



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ana-Marija Lulić

**REGULACIJA I ZNAČAJ LIZOFOSFOLIPAZE
PNPLA7 U STANIČNOM MODELU METABOLIČKI
AKTIVNOGA TKIVA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
dr. sc. Maja Katalinić, znan. savj.

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ana-Marija Lulić

**REGULATION AND SIGNIFICANCE OF
LYSOPHOSPHOLIPASE PNPLA7 IN A CELLULAR
MODEL OF METABOLICALLY ACTIVE TISSUE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Maja Katalinić, PhD, Scientific Advisor

Zagreb, 2024

Zahvaljujem mentorici Maji Katalinić na odabiru zanimljive teme i pomoći prilikom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem Sergeju Pirkmajeru i Katarini Miš s Instituta za patofiziologiju, Sveučilišta u Ljubljani, na upoznavanju rada s primarnim stanicama skeletnih mišića, RT-PCR i borbi s Western analizom.

Zahvaljujem Jovici Lončar s Instituta Ruđer Bošković, Moniki Oberer i cijelom njenom timu s Instituta za molekularne bioznanosti, Sveučilišta u Grazu, na velikoj pomoći u izazovu ekspresije proteina.

I najvažnije, najveća zahvala mom Tomi, mami, tati i bratu na konstantnoj podršci, ohrabrenju, motivaciji i podsjetniku da ne gubim vjeru u sebe.

ppp b m mmmmm. čuču bččč ččč m m m

Sadržaj

SAŽETAK	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Općenito o PNPLA enzimima	3
2.2. Klasifikacija PNPLA enzima	6
2.2.1. <i>PNPLA1 (EC 2.3.1.296)</i>	7
2.2.2. <i>PNPLA2 (EC 3.1.1.3)</i>	7
2.2.3. <i>PNPLA3 (EC 2.3.1.51)</i>	10
2.2.4. <i>PNPLA4 (EC 3.1.1.3)</i>	11
2.2.5. <i>PNPLA5 (EC 3.1.1.3)</i>	11
2.2.6. <i>PNPLA6 (EC 3.1.1.5)</i>	12
2.2.7. <i>PNPLA8 (EC 3.1.1.5)</i>	15
2.2.8. <i>PNPLA9 (EC 3.1.1.4)</i>	16
2.2.9. <i>Dosadašnje spoznaje i izazovi u istraživanju enzima PNPLA7 (EC 3.1.1.5)</i>	18
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Značaj i regulacija lizofosfolipaze PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva	22
3.1.1. <i>Materijali</i>	22
3.1.2. <i>Uzgoj i tretman stanica</i>	25
3.1.3. <i>Utišavanje PNPLA7</i>	26
3.1.4. <i>Priprema uzoraka za Western analizu</i>	27
3.1.5. <i>Western analiza</i>	28
3.1.6. <i>Neutralizacija primarnog protutijela anti-PNPLA7</i>	32
3.1.7. <i>Izolacija RNA</i>	32
3.1.8. <i>Reverzna transkripcija</i>	33
3.1.9. <i>Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction)</i>	33
3.1.10. <i>Statistička analiza</i>	35
3.2. Ekspresija ljudskog rekombinantnog enzima PNPLA7 i procjena PNPLA7 kao mete organofosfornih spojeva	36
3.2.1. <i>Materijali</i>	36
3.2.2. <i>Izolacija i umnažanje nukleotidnog slijeda PNPLA7</i>	38

3.2.3. Kloniranje -TM PNPLA7	39
3.2.4. Kloniranje PAT, AB-PAT, CNB 2-3 PNPLA7.....	40
3.2.5. Umnažanje ekspresijskog vektora pST44 i AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7 lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. polimerase chain reaction).....	42
3.2.6. Gibson assembly	43
3.2.7. Agarozna elektroforeza na gelu	43
3.2.8. Transformacija kompetentnih bakterija <i>E.coli</i> DH5a.....	43
3.2.9. Izolacija plazmidne DNA i sekvenciranje	44
3.2.10. Prekomjerna ekspresija skraćenih konstrukata PNPLA7.....	45
3.2.11. Priprema lizata bakterijskih stanica.....	46
3.2.12. Pročišćavanje u nativnim uvjetima.....	47
3.2.13. Pročišćavanje u denaturirajućim uvjetima.....	48
3.2.14. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	48
3.2.15. Western analiza	49
3.2.16. Mjerenje enzimске aktivnosti u lizatima bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7.....	50
3.2.17. Inhibicija lizata bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7	51
3.2.18. Predviđanje 3D strukture proteina.....	52
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	55
4.1. Regulacija i značaj PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva.....	56
4.1.1. Istraživanje specifičnosti protutijela anti-PNPLA7	56
4.1.2. Utjecaj utišavanja PNPLA7 na odabrane mete i signalne puteve u mioblastima.....	58
4.1.3. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na PNPLA7 u miotubulima	62
4.1.4. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na ekspresiju PNPLA7 u staničnoj liniji HepG2	69
4.2. Ekspresija ljudskog rekombinantnog enzima PNPLA7 i procjena PNPLA7 kao mete organofosfornih spojeva	74
4.2.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje -TM PNPLA7	77
4.2.2. Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje PAT PNPLA7, AB-PAT PNPLA7 i CNB 2-3 PNPLA7	83
4.2.3. Mjerenje enzimске aktivnosti AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7.....	92
4.2.4. Utjecaj organofosfornih spojeva na enzimsku aktivnost AB-PAT, PAT i CNB2-3 PNPLA7.....	93
4.2.5. Predviđanje struktura patatinske domene, AB domene i CNB 2-3 PNPLA7	95
§ 5. ZAKLJUČAK.....	102
§ 6. LITERATURNI IZVORI	104

§ 7. DODATAK.....	XV
7.1. Nukleotidni i aminokiselinski sljedovi proteina PNPLA7 korištenih u provedenom istraživanju	xv
7.1.1. Cijeli protein PNPLA7.....	xv
7.1.2. -TM PNPLA7.....	xviii
7.1.3. AB-patatinska domena PNPLA7.....	xxi
7.1.4. Patatinska domena PNPLA7.....	xxiii
7.1.5. CNB 2-3 PNPLA7	xxiv
7.2. Aminokiselinski sljedovi PNPLA7 korištenih u predviđanju struktura domena.....	xxv
7.2.1. Patatinska domena.....	xxv
7.2.2. AB-domena.....	xxv
7.2.3. Vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3.....	xxv
7.3. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na β-aktin u miotubulima	xxvi
7.4. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na β-aktin u staničnoj liniji HepG2	xxvii
§ 8. ŽIVOTOPIS	XXIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

REGULACIJA I ZNAČAJ LIZOFOSFOLIPAZE PNPLA7 U STANIČNOM MODELU METABOLIČKI AKTIVNOGA TKIVA

Ana-Marija Lulić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10001 Zagreb

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti važnost lizofosfolipaze PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva mišića i jetre te procijeniti ovaj enzim kao metu toksičnih organofosfornih (OP) spojeva s obzirom da značaj i uloga ovog enzima nisu još dovoljno poznati. Dobiveni rezultati pokazuju da utišavanje *PNPLA7* smanjuje razinu ionske pumpe $\text{NKA}\alpha 1$ te mete u signalnim putevima mTOR i AMPK što upućuje na važnost proteina PNPLA7 u osnovnoj fiziološkoj funkciji stanica. Zatim, pokazano je da povišenje koncentracije glukoze i inzulina rezultira smanjenjem razine PNPLA7 što sugerira da je reguliran ovisno o energetske statusu stanice i da ima potencijalnu ulogu u metabolizmu energije. Također, izrađen je protokol za prekomjernu ekspresiju proteina u bakteriji *Escherichia coli* s ciljem kinetičke karakterizacije interakcija PNPLA7 sa supstratima i inhibitorima. Mjerenjem enzimske aktivnosti PNPLA7 u lizatima stanica, pokazano je da su eksprimirane forme patatinska domena i AB-patatinska domena katalitički aktivne prema supstratu *p*-nitrofenil valeratu i da su inhibirane odabranim OP spojevima. Zaključno, dobiveni rezultati upućuju na važnost PNPLA7 i važnost daljnjih istraživanja ovog enzima u razvoju lijekova za mogući tretman otrovanja OP-ima, ali i za liječenje drugih stanja i bolesti povezanih uz metabolizam lipida.

(115 + xxxii stranica, 46 slika, 8 tablica, 236 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: AlphaFold2/ ekspresija/ metabolizam/ PNPLA7/ regulacija/ utišavanje

Mentorica: dr. sc. Maja Katalinić, znan. savj.

Rad prihvaćen: 4. rujna 2024.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić

2. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

3. dr. sc. Marija Ljubojević, znan. savj.

Zamjena: dr. sc. Tihomir Balog, znan. savj. u tr. zv.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

REGULATION AND SIGNIFICANCE OF LYSOPHOSPHOLIPASE PNPLA7 IN A CELLULAR MODEL OF METABOLICALLY ACTIVE TISSUE

Ana-Marija Lulić

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia

The main goal of this doctoral dissertation was to examine the importance of lysophospholipase PNPLA7 in a cellular model of metabolically active muscle and liver and to evaluate this enzyme as a target of toxic organophosphorus (OP) compounds, given that the significance and role of this enzyme are not yet sufficiently known. The obtained results show that the *PNPLA7* silencing reduces the level of the ion pump $NKA\alpha 1$ and targets in the mTOR and AMPK signalling pathways, which points to the importance of PNPLA7 in the basic physiological function of cells. Furthermore, it was shown that an increase in glucose and insulin concentration results in a decrease of PNPLA7 levels, suggesting that it is regulated depending on the energy status of the cell and that it has a potential role in energy metabolism. Moreover, protocol for PNPLA7 overexpression in *Escherichia coli* was proposed for further kinetic studies of its interactions with substrates and inhibitors. By measuring PNPLA7 enzyme activity in cell lysates with *p*-nitrophenyl valerate, it was shown that the expressed forms of patatin domain and AB-patatin domain are catalytically active and are inhibited by OP compounds. In summary, the obtained results indicate the significance of PNPLA7 and the importance of further research on this enzyme in the development of drugs for the treatment of OP poisoning or in the treatment of other conditions and diseases related to lipid metabolism.

(115 + xxxii pages, 46 figures, 8 tables, 236 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: AlphaFold2/ expression/ metabolism/ PNPLA7/ regulation/ silencing

Supervisor: Dr. Maja Katalinić, Scientific Advisor

Thesis accepted: September 4th 2024

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
 2. Dr. Branimir Bertoša, Full Professor
 3. Dr. Marija Ljubojević, Scientific Advisor
- Substitute: Dr. Tihomir Balog, Permanent Scientific Advisor

§ 1. UVOD

PNPLA7 je jedan od devet članova PNPLA (engl. *Patatin-like Phospholipase domain containing proteins*) porodice proteina imenovanih PNPLA1-PNPLA9, kojima je zajedničko obilježje prisutnost tzv. patatinske domene.¹⁻³ Katalitička aktivnost ovih enzima, vezana je upravo za patatinsku domenu u kojoj se nalazi aktivno mjesto i sadrži katalitičku dijadu serin i aspartat, pri čemu se serin nalazi u $\alpha/\beta/\alpha$ trosloju i dio je motiva Gly-X-Ser-X-Gly (X-bilo koja aminokiselina), strukturnog motiva prisutnog u velikom broju lipaza.¹⁻⁴ Članovi PNPLA porodice enzima pokazuju hidrolitičku aktivnost prema različitim lipidnim supstratima kao što su fosfolipidi, triacilgliceridi, esteri retinola i kolesterola, a neki od članova pokazuju i lizofosfolipaznu i transacilaznu aktivnost.¹⁻³ Fiziološka uloga i mehanizmi njihove katalitičke aktivnosti još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni za većinu PNPLA enzima, ali rezultati brojnih istraživanja sugeriraju da ovi enzimi imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze i integriteta membrana staničnih organela, u staničnom rastu, signalizaciji, staničnoj smrti i metabolizmu lipida.²⁻⁵

PNPLA6 (NTE, engl. *Neuropathy Target Esterase*) i PNPLA7 (NRE, engl. *NTE-Related Esterase*) čine filogenetski odvojenu skupinu PNPLA enzima, pokazuju sličnu preferenciju prema supstratima i prema EC nomenklaturi im je dodijeljena ista oznaka (EC 3.1.1.5).^{3,6-10} Nadalje, sadrže sličnu organizaciju strukturnih domena i lokalizaciju u stanici, ali različitu distribuciju u tkivima.^{3,6-10} Enzim PNPLA6, otkriven je kao meta toksičnih organofosfornih spojeva (pesticidi, živčani bojni otrovi), a čija inhibicija ovim spojevima se povezuje s razvojem neuropatije odnosno, tzv. OPIDN (engl. *Organophosphate-Induced Delayed Neuropathy*) sindroma kao posljedice degeneracije motornih aksona u leđnoj moždini i perifernom živčanom sustavu.¹⁰⁻¹² Brojna istraživanja provedena na PNPLA6, pokazala su da ima važnu ulogu u razvoju živčanih stanica i normalnoj funkciji mozga, ali njegova fiziološka uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.¹²⁻¹⁴ Za razliku od PNPLA6, istraživanja provedena na PNPLA7 su malobrojna, a većina ih je provedena na modelu miša ili štakora u kojima je pokazano da je mRNA *PNPLA7* eksprimirana u važnim metaboličkim tkivima i tkivima koja su meta inzulina.^{7,15,16} Također, *in vivo* istraživanja pokazala su da je ekspresija mRNA *PNPLA7* regulirana inzulinom i stanjima gladi/sitosti što upućuje na ulogu ovog enzima u metabolizmu energije.^{7,15} Fiziološka uloga ovog enzima zasad je nepoznata, no nedavna istraživanja

provedena na modelu miša, pokazala su da delecija *PNPLA7* dovodi do sustavnih abnormalnosti u metabolizmu jetre i razvoju miševa što zajednički upućuje na važnu ulogu *PNPLA7* u organizmu.¹⁷⁻¹⁹ *In vitro* istraživanja pokazala su da *PNPLA7* katalizira reakciju hidrolize masne kiseline u molekuli lizofosfolipida, preferentno nezasićenih vrsta lizofosfatidilkolina, lizofosfatidilne kiseline i lizofosfatidiletanolamina.^{7,8} Međutim, kinetička karakterizacija i interakcije ovog enzima sa supstratima i potencijalnim inhibitorima nije istražena, a isto tako, nije riješena ni kristalna struktura *PNPLA7*.

S obzirom na dosadašnja saznanja o *PNPLA7* i usporedbi s istraživanjima provedenima na miševima/štakorima, prva hipoteza ovog istraživanja je da je u ljudskom organizmu *PNPLA7* reguliran metabolički važnim molekulama. Stoga, prvi cilj ovog doktorskog rada bio je istražiti fiziološku ulogu i regulaciju lizofosfolipaze *PNPLA7* u staničnom modelu metabolički aktivnih tkiva. U prvom koraku istraživanja, istražen je utjecaj utišavanja *PNPLA7* na proteine i signalne puteve koji su važni u metabolizmu energije radi dobivanja uvida u fiziološku ulogu ovog enzima. Nadalje, istražen je utjecaj različitih nutrijenata, hormona i signalnih molekula na ekspresiju mRNA i razinu proteina *PNPLA7*. Western analizom, praćen je utjecaj različitih tretmana na razinu proteina, a metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polimerase Chain Reaction*), praćen je utjecaj na razinu mRNA odabranih meta.

Zbog sličnosti s *PNPLA6*, druga hipoteza ovog istraživanja je bila da toksični organofosforni spojevi mogu inhibirati *PNPLA7*.⁷ Stoga, drugi cilj doktorskog rada bio je pokušati prekomjerno eksprimirati rekombinantni enzim *PNPLA7* u odgovarajućem ekspresijskom sustavu i pročistiti ga do zadovoljavajuće čistoće za provođenje kinetičkih mjerenja i karakterizacije aktivnosti *in vitro*. Dobiveni rezultati pojasnit će važnost *PNPLA7* kao mete toksičnih organofosfornih spojeva i dati uvid može li se ovaj enzim razmatrati kao meta u liječenju nakon trovanja ovom skupinom spojeva.

Zaključno, razumijevanjem fiziološke uloge *PNPLA7*, moguće je dobiti uvid u ulogu i povezanost *PNPLA7* s razvojem različitih bolesti i stanja poput dijabetesa, hiperlipidemije, atrofije i distrofije mišića te razvoja tumora, što ga čini i potencijalnom novom metom za razvoj lijekova.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

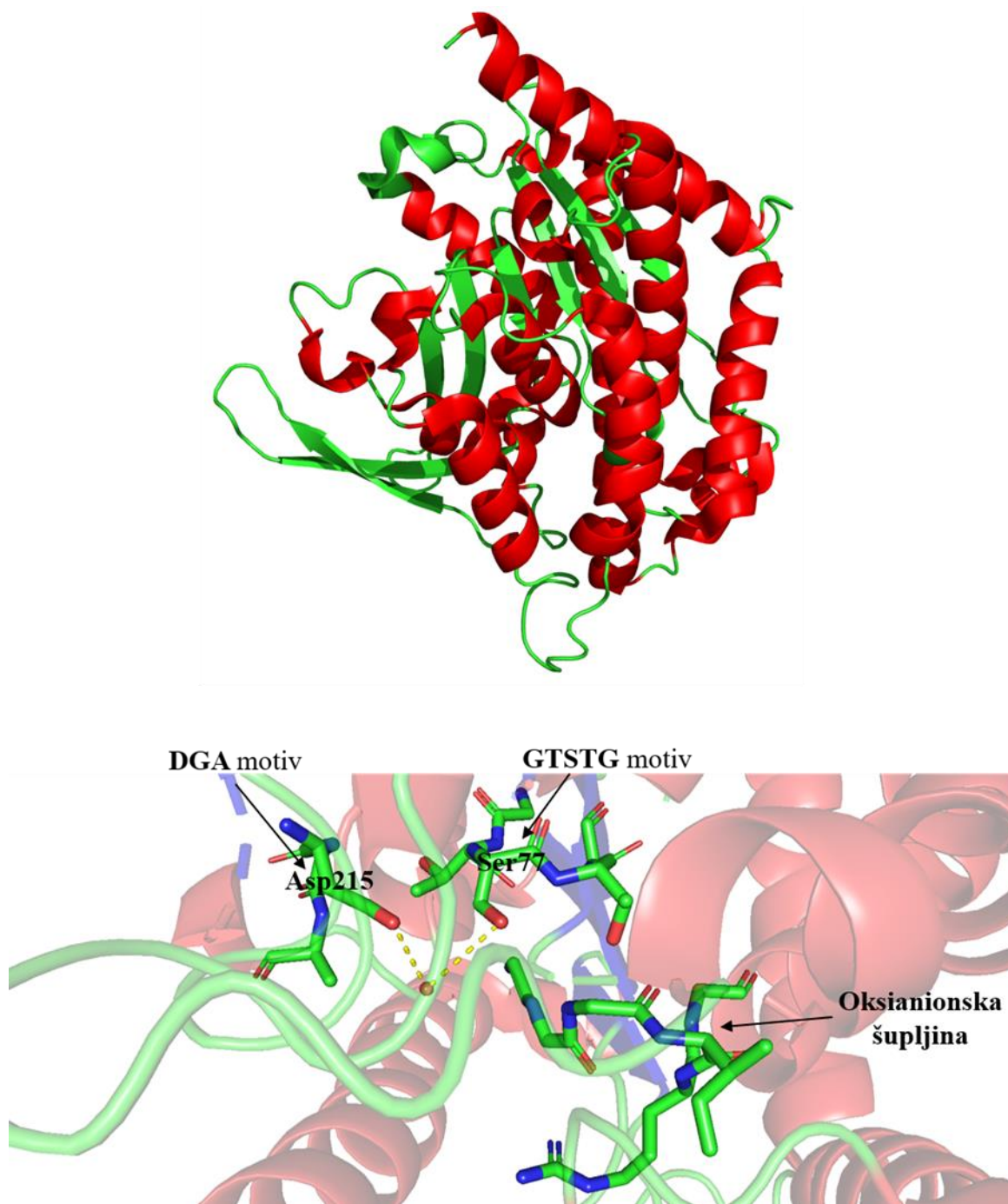
2.1. Općenito o PNPLA enzimima

PNPLA porodica serinskih hidrolaza, sastoji se od devet enzima imenovanih PNPLA1-PNPLA9 kojima je zajedničko obilježje prisutnost tzv. patatinske domene.¹⁻⁴ Patatinska domena prvotno je otkrivena u enzimu patatin, glikoproteinu, koji je visoko zastupljen u gomolju krumpira.^{20,21} Patatin je nespecifična acil-hidrolaza koja može katalizirati hidrolizu širokog spektra supstrata uključujući fosfolipide, triacilgliceride i estere retinola te ima važnu ulogu u staničnoj signalizaciji, hidrolizi membranskih lipida i obrani od parazita.²⁰⁻²²

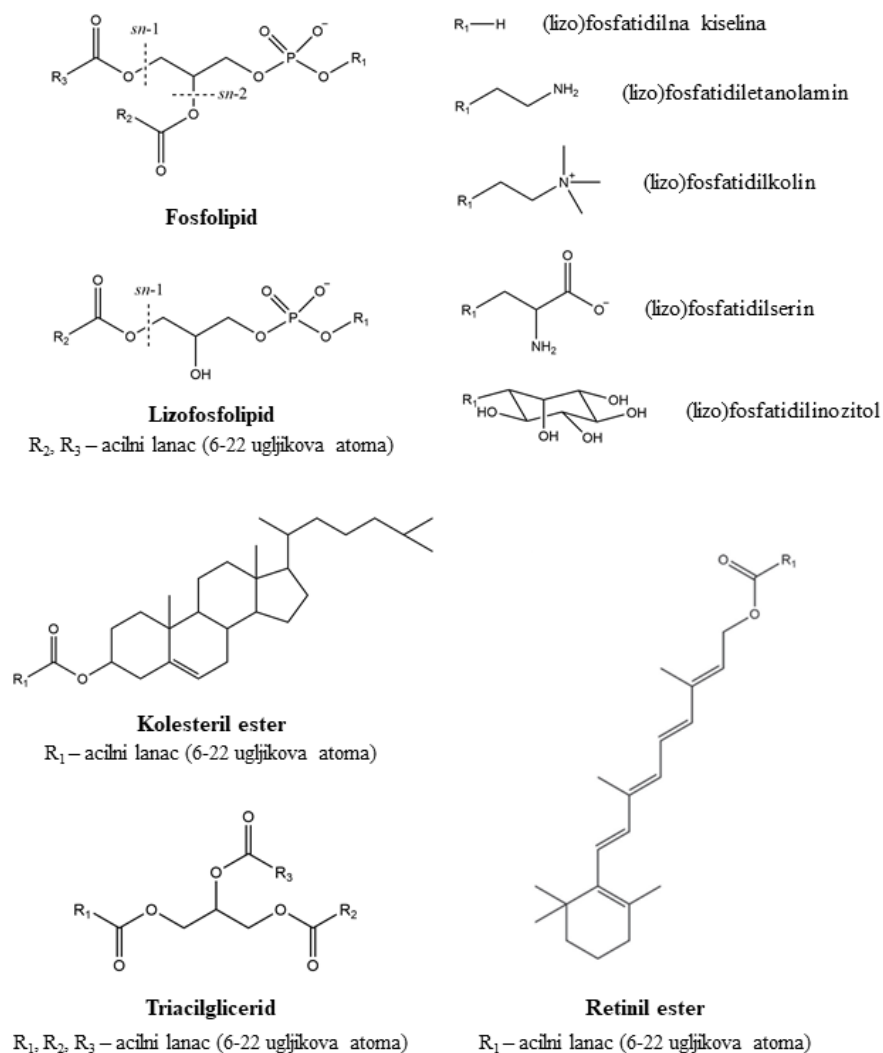
Za razliku od većine serinskih hidrolaza, aktivno mjesto patatina sadrži katalitičku dijadu Ser-Asp pri čemu je serin dio motiva Gly-Thr-Ser-Thr-Gly, a aspartat dio motiva Asp-Gly-Ala.^{20,21} U reakcijskom mehanizmu, serin je nukleofil, a aspartat ima ulogu i opće baze i opće kiseline.^{20,21} Rješavanjem kristalne strukture patatina (**slika 1.A**), pokazano je da je aktivno mjesto patatina dio $\alpha/\beta/\alpha$ trosloja, pri čemu se nukleofil Ser nalazi na prijelazu iz β -strukture u α -zavojnici (**slika 1.B**).^{20,21} Svi navedeni motivi prisutni su u velikom broju lipaza i očuvani u svim enzimima koji sadrže patatinsku domenu.^{1-5,20,21} U prirodi postoji veliki broj enzima koji sadrže patatinsku domenu; ti enzimi rasprostranjeni su i u prokariotskim i u eukariotskim organizmima, a sudjeluju u velikom broju bioloških procesa uključujući metabolizam lipida, prijenos tvari preko membrane, indukciju sepse i u mnogim drugima.^{6,23-25}

Enzimi iz PNPLA porodice serinskih hidrolaza prisutni su u velikom broju sisavaca, a njihovi ortolozi prisutni su i u drugim eukariotima poput ameba, oblića, kvasaca, insekata i brojnih drugih.^{6,23-25} PNPLA enzimi pripadaju u veliku obitelj enzima fosfolipaza A2 koje kataliziraju reakciju hidrolize supstituenta koji se nalazi na položaju *sn*-2 fosfolipida, a poznati su još i pod engleskim nazivom *Ca*²⁺-*independent phospholipases* A2 (iPLA2s) zato što za njihovu aktivnost nije potrebna prisutnost iona kalcija.⁵ Unatoč činjenici da se PNPLA enzimi klasificiraju kao fosfolipaze A2, pojedini članovi mogu hidrolizirati lizofosfolipide, triacilgliceride, estere kolesterola i retinola (**slika 2**), a neki od članova pokazuju i transacilaznu aktivnost.^{1-5,23,24} Isto tako, određeni članovi mogu hidrolizirati supstituente i na položaju *sn*-1.

1-5



Slika 1. A) Prikaz 3D strukture glikoproteina patatina (PDB: 1OXW) koja je riješena 2003.²⁰ α -zavojnice prikazane su crvenom bojom, a β -strukture zelenom bojom. B) Prikaz aktivnog mjesta patatina koje se sastoji od $\alpha/\beta/\alpha$ trosloja pri čemu se β -struktura nalazi između dvije α -zavojnice. U aktivnom mjestu se nalazi katalitička dijada koju čine serin (Ser77) i aspartat (Asp215). Nukleofil serin se nalazi na prijelazu iz β -strukture u α -zavojnicu i dio je motiva Gly-Thr-Ser-Thr-Gly. Aspartat je dio motiva Asp-Gly-Ala i ima ulogu opće baze i opće kiseline. U blizini aktivnog mjesta, nalazi se oksianionska šupljina koja je karakterizirana motivom Gly-Gly-Gly-Ala-Arg-Gly i ima ulogu stabilizacije prijelaznog stanja.²⁰ Molekula vode prikazana je crvenom kuglom. Žute iscrtkane linije označavaju vodikovu vezu između Ser77 i molekule vode te Asp215 i molekule vode. Obje slike su izrađene u programu PyMol.²⁵



Slika 2. Strukture lipidnih vrsta koje hidroliziraju PNPLA enzimi. Iako PNPLA enzimi pripadaju porodici fosfolipaza A2, određeni članovi mogu hidrolizirati lizofosfolipide, triacilgliceride, estere kolesterola i retinola na položajima *sn-2* i/ili *sn-1*. Također, pojedini PNPLA enzimi pokazuju i transacilaznu aktivnost. Slika je izrađena u programu ChemDraw.²⁶

Fiziološka uloga većine PNPLA enzima još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali brojna istraživanja su pokazala da mutacije, genski polimorfizmi i nepravilna regulacija enzimske aktivnosti određenih članova mogu biti povezane s razvojem različitih bolesti što sugerira na važnost ovih enzima za normalnu funkciju organizma.^{2,3} Npr. mutacije *PNPLA2* povezane su s bolestima koje karakterizira akumulacija triacilglicerida u gotovo svim tkivima, a mutacije *PNPLA3* povezane su s razvojem brojnih bolesti jetre.^{2,3,5,24,27,28} Mutacije i nepravilna enzimska aktivnost *PNPLA6* i *PNPLA9* povezane su s razvojem neuroloških i neurodegenerativnih bolesti, a fiziološka uloga ostalih članova ove porodice enzima i njihova povezanost s razvojem bolesti još nije dovoljno istražena.^{2,3,12,24,29}

2.2. Klasifikacija PNPLA enzima

S obzirom na sličnu organizaciju domena i preferenciju prema sličnim lipidnim vrstama kao supstratima, PNPLA porodica enzima od PNPLA1-7 može se podijeliti na dvije veće skupine; ADPN i NTE skupinu, a PNPLA8 i PNPLA9 ne pripadaju ni u jednu od ove dvije skupine.^{2,3} U **tablici 1**, prikazana je duljina aminokiselinskog slijeda, položaj patatinske domene i katalitičke dijade za svaki PNPLA enzim. ADPN-skupina dobila je naziv prema alternativnom engleskom nazivu PNPLA3 - *Adiponutrin* i predviđeno je da članovi ove skupine sadrže N-terminalnu domenu u kojoj se nalazi patatinska domena i C-terminalnu domenu.^{1-3,30} NTE-skupina je dobila naziv prema alternativnom engleskom nazivu PNPLA6 - *Neuropathy-Target Esterase* i predviđeno je da PNPLA6 i PNPLA7 sadrže jednu transmembransku domenu u blizini N-terminalnog kraja, tri vezna mjesta za cikličke nukleotide te C-terminalnu domenu koja sadrži patatinsku domenu, a u **tablici 2** prikazan je njihov predviđeni položaj u aminokiselinskom slijedu.^{2,7,12}

Tablica 1. Klasifikacija ljudskih PNPLA enzima; duljina aminokiselinskog slijeda, položaj patatinske domene i katalitičke dijade u aminokiselinskom slijedu (podaci su preuzeti sa UniProt-a, besplatne baze podataka proteinskih sljedova i funkcije proteina, <https://www.uniprot.org/>, pristupljeno 11.1.2024.).

	Protein	Duljina aminokiselinskog slijeda	Položaj patatinske domene u aminokiselinskom slijedu	Položaj katalitičke dijade u aminokiselinskom slijedu
ADPN skupina	PNPLA1	532	16-185	Ser53-Asp172
	PNPLA2	504	10-179	Ser47-Asp166
	PNPLA3	481	10-179	Ser47-Asp166
	PNPLA4	253	6-176	Ser43-Asp163
	PNPLA5	429	12-181	Ser49-Asp168
NTE skupina	PNPLA6	1327	981-1147	Ser1014-Asp1147
	PNPLA7	1317	928-1094	Ser961-Asp1081
	PNPLA8	782	445-650	Ser483-Asp627
	PNPLA9	806	481-665	Ser519-Asp652

Tablica 2. Položaj transmembranske domene, tri vezna mjesta za cikličke nukleotide i patatinske domene u aminokiselinskim sljedovima ljudskih enzima PNPLA6 i PNPLA7 (podaci su preuzeti s UniProt-a, <https://www.uniprot.org/>, pristupljeno 11.1.2024.).

Protein	Položaj transmembranske domene	Položaj veznih mjesta za cikličke nukleotide 1, 2 i 3	Položaj patatinske domene u aminokiselinskom slijedu
PNPLA6	60-83	195-322, 511-623, 629-749	981-1147
PNPLA7	13-33	145-272, 458-563, 591-696	928-1094

2.2.1. *PNPLA1* (EC 2.3.1.296)

PNPLA1 je transacilaza koja ima važnu ulogu u zadnjem koraku biosinteze ω -*O*-acilceramida, vrste lipida koja ima važnu ulogu u razvoju i funkciji permeabilne barijere kože.³¹⁻³⁴ *In vitro* istraživanja, pokazala su da *PNPLA1* katalizira reakciju prijenosa linoleinske kiseline s triacilglicerida na molekulu *O*-hidroksiceramida.³¹⁻³³ mRNA *PNPLA1* visoko je eksprimirana u granularnom sloju vanjskog sloja kože, tj. u epidermisu, a ekspresija mRNA *PNPLA1* se povećava tijekom diferencijacije keratinocita.³⁵⁻³⁷

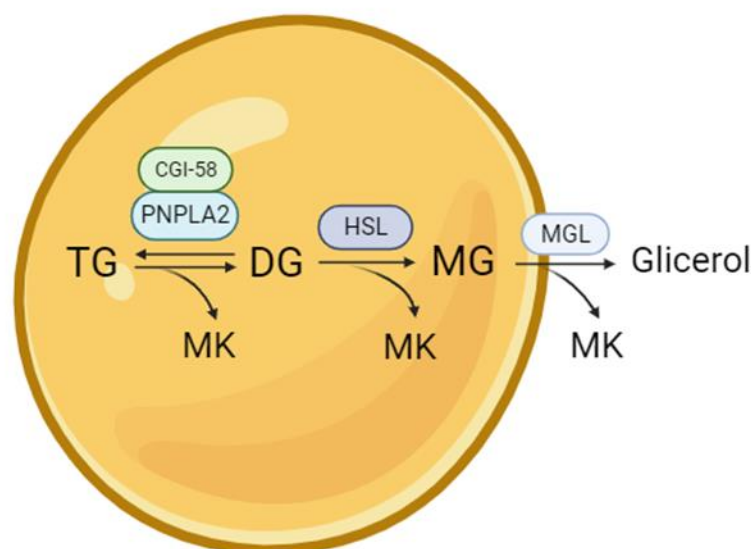
U stanici, *PNPLA1* se može nalaziti u citosolu kao slobodan enzim, ali može asociirati i s lipidnim kapljicama.^{36,38} Asocijacija s lipidnim kapljicama ostvaruje se preko slijeda bogatog aminokiselinom prolin koja se nalazi u C-terminalnoj domeni, a delecija C-terminalne domene onemogućava ostvarivanje asocijacije s lipidnim kapljicama.^{39,40} Lipidne kapljice ili adiposomi, su dinamični stanični organeli koji se formiraju u blizini tubularnih membrana na perifernom dijelu endoplazmatskog retikuluma i prisutne su u svim stanicama u organizmu.^{39,40} Srž lipidnih kapljica sadrži triacilgliceride, estere kolesterola i retinola, obavijene su fosfolipidnim monoslojem i mogu asociirati s više od 100 proteina.³⁹⁻⁴¹ U stanju gladi, na lipidnim kapljicama se odvija proces lipolize, tj. razgradnje triacilglicerida za dobivanje energije.^{42,43} Osim što imaju važnu ulogu u metabolizmu energije, lipidne kapljice sudjeluju u održavanju homeostaze proteina, zaštiti od staničnog stresa i brojnim drugim procesima.⁴⁴ *In vitro* istraživanja pokazala su da protein CGI-58 (engl. *Comparative Gene Identification-58*) regrutira *PNPLA1* za asocijaciju s lipidnim kapljicama i povećava njegovu enzimsku aktivnost, ali točan mehanizam njihove interakcije još nije razjašnjen.^{45,46}

Mutacije u C- i N-terminalnoj domeni *PNPLA1*, povezane su s razvojem autosomalne recesivne kongenitalne ihtioze (ARCI, engl. *Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis*) što rezultira abnormalnom akumulacijom lipidnih kapljica u fibroblastima i poremećajima u biosintezi ω -*O*-acilceramida.⁴⁵⁻⁴⁷ Pojedinci koji boluju od ARCI-ja imaju suhu i "ljudskavu" kožu.⁴⁷

2.2.2. *PNPLA2* (EC 3.1.1.3)

mRNA *PNPLA2* eksprimirana je u gotovo svim tkivima u ljudskom organizmu, a najviše u smeđem i bijelom masnom tkivu.³⁰ *In vitro* i *in vivo* istraživanja, pokazala su da povećanjem koncentracije inzulina, dolazi do smanjenja ekspresije mRNA *PNPLA2* i da je ekspresija mRNA *PNPLA2* smanjena u stanju sitosti, a povećana u stanju gladi.^{30,48,49} Isto tako, pokazano je da se ekspresija mRNA *PNPLA2* povećava tijekom diferencijacije mišjih 3T3 adipocita.^{30,48}

PNPLA2 ima važnu ulogu u metabolizmu lipida i lipolizi, a na **slici 3** prikazana je pojednostavljena shema lipolize.^{50,51} PNPLA2 katalizira reakciju hidrolize masne kiseline na položaju *sn*-1 ili *sn*-2 triacilglicerida pri čemu dolazi do oslobađanja diacilglicerida (DG) i neesterificirane masne kiseline (MK).⁵⁰⁻⁵³ Zatim, hormon-osjetljiva lipaza (HSL, engl. *Hormon-Sensitive Lipase*) katalizira reakciju hidrolize diacilglicerida pri čemu dolazi do oslobađanja monoacilglicerida (MG) i druge neesterificirane masne kiseline.^{52,53} Nadalje, monoacilglicerid-lipaza (MGL) hidrolizira monoacilglicerid što rezultira oslobađanjem glicerola koji ulazi u proces glukoneogeneze i treće neesterificirane masne kiseline.^{53,54} Naposljetku, masne kiseline se mobiliziraju u tkiva kojima je potrebna energija.^{53,54}



Slika 3. Pojednostavljena shema lipolize koja se sastoji od tri koraka.^{52,53} U prvom koraku, PNPLA2 katalizira hidrolizu triacilglicerida (TG) pri čemu se oslobađa diacilglicerid (DG) i nesterificirana masna kiselina (MK). U drugom koraku enzim hormon-osjetljiva lipaza (HSL, engl. *Hormon-Sensitive Lipase*) katalizira hidrolizu diacilglicerida pri čemu se oslobađa monoacilgliceril (MG) i nesterificirana masna kiselina. U zadnjem koraku, monoacilglicerid-lipaza (MGL) hidrolizira monoacilglicerid što rezultira oslobađanjem nesterificirane masne kiseline i glicerola.^{52,53} Slika je izrađena u programu BioRender.com.⁵⁵

U stanici, PNPLA2 se može nalaziti u citosolu ili u asocijaciji s lipidnim kapljicama koja se ostvaruje putem hidrofobnog slijeda od 40 aminokiselina koja se nalazi u C-terminalnoj domeni.^{37,54,56} Istraživanja su pokazala da protein CGI-58, regrutira PNPLA2 na lipidne kapljice, kao i PNPLA1.^{51,53,56-58} U bazalnim uvjetima u adipocitima, CGI-58 je asociiran s proteinom perilipin-1 na površini lipidnih kapljica.^{52,53,59} Perilipini su skupina proteina koji se nalaze na površini lipidnih kapljica i u bazalnim uvjetima štite lipidne kapljice od lipolize.^{52,53}

Međutim, u stanju gladi, β -adrenergičnom (hormonskom) stimulacijom dolazi do aktivacije protein kinaze A koja fosforilira perilipin-1 na nekoliko aminokiselinskih bočnih ogranaka što dovodi do oslobađanja proteina CGI-58 iz interakcije s perilipinom-1.^{52,53,59} Zatim, disocirani CGI-58 ostvaruje interakciju s PNPLA2 preko N-terminalne domene, regrutira ga na površinu lipidnih kapljica i na taj način stimulira lipolizu.^{52,53,59} Smanjenje koncentracije cAMP u citosolu uzrokuje ponovno vezanje CGI-58 na lipidne kapljice.^{52,53,59} Jedno istraživanje pokazalo je da u odsutnosti CGI-58, PNPLA2 hidrolizira masnu kiselinu samo s položaja *sn*-2 triacilglicerida, dok u prisutnosti CGI-58, PNPLA2 može hidrolizirati masne kiseline i na položajima *sn*-1 i *sn*-2.⁶⁰ Nekoliko *in vitro* istraživanja pokazala su da enzimsko aktivnost PNPLA2 može biti inhibirana na nekoliko načina - asocijacijom s proteinom G0G2 (engl. *G0/G1 switch protein 2*),^{52,53,56,61} asocijacijom s proteinom HILPDA (engl. *Hypoxia-Inducible Lipid Droplet-Associated protein*),^{58,59} i acil-CoA koji sadrže dugačku masnu kiselinu.⁶² Proces regulacije PNPLA2 u ostalim tkivima, npr. u srčanom i skeletnom mišiću u kojima se energija dobiva procesom oksidacije masnih kiselina, još nije dovoljno istražen jer je perilipin-1 eksprimiran u niskoj razini ili uopće nije eksprimiran.⁵² Međutim, *in vitro* i *in situ* istraživanja potvrdila su prisutnost perilipina-5 u srčanom mišiću i skeletnim mišićima.^{52,57,63} Pretpostavlja se da se u stanju gladi, perilipin-5 direktno veže PNPLA2 i CGI-58, regrutira ih na lipidne kapljice i stimulira lipolizu.^{52,57,63}

Osim triacilglicerida, istraživanja su pokazala da PNPLA2 može hidrolizirati estere retinola *in vitro*, a pokazuje fosfolipaznu A2 i transacilaznu aktivnost u manjoj razini.^{49,64} Nedavno istraživanje pokazalo je da PNPLA2 može katalizirati reakciju prijenosa masne kiseline s triacilglicerida ili diacilglicerida na molekulu hidroksi masne kiseline primjenjujući transacilaznu aktivnost, pri čemu dolazi do sinteze estera hidroksi masnih kiselina, vrste masnih kiselina s potencijalnim protu-upalnim svojstvima.⁶⁵

Istraživanja su pokazala da su mutacije u C- i N-terminalnoj domeni PNPLA2 povezane s razvojem rijetkog autosomalnog recesivnog sindroma tzv. NLSD (engl. *Neutral Lipid Storage Disease*), koji je karakteriziran akumulacijom triacilglicerida u gotovo svim tkivima u organizmu što dovodi do pojave miopatija u srčanom mišiću i skeletnim mišićima te razvojem steatoze u jetri.^{50,53,61}

Budući da su poremećaji u metabolizmu lipida povezani s razvojem brojnih sindroma i tumora, PNPLA2 predstavlja potencijalnu metu u liječenju. Jedno istraživanje je pokazalo da inhibicija PNPLA2 usporava razvoj nealkoholne bolesti masne jetre (NAFLD, engl. *Non-*

Alcoholic Fatty Liver Disease) i usporava razvoj otpornosti na inzulin uzrokovanom prehranom bogatom mastima.⁶⁶⁻⁶⁸ Isto tako, pokazano je da PNPLA2 pospješuje lipolizu u kolorektalnom i hepatocelularnom karcinomu *in vitro*,⁶⁸⁻⁷⁰ dok inhibicija PNPLA2 usporava metastaziranje raka dojke u pluća.^{71,72} Pokazano je da upotreba atglstatina, specifičnog inhibitora PNPLA2, smanjuje rast tumora *in vivo*.⁶⁷ Međutim, točan mehanizam i uloga PNPLA2 u razvoju tumora još nije dovoljno istražena.

2.2.3. PNPLA3 (EC 2.3.1.51)

PNPLA3 ili adiponutrin, pokazuje visoku sličnost s PNPLA2.^{1,3} U organizmu, mRNA *PNPLA3* je najviše eksprimirana u jetri, a umjereno u masnom tkivu, mozgu, bubrezima i koži.^{58,73} Za razliku od mRNA *PNPLA2*, ekspresija mRNA *PNPLA3* je u stanju sitosti povećana, a u stanju gladi smanjena, što upućuje na potencijalnu ulogu u biosintezi lipida, tj. lipogenezi.^{61,73} U stani, PNPLA3 može biti lociran u citosolu ili u asocijaciji s lipidnim kapljicama u stanju sitosti.^{37,73,74} Kao i PNPLA1 i PNPLA2, protein CGI-58 regrutira PNPLA3 za asocijaciju s lipidnim kapljicama, a istraživanja su pokazala da se PNPLA2 i PNPLA3 natječu za asocijaciju s ovim proteinom.^{73,75}

PNPLA3 je lipaza koja hidrolizira masnu kiselinu na položaju *sn*-2 triacilglicerida i estera retinola, a pokazuje i tioesteraznu aktivnost prema fosfolipidima.^{37,73,77} Također, ovaj enzim pokazuje i transacilaznu aktivnost specifičnu za lizofosfatidilnu kiselinu i acil-CoA pri čemu masna kiselina mora sadržavati 16 ili više ugljikovih atoma.⁷⁶

Fiziološka uloga PNPLA3 zasad je nepoznata, no ovaj enzim je privukao pažnju otkrićem polimorfizma u genu u kojem je citozin mutiran u gvanin, pri čemu dolazi do zamjene aminokiseline Ile u Met na položaju 148 (I148M).^{76,78} Brojna istraživanja su pokazala da je ovaj mutirani oblik enzima povezan s razvojem brojnih bolesti jetre uključujući NAFLD, nealkoholni steatohepatitis, fibrozu, cirozu jetre i hepatocelularni karcinom kao posljedice prekomjernog nakupljanja triacilglicerida u jetri.^{76,78-80} Nekoliko *in vitro* istraživanja su pokazala da se aktivnost mutiranog oblika I148M PNPLA3 smanjuje za 80-90 % što upućuje da novoprисutna aminokiselina metionin blokira pristup aktivnom mjestu.^{74,75,78} Također, pokazano je da se I148M PNPLA3 prekomjerno nakuplja na lipidnim kapljicama i čak onemogućava pristup proteinu PNPLA2 lipidnim kapljicama, pa na taj način narušava metabolizam lipida što može dovesti do upale i fibroze.^{74,75,78-82} Isto tako, mutirani oblik I148M PNPLA3 ostvaruje jaču interakciju s proteinom CGI-58 nego nemutirani oblik PNPLA3, i

otporniji je na uklanjanje i razgradnju procesom autofagije što rezultira njegovim nakupljanjem na lipidnim kapljicama.^{73,78,80,81,83,84}

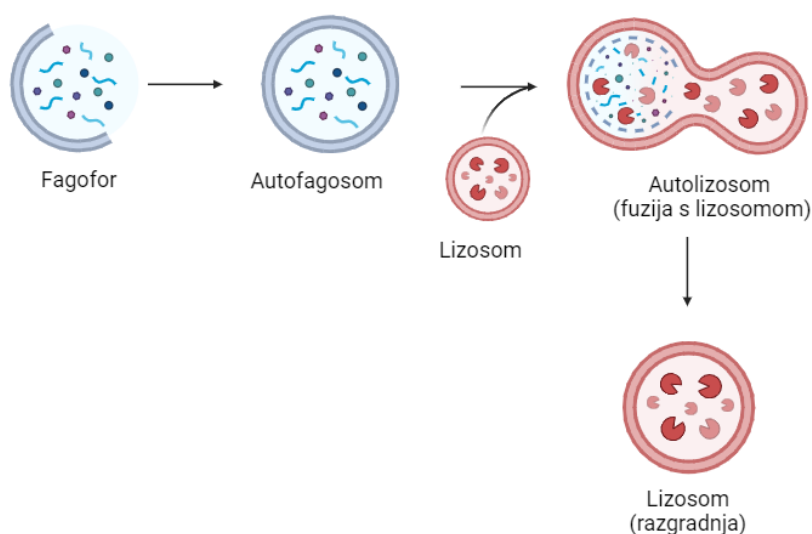
2.2.4. *PNPLA4 (EC 3.1.1.3)*

PNPLA4 ili GS2 je najmanji PNPLA enzim koji je lociran isključivo u citoplazmi i ne sadrži motiv za asocijaciju s organelima.^{1,3,85} mRNA *PNPLA4* eksprimirana je u gotovo svim tkivima u organizmu uključujući masno tkivo, jetru, mišiće, bubrege, pluća, placentu i mozak.^{28,80} PNPLA4 katalizira reakciju hidrolize triacilglicerida i estera retinola, no pokazuje i transacilaznu aktivnost.^{2,42,85-89} Fiziološka uloga PNPLA4 zasad je nepoznata, no pretpostavlja se da ima ulogu u hidrolizi estera retinola u keratinocitama u koži.⁸⁹ Jedno istraživanje pokazalo je da protein TIP47 (engl. 47 kDa *Tail-Interacting Protein*) inhibira aktivnost PNPLA4 što sugerira da TIP47 regulira razinu estera retinola i ima ulogu u regulaciji diferencijacije keratinocita.⁸⁶

2.2.5. *PNPLA5 (EC 3.1.1.3)*

PNPLA5, poznat i pod engleskim nazivom *GS2-like*, je triacilglicerid-hidrolaza eksprimirana u gotovo svim tkivima u ljudskom organizmu, a najviše u mozgu i hipofizi.^{1,3,30,34} Kao i PNPLA3, ekspresija mRNA *PNPLA5* povišena je u stanju sitosti.³⁰ U stanici, PNPLA5 može asociirati s lipidnim kapljicama putem motiva bogatog aminokiselinom Arg koji se nalazi u C-terminalnoj domeni na položajima 358-361 u aminokiselinskom slijedu.³⁶

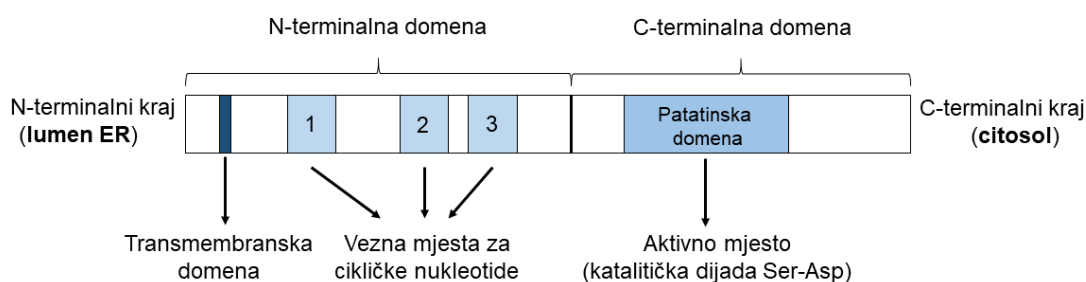
Iako je fiziološka uloga PNPLA5 nepoznata, istraživanja su pokazala da ima važnu ulogu za optimalnu inicijaciju autofagije.⁹⁰⁻⁹² Autofagija je proces u kojemu stanica uklanja proteinske agregate, unutarstanične patogene i oštećene organele, a pojednostavljena shema ovog procesa prikazana je na **slici 4**.⁹⁰⁻⁹² Prvi korak autofagije uključuje nastajanje fagofora, prekursora koji se proširuje i zatvara u autofagosom koji je omeđen dvostrukom membranom, a pretpostavlja se da PNPLA5 ima ulogu u nastajanju membrane autofagosoma.^{91,92} Autofagosom uzima dijelove citoplazme ili specifične mete i spaja se s lizosomom u kojemu se razgrađuje sadržaj autofagosoma.^{91,92}



Slika 4. Pojednostavljena shema autofagije, procesa putem kojeg stanica uklanja oštećene organele, proteinske agregate i unutarstanične patogene.⁹¹ U prvom koraku autofagije, dolazi do nastajanja fagofora koji se proširuje i zatvara u autofagosom. Zatim, autofagosom uzima dijelove citoplazme ili specifične mete i spaja se s lizosomom što rezultira razgradnjom sadržaja autofagosoma.⁹¹ Kuglice i crtice predstavljaju proteine i sadržaj citoplazme koji će biti razgrađen. Crvene i roze strukture, engl. *pac-man*, predstavljaju hidrolitičke enzime koji razgrađuju sadržaj autofagosoma. Slika je izrađena u programu Biorender.com.⁵⁵

2.2.6. PNPLA6 (EC 3.1.1.5)

PNPLA6 je membranski protein visoko eksprimiran u mozgu i limfocitima, a u manjoj mjeri u leđnoj moždini, jetri, bubrezima i slezeni.^{1,3,11-13,93-94} PNPLA6 i PNPLA7 čine filogenetski odvojenu skupinu PNPLA enzima i pokazuju sličnu preferenciju prema supstratima, sadrže sličnu organizaciju strukturalnih domena i lokalizaciju u stanici, ali različitu distribuciju u tkivima.^{1,3} Na **slici 5** prikazana je pretpostavljena organizacija domena PNPLA6 i PNPLA7.



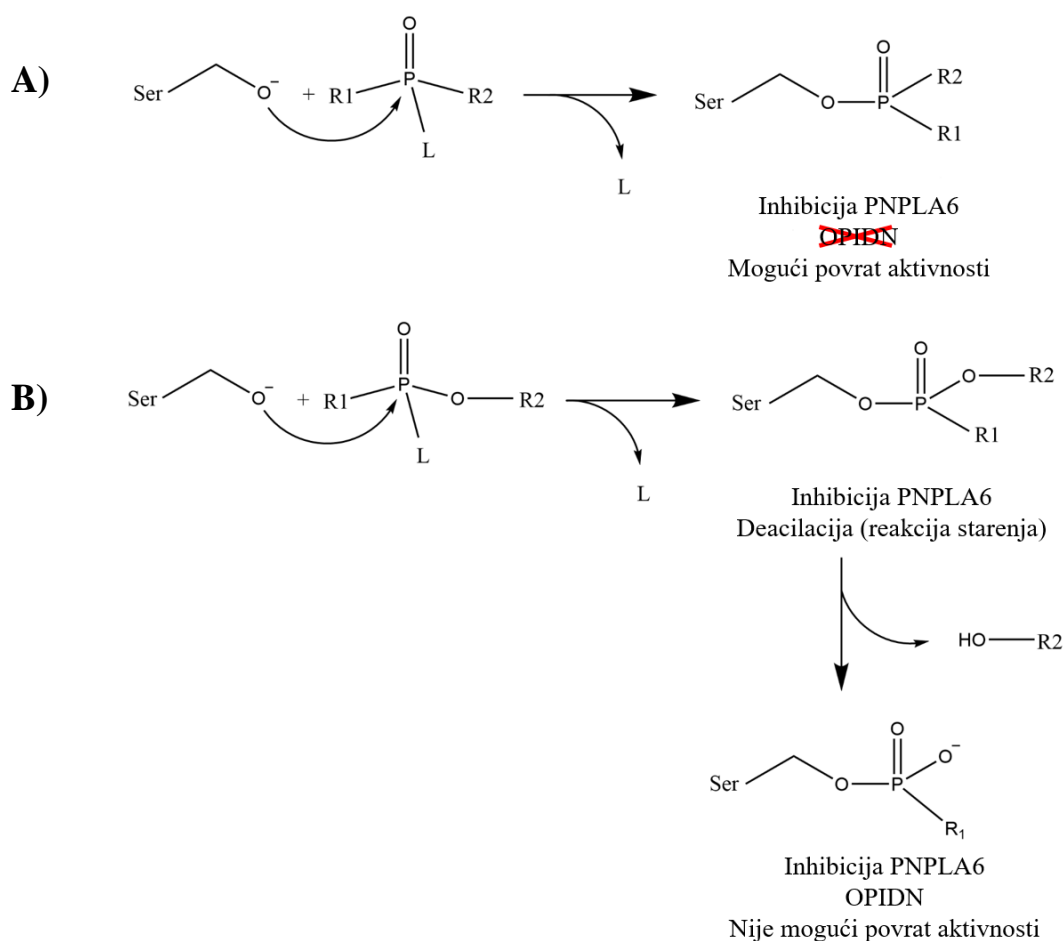
Slika 5. Pretpostavljena organizacija domena PNPLA6 i PNPLA7. Oba enzima sadrže dvije domene; N-terminalnu domenu u kojoj se nalazi jedna transmembranska domena i tri vezna mjesta za cikličke nukleotide i C-terminalnu domenu u kojoj se nalazi patatinska domena s aktivnim mjestom.^{1,3}

U stanici, PNPLA6 može biti usidren u membranu endoplazmatskog retikuluma putem transmembranske domene pri čemu je N-terminalni kraj orijentiran prema lumenu endoplazmatskog retikuluma, a ostatak enzima prema citosolu.^{12,94} Međutim, za pravilnu asocijaciju s endoplazmatskim retikulumom potrebna je cijela N-terminalna domena.⁹¹ PNPLA6 može asociirati i s lipidnim kapljicama, no točan mehanizam asocijacije još nije u potpunosti razjašnjen.⁹⁴ Istraživanja su pokazala da cijeli enzim ne ostvaruje asocijaciju s lipidnim kapljicama i da su za optimalnu asocijaciju važna vezna mjesta za cikličke nukleotide.⁹⁴ Također, sama C-terminalna domena enzima pokazuje visoki afinitet za asocijaciju s lipidnim kapljicama i ta asocijacija neovisna je o enzimskoj aktivnosti.⁹⁴ Istraživanja su pokazala da je C-terminalna domena katalitički kompetentna i bez prisutnosti N-terminalne domene te da ciklički nukleotidi ne utječu na katalitičku aktivnost C-terminalne domene.⁹⁴

PNPLA6 je fosfolipaza B koja katalizira reakciju hidrolize masnih kiselina na položajima *sn*-1 i *sn*-2 fosfolipida i lizofosfolipida, a ponajviše preferira lizofosfatilkolin kao supstrat.^{93,95-}⁹⁷ Također, *in vitro* istraživanja su pokazala da ovaj enzim može hidrolizirati acetilkolin i monoacilgliceride.⁹³

Fiziološka uloga PNPLA6 nije u potpunosti razjašnjena, ali pretpostavlja se da ovaj enzim ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i fluidnosti staničnih membrana.¹³ Delecija *PNPLA6* u miševima, dovela je do smrti u 8. danu trudnoće zbog zatajenja placente i poremećaja u razvoju krvnih žila što upućuje na važnu ulogu PNPLA6 u embrionalnom razvoju.^{13,98} Također, pokazano je da niska ekspresija mRNA *PNPLA6* ima negativan utjecaj na razvoj živčanog, krvožilnog i dišnog sustava embrija.¹³ Osim toga, rezultati istraživanja upućuju na to da PNPLA6 sudjeluje u diferencijaciji ljudskih hNT2 stanica (engl. *human neuronal NT2 cell line*).⁹⁸

PNPLA6 je otkriven prije više od 50 godina kao meta visokotoksičnih organofosfornih spojeva (OP) kao što su živčani bojni otrovi i pesticidi.^{10,12} Inhibicija PNPLA6 OP spojevima dovodi do razvoja sindroma OPIDN koji je karakteriziran slabošću, gubitkom koordinacije te trncima i grčevima u mišićima donjih udova kao rezultat degeneracije dugačkih motornih aksona u leđnoj moždini i perifernom živčanom sustavu.^{10,12} Pretpostavljeni mehanizam inhibicije enzima PNPLA6 OP spojevima prikazan je na **slici 6**.



