i MethylKey za procesiranje beta mapa kako bi detektirali diferencijalno metilirane regije (DMR). Određene su FDR p-vrijednosti < 0.05 , korištenjem paketa *DMRcate* [65].

Na neobrađenim podacima *Infinium Mouse Methylation BeadChip*-a izvršena je „Noob” normalizacija i kontrola kvalitete pomoću paketa *SeSAME* [66]. Beta vrijednosti su pretvorene u M-vrijednosti pomoću R funkcije *beta2m* kako je implementirano u *lumi* paketu [67]. Usporedbe među skupinama provedene su primjenom linearne regresijske analize korištenjem *limma* R paketa [68] uz kontrolu za višestruko testiranje. Nakon toga su analizirani DMR-ovi (engl. *differentially methylated regions*, DMRs) preko statistički značajnih diferencijalno metiliranih proba (engl. *differentially methylated probes*, DMP) s FDR p-vrijednosti < 0.05 , korištenjem paketa *DMRcate* [65].

Za kvantifikaciju razine metilacije na pojedinačnim dinukleotidima CpG određene pirosekvenciranjem, svaki lokus je izražen kao postotak metilacije citozina u odnosu na sve citozine. Prosjek je uzet za statističku analizu koja je napravljena pomoću programa GraphPad (GraphPad Software). Korišteni testovi za ispitivanje statističke značajnosti su dvosmjerna analiza varijance i Kuskal-Wallis test, p-vrijednosti $< 0,05$ uzeta je kao statistički značajna. Normalnost i lognormalnost podataka određena je Shapiro-Wilkovim testom.

Ostala bioinformatička analiza izrađena je u programu R v4.0.0 [69]. Analize glavnih komponenti (PCA) provedene su korištenjem R funkcije *prcomp*. Toplinske mape generirane su pomoću *ComplexHeatmap* paketa v2.4.3 [70]. Vennovi dijagrami su kreirani s *eulerr* paketom 244 v6.1.1. *Reactome* putevi vizualizirani su kao točkasti dijagrami korištenjem paketa *enrichplot* v1.14.1. Svi ostali prikazi kreirani su pomoću paketa *ggplot2* v3.3.5 [71]. Za

kombiniranje pojedinačnih slika korišten je paket `multipanelfigure` v2.1.2 [72]. Za testiranje značajnog preklapanja između diferencijalno izraženih gena (engl. *differentially expressed genes*, DEGs) i diferencijalno metiliranih regija (DMR), izvedeni su hipergeometrijski testovi korištenjem osnovne R funkcije `phyper`.

Drugi korišteni statistički postupci opisani su u rezultatima.

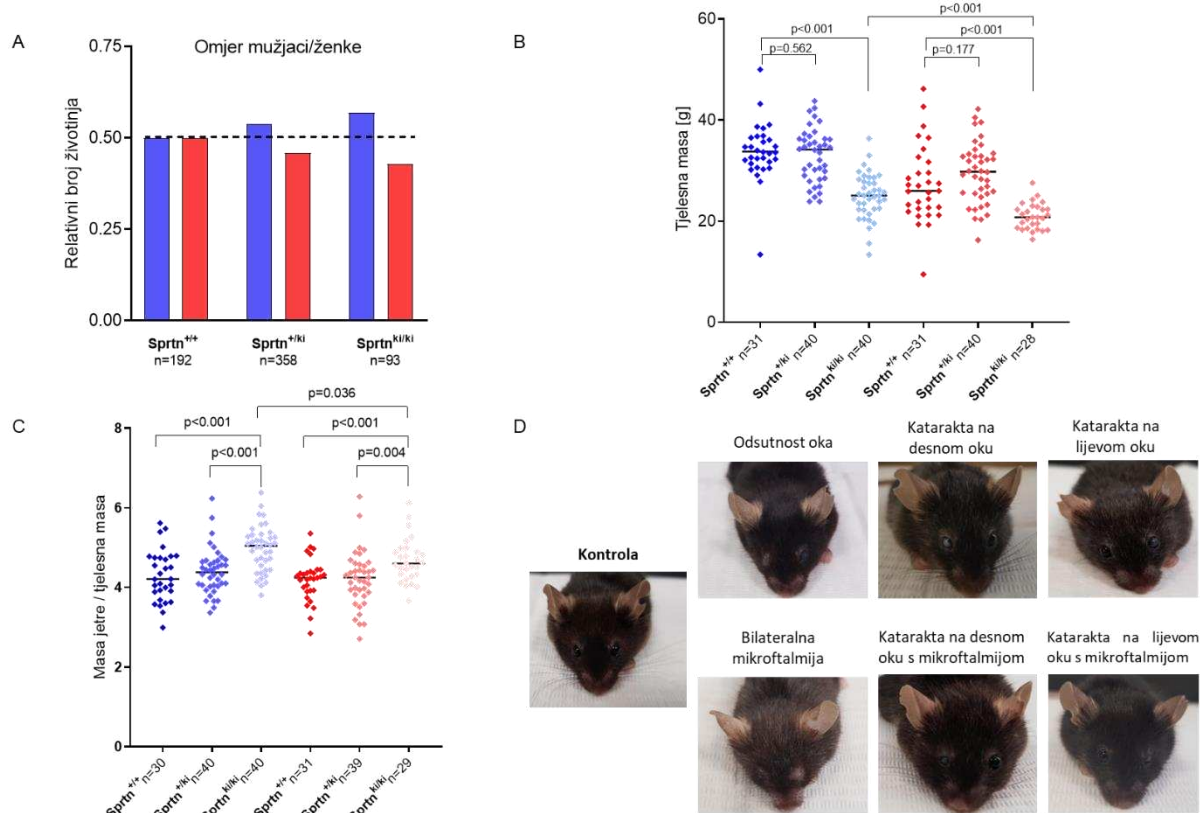
4. REZULTATI

4.1. Epigenetske promjene u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma

U prvom dijelu rezultata opisani su miševi $Sprtn^{ki/ki}$ koji su model za ljudski Ruijs-Aalfsov sindrom. Slijedi određivanje novih interaktora proteina SPRTN uključenih u održavanje obrasca metilacije te analiza epigenetskih, transkriptomskih i kromatinskih promjena u mišjem modelu. Ovim pokusima doprinosimo razumijevanju funkcije proteina SPRTN, a što je od velike biološke važnosti jer se radi o genu čija mutacija dovodi do a. najagresivnijeg tumora jetre – hepatocelularnog karcinoma, i do b. ubrzanog starenja tzv. progeroidnog fenotipa. Trenutno je poznata funkcija gena u uklanjanju DPC oštećenja, a naši rezultati upućuju i na njegove druge uloge.

4.1.1. Karakterizacija mišjeg modela s Ruijs-Aalfsivim sindromom

Križanjem heterozigota ($Sprtn^{+/ki}$), umjesto očekivanog omjera 25:50:25 po Mendelovim zakonima nasljeđivanja, od 643 životinje 14% je bilo $Sprtn^{ki/ki}$, 56% $Sprtn^{+/ki}$ i 30% $Sprtn^{+/+}$ iz čega zaključujemo da je dio mutanti $Sprtn^{ki/ki}$ embrionalno letalno. Gledajući distribuciju spolova unutra svakog pojedinog genotipa, $Sprtn^{ki/ki}$ ženke su bile manje zastupljene (43%) u odnosu na mužjake istog genotipa (57%) što znači da imaju veći embrionalni letalitet (Slika 7A). Nadalje, pronašli smo da ženke s mutacijom na oba alela imaju agresivniji fenotip u odnosu na mužjake $Sprtn^{ki/ki}$ (Slika 7), a i svi Ruijs-Aalfs pacijenti bili su muškog spola. Miševi $Sprtn^{ki/ki}$ imaju manju tjelesnu masu i veći omjer jetre u odnosu na tjelesnu masu miševa $Sprtn^{+/+}$ (miševi bez mutacija u genu *Sprtn*) (Slika 7B, C). Miševi $Sprtn^{ki/ki}$ pokazuju različit fenotip na oku - od nedostatka oka, oka manje veličine (mikroftalmije) do katarakte (Slika 7D). Abnormalnosti oka kod ženki $Sprtn^{ki/ki}$ utvrđene su u 59% jedinki (n=29), a u mužjaka istog genotipa u 25% slučajeva (n=40).

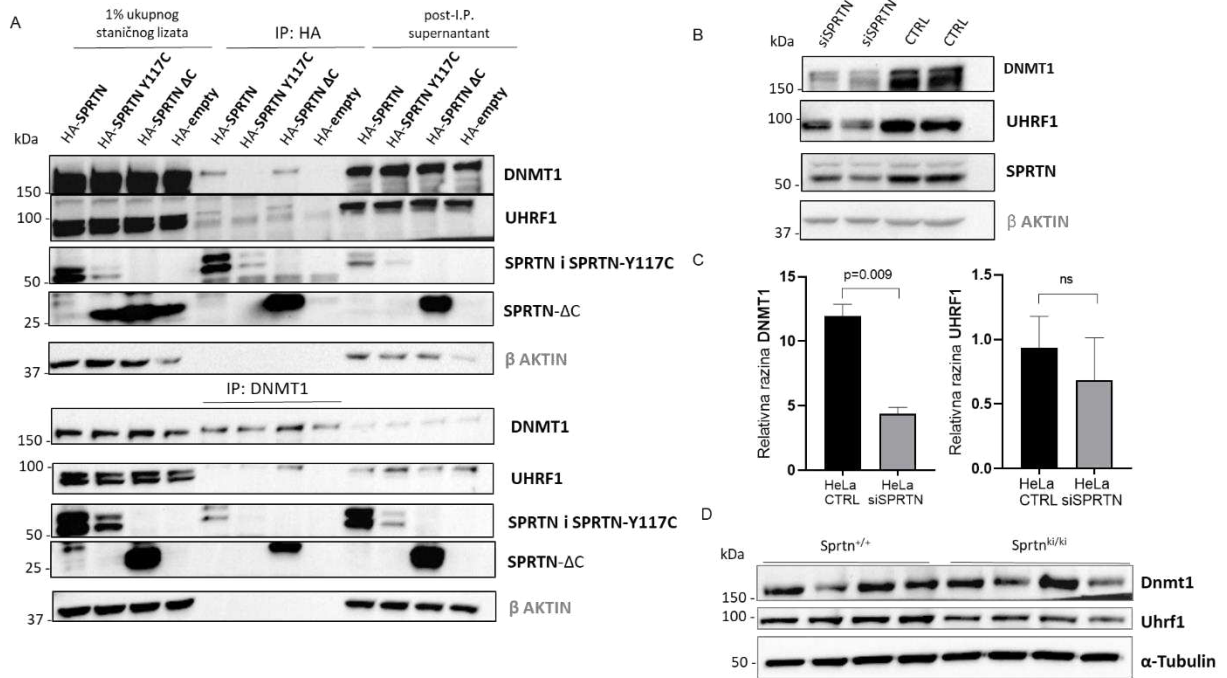


Slika 7. Fenotipske karakteristike miševa $Sprtn^{ki/ki}$ u usporedbi s kontrolama. Na grafovima plava boja predstavlja mužjake, a crvena ženke. (A) Distribucija spolova unutar sva tri genotipa proizašli iz križanja heterozigota. Testirano s Pearsonovim hi-kvadrat testom uz Yates-ovu korekciju, p-vrijednost nije značajna (p-vrijednost za $Sprtn^{+/ki}$ vs $Sprtn^{+/+}$ je 0,4319, a $Sprtn^{ki/ki}$ vs $Sprtn^{+/+}$ 0,3265). (B) Prikaz tjelesne mase miševa među genotipovima i spolovima. (C) Prikaz vrijednosti dobivenih omjerom mase jetre i tjelesne mase miševa. (B i C) Na grafovima je prikazan medijan (crna linija), a kvadratići predstavljaju individualne vrijednosti. Distribucija podataka ispitivana je Shapiro-Wilk testom. Korišten je dvosmjerni student T-test za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney test za asimetričnu distribuciju. (D) Spektar abnormalnosti na oku miševa $Sprtn^{ki/ki}$ u odnosu na kontrolu ($Sprtn^{+/+}$).

4.1.2. Pronalazak novih interaktora proteina SPRTN

U svrhu ispitivanja novih proteinskih interaktora s proteinom SPRTN, korištene su immortalizirane stanice adenokarcinoma vrata maternice tzv. stanice HeLa. U dva pokusa, korištenjem staničnog lizata koji prekomjerno izražava varijante proteina Spartan obilježene hemaglutininom, HA (alel divljeg tipa HA-SPRTN, te mutante HA-SPRTN *Y117C* i HA-SPRTN ΔC) ili kontrolni plazmid (HA-empty), napravljena je imunoprecipitacija s protutijelom koje prepoznaje aminokiselinski slijed HA (koji obilježava SPRTN), a u drugom pokusu reverzna imunoprecipitacija je napravljena protutijelom za DNMT1. Utvrđeno je postojanje interakcije proteina SPRTN s metiltransferazom DNMT1 (engl. *DNA Methyltransferase 1*) i njenim kočimbenikom, E3 ubikvitin ligazom, UHRF1 (engl. *Ubiquitin Like With PHD And Ring*

Finger Domains 1). Pojedinačno su sve tri varijante proteina (divlji tip i mutante) u kompleksu s DNMT1 i UHRF1 (Slika 8A).

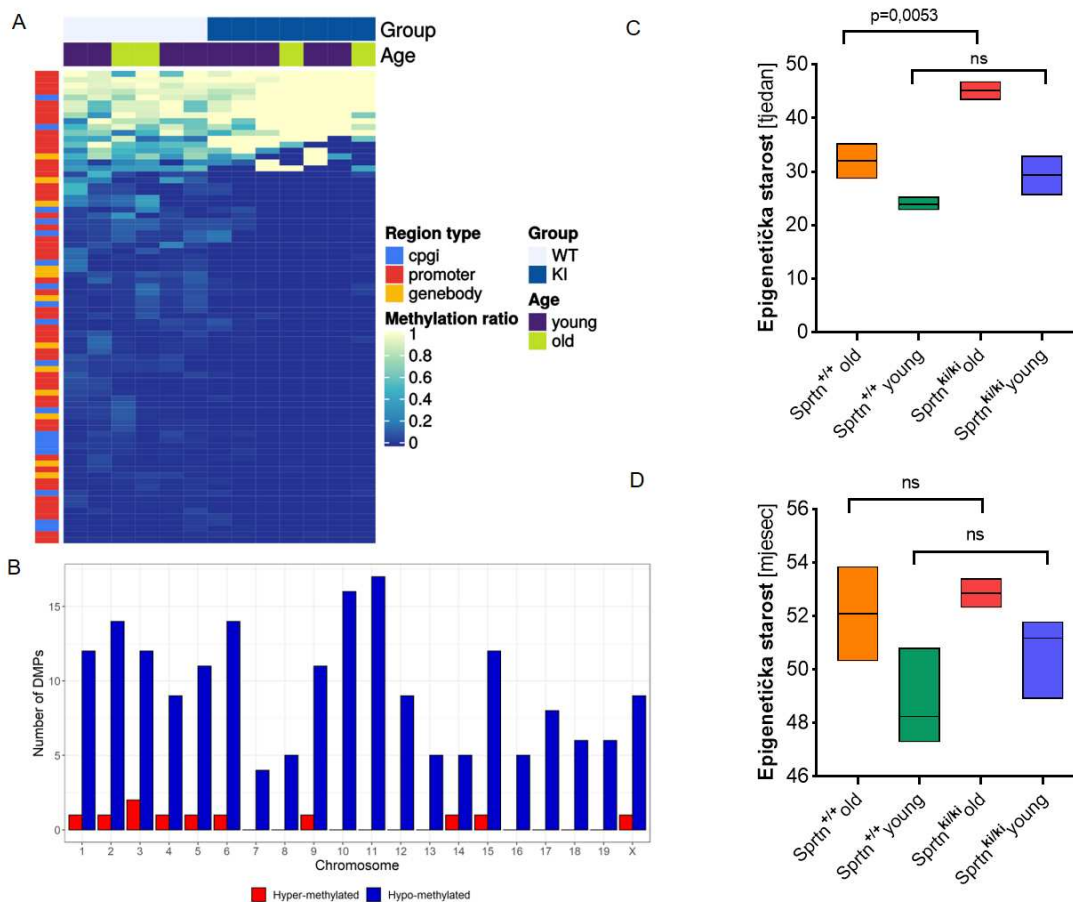


Slika 8. Interakcija proteina SPRTN s održavateljskom metiltransferazom 1 (DNMT1) i E3 ubikvitin-proteinskom ligazom UHRF1. (A) Imunoblot prikaz (*western blot*) rezultata dobivenih imunoprecipitacijom (s protutijelom na HA) i reverznom imunoprecipitacijom (s protutijelom na DNMT1) za detekciju interakcija proteina SPRTN s proteinima uključenima u epigenetsku regulaciju – DNMT1 i UHRF1. Beta aktin je korišten kao kontrola nanošenja količine proteinskog uzorka na gel. (B) Imunoblot rezultata nakon utišavanja SPRTN u stanicama HeLa za potvrdu međuovisnosti s DNMT1 i UHRF1. Beta aktin je korišten kao kontrola nanošenja proteina na gel. (C) Grafički prikaz kvantifikacije ekspresije DNMT1 i UHRF1 nakon utišavanja proteina SPRTN. Kvantificiran je prikazani, reprezentativni imunoblot (B). Statistička analiza provedena je korištenjem T-testa. Statistička značajnost: $p < 0.05$. (D) *Western blot* analiza ekspresije Dnmt1 i Uhrf1 u tkivu jetre miševa. Alfa tubulin je korišten kao kontrola količine nanošenja proteinskog lizata na gel. Napomena; svaki pokus je ponovljen barem tri puta ($n=3$).

