

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Iva B. Pruner

FUNKCIONALNA ANALIZA GENSKE
VARIJANTE C20068T U 3'KRAJU GENA
ZA PROTROMBIN ČOVEKA I NJENA
ULOGA U PATOGENEZI TROMBOFILIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Iva B. Pruner

THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE
C20068T GENE VARIANT IN THE 3'END
OF THE PROTHROMBIN GENE AND ITS
ROLE IN THE PATHOGENESIS OF
THROMBOPHILIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

MENTORI:

dr **Valentina Dorđević**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut
za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr **Duška Savić Pavićević**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut
za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr **Mirjana Kovač**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr **Branko Tomić**, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut
za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane _____

Ovaj doktorski rad urađen je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Zahvaljujem se svim kolegama na pomoći i savetima koje su mi pružali tokom godina. Posebno bih želela da se zahvalim svojim mentorima i članovima komisije:

dr Valentini Đorđević, koja je uz mene bila od prvih koraka u laboratoriji do poslednjih slova napisanih u ovom radu. Njen entuzijazam me je vodio u najtežim trenucima, njena upornost me je naučila da nikada ne odustajem, a njena kreativnost mi je pokazala da granice ne postoje. Vanja, hvala ti što si sa mnom podelila svoje naučne snove i pokazala mi da mentor nije samo profesionalni savetnik, već i iskreni prijatelj.

Dr Dušanki Savić Pavićević sam zahvalna na svojoj pomoći i savetima koje mi je pružila od trenutka kada je ova teza bila samo ideja.

Dr Dragici Radojković želim da se zahvalim, kao rukovodiocu Laboratorije za molekularnu biologiju, na svojoj podršci, savetima i pomoći koju mi je pružala tokom eksperimentalnog rada i finalnog uobličavanja ove teze.

Dr Mirjani Kovač, našem spoljnom saradniku i saborcu u mnogim malim i velikim borbama, bez čijeg zalaganja i posvećenosti veliki deo ove teze ne bi bilo moguće uraditi.

Dr Branku Tomiću, sa kojim imam zadovoljstvo da svakodnevno radim, učim od njega i čija me kreativnost uvek iznova oduševljava. Branko, hvala ti na pomoći koju si mi pružao tokom svih ovih godina, na svim razgovorima o životnim stvarima, našem specifičnom jutarnjem pozdravu, kao i smehu i muzici koji našu laboratoriju čine najprijatnijim mestom za boravak.

Svim članovima LAB03 kolektivno zahvaljujem na divnoj atmosferi i osećaju pripadanja, a posebno:

Sneži, Lili, Kušić i Đoletu, starijim od mene po godinama, ali uvek spremnim na šalu i smeh, pa i po neki životni savet i mudrost.

Aleks i Saškici, mojim "maćehama", od kojih sam naučila puno životnih i korisnih stvari.

Mili, sa kojom delim ljubav prema kreativnom haosu na radnom mestu, želim da zahvalim na svim popodnevnim satima i lekovitim razgovorima u kojima smo izbacivali ljutnje, frustracije i salve smeha, kao i svakom dogovoru da ćemo vežbati, a koji nismo ispoštovali.

Alekici, osobi sa najzaraznijim smehom na svetu, na svim divnim razgovorima koji svakodnevno čine da nam laboratorija bude puna graje i smeha.

Jovani, za deceniju dugo prijateljstvo i sve što smo zajedno podelile.

Sandri i Miri, na pozitivnoj energiji i kolektivnom duhu koji održavaju u životu.

Maji, koja je svojim dolaskom u trombotički tim unela novu snagu i polet. Majo, hvala ti na svim malim i velikim stvarima koje si uradila za mene i umesto mene, na razumevanju za sve moje probleme i raspoloženja, na upornosti i perfekcionizmu koji planiram da učim od tebe u godinama koje nam dolaze.

Marijani i Jeleni, našim master studentkinjama, koje su mi pomagale da se prisetim mladalačkog entuzijazma u trenucima kada nijedan eksperiment nije išao.

Istraživačkoj Stanici Petnica, u kojoj sam se davne 2001. godine zarazila naukom i gde sam naučila kako nauka treba da izgleda. Petnica je i dalje moja oaza i mirna luka u koju mogu da pobegnem od surove realnosti.

Mom seminaru Biomedicini, Luki, Voinu, Zverku, Veci, Duletu, Gumbiju, ostalim mlađim saradnicima i svim polaznicima, velika mi je čast što ste deo mog života, sa vama sam rasla i sazrevala, bez vas ne bih bila osoba kakva sam danas.

Mojim najstarijim prijateljicama, a danas i kumama, Jovani i Ani, što su najdivnije osobe na svetu i što me trpe ovako napornu kakva jesam.

DnD ekipi, sa kojom sam eliminisala bezbrojne orke i zmajeve, bacala magije, opsedala kule i gradove, beskrajno uživajući u svakom trenutku.

Skeletoru, koji je svojim humorom olakšavao moje dane.

Svim mojim prijateljima, koji su verovatno zaboravili da postojim u poslednjih pet godina.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici,

Andreju, bez čije ljubavi, reči utehe i najtoplijeg zagrljaja na svetu ne bih mogla da postojim. Hvala ti što me voliš i razumeš, iako nije uvek lako.

Mojim roditeljima, koji su moja snaga i podrška tokom svakog trenutka i kojima je ovaj rad posvećen. Želja da vas učinim ponosnim je uvek u mojim mislima, nadam se da sam vam pružila bar deo onoga što ste vi pružili meni. Volim vas!

Ovu tezu posvećujem mojim roditeljima

Biljani i Borisu

Funkcionalna analiza genske varijante C20068T u 3'kraju gena za protrombin čoveka i njena uloga u patogenezi trombofilije

REZIME

Protrombin (Faktor II) je prekursor trombina, jednog od ključnih molekula u održavanju hemostazne ravnoteže. Povišeni nivo protrombina dovodi do poremećaja hemostazne ravnoteže i stanja hiperkoagulacije, koje se manifestuje pojavom tromboza. Pokazano je da 3'kraj protrombinskog gena poseduje nekanonsku organizaciju, usled čega je podložan mutacijama koje dovode do povećane ekspresije protrombina i povišenog rizika za pojavu trombofilije.

U okviru prethodne studije, sprovedene u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, u poslednjem egzonu gena za protrombin identifikovana je promena citozina (C) u timin (T) na mestu 20068. Ova genska varijanta dovodi do zamene CGC kodona za arginin u CGT kodon koji takođe kodira za arginin na poziciji 608 u proteinu. U bazi dsSNP/NCBI je klasifikovana kao sinonimna promena, pod brojem rs3136532. Pokazano je da je ova genska varijanta zastupljenija kod pacijenata sa trombozama i da njeno prisustvo dovodi do povećane ekspresije iRNK.

Prvi deo istraživanja, u okviru ove doktorske disertacije, podrazumevao je određivanje učestalosti genske varijante C20068T u grupi pacijenata sa trombofilijom, kao i u odgovarajućoj grupi zdravih ispitanika, čime bi se utvrdilo da li ova varijanta predstavlja potencijalni novi trombofilni marker. Drugi deo istraživanja obuhvatio je funkcionalnu analizu C20068T varijante, u cilju rasvetljavanja mehanizma kojim ova sinonimna varijanta utiče na promenu ekspresije gena za protrombin.

U okviru ove studije testirano je ukupno 797 ispitanika, od toga 606 pacijenata i 191 ispitanik kontrolne grupe. Pacijenti su podeljeni u grupe, shodno poremećaju od koga su bolovali, u grupu pacijenata sa trombotičkim poremećajima (443 pacijenta, od čega: 106 sa cerebrovaskularnim insultom, 101 sa plućnim embolizmom, 175 sa trombozom dubokih vena i 61 sa kombinovanim trombotičkim poremećajima) i grupu pacijentkinja sa spontanim pobačajima (163 pacijentkinje).

U grupi pacijenata sa cerebrovaskularnim insultom detektovana su tri heterozigotna nosioca C20068T varijante (OR 5,53; P=0,13). U grupi pacijenata sa

izolovanim plućnim embolizmom takođe su detektovana tri heterozigotna nosioca (OR 5,81; P=0,12). Kod pacijenata sa trombozom dubokih vena detektovano je šest nosilaca (OR 6,74; P=0,057), dok su kod pacijenata sa kombinovanim trombotičkim poremećajima detektovana tri nosioca (OR 9,83; P=0,045). U ukupnoj grupi pacijenata sa trombotičkim poremećajima, prisustvo C20068T varijante u heterozigotnom obliku je predstavljalo statistički značajan faktor rizika (OR 6,66; P=0,049). U grupi žena sa spontanim pobačajima detektovana su 4 heterozigotna nosioca ove genske varijante (OR 4,26; P=0,31). U ovoj studiji nisu detektovani homozigotni nosioci C20068T varijante.

Prisustvo C20068T varijante dovodi do povećanja količine protrombina u plazmi pacijenata koji su heterozigotni nosioci ove varijante. U odnosu na standardnu plazmu (referentna vrednost 100), kvantifikovana količina protrombina u plazmi pacijenata iznosila je $143,65 \pm 28,8$; P<0,05.

Dalja funkcionalna analiza C20068T je pokazala da ova varijanta dovodi do 1,60 puta povećane ekspresije protrombinske iRNK u odnosu na wt (*wild type*). Ovi rezultati su dobijeni relativnom kvantifikacijom iRNK metodom real-time PCR na odabranim klonovima stabilno transfekovanih cos-7 ćelija za koje je utvrđeno da imaju isti broj kopija inserata. Za potrebe ovog eseja, prvi put je standardizovana nova metoda za određivanje broja kopija transgenih inserata (metod qfPCR-kapilarna elektroforeza).

In silico predikcija sekundarne strukture poslednjeg egzona protrombinskog gena je pokazala da prisustvo T na mestu 20068 dovodi do promena u sekundarnoj strukturi egzona i potencijalno može da utiče na stabilnost iRNK. Međutim, esej ispitivanja stabilnosti iRNK u cos-7 ćelijama stabilno transfekovanim wt i 20068T konstruktima je pokazao da prisustvo bazne zamene C u T ne dovodi do značajnih promena u stabilnosti iRNK za protrombin.

Ova studija je obuhvatila i određivanje potencijalnih razlika u mestu iskrajanja između protrombinskih iRNK dobijenih iz ćelija transfekovanih wt i 20068T konstruktima. Rezultati su pokazali da prisustvo 20068T varijante dovodi do stvaranja transkripata sa manjom dužinom 3'kraja u poređenju sa wt transkriptima.

Analiza DNK/protein interakcija je obuhvatila EMSA esej sa identifikacijom vezanih proteina masenom spektrometrijom i metod određivanje mesta vezivanja proteina za jednolančanu DNK probu esejem FP-PCR (*Footprinting Primer-PCR*) koji je standardizovan u okviru ove studije. Rezultati masene spektrometrije su pokazali da

se za region wt probe vezuje 11 proteina, dok se za 20068T probu vezuju tri proteina iz jedarnog ekstrakta HepG2 ćelijske linije. Identifikovani proteini pretežno pripadaju porodici heterogenih nuklearnih ribonukleoproteina, ali na osnovu njihovih do sada opisanih funkcija nije moguće pretpostaviti koja bi bila njihova uloga u regulaciji ekspresije gena za protrombin. Ispitivanje interakcije jedarnih proteina HepG2 ćelija sa jednonolančanom DNK probom FP-PCR metodom je pokazalo da prisustvo T na mestu 20068 dovodi do stvaranja vezivnog mesta za protein ili proteinski kompleks koje se ne vezuje za wt varijantu.

Rezultati ove studije su pokazali da C20068T varijanta predstavlja novi, značajni trombofilni marker sa učestalošću od oko 3% u grupi pacijenata sa trombofilijom. Funkcionalna analiza je pokazala da prisustvo ove varijante dovodi do povećane količine protrombina u plazmi pacijenata, kao i do povećane ekspresije iRNK za protrombin u ćelijama stabilno transfekovanim 20068T konstruktom. Dalja funkcionalna analiza je pokazala da ova genska varijanta dovodi do povećane ekspresije protrombina na više nivoa regulacije, utičući na dužinu 3'kraja protrombinske iRNK, njenu sekundarnu strukturu, DNK-protein interakcije i interakcije sa regulatornim proteinima. Na osnovu dobijenih rezultata, C20068T predstavlja funkcionalnu sinonimnu gensku varijantu, čiji mehanizam delovanja do sada nije opisan i potrebne su dalje studije da bi se on do kraja rasvetlio.

KLJUČNE REČI: protrombin, 3'kraj protrombinskog gena, genska varijanta C20068T, sinonimna genska varijanta, regulacija ekspresije, trombofilija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 577.218: [616.151.5: 612.115] (043.3)

The functional analysis of the C20068T gene variant in the 3'end of the prothrombin gene and its role in the pathogenesis of thrombophilia

ABSTRACT

Prothrombin (Factor II) is a precursor of thrombin, one of the key regulatory enzymes in the maintenance of haemostasis. Elevated level of prothrombin leads to haemostatic disbalance and hypercoagulation, which can manifest as thrombotic disorders. The 3'end of the prothrombin gene has noncanonical architecture that is sensitive to gain-of-function mutations, leading to increased prothrombin expression and elevated risk for thrombophilia.

In our previous study we detected a novel C to T point mutation at the position 20068 in the last exon of the prothrombin gene. This gene variant leads to exchange of CGC to CGT codon which both code for arginine at the position 608 in the protein. C20068T gene variant is classified as synonymous gene variant, under reference SNP ID number 3136532. This variant was more frequent in the patients with thrombosis compared to controls and leads to increased prothrombin mRNA expression.

The first aim of this study was to determine the prevalence of C20068T gene variant in patients with thrombophilia, as well as in healthy controls. The second aim of this study was to elucidate the mechanism by which C20068T variant affects the prothrombin gene expression and pathogenesis of thrombophilia.

This study included 797 subjects, divided in study and control groups. Patients were divided in five groups, according to thrombotic event they suffered from: 443 with several thrombotic manifestations, including 106 patients with cerebrovascular insult, 101 patient with pulmonary embolism, 175 patients with deep vein thrombosis and 61 patient with combined thrombotic events. This study also included 163 women who suffered from foetal losses. In the groups of patients with cerebrovascular insult, we have detected three heterozygous carriers of C20068T variant (OR 5.53; P=0.13), as well as in the group of patients with isolated pulmonary embolism (OR 5,81; P=0,12. In patients with deep vein thrombosis, 6 carriers of 20068CT genotype were detected (OR 6.74; P=0.057. Three heterozygous carriers were detected in the patients with combined thrombotic manifestations (OR 9.83; P=0.045). Our results indicate that C20068T represents significant risk factor for thrombotic occurrence (OR 6.66; P=0.049). Four

heterozygous carriers were detected in women with foetal loss (OR 4.26; P=0.31). No homozygous carriers of C20068T gene variant were detected in this study.

Our results have shown that the presence of C20068T variant leads to the increase of prothrombin level in the plasma of heterozygous carries. Compared to the standard plasma (reference value 100), quantified the amount of prothrombin in the plasma of patients was 143.65 ± 28.8 ($P < 0.05$).

Further functional analysis of C20068T variant showed that this variant leads to 1.60-fold increased prothrombin mRNA expression, compared to *wild type* (wt) prothrombin mRNA. These results were obtained by relative quantification of mRNA by real-time PCR, using the stably transfected cos-7 cell clones with same transgene copy number. For the purposes of this study, we have standardized the new method for determination of the transgene copy number (qfPCR-capillary electrophoresis).

In silico prediction of the secondary structure of the last exon of the prothrombin gene revealed that the presence of T at the position 20068 leads to a change in the secondary structure and can potentially affect the stability of the mRNA. However, the measurement of mRNA stability in cos-7 cells stably transfected with wt and 20068T constructs showed that C to T substitution does not lead to significant changes in the stability of prothrombin mRNA.

This study also included the determination of potential differences in the choice of cleavage site in prothrombin mRNA extracted from cells transfected with wt and 20068T constructs. The results showed that the presence 20068T leads to generation of transcripts with a shorter 3'end compared to wt transcripts.

DNA-protein interaction analysis included EMSA assay with the identification of proteins by mass spectrometry and the assay for determination of the protein interactions with the single-stranded DNA probes. This assay, Footprinting Primer-PCR (FP-PCR), was for the first time standardized in this study. The results of the mass spectrometry revealed that 11 proteins have bonded with wt probe and 3 proteins have bonded with 20068T probe. Identified proteins mainly belong to the family of heterogenous nuclear ribonucleoproteins, but their role in the regulation of the prothrombin expression remains to be elucidated. Investigation of the interaction of HepG2 nuclear proteins with single-stranded DNA (ssDNA) probe by FP-PCR method

have shown that the presence of T at the position 20068 results in the formation of the ssDNA/protein complex binding site that does not exist in the wt DNA probe.

The results of this study showed that C20068T variant represents a new significant thrombophilic marker, with a frequency of approximately 3% in the group of patients with thrombophilia. Functional analysis demonstrated that the presence of this variant leads to increased prothrombin plasma level in, as well as, to an increased prothrombin mRNA expression. Further analysis has elucidated that C20068T variant most likely affects prothrombin expression on several levels of gene expression regulation, including the length of the prothrombin mRNA 3'end, its secondary structure, DNA-protein interactions and interactions with other regulatory proteins. Based on our results, C20068T variant is a functional synonymous gene variant, whose exact mechanism of action remains to be elucidated in our further studies.