Slika 6. Pojednostavljena shema inhibicije PNPLA6 organofosforinim spojevima (OP).^{10,12} Prvi korak u reakciji započinje nukleofilnim napadom kisika iz hidroksilne skupine Ser, na fosforin atom OP spoja, što rezultira nastajanjem tetraedarskog intermedijera. R1, R2 - acilne skupine, L - izlazna skupina. **A)** Reakcija inhibicije PNPLA6 s OP spojem koji ne podliježe reakciji starenja, ne dolazi do nastajanja sindroma OPIDN i moguć je povrat aktivnosti PNPLA6. **B)** Reakcija PNPLA6 s OP spojem koji sadrži kemijsku vezu P-O-R ili P-NH-R i podliježe reakciji starenja u kojoj dolazi do spontane deacilacije R skupine s tetraedarskog intermedijera. Kao rezultat reakcije starenja, na fosfatnoj skupini u intermedijeru ostaje negativan naboj i ona ostaje kovalentno vezana u aktivnom mjestu enzima zbog čega nije moguć povrat aktivnosti enzima. Negativno nabijena fosfatna skupina stabilizirana je vodikovim vezama u oksianionskoj šupljini. OP spojevi koji podliježu reakciji starenja uzrokuju razvoj neuropatije i OPIDN sindroma.^{10,12}

Reakcija inhibicije PNPLA6 OP-om započinje nukleofilnim napadom hidroksilne skupine Ser iz katalitičke dijade, na fosforov atom OP spoja, pri čemu nastaje prijelazno stanje trigonsko bipiramidalne geometrije.^{10,12} Kovalentnom acilacijom, izlazna skupina (L) izlazi iz kompleksa pri čemu dolazi do nastajanja tetraedarskog produkta.^{10,12} Pretpostavlja se da OP spojevi koji u svojoj strukturi sadrže kemijske veze poput P-O-R ili P-NH-R podliježu tzv. reakciji "starenja", pri čemu dolazi do izlaska R-skupine (**slika 6**).^{10,12} Kao rezultat reakcije "starenja", fosfatna skupina postaje negativno nabijena i ostaje kovalentno vezana na Ser u aktivnom mjestu.^{10,12}

Tako negativno nabijena skupina stabilizirana je vodikovim vezama u oksianionskoj šupljini enzima.^{10,12} U ovakvom kompleksu, enzimu je jako teško povratiti aktivnost zbog prisutnosti negativnog naboja na fosfatnoj skupini.^{10,12} Istraživanja su pokazala da najmanje 70 % enzima PNPLA6 mora biti inhibirano u živčanom sustavu da bi se razvio OPIDN sindrom.^{10,12}

Neadekvatna ekspresija *PNPLA6* može dovesti do razvoja bolesti motornih neurona i nasljedne spastične paraplegije 39, koja se očituje mišićnom slabošću i paralizom kao rezultat degeneracije dugačkih aksona u leđnoj moždini.^{12,99} Osim toga, mutacije *PNPLA6* su povezane s razvojem autosomalnih recesivnih poremećaja kao što su Boucher-Neuhauserov sindrom, Gordon-Holmesov sindrom, Oliver-McFarlaneov sindrom i Laurence-Moonov sindrom, koji su karakterizirani poremećajima kretanja i mentalnim oštećenjima.^{12,100}

2.2.7. *PNPLA8* (EC 3.1.1.5)

PNPLA8 ili *iPLA γ* je visokoeksprimiran u srčanom mišiću, a u nešto manjoj razini u skeletnim mišićima, mozgu, jetri, gušterači, plućima i placenti.^{2,3,101,102} S obzirom na signalni slijed lokalizacijske sekvence, *PNPLA8* može asociirati s peroksisomima, mitohondrijem, endoplazmatskim retikulumom ili autofagosomom, no uloga i mehanizmi asocijacije s navedenim organelima nije u potpunosti razjašnjena.¹⁰²⁻¹⁰⁶

PNPLA8 je fosfolipaza A1, tj. katalizira reakciju hidrolize masne kiseline s položaja *sn*-1 fosfolipida, ali pokazuje i nisku lizofosfolipaznu aktivnost.¹⁰⁴ Međutim, ukoliko je u kosturu fosfolipida vezana masna kiselina s više nezasićenih veza na položaju *sn*-2, *PNPLA8* pokazuje i fosfolipaznu A2 aktivnost pri čemu kao produkt hidrolize nastaje 2-arahidonoil-lizofosfatidilkolin (2-AA-LPC), vrsta lipida koja je prisutna u ljudskom srčanom mišiću.^{103,104,107} 2-AA-LPC se dalje može razgraditi na endokanabinoide i eikozanoide koji imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i održavanju funkcije srčanog mišića.^{104,107} Također, *PNPLA8* može hidrolizirati kardiolipin, vrstu fosfolipida koja je prisutna isključivo u membrani mitohondrija i važna za njegovu normalnu funkciju.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

U nekoliko istraživanja, pokazano je da delecija *PNPLA8* rezultira poremećajima u normalnoj funkciji mitohondrija i otvaranju mitohondrijske propusne pore, povećanom nastajanju reaktivnih kisikovih vrsta, povećanoj peroksidaciji lipida i smanjenoj razini ATP-a i glutationa, a na kraju i apoptozom stanica skeletnih mišića i jetre.^{109,111-116} Na primjer, delecija *PNPLA8* u miševima uzrokovala je porast razine kardiolipina što je rezultiralo poremećajem oksidativne fosforilacije i narušavanjem funkcije mitohondrija za dobivanje energije u stanici.^{108,109} Jedno istraživanje sugerira da *PNPLA8* može potaknuti popravak peroksidiranog

kardiolipina u mitohondriju i na taj način zaštititi stanice od apoptoze.¹¹⁷ Fiziološka uloga PNPLA8 nije u potpunosti razjašnjena, ali rezultati provedenih istraživanja sugeriraju da ovaj enzim sudjeluje u održavanju homeostaze fosfolipida, staničnoj signalizaciji i normalnoj funkciji mitohondrija.^{118,119}

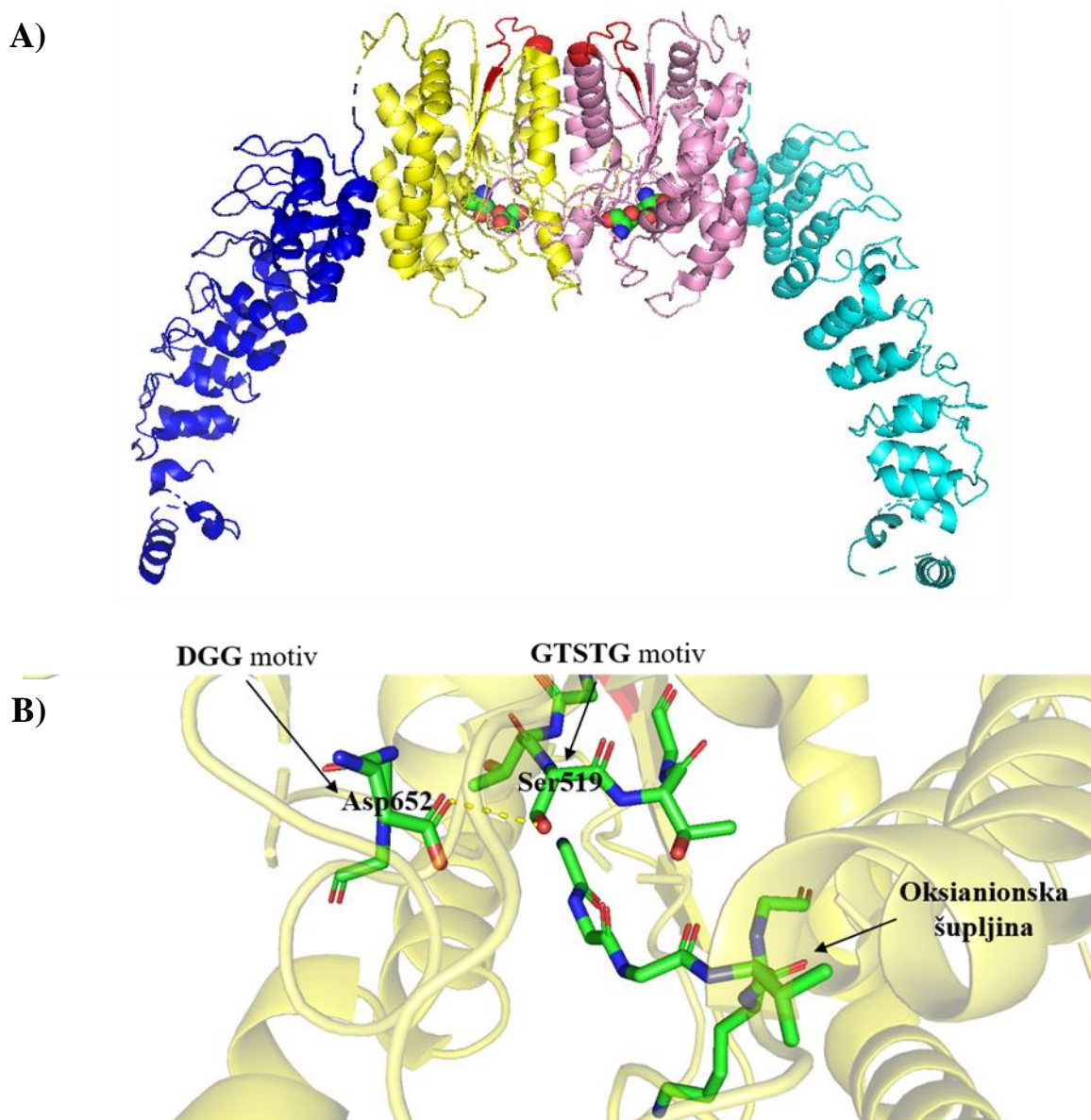
2.2.8. PNPLA9 (EC 3.1.1.4)

PNPLA9, poznat i pod nazivom iPLA β ili PLA2G6, eksprimiran je u gotovo svim tkivima u ljudskom organizmu.^{3,4,27} U stanici, većinom se nalazi u citoplazmi, ali može asociirati s različitim staničnim organelima uključujući staničnu membranu, mitohondrij, endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat i jezgrinu ovojnicu.^{2,3,5,27,29,120-124} Međutim, mehanizmi asocijacije s različitim organelima nisu u potpunosti razjašnjeni.

PNPLA9 je jedini PNPLA enzim čija je kristalna struktura riješena, a prikazana je na **slici 7**.^{29,120,125} Osim N-terminalne domene i katalitičke domene s aktivnim mjestom, ovaj enzim sadrži i domenu s ankirinskim ponavljanjima.^{29,120,125} Ankirinska ponavljanja su strukturni motivi koji se sastoje od 33 aminokiseline formirane u dvije α -zavojnice odvojene petljom, a prisutni su u stotinama proteina i imaju važnu ulogu u ostvarivanju interakcija između proteina.^{126,127} Za razliku od patatina u kojemu je aktivno mjesto povezano s dva uska "tunela" s površinom, aktivno mjesto PNPLA9 smješteno je u širokoj šupljini u koju se mogu smjestiti fosfolipidi s dugačkim nezasićenim lancima masnih kiselina.^{29,120,125} Rješavanjem kristalne strukture, pokazano je da PNPLA9 formira stabilan dimer, a interakcija između monomera posredovana je katalitičkim domenama.^{29,120} Aktivna mjesta nalaze se u neposrednoj blizini mjesta dimerizacije, a narušavanje dimera rezultira neaktivnim enzimom.^{29,120} U dimeru, ankirinska ponavljanja orijentirana su prema suprotnim stranama dimera, tj. prema potencijalnim mjestima interakcije s membranama organela ili drugim proteinima.^{29,120,125}

Istraživanja su pokazala da PNPLA9 može ostvariti interakciju s ATP-om, sa šaperonom kalneksinom i kinazom CaM (engl. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein kinase II*) koja inhibira enzimsku aktivnost ovog enzima u prisutnosti kalcija.^{27,29,120,122}

PNPLA9 je fosfolipaza A2 koja katalizira hidrolizu masne kiseline na položaju *sn*-2 glicerofosfolipida što rezultira oslobađanjem masne kiseline i lizofosfolipida, a kao supstrate preferira plazmalogene, vrstu glicerofosfolipida u kojima je masna kiselina vezana eterskom vezom.^{3,27,29,120,128,129} Također, PNPLA9 pokazuje tioesteraznu i transacilaznu aktivnost.^{27,123}



Slika 7. A) Prikaz 3D strukture dimera PNPLA9 (PDB: 6AUN) iz stanične linije hrčka CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary cells*).²⁹ Katalitičke domene monomera prikazane su žutom i ružičastom bojom. Aktivna mjesta prikazana su u obliku kuglica i štapića. Ankirinska ponavljanja prikazana su svijetloplavom i tamnoplavom bojom. Vezna mjesta za CaM kinazu (engl. *Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein kinase II*) prikazana su crvenom bojom. **B)** Aktivno mjesto PNPLA9 sadrži katalitičku dijadu Ser519-Asp652. Serin se nalazi na prijelazu iz β -strukture u α -zavojnici. Ser519 je dio motiva Gly-Thr-Ser-Thr-Gly, a Asp652 dio motiva Asp-Gly-Gly. U blizini aktivnog mjesta, nalazi se oksianionska šupljina za stabilizaciju prijelaznog stanja i karakterizirana je motivom Gly-Gly-Gly-Ala-Arg-Gly. Žuta iscrtkana linija predstavlja vodikovu vezu koja se ostvaruje između Ser519 i Asp652.

Istraživanja su pokazala da je PNPLA9 uključen u brojne fiziološke procese uključujući rast stanica i njihovu migraciju, remodeliranje staničnih membrana, autofagiju, izlučivanje inzulina, formiranje kostiju, kontrakciju i relaksaciju krvnih žila, apoptozu, ali njegova točna fiziološka

uloga u ovim procesima zasad je nepoznata.^{3,27,120,123,129-131} Delecija *PNPLA9* u miševima, rezultirala je neurološkim oštećenjima zbog narušene homeostaze membrana aksona i astrocita.^{131,132} Poremećaji u enzimskoj aktivnosti *PNPLA9* povezuju se s razvojem kardiovaskularnih bolesti, tumora, dijabetesa, mišićne distrofije, nealkoholnog steatohepatitisa i brojnih neuroloških i neurodegenerativnih bolesti.^{3,27,29,133-137} Bolesti uzrokovane mutacijama ili narušenom aktivnošću *PNPLA9* skupno se nazivaju PLA2G6-uzrokovana degeneracija koja je karakterizirana nastajanjem sferoida u središnjem i perifernom živčanom sustavu kao posljedica akumulacije membrana, staničnih organela i nepravilno smotanih proteina u neuronima.^{125,132,137} Takve mutacije prisutne su kroz cijeli aminokiselinski slijed *PNPLA9* i mogu imati različiti utjecaj na enzimsku aktivnost, regulaciju i potencijalne interakcije s drugim makromolekulama.^{27,29,120} Posljedično, navedene mutacije mogu dovesti do razvoja neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, Karakovog sindroma, neuroaksonalne distrofije novorođenčadi i neurodegeneracije s nakupljanjem željeza u mozgu.^{3,27,29,132,138,139} Također, mutacije *PNPLA9* povezane su i s razvojem Alzheimerove i Parkinsonove bolesti kod kojih nije prisutna akumulacija željeza.²⁷

2.2.9. Dosadašnje spoznaje i izazovi u istraživanju enzima *PNPLA7* (EC 3.1.1.5)

Većina istraživanja o *PNPLA7*, provedena su na modelu miša ili štakora, a u literaturi općenito ne postoji puno informacija o ovom enzimu. U bazi znanstvenih članaka PubMed® (upisani pojmovi: *PNPLA7*, *NTE-Related Esterase*, pristupljeno 7.8.2024.g.), objavljeno je tek 26 eksperimentalnih znanstvenih članaka, u razdoblju od objave prvog znanstvenog članka 2003.g. do 2024.g.¹⁴⁰ Provedena istraživanja pokazala su da je mRNA *PNPLA7* najviše eksprimirana u testisima, srčanom mišiću i tkivima koja su meta inzulina, kao što su skeletni mišići, masno tkivo i jetra, dok je njegova ekspresija znatno niža u mozgu, plućima i slezeni miša.^{7,15,16,141} O regulaciji *PNPLA7* u tkivima u kojima je eksprimiran nije dostupno puno informacija, ali pokazano je da je ekspresija mRNA *PNPLA7* povećana u stanju gladi, a smanjena u stanju sitosti u testisima, skeletnom i srčanom mišiću te masnom tkivu miša.⁷ Nadalje, pokazano je da se ekspresija mRNA *PNPLA7* smanjuje povećanjem koncentracije inzulina u mišjim 3T3-L1 stanicama masnog tkiva što navodi na pretpostavku da je *PNPLA7* reguliran ovisno o energetsom statusu organizma i da ima ulogu u metabolizmu energije.⁷

U stanici, mišji *PNPLA7* može biti asociran s endoplazmatskim retikulumom i lipidnim kapljicama.^{8,142} Poput *PNPLA6*, *PNPLA7* može biti usidren u membranu endoplazmatskog retikuluma putem transmembranske domene pri čemu je N-terminalni kraj orijentiran prema

lumenu endoplazmatskog retikuluma, a ostatak enzima prema citosolu. Osim transmembranske domene, za optimalno usidrenje PNPLA7 u membranu endoplazmatskog retikuluma, važna su i vezna mjesta za cikličke nukleotide.⁸ Porastom unutarstanične koncentracije cikličkih nukleotida, tj. cikličkog AMP-a ili GMP-a, PNPLA7 može asociirati s lipidnim kapljicama.⁸ Lipidne kapljice nastaju u cjevastim membranama perifernog endoplazmatskog retikuluma na mjestima nakupljanja novosintetiziranih masnih kiselina.^{143,144} Zatim, lipidne kapljice se mogu odvojiti od endoplazmatskog retikuluma u citosol ili ostati vezane na endoplazmatskom retikulumu.^{143,144} Istraživanja su pokazala da PNPLA7 može biti asociiran s lipidnim kapljicama koje se nalaze u citosolu, ali i sa tek nastajućim lipidnim kapljicama u endoplazmatskom retikulumu.⁸ Naime, za asocijaciju PNPLA7 s lipidnim kapljicama, vrlo je važan dio C-terminalne domene od 742. do 1016. aminokiseline.¹⁴² Također, pokazano je da dio veznog mjesta za cikličke nukleotide 3, od 681. do 741. aminokiseline, pospješuje asocijaciju s lipidnim kapljicama, dok N-terminalna domena (do 680. aminokiseline) i C-terminalni kraj enzima (od 1169. aminokiseline) inhibiraju asocijaciju s lipidnim kapljicama.¹⁴²

U literaturi ne postoji protokol za dobivanje čistoga PNPLA7 enzima, a sva kinetička mjerenja provedena su u lizatima stanica koje su prekomjerno ekspimirale ovaj enzim. Provedena istraživanja pokazala su da PNPLA7 katalizira reakciju hidrolize masne kiseline s položaja *sn*-1 molekule lizofosfolipida *in vitro* pri čemu dolazi do oslobađanja glicerol-3-fosfolipida i masne kiseline, dok ne pokazuje hidrolitičku aktivnost prema drugim lipidnim vrstama.⁷ Među lizofosfolipidima, PNPLA7 preferira nezasićene vrste lizofosfatidilkolina, lizofosfatidilne kiseline i lizofosfatidiletanolamina *in vitro*.^{7,8} Također, istraživanja su pokazala da je C-terminalna domena katalitički kompetentna i bez ostatka enzima, i da ciklički nukleotidi ne utječu na aktivnost PNPLA7.⁷

Fiziološka uloga PNPLA7 nije dovoljno istražena, ali istraživanja na miševima u kojima je utišan ili deletiran *PNPLA7* upućuju na važnu ulogu ovog enzima u metabolizmu energije. U jednom istraživanju, delecija *PNPLA7* je rezultirala degeneracijom i nekrozom stanica skeletnih mišića, žlijezda slinovnica, gušterače, jetre i masnog tkiva u miševima.¹⁸ Ujedno, došlo je do porasta broja limfocita i povećanja razine proupalnog citokina interleukina-6.¹⁸ U drugom istraživanju, utišavanje *PNPLA7* u jetri miševa je rezultiralo povećanim nakupljanjem triacilglicerida u citosolu u stanicama jetre, smanjenim izlučivanjem čestica VLDL (engl. *Very Low Density Lipoproteins*) iz jetre, i manjoj veličini VLDL čestica u plazmi.¹⁷ Utišavanje *PNPLA7* je rezultiralo i smanjenjem razine apolipoproteina E, koji ima važnu ulogu u

izlučivanju VLDL čestica iz stanica jetre. Naime, pretpostavlja se da PNPLA7 ostvaruje interakciju s apolipoproteinom E i usporava njegovu razgradnju, što rezultira stimulacijom izlučivanja VLDL čestica iz stanica jetre.¹⁷ U najnovijem istraživanju, istražena je važnost PNPLA7 i PNPLA8 u metabolizmu fosfatidilkolina i kolina u jetri.¹⁹ Naime, kolin je strukturni element membranskog fosfatidilkolina i ima važnu ulogu kao donor metilnih skupina u ciklusu metionina u jetri.¹⁹ Miševi u kojima je deletiran *PNPLA7* ili *PNPLA8* rađaju se normalno, ali nakon rođenja primijećene su karakteristike koje su svojstvene manjku metionina u organizmu kao što su povećani unos hrane, povećana pokretljivost, smanjena tjelesna masa, usporeni rast, slabost u mišićima, povećana potrošnja kisika, hipoglikemija i hipotermija.¹⁹ Također, miševi su se oslanjali na lipide kao osnovni izvor energije pri čemu je ekspresija gena uključenih u lipogenezu bila snižena, a ekspresija gena uključenih u lipolizu i β -oksidaciju masnih kiselina povišena.¹⁹ Navedene karakteristike su bile izraženije u miševima kojima je deletiran *PNPLA7* i rezultirale su smrću miševa mjesec dana nakon rođenja.¹⁹ Miševi kojima je deletiran *PNPLA7*, pokazali su smanjenu koncentraciju glicerol-3-fosfokolina, kolina, fosfokolina u jetri i smanjenu razinu glukoze, triacilglicerida, inzulina i leptina u plazmi. Također, razina metabolita koji su uključeni u ciklus metionina u jetri, kao što su betain, metionin i S-adenozilmetionin su bile snižene. S obzirom na sličan fenotip miševa u kojima je deletiran *PNPLA7* ili *PNPLA8*, pretpostavlja se da oba enzima sudjeluju u istom metaboličkom putu u jetri pri čemu PNPLA8 katalizira hidrolizu fosfatidilkolina u lizofosfatidilkolin, supstrat PNPLA7. Zatim, PNPLA7 katalizira reakciju hidrolize lizofosfatidilkolina u glicerol-3-fosfokolin, koji se drugim enzimima prevodi u glicerol-3-fosfat i kolin.^{19,145} Naposljetku, kolin se može ponovno prevesti u fosfatidilkolin, a metilne skupine kolina se mogu koristiti u ciklusu biosinteze metionina.^{19,145}

Povezanost PNPLA7 s razvojem bolesti još nije dovoljno istraženo. Jedno istraživanje pokazalo je da je ekspresija mRNA *PNPLA7* smanjena u hepatocelularnom karcinomu kao posljedica hipermetilacije njegovog promotora.¹⁴⁶ U najnovijem istraživanju, pokazano je da je ekspresija mRNA *PNPLA7* smanjena u kolorektalnom karcinomu i raku želuca u usporedbi sa zdravim tkivima, i da oboljeli kod kojih je povećana ekspresija *PNPLA7* imaju veću šansu za oporavak.¹⁴⁷ Rezultati ovog istraživanja su dobiveni na temelju podataka iz online baze podataka GEPIA 2 (engl. *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) koja obuhvaća javno dostupne podatke sekvenciranja RNA iz 9 736 uzoraka tumorskog tkiva i 8 587 uzoraka

zdravog tkiva dobivenih kao rezultat projekata TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas Program*) i GTEx (engl. *The Genotype-Tissue Expression*).¹⁴⁸

S obzirom na potencijalno važnu fiziološku ulogu u mišu i na nedostatak informacija o ulozi u ljudskim stanicama i tkivima, PNPLA7 je enzim vrijedan detaljnog istraživanja. Razumijevanjem regulacije i važnosti PNPLA7 u tkivima u kojima je zastupljen, otvorit će put prema procjeni ovog enzima kao mete u razvoju i liječenju raznih bolesti. Isto tako, uspostavljanjem protokola za dobivanje aktivnoga PNPLA7 visoke čistoće, prvi je korak prema određivanju kristalne strukture ovog enzima. Svaka nova informacija dovest će na korak bliže razumijevanju njegove fiziološke uloge i dodati djelić u veliku slagalicu PNPLA proteina, njihove funkcije i međudjelovanja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Značaj i regulacija lizofosfolipaze PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva

3.1.1. Materijali

Standardne kemikalije: Natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), magnezijev klorid (MgCl_2), natrijev fluorid (NaF), octena kiselina, klorovodična kiselina (HCl), dimetilsulfoksid (DMSO), etanol i metanol su kupljeni od tvrtke *Kemika d.o.o.* (Zagreb, Hrvatska). Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris), natrijev dodecilsulfat (SDS), dinatrijev ortovanadat (Na_2VO_4), glicerol, β -merkptoetanol, glicin, albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), Triton X-100 i Tween-20 su kupljeni od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka).

Potrošni materijal: Za uzgoj stanica, korištene su bočice površine 25 cm² (T25) ili 75 cm² (T75), a za tretman stanica pločice sa 6, 12 ili 96 jažica koje su kupljene su od tvrtki *Sarstedt AG & Co. KG* (Nümbrecht, Njemačka), *Techno Plastic Products AG* (Transandigrn, Švicarska) ili *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Pločice za PCR sa 96 jažica i plastični filmovi za pokrivanje PCR pločica kupljeni su od tvrtke *Bio-Rad* (Hercules, SAD).

Opći laboratorijski uređaji: Centrifuga *Centrifuge 5702R* je kupljena od tvrtke *Eppendorf* (Hamburg, Njemačka), a centrifuga *Megafuge ST Plus Series* od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Orbitalna miješalica *Mini Rocker-Shaker* je kupljena od tvrtke *Grant Instruments* (Cambridgeshire, Ujedinjeno Kraljevstvo). Magnetna miješalica *C-MAG HS 7 control* je kupljena od tvrtke *IKA* (Staufen im Breisgau, Njemačka). pH metar *SevenEasy S20* je kupljen od tvrtke *Mettler Toledo* (Columbus, SAD). Termoblok *ThermoMixer C* je kupljen od tvrtke *Eppendorf* (Hamburg, Njemačka). Inkubator za uzgoj stanica *Heracell™ VIOS 160i* je kupljen od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

Rad sa staničnim kulturama: Istraživanje na primarnim stanicama ljudskih skeletnih mišića provedena su u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sergeja Pirkmajera (Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Ljubljani, Slovenija). Primarne stanice ljudskih skeletnih mišića prethodno su pripremljene iz uzoraka *semitendinosus* mišića dobivenih kao otpadno tkivo nakon provođenja rutinskih ortopedskih operacija prema utvrđenom protokolu uz odobrenje Nacionalnog medicinskog etičkog povjerenstva Republike Slovenije (broj etičkog odobrenja: 71/05/12 i 0120-698/2017/4).¹⁴⁹⁻¹⁵¹ U istraživanju regulacije proteina PNPLA7, korištene su i komercijalno dostupne primarne stanice skeletnih mišića, HSkM A12555 kupljene od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Također, određena istraživanja regulacije PNPLA7 provedena su i na staničnoj liniji hepatoblastoma HepG2 kupljenoj od tvrtke *ATCC American Type Culture Collection* (Manassas, SAD), prvotno izolirane iz uzorka hepatocelularnog karcinoma 15-godišnjeg mladića.¹⁵²

Mediji i ostale kemikalije za uzgoj i tretman stanica: *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), *Advanced MEM*, *Opti-MEM*, vodena otopina MEM vitamina, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), DMEM medij bez glukoze, DMEM medij suplementiran s 1 g dm⁻³ ili 4,5 g dm⁻³ glukoze, fetalni goveđi serum (FBS, engl. *Fetal Bovine Serum*), vodena otopina antibiotika fungizon (250 µg cm⁻³), vodena otopina antibiotika gentamicin (10 mg cm⁻³), vodena otopina tripsina i soli etilediamintetraoctena kiselina (tripsin-EDTA, otopina s 2,5 g dm⁻³ tripsina i 0,2 g dm⁻³ Na₄EDTA otopljena u puferu HBSS (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*), fenol-plavo), vodena otopina antibiotika penicilin i streptamicin (P/S, otopina s 10000 jedinica penicilina i 10 mg cm⁻³ streptomocina), lipofektamin 2000 i mala interferirajuća RNA prema PNPLA7 (*Silencer™ Select Pre-Designed siRNA*) su kupljeni od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Nekodirajuća RNA (*ON-TARGETplus Non-Targeting Pool*) je kupljena od tvrtke *Dharmacon* (Lafayette, SAD). Vodena otopina neesencijalnih aminokiselina (NEAA, engl. *Non-Essential Amino Acids*), vodena otopina boje tripan-plavo (0,4 g boje tripan-plavo otopljene u 100 mL pufera PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*), forskolin (izvorna otopina: 10 mmol dm⁻³ u DMSO-u) i dibutiril ciklički-AMP (izvorna otopina: 100 mmol dm⁻³ u destiliranoj vodi) su kupljeni od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Inzulin (izvorna otopina 35 µg cm⁻³) je kupljen od tvrtke *NovoNordisk*

(Bagsværd, Danska), a deksametazon (izvorna otopina: 4 mg cm⁻³) od tvrtke *Krka d.d.* (Novo Mesto, Slovenija).

Western analiza

Za analizu proteina u uzorcima nakon tretmana korišteno je sljedeće:

Kemikalije: Marker molekulskih masa *Amersham ECL Full Range Rainbow* je kupljen od tvrtke *Cytiva* (Marlborough, SAD). Komercijalno pripremljeni gelovi *CriterionTM XT Precast Gel (4-12 % Bis-Tris)* i pufer za gel elektroforezu *XT MES* su kupljeni od tvrtke *Bio-Rad* (Hercules, SAD). Amonijev peroksodisulfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), poliviniliden fluoridne (PVDF) membrane, mlijeko u prahu bez masti, boja bromfenol plavo i boja Ponceau S su kupljene od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka).

Protutijela: Primarna protutijela anti-PNPLA7 (kataloški broj: #HPA009130), anti- β -aktin (kataloški broj: #A5441) i anti-NKA α 1, tj. prema α 1-podjedinici Na⁺,K⁺-ATP-aze (kataloški broj: #05-369) su kupljeni od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Primarna protutijela anti- β -aktin (kataloški broj: #4967), anti-AMPK (engl. *AMP-activated protein Kinase*) fosforilirana na položaju Thr172 (kataloški broj: #2535), anti-ACC (engl. *Acetyl-CoA Carboxylase*, kataloški broj: #3676), anti-ACC forforilirana na položaju Ser79 (kataloški broj: #3661), anti-p70S6K fosforilian na položaju Thr389 (kataloški broj: #9205), anti-S6RP (engl. *Ribosomal Protein S6*) fosforiliran na položajima Ser235/236 (kataloški broj: #2211), p-4E-BP1 fosforiliran na položajima Thr37/46 (kataloški broj: #2855) i p-STAT3 fosforiliran na položaju Tyr705 (kataloški broj: #9145) su kupljeni od tvrtke *Cell Signalling Technologies, Inc.* (Danvers, SAD). Sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena anti-zečje IgG iz kože (kataloški broj: #170–6515) i anti-mišje IgG iz kože (kataloški broj: #170–6516) su kupljeni od tvrtke *Bio-Rad* (Hercules, SAD).

Komercijalni kompleti: Kompleti *Pierce BCA Protein Assay kit* i *Pierce 660 nm Protein Assay kit* za mjerenje koncentracije proteina su kupljeni od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Komplet za pripremu gelova *TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12 %* koji sadrži otopine za pripremu gela za razdvajanje (*Resolver A* i *Resolver B*) i gela za sabijanje proteina (*Stacker A* i *Stacker B*), supstrati *ClarityTM Western ECL Substrate* i *Clarity MaxTM Western ECL Substrate* za detekciju signala kemiluminiscencije imunoreaktivnih proteinskih vrpca su kupljeni od tvrtke *Bio-Rad* (Hercules, SAD).

Analiza mRNA i kvantitativni PCR

Za analizu RNA u uzorcima nakon tretmana korišteno je sljedeće:

Komercijalni kompleti: Komplet *RNA E.Z.N.A HP Total RNA kit* za izolaciju RNA je kupljen od tvrtke *Omega Bio-Tek* (Norcross, SAD). Komplet *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* za reverznu transkripciju je kupljen od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

TaqMan sonde za ekspresiju gena: *PNPLA7* (kataloški broj: Hs00295012_m1), interleukin 6 (*IL-6*, kataloški broj: Hs00174131_m1), acetil-CoA karboksilaza 1 (*ACACA*, kataloški broj: Hs01046047_m1), acetil-CoA karboksilaza 2 (*ACACB*, kataloški broj: Hs01565914_m1), β -aktin (*ACTB*, kataloški broj: Hs99999903_m1) i 18S rRNA (kataloški broj: Hs99999901_s1) su kupljeni od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

3.1.2. Uzgoj i tretman stanica

Stanice korištene u provedenom istraživanju uzgajane su u T75 ili T25 bočicama za uzgoj stanica, a medij za uzgoj je mijenjan svaka dva dana. Stanice su uzgajane pri kontroliranim uvjetima u inkubatoru pri 37 °C uz parcijalni tlak ugljičnog dioksida koji je iznosio 5 %. Za odvajanje stanica od podloge za potrebe presađivanja, stanice su isprane sterilnim puferom PBS (engl. *Phosphate Buffer Saline*, sastava: 132 mmol dm⁻³ NaCl, 2,7 mmol dm⁻³ KCl, 10 mmol dm⁻³ Na₂HPO₄, 1,8 mmol dm⁻³ KH₂PO₄, pH=7,4, destilirana voda, pripremljenim kao 10 puta koncentrirana otopina, te prethodno razrijeđenim 10 puta u destiliranoj vodi), zatim inkubirane u otopini 0,25 % tripsina i EDTA do 2 min na 37 °C (1 ili 2 ml ovisno o veličini bočice), nakon čega su resuspendirane u odgovarajućem suplementiranom mediju i presađene. Za potrebe tretmana, stanice su nasađene na prozirne polistirenske pločice za uzgoj stanica sa 6 ili 12 jažica prema već utvrđenom protokolu.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Također, u svim provedenim pokusima, stanice su bile niskih pasaža (5.-10. pasaža).

Primarne stanice skeletnih mišića ili mioblasti, uključujući i komercijalno dostupne primarne stanice skeletnih mišića (HskM A12555), uzgajani su u suplementiranom *Advanced MEM* mediju (10 % FBS, 1 % komercijalne otopine GlutaMAX, 1 % komercijalne otopine MEM vitamina, 0,3 % komercijalne otopine antibiotika fungizon i 0,15 % komercijalne otopine antibiotika gentamicin). Pokusi istraživanja regulacije *PNPLA7* provedeni su na diferenciranim mioblastima, tj. miotubulima. Za diferencijaciju, mioblasti su nasađeni na pločice sa 12 jažica, a diferencijacija je potaknuta dodatkom suplementiranog *Advanced MEM* medija sa sniženim

udjelom seruma (2 % FBS, 1 % komercijalne otopine GlutaMAX, 1 % komercijalne otopine MEM vitamina, 0,3 % komercijalne otopine antibiotika fungizon i 0,15 % komercijalne otopine antibiotika gentamicin) i trajala je 7-10 dana.

Stanična linija hepatoblastoma HepG2 uzgajana je u suplementiranom MEM mediju (10 % FBS, 1 % komercijalne otopine neesencijalnih aminokiselina, 1 % komercijalne otopine smjese antibiotika penicilin i streptamicin). Kad su stanice dosegnule 70-80 % konfluentnosti, odvojene su od podloge, i izbrojane prema protokolu proizvođača na sljedeći način. Suspenzija HepG2 stanica, pomiješana je s bojom tripan-plavo u omjeru 1:1 i nanesa na pločicu za brojanje *TC10/20* (Bio-Rad, Hercules, SAD). Brojanje stanica provedeno je na uređaju *TC20TM Automated Cell Counter* (Bio-Rad, Hercules, SAD). Kao rezultat, uređaj pokazuje ukupni broj stanica i postotak živih stanica u uzorku. Nakon brojanja, nasađeno je milijun živih stanica po jažici za provedbu pokusa te su stanice ostavljene preko noći da se zalijepe za podlogu.

Prije tretmana, stanice su isprane sterilnim puferom PBS. Istraživanje regulacije PNPLA7, tj. utjecaja nutrijenata, signalnih molekula i hormona na PNPLA7, provedeno je na miotubulima i staničnoj liniji HepG2. Tretmani su provedeni u mediju DMEM različitih koncentracija glukoze - $0,5 \text{ g dm}^{-3}$, 1 g dm^{-3} i $4,5 \text{ g dm}^{-3}$ koji nije suplementiran serumom, inzulinom i antibioticima. Stanice su tretirane inzulinom - $0,1 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ i/ili $10 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$, $1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ deksametazonom, $5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ forskolinom (ishodna otopina pripravljena u DMSO-u), 0,5 % (v/v) DMSO-om kao kontrolom za tretman forskolinom i $200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ dibutilil cikličkim-AMP-om u trajanju od 16 h i/ili 24 h. Po završetku tretmana, stanice su isprane puferom PBS i uzorci stanica pripremljeni su za analizu mRNA i proteina.

3.1.3. Utišavanje PNPLA7

Pokus utišavanja *PNPLA7* proveden je na mioblastima koristeći malu interferirajuću RNA prema *PNPLA7* (siRNA, engl. *small interfering RNA*). siRNA je dvolančana molekula RNA duljine 20-24 nukleotida, koja se veže na komplementarni nukleotidni slijed mRNA ciljnog proteina što rezultira razgradnjom ciljne mRNA i sprječavanjem translacije.¹⁵³ Utišavanje je provedeno prema prethodno objavljenom protokolu.¹⁵⁴ Mioblasti su nasađeni na pločice sa 6 jažica i uzgajani u suplementiranom mediju *Advanced MEM* (10 % FBS, 1 % komercijalne otopine GlutaMAX i 1 % komercijalne otopine MEM vitamina, ali bez antibiotika) do 70 % kofluentnosti. Za unos siRNA prema *PNPLA7* u stanice, korišten je lipofektamin, a kao negativna kontrola u utišavanju je korištena nekodirajuća RNA (SCR, engl. *scrambled RNA*).

Smjesa lipofektamina i siRNA prema PNPLA7, kao i smjesa lipofektamina i SCR pripremljena je u mediju Opti-MEM netom prije tretmana. Konačne koncentracije siRNA prema PNPLA7 i SCR iznosile su 10 mmol dm^{-3} , a lipofektamina 2 % (v/v). 24 h nakon početka utišavanja, stanicama je zamijenjen medij i dodan je suplementirani *Advanced MEM* medij (10 % FBS, 1 % komercijalne otopine GlutaMAX, 1 % komercijalne otopine MEM vitamina, 0,3 % komercijalne otopine antibiotika fungizon i 0,15 % komercijalne otopine antibiotika gentamicin) te su dalje uzgajane do 72 h nakon tretmana bez zamjene medija. Uzorci za analizu mRNA uzeti su 48 h nakon početka utišavanja, a za analizu proteina 72 h nakon početka utišavanja. Priprema uzoraka za analizu je opisana u nastavku.

3.1.4. Priprema uzoraka za Western analizu

Po završetku specifičnog tretmana, mioblasti i miotubuli su isprani tri puta ohlađenim puferom PBS, pri čemu su i pločice sa stanicama držane na ledu. U jažice je dodano $120 \mu\text{L}$ pripremljenog Laemmlijevog pufera ($6,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH=6,8), 2 % natrijev dodecilsulfat, 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v) 2-merkaptioetanol i 0,002 % brom fenol plavo, destilirana voda) za lizu stanica. Uzorci mioblasta i miotubula prebačeni su u plastične mikroeprovete te sonificirani ultrasoničnim procesorom *UP50H* (*Hielscher*, Teltow, Njemačka) uz amplitudu - 50 % i ciklus - 0,5, što znači da ultrasonični val traje 0,5 s nakon kojeg dolazi 0,5 s pauze. Zatim, uzorci su inkubirani na termobloku uz konstantno miješanje od 600 okretaja po minuti (rpm, engl. *revolutions per minute*) pri $56 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min. Uzorcima je izmjerena koncentracija proteina koristeći *Pierce 660 nm Assay* prema uputama proizvođača,¹⁵⁵ kako bi se osiguralo nanošenje uzorka u istoj koncentraciji za Western analizu. $10 \mu\text{L}$ uzoraka, standarda BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*) i Laemmlijevog pufera (negativna kontrola za uzorke) nanoseno je na mikrotitarsku pločicu u duplikatima. Kao standard, korištene su otopine BSA u koncentracijskom rasponu $125\text{-}2000 \mu\text{g cm}^{-3}$ za potrebe izrade baždarnog pravca. Zatim, pripremljena je smjesa reagensa *Pierce 660 nm Protein Assay Reagent* i *Ionic Detergent Compatibility Reagent* (IDCR) pri čemu je za 20 mL reagensa *Pierce 660 nm Protein Assay Reagent* potrebno dodati 1 g reagensa IDCR. Zatim, u svaku jažicu je dodano $150 \mu\text{L}$ navedene smjese reagenasa, pločica je miješana laganom trešnjom rukom 1 min i na kraju inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi ($22\text{-}24 \text{ }^\circ\text{C}$) u mraku. Mjerenje je provedeno pri 660 nm na spektrofotometru *Epoch™* u programu Gen5 (*BioTek Instruments, Inc.*, Winooski, SAD).

Nakon provedenog tretmana (pločice sa 12 jažica), stanice HepG2 su isprane hladnim puferom PBS na ledu te su lizirane tzv. homogenizacijskim puferom (137 mmol dm^{-3} NaCl, 2,7

mmol dm⁻³ KCl, 1 mmol dm⁻³ MgCl₂, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) glicerol, 20 mmol dm⁻³ Tris baza (pH=7,8), 10 mmol dm⁻³ NaF, 1 mmol dm⁻³ EDTA, 0,5 mmol dm⁻³ Na₂VO₄, 1 mmol dm⁻³ PMSF, destilirana voda) koji je dodan u volumenu od 200 µL u svaku jažicu. Dobiveni lizati su prebačeni u mikroeprovete te centrifugirani (4 °C, 10000 rpm, 15 min) pri čemu se u talog odvajaju stanične membrane i nukleinske kiseline (DNA i RNA), a u supernatant stanični proteini za analizu. Uzorcima supernatanta izmjerena je koncentracija proteina koristeći *Pierce BCA Protein Assay Kit* prema uputama proizvođača,¹⁵⁶ a talog je bačen. Ukratko, 10 µL supernatanta uzoraka, standarda BSA (u koncentracijskom rasponu 125-2000 µg cm⁻³ za potrebe izrade baždarnog pravca) i homogenizacijskog pufera (negativna kontrola za uzorke) naneseo je na mikrotitarsku pločicu u duplikatima. Zatim, pripremljen je reagens *BCA Working Reagent (WR)* na način da su reagensi *BCA Reagent A* i *BCA Reagent B* pomiješani u omjeru 50:1. Na svaku jažicu naneseo je 200 µL reagensa BCA WR, a pločica je zatim inkubirana na termobloku 30 min, pri 37 °C uz konstantno miješanje pri 300 rpm. Mjerenje je provedeno pri 562 nm na spektrofotometru *TECAN M200 Infinite Pro (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija)*. Svi uzorci su usklađeni prema uzorku s najnižom izmjerenom koncentracijom proteina razrjeđenjem destiliranom vodom. Prema izmjerenoj koncentraciji proteina, uzorci su resuspendirani u Laemmlievom puferu u omjeru 1:4, sonificirani ultrasoničnim procesorom *UP50H (Hielscher, Teltow, Njemačka)* na prethodno opisan način, pa inkubirani na termobloku (56 °C, 600 rpm, 20 min).

3.1.5. Western analiza

Western analiza je imunokemijska metoda odijeljivanja proteina na temelju njihove veličine u električnom polju jer su svi proteini obloženi negativnim nabojem SDS deterdženta. Zatim slijedi prijenos odijeljenih proteina na membranu, označavanju željenog proteina primarnim i potom sekundarnim protutijelom te naposljetku, njegovoj detekciji specifičnom reakcijom.¹⁵⁷ Western analiza je provedena prema prethodno utvrđenom i objavljenom protokolu.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Ukratko, u prvom koraku, pripremljeni uzorci u Laemmlievom puferu su naneseo u jažice SDS-poliakrilamidnih gelova, SDS-PAGE (ili gotovih kupljenih ili pripremljenih u laboratoriju). Volumen uzoraka nanesenih na gel podešen je prema izmjerenoj koncentraciji proteina tako da je u svaku jažicu gela naneseo ista količina proteina. Za odvajanje proteina iz uzoraka mioblasta i miotubula, korišteni su komercijalno pripremljeni gelovi vertikalnog gradijenta, 4-12 % bis-tris SDS-poliakrilamidni gelovi, debljine 1,0 mm koji sadrže 12+2 jažica. Gel je postavljen u sustav za elektroforezu *CriterionTM (Bio-Rad, Hercules, SAD)*, dodan

je pufer za elektroforezu XT MES *Running Buffer* prethodno razrijeđen u destiliranoj vodi u omjeru 1:20 i uzorci su nanoseni u jažice. Na krajnju lijevu jažicu nanoseno je 2,5 μL , na krajnju desnu jažicu 4,5 μL standarda molekulskih masa (*Amersham ECL Full Range Rainbow*, Cytiva, Marlborough, SAD). SDS-PAGE je provedena pri konstantnom naponu od 200 V u trajanju od 45 min (uz sustav za napajanje *PowerPackTM HC*, Bio-Rad, Hercules, SAD).

Za odvajanje proteina iz uzoraka stanica HepG2, pripremljeni su vertikalni tzv. *stain-free* 12 %-tni tris-glicinski akrilamidni gelovi TGX, debljine 1,5 mm koji sadrže 15 jažica. Naime, *stain-free* gelovi sadrže 2,2,2-trikloroetanol koji se kovalentno veže na bočne ogranke Trp u proteinima.¹⁵⁸ Ukoliko se izlože UV svjetlosti, tako modificirani bočni ogranci Trp fluoresciraju jačeg intenziteta u odnosu na nemodificirane bočne ogranke Trp što omogućava detekciju proteina koji su prisutni i u niskim koncentracijama (čak 10-25 ng).¹⁵⁸ Navedeni gelovi pripremljeni su prema uputama proizvođača (**tablica 3**).¹⁵⁹ Nakon što je gel polimerizirao, postavljen je u sustav za elektroforezu *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, Hercules, SAD), uz dodan pufer za elektroforezu (za jednu litru pufera dodano je 100 mL pufera za elektroforezu i prijenos proteina (engl. *running/transfer* pufer, sastava: 0,25 mmol dm⁻³ Tris, 1,92 mol dm⁻³ glicin, destilirana voda), 10 mL 10 % SDS, 890 mL destilirane vode). Na krajnju lijevu jažicu nanoseno je 4,5 μL standarda molekulskih masa (*Amersham ECL Full Range Rainbow*, Cytiva, Marlborough, SAD), u sljedeće jažice 30 μL pripremljenog uzoraka proteina, a nakon zadnjeg uzorka nanoseno je 2,5 μL standarda molekulskih masa. Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 80 V sve dok uzorci nisu ušli u gel za razdvajanje, a dalje pri 120 V (uz sustav za napajanje *PowerPackTM HC*, Bio-Rad, Hercules, SAD). Nakon elektroforeze, proteini na gelu su aktivirani na uređaju *ChemiDocTM MP Imaging System* (Bio-Rad, Hercules, SAD) pri valnoj duljini od 280 nm, a ekspozicija je trajala 5 min. Ova aktivacija omogućuje vizualizaciju nativnih proteinskih vrpca i na gelu i na membrani nakon prijenosa proteina bez korištenja posebnih boja (npr. Coomassie blue i Ponceau S).

Tablica 3. Sastav i priprema tzv. *stain-free* TGX 12 %-tnog akrilamidnog gela debljine 1,5 mm s 15 jažica.

	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
<i>Resolver A</i>	4 mL	
<i>Resolver B</i>	4 mL	
<i>Stacker A</i>		1,5 mL
<i>Stacker B</i>		1,5 mL
TEMED	4 μL	3 μL
10 % APS	40 μL	15 μL

Prijenos razdvojenih proteina metodom SDS-PAGE, s gela na poliviniliden fluoridnu (PVDF) membranu, promjera pora 0,45 μm , proveden je pomoću sustava *Criterion*TM i sustava za napajanja *PowerPack*TM HC (Bio-Rad, Hercules, SAD). Prije prijenosa proteina s gela na PVDF membrane, membrane su aktivirane u 100 % (v/v) metanolu. Po završetku elektroforeze, pripremljen je tzv. "transfer-sendvič" pri čemu je na dno postavljen filter papir, zatim je na filter papir postavljen gel, pa aktivirana membrana i na vrh je ponovno postavljen filter papir. Tako složeni "transfer-sendvič" postavljen je u *Criterion*TM (Bio-Rad, Hercules, SAD) kadicu pri čemu je gel okrenut prema anodi, a membrana prema katodi, jer proteine oblaže negativni naboj SDS deterdženta. Prijenos je proveden pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 1 h i 30 min uz hlađenje. Za prijenos proteina iz uzoraka mioblasta i miotubula, korišten je transfer pufer sljedećeg sastava: 1 mmol dm^{-3} Tris, 0,24 mol dm^{-3} glicin, 10 % (v/v) metanol i 0,01 % SDS, destilirana voda. Za prijenos proteina iz uzoraka HepG2 stanica, korišten je transfer pufer za čiju pripremu jedne litre je dodano 100 mL pufera za elektroforezu i prijenos proteina (engl. *running/transfer* pufer, sastava: 0,25 mmol dm^{-3} Tris, 1,92 mol dm^{-3} glicin, destilirana voda), 200 mL 100 % (v/v) metanola i 700 mL destilirane vode.

Nakon prijenosa, membranama je odrezan lijevi gornji kut kao oznaka strane i isprane su 2-3 puta u puferu TBST (20 mmol dm^{-3} Tris (pH=7,5), 150 mmol dm^{-3} NaCl, 0,02 % (v/v) Tween-20, destilirana voda). Radi provjere uspješnosti prijenosa proteina s gela na membranu, membrane na koje su preneseni uzorci proteina mioblasta i miotubula isprane su tri puta u 5 % (v/v) octenoj kiselini i inkubirane u 0,1 %-tnoj vodenoj otopini boje Ponceau S u trajanju od 5 min. Po završetku bojanja, membrane su ponovno isprane u 5 % (v/v) octenoj kiselini i vidljivi proteini su snimljeni nakon skeniranja na uređaju *ImageRUNNER Advance DX C3752i* (Canon, Tokyo, Japan). Nakon snimanja, membrane su isprane dva puta u puferu TBST po 5 min radi ispiranja boje Ponceau S. Membrane na koje su preneseni uzorci proteina HepG2 stanica sa TGX gela, vizualizirane su na uređaju *ChemiDoc*TM MP *Imaging System* (Bio-Rad, Hercules, SAD) pri čemu je korištena optimalna ekspozicija samog uređaja.

U sljedećem koraku, obje vrste membrana su inkubirane u puferu za blokiranje nespecifičnih interakcija u trajanju od 1 h i 30 min na orbitalnoj miješalici na sobnoj temperaturi (22-24 °C). Pufer za blokiranje nespecifičnih interakcija je pripremljen na način da je 3,75 g mlijeka u prahu bez masti otopljeno u 50 mL pufera TBST, pri čemu je konačni udio mlijeka u prahu iznosio 7,5 %. U pufer za blokiranje nespecifičnih interakcija za PNPLA7, dodano je i 0,4-0,75 g BSA pri čemu je konačni udio BSA iznosio 0,8-1,5 %.

Po završetku blokiranja nespecifičnih interakcija, membrane su isprane više puta u puferu TBST, pa inkubirane u otopini odabranih primarnih protutijela (**tablica 4**) na orbitalnoj miješalici preko noći pri 4 °C. Primarna protutijela pripravljena su u puferu za primarna protutijela (sastava: 20 mmol dm⁻³ Tris (pH=7,5), 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1 % BSA, 0,1 % natrijev azid, destilirana voda) prema uputama proizvođača, a podrijetlo protutijela, tip i razrijeđenje primarnog i sekundarnog protutijela prikazano je u **tablici 4**.

Tablica 4. Popis primarnih protutijela korištenih u Western analizi, njihovo podrijetlo, tip i razrijeđenje primarnih i sekundarnih protutijela.

1° protutijelo	Podrijetlo	Tip	Razrijeđenje	2° protutijelo
PNPLA7	zec	poliklonalno	1:400	1:20000
ACC	zec	monoklonalno	1:1000	1:10000
p-ACC (Ser79)	zec	poliklonalno	1:1000	1:10000
β-actin	miš	monoklonalno	1:10000	1:12500
NKAα1	miš	monoklonalno	1:2000	1:20000
p-p70S6K1 (Thr389)	zec	poliklonalno	1:1000	1:10000
p-S6RP (Ser235/236)	zec	poliklonalno	1:1000	1:15000
p-4E-BP1 (Thr37/46)	zec	monoklonalno	1:1000	1:10000
p-AMPK (Thr172)	zec	monoklonalno	1:1000	1:10000
p-STAT3 (Tyr705)	zec	monoklonalno	1:1000	1:10000

Sljedeći dan, membrane su isprane tri puta u puferu TBST po 10 min, pa inkubirane u sekundarnom protutijelu konjugiranom s peroksidazom iz hrena na orbitalnoj miješalici 1 h pri sobnoj temperaturi (22-24 °C). Pufer za pripremu sekundarnih protutijela pripremljen je na način da je 2,5 g mlijeka u prahu bez masti otopljeno u 50 mL pufera TBST, pri čemu je konačni udio mlijeka u prahu iznosio 5 %. Sekundarna protutijela su otopljena u navedenom puferu u omjerima navedenima u **tablici 4**. Korištena su dva sekundarna protutijela konjugirana s peroksidazom iz hrena: kozje anti-zečje IgG ukoliko je podrijetlo primarnog protutijela bilo iz zeca ili kozje anti-mišje IgG sekundarno protutijelo ukoliko je podrijetlo primarnog protutijela bilo iz miša.

U zadnjem koraku, membrane su isprane tri puta u puferu TBST po 10 min i inkubirane u otopini ECL reagensa (engl. *Enhanced ChemiLuminescence*) 1 min koja je dobivena miješanjem otopina peroksida i luminola u volumnom omjeru 1:1. Kemiluminiscencija obilježenih proteina vizualizirana je na uređaju *Fusion FX6* u programu *Evolution-Capt* (*Vilber*,

Francuska) ili na uređaju *ChemiDoc™ MP Imaging System* u programu *Image Lab Touch Software* (*Bio-Rad*, Hercules, SAD). Imunoreaktivne vrpce su analizirane u programu *Quantity-One 1D* (*Bio-Rad*, Hercules, CA, SAD).