Interakcija je provjerena na prekomjerno eksprimiranom sustavu, zbog komercijalno nedostupnog protutijela za SPRTN koje je validno za imunoprecipitaciju, pa je za dodatnu potvrdu međuovisnosti proteina SPRTN s DNMT1 i UHRF1, napravljeno utišavanje endogenog proteina SPRTN (Slika 8B). *Western blot* analizom i relativnom kvantifikacijom u odnosu na beta aktin pokazano je da deplecijom proteina SPRTN pada izražaj DNMT1 kao i UHRF1 (Slika 8C). Imunoblot ova dva proteina u tkivu jetre miševa Sprtn^{+/+} i Sprtn^{ki/ki} pokazao je približno sličnu ekspresiju među genotipovima, iz čega zaključujemo da mutacija u metaloproteinaznoj domeni proteina SPRTN ne utječe na ekspresiju ovih epigenetičkih regulatora (Slika 8D).

4.1.3. Analiza metiloma jetre

U svrhu provjere sveukupnog metilacijskog profila u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma, DNA je izolirana iz jetre te su korištene metode reduciranog bisulfitnog sekvenciranja (RRBS) i *Infinium Mouse Methylation BeadChip* za utvrđivanje genomskih metilacijskih promjena. Gledajući metilom, miševi $Sprtn^{ki/ki}$ imaju globalnu hipometilaciju s izraženim promjenama u promotorskim regijama nekih gena (Slika 9A,B).



Slika 9. Analiza sveukupnih promjena u metilaciji DNA izolirane iz tkiva jetre te epigenetički sat. (A) Rezultati reduciranog reprezentativnog bisulfitnog sekvenciranja (RRBS). Prikaz 80 najpromjenjenijih diferencijalno metiliranih regija (DMR) s FDR p-vrijednosti < 0.05 , a koji su imali promjenu u metilaciji $> 5\%$. RRBS-om smo analizirali $Sprtn^{+/+}$ $n=6$ i $Sprtn^{ki/ki}$ $n=7$. „Old“ predstavlja miševe starosti 23 mjeseca, a „young“ miševe stare sedam mjeseci. (B) *Infinium Mouse Methylation BeadChip*. Prikaz 200 najpromjenjenijih diferencijalno metiliranih proba (DMP) koje su imale FDR p-vrijednost $< 0,05$ i promjenu u metilaciji $> 5\%$. Graf prikazuje obogaćenje po kromosomima $Sprtn^{+/+}$ $n=3$ i $Sprtn^{ki/ki}$ $n=3$, sedam mjeseci starosti. (C) Stubbs-ov epigenetički sat iz RRBS skupa podataka. Rezultati su prikazani u tjednima. Broj miševa uključenih u analizu: $Sprtn^{+/+}$ old $n=2$, young $n=4$ i $Sprtn^{ki/ki}$ old $n=2$, odnosno young $n=5$. (D) SeSAm epigenetički sat za predikciju starosti kod miševa izražen u mjesecima proizašao iz *Infinium Mouse Methylation BeadChip* analize. Graf prikazuje starost miševa $Sprtn^{+/+}$ old $n=2$, young $n=3$ i $Sprtn^{ki/ki}$ old $n=2$, odnosno young $n=3$. Statistička obrada podataka napravljena je korištenjem jednosmjerne analize varijance s višestrukom usporedbom. p-vrijednost $< 0,05$ uzeta je kao statistički značajna.

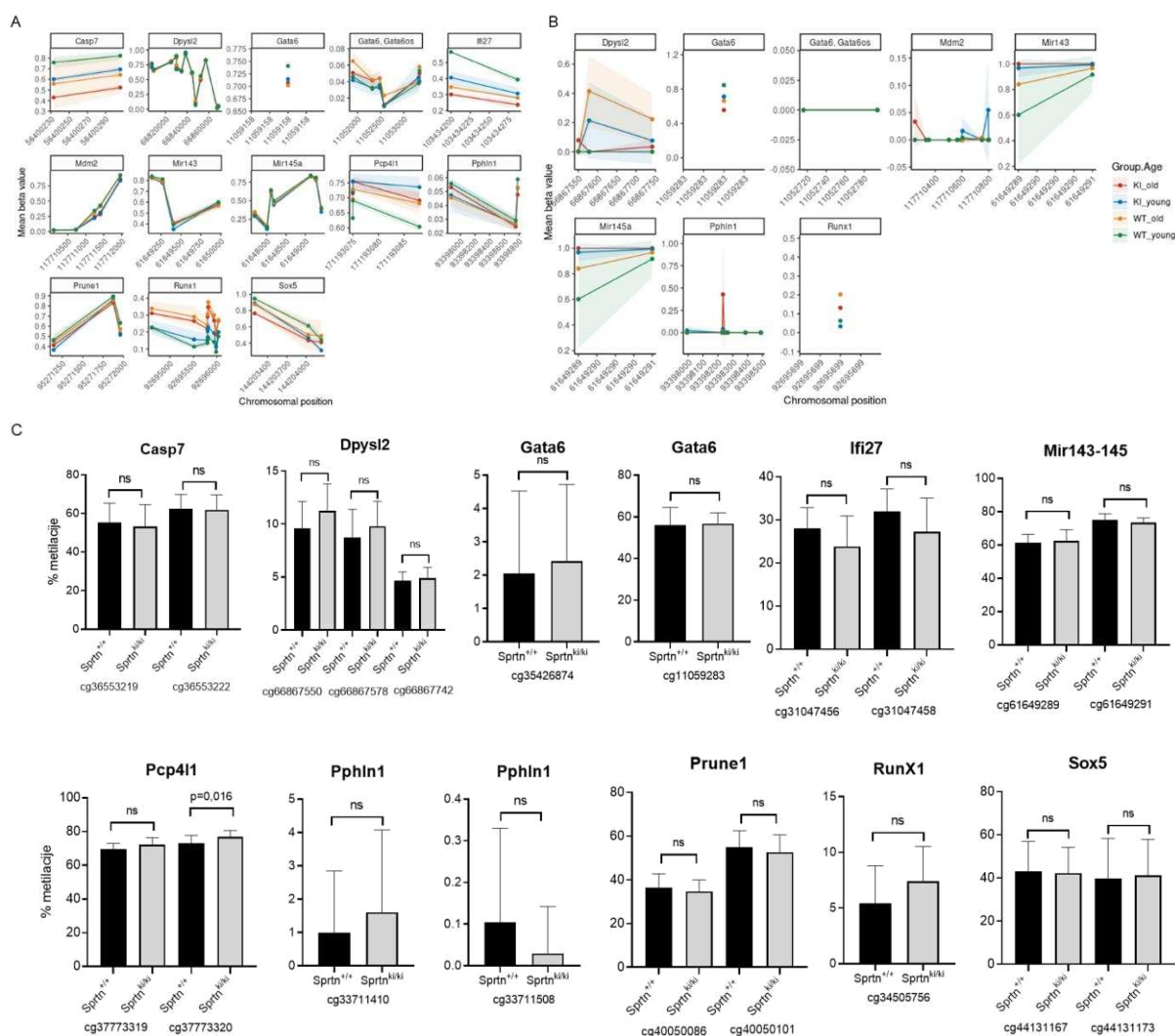
Analizom RRBS-a i primjenom graničnih vrijednosti FDR p-vrijednost $< 0,05$ uz apsolutnu srednju vrijednost između grupa 5 (engl. *absolute mean difference based on batch-correction M-values*), pronašli smo da su promjene u metilomu miševa Sprtn^{ki/ki} izraženije u miševa starih 23 mjeseca (na grafu „old“) u odnosu na miševe stare sedam mjeseci (na grafu „young“) - odnos diferencijalno metiliranih regija (DMR) među ove dvije grupe je 324 u starih, naspram 276 u mladih miševa.

Korelirali smo metilacijske promjene sa stvarnom starošću miševa jer je poznato da se dio CpG-ova specifično mijenja starenjem što može poslužiti kao determinanta biološke starosti [51]. Korištenjem dva epigenetička sata iz različitih skupova podataka (RRBS i *Infinium Mouse Methylation BeadChip*), pokazali smo da su Sprtn^{ki/ki} epigenetički stariji (Slika 9C,D). Epigenetička starost reflektira biološko starenje te može poslužiti kao prediktivna mjera za opadanje fizioloških funkcija. U analizu smo uključili miševe starosti 23 i sedam mjeseci, odnosno 100 i 30 tjedana. Epigenetička starost određena Stubbs-ovim satom (Slika 9C) daje rezultate u tjednima te je algoritam optimiziran i razvijen za miševe do 41 tjedna starosti, pa je u obje grupe miševa starosti od 23 mjeseca (100 tjedana) vidljivo da kronološka starost nije u skladu s epigenetičkom dobi, za razliku od nalaza na mlađim miševima. Preciznije, miševi Sprtn^{+/+}, stari 30 tjedana, prosječno su epigenetički stari 23,95 tjedana, a Sprtn^{ki/ki}, stari 30 tjedana, imaju prosječnu epigenetičku dob 28,76 tjedana. Gledajući starije miševe, tj. stare 100 tjedana, divlji tip (Sprtn^{+/+}) ima prosječnu epigenetičku starost 32 tjedna, a Sprtn^{ki/ki} 45,15 tjedana. Unatoč korištenom algoritmu koji je idealan za miševe mlađe od 41 tjedan, ipak iz rezultata možemo zaključiti da se epigenetička starost povećava s kronološkim starenjem, te da su te promjene izraženije unutar Sprtn^{ki/ki} grupe, što je u skladu sa sindromom progerije kojeg ti miševi imaju. I prema SeSAME analizi [66] vidljiv je utjecaj progeroidnog fenotipa na epigenom miševa Sprtn^{ki/ki} kroz brže epigenetičko starenje izraženo u mjesecima iako te razlike nisu bile značajne (Slika 9D).

Rezultati profiliranja metiloma DNA pokazuju deregulaciju epigenoma u miševa Sprtn^{ki/ki}, s dominantnom hipometilacijom u regulatornim regijama gena. Promjene su obuhvatile i otoke CpG koji su uvršteni u algoritme za određivanje epigenetske starosti ukazujući na to da su miševi Sprtn^{ki/ki} epigenetski stariji u odnosu na jednako stare kontrolne jedinke.

4.1.4. Potvrđivanje rezultata analize metiloma jetre

Analizom rezultata metiloma dobivenih metodama RRBS i *Infinium Mouse Methylation BeadChip*-om te pretraživanjem literature, odabrali smo set kandidat gena čije bi promjene mogle doprinijeti fenotipu Ruijs-Aalfsovog sindroma (Slika 10A,B). Promjene metilomskog statusa diferencijalno metiliranih regija provjerili smo pirosekvenciranjem te smo uključili dodatne uzorke DNA koji su također bili izolirani iz tkiva jetre (Slika 10C). Prosječna starost obje ispitivane skupine bila je 12 mjeseci. Krajnji broj uzoraka korišten za potvrdu rezultata pirosekvenciranjem bio je 16 za skupinu životinja *Sprtn*^{+/+} genotipa, te 14 za skupinu genotipa *Sprtn*^{ki/ki}.



Slika 10. Regionalni plotovi i potvrđivanje odabranih diferencijalno metiliranih regija u jetri miševa *Sprtn*^{ki/ki}. Regionalni plotovi kandidat gena odabranih iz analize (A) *Infinium Mouse Methylation BeadChip*-om i (B) reduciranog bisulfitnog sekvenciranja. Na apscisi (os x) prikazana je kromosomska pozicija (engl. *chromosomal position*) diferencijalno metiliranih regija, a na ordinati (os y) srednja beta vrijednost (engl. *mean beta value*) koja označava postotak metilacije ispitivanih CpG-ova. Oznake *KI.old* i *WT.old* odnose se na *Sprtn*^{ki/ki} i *Sprtn*^{+/+} stare 23 mjeseca, a *KI.young* i *WT.young* su miševi stari sedam mjeseci. Regionalni plotovi

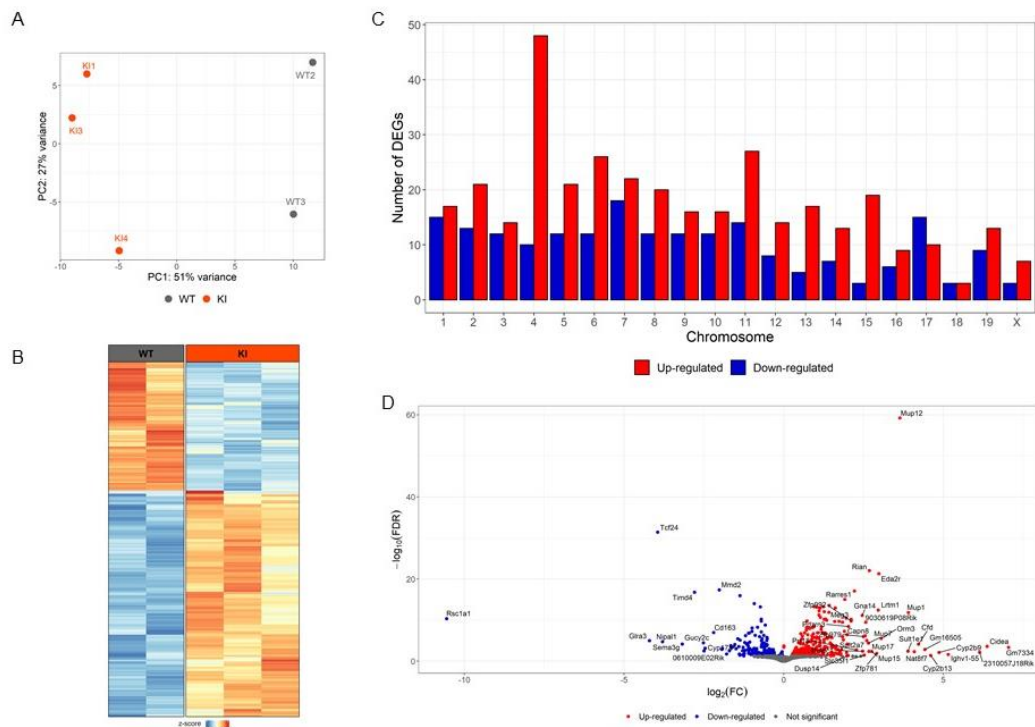
Methylation BeadChip (A) prikazuju +/- 250 pb od DMR, a RRBS (B) DMR-ovi prikazuju +/- 500 pb od DMR od interesa. Sjena oko linija na grafu predstavlja standardnu devijaciju. (C) Rezultati pirosekvenciranja CpG-ova unutar odabranih lokusa. Grafovi prikazuju srednju vrijednost razine metilacije DNA pojedinih CpG-ova (identifikacijski broj probe naznačen na osi x grafa) u uzorcima. Normalnost i log-normalnost podataka određena je Shapiro-Wilkovim testom. Korišteni testovi za ispitivanje statističke značajnosti su T-test za normalno distribuirane podatke i Mann-Whitney test za asimetričnu distribuciju. Podaci s p-vrijednosti manjom od 0,05 prihvaćeni su kao statistički značajni.

Rezultati pirosekvenciranja koji su napravljeni na većem broju miševa nisu potvrdili rezultate dobivene bisulfitnim sekvenciranjem i *Methylation BeadChip* pristupom. To jest, skoro svi dodatno ispitani CpG-ovi nisu bili statistički značajno promijenjeni. Jedini otok CpG koji je pokazao statističku značajnost, nalazi se u genu *Pcp4l1* (engl. *Purkinje Cell Protein 4 Like 1*), a ispitivani CpG odgovara probi cg37773320.

4.1.5. Analiza transkriptoma jetre

Analiza glavnih komponenti (PCA) izražajnog profila gena jetre razdvojila je miševe *Sprtn*^{ki/ki} od kontrola (*Sprtn*^{+/+}) (Slika 11A). Analizom metiloma ustanovljena je globalna hipometilacija u CpG-ovima promotora gena miševa *Sprtn*^{ki/ki} (Slika 9), a kako metilacija DNA ima regulacijske učinke, očekivali smo odraz metilacijskih promjena na transkriptom jetre. Specifičnije, hipometilacija DNA u promotorskim regijama povećava ekspresiju gena, a što smo utvrdili analizom ukupne mRNA jetre miševa (Slika 11B, C).

Gledajući distribuciju i raspored diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) po kromosomima miševa *Sprtn*^{ki/ki}, u većini njih geni su bili povećano izraženi. Izuzetak je kromosom 17 koji je jedni imao više gena sa smanjenom ekspresijom, te kromosom 18 s jednakom zastupljenošću DEG-ova promijenjenih u oba smjera (Slika 11C).