KEY WORDS: prothrombin, 3'end of the prothrombin gene, C20068T gene variant, synonymous gene variant, gene expression regulation, thrombophilia

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 577.218: [616.151.5: 612.115] (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Trombofilija	1
1.1.1. Opšti pregled hemostaze	1
1.1.2. Tromboze i trombofilija	4
1.1.3. Nasledni faktori rizika za nastanak trombofilije	4
1.2. Protrombin	7
1.2.1. Gen za protrombin	7
1.2.2. Struktura i funkcija protrombina	10
1.3. Uloga 3'kraja protrombinskog gena u regulaciji genske ekspresije	15
1.3.1. Regulacija genske ekspresije kod eukariota	15
1.3.2. Struktura 3'kraja gena	17
1.3.3. Mehanizam obrade 3'kraja pre-iRNK	19
1.3.4. Uloga 3'kraja gena u regulaciji genske ekspresije	21
1.3.5. Uloga 3'kraja gena u patološkim stanjima	22
1.3.6. Struktura 3'kraja gena za protrombin	23
1.3.7. Uloga genskih varijanti 3'kraja protrombinskog gena u regulaciji ekspresije protrombina i nastanku trombofilije	26
2. CILJ	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Ispitanici	30
3.2. Materijal	31
3.2.1. Čelijske linije	31
3.2.2. Bakterijski sojevi	31
3.2.3. Plazmidni vektori	31
3.2.4. Oligonukleotidi	33
3.3. Metode	35
3.3.1. Metode za detekciju genske varijante C20068T	35
Izolacija DNK iz periferne krvi	35
Izolacija DNK iz ćelija bukalne sluzokože	35

Analiza DNK na agaroznom gelu	36
PCR-RFLP metoda	36
Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	38
Vizualizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima srebro nitratom	38
Sekvenciranje DNK	39
Statistička obrada podataka	41
3.3.2. Kvantifikacija količine protrombina u humanoj plazmi	41
Western blot analiza	41
a) Elektroforeza proteina na denaturišućem poliakrilamidnom gelu	41
b) Prenos proteina na membranu	42
c) Imunodetekcija proteina na membrani	43
3.3.3. Metode za funkcionalnu analizu genske varijante C20068T	44
Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi	44
Kultivacija permanentnih ćelijskih linija	45
Transfekcija cos-7 ćelijske linije plazmidnom DNK	45
Kultivacija stabilnih transfektanata cos-7 ćelija	46
Kultivacija stabilnih transfektanata poreklom od pojedinačnih ćelija	46
Određivanje broja kopija inserata u ćelijskim klonovima	47
a) Esej qfPCR-kapilarna elektroforeza	47
b) Verifikacija eseja qfPCR-kapilarna elektroforeza metodom <i>real-time</i> PCR	49
Izolacija celokupne RNK iz ćelija u kulturi	51
Prečišćavanje RNK	51
Sinteza cDNK	52
Kvantifikacija iRNK metodom <i>real-time</i> PCR	52
<i>In silico</i> predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068	53
Određivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama transfekovanim wt i C20068T konstruktima	54
Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK izolovane iz cos-7 ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima modifikovanom 3'RACE metodom	55
3.3.3.1. Metode za ispitivanje DNK-protein interakcija	57
Izolacija jedarnih proteina iz HepG2 i HeLa ćelija	57

Esej promjenjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)	58
Masena spektrometrija na Orbitrap LTQ XL	60
Vezivanje proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija za jednolančane wt i mutirane 20068T probe-esej Footprinting Primer-PCR (FP-PCR)	63
a) Kloniranje PCR produkta u pJET1.2/blunt vektor	66
b) Kultivacija bakterija	66
c) Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju	66
d) Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija	67
e) Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali	67
4. REZULTATI	69
4.1. Određivanje učestalosti genske varijante C20068T	69
4.2. Kvantifikacija količine protrombina u plazmi	74
4.3. Funkcionalna analiza genske varijante C20068T	76
4.3.1. Kultivacija stabilnih transfektanata poreklom od pojedinačnih ćelija	76
4.3.2. Određivanje broja kopija inserata protrombinskog gena u ćelijskim klonovima	76
4.3.3. Praćenje ekspresije gena za protrombin relativnom kvantifikacijom iRNK	79
4.3.4. <i>In silico</i> predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068	81
4.3.5. Ispitivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama transfekovanim wt i 20068T konstruktima	84
4.3.6. Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK	85
4.3.7. DNK-protein interakcije	87
a) Ispitivanje interakcije jedarnih proteina HepG2 i HeLa ćelija sa wt i 20068T probom	87
b) Identifikacija proteina masenom spektrometrijom	89
c) Vezivanje proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija za jednolančane wt i 20068T probe	92
5. DISKUSIJA	95
5.1. Učestalost genske varijante C20068T	95
5.2. Kvantifikacija količine protrombina	100
5.3. Funkcionalna analiza genske varijante C20068T	102
5.3.1. Određivanje broja kopija inserata u ćelijskim klonovima esejem qfPCR-kapilarna elektroforeza	102

5.3.2. Praćenje ekspresije gena za protrombin u odabranim klonovima relativnom kvantifikacijom iRNK	103
5.3.3. <i>In silico</i> predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068	104
5.3.4. Određivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama stabilno transfekovanim wt i 20068T konstruktima	107
5.3.5. Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK izolovane iz ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima	108
5.3.6. DNK-protein interakcije	109
a) Analiza DNK-protein interakcija i identifikacija vezanih proteina	109
b) Interakcija proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija sa jednolančanim wt i 20068T probama-esej FP-PCR	114
5.4. Sinonimne genske varijante u regulaciji genske ekspresije	115
6. ZAKLJUČCI	119
7. REFERENCE	122

1. UVOD

1.1. Trombofilija

1.1.1. Opšti pregled hemostaze

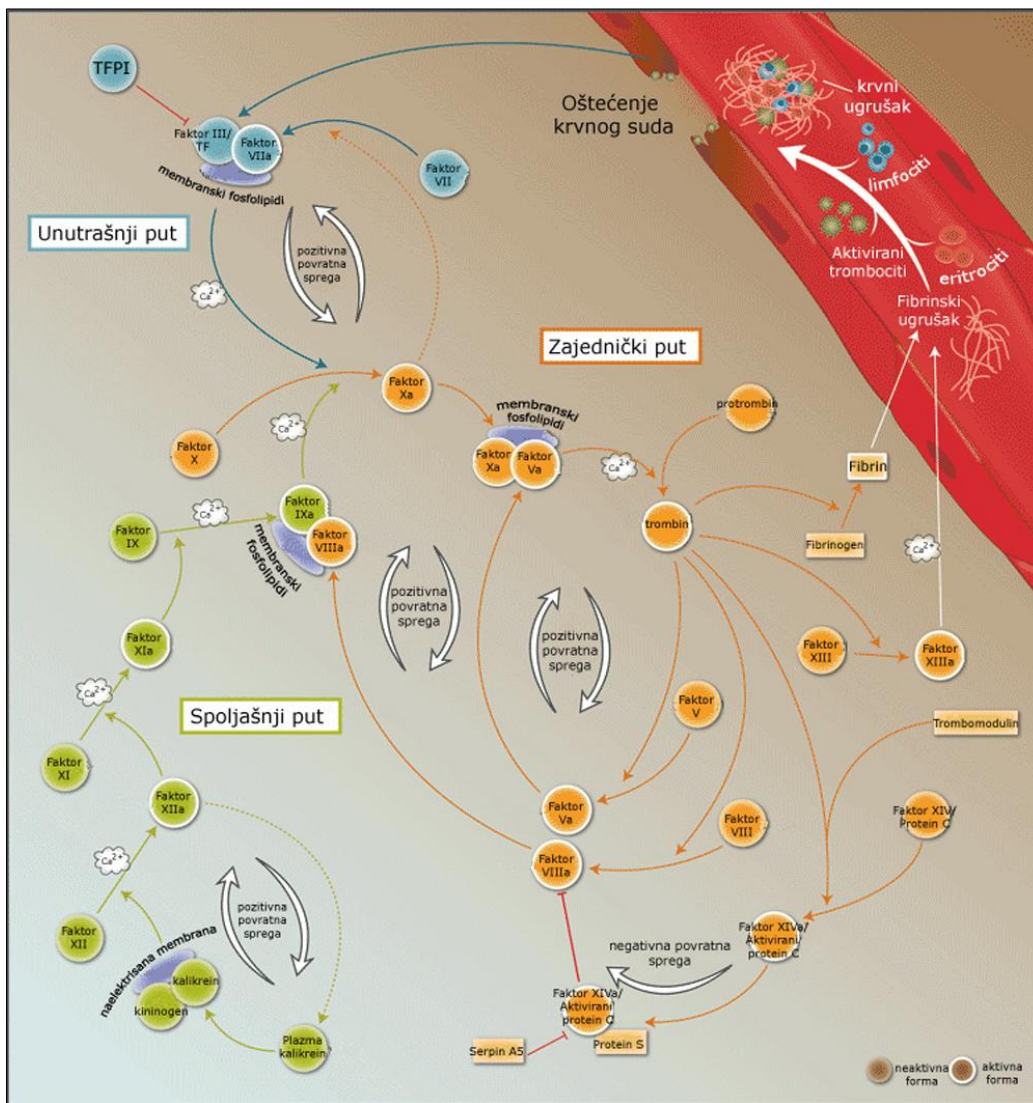
Hemostaza predstavlja jedan od mehanizama za održavanje normalne homeostaze organizma [1]. Prevažna funkcija hemostaze je održavanje tečnog stanja krvi i njenog normalnog protoka kroz cirkulaciju, a u slučaju povrede krvnog suda sprečavanje gubitka krvi kroz formiranje krvnog ugruška na mestu povrede. Normalna hemostaza se održava osetljivom ravnotežom između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora, a svako narušavanje ove ravnoteže može dovesti do krvarenja ili formiranja krvnih ugrušaka koji dovode do začepljenja krvnog suda. Glavne komponente hemostaznog sistema su: endotel krvnih sudova, trombociti, proteini koagulacione kaskade, kao i inhibitori koagulacije i sistem fibrinolize [1].

Vaskularni endotel predstavlja barijeru koja odvaja ćelije krvi i faktore plazme od visokoreaktivnih molekula i proteina smeštenih u dubljim slojevima zidova krvnih sudova [2]. U slučaju povrede krvnog suda, nakon lokalne vazokonstrukcije glatke muskulature na mestu oštećenja, endotelne ćelije započinju sintezu hemostatskih faktora koji omogućavaju dalje formiranje krvnog ugruška (tkivni faktor i fon Vilebrandov faktor) [3, 4].

Trombociti nastaju od prekursorskih ćelija kostne srži-megakariocita [5, 6]. U cirkulaciji su prisutni u neaktivnom obliku kao pojedinačne ćelije, jer ne adheriraju na neoštećeni vaskularni endotel. U slučaju povrede krvnog suda, trombociti započinju adheziju na mestu povrede, kroz receptorske kontakte sa fon Vilebrandovim faktorom, fibrinogenom i fibronektinom [7]. Potom sledi aktivacija trombocita i sekrecija faktora iz trombocitnih granula koji omogućavaju dalju agregaciju trombocita i formiranje trombocitnog ugruška, kao i pokretanje koagulacione kaskade (Slika 1).

Proteini koagulacione kaskade imaju ključnu ulogu u stvaranju fibrina koji je glavna komponenta krvnog ugruška. Faktori koagulacije su u cirkulaciji prisutni u neaktivnoj formi (profaktori). Neaktivni faktori se u nizu enzimskih reakcija aktiviraju, po kaskadnom principu, a kao krajnji proizvod nastaje fibrin koji omogućava stvaranje krvnog ugruška. Sistem za koagulaciju može da se aktivira na dva načina, kroz spoljašnji i unutrašnji put, a novija istraživanja pokazuju da *in vivo* postoji interakcija

ova dva puta [3, 7-10]. Unutrašnji i spoljašnji put se spajaju u zajednički put, pri čemu u poslednjem koraku dolazi do stvaranja trombina koji dovodi do prevođenja fibrinogena u fibrin i stvaranja krvnog ugruška. Trombin je centralni regulatorni molekul procesa koagulacije, koji pored prevođenja fibrinogena u fibrin, mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege reguliše čitav proces i omogućava normalno odvijanje hemostaze (Slika 1) [11].



Slika 1. Koagulaciona kaskada i proces formiranja krvnog ugruška.

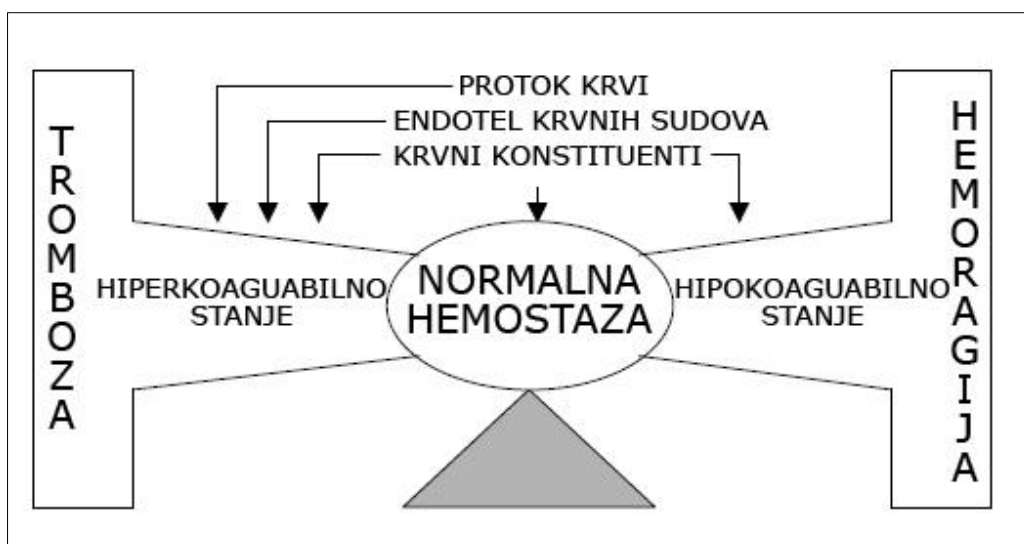
Preuzeto i modifikovano sa [www.rndsystems.com]

U održavanje normalne hemostaze su uključeni i inhibitori koagulacije, koji specifično inhibiraju različite faktore koagulacije. Najznačajniji inhibitori koagulacije

su antitrombin, protein C, protein S, trombomodulin, inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI), C1 inhibitor, α 1-proteazni inhibitor, α 2-makroglobulin, heparin kofaktor II i drugi [12].

Razgradnja krvnog ugruška dešava se nedugo nakon njegovog formiranja, kao deo normalne hemostaze, što omogućava ponovno uspostavljanje toka krvi i dalji oporavak oštećenog tkiva. Proces razgradnje krvnog ugruška naziva se fibrinoliza. Kao i u slučaju formiranja ugruška, njegova razgradnja podrazumeva niz koraka koje kontrolišu aktivatori i inhibitori, formirajući fibrinolitičku kaskadu. Plazminogen, glavni proenzim fibrinolitičkog procesa prisutan je u krvi u neaktivnoj formi. Delovanjem aktivatora plazminogena on se prevodi u aktivnu formu, plazmin. Plazmin vrši digestiju fibrinskih lanaca, pri čemu nastaju solubilni fibrinski degradacioni proizvodi. Aktivnost plazmina regulisana je inhibitorima fibrinolize, među kojima su najznačajniji inhibitori aktivatora plazminogena (PAI-1 i PAI-2) i α ₂-antiplazmin [13].

Poremećaji hemostaze javljaju se u slučaju nedostatka ili poremećene funkcije jednog ili više učesnika ovog procesa [14]. U slučaju poremećene hemostaze dolazi do odstupanja od hemostazne ravnoteže u smeru hipo- ili hiperkoagulacije, što za posledicu ima krvarenje (hemoragija) ili začepljenje krvnog suda (tromboza). Hiperkoagulacija se javlja usled povećanja nivoa koagulacionih faktora i/ili smanjenog nivoa prirodnih inhibitora koagulacije i faktora fibrinolitičkog sistema (Slika 2).



Slika 2. Održavanje hemostazne ravnoteže.

Preuzeto i modifikovano iz Rasche H, 2001 [14]

1.1.2. Tromboze i trombofilija

Tromboze predstavljaju patofiziološko stanje usled koga dolazi do stvaranja tromba (krvnog ugruška) koji dovodi do začepjenja krvnog suda. Tromb nastaje kao posledica poremećene ravnoteže između faktora uključenih u održavanje normalne hemostaze: endotel krvnih sudova, trombociti, koagulacioni i fibrinolitički sistem. Tromboze se dele na arterijske i venske, a zbog razlika između arterijskog i venskog krvotoka, razlikuju se i tipovi trombova koji nastaju u njima. U arterijama preovladava "beli tromb" koji je bogatiji trombocitima, sa manjim udelom fibrina, dok u venama preovladava "crveni tromb", bogatiji fibrinom i eritrocitima [15]. Najčešće posledice arterijskih tromboza su infarkt miokarda i moždani udar, dok su najčešće manifestacije venskih tromboza tromboze dubokih vena i plućni embolizam, koji mogu da se manifestuju i kao venski tromboembolizam. Venski tromboembolizam ima učestalost od 1 na 1000 stanovnika godišnje i najčešći je uzrok smrti kod trudnica, porodilja i hospitalizovanih pacijenata [16].