3.1.6. Neutralizacija primarnog protutijela anti-PNPLA7

Specifičnost primarnog protutijela anti-PNPLA7, određena je koristeći rekombinantni proteinski fragment PNPLA7, tzv. PrEST peptid (engl. *Protein Epitope Signature Tag*) prema kojemu je protutijelo anti-PNPLA7 specifično. PrEST peptid bio je sljedećeg aminokiselinskog slijeda:

CEVGYQHGRITVFDIWRSGVLEKMLRDQQGSPKPPASAVLTCPNASFDTDLAEIVSRIEPAKP
AMVDDES DYQTEYEEELLDVPRDAYADFQSTSAQQGSDLEDESSLRHRHPSLAFFKLSE.

Neutralizacijski peptid dobiven je od proizvođača primarnog protutijela anti-PNPLA7 (*Prestige Antibodies® Powered by Atlas Antibodies, Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Njemačka)

U prvom koraku, 10 μL otopine protutijela anti-PNPLA7 (konačne koncentracije 0,4 $\mu\text{g dm}^{-3}$) inkubirano je s 1,1 μL neutralizacijskog PrEST peptida prema protutijelu anti-PNPLA7 (konačne koncentracije 0,8 $\mu\text{g dm}^{-3}$) i 29 μL pufera za primarna protutijela u koji je prethodno dodana ureja konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3} . Pripremljena smjesa, inkubirana je 3,5 h pri 22 °C uz konstantno miješanje pri 300 rpm. Nakon inkubacije, smjesa je razrijeđena puferom za primarna protutijela (u koji je prethodno dodana ureja konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3}), pri čemu je ukupni volumen smjese iznosio 5000 μL , a protutijelo anti-PNPLA7 je u konačnici razrijeđeno 1:500. Tako pripremljena smjesa koja je sadržavala otopinu neutraliziranog protutijela anti-PNPLA7, korištena je u Western analizi za potvrđivanje specifičnosti vezanja anti-PNPLA7 protutijela prema PNPLA7 proteinu u određenim uzorcima.

3.1.7. Izolacija RNA

Po završetku provedenog tretmana, stanice su isprane tri puta sterilnim puferom PBS, a sveukupna RNA izolirana je koristeći *E.Z.N.A. HP Total RNA Kit* prema uputama proizvođača.¹⁶⁰ Ukratko, na uzorke stanica, nanoseno je 350 μL pufera *GTC Lysis Buffer* u koji je prethodno dodan β -merkaptotanol (20 μL na 1 mL pufera *GTC Lysis Buffer*), nakon čega su lizati stanica prebačeni u kolonice *RNA Homogenizer Mini Column* i centrifugirane (1 min, 13300 rpm). Kolonica je uklonjena, a u filtrat je dodano 350 μL 70 % (v/v) etanola. Zatim, filtrat je prenesen na kolonicu *HiBind® RNA Mini Column* i centrifugiran (1 min, 10000 rpm). Dobiveni filtrat je uklonjen, a na kolonicu je dodano 500 μL pufera *RNA Wash Buffer I* i

centrifugirano (30 s, 10000 rpm). Filtrat je uklonjen, a na kolonicu je dodano 500 µL pufera RNA Wash Buffer II i centrifugirano (1 min, 10000 rpm). U zadnjem koraku, na kolonicu dodano je 40 µL sterilne vode iz komercijalnog kompleta koja ne sadrži nukleazu, i centrifugirano (2 min, 13300 rpm). Nakon centrifugiranja, u filtratu se nalazi izolirana sveukupna RNA kojoj je u sljedećem koraku izmjerena koncentracija. Po 2 µL uzoraka izolirane RNA nanoseno su na *Take3* pločice (*BioTek Instruments, Inc.*, Winooski, SAD) i izmjerena je apsorbancija (260 nm/280 nm) na spektrofotometru *Epoch™* (*BioTek Instruments, Inc.*, Winooski, SAD), a u mjerenju je kao negativna kontrola korištena voda bez nukleaze iz komercijalnog kompleta. Prema rezultatima mjerenja koncentracije RNA, pripremljeno je po 10 µL uzoraka na način da sadrže istu koncentraciju RNA razrjeđenjem u vodi bez nukleaze iz komercijalnog kompleta.

3.1.8. Reverzna transkripcija

Uzorci izolirane RNA prevedeni su u cDNA metodom reverzne transkripcije pri čemu korišten *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* prema uputama proizvođača.¹⁶¹ U navedenoj metodi, enzim reverzna transkriptaza katalizira reakciju sinteze komplementarnog DNA lanca prema RNA kalupu.¹⁶² Za provedbu reverzne transkripcije jednog uzorka, reakcijska smjesa sadržavala je sljedeće komponente komercijalnog kompleta: 2 µL pufera 10X RT, 0,8 µL 25X dNTP-a, 2 µL RT nasumičnih početnica, 0,4 µL inhibitora RNaze, 1 µL reverzne transkriptaze i 4,8 µL vode koja ne sadrži RNazu iz komercijalnog kompleta. Kao negativna kontrola (RT-), izabran je uzorak najveće koncentracije RNA, a u reakcijsku smjesu nije dodana reverzna transkriptaza. Reverzna transkripcija provedena je na uređaju *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (*MJ Research Inc., Bio-Rad*, Hercules, SAD) prema sljedećem programu: 10 min pri 25 °C, 120 min pri 37 °C, 5 min pri 85 °C.

3.1.9. Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction)

U sljedećem koraku, dobivena cDNA umnožena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (PCR) primjenjujući TaqMan sustav.^{163,164} Lančana reakcija polimerazom temelji se na ponavljanju ciklusa od tri koraka koji uključuju toplinsku denaturaciju lanaca molekule DNA, vezanje početnica na komplementarne dijelove DNA i sintezu komplementarnih lanaca DNA polimerazom, enzimom koji katalizira reakciju produljenja DNA lanca iz 5' kraja prema 3' kraju molekule DNA.¹⁶³ TaqMan sustav je vrsta metode PCR koja se temelji na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti Taq-DNA polimeraze, na korištenju sonde, tj. oligonukleotida koji

sadrži fluorescentnu boju na 5' kraju i utišivača fluorescencije, tzv. *quencher* na 3' kraju koji emitira svjetlost pri različitim valnim duljinama.¹⁶⁴ TaqMan sonda se veže na specifično mjesto DNA između dvije početnice. Tijekom polimerizacije, kad Taq-DNA polimeraza stigne do sonde, zbog svoje 5'-3' egzonukleazne aktivnosti, oslobodit će sondu koja će početi emitirati svjetlost i doći će do porasta fluorescencije koja je proporcionalna količini nastalog amplikona.¹⁶⁴ U reakcijskoj smjesi korišteni su *TaqMan® Universal Master Mix II* sa UNG i *TaqMan assay*-i za ekspresiju *PNPLA7*, *IL-6* (interleukin-6), *ACACA* (acetil-CoA karboksilaza 1), *ACACB* (acetil-CoA karboksilaza 2), *ACTB* (β -aktin) i 18S rRNA. Na polistirenske pločice za PCR s 96 jažica, nanoseno je po 2 μ L uzoraka odgovarajuće cDNA u duplikatima, negativne kontrole reverzne transkripcije (RT-) te sterilne vode iz komercijalnog kompleta koja ne sadrži DNazu i RNazu kao negativnu kontrolu za PCR. Zatim, za svaki navedeni uzorak, dodano je po 8 μ L reakcijske smjese pri čemu je za umnažanje jednog uzorka cDNA, reakcijska smjesa sadržavala 5 μ L *TaqMan® Universal Master Mix II* sa UNG, 0,5 μ L *TaqMan assay*-a za odgovarajući gen i 2,5 μ L sterilne vode iz komercijalnog kompleta koja ne sadrži DNazu i RNazu. Kao endogene kontrole, korišteni su *ACTB* i 18S rRNA. Pri provođenju kvantitativnog PCR-a za 18S rRNA, nakon reverzne transkripcije, uzorci su razrijeđeni 1:100 u sterilnoj vodi iz komercijalnog kompleta koja ne sadrži DNazu i RNazu. Mikrotitarske pločice pokrivene su plastičnom folijom i centrifugirane 2 min pri 1000 rpm. Zatim, kvantitativni PCR proveden je na uređaju *Quant Studio 3* (*Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD*) prema sljedećem programu:

1. UNG inkubacija - 2 min pri 50 °C,
2. Aktivacija Taq-DNA polimeraze - 10 min pri 95 °C,
3. Denaturacija - 15 s pri 95 °C,
4. Vezanje i produljenje početnica - 1 min pri 60 °C.

Postupak denaturacije, vezanja i produljenja početnica ponovljen je 40 puta. Rezultati kvantitativnog PCR-a izraženi su kao omjer:

$$\frac{(1 + E_{\text{referentni gen}})^{C_{t,\text{referentni gen}}}}{(1 + E_{\text{meta}})^{C_{t,\text{meta}}}}$$

pri čemu je E učinkovitost PCR-a, a C_t broj ciklusa. Budući da su korištene dvije endogene kontrole (*ACTB* i 18S rRNA), u normiranju je korištena geometrijska sredina obje endogene kontrole. Učinkovitost PCR-a (E) izračunata je korištenjem programa LinRegPCR.^{150,152,165,166}

3.1.10. Statistička analiza

Provedeni pokusi ponovljeni su najmanje tri puta. Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti sa standardnom pogreškom srednje vrijednosti (\pm SEM). Statistička analiza provedena je u programima Microsoft Excel (Microsoft Office 2016, *Microsoft*, Redmond, SAD) i GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, *DotMatics*, La Jolla, SAD). Statistička značajnost određena je primjenom statističkih testova: t-test i *two-way* ANOVA s Tukey *post hoc* testom, a razlika između grupa statistički je značajna pri vrijednosti $p \leq 0.05$.

3.2. Ekspresija ljudskog rekombinantnog enzima PNPLA7 i procjena PNPLA7 kao mete organofosfornih spojeva

3.2.1. Materijali

Standardne kemikalije: Natrijev klorid (NaCl), kalijev klorid (KCl), dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), natrijev hidrogenfosfat (NaH_2PO_4), dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), kalijev hidrogenfosfat (KH_2PO_4), klorovodična kiselina (HCl), glicerol, tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP), metanol, etanol, izopropanol i agarozu su kupljeni od tvrtke *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Njemačka), *Kemika d.o.o.* (Zagreb, Hrvatska) ili *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), imidazol, IGEPAL CA-630 (NP-40), ureja, niklov sulfat (NiSO_4), 3-(cikloheksilamino)-1-propansulfonska kiselina (CAPS), natrijev dodecilsulfat (SDS), albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*), *p*-nitrofenil valerat i organofosfat paraokson su kupljeni od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Organofosfat di-izopropilfluorofosfat (DFP) je kupljen od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

Opći laboratorijski uređaji i oprema: Centrifuge *Centrifuge 5702R* i *Centrifuge 5810R* su kupljene od tvrtke *Eppendorf* (Hamburg, Njemačka), a centrifuga *Avanti JXN-26 Series* od tvrtke *Beckman Coulter* (Brea, SAD). Orbitalna miješalica *Mini Rocker-Shaker* je kupljena od tvrtke *Grant Instruments* (Cambridgeshire, Ujedinjeno Kraljevstvo). pH metar *SevenEasy S20* je kupljen od tvrtke *Mettler Toledo* (Columbus, SAD). Termoblok *ThermoMixer C* je kupljen od tvrtke *Eppendorf* (Hamburg, Njemačka). Inkubatori za uzgoj stanica *Unitron*, *Minitron* i *Celltron* su kupljeni od tvrtke *Infors-HT* (Bottmingen, Švicarska). Filteri za špricu su kupljeni od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Gravitacijske kolone za afinitetnu kromatografiju su kupljene od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

Kloniranje

Komercijalni kompleti: Komplet *Plasmid MiniPrep kit* za izolaciju plazmidne DNA, komplet *Q5 Site-Directed Mutagenesis kit* za provedbu lančane reakcije polimerazom (PCR) i komplet *Gibson assembly NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix kit* za provedbu metode tzv. *Gibson assembly* su kupljeni od tvrtke *New England Biolabs* (Ipswich, SAD).

Početnice za kloniranje, PCR i sekvenciranje su kupljene od tvrtke *Microsynth AG* (Balgach, Švicarska).

Analiza DNA agaroznom elektroforezom na gelu: marker molekulskih masa *1 kb DNA Ladder*, boja *Gel Loading dye Purple 6X* za nanošenje uzoraka na agarozni gel i boja *SYBR Safe* za vizualizaciju DNA na agaroznom gelu su kupljene od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD).

Rad s bakterijskom kulturom

Bakterijski sojevi: *Escherichia coli* DH5 α je kupljen od tvrtke *New England Biolabs* (Ipswich, SAD). *Escherichia coli* BL21-CodonPlus-RIL je kupljen od tvrtke *Agilent Technologies* (Santa Barbara, SAD).

Reagensi i kemikalije za rad s bakterijskim stanicama: agar, Luria-Bertani (LB) medij, ampicilin, kloramfenikol, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) su kupljeni od tvrtke *Carl Roth, GmbH* (Karlsruhe, Njemačka). Medij SOC *outgrowth* je kupljen od tvrtke *New England Biolabs* (Ipswich, SAD).

Western analiza

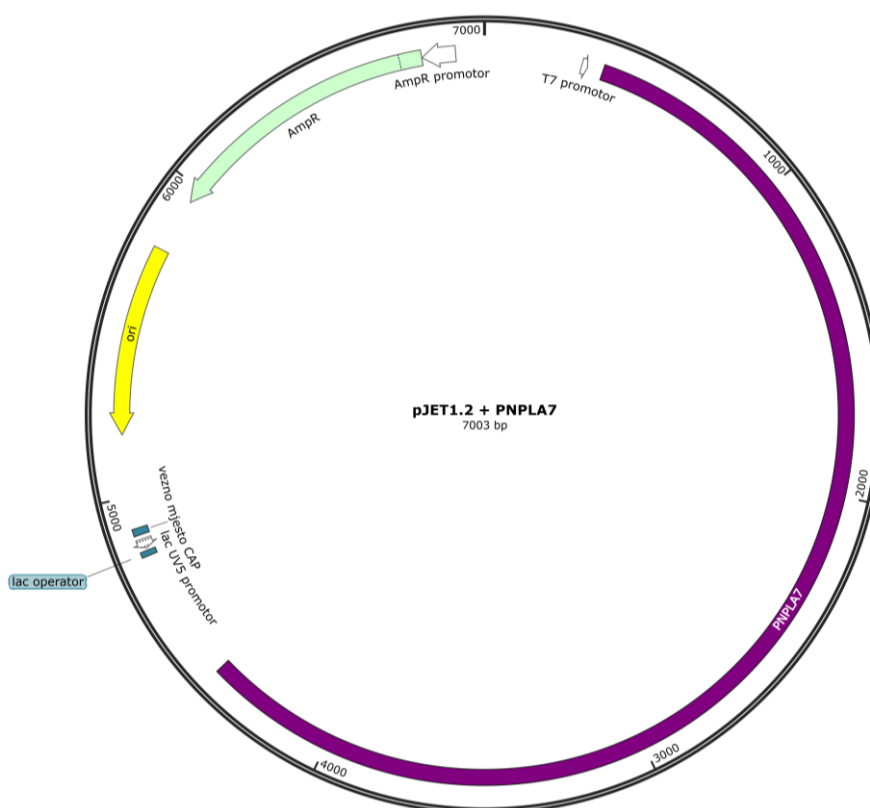
Boje i markeri molekulskih masa: Boja *ReadyBlue Protein Gel Stain* za vizualizaciju proteina na poliakrilamidnom gelu je kupljena od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Marker molekulskih masa *Pierce Unstained Protein Molecular Weight* je kupljen od tvrtke *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, SAD). Marker molekulskih masa *Blue Prestained protein standard broad range* je kupljen od tvrtke *New England Biolabs* (Ipswich, SAD).

Protutijela: Primarno mišje protutijelo anti-pentahistidin (#34650) je kupljeno od tvrtke *QIAGEN* (Düsseldorf, Njemačka). Sekundarno protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena anti-mišje IgG iz kože je kupljeno od tvrtke *GE Healthcare Bio-Sciences* (Buckinghamshire, UK).

Ostali materijali i reagensi za Western analizu: Mlijeko u prahu bez masti, filter papiri i PVDF membrane su kupljene od tvrtke *Merck/Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Njemačka). Supstrati *Amersham ECL immunoblotting detection reagent* za detekciju signala kemiluminiscencije imunoreaktivnih proteinskih vrpci su kupljeni od tvrtke *GE Healthcare Bio-Sciences* (Buckinghamshire, UK).

3.2.2. Izolacija i umnažanje nukleotidnog slijeda PNPLA7

Za potrebe ekspresije proteina PNPLA7, ukupna mRNA izolirana je iz uzorka ljudskih primarnih stanica skeletnih mišića u laboratoriju prof. dr. sc. Sergeja Pirkmajera. Metodom reverzne transkripcije specifična mRNA *PNPLA7* prevedena je u cDNA prema ranije utvrđenom protokolu,¹⁶⁷ a dobiveni nukleotidni slijed PNPLA7 duljine 4029 nukleotida, ukloniran je u vektor pJET1.2. Zatim, bakterijski soj *E. coli* DH5 α je transformiran navedenim vektorom, izolirana je plazmidna DNA, i pripremljeni su uzorci za sekvenciranje, a navedeno je proveo dr. sc. Jovica Lončar u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska. Sekvenciranje je provela tvrtka *Macrogen Ltd.* (Seoul, Južna Koreja) tzv. metodom *primer walking*. Na **slici 8** prikazana je mapa vektora pJET1.2 s nukleotidnim slijedom cijelog proteina PNPLA7, a u dodatku (odjeljak 7.1.1.) je prikazan nukleotidni i aminokiselinski slijed cijelog proteina PNPLA7 potvrđen od strane tvrtke *Macrogen Ltd.* (Seoul, Južna Koreja).



Slika 8. Mapa vektora pJET1.2 s prikazom pozicije slijeda nukleotida cijelog proteina PNPLA7.

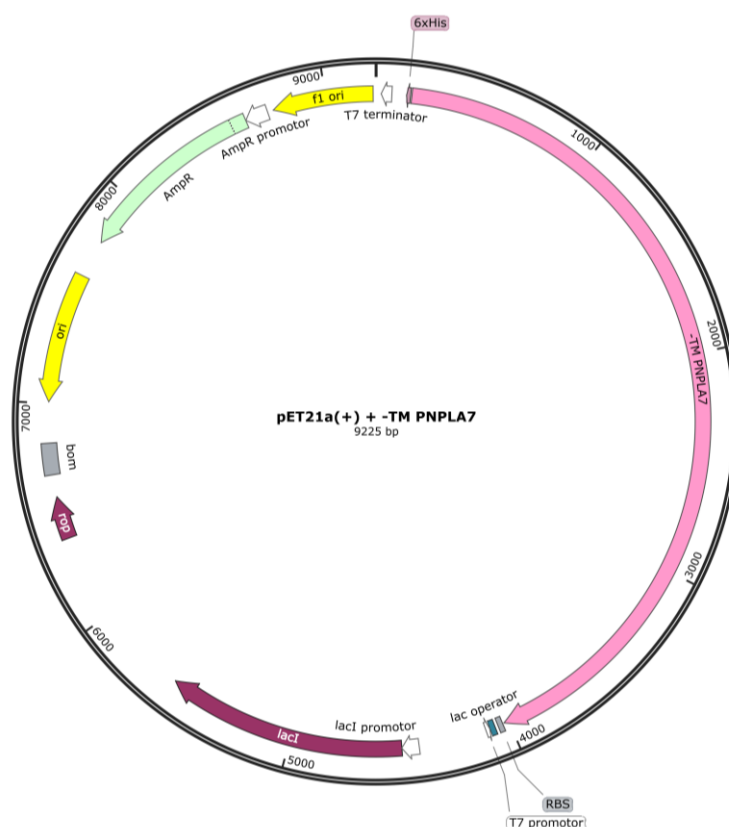
S obzirom na molekulsku masu PNPLA7 i prisutnost transmembranske domene, eksprimirani su sljedeći skraćeni konstrukti: PNPLA7 bez transmembranske domene (-TM PNPLA7), patatinska domena (PAT PNPLA7), produljena patatinska domena (AB-PAT PNPLA7) i vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3 PNPLA7). Duljine nukleotidnih sljedova navedenih konstrukata i odgovarajućih produkata translacije prikazani su u **tablici 5** i u dodatku (odjeljak 7.1.2.-7.1.5.). Priprema i prekomjerna ekspresija konstrukata navedena je dalje u tekstu.

Tablica 5. Duljina nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova odabranih skraćenih konstrukata PNPLA7.

Konstrukt PNPLA7	Duljina nukleotidnog slijeda	Broj aminokiselina
-TM PNPLA7	3855	1285
PAT PNPLA7	876	292
AB-PAT PNPLA7	1470	490
CNB 2-3 PNPLA7	801	267

3.2.3. Kloniranje -TM PNPLA7

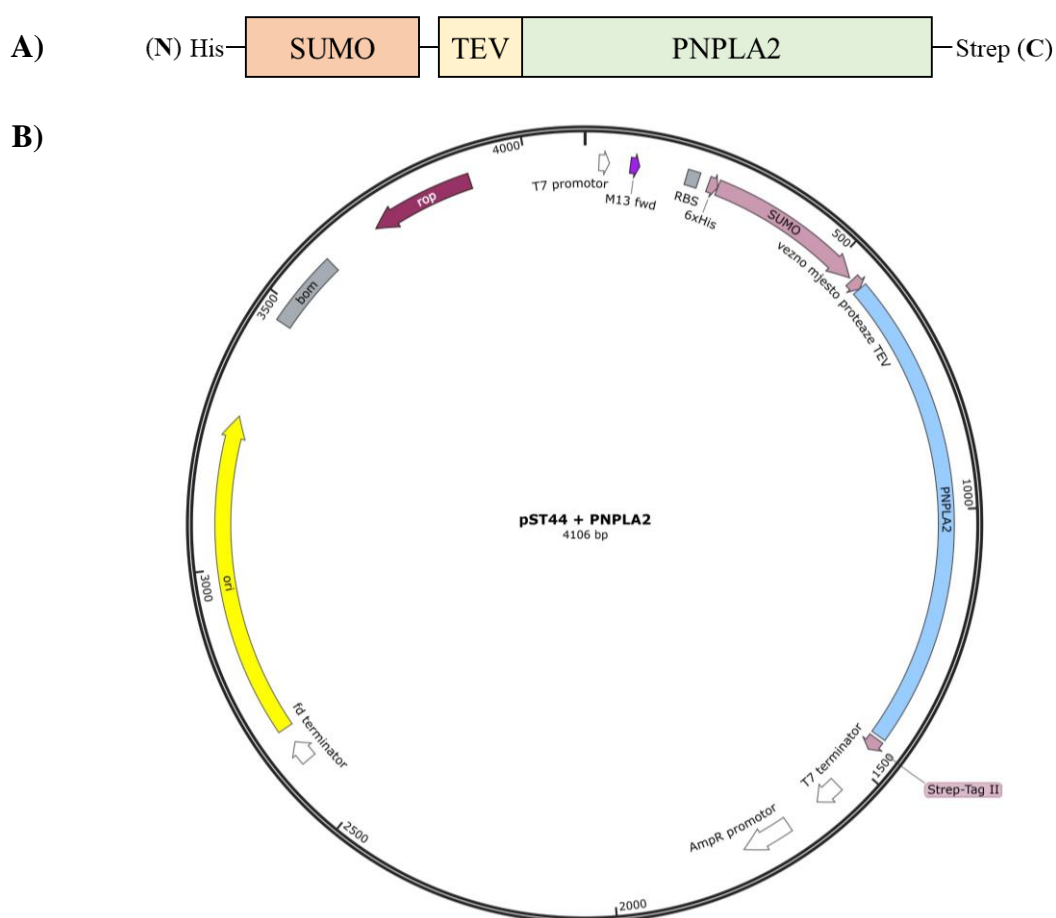
Kao ekspresijski vektor za -TM PNPLA7, odabran je pET-21a(+) koji sadrži promotorsku regiju za T7 RNA polimerazu iz T7 bakteriofaga koja je pod kontrolom *lac* operona i gen za ampicilinsku rezistenciju. Za kloniranje -TM PNPLA7, dizajnirane su početnice koje nalježu na nukleotidni slijed PNPLA7 od 175. nukleotida pri čemu su u početnice uvedena mjesta prepoznavanja restrikcijskih endonukleaza *HindIII* i *NdeI*. Nukleotidni slijed -TM PNPLA7 prekloniran je iz vektora pJET1.2 u ekspresijski vektor pET-21a(+) u orijentaciji u kojoj će histidinski privjesak (His₆) biti na C-terminalnom kraju aminokiselinskog slijeda, a na **slici 9** prikazana je mapa ekspresijskog vektora pET-21a(+) s nukleotidnim slijedom -TM PNPLA7. Kloniranje -TM PNPLA7 u ekspresijski vektor pET-21a(+), transformaciju bakterijskog soja *E. coli* DH5α navedenim vektorom, izolaciju plazmidne DNA, pripremu uzoraka za sekvenciranje i analizu nukleotidnog slijeda dobivenog sekvenciranjem proveo je dr. sc. Jovica Lončar u Laboratoriju za molekularnu ekotoksikologiju, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska. Potvrda uklonirane sekvence provedena je tzv. metodom *primer walking* koju je provela tvrtka *Macrogen Ltd* (Seoul, Južna Koreja).



Slika 9. Mapa ekspresijskog vektora pET21a(+) s prikazom pozicije slijeda nukleotida PNPLA7 koji ne sadrži transmembransku domenu (-TM PNPLA7).

3.2.4. Kloniranje PAT, AB-PAT, CNB 2-3 PNPLA7

Kao ekspresijski vektor za PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7, odabran je pST44 koji je prethodno korišten za uspješnu prekomjernu ekspresiju patatinske domene mišjeg proteina PNPLA2^{168,169} u laboratoriju prof. dr. sc. Monike Oberer (Institut za molekularne bioznanosti, Sveučilište u Grazu, Austrija). Osim nukleotidnog slijeda patatinske domene mišjeg proteina PNPLA2, ekspresijski vektor pST44 sadrži nukleotidni slijed za His₆, protein SUMO koji poboljšava topljivost i pravilno smatanje proteina, TEV privjesak koji sadrži mjesto cijepanja enterokinaze i streptavidinski privjesak (Strep).^{168,169} Kao i pET-21a(+), ekspresijski vektor pST44 sadrži promotorsku regiju za T7 RNA polimerazu iz T7 bakteriofaga koja je pod kontrolom *lac* operona i gen za ampicilinsku rezistenciju.^{168,169} Na **slici 10** prikazana je mapa ekspresijskog vektora pST44 s navedenim privjescima i pozicijom nukleotidnog slijeda patatinske domene mišjeg proteina PNPLA2.



Slika 10. **A)** Shematski prikaz konstrukta mišjeg proteina PNPLA2 (PNPLA2) koji sadrži histidinski privjesak (His_6) na N-terminalnom kraju (N), SUMO protein za poboljšanje topljivosti i smatanja proteina, vezno mjesto za enterokinazu TEV (TEV) i streptavidinski privjesak (Strep) na C-terminalnom kraju (C). **B)** Mapa vektora pST44 s pozicijom nukleotidnog slijeda patatinske domene mišjeg proteina PNPLA2 umjesto kojeg su uklonirani skraćeni konstrukti PNPLA7.^{168,169}

Nukleotidni slijedovi navedenih konstrukata PNPLA7, preklonirani su iz ekspresijskog vektora pET-21a(+) koji sadrži slijed nukleotida -TM PNPLA7 u ekspresijski vektor pST44 tzv. metodom *Gibson assembly*. *Gibson assembly* je inovativna metoda kloniranja pomoću koje je moguće spojiti nekoliko fragmenata DNA, a provodi se u izotermnim uvjetima.^{170,171} Ova metoda kloniranja temelji se na aktivnosti tri enzima: 1) 5' egzonukleazi koja cijepa linearnu ili cirkularnu dvolančanu DNA molekulu u smjeru 5' prema 3' generirajući ljepljive komplementarne krajeve DNA, 2) DNA polimerazi koja sintetizira komplementarne krajeve DNA molekula i 3) DNA ligazi koja kovalentno povezuje fragmente DNA.^{170,171} U tu svrhu, dizajnirane su specifične početnice za umnažanje navedenih konstrukata koji imaju preklapajuće krajeve sa ekspresijskim vektorom pST44. Početnice su dizajnirane pomoću kompjuterski dostupnog alata NEBuilder[®] assembly tool (verzija 2.10.2)¹⁷² i prikazane su u **tablici 6**.

Početnice su otopljene u sterilnoj vodi koja ne sadrži nukleazu, u konačnoj koncentraciji 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, pa inkubirane na termobloku (5 min, 56 °C).

Tablica 6. Nukleotidni slijedovi početnica korištenih u reakciji PCR i kloniranju metodom *Gibson assembly* te pripadajuće temperature sljepljivanja početnica (T_a). F - *forward primer*, R - *reverse primer*.

	Nukleotidni slijed početnica u smjeru 5' → 3'	$T_a/^\circ\text{C}$
pST44 + PNPLA2	F: AGCGCTTGGAGCCACCCG	71,2
	R: GCCCTGAAAATACAGGTTTTCTCCGC	71,2
PAT PNPLA7	F: AAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATTGCCCTGGTGCTTG	66,8
	R: TGC GGGTGGCTCCAAGCGCTGTCGCGGAGCATCTTCTC	66,8
AB-PAT PNPLA7	F: AAAACCTGTATTTTCAGGGCGTCAACCTGTCCACGGTG	66,8
	R: TGC GGGTGGCTCCAAGCGCTGTCGCGGAGCATCTTCTC	66,8
CNB 2-3 PNPLA7	F: AAAACCTGTATTTTCAGGGCGATGAGACCCTGGCCAGC	69,3
	R: TGC GGGTGGCTCCAAGCGCTCACAGGTCCTGCTGGAG	69,3

3.2.5. Umnažanje ekspresijskog vektora pST44 i AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7 lančanom reakcijom polimerazom (PCR, engl. polimerase chain reaction)

U prvom koraku, umnožen je ekspresijski vektor pST44 i odabrani konstrukti metodom PCR koristeći *Q5 Site-Directed Mutagenesis kit* prema uputama proizvođača.¹⁷³ Za umnažanje jednog uzorka DNA, reakcijska smjesa sadržavala je sljedeće komponente komercijalnog kompleta: 12,5 μL *Q5 Hot Start High Fidelity 2X master mix*, 1,25 μL *forward* početnice koncentracije 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, 1,25 μL *reverse* početnice koncentracije 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, 1 μL DNA (pST44 vektor, konstrukti PNPLA7) koncentracije 1-25 ng mm^{-3} i 9 μL sterilne vode koja ne sadrži nukleazu. PCR je proveden na uređaju *Master Cycler X40* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) prema programu koji je prikazan u **tablici 7**. Uspješnost provedene reakcije PCR provjereno je agaroznom elektroforezom na gelu.

Tablica 7. PCR program za umnažanje pST44 vektora i skraćenih konstrukata PNPLA7: PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7. *Temperatura ovisi o temperaturi sljepljivanja odgovarajućih početnica (**tablica 6**).

	Temperatura/ $^\circ\text{C}$	Vrijeme
1. Početna denaturacija	98	30 s
2. 25 ciklusa	98	10 s
	50-72*	30 s
	72	30 s
3. Završno produljenje	72	2 min

3.2.6. Gibson assembly

U sljedećem koraku, proveden je *Gibson assembly* koristeći *NEBuilder® HiFi DNA Assembly kit* prema uputama proizvođača.¹⁷⁴ Reakcijska smjesa sadržavala je sljedeće komponente: 10 μL *Gibson Assembly Master Mix (2X)*, 5,25 ili 5,5 μL sterilne vode koja ne sadrži nukleazu, 1,5 ili 1,75 μL konstrukta PNPLA7 i 3 μL ekspresijskog vektora pST44. Metoda *Gibson assembly* je provedena na termobloku (15 min, 50 °C). Uspješnost kloniranja potvrđena je agaroznom elektroforezom na gelu (opis u nastavku).

3.2.7. Agarozna elektroforeza na gelu

Agarozna elektroforeza na gelu je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje fragmenata DNA duljine od 100 parova baza (pb) do 200 kb, a temelji se na činjenici da je omjer mase i naboja jednak za sve nukleotide.¹⁷⁵ Agarozna je linearni polimer D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze, a agarozni gel ima ulogu molekuskog sita pri čemu veće molekule sporije putuju kroz gel.¹⁷⁵

Agarozna elektroforeza na gelu provedena je koristeći 1 %-tni agarozni gel koji je pripremljen na način dodano 40 mL pufera TAE (sastava: 40 mmol dm^{-3} Tris, 20 mmol dm^{-3} octena kiselina, 1 mmol dm^{-3} EDTA, destilirana voda) i 0,4 g agaroze, a smjesa je zagrijana u mikrovalnoj pećnici (*Somogyi Elektronik Kft.*, Győr, Mađarska) dok se otopina nije razbistrila. Zatim, u bistru otopinu je dodano 4 μL boje SYBR nakon čega je otopina prelivena je u postolje *Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, Hercules, SAD)*, i ostavljeno je da gel polimerizira 40 min. Uzorci su pripremljeni u plastičnoj mikroepreveti u koju je dodano 6 μL produkta reakcije PCR, 4 μL sterilne vode koja ne sadrži nukleazu i 2 μL boje *Purple 6X loading dye*, a na agarozni gel nanoseno je 12 μL tako pripremljenih uzoraka. Agarozna elektroforeza provedena je 30 min pri konstantnom naponu od 80 V uz sustav za napajanje *PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, Hercules, SAD)*.

3.2.8. Transformacija kompetentnih bakterija *E.coli DH5 α*

Kompetentne bakterijske stanice *E. coli DH5 α* transformirane su ekspresijskim vektorom pET-21a(+) koji sadrži nukleotidni slijed -TM PNPLA7 ili ekspresijskim vektorom pST44 koji sadrži nukleotidni slijed PAT, AB-PAT ili CNB 2-3 PNPLA7 tzv. metodom *heat shock*.¹⁷⁶ Uzorak bakterijskih stanica i ekspresijskih vektora držani su na ledu 5 minuta, nakon čega je dodano 1 μL ekspresijskog vektora u 25 μL bakterijskih stanica, a dobivena smjesa inkubirana je na termobloku (45 s, 42 °C). Transformirane bakterijske stanice držane su na ledu 2 min,

nakon čega je dodano 400 μL medija SOC *outgrowth*, a dobivena smjesa je inkubirana na termobloku uz konstantno miješanje pri 650 rpm (1 h, 37 °C). Naposljetku, 100 μL suspenzije transformiranih bakterijskih stanica naneseo je na agaroznu pločicu koja sadrži antibiotik ampicilin, a samo kolonije koje su uspješno transfecirane plazmidom će rasti na podlozi. Agarozna pločica postavljena je u inkubator preko noći na 37 °C. Sljedeći dan, pripremljena je bakterijska pretkultura u plastičnoj epruveti ukupnog volumena od 50 mL. U epruvetu je dodano 10 mL sterilnog LB medija, 10 μL antibiotika ampicilina konačne koncentracije 50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i jedna bakterijska kolonija, izrasla na agaroznoj podlozi, dodana vrhom sterilnog plastičnog nastavka za pipetu. Bakterijska kultura postavljena je u inkubator pri 37 °C uz konstantno miješanje pri 230 rpm preko noći.

3.2.9. Izolacija plazmidne DNA i sekvenciranje

Sljedeći dan, bakterijska pretkultura je centrifugirana (15 min, 4000 rpm). Supernatant je uklonjen, a iz taloga bakterijske kulture izolirana je plazmidna DNA koristeći *Plasmid MiniPrep Kit* prema uputama proizvođača uz manje preinake.¹⁷⁷ Ukratko, talog bakterijskih stanica resuspendiran je u 200 μL pufera *Plasmid Resuspension Buffer B1*, pa je prebačen u čistu plastičnu mikroeprovetu. Zatim, dodano je 200 μL pufera *Plasmid Lysis Buffer B2*, a dobivena suspenzija resuspendirana je okretanjem plastične mikroeprove 5-6 puta pa je ostavljena na sobnoj temperaturi (22-24 °C) 1 min. U dobivenu smjesu, dodano je 400 μL pufera *Plasmid Neutralization Buffer*, suspenzija je resuspendirana nježnim okretanjem plastične mikroeprove sve dok suspenzija nije poprimila žutu boju nakon čega je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi (22-24 °C) i naposljetku centrifugirana (15 min, 13300 rpm). Supernatant je prebačen u kolonicu za pročišćavanje iz kompleta i centrifugiran (1 min, 13000 rpm), a talog je bačen. Filtrat dobiven centrifugiranjem supernatanta je uklonjen, a kolonica je ponovno centrifugirana (1 min, 13000 rpm). Zatim, na kolonicu je dodano 200 μL pufera *Plasmid Wash Buffer I* i centrifugirano (1 min, 13300 rpm). Filtrat je uklonjen i na kolonicu je dodano 400 μL pufera *Plasmid Wash Buffer II* i centrifugirano (1 min, 13300 rpm). U sljedećem koraku, kolonica je prebačena u plastičnu mikroeprovetu, a plazmidna DNA izolirana je dodatkom 30 μL sterilne vode bez nukleaze prethodno zagrijane na 95 °C. Kolonica je ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi (22-24 °C) nakon čega je centrifugirana (1 min, 13300 rpm) pri čemu se u filtratu nalazi izolirana plazmidna DNA.

U sljedećem koraku, izmjerena je koncentracija plazmidne DNA na spektrofotometru *NanoDrop ND-1000* (*Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen, Njemačka). Kao negativna

kontrola korišten je 1,5 μL sterilne vode bez nukleaze, a nakon toga je nanoseno po 1,5 μL uzoraka. Uzorcima je određena koncentracija i čistoća iz omjera apsorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} .

Naposljetku, pripremljeni su uzorci za sekvenciranje pri čemu je ukupni volumen uzorka iznosio 12 μL , a konačna koncentracija 100 ng dm^{-3} . Početnice korištene u sekvenciranju su prikazane u **tablici 8**. Plazmidna DNA sekvencirana je metodom *Sanger* sekvenciranja koju je provela tvrtka *Microsynth* (Balgach, Švicarska). Rezultati sekvenciranja su analizirani i potvrđeni u programu SnapGene Viewer i alatima BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*)¹⁷⁸, EMBOSS Needle PSA (PSA, engl. *Pairwise Sequence Alignment*)¹⁷⁹ i Expsy Translate tool¹⁸⁰.

Tablica 8. Nukleotidni sljedovi početnica korištenih u *Sanger* sekvenciranju kojeg je provela tvrtka *Microsynth* (Balgach, Švicarska). *Nazivi PNPLA1-PNPLA4 odnose se samo na imenovanje početnica za sekvenciranje.

Početnice	Nukleotidni slijed početnica u smjeru 5' → 3'
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
PNPLA7 1	GCCTTCCATTCGCAA
PNPLA7 2	GAAGGATGATGGGAAG
PNPLA7 3	GCACTCAGACTTCTC
PNPLA7 4	CATCCTCGACATCATCAC

3.2.10. Prekomjerna ekspresija skraćenih konstrukata PNPLA7

Kompetentne bakterijske stanice *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus transformirane su ekspresijskim vektorom pET-21a(+) koji sadrži slijed nukleotida -TM PNPLA7 ili ekspresijskim vektorom pST44 koji sadrži slijed nukleotida PAT, AB-PAT ili CNB 2-3 PNPLA7 metodom *heat shock* na prethodno opisan način (odjeljak 3.2.8.). Bakterijske kolonije uzgojene su na agaroznim pločicama koje su sadržavale antibiotike ampicilin i kloramfenikol, u inkubatoru preko noći pri 37 °C.

Sljedeći dan, pripremljena je bakterijska pretkultura u epruveti ukupnog volumena od 50 mL. U epruvetu dodano je 20 mL LB medija, 20 μL ampicilina (konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3}), 20 μL kloramfenikola (konačne koncentracije 0,1 mmol dm^{-3}) i jedna bakterijska kolonija s agarozne pločice, koja je zahvaćena vrhom sterilnog plastičnog nastavka za pipete.

Bakterijska pretkultura uzgojena je pri temperaturi od 37 °C uz konstantno miješanje pri 230 rpm u inkubatoru preko noći.

Nadalje, u staklenu tikvicu ukupnog volumena od 2 L, dodano je 500 mL LB medija, 500 µL ampicilina (konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³), 500 µL kloramfenikola (konačne koncentracije 0,1 mmol dm⁻³) i 5 mL baterijske pretkulture. Bakterijska kultura u tikvici uzgajana je dalje u inkubatoru pri temperaturi od 37 °C uz konstantno miješanje na tresilici (205-250 rpm) sve dok vrijednost optičke gustoće uzorka (OD) nije iznosila 0,6. Vrijednost OD=0,6 označava da su bakterijske stanice u srednjem dijelu logaritamske faze rasta, a tada se dioba stanica odvija konstantnom brzinom i njihov broj se udvostručuje.¹⁸¹ Mjerenje OD provedeno je na uređaju *NanoColor 500 D* (*Macherey-Nagel*, Düren, Njemačka) pri valnoj duljini od 600 nm, a kao negativna kontrola korišten je LB medij bez dodatka bakterijske pretkulture. Kada je vrijednost OD dostigla 0,6, odvojen je 1 mL bakterijske kulture (NI, neinducirana bakterijska kultura) i centrifugiran (10 min, 13300 rpm). Po završetku centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a talog resuspendiran u 900 µL Laemmlijevo pufera (sastava: 6,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH=6,8), 2 % natrijev dodecilsulfat, 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v) 2-merkptoetanol, 0,002 % brom fenol plavo, destilirana voda). Zatim, uzorak je zagrijan 10 min pri temperaturi od 95 °C i pohranjen na temperaturi –20 °C do analize metodom SDS-PAGE.

Zatim, u tikvicu s bakterijskom kulturom je dodano 500 µL IPTG-a kako bi se potaknula prekomjerna ekspresija konstrukata PNPLA7, pri čemu je konačna koncentracija IPTG-a u bakterijskoj kulturi iznosila 0,5 mmol dm⁻³ ili 1 mmol dm⁻³. Prekomjerna ekspresija provedena je u trajanju od 4 h ili 6 h pri temperaturi od 37 °C ili preko noći pri temperaturi od 18 °C uz konstantno miješanje u inkubatoru. Po završetku prekomjerne ekspresije konstrukata PNPLA7, ponovno je izmjerena vrijednost OD kako bi se odvojio uzorak bakterijske kulture (IND, inducirana bakterijska kultura) jednake koncentracije proteina za daljnju analizu metodom SDS-PAGE. Uzorci IND pripremljeni su na isti način kao i uzorci NI, a uspješnost indukcije prekomjerne ekspresije analizirana je metodom SDS-PAGE (opisano u nastavku).

3.2.11. Priprema lizata bakterijskih stanica

Inducirana bakterijska kultura prenesena je u plastične boce i centrifugirana 30 min uz konstantnu brzinu 6000 rpm, pri 4 °C, nakon čega je supernatant uklonjen, a talog je resuspendiran u 25 mL pufera za lizu stanica. Pufer za lizu bakterijskih stanica korištenih za prekomjernu ekspresiju -TM PNPLA7 bio je sljedećeg sastava: 100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄

(pH=7,5), 100 mmol dm⁻³ KCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ TCEP, 0,01 % (v/v) NP-40, 30 mmol dm⁻³ imidazol, destilirana voda. Pufer za lizu bakterijskih stanica korištenih za prekomjernu ekspresiju PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7 bio je sljedećeg sastava: 100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,0 za CNB 2-3 PNPLA7, pH=7,5 za PAT i AB-PAT PNPLA7), 300 mmol dm⁻³ NaCl, 0,01 % (v/v) NP-40, destilirana voda. Lizati bakterijskih stanica homogenizirani su uređajem *T18 digital ULTRA TORRAX* (IKA-Werke, Staufen, Njemačka), pa sonificirani 30 minuta uz ciklus - 0,5 i amplitudu - 85 %, i naposljetku centrifugirani (25000 rpm, 4 °C, 30 min). Nakon centrifugiranja, talog je bačen, a supernatant propušten kroz tzv. *syringe*-filter veličine pora 0,45 μm, smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80 °C do pročišćavanja.

3.2.12. Pročišćavanje u nativnim uvjetima

Svi konstrukti PNPLA7 korišteni u provedenom istraživanju sadržavali su privjesak His₆, a pročišćavanje je provedeno afinitetnom kromatografijom koristeći gravitacijske kolone na koje je imobiliziran metalni ion Ni²⁺. Navedena metoda se temelji na interakciji imidazolnih prstenova susjednih histidinskih bočnih ogranaka u histidinskom privjesku proteina s dva slobodna koordinacijska mjesta iona Ni²⁺, dok ostala četiri koordinacijska mjesta zauzima nitrilotriocetna kiselina (NTA).¹⁷⁹ Postepenim povećavanjem koncentracije imidazola dolazi do ispiranja proteina koji su se nespecifično vezali za smolu, dok se željeni protein konačno eluira dodatkom visoke koncentracije imidazola.¹⁸² Svaki konstrukt pročišćen je na zasebnoj koloni u hladnoj komori pri 4 °C. Puferi za lizu stanica, ispiranje i eluciju proteina pripremljeni su netom prije pročišćavanja i profiltrirani vakuum pumpom.

Pročišćavanje -TM PNPLA7 provedeno je na kromatografskoj koloni volumena (CV, engl. *Column Volume*) 10 mL. Na kolonu je nanoseno 10 mL smole koja je aktivirana dodatkom 50 mL 70 % (v/v) etanola, a na kraju je dodano 5 mL NiSO₄ koncentracije 0,1 mmol dm⁻³ i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi (22-24 °C). Zatim, kolona je isprana dva puta s 50 mL redestilirane vode i 50 mL pufera za lizu stanica (PL). Sve frakcije propuštene kroz kolonu skupljene su u plastične epruvete volumena 50 mL i imenovane FT (engl. *Flow-Through*). Pročišćavanje svih konstrukata PNPLA7 provedeno je u hladnoj komori pri 4 °C.

Nakon pripreme kolone opisanim postupkom, nanoseno je 25 mL supernatanta lizata bakterijskih stanica koji je ostavljen 30 min pa propušten (SN FT). U idućem koraku, dodano je 50 mL pufera za ispiranje 1 (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,5), 100 mmol dm⁻³ KCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ TCEP, 30 mmol dm⁻³ imidazol, destilirana voda) i skupljeno (PI 1),

pa 50 mL pufera za ispiranje 2 (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,5), 100 mmol dm⁻³ KCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ TCEP, destilirana voda) i skupljeno (PI 2). Na kraju je dodano 15 mL pufera za eluciju (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,5), 100 mmol dm⁻³ KCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ TCEP, 250 mmol dm⁻³ imidazol, destilirana voda) i skupljeno (PE). Sve frakcije analizirane su metodom SDS-PAGE.

Pročišćavanje PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7 provedeno je na kromatografskoj koloni volumena (CV) 2 mL. Na kolonu je nanoseno 2 mL smole koja je aktivirana dodatkom 10 mL 70 % (v/v) etanola, a na kraju je dodan 1 mL NiSO₄ koncentracije 0,1 mol dm⁻³ i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi (22-24 °C). Zatim, kolona je isprana dva puta sa 10 mL redestilirane vode i jednom s 10 mL pufera za lizu stanica (PL). Sve frakcije propuštene kroz kolonu skupljene su u plastične epruvete volumena 50 mL i imenovane FT.

Nakon pripreme kolone opisanim postupkom, nanoseno je 6 mL supernatanta lizata bakterijskih stanica koji je ostavljen 30 min pa propušten (SN FT). U idućem koraku dodano je 10 mL pufera za ispiranje 1 (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,0 ili 7,5), 300 mmol dm⁻³ NaCl, 0,01 % (v/v) NP-40, destilirana voda) i skupljeno (PI 1), pa 10 mL pufera za ispiranje 2 (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,0 ili 7,5), 300 mmol dm⁻³ NaCl, 30 mmol dm⁻³ imidazol, destilirana voda) i skupljeno (PI 2). Zatim, dodano je 3 mL pufera za eluciju (100 mmol dm⁻³ K_yH_xPO₄ (pH=7,0 ili 7,5), 300 mmol dm⁻³ NaCl, 200 mmol dm⁻³ imidazol, destilirana voda) i skupljeno (PE), pa 3 mL imidazola koncentracije 5 mol dm⁻³ i skupljeno (IM). Sve frakcije analizirane su metodom SDS-PAGE.

3.2.13. Pročišćavanje u denaturirajućim uvjetima

Pročišćavanje -TM PNPLA7 u denaturirajućim uvjetima provedeno je na istoj kromatografskoj koloni prema istom protokolu koristeći pufere istog sastava, kao i u nativnim uvjetima (odjeljak 3.2.12.). Međutim, kao uzorak proteina, korištena je frakcija SN FT dobivena pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom u nativnim uvjetima u koju je dodana ureja konačne koncentracije 6 mol dm⁻³. Sve frakcije su analizirane metodom SDS-PAGE.

3.2.14. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Uzorci frakcija su resuspendirani u Laemmlijevom puferu (6,5 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH=6,8), 2 % natrijev dodecilsulfat, 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v) 2-merkaptetanol, 0,002 % brom fenol plavo, destilirana voda) u omjeru 1:1, inkubirani na termobloku (10 min, 95 °C), pa vorteksirani i centrifugirani 1 min. SDS-PAGE je provedena na 12 %-tnom tris-glicinskom

SDS-poliakrilamidnom gelu debljine 1,0 mm s 15 jažica koji je prethodno pripremljen standardnim postupkom u laboratoriju prof. dr. sc. Monike Oberer (Graz, Austrija). Gel je postavljen u sustav za elektroforezu *Mini-PROTEAN[®] Tetra* (Bio-Rad, Hercules, SAD) nakon čega je na gel je naneseo 3 μL markera molekulske mase *Pierce[™] Unstained Protein MW Marker* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD) i 10 μL svakog uzoraka. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (20 mmol dm^{-3} glicin, 0,25 mol dm^{-3} Tris baza, 35 mmol dm^{-3} SDS, destilirana voda) uz konstantni napon 210 V u trajanju od 75 min i sustav za napajanje *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, SAD). Za vizualizaciju proteinskih vrpca, gel je umočen u boju *ReadyBlue Protein Gel Stain*, zagrijan u mikrovalnoj pećnici (*Somogyi Elektronik Kft.*, Győr, Mađarska) 1 min i ostavljen na sobnoj temperaturi (22-24 °C) na orbitalnoj tresilici 1 h.

3.2.15. Western analiza

Za Western analizu, uzorci su pripremljeni na prethodno opisan način (odijeljak 3.2.14.), kao i za SDS-PAGE. Međutim, korišten je drugačiji marker, točnije marker molekulaskih masa *Blue Prestained protein standard broad range* (New England Biolabs, Ipswich, SAD), a SDS-PAGE je provedena pri 140 V, u trajanju 1 h i 30 min uz sustav za napajanje *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, SAD). Prije završetka elektroforeze, pripremljene su PVDF membrane promjera pora 0,45 μm i aktivirane u 100 % (v/v) metanolu 10 min. Po završetku elektroforeze, pripremljen je tzv. "transfer-sendvič" pri čemu su na dno, tj. na crni dio kazete postavljene dvije spužve, pa dva filter papira na koji je položen gel. Na gel je postavljena aktivirana membrana na koju su položena dva filter papira, pa dvije spužvice. Tako složeni "transfer-sendvič" postavljen je u *Mini Trans-Blot[®] Cell* kadicu (Bio-Rad, Hercules, SAD) pri čemu je gel okrenut prema anodi, a membrana prema katodi. Prijenos je proveden u transfer puferu sastava: 10 mmol dm^{-3} CAPS (pH=11,0), 10 % (v/v) metanol, destilirana voda, pri konstantnoj jakosti struje 210 mA u trajanju od 1 h i 30 min uz sustav za napajanje *PowerPac[™] Basic Power Supply* (Bio-Rad, Hercules, SAD).

U sljedećem koraku, radi sprječavanja nespecifičnih interakcija protutijela, membrane su inkubirane u puferu za blokiranje nespecifičnih interakcija 2 h na orbitalnoj miješalici na sobnoj temperaturi (22-24 °C). Pufer za blokiranje nespecifičnih interakcija je pripremljen na način da je 1,5 g BSA otopljeno u 50 mL pufera TBS (sastava: 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl (pH=7,4), 150 mmol dm^{-3} NaCl, destilirana voda) pri čemu je konačni udio BSA iznosio 3 %.

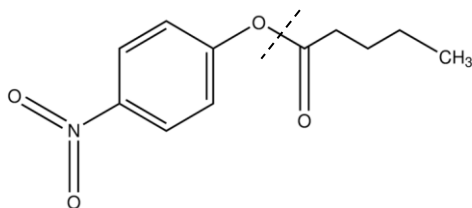
Zatim, membrane su isprane dva puta po 10 min u puferu TBS, pa inkubirane u otopini primarnog protutijela prema histidinskom privjesku (anti-penta-His protutijelo) preko noći na orbitalnoj miješalici pri 4 °C. Otopina za pripremu primarnog protutijela pripravljena je na način da je 1,2 g BSA otopljeno u 40 mL pufera TBS (pri čemu je konačni udio BSA iznosio 3 %), nakon čega je primarno protutijelo razrijeđeno u omjeru 1:10000 u navedenoj otopini.

Sljedeći dan, membrana je isprana dva puta po 10 min u puferu TBS, pa inkubirana u otopini sekundarnog protutijela konjugiranog s peroksidazom iz hrena na orbitalnoj miješalici u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi (22-24 °C). Pufer za pripremu sekundarnog protutijela je pripremljen na način da je 2 g mlijeka u prahu bez masti otopljeno u 40 mL pufera TBST (sastava: 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH=7,4), 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,02 % (v/v) Triton X-100, destilirana voda), a sekundarno protutijelo je razrijeđeno u omjeru 1:5000 u navedenom puferu.

Po završetku inkubacije u sekundarnom protutijelu, membrane su isprane dva puta po 10 min u puferu TBS. Na kraju, membrane su inkubirane 1 min u otopini ECL reagensa koja je dobivena miješanjem otopina peroksida i luminola u volumnom omjeru 1:1. Kemiluminiscencija histidinskim privjeskom obilježenih proteina vizualizirana je na uređaju *ChemiDocTM MP Imaging System* u programu Image Lab Touch Software (*Bio-Rad*, Hercules, SAD)

3.2.16. Mjerenje enzimске aktivnosti u lizatima bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7

Prije početka mjerenja aktivnosti, svim uzorcima izmjerena je koncentracija proteina koristeći *Pierce BCA Protein Assay kit* prema uputama proizvođača (opisano u odjeljku 3.1.4.). Metoda mjerenja aktivnosti enzima preuzeta je iz literature u kojoj je kao supstrat korišten ester *p*-nitrofenil valerata čija je struktura prikazana na **slici 11**.⁷ U mjerenju enzimске aktivnosti, esteraze kataliziraju hidrolizu esterske veze (označeno iscrtkanom linijom), što rezultira oslobađanjem *p*-nitrofenola, produkta koji daje žuto obojenje otopini.



Slika 11. Struktura estera *p*-nitrofenil valerata, supstrata korištenog za mjerenje esterazne aktivnosti konstrukata PNPLA7. Iscrtkanom linijom je označena esterska veza čiju hidrolizu kataliziraju esteraze.