Slika 11. **Analiza ukupne ekspresije mRNA u jetri miševa *Sprtn*^{ki/ki}.** (A) Graf analize glavnih komponenti (PCA) ukupnog transkriptoma. Pokazuje grupiranje *Sprtn*^{+/+} i *Sprtn*^{ki/ki} uzoraka po PC1 osi koja objašnjava 51% varijance u ekspresiji gena. (B) Prikaz 554 značajnih diferencijalno ekspimiranih gena (DEG) proizašlih iz usporedbe *Sprtn*^{ki/ki} sa *Sprtn*^{+/+} grupom. (C) Raspored diferencijalno ekspimiranih gena po kromosomima miševa *Sprtn*^{ki/ki}. (D) Prikaz veličine i značajnosti promjene gena s najvećim povećanjem (engl. *up-regulated*) ili smanjenjem (engl. *down-regulated*) u izražaju u jetri miševa s Ruijs-Aalfsovom sindromom.

Analizom genske ontologije (engl. *gene ontology*, GO) diferencijalno ekspimirani geni ukazali su na deregulaciju lipidnog metabolizma na čelu s genom *Cidea* (engl. *Cell Death-Inducing DNA Fragmentation Factor-Alpha-Like Effector A*), koji je bio jedan od najpromjenjenijih u smjeru povećane regulacije s log₂ FC 6,366 i FDR p-vrijednosti 0,00024 (Tablica 4 i Slika 11D). Nadalje, gen *Eda2r* (engl. *Ectodysplasin A2 receptor*) je povećano izražen u *Sprtn*^{ki/ki} grupi (log₂ FC = 2,979 i FDR p-vrijednosti = 4,88687E-22). Mutacija u genu *Sprtn* utjecala je i na p53 signalni put kroz deregulaciju gena *Zmat3* i *Ccng1* koji su bili statistički značajno povišeni u *Sprtn*^{ki/ki} skupini.

Tablica 4. Popis bioloških procesa obogaćenih u jetri miševa Sprtn^{ki/ki} prema GO analizi.

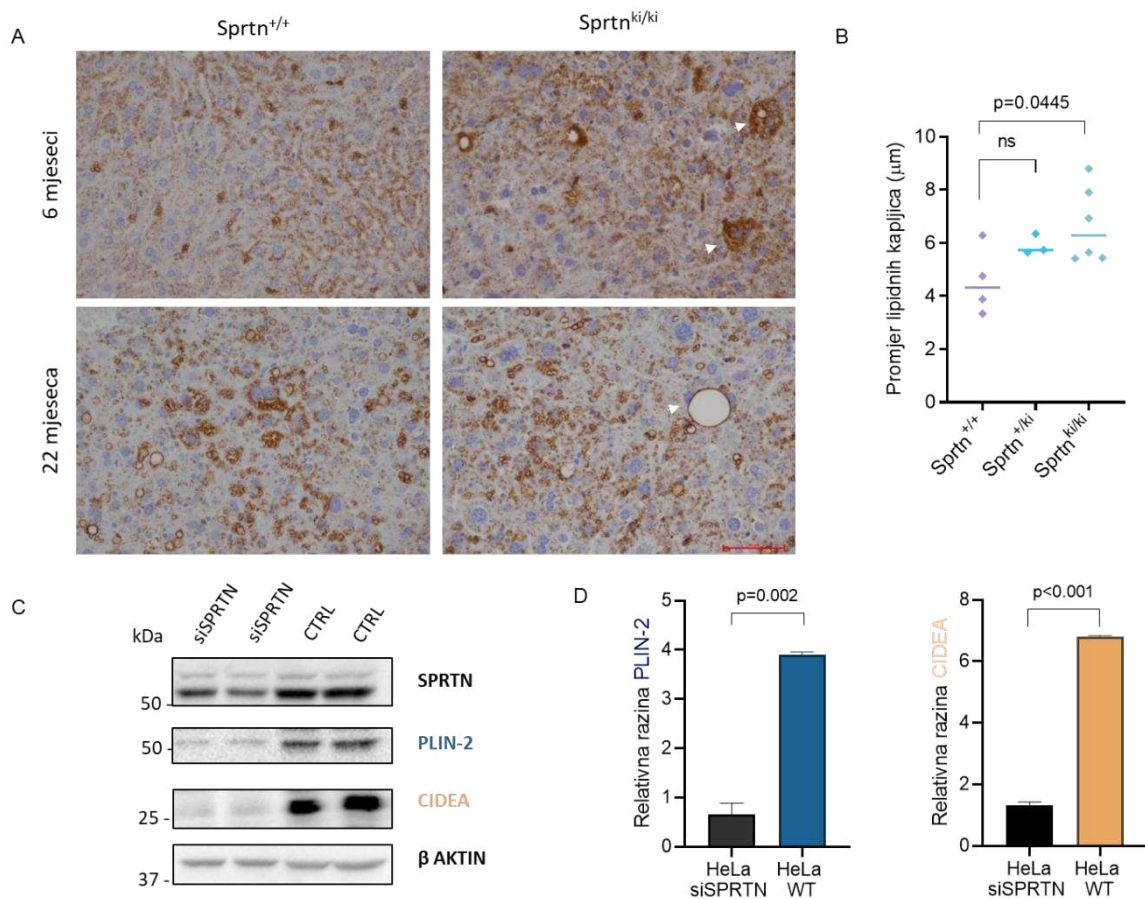
Regulacija*	ID	GO biološki proces	FDR p-vrijednost	Geni
↑	GO:0006690	Metabolički proces ikosanoida	3,13E-07	Akr1c14, Akr1c20, Akr1c6, Cyp2b13, Cyp2b9, Cyp2c29, Cyp2c37, Cyp2c50, Cyp2c54, Cyp2d9, Cyp2e1, Daglb, Ltc4s, Ptges
↑	GO:0006631	Metabolički proces masnih kiselina	3,13E-07	Abcd3, Acot11, Acsm5, Adtrp, Akr1c14, Akr1c20, Akr1c6, Aldh3a2, Cyp2b13, Cyp2b9, Cyp2c29, Cyp2c37, Cyp2c50, Cyp2c54, Cyp2d9, Cyp2e1, Daglb, Lonp2, Pdk1, Per2, Pparg, Ptges, Rgn, Thns12
↑	GO:0006805	Metabolički proces ksenobiotika	3,13E-07	Ahr, Cyp1a2, Cyp2b13, Cyp2b9, Cyp2c29, Cyp2c37, Cyp2c50, Cyp2c54, Cyp2d9, Cyp2e1, Gstm2, Nceh1, Pon3, Ugt1a1
↑	GO:0010889	Regulacija sekvestracije triglicereida	0,0376648	Cidea , Fitm1, Pparg
↑	GO:0001659	Temperaturna homeostaza	0,0453258	Abhd6, Acot11, Aldh1a1, Cidea , Ednrb, Mup1, Pdgfc, Per2, Tle3
↑	GO:0016042	Katabolički procesi lipida	0,0008577	Abcd3, Abhd6, Adtrp, Ces1g, Ces3a, Cidea , Cyp1a2, Daglb, Gpcpd1, Lonp2, Nceh1, Plbd1, Plcg1, Smpd3, Spp1, Sult1e1
↑	GO:0019216	Regulacija lipidnih metaboličkih procesa	0,0453258	Abhd6, Ces1g, Cidea , Fgfr3, Kit, Lonp2, Mup1, Pdk1, Pik3r3, Pparg, Rgn, Serpina12, Smpd3

*↑ predstavlja povećan izražaj mRNA

4.1.6. Potvrđivanje rezultata lipidnog metabolizma proizašlih iz analize transkriptoma

Kako bismo potvrdili rezultate dobivene sekvenciranjem RNA koji ukazuju na promjenu metabolizma lipida u miševa *Sprtn*^{ki/ki}, prvenstveno promjene u izražaju gena *Cidea* i određenih gena iz obitelji *Cyp*, napravili smo analizu distribucije masti u jetri analizom proteina Perilipin-2 (Plin-2) koji se nalazi u membranama lipidnih kapljica. Imunohistokemijskom analizom pronašli smo poremećaj veličine lipidnih kapljica u tkivu jetre miševa *Sprtn*^{ki/ki} (Slika 12A), čime smo potvrdili da pronađeni transkriptomski poremećaj u konačnici dovodi i do promjena na proteinskoj razini (Tablica 4). Rezultati su pokazali da su lipidne kapljice u grupi *Sprtn*^{ki/ki} većeg promjera (srednja vrijednost je 6,69 μm) u usporedbi s *Sprtn*^{+ki} (5,91 μm) i *Sprtn*^{+/+} (4,57 μm) (Slika 12B). Nadalje, za dodatnu potvrdu međuovisnosti proteina SPRTN s proteinima lipidnog metabolizma napravljeno je utišavanje SPRTN RNA interferencijom u stanicama HeLa. Pokazano je smanjenje izražaja proteina CIDEA i PLIN-2 (Slika 12C), što je relativno kvantificirano u odnosu na uzorak β -AKTINA (Slika 12D).

Pokazali smo abnormalnu raspodjelu i nakupljanje velikih lipidnih kapljica koje su bile promjera do 40 μm u miševa s Ruijs-Aalfsovim fenotipom, dok su u kontrolnim skupinama miševa najveće kapljice bile 11 odnosno 14 μm . Slične promjene povezane su s masnom bolešću jetre u ljudi [73]. Povezanost proteina SPRTN s proteinima važnim za lipidni metabolizam potvrdili smo i RNA interferencijom što zajedno upućuje na ulogu proteina SPRTN u lipidnom metabolizmu.



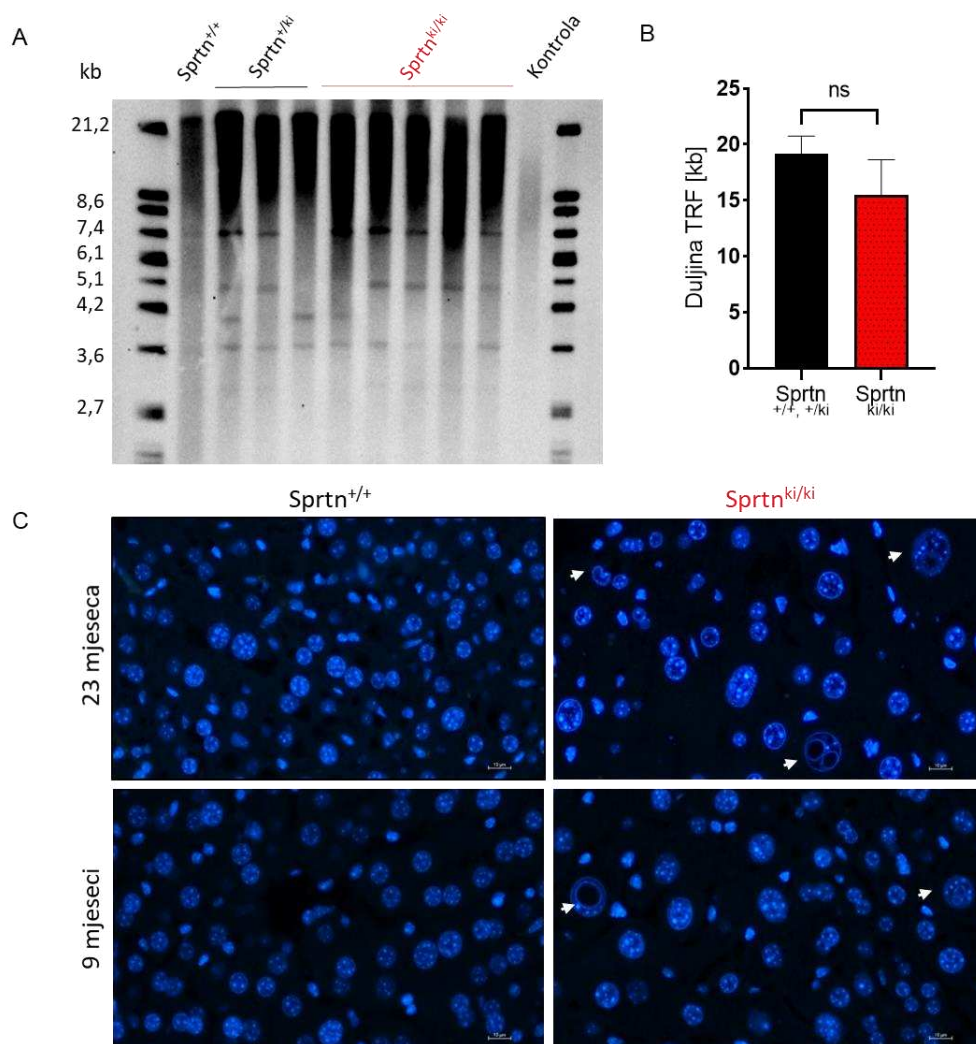
Slika 12. **Deregulacija lipidne homeostaze zbog mutacije u genu *Sprtn* i redukcije izražaja proteina SPRTN.** (A) Reprezentativni prikaz raspodjele lipidnih kapljica u tkivu jetre Sprtn^{ki/ki} i kontrolnih miševa starih šest i 22 mjeseca. Precipitirani smeđi kromogen je na mjestima detekcije proteina Perilipin-2 (PLIN-2), gradivne komponente lipidnih kapljica. Na preparatima Sprtn^{ki/ki} bijelim strelicama su označene velike lipidne kapljice i pjenušava citoplazma hepatocita. (B) Promjer lipidnih kapljica u sva tri genotipa miševa. Kvadratići predstavljaju individualne vrijednosti te je prikazan medijan. Korišteni testovi za ispitivanje statističke značajnosti su jednosmjerna analiza varijance s višestrukom usporedbom, p-vrijednost < 0,05 uzeta je kao statistički značajna. Normalnost i log-normalnost podataka određena je Shapiro-Wilkovim testom. (C) Imunoblot utišavanja SPRTN u stanicama HeLa za provjeru međuovisnosti s proteinima uključenima u lipidni metabolizam. β-AKTIN je kontrola nanošenja količine proteinskog uzorka na gel. (D) Relativna kvantifikacija proteina PLIN-2 i CIDEA nakon utišavanja SPRTN. Količina proteina je određena korištenjem programa ImageJ u odnosu na β-AKTIN. Prikazana je kvantifikacija imunoblota pod (C). Statistička analiza provedena je u GraphPad programu korištenjem T-testa. Podaci s p-vrijednosti manjom od 0,05 su prihvaćeni kao statistički značajni.

4.1.7. Poremećaji kromatina

Obzirom da miševi Sprtn^{ki/ki} ubrzano stare, provjerili smo duljinu telomera DNA u stanicama jetre korištenjem Southern blot analize (Slika 13A). Denzitometrijska kvantifikacija pokazala je da imaju kraće telomere od kontrola (Sprtn^{+/+} i Sprtn^{+/ki}), unatoč izostanku statističke značajnosti (Slika 13B). Analizirani su miševi stari 23 mjeseca, a prosječna duljina

telomernih restrikcijskih fragmenata (TRF) miševa *Sprtn*^{ki/ki} bila je 15,3 kilobaza (kb) dok su kontrole imale 19,2 kb.

Budući da smo pronašli interakciju SPRTN s DNMT1 i UHRF1, a onda i hipometilaciju epigenoma miševa *Sprtn*^{ki/ki} pretpostavili smo da će arhitektura kromatina biti narušena, posebno zato što ispitivani miševi imaju mutaciju u enzimskoj domeni gena, tj. u domeni koja je odgovorna za njegove ključne funkcije. Pregledom tkiva jetre obojane fluorescentnom bojom DAPI koja specifično boja jezgru, pronašli smo narušenu nuklearnu arhitekturu hepatocita i smanjenu kondenziranost kromatina u pericentromernim regijama kromosoma (Slika 13C).