Tromboze su multifaktorijalno oboljenje koje nastaje usled interakcije većeg broja stečenih i naslednih faktora. Najčešći stečeni faktori za arterijske tromboze su: pušenje, dijabetes, gojaznost i hiperholesterolemija, a u slučaju venskih tromboza hirurške intervencije, traume, imobilizacija, maligniteti, imunizacija, trudnoća i puerperijum [15, 16].

Trombofilija u najširem smislu obuhvata sva nasledna i stečena klinička stanja povišene sklonosti ka nastanku tromboze.

1.1.3. Nasledni faktori rizika za nastanak trombofilije

Na mogući značaj naslednih faktora u etiologiji trombofilije ukazala su familijarne tromboze, odnosno povećana sklonost ka tromboziranju kod većeg broja članova jedne porodice. U poslednjih pedeset godina opisan je veći broj mutacija koje povećavaju rizik za nastanak tromboza. Ove mutacije podeljene su u tri grupe: 1) mutacije u genima koji kodiraju za inhibitore koagulacije, što dovodi do smanjene inhibicije koagulacije, 2) mutacije u genima koji kodiraju za prokoagulantne faktore, što dovodi do povećane sinteze ovih faktora ili smanjene inhibicije, 3) mutacije u genima koji kodiraju faktore fibrinolitičkog sistema, usled čega dolazi do poremećenog funkcionisanja fibrinolize [17].

Prvi nasledni poremećaj, doveden u vezu sa trombofilijom, bio je deficijencija antitrombina (AT), opisana 1965. godine od strane Egeberga i saradnika [18]. AT deficijencija se javlja usled mutacija u genu *SERPINC1*. Homozigotni nosioci mutacija nisu kompatibilni sa životom. Osamdesetih godina prošlog veka opisane su mutacije koje dovode do deficijencija proteina S i proteina C [19, 20]. Do deficijencije proteina C dolazi usled mutacija u genu koji kodira protein S (*PROC* gen), dok se deficijencija proteina S javlja usled mutacija u *PROS1* genu. Ovi poremećaji su retki u opštoj populaciji, ali su povezani sa visokim rizikom za dobijanje tromboza.

Prekretnicu u istraživanju naslednih osnova trombofilije predstavlja otkriće rezistencije na aktivirani protein C (APCR) od strane Dalbaka i saradnika i mutacije G1691A u genu za faktor V (FV Leiden mutacija) od strane Bertine i saradnika [21, 22]. FV Leiden mutacija dovodi do zamene aminokiseline arginin glutaminom na poziciji 506 u proteinu. Faktor V Gln506 se normalno aktivira trombinom, ali je njegova inaktivacija aktiviranim proteinom C otežana što dovodi do produženog prokoagulantnog dejstva [22, 23]. Produženo dejstvo aktiviranog faktora V dovodi do poremećene hemostazne ravnoteže i pomeranja ka hiperkoagulantnom stanju. Mutacija je prisutna kod 15-50% bolesnika sa venskim tromboembolizmom i kod 5% individua u opštoj populaciji. FV Leiden mutacija je najučestalija mutacija kod pacijenata sa trombofilijom, dok je druga po učestalosti genska varijanta u 3'neokodirajućem regionu gena za protrombin (FII G20210A) [24]. Varijanta FII G20210A je povezana sa povećanim nivoom protrombina u krvi. Učestalost genske varijante FII G20210A u opštoj populaciji iznosi 1-6%, dok je kod pacijenata sa trombofilijom učestalost 6-18%. Zbirno, FV Leiden mutacija i FII G20210A varijanta su prisutne kod više od dve trećine pacijenata sa trombofilijom [16].

U poslednjih desetak godina veći broj genskih varijanti u različitim genima povezan je sa povećanim rizikom ka trombozama. Insercija 23bp u egzonu 3 gena za endotelijalni receptor za protein C/aktivirani protein C povećava rizik za pojavu tromboza [25]. Disfibrinogenemije uglavnom izazivaju krvarenja, ali je pokazano da određeni genotipovi mogu dovesti do tromboembolija, kao što su fibrinogen γ C10034T i fibrinogen β 455G/A [26].

Među genskim varijantama koji dovode do poremećaja fibrinolitičkog sistema, najveći značaj ima 4G/5G varijanta u promotoru PAI-1 gena, koja za posledicu ima

povišenu ekspresiju PAI-1 proteina, a samim tim i povećanu inhibiciju fibrinolize, što dovodi do hiperkoagulacije [27].

Razvoj novih tehnologija, poput sekvenciranja nove generacije, omogućio je analizu velikog broja gena i identifikaciju novih potencijalnih faktora rizika kod pacijenata sa trombofilijom. Nedavno objavljena studija, u kojoj je analizirano 20000 SNPova (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*) u okviru 11000 gena, kod 3000 pacijenata sa trombozama i 5000 zdravih osoba pokazala je višu učestalost nekoliko genskih varijanti u okviru gena za CYP4V2, AT, Faktor XI i glikoprotein 6 kod pacijenata sa trombozama, što potencijalno može doprineti patogenezi trombofilije [28].

Velika GWAS (engl. *Genome-Wide Association Study*) koja je obuhvatila analizu 317000 SNPova kod 453 bolesnika sa venskim tromboembolizmom i 1327 zdravih ispitanika pokazala je jasnu udruženost samo tri genske varijante: jedne u genu za faktor V i dve u genima koji determinišu ABO krvni sistem. Prema ovoj studiji, FV Leiden mutacija predstavlja najveći rizik za venski tromboembolizam, dok krvne grupe O i A2 predstavljaju manje faktore rizika. Druge detektovane varijante nisu pokazale statistički značajno veću učestalost kod pacijenata sa trombozama [29].

Određene genske varijante mogu predstavljati i protektivne faktore za tromboze, poput varijante G>T u genu za faktor XIII koji dovodi do aminokiselinske zamene arginina za leucin u proteinu, što značajno smanjuje rizik za pojavu tromboza [30].

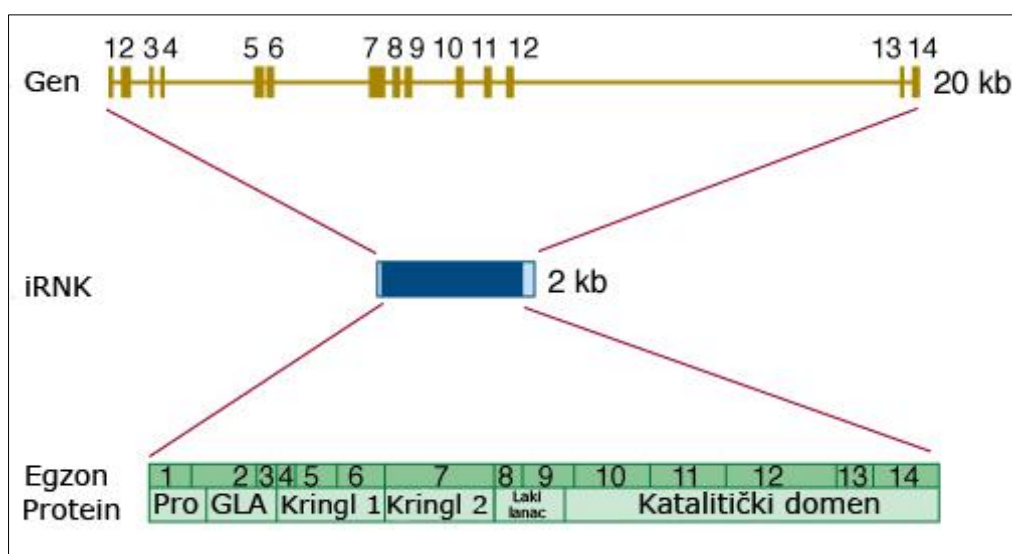
Obzirom da su tromboze multifaktorijalno oboljenje, od velikog je značaja ispitivanje uticaja prisustva dve ili više genskih varijanti, njihove međusobne interakcije, kao i interakcije sa sredinskim faktorima. Pacijenti koji su kombinovani heterozigoti za FV Leiden i FII G20210A imaju 2,6 puta veći rizik za nastanak tromboza nego nosioci samo FV Leiden mutacije [31].

Iako je opisan veliki broj genskih varijanti, njihova primena kao trombofilnih markera je ograničena. Za većinu novoopisanih varijanti nije utvrđena jasna udruženost sa pojavom bolesti, pa se u dijagnostici trombofilije najčešće koristi utvrđivanje prisustva deficita AT, proteina C i proteina S, kao i FV Leiden i FII G20210A genskih varijanti [32].

1.2. Protrombin

1.2.1. Gen za protrombin

Gen za protrombin čoveka je sekvenciran 1987. godine od strane Degen i saradnika i dugačak je ~21 kb, sadrži 14 egzona, dužine 25-315 bp, razvojenih sa 13 introna čije se dužine kreću od 84-9447 bp [33]. Purinske i pirimidinske baze su približno jednako distribuirane u genu, sa 23% adenina, 25% citozina, 25,6% guanina i 26,4% timina. Približno 40% gena za protrombin čine repetitivne sekvence koje pripadaju Alu i Kpn familiji. Ovako visok udeo repetitivnih sekvenci nije uobičajen za sisarske gene. Rojl i saradnici su 1987. godine utvrdili poziciju protrombinskog gena na hromozomu 11(p11-q12), u blizini centromere [34]. Informaciona RNK (iRNK) koja se sintetishe sa ovog gena dugačka je oko 2300 bp, zajedno sa 5'netranslatirajućim regionom i poli(A) repom (Slika 3). Gen za protrombin je predominantno eksprimiran u jetri, ali je pokazano da se u manjoj meri eksprimira u mozgu, dijafragmi, bubrezima, kao i u placentalnom i adrenalnom tkivu [35].



Slika 3. Strukturna organizacija protrombinskog gena, iRNK i proteina.

Preuzeto i modifikovano iz Lictman LA, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT; Williams hematology, 8th Edition; www.accessmedicine.com

Promotor gena za protrombin čoveka, slično promotorima za faktore VII i XI i proteina C, ne sadrži konsenzusne TATA i CCAAT sekvence. Smatra se da odsustvo

ovih sekvenci u promotoru protrombinskog gena doprinosi heterogenosti mesta za inicijaciju transkripcije, koja su grupisana u regionu -40 do -20 nukleotida u odnosu na mesto početka translacije. U okviru promotora protrombinskog gena takođe se nalaze i GC-bogati regioni, čija uloga u regulaciji transkripcije ovog gena još uvek nije razjašnjena [36]. U okviru promotorskog regiona prisutna su najmanje dva regulatorna elementa. U eksperimentima finog mapiranja, pokazano je da je prvih 400 bp uzvodno od mesta početka transkripcije neophodno za bazalnu aktivnost promotora, a naročito 72 bazna para smeštena uzvodno od glavnog mesta početka transkripcije. U ovom regionu postoje vezivna mesta za veći broj jedarnih proteina. Dodatni regularni element nalazi se uzvodnije, na poziciji od -922 do -845 nukleotida i ima pojačavačku (engl. *enhancer*) funkciju, neophodnu za regulaciju ekspresije protrombinskog gena [37]. Uklanjanje pojačavačkog regiona dovodi do smanjenja transkripcione aktivnosti od 90%. Ovaj udaljeni element, funkcioniše u obe orijentacije, a u okviru njega su prisutna najmanje tri mesta za koja se vezuju faktori odgovorni za jetra-specifičnu ekspresiju protrombina [38]. Pokazano je da se za mesto 1 u pojačavačkom regionu, na poziciji -922 do -897 nukleotida vezuje HNF4- α (engl. *hepatocyte nuclear factor*). Za mesto 2, na poziciji -895 do -871 vezuju se HNF1- α , HNF3- β i jedan za sada neidentifikovani transkripcioni faktor [38, 39]. Mesta vezivanja HNF faktora u ovom regionu se najverovatnije preklapaju i međusobno isključuju. Na mestu 3 (-680 do -836) vezuju se Sp1 i Sp3 (engl. *specificity protein*). Sva tri mesta vezivanja regulatornih proteina su veoma značajna za normalnu transkripciju protrombinskog gena. Nemogućnost vezivanja HNF3- β dovodi do dramatičnog smanjenja aktivnosti promotora, dok nevezivanje HNF4- α ili Sp1/Sp3 ima umerenije efekte na aktivnost promotora.

3'kraj gena za protrombin ima nekanonsku organizaciju i detaljno je opisan u poglavlju 1.3.6.

Mutacije u genu za protrombin mogu dovesti do značajnih poremećaja procesa u koje je protrombin uključen. Osim funkcije u hemostazi, protrombin ima značajnu ulogu i u drugim fiziološkim i patofiziološkim procesima poput reparacije tkiva, rasta neurita, aterosklerozi, inflamaciji i metastaziranju tumora [40-44]. Pokazano je da *knockout* miševi za protrombin (FII^{-/-} miševi) razvijaju hemoragijski fenotip ubrzo nakon rođenja i umiru u roku od dva dana [45, 46]. Tokom embrionalnog razvoja FII^{-/-} embrioni pokazuju dva različita fenotipa. Rani fenotip iskazuje zaostatak u razvoju, sa

veličinom od samo 15% u odnosu na normalne embrione i krvarenjima u oblasti žumančične kese. Iako bez vidljivog krvnog protoka, ekstraembrionalni krvni sudovi ne pokazuju znakove oštećenja i nekroze. Ovakvi embrioni umiru oko desetog dana gestacije. Međutim, deo FII^{-/-} embriona se normalno razvija do kraja gestacije. Pretpostavlja se da protrombin majke parcijalno nadoknađuje nedostatak protrombina kod embriona, što obezbeđuje normalan razvoj određenog broja FII^{-/-} embriona, jer rezerve protrombina majke nisu dovoljne da nadoknade nedostatak kod svih embriona. Shodno tome, pretpostavlja se da ni u slučaju humanih embriona protrombin majke nije dovoljan da nadomesti kongenitalnu deficijenciju protrombina kod embriona, što dovodi do njegove smrti. Slični rezultati dobijeni su u studiji Deja i saradnika sa *knockout* embrionima zebrice [47, 48], gde su takođe primećena dva različita fenotipa. Rani fenotip pokazivao je abnormalnosti u razvoju prvog dana nakon fertilizacije, a već drugog dana javljali su se defekti u vaskularnom sistemu, sa smanjenim brojem ćelija u cirkulaciji i poremećenim krvnim tokom, sa prisutnim perikardijalnim edemom. Kasni fenotip iskazivao je krvarenja u regionu mozga i produženo vreme koagulacije. Embrioni zebrice, za razliku od embriona miševa, ne umiru u ranim stadijumima embrionalnog razvoja, najverovatnije zbog toga što za rane embrionalne stadijume zebrice nisu potrebni razvijeni vaskularni sistem i transport kiseonika, obzirom da embrioni zebrice kiseonik mogu da usvajaju direktno iz vode. Eksperimenti sa kondicioniranim *knockout* miševima, kod kojih je protrombin deletiran u adultnom periodu, pokazali su da ovi miševi umiru od masivnih krvarenja u roku od nedelju dana [49].

Mutacije u genu za protrombin najviše su povezane sa poremećajima hemostazne ravnoteže. Obzirom na različite supstrate sa kojima trombin, aktivna forma protrombina, interaguje, poremećaji mogu biti u smeru hipokoagulacije ili u smeru hiperkoagulacije.

Kongenitalna deficijencija protrombina (hipoprotrombinemija) je redak autozomalno recesivni poremećaj praćen masovnim krvarenjima i smanjenim nivoom i aktivnošću protrombina (ispod 10% normalnih vrednosti). Disprotrombinemiju karakteriše prisustvo disfunkcionalnog protrombina, ali je nivo proteina normalan. Smatra se da kompletna deficijencija protrombina (aprotrombinemija) nije kompatibilna sa životom [50]. Do deficijencije protrombina dovode mutacije u kodirajućem regionu

gena. Do danas je opisano više od 32 mutacije u protrombinskom genu koje dovode do aminokiselinske zamene ili pojave stop kodona [51]. Kvik i saradnici su 1955. godine opisali slučaj pacijenta sa disprotrombinemijom kod koga je kasnije utvrđeno prisustvo C>T tranzicije koja dovodi do zamene arginina cisteinom na poziciji 382 u proteinu (protrombin Quick I) i G>T transverzije koja dovodi do zamene glicina valinom na poziciji 558 u proteinu (protrombin Quick II). Obe zamene dovode do promena u katalitičkom regionu protrombina, što rezultuje izmenjenom interakcijom sa fibrinogenom i izrazito smanjenom protrombinskom aktivnošću [52, 53]. Varijanta protrombina nazvana Himi I pronađena je kod pacijentkinje sa disprotrombinemijom [54] i predstavlja T>C tranziciju na poziciji 8751 u egzonu 10, koja dovodi do zamene metionina treoninom na poziciji 337 u proteinu. Osim Himi I mutacije, kod iste pacijentkinje je utvrđeno prisustvo G>A tranzicije koja dovodi do zamene arginina histidinom na poziciji 388 u proteinu (protrombin Himi II) [54]. Ivahana i saradnici su 1992. godine opisali slučaj pacijentkinje složenog heterozigota za hipoprotrombinemiju i disprotrombinemiju [55]. Kod ove pacijentkinje je nađena insercija 1 bp u egzonu 6 (4177insT) koja predstavlja mutaciju izmenjenog okvira čitanja (engl. *frameshift*) i dovodi do stvaranja terminacionog kodona u egzonu 7, koji kodira Kringl 2 domen proteina (hipoprotrombinemija). Osim ove insercije, kod pacijentkinje je nađena i Arg418Trp zamena u proteinu (disprotrombinemija) [56].