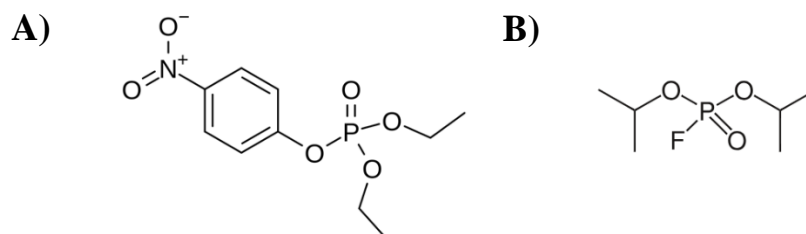
Mjerenje enzimске aktivnosti provedeno je u plastičnim kivetama optičkog puta od 1 cm, a ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 1 mL. Reakcijska smjesa pripravljena je u natrij fosfatnom puferu (pripremljen miješanjem vodenih otopina Na_2HPO_4 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i NaH_2PO_4 koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i $\text{pH}=7,4$. Izvorna otopina *p*-nitrofenil valerata koncentracije 6 mmol dm^{-3} , pripravljena je u navedenom natrij fosfatnom puferu. Volumen uzoraka lizata u reakcijskoj smjesi iznosio je $100 \mu\text{L}$, a reakcija je započeta dodatkom supstrata volumena $130 \mu\text{L}$ (konačna koncentracija supstrata 1 mmol dm^{-3}). Mjerenje je provedeno u trajanju od 10 ili 30 minuta pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i valnoj duljini od 405 nm na spektrofotometru *CARY 300 UV-Visible* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, SAD). Nagib pravca promjene apsorbancije u vremenu proporcionalan je enzimskoj aktivnosti (Beer-Lambert zakon) u linearnom dijelu krivulje ovisnosti apsorbancije o vremenu. Stoga, enzimska aktivnost AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7 je izražena kao dA min^{-1} . Budući da CNB 2-3 PNPLA7 ne sadrži aktivno mjesto, navedeni uzorak je korišten kao negativna kontrola. Konačna vrijednost dA min^{-1} AB-PAT i PAT izračunata je oduzimanjem vrijednosti dA min^{-1} CNB 2-3 PNPLA7 od eksperimentalno dobivene vrijednosti dA min^{-1} za AB-PAT i PAT PNPLA7 prema sljedećoj jednačini:

$$\text{dA min}^{-1}(\text{AB-PAT, PAT}) = \text{dA min}^{-1}(\text{AB-PAT, PAT eksperimentalno}) - \text{dA min}^{-1}(\text{CNB 2 - 3})$$

3.2.17. Inhibicija lizata bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale PAT, AB-PAT i CNB 2-3 PNPLA7

Lizati bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale PAT, AB-PAT i CNB 2-3 inkubirani su OP spojevima, tj. paraoksonom i DFP-om čija struktura je prikazana na **sluci 12**. Izvorna otopina oba pesticida, koncentracije $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$, pripravljena je u 96 % (v/v) etanolu. Mjerenje enzimске aktivnosti, provedeno je na prozirnim mikrotitarskim pločicama ravnog dna s 96 jažica pri čemu je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio $300 \mu\text{L}$, a reakcijska smjesa pripravljena je u natrij fosfatnom puferu (priprema opisana u odjeljku 3.2.16.) koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ i $\text{pH}=7,4$. U prvom koraku, u jažicu mikrotitarske pločice, nanoseno je $30 \mu\text{L}$ uzorka navedenih lizata bakterijskih stanica, $15 \mu\text{L}$ paraoksone ili DFP-a konačne koncentracije $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, te $105 \mu\text{L}$ pufera, u duplikatu. Također, u zasebne jažice nanoseno je $0,15 \mu\text{L}$ 96 % (v/v) etanola kao kontrola djelovanja otapala. Nadalje, kao kontrola su korišteni i lizati bakterijskih stanica koji nisu inkubirani OP spojevima (volumen OP spoja

nadomješten je natrij fosfatnim puferom) niti etanolom. Zatim, reakcijska smjesa je inkubirana na termobloku pri 37 °C u trajanju od 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h ili 6 h.



Slika 12. Struktura organofosforinih spojeva: A) paraoksiona i B) DFP-a, korištenih u inhibiciji esterazne aktivnosti lizata bakterijskih stanica.

Po završetku vremena inkubacije, u jažice je dodano 150 μL supstrata *p*-nitrofenil valerata konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3} , čime je započeta reakcija i provedeno je mjerenje enzimske aktivnosti u trajanju od 10 min pri valnoj duljini od 405 nm na čitaču mikrotitarskih pločica *SpectraMax® iD3* (*Molecular Devices Ltd*, Winersh, Ujedinjeno Kraljevstvo). Izvorna otopina estera *p*-nitrofenil valerata, koncentracije 2 mmol dm^{-3} pripremljena je u natrij fosfatnom puferu. Enzimska aktivnost izražena je kao nagib pravca promjene apsorbancije u vremenu (dA min^{-1}). dA min^{-1} AB-PAT i PAT PNPLA7 izračunata je prema jednadžbi navedenoj u odjeljku 3.2.16.

% aktivnosti izražen je kao omjer:

$$\% \text{ aktivnosti} = \frac{\text{dA min}^{-1} (\text{inkubacija s OP spojem})}{\text{dA min}^{-1} (\text{inkubacija bez OP spoja})} \times 100$$

3.2.18. Predviđanje 3D strukture proteina

Za predviđanje vrijednosti izoelektrične točke (pI) patatinske domene, AB-patatinske domene i CNB 2-3 PNPLA7, korišteni su sljedeći alati: ProtParam Expasy¹⁸³, alat za predikciju izoelektrične točke bioinformatics.org¹⁸⁴ i prot pi¹⁸⁵.

S obzirom da kristalna struktura PNPLA7 nije riješena, u istraživanju je korištena predviđena 3D struktura PNPLA7 iz sustava AlphaFold2 (*AlphaFold Protein Structure Database*).^{186,187} AlphaFold2 je sustav umjetne inteligencije koji koristi strojno učenje za predviđanje 3D strukture proteina na temelju njihovog aminokiselinskog slijeda.^{186,187} Uz 3D strukturu, AlphaFold2 navodi i parametre mjere pouzdanosti u model 3D strukture proteina:

pLDDT (engl. *predicted Local Distance Difference Test*) i PAE (engl. *Predicted Aligned Error*).^{186,187} pLDDT je tzv. mjera pouzdanosti u lokalnu strukturu koja procjenjuje u kojoj mjeri bi se pretpostavljena struktura slagala s eksperimentalnom strukturom. Vrijednost pLDDT može biti u rasponu 0-100, pri čemu veća vrijednost pLDDT označava visoku pouzdanost u lokalnu strukturu.^{186,187} Vrijednost PAE je tzv. mjera pouzdanosti sustava AlphaFold2 u relativni položaj dvije aminokiseline u predviđenoj strukturi, pri čemu niska vrijednost između dvije aminokiseline u dvije različite domene označava nisku predviđenu pogrešku, dok visoka vrijednost PAE znači da AlphaFold2 nije "siguran" u njihov relativni položaj.^{186,187} Uz 3D strukturu proteina, AlphaFold2 može predvidjeti i komplekse protein-protein te proteinske komplekse istog ili dva različita proteina. Međutim, AlphaFold2 ne može predvidjeti strukturu nukleinskih kiselina, komplekse proteina i DNA, vezanje liganda ili iona, posttranslacijske modifikacije i membransku os za transmembranske proteine.^{186,187}

Za predviđanje skraćenih kontrukata PNPLA7 s ukloniranim privjescima korišten je ColabFold (*ColabFold v1.5.5: AlphaFold2 using MMseq2*), kompjuterski dostupna inačica sustava AlphaFold2, pri čemu se postupak predviđanja strukture odvija na tzv "oblaku" (engl. *cloud*).¹⁸⁸ U sučelje ColabFold-a, u polje *query_sequence* unesen je željeni aminokiselinski slijed, a u polje *jobname* odabrani naziv aminokiselinskog slijeda (npr. *patatin domain PNPLA7*). U sučelju nisu mijenjani automatski zadani parametri (num_relax: 0, template_mode: none, msa_mode: mmseqs2_uniref_env, pair_mode: unpaired_paired, model_type: none, num_recycles: 3, recycle_early_stop_tolerance: auto, relax_max_iterations: 200, pairing_strategy: greedy, max_msa: auto, num_seeds: 1, dpi: 200).¹⁸⁸ Naposljetku, rezultati su dostupni u obliku *zip* dokumenta koji uključuje 3D strukturu u obliku PDB dokumenta (engl. *Protein Data Bank*), grafove s pLDDT vrijednostima, grafove koji opisuju kvalitetu modela, grafovi koji pokazuju MSA (engl. *Multipple Sequence Alignment*), tj. usporedbu zadanog aminokiselinskog slijeda s aminokiselinskim slijedovima sličnih proteina i ostalo.¹⁸⁸

Za predviđanje struktura domena PNPLA7 korišteni su sustavi ColabFold¹⁸⁸ na prethodno opisani način i PHYRE2 (engl. *Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0*)¹⁸⁹. PHYRE2 je jedan od vrlo često korištenih računalno dostupnih sustava za predviđanje 3D strukture proteina. U sučelje PHYRE2, u polje *Amino Acid Sequence* je unesen željeni aminokiselinski slijed, u polje *Optional Job description* je upisan odabrani naziv aminokiselinskog slijeda, a u polje *Modelling Mode* je odabrana opcija *Normal*. Naposljetku,

rezultati su dostupni u sustavu PHYRE2 koji uključuje 3D strukturu u obliku PDB dokumenta, naziva proteina prema kojemu je predviđena 3D struktura unesenog aminokiselinskog slijeda, pouzdanost u model, usporedba zadanog aminokiselinskog slijeda s aminokiselinskim sljedovima sličnih proteina (PSI-BLAST *Pseudo-Multiple Sequence Alignment*), prikaz sekundarne strukture unesenog aminokiselinskog slijeda i pouzdanost u sekundarnu strukturu.¹⁸⁹ Aminokiselinski sljedovi korišteni za predviđanje strukture sustavima ColabFold i PHYRE2 su prikazani u dodatku (poglavlje 7.2.). Za vizualizaciju struktura korišten je program PyMOL 2.0 (*Schrödinger, Inc. New York, SAD*).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ove doktorske disertacije, istražen je značaj i regulacija lizofosfolipaze PNPLA7 u primarnim stanicama ljudskih skeletnih mišića (mioblastima i miotubulima) i staničnoj liniji HepG2, kao modelima metabolički aktivnoga tkiva. U prvom dijelu istraživanja, pokazano je da utišavanje *PNPLA7* u mioblastima smanjuje razinu ionske pumpe Na^+, K^+ -ATPaze, te mete u signalnim putevima mTOR (engl. *mammalian Target of Rapamycin*) i AMPK (engl. *AMP-activated protein Kinase*), što upućuje na važnost PNPLA7 za normalnu funkciju metabolizma mioblasta, dok istovremeno nije bilo utjecaja na signalni put interleukin-6 (IL-6), odnosno početni korak upalnog procesa. Također, istražen je utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na ekspresiju mRNA i razinu proteina PNPLA7. Rezultati su pokazali da povišene koncentracija glukoze i inzulina smanjuju ekspresiju mRNA i razinu proteina PNPLA7 u oba modela metabolički aktivnoga tkiva, što sugerira da je ovaj protein reguliran ovisno o energetsom statusu stanice i da ima potencijalnu ulogu u metabolizmu energije, anabolizmu i/ili katabolizmu. U drugom dijelu istraživanja, koristeći AlphaFold2 model strukture PNPLA7 kao vodilju, dizajnirane su i prekomjerno eksprimirane patatinska domena, patatinska domena s dodatnom domenom nepoznate funkcije nazvanom AB (AB-patatinska domena), i vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 PNPLA7 u bakterijskim stanicama *Escherichia coli*. S obzirom da u provedenom istraživanju nijedan od navedenih konstrukta nije bio pročišćen do zadovoljavajuće čistoće, mjerenje enzimske aktivnosti provedeno je u lizatima bakterijskih stanicama. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti pokazano su da su patatinska domena i AB-patatinska domena katalitički aktivne pri čemu AB-patatinska domena pokazuje tri puta veću aktivnost u odnosu na patatinsku domenu prema supstratu *p*-nitrofenil valeratu. Također, istražen je utjecaj organofosfornih spojeva, paraoksona i DFP-a, na enzimsku aktivnost patatinske domene i AB-patatinske domene u različitim vremenskim točkama. Rezultati su pokazali da su oba spoja slabi inhibitori patatinske domene, dok DFP progresivno smanjuje enzimsku aktivnost AB-patatinske domene, uz zabilježenu vjerojatnost spontane reaktivacije 6 h nakon početka izloženosti OP spoju.

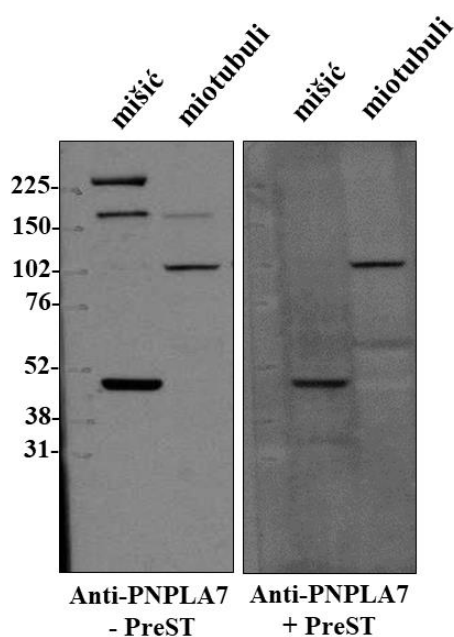
4.1. Regulacija i značaj PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva

Većina dosadašnjih istraživanja o PNPLA7, provedena su na modelu miša ili štakora, a u literaturi ne postoje informacije o važnosti i regulaciji PNPLA7 u ljudskim tkivima.^{7,15,16,141} Prema bazi podataka UniProt (engl. *Universal Protein Resource*), mišji PNPLA7 (oznaka: A2AJ88) postoji u obliku tri izoforme kao rezultat alternativnog izrezivanja (engl. *alternative splicing*) pri čemu je samo jedna izoforma potvrđena kao konsenzusna prema bazi podataka CDSS (engl. *Consensus CDS protein set*), a to je izoforma A2AJ88-1 duljine 4310 nukleotida koja se prevodi u slijed od 1352 aminokiseline (150,5 kDa). Međutim, ljudski PNPLA7 (oznaka: Q6ZV29) postoji u obliku pet izoformi kao rezultat alternativnog izrezivanja, pri čemu su dvije izoforme potvrđene kao konsenzusne prema bazi podataka CDSS. Prva izoforma (oznaka: Q6ZV29-1) je duljine 3954 nukleotida i prevodi se u slijed od 1317 aminokiselina (145,7 kDa), a druga izoforma (oznaka: Q6ZV29-5) je duljine 4029 nukleotida i prevodi se u slijed od 1342 aminokiseline (148,4 kDa), tj. sadrži dodatnih 25 aminokiselina u blizini N-terminalnog kraja, a prije transmembranske domene. U ovoj disertaciji, pomoću alata EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (pristupljeno 18.2.2024.)¹⁷⁹, uspoređeni su nukleotidni i aminokiselinski sljedovi miše i ljudske PNPLA7. Rezultati usporedbe nukleotidnih sljedova pokazali su 78,5 % identičnosti i sličnosti između A2AJ88-1 i Q6ZV29-1 i 80 % identičnosti i sličnosti između A2AJ88-1 i Q6ZV29-5. Rezultati usporedbe aminokiselinskih sljedova A2AJ88-1 i Q6ZV29-1 pokazali su 80,3 % identičnosti i 86,9 % sličnosti, a usporedba aminokiselinskih sljedova A2AJ88-1 i Q6ZV29-5, pokazala je 81,5 % identičnosti i 88,3 % sličnosti. Na temelju visokog postotka identičnosti i sličnosti, pretpostavljeno je da je ljudski PNPLA7 prisutan u istim tkivima, reguliran na sličan način i da ima sličnu funkciju kao i u mišu.

4.1.1. Istraživanje specifičnosti protutijela anti-PNPLA7

Istraživanja na mišu i štakoru pokazala su da je mRNA *PNPLA7* najviše eksprimirana u tkivima koja su važna u metabolizmu energije uključujući bijelo i smeđe masno tkivo, srčani i skeletni mišić, jetra, testisi, dok je ekspresija u mozgu, slezeni i plućima znatno niža.^{7,15} U prvom koraku istraživanja, istražena je prisutnost proteina PNPLA7 u primarnim stanicama ljudskih skeletnih mišića (mioblasti) Western analizom koristeći primarno protutijelo anti-PNPLA7 (kataloški broj: HPA009130, *Merck/Sigma-Aldrich*, Darmstadt, Njemačka). Ovo protutijelo je bilo jedino

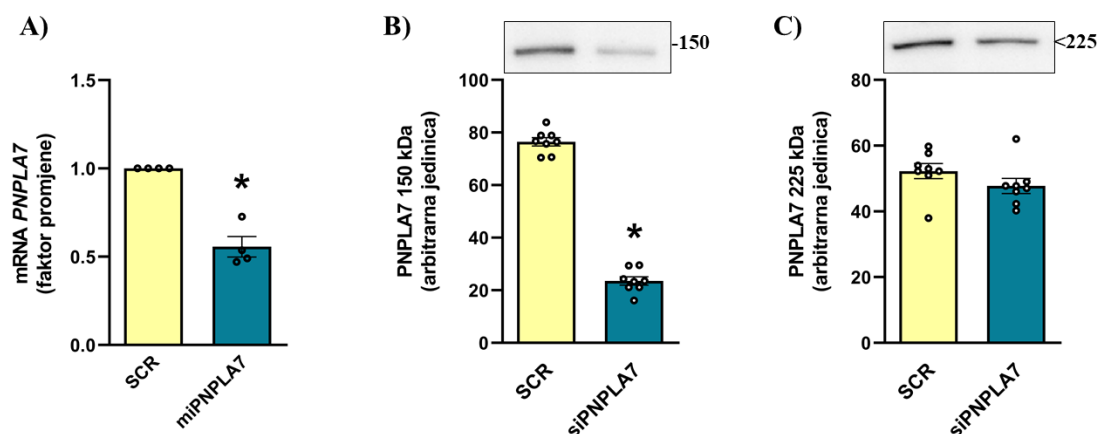
komercijalno dostupno uz svega nekoliko literaturnih podataka. Rezultati Western analize pokazali su prisutnost imunoreaktivne proteinske vrpce pri ~ 150 kDa koja odgovara proteinu PNPLA7, ali i prisutnost imunoreaktivnih vrpca pri ~ 45 kDa, 102 kDa i vrpce koja se nalazi iznad imunoreaktivne vrpce markera najveće molekulske mase koja iznosi 225 kDa (**slika 13**). Radi validacije specifičnosti, protutijelo anti-PNPLA7 inkubirano je s rekombinantnim proteinskim fragmentom PNPLA7, tzv. PrEST peptidom (engl. *Protein Epitope Signature Tag*) dobivenog od proizvođača primarnog protutijela anti-PNPLA7. Vežanje PrEST peptida i primarnog protutijela anti-PNPLA7 rezultira neutralizacijom, pri čemu bi imunoreaktivne vrpce specifične za PNPLA7 trebale nestati. Rezultati inkubacije neutralizacijskim peptidom prikazani su na **slici 13** i pokazuju nestanak proteinskih imunoreaktivnih vrpca pri ~ 150 kDa i 225 kDa što je potvrdilo pretpostavku da imunoreaktivna proteinska vrpca pri ~ 150 kDa odgovara proteinu PNPLA7 te da se ovo protutijelo može koristiti za daljnja istraživanja.



Slika 13. Rezultati istraživanja specifičnosti protutijela anti-PNPLA7 (kataloški broj: HPA009130, Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) Western analizom. Primarno protutijelo anti-PNPLA7 inkubirano je bez (- PrEST) ili s (+ PrEST) rekombinantnim proteinskim fragmentom PNPLA7, tj. peptidom PrEST (engl. *Protein Epitope Signature Tag*) u ljudskom uzorku mišića iz križnog ligamenta i miotubula diferenciranih 10 dana. Brojevi označavaju marker molekulske mase u kDa.

U sljedećem koraku, radi potvrde odgovaraju li imunoreaktivne proteinske vrpce pri 150 kDa i 225 kDa zaista proteinu PNPLA7, provedeno je utišavanje *PNPLA7* koristeći malu interferirajuću RNA prema PNPLA7, a uspješnost utišavanja istražena je metodom RT-PCR i Western analizom. Rezultati utišavanja (**slika 14**) pokazuju da je utišavanje rezultiralo

značajnim smanjenjem ekspresije mRNA *PNPLA7*. Također, rezultati pokazuju značajno smanjenje intenziteta imunoreaktivne proteinske vrpce pri 150 kDa što potvrđuje pretpostavku da navedena proteinska vrpca odgovara *PNPLA7*. Utišavanje nije rezultiralo značajnom promjenom u intenzitetu imunoreaktivne vrpce pri 225 kDa, stoga, identitet navedene imunoreaktivne vrpce zasad ostaje nepoznat.



Slika 14. Rezultati utišavanja *PNPLA7* u mioblastima u kojemu je korištena mala interferirajuća RNA prema *PNPLA7* (si*PNPLA7*) i mala nekodirajuća RNA kao negativna kontrola (SCR, engl. *scrambled RNA*). **A)** Rezultati analize PCR 48 h nakon početka tretmana, N=4. Rezultati Western analize: **B)** Imunoreaktivne vrpce pri 150 kDa, 72 h nakon početka tretmana, N=7, **C)** Imunoreaktivne vrpce < 225 kDa, 72 h nakon početka tretmana, N=8. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti, a N je broj donora mioblasta odnosno broj analiziranih uzoraka. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je * $p \leq 0,05$, u odnosu na SCR. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekularnu masu proučavanog proteina u odnosu na marker proteinskih vrpce u kDa.

Kao dodatna kontrola, istražena je mogućnost preklapanja sekvence PrEST peptida prema protutijelu anti-*PNPLA7* sa drugim proteinima koristeći računalni alat BLAST (pristupljeno 9.9.2022.g.).¹⁷⁸ BLAST analiza, pokazala je 100 %-tnu identičnost s ljudskim proteinom *PNPLA7* i 43 %-tnu identičnost s ljudskim proteinom *PNPLA6*.

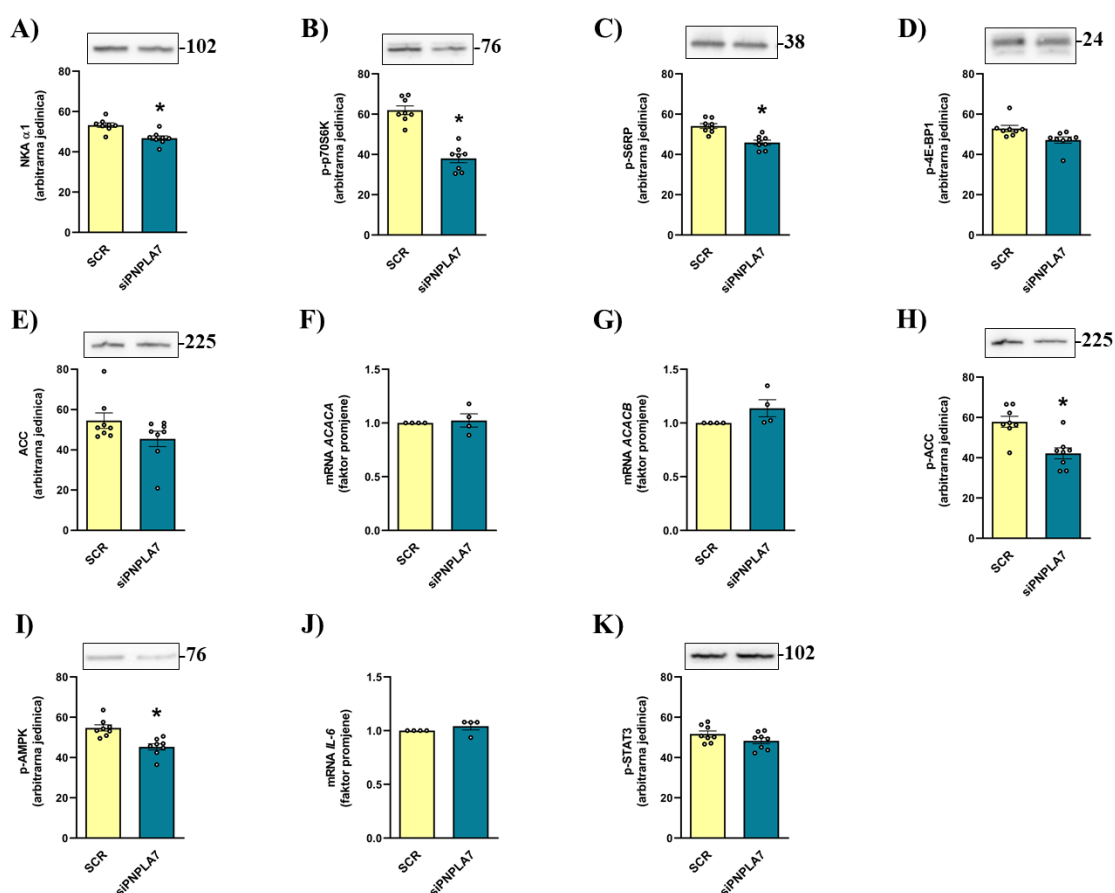
4.1.2. Utjecaj utišavanja *PNPLA7* na odabrane mete i signalne puteve u mioblastima

Fiziološka uloga *PNPLA7* nije razjašnjena. Fiziološka uloga srodnog enzima *PNPLA6* *in vitro* i *in vivo* puno je istraženija u odnosu na *PNPLA7*, a istraživanja su pokazala da *PNPLA6* ima važnu ulogu u održavanju homeostaze staničnih membrana i razvoju živčanog sustava.¹⁹⁰⁻¹⁹² Istraživanja su pokazala da *knock-out* *PNPLA6* u miševima, dovodi do poremećaja i gubitka membrana endoplazmatskog retikuluma, ali i do nastajanja stresa u endoplazmatskom retikulumu zbog povećanja koncentracije lizofosfatidilkolina.^{98,193} Točnije, utišavanje *PNPLA6*

u staničnoj liniji hNT2 je dovelo do promjena u fluidnosti membrana i vezikularnog prijenosa zbog poremećaja u metabolizmu fosfolipida.⁹⁸ S obzirom na sličnost s PNPLA6 i na pokazanu važnu ulogu PNPLA7 u metabolizmu fosfatidilkolina u jetri,¹⁹ pretpostavljeno je da PNPLA7 ima važnu ulogu i u skeletnim mišićima kao drugom metabolički aktivnome tkivu.

U ovoj disertaciji, važnost PNPLA7 istražena je utišavanjem *PNPLA7* u mioblastima pri čemu je praćena ekspresija mRNA ili razina proteina kao $\alpha 1$ -podjedinice primarne ionske pumpe N^+, K^+ -ATP-aze (NKA $\alpha 1$) i proteina signalnih puteva mTOR (engl. *mammalian Target of Rapamycin*), AMPK (engl. *AMP-activated protein Kinase*) i IL-6 (Interleukin 6), kao i njihovih meta fosforilacije u signalnom putu, a rezultati su prikazani na **slici 15**.

Utišavanje *PNPLA7* rezultiralo je značajnim smanjenjem razine proteina NKA $\alpha 1$ (**slika 15.A**) što sugerira da PNPLA7 ima važnu ulogu u funkciji ljudskih stanica skeletnih mišića, ali mehanizam utjecaja PNPLA7 na NKA $\alpha 1$ zasad je nepoznat. Naime, NKA je ionska pumpa koja katalizira reakciju uspostavljanja elektrokemijskog gradijenta prijenosa natrijevih iona izvan i kalijevih iona unutar stanice pri čemu njen primarni prijenos ima važnu ulogu u brojnim staničnim procesima uključujući održavanje ionske homeostaze, membranskog potencijala, volumena stanica, kontrakcije mišića i brojnih drugih.^{194,195} Strukturno, NKA je heterodimer koji se sastoji od katalitičke α -podjedinice i glikoproteinske β -podjedinice koja regulira formiranje heterodimera i umetanje pumpe u staničnu membranu.¹⁹⁴ NKA je prisutna u obliku nekoliko izoformi koje imaju različite uloge i prisutne su u različitim tkivima, a NKA $\alpha 1$ je najzastupljenija izoforma u nediferenciranim stanicama skeletnih mišića.¹⁹⁴ Ionska pumpa NKA može biti regulirana na razini promjene aktivnosti, dostupnosti na staničnoj membrani i na razini mRNA ili proteina.¹⁹⁴ Između ostaloga, istraživanja su pokazala da sastav lipida u staničnoj membrani može utjecati na dostupnost NKA i da lizofosfatidilkolin inhibira aktivnost NKA *in vitro*.¹⁹⁶ Upravo ovo može biti poveznica s PNPLA7 odnosno smjer daljnjih istraživanja povezanosti PNPLA7 i NKA.



Slika 15. Utjecaj utišavanja *PNPLA7* na razinu: **A)** $\alpha 1$ -podjedinice ionske pumpe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aze}$, **B)** proteina p70S6K fosforiliranog na Thr389, **C)** proteina S6RP fosforiliranog na Ser235/236, **D)** proteina 4E-BP1 fosforiliranog na Thr37/46, **E)** proteina ACC, **F)** mRNA *ACACA* (izoforna ACC1), **G)** mRNA *ACACB* (izoforna ACC2), **H)** proteina ACC fosforiliranog na Ser79, **I)** proteina AMPK fosforiliranog na Thr172, **J)** mRNA *IL-6* (interleukin-6), **K)** proteina STAT3 fosforiliranog na Tyr705. Utišavanje *PNPLA7*, provedeno je na mioblastima koristeći malu interferirajuću RNA prema *PNPLA7* (si*PNPLA7*, engl. *small interfering RNA*) i malu nekodirajuću RNA (SCR, engl. *scrambled RNA*) kao negativnu kontrolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti, a N je broj donora mioblasta i broj analiziranih uzoraka. Razina proteina praćena je Western analizom, N=7. Razina mRNA praćena je metodom kvantitativnog PCR-a, a rezultati su prikazani kao geometrijska sredina omjera ekspresije *ACACA*, *ACACB* ili *IL-6* i referentnih gena, 18S rRNA i *ACTB* (β -aktin), N=4. N je broj donora mioblasta odnosno broj analiziranih uzoraka. Statistička značajnost određena je u programu GraphPad Prism pri čemu je * $p < 0,05$ u odnosu na SCR. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekulsku masu proučavanog proteina u odnosu na marker proteinskih vrpce u kDa.

Nadalje, podaci iz literature pokazuju da se ekspresija mRNA *PNPLA7* povećava u stanju gladi i smanjuje u stanju sitosti u miševima što sugerira da *PNPLA7* potencijalno može ostvariti interakciju sa signalnim putevima koji su osjetljivi na energetske status kao što su signalni put mTOR ili AMPK. mTOR je kinaza koja fosforilira bočne ogranke Ser ili Thr svojih supstrata, a sastoji se od dva strukturno različita kompleksa mTORC1 i mTORC2 koji fosforilacijom

svojih meta reguliraju različite stanične anaboličke procese uključujući sintezu proteina, lipida, glikolizu, autofagiju i brojne druge.¹⁹⁷ Utjecaj utišavanja *PNPLA7* na signalni put mTOR, praćen je ogrankom signalnog puta mTORC1 koji sudjeluje u regulaciji sinteze proteina i aktivira se ovisno o dostupnosti nutrijenata, energije i kisika u stanici.¹⁹⁷ Točnije, istraženo je dolazi li do promjene razine proteina p70S6K (engl. *70 kDa Ribosomal Protein S6 Kinase*) fosforiliranog na Thr389 i njegovog supstrata S6RP (engl. *Ribosomal Protein S6*) fosforiliranog na Ser235/236 koji aktiviraju translaciju proteina i sintezu ribosoma.¹⁹⁷ Također, praćena je razina proteina 4E-BP1 fosforiliranog na Thr37/46 koji inhibira sintezu proteina.¹⁹⁷ Utišavanje *PNPLA7* rezultiralo je značajnim smanjenjem razine fosforiliranog p70S6K i S6RP (**slika 15.B i C**), dok nije bilo utjecaja na razinu fosforiliranog 4E-BP1 (**slika 15.D**). Iako je mehanizam povezanosti *PNPLA7* i signalnog puta mTORC1 zasad nerazjašnjen, ovi rezultati upućuju da *PNPLA7* potencijalno modulira signalni put mTOR, ali ima različit utjecaj na njegove supstrate. Budući da *PNPLA7* može biti asociran s endoplazmatskim retikulumom⁷ gdje se odvija sinteza proteina, manjak prisutnosti samog *PNPLA7* može potencijalno rezultirati poremećajima u membranama endoplazmatskog retikuluma što može dovesti do stresa u samom endoplazmatskom retikulumu i time djelovati na sintezu proteina.¹⁹⁷

Utišavanjem *PNPLA7*, došlo je do značajnog smanjenja ukupne razine acetil-koenzim A karboksilaze (ACC, engl. *Acetyl-CoA Carboxylase*) (**slika 15.E**), a može se uočiti i tendencija smanjenja razine fosforilirane ACC koje ipak nije postiglo statističku značajnost korištenim statističkim testom (**slika 15.H**). Budući da utišavanje *PNPLA7* nije imalo utjecaj na razinu mRNA izoformi ACC1 (*ACACA*) i ACC2 (*ACACB*) (**slika 15.F i G**), može se zaključiti da smanjenje sveukupne razine ACC nije posljedica smanjenja na razini transkripcije. Međutim, može se uočiti da utišavanje *PNPLA7* rezultira značajnim smanjenjem aktiviranog oblika AMPK (**slika 15.I**), tj. proteina AMPK fosforiliranog na Thr172, što onda posljedično objašnjava i smanjenje razine fosforiliranog ACC. AMPK je kinaza koja djeluje kao svojevrsni senzor stanja niske energije u stanici pri čemu aktivira procese u kojima nastaje ATP, a inhibira procese koji troše ATP.¹⁹⁸ Strukturno, AMPK je heterotrimerni proteinski kompleks koji sadrži α , β i γ podjedinicu, a svaka od podjedinica ima ulogu u stabilnosti i aktivnosti AMPK.¹⁹⁸ Specifično, α -podjedinica sadrži katalitičku domenu koja se fosforilacijom na Thr172 aktivira čak sto puta.¹⁹⁸ Njenom aktivacijom se potiče unos glukoze, β -oksidacija masnih kiselina i lipoliza u skeletnim mišićima i jetri, a inhibira lipogeneza i sinteza kolesterola, te regulira izlučivanje inzulina iz β -stanica gušterače.¹⁹⁸ Naime, ACC je jedna od meta u signalnom putu

AMPK koja ima važnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina, a katalizira reakciju pretvorbe acetil-koenzim A u malonil-koenzim A, supstrata za biosintezu masnih kiselina.¹⁹⁹ AMPK inhibira ACC fosforilacijom na Ser79 što rezultira inhibicijom lipogeneze, pa se time smanjuje i utrošak ATP-a.^{198,199}

Podaci iz literature navode da je *knock-out* PNPLA7 u miševima, rezultirao značajnim miopatskim promjenama uključujući povećanu razinu IL-6 u plazmi,¹⁸ ali sniženu razinu mRNA *IL-6* i *IL-1 β* u jetri.¹⁹ Naime, IL-6 je proupalni citokin, ali u stanicama skeletnih mišića može djelovati kao protuupalni miokin.²⁰⁰ Stoga, istražen je utjecaj utišavanja *PNPLA7* na ekspresiju mRNA *IL-6* i njegovu metu, protein STAT3 fosforiliran na Tyr705. U ovom pokusu, rezultati nisu pokazali statistički značajnu promjenu (**slika 15.J i K**). Postoji mogućnost da provedeno utišavanje *PNPLA7* u mioblastima, koje je iznosilo ~ 75 %, nije bilo dovoljno da izazove značajnu promjenu u razini IL-6 ili da trajanje utišavanja nije bilo dovoljno dugo.

Sveukupno gledajući, dobiveni rezultati utišavanja *PNPLA7* u mioblastima pokazuju da ovaj protein ima važnu ulogu u brojnim aspektima funkcije mioblasta, a prema tome i u funkciji ljudskih skeletnih mišića.

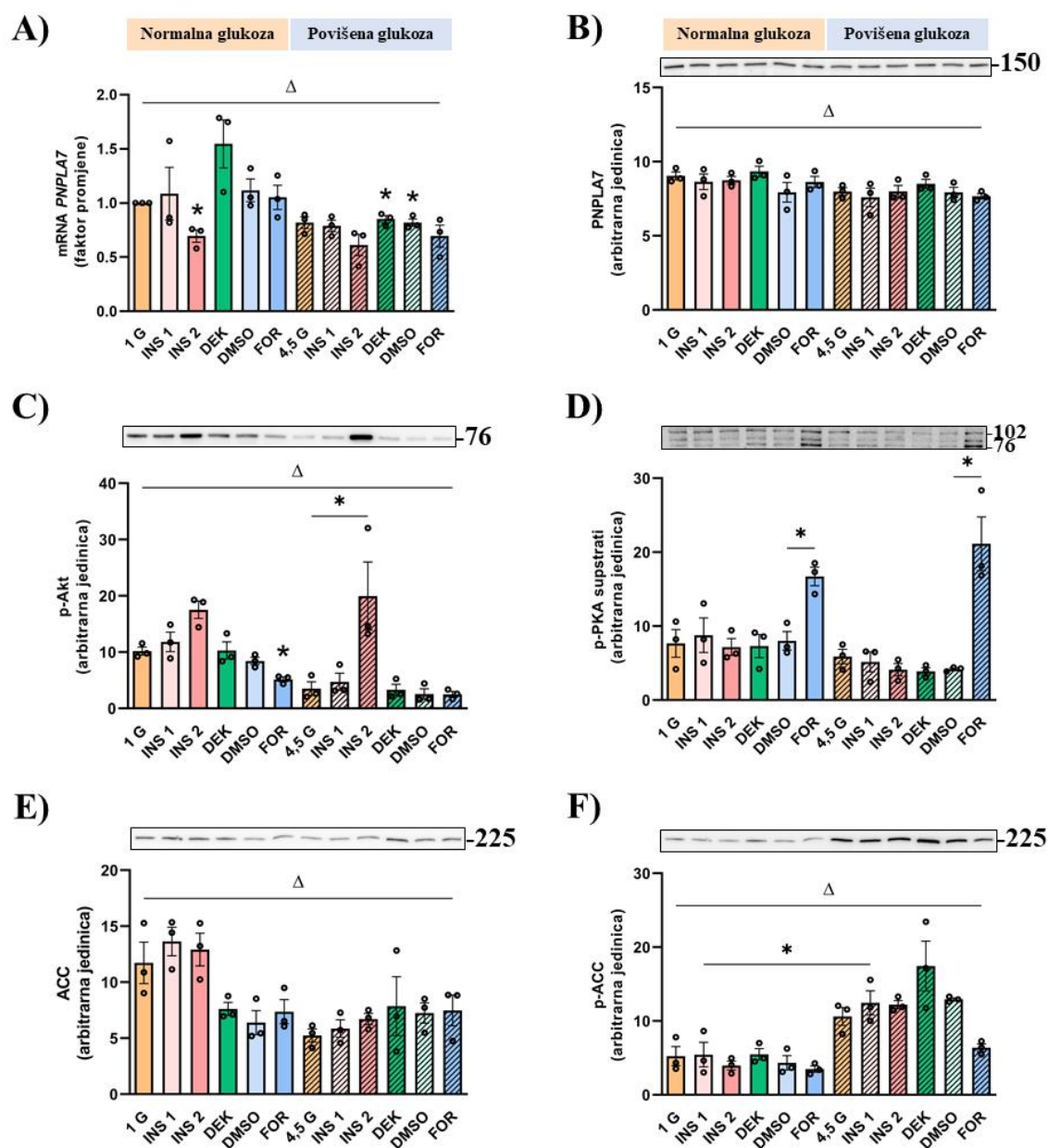
4.1.3. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na *PNPLA7* u miotubulima

Do sada objavljena istraživanja, pokazala su da je ekspresija mRNA *PNPLA7* u miševima povećana u stanju gladi, a smanjena u stanju sitosti u testisima, skeletnim i srčanom mišiću te masnom tkivu.⁷ Nadalje, ekspresija mRNA *PNPLA7* smanjuje se povećanjem koncentracije inzulina u mišjim 3T3-L1 adipocitama što upućuje da je *PNPLA7* reguliran ovisno o energetsom statusu organizma.⁷ Stoga, u ovoj disertaciji istražen je utjecaj različitih koncentracija glukoze i inzulina, sintetskog glukokortikoida deksametazona i forskolina (aktivatora signalnog puta protein kinaze A i adenilil ciklaze) i DMSO-a kao kontrole za forskolin, na ekspresiju mRNA i razinu proteina *PNPLA7* u ljudskim miotubulima. Tretmani su provedeni pri dvije različite koncentracije glukoze, tj. pri fiziološkoj koncentraciji glukoze i povišenoj koncentraciji glukoze u trajanju od 16 h u nesuplementiranom DMEM mediju (u tzv. *serum starvation* uvjetima). Utjecaj drugih gore navedenih tvari, praćen je i u odnosu na tretman u kojima su miotubuli tretirani samo fiziološkom koncentracijom glukoze i uspoređene su razlike između istih tretmana i pri povišenoj koncentraciji glukoze.

Rezultati tretmana prikazani su na **slici 16** i može se uočiti da pri povišenoj koncentraciji inzulina (INS 2, $\gamma=10 \mu\text{g dm}^{-3}$) dolazi do smanjenja ekspresije mRNA *PNPLA7* pri fiziološkoj

koncentraciji glukoze (**slika 16.A**), dok nijedan tretman nije uzrokovao promjene na razini proteina (**slika 16.B**) u vremenskom okviru tretmana od 16 h. Pri povišenoj koncentraciji glukoze, inzulin je imao sličan utjecaj na mRNA *PNPLA7*, ali bez statističke značajnosti (**slika 16.A**). Naime, inzulin je hormon koji ima važnu ulogu u regulaciji anabolizma, odnosno prijelaza između sinteze staničnih konstituenata i pohrane ovisno o energetske stanju organizma.²⁰¹ Nakon obroka, dolazi do porasta koncentracije glukoze u plazmi koja kada postigne određeni prag, potiče izlučivanje inzulina iz β -stanica gušterače.²⁰⁰ U zdravom organizmu, inzulin potiče pohranu glukoze u vidu sinteze glikogena i lipida u jetri, a inhibira glukoneogenezu u jetri i lipolizu u masnom tkivu.²⁰⁰ U skeletnim mišićima, izlučivanje inzulina potiče unos glukoze pažljivo reguliranom translokacijom vezikula koje sadrže transmembranske prijenosnike glukoze (specifično protein GLUT4), njihovu fuziju sa staničnom membranom i ugradnju GLUT4 na površinu stanice.²⁰⁰ Stoga, *PNPLA7* potencijalno može imati ulogu u procesima koje inhibira inzulin kao što je lipoliza. Istraživanja provedena na *PNPLA2*, enzimu koji ima važnu ulogu u lipolizi, pokazala su sličan način regulacije, tj. povišena koncentracija inzulina dovela je do smanjenja mRNA *PNPLA2*.⁴⁸ Isto tako, pokazano je da je razina mRNA *PNPLA2* povećana u stanju gladi, a smanjena u stanju sitosti, kao i mRNA *PNPLA7*.^{7,48}

Nadalje, može se uočiti da pri fiziološkoj koncentraciji glukoze deksametazom povećava razinu mRNA *PNPLA7*, ali pri povišenoj koncentraciji glukoze je značajno smanjio razinu mRNA *PNPLA7* (**slika 16.A**), dok nije bilo promjene na razini proteina ni pri fiziološkoj ni pri povišenoj koncentraciji glukoze u promatranom vremenskom razdoblju. Inače, glukokortikoidi su steroidni hormoni koji također imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze, ali imaju obrnuti učinak od inzulina, tj. sprječavaju glikolizu i unos glukoze u stanice skeletnih mišića.²⁰² Istraživanja su pokazala da tretman mišjih i ljudskih miotubula glukokortikoidima smanjuje translokaciju prijenosnika glukoze GLUT4 na staničnu membranu, a time i unos glukoze potaknut inzulinom.²⁰²



Slika 16. Utjecaj glukoze, inzulina, deksametazona i forskolina na ekspresiju PNPLA7 u miotubulima, diferenciranim primarnim stanicama skeletnih mišića. Miotubuli su tretirani inzulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS1) i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS2), deksametazonom $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (DEK) i forskolinom $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (FOR) u trajanju od 16 h pri dvije različite koncentracije glukoze, pri normalnoj (1 g dm^{-3} , 1 G) i pri visokoj ($4,5 \text{ g dm}^{-3}$, 4,5 G). **A)** ekspresija mRNA *PNPLA7* praćena je metodom kvantitativnog PCR-a, a rezultati su prikazani kao geometrijska sredina omjera ekspresije mRNA *PNPLA7* i referentnih gena, 18S rRNA i *ACTB* (β -aktin). **B)** razina proteina PNPLA7, **C)** razina proteina Akt fosforiliranog na Ser473 (p-Akt), **D)** razina fosforiliranih supstrata PKA (p-PKA), **E)** razina proteina ACC, **F)** razina proteina ACC fosforilirane na Ser79 (p-ACC). Promjene na razini proteina (**B-F**) praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=3$, broj donora miotubula. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $*p < 0,05$ u odnosu na 1 g dm^{-3} G. $\Delta p < 0,05$ između 1 g dm^{-3} G i $4,5 \text{ g dm}^{-3}$ G. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekulska masu proučavanog proteina u odnosu na marker proteinskih vrpca u kDa.

Budući da PNPLA7 sadrži tri vezna mjesta za cikličke nukleotide, istražen je utjecaj forskolina, aktivatora adenilil ciklaze koja katalizira reakciju nastajanja cikličkog AMP-a (cAMP) iz ATP-a, i DMSO-a kao negativne kontrole za forskolin. Rezultati pokazuju da forskolin nije imao utjecaj na ekspresiju mRNA *PNPLA7* ni na razinu proteina (**slika 16.A i B**) u vremenskom razdoblju od 16 h. Međutim, može se uočiti da DMSO značajno smanjuje razinu mRNA *PNPLA7* pri povišenoj koncentraciji glukoze (**slika 16.A i B**), zbog čega se ne može sa sigurnošću odrediti da forskolin ne utječe na ekspresiju PNPLA7 ili DMSO interferira u utjecaju forskolina.

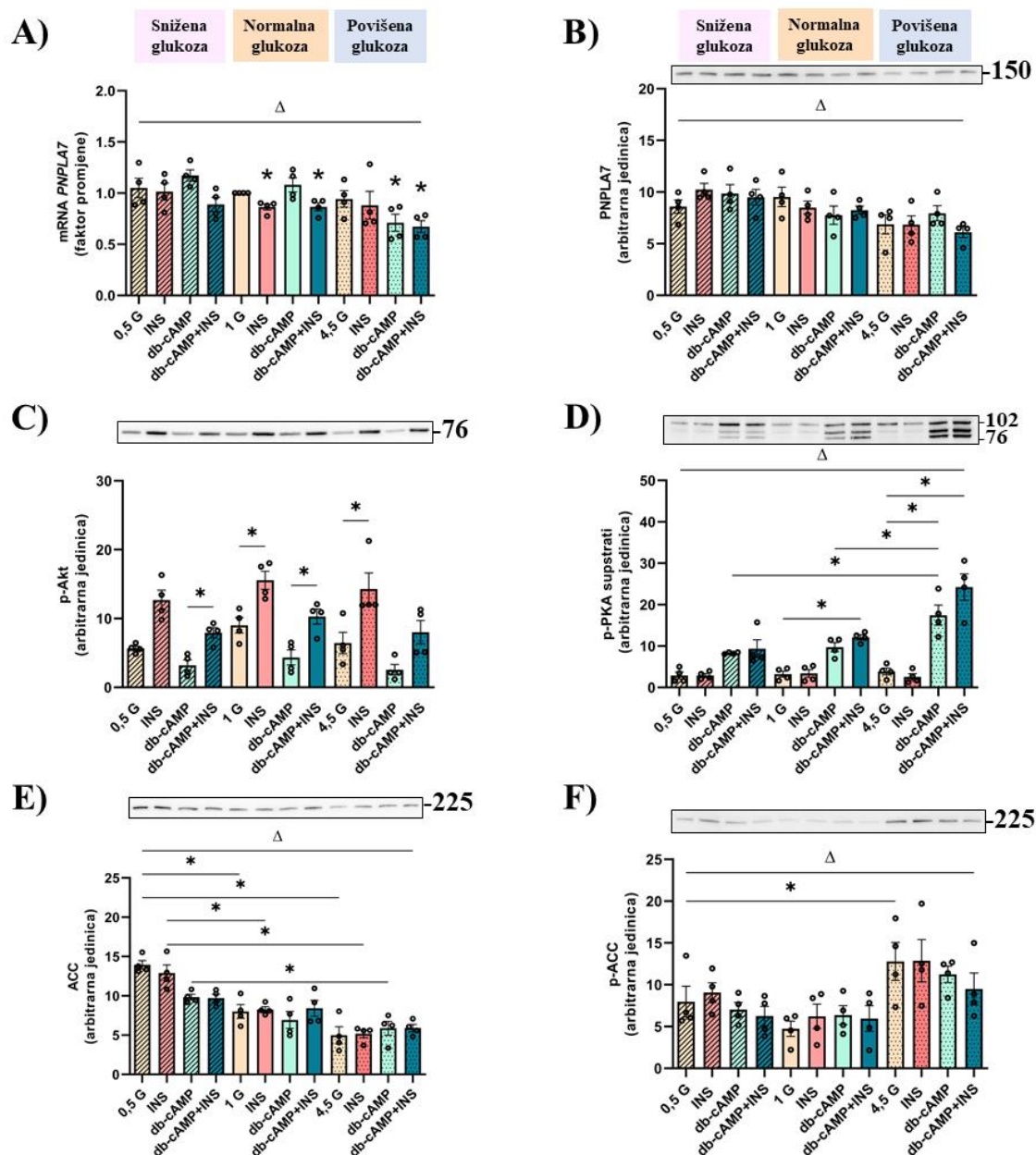
Kako bi se potvrdili rezultati, istražene su i dodatne mete utjecaja istraživanih tretmana. Rezultati pokazuju da navedeni tretman nisu imali utjecaj na razine proteina β -aktin (dodatak, poglavlje 7.3, **slika 43**). Naime, β -aktin se vrlo često koristi kao endogena kontrola u Western analizi i metodi RT-PCR radi normalizacije istraživanih uzoraka.²⁰³ Endogena kontrola se odnosi na gen čija ekspresija se ne bi trebala mijenjati u uvjetima istraživanja, tzv. *housekeeping* geni, a osim proteina β -aktin, mogu se koristiti i GAPDH, 18S-rRNA, i drugi.²⁰³ Za istraživanje aktivacije signalnog puta inzulina, praćena je razina kinaze Akt fosforilirane na položaju Ser473 (p-Akt), a rezultati pokazuju povećanu razinu p-Akt u tretmanu povišenom koncentracijom inzulina, što je izraženije pri povišenoj koncentraciji glukoze (**slika 16.C**), kao što je i očekivano. Forskolin je aktivator signalnog puta protein kinaze A (PKA) koja aktivira svoje mete fosforilacijom i pokazano je da forskolin značajno povećava razinu fosforiliranih supstrata PKA (**slika 16.D**). Nadalje, povišenjem koncentracije glukoze, može se uočiti da dolazi do značajnog smanjenja aktivnog oblika, tj. nefosforiliranog oblika ACC (**slika 16.E**), dok se razina inhibiranog oblika ACC, tj. ACC fosforilirane na položaju Ser79 povećava povećanjem koncentracije glukoze (**slika 16.F**). Sve to upućuje da su tretmani ispravno provedeni i da su dobiveni rezultati za PNPLA7 validirani.

Radi detaljnijeg istraživanja regulacije PNPLA7, miotubuli su tretirani inzulinom, dibutiril-cAMP-om (db-cAMP, analog cAMP) i njihovom kombinacijom u trajanju od 16 h u nesuplementiranom DMEM mediju. Tretmani su provedeni pri tri različite koncentracije glukoze, tj. pri niskoj, fiziološkoj (normalnoj) i visokoj koncentraciji glukoze, pri čemu najniža koncentracija glukoze odgovara stanju gladi, a najviša stanju sitosti. Utjecaj inzulina, db-cAMP-a i njihove kombinacije, praćen je u odnosu na tretman u kojima su miotubuli tretirani samo fiziološkom koncentracijom glukoze i uspoređene su razlike između istih tretmana pri niskoj i visokoj koncentraciji glukoze.

Rezultati su prikazani na **slici 17**. Pri fiziološkoj koncentraciji glukoze, inzulin i kombinacija inzulina i db-cAMP-a značajno su smanjili ekspresiju mRNA *PNPLA7* (**slika 17.A**), dok navedeni tretmani nisu imali utjecaja na razinu proteina PNPLA7 u praćenom vremenskom razdoblju (**slika 17.B**). Isto tako, može se uočiti da je db-cAMP povećao ekspresiju mRNA *PNPLA7* pri niskoj i fiziološkoj koncentraciji glukoze, ali taj utjecaj nije bio statistički značajan (**slika 17.A**). Međutim, pri povišenoj koncentraciji glukoze, db-cAMP i kombinacija inzulina i db-cAMP-a značajno su smanjili ekspresiju mRNA *PNPLA7* (**slika 17.A**).

Dobiveni rezultati mogu se povezati s prethodnim istraživanjem provedenom na proteinu PNPLA6, u kojem su stanice HeLa tretirane db-cAMP-om u trajanju od 24 h što je rezultiralo povećanjem ekspresije mRNA i razine proteina PNPLA6, dok nije bilo utjecaja na enzimsku aktivnost PNPLA6.²⁰⁴ Nadalje, istraživanja su pokazala da se transkripcijski faktor CREB (engl. *cAMP Response Element-Binding protein*) može vezati na promotor *PNPLA6* pri čemu dolazi do povećanja razine mRNA i proteina PNPLA6 putem signalnog puta cAMP/PKA u staničnoj liniji HeLa.^{204,205} Stoga, bilo bi važno odrediti utječe li db-cAMP na ekspresiju *PNPLA7* kroz signalni put CREB/PKA ili direktnim vezanjem na vezna mjesta za cikličke nukleotide. Također, istraživanja su pokazala da inkubacija lizata koji prekomjerno ekspimiraju PNPLA6 ili PNPLA7 s cAMP-om ili cGMP-om ne utječu na enzimsku aktivnost ni na jedan od ta dva enzima.^{7,204} Ali nakon inkubacije s cAMP-om, PNPLA7 u povećanoj mjeri asocira s lipidnim kapljicama,⁷ stoga postoji mogućnost da ciklički nukleotidi utječu na staničnu lokalizaciju PNPLA7.

Iako nijedan tretman nije imao značajan utjecaj na razinu proteina PNPLA7 (**slika 17.B**) unutar 16 h, statistička analiza pokazala je da povećanjem koncentracije glukoze ponovno dolazi do smanjenja ekspresije PNPLA7 na razini mRNA i proteina što upućuje na pretpostavku da je u ovim pokusima glukoza glavni regulator PNPLA7. No, treba uzeti u obzir da u ovom istraživanju nije određeno vrijeme poluživota proteina PNPLA7, pa se ne može sa sigurnošću zaključiti da promjene na razini proteina ne prate promjene na razini mRNA ili da odabrani vremenski period tretmana koji je iznosio 16 h nije bio dovoljan da uzrokuje promjene na razini proteina.



Slika 17. Utjecaj glukoze, inzulina, i dibutil cikličkog AMP-a (db-cAMP) na ekspresiju PNPLA7 u miotubulima, diferenciranim primarnim stanicama skeletnih mišića. Miotubuli su tretirani inzulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS), db-cAMP-om $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (db-cAMP) i njihovom kombinacijom (db-cAMP+INS) u trajanju od 16 h pri tri različite koncentracije glukoze, pri niskoj ($0,5 \text{ g dm}^{-3}$, 0,5 G), fiziološkoj (1 g dm^{-3} , 1 G) i visokoj ($4,5 \text{ g dm}^{-3}$, 4,5 G) koncentraciji glukoze. **A)** ekspresija mRNA *PNPLA7* praćena je metodom kvantitativnog PCR-a, a rezultati su prikazani kao geometrijska sredina omjera ekspresije mRNA *PNPLA7* i referentnih gena, 18S rRNA i *ACTB* (β -aktin). **B)** razina proteina PNPLA7, **C)** razina proteina Akt fosforiliranog na Ser473 (p-Akt), **D)** razina fosforiliranih supstrata PKA (p-PKA), **E)** razina proteina ACC, **F)** razina proteina ACC fosforilirane na Ser79 (p-ACC). Promjene na razini proteina (**B-F**) praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=4$, broj donora miotubula. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $*p < 0,05$ u odnosu na $1 \text{ g dm}^{-3}\text{G}$. $\Delta p < 0,05$ između različitih koncentracija glukoze. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekulsku masu proučavanog proteina u odnosu na marker proteinskih vrpce u kDa.

Kao i u prethodnom pokusu, navedeni tretmani nisu imali utjecaj na razine proteina β -aktin (dodatak, poglavlje 7.3, **slika 44**). Također, praćen je utjecaj navedenih tretman na razinu kinaze Akt fosforilirane na Ser473 (p-Akt) kao mete inzulina, supstrata koje fosforilira PKA (PKA supstrati) stimulacijom db-cAMP-om, i razinu ACC i ACC fosforilirane na Ser79 kao kontrola utjecaja glukoze. Tretman inzulinom značajno je povećao razinu proteina p-Akt pri svim koncentracijama glukoze, dok je tretman db-cAMP-om značajno smanjio razinu proteina p-Akt (**slika 17.C**). Razina fosforiliranih supstrata PKA povećana je tretmanom db-cAMP-om te kombinacijom inzulina i db-cAMP-a što je bilo izraženije pri povišenoj koncentraciji glukoze (**slika 17.D**). Kao i u prethodnom pokusu, povećanjem koncentracije glukoze, dolazi do smanjenja razine proteina ACC (**slika 17.E**) i povećanja razine proteina ACC fosforilirane na Ser79 (**slika 17.F**).