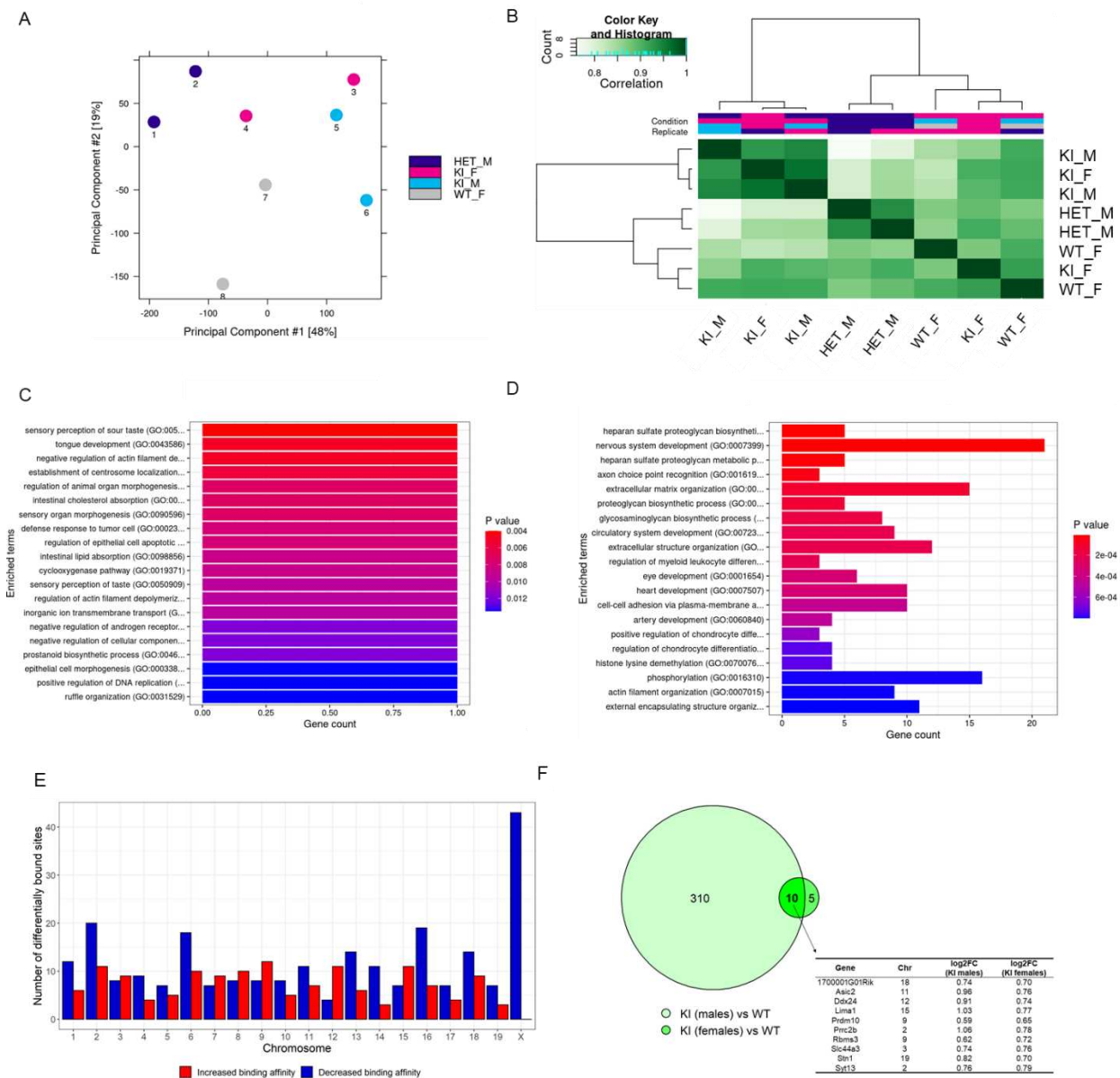


Slika 13. **Kromatinske promjene u jetri u modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma.** (A) Imunoblot telomernih restrikcijskih fragmenata (TRF) dobivenih analizom Southern *blot*. (B) Denzitometrijska kvantifikacija imunoblota (A) prema markeru na membrani, napravljena pomoću programa ImageLab. Statistička analiza provedena je korištenjem T-testa. Statistička značajnost: $p < 0,05$. (C) Preparati jetre miševa *Sprtn*^{ki/ki} i *Sprtn*^{+/+} obojani fluorescentnom bojom DAPI. Prikazane su reprezentativne slike miševa starih devet i 23 mjeseca, a bijele strelice ukazuju na primjere nuklearnih atipija pronađenih u hepatocitima *Sprtn*^{ki/ki}. Slike su snimljene na mikroskopskom povećanju od 400x.

Pronađeni nuklearni polimorfizmi (ili nuklearne atipije) uključivali su pleomorfizme, anizokarioze, makrokarioze, promjene u gustoći i količini kromatina, redistribuciji heterokromatina uz prisustvo makronukleola unutar jezgara. Te promjene mogu modulirati globalni izražaj gena kroz epigenetičke promjene i relokalizaciju kromatinskih čimbenika, što bi moglo doprinosti Ruijs-Aalfsovom fenotipu.

4.1.8. Kromatinske promjene u primarnim mišjim embrionalnim fibroblastima $Sprtn^{ki/ki}$

Za ispitivanje kromatinskih promjena napravljeno je sekvenciranje ATAC na primarnim mišjim embrionalnim fibroblastima (MEF) koje smo proizveli križanjem miševa $Sprtn^{+/ki}$. Analizirano je remodeliranje kromatina fibroblasta izoliranih iz mišjih embrija starosti 15,5 dana. Analiza glavnih komponenti razdvojila je divlji tip od heterozigotnih stanica MEF (Slika 14A), iako miševi $Sprtn^{+/ki}$ nemaju karakteristike Ruijs-Aalfsovog sindroma. U korelacijskoj analizi jedna jedinka $Sprtn^{ki/ki}$ ženskog genotipa (označena brojem 4 na PCA grafu), izdvojila se od ostalih jedinki $Sprtn^{ki/ki}$ i grupirala se među MEF-ove divljeg tipa (Slika 14B). Različitost MEF-ova heterozigota i jedinki divljeg tipa (Slika 14A), predlaže da se, na kromatinskoj razini, njihov embrionalni razvoj donekle razlikuje, iako se heterozigoti po rođenju ne razlikuju od jedinki divljeg tipa. Dalje smo usporedili $Sprtn^{ki/ki}$ MEF-ove muškog i ženskog genotipa s kromatinskom dostupnošću stanica divljeg tipa. Biološka značajnost promjena utvrđena je genskom ontologijom (GO) uspoređujući stanice MEF $Sprtn^{ki/ki}$ ženki sa stanicama divljeg tipa (Slika 14C). Ta analiza pokazala je obogaćenost gena za uspostavljanje organizacije centrosoma (engl. *establishment of centrosome organization*), morfogenezu osjetnih organa (engl. *sensory organ morphogenesis*), ciklooksigenazni put (engl. *cyclooxygenase pathway*) uz obogaćenost više drugih procesa (Slika 14C). Uspoređujući $Sprtn^{ki/ki}$ MEF-ove muškog genotipa s divljim tipom MEF-ova istaknuli su se biološki procesi vezani za razvoj živčanog sustava (engl. *nervous system development*), razvoj oka (engl. *eye development*) i inkapsulirane strukture (engl. *external encapsulating structure organization*) poput leće oka, a koji su zanimljivi u kontekstu proučavanja proteina SPRTN (Slika 14D). Vezanje transkripcijskih čimbenika kao i prisustvo nukleosoma, sprječava djelovanje enzima transpozaze Tn5 tijekom pripreme uzoraka za sekvenciranje. Stoga smo usporedili obrasce djelovanja transpozaze Tn5 u $Sprtn^{ki/ki}$ i $Sprtn^{+/+}$ MEF-ovima po kromosomima (engl. *number of differentially bound sites*) (Slika 14E). Ti rezultati ukazuju na masivno kromatinsko remodeliranje zbog mutacije u genu *Sprtn*.



Slika 14. Epigenomsko remodeliranje kromatina u *Sprtn*^{ki/ki} primarnim mišjim embrionalnim fibroblastima (MEF). (A) Graf analize glavnih komponenti (PCA) sekvenciranja ATAC. (B) Pearsonova korelacija očitavanja nakon normalizacije pomoću DESeq2 (engl. *Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution*). Promijenjeni GO biološki procesi u (C) *Sprtn*^{ki/ki} skupini ženskog genotipa u usporedbi sa *Sprtn*^{+/+} ženskog genotipa i (D) *Sprtn*^{ki/ki} skupini muškog genotipa u usporedbi sa *Sprtn*^{+/+} ženskog genotipa pomoću mrežnog alata EnrichR. (E) Broj diferencijalnih veznih mjesta i njihovo obogaćenje po kromosomima, proizašao iz usporedbe MEF stanica *Sprtn*^{+/+} muškog i ženskog genotipa sa *Sprtn*^{+/+} ženskog genotipa s dominantnom smanjenom sposobnošću vezanja (engl. *Decreased binding affinity*) u usporedbi s povećanom sposobnošću vezanja (engl. *Increased binding affinity*). (F) Venn-ov prikaz zajedničkih gena muškog (KI males) i ženskog (KI females) genotipa *Sprtn*^{ki/ki} MEF-ova nakon usporedbe s kontrolnim MEF-ovima divljeg tipa, s kromosomskom lokalizacijom (Chr) i log₂ FC vrijednostima. HET_M, *Sprtn*^{+/ki} heterozigotni MEF-ovi muškog genotipa; KI_F *Sprtn*^{ki/ki} homozigotni mutirani MEF-ovi ženskog genotipa; KI_M *Sprtn*^{ki/ki} homozigotni mutirani MEF-ovi muškog genotipa; WT_F *Sprtn*^{+/+} homozigotni MEF-ovi divljeg tipa i ženskog genotipa.

Područja remodeliranog genoma koja su zajednička mutiranim MEF-ovima (Sprtn^{ki/ki}) muškog i ženskog genotipa zajedno obuhvaćaju deset gena od kojih su neki dio metabolizma RNA (*Ddx24*, *Prrc2b* i *Rbms3*) prema mrežnom alatu *GeneCards* (Slika 14F). Gen *Prdm10* je prema genskoj ontologiji istog mrežnog alata dio puta aktivnosti metiltransferaza (engl. *methyltransferase activity*) i vezanja na nukleinske kiseline (engl. *nucleic acid binding*), a gen *Stn1* je dio kompleksa koji inhibira telomerazu i uključen je u održavanje homeostaze duljine telomera (Slika 14F).

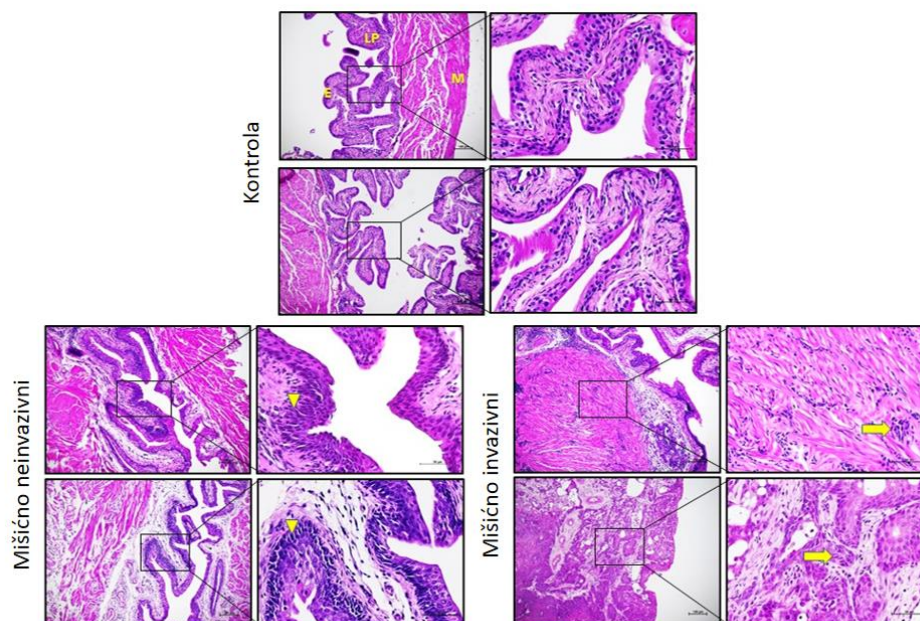
4.2. Epigenetske razlike između neinvazivnog i invazivnog raka mokraćnog mjehura

Tumori inducirani BBN-om kod miševa dijele slične molekularne i histološke karakteristike s ljudskim tumorima mokraćnog mjehura, čineći taj model prikladnim za istraživanje nastanka i razvoja te bolesti u ljudi. Rastući je broj dokaza da poremećaji metilacije DNA utječu na razvoj raka. U skladu s tim, pokazano je da deregulaciju metilacije DNA prati remodeliranje kromatina, što bi mogao biti ključan događaj u patogenezi raka mokraćnog mjehura. U ovom dijelu rezultata prikazujemo metilomske i transkriptomске promjene u neinvazivnom i mišićno-invazivnom raku mokraćnog mjehura miševa tretiranih BBN-om.

4.2.1. Indukcija tumora mokraćnog mjehura u miševa i probir uzoraka

Histološka analiza uzoraka mokraćnog mjehura pokazala je da su BBN-om tretirane životinje razvile urotelne karcinome različite arhitekture, stanične morfologije te stadija progresije tumora (Slika 15).

Uzorci su prema histopatološkoj analizi razvrstani u grupe s mišićno invazivnim tumorom (I), mišićno neinvazivnim tumorom (NI) te zdravim mjehurom, tj. u kontrolnu skupinu (CTRL). Na histološkim preparatima s invazivnim tumorima (n=11), bile su prisutne aberantne stanice u subepitelnom vezivnom tkivu s ili bez mišićne invazije. U dijelu uzoraka s neinvazivnim tumorima (n=6) pronađen je *carcinoma in situ* (n=4), dok ostala dva uzorka histološki nisu pokazivala znakove tumorske patologije. Kontrolna, netretirana skupina imala je održanu arhitekturu tkiva mokraćnog mjehura.

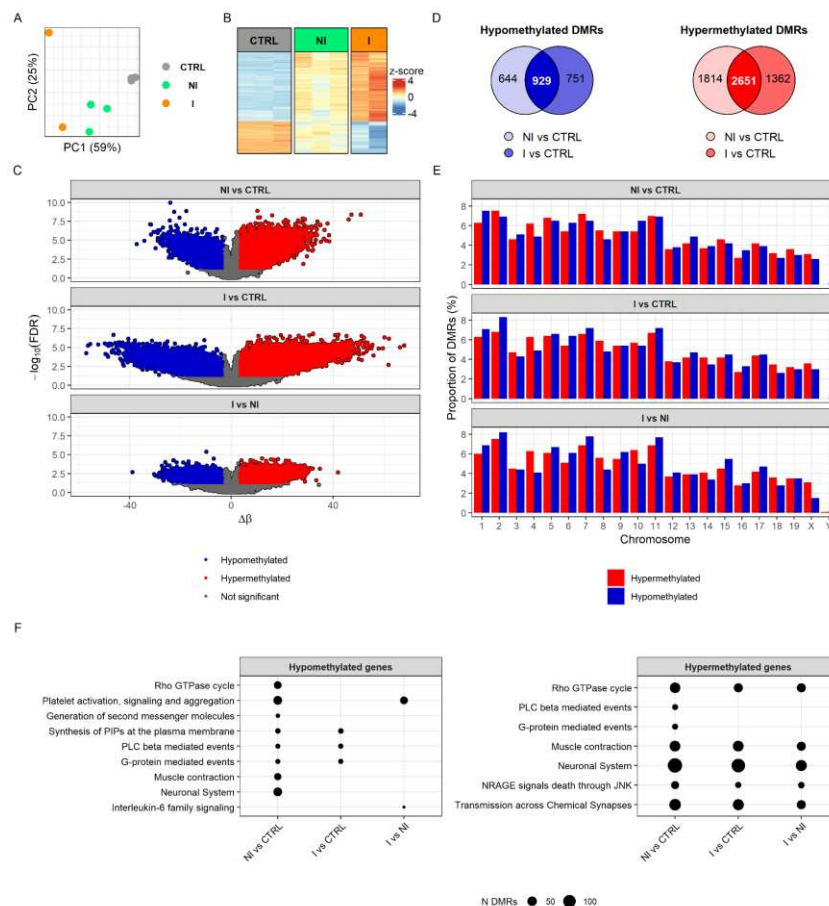


Slika 15. **Morfologija tumorskog i zdravog tkiva mokraćnog mjehura miševa.** Reprezentativne fotografije histopatološke klasifikacije tkiva mjehura obojanih hemalaun-eozinom. Na kontrolnim uzorcima prikazana je osnovna histološka građa mokraćnog mjehura (E, epitel; LP, lamina propria; M, mišić). Uzorci miševa tretiranih BBN-om razvrstani su u neinvazivne (glave strelica prikazuju nasumično raspoređene i zbijene stanice s velikim, pleomorfim jezgrama te stanice s više jezgara) i invazivne tumore (strelice ukazuju na invaziju urotelnih stanica u mišić). Slike su snimljene na povećanju od 400x i 600x.

4.2.2. Profiliranje metiloma raka mokraćnog mjehura

Za karakterizaciju metilacijskih promjena molekule DNA povezanih s progresijom raka mokraćnog mjehura, profilirali smo metilom BBN-induciranih tumora mjehura i kontrola korištenjem metode *Infinium Mouse Methylation BeadChip* (Illumina). Analiza komponenti PCA diferencijalno metiliranih regija, razdvojila je sve tri skupine; invazivne od neinvazivnih tumora te oba tipa tumora od kontrolne skupine (Slika 16A). Metilacijski status DMR-ova pokazuje dosljednost i konzervirani uzorak među biološkim replikatima unutar svake pojedine skupine (Slika 16B). Razlike u metilacijskom profilu između kontrola i tumora su vidljive, s relativno izraženijom promjenom u invazivnim tumorima (Slika 16B,C). Preklapanjem 1680 hipometiliranih DMR-ova dobivenih usporedbom invazivne skupine s kontrolom, pronašli smo da je njih 929 zajedničko s neinvazivnom skupinom koja je prethodno bila uspoređena s kontrolom. Dok je od 4013 hipermetiliranih DMR-ova u invazivnim tumorima, 2651 bilo zajedničko s neinvazivnim (Slika 16D). Analiza metilacijskog uzorka pokazuje da opsežne epigenetske promjene prate transformaciju stanica u zloćudne. Usporedbom invazivnih karcinoma s neinvazivnima, pronađene su izražene hipometilacijske promjene duž većine

kromosoma, što kazuje da je gubitak metilacijskog uzorka promjena koja prati progresiju urotelnih tumora (Slika 16E).