Osim ovih varijanti opisane su i protrombin Barcelona (Arg271Cys), Denver I (Glu300Lys), Denver II (Glu309Lys), Saint-Denis (Asp552Glu), Arg382His i Tyr44Cys [51, 57-60]. Sve ove varijante dovode do krvarenja.

Kada je u pitanju hiperkoaguabilnost, u promotorskom i kodirajućem regionu gena za protrombin nisu pronađene varijante koje dovode do povećane ekspresije gena ili aktivnosti proteina. Sa povećanom ekspresijom proteina su povezane varijante u 3' kraju ovog gena i one su detaljno opisane u posebnom poglavlju 1.3.7.

1.2.2. Struktura i funkcija protrombina

Protrombin je prekursor trombina, ključnog regulatora procesa hemostaze. Protrombin je protein od ~72 kDa, sintetiše se predominantno u jetri i izlučuje u krvotok, gde u formi zimogena cirkuliše do trenutka aktivacije [1]. Pripada grupi vitamin K zavisnih enzima, pored faktora VII, IX i X, kao i proteina C i S. Humani protrombin je

glikoprotein od 579 aminokiselina, sa tri N-vezana ugljenohidratna lanca, na pozicijama Asn78, Asn100 i Asn373. Protrombin čini nekoliko domena: Gla, Kringl 1, Kringl 2, laki lanac i katalitički domen. U prekursorskoj formi protrombina, na N-kraju se nalazi propeptidna sekvenca od ~20 aminokiselina koja prekursor protrombina usmerava ka endoplazmatičnom retikulumu u kome se obavlja posttranslaciona modifikacija [61]. U okviru propeptidne sekvence se nalazi i mesto prepoznavanja za γ -karboksilaciju. Ova posttranslaciona modifikacija protrombina podrazumeva karboksilaciju 10 aminokiselinskih ostataka glutaminske kiseline koji se prevode u γ -karboksilglutaminsku kiselinu (Gla) i formiraju Gla domen protrombina. Ovaj proces u rapavom endoplazmatičnom retikulumu katalizuje enzim vitamin K zavisna karboksilaza [62]. Gla domen ima ulogu u vezivanju jona kalcijuma i interakciji sa membranskim površinama. Nepravilno karboksilovan Gla domen otežano interaguje sa protrombinaznim kompleksom, što dovodi do neefikasne aktivacije protrombina.

Pored Gla domena, prisutni su Kringl motivi (engl. *kringle motifs*), dužine od po 80 aminokiselina, na koje se nastavljaju domen lakog lanca trombina i katalitičko serin-proteazno jezgro trombina (Slika 3). Kringl motivi su prisutni u mnogim proteinima plazme, uključujući protrombin, plazminogen, tkivni aktivator plazminogena, urokinazu, faktor XII i apolipoprotein A [1].

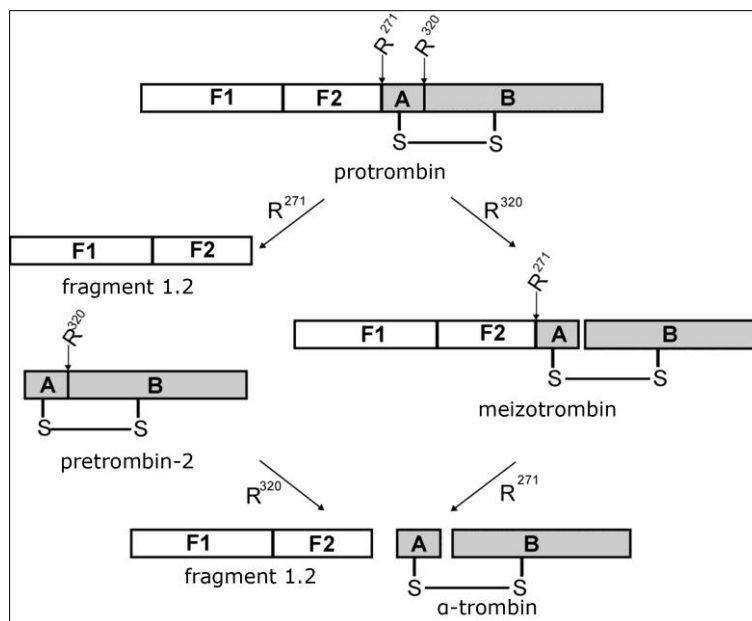
Gla domen i Kringl 1 čine fragment 1 protrombina [63, 64]. Vezivanje jona kalcijuma za Gla aminokiselinske ostatke indukuje značajne konformacione promene Gla domena. U odsustvu jona kalcijuma, Gla je nestruktuiran, dok u njegovom prisustvu zauzima struktuiranu konformaciju neophodnu za interakciju sa kiselim fosfolipidima membranskih površina. Vezivanje protrombina za membranske površine ga čini dostupnim za delovanje protrombinaznog kompleksa. Uloga Kringl 1 motiva u okviru fragmenta 1 protrombina nije u potpunosti razjašnjena, mada se smatra da interaguje sa aktiviranim faktorom V u okviru protrombinaznog kompleksa.

Fragment 2 protrombina čini Kringl 2 motiv [65]. Kringl 2 je po aminokiselinskoj sekvenci i strukturi sličan Kringl 1 i obavlja više različitih funkcija. Smatra se da vezuje jone kalcijuma i predstavlja glavno mesto u protrombinu na kome se dešava interakcija protrombina i aktiviranog faktora V iz protrombinaznog kompleksa, što indukuje promenu konformacije protrombina i izlaže ga delovanju aktiviranog faktora X. Kristalografskim analizama je pokazano da Kringl 2 region

protrombina može da interaguje sa anjon-vezujućim mestom II (engl. *exosite II*) u trombinu čime inhibira inaktivaciju trombina antitrombinom, modifikuje aktivno mesto i anjon-vezujuće mesto I (engl. *exosite I*) u trombinu, ubrzava delovanje trombina prema malim peptidnim supstratima, inhibira sposobnost trombina da iseca fibrinogen i utiče na aktivaciju proteina C.

Aktivacija protrombina u aktivnu formu α -trombin odvija se u nekoliko koraka, preko dva različita puta (Slika 4) [66-69].

Najpre se na površini membrane formira protrombinazni kompleks koga čine aktivirani faktori V i X i joni kalcijuma, koji omogućava aktivaciju protrombina [70, 71]. Jedan put aktivacije započinje isecanjem protrombina na poziciji Arg271, čime nastaju protrombinski fragment 1.2 i pretrombin 2. Isecanjem pretrombina 2 na poziciji Arg320 nastaje α -trombin sastavljen iz dva lanca, koji je nekovalentno povezan sa fragmentom 1.2. Dodatnim isecanjem α -trombina na poziciji Arg284 od strane samog trombina dobija se stabilna i aktivna forma trombina (Slika 4) [72].



Slika 4. Šematski prikaz puteva aktivacije protrombina.

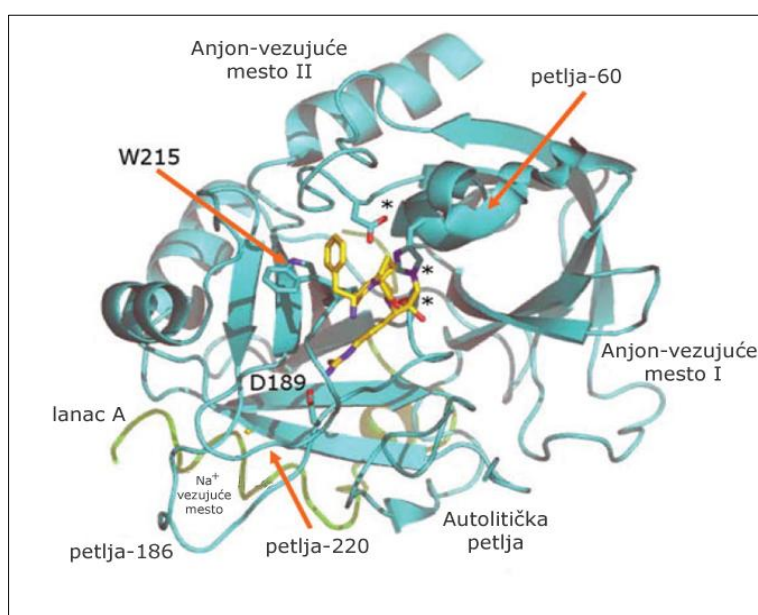
Preuzeto i modifikovano iz Wood et al, 2011 [70]

Drugi put aktivacije protrombina počinje isecanjem na poziciji Arg320 čime nastaje meizotrombin. Daljim delovanjem protrombinaznog kompleksa na poziciji Arg271 nastaju fragment 1.2 i α -trombin. Sa druge strane, meizotrombin se

autokatalitički iseca na poziciji Arg156, čime nastaju fragment 1 i meizotrombin des-fragment[73]. Iako je meizotrombin intermedijarni produkt aktivacije protrombina sa kratkim polu-životom, pokazano je da i on može imati različite uloge u procesu koagulacije. Daljim autokatalitičkim delovanjem na poziciji Arg283 nastaje stabilna forma α -trombina (Slika 4) [74, 75].

Osim navedenih formi trombina, u cirkulaciji su prisutne i degradovane β i γ forme koje najverovatnije nastaju autokatalitičkim delovanjem samog α -trombina. Degradovane forme trombina zadržavaju deo katalitičke aktivnosti i delimično učestvuju u aktivaciji faktora XIII i samog protrombina [1].

Trombin pripada familiji S1 proteaza i njegov S1 proteazni domen se nalazi u okviru B lanca [76]. Kao i svi predstavnici ove familije i trombin formira disulfidni most između cisteina na pozicijama 1 i 122 (Slika 5).



Slika 5. Struktura trombina i kompleksu sa ireverzibilnim inhibitorom trombinskog aktivnog mesta (H-D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl).

Preuzeto i modifikovano iz Di Cera et al, 2007 [77]

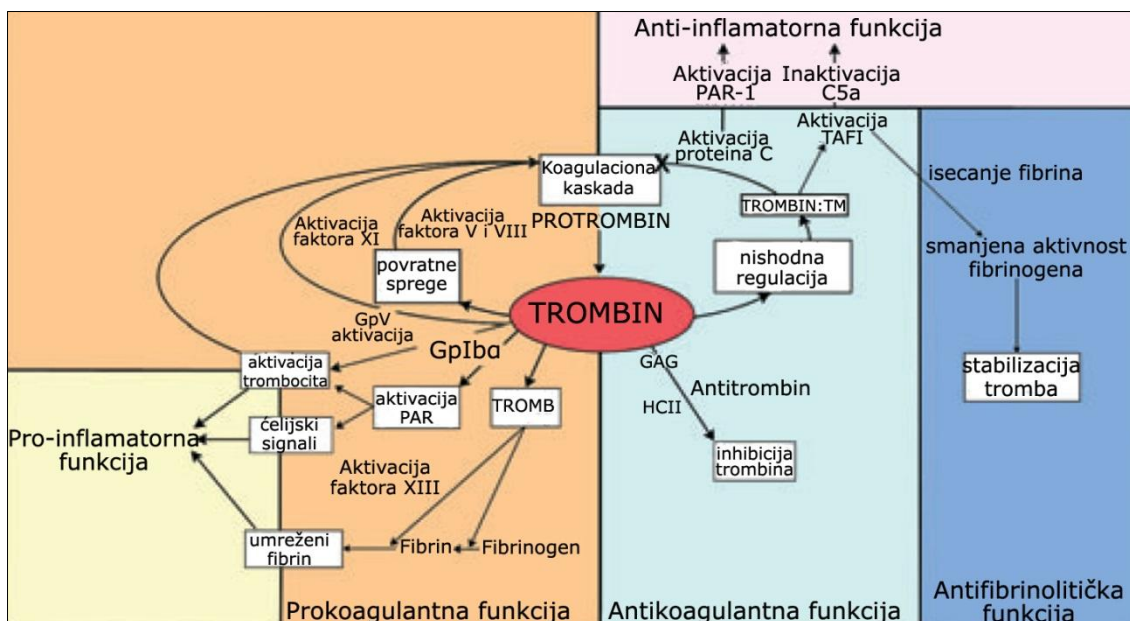
U aktivnom mestu trombina nalaze se Ser195 zajedno sa His57 i Asp189 (prema numeraciji himotripsina), koji su neophodni za nukleofilni napad na peptidne veze različitih supstrata [77, 78]. Oko aktivnog mesta nalaze se petlje i šaržirani regioni. Petlje 60 i γ uokviravaju džep u kome se nalazi katalitička trijada. Petlja 60 interaguje sa

hidrofobnim aminokiselinskim ostacima na N-kraju mesta isecanja u supstratima. Sa druge strane, γ -petlja je hidrofilna i interaguje sa karboksiterminalnim aminokiselinskim ostacima supstrata koji se iseca. Trombin sadži i dva anjon-vezujuća domena (engl. *exocites I i II*). Anjon-vezujući domen I učestvuje u vezivanju fibrinogena i fibrina, supstratnom prepoznavanju PAR-1 i PAR-4 (engl. *protease activated receptor 1 i 4*) kao i vezivanju stafilokoagulaze i hirudina. Anjon-vezujući domen II učestvuje u interakcijama sa različitim supstratima, uključujući heparin i protrombin [79].

Veoma važna karakteristika trombina je prisustvo petlje koja vezuje jone natrijuma [77, 80]. Vezivanje natrijuma vrši alosteričku modulaciju aktivnosti trombina i reguliše prelaz između njegove prokoagulantne i antikoagulantne aktivnosti [81, 82]. Prokoagulantna aktivnost ogleda se prevashodno u aktivaciji fibrinogena i njegovom prevođenju u fibrin [83]. Takođe, trombin dovodi do aktivacije faktora XIII koji se kovalentno vezuje za krvni ugrušak, katalizuje umrežavanje fibrinskih vlakana i stabilizuje nastali fibrinski ugrušak [83]. Kroz aktivaciju trombinom aktiviranog inhibitora fibrinolize (TAFI), trombin utiče na inhibiciju fibrinolize [84], a takođe učestvuje u proteolitičkoj aktivaciji faktora V, VIII i XI [85-87]. Preko aktivacije PAR 1 i 4 koji pripadaju familiji G-protein kuplovanih receptora, trombin utiče na aktivaciju trombocita [88]. Drugi mehanizam aktivacije trombocita podrazumeva proteolizu glikoproteina GpV, koji je deo Gplb-IX-V kompleksa na površini cirkulišućih trombocita [89].

Svoju antikoagulantnu aktivnost trombin ispoljava kroz aktivaciju proteina C [90]. *In vivo*, trombin se vezuje za trombomodulin, receptor na membrani endotelnih ćelija. Vezivani trombomodulin suprimira sposobnost trombina da proteolitički deluje na fibrinogen i PAR-1, ali povećava supstratnu specifičnost prema zimogenu proteina C. Aktivirani protein C inaktivira aktivirane forme FV, FVIII, FX i XI, esencijalne faktore za prevođenje protrombina u trombin. Sam trombin se ireverzibilno inhibira antitrombinom i trombin specifičnim heparin kofaktorom II.

Pored uloge u procesu koagulacije, trombin učestvuje i u procesima inflamacije, angiogeneze, reparacije tkiva i diferencijaciji neurona. Grafički prikaz funkcija trombina dat je na Slici 6.



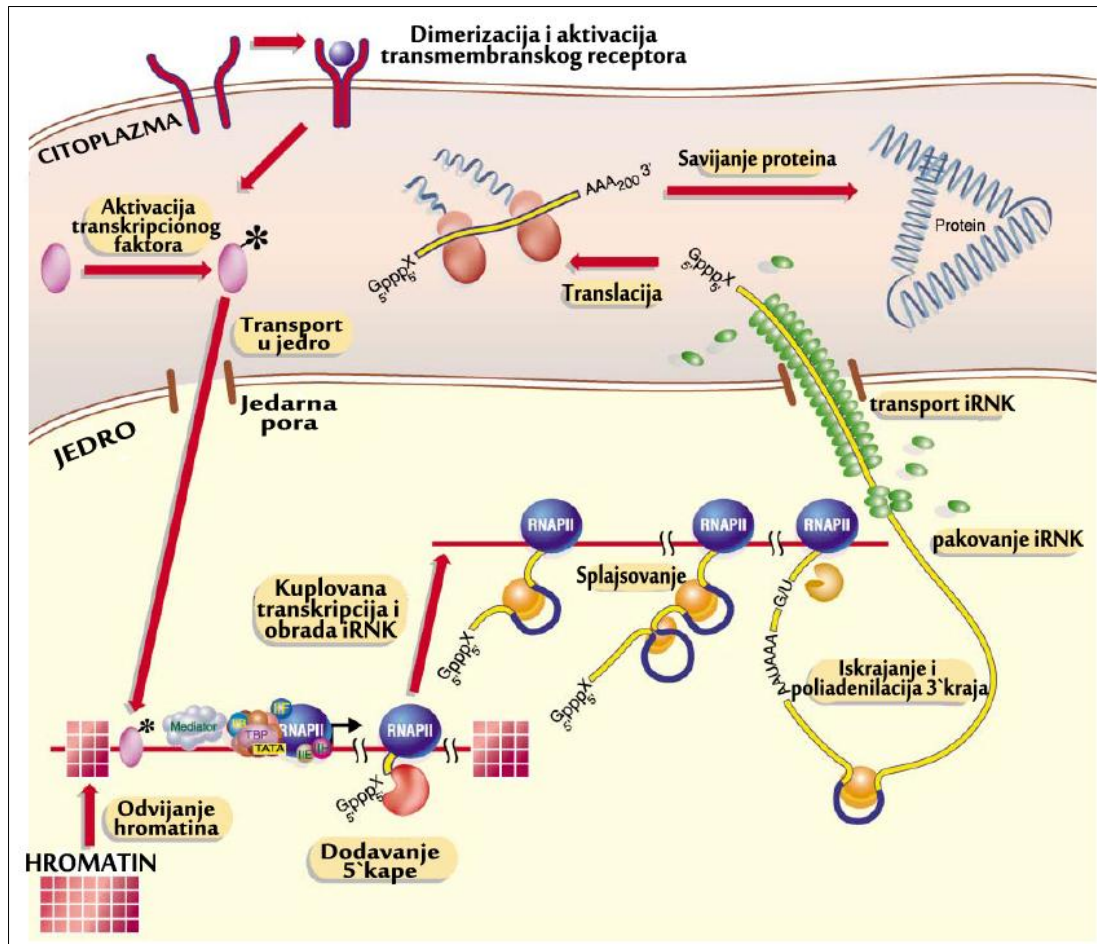
Slika 6. Funkcije trombina.