Uzimajući u obzir sve rezultate ovog dijela provedenog istraživanja, može se zaključiti kako su uočene varijacije između donora utjecale na statističku obradu rezultata te bi bilo poželjno povećati broj uzoraka u istraživanju kako bi se neke tendencije povećanja ili smanjenja ekspresije PNPLA7 ili potvrdile ili negirale. Naime, primarne stanice skeletnih mišića standardni su model za istraživanja skeletnih mišića *in vitro*, a jedna od prednosti korištenja ovog modela je što primarne stanice zadržavaju neke od karakteristika ljudskih donora.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Međutim, primarne kulture često sadržavaju i stanice koje nisu mišićne pa primarna kultura nije homogena kao životinjske stanične kulture, npr. štakorske L6 i mišje C2C12 stanice skeletnih mišića.²⁰⁶ Varijabilnost u rezultatima pokusa obično su veće zbog varijabilnost između donora.²⁰⁸ Isto tako, stanice različitih donora mogu imati drugačiju razinu pojedinih proteina i drugačiji odgovor na pojedini tretman što može izazvati poteškoće prilikom statističke analize i interpretacije rezultata.²⁰⁸ Veća varijabilnost u nekim slučajevima ne može se izbjeći povećanjem broja donora u pokusu zbog same nedostupnosti većeg broja donora i ograničene diobe primarnih stanica skeletnih mišića što samim time ograničava i broj pasaža. S druge strane, životinjske stanične linije nisu uvijek prikladna zamjena zbog potencijalno drugačije ekspresije i funkcije ciljnih proteina.²⁰⁷ Unatoč navedenih nedostacima, primarne stanice skeletnih mišića predstavljaju koristan model za proučavanje fiziologije ljudskih skeletnih mišića te svakako predstavljaju i dobar model za daljnju analizu fiziološke uloge PNPLA7 enzima.

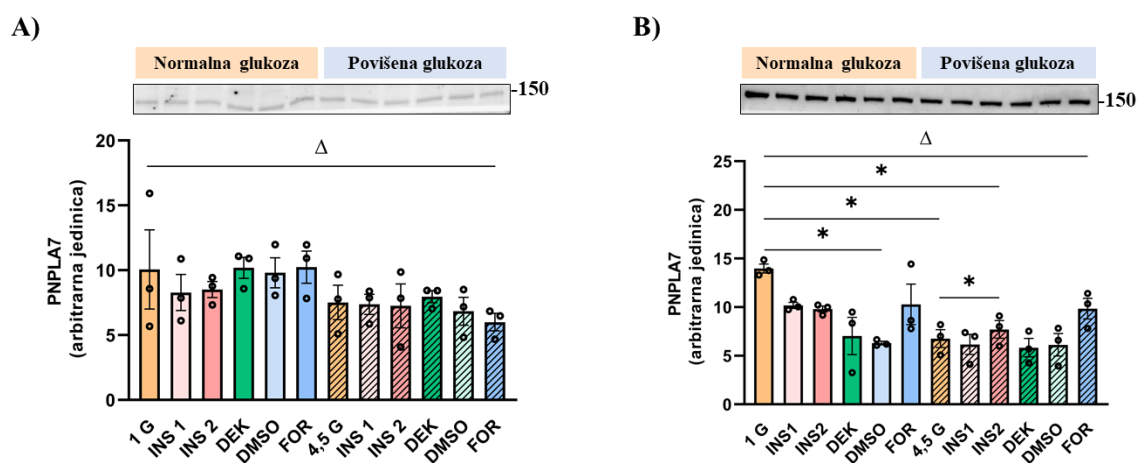
4.1.4. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na ekspresiju *PNPLA7* u staničnoj liniji *HepG2*

Radi dobivanja uvida u način regulacije *PNPLA7* u jetri, istražen je utjecaj glukoze, inzulina, deksametazona i forskolina na razinu proteina *PNPLA7* u staničnoj liniji *HepG2*, kao modela metabolički aktivnoga tkiva jetre. Ranije istraživanje pokazalo je da je promotor *PNPLA7* hipermetiliran u ljudskim uzorcima hepatocelularnog karcinoma što rezultira smanjenom ekspresijom *PNPLA7*,¹⁴³ a i podaci iz baze podataka Gepia2 pokazuju da je ekspresija *PNPLA7* smanjena u ljudskim uzorcima hepatocelularnog karcinoma.¹⁴⁴ U nedavnom istraživanju provedenom na *HepG2* stanicama, pokazano je da uzgoj *HepG2* stanica u mediju bez metionina dovodi do smanjenja metilacije promotora *PNPLA7* što rezultira povećanjem ekspresije *PNPLA7*, i povećanjem stanične razine glicerol-3-fosfokolina, kolina, fosfokolina i CDP-kolina.¹⁴²

U ovoj disertaciji, stanice *HepG2* tretirane su različitim koncentracijama inzulina, deksametazonom, forskolinom i DMSO-om kao kontrolom za forskolin. Navedeni tretmani provedeni su pri dvije različite koncentracije glukoze, tj. pri fiziološkoj (normalnoj) i povišenoj koncentraciji glukoze u trajanju od 16 i 24 h u nesuplementiranom DMEM mediju. Promjene samo na razini proteina su praćene Western analizom, a utjecaj tretmana praćen je u odnosu na tretman u kojima su stanice *HepG2* tretirane samo fiziološkom koncentracijom glukoze i uspoređene su razlike između gore navedenih, istih tretmana pri dvije koncentracije glukoze, fiziološkoj i povišenoj. U provedenom istraživanju na *HepG2* nije praćeno jesu li tretmani aktivirali njihove nizvodne signalne puteve zbog ranije poznatih literaturnih podataka.²⁰⁹

Rezultati su prikazani na **slici 18** i pokazuju da je u tretmanu koji je trajao 16 h, povećanjem koncentracije glukoze došlo do statistički značajnog smanjenja razine *PNPLA7* kao i u miotubulima, dok ostali tretmani nisu imali utjecaj na razinu *PNPLA7* (**slika 18.A**). U tretmanu koji je trajao 24 h, povećanje koncentracije glukoze također je rezultiralo značajnim smanjenjem razine *PNPLA7* (**slika 18.B**), a navedeno smanjenje je izraženije u odnosu na tretman koji je trajao 16 h. Može se uočiti da pri fiziološkoj koncentraciji glukoze, obje koncentracije inzulina smanjuju razinu *PNPLA7*, no to smanjenje nije bilo statistički značajno provedenom analizom (**slika 18.B**). Međutim, pri povećanoj koncentraciji glukoze, utjecaj inzulina na smanjenje razine *PNPLA7* bio je statistički značajan (**slika 18.B**). Isto tako, DMSO je značajno smanjio i razinu *PNPLA7* pri fiziološkoj koncentraciji glukoze (**slika 18.B**), dok forskolin i deksametazon nisu imali utjecaj na razinu *PNPLA7* u obje vremenske točke. Kao i u pokusima provedenima na miotubulima, ne može se sa sigurnošću odrediti utjecaj forskolina

zbog utjecaja samog DMSO-a na razinu PNPLA7. Također, može se uočiti da nakon tretmana koji je trajao 16 h, deksametazon povećava razinu PNPLA7 u odnosu na inzulin, ali nakon 24 h tretmana, deksametazon snižava razinu PNPLA7 u odnosu na inzulin pri obje koncentracije glukoze što potencijalno može značiti da inzulin i deksametazon imaju očekivani oprečan utjecaj na regulaciju PNPLA7 (slika 18.A).



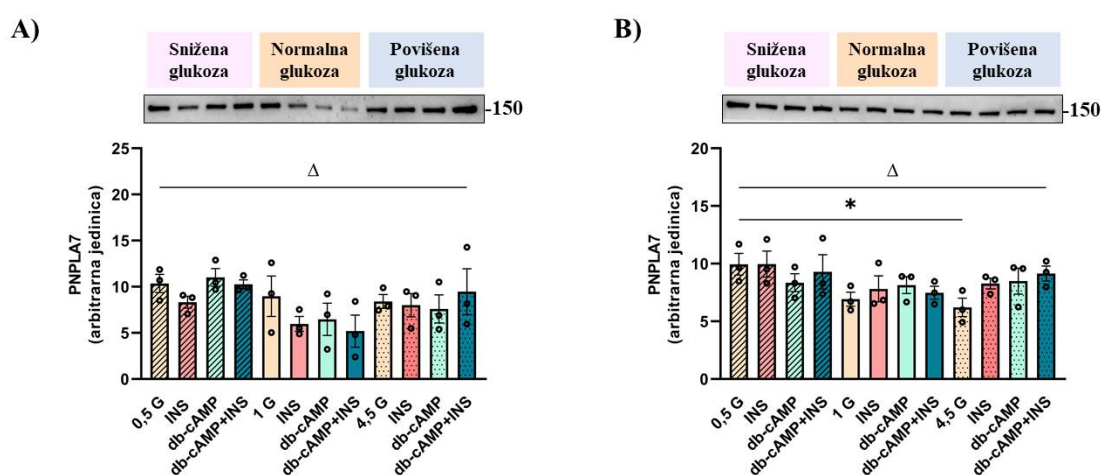
Slika 18. Utjecaj glukoze, inzulina, deksametazona i forskolina na razinu proteina PNPLA7 u staničnoj liniji HepG2. Stanice HepG2 su tretirane inzulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS 1) i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS 2), deksametazonom $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (DEK) i forskolinom $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (FOR) u trajanju od 16 h ili 24 h pri dvije različite koncentracije glukoze, pri fiziološkoj (1 G, 1 g dm^{-3}) i pri visokoj ($4,5 \text{ G}$, $4,5 \text{ g dm}^{-3}$) koncentraciji glukoze. Utjecaj tretmana na razinu PNPLA7 nakon: **A)** 16 h izloženosti, **B)** 24 h izloženosti. Promjene na razini proteina praćene Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N = 3$, broj analiziranih uzoraka. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $*p < 0,05$ u odnosu na $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$. $\Delta p < 0,05$ između $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$ i $4,5 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekulska masu PNPLA7 u odnosu na marker proteinskih vrpce u kDa.

Također, praćen je utjecaj navedenih tretmana u obje vremenske točke na razinu proteina β -aktin. Rezultati (dodatak, odjeljak 7.4, slika 45) pokazuju da glukoza značajno utječe na razinu proteina β -aktin nakon tretmana koji je trajao 16 h (slika 45.A), dok nije bilo utjecaja nakon tretmana koji je trajao 24 h (slika 45.B) što sugerira da ovaj protein nije dobra endogena kontrola u HepG2 stanicama, za razliku od gore prikazanih istraživanja na mioblastima i miotubulima u ovim uvjetima.

Zatim, na isti način kao i u istraživanju regulacije PNPLA7 u miotubulima, stanice HepG2 tretirane su inzulinom, dibutiril-cAMP-om (db-cAMP, analog cAMP) i njihovom kombinacijom (db-cAMP+INS) u trajanju od 16 i 24 h u nesuplementiranom DMEM mediju. Navedeni tretmani su provedeni pri tri različite koncentracije glukoze, tj. pri niskoj, fiziološkoj

(normalnoj) i visokoj koncentraciji glukoze radi imitacije stanja gladi i stanja sitosti, pri čemu najniža koncentracija glukoze odgovara stanju gladi, a najviša stanju sitosti. Utjecaj inzulina, db-cAMP-a i njihove kombinacije, praćen je u odnosu na tretman u kojima su stanice HepG2 tretirane samo fiziološkom koncentracijom glukoze i uspoređene su razlike između istih tretmana pri niskoj i visokoj koncentraciji glukoze.

Rezultati su prikazani na **slici 19**, i pokazuju da nijedan tretman nije imao značajan utjecaj na PNPLA7, osim izloženosti glukozi. Povećanjem koncentracije glukoze došlo je do smanjenja razine PNPLA7, a utjecaj glukoze na razinu proteina PNPLA7 je izraženiji nakon tretmana koji je trajao 24 h (**slika 19.B**).



Slika 19. Utjecaj glukoze, inzulina, i dibutiril cikličkog AMP-a (db-cAMP) na ekspresiju PNPLA7 u staničnoj liniji HepG2. Stanice HepG2 su tretirane inulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS), db-cAMP-om $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i njihovom kombinacijom (db-cAMP+INS) u trajanju od 16 h ili 24 h pri tri različite koncentracije glukoze, pri niskoj (0,5 G, $0,5 \text{ g dm}^{-3}$), fiziološkoj (1 G, 1 g dm^{-3}) i visokoj (4,5 G, $4,5 \text{ g dm}^{-3}$) koncentraciji glukoze. Utjecaj tretmana na razinu PNPLA7 nakon: **A)** 16 h izloženosti, **B)** 24 h izloženosti. Promjene na razini proteina praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=3$, broj analiziranih uzoraka. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $*p \leq 0,05$ u odnosu na $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$. $\Delta p < 0,05$ između različitih koncentracija glukoze. Brojevi na desnoj strani uz graf označavaju molekularnu masu PNPLA7 u odnosu na marker proteinskih vrpca u kDa.

Kao i u prethodnom pokusu, rezultati (dodatak, odjeljak 7.4, **slika 46**) su pokazali da glukoza značajno utječe na razinu proteina β -aktin nakon tretmana koji je trajao 16 h, dok nije bilo utjecaja nakon tretmana koji je trajao 24 h što sugerira da ovaj protein nije dobra endogena kontrola u ovim uvjetima. Kao što je ranije spomenuto, protein β -aktin se vrlo često koristi za normalizaciju istraživanih uzoraka jer se dugo smatralo da je njegova ekspresija stabilna.

Međutim, literaturni podaci i podaci iz baze podataka Gepia pokazali su da je ekspresija β -aktina povećana u tkivima hepatocelularnog karcinoma.²¹⁰ Također, u ovom istraživanju je pokazano da se razina ovog proteina u stanicama HepG2 mijenja ovisno o koncentraciji glukoze pa dobiveni rezultati nisu ni normalizirani u odnosu na β -aktin. Naime, preporučuje se normalizacija na ukupni broj protein koristeći npr. *stain-free* tehnologiju.²¹⁰

U konačnici, na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da je glukoza glavni regulator ekspresije PNPLA7 u provedenim uvjetima što upućuje na uključenost PNPLA7 u metabolizam energije. Budući da je u istraživanju provedenom na staničnoj liniji HepG2 praćena samo promjena na razini proteina, bilo bi zanimljivo istražiti utječu li navedeni tretmani na razinu mRNA i naposljetku usporediti promjene na transkripcijskoj i translacijskoj razini PNPLA7, kao što je provedeno na miotubulima. Isto tako, postoji mogućnost da trajanje tretmana nije bilo dovoljno da izazove značajniju promjenu na razini proteina.

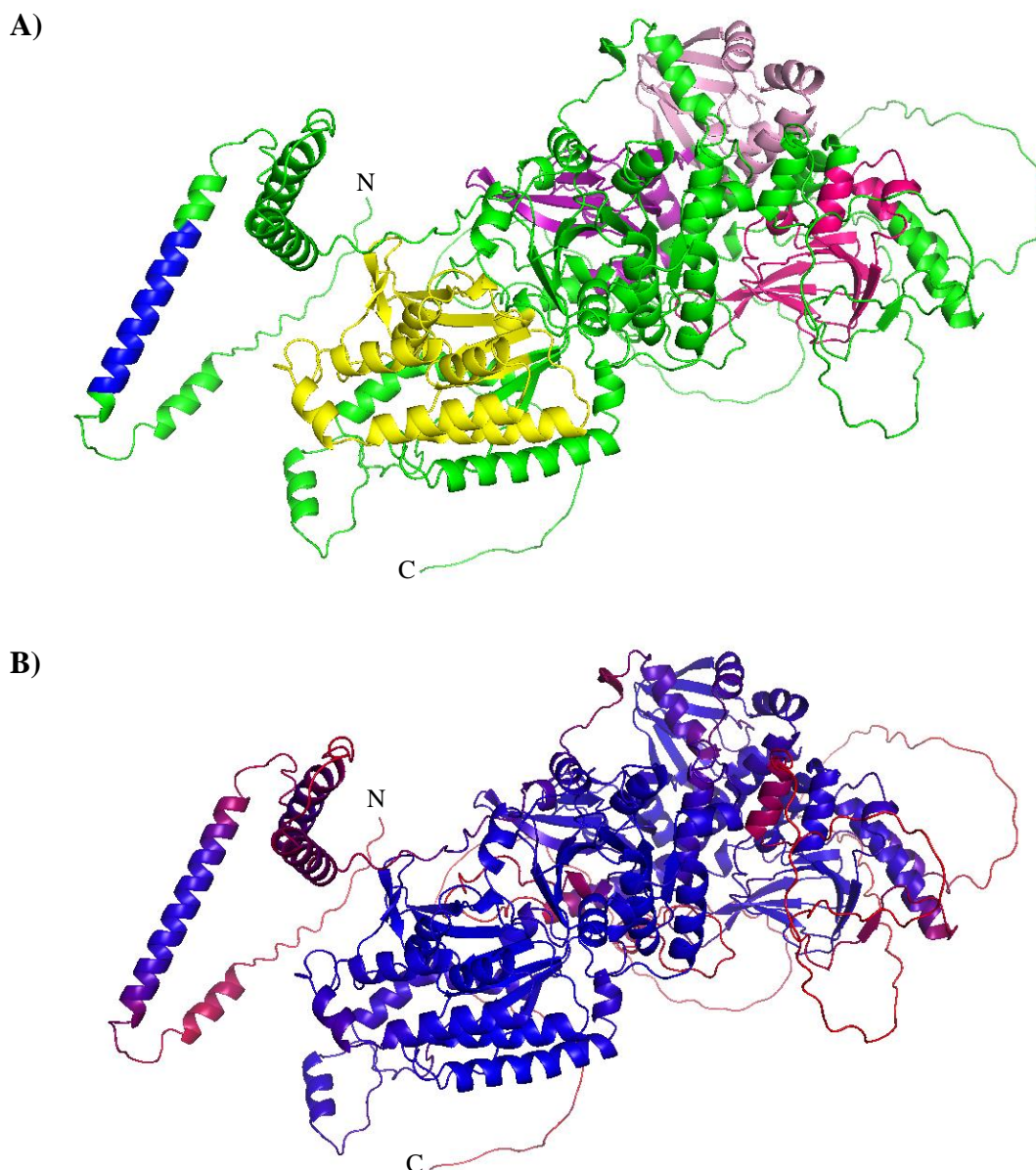
Kao što je spomenuto ranije, istraživanja su pokazala da je promotor *PNPLA7* hipermetiliran u hepatocelularnom karcinomu i staničnoj liniji HepG2 što rezultira smanjenjem ekspresije *PNPLA7* u odnosu na zdrave stanice jetre.¹⁴⁶ Rezultati provedenog istraživanja su u podudarnosti s literaturnim podacima, što sugerira da je unatoč smanjenoj ekspresiji u tumorskim stanicama, PNPLA7 reguliran na isti način kao i u zdravim stanicama. Stoga, bilo bi zanimljivo usporediti imaju li navedeni tretmani isti utjecaj na PNPLA7 u zdravim stanicama jetre obzirom da bi predstavljale bolji i vjerodostojniji model jetre jer bolje opisuju stanje *in vivo*.²⁰⁹⁻²¹¹ Dostupnost primarnih stanica jetre, vrlo često je limitirana, i mogućnost njihove diobe je ograničena, što samim time ograničava i broj pasaža kao i u slučaju primarnih stanica skeletnih mišića.^{210,211} Međutim, stanična linija HepG2 vrlo često se koristi kao model jetre u širokom spektru istraživanja, uključujući istraživanja metabolizma ksenobiotika i toksičnosti teških metala, nanočestica i potencijalnih lijekova *in vitro*.^{209,211} Stanična linija HepG2 izolirana je iz uzorka tkiva jetre 15-godišnjaka oboljelog od hepatocelularnog karcinoma jetre, no prema citološkim karakteristikama, stanice HepG2 su sličnije tumorskim stanicama hepatoblastoma, ali imaju i karakteristike slične zdravim stanicama jetre. Stoga, ne može se sa sigurnošću zaključiti bi li se i konačni rezultati i zapažanja mogla razlikovati.^{209,211} No, kako su zabilježeni učinci na ekspresiju PNPLA7 ipak povezani s bazičnim metabolizmom glukoze koji je očuvan i u stanicama skeletnih mišića, pretpostavlja se da bi i ovaj učinak na PNPLA7 bio jednak. Također, kako je već navedeno, u rezultatima istraživanja regulacije PNPLA7 mogu se uočiti i

varijacije rezultata u biološkim replikatima, tj. donora miotubula, te biološkim replikatima u slučaju stanica HepG2 što otežava interpretaciju rezultata.

Zaključno, dobiveni rezultati pokazuju da povećanjem koncentracije glukoze dolazi do značajnog smanjenja ekspresije PNPLA7, a isto tako, inzulin značajno smanjuje razinu PNPLA7 u miotubulima i staničnoj liniji HepG2 što upućuje na sličan i vjerojatno očuvan način regulacije u navedenim staničnim modelima metabolički aktivnih tkiva. Isto tako, dobiveni rezultati sugeriraju na uključenost PNPLA7 u metabolizam energije, odnosno u katabolizam, i uključenost u procese koje inhibiraju prisutnost glukoze i djelovanje inzulina što predstavlja osnovu za daljnja istraživanja.

4.2. Ekspresija ljudskog rekombinantnog enzima PNPLA7 i procjena PNPLA7 kao mete organofosfornih spojeva

Na slici 20 prikazana je 3D struktura dulje konsenzusne izoforme PNPLA7 (UniProt kod: Q6ZV29-5) predviđena sustavom AlphaFold2, na kojoj je provedeno ovo istraživanje.



Slika 20. Predviđena struktura dulje konsenzusne izoforme ljudskog proteina PNPLA7 (UniProt kod: Q6ZV29-5) sustavom AlphaFold2: **A)** prikaz organizacije domena prema UniProt bazi podataka: transmembranska domena (plavo), tri vezna mjesta za cikličke nukleotide (svjetlo ružičasto, ružičasto, ljubičasto), patatinska domena (žuto). **B)** prikaz prema vrijednosti pLDDT (engl. *predicted Local Distance Difference Test*), tzv. mjera pouzdanosti predikcije u lokalnu strukturu, plavo - visoka vrijednost pLDDT, crveno - niska vrijednost pLDDT. N - N-terminalni kraj, C - terminalni kraj.

Prema bazi podataka UniProt, predviđa se da ljudski protein PNPLA7 (UniProt kod: Q6ZV29-5) sadrži jednu transmembransku domenu duljine 20 aminokiselina (38.-58. aminokiselina u slijedu), tri vezna mjesta za cikličke nukleotide (CNB); CNB 1 duljine 127 aminokiselina (170.-297. aminokiselina u slijedu), CNB 2 i CNB 3 duljine 105 aminokiselina (483.-588. aminokiselina i 616.-721. aminokiselina u slijedu) i patatinsku domenu duljine 166 aminokiselina (953.-1119. aminokiselina u slijedu). Aktivno mjesto nalazi se u patatinskoj domeni, a sadrži katalitičku dijadu Ser983 i Asp1106 te oksianionsku šupljinu Gly957-Gly958-Gly959-Ala960-Arg961-Gly961. U katalitičkoj dijadi, Ser983 ima ulogu nukleofila i dio je očuvanog motiva Gly981-Thr982-Ser983-Ile984-Gly985, a Asp1106 ima ulogu opće baze i opće kiseline i dio je očuvanog motiva Asp1106-Gly1107-Gly1108.

U prvom koraku istraživanja, izoliran je nukleotidni slijed cijelog proteina PNPLA7 iz uzorka ljudskih primarnih stanica skeletnih mišića (jedan nasumično odabran donor), a nakon sekvenciranja i analize nukleotidnog slijeda primijećene su dvije mutacije na sljedećim položajima:

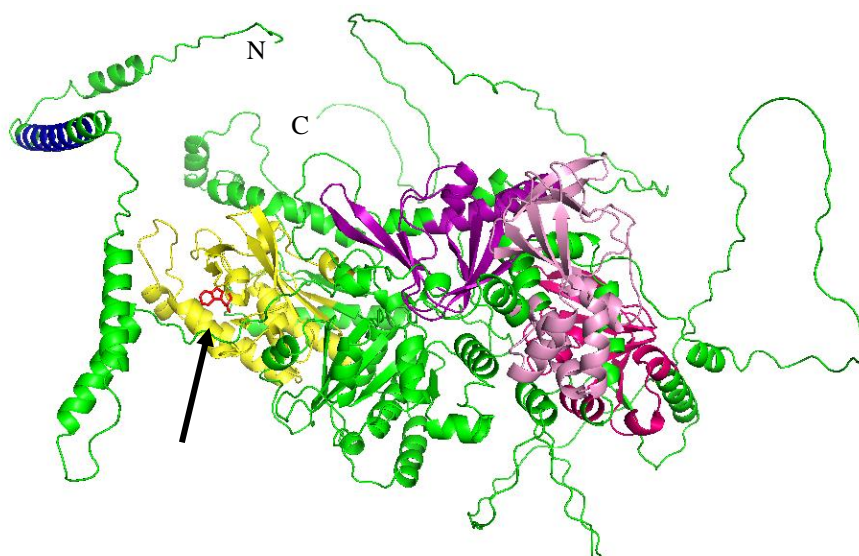
1. Mutacija citozina u timin na položaju 453 u nukleotidnom slijedu što rezultira promjenom kodona GAC → GAT, ali ne uzrokuje mutaciju aminokiseline (Asp151), tzv. tiha mutacija.
2. Mutacija timina u citozin na položaju 3238 u nukleotidnom slijedu što rezultira promjenom kodona TGG → CGG, a posljedično i promjenom aminokiseline triptofan u arginin na položaju 1080 u aminokiselinskom slijedu koja se nalazi u patatinskoj domeni.

S obzirom na prisutnost mutacije Trp1080Arg, korišten je alat BLAST radi provjere postoji li zabilježena sekvenca PNPLA7 koja sadrži mutaciju na istom položaju u aminokiselinskim slijedu. Rezultati BLAST analize (pristupljeno 26. travnja 2024.) pokazali su da je zabilježeno nekoliko ljudskih aminokiselinskih sljedova PNPLA7 koje pokazuju 99 % sličnosti sa slijedom korištenom u ovom istraživanju, a koje sadrže navedenu mutaciju sljedećih pristupnih brojeva:

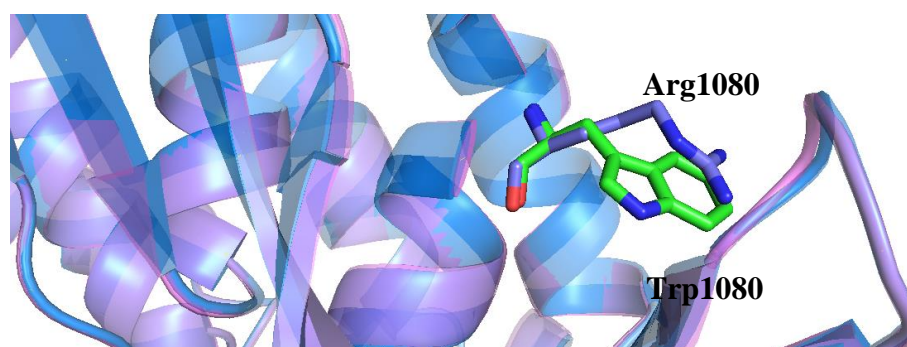
1. KAI2554787.1 i KAI2554788.1 iz potpuno sekvenciranog i obilježenog genoma muškarca iz Puerto Rica referentne kvalitete,²¹²
2. BAC86036.1 iz projekta NEPO *Human cDNA sequencing project* iz Japana,²¹³
3. XP_054218918.1, XP_054218919.1, XP_054218920.1 i XP_05428921.1 predviđenih automatskom komputacijskom analizom iz sekvence genoma pristupnog broja NC_060933.²¹⁴

Budući da je nukleotidni slijed cijelog proteina PNPLA7 izoliran iz uzorka skeletnog mišića ljudskog donora, postoji mogućnost da je ova mutacija prirodno zastupljena i da je specifična za pojedince. Na **slici 21.A**, prikazan je položaj aminokiseline Arg1080 u strukturi cijelog ljudskog proteina PNPLA7, a na **slici 21.B** prikazana je usporedba struktura aminokiselina Arg1080 i Trp1080 dobivena sustavom ColabFold, koji je korišten za izradu modela strukture patatinske domene.

A)



B)



Slika 21. **A)** Položaj aminokiseline Trp1080 koja je mutirana u Arg1080 u strukturi cijelog ljudskog proteina PNPLA7 predviđenoj sustavom AlphaFold2. Crna strelica pokazuje na položaj mutacije u strukturi cijelog proteina, a aminokiselina Trp1080 prikazana je u obliku štapića crvene boje. **B)** Usporedba struktura aminokiselina Arg1080 i Trp1080 dobivena sustavom ColabFold, koji je korišten za izradu modela strukture patatinske domene. Aminokiseline Trp1080 (zeleno) i Arg1080 (plavo) prikazane su u obliku štapića. N - N-terminalni kraj, C - terminalni kraj.

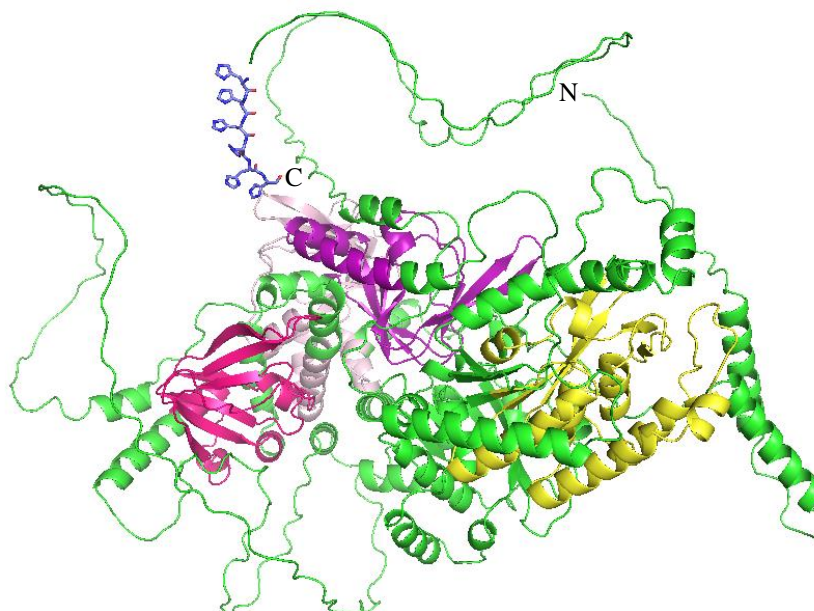
Naime, može se uočiti da se Arg1080 nalazi na površini proteina, stoga se ne očekuje da utječe na samu aktivnost aktivnog mjesta, ali ipak uloga ove aminokiseline u enzimskoj aktivnosti, lokalizaciji ili interakciji s drugim proteinima zasad ostaje nepoznata te je potrebno dodatno

istražiti i potvrditi. S obzirom na navedeno, upotreba nukleotidnog slijeda proteina PNPLA7 s navedenom mutacijom nastavljena je u sljedećim pokusima.

4.2.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje -TM PNPLA7

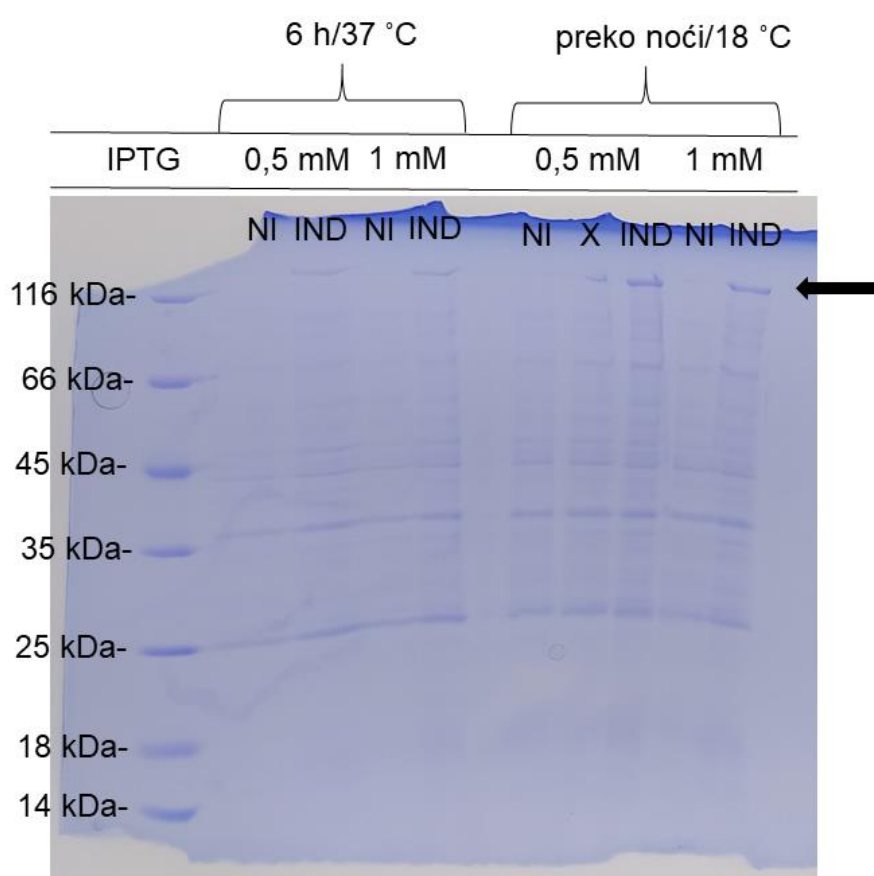
Membranski proteini čine 20-30 % ukupnog broja proteina u eukariotskim i prokariotskim stanicama i imaju važnu ulogu u brojnim staničnim procesima.²¹⁵ Međutim, hidrofobna svojstva membranskih proteina i njihova slaba topljivost u vodenim otopinama predstavljaju izazov u njihovoj ekspresiji i pročišćavanju jer je potrebna upotreba deterdženata ili drugih tvari za povećanje njihove topljivosti, no upotreba deterdženata može imati negativan utjecaj na njihovu strukturu i funkciju.²¹⁰ Također, prekomjerna ekspresija membranskih proteina vrlo često je karakterizirana njihovom agregacijom u citosolu ili u obliku inkluzijskih tijela.²¹⁰

U prvom koraku provedenog istraživanja, prekomjerno je eksprimiran PNPLA7 bez transmembranske domene (-TM PNPLA7) sa svrhom povećanja topljivosti ovog proteina. Stoga, nukleotidni slijed PNPLA7 bez prvih 174 nukleotida, tj. bez prvih 58 aminokiselina, je ukloniran u ekspresijski vektor pET-21a(+) u takvoj orijentaciji da se histidinski privjesak (His₆) nalazi na C-terminalnom kraju. Nukleotidni slijed -TM PNPLA7 prevodi se u 1292 aminokiseline (149,5 kDa), a njegova pretpostavljena struktura (sustav ColabFold) prikazana je na **slici 22**.



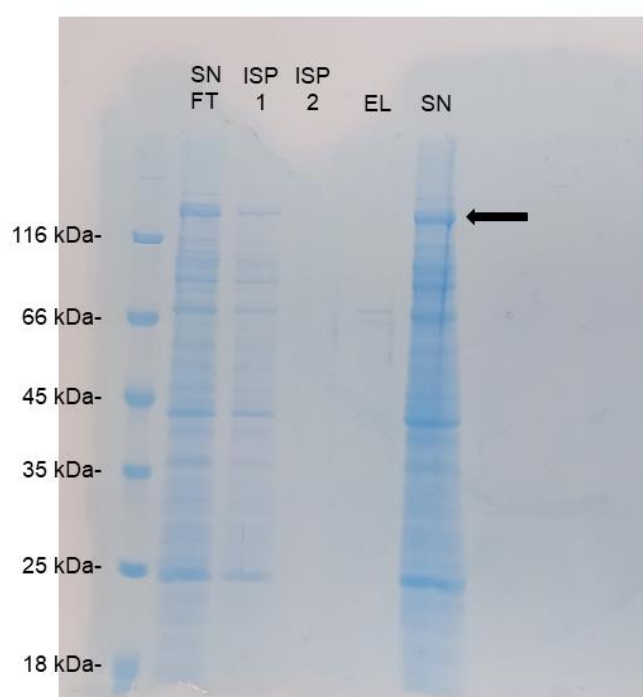
Slika 22. Prikaz modela strukture proteina -TM PNPLA7 predviđen sustavom ColabFold. Vezna mjesta za cikličke nukleotide prikazana su svjetlo ružičastom, ružičastom, ljubičastom bojom, patatinska domena žutom bojom, a histidinski privjesak u obliku štapića ljubičaste boje. C - C-terminalni kraj, N - N-terminalni kraj proteina.

Za prekomjernu ekspresiju -TM PNPLA7, odabran je bakterijski soj *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. Prekomjerna ekspresija potaknuta je dodatkom IPTG-a kao stimulatora *lac* operona i provedena je pri 37 °C u trajanju od 6 h i pri 18 °C preko noći uz konstantno miješanje u inkubatoru. Rezultati prekomjerne ekspresije prikazani su na **slici 23** i pokazuju prisutnost proteinske vrpce iznad vrpce markera molekulske mase koja iznosi 116 kDa koji odgovara očekivanoj veličini -TM PNPLA7 pri 149,5 kDa. Također, može se uočiti da je indukcija prekomjerne ekspresije bila veća dodatkom 1 mmol dm⁻³ IPTG-a. Međutim, vrpca koja odgovara prekomjerno eksprimiranom -TM PNPLA7 nije visokog intenziteta, što je i očekivano s obzirom na veličinu samog produkta translacije.



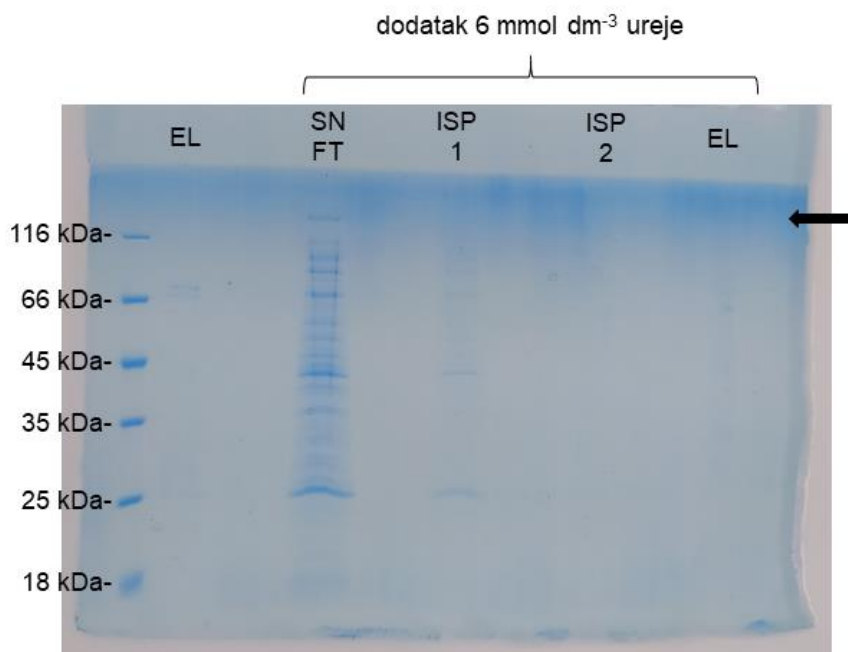
Slika 23. Rezultati prekomjerne ekspresije -TM PNPLA7 u bakterijskom soju *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus analizirani metodom SDS-PAGE. Prekomjerna ekspresija inducirana je dodatkom 0,5 ili 1 mmol dm⁻³ IPTG-a, u trajanju od 6 h pri 37 °C ili preko noći pri 18 °C. **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura. Crna strelica označava proteinsku vrpca na gelu pri otprilike 149,5 kDa koja odgovara molekulskoj masi -TM PNPLA7.

U sljedećem koraku, supernatant liziranih stanica *E. coli* induciranih 1 mmol dm^{-3} IPTG-om, nanesen je na kromatografsku kolonu koja sadrži Ni-NTA smolu za afinitetno pročišćavanje u nativnim uvjetima, a rezultati pročišćavanja prikazani su na **slici 24**. Može se primijetiti da je vrpca koja odgovara -TM PNPLA7, najvećeg intenziteta u frakciji supernatanta koji je prošao kroz kolonu (SN FT) što sugerira da se protein jako slabo veže na kromatografsku kolonu. Isto tako, vrpca koja odgovara -TM PNPLA7 prisutna je u frakcijama pufera za ispiranja 1 i pufera za eluiranje, ali je jako niskog intenziteta što upućuje na činjenicu da u nativnim uvjetima nije moguće izolirati veću količinu ovog proteina.



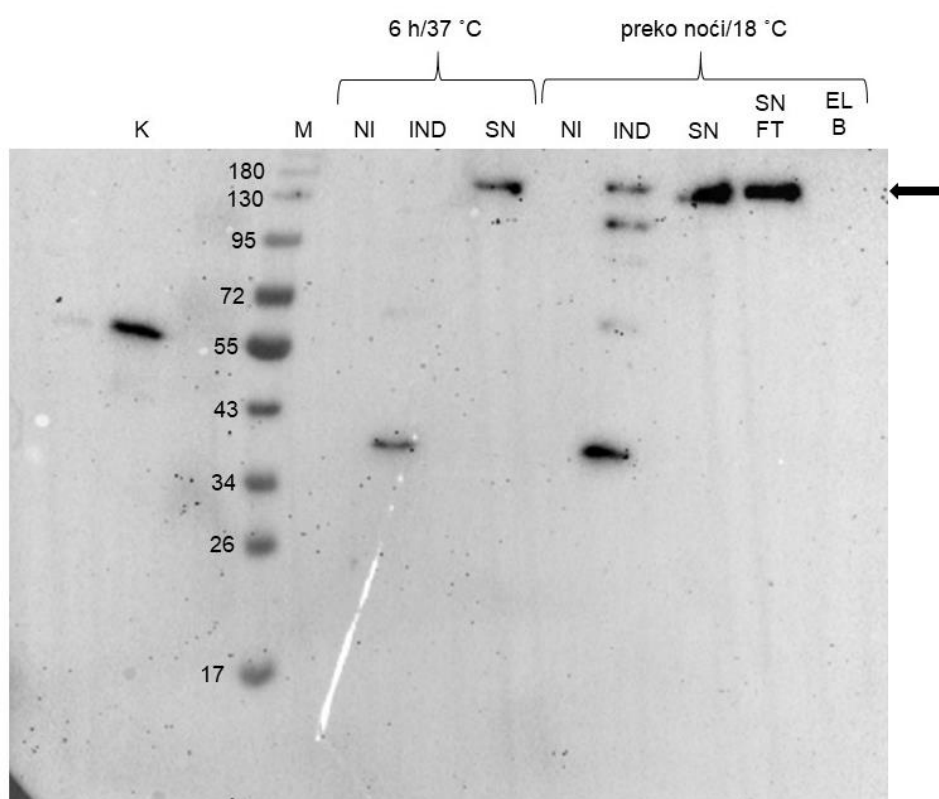
Slika 24. Rezultati pročišćavanja -TM PNPLA7 na gravitacijskoj kromatografskoj Ni-NTA koloni u nativnim uvjetima analizirani metodom SDS-PAGE. **SN FT** - supernatant lizata bakterijskih stanica koji je propušten kroz kolonu. **ISP 1** - pufer za ispiranje 1, **ISP 2** - pufer za ispiranje 2, **EL** - pufer za eluciju, **SN** - supernatant lizata bakterijskih stanica prije nanošenja na kromatografsku kolonu. Crna strelica označava proteinsku rpu na gelu pri otprilike 149,5 kDa koja odgovara molekulskoj masi -TM PNPLA7.

U sljedećem koraku, provedeno je pročišćavanje u denaturirajućim uvjetima, a rezultati pročišćavanja prikazani su na **slici 25**. Kao i u nativnim uvjetima, proteinska vrpca koja odgovara -TM PNPLA7 je najjačeg intenziteta u frakciji SN FT, dok u ostalim frakcijama nije prisutna.



Slika 25. Rezultati pročišćavanja -TM PNPLA7 na gravitacijskoj kromatografskoj Ni-NTA koloni u denaturirajućim uvjetima analizirani metodom SDS-PAGE. **SN FT** - supernatant lizata bakterijskih stanica koji je propušten kroz kolonu. **ISP 1** - pufer za ispiranje 1, **ISP 2** - pufer za ispiranje 2, **EL** - pufer za eluciju, **SN** - supernatant lizata bakterijskih stanica prije nanošenja na kromatografsku kolonu. Crna strelica označava proteinsku vrpca na gelu pri otprilike 149,5 kDa koja odgovara molekulskej masi -TM PNPLA7.

Radi dodatne potvrde prisutnosti proteinske vrpce -TM PNPLA7, provedena je Western analiza koristeći primarno protutijelo prema histidinskom privjesku. Rezultati Western analize prikazani su na **slici 26** i potvrđuju prisutnost -TM PNPLA7 u supernatantu i frakciji SN FT, ali ne i u elucijskom puferu što potvrđuje pretpostavku da se protein jako slabo vezao na kolonu. Isto tako, može se uočiti prisutnost i tri dodatne vrpce pri ~ 100 kDa, 90 kDa i 40 kDa u uzorku *E. coli* induciranih IPTG-om što upućuje na razgradnju produkta translacije. Također, u uzorcima *E. coli* induciranih IPTG-om, u kojima je prekomjerna ekspresija trajala preko noći pri 18 °C, vrpca koja odgovara -TM PNPLA7 je jačeg intenziteta što znači da su navedeni uvjeti bolji za prekomjernu ekspresiju u odnosu na prekomjernu ekspresiju u trajanju od 6 sati pri 37 °C.

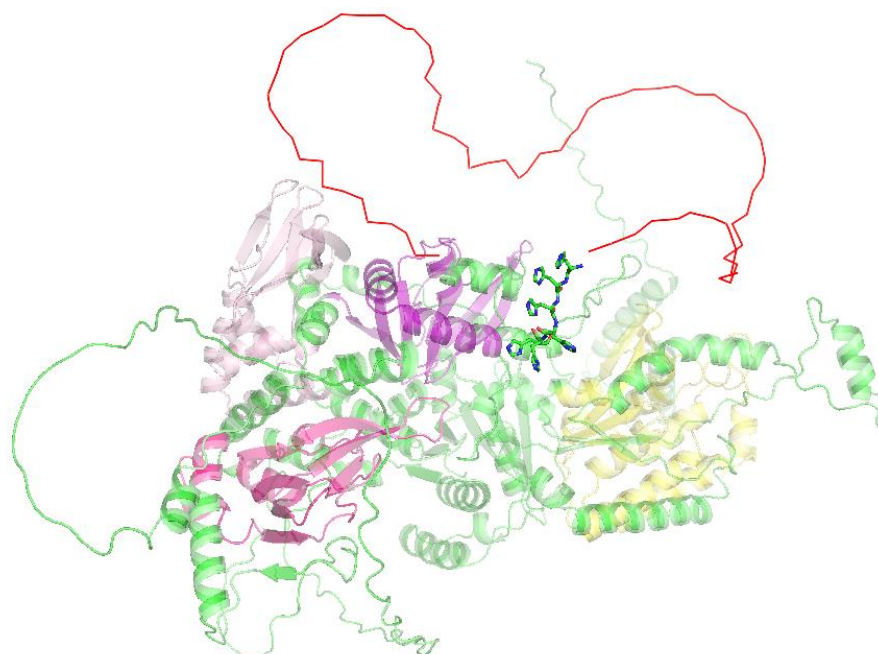


Slika 26. Rezultati prekomjerne ekspresije -TM PNPLA7 u bakterijskom soju *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus i pročišćavanja na kromatografskoj Ni-NTA koloni u nativnim uvjetima analizirani Western analizom. **K** - pozitivna kontrola za histidinski privjesak (mišji PNPLA2), **M** - marker molekulskih masa (kDa), **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura, **SN** - supernatant lizata bakterijskih stanica prije nanošenja na kromatografsku kolonu, **SN FT** - supernatant lizata bakterijskih stanica koji je propušten kroz kolonu, **EL** - pufer za eluciju. Crna strelica označava proteinsku vrpcu na membrani pri otprilike 149,5 kDa koja odgovara molekulskoj masi -TM PNPLA7.

Uzimajući u obzir sve dobivene rezultate, može se zaključiti kako pročišćavanje proteina PNPLA7 bez transmembranske domene (-TM PNPLA7) nije bilo uspješno. Iako je prekomjerna ekspresija dokazana, ovakav konstrukt velike molekulske mase većinom u ostaje u netopljivoj frakciji. Isto tako, treba uzeti u obzir da nije optimiziran sadržaj kodona, a svaki organizam ima drugačiju upotrebu kodona.²¹⁶ Također, proteini velike molekulske mase mogu biti toksični za bakterijske stanice, teže se smataju u odnosu na proteine male molekulske mase, a za njihovu pravilno smatanje vrlo često su potrebni šaperoni.²¹⁷⁻²²⁰ Ukoliko količina šaperona nije dovoljna, proteini se mogu samo djelomično smotati ili smotati u krivu konformaciju što može rezultirati nastajanjem topljivih agregata i/ili inkluzijskih tijela.²¹⁸ Izolacija proteina iz topljivih agregata ili inkluzijskih proteina je moguća, ali optimizacija uvjeta solubilizacije i renaturacije je vrlo zahtjevna jer je svaki protein jedinstven.²¹⁸ Ujedno, ako su za enzimsku

aktivnost ili pravilno smatanje proteina potrebne posttranslacijske modifikacije, bakterijske stanice nisu dobar ekspresijski sustav jer nemaju razvijene sustave za posttranslacijske modifikacije.²¹⁸

Nakon detaljnog proučavanja AlphaFold2 modela strukture PNPLA7, uočena je prisutnost fleksibilne petlje duljine skoro 100 aminokiselina (1269.-1342. aminokiselina u slijedu) na C-terminalnom kraju gdje se nalazi His₆ privjesak (**slika 27**). Naime, petlje su vrlo često nestrukturirani i fleksibilni motivi sekundarne strukture proteina, a imaju važnu ulogu u ostvarivanju interakcije proteina s drugim proteinima ili organelima, enzimskoj aktivnosti ili alosteričkoj modulaciji.^{221,222} Postoji mogućnost da je navedena petlja na čijem kraju se nalazi His₆ privjesak skrivena u strukturi proteina ili nije dovoljno izložena za vezanje za Ni-NTA kromatografsku kolonu. Isto tako, u predviđenoj strukturi može se uočiti prisutnost i drugih dugačkih petlji, tj. prisutnost dugačke petlje između transmembranske domene i CNB 1 te između CNB 1 i 2.

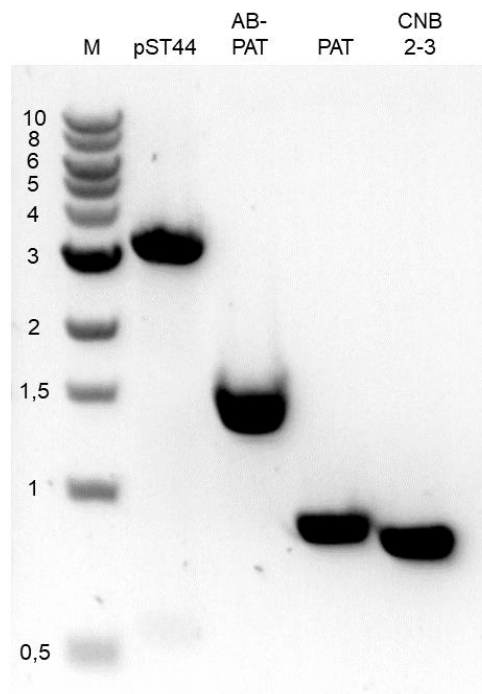


Slika 27. Prikaz dugačke petlje (crvena boja, 1269.-1342. aminokiselina u slijedu) na C-terminalnom kraju -TM PNPLA7 na kojem se nalazi histidinski privjesak prikazan u obliku štapića dobivena sustavom ColabFold.

4.2.2. Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje PAT PNPLA7, AB-PAT PNPLA7 i CNB 2-3 PNPLA7

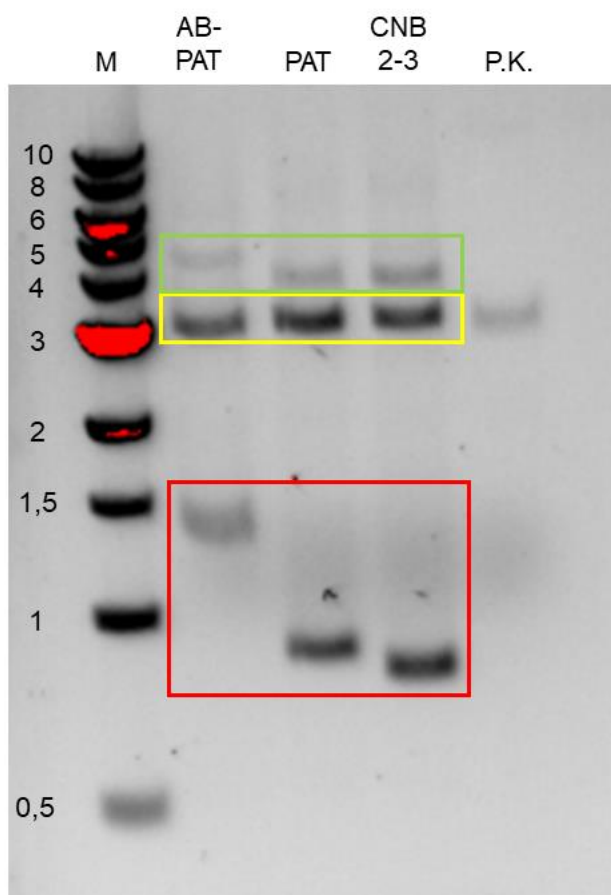
Koristeći AlphaFold2 model kao vodilju, pripremljeni su kraći konstrukti proteina PNPLA7 pri čemu su uklonjene dugačke petlje i drugi nestrukturirani motivi koji mogu imati negativan utjecaj na prekomjernu ekspresiju i pročišćavanje. Istraživanja su pokazala da je patatinska domena koja sadrži aktivno mjesto, katalitički kompetentna i bez ostatka enzima.⁷ Stoga, kao prvi konstrukt odabrana je upravo patatinska domena duljine 876 nukleotida koja se prevodi u 292 aminokiseline. U blizini patatinske domene, uočena je prisutnost domene karakterizirane α/β motivima za koju AlphaFold2 model pokazuje visoku vrijednost pLDDT (pLDDT > 90), čak veću vrijednost od CNB 1-3. Navedena domena se nalazi između CNB 3 i patatinske domene u aminokiselinskom slijedu, a njezina funkcija je zasad nepoznata. Međutim, pretpostavlja se da ima ulogu u interakciji s lipidnim kapljicama,¹⁴² a i potencijalnu važnost u aktivnosti enzima zbog blizine patatinske domene. Stoga, kao drugi konstrukt odabrana je navedena domena i patatinska domena (AB-patatinska domena) duljine 1470 nukleotida koji se prevodi u 490 aminokiseline. Na kraju, kao treći konstrukt odabrana su vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3) duljine 801 nukleotida koji se prevodi u slijed od 267 aminokiseline. Iako PNPLA7 sadrži tri vezna mjesta za cikličke nukleotide, između CNB 1 i 2 je prisutna dugačka fleksibilna petlja koja potencijalno može imati negativan utjecaj na prekomjernu ekspresiju i pročišćavanje, stoga nije uzeta u obzir. Kao ekspresijski vektor, korišten je vektor pST44 koji je prethodno korišten za uspješnu prekomjernu ekspresiju patatinske domene mišjeg proteina PNPLA2 u laboratoriju prof. dr. sc. Monike Oberer (Graz, Austrija).^{168,168} Produkt translacije navedenog vektora sljedećim poretком od N-terminalnog kraja prema C-terminalnom kraju sadrži: histidinski privjesak, protein SUMO, vezno mjesto i mjesto cijepanja proteaze TEV, patatinsku domenu mišjeg PNPLA2 i StrepII privjesak (poglavlje materijali i metode, odjeljak 3.2.4., **slika 10**). Stoga, u prvom koraku uklonjena je patatinska domena PNPLA2 i na njeno mjesto su uklonirani odabrani skraćeni konstrukti PNPLA7 tzv. metodom *Gibson assembly*. Za provedbu metode *Gibson assembly*, dizajnirane su specifične početnice za umnažanje odabranih konstrukata PNPLA7, a koje ujedno sadrže slijed nukleotida koji se preklapa sa nukleotidnim slijedom vektora pST44. Koristeći početnice dizajnirane za *Gibson assembly*, metodom PCR je umnožen ekspresijski vektor pST44 i skraćeni konstrukti PNPLA7 iz ekspresijskog vektora pET21a(+), koji sadrži nukleotidni slijed -TM PNPLA7, a uspješnost metode PCR potvrđena je agaroznom elektroforezom na gelu (**slika 28**). Ukupna duljina ekspresijskog vektora pST44 s patatinskom domenom PNPLA2 iznosi

4106 parova baza, a korištenjem specifično dizajniranih početnica, umnožen je pST44 vektor bez patatinske domene PNPLA7 duljine 3236 nukleotida. Isto tako, uspješno su umnožene sekvence skraćenih konstrukata PNPLA7 odgovarajućih duljina.