Slika 16. **Analiza metilacije DNA mokraćnih mjehura miševa.** (A) Graf analize glavnih komponenti (PCA) ukupnih promjena metilacije DNA. (B) Prikaz diferencijalno metiliranih proba ($n = 6291$) s delta beta većom od $> 0,25$ u skupinama I, NI i CTRL proizašao iz preklapanja triju usporedba (NI vs CTRL, I vs CTRL i I vs NI). (C) Vulkano grafovi sa sumiranom analizom metiloma prikazuju različitu distribuciju hiper- i hipometiliranih DMR-ova. (D) Venn-ovi dijagrami s brojem DMR-ova koji su hipometilirani, odnosno hipermetilirani u različitim usporedbama te broj zajedničkih DMR-ova preklapanjem analiza s genima koji su imali srednju razliku metilacije DNA veću od 3. (E) Distribucija DMR-ova na svim kromosomima miša. (F) Najpromjenjeniji biološki putevi (prema *Reactome* bazi) obogaćeni u hipo- i hipermetiliranim DMR-ovima u svakoj usporedbi.

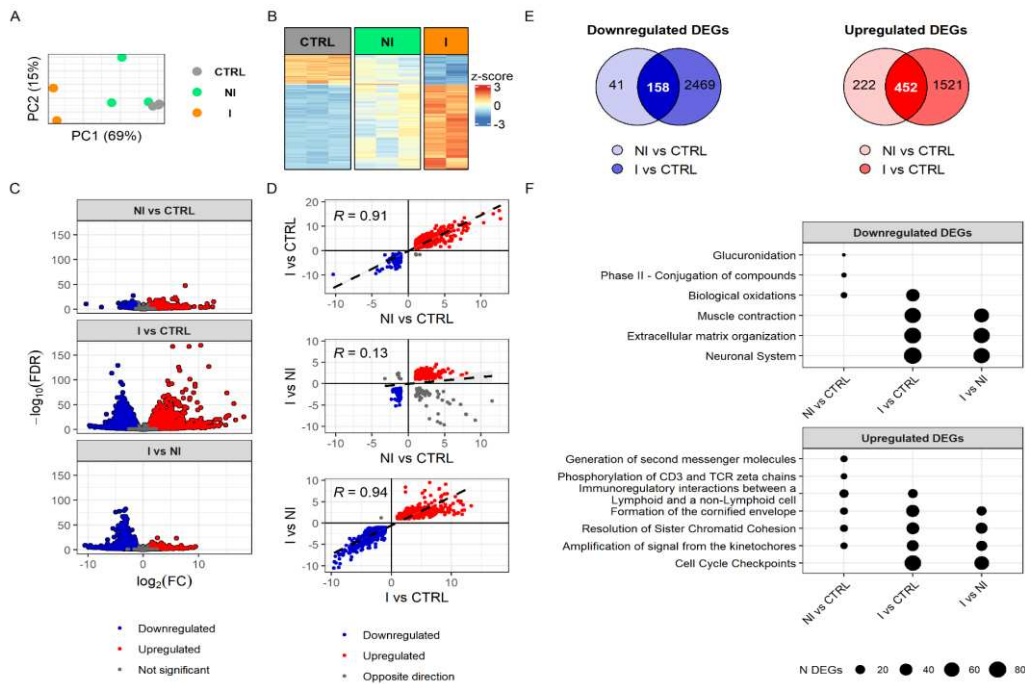
I, invazivni tumor; NI, neinvazivni tumor; CTRL, kontrola; „z-score“, z vrijednost (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije); DMR, diferencijalno metilirane regije; „not significant“, rezultati bez značajne statističke razlike.

Za sveobuhvatni pregled promjena, biološke funkcije diferencijalno metiliranih regija utvrđene su pomoću *Reactome* puteva. Hipometilacija neinvazivnih tumora, uspoređena s kontrolom, povezana je s aktivacijom, signalizacijom i agregacijom trombocita (engl. *platelet activation, signaling and aggregation*), Rho GTPaznim ciklusom (engl. *Rho GTPase cycle*), živčanim sustavom (engl. *neuronal system*) i genima uključenima u mišićnu kontrakciju (engl. *muscle contractions*), dok je hipometilacija u invazivnim tumorima (uspoređenima s

kontrolom) povezana s putevima za sintezu fosfatidilinozitol fosfataze (engl. *synthesis of phosphatidylinositol phosphates at the plasma membranes*, PIPs), fosfolipazu C beta (engl. *phospholipase C beta mediated events*, PLC) i G-proteinom posredovani događaji (engl. *G-protein-mediated events*) (Slika 16F). Uzorak hipermetiliranih DMR-ova pronađenih u obje grupe s tumorima (NI i I) bili su povezani s mišićnom kontrakcijom, živčanim sustavom, transmisijom preko kemijskih sinapsa (engl. *transmission across chemical synapses*), Rho GTPazni ciklusom i NRAGE signalnom smrću pomoću JUN kinaze (engl. *NRAGE signals death through JNK*) (Slika 16F). Sveukupno gledajući, u tumorima je više bilo zajedničkih puteva zahvaćenih hipermetilacijom nego hipometilacijom. Hipo- i hipermetilacija su imale utjecaja na procese vezane za mišićnu kontrakciju i živčani sustav u neinvazivnoj skupini, dok su isti procesi bili zahvaćeni isključivo hipermetilacijom u invazivnim tumorima. Direktnom usporedbom invazivnih i neinvazivnih tumora, hipometilirani DMR-ovi bili su dio puteva za aktivaciju, signalizaciju i nakupljanje trombocita te za signalizaciju interleukinom 6 (engl. *IL6 signaling*), dok su hipermetilacijski profili bili slični među sve tri usporedbe (Slika 16F).

4.2.3. Mjerenje ukupnog genskog izražaja zloćudnih tumora mokraćnog mjehura

Za provjeru utječu li metilomske promjene na transkriptom i na koji način, provedeno je sekvenciranje RNA na istom setu uzoraka. Ti su rezultati pokazali da je transkriptom značajno zahvaćen kroničnim BBN tretmanom te da promjene izražaja gena ovise o tumorskoj invazivnosti. Analiza glavnih komponenti ekspresijskog profila gena pokazala je jasno grupiranje uzoraka i heterogenost u grupi bez invazije (Slika 17A), što je u skladu s histopatološkom analizom (Slika 15). Na grafu s 234 diferencijalno eksprimirana gena (engl. *differentially expressed genes*, DEG), koji su bili zajednički nakon tri usporedbe (naznačene u opisu Slike 17B), neinvazivna skupina izgleda kao prijelazno stanje između kontrole i invazivnih tumora (Slika 17B). Gledajući uzorke pojedinačno, dva u neinvazivnoj skupini imaju sličniji transkriptomski profil kontroli, dok je treći neinvazivni tumor bio bliži invazivnoj grupi, ali s manje izraženim promjenama (Slika 17B). Općenito, za invazivne tumore je bio karakteristično smanjen izražaj DEG-ova uspoređujući s neinvazivnom skupinom (Slika 17C). Ovo je također vidljivo iz korelacijske analize DEG-ova, gdje se istaknuo nedostatak korelacije u usporedbi NI vs CTRL s DEG-ovima proizašlim iz usporedbe I vs NI ($R=0,13$; $p=0,025$) (Slika 17D).



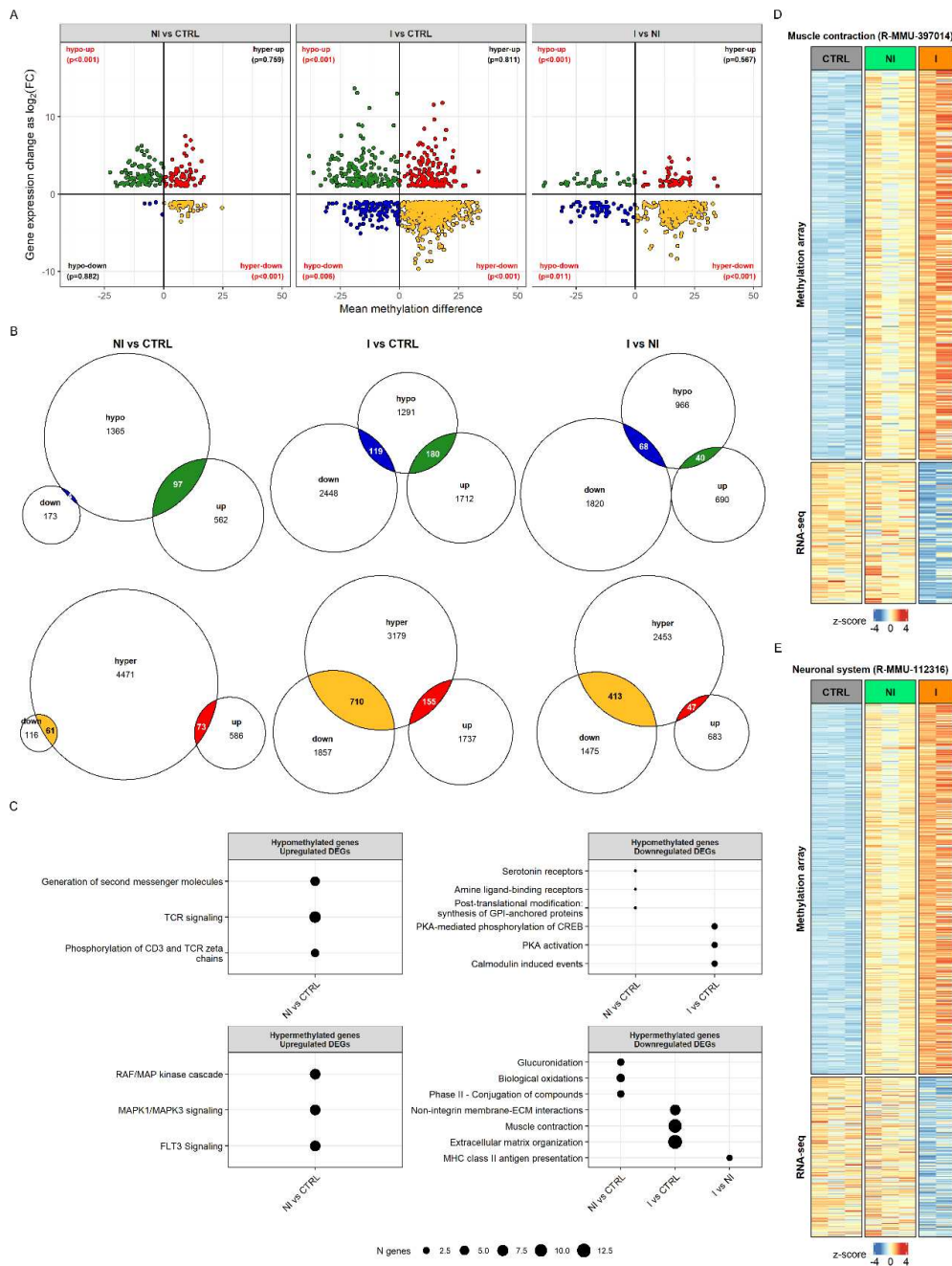
Slika 17. **Profil ekspresije gena raka mokraćnog mjehura.** (A) Analiza glavnih komponenti prikazuje grupiranje uzoraka prema ekspresijskom profilu. (B) Prikaz 234 zajednička diferencijalno eksprimirana gena (DEG) proizašla iz preklapanja triju analiza (NI vs CTRL, I vs CTRL i I vs NI). (C) Vulkano grafovi s \log_2 promjenom omjera izražaja (engl. *fold change*, FC) s FDR p-vrijednosti u svakoj usporedbi. (D) Korelacija između \log_2 FC diferencijalno eksprimiranih gena kroz tri usporedbe (naznačene na x i y osi grafova) korištenjem Pearsonove korelacije. (E) Preklapanje smanjeno (engl. *downregulated*) i prekomjerno (engl. *upregulated*) izraženih DEG-ova identificiranih u invazivnoj i neinvazivnoj skupini u usporedbi s kontrolom. (F) Obogaćeni *Reactome* putevi u smanjeno i prekomjerno reguliranim DEG-ovima. I, invazivni tumor; NI, neinvazivni tumor; CTRL, kontrola; „z-score“, z vrijednost (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije); DEG, diferencijalno eksprimirani geni; „not significant“, rezultati bez značajne statističke razlike; „opposite direction“, suprotno usmjereni DEG-ovi.

Nadalje, preklapanjem DEG-ova nakon usporedbe tumorskih uzoraka s kontrolom, pronašli smo da neinvazivni tumori dijele s invazivnim tumorima više prekomjerno eksprimiranih gena nego smanjeno eksprimiranih (n=452 prema n=158). U usporedbi s neinvazivnim tumorima, invazivni tumori imaju više promjena na nivou ukupnog genskog izražaja, uključujući više DEG-ova s prosječno višim omjerima promjene izražaja (FC) s značajnijim p-vrijednostima (Slika 17C,E). Funkcionalnom analizom DEG-ova, istaknuli su se geni uključeni u mišićnu kontrakciju, organizaciju izvanstaničnog matriksa (engl. *extracellular matrix organization*) te geni živčanog sustava kao smanjeno eksprimirani unutar invazivne skupine, ali ne i u neinvazivnoj grupi (Slika 17F).

4.2.4. Analiza odnosa metiloma i transkriptoma u raku mokraćnog mjehura

Kako bi ispitali možemo li zapažene promjene u transkriptomu objasniti s promjenama u metilacijskom statusu gena, usporedili smo rezultate analiza metilacije DNA i sveukupnog izražaja gena.

Hipermetilacijski status je pozitivno korelirao sa smanjenom ekspresijom gena što je pokazano hipergeometrijskim testom (p-vrijednosti prikazane na Slici 18A). Preklapanjem značajno promijenjenih gena u obje analize (metilacije i transkripcije) proizašlo je sljedeće: 28,11% DEG-ova i 3,87% DMR-ova preklapilo se u usporedbi NI s CTRL; 26,10% DEG-ova i 20,66% DMR-ova u I vs CTRL te 26,20% DEG-ova i 14,24% DMR-ova u I vs NI usporedbi (Slika 18B). Za procjenu biološke važnosti skupine gena koji dijele promijenjeni metilacijski i transkripcijski status u svakoj ispitanoj skupini, napravili smo analizu prekomjerne zastupljenosti korištenjem *Reactome* puteva (Slika 18C). Hipometilacija koju prati prekomjerna ekspresija obuhvatila je gene uključene u signalizaciju stanica T (engl. *T-cell signaling*), ali samo u grupi s neinvazivnim tumorima. Hipermetilacija i prekomjerna ekspresija gena u istoj grupi, zahvatila je signalne puteve povezane s MAP (engl. *RAF/MAP kinase cascade* i *MAPK1/MAPK3 signaling*) i FLT3 signalizacijom (engl. *Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase signaling*). U invazivnoj skupini, hipometilirani i smanjeno izraženi geni bili su povezani s događajima vezanim za protein kinazu A (engl. *PKA activation*) i kalmodulin (engl. *calmodulin induced events*).



Slika 18. Odnos metilacije DNA i ekspresije gena u tumorima mokraćnog mjehura induciranih BBN-om. (A) Graf prikazuje srednju vrijednost promjene metilacije u odnosu na \log_2 promjene omjera ekspresije (FC) gena. U analizu su uključeni geni koji su imali srednju vrijednost metilacije iznad > 3 i \log_2 FC iznad > 1 , FDR p-vrijednosti manjom od $< 0,05$; p-vrijednost dobivena je hipergeometrijskim testom. (B) Prikaz preklapanja diferencijalno ekspimiranih gena (DEG) i diferencijalno metiliranih regija (DMR). (C) Najpromjenjeniji putevi obogaćeni u različitim usporedbama (NI vs CTRL; I vs CTRL; I vs NI) temeljenima na preklapanju DEG-ova i DMR-ova. (D, E) Grupiranje uzoraka prema stupnjevima metilacije DNA (engl. *Methylation Array*) i izražaja gena (engl. *RNA-seq*) uključenih u mišićnu kontrakciju (D) i živčani sustav (E), prema *Reactome* bazi signalnih puteva. I, invazivni tumor; NI, neinvazivni tumor; CTRL, kontrola; „z-score“, z vrijednost (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije).