Preuzeto i modifikovano iz Crawley et al, 2007 [11]

1.3. Uloga 3'kraja protrombinskog gena u regulaciji genske ekspresije

1.3.1. Regulacija genske ekspresije kod eukariota

Evolucija kompleksnih bioloških sistema poput eukariota nije išla samo u pravcu povećanja broja gena, već i u pravcu formiranja kompleksnih i višestrukih sistema regulacije ekspresije gena. Regulacija genske ekspresije kod eukariota podrazumeva vremenski i prostorno precizno orkestrirane procese koji uključuju opšte i specifične proteinske faktore, kao i *cis* regulatorne elemente prisutne u samim genima [91-93]. Mehanizmi kontrole ekspresije gena mogu se u osnovi podeliti na mehanizme koji deluju na transkripcionom nivou, i mehanizme koji deluju na posttranskripcionom nivou. Na putu od gena do dobijanja funkcionalnog proteinskog produkta postoji nekoliko nivoa regulacije: proces transkripcije, procesovanje iRNK, transport iRNK, proces translacije, degradacija iRNK, aktivacija, inaktivacija i degradacija proteina i epigenetska kontrola. Model regulacije ekspresije eukariotskih gena na različitim nivoima dat je na Slici 7.



Slika 7. Nivoi regulacije ekspresije gena kod eukariota.

Preuzeto i modifikovano prema Orphanides & Reinberg, 2002 [91]

Transkripciji eukariotskih gena prethodi niz događaja koji obezbeđuju uspešno prepisivanje datog gena. Ovi događaji uključuju dekondenzaciju lokalne strukture hromatina, remodelovanje nukleozoma, modifikaciju histona, regrutovanje transkripcionih aktivatora i koaktivatora i njihovo vezivanje za pojačavače i promotore, kao i vezivanje bazalne transkripcione mašinerije za sam promotor [92, 94, 95].

Promotorska sekvenca je pozicionirana uzvodno od gena koji se prepisuje i predstavlja jedan od glavnih regulatornih regiona za kontrolu ekspresije [92]. Oko 30% eukariotskih gena sadrži TATA box u promotorskom regionu. Osim ovog elementa, mogu biti prisutni i inicijatorski (INR) motiv i nizvodni regulatorni element (DRE), Neki eukariotski promotori ne sadrže ove karakteristične elemente, već poseduju GC-bogate strukture.

Pojačavači predstavljaju *cis*-regulatorne elemente koji stimulišu gensku ekspresiju na nivou transkripcije [96]. Aktivnosti pojačavača su različite: posredovanje u otvaranju hromatinskih struktura, pozicioniranje gena u transkripciono aktivne regione jedra, regrutovanje transkripcionih kompleksa i moduliranje elongacije transkripcije. Nedavno je pokazano da se sa pojačavačkih regiona prepisuju kratki RNK molekuli (*eRNAs*) koje imaju krucijalnu ulogu u kontaktu između pojačavača i promotora.

Utišivači ili sajlerseri predstavljaju *cis* regulatorne regione koje prepoznaju transkripcioni represori [97, 98]. Vezivanje represora, zajedno sa enzimima za modifikaciju histona dovodi do stvaranja lokalne heterohromatinske strukture koja onemogućava transkripciju ciljnog gena.

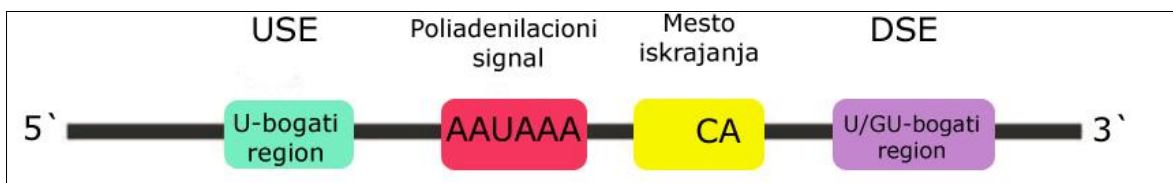
Posttranskripciona kontrola ekspresije gena podrazumeva mehanizme uključene u procesovanje iRNK, transport, lokalizaciju, translaciju i degradaciju [99]. Ono što je zajedničko za sve ove procese je da kontrolišu da li će se i gde data iRNK prevesti u protein. Pre transporta u citoplazmu, primarni transkript sa određenog gena prolazi kroz obradu koje uključuju formiranje 5'kape, proces "splajsovanja" odnosno isecanje introna iz pre-iRNK i formiranje 3'kraja, najčešće uz poliadenilaciju. Svi ovi koraci se dešavaju kotranskripciono i mogu uticati jedni na druge [100-102].

Stvaranje i obrada 3'kraja iRNK biće detaljno objašnjeni u poglavlju 1.3.3.

1.3.2. Struktura 3'kraja gena

U osnovi 3'kraj gena čine dva regiona: 3'UTR (engl. *untranslated region*) koji se prepisuje u procesu transkripcije i nakon obrade ostaje u sastavu zrele iRNK i 3'FR (engl. *flanking region*) koji se delimično prepisuje, ali se iskraja tokom obrade iRNK.

U okviru 3'krajeva većine gena nalaze se tri elementa koja čine jezgro poliadenilacionog signala u okviru pre-iRNK: AAUAAA motiv nalazi se 10-30 nukleotida uzvodno od mesta isecanja, U-bogate ili GU-bogate sekvence koje se nalaze nizvodno od mesta isecanja i samo mesto isecanja koje predstavlja mesto dodavanja poli(A)-repa. Van jezgra poliadenilacionog signala nalaze se dodatne regulatorne sekvence koje regrutuju regulatorne proteine ili održavaju poliadenilacioni signal u otvorenoj i pristupačnoj formi (Slika 8).



Slika 8. Struktura 3'kraja iRNK. *USE-upstream element; DSE-downstream element.*

Preuzeto i modifikovano iz Stasinopoulos et al, 2005 [103]

Konsenzusna sekvenca AAUAAA je prisutna u skoro svim poliadenilovanim iRNK ćelija [104]. U studijama u kojima je vršena mutageneza ovog motiva je pokazano da je ovaj heksanukleotid esencijalan za pravilno isecanje i dodavanja poli(A)-repa. Sekvenca AAUAAA je visoko konzervirani element i predstavlja kanonsku sekvencu, obzirom da mutacije u bilo kom od nukleotida ovog motiva dovode do inhibicije procesovanja 3'kraja. Pokazano je da ova sekvenca nije prisutna u nekim genima, ali je u njima dokazano prisustvo sekvenci sličnih ovom motivu. Smatra se da su različite forme ove sekvence povezane sa alternativnom ili tkivno-specifičnom poliadenilacijom [105].

Nizvodno od poli(A)-mesta, oko 30 nukleotida, u FR regionu, nalazi se nizvodni element DSE (engl. *downstream element*). Ovaj element je manje evolutivno konzervisan. On može biti prisutan u dve forme: kao U-bogati i GU-bogati element. U-bogati element čini nekoliko uridina, a GU-element ima konsenzusnu sekvencu YGUGUUY (Y-pirimidinska baza). Poliadenilacioni signal može imati samo jedan DSE, a mogu biti prisutni i dodatni U-bogati i GU-bogati elementi. Pokazano je da mutacije i delecije DSE imaju mali uticaj na pravilno formiranje 3'kraja, iako blizina DSE poli(A)-mestu može uticati na odabir mesta isecanja primarnog transkripta [104].

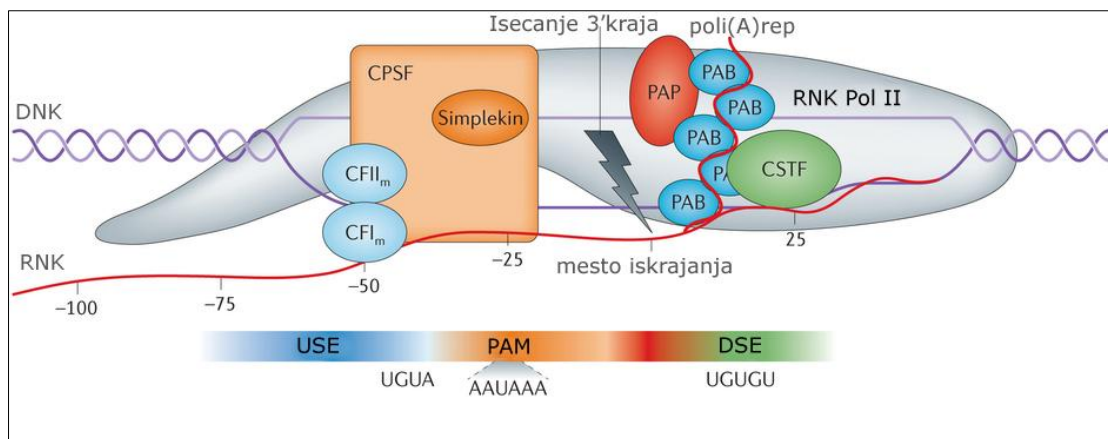
Poli(A)-mesto predstavlja tačnu poziciju na kojoj se iseca primarni transkript i na kojoj se dodaje poli(A) rep. Tačno mesto isecanja određeno je prevashodno razdaljinom između uzvodne AAUAAA sekvence i DSE elementa. Sekvenca koja okružuje mesto isecanja nije konzervirana, mada se na ovom mestu kod 70% iRNK kičmenjaka nalazi A, zatim U i C, a najređe se na ovoj poziciji nalazi G. Takođe je pokazano da se u 59% slučajeva ispred A nalazi C, tako da dinukleotid CA definiše poli(A) mesto većine gena [106].

Uzvodno od konzerviranog AAUAAA elementa nalazi se uzvodni regulatorni element USE (engl. *upstream element*). USE predstavlja pojačavačku sekvencu, čije je prisustvo prvi put primećeno u virusnim genima, a kasnije je utvrđeno i njihovo prisustvo u sisarskim genima. USE motivi su uridinom bogati regioni koji ubrzavaju poliadenilaciju 3'krajeva gena u kojima se nalaze [106].

Alternativna poliadenilacija predstavlja značajan mehanizam regulacije ekspresije gena koji dovodi do stvaranja izoformi iRNK sa različitim 3'krajem [105]. Odvijanje alternativne poliadenilacije je omogućeno prisustvom multiplih poliadenilacionih mesta ili međusobnim isključivanjem terminalnih egzona i dešava se u približno 50% humanih gena. Postojanje alternativnih 3'UTR obezbeđuje raznovrsnost ekspresije jednog gena i značajan je aspekt tkivno-specifične ekspresije i ekspresije gena tokom razvoja [105].

1.3.3. Mehanizam obrade 3'kraja pre-iRNK

U formiranju i obradi 3'kraja iRNK učestvuje veliki broj proteinskih faktora (Slika 9). Kod sisara, u ovaj proces uključeni su proteinski kompleks CPSF (engl. *cleavage/polyadenylation specificity factor*), CstF (engl. *cleavage-stimulatory factor*), CF I_m i CF II_m (engl. *cleavage factors*), RNK polimeraza II, PAP (engl. *Poly(A)-polimerase*) i PAB II (engl. *Poly(A)-binding protein II*).



Slika 9. Proteinske komponente sistema za iskrajanje i poliadenilaciju 3'kraja gena.

Preuzeto i modifikovano iz Elkon et al, 2013 [105]

CPSF proteinski kompleks prepoznaje specifično AAUAAA sekvencu. Sastoji se od subjedinica, označenih kao CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73 i CPSF-30. Pokazano je da subjedinica CPSF-160 specifično prepoznaje AAUAAA sekvencu i vezuje se za nju. Ostale subjedinice omogućavaju stvaranje stabilnog kompleksa na RNK prekursoru i interaguju sa CstF i PAP [107].

CstF je neophodan za iskrajanje, ali ne i za poliadenilaciju, iako može da stimuliše dodavanje poli(A) repa pomoću CstF-vezujućeg mesta, lokalizovanog uzvodno od AAUAAA heksanukleotida. CstF je multiproteinski kompleks koga čine subjedinice od 77, 64 i 59 kDa. Njegove subjedinice sadrže RNK-vezujuće domene i vezuje se za U-bogati region u DSE, a takođe učestvuju u protein-protein interakcijama sa drugim komponentama mašinerije za iskrajanje i poliadenilaciju [104].

CF I_m i CFII_m faktori učestvuju isključivo u procesu isecanja primarnog transkripta i pretpostavlja se da deluju kao dodatni faktori stabilizacije CPSF kompleksa sa RNK supstratom [104].

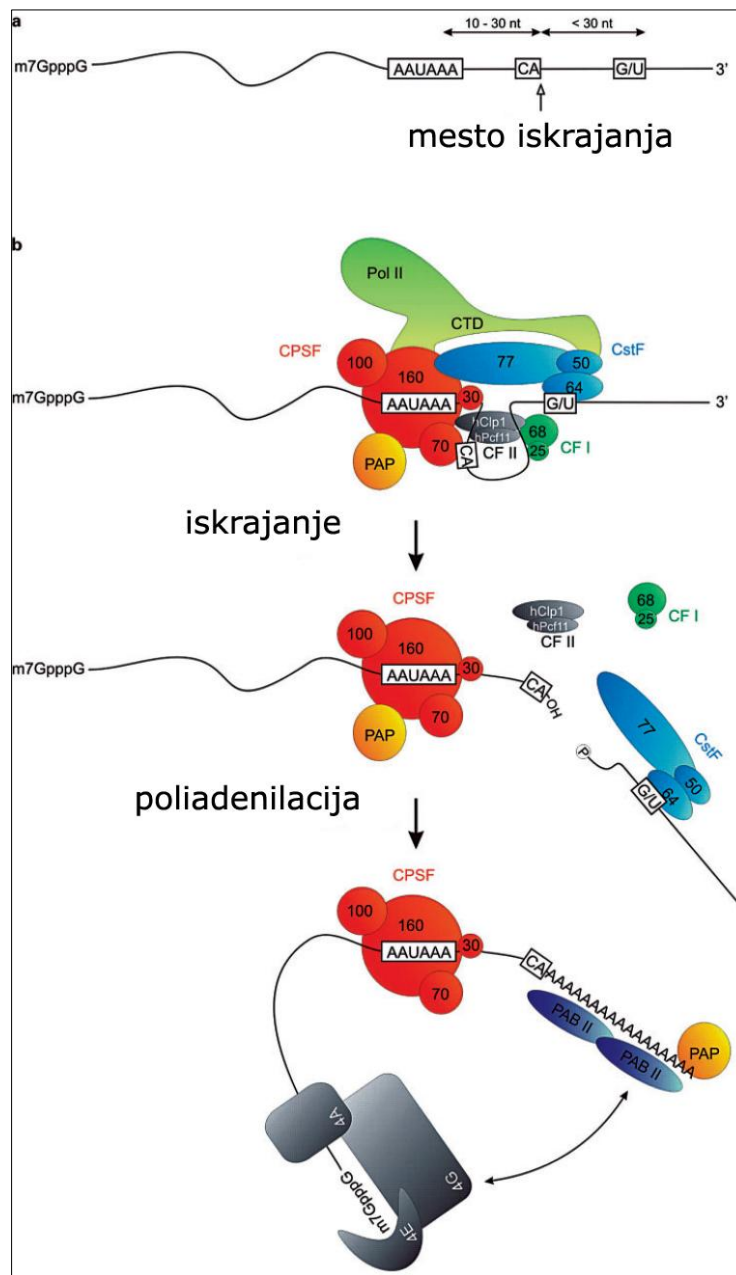
RNK polimeraza II sadrži konzervirani karboksiterminalni domen (CTD), koji je potreban u procesu isecanja (engl. *cleavage factor*). RNK polimeraza nije uključena u sam proces dodavanja adenina, ali doprinosi stabilizaciji kompleksa sa CPSF i CstF [104].

Poli(A) polimeraza je enzim koji dodaje adenezine na 3'kraj RNK molekula. Pripada familiji nukleotidil transferaza i visoko je konzervisana među eukariotima. PAP ne poseduje specifičnost za RNK supstrate, već specifično prepoznaje ATP [104].