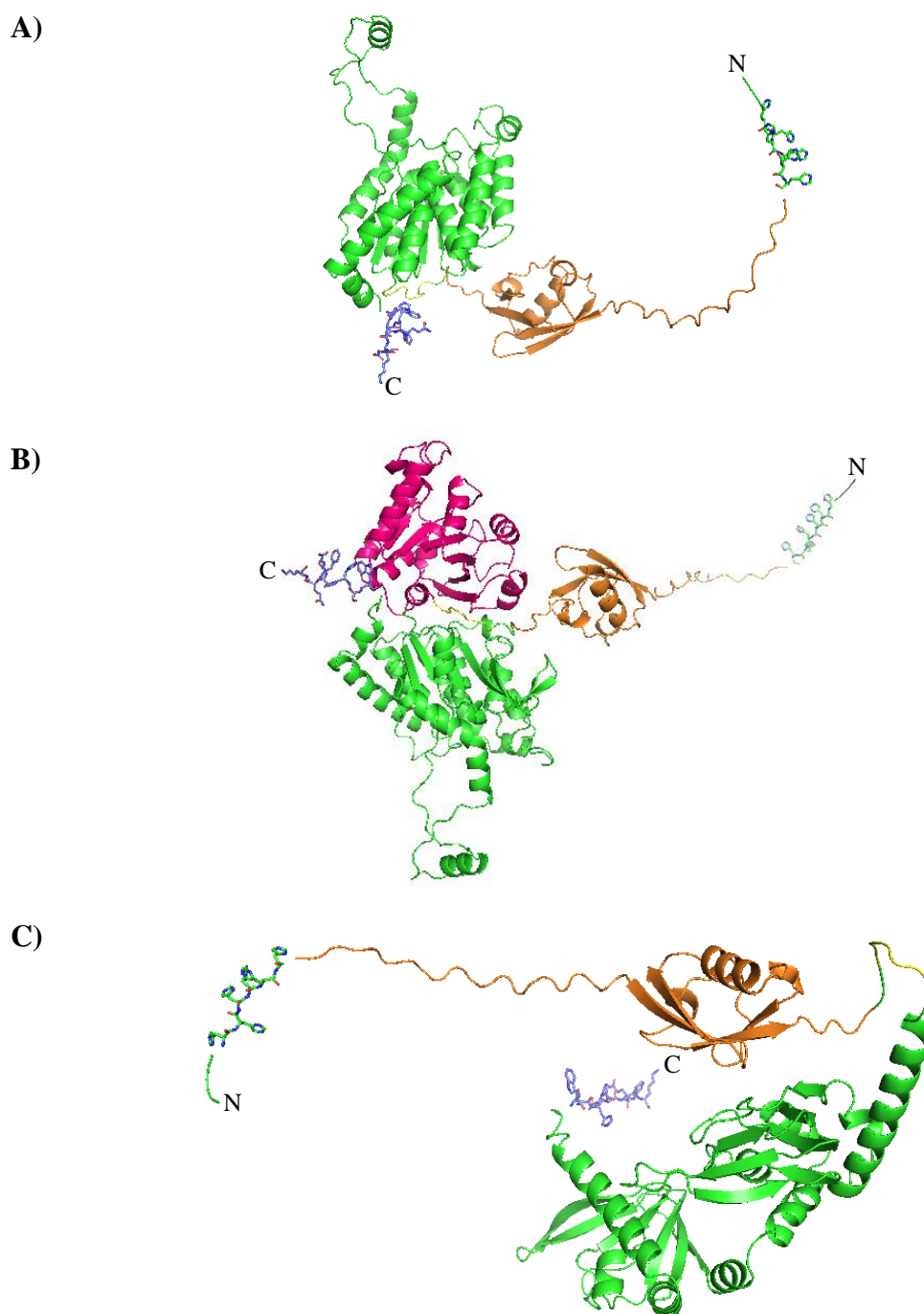
Slika 28. Rezultati umnažanja ekspresijskog vektora **pST44** (3236 nukleotida), AB-patatinske domene (**AB-PAT**, 1470 nukleotida), patatinske domene (**PAT**, 876 nukleotida) i veznih mjesta za cikličke nukleotide (**CNB 2-3**, 801 nukleotida) PNPLA7 metodom PCR analizirani agaroznom elektroforezom na gelu. **M** - marker molekulskih masa (kilobaza, kb).

U sljedećem koraku, provedena je metoda *Gibson assembly* koristeći specifično dizajnirane početnice, vektor pST44 i skraćene konstrukte PNPLA7 koji su umnoženi metodom PCR. Uspješnost provedene metode potvrđena je agaroznom elektroforezom na gelu, a rezultati su prikazani na **slici 29**. Rezultati pokazuju uspješnost kloniranja, ali obzirom na slabiji intenzitet vrpce, prinos reakcije nije bio visok. Isto tako, nizak prinos reakcije potvrđuje i prisutnost vrpce koje odgovaraju reaktantima reakcije, točnije praznom vektoru pST44 i skraćenim konstruktima PNPLA7. Unatoč niskom prinosu metode *Gibson assembly*, bakterijski soj *E. coli* DH5 α transformiran je ekspresijskim vektorom pST44 koji sadrži AB-PAT, PAT ili CNB 2-3 PNPLA7, uzgojen u prekonoćnoj kulturi i na kraju je izolirana plazmidna DNA za sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja plazmidne DNA potvrdili su da je bakterijski soj *E. coli* DH5 α zaista transformiran ekspresijskim vektorom koji sadrži željene kraće konstrukte PNPLA7.



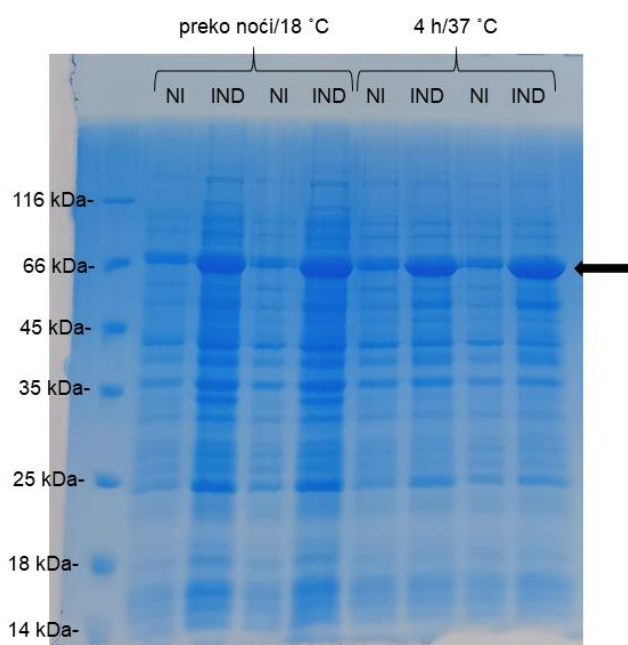
Slika 29. Rezultati kloniranja metodom *Gibson assembly* analizirani agaroznom elektroforezom na gelu. **M** - marker molekulskih masa (kb), **AB PAT** - AB-patatinska domena, **PAT** - patatinska domena, **CNB 2-3** - vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3, **P.K.** - pozitivna kontrola dobivena uz komercijalni komplet *NEBuilder® HiFi DNA Assembly kit* (*New England Biolabs*, Ipswich, SAD). Zeleni okvir - produkti metode *Gibson assembly*, tj. skraćeni konstrukti PNPLA7 uspješno uklonirani u pST44 vektor, žuti okvir - prazan ekspresijski vektor pST44, crveni okvir - skraćeni konstrukti PNPLA7.

Prije početka prekomjerne ekspresije i pročišćavanja skraćenih konstrukata PNPLA7, vizualizirane su strukture skraćenih konstrukata dobivenih sustavom ColabFold za predviđanje potencijalne strukture, a modeli pretpostavljenih struktura prikazani su na **slici 30**.

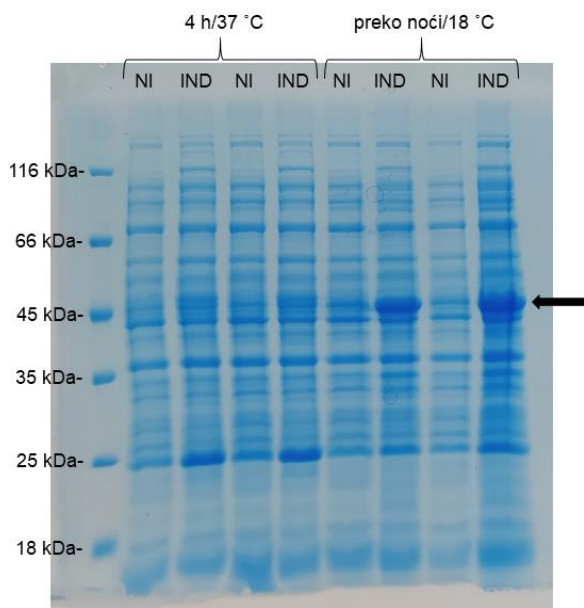


Slika 30. Prikaz 3D struktura: **A)** patatinske domene, **B)** AB-patatinske domene i **C)** veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3) predviđene sustavom ColabFold. AB-domena prikazana je ružičastom bojom, a CNB 2-3 i patatinska domena zelenom bojom, protein SUMO narančastom bojom, vezno mjesto za proteazu TEV žutom bojom. Histidinski privjesak (zeleno) i streptavidinski privjesak (ljubičasta boja) prikazani su u obliku štapića. C - C-terminalni kraj, N - N-terminalni kraj proteina.

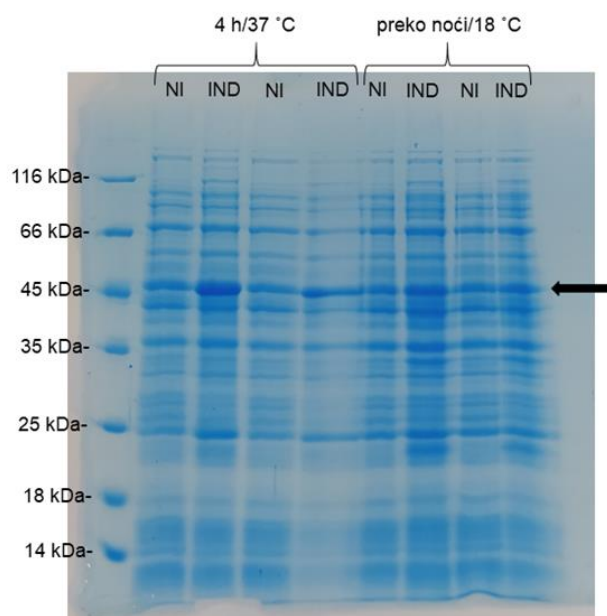
Za prekomjernu ekspresiju sva tri konstrukta PNPLA7, ponovno je odabran bakterijski soj *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus. Prekomjerna ekspresija potaknuta je dodatkom IPTG-a i provedena je pri 37 °C u trajanju od 4 h i pri 18 °C preko noći uz konstantno miješanje u inkubatoru. Po završetku indukcije prekomjerne ekspresije, bakterijske stanice su lizirane u istom puferu za lizu stanica kao i za -TM PNPLA7, homogenizirane i sonificirane. Rezultati prekomjerne ekspresije AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7, prikazani su na slikama 31-33. Prekomjerna ekspresija sva tri kraća konstrukta PNPLA7 bila je puno veća u odnosu na -TM PNPLA7 što je pokazano prisutnošću proteinskih vrpca visokog intenziteta na SDS-poliakrilamidnom gelu (Slike 31-33). Isto tako, može se uočiti da je AB-PAT jednako dobro prekomjerno ekspimiran u kraćem vremenskom razdoblju pri 37 °C i preko noći pri 18 °C (slika 31). Međutim, PAT je bolje prekomjerno ekspimiran pri 18 °C preko noći, kao i patatinska domena mišjeg PNPLA2 (slika 32),¹⁶⁸ dok je CNB 2-3 bolje prekomjerno ekspimiran u 4 h pri 37 °C (slika 33).



Slika 31. Rezultati prekomjerne ekspresije AB-patatinske domene (AB-PAT) PNPLA7 u bakterijskom soju *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus analizirani metodom SDS-PAGE. Prekomjerna ekspresija inducirana je dodatkom 1 mmol dm⁻³ IPTG-a, u trajanju od 4 h pri 37 °C ili preko noći pri 18 °C. **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura. Crna strelica označava proteinsku vrpcu na gelu pri oko 70 kDa koja odgovara molekularnoj masi AB-patatinske domene PNPLA7. Brojevi s lijeve strane gela i vrpce označuju marker molekularnih masa.

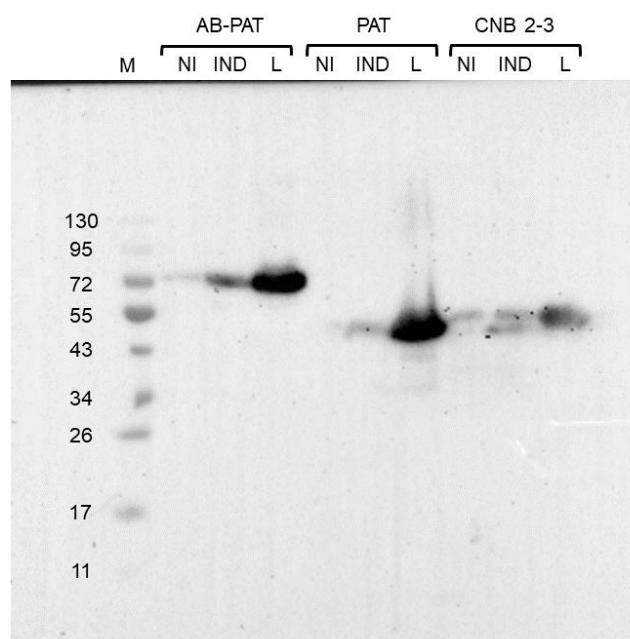


Slika 32. Rezultati prekomjerne ekspresije patatinske domene (PAT) PNPLA7 u bakterijskom soju *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus analizirani metodom SDS-PAGE. Prekomjerna ekspresija inducirana je dodatkom 1 mmol dm^{-3} IPTG-a, u trajanju od 4 h pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ili preko noći pri $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura. Crna strelica označava proteinsku vrpce na gelu pri 47 kDa koja odgovara molekularnoj masi patatinske domene PNPLA7. Brojevi s lijeve strane gela i vrpce označuju marker molekularnih masa.



Slika 33. Rezultati prekomjerne ekspresije veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3) PNPLA7 u bakterijskom soju *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus analizirani metodom SDS-PAGE. Prekomjerna ekspresija inducirana je dodatkom 1 mmol dm^{-3} IPTG-a, u trajanju od 4 h pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ili preko noći pri $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura. Crna strelica označava proteinsku vrpce na gelu pri 44 kDa koja odgovara molekularnoj masi CNB 2-3 PNPLA7. Brojevi s lijeve strane gela i vrpce označuju marker molekularnih masa.

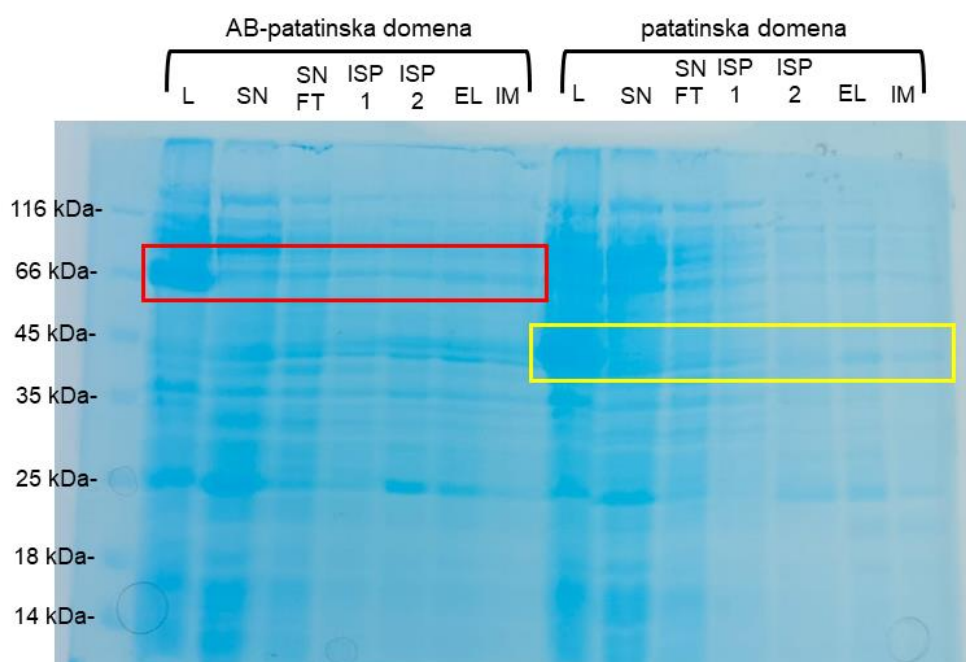
Radi dodatne potvrde, provedena je Western analiza, a rezultati su prikazani na **slici 34**. Rezultati Western analize, pokazali su prisutnost imunoreaktivne proteinske vrpce visokog intenziteta u uzorcima IND i L pri oko 70 kDa koja odgovara AB-PAT (69,1 kDa). Isto tako, potvrđena je prisutnost imunoreaktivne proteinske vrpce pri 47 kDa koja odgovara PAT, a pri 44 kDa CNB 2-3. U svim uzorcima NI može se uočiti i prisutnost proteinskih vrpce niskog intenziteta čija molekulska masa odgovara konstruktima PNPLA7 što upućuje na tzv. "cureću" ekspresiju, što znači da bakterijske stanice eksprimiraju konstrukte PNPLA7 i prije dodatka IPTG-a, no ta ekspresija nije visoka. Isto tako, kod uzorka IND CNB 2-3 može se uočiti prisutnost dvije proteinske vrpce slabijeg intenziteta, jedna pri 44 kDa i druga pri 42 kDa. Postoji mogućnost da je pri indukciji prekomjerne ekspresije pri 37 °C došlo do raspadanja produkta, npr. na veznom mjestu za proteazu TEV.



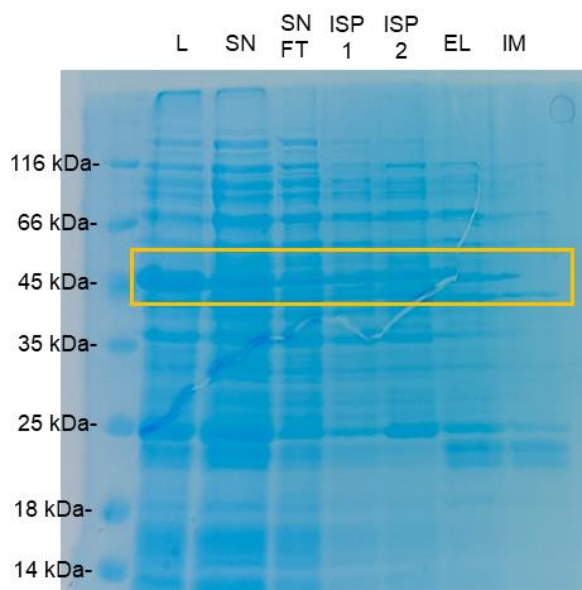
Slika 34. Rezultati prekomjerne ekspresije AB-patatinske domene (AB-PAT, 70 kDa), patatinske domene (PAT, 47 kDa) i vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3, 44 kDa) PNPLA7 u bakterijskom soju *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus i lize bakterijskih stanica analizirani Western analizom. **M** - marker molekulskih masa (kDa), **NI** - neinducirana bakterijska kultura, **IND** - inducirana bakterijska kultura, **L** - lizat bakterijskih stanica nakon otapanja u puferu za lizu stanica, homogenizacije i sonifikacije.

Nakon uspješne Western analize, bakterijske stanice u kojima je inducirana prekomjerna ekspresija PNPLA7 su lizirane, homogenizirane, sonificirane i centrifugirane nakon čega je pola supernatanta odvojeno za pročišćavanje afinitetnom kromatografijom, a pola za mjerenje aktivnosti. Supernatanti su nanoseni na Ni-NTA kolonu za afinitetno pročišćavanje u nativnim

uvjetima, a rezultati pročišćavanja AB-PAT, PAT i CNB 2-3 prikazani su na slikama 35 i 36. Rezultati pokazuju prisutnost sva tri skraćena konstrukta PNPLA7 u lizatu bakterijskih stanica (L), dok je ista proteinska vrpca manjeg intenziteta u uzorku supernatanta (SN) nakon centrifugiranja lizata što sugerira da dio proteina ostaje u talogu lizata bakterijskih stanica. Stoga, kombinacijom različitih deterdženata i soli, potrebno je pokušati povećati topljivost proteina u puferu za lizu stanica. Ali, rezultati pokazuju da su se sva tri konstrukta vezala na kolonu. Na lijevoj strani slike 35, uočena je prisutnost proteinske vrpce pri 70 kDa koja odgovara AB-PAT koja je prisutna u svim koracima pročišćavanja. Također, proteinska vrpca pri 47 kDa koja odgovara patatinskoj domeni PNPLA7 je prisutna u svim koracima pročišćavanja (slika 35). Navedena proteinska vrpca je najvišeg intenziteta nakon nanošenja pufera za eluciju proteina koji sadrži 200 mmol dm⁻³ imidazol, dok je nižeg intenziteta nakon nanošenja 5 mol dm⁻³ imidazola.



Slika 35. Rezultati pročišćavanja AB-patatinske domene i patatinske domene PNPLA7 na gravitacijskoj kromatografskoj Ni-NTA koloni afinitetnom kromatografijom u nativnim uvjetima analizirani metodom SDS-PAGE. **L** - lizat bakterijskih stanica nakon homogenizacije i sonifikacije, **SN** - supernatant lizata nakon centrifugiranja, **SN FT** - supernatant lizata bakterijskih stanica koji je propušten kroz kolonu, **ISP 1** - pufer za ispiranje, **ISP 2** - pufer za ispiranje 2, **EL** - pufer za eluciju, **IM** - 5 mol dm⁻³ imidazol. Crveni pravokutnik - proteinska vrpca na gelu koja pri 70 kDa koja odgovara molekularnoj masi AB-patatinske domene, žuti pravokutnik - proteinska vrpca na gelu koja pri 47 kDa koja odgovara molekularnoj masi patatinske domene PNPLA7. Brojevi s lijeve strane gela i vrpce označuju marker molekularskih masa.



Slika 36. Rezultati pročišćavanja veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3) PNPLA7 na gravitacijskoj Ni-NTA koloni afinitetnom kromatografijom u nativnim uvjetima analizirani metodom SDS-PAGE. **L** - lizat bakterijskih stanica nakon homogenizacije i sonifikacije, **SN** - supernatant lizata nakon centrifugiranja, **SN FT** - supernatant lizata bakterijskih stanica koji je propušten kroz kolonu, **ISP 1** - pufer za ispiranje 1, **ISP 2** - pufer za ispiranje 2, **EL** - pufer za eluciju, **IM** - 5 mol dm⁻³ imidazol. Narančasti pravokutnik - proteinska vrpca na gelu koja pri 44 kDa koja odgovara molekularnoj masi CNB 2-3 PNPLA7. Brojevi s lijeve strane gela i vrpce označuju marker molekularnih masa.

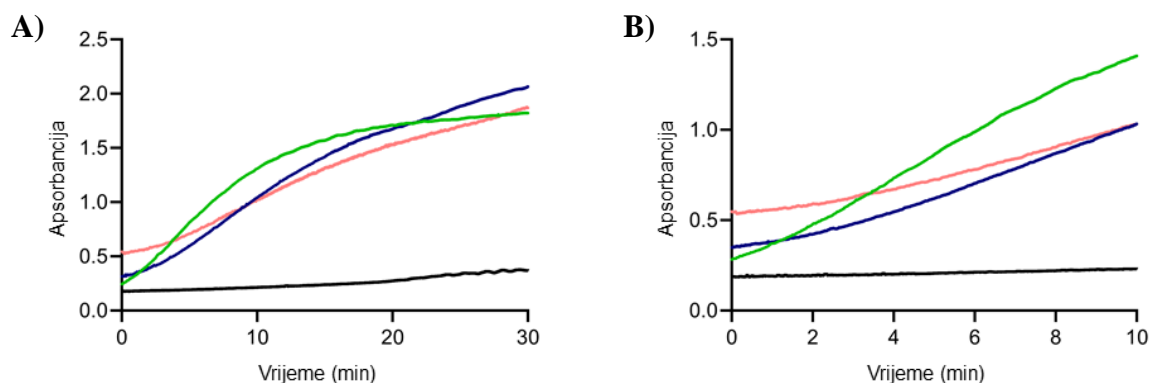
Kao i u slučaju AB-PAT, proteinska vrpca pri 44 kDa koja odgovara CNB 2-3 PNPLA7 je prisutna u svim koracima pročišćavanja (**slika 36**). Međutim, osim proteinskih vrpce koje odgovaraju konstruktima PNPLA7, u svim koracima pročišćavanja prisutan je i velik broj drugih proteina što znači u ovim uvjetima nije moguće izolirati konstrukte PNPLA7 visoke čistoće. Stoga je potrebna dodatna optimizacija uvjeta pročišćavanja mijenjanjem sastava pufera za ispiranje i eluciju. Potrebno je i ostaviti dovoljno vremena između koraka pročišćavanja, tj. pričekati da se smola slegne nakon nanošenja pufera na kolonu i/ili prilagoditi brzinu protoka pufera kroz kolonu.²²³ Budući da konstrukti PNPLA7 sadrže Streptag II na C-terminalnom kraju, moguće je pročišćavanje koristeći kolonu uz punilo s modificiranim streptavidinom, i biotinom za eluciju proteina s kromatografske kolone.²²⁴ Isto tako, pročišćavanje bi se moglo poboljšati metodom FPLC (engl. *Fast Protein Liquid Chromatography*) koja se provodi na instrumentima poput *Äkta Pure* pod visokim tlakom.²²⁵ Međutim, navedena metoda je financijski skuplja u odnosu na korištenje gravitacijskih kolona. Uklanjanje proteina manje ili veće molekularne mase, moguće je i primjenom metode gel filtracije.²²⁵ Isto tako, moguće je pokušati prekomjerno eksprimirati navedene konstrukte u

drugim organizmima, npr. u staničnoj liniji Sf9, koja je izolirana iz insekta *Spodoptera frugiperda*, ili u ljudskoj staničnoj liniji Expi293F, koje se vrlo često koriste za prekomjernu ekspresiju proteina.¹⁶⁸ Naime, istraživanje je pokazala da stanična linija Expi293F puno bolje prekomjerno eksprimira patatinsku domenu PNPLA2 u odnosu na bakterijske stanice.¹⁶⁸ Ovaj korak zahtijevao bi kloniranje konstrukata u druge odgovarajuće ekspresijske vektore pogodne za eukariotske stanice što je financijski i izvedbeno kompleksnije.

4.2.3. Mjerenje enzimske aktivnosti AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7

Budući da u sklopu ove doktorske disertacije nije bilo moguće izolirati konstrukte PNPLA7 visoke čistoće, mjerenje aktivnosti provedeno je u supernatantima lizata bakterijskih stanica koje su prekomjerno ekspimirale AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7 pri čemu je kao supstrat korišten *p*-nitrofenil valerat prema protokolu preuzetom iz literature.⁷ Na **slici 37** prikazani su rezultati mjerenja esterazne aktivnosti kao promjene apsorbancije u trajanju od 30 i 10 minuta. Može se uočiti da supernatanti staničnih lizata sva tri konstrukta pokazuju porast promjene apsorbancije u vremenu (dA min^{-1}), pri čemu je najviša vrijednost dA min^{-1} za AB-PAT, a najniža za CNB 2-3. Također, na **slici 37.A**, može se uočiti da nakon 10 minuta mjerenja, za uzorke PAT i CNB 2-3 dolazi do slabog pada promjene apsorbancije, što je izraženije u uzorku AB-PAT u kojemu krivulja postaje linearna nakon 15. minute mjerenja. Budući da uzorak CNB 2-3 ne sadrži aktivno mjesto, pretpostavljeno je da je u navedenom uzorku zapravo mjerena aktivnost bakterijskih lipaza, pa je navedeni uzorak korišten kao negativna kontrola. Isto tako, obzirom da nije zamijećena aktivnost u uzorku pufera za lizu stanica, zaključeno je da komponente navedenog pufera nemaju utjecaj na mjerenje, tj. ne dolazi do neenzimske reakcije između supstrata i komponenti pufera.

Analizom krivulja promjene apsorbancije u vremenu, pokazano je da je koeficijent determinacije najviši (99,9 %) od 2. do 7. minute mjerenja za AB-PAT i od 4. do 10. minute za PAT, što znači da je u ovom vremenskom okviru promjena apsorbancije u vremenu linearna (ovisnost količine nastalog produkta o vremenu je linearna - inicijalna brzina reakcije). Nagib pravca ili vrijednost u navedenim vremenskim razdobljima mjerenja iznose $0,068 \text{ min}^{-1}$ za AB-PAT i $0,022 \text{ min}^{-1}$ za PAT PNPLA7. Prema navedenim rezultatima, AB-PAT pokazuje tri puta veću aktivnost u odnosu na PAT, što sugerira da AB-domena koja se nalazi u blizini patatinske domene ima pozitivan utjecaj na enzimsku aktivnost PNPLA7.



Slika 37. Rezultati mjerenja esterazne aktivnosti u supernatantima lizata stanica koje su prekomjerno eksprimirale AB-patatinsku domenu (AB-PAT, zelena boja), patatinsku domenu (PAT, plava boja) i vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3, narančasta boja) u trajanju od **A)** 30 minuta, **B)** 10 minuta, uz *p*-nitrofenil valerat kao supstrat koncentracije 1 mmol dm⁻³. Crnom bojom prikazan je puffer za lizu stanica. Mjerenje je provedeno pri valnoj duljini od 405 nm, pri 37 °C u trajanju od 10 minuta.

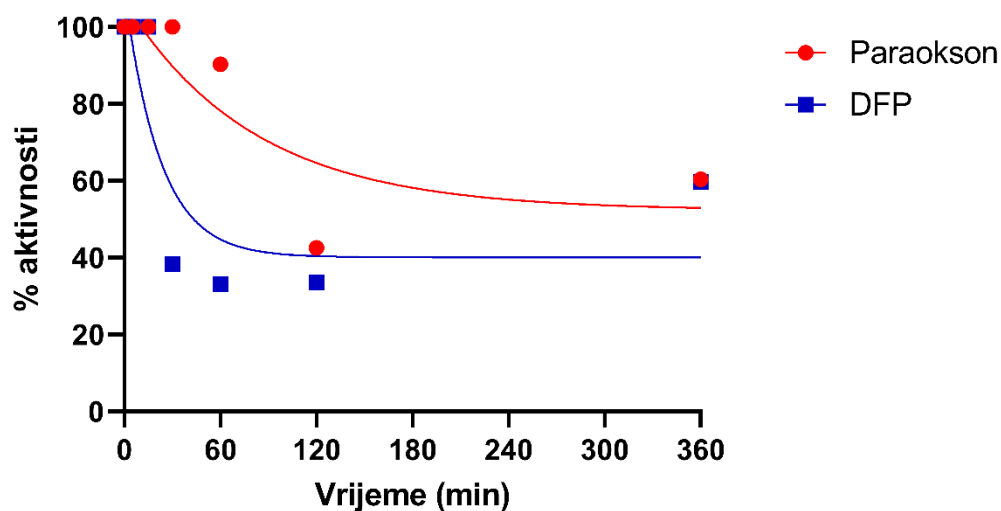
4.2.4. Utjecaj organofosfornih spojeva na enzimsku aktivnost AB-PAT, PAT i CNB2-3 PNPLA7

Prema literaturnim podacima, poznato je da je srodni enzim PNPLA6 meta organofosfornih spojeva (OP) čijom inhibicijom dolazi do razvoja sindroma OPIDN, a simptomi navedenog sindroma pojavljuju se 8-10 dana nakon prve izloženosti OP spojevima.^{10,12} Naime, kristalna struktura PNPLA6 nije riješena, a u literaturi nisu dostupni protokoli za izolaciju navedenog proteina zadovoljavajuće čistoće za provedbu kinetičkih mjerenja, kao što je i u slučaju proteina PNPLA7. Za istraživanje utjecaja OP spojeva na enzimsku aktivnost PNPLA6, korišteni su uzorci tkiva mozga odraslih kokoši ili lizati stanica koje su prekomjerno eksprimirale PNPLA6.^{10,12} Literaturni podaci su pokazali da sama inhibicija PNPLA6 ne uzrokuje razvoj sindroma OPIDN, nego da je za njegov razvoj potrebno doći do tzv. reakcije starenja (opisano u odjeljku 2.2.6.).^{10,12} Zbog sličnosti PNPLA6 i PNPLA7, pretpostavljeno je da OP spojevi mogu inhibirati i PNPLA7.

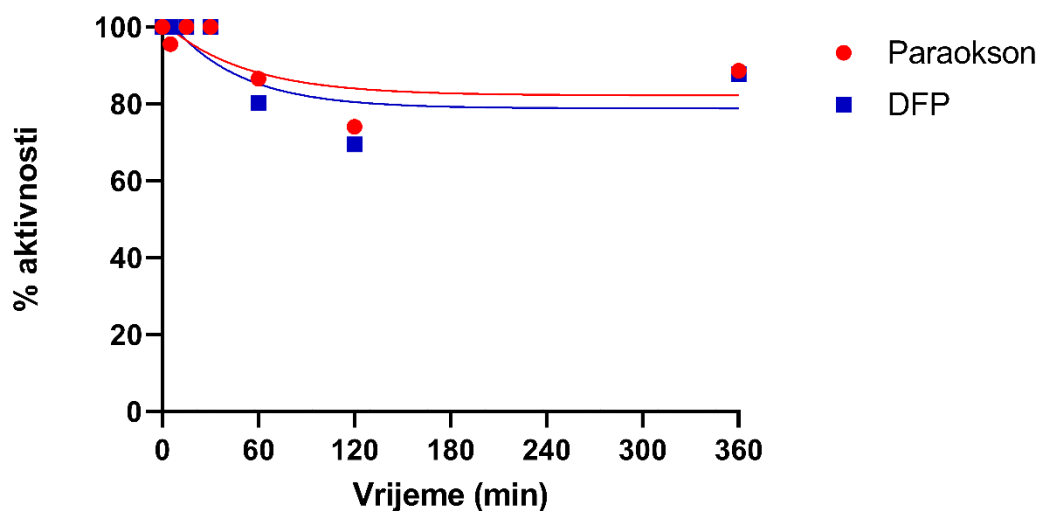
U tu svrhu, lizati bakterijskih stanica koje su prekomjerno eksprimirale AB-PAT, PAT i CNB 2-3 PNPLA7, inkubirani su s paraoksonom, predstavnikom skupine OP spojeva koji ne uzrokuje razvoj sindroma OPIDN, i DFP-om, predstavnikom skupine OP spojeva koji uzrokuje razvoj sindroma OPIDN.¹² Rezultati mjerenja enzimске aktivnosti u različitim vremenskim točkama nakon inkubacije OP spojevima, prikazani su na **slici 38**. Rezultati mjerenja aktivnosti, pokazuju da paraokson i DFP inhibiraju AB-PAT. Može se uočiti da aktivnost AB-PAT pada na 40 % nakon inkubacije s DFP-om u trajanju od 30 min, 60 min i 120 min, dok nakon inkubacije u trajanju 360 min (6 h) dolazi do porasta aktivnosti na 60 %. Aktivnost AB-PAT

nakon inkubacije s paraoksonom u trajanju od 60 min pada na 90 %, nakon 120 min na 40 %, ali nakon 360 min inkubacije, dolazi do porasta aktivnosti na 60 %. Ovi rezultati pokazuju da je DFP jači inhibitor AB-PAT u odnosu na paraokson, i da postoji mogućnost reaktivacije AB-PAT nakon 6 h.

A)



B)



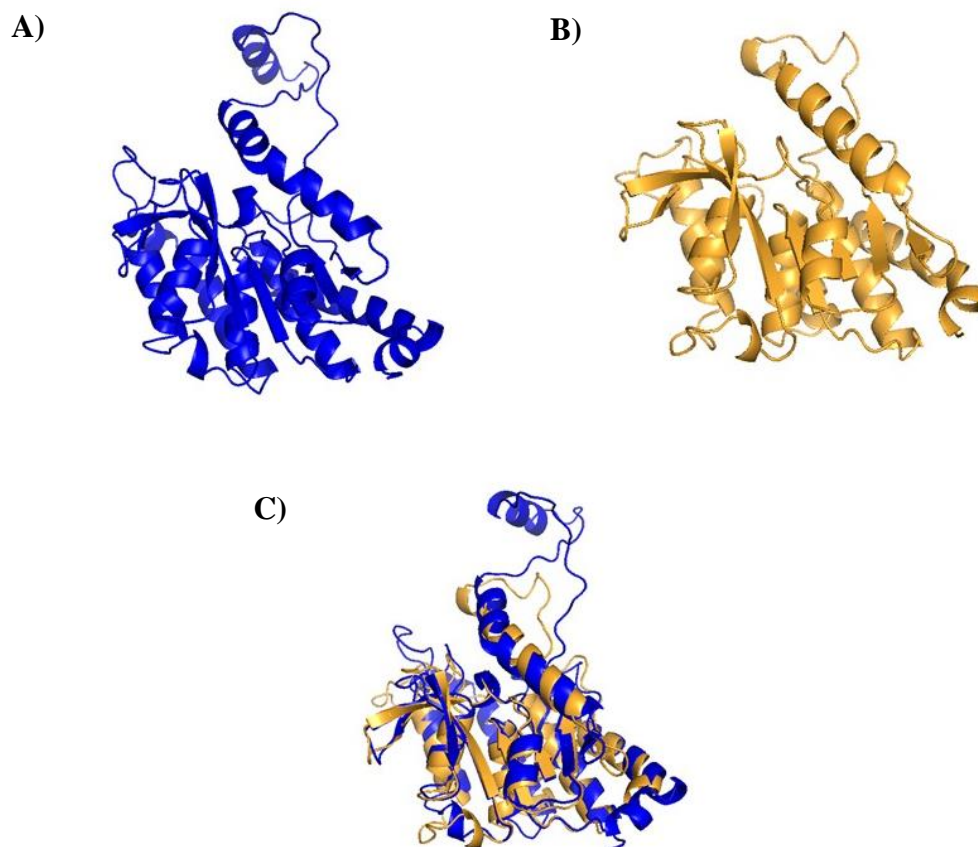
Slika 38. Rezultati mjerenja esterazne aktivnosti lizata bakterijskih stanica koje su prekomjerno eksprimirale: **A)** AB-patatinsku domenu (AB-PAT), **B)** patatinsku domenu (PAT), nakon inkubacije s organofosforinim spojevima, tj. paraoksonom i DFP-om (koncentracija OP spojeva u reakcijskoj smjesi je iznosila 10^{-5} mol dm^{-3}), u različitim vremenskim točkama. Rezultati su prikazani kao ovisnost % aktivnosti skraćenih konstrukata PNPLA7 o vremenu.

Za razliku od AB-PAT, rezultati mjerenja aktivnosti pokazuju da paraokson i DFP slabije inhibiraju PAT. Može se uočiti da aktivnost PAT pada na 80 % nakon inkubacije s DFP-om i paraoksonom u trajanju od 60 min, nakon 120 min pada na 70 %, ali nakon 360 min inkubacije dolazi do porasta aktivnosti na 90 %. Budući da su paraokson i DFP jači inhibitori AB-PAT PNPLA7, ova činjenica podupire pretpostavku da AB-domena ima ulogu u modulaciji enzimske aktivnosti. Međutim, njena točna uloga u enzimskoj aktivnosti PNPLA7 zasad ostaje neobjašnjena.

4.2.5. Predviđanje struktura patatinske domene, AB domene i CNB 2-3 PNPLA7

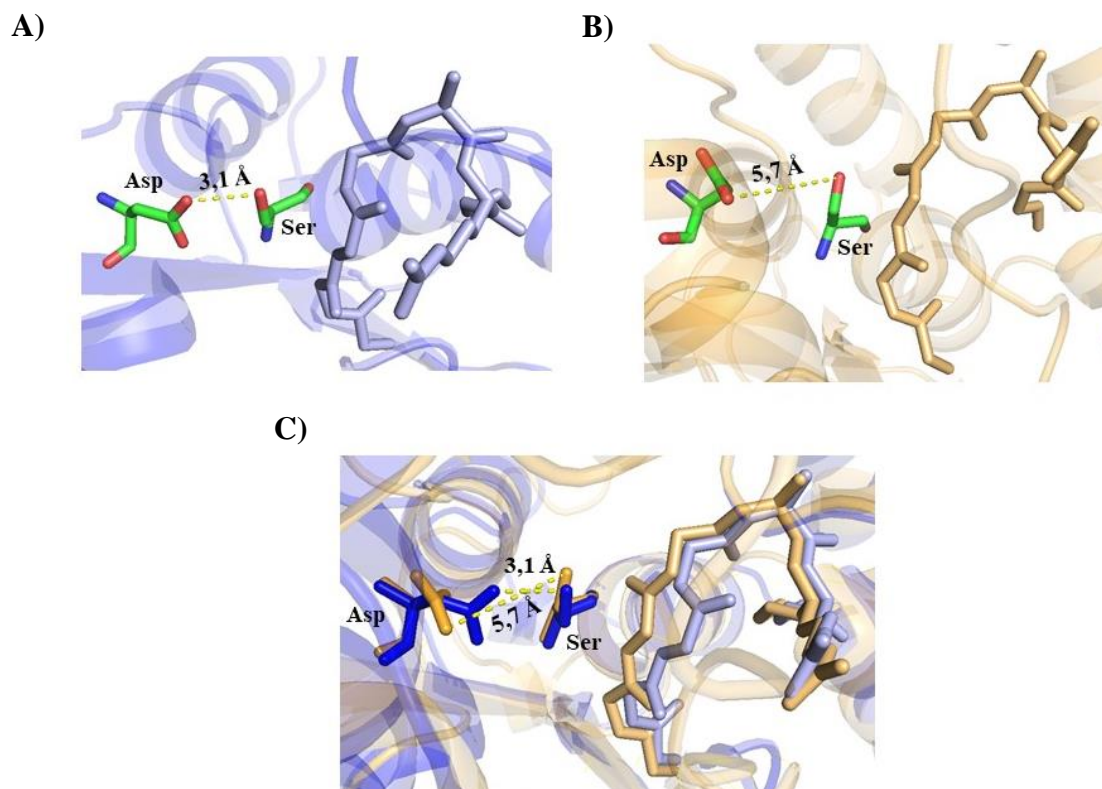
Budući da PNPLA7 sadrži nekoliko strukturnih domena, sustavima ColabFold i PHYRE2 predviđene su strukture patatinske domene, AB-domene i veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 radi dobivanje uvida u strukturna svojstva i funkciju navedenih domena.

Aminokiselinski slijed patatinske domene PNPLA7, pokazuje najveću sličnost s proteinom PlpD (*Patatin-like protein*, PDB: 5FYA)²²⁶ iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa* prema sustavima ColabFold i PHYRE2. Isto tako, aminokiselinski slijed patatinske domene PNPLA7 pokazuje sličnost s drugim proteinima koji sadrže patatinsku domenu kao što su VipD (*Vacuolar protein sorting inhibitor protein D*, PDB: 4AKF)²²⁷ iz bakterije *Legionella pneumophila*, ExoU (PDB: 4QMK)²²⁸ iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, patatin (PDB:1OXY)²⁰ iz krumpira *Solanum tuberosum* i PNPLA9 iz stanične linije hrčka CHO (PDB: 6AUN)²⁹, jedinim PNPLA enzimom čija je kristalna struktura riješena. Na **slici 39** prikazani su modeli strukture patatinske domene i njihova preklapanja, a na **slici 40** prikazana je organizacija aktivnog mjesta i njihova preklapanja. Može se uočiti da su strukture međusobno slične (**slika 39.A i B**) pri čemu su najveće razlike u orijentaciji i položaju fleksibilnih petlji. Također, organizacija aktivnog mjesta oba strukturna modela je slična (**slika 40.A i B**), pri čemu aktivno mjesto sadrži katalitičku dijadu Ser i Asp te oksianionsku šupljinu u blizini katalitičke dijade. Naime, može se uočiti da udaljenost kisikovog atoma O_γ bočnog ogranka Ser i kisikovog atoma O_{δ2} bočnog ogranka Asp u strukturnom modelu PHYRE2 iznosi 5,7 Å (**slika 40.B**), dok u strukturnom modelu ColabFold iznosi 3,1 Å (**slika 40.A**) koja odgovara udaljenosti Ser i Asp proteina PlpD, i drugih proteina koji sadrže katalitičku dijadu u aktivnom mjestu, što čini strukturni model ColabFold pouzdanijim.



Slika 29. Modelna struktura patatinske domene ljudskog proteina PNPLA7 (925.-1098. aminokiselina) predviđena sustavima: **A)** ColabFold (plava boja), **B)** PHYRE2 (narančasta boja), **C)** preklapanje modelnih struktura dobivenih sustavima ColabFold i PHYRE2.

Inače, protein PlpD je fosfolipaza A1 koja katalizira reakciju hidrolize acilnog lanca fosfatidilinozitola na položaju *sn*-1 što rezultira narušavanjem integriteta eukariotskih stanica.²²⁶ Međutim, PlpD ne hidrolizira fosfatidiletanolamin, fosfolipid koji je najzastupljeniji u membranama bakterijskih stanica.²²⁶ Strukturni model patatinske domene PNPLA7, dobro se preklapa i sa patatinskim domenama proteina VipD, ExoU, patatina i PNPLA9 što sugerira da je struktura patatinske domene i aktivnog mjesta očuvana u prokariotskim i eukariotskim organizmima. Kao rezultat očuvanosti, u svim enzimima koji je sadrže, patatinska domena ima istu topologiju i u PNPLA7, a sastoji se od šest β -ploča koje su okružene s osam dugačkih α -zavojnica.

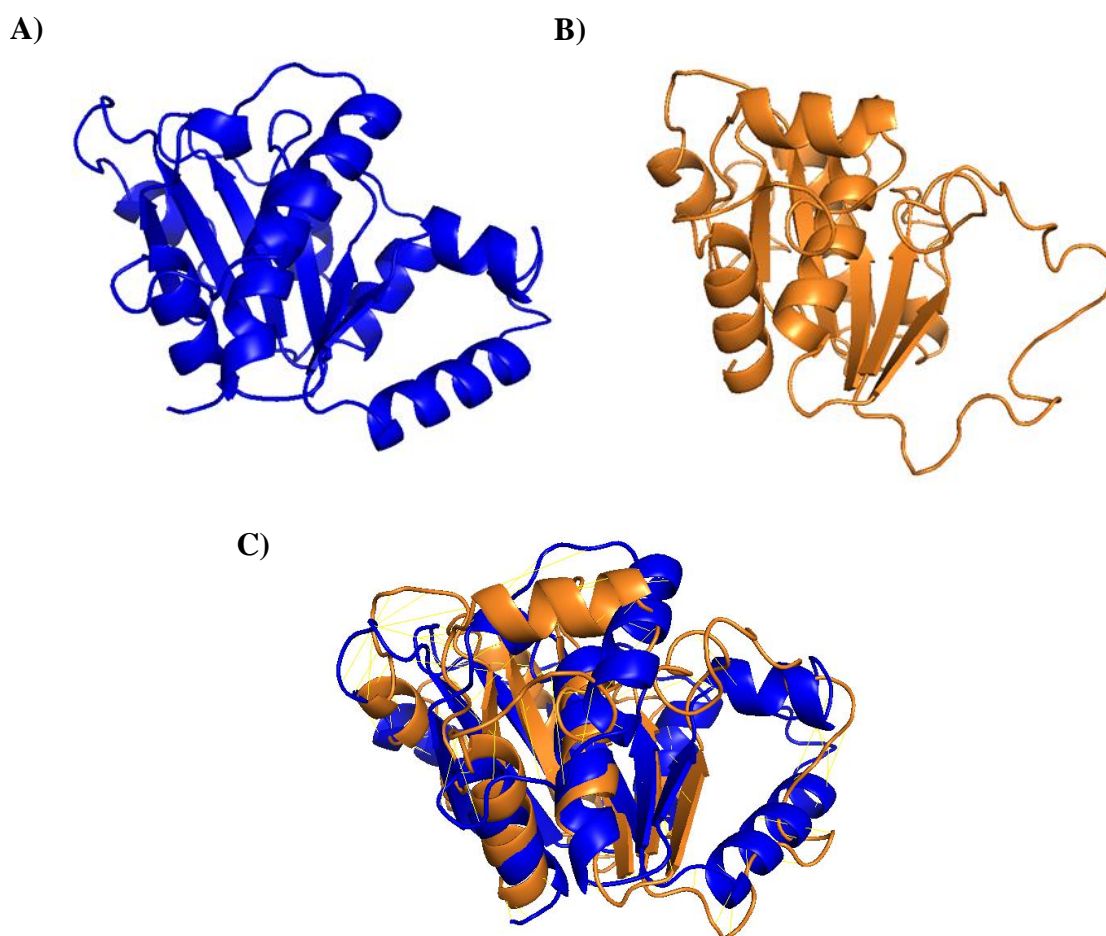


Slika 40. Prikaz aktivnog mjesta patatinske domene ljudskog proteina PNPLA7 kojeg čine katalitička dijada Ser i Asp, njihova udaljenost te oksianionska šupljina predviđena sustavima: **A)** ColabFold, **B)** PHYRE2, **C)** preklapanje modelnih struktura dobivenih sustavima ColabFold i PHYRE2. Oksianionska šupljina u modelu dobivenog sustavom ColabFold (**A**, **C**) prikazana je u obliku štapića svijetloplave boje, a sustavom PHYRE2 svijetlonarančastom bojom (**B**, **C**).

Aktivno mjesto proteina PlpD i patatina,^{20,226} nalazi se u dugačkom hidrofobnom tunelu pri čemu je nukleofil Ser pozicioniran na prijelazu između α -zavojnice i β -ploče, na tzv. nukleofilnom laktu, a Asp na vrhu β -ukosnice. Stoga, pretpostavlja se da je patatinska domena PNPLA7 slične topologije i strukture kao i u ostalim enzimima koji sadrže ovu domenu. Istraživanja su pokazala da su PlpD i PNPLA9 aktivni jedino u obliku dimera pri čemu se dimer formira kroz veliko hidrofobno sučelje, a mjesto kontakta monomera se formira putem jedne β -ploče, tri α -zavojnice i nekoliko petlji.^{29,226} U dimeru, aktivna mjesta monomera su u međusobnoj blizini i u blizini hidrofobnog sučelja. Međutim, zasad ne postoje dokazi da je PNPLA7 prisutan i/ili aktivan u obliku dimera.

Prema modelu PHYRE2, aminokiselinski slijed AB-domene PNPLA7, pokazuje najveću sličnost s proteinom *Nitrogenase Iron Protein* (PDB: 1CP2)²²⁹ iz bakterije *Clostridium pasterianum* s 19 % identičnosti aminokiselinskog slijeda, a pouzdanost modela iznosila je 96 %. Isto tako, AB-domena PNPLA7 pokazuje sličnost s proteinom koji sudjeluje u segregaciji kromosoma Soj (PDB: 6IUC)²³⁰ iz bakterije *Thermus thermophilus* i proteinom koji sudjeluje

u regulaciji diobe stanica MinD (PDB: 1HYQ)²³¹ iz bakterije *Archaeoglobus fulgidus*. Međutim, model ColabFold nije pronašao sličnost niti s jednim enzimom iz baze kristalnih struktura proteina PDB (engl. *Protein Data Bank*). Na **slici 41** prikazani su modeli strukture AB-domene korištenjem sustava ColabFold i PHYRE2 i njihovo preklapanje. Može se uočiti da su prikazani modeli relativno slični pri čemu se srž ove domene sastoji od nekoliko β -ploča koje su omeđene α -zavojnica i petljama koje podsjećaju na strukturu patatinske domene. Također, može se uočiti da su određene petlje prisutne u strukturnom modelu PHYRE2 (**slika 41.B**), modelirane kao α -zavojnice u strukturnom modelu ColabFold (**slika 41.A**).



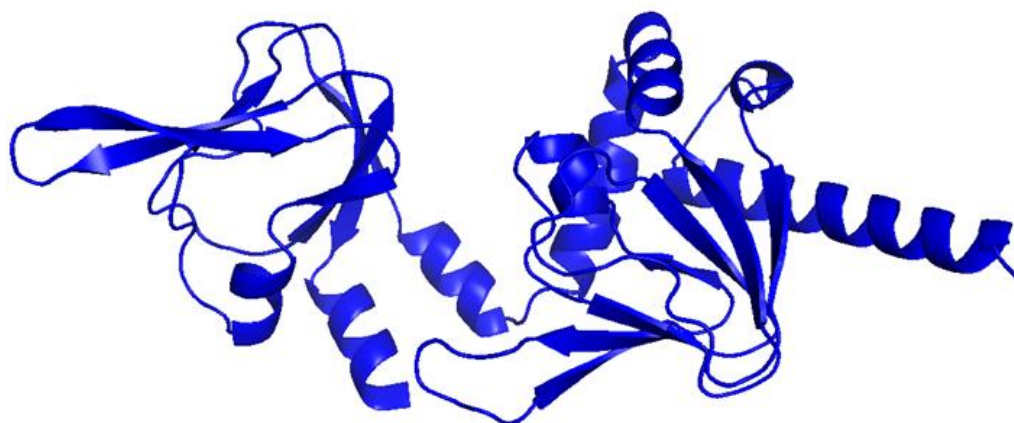
Slika 41. Modelna struktura AB-domene ljudskog proteina PNPLA7 (725.-925. aminokiselina) predviđena sustavima: **A)** ColabFold, **B)** PHYRE2, **C)** preklapanje modelnih struktura dobivenih sustavima ColabFold i PHYRE2.

Naime, proteini *Nitrogenase Iron Protein*, MinD i Soj pripadaju u skupinu hidrolaza trifosfata koje sadrže P-petlju (engl. *P-loop NTPases*) koje kataliziraju hidrolizu kemijske veze između β - i γ -fosfatne skupine nukleozid trifosfata.²³¹ Ova skupina enzima veže i hidrolizira ATP ili GTP, a energiju oslobođenu hidrolizom koriste za pospješivanje konformacijskih

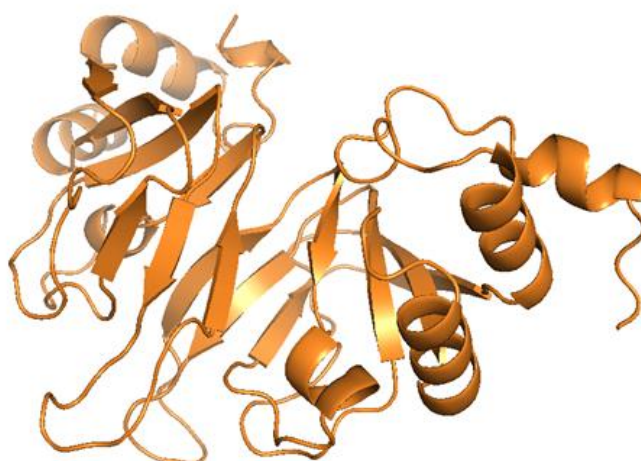
promjena u drugim proteinima.^{231,232} Srž ove skupine enzima, sastoji se od paralelnih β -ploča koje su s obje strane okružene α -zavojnica, a pretpostavlja se da je ovaj strukturni motiv pojavio i prije posljednjeg zajedničkog pretka (LUCA, engl. *Last Universal Common Ancestor*).²³¹ U aminokiselinskom slijedu, *P-loop* NTP-aze sadrže nekoliko motiva koji su zajednički svim proteinima u ovoj skupini, a to su motiv Walker A ili P-petlja, Walker B, Switch 1 i Switch 2.²³² Motiv Walker A se sastoji od visoko očuvanog slijeda aminokiselina Gly-X-X-X-X-Gly-Arg-Thr/Ser (X - bilo koja aminokiselina) pri čemu Gly-X-X-X-X-Gly ima važnu ulogu u orijentaciji fosfatne skupine za hidrolizu, a Arg-Thr/Ser ima važnu ulogu u stabilizaciji negativnog naboja na γ -fosfatnoj skupini molekule NTP i koordinaciji iona Mg^{2+} .²³² Walker B motiv sadrži očuvane Asp ili Glu koji također koordiniraju ion Mg^{2+} preko molekule vode. Motivi Switch 1 i 2 su fleksibilne petlje koje se nalaze na C-terminalnim krajevima β -ploča i ostvaruju interakciju s NTP-om ili molekulama vode, a Walker motivi i Switch petlje su međusobno povezane kroz nekoliko očuvanih ionskih mostova i vodikovih veza.^{231,232} Međutim, aminokiselinski slijed AB-domene PNPLA7 ne sadrži nijedan od navedenih motiva, niti je predviđeno da može vezati ili hidrolizirati ATP ili GTP. Iako rezultati mjerenja aktivnosti pokazuju da AB povećava aktivnost patatinske domene PNPLA7, funkcija navedene domene zasad ostaje nepoznata.