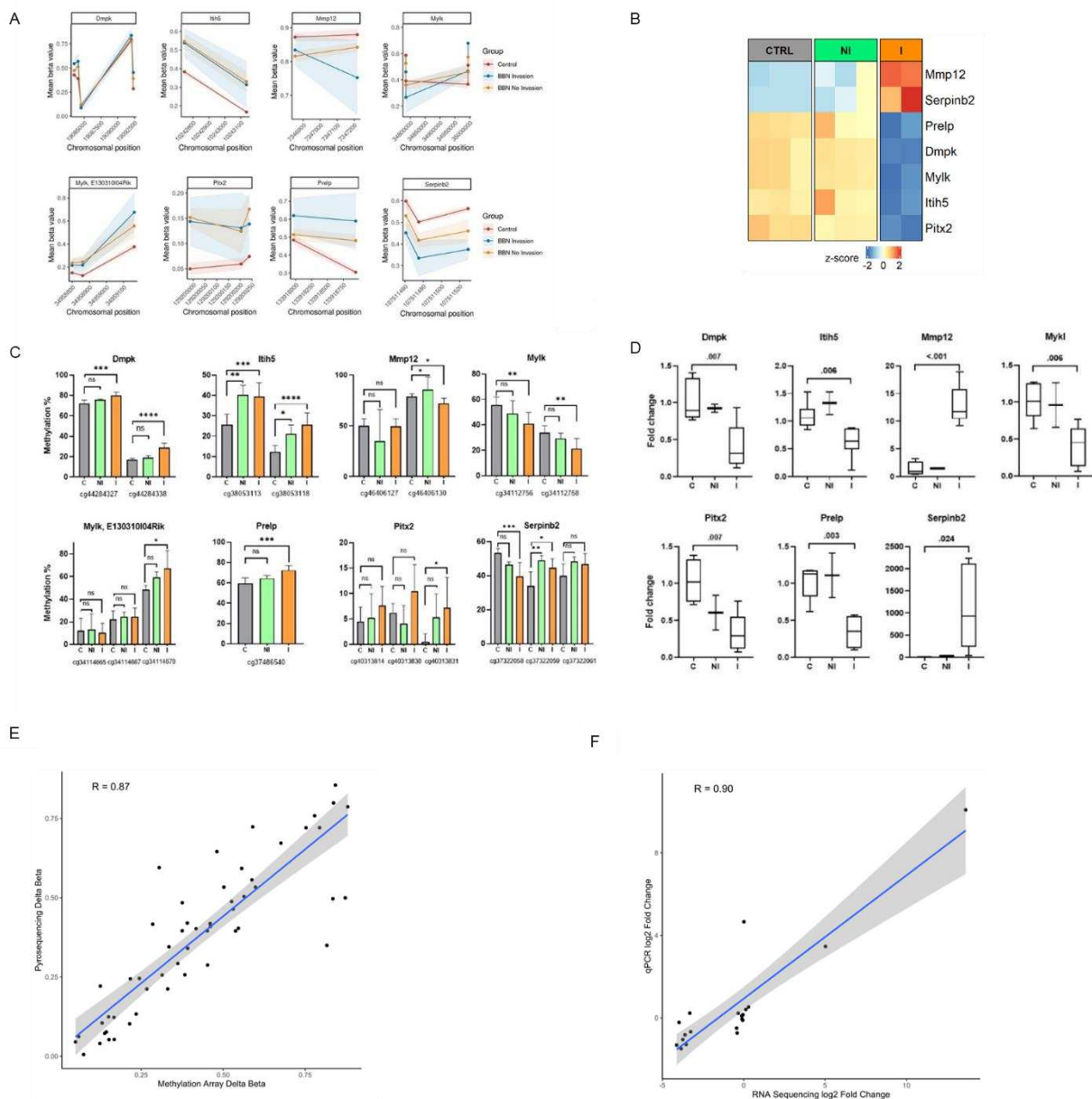
Najveći udio značajno promijenjenih gena bio je hipermetilirano i imao je smanjen izražaj u odnosu na kontrole. Neinvazivna skupina obuhvatila je gene uključene u

glukuronidaciju (engl. *glucuronidation*) i biološku oksidaciju (engl. *biological oxidations*), dok su geni s ovakvim promjenama u invazivnoj skupini obuhvatili procese mišićne kontrakcije, organizacije izvanstaničnog matriksa i interakcije ne-integrinskih proteina membrana i proteina izvanstaničnog matriksa (engl. *non-integrin membrane-ECM interaction*).

Geni pripadnici bioloških procesa mišićne kontrakcije i živčanog sustava nisu pokazali razlike na nivou ekspresije gena u neinvazivnoj skupini, iako su prema metilacijskom statusu bili hipermetilirani, kao i u invazivnoj skupini, ali s manjim opsegom promjena na istim otocima CpG. Neinvazivni uzorci su se grupirali s kontrolama na razini transkriptoma, dok se opseg metilacijskih promjena u invazivnoj skupini jasno odražava na transkriptom, kroz smanjenu ekspresiju zahvaćenih gena (Slika 18D,E).

4.2.5. Potvrđivanje metilacije i ekspresije odabranih kandidat gena

Za potvrdu pronađenih promjena, koristili smo veći broj uzoraka DNA i mRNA izoliranih iz mokraćnih mjehura miševa s tumorima te zdravih tkiva. Kandidat gene odabrali smo preklapanjem analiza *genome-wide* profiliranja metiloma i transkriptoma kako bi pronašli potencijalno interesantne kandidate koji bi mogli djelomično biti odgovorni za razvoj invazivnih svojstava u mišićno invazivnom raku mokraćnog mjehura. Geni su odabrani temeljem njihove statističke značajnosti u obje analize, s FDR p-vrijednosti $< 0,05$ i delta beta vrijednosti $> 0,25$ za DMR-ove te $\pm FC > 2$ za DEG-ove i pretraživanjem literature (Slika 19A, B). Odabrani geni su uglavnom uključeni u procese vezane za mišiće i izvanstanični matriks, koji su se u analizama funkcionalnog obogaćivanja istaknuli kao jedni od promjenjenijih. Dodatnom provjerom smo potvrdili prisustvo promjena u diferencijalno metiliranim i eksprimiranim genima u invazivnoj grupi (Slika 19C, D).



Slika 19. Potvrđivanje promjena u metilaciji i ekspresiji te njihova korelacija za set odabranih gena. (A) Regionalni grafovi beta vrijednosti metilacije DNA određene metodom *Infinium Mouse Methylation BeadChip*. (B) Uzorak ekspresije odabranih kandidat gena izmjeren sekvenciranjem RNA prikazan z-vrijednošću (broj očitavanja po uzorku nakon normalizacije). (C) Rezultati pirosekvenciranja. Srednja vrijednost razine metilacije DNA pojedinih CpG-ova u ispitivanim uzorcima (identifikacijski broj probe naznačen na x osi grafa). Broj uzoraka uključen u analizu: kontrolnih tkiva (C) n=8, neinvazivnih tumora (NI) n=3 i mišićno invazivnih tumora (I) n=9. (D) Potvrđivanje ekspresije gena napravljeno je na pet kontrolnih uzoraka (C), dva neinvazivna (NI) te šest invazivnih (I) tumora. Vrijednosti su normalizirane u odnosu na beta aktin i prikazane kao omjer promjene ekspresije (engl. *Fold change*). Pearsonova korelacija (E) razine metilacije izmjerene metodama pirosekvenciranja i *Infinium Mouse Methylation BeadChip*-a, i (F) ekspresije gena izmjerene qPCR-om i sekvenciranjem RNA. Točkice predstavljaju individualne vrijednosti. I, invazivni tumor; NI, neinvazivni tumor; CTRL ili C, kontrola. *p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns, statistički nije značajno.

Hipermetilaciju u DMR-u *Itih5* gena pratila je reducirana genska ekspresija u invazivnoj skupini, dok je neinvazivna grupa dijelila ekspresijski uzorak s kontrolom. Slično je bilo i s

genom *Mmp12* (identifikacijski broj probe: cg46406130), gdje bi ta promjena mogla biti djelomično odgovorna za uočenu prekomjerni izražaj ovog gena. Nadalje, invazivni uzorci su pokazali hiper- i hipometilaciju u *Serpina2* (cg37322058 i cg37322059) na dva susjedna dinukleotida CpG, što je rezultiralo prekomjernom količinom njegovog transkripta. Moguće objašnjenje je da je CpG (koji odgovara probi cg37322058) bliži promotorskoj regiji gena.

Nadalje, rezultati provjere pokazali su visoku korelaciju s rezultatima sekvenciranja i mjerenja globalnih promjena u metilomu DNA (Slika 19E,F). U neinvazivnoj skupini, metilacijske promjene nisu uvijek bile statistički značajne, djelomično i zbog malog broja uzoraka s neinvazivnim tumorom, ali generalno je vidljiva deregulacija njihovog metilacijskog statusa (u manjem opsegu) dok na nivou transkripta zadržavaju sličan profil kao i kontrole.

5. RASPRAVA

5.1. Abnormalnosti u mišjem modelu Ruijs-Aalfsovog sindroma

Brojni mehanizmi popravka DNA, poput popravka izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*) ili signalnog puta Fancomi anemije, nisu neophodnih za vijabilnost stanica osim ako su stanice izložene visokim dozama oštećenja [24]. Nasuprot tome, gubitak proteaze SPRTN za stanice sisavaca je letalan, jer uslijed nedostatka aktivnosti tog enzima u stanicama se nakupljaju DPC-ijevi koji uzrokuju smrt tijekom embrionalnog razvoja [18]. Razvoj terapijskih strategija s direktnim djelovanjem na popravak DPC-ijeva mogao bi otvoriti novi put za liječenje raka budući da kemoterapeutici uzrokuju nakupljanje kovalentno vezanih proteina na DNA [27]. Stanice sisavaca stalno se suočavaju s razrješavanjem DPC-ijeva, pa znanstvenici ulažu velike napore za razumijevanje mehanizama djelovanja proteina SPRTN u popravku takvih lezija [25,74–77].

U našoj studiji na Ruijs-Aalfsovom sindromu, pronašli smo da je SPRTN u interakciji s DNMT1 i UHRF1 te na taj način prvi pokazali da je ovaj protein dio epigenetske mašinerije. Proteini DNMT1 i UHRF1 vezali su sve tri varijante proteina SPRTN – divlji tip, SPRTN-Y117C i SPRTN-ΔC, što ukazuje da je mjesto njihove interakcije u N-terminalnoj domeni proteina SPRTN, tj. u prve 246 aminokiseline, obzirom da je ΔC varijanta vezala oba epigenetička regulatora. Provjerili smo postoji li interakcija proteina SPRTN s DNA metiltransferazama 3A i 3B (DNMT3A / 3B), ali njihova interakcija nije potvrđena (ti rezultati nisu prikazani). Vjerujemo da je interakcija proteina SPRTN s DNMT1 i UHRF1 funkcionalno važna, jer je profiliranje metilacije DNA miševa *Sprtn*^{ki/ki} otkrilo opsežne metilacijske promjene, a što je možda uzrokovano smanjenom učinkovitošću održavanja metilacijskog uzorka DNA prilikom njene replikacije, za koji je odgovorna DNMT1 [11]. Prema tome možemo zaključiti da je SPRTN direktno uključen u održavanje metilacijskog obrasca s DNMT1, ali ne i u kontrolu *de novo* metilacije zbog izostanaka interakcije s DNMT3A / 3B. Odabirom deset diferencijalno metiliranih gena iz analize svih promjena metiloma DNA te njihovom potvrdom na dodatnim uzorcima, nismo pronašli statistički značajne promjene u stupnju metilacije većine lokusa prema čemu zaključujemo da miševi *Sprtn*^{ki/ki} nasumično nakupljaju metilacijske promjene zbog naruše funkcionalnosti kompleksa proteina *Sprtn* s *Dnmt1* i *Uhrf1*. Možda opaženi metilacijski obrazac objašnjava graduirani fenotip miševa *Sprtn*^{ki/ki}, od jedinki rođenih bez oka, do miševa koji kasno u životu razvijaju samo kataraktu (Slika 7D). Jedini lokus sa statistički značajnom promjenom stupnja metilacije je *Pcp41l*, koji je prema mrežnom alatu *GeneCards* povezan s distrofijom rožnice, a koja se uočava i u dijelu miševa *Sprtn*^{ki/ki}. Također je pokazano je da je uslijed smanjenog izražaja gena *Pax6*, nužnog za razvoj oka, pada razina izražaja gena *Pcp4* [78] (važan paralog *Pcp41l* prema *GenesCard*),

a miševi *Sprtn*^{ki/ki} imaju hipermetilaciju unutar tog lokusa. Uloga proteina SPRTN u razvoju oka je nepoznata pa bi buduće studije u tom kontekstu mogle dodatno istražiti zajedničke funkcije proteina PAX6 i PCP4L1 u dijelovima mozga važnim za razvoj oka.

Proučavajući traskriptom miševa *Sprtn*^{ki/ki} pronašli smo porast sveukupne mRNA, što je u skladu s hipometilacijom znatnog broja promotora. Porast ekspresije gena zahvatio je više bioloških procesa. Za izdvojiti je lipidni metabolizam čije su se promjene odrazile na nenormalnu distribuciju lipidnih kapljica u hepatocitima praćenu nakupljanjem velikih masnih kapljica (i do 40 µm) s jezgrama okruženima pjenušavom citoplazmom. Te promjene mogle bi biti relevantne u kontekstu patologije hepatocelularnog karcinoma koji karakterizira Ruijs-Aalfsov sindrom u čovjeka. Budući da je steatohepatozna, masna bolest jetre, jedan od ključnih okidača zloćudnih tumora jetre, za pretpostaviti je da poremećeni metabolizam masti, koji smo uočili, doprinosi razvoju raka jetre i u ovom sindromu [79]. Prekomjerna ekspresija gena *Cidea* u jetri miševa povezan je s nakupljanjem lipida u hepatocitima i stvaranjem lipidnih kapljica te se njegova ekspresija povećava starenjem [73,80]. Uz protein *Cidea* koja potiče nakupljanje masti, povećan je izražaj gena obitelji *Cyp* koji su važni za metabolizam lipida i normalno funkcioniranje mitohondrija, stoga je logično pretpostaviti da su promjene u tim genima dio mozaika nastanka hepatocelularnog karcinoma u Ruijs-Aalfsovom sindromu [49,81]. Nadalje jedan od najpromjenjenijih gena bio je *Eda2R*, a radi se o genu za koji je pokazano da ga aktivira signalni put p53 tijekom gubitka kose uslijed kemoterapije, a njegov povećan izražaj potiče apoptozu folikula dlake miševa [82].

Promjene u epigenetskoj regulaciji aktivnosti gena važan su dio procesa tumorigeneze i starenja [5,49]. Epigenetske modifikacije DNA (i histona) često prate i kromatin remodelirajući procesi [83]. Provjerom arhitekture kromatina u dereguliranom metilomu miševa *Sprtn*^{ki/ki}, pronašli smo brojne jezgrene atipije s različito raspoređenim kromatinom i fokusima manje kondenziranosti u odnosu na kontrolnu skupinu. Dekondenzacija pericentromernih dijelova dovodi do redistribucije satelitnih ponavljanja koji su inače utišani [84]. Pericentromerene regije bogate su repetitivnim elementima pa bi eukromatičnost tog dijela genoma mogla rezultirati ekspanzijom repetitivnih elemenata po genomu i posljedičnom genomskom nestabilnošću [9]. Prisustvo većeg broja nukleola unutar jezgre može upućivati na nagomilavanje oštećenja DNA [85], što bi bilo u skladu s genomskom nestabilnošću uslijed defektnog popravljivanja DPC-ijeva. Uz to, kod miševa *Sprtn*^{ki/ki} dokazali smo ubrzano skraćivanje telomera, što je prateća karakteristika progeroidnih sindroma. Telomere su dio organizacije genoma i dinamične nuklearne arhitekture pa njihovo skraćivanje uzrokuje genomsku nestabilnost što u konačnici može dovesti do stanične senescencije, procesa koji

obilježava starenje [86]. Osim toga, brojni su proteini povezani s telomerama (tvoreći telosome) pa tako i proteini uključeni u mehanizme popravka DNA među kojima su p53, PARP (engl. *Polyadenosine Diphosphate Ribose Polymerase*), WRN (engl. *Werner Syndrome RecQ Like Helicase*) i BLM helikaze (engl. *Bloom Syndrome RecQ Like Helicase*) [87]. Za dodatno razumijevanje promjena kromatina u embrionalnom razvoju miševa s Ruijs-Aalfsom napravljeno je sekvenciranje ATAC iz primarnih fibroblasta izoliranih iz embrija miševa sa sva tri genotipa (divlji tip, heterozigoti i mutirani homozigoti). Heterozigoti su na kromatinskoj razini pokazali odvojeno grupiranje u analizi PCA, pa unatoč izostanku Ruijs-Aalfsovog fenotipa, na nivou kromatina tijekom embrionalnog razvoja promjene su uočljive. Kao i s fenotipom, izgled jezgara stanica jetre heterozigota nakon DAPI bojanja nije pokazao jezgrene atipije i promjene u distribuciji kromatina koje su prisutne u miševa *Sprtn^{ki/ki}*, iz čega možemo zaključiti da je dovoljna polovica izražaja divljeg tipa proteina *Sprtn* da se spriječi nakupljanje navedenih promjena starenjem. U analizi ATAC miševa *Sprtn^{ki/ki}*, vodili smo računa o spolu jer smo pokazali da je progeroidni sindrom izraženiji kod ženki. Generalno su genomi MEF stanica iz miševa *Sprtn^{ki/ki}* pokazali manje otvorenih regija u embrionalnom razvoju, što nije u skladu s hipometilacijom i eukromatičnim regijama pronađenim u tkivima starijih miševa, no razlog tome može biti nakupljanje DPC-ijeva ili transkripcijskih faktora u otvorenim regijama kromatina koji su spriječili vezanje transpozaze Tn5.

Naša istraživanja mišjeg modela Ruijs-Aalfsovog sindroma pokazala su važnu ulogu proteina SPRTN u epigenetskim procesima, što se reflektira na promjene metilacijskog statusa genoma, na izmjene strukture kromatina s posljedičnim promjenama transkriptoma, a kao vjerojatni uzrok tim promjenama je međudjelovanje proteina *Sprtn* s *Dnmt1* i njenim kočimbenikom *Uhrfl*.