PAB II je protein od 33 kDa koji je neophodan za brzu elongaciju i kontrolu dužine poli(A) repa. *In vitro* je pokazano da se vezuje direktno za CPSF-30 [104].

Inicijalni korak u stvaranju funkcionalnog kompleksa za iskrajanje i poliadenilaciju RNK predstavlja prepoznavanje signala na prekursorskoj RNK od strane CPSF i CstF, uz asistenciju CF I_m. CPSF-160 se uz asistenciju CPSF-30 i CPSF-100 vezuje za AAUAAA, dok se CstF vezuje za DSE preko CstT-64 subjedinice. Interakcija CPSF i CstF sa njihovim sekvencama je slaba, ali stabilizovana protein-protein interakcijom između CPSF-160 i CstF-77. Poslednji deo inicijacionog kompleksa je RNK polimeraza II koja vrši isecanje, najverovatnije uz asistenciju CPSF-73. Za uspešno isecanje, u kompleks se regrutuju i CF II_m i PAP. Po završetku, faktori isecanja disosuju iz kompleksa, PAB II se vezuje, nakon čega dolazi do brze elongacije poli(A)

repa do dužine od 250 adeninskih ostataka. Nakon toga se brzina elongacije smanjuje, a komponente poliadenilacione mašinerije disosuju sa molekula RNK (Slika 10) [104].



Slika 10. Proces obrade i poliadenilacije 3'kraja iRNK.

Preuzeto i modifikovano iz Danckwardt et al, 2006 [108]

1.3.4. Uloga 3'kraja gena u regulaciji genske ekspresije

3'kraj gena uključen je u regulaciju ekspresije na nivou: transkripcije, obrade primarnog transkripta, transporta iz jedra, lokalizacije iRNK u citoplazmi [109],

stabilnosti iRNK [110] i translacije [111]. Takođe, region 3'kraja predstavlja mesto interakcije sa mikroRNK i drugim malim RNK molekulima [112].

Sam proces sinteze i obrade primarnog RNK transkripta ima veoma važnu ulogu u regulaciji ekspresije. Pre svega, očuvana arhitektura poliadenilacionog signala je esencijalna za završetak procesa obrade 3'kraja. Postojanje više poliadenilacionih signala u jednom genu omogućava alternativnu obradu 3'kraja i pojavu više izoformi iRNK. Za ovaj proces je pokazano da može imati ulogu u regulaciji ekspresije istog gena u različitim tkivima. Takođe, alternativna poliadenilacija može igrati veliku ulogu u procesu embriogeneze i diferencijacije ćelija [104, 105].

Posebno važnu ulogu u stabilnosti iRNK i procesu translacije ima poli(A) rep. Poli(A) rep je neophodan za uspešni eksport iRNK iz nukleusa u citoplazmu gde se odvija proces translacije [113]. Dužina poli(A) repa i njegova „zaštićenost“ PAB proteinima utiču na poluživot iRNK. Kratkoživeće iRNK imaju kraće poli(A) repove i odlikuju se AU bogatim motivima u 3'UTRu. Pretpostavlja se, da kod ovih iRNK, PAB proteini migriraju i vezuju se za AU bogate regione na 3'kraju ostavljajući poli(A) rep nezaštićen i podložan degradaciji [114].

Veoma značajna za regulaciju ekspresije je i interakcija 3'kraja sa mikroRNK (miRNK). miRNK su 20-30bp dugi, jednolančani molekuli RNK koji su komplementarni delovima iRNK za koje se vezuju i onemogućavaju proces translacije [115]. Analizom 207 različitih humanih miRNK, za čak 43,5% je pokazano da su komplementarne konzervisanim osmomerima identifikovanim uporednom studijom 3'kraja gena kod različitih sisara [116].

1.3.5. Uloga 3'kraja gena u patološkim stanjima

Istraživanja su pokazala da 3'kraj gena ima i značajnu ulogu u patogenezi različitih bolesti [117, 118]. Mutacije koje pogađaju stop kodon, poliadenilacioni signal i menjaju sekundarnu strukturu 3'kraja iRNK dovode do poremećene regulacije procesa u kojima učestvuje 3'kraj i mogu dovesti do pojave bolesti.

Promene koji dovode do perturbacija položaja stop kodona mogu značajno uticati na dužinu 3'UTRa, kao i na dužinu translatiranog proteina. EBS (lat. *epidermolysis bullosa simplex*) ili keratinska bolest je autozomno dominantno oboljenje povezano sa keratinskim genima *KRT14/KRT5*. Mutacije u ovim genima dovode do

formiranja preuranjenih stop kodona, a takođe su opisane i mutacije koje dovode do formiranja odloženih stop kodona i 3'UTRa nefiziološke dužine [119-121]. Slične mutacije dešavaju se i u genu *PAX6* koji dovodi do aniridije, oboljenja koje se karakteriše gubitkom irisa [122, 123].

Mutacije koje pogađaju poliadenilacioni signal su retke, a dovode do nemogućnosti vezivanja proteina poliadenilacione mašinerije i gubitka proteinskog produkta datog gena. Promene u kanonskoj sekvenci poliadenilacionog signala opisane su kod talasemijskih poremećaja [124] i u *FOXP3* genu koji kodira transkripcioni faktor zadužen za regulaciju razvoja i funkcije regulatornih T-ćelija. Mutacije u ovom genu dovode do IPEX sindroma (engl. *immune dysfunction, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked*) [125].

Obzirom da 3'UTR formira specifične sekundarne strukture, promene u sekvenci dovode do formiranja nepravilnih struktura, što može biti osnova za nastanak bolesti. Na primer, mutacije u 3'regionu *GATA4* gena menjaju sekundarnu strukturu iRNK i njenu lokalizaciju i translaciju. Mutacije u ovom genu su povezane sa kongenitalnim srčanim oboljenjima [126].

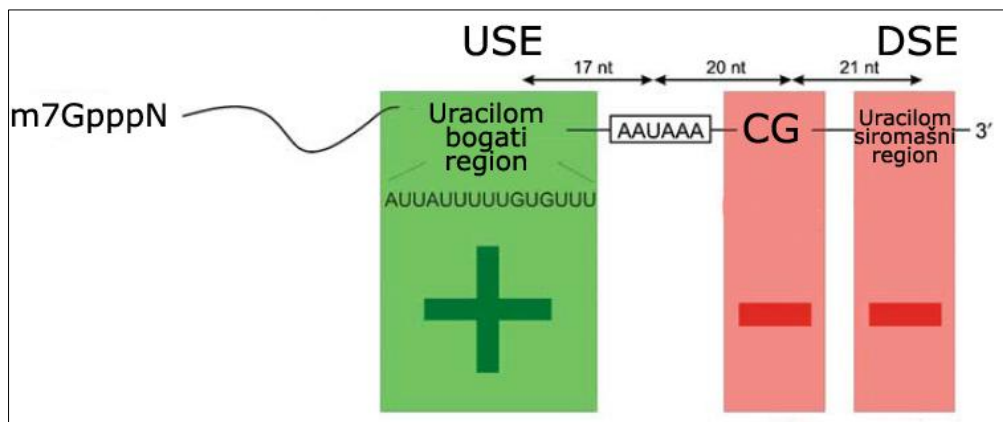
Za razliku od goreopisanih promena, koje najčešće dovode do smanjene količine ili potpunog odsustva proteina, posebnu grupu promena u 3'kraju gena čine *gain of function* polimorfizmi koji dovode do povećane ekspresije gena. Ovakve promene su daleko ređe i mehanizmi kojim utiču na ekspresiju gena nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedna od takvih je G20210A genska varijanta koja se nalazi na mestu iskrajanja pre-iRNK za protrombin i biće detaljno razmatrana u poglavlju 1.3.7 [127].

1.3.6. Struktura 3'kraja gena za protrombin

3'kraj protrombinskog gena poseduje specifičnu, nekanonsku organizaciju [127]. Za razliku od ostalih humanih gena, 3'kraj protrombinskog gena čine aktivni USE element, manje efikasno mesto iskrajanja i neaktivni DSE element (Slika 11).

Za razliku od većine gena, obrada 3'kraja protrombinskog gena se odvija na USE-zavisani način [108, 128]. USE motiv protrombinskog gena nalazi se na poziciji -33 do -17 baza uzvodno od poliadenilacionog signala i predstavlja timinom bogati region. Ovakvi USE elementi su prvi put opisani kod virusa, gde su široko rasprostranjeni i imaju ulogu pojačavača obrade 3'kraja. Kod sisara su opisani u svega

nekoliko iRNK, uključujući humani komplement C2, lamin B2, ciklooksigenazu-2 i kolagenske gene [129-132].

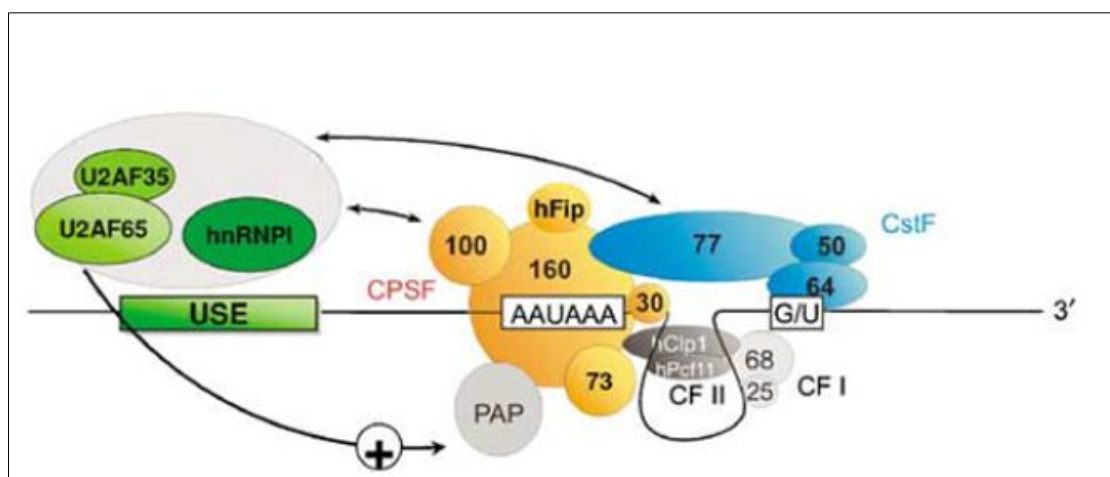


Slika 11. Prikaz organizacije 3'kraja iRNK za protrombin. USE-*upstream element*; DSE-*downstream element*.

Preuzeto i modifikovano prema Danckwardt et al, 2008 [118]

Međutim, kompjuterske analize su pokazale da je USE-zavisno iskrajanje 3'krajeva široko rasprostranjeno među sisarskim iRNK i da ovaj motiv predstavlja jedan od vrlo značajnih regulatornih regiona 3'kraja. Poređenje USE elementa protrombina sa poznatim motivima 3'UTRa je pokazalo da FII USE sadrži dva visoko konzervirana motiva koji se preklapaju- UAUUUUU i UUUUGU, oba neophodna za efikasno procesovanje 3'kraja iRNK za protrombina. *In vivo* je pokazano da odsustvo USE motiva onemogućava formiranje 3'kraja protrombina. Takođe, uklanjanje nekoliko nukleotida iz USE motiva dovodi do smanjene obrade 3'kraja [128]. Relativna pozicija u odnosu na poliadenilacioni signal takođe ima značajnu ulogu u efikasnosti obrade 3'kraja iRNK za protrombin. Pomeranje USE motiva nizvodno prema poliadenilacionom signalu ubrzava procesovanje 3'kraja, dok pomeranje 10-30 nukleotida uzvodno dovodi do gubitka funkcije u 3'procesovanju. Iako se pretpostavljalo da je za uspešnu obradu 3'krajeva koji su nekanonski organizovani potrebno da USE element sadrži veći broj uracilskih ostataka, u slučaju protrombinskog 3'kraja je pokazano da svako smanjenje, ali i povećanje broja uracila u USE elementu dovodi do gubitka funkcije u obradi 3'kraja. Sa druge strane, duplikacija celog USE elementa povećava brzinu procesovanja 3'kraja. Svi ovi podaci ukazuju na činjenicu da

je USE element protrombina evoluirao u pravcu sekvence koja povećava efikasnost i brzinu obrade 3'kraja. Eksperimentalno je pokazano da se za USE element vezuju dve klase proteina: faktori koji učestvuju u iskrajanju i faktori koji pripadaju poliadenilacionoj mašineriji. Od faktora iskrajanja potvrđeno je vezivanje hnRNPI/PTB (engl. *heterogenous nuclear ribonuclearprotein I/polypyrimidine tract-binding protein 1*), U2AF65 (engl. *splicing factor U2AF 65-kDa subunit*) i U2AF35 (engl. *splicing factor U2AF 35-kDa subunit*). Od faktora poliadenilacione mašinerije, za USE element se vezuju; CstF 50, CPSF 160, CstF 77, CstF 64 i CPSF 100. Za U2AF65 je pokazano da interaguje i sa PAP i CF I_m, što ukazuje da su procesi iskrajanja poslednjeg egzona i pospešivanja obrade 3'kraja kod protrombina kompleksno povezani sa USE regulatornim motivom. Model obrade 3'krajeva sa nekanonskom organizacijom dat je na Slici 12.



Slika 12. Obrada nekanonski organizovanih 3'krajeva gena USE-zavisnim mehanizmom.

Preuzeto i modifikovano iz Danckwardt et al, 2007 [128]

Za razliku od većine eukariotskih iRNK kod kojih je dinukleotid CA karakterističan za mesto isecanja, nemutirana sekvenca protrombina na ovom mestu poseduje CG dinukleotid. *In vitro* je pokazano da je isecanje iza CG dinukleotida najmanje efikasno od svih mogućih kombinacija, te se G nukleotid najređe nalazi na ovoj poziciji. Zamena G nukleotida bilo kojim drugim u protrombinu dovodi do povećane efikasnosti isecanja i povećane ekspresije protrombina [127].

DSE regulatorni element protrombinskog gena je daleko siromašniji uraciliom u odnosu na druge sisarske gene, što značajno smanjuje sposobnost vezivanja CstF kompleksa i minimalizuje njegovu ulogu u procesu iskrajanja iRNK protrombina.

Na osnovu ovoga je postavljen model po kome su iskrajanje i poliadenilacija kod 3'kraja gena za protrombin regulisani balansom pozitivnih i negativnih regulatora, sa akcentom na značajnu ulogu USE elementa u ovim procesima (Slika 11) [128].

1.3.7. Uloga genskih varijanti 3'kraja protrombinskog gena u regulaciji ekspresije protrombina i nastanku trombofilije

Nekanonska organizacija 3'kraja gena za protrombin, u kome postoje regioni manje efikasni u procesu iskrajanja iRNK u poređenju sa drugim genima, čini ovaj region potencijalnim mestom za nastanak funkcionalnih genskih varijanti koje dovode do povećane ekspresije gena (*gain of function*) [127]. Do danas je u ovom regionu protrombinskog gena opisan veći broj genskih varijanti povezanih sa povećanom ekspresijom protrombina.

Među do sada opisanim genskim varijantama u 3'kraju gena za protrombin najznačajnija je FII G20210A varijanta. Poort i saradnici su sekvenciranjem svih egzona, kao i 5'- i 3'- UTRa gena za protrombin, kod 28 pacijenata sa dokumentovanom venskom trombozom i pozitivnom porodičnom anamnezom, identifikovali G>A promenu i to u 3'UTRu gena na poziciji 20210, koja predstavlja mesto iskrajanja iRNK [24]. Ova genska varijanta je bila prisutna kod 18% pacijenata i 1% zdravih ispitanika, što ga čini faktorom rizika od 2,8 za nastanak venskih tromboza. Kod heterozigotnih nosilaca FII G20210A varijante detektovan je povišeni nivo protrombina u plazmi (>od 115 U/dL). U daljim studijama je pokazano da ova varijanta predstavlja značajan faktor rizika za nastanak venskih tromboza [133, 134]. To je posebno izraženo kod pacijenata sa idiopatskim trombozama portne vene, gde je učestalost ove varijante više od osam puta povećana u odnosu na kontrolu grupu [135], kao i kod pacijentkinja u trudnoći ili na hormonskoj terapiji [136-139]. Takođe je pokazano da ova protrombinska varijanta može da predstavlja značaj faktor rizika za pojavu spontanih pobačaja i smrti fetusa u uterusu [135, 138, 140]. Uloga FII G20210A varijante u nastanku arterijskih tromboza je daleko manja. *META* analize pokazuju da predstavlja blagi faktor rizika za pojavu infarkta miokarda i moždanog udara, naročito u

slučajevima kada je udružen sa sredinskim faktorima [141, 142]. Na osnovu zbirnog pregleda rezultata iz 11 centara u kojima je testirano 5527 ljudi, utvrđeno je da je učestalost G20210A varijante oko 2% u opštoj populaciji. Među osobama koji ne pripadaju populaciji belaca frekvencija FII G20210A varijante je iznosila svega 0,67% [143].

U regionu iskrajanja iRNK kod pripadnika crne rase opisana je C20209T varijanta [144] sa učestalošću od svega 0,4%, dok je kod belaca opisana samo kod nekoliko pacijenata. Iako je otkrivena kod pacijenata sa trombozama, nije dokazana njena povezanost sa trombofilijom [145]. *In vitro* funkcionalni eseji su dali kontroverzne rezultate. Naime, prema rezultatima grupe iz Lajdena, 20209T varijanta ne dovodi do povećanja, već do blagog smanjenja ekspresije gena za protrombin [146]. Sa druge strane, istraživači iz Hajdelberga su pokazali da je C20209T funkcionalna varijanta koji dovodi do povećane ekspresije protrombinskog gena [147].