Prema modelu ColabFold i PHYRE2, aminokiselinski slijed veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 (CNB 2-3) PNPLA7, pokazuje najveću sličnost s proteinom Epac2 (*Exchanged protein directly activated by cAMP*, PDB: 1O7F)²³³ iz miša s 24 % identičnosti aminokiselinskog slijeda, a pouzdanost modela iznosila je 100 %. Isto tako, CNB 2-3 PNPLA7 pokazuje sličnost s regulatornom domenom protein kinaze A (PKA, PDB: 4DIN, 1RGS)^{234,235} iz miša s 24 % identičnosti aminokiselinske sekvence, a pouzdanost modela iznosila je 100 %. Na **slici 42** prikazani su modeli strukture CNB 2-3 dobiveni sustavima ColabFold i PHYRE2 i njihovo preklapanje. Najveća razlika između dva prikazana modela je udaljenost između veznih mjesta za cikličke nukleotide i oblik strukture, dok je srž strukture jako slična. Naime, udaljenost između CNB 2 i 3 je veća u modelu ColabFold (**slika 42.A**) i struktura izduženija, dok je udaljenost između CNB 2 i 3 manja u modelu PHYRE2 (**slika 42.B**), a time i struktura kompaktnija.

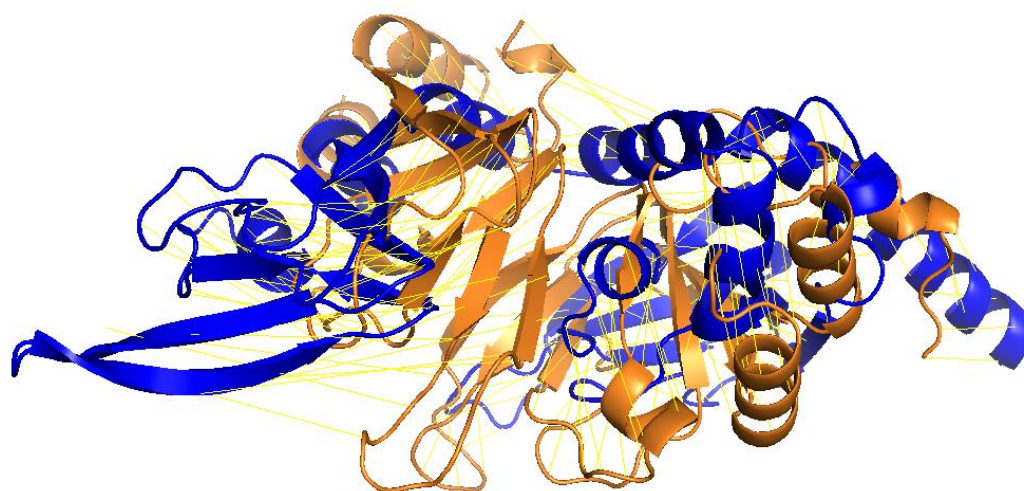
A)



B)



C)



Slika 42. Modelna struktura veznih mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3 ljudskog proteina PNPLA7 (440.-706. aminokiselina) predviđena sustavima: **A)** ColabFold, **B)** PHYRE2, **C)** preklapanje modelnih struktura dobivenih sustavima ColabFold i PHYRE2.

Epac proteini su unutarstanični proteini koji imaju visoki afinitet za vezanje cAMP-a pri čemu aktiviraju male proteine iz obitelji GTP-aza, Rap1 i Rap2, koji su uključeni u regulaciju brojnih staničnih procesa.²³³ Struktura Epac2 sastoji se od C-terminalne domene koja sadrži aktivno mjesto za izmjenu nukleotida i N-terminalne domene koja sadrži dva vezna mjesta za cikličke nukleotide (CNB). CNB Epac2 i PKA su strukturno slični, a sadrže supersekundarnu strukturu nazvanu engl. *Jelly roll* koja se sastoji od osam β -ploča organiziranih u dvije velike ploče kroz hidrofobno sučelje i koje su orijentirane jedna prema drugoj.²³³ Međutim, u ovakvoj orijentaciji, CNB ne mogu vezati cAMP, pa se pretpostavlja da vezanjem cAMP-a dolazi do konformacijske promjene. Može se uočiti da je struktura CNB 2-3 PNPLA7 dobivena u oba modela strukture jako slična supersekundarnoj strukturi *Jelly roll*.²³³ CNB sadrže očuvani slijed aminokiselina Gly-Glu-Leu-Ala-Leu-(X)₅-Pro-Arg-Ala/Thr-Ala-Thr/Ser (X - bilo koja aminokiselina), a navedeni motiv djelomično je očuvan u CNB 2 i 3 ljudskog PNPLA7. Navedeni motiv ostvaruje interakciju s fosfatnom i riboznom skupinom iz molekule cAMP.^{233,236} Pri vezanju u CNB proteina Epac2, cAMP prvo ostvaruje interakciju s motivom Pro-Arg-Ala/Thr-Ala-Thr/Ser što dovodi do konformacijske promjene u motivu Gly-Glu-Leu-Ala-Leu radi ostvarivanja daljnjih interakcija.²³³ Naime, Gly ostvaruje interakciju s 2'-hidroksilnom skupinom riboze pri čemu podliježe maloj konformacijskoj promjeni, dok Ala ostvaruje interakciju s kisikom iz fosfatne skupine cAMP-a pri čemu podliježe velikoj konformacijskoj promjeni.²³³ Stoga, pretpostavlja se da ciklički nukleotidi, cAMP ili cGMP, imaju ulogu u regulaciji i da se vežu za PNPLA7, no točan mehanizam vezanja i afinitet PNPLA7 za vezanje cikličkih nukleotida, zasad je nepoznat. Istraživanja su pokazala da porastom koncentracije cAMP, PNPLA7 pretežito asocira s lipidnim kapljicama što je dovelo do pretpostavke da ciklički nukleotidi imaju ulogu u regulaciji PNPLA7.⁷ Isto tako, treba uzeti u obzir da PNPLA7 sadrži tri vezna mjesta za cikličke nukleotide, dok proteini Epac2 i PKA sadrže samo dva.²³³⁻²³⁵

§ 5. ZAKLJUČAK

- Prisutnost proteina PNPLA7, eksperimentalno je potvrđeno u primarnim stanicama ljudskih skeletnih mišića i staničnoj liniji HepG2 kao modelima metabolički aktivnih tkiva, a važnost i regulacija PNPLA7 je istražena mijenjanjem uvjeta rasta stanica.
- U nediferenciranim stanicama ljudskih skeletnih mišića, utišavanje *PNPLA7* rezultiralo je smanjenjem razine $\alpha 1$ podjedinice ionske pumpe N^+,K^+ -ATP-aze i smanjenjem razina fosforiliranih proteina p70S6K i S6RP, koji stimuliraju biosintezu proteina u stanici, dok nije bilo utjecaja na razinu fosforiliranog proteina 4E-BP1, koji inhibira biosintezu proteina. Isto tako, utišavanje *PNPLA7* rezultiralo je smanjenjem razine fosforilirane AMPK i njene mete ACC, dok nije bilo utjecaja na signalni put IL-6, koji ima protu-upalni učinak u mioblastima.
- Stimuliranje metabolizma povećanjem koncentracije glukoze i inzulina u diferenciranim stanicama ljudskih skeletnih mišića i staničnoj liniji HepG2 smanjuje razinu proteina PNPLA7, dok utjecaj glukokortikoida - deksametazona, i modulatora cAMP-ovisne signalne kaskade metabolizma - forskolina i db-cAMP-a, na razine mRNA i proteina PNPLA7 nije uočen u istraživanim uvjetima. Obzirom na slične dobivene rezultate u dva različita modela metabolički aktivnoga tkiva, pretpostavlja se da je PNPLA7 reguliran na sličan način i da ima sličnu ulogu u ljudskim stanicama skeletnih mišića i jetre.
- Zaključno, dobiveni rezultati prvog dijela istraživanja ukazuju na značajnost uloge PNPLA7 u fiziološkim procesima stanice te sugeriraju regulaciju njegove ekspresije ovisno o energetsom statusu organizma i moguću ulogu u procesima koje inhibira inzulin i povećana razina glukoze.
- Nadalje, uspješno je izoliran nukleotidni slijed PNPLA7 iz uzorka ljudskog donora skeletnih mišića i analizom modela strukture PNPLA7 predviđenim sustavom AlphaFold2, pripremljeni su konstrukti za prekomjernu ekspresiju rekombinantnog PNPLA7, koji sadrže histidinski privjesak, u bakterijskim stanicama *Escherichia coli*. S obzirom na negativne rezultate prekomjerne ekspresije i pročišćavanja cijelog enzima bez transmembranske domene, za daljnja istraživanja odabrana je sama patatinska domena koja sadrži aktivno mjesto, produljena patatinska domena koja sadrži strukturu nepoznate funkcije

karakteriziranu α/β motivima (nazvana AB domena), a za koju AlphaFold2 model pokazuje visoku pouzdanost, te vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3. Sva tri navedena konstrukta prekomjerno su eksprimirana u puno većoj količini u odnosu na PNPLA7 kojemu je uklonjena samo transmembranska domena. Iako u sklopu ove doktorske disertacije nijedan od navedenih konstrukta nije bio pročišćen do zadovoljavajuće čistoće, kinetička mjerenja provedena su u supernatantima lizata bakterijskih stanica koje su prekomjerno eksprimirale navedene konstrukte.

- Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti pokazali su da su patatinska domena i AB-patatinska domena katalitički aktivne pri čemu je aktivnost AB-patatinske domene bila tri puta veća u odnosu na patatinsku domenu prema supstratu *p*-nitrofenil valerat. S obzirom na rezultate dobivene mjerenjem aktivnosti, pretpostavljeno je da AB-domena ima ulogu u katalitičkoj aktivnosti enzima, no njena točna funkcija zasad ostaje nepoznata. Također, rezultati mjerenja enzimske aktivnosti nakon inhibicije PNPLA7 odabranim OP spojevima, ukazuju na progresivnu inhibiciju ovog enzima, ali i moguću spontanu reaktivaciju unutar 6 h.
- Zaključno, rezultati drugog dijela istraživanja predstavljaju prvi korak u daljnjoj optimizaciji ekspresije i pročišćavanja PNPLA7 konstrukta za određivanje interakcija sa supstratima i inhibitorima u svrhu procjene i određivanja moguće fiziološke uloge te značajnosti enzima kao mete u dizajnu lijekova. U tu svrhu, i računalno generirane modelne strukture aktivnog mjesta poslužit će za dobivanje uvida u interakcije enzim-ligand i mogući dizajn specifičnih inhibitora s ciljem razvoja novih lijekova.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. P. A. Wilson, S. D. Gardner, N. M. Lambie, S. A. Commans i D. J. Crowther, *J. Lipid R.* **47** (2006) 1940-1949.
2. P. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass i R. Zechner, *J. Lipid R.* (2009) S63-S68.
3. A. M. Lulić i M. Katalinić, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **74(2)** (2023) 75-89.
4. J. Z. Long i B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6022-6063.
5. E. A. Dennis, J. Cao, Y. H. Hsu, V. Magriotti i G. Kokotos, *Chem. Rev.* **11** (2011) 6130-6185.
6. R. Holmes, *Open Access Bioinf.* **4** (2012) 15-29.
7. P. C. Kienerberger, A. Lass, K. Preiss-Landl, H. Wolinski, S. D. Kohlwein, R. Zimmerman i R. Zechner, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 5908-5917.
8. C. Heier, B. Kien, F. Huang, T. O. Eichmann, H. Xie, R. Zechner i P. A. Chang, *J. Biol. Chem.* **292** (2017) 19087-19098.
9. P. A. Chang, L. He, Y. Wang, C. Heier, Y. Wu i F. Huang, *Biomolecules* **9** (2019) 1-16.
10. R. J. Richardson, J. K. Fink, P. Glynn, R. B. Hufnagel, G. F. Makhaeva i S. J. Wijeyesakere, *Adv. Neurotoxicol.* **4** (2020) 1-78.
11. S. J. Wijeyesakere, R. J. Richardson i J. A. Stuckey, *Protein J.* **26 (3)** (2007) 165-72.
12. R. J. Richardson, N. D. Hein, S. J. Wijeyesakere, J. K. Fink i G. F. Makhaeva, *Chem.-Biol. Interact.* **203** (2013) 238-244.
13. M. A. Sogorb, D. Pamies, C. Estevan, J. Estevez i E. Vilanova, *Chem.-Biol. Interact.* (2016) 1-6.
14. D. Pamies, A. Bal-Price, M. Fabbri, L. Gribaldo, B. Scelfo, G. Harris, A. Collotta, E. Vilanova i M. A. Sogorb, *Neuroscience* **281** (2014) 54-67.
15. M. Xie, D. Yang, L. Matoney i B. Yan, *Arch. Biochem. Biophys.* **416(2)** (2003) 137-146.
16. P. A. Chang, D. X. Long i Y. J. Wu, *Mol. Cell. Biochem* **306** (2007) 25-32.
17. X. Wang, M. Guo, Q. Wang, Q. Wang, S. Zuo, X. Zhang, H. Tong, J. Chen, H. Wang, X. Chen, J. Guo, X. Su, H. Liang, H. Zhou i J. Z. Li, *Hepatology* **72** (2020) 1569-1585.
18. P. Vogel, R. W. Read, G. M. Hansen i D. R. Powell, *Vet. Pathol.* **58** (2021) 1158-1171.
19. T. Hirabayashi, M. Kawaguchi, S. Harada, M. Mouri, R. Takamiya, Y. Miki, H. Sato, Y. Taketomi, K. Yokoyama, T. Kobayashi, S. M. Tokuoka, Y. Kita, E. Yoda, S. Hara, K. Mikami, Y. Nishito, N. Kikuchi, R. Nakata, M. Kaneko, H. Kiyonari, K. Kasahara, T. Aiba, K. Ikeda, T. Soga, M. Kurano, Y. Yatomi i M. Murakami, *Cell. Rep.* **42(2)** (2023) 111940.
20. T. J. Rydel, J. M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W. C. Stallings, S. M. Brown, J. C. Pershing, J. P. Purcell i M. F. Alibhai, *Biochemistry* **43** (2003) 6696-6708.

21. J. Wu, Q. Wu, D. Yang, M. Zhou, J. Xu, Q. Wen, Y. Cui, Y. Bai, S. Xu, Z. Wang i S. Wang, *Food Chem.* **344** (2021) 128661.
22. S. J. Wijeyesakere, R. J. Richardson i J. A. Stuckey, *PLoS One* **9(9)** (2014) e108245.
23. M. Murakami, Y. Taketomi, Y. Miki, H. Sato, T. Hirabayashi i K. Yamamoto, *Prog. Lipid Res.* **50** 152-192.
24. M. Murakami, H. Sato i Y. Taketomi, *Biomolecules* **10(10)** (2020) 1457.
25. <https://pymol.org/> (pristupljeno 21.10.2024.)
26. D.A. Evans, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53(42)** (2014) 11140-11145.
27. S. Ramanadham, T. Ali, J. W. Ashley, R. N. Bone, W. D. Hancock i X. Lei, *J. Lipid Res.* **56** (2015) 1643-1668.
28. P. Pingitore i S. Romeo, *Biochim Biophys Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* 1864 (2019) 900-906.
29. K. R. Malley, O. Koroleva, I. Miller, R. Sanishvili, C. M. Jenkins, R. W. Gross i S. Korolev, *Nat. Commun.* **9(1)** (2018) 765.
30. A. C. Lake, Y. Sun, J. L. Li, J. E. Kim, J. W. Johnson, D. Li, T. Revett, H. H. Shih, W. Liu, J. E. Paulsen i R. E. Gimeno, *J. Lipid R.* **46** (2005) 2477-2487.
31. T. Hirabayashi, T. Anjo, A. Kaneko, Y. Senoo, A. Shibata, H. Takama, K. Yokoyama, Y. Nishito, T. Ono, C. Taya, K. Muramatsu, K. Fukami, A. Muñoz-Garcia, A. R. Brash, K. Ikeda, M. Arita, M. Akiyama i M. Murakami, *Nat. Commun.* **8** (2017) 14609.
32. S. Grond, T. O. Eichmann, S. Dubrac, D. Kolb, M. Schmuth, J. Fischer, D. Crumrine, P. M. Elias, G. Haemmerle, R. Zechner, A. Lass i F. P. W. Radner, *J. Invest. Dermatol.* **137(2)** (2017) 394-402.
33. Y. Ohno, N. Kamiyama, S. Nakamichi i A. Kihara, *Nat. Commun.* **8** (2017) 14610.
34. M. Murakami, K. Yamamoto i Y. Taketomi, *Inflamm. Regen.* **38(31)** (2018).
35. P. A. Chang, Y. J. Sun, F. F. Huang, W. Z. Qin, Y. Y. Chen, X. Zeng i Y. J. Wu, *Mol. Biol. Rep.* **40** (2013) 5597-5605.
36. S. Murugesan, E. B. Goldberg, E. Dou i W. J. Brown, *PLoS One* **8(5)** (2013) e64950.
37. P. A. Chang, L. P. Han, L. X. Sun i F. F. Huang, *Gene* **591(2)** (2016) 344-50.
38. G. Onal, O. Kutlu, E. Ozer, D. Gozuacik, A. Karaduman i S. Dokmeci Emre, *J. Dermatol. Sci.* **93** (2019) 50-7.
39. F. Wilfling, J. T. Haas, T. C. Walther i R. V. Farese Jr., *Curr. Opin. Cell Biol.* **29** (2014) 39-45.
40. K. Ben M'barek, D. Ajjaji, A. Chorlay, S. Vanni, L. Forêt i A. R. Thiam, *Dev. Cell* **41(6)** (2017) 591-604.
41. V. Choudhary, G. Golani, A. S. Joshi, S. Cottier, R. Schneiter, W. A. Prinz i M. M. Kozlov, *Curr. Biol.* **28(6)** (2018) 915-926.
42. A. Lass, R. Zimmerman, M. Oberer i R. Zechner, *Prog. Lipid Res.* **50** (2011) 14-27.

43. T. C. Walther i R. V. Farese Jr., *Annu. Rev. Biochem.* **81** (2012) 687–714.
44. M. A. Welte i A. P. Gould, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1862(10 Pt B)** (2017) 1260-1272.
45. B. Kien, S. Grond, G. Haemmerle, A. Lass, T.O. Eichmann i F. P. W. Radner, *J. Lipid Res.* **59** (2018) 2360–7.
46. Y. Ohno, A. Nara, S. Nakamichi i A. Kihara, *J. Dermatol. Sci.* **92** (2018) 245–53.
47. F. P. Radner, S. Grond, G. Haemmerle, A. Lass i R. Zechner, *Derm.-Endocrinol.* **3** (2011) 77–83.
48. E. E. Kershaw, J. K. Hamm, L. A. Verhagen, O. Peroni, M. Katic i J. S. Flier, *Diabetes* **55** (2006) 148–57.
49. P. C. Kienesberger, D. Lee, T. Pulinilkunnil, D. S. Brenner, L. Cai, C. Magnes, H. C. Koefeler, I. E. Streith, G. N. Rechberger, G. Haemmerle, J. S. Flier, R. Zechner, Y. B. Kim i E. E. Kershaw, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 30218–29.
50. R. Zimmermann, A. Lass, G. Haemmerle i R. Zechner, *Biochim. Biophys. Acta* **1791** (2009) 494–500.
51. R. Zechner, P. C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann i A. Lass, *J. Lipid R.* **50** (2009) 3-21.
52. A. Lass, R. Zimmerman, M. Oberer i R. Zechner, *Prog. Lipid Res.* **50** (2011) 14–27.
53. R. Zechner, R. Zimmerman, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass i F. Madeo, *Cell Metab.* **15** (2012) 279-291.
54. E. Smirnova, E. B. Goldberg, K. S. Makarova, L. Lin, W. J. Brown i C. L. Jackson, *EMBO Rep.* **7** (2006) 106-113.
55. <https://www.biorender.com/> (pristupljeno 21.10.2024.)
56. I. Cornaciu, A. Boeszoermenyi, H. Lindermuth, H. M. Nagy, I. K. Cerk, C. Ebner, B. Salzburger, A. Gruber, M. Schweiger, R. Zechner, A. Lass, R. Zimmermann i M. Oberer, *PLoS ONE* **6(10)** (2011) e26349.
57. M. Schweiger, A. Lass, R. Zimmermann, T. O. Eichmann i R. Zechner, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297(2)** (2009) E289–96.
58. R. Schreiber, H. Xie i M. Schweiger, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864** (2019) 880–99.
59. N. Kulminkaya i M. Oberer, *Biochimie* **169** (2020) 62–8.
60. T. O. Eichmann, M. Kumari, J. T. Haas, R. V. Farese Jr, R. Zimmermann, A. Lass i R. Zechner, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 41446–57.
61. A. Yang i E. P. Mottillo, *Biochem. J.* **477** (2020) 985–1008.
62. H. M. Nagy, M. Paar, C. Heier, T. Moustafa, P. Hofer, G. Haemmerle, A. Lass, R. Zechner, M. Oberer i R. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* **1841** (2014) 588–94.

63. J. G. Granneman, H. P. Moore, E. P. Mottillo, Z. Zhu i L. Zhou, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 5126–35.
64. U. Taschler, R. Schreiber, C. Chitraju, G. F. Grabner, M. Romauch, H. Wolinski, G. Haemmerle, R. Breinbauer, R. Zechner, A. Lass i R. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* **1851** (2015) 937–45.
65. R. Patel, A. Santoro, P. Hofer, D. Tan, M. Oberer, A. T. Nelson, S. Konduri, D. Siegel, R. Zechner, A. Saghatelian i B. B. Kahn, *Nature* **606** (2022) 968–75.
66. C. D. Fuchs, R. Radun, E. D. Dixon, V. Mlitz, G. Timelthaler, E. Halilbasic, M. Herac, J. W. Jonker, O. A. H. O. Ronda, M. Tardelli, G. Haemmerle, R. Zimmermann, H. Scharnagl, T. Stojakovic, H. J. Verkade i M. Trauner, *Hepatology* **75** (2022) 125–39.
67. H. Xie, C. Heier, B. Kien, P. W. Vesely, Z. Tang, V. Sexl, G. Schoiswohl, I. Strießnig-Bina, G. Hoefler, R. Zechner i M. Schweiger, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids* **1865(9)** (2020) 158737.
68. H. Yin, W. Li, L. Mo, S. Deng, W. Lin, C. Ma, Z. Luo, C. Luo i H. Hong, *J. Cell. Mol. Med.* **25** (2021) 3963–75.
69. X. Liu, Y. Liang, R. Song, G. Yang, J. Han, Y. Lan, S. Pan, M. Zhu, Y. Liu, Y. Wang, F. Meng, Y. Cui, J. Wang, B. Zhang, X. Song, Z. Lu, T. Zheng i L. Liu, *Mol. Cancer* **17(1)** (2018) 90.
70. M. Liu, X. Yu, L. Lin, J. Deng, K. Wang, Y. Xia, X. Tang i H. Hong, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **33(11)** (2019) e22391.
71. P. Li, M. Lu, J. Shi, Z. Gong, L. Hua, Q. Li, B. Lim, X. H. Zhang, X. Chen, S. Li, L. D. Shultz i G. Ren, *Nat. Immunol.* **21** (2020) 1444–55.
72. Z. Gong, Q. Li, J. Shi, E. T. Liu, L. D. Shultz i G. Ren, *Cell Metab.* **34(12)** (2022) 1960–1976.
73. A. Yang, E. P. Mottillo, L. Mladenovic-Lucas, L. Zhou i J. G. Granneman, *Nat. Metab.* **1** (2019) 560–9.
74. Z. Chamoun, F. Vacca, R. G. Parton i J. Gruenberg, *Biol. Cell* **105** (2013) 219–33.
75. Y. Wang, N. Kory, S. BasuRay, J. C. Cohen i H. H. Hobbs, *Hepatology* **69** (2019) 2427–41.
76. M. Kumari, G. Schoiswohl, C. Chitraju, M. Paar, I. Cornaciu, A. Y. Rangrez, N. Wongsiriroj, H. M. Nagy, P. T. Ivanova, S. A. Scott, O. Knittelfelder, G. N. Rechberger, R. Birner-Gruenberger, S. Eder, H. A. Brown, G. Haemmerle, M. Oberer, A. Lass, E. E. Kershaw, R. Zimmermann i R. Zechner, *Cell Metab.* **15** (2012), 691-702.
77. M. E. Winberg, M. K. Motlagh, K. G. Stenkula, C. Holm i H. A. Jones, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446** (2014) 1114–9.
78. X. C. Dong, *Front. Med.* **6 (203)** (2019).
79. H. Ruhanen, J. Perttilä, M. Hölttä-Vuori, Y. Zhou, H. Yki-Järvinen, E. Ikonen, R. Käkelä i V. M. Olkkonen, *J. Lipid Res.* **55** (2014) 739–46.

80. S. BasuRay, Y. Wang, E. Smagris, J. C. Cohen i H. H. Hobbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116** (2019) 9521–6.
81. S. BasuRay, E. Smagris, J. C. Cohen i H. H. Hobbs, *Hepatology* **66** (2017) 1111–24.
82. H. R. Witzel, I. M. G. Schwittai, N. Hartmann, S. Mueller, J. M. Schattenberg, X. M. Gong, J. Backs, P. Schirmacher, D. Schuppan, W. Roth i B. K. Straub, *Cells* **12(1)** (2022) 73.
83. L. Valenti i P. Dongiovanni, *Hepatology* **66** (2017) 1026–8.
84. S. McHenry i N. O. Davidson, *Hepatology* **69** (2019) 2323–5.
85. J. Gao i M. Simon, *J. Invest. Dermatol.* **124** (2005) 1259–66.
86. J. G. Gao i M. Simon, *J. Invest. Dermatol.* **126** (2006) 2087–95.
87. J. G. Gao, A. Shih, R. Gruber, M. Schmuth i M. Simon, *Mol. Genet. Metab.* **96** (2009) 253–60.
88. R. S. Holmes, *Biotech.* **2** (2012) 277–86.
89. R. Schreiber, U. Taschler, K. Preiss-Landl, N. Wongsiriroj, R. Zimmermann i A. Lass, *Biochim. Biophys. Acta* **1821** (2012) 113–123.
90. N. Dupont, S. Chauhan, J. Arko-Mensah, E. F. Castillo, A. Masedunskas, R. Weigert, H. Robenek, T. Proikas-Cezanne i V. Deretic, *Curr. Biol.* **24** (2014) 609–620.
91. C. Ward, N. Martinez-Lopez, E. G. Otten, B. Carroll, D. Maetzel, R. Singh, S. Sarkar i V. I. Korolchuk, *Biochim. Biophys. Acta* **1861** (2016) 269–84.
92. F. Cingolani i M. J. Czaja, *Trends Endocrinol. Metab.* **27** (2016) 696–705.
93. J. X. Chen, D. X. Long, W. Y. Hou, W. Li i Y. J. Wu, *Pharmacol. Res.* **62** (2010) 259–64.
94. P. A. Chang, L. He, Y. Wang, C. Heier, Y. Wu i F. Huang, *Biomolecules* **9(12)** (2019) 848.
95. P. A. Chang i Y. J. Wu, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42** (2010) 573–585.
96. S. C. Vose, K. Fujioka, A. G. Gulevich, A. Y. Lin, N. T. Holland i J. E. Casida, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **232** (2008) 376–383.
97. A. J. Greiner, R. J. Richardson, R. M. Worden i R. Y. Ofoli, *Biochim. Biophys. Acta* **1798** (2010) 1533–1539.
98. D. Pamies, A. Bal-Price, M. Fabbri, L. Gribaldo, B. Scelfo, G. Harris, A. Collotta, E. Vilanova i M. A. Sogorb, *Neuroscience* **281** (2014) 54–67.
99. N. D. Hein, J. A. Stuckey, S. R. Rainier, J. K. Fink i R. J. Richardson, *Toxicol. Lett.* **196** (2010) 67–73.
100. M. Synofzik, M. A. Gonzalez, C. M. Lourenco, M. Coutelier, T. B. Haack, A. Rebelo, D. Hannequin, T. M. Strom, H. Prokisch, C. Kernstock, A. Durr, L. Schöls, M. M. Lima-Martínez, A. Farooq, R. Schüle, G. Stevanin, W. Marques i S. Züchner, *Brain* **137** (2014) 69–77.
101. H. Tanaka, R. Takeya i H. Sumimoto, *Biophys. Res. Commun.* **272** (2000) 320–326.
102. D. J. Mancuso, C. M. Jenkins i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **275(14)** (2000) 9937–45.
103. C. M. Jenkins, A. Cedars i R. W. Gross, *Cardiovasc. Res.* **82** (2009) 240–9.

104. W. Yan, C. M. Jenkins, X. Han, D. J. Mancuso, H. F. Sims, K. Yang i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 26669–26679.
105. A. J. Rauckhorst, D. R. Pfeiffer i K. M. Broekemeier, *FEBS Lett.* **589** (2015) 2367–71.
106. K. Y. Kim, H. J. Jang, Y. R. Yang, K. I. Park, J. Seo, I. W. Shin, T. I. Jeon, S. C. Ahn, P. G. Suh, T. F. Osborne i Y. K. Seo, *Sci. Rep.* **6** (2016) 35732.
107. S. H. Moon, C. M. Jenkins, X. Liu, S. Guan, D. J. Mancuso i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 14880–14895.
108. D. J. Mancuso, P. Kotzbauer, D. F. Wozniak, H. F. Sims, C. M. Jenkins, S. Guan, X. Han, K. Yang, G. Sun, I. Malik, S. Conyers, K. G. Green, R. E. Schmidt i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 35632–44.
109. E. Yoda, K. Hachisu, Y. Taketomi, K. Yoshida, M. Nakamura, K. Ikeda, R. Taguchi, Y. Nakatani, H. Kuwata, M. Murakami, I. Kudo i S. Hara, *J. Lipid Res.* **51** (2010) 3003–3015.
110. C. Ye, Z. Shen i M. L. Greenberg, *J. Bioenerg. Biomembr.* **48** (2016) 113–23.
111. C. J. Saunders, S. H. Moon, X. Liu, I. Thiffault, K. Coffman, J. B. LePichon, E. Taboada, L. D. Smith, E. G. Farrow, N. Miller, M. Gibson, M. Patterson, S. F. Kingsmore, R. W. Gross, *Hum Mutat.* **36** (2015) 301–6.
112. H. Chao, Y. Liu, X. Fu, X. Xu, Z. Bao, C. Lin, Z. Li, Y. Liu, X. Wang, Y. You, N. Liu i J. Ji, *Exp Neurol* **300** (2018) 74–86.
113. S. H. Moon, B. G. Dilthey, X. Liu, S. Guan, H. F. Sims i R. W. Gross, *J. Lipid Res.* **62** (2021) 100052.
114. P. Průchová, K. Gotvaldová, K. Smolková, L. Alán, B. Holendová, J. Tauber, A. Galkin, P. Ježek i M. Jabůrek, *Antioxidants* **11**(2) (2022) 198.
115. A. Shukla, R. P. Saneto, M. Hebbar, G. Mirzaa i K. M. Girisha, *Am. J. Med. Genet. A* **176** (2018) 1232–7.
116. S. H. Moon, C. M. Jenkins, M. A. Kiebish, H. F. Sims, D. J. Mancuso i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 29837–50.
117. X. Liu, H. F. Sims, C. M. Jenkins, S. Guan, B. G. Dilthey i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **295** (2020) 5307–20.
118. A. J. Rauckhorst, K. M. Broekemeier i D. R. Pfeiffer, *J. Lipid Res.* **55** (2014) 826–36.
119. S. H. Moon, X. Liu, A. M. Cedars, K. Yang, M. A. Kiebish, S. M. Joseph, J. Kelley, C. M. Jenkins i R. W. Gross, *J. Biol. Chem.* **293** (2018) 115–29.
120. J. Turk, T. D. White, A. J. Nelson, X. Lei i S. Ramanadham, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864** (2019) 846–60.
121. X. Lei, S. E. Barbour i S. Ramanadham, *Biochimie* **92** (2010) 627–37.

122. I. Malik, J. Turk, D. J. Mancuso, L. Montier, M. Wohltmann, D. F. Wozniak, R. E. Schmidt, R. W. Gross i P. T. Kotzbauer, *Am. J. Pathol.* **172** (2008) 406–16.
123. S. Bao, D. A. Jacobson, M. Wohltmann, A. Bohrer, W. Jin, L. H. Philipson i J. Turk, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294(2)** (2008) E217–29.
124. H. Song, S. Bao, X. Lei, C. Jin, S. Zhang, J. Turk i S. Ramanadham, *Biochim. Biophys. Acta* **1801** (2010) 547–58.
125. Y. H. Hsu, D. Bucher, J. Cao, S. Li, S. W. Yang, G. Kokotos, V. L. Woods Jr, J. A. McCammon i E. A. Dennis, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 1330–7.
126. P. Michaely, D. R. Tomchick, M. Machius i R. G. Anderson, *EMBO J.* **21(23)** (2002) 6387–96.
127. L. K. Mosavi, T. J. Cammett, D. C. Desrosiers i Z. Y. Peng, *Protein Sci.* **13(6)** (2004) 1435–48.
128. K. Morrison, K. Witte, J. R. Mayers, A. L. Schuh i A. Audhya, *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 38824–34.
129. A. M. Astudillo, M. A. Balboa i J. Balsinde, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1864** (2019) 772–83.
130. H. Song, S. Bao, X. Lei, C. Jin, S. Zhang, J. Turk i S. Ramanadham, *Biochim. Biophys. Acta* **1801** (2010) 547–58.
131. C. C. Chiu, C. S. Lu, Y. H. Weng, Y. L. Chen, Y. Z. Huang, R. S. Chen, Y. C. Cheng, Y. C. Huang, Y. C. Liu, S. C. Lai, K. J. Lin, Y. W. Lin, Y. J. Chen, C. L. Chen, T. H. Yeh i H. L. Wang, *Mol. Neurobiol.* **56** (2019) 3835–53.
132. A. Gregory, S. K. Westaway, I. E. Holm, P. T. Kotzbauer, P. Hogarth, S. Sonek, J. C. Coryell, T. M. Nguyen, N. Nardocci, G. Zorzi, D. Rodriguez, I. Desguerre, E. Bertini, A. Simonati, B. Levinson, C. Dias, C. Barbot, I. Carrilho, M. Santos, I. Malik, J. Gitschier i S. J. Hayflick, *Neurology* **71** (2008) 1402–9.
133. X. Deng, J. Wang, L. Jiao, T. Utaipan, S. Tuma-Kellner, G. Schmitz, G. Liebisch, W. Stremmel i W. Chamulitrat, *Biochim. Biophys. Acta* **1861** (2016) 449–61.
134. J. Turk, H. Song, M. Wohltmann, C. Frankfater, X. Lei i S. Ramanadham, *Biomolecules* **10(10)** (2020) 1455.
135. T. Ali, X. Lei, S. E. Barbour, A. Koizumi, C. E. Chalfant i S. Ramanadham, *Molecules* **26(21)** (2021) 6361.
136. T. Jin, J. Lin, Y. Gong, X. Bi, S. Hu, Q. Lv, J. Chen, X. Li, J. Chen, W. Zhang, M. Wang i G. Fu, *Cells* **10(6)** (2021) 1446.
137. D. Chen, B. Chu, X. Yang, Z. Liu, Y. Jin, N. Kon, R. Rabadan, X. Jiang, B. R. Stockwell i W. Gu, *Nat. Commun.* **12(1)** (2021) 3644.
138. G. Lin, P. T. Lee, K. Chen, D. Mao, K. L. Tan, Z. Zuo, W. W. Lin, L. Wang i H. J. Bellen, *Cell Metab.* **28** (2018) 605–618.

139. Y. Cheon, H. W. Kim, M. Igarashi, H. R. Modi, L. Chang, K. Ma, D. Greenstein, M. Wohltmann, J. Turk, S. I. Rapoport i A. Y. Taha, *Biochim. Biophys. Acta* **1821** (2012) 1278–86.
140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno 26.8.2024.)
141. P. A. Chang, Y. Y. Chen, D. X. Long, W. Z. Qin i X. L. Mou, *Mol. Biol. Rep.* **39** (2012) 7125-7131.
142. P. A. Chang, T. Sun, C. Heier, H. Gao, H. Xu i F. Huang, *Mol. Cells* **43** (2020) 286-297.
143. A. Chorlay i A. R. Thiam, *Biophys. J.* **114(3)** (2018) 631-640.
144. F. Wilfling, J. T. Haas, T. C. Walther i R. V. Farese Jr, *Curr. Opin. Cell Biol.* **29** (2014) 39-45.
145. S. Harada, Y. Taketomi, T. Aiba, M. Kawaguchi, T. Hirabayashi, B. Uranbileg, M. Kurano, Y. Yatomi i M. Murakami, *Biomolecules* **2023** 13(3) 471.
146. X. Zhang, J. Zhang, R. Wang, S. Guo, H. Zhang, Y. Ma, Q. Liu, H. Chu, X. Xu, Y. Zhang, D. Yang, J. Wang i J. Liu, *Oncol. Lett.* **12(1)** (2016) 670-674.
147. Y. Bai, K. Luo i W. Xie, *Medicine* **102(42)** (2023) e35279.
148. Z. Tang, B. Kang, C. Li, T. Chen i Z. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **47(W1)** (2019) W556-W560.
149. T. Mars, K. Mis, M. Meznaric, S. Prpar Mihevc, V. Jan, F. Haugen, B. Rogelj, A.C. Rustan, G.H. Thoresen, S. Pirkmajer i N. Nikolić, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **46(4)** (2020) 299–308.
150. S. Pirkmajer, K. Bezjak, U. Matkovic, K. Dolinar, L.Q. Jiang, K. Mis, K. Gros, K. Milovanova, K.P. Pirkmajer, T. Marš, L. Kapilevich i A.V. Chibalin. *Front. Physiol.* **11** (2020) 566584.
151. K. Dolinar, V. Jan, M. Pavlin, A.V. Chibalin i S. Pirkmajer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **315(6)** (2018) C803-C817.
152. D.P. Aden, A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov i B.B. Knowles. *Nature* **282(5739)** (1979) 615-6.
153. S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber i Tuschl T. *Nature*. **411(6836)** (2001) 494-8.
154. M. Petrič, A. Vidović, K. Dolinar, M. Miš, A.V. Chibalin i S. Pirkmajer. *J. Membr. Biol.* **254(5-6)** (2021) 531-548.
155. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22662> (pristupljeno 26.8.2024.)
156. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> (pristupljeno 26.8.2024.)
157. T. Mahmood i P.C. Yang. *N Am J Med Sci.* 4(9) (2012) 429-34.
158. R.L.S. Neris, A.M.C. Dobles i A.V. Gomes AV. *Methods Mol. Biol.* **2261** (2021) 443-456.
159. <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10033918.pdf> (pristupljeno 8.10.2024.)
160. <https://omegabiotek.com/product/e-z-n-a-hp-total-rna-kit/> (pristupljeno 11.7.2024.)
161. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814> (pristupljeno 11.7.2024.)
162. H.M. Temin i S. Mizutani. *Nature* **226** (5252) (1970) 1211-3.

163. R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn i N. Arnheim. *Science* **230**(4732) (1985) 1350-54.
164. P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson i D.H. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(16) (1991)7276-80.
165. J. M. Tuomi, F. Voorbraak, D. L. Jones i J. M. Ruijter. *Methods* **50**(4) (2010) 313–22.
166. J. M. Ruijter, C. Ramakers, W. M. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. van den Hoff i A. F. Moorman. *Nucleic Acids Res.* **37**(6) (2009) e45.
167. S. Fischer, J. Loncar, R. Zaja, S. Schnell, K. Schirmer, T. Smital i T. Luckenbach. *Aquat. Toxicol.* **101**(2) (2011) 438-446.
168. N. Kulminskaya, C. Radler, R. Viertlmayr, C. Heier, P. Hofer, M. Colaço-Gaspar, R. J. Owens, R. Zimmermann, R. Schreiber, R. Zechner i M. Oberer. *J. Biol. Chem.* **297**(4) (2021) 101206.
169. N. Kulminskaya, C. F. Rodriguez Gamez, P. Hofer, I. K. Cerk, N. Dubey, R. Viertlmayr, T. Sagmeister, T. Pavkov-Keller, R. Zechner i M. Oberer. *J. Lipid Res.* **65**(1) (2024) 100491.
170. D. Gibson, L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison III i H. O. Smith. *Nat Methods* **6** (2009) 343–345.
171. D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison III, H. O. Smith, J. C. Venter. *Science* 329(5987) (2010) 52-56.
172. <https://nebuilder.neb.com/#/> (pristupljeno 11.7.2024.).
173. <https://www.neb.com/en/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit> (pristupljeno 11.7.2024.).
174. <https://www.neb.com/en/products/e5520-nebuilder-hifi-dna-assembly-cloning-kit> (pristupljeno 11.7.2024.).
175. P.Y. Lee, J. Costumbrado, C.Y. Hsu i Y.H. Kim. *J Vis Exp.* **62** (2012) 3923.
176. A. Froger i J.E. Hall. *J. Vis. Exp.* **6** (2007) 253.
177. <https://www.neb.com/en/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit> (pristupljeno 11.7.2024.).
178. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (pristupljeno 11.7.2024.)
179. https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle (pristupljeno 11.7.2024.)
180. <https://web.expasy.org/translate/> (pristupljeno 11.7.2024.)
181. G. Sezonov, D. Joseleau-Petit i R. D'Ari. *J Bacteriol.* **189**(23) (2007) 8746-9.
182. A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block i Maertens B. *Methods Enzymol.* **559** (2015) 1-15.
183. <https://web.expasy.org/protparam/> (pristupljeno 24.4.2024.).

184. https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html (pristupljeno 24.4.2024.).
185. <https://www.protpi.ch/Calculator/ProteinTool> (pristupljeno 24.4.2024.).
186. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli i D. Hassabis. *Nature* **596** (2021) 583–589.
187. M. Varadi, D. Bertoni, P. Magana, U. Paramval, I. Pidruchna, M. Radhakrishnan, M. Tsenkov, S. Nair, M. Mirdita, J. Ye, O. Kovalevskiy, K. Tunyasuvunakool, A. Laydon, A. Žídek, H. Tomlinson, D. Hariharan, J. Abrahamson, T. Green, J. Jumper, E. Birney, M. Steinegger, D. Hassabis, S. Velankar. *Nucleic Acids Res.* **52(D1)** (2024) D368–D375.
188. M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov i M. Steinegger. *Nat. Methods* **19** (2022) 679–682.
189. L. Kelley, S. Mezulis, C. Yates, M. N. Wass i M. J. E. Sternberg. *Nat. Proto.c* **10** (2015) 845–858.
190. M. Mühlig-Versen, A.B. da Cruz, J.A. Tschäpe, M. Moser, R. Büttner, K. Athenstaedt, P. Glynn i D. Kretzschmar. *J. Neurosci.* **25(11)** (2005) 2865-73.
191. D.J. Read, Y. Li, M.V. Chao, J.B. Cavanagh i P. Glynn. *J. Neurosci.* **29(37)** (2009) 11594-600.
192. M.A. Sogorb, D. Pamies, J. Estevan, J. Estévez i E. Vilanova. *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 352-357.
193. E.R. Sunderhaus, A.D. Law i D. Kretzschmar. *Neurobiol. Dis.* **130** (2019) 104520.
194. K. Akassoglou, B. Malester, J. Xu, L. Tessarollo, J. Rosenbluth i M.V. Chao. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(14)** (2004) 5075-80.
195. S. Pirkmajer i A.V. Chibalin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **311(1)** (2016) E1-E31.
196. R.A. Kell, D.S. O'Hara, W.E. Mitch i T.W. Smith TW. *J. Biol. Chem.* **261(25)** (1986) 11704-11.
197. C. Appenzeller-Herzog C i N.M. Hall. *Trends Cell. Biol.* **22(5)** (2012) 274-82.
198. S.C. Lin i D.G. Hardie. *Cell. Metab.* **27(2)** (2018) 299-313.
199. L. Tong. *Cell. Mol. Life Sci.* **62(16)** (2005) 1784-803.
200. B.K. Pedersen i M.A. Febbraio. *Nat Rev. Endocrinol.* **8(8)** (2012) 457-465.
201. P. Sonksen i J. Sonksen. *Br. J. Anaesth.* **85(1)** (2000) 69-79.
202. O.C. Meijer, L.L. Koorneef i J. Kroon. Glucocorticoid receptor modulators. *Ann. Endocrinol.* **79(3)** (2018) 107-111.
203. E. Eisenberg i E.Y. Levanon. *Trends Genet.* **29(10)** (2013) 569-574.
204. J.X. Chen, D.X. Lon, H.W. Hou, W. Li i Y.J. Wu. *Pharmacol. Res.* **62(3)** (2010):259–64.
205. J.X. Chen i Y.J. Wu. *DNA Cell. Biol.* **32(4)** (2013) 199-205.

206. V. Aas, S.S. Bakke, Y.Z. Feng, E.T. Kase, J. Jensen i S. Bajpeyi. *Cell. Tissue Res.* **354(3)** (2013) 671–82.
207. A.M. Abdelmoez, L. Sardon Puig, J.A. Smith, B.M. Gabriel, M. Savikj i L. Dollet. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **318(3)** (2019) C615–C626.
208. P.B. Katare, A. Mengeste, H. Hamarsland i H. Bakke. *Front. Physiol.* **13** (2022) 982842.
209. J.R. Wiśniewski, A. Vildhede, A. Norén i P. Artursson P. *J. Proteomics.* **136** (2016) 234-47.
210. S. Sefried, H.U. Häring, C. Weigert i S.S. Eckstein. *Open Biol.* **8(10)** (2018) 180147.
211. V.A. Arzumanyan, O.I. Kiseleva i E.V. Poverennaya. *Int. J. Mol. Sci.* **22(23)** (2021) 13135.
212. A.V. Zimin, A. Shumate, I. Shinder, J. Heinz, D. Puiu, M. Pertea i S.L. Salzberg SL. *Genetics* **220(2)** (2022) iyab227.
213. Y. Maruyama, A. Wakamatsu, Y. Kawamura, K. Kimura, J. Yamamoto, T. Nishikawa, Y. Kisu, S. Sugano, N. Goshima, T. Isogai i N. Nomura N. *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D762-6.
214. S. Nurk, S. Koren, A. Rhie, M. Rautiainen, A.V. Bzikadze, A. Mikheenko, E.E. Eichler, K.H. Miga i A.M. Phillippy. *Science* **376(6588)** (2022) 44-53.
215. S. Wagner, M.L. Bader, D. Drew i J.W. de Gier JW. *Trends Biotechnol.* **24(8)** (2006) 364-71.
216. M.W. Lluís, J.I. Godfroy 3rd i H. *Protein Eng. Des. Sel.* **26(2)** (2013) 91-100.
217. M.J. Moss, L.M. Chamness i P.L. Clark PL. *Annu. Rev. Biophys.* **53(1)** (2024) 87-108.
218. Y.E. Kim, M.S. Hipp, A. Bracher, M. Hayer-Hartl i F.U. Hartl. *Annu. Rev. Biochem.* **82** (2013) 323-55.
219. A.M. Seddon, P. Curnow i P.J. Booth PJ. *Biochim. Biophys. Acta.* **1666(1-2)** (2004) 105-17.
220. E.P. Carpenter, K. Beis, A.D. Cameron i S. Iwata. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18(5)** (2008) 581-6.
221. E.S. Kempner. *FEBS Lett.* **326(1-3)** (1993) 4-10.
222. Y. Choi, S. Agarwal i C.M. Deane. *Peer J.* **1** (2013) e1.
223. A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block i B. Maertens. *Enzymol.* **559** (2015) 1-15.
224. T.G. Schmidt i A. Skerra. *Nat. Protoc.* **2(6)** (2007) 1528-35.
225. M. Gotesman, Y. Wang, S.C. Madasu i C.A. Mitchell. *Methods Mol. Biol.* **2364** (2022) 237-249.
226. P.V. da Mata Madeira, S. Zouhir, P. Basso, D. Neves, A. Laubier, R. Salacha, S. Bleves, E. Faudry, C. Contreras-Martel i A. Dessen. *J. Mol. Biol.* **428(9 Pt A)** (2016) 1790-803.
227. B. Ku, K.H. Lee, W.S. Par, C.S. Yang, J. Ge, S.G. Lee, S.S. Cha, F. Shao, W.D. Heo, J.U. Jung i B.H. Oh. *PLoS Pathog.* **8(12)** (2012) e1003082.
228. G.H. Tyson, A.S. Halavaty, H. Kim, B. Geissler, M. Agard, K.J. Satchell, W. Cho, W.F. Anderson i A.R. Hauser AR. *J. Biol. Chem.* **290(5)** (2015) 2919-37.
229. J.L. Schlessman, D. Woo, L. Joshua-Tor, J.B. Howard i D.C. Rees. *J. Mol. Biol.* **280(4)** (1998) 669-85.
230. T.A. Leonard, P.J. Butler i J. Löwe J. *EMBO J.* **24(2)** (2005) 270-82.

-
231. S.C. Cordell i J. Löwe J. *FEBS Lett.* **492(1-2)** (2001) 160-5.
232. M.I. Kozlova, D.N. Shalaeva, D.V. Dibrova i A.Y. Mulkidjanian. *Biomolecules* **12(10)** (2022) 1345.
233. A.O. Maggiolo, S. Mahajan, D.C. Rees i W.M. Clemons. *J. Mol. Biol.* **435(11)** (2023) 167965.
234. H. Rehman, B. Prakash, E. Wolf, A. Rueppel, J. de Rooij, J.L. Bos i A. Wittinghofer. *Nat. Struct. Biol.* 10(1) (2003) 26-32.
235. R. Ilouz, J. Bubis, J. Wu, Y.Y. Yim, M.S. Deal, A.P. Kornev, Y. Ma, D.K. Blumenthal i S.S. Taylor SS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109(31)** (2012) 12443-8.
236. T.C. Diller, N.H. Xuong i S.S. Taylor. *Structure* 9(1) (2001) 73-82.

§ 7. DODATAK

7.1. Nukleotidni i aminokiselinski sljedovi proteina PNPLA7 korištenih u provedenom istraživanju

7.1.1. Cijeli protein PNPLA7

Oznake: Ružičastom bojom su istaknuti start kodon (ATG) i stop kodon (TAG), a neistaknuti dio nukleotidnog slijeda odgovara PNPLA7.

Napomena: *3238. nukleotid ljudskog enzima PNPLA7 mutiran je iz citozina (C) u timin (T) što rezultira promjenom kodona koji aminokiseline Trp1080 (TGG) u kodon koji kodira aminokiselinu Arg1080 (oznaka u slijedu nukleotida: **CGG**), a navedena mutacija bit će prisutna u sljedećim konstruktima PNPLA7: -TM PNPLA7, AB-patatsinska domena PNPLA7 i patatsinska domena PNPLA7.