5.2. Metilomske i transkriptomске promjene u mišjem modelu raka mokraćnog mjehura

Mišićno invazivni karcinom je bolest s lošom prognozom, s visokim metastatskim potencijalom i znatnom stopom smrtnosti [40]. Nekoliko studija profiliralo je mutacijske obrasce tumora mokraćnog mjehura gdje su pronašli visoku stopu mutacija u genima uključenima u epigenetsku regulaciju, što predlaže da poremećeni epigenetski mehanizmi imaju važnu ulogu u karcinogenezi mokraćnog mjehura [88]. Budući da promjene metilacije DNA – glavnog epigenetičkog mehanizma uključenog u tumorigenezu – prethode modulaciji genskog izražaja [89] pretpostavili smo da bi takve promjene mogle prethoditi invaziji zloćudnih tumora. U ovoj studiji naš je cilj bio identificirati promjene širom metiloma i transkriptoma u neinvazivnim i invazivnim tumorima mokraćnog mjehura induciranog BBN-om u miševa. Profiliranje metiloma pokazalo je gradacijsku promjenu metilacije između neinvazivnih i invazivnih tumora, što upućuje na postojanje tumorskog metilacijskog uzorka koji postaje izraženiji tijekom progresije tumora. U ovome smo istraživanju pronašli da je deregulacija metilacije na otocima CpG gena koji su dio genskih grupa mišićne kontrakcije i živčanog sustava, najizraženija promjena u tumorima, s hipo- i hipermetilacijskim promjenama u neinvazivnim tumorima, dok su invazivni tumori pokazivali samo hipermetilacijske promjene u istim biološkim procesima prema bazi *Reactome*. Metilacijske promjene u oba smjera kod neinvazivnih tumora mogle bi biti rezultat heterogenosti tumora, jer u invazivnim tumorima često dominira jedan stanični tip, a što nije slučaj u neinvazivnim tumorima.

Na nivou transkriptoma, geni uključeni u mišićnu kontrakciju bili su smanjeno eksprimirani u invazivnoj grupi, ali ne i u neinvazivnoj, što nam indicira da opseg metilacijskih promjena pronađenih u neinvazivnim tumorima nije dovoljan da bi rezultirao promjenama u izražaju gena. Metilacijske promjene ove skupine gena prisutne su u ranoj fazi bolesti i dalje se pojačavaju kako tumor napreduje. Naši pronalasci su u skladu sa studijom provedenoj na humanim uzorcima [90], u kojoj su autori identificirali smanjenu ekspresiju gena uključenih u kontrakciju glatkih mišića krvnih žila i u izvanstanični matriks. Nadalje, u drugoj studiji [91], autori su otkrili gene koji su dio puteva za mišićnu kontrakciju i mišićni sustav kao izrazito smanjeno izražene procese u raku mokraćnog mjehura, što je u skladu s našim rezultatima. Ovo sve ističe važnost deregulacije mišićnih procesa kao rane promjene u karcinogenezi mokraćnog mjehura.

Osim mišićne kontrakcije, otkrili smo skupinu gena s istim trendom promjena, a koji su dio procesa živčanog sustava, tj. deregulirani metilom pronađen je u neinvazivnim i invazivnim tumorima, dok je deregulacija transkriptoma zabilježena samo u invazivnim tumorima.

Neuralne promjene bi mogle ukazivati na promjene u urotelno-živčanoj regulaciji uslijed tranzicije iz neinvazivnih u invazivne tumore. Urotelne stanice su senzori i transduktori promjena u mjehuru koje se vjerojatno mijenjaju u patološkim stanjima te mogu dovesti do modifikacija u lokalnim senzornim živcima koji kontroliraju mišićnu kontrakciju [92]. Glatki mišići mokraćnog mjehura regulirani su aktivnošću brojnih ionskih kanala, primarno kalcijevih kao što su Cav1, Cacna1c, Atp2b4 i Trp [92], koji su u i u našoj studiji pokazali promjene u izražaju gena i metilaciji DNA u invazivnih tumora. Promjene u kontraktilnosti mokraćnog mjehura također je jedna od karakteristika raka mokraćnog mjehura, a promjene u *m. detrusor* pronađene su u modelu štakora za ovu bolest, što je u skladu s našim nalazima, dodatno ističući važnost funkcionalne neuro-muskularne interakcije u raku mokraćnog mjehura [93].

Sa specifičnim fokusom na gene pretežito promijenjene u mišićno-invazivnom raku mokraćnog mjehura odabrali smo nekoliko kandidat gena za potvrdu glavnih rezultata na većem broju uzoraka. Provjereni geni uglavnom su bili uključeni u procese mišićne kontrakcije. Među potvrđenim genima, *Itih5* (identifikacijski broj proba: cg38053113 i cg38053118), *Mmp12* (cg46406130) i *Serpinb2* (cg37322059) pokazali su statistički značajne promjene metilacije u pojedinim CpG-ovima u oba stadija tumora (I i NI). Među dodatno ispitanim diferencijalno metiliranim regijama (DMR), pronašli smo gradijentne promjene u metilaciji CpG od neinvazivne do invazivne skupine. Ovaj nalaz sugerira da se metilacija DNA mijenja u ranijim stadijima razvoja raka mokraćnog mjehura te da bi bilo vrijedno detaljnije istražiti ovu vrstu deregulacije u vrlo ranim fazama tumorigeneze mokraćnog mjehura. Ekspresija iste skupine gena pokazala je značajne razlike u invazivnim tumorima, dok su neinvazivni imali približno sličan obrazac ekspresije gena kao i kontrolni uzorci, što nam potvrđuje rezultate analiza sekvenciranja RNA i određivanja sveukupnih metilomskih promjena.

Gledajući biološku važnost dodatno ispitanih gena, pronašli smo da je gen *ITIH5* (engl. *Inter-trypsin inhibitor heavy chain 5*) često epigenetički promijenjen u različitim vrstama raka pa tako i u raku mokraćnog mjehura. Naime, hipermetilacija promotora tog gena povezuje se s progresivnim stadijem ove bolesti [94,95]. Nadalje, *ITIH5* ima ulogu u stabilizaciji izvanstaničnog matriksa i u smanjivanju metastatskog potencijala. Narušavanje njegove funkcije može utjecati na fokalnu adheziju stanica – jedan od bioloških puteva koji je poremećen u obje tumorske skupine u našoj studiji. Gen *MMP12* (engl. *Matrix metalloproteinases 12*) prethodno je bio povezan s progresijom tumora putem modulacije tumorskog okoliša kroz degradaciju izvanstaničnog matriksa. Iste su studije istaknule važnost te obitelji proteina u raku mokraćnog mjehura [96–98]. Koliko znamo, promjene u metilaciji DNA u ovom genu u kontekstu tumorigeneze mokraćnog mjehura nisu opisane pa bi buduća

istraživanja mogla dodatno ispitati važnost njegove epigenetske regulacije u nastanku i progresiji ove bolesti. Na kraju, trenutno nema dostupnih publikacija o ulozi *SERPINB2* (engl. *Serpin Family B Member 2*) u razvoju tumora mokraćnog mjehura, ali poznato je da je njegov prekomjerni izražaj povezan s metastatskom progresijom različitih tipova zloćudnih tumora [99].

Malignom transformacijom urotela bili su zahvaćeni i biološki procesi vezani za glukuronidaciju, signaliziranje stanica T, MAP kinaznu kaskadu i biološku oksidaciju, ukazujući na temeljite promjene u mokraćnom mjehuru tijekom procesa maligne transformacije.

Zaključno, otkrili smo nekoliko gena / molekula koje doprinose patogenezi mišićnog invazivnog raka mokraćnog mjehura koje mogu biti nove molekularne mete. Ti bi geni mogli poslužiti kao biomarkeri za razvoj epigenetički utemeljenih strategija za praćenje pacijenata s rakom mokraćnog mjehura kao i ciljane terapije kojima bi mogli smanjiti potencijal za progresiju raka mokraćnog mjehura kao i stopu njegovog recidiviranja. Osim toga, rezultati naše studije mogli bi unaprijediti razumijevanje biološke osnove raka mokraćnog mjehura. Promjena transkripcije gena uključenih u mišićne i živčane procese korelira s invazivnim osobinama raka mokraćnog mjehura, dok su epigenetičke promjene u toj skupini gena uočljive i u ranijim fazama karcinogeneze, s potencijalom za predikciju invazivnosti tumora. Tumori inducirani BBN-om kod miševa imaju molekularne i histološke karakteristike humanih tumora mokraćnog mjehura, što ukazuje da bi nalazi iz naše studije mogli biti i klinički relevantni.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Studija Ruijs-Aalfsovog sindroma

- a. Miševi s mutacijom Y117C odgovornom za Ruijs-Aalfsov sindromom - $Sprtn^{ki/ki}$, ubrzano stare i imaju veću embrionalnu smrtnost.
- b. Ženke s mutiranim genom *Sprtn*, $Sprtn^{ki/ki}$, imaju agresivniji fenotip.
- c. Miševi $Sprtn^{ki/ki}$ imaju globalnu deregulaciju metiloma DNA s dominantnom hipometilacijom, epigenetički su stariji, a telomere su im kraće.
- d. Protein SPRTN je u interakciji s proteinima DNMT1 i UHRF1, važnim regulatorima metilacije DNA. Veže ih preko svog N-terminalnog dijela, a njihova ekspresija ovisi o količini proteina SPRTN u stanici.
- e. Ukupna količina mRNA u jetri miševa $Sprtn^{ki/ki}$ je povećana, što je u skladu s hipometilacijom mnogih promotora.
- f. Na nivou transkriptoma u miševa $Sprtn^{ki/ki}$ poremećeni su mnogi biološki procesi, a posebno lipidni metabolizam.

6.2. Metilom i transkriptom tumora mokraćnog mjehura

- a. Neinvazivni i invazivni tumori mokraćnog mjehura imaju više diferencijalno metiliranih regija. Te su promjene izraženije i veći je broj regija hipermetiliran u invazivnim tumorima.
- b. Među biološkim procesima koji su zahvaćeni metilacijskim promjenama istaknuli su se mišićni i živčani procesi, što je praćenom deregulacijom transkriptoma u invazivnim tumorima.
- c. Provjera metilacije i ekspresije gena izdvojila je gene *Itih5*, *Mmp12* i *Serpinb2* kao potencijalne biomarkere. Njihov se metilacijski status značajno mijenja prije nego tumor postane invazivan, ali su im transkripcijske promjene vidljive tek nakon invazije.
- d. Rane epigenetičke promjene u procesima mišićne kontrakcije i živčanog sustava ukazuju na mehanizme invazivnosti tumora mokraćnog mjehura.

7. LITERATURA

1. Fitz-James MH, Cavalli G. Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet.* 2022 Jan;0123456789.
2. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol.* 2012 Feb;41(1):10–3.
3. Herceg Z. Epigenetic Mechanisms as an Interface Between the Environment and Genome. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 903. Boston, MA: Springer US; 2016. 3–15 p.
4. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell’Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. Greally JM, editor. *PLOS Genet.* 2018 Jun;14(6):e1007362.
5. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31–46.
6. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008 Jul;659(1–2):40–8.
7. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 Jul;13(7):484–92.
8. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013 Mar;14(3):204–20.
9. Greenberg MVC, Bourc’his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Oct;20(10):590–607.
10. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2018 Feb;19(2):81–92.
11. Nishiyama A, Mulholland CB, Bultmann S, Kori S, Endo A, Saeki Y, et al. Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat Commun.* 2020 Dec;11(1):1222.
12. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 2011 Dec;13(1):28-35.
13. Sawan C, Herceg Z. Histone Modifications and Cancer. In: *Advances in Genetics*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2010. p. 57–85.
14. Zhao Z, Shilatifard A. Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol.* 2019 Dec;20(1):245.
15. Yang X, Liu M, Li M, Zhang S, Hiju H, Sun J, et al. Epigenetic modulations of noncoding RNA: A novel dimension of Cancer biology. *Mol Cancer.* 2020 Mar;19(1):1–12.
16. Krutovskikh VA, Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer

- biomarkers. *BioEssays*. 2010 Oct;32(10):894–904.
17. Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*. 2015 Feb;16(2):71–84.
 18. Maskey RS, Kim MS, Baker DJ, Childs B, Malureanu LA, Jeganathan KB, et al. Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes. *Nat Commun*. 2014 Dec;5(1):5744.
 19. 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 Nov;46(11):1239–44.
 20. Serbyn N, Noireterre A, Bagdiul I, Plank M, Michel AH, Loewith R, et al. The Aspartic Protease Ddi1 Contributes to DNA-Protein Crosslink Repair in Yeast. *Mol Cell*. 2020 Mar;77(5):1066-1079.e9.
 21. 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 Nov;5:1–19.
 22. Juhasz S, Balogh D, Hajdu I, Burkovics P, Villamil MA, Zhuang Z, et al. Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov;40(21):10795–808.
 23. Weickert P, Stingele J. DNA–Protein Crosslinks and Their Resolution. *Annu Rev Biochem*. 2022; (10.1146/annurev-biochem-032620–105820):1–25. (Pristupljeno: 2.5.2022.)
 24. Reinking HK, Kang H, Götz MJ, Li H-Y, Kieser A, Zhao S, et al. DNA Structure-Specific Cleavage of DNA-Protein Crosslinks by the SPRTN Protease. *Mol Cell*. 2020 Aug;1–12.
 25. Reinking HK, Hofmann K, Stingele J. Function and evolution of the DNA-protein crosslink proteases Wss1 and SPRTN. *DNA Repair (Amst)*. 2020 Apr;88:102822.
 26. Zhang H, Xiong Y, Chen J. DNA–protein cross-link repair: what do we know now? *Cell Biosci*. 2020 Dec;10(1):3.
 27. Vaz B, Popovic M, Ramadan K. DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair. *Trends Biochem Sci*. 2017 Jun;42(6):483–95.
 28. Ruggiano A, Ramadan K. DNA–protein crosslink proteases in genome stability. *Commun Biol*. 2021 Dec;4(1):11.
 29. Stingele J, Bellelli R, Boulton SJ. Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Sep;18(9):563–73.

30. 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 Nov;64(4):704–19.
31. Zhao S, Kieser A, Li H, Reinking HK, Weickert P, Euteneuer S, et al. A ubiquitin switch controls autocatalytic inactivation of the DNA–protein crosslink repair protease SPRTN. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan;49(2):902–15.
32. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
33. Kamat AM, Hahn NM, Efstathiou JA, Lerner SP, Malmström P-U, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet*. 2016 Dec;388(10061):2796–810.
34. Compérat E, Varinot J, Moroch J, Eymerit-Morin C, Brimo F. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*. 2018 Mar;15(3):143–54.
35. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alemozaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Dec;3(1):17022.
36. Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Haupt B, Ivanišević T, Franković L, et al. Targeting Stat3 signaling impairs the progression of bladder cancer in a mouse model. *Cancer Lett*. 2020 Oct;490:89–99.
37. Bošković M, Roje B, Chung FF, Gelemanović A, Cahais V, Cuenin C, et al. DNA Methylome Changes of Muscle- and Neuronal-Related Processes Precede Bladder Cancer Invasiveness. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan;14(3):487.
38. Korac-Prlic J, Degoricija M, Vilović K, Vujević S, Terzić J. BBN-driven urinary bladder cancer mouse model. In: *Methods in Cell Biology*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2021. p. 77–92.
39. He Z, Kosinska W, Zhao Z-L, Wu X-R, Guttenplan JB. Tissue-specific mutagenesis by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine as the basis for urothelial carcinogenesis. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2012 Feb;742(1–2):92–5.
40. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2017 Jan;71(1):96–108.
41. Degoricija M, Korac-Prlic J, Vilovic K, Ivanisevic T, Haupt B, Palada V, et al. The dynamics of the inflammatory response during BBN-induced bladder carcinogenesis in mice. *J Transl Med*. 2019 Dec;17(1):394.
42. Herceg Z, Ghantous A, Wild CP, Sklias A, Kondo Y, Lepeule J, et al. Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of cancer. *Int J cancer*.

- 2018 Mar;142(5):874–82.
43. Saul D, Kosinsky RL. Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan;22(1):401.
 44. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol.* 2007 Jun;1(1):26–41.
 45. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell.* 2012 Jul;150(1):12–27.
 46. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet.* 2016 May;17(5):284–99.
 47. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jul;13(7):497–510.
 48. Shen SY, Singhanian R, Fehring G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature.* 2018 Nov;563(7732):579–83.
 49. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013 Jun;153(6):1194–217.
 50. Zupkovitz G, Kabiljo J, Kothmayer M, Schlick K, Schöfer C, Lagger S, et al. Analysis of Methylation Dynamics Reveals a Tissue-Specific, Age-Dependent Decline in 5-Methylcytosine Within the Genome of the Vertebrate Aging Model *Nothobranchius furzeri*. *Front Mol Biosci.* 2021;8(June):1–15.
 51. Stubbs TM, Bonder MJ, Stark A-K, Krueger F, von Meyenn F, Stegle O, et al. Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse. *Genome Biol.* 2017 Dec;18(1):68.
 52. Kane AE, Sinclair DA. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2019 Jan;54(1):61–83.
 53. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018 Jun;19(6):371–84.
 54. Seale K, Horvath S, Teschendorff A, Eynon N, Voisin S. Making sense of the ageing methylome. *Nat Rev Genet.* 2022 May. (Pristupljeno: 5.5.2022.)
 55. Blagosklonny M V. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle.* 2008 Nov 5;7(21):3344–54.
 56. Xu J. Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts. In: *Current Protocols in Molecular Biology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. p. 1–8.
 57. Schneider, C., Rasband, W., Eliceiri K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jul;(9):671–5.

58. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, et al. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. 990 p.
59. Corces MR, Trevino AE, Hamilton EG, Greenside PG, Sinnott-Armstrong NA, Vesuna S, et al. An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods*. 2017 Oct;14(10):959–62.
60. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul;25(14):1754–60.
61. Faust GG, Hall IM. SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics*. 2014 Sep;30(17):2503–5.
62. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297–303.
63. Frankish A, Diekhans M, Ferreira A-M, Johnson R, Jungreis I, Loveland J, et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan;47(D1):D766–73.
64. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec;15(12):550.
65. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V Lord R, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2015 Dec;8(1):6.
66. Zhou W, Triche TJ, Laird PW, Shen H. SeSAmE: reducing artifactual detection of DNA methylation by Infinium BeadChips in genomic deletions. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul;46(20):1–15.
67. Du P, Zhang X, Huang C-C, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010 Dec;11(1):587.
68. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr;43(7):e47–e47.
69. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. (Pristupljeno: 24.4.2020.)
70. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi A J Integr Biol*. 2012 May;16(5):284–7.

71. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York; 2016.
72. Graumann J, Cotton R. *multipanelfigure: Simple Assembly of Multiple Plots and Images into a Compound Figure*. *J Stat Softw*. 2018;84.
73. Zhou L, Xu L, Ye J, Li D, Wang W, Li X, et al. Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids. *Hepatology*. 2012 Jul;56(1):95–107.
74. Huang J, Zhou Q, Gao M, Qin B, Machida Y, Lou Z, et al. Article Tandem Deubiquitination and Acetylation of SPRTN Promotes DNA-Protein Crosslink Repair and Protects against Aging Article Tandem Deubiquitination and Acetylation of SPRTN Promotes DNA-Protein Crosslink Repair and Protects against Aging. *Mol Cell*. 2020 Sep;1–12.
75. Zhao S, Kieser A, Li H-Y, Reinking HK, Weickert P, Euteneuer S, et al. A ubiquitin switch controls autocatalytic inactivation of the DNA–protein crosslink repair protease SPRTN. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan;49(2):902–15.
76. Saha LK, Murai Y, Saha S, Jo U, Tsuda M, Takeda S, et al. Replication-dependent cytotoxicity and Spartan-mediated repair of trapped PARP1 – DNA. *Nucleic Acids Res*. 2021 Sep;49(18):10493–10506.
77. Fielden J, Wiseman K, Torrecilla I, Li S, Hume S, Chiang S-C, et al. TEX264 coordinates p97- and SPRTN-mediated resolution of topoisomerase 1-DNA adducts. *Nat Commun*. 2020 Dec;11(1):1274.
78. Chauhan BK, Zhang W, Cveklova K, Kantorow M, Cvekl A. Identification of differentially expressed genes in mouse Pax6 heterozygous lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jun;43(6):1884–90.
79. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol*. 2012 Mar;56(3):704–13.
80. Xu W, Wu L, Yu M, Chen F, Arshad M, Xia X, et al. Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor- α -like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes. *J Biol Chem*. 2016 Feb;291(9):4282–93.
81. Bishop-Bailey D, Thomson S, Askari A, Faulkner A, Wheeler-Jones C. Lipid-Metabolizing CYPs in the Regulation and Dysregulation of Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014 Jul;34(1):261–79.
82. Brosh R, Sarig R, Natan EB, Molchadsky A, Madar S, Bornstein C, et al. p53-dependent transcriptional regulation of EDA2R and its involvement in chemotherapy-induced hair

- loss. *FEBS Lett.* 2010 Jun;584(11):2473–7.
83. Plass C, Pfister SM, Lindroth AM, Bogatyrova O, Claus R, Lichter P. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet.* 2013 Nov;14(11):765–80.
 84. Swanson EC, Manning B, Zhang H, Lawrence JB. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J Cell Biol.* 2013 Dec;203(6):929–42.
 85. Larsen DH, Stucki M. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan;44(2):538–44.
 86. Swanson EC, Rapkin LM, Bazett-Jones DP, Lawrence JB. Unfolding the story of chromatin organization in senescent cells. *Nucleus.* 2015 Jul;6(4):254–60.
 87. Turner K, Vasu V, Griffin D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells.* 2019 Jan;8(1):73.
 88. Eray A, Güneri PY, Yılmaz GÖ, Karakulah G, Erkek-Ozhan S. Analysis of open chromatin regions in bladder cancer links β -catenin mutations and Wnt signaling with neuronal subtype of bladder cancer. *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):18667.
 89. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(S3):245–54.
 90. Gao X, Chen Y, Chen M, Wang S, Wen X, Zhang S. Identification of key candidate genes and biological pathways in bladder cancer. *PeerJ.* 2018 Dec;6:e6036.
 91. Han Y, Jin X, Zhou H, Liu B. Identification of key genes associated with bladder cancer using gene expression profiles. *Oncol Lett.* 2018 Oct;15(1):297–303.
 92. Birder LA, Wolf-Johnston AS, Chib MK, Buffington CA, Roppolo JR, Hanna-Mitchell AT. Beyond Neurons: Involvement of Urothelial and Glial Cells in Bladder Function. *NeuroUrol Urodyn.* 2010 Jul;29(1):88–96.
 93. Philyppov IB, Sotkis G V., Rock A, Roudbaraki M, Bonnal J-L, Mauroy B, et al. Alterations in detrusor contractility in rat model of bladder cancer. *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):19651.
 94. Rose M, Bringezu S, Godfrey L, Fiedler D, Gaisa NT, Koch M, et al. ITIH5 and ECRG4 DNA Methylation Biomarker Test (EI-BLA) for Urine-Based Non-Invasive Detection of Bladder Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb;21(3):1117.
 95. Rose M, Gaisa NT, Antony P, Fiedler D, Heidenreich A, Otto W, et al. Epigenetic inactivation of ITIH5 promotes bladder cancer progression and predicts early relapse of pT1 high-grade urothelial tumours. *Carcinogenesis.* 2014 Mar;35(3):727–36.

96. Kader AK, Liu J, Shao L, Dinney CP, Lin J, Wang Y, et al. Matrix Metalloproteinase Polymorphisms Are Associated with Bladder Cancer Invasiveness. *Clin Cancer Res.* 2007 May;13(9):2614–20.
97. Kudelski J, Młynarczyk G, Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B, Darewicz B, Bruczko-Goralewska M, et al. Enhanced Expression but Decreased Specific Activity of Matrix Metalloproteinase 10 (MMP-10) in Comparison with Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3) in Human Urinary Bladder Carcinoma. *J Clin Med.* 2021 Aug;10(16):3683.
98. Nagumo Y, Kandori S, Tanuma K, Nitta S, Chihara I, Shiga M, et al. PLD1 promotes tumor invasion by regulation of MMP-13 expression via NF-κB signaling in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2021 Jul;511:15–25.
99. Lee N-H, Park S-R, Lee JW, Lim S, Lee S-H, Nam S, et al. SERPINB2 Is a Novel Indicator of Cancer Stem Cell Tumorigenicity in Multiple Cancer Types. *Cancers (Basel).* 2019 Apr;11(4):499.

8. SAŽETAK

Epigenetske, genomske i proteomske promjene obilježja su razvoja raka, kao i sindroma starenja. S naglaskom na te procese proučavani su mišji modeli Ruijs-Aalfsovog sindroma i raka mokraćnog mjehura.

Naša istraživačka skupina otkrila je mutacije u genu *SPRTN* kao uzrok progeroidnog poremećaja poznatog kao Ruijs-Aalfsov sindrom (RAS), rijetke bolesti karakterizirane preranim starenjem i razvojem hepatocelularnog karcinoma u adolescentskoj dobi. Da bismo proučavali RAS, generirali smo *Sprtn knock-in* mišveve ($Sprtn^{ki/ki}$) s mutacijom pronađenom u pacijenata. Ti miševi recapituliraju RAS-fenotip te imaju smanjeno kondenzirani kromatin, jezgrene atipije i kraće telomere. Stoga smo profilirali epigenom miševa $Sprtn^{ki/ki}$ analizirajući njihov metilom, kao i dostupnost kromatina, korištenjem metoda sekvenciranja i različitih molekularnih pristupa. Pronašli smo globalnu hipometilaciju i različitu dostupnost kromatina, s prekomjernom regulacijom mRNA koja utječe na promjene u metabolizmu lipida. Molekularno testiranje identificiralo je interakciju proteina SPRTN s ključnim epigenetičkim proteinima - DNMT1 i UHRF1, otkrivajući mehanističku poveznicu s uočenim promjenama metiloma. Ovi podaci podupiru ideju da deregulacija epigenoma može biti temeljni mehanizam teškog fenotipa uočenog u bolesnika s RAS-om, kao i u miševa s mutacijom. Budući da je epigenetika, posebice metilacija DNA, nedavno prepoznata kao jedna od osnova starenja i karcinogeneze, stečeni uvid u ulogu proteina SPRTN u epigenetici od iznimne je važnosti.

Dodatno smo proučavali potpise metilacije DNA i njihov utjecaj na ekspresiju gena u mišjem modelu raka mokraćnog mjehura (RMM) nakon primjene *N*-butil-*N*-(4-hidroksibutil)-nitrozamina. Budući da je deregulirana metilacija DNA praćena promjenama u izražaju gena važan element patogeneze raka, profilirali smo metilom i transkriptom RMM-a koristeći metode sekvenciranja. Hipo- i hipermetilacija su izmjerene u neinvazivnom RMM, u CpG-ovima gena uključenih u mišićne i živčane procese, ali se nisu odrazili na ekspresiju odgovarajućih gena. Međutim, invazivni tumori su pokazali promjene hipermetilacije u istim procesima s refleksijom na ekspresiju gena. Naši nalazi upućuju na to da bi se progresija i potencijal RMM-a mogli otkriti profiliranjem metilacije u predinvazivnoj fazi, što bi moglo pomoći u boljem praćenju bolesnika s ovom bolešću.

9. SUMMARY

Epigenetic, genomic, and proteomic changes are hallmarks of cancer development as well as of the aging syndromes. With an emphasis on those processes' mice models of Ruijs-Aalfs syndrome and bladder cancer were studied.

Our research group has identified mutations in the *SPRTN* gene as a cause of progeroid disorder known as Ruijs-Aalfs syndrome (RAS), a rare disease characterized by premature aging and the development of early-onset hepatocellular carcinoma. To study RAS more deeply we generated *Sprtn* knock-in mice (*Sprtn*^{ki/ki}) harboring the mutation found in RAS patients. These mice display phenotypes reminiscent of RAS but also abnormal nuclei, less condensed chromatin, and shorter telomeres. Thus, we profiled the epigenome of *Sprtn*^{ki/ki} mice by analyzing their methylome as well as chromatin landscape using sequencing and different molecular approaches. Global hypomethylation was observed and different chromatin accessibility, with global upregulation of mRNA affecting changes in lipid metabolism. Molecular testing identified the interaction of SPRTN with key epigenetics players - DNMT1 and UHRF1 revealing mechanistic insight into observed methylome changes. These data support the notion that the epigenome deregulation may be an underlying mechanism of the severe phenotype observed in RAS patients as well as in mutant mice. Because epigenetics, in particular DNA methylation, has recently been recognized as one of the pillars of aging and carcinogenesis, gaining insight into Spartan's role in epigenetics is of primary importance.

We additionally studied DNA methylation signatures and its impacts on gene expression in mouse models of urinary bladder cancer (BC) following *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine administration. Because aberrant DNA methylation accompanied by changes in gene expression is an important element of cancer pathogenesis, we profiled the methylome and transcriptome of BC using sequencing approaches. Hypo- and hypermethylation were present in non-invasive BC, across CpGs of the genes involved in muscle- and neuronal-related pathways, but were not reflected in the expression of the respective genes. However, invasive tumors displayed only hypermethylation changes with alterations in gene expression in these genes. Our findings suggest that BC progression could be revealed through methylation profiling at its pre-invasive stage, which could assist in better monitoring of BC patients.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Maria Bošković

Datum rođenja: 28.02.1993.

E-mail: maria.boskovic@mefst.hr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7701-0643>

RADNO ISKUSTVO

06/2018 – danas Asistentica na HRZZ projektu "Uloga upale u razvoju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura", Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

11/2017 – 06/2018 Suradnica na projektu IRI "Nova generacija visokoprotočnih gliko-servisa" Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

11/2014 – 08/2015 Voditelj terenskog dijela istraživanja na projektu "BBMRI-LPC – Biobanking and Biomolecular Research Infrastructure – Large Prospective Cohorts" Hrvatski centar za globalno zdravlje, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

OBRAZOVANJE

02/2019 – 06/2022 Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Poslijediplomski studij "Biologija novotvorina"

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

09/2011 – 09/2014 Sveučilište u Splitu, Odjel zdravstvenih studija, Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

09/2007 – 09/2011 Zdravstvena škola Split, smjer farmaceutski tehničar

OSOBNJE VJEŠTINE

Jezici: hrvatski, engleski

Organizacijske vještine:

- Voditeljica znanstvenih radionica u OŠ Harfa 2021. i 2022.
- Članica žirija na natjecanju u izradi i prezentaciji znanstvenog postera, na temu imunizacije za obilježavanje „World Immunization Week 2021.“ u organizaciji CPSA
- Organizatorica i voditeljica radionica na Festivalu znanosti 2019. i 2021.
- Organizatorica i voditeljica radionice "Genetičko inženjerstvo" na Noći biologije 2018.

DODATNE INFORMACIJE

Publikacije:

- Bošković M, Roje B, Chung FF-L, Gelemanović A, Cahais V, Cuenin C, Khoueiry R, Vilović K, Herceg Z, Terzić J. DNA Methylation Changes of Muscle- and Neuronal-Related Processes Precede Bladder Cancer Invasiveness. *Cancers*. 2022 Jan 19; 14(3):487.
- Mijakovac A, Miškec K, Krištić J, Vičić Bočkor V, Tadić V, Bošković M, Lauc G, Zoldoš V, Vojta A. A Transient Expression System with Stably Integrated CRISPR-dCas9 Fusions for Regulation of Genes Involved in Immunoglobulin G Glycosylation. *CRISPR J*. 2022 Jan 12; 237–253.
- Stanić Ž, Pribisalić A, Bošković M, Bućan Cvitanić J, Boban K, Bašković G, Bartulić A, Demo S, Polašek O, Kolčić I. Does Each Menstrual Cycle Elicit a Distinct Effect on Olfactory and Gustatory Perception? *Nutrients*. 2021 Jul 22;13(8):2509.
- Jurić M, Balog M, Ivić V, Bošković M, Benzon B, Racetin A, Vukojević K, Bočina I, Kević N, Restović I, Szűcs KF, Gáspár R, Heffer M, Vari SG, Filipović N. Increased expression of dendrin in the dorsal horn of the spinal cord during stress is regulated by sex hormones. *Neuropeptides*. 2021 Jan;86:102126.
- Josipović G, Tadić V, Klasić M, Zanki V, Madunić J, Bečeheli I, Chung F, Ghantous A, Keser T, Madunić J, Bošković M, Lauc G, Herceg Z, Vojta A, Zoldoš V. Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system. *Nucleic Acids Res*. 2019 Oct 10;47(18):9637–57.
- Relja A, Miljković A, Gelemanović A, Bošković M, Hayward C, Polašek O, Kolčić I. Nut Consumption and Cardiovascular Risk Factors: A Cross-Sectional Study in a Mediterranean Population. *Nutrients*. 2017 Nov 28;9(12):1296.

Održana znanstveno-popularna predavanja:

- PhD Café doktoranada financiranih u okviru „Projekta razvoja karijera mladih istraživača” Hrvatske zaklade za znanost, Split, 2022.
- Međužupanijsko stručno vijeće ZLT i ST, virtualno okruženje, 2021.

- Obilježavanje Međunarodnog dana laboratorijske medicine, Zdravstvena škola Split, virtualno okruženje, 2021.

Priznanja i nagrade:

EMBO *short term fellowship* – projekt 9030

Diploma magistre molekularne biologije s pohvalom (*cum laude*)

Znanstvena usavršavanja:

- Radionica BioRender VISUALIZE 2021 – aktivno sudjelovanje
- The 45th FEBS Virtual Congress, 2021. – sudionik
- Simpozij mladih znanstvenika, Split, 2021. – usmena prezentacija
- Radionica Better Skills for Better Jobs: Excellent Lab Book for an Excellent Career, virtualno okruženje, 2020. – sudionik
- Annual meeting of the Croatian Immunological Society, Rovinj, 2019. – sudionik
- Training programme on science communication (British Council), Split, 2019. – aktivno sudjelovanje
- 2nd Frankfurt Conference on Quality Control in Life Processes & 8th International p63/p73 Workshop, Frankfurt, 2018. – sudionik
- 3th Student's Symposium in Biology and Life Sciences – SiSB 3, Zagreb, 2017. – sudionik
- 1st Croatian Symposium of Biologists in Health Care, Zagreb, 2015. – sudionik
- 9th ISABS conference, Bol, 2015. – sudionik

Certifikat:

- Tečaj za osposobljavanje za rad s eksperimentalnim životinjama – LabAnim, Zagreb, 2019.

Edukacija:

- Provedba dijela istraživanja za doktorsku disertaciju uz podršku EMBO stipendije i Hrvatske zaklade za znanost u grupi za epigenetiku na International Agency for Research on Cancer/WHO, Lyon, 09/2021 – 12/2021.
- Profesionalni razvoj i edukacija u trajanju od mjesec dana kroz program "Early career and visiting scientist" u grupi za epigenetiku na International Agency for Research on Cancer/WHO, Lyon, 2020.
- Istraživački boravak u trajanju od dva tjedna na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, Zagreb, 2019.