U okviru DSE regiona 3'kraja gena za protrombin opisane su A20218G, T20219A i C20221T varijante [148-150]. Varijanta A20218G je opisana kod svega dve pacijentkinje sa trombozama, od kojih je jedna bila nosilac FII G20210A i FV Leiden mutacija. Varijanta T20219A je otkrivena kod jedne pacijentkinje sa trombozom nakon porođaja, dok je C20221T varijanta opisana kod nešto većeg broja pacijenata, ali do sada nije urađena studija o njenoj frekvenciji. Za C20221T gensku varijantu je u *in vitro* studiji potvrđeno da dovodi do povećane ekspresije protrombina, najverovatnije mehanizmom efikasnijeg DSE elementa u slučaju timina na poziciji 20221 [151, 152].

Za varijantu A19911G, koja je locirana u poslednjem intronu gena za protrombin, takođe je pokazano da dovodi po povišenog nivoa protrombina [153]. Studije su pokazale da je ova varijanta zastupljenija kod pacijenata sa trombozama, ali da, sama po sebi, predstavlja vrlo blagi faktor rizika za nastanak tromboza. Međutim, u kombinaciji sa drugim genskim varijantama (FII G20210A i FV Leiden) može biti dodatni faktor rizika [153-156].

Nedavno su u poslednjem egzonu gena za protrombin otkrivene dve nukleotidne zamene koje dovode do rezistencije na antitrombin, što predstavlja novi mehanizam nastanka trombofilije. Mutacija nazvana protrombin Yukuhashi (G20031T) otkrivena je kod japanske pacijentkinje sa trombozama [157]. Ova *missense* mutacija dovodi do aminokiselinske zamene arginina leucinom na poziciji 596 u proteinu. Druga mutacija,

koja pogađa istu poziciju, pronađena je u dve srpske porodice sa različitim trombotičkim poremećajima. Ova mutacija je nazvana protrombin Beograd (G20031A) i dovodi do aminokiselinske zamene arginina glutaminom na poziciji 596 u proteinu [158]. Funkcionalne analize su pokazale da obe mutacije dovode do otežane inaktivacije trombina antitrombinom, što dovodi do poremećaja hemostazne ravnoteže i pojave tromboza. Protrombin Yukuhashi i Beograd predstavljaju retke varijante protrombinskog gena, sa učestalošću manjom od 1% [157, 158].

Nedavno su u Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI, detektovane nove genske varijante T20063C, C20068T i T20298C 3'kraja gena za protrombin [159]. Genska varijanta T20063C nalazi se u poslednjem egzonu i dovodi do aminokiselinske zamene fenilalanina izoleucionom na poziciji 606 u proteinu, dok se T20298C varijanta nalazi u delu 3' FR sekvence. Ove varijante su retke i njihova funkcija je još uvek nepoznata. Genska varijanta C20068T predstavlja sinonimnu zamenu u poslednjem egzonu protrombinskog gena i ne dovodi do izmena u aminokiselinskoj sekvenci protrombina. U preliminarnim, *in vitro* studijama je pokazano da konstrukti sa genskom varijantom C20068T dovode do 1,64 puta povećane ekspresije iRNK u odnosu na wt konstrukt, što ukazuje na mogućnost da ova genska varijanta ima funkcionalne posledice i može biti potencijalno značajan marker trombofilije [159].

FII C20068T genska varijanta je, kao funkcionalna varijanta, čiji mehanizam delovanja nije poznat, odabrana kao predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

2. CILJ

Ova studija se bavi sinonimnom genskom varijantom C20068T u poslednjem egzonu gena za protrombin. Sam 3'kraj protrombina, ima nekanonsku organizaciju i specifičnu arhitekturu koja ga čini podložnim *gain of function* mutacijama. Do danas je opisano više genskih varijanti u ovom regionu za koje je pokazano da dovode do povećane ekspresije gena za protrombin, što je povezano sa poremećajem hemostazne ravnoteže i pojavom trombofilije.

Poslednjih godina, sve je više podataka o ulozi sinonimnih zamena u regulaciji ekspresije gena. Iako ne dovode do aminokiselinske zamene u finalnom proteinskom produktu, sinonimne zamene mogu regulisati ekspresiju datog gena na drugim nivoima, od brzine transkripcije, obrade, transporta i degradacije RNK, do promena u brzini i stopi translacije proteina, što znatno može uticati na vremenski i prostorno regulisanu ekspresiju jednog proteina.

Ciljevi ove doktorske disertacije su definisani na sledeći način:

1. Određivanje učestalosti genske varijante C20068T u grupi pacijenata sa trombofilijom, kao i odgovarajućoj grupi zdravih ispitanika, čime bi se utvrdilo da li C20068T varijanta može predstavljati novi trombofilni marker.
2. Funkcionalna analiza C20068T varijante u cilju rasvetljavanja mehanizma kojim ova sinonimna genska varijanta utiče na promenu ekspresije gena za protrombin.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

U okviru ove studije testirano je ukupno 797 ispitanika, od toga 606 pacijenata i 191 ispitanik kontrolne grupe.

Pacijenti su selektovani iz grupe od 4000 pacijenata koji su upućeni u Laboratoriju za molekularnu biologiju, IMGGI, zarad testiranja na trombofilne mutacije. Na osnovu anamnestičkih podataka iz studije su isključeni pacijenti sa malignitetima, infektivnim bolestima i endokrinološkim poremećajima, kao i pacijenti sa deficitom antitrombina, proteina C i proteina S. Pacijenti su testirani na prisustvo FV Leiden i FII G20210A mutacija i u studiju su uključeni oni za koje je utvrđeno da nisu nosioci ovih mutacija. Od 606 ovako selektovanih pacijenata, njih 443 je imalo neki trombotički poremećaj, dok je 163 imalo ponovljene spontane pobačaje nepoznate etiologije. Pacijenti sa trombotičkim poremećajima su podeljeni u grupe, shodno trombotičkom poremećaju koji su imali. Grupu pacijenata sa cerebrovaskularnim insultima činilo je 106 pacijenata, grupu sa izolovanim plućnim embolizmom činio je 101 pacijent, grupu sa trombozom dubokih vena 175 pacijenata [160], dok je 61 pacijent imao kombinovane trombotičke epizode.

Opštu kontrolnu grupu činilo je 191 zdravih ispitanika oba pola, dok je kontrolnu grupu za pacijentkinje sa spontanim pobačajima činilo 75 zdravih žena, bez istorije trombotičkih epizoda, koje su imale najmanje jednu uspešnu trudnoću.

Za izolaciju DNK pacijenata i ispitanika kontrolne grupe korišćeni su limfociti periferne krvi, kao i ćelije bukalne sluzokože. Krv je uzimana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1. Uzorci bukalne sluzokože su uzimani sterilnim štapićem za bris. Plazma pacijenata je dobijena centrifugiranjem pune krvi uzete sa Na-citratom kao antikoagulansom na 3000rpm u trajanju od 10 minuta. Uzorci DNK čuvani su na -20°C, a uzorci plazme na -80°C.

Ovo istraživanje je odobrio Etički komitet Instituta za transfuziju krvi Srbije.

3.2. Materijal

3.2.1. Čelijske linije

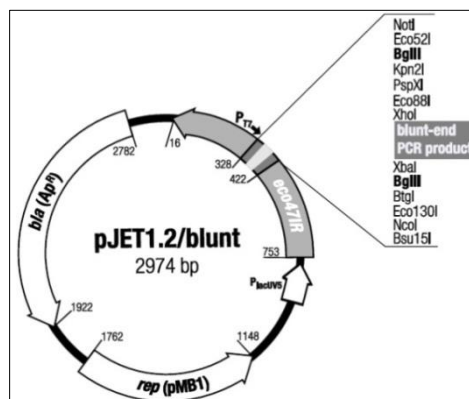
U okviru funkcionalne analize C20068T varijante u genu za protrombin korišćene su komercijalno dostupne cos-7, HepG2 i HeLa permanentne čelijske linije. Cos-7 permanentna čelijska linija nastala je transformacijom CV-1 čelijske linije, poreklom od ćelija bubrega afričkog zelenog majmuna, pomoću virusa SV-40. HepG2 permanentna čelijska linija dobijena je iz tkiva jetre petnaestogodišnjeg dečaka koji je bolovao od hepatocelularnog karcinoma. HeLa čelijska linija dobijena je iz ćelija raka grlića materice.

3.2.2. Bakterijski sojevi

U studiji je korišćen soj *E. coli* **DH5 α** (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

3.2.3. Plazmidni vektori

Za kloniranje PCR produkata korišćen je pJET1.2/blunt plazmidni vektor (*Thermo Scientific*), veličine ~3kb (Slika 13). Ovaj vektor se može koristiti za kloniranje PCR produkata sa lepljivim ili ravnim krajevima, sa veličinama inserta od 6 bp do 10kb. Nakon transformacije, recirkularizovani pJET1.2/blunt vektor eksprimira letalni restrikcioni enzim, čime prestaje njegova propagacija, tako da se na Petri šolji pojavljuju samo rekombinovani klonovi koji sadrže insert. Vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin.

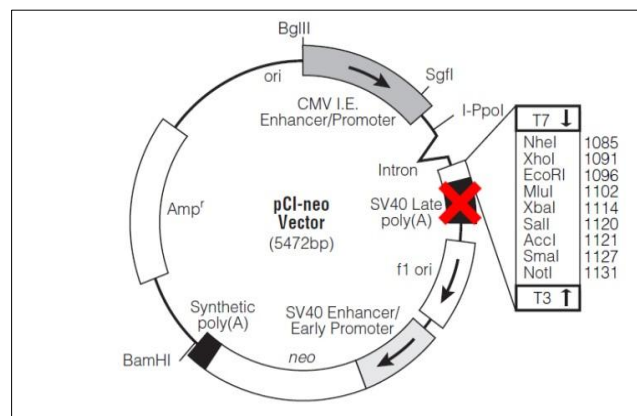


Slika 13. pJET1.2/blunt vektor.

Preuzeto sa www.thermoscientific.com

U eksperimentima transfekcije korišćen je pCI-neo ekspresioni vektor (*Promega*), veličine ~5,5 kb (Slika 14). pCI-neo sisarski ekspresioni vektor nosi citomegalovirusni pojačavač/promotor koji omogućava konstitutivnu ekspresiju ukloniranih DNK inserata u različitim sisarskim ćelijama. Efikasnu selekciju ćelija, transfekovanih pomoću ovog vektora, omogućava gen za neomicin fosfotransferazu, koji obezbeđuje otpornost na antibiotik G-418. G-418 antibiotik je aminoglikozid koji proizvode streptomicete, a citotoksični efekat ispoljava kroz blokiranje translacije. Neomicin fosfotransferaza inaktivira G-418 putem fosforilacije, čime sprečava njegov toksični efekat i omogućava preživljavanje ćelija koje nose vektor. Za propagaciju u bakterijskim ćelijama vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin. U okviru ovog vektora nalazi se i kasni signal za poliadenilaciju iz virusa SV40, za koji je pokazano da povećava efikasnost obrade i translacije kloniranih DNK fragmenata.

Za potrebe funkcionalne analize 3' kraja gena za protrombin korišćen je vektor pCIneo kome je deletiran region dužine 226bp sa SV40 poliadenilacionim signalom-pCIneo Δ SV40 [161]. Uklanjanjem virusnog poliadenilacionog signala sprečen je njegov uticaj na ekspresiju kloniranog gena. U ovoj studiji je korišćen vektor pCIneo Δ SV40 u koji je uklonirana celokupna cDNK za protrombin: signalna sekvenca, 14 egzona, 3' nekodirajući region i 50bp 3'FR regiona nizvodno od mesta iskrajanja: **pCIneo Δ SV40Pt+50-wt** konstrukt [161]. U ovaj vektor je metodom *in-situ* mutageneze uvedena zamena na mestu 20068 (**pCIneo Δ SV40Pt+50-20068T-20068T** konstrukt) [159].



Slika 14. Cirkularna mapa pCI-neo vektora.

Preuzeto i modifikovano sa www.promega.com

3.2.4. Oligonukleotidi

Nazivi i sekvence oligonukleotida i prajmera korišćenih u ovom radu dati su u Tabeli 1.

Tabela 1. Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida

Naziv	Sekvenca	Eksperiment
FIIpsm	5'-GCTTCTACACACATGTGTTGC-3'	PCR-RFLP
Pt2	5'-TCAATGCTCCCAGTGCTATTC-3'	PCR-RFLP, <i>real-time</i> PCR, fragment analiza
FIII3a	5'-GGAAACGAGGGGATGCCTGT-3'	Sekvenciranje DNK
A6b	5'-GTGAGAGGAAAGATGGCAGG-3'	Sekvenciranje DNK
F13/14 FAM	5'-FAM-CCCTTTGTCATGAAGGAGCCCC TTT-3'	Fragment analiza
18sRNKeur F	5'-NED- AGGATCCATTGGAGGGCAAGT-3'	Fragment analiza
18sRNKeur R	5'-TCCAACACTACGAGCTTTTTAACTGCA-3'	Fragment analiza
F13/14 neobeleženi	5'-CCCTTTGTCATGAAGGAGCCCCCTTT-3'	<i>real-time</i> PCR, modifikovani 3' RACE
M1	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	<i>real-time</i> PCR
M2	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	<i>real-time</i> PCR
RT418a	5'-CCGGTCTTGTCGATCAG-3'	<i>real-time</i> PCR
RT418b	5'-TGAGCCTGGCGAACAGTTC-3'	<i>real-time</i> PCR
G418-proba	5'-VIC-ATGCTCTTCGTCCAGAT- MGBNFQ-3'	<i>real-time</i> PCR
Pt1 FAM	5'-FAM-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'	modifikovani 3'RACE

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Eksperiment
polyT	5'-T(20) -3'	modifikovani 3'RACE
Pt1	5'-GGATGGGAAATATGGCTTCTAC-3'	EMSA
FII Lo	5'-TACTCTCCAAACTGATCAATGAC-3'	EMSA
PAI-1a	5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'	EMSA
PAI-1b	5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'	EMSA
20068mut	5'-ACACATGTGTTCCGTCTGAAGAAGTGG AACAG-3'	<i>Footprinting</i> <i>Primer</i> PCR
FIIwt20068	5'-ACACATGTGTTCCGCCTGAAGAAGTGGA TACAG-3'	<i>Footprinting</i> <i>Primer</i> PCR
pJET1.2 forward	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'	za sekvenciranje pJET1.2/blunt plazmida
pJET1.2 reverse	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	za sekvenciranje pJET1.2/blunt plazmida

3.3. Metode

3.3.1. Metode za detekciju genske varijante C20068T

Za detekciju genske varijante C20068T kod pacijenata i ispitanika kontrolne grupe korišćene su metode PCR-RFLP (engl. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) i sekvenciranje DNK.

Izolacija DNK iz periferne krvi

[protokol za *QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*]

U mikrotube od 1,5mL dodavano je 200 μ L periferne krvi, 20 μ L *QIAGEN* proteinaze K i 200 μ L pufera AL. Smeša je vorteksovana 15s i zatim inkubirana na 56°C 10min, da bi se ćelije lizirale i DNK oslobodila od proteina. Nakon toga je dodavano 200 μ L apsolutnog etanola i smeša je ponovo vorteksovana 15s. Smeša je zatim nanošena na QIAamp kolonu i centrifugirana na 8000rpm u toku 1min. Nakon odbacivanja eluata (DNK se vezuje za kolonu), dodavano je 500 μ L pufera AW1 i kolona ponovo centrifugirana na 8000rpm u toku 1min. Eluat je odbacivan, a kolona prebacivana u novu epruvetu za sakupljanje eluata. U sledećem koraku, dodavan je pufer AW2 koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i kolona centrifugirana na 13000rpm u toku 3min. Nakon toga, kolona je prebacivana u novu epruvetu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1min, kako bi se uklonili tragovi pufera. U poslednjem koraku kolona je prebacivana u čistu mikrotubu od 1,5mL. DNK je spirana sa kolone dodavanjem 200 μ L sterilne vode, kolona je inkubirana 1min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 8000rpm u toku 1min. Izolovana DNK čuvana je na -20°C do daljeg korišćena.

Izolacija DNK iz ćelija bukalne sluzokože

[protokol za *QIAamp DNA Mini Kit-QIAGEN*]

Deo štapića za uzimanje bukalnog brisa sa pamučnom vaticom na kojoj se nalaze ćelije bukalne sluzokože je smeštan u mikrotubu zapremine 2mL. U nju je dodavano 400 μ L 1xPBS pufera (137mM NaCl; 3,375mM KCl; 1,76mM KH₂PO₄; 10mM Na₂HPO₄; pH7,5) i 20 μ L *QIAGEN* proteinaze K. Zatim je dodavano 400 μ L pufera AL i smeša odmah vorteksovana 15s. Nakon toga, smeša je inkubirana 10min na 56°C,

dodavano je 400 μ L etanola i cela smeša je vorteksovana. 700 μ L smeše je nanošeno na kolonu i ona je centrifugirana na 8000rpm u toku 1min. Eluat je odbacivan i ostatak smeše je nanošen na istu kolonu uz ponovljeno centrifugiranje. U sledećem koraku je dodavano 500 μ L pufera AW1 i kolona centrifugirana na 8000rpm u toku 1min. Nakon odbacivanja eluata, dodavano je 500 μ L pufera AW2. Kolona je centrifugirana na 13000rpm u toku 3min. Nakon toga kolona je prebacivana u novu epruvetu i ponovo centrifugirana na istoj brzini u toku 1min kako bi se uklonili tragovi pufera. Po završetku centrifugiranja, kolona je prebacivana u čistu epruvetu. Na kolonu je dodavano po 200 μ L sterilne vode. Kolona je 1min inkubirana na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 8000rpm u toku 1min, čime je DNK eluirana sa kolone.