Nukleotidni slijed duljine 4029 nukleotida u vektoru pJET1.2:

ATGGAGGAAGAGAAAGATGACAGCCACAGGCTGACTTCTGCCTGGGCACCGCCCTGCACTC
TTGGGGACTGTGGTTACGGAGGAAGGTTACCGTCCACCATGCTGACGGGGATTGCAGTTG
GAGCCCTCCTGGCCCTGGCCTTGGTTGGTGTCTCATCCTTTTCATGTTTCAGAAGGCTTAGA
CAATTTTCGACAAGCACAGCCCACTCCTCAGTACCGGTTCCGGAAGAGAGACAAAGTGATGTT
TTACGGCCGGAAGATCATGAGGAAGGTGACCACACTCCCCAACACCCTTGTGGAGAACACTG
CCCTGCCCCGGCAGCGGGCCAGGAAGAGGACCAAGGTGCTGTCTTTGGCCAAGAGGATTCTG
CGTTTCAAGAAGGAATACCCGGCCCTGCAGCCCAAGGAGCCCCCGCCCTCCCTGCTGGAGGC
CGACCTCACGGAGTTTGACGTGAAGAATTCTCACCTGCCATCGGAAGTTCTGTACATGCTGA
AAAACGTTCCGGGTCCTGGGCCACTTTGAGAAGCCGCTGTTCTTGGAGCTTTGCAAACACATC
GTCTTTGTGCAGCTGCAGGAAGGGGAGCACGTCTTCCAGCCCAGGGAGCCGGACCCAGCAT
CTGTGTGGTGCAGGACGGGCGGCTGGAGGTCTGCATCCAGGACACTGACGGCACCGAGGTGG
TGGTGAAGAGGTTCTGGCGGGAGACAGCGTCCACAGCCTGCTCAGCATCCTGGACATCATC
ACCGGCCATGCTGCACCTTACAAAACGGTCTCCGTCCGCGGGCCATCCCGTCCACCATCCT
CCGGCTTCCAGCTGCGGCTTTTCATGGAGTTTTTGAGAAATATCCGGAAACTCTGGTGAGGG
TGGTGCAGATCATCATGGTGC GGCTGCAGAGGGTGACCTTTCTGGCTCTGCACAACACTACCTC
GGCCTGACCACAGAGCTCTTCAACGCTGAGAGCCAGGCCATCCCTCTCGTGTCTGTAGCCAG
TGTGGCTGCCGGGAAGGCCAAGAAGCAGGTGTTCTATGGCGAAGAAGAGCGGCTTAAAAAGC
CACCGCGGCTCCAGGAGTCTGTGACTCAGATCACGGGGGCGGCCGCCCGGCAGCTGCTGGG
CCCCTGCTGAAGAGGAGCCACTCCGTCCCCGCGCCTTCCATTCGCAAACAGATCTTGGAGGA
GCTGGAGAAGCCCGGGGCAGGTGACCCGTGACCCTTCGGCCCCACAAGGGGGCCAGGCAGTG
CCACTTCTGATCTGGGGATGGCATGTGACCGTGCAGGGTCTTCTTGCCTCGGACGAGCAC
CCCGGGAGCTCCGTGGCCAGCAAGTCCAGGAAAAGCGTGATGGTTGCAGAGATAACCTCCAC
GGTCTCCAGCACTCAGAGAGTACACGGATGAGACCCTGGCCAGCAGGAAGTCGGATGCCA
TCTTACAGAGCTGCCAAGAAGGACCTGCTCACCTGATGAAGCTGGAAGACTCATCTCTGTTG
GATGGCCGGGTGGCGCTTCTGCACGTTCTGACGGCACGGTGGTGTCAAGGCAGGGAGACCA
GGACGCCAGCATCCTGTTCTGTGGTCTCGGGGCTGCTGCACGTGTACCAGCGGAAGATCGGCA

GCCAGGAGGACACCTGCTTGTTCCTCACGCGCCCCGGGGAGATGGTGGGCCAGCTGGCCGTG
CTCACCGGGGAGCCTCTCATCTTACCCTCAAGGCCAACAGGGACTGCAGCTTCTGTCCAT
CTCCAAGGCCCACTTCTATGAAATCATGCGGAAGCAGCCGACCGTCGTCTGGGTGTGGCGC
ACACTGTGGTGAAGAGGATGTCGTCTTTCGTGCGGCAAATCGACTTTGCCCTGGACTGGGTG
GAGGTGGAGGCCGGGCGAGCAATATACAGGCAGGGGGACAAGTCCGACTGCACGTACATCAT
GCTCAGCGGCCGGCTGCGCTCTGTGATCCGGAAGGATGATGGGAAGAAGCGCCTGGCCGGGG
AGTACGGCCGAGGAGACCTCGTCGGCGTGGTGGAGACACTGACCCACCAGGCCCGGGCGACC
ACGGTGCATGCCGTTTCGGGACTCAGAATTGGCCAAGCTGCCGGCAGGAGCCCTCACGTCCAT
CAAGCGCAGGTACCCACAGGTGGTACTCGGCTGATTCATCTCTTGGGTGAGAAGATCCTGG
GCAGCCTCCAGCAGGGACCTGTGACAGGCCACCAGCTTGGGCTCCCCACGGAGGGCAGCAAG
TGGGACTTGGGGAACCCGGCTGTCAACCTGTCCACGGTGGCAGTGATGCCCGTGTGAGAGGA
AGTGCCCCCTACCGCCTTCGCCCTGGAGCTGGAGCATGCCCTCAGCGCCATCGGCCCGACCC
TGCTGCTGACTAGTGACAACATAAAACGGCGCCTTGGCTCCGCTGCCCTGGACAGTGTTCAC
GAGTACCGGCTGTCCAGCTGGCTGGGGCAGCAGGAGGACACCCACAGGATCGTGCTCTACCA
GGCAGATGGCAGCTCACACCCCTGGACCCAGCGCTGCGTGCGCCAGGCCGACTGCATCCTCA
TCGTGGGCCTGGGTGACCAGGAGCCACAGTGGGCGAGCTGGAGCGGATGCTGGAGAGCACA
GCTGTGCGTGCCAGAAGCAGCTGATCCTGCTGCACAGGGAGGAGGGCCCCGGCGCCAGCGCG
CACCGTGGAGTGGCTCAACATGCGGAGCTGGTGTCTCCGGCCACCTGCACCTCTGCTGCCCGC
GCCGCGTCTTCTCCAGGAGGAGCCTGCCAAGCTGGTGGAGATGTACAAGCATGTCTTCCAG
CGGCCCCCGGACCGACACTCAGACTTCTCCCGCCTGGCGAGGGTGTGACGGGCAACGCCAT
TGCCCTGGTGTCTGGGGGAGGGGGAGCAAGAGGCTGTGCCAGGTGGGCGTCTCAAGGCCT
TGGCGGAGTGCGGCATCCCTGTGGACATGGTGGGAGGCACGTCCATCGGGGCCCTTCGTGGGT
GCCCTGTACTCTGAGGAGCGGAACACTACAGCCAGATGCGGATCCGGGCCAAGCAGTGGGCCGA
GGGCATGACGTCCTTGATGAAGGCCGCGCTGGACCTCACCTACCCATCACGTCCATGTTCT
CCGGAGCCGGCTTCAACAGCAGCATCTTCAGCGTCTTCAAGGACCAGCAGATCGAGGACCTG
TGGATTCTTATTTCCGATCACACCGACATCACAGCCTCGGCCATGCGGGTCCACACCGA
CGGCTCCCTGTGGCGGTACGTGCGTGCCAGCATGTCCCTGTCCGGTTACATGCCCCCTCTCT
GTGACCCGAAGGACGGACACCTGCTGATGGACGGGGGCTACATCAACAACCTCCCAGCGGAT
GTGGCCCCGTTCCATGGGGGCAAAAGTGGTGTGATCGCCATTGACGTGGGCAGCCGAGATGAGAC
GGACCTCACCAACTATGGGGATGCGCTGTCTGGGTGGTGGCTGCTGTGGAAACGCTGGAACC
CCTTGGCCACGAAAGTCAAGGTGTTGAACATGGCAGAGATTCAGACGCGCCTGGCCTACGTG
TGTGCGTGCGGCAGCTGGAGGTGGTGAAGAGCAGTGACTACTGCGAGTACCTGCGCCCCC
CATCGACAGCTACAGCACCCCTGGACTTCGGCAAGTTCAACGAGATCTGCGAAGTGGGCTACC
AGCACGGGCGCACGGTGTGTTGACATCTGGGGCCGACGGCGTGTGGAGAAGATGCTCCGC
GACCAGCAGGGGCCGAGCAAGAAGCCCGCAGTGCGGTCTCACCTGTCCAACGCCCTCCTT
CACGGACCTTGCCGAAATGTGTCTCGCATTGAGCCCGCCAAGCCCGCCATGGTGGATGACG
AATCTGACTACCAGACGGAGTACGAGGAGGAGCTGCTGGACGTCCCAGGGATGCATACGCA
GACTTCCAGAGCACCTCAGCCCAGCAGGGCTCAGACTTGGAGGACGAGTCTCACTGCGGCA
TCGACACCCCAGTCTGGCTTTCCAAAACCTGTCTGAGGGCTCCTCTGACCAGGACGGGTAG

Translacija nukleotidnog slijeda PNPLA7, duljine 4029 nukleotida, rezultirala je sljedećim aminokiselinskim slijedom duljine 1342 aminokiseline:

M E E E K D D S P Q A D F C L G T A L H S W G L W F T E E G S P S T M L T G I A V G A L L A L A L V G V L I L F M F R R L R
Q F R Q A Q P T P Q Y R F R K R D K V M F Y G R K I M R K V T T L P N T L V E N T A L P R Q R A R K R T K V L S L A K R I L
R F K K E Y P A L Q P K E P P P S L L E A D L T E F D V K N S H L P S E V L Y M L K N V R V L G H F E K P L F L E L C K H I
V F V Q L Q E G E H V F Q P R E P D P S I C V V Q D G R L E V C I Q D T D G T E V V V K E V L A G D S V H S L L S I L D I I
T G H A A P Y K T V S V R A A I P S T I L R L P A A A F H G V F E K Y P E T L V R V V Q I I M V R L Q R V T F L A L H N Y L
G L T T E L F N A E S Q A I P L V S V A S V A A G K A K K Q V F Y G E E E R L K K P P R L Q E S C D S D H G G G R P A A A G
P L L K R S H S V P A P S I R K Q I L E E L E K P G A G D P D P S A P Q G G P G S A T S D L G M A C D R A R V F L H S D E H
P G S S V A S K S R K S V M V A E I P S T V S Q H S E S H T D E T L A S R K S D A I F R A A K D L L T L M K L E D S S L L
D G R V A L L H V P A G T V V S R Q G D Q D A S I L F V V S G L L H V Y Q R K I G S Q E D T C L F L T R P G E M V G Q L A V
L T G E P L I F T V K A N R D C S F L S I S K A H F Y E I M R K Q P T V V L G V A H T V V K R M S S F V R Q I D F A L D W V
E V E A G R A I Y R Q G D K S D C T Y I M L S G R L R S V I R K D D G K K R L A G E Y G R G D L V G V V E T L T H Q A R A T
T V H A V R D S E L A K L P A G A L T S I K R R Y P Q V V T R L I H L L G E K I L G S L Q Q G P V T G H Q L G L P T E G S K
W D L G N P A V N L S T V A V M P V S E E V P L T A F A L E L E H A L S A I G P T L L L T S D N I K R R L G S A A L D S V H
E Y R L S S W L G Q Q E D T H R I V L Y Q A D G T L T P W T Q R C V R Q A D C I L I V G L G D Q E P T V G E L E R M L E S T
A V R A Q K Q L I L L H R E E G P A P A R T V E W L N M R S W C S G H L H L C C P R R V F S R R S L P K L V E M Y K H V F Q
R P P D R H S D F S R L A R V L T G N A I A L V L G G G G A R G C A Q V G V L K A L A E C G I P V D M V G G T S I G A F V G
A L Y S E E R N Y S Q M R I R A K Q W A E G M T S L M K A A L D L T Y P I T S M F S G A G F N S S I F S V F K D Q Q I E D L
W I P Y F A I T T D I T A S A M R V H T D G S L W R Y V R A S M S L S G Y M P P L C D P K D G H L L M D G G Y I N N L P A D
V A R S M G A K V V I A I D V G S R D E T D L T N Y G D A L S G W W L L W K R W N P L A T K V K V L N M A E I Q T R L A Y V
C C V R Q L E V V K S S D Y C E Y L R P P I D S Y S T L D F G K F N E I C E V G Y Q H G R T V F D I W G R S G V L E K M L R
D Q Q G P S K K P A S A V L T C P N A S F T D L A E I V S R I E P A K P A M V D D E S D Y Q T E Y E E E L L D V P R D A Y A
D F Q S T S A Q Q G S D L E D E S S L R H R H P S L A F P K L S E G S S D Q D G

7.1.2. -TM PNPLA7

Oznake: Ružičastom bojom istaknuti su start kodon (ATG) i stop kodon (TAG), žutom bojom poveznica, zelenom bojom nukleotidni slijed His₆, a neistaknuti dio nukleotidnog slijeda odgovara -TM PNPLA7.

Napomene: *453. nukleotid ljudskog enzima -TM PNPLA7 mutiran je iz citozina (C) u timin (T) što rezultira promjenom kodona iz GAC u GAT, ali ne rezultira promjenom aminokiseline Asp na položaju 151 u aminokiselinskom slijedu -TM PNPLA7.

Nukleotidni slijed proteina -TM PNPLA7, poveznice i privjeska His₆, ukupne duljine 3855 nukleotida u vektoru pET21a(+):

```
ATGAGAAGGCTTAGACAATTTTCGACAAGCACAGCCACTCCTCAGTACCGGTTCCGGAAGAG
AGACAAAGTGATGTTTTACGGCCGGAAGATCATGAGGAAGGTGACCACACTCCCCAACACCC
TTGTGGAGAACACTGCCCTGCCCGGCAGCGGGCCAGGAAGAGGACCAAGGTGCTGTCTTTG
GCCAAGAGGATTCTGCGTTTTCAAGAAGGAATACCCGGCCCTGCAGCCCAAGGAGCCCCCGCC
CTCCCTGCTGGAGGCCGACCTCACGGAGTTTTGATGTGAAGAATTCTCACCTGCCATCGGAAG
TTCTGTACATGCTGAAAAACGTTCCGGTCTTGGGCCACTTTGAGAAGCCGCTGTTCTTGGAG
CTTTGCAAACACATCGTCTTTGTGCAGCTGCAGGAAGGGGAGCACGTCTTCCAGCCCAGGGA
GCCGGACCCCAGCATCTGTGTGGTGCAGGACGGGCGGCTGGAGGTCTGCATCCAGGACACTG
ACGGCACCGAGGTGGTGGTGAAGAGGTTCTGGCGGGAGACAGCGTCCACAGCCTGCTCAGC
ATCCTGGACATCATCACCGGCCATGCTGCACCTTACAAAACGGTCTCCGTCCGCGCGGCCAT
CCCGTCCACCATCCTCCGGCTTCCAGCTGCGGCTTTTCATGGAGTTTTTTGAGAAATATCCGG
AAACTCTGGTGAGGGTGGTGCAGATCATCATGGTGCAGGCTGCAGAGGGTGACCTTTCTGGCT
CTGCACAACACTACCTCGGCCTGACCACAGAGCTCTTCAACGCTGAGAGCCAGGCCATCCCTCT
CGTGTCTGTAGCCAGTGTGGCTGCCGGGAAGGCCAAGAAGCAGGTGTTCTATGGCGAAGAAG
AGCGGCTTAAAAGCCACCGCGGCTCCAGGAGTCTGTGACTCAGATCACGGGGGCGGCCGC
CCGGCAGCTGCTGGGCCCTGCTGAAGAGGAGCCACTCCGTCCCCGCGCCTTCCATTCGCAA
ACAGATCTTGGAGGAGCTGGAGAAGCCCGGGGCAGGTGACCCTGACCCTTCGGCCCCACAAG
GGGCCCAGGCAGTGCCACTTCTGATCTGGGGATGGCATGTGACCGTGCCAGGGTCTTCCTG
CACTCGGACGAGCACCCCGGGAGCTCCGTGGCCAGCAAGTCCAGGAAAAGCGTGATGGTTGC
AGAGATAACCCTCCACGGTCTCCAGCACTCAGAGAGTACACGGATGAGACCCTGGCCAGCA
GGAAGTCGGATGCCATCTTCCAGAGCTGCCAAGAAGGACCTGCTCACCTGATGAAGCTGGAA
GACTCATCTCTGTTGGATGGCCGGGTGGCGCTTCTGCACGTTCTGTCAGGCACGGTGGTGTG
AAGGCAGGGAGACCAGGACGCCAGCATCCTGTTGTTGTTCTCGGGGCTGCTGCACGTGTACC
AGCGGAAGATCGGCAGCCAGGAGGACACCTGCTTGTTCCTCACGCGCCCCGGGGAGATGGTG
GGCCAGCTGGCCGTGCTCACCGGGGAGCCTCTCATCTTACCCTCAAGGCCAACAGGGACTG
CAGCTTCTGTCCATCTCCAAGGCCACTTCTATGAAATCATGCGGAAGCAGCCGACCGTCG
TCTTGGGTGTGGCGCACACTGTGGTGAAGAGGATGTCGTCTTCTGTCGGCAAATCGACTTT
GCCCTGGACTGGGTGGAGGTGGAGGCCGGGCGAGCAATATACAGGCAGGGGGACAAGTCCGA
CTGCACGTACATCATGCTCAGCGGCCGGCTGCGCTCTGTGATCCGGAAGGATGATGGGAAGA
AGCGCCTGGCCGGGGAGTACGGCCGAGGAGACCTCGTCGGCGTGGTGGAGACACTGACCCAC
CAGGCCCGGGCGACCACGGTGCATGCCGTTCTGGGACTCAGAATTGGCCAAGCTGCCGGCAGG
AGCCCTCACGTCCATCAAGCGCAGGTACCCACAGGTGGTACTCGGCTGATTCATCTCTTGG
GTGAGAAGATCCTGGGCAGCCTCCAGCAGGGACCTGTGACAGGCCACCAGCTTGGGCTCCCC
ACGGAGGGCAGCAAGTGGGACTTGGGGAACCCGGCTGTCAACCTGTCCACGGTGGCAGTGAT
```

GCCCGTGTCTCAGAGGAAGTGCCCCTCACCGCCTTCGCCCTGGAGCTGGAGCATGCCCTCAGCG
CCATCGGCCCGACCCTGCTGCTGACTAGTGACAACATAAAAACGGCGCCTTGGCTCCGCTGCC
CTGGACAGTGTTCACGAGTACCGGCTGTCCAGCTGGCTGGGGCAGCAGGAGACACCCACAG
GATCGTGCTCTACCAGGCAGATGGCACGCTCACACCCTGGACCCAGCGCTGCGTGCGCCAGG
CCGACTGCATCCTCATCGTGGGCCTGGGTGACCAGGAGCCACAGTGGGCGAGCTGGAGCGG
ATGCTGGAGAGCACAGCTGTGCGTGCCAGAAGCAGCTGATCCTGCTGCACAGGGAGGAGGG
CCCGGCGCCAGCGCGCACCGTGGAGTGGCTCAACATGCGGAGCTGGTGTCTCCGGCCACCTGC
ACCTCTGCTGCCCGCGCCGCGTCTTCTCCAGGAGGAGCCTGCCCAAGCTGGTGGAGATGTAC
AAGCATGTCTTCCAGCGGCCCGGACCGACACTCAGACTTCTCCCGCCTGGCGAGGGTGCT
GACGGGCAACGCCATTGCCCTGGTGTCTGGGGGAGGGGGAGCAAGAGGCTGTGCCAGGTGG
GCGTTCTCAAGGCCTTGGCGGAGTGCGGCATCCCTGTGGACATGGTGGGAGGCACGTCCATC
GGGGCCTTCGTGGGTGCCCTGTACTCTGAGGAGCGGAACTACAGCCAGATGCGGATCCGGGC
CAAGCAGTGGGCCGAGGGCATGACGTCCTTGATGAAGGCCGCGCTGGACCTCACCTACCCCA
TCACGTCCATGTTCTCCGGAGCCGGCTTCAACAGCAGCATCTTCAGCGTCTTCAAGGACCAG
CAGATCGAGGACCTGTGGATTCCCTTATTTCCGATCACCACCGACATCACAGCCTCGGCCAT
GCGGGTCCACACCGACGGCTCCCTGTGGTGGTACGTGCGTGCCAGCATGTCCCTGTCCGGTT
ACATGCCCCCTCTCTGTGACCCGAAGGACCGGACACCTGCTGATGGACGGGGGCTACATCAAC
AACCTCCCAGCGGATGTGGCCCCGGTCCATGGGGGCAAAAGTGGTGTATCGCCATTGACGTGGG
CAGCCGAGATGAGACGGACCTCACCAACTATGGGGATGCGCTGTCTGGGTGGTGGCTGCTGT
GGAAACGCTGGAACCCCTTGGCCACGAAAGTCAAGGTGTTGAACATGGCAGAGATTCAGACG
CGCCTGGCCTACGTGTGTTGCGTGCGGCAGCTGGAGGTGGTGAAGAGCAGTGACTACTGCGA
GTACCTGCGCCCCCCCATCGACAGCTACAGCACCCCTGGACTTCGGCAAGTTCAACGAGATCT
GCGAAGTGGGCTACCAGCACGGGCGCACGGTGTGTTGACATCTGGGGCCGCAGCGGCGTGCTG
GAGAAGATGCTCCGCGACCAGCAGGGGCCGAGCAAGAAGCCCGCGAGTGCGGTCTCACCTG
TCCCAACGCCTCCTTCACGGACCTTGCCGAAATTGTGTCTCGCATTGAGCCCGCCAAGCCCG
CCATGGTGGATGACGAATCTGACTACCAGACGGAGTACGAGGAGGAGCTGCTGGACGTCCCC
AGGGATGCATACGCAGACTTCCAGAGCACCTCAGCCCAGCAGGGCTCAGACTTGGAGGACGA
GTCCTCACTGCGGCATCGACACCCAGTCTGGCTTCCCAAAACTGTCTGAGGGCTCCTCTG
ACCAGGACGGGCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

Translacija nukleotidnog slijeda -TM PNPLA7 i privjeska His₆, rezultirala je sljedećim aminokiselinskim slijedom duljine 1293 aminokiselina:

MRRRLRQFRQAQPTPQYRFRKRDKVMFYGRKIMRKVTTLPNTLVENTALPRQRARKRTKVLSSL
AKRILRFKKEYPALQPKEPPPSLLEADLTFEDVKNSHLPSEVLYMLKNVRVLGHFEKPLFLE
LCKHIVFVQLQEGEHVFPREPDPSCVVDGRLEVCIQDQTDGTEVVVKEVLGADSVHSLLS
ILDIITGHAAPYKTVSVRAAIPSTILRLPAAAFHGVFEKYPETLVRVVQIIMVRLQRVTFLLA
LHNYLGLTTELFNAESQAIPLVSVASVAAGKAKKQVFYGEERLKKPPRLQESCDSDHGGGR
PAAAGPLLKRSHSVPAPSIRKQILEELEKPGAGDPDPSAPQGGPGSATSDLGMACDRARVFL
HSDEHPGSSVASKSRKSVMAEIPSTVSQHSESHTDETLASRKSDAIFRAAKDLLTLMKLE
DSSLLDGRVALLHVPAGTVVSRQGDQDASILFVVSGLLHVVYQRKIGSQEDTCLFLTRPGEMV
GQLAVLTGEPLIFTVKANRDCSFLSISKAHFYEIMRKQPTVVLGVAHTVVKRMSSFVRQIDF
ALDWVEVEAGRAIYRQGDKSDCTYIMLSGRLRSVIRKDDGKKRLAGEYGRGDLVGVVETLTH
QARATTVHAVRDSELAKLPAGALTSIKRRYPQVVTRLIHLLGEKILGSLQQGPVTGHQLGLP
TEGSKWDLGNPAVNLSTVAVMPVSEEVPLTAFALELEHALSAIGPTLLLTSDNIKRRLLGSAA
LDSVHEYRLSSWLGGQEDTHRIVLYQADGTLTPWTQRCVRQADCILIVGLGDQEPVGELE
MLESTAVRAQKQLILLHREEGPAPARTVEWLNMRSWCSGHLHLCCPRRVFSRRSLPKLVEMY
KHVFQRPPDRHSDFSRRLARVLTGNAIALVLGGGGARGCAQVGVKALAECEGIPVDMVGGT
SIFGAFVYSEERNYSQMRIRAKQWAEGMTSLMKAALDLYPITSMFSGAGFNSSIFSVFKDQ
QIEDLWIPYFAITTDITASAMRVHTDGSLWR^RYVRASMSLSGYMPPLCDPKDGHLMDGGYIN
NLPADVARSMGAKVVI^AIDVGSRDETDLTNYGDALSGWLLWKRWNPLATKVKVLNMAEIQ
TRLAYVCCVRQLEVVKSSDYCEYL^RPPIDSYSTLDFGKFNEICEVGYQHGRVFDIWRSGVL
EKMLRDQQGPSKKPASAVLTCPNASFTDLAEIVSRIEPAKPA^MVDD^ESDYQTEYEEELLDVP
RDAYADFQSTSAQQGSDLEDESSLRHRHPSLAFPKLSEGSSDQDGL^EHHHHHH

7.1.3. AB-patatinska domena PNPLA7

Oznake: Ružičastom bojom istaknuti su start kodon (ATG) i stop kodon (TAA), žutom bojom poveznice, zelenom bojom privjesak His₆, plavom bojom protein SUMO, narančastom bojom mjesto cijepanja enterokinaze TEV, a crvenom bojom streptavidinski privjesak (Strep). Neoznačeni dio nukleotidnog slijeda odgovara AB-patatinskoj domeni.

Nukleotidni slijed privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, AB-patatinske domene PNPLA7 i privjeska Strep, ukupne duljine 1851 nukleotida u vektoru pST44:

```

ATGGGATCCATGCATCACCATCACCATCACTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCC
AGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCT
AAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGC
TGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAAC
AGATTGGTGGTGGCGGAGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGTCAACCTGTCCACGGTGGCAGTG
ATGCCCCGTGTCAGAGGAAGTGCCCCCTCACCGCCTTCGCCCTGGAGCTGGAGCATGCCCTCAG
CGCCATCGGCCCGACCCTGCTGCTGACTAGTGACAACATAAAAACGGCGCCTTGGCTCCGCTG
CCCTGGACAGTGTTACAGAGTACCGGCTGTCCAGCTGGCTGGGGCAGCAGGAGGACACCCAC
AGGATCGTGCTCTACCAGGCAGATGGCACGCTCACACCCTGGACCCAGCGCTGCGTGCCCA
GGCCGACTGCATCCTCATCGTGGGCCTGGGTGACCAGGAGCCACAGTGGGCGAGCTGGAGC
GGATGCTGGAGAGCACAGCTGTGCGTGCCCAGAAGCAGCTGATCCTGCTGCACAGGGAGGAG
GGCCCCGGCGCCAGCGCGCACCGTGGAGTGGCTCAACATGCGGAGCTGGTGTCTCCGGCCACCT
GCACCTCTGCTGCCCGCGCCGCGTCTTCTCCAGGAGGAGCCTGCCAAGCTGGTGGAGATGT
ACAAGCATGTCTTCCAGCGGCCCCCGGACCGACACTCAGACTTCTCCCGCCTGGCGAGGGTG
CTGACGGGCAACGCCATTGCCCTGGTGCTTGGGGGAGGGGGAGCAAGAGGCTGTGCCAGGT
GGGCGTTCTCAAGGCCTTGGCGGAGTGGGCATCCCTGTGGACATGGTGGGAGGCACGTCCA
TCGGGGCCTTCGTGGGTGCCCTGTACTCTGAGGAGCGGAACTACAGCCAGATGCGGATCCGG
GCCAAGCAGTGGGCCGAGGGCATGACGTCCTTGATGAAGGCCGCGCTGGACCTCACCTACCC
CATCACGTCCATGTTCTCCGGAGCCGGCTTCAACAGCAGCATCTTCAGCGTCTTCAAGGACC
AGCAGATCGAGGACCTGTGGATTCCTTATTTCCGCATCACACCCGACATCACAGCCTCGGCC
ATGCGGGTCCACACCGACGGCTCCCTGTGGCGGTACGTGCGTGCCAGCATGTCCCTGTCCGG
TTACATGCCCCCTCTCTGTGACCCGAAGGACGGACACCTGCTGATGGACGGGGGCTACATCA
ACAACCTCCCAGCGGATGTGGCCCCGGTCCATGGGGGCAAAAGTGGTGATCGCCATTGACGTG
GGCAGCCGAGATGAGACGGACCTCACCAACTATGGGGATGCGCTGTCTGGGTGGTGGCTGCT
GTGGAAACGCTGGAACCCCTTGGCCACGAAAGTCAAGGTGTTGAACATGGCAGAGATTCAGA
CGCGCCTGGCCTACGTGTGTTGCGTGCGGCAGCTGGAGGTGGTGAAGAGCAGTGACTIONTGC
GAGTACCTGCGCCCCCCCATCGACAGCTACAGCACCCCTGGACTTCGGCAAGTTCAACGAGAT
CTGCGAAGTGGGCTACCAGCACGGGCGCACGGTGTGTTGACATCTGGGGCCGACGCGCGTGC
TGGAGAAGATGCTCCGCGACAGCGCTGGAGCCACCCGACGTTTCGAAAAATAA

```


Translacija nukleotidnog slijeda privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, AB-patatske domene i Strep privjeska, rezultirala je sljedećim aminokiselinskim slijedom duljine 617 aminokiselina:

MGSMHHHHHSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAF
KRQGKEMDSLRFYLDGIRIQADQTPEDLDMEDNDI IEAHREQIGGGGENLYFOGK VNLSTVA
VMPVSEEVPLTAFALELEHALSAIGPTLLLTS DNIKRRLGSAALDSVHEYRLSSWLGQQEDT
HRIVLYQADGTLTPWTQRCVRQADCILIVGLGDQEP TVGELERMLESTAVRAQKQLILLHRE
EGPAPARTVEWLNMRSWCSGHLHLCCPRRVFSRRSLPKLVEMYKHVFQRPDRHSDFSR
LAR VLTGNAIALVLGGGGARGCAQVGV LKALAECGIPVDMVGGT SIGAFVGALYSEERNYSQM
RI RAKQWAEGMTSLMKAALDLTYPI TSMFSGAGFNSSIFS VFKDQ QIEDLWIPYFAITTDIT
AS AMRVHTDGS LWR YVRASMSLSGYMPPLCDPKDGHLLMDGGYINNL PADVARSMGAKV
VIAID VGSRDETDLTNYGDALSGWLLWKRWNPLATKVKVLNMAEIQTRLAYVCCVRQLE
VVKSSDY CEYLRPPIDSYSTLDFGKFNEICEVGYQHGR TVFDIWGRSGVLEKMLRD
SAWSHPQFEK

7.1.4. Patatinska domena PNPLA7

Oznake: Ružičastom bojom istaknuti su start kodon (ATG) i stop kodon (TAA), žutom bojom poveznice, zelenom bojom privjesak His₆, plavom bojom protein SUMO, narančastom bojom mjesto cijepanja enterokinaze TEV, a crvenom bojom streptavidinski privjesak (Strep). Neoznačeni dio nukleotidnog slijeda odgovara patatinskoj domeni.

Nukleotidni slijed privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, patatinske domene PNPLA7 i privjeska Strep, ukupne duljine 1257 nukleotida u vektoru pST44:

```

ATGGATCCATGCATCACCATCACCATCACTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCC
AGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTTCGCT
AAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGC
TGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAAC
AGATTGGTGGTGGCGGAGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATTGCCCTGGTGCTTGGGGGA
GGGGGAGCAAGAGGCTGTGCCCAGGTGGGCGTTCTCAAGGCCTTGGCGGAGTGCGGCATCCC
TGTGGACATGGTGGGAGGCACGTCCATCGGGGCCTTCGTGGGTGCCCTGTACTCTGAGGAGC
GGAACTACAGCCAGATGCGGATCCGGGCCAAGCAGTGGGCCGAGGGCATGACGTCTTGATG
AAGGCCGCGCTGGACCTCACCTACCCCATCACGTCCATGTTCTCCGGAGCCGGCTTCAACAG
CAGCATCTTCAGCGTCTTCAAGGACCAGCAGATCGAGGACCTGTGGATTCTTATTTTCGCCA
TCACCACCGACATCACAGCCTCGGCCATGCGGGTCCACACCGACGGCTCCCTGTGGCGGGTAC
GTGCGTGCCAGCATGTCCCTGTCCGGTTACATGCCCCCTCTCTGTGACCCGAAGGACGGACA
CCTGCTGATGGACGGGGGCTACATCAACAACCTCCCAGCGGATGTGGCCCCGGTCCATGGGGG
CAAAGTGTTGATCGCCATTGACGTGGGCAGCCGAGATGAGACGGACCTCACCAACTATGGG
GATGCGCTGTCTGGGTGGTGGCTGCTGTGAAACGCTGGAACCCCTTGGCCACGAAAGTCAA
GGTGTGAACATGGCAGAGATTCAGACGCGCCTGGCCTACGTGTGTTGCGTGCGGCAGCTGG
AGGTGGTGAAGAGCAGTGACTIONTGCAGTACCTGCGCCCCCATCGACAGCTACAGCACC
CTGGACTTCGGCAAGTTCAACGAGATCTGCGAAGTGGGCTACCAGCACGGGCGCACGGTGTT
TGACATCTGGGGCCGACGGCGTGCTGGAGAAGATGCTCCGCGACAGCGCTTGGAGCCACC
CGCAGTTCGAAAAATAA

```

Translacija nukleotidnog slijeda privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, patatinske domene PNPLA7 i Strep privjeska, rezultirala je sljedećim aminokiselinskim slijedom duljine 419 aminokiselina:

```

MGSMHHHHHSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAF
KRQ GKEMDSLRF LYDGI RIQADQTPEDLDMEDNDI IEAHREQIGGGENLYFOGKAIALVLG
GGGARGCAQVGV LKALAECGIPVDMVGGT SIGAFV GALYSEERNYSQMRIRAKQWAEGMTSL
MKAALDLTYPI TSMFSGAGFNSSIFSVFKDQQIEDLWIPYFAITTDITASAMRVHTDGLWR
YVRASMSLSGYMPPLCDPKDGHLLMDGGYINNLPADVARSMGAKVVI AIDVGSRDETDLTNY
GDALSGWLLWKRWNPLATKVKVLNMAEIQTRLAYVCCVRQLEVVKSSDYCEYL RPPIDSYS
TLDFGKFNEICEVGYQHGRVTFDIWGRSGVLEKMLRD SAWSHPQFEK

```

7.1.5. CNB 2-3 PNPLA7

Oznake: Ružičastom bojom istaknut je start kodon (ATG) i stop kodon (TAA), žutom bojom poveznice, zelenom bojom privjesak His₆, plavom bojom protein SUMO, narančastom bojom mjesto cijepanja enterokinaze TEV, a crvenom bojom streptavidinski privjesak (Strep). Neoznačeni dio nukleotidnog slijeda odgovara patatinskoj domeni.

Nukleotidni slijed privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, CNB 2-3 PNPLA7 i privjeska Strep, ukupne duljine 1176 nukleotida u vektoru pST44:

ATGGGATCCATGCATCACCATCACCATCACTCGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCC
 AGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTT
 CAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCT
 AAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGC
 TGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAAC
 AGATTGGTGGTGGCGGAGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGATGAGACCCTGGCCAGCAGGAAG
 TCGGATGCCATCTTCAGAGCTGCCAAGAAGGACCTGCTCACCCCTGATGAAGCTGGAAGACTC
 ATCTCTGTTGGATGGCCGGGTGGCGCTTCTGCACGTTCTGCAGGCACGGTGGTGTCAAGGC
 AGGGAGACCAGGACGCCAGCATCCTGTTCGTGGTCTCGGGGCTGCTGCACGTGTACCAGCGG
 AAGATCGGCAGCCAGGAGGACACCTGCTTGTTCCTCACGCGCCCCGGGGAGATGGTGGGCCA
 GCTGGCCGTGCTCACCGGGGAGCCTCTCATCTTACCCTCAAGGCCAACAGGGACTGCAGCT
 TCCTGTCCATCTCCAAGGCCACTTCTATGAAATCATGCGGAAGCAGCCGACCGTCTGTCCTG
 GGTGTGGCGCACACTGTGGTGAAGAGGATGTCGTCCTTCGTGCGGCAAATCGACTTTGCCCT
 GGACTGGGTGGAGGTGGAGGCCGGGCGAGCAATATACAGGCAGGGGGACAAGTCCGACTGCA
 CGTACATCATGCTCAGCGGCCGGCTGCGCTCTGTGATCCGGAAGGATGATGGGAAGAAGCGC
 CTGGCCGGGGAGTACGGCCGAGGAGACCTCGTTCGGCGTGGTGGAGACACTGACCCACCAGGC
 CCGGGCGACCACGGTGCATGCCGTTTCGGGACTCAGAATTGGCCAAGCTGCCGGCAGGAGCCC
 TCACGTCCATCAAGCGCAGGTACCCACAGGTGGTGACTCGGCTGATTCATCTCTTGGGTGAG
 AAGATCCTGGGCAGCCTCCAGCAGGGACCTGTGAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAA
 ATAA

Translacija nukleotidnog slijeda privjeska His₆, proteina SUMO, mjesta cijepanja TEV, CNB 2-3 PNPLA7 i Strep privjeska, rezultirala je sljedećim aminokiselinskim slijedom duljine 394 aminokiselina:

MGSMHHHHHSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAF
 KRQKEMDSLRFYLDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGGENLYFOGKDETLASR
 KSDAIFRAAKDLLTLMKLEDSSLLDGRVALLHVPAGTVVSRQGDQDASILFVVSGLLHVYQ
 RKIGSQEDTCLFLTRPGEMVQQLAVLTGEPLIFTVKANRDCSFLSISKAHFYEIMRKQPTVV
 LGVAHTVVKRMSFVRQIDFALDWVEVEAGRAIYRQGDKSDCTYIMLSGRLRSVIRKDDGKK
 RLAGEYGRGDLVGVVETLTHQARATTVHAVRDSELAKLPGALTSIKRRYPQVVTRLIHLIG
 EKILGSLQQGPVSAWShpQFEK

7.2. Aminokiselinski sljedovi PNPLA7 korištenih u predviđanju struktura domena

7.2.1. Patatinska domena

Aminokiselinski slijed duljine patatinske domene (953.-1241. aminokiselina u slijedu) duljine 289 aminokiselina:

LVLGGGGARGCAQVGVKALAECCGIPVDMVGGTSSIGAFVGGALYSEERNYSQMRIIRAKQWAEG
MTSLMKAALDLTYPITSMFSGAGFNSSIFSVEFKDQQIEDLWIPYFAITTDITASAMRVHTDG
SLWRYVRASMSLSGYMPPLCDPKDGHLLMDGGYINNLPADVARSMGAKVVIAIDVGSRDETD
LTNYGDALSGWLLWKRWNPLATKVKVLNMAEIQTRLAYVCCVRQLEVVKSSDYCEYLRPPI
DSYSTLDFGKFNICEVGYQHGRVFDIWGRSGVLEKMLRD

7.2.2. AB-domena

Aminokiselinski slijed duljine AB-domena domene (752.-949. aminokiselina u slijedu) duljine 198 aminokiselina:

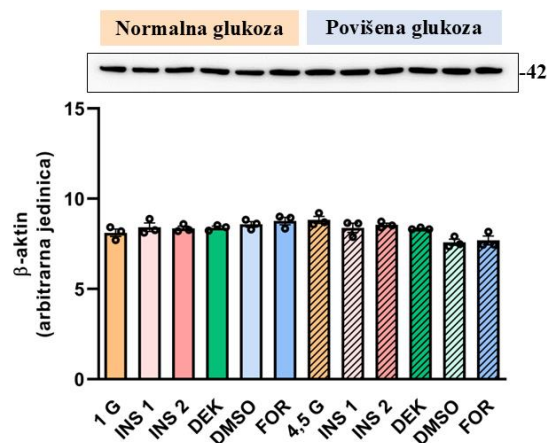
VNLSTVAVMPVSEEVPLTAFALALEHALSAIGPTLLLTSDNIKRRLGSAALDSVHEYRLSSW
LGQQEDTHRIVLYQADGTLTPWTQRCVRQADCILIVGLGDQEPVGELERMLESTAVRAQKQ
LILLHREEGPAPARTVEWLNMRSWCSGHLHLCCPRRVFSRRSLPKLVEMYKHVFQRPPDRHS
DFSRLARVLTGN

7.2.3. Vezna mjesta za cikličke nukleotide 2 i 3

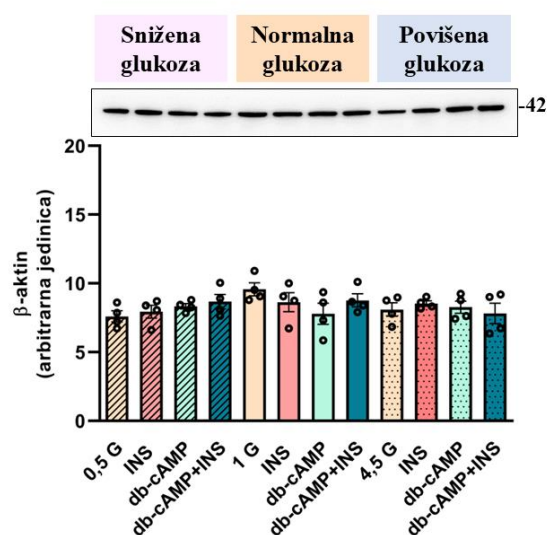
Aminokiselinski slijed duljine patatinske domene (465.-728. aminokiselina u slijedu) duljine 267 aminokiselina:

DETLASRKSDAIFRAAKDLLTLMKLEDSSLLDGRVALLHVPAGTVVSRQGDQDASILFVVS
GLLHVYQRKIGSQEDTCLFLTRPGEMVGLAVLTGEPLIFTVKANRDCSFLSISKAHFYEIM
RKQPTVVLGVAHTVVKRMSSFVRQIDFALDWVEVEAGRAIYRQGDKSDCTYIMLSGRLRSVI
RKDDGKKRLAGEYGRGDLVGVVETLTHQARATTVHAVRDSELAKLPAAGALTSIKRRYPQVVT
RLIHLLGEKILGSLQQGPV

7.3. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na β -aktin u miotubulima

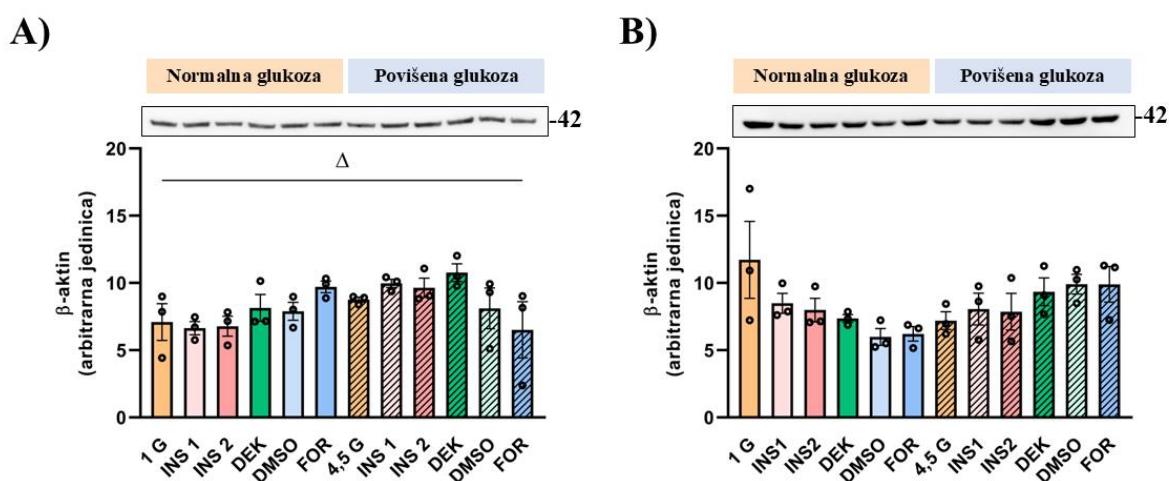


Slika 43. Utjecaj glukoze, inzulina, deksametazona i forskolina na razinu proteina β -aktin u miotubulima, diferenciranim primarnim stanicama skeletnih mišića. Miotubuli su tretirani inzulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS1) i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS2), deksametazonom $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (DEK) i forskolinom $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (FOR) u trajanju od 16 h pri dvije različite koncentracije glukoze, pri normalnoj (1 g dm^{-3} , 1 G) i pri visokoj ($4,5 \text{ g dm}^{-3}$, 4,5 G) koncentraciji glukoze. Promjene na razini proteina praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=3$, broj donora miotubula. Broj na desnoj strani uz graf označavaju molekulska masa proteina β -aktin u odnosu na marker proteinskih vrpca u kDa.

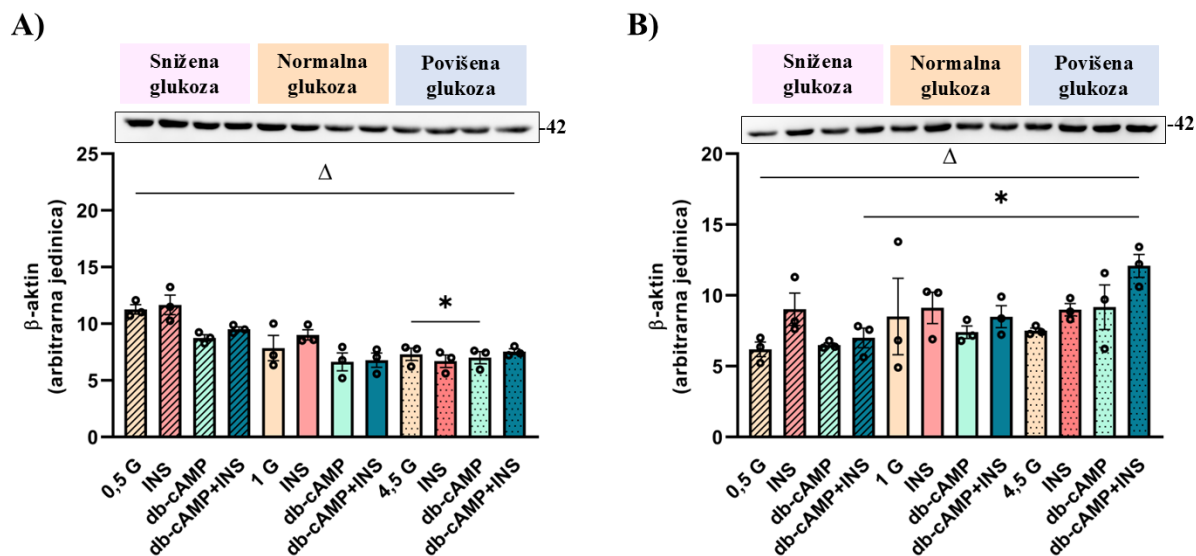


Slika 44. Utjecaj glukoze, inzulina, i dibutilil cikličkog AMP-a (db-cAMP) na razinu proteina β -aktin u miotubulima, diferenciranim primarnim stanicama skeletnih mišića. Miotubuli su tretirani $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ inzulinom (INS), $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ db-cAMP-om (db-cAMP) i njihovom kombinacijom (db-cAMP+INS) u trajanju od 16 h pri tri različite koncentracije glukoze, pri niskoj ($0,5 \text{ g dm}^{-3}$, 0,5 G), fiziološkoj (1 g dm^{-3} , 1 G) i pri visokoj ($4,5 \text{ g dm}^{-3}$, 4,5 G) koncentraciji glukoze. Promjene na razini proteina praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=4$, broj donora miotubula. Broj na desnoj strani uz graf označavaju molekulska masa proteina β -aktin u odnosu na marker proteinskih vrpca u kDa.

7.4. Utjecaj glukoze, hormona i signalnih molekula na β -aktin u staničnoj liniji HepG2



Slika 45. Utjecaj glukoze, inzulina, deksametazona i forskolina na razinu proteina β -aktin u staničnoj liniji HepG2. Stanice HepG2 su tretirane inzulinom $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS 1) i $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (INS 2), deksametazonom $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (DEK) i 5 forskolinom $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (FOR) u trajanju od 16 h i 24 h pri dvije različite koncentracije glukoze, pri fiziološkoj (1 G, 1 g dm^{-3}) i pri visokoj (4,5 G, $4,5 \text{ g dm}^{-3}$) koncentraciji glukoze. Utjecaj tretmana na razinu proteina β -aktin nakon: **A)** 16 h izloženosti, **B)** 24 h izloženosti. Promjene na razini proteina praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=3$, broj tehničkih replikata. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $\Delta p < 0,05$ između 1 g dm^{-3} G i $4,5 \text{ g dm}^{-3}$ G. Broj na desnoj strani uz graf označavaju molekulsku masu proteina β -aktin u odnosu na marker proteinskih vrpca u kDa.



Slika 46. Utjecaj glukoze, inzulina, i dibutilil cikličkog AMP-a (db-cAMP) na razinu proteina β -aktin u staničnoj liniji HepG2. Stanice HepG2 su tretirane $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ inulinom (INS), $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ db-cAMP-om i njihovom kombinacijom (db-cAMP+INS) u trajanju od 16 h i 24 h pri tri različite koncentracije glukoze, pri niskoj ($0,5 \text{ G}$, $0,5 \text{ g dm}^{-3}$), fiziološkoj (1 G , 1 g dm^{-3}) i pri visokoj ($4,5 \text{ G}$, $4,5 \text{ g dm}^{-3}$) koncentraciji glukoze. Utjecaj tretmana na razinu proteina β -aktin nakon: **A)** 16 h izloženosti, **B)** 24 h izloženosti. Promjene na razini proteina praćene su Western analizom, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost i standardna pogreška srednje vrijednosti. $N=3$, broj tehničkih replikata. Statistička značajnost je određena u programu GraphPad Prism pri čemu je $*p < 0,05$ u odnosu na $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$. $\Delta p < 0,05$ između $1 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$ i $4,5 \text{ g dm}^{-3} \text{ G}$. Broj na desnoj strani uz graf označavaju molekulsku masu proteina β -aktin u odnosu na marker proteinskih vrpce u kDa.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Ana-Marija Lulić
Ustanova	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Adresa	Ksaverska cesta 2, pp 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska
Telefon/E-mail	+385 1 4682 564 / mlulic@imi.hr
Radno iskustvo	
Godina (od - do)	2020. →
Ustanova	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (Zagreb, Hrvatska)
Odjel	Zavod za toksikologiju
Radno mjesto	Asistent doktorand
Područje istraživanja	Istraživanje fiziološke uloge i regulacije lizofosfolipaze PNPLA7 u staničnom modelu metabolički aktivnoga tkiva, proučavanje mehanizma toksičnosti protuotrova organofosforinim spojevima na različitim staničnim linijama Metode: stanična kultura, stanični testovi, spektrofotometrija, enzimska kinetika, Western analiza, imunohistokemija
Obrazovanje	
Godina (od - do)	2020. →
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer: biokemija
Godina (od - do)	2017. - 2020.
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Diplomski studij kemije, smjerovi: analitička kemija i biokemija
Zvanje	Magistra kemije
Godina (od - do)	2013. - 2017.
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Preddiplomski studij kemije
Zvanje	Prvostupnica kemije
Publikacije	
<p>1. Miš, Katarina; Lulić, Ana-Marija; Marš, Tomaž; Pirkmajer, Sergej; Katalinić, Maja. Insulin, dibutyryl-cAMP, and glucose modulate expression of patatin-like domain containing protein 7 in cultured human myotubes. <i>Frontiers in endocrinology</i>, 14 (2023), 1139303. doi: 10.3389/fendo.2023.1139303.</p>	
<p>2. Lulić, Ana-Marija; Katalinić, Maja. The PNPLA family of enzymes: characterisation and biological role. <i>Arhiv za higijenu rada i toksikologiju</i>, 74 (2023), 75-89. doi: 10.2478/aiht-2023-74-3723.</p>	

Znanstvena usavršavanja	
Godina (od - do)	1.2.2024.-2.5.2024.
Ustanova	Institut za molekularne bioznanosti, Sveučilište u Grazu, Austrija
Odjel	Strukturna biologija
Mentor/ica	Prof. dr. sc. Monika Oberer
Područje istraživanja	Optimizacija ekspresije i pročišćavanje konstrukata ljudskog proteina PNPLA7 u <i>E.coli</i> Metode: kloniranje (<i>Gibson assembly</i>), PCR, bakterijska kultura, prekomjerna ekspresija proteina, afinitetna kromatografija, predviđanje 3D strukture sustavima AlphaFold2 i PHYRE2
Godina (od - do)	16.8.2021.-15.10.2021., 24.1.2022.-24.2.2022.
Ustanova	Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Ljubljana, Slovenija
Odjel	Laboratorij za molekularnu neurobiologiju
Mentor/ica	Prof. dr. sc. Sergej Pirkmajer
Područje istraživanja	Istraživanje važnosti i regulacije proteina PNPLA7 u primarnim stanicama ljudskih skeletnih mišića Metode: Uzgoj i diferencijacija primarnih stanica skeletnih mišića, utišavanje koristeći malu interferirajuću RNA, Western analiza, PCR
Godina (od - do)	1.10.2019.-1.12.2019.
Ustanova	Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska
Odjel	Zavod za analitičku kemiju
Mentor/ica	Prof. dr. sc. Predrag Novak
Područje istraživanja	Sinteza, pročišćavanje i struktura karakterizacija makrozona, konjugata makrolidnih antibiotika Metode: NMR, MS, HPLC
Godina (od - do)	15.6.2019.-29.7.2019.
Ustanova	Medicinski fakultet, Łódź, Poljska
Odjel	Laboratorij za molekularnu dijagnostiku i farmakogenomiku
Mentor/ica	Prof. dr. sc. Ewa Balcerzak
Područje istraživanja	Analiza genske ekspresije i SNP-ova (engl. <i>single polynucleotide polymorphism</i>) Metode: izolacija RNA i DNA, PCR, gel elektroforeza, Western analiza
Nagrade i stipendije	
1. FEBS-YSF stipendija za sudjelovanje na <i>Young Scientist's Forum</i> (YSF 2024) održanom 26.7.-29.6.2024. u Paviji, Italija, i 48. FEBS kongresu održanom 29.6.-3.7.2024. u Milanu, Italija.	
2. Stipendija MOBDOK-2023 dodjeljena od strane Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) za znanstveno-istraživačko usavršavanje na Institutu za molekularne bioznanosti, Sveučilište u Grazu, Austrija, u trajanju 1.2.2024.-2.5.2024.g., pod mentorstvom prof. dr. sc. Monika Oberer	
Jezici	
Hrvatski, ruski i engleski jezik	
Članstva	
1. 2020. → trenutno Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju	
2. 2018.-2020. IAESTE Hrvatska	
Tehničke kompetencije	
Microsoft Office, GraphPad Prism, softveri za analizu rezultata western blotting: Quantity One, Image Lab, softveri za vizualizaciju molekula: MedChem Designer, ChemDraw, softveri za homologno modeliranje: Phyre2, AlphaFold2, I-TASSER, ostali softveri: PyMOL, SnapGene Viewer, BLAST, EMBOSS Needle, Expasy	

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima s usmenim priopćenjem
1. Lulić, Ana-Marija. Lipidne kapljice – masti nadohvat ruke // Inkubator ideja @IMI 2023. (27.-28.4.2023.g. Zagreb, Hrvatska).
2. Lulić, Ana-Marija; Katalinić, Maja. Regulation of lysophospholipase PNPLA7 by metabolic signals in hepatocellular carcinoma cell line // <i>7th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry</i> (21.11.2023.g., Zagreb, Hrvatska) // <i>7th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry: Book of Abstracts</i> . HKD - sekcija za medicinsku i farmaceutsku kemiju, 2023. str. 7-7.
Sudjelovanje na znanstvenim skupovima s posterskim priopćenjem (prvo autorstvo)
1. Lulić, Ana-Marija; Katalinić, Maja. The effect of nutrients, hormones and signalling molecules on the expression of lysophospholipase PNPLA7 and β -actin in hepatocellular carcinoma cell line // <i>The 23rd FEBS Young Scientists' Forum</i> (YSF 2024, 26.6.-29.6.2024.g., Pavia, Italija) & <i>48th FEBS Congress – 'Mining biochemistry for human health and well-being'</i> (29.6.-3.7.2024.g., Milano, Italija) // <i>FEBS Open Bio</i> 14 (2024), S2; str.255-255. doi: 10.1002/2211-5463.13837.
2. Lulić, Ana-Marija; Katalinić, Maja. Time-dependent study - regulation of lysophospholipase PNPLA7 by metabolic signals in hepatocellular carcinoma cell line // <i>FEBS-IUBMB-ENABLE 2023: The emerging challenge – environmental impacts on human health</i> (23.11.-25.11.2023.g., Köln, Njemačka) // <i>FEBS Open Bio</i> 14 (2024), S1; str.38-38. doi: 10.1002/2211-5463.13792.
3. Lulić, Ana-Marija; Miš, Katarina; Pirkmajer, Sergej; Katalinić, Maja. Metabolic regulation and importance of lysophospholipase PNPLA7 in human skeletal muscles // <i>The 47th FEBS Congress: Together in Bioscience for a better future</i> (8.7.-12.7.2024., Tours, Francuska) // <i>FEBS Open Bio</i> 13 (2023), S2; str. 109-109, doi: 10.1002/2211-5463.13646.
4. Lulić, Ana-Marija; Miš, Katarina; Pirkmajer, Sergej; Katalinić, Maja. Neuropathy target esterase-related enzyme and its kinetic characterization // <i>International Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology - From Science to Knowledge</i> (28.9.-1.10.2022.g., Brela, Hrvatska) // <i>Book of Abstract of International Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology - From Science to Knowledge</i> 2022. str. 102-102.
Sudjelovanje na znanstvenim skupovima s posterskim priopćenjem (ko-autorstvo)
1. Zandona, Antonio; Marčelić, Lucija; Lulić, Ana-Marija; Ramić, Alma; Primožič, Ines; Katalinić, Maja. Novel dodecylaminoquinuclidines as potent inhibitors of components of the cholinergic system // <i>48th FEBS Congress – 'Mining biochemistry for human health and well-being'</i> (29.6.-3.7.2024.g., Milano, Italija) // <i>FEBS Open Bio</i> , 14 (2024), S2; 92-516. doi: 10.1002/2211-5463.13837.
2. Vrhovac Madunić, Ivana; Kureljak, Dunja; Zandona, Antonio; Lulić, Ana-Marija; Madunić, Josip; Katalinić, Maja. Cytotoxic effect of imidazolium oximes on Prostate Cancer cells (PC-3) // <i>International Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology - From Science to Knowledge</i> (28.9.-1.10.2022.g., Brela, Hrvatska) // <i>Book of Abstract of International Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology - From Science to Knowledge</i> 2022. str. 156-156.
3. Kovarik, Zrinka; Pehar, Vesna; Čadež, Tena; Kolić, Dora; Zandona, Antonio; Lulić, Ana-Marija; Šinko, Goran; Katalinić, Maja. Biological assessment of selected herbicides and pesticides in use as inhibitors of human cholinesterases and on HepG2 and SH-SY5Y cell lines // <i>25th IUBMB Congress, the 46th FEBS Congress and the 15th PABMB Congress - The Biochemistry Global Summit</i> (9.7.-14.7.2022., Lisabon, Portugal) // <i>FEBS Open Bio</i> . 2022. str. 129-129 doi: 10.1002/2211-5463.13440.
4. Madunić, Josip; Zandona, Antonio; Lulić, Ana-Marija; Miš, Katarina; Bušić, Valentina; Gašo-Sokač, Dajana; Pirkmajer, Sergej; Katalinić, Maja. The effects of vitamin B3-based compounds on neuronal and muscle cells // <i>17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms</i> (8.5.-12.5.2022., Dubrovnik, Hrvatska) // <i>17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022) - Programme and Abstracts</i> , 2022. str. 64-64.

5. Kolić, Dora; **Lulić, Ana-Marija**; Spahić, Zlatan; Primožič, Ines; Katalinić, Maja; Kovarik, Zrinka. Characterization of novel imidazolium oximes as selective reactivators of nerve agent-inhibited butyrylcholinesterase // *17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms* (8.5.-12.5.2022., Dubrovnik, Hrvatska) // *17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022) - Programme and Abstracts*, 2022. str. 62-62.

Sudjelovanje na znanstvenim radionicama

1. Online radionica "Uvod u molekulsko modeliranje", 3., 4. i 7.12.2020.g., Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska.

2. Online radionica "Better Skills for Better Jobs: Excellent Lab Book for an Excellent Career", 17. i 18.12.2020.g., HDBMB & FEBS Education workshop, Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Zagreb, Hrvatska.

3. Online radionica "Basics of Computer Aided Drug Discovery Part-I", 8.7.2021.g., Udemy

4. **Lulić, Ana-Marija**; Miš, Katarina; Pirkmajer, Sergej; Katalinić, Maja. Neuropathy target esterase-related esterase and its potential role in maintaining the membrane homeostasis of the endoplasmic reticulum in human skeletal muscle cells // *EMBO/FEBS Advanced Lecture Course "Lipids, proteins and their interactions in organelle biology"* (29.5.-4.6.2022., Spetses, Grčka) // *Book of abstracts of EMBO/FEBS Advanced Lecture Course "Lipids, proteins and their interactions in organelle biology"*. 2022, str. 96.

5. Online radionica "Fundamentals of Western Blotting - Course 1: Sample Preparation", pristupljeno 29.3.2023.g., Bio-Rad Academy.

6. Online radionica "Fundamentals of Western Blotting - Course 2: Gel Electrophoresis and Transfer", pristupljeno 31.3.2023.g., Bio-Rad Academy.

7. Online radionica "Fundamentals of Western Blotting - Course 3: Immunodetection", pristupljeno 12.4.2023.g., Bio-Rad Academy.

8. Online radionica "Fundamentals of Western Blotting - Course 4: Image Acquisition", pristupljeno 13.4.2023.g., Bio-Rad Academy.

9. Online radionica "Fundamentals of Western Blotting - Course 5: Image Analysis", pristupljeno 13.4.2023.g., Bio-Rad Academy.

10. Online radionica "Advanced Western Blotting - Course 1: Sample Preparation", pristupljeno 19.7.2023.g., Bio-Rad Academy.