Za merenje koncentracije DNK je korišćen spektrofotometar *NanoVue* (*GE Healthcare, Life sciences*), po uputstvu za rad na aparatu.

Analiza DNK na agaroznom gelu

Prema referenci [162]

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (0,8- 2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5 μ g/mL). Elektroforeza je vršena u TAE puferu (40mM Tris; 20 mM sirćetna kiselina; 1mM Na₂EDTA), pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizualizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm. Nakon elektroforeze gelovi su dokumentovani CCD kamerom sa *BioDocAnalyze* sistemom. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (*NE BioLabs*).

PCR-RFLP metoda

prema referencama [163] i [164]

PCR-RFLP (engl. *Polimerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) je metoda koja se koristi za direktnu detekciju prisustva mutacija i genskih varijanti. Zasniva se na tome da postojanje promene u sekvenci kreira novo ili ukida postojeće mesto prepoznavanja odgovarajućeg restriktionog enzima. Na taj način, umnoženi fragment DNK će nakon delovanja restriktionog enzima imati različite dužine u zavisnosti od prisustva/odsustva polimorfizma. Reakcija lančanog

umnožavanja DNK (engl. *PCR-Polymerase Chain Reaction*), omogućava umnožavanje željenog fragmenta DNK iz minimalne količine početnog materijala, korišćenjem termostabilne *Taq* polimeraze. Ukoliko se reakcija lančanog umnožavanja odvija direktno iz pune krvi, bez prethodne izolacije DNK, na početku se koristi "hot start", odnosno nekoliko ciklusa grejanja i hlađenja, kako bi se omogućila liza ćelija i oslobađanje DNK.

Metoda **PCR-PSM** (engl. *Polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis*) se zasniva na mogućnosti *Taq* polimeraze da uvede promenu u sekvenci DNK tokom reakcije lančanog umnožavanja tako što jedan od prajmera koji se koristi nije potpuno komplementaran DNK matrici. Na taj način omogućava se stvaranje novog restrikcionog mesta u umnoženom segmentu čije će postojanje zavisiti od prisustva ili odsustva mutacije koja se analizira.

Za detekciju genske varijante C20068T korišćena je PCR smeša, u finalnoj zapremini 25 μ L, sledećeg sastava:

200-500ng DNK ili 1 μ L pune krvi	
10x PCR pufer	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTPs	2,5 μ L
10 pmol FIIpsm	0,5 μ L
10 pmol Pt2	0,5 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije kada je umnožavanje rađeno iz DNK bio je sledeći:

95°C/5min

(94°C/1min, 61°C /1min, 72°C/1min)x 30 ciklusa

72°C/10min

Temperaturni profil PCR reakcije kada je umnožavanje rađeno direktno iz pune krvi bio je sledeći:

(97°C/3min, 55°C/3min)x 3 ciklusa

95°C/5min

(94°C/1min, 61°C /1min, 72°C/1min)x 30 ciklusa

72°C/10min

Produkti PCR reakcije su proveravani na 2% agaroznom gelu, a zatim su tretirani odgovarajućim restrikcionim enzimom na 37°C tokom 16h. Sastav smeše za digestiju, finalne zapremine 25µL, bio je sledeći:

PCR produkt	15µL
10x pufer M	2,5µL
<i>HhaI</i> (10U/µL)	0,5µL
uslovi digestije	37°C/16h

Produkti digestije DNK restrikcionim enzimom analizirani su vertikalnom elektroforezom na 10% poliakrilamidnim gelovima. DNK je vizuelizovana bojenjem gelova solima srebra.

Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Prema referenci [162]

Fragmenti DNK su razdvajani na nedenaturišućim 10% poliakrilamidnim gelovima (9,7% akrilamid; 0,3% N,N-metilenbisakrilamid; 100mM Tris; 83mM borna kiselina; 1mM EDTA pH 8; 0,1% amonijumpersulfat; 0,01% TEMED). Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u TBE puferu (100mM Tris; 83mM borna kiselina; 1mM EDTA pH 8). Po završetku elektroforeze, gelovi su bojeni solima srebra.

Vizualizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima srebro nitratom

Prema referenci [165]

Vizualizacija DNK u poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebro nitratom. Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30min u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni u 0,1% rastvoru srebro nitrata 10min. Višak srebra je uklanjan ispiranjem najpre u redestilovanoj vodi, a zatim u razvijaču sledećeg sastava: 1,5% natrijum hidroksid, 0,01% natrijum borhidrid i 0,048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču inkubirani 20min. Fiksiranje dobijenih traka vršeno je potapanjem gelova u 0,75% rastvor natrijum bikarbonata u trajanju od 20min.

Sekvenciranje DNK

[protokol za *BigDye Terminator Ready Reaction Kit*- Applied Biosystems]

Metodom sekvenciranja se određuje redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK sekvenaze da sintetiše komplementarni lanac DNK, nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK, pri čemu koristi smešu dezoksiribonukleotida i didezoksiribonukleotida [166]. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Na ovaj način se dobija serija jednolančanih fragmenata čija se dužina razlikuje za jedan bazni par. Svaki od četiri didezoksinukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji.

Za sekvenciranje DNK korišćen je kit *BigDyeTM Terminator Version 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems)*. Produkti reakcije sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na aparatu *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Fragment 3'kraja gena za protrombin dužine 715bp najpre je umnožavan metodom PCR-a, pomoću prajmera FII13a i A6b. PCR smeša finalne zapremine 25 μ L sadržala je sledeće komponente:

200-500 ng DNK	
10xPCR pufer	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTPovi	2,5 μ L
10 pmol FII13a	0,5 μ L
10 pmol A6b	0,5 μ L
5 U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije kada je umnožavanje vršeno iz DNK bio je sledeći:

94°C/5min

(94°C/45s, 61°C/45s, 72°C/45s)x35 ciklusa

72°C/10min

Temperaturni profil PCR reakcije kada je umnožavanje vršeno iz pune krvi bio je sledeći:

(97°C/3min, 55°C/2min)x 3 ciklusa

95°C/5min

(94°C/1min, 61°C/1min, 72°C/1min)x 30 ciklusa

72°C/10min

Nakon provere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, vršeno je prečišćavanje DNK na koloni (*QIAquick PCR Purification kit, Qiagen*) prema uputstvu proizvođača. U PCR smešu dodavano je 80µL PBI pufera, nakon čega je smeša vorteksovana i centrifugirana 5s. Čitava zapremina je nanošena na QIAquick spin kolonu i centrifugirana tokom na 13000rpm/1min radi vezivanja umnoženog PCR produkta za kolonu. Eluat je odbacivan, nakon čega je na kolonu dodavano 750µL pufera PE, a smeša centrifugirana na 13000rpm/1min. Nakon odbacivanja eluata, kolona je dodatno centrifugirana na 13000rpm/1min, radi dodatnog uklanjanja preostale tečnosti. QIAquick kolona je zatim prebačena u čistu mikrotubu od 1,5mL, dodato je 50µL sterilne vode, kolona je inkubirana 1min na sobnoj temperaturi, nakon čega je PCR produkt eluiran sa kolone centrifugiranjem na 13000rpm/1min.

Smeša za reakciju sekvenciranja, finalne zapremine 8µL, sadržala je sledeće komponente:

-10 ng prečišćenog PCR produkta
-3,2 pmol FII13a
-2µL <i>Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)</i>

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje bio je sledeći:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min)x25 ciklusa

4°C/ ∞

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U 8µL smeše je dodavano po 40µL 0,1M Na-acetata pH 5,2, rastvorenog u etanolu. Zatim je vršeno centrifugiranje na 13000rpm u toku 10min, uz

odlivanje supernatanta. Talog je ispiran dva puta sa po 200 μ L 70% etanola, uz centrifugiranje 13000rpm/10min i odlivanje supernatanta. Nakon toga je u potpunosti osušen. Osušeni talog je rastvaran u 25 μ L *HiDi Formamide (Applied Biosystems)* i celokupna zapremina je nanošena na aparat za automatsko sekvenciranje. Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*.

Statistička obrada podataka

[MedCalc 12.2.1.0]

Za statističku obradu podataka korišćeni su: χ^2 test i Studentov t-test, sa nivoom statističke značajnosti od 0,05. Određivani su P vrednost, OR (*Odds Ratio*) i 95%CI (*Confidence Interval*). Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket *MedCalc*, verzija 12.2.1.0. Za određivanje Hardi-Vajnbergove ravnoteže korišćen je *Hardy-Weinberg equilibrium calculator* (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>).

3.3.2. Kvantifikacija količine protrombina u humanoј plazmi

Za relativnu kvantifikaciju količine protrombina u plazmi pacijenata korišćena je *Western blot* analiza. Kao referentni uzorak korišćena je komercijalno dostupna standardna humana plazma (*Siemens*).

Western blot analiza

Prema referenci [167]

Western blot je metoda koja omogućava imunodetekciju ciljnog proteina u uzorku. Metoda podrazumeva sledeće korake: razdvajanje proteina elektroforezom, transfer razdvojenih proteina na membranu i imunodetekciju proteina na membrani.

- a) Elektroforeza proteina na denaturišućem poliakrilamidnom gelu

Prema referenci [168]

SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) je metoda koja omogućava razdvajanje proteina prema molekularnoj težini.

Ova metoda je korišćena za razdvajanje proteina plazme pacijenata. Za njihovo razdvajanje je korišćen diskontinuirani SDS poliakrilamidni gel koji se sastoji iz gela za koncentrovanje (*stacking gel*) koji omogućava homogenizaciju uzoraka i gela za razdvajanje (*running gel*) u kome se proteini iz uzorka razdvajaju po svojoj masi.

Korišćen je gel za razdvajanje sledećeg sastava: 12% poliakrilamid; 375mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Sastav gela za koncentrovanje je bio: 6% poliakrilamid; 0,5M Tris pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% amonijumpersulfat i 0,01% TEMED. Po 20 μ L plazme pacijenata, 20 puta diluirane u sterilnoj vodi, je najpre pomešano sa 10 μ L pufera za nanošenje uzorka (50mM Tris pH 6,8; 2%SDS; 10% glicerol; 0,1% bromfenolplavo), a zatim denaturisano kuvanjem na 95°C tokom 5 min. Na gel je nanošeno po 25 μ L uzorka. Kao negativna kontrola korišćena je FII deficijenta plazma (*HemosIL*), a kao pozitivna kontrola standardna humana plazma (*Siemens*), nanošene po 25 μ L. Elektroforeza se odvijala u puferu TG (25mM Tris pH 8,8; 250mM glicin; 0,1% SDS), pod konstantnim naponom od 100V u gelu za koncentrovanje i 180V u gelu za razdvajanje. Zajedno sa uzorcima na gel je nanošen marker odgovarajućih molekulskih težina. Po završetku elektroforeze proteini razdvojeni na gelu su dalje analizirani metodom *Western blot*.

b) Prenos proteina na membranu

Proteini plazme pacijenata su nakon razdvajanja elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu prenošeni na *Immobilon-P* membranu za transfer (*Millipore*) od poliviniliden fluorida (PVDF), pomoću sistema za polusubi transfer (*Biometra*). Gel je inkubiran u katodnom puferu (25mM Tris/HCl pH 9,4; 40mM glicin; 20% metanol). Membrana je aktivirana potapanjem u metanol 1-2s, a zatim ispirana u vodi 5min i inkubirana u anodnom puferu II (25mM Tris/HCl pH 10,4; 20% metanol) 5min. Na anodnu ploču, koja je najpre nakvašena anodnim puferom I (300mM Tris/HCl pH 10,4; 20% metanol) stavljan je po 2 sloja 3 MM papira, nakvašenih anodnim puferom I. Preko ovog sloja stavljan je po jedan 3MM papir natopljen anodnim puferom II. Zatim je stavljan aktivirana membrana, a preko nje gel. Kao poslednji sloj stavljan su po tri 3MM papira natopljena u katodni pufer. Aparatura je zatvarana postavljanjem katode na složeni „sendvič“. Transfer je trajao 40min pri maksimalnoj struji od 5mA/cm² membrane.

c) Imunodetekcija proteina na membrani

Detekcija ispitivanog proteina se najčešće vrši u dve faze–korišćenjem primarnog i sekundarnog antitela. Primarno antitelo (I Ab) je specifično za određeni epitop „target“ proteina, dok sekundarno antitelo (II Ab) "prepoznaje" primarno i najčešće je specifično za epitop imonoglobulina životinje iz koje je izolovano I Ab. Sekundarno antitelo je konjugovano sa molekulom pomoću koga se može izvršiti detekcija signala (biotin, alkalna fosfataza, peroksidaza rena, itd).

Membrana je, nakon transfera, preko noći inkubirana u 5%BSA (*Bovine serum albumin*) rastvorenom u puferu PBST (80mM Na₂HPO₄; 20mM NaH₂PO₄; 100mM NaCl pH 7,5; 0,1% Tween 20), da bi se blokiralo nespecifično vezivanja antitela. Nakon toga, membrana je kratko ispirana u puferu PBST i inkubirana sa primarnim antitelom *Thrombin K-20 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology)* tokom 1h, uz blago mešanje. Ovo primarno antitelo prepoznaje središnji region humanog trombina i može se koristiti za detekciju i trombina i protrombina. Primarno antitelo je korišćeno u razblaženju 1:2000 u 2%BSA, rastvorenom u PBST puferu. Nakon inkubiranja, primarno antitelo je ispirano prvo 15min, a zatim 3x5min u PBST puferu, uz neprestano mešanje. Membrana je zatim inkubirana 1h i 15min u sekundarnom antitelu *Anti-Goat IgG, peroxidase conjugate (Sigma)*, razblaženom 1:80000 u 2%BSA, rastvorenom u PBST puferu, takođe uz mešanje. Sekundarno antitelo je ispirano 15 min i 3x5 min u PBST puferu, nakon čega je vršena detekcija hemiluminiscentnog signala. Za indukciju hemiluminiscencije je korišćen komercijalni reagens *ImobilonTM Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore)*, prema uputstvu proizvođača. Peroksidaza rena (*HRP-Horseradish Peroxidase*) katalizuje reakciju u kojoj se supstrat (Lumigen PS-3 akridan) prevodi u jedinjenje koje daje hemiluminiscentni signal sa maksimalnom apsorpcijom na talasnoj dužini od 430 nm. Membrana je inkubirana sa reagensom 5min, nakon čega je uklonjen višak reagensa. Detekcija signala vršena je na radiografskim filmovima, a trajanje ekspozicije određivano empirijski.

Na svaki gel je, zajedno sa uzorkom, nanošena pozitivna kontrola, u odnosu na koju je rađena relativna kvantifikacija količine protrombina kod pacijenata. Svi uzorci su nanošeni u triplikatu u tri nezavisna eksperimenta. Relativna kvantifikacija signala, koji odgovara količini protrombina vršena je pomoću softvera za analizu *Western blota Image Studio Lite*, proizvođača LI-COR.

3.3.3. Metode za funkcionalnu analizu genske varijante C20068T

Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi

[protokol za *EndoFree Plasmid Maxi Kit*-QIAGEN]

Za uspešnu transfekciju potrebno je da plazmid bude oslobođen bakterijskih endotoksina, pa je zbog toga izolacija željenih plazmida rađena kitom za *EndoFree* izolaciju plazmida.

Na čvrstu LB podlogu (1% tripton; 1% NaCl; 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar) sa ampicilinom su direktno iz glicerolskog štoka sejani prethodno dobijeni pCIneoΔSV40Pt+50 (wt) i pCIneoΔSV40Pt+50-20068T (20068T) transformanti [159]. Sa čvrste selektivne podloge su zasejavane pojedinačne bakterijske kolonije u 5mL LB medijuma (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) i inkubirane 8 sati na 37°C/300rpm. 100μL ove kulture je zasejavano u 100mL LB medijuma sa ampicilinom i inkubirano 12-16 sati na 37°C/300rpm. U tečne i u čvrste medijume dodavan je ampicilin u finalnoj koncentraciji od 100μg/mL. Bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem na 4700rpm/4°C/25 min. Talog je resuspendovan u 10mL pufera P1, zatim je dodavano po 10mL pufera P2, uz mešanje invertovanjem. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 5min. Nakon toga dodavano je 10mL pufera P3 i smeša invertovana 4-6 puta. Dobijeni ćelijski lizat je nanošen na *QIAfilter Maxi*, inkubiran 10min na sobnoj temperaturi, a zatim profiltriran. U filtrirani lizat je dodavano 2,5mL pufera ER, smeša promešana invertovanjem i inkubirana na ledu 30min. Za to vreme je kolona *QIAGEN-tip 500* ekvilibrisana dodavanjem 10mL pufera QBT. Na ekvilibrisanu kolonu nanošen je filtrirani lizat. DNK vezana za kolonu je dva puta ispirana sa 30mL pufera QC i eluirana puferom QN. Eluirana DNK je precipitirana dodavanjem 10,5mL izopropanola i centrifugiranjem na 8000rpm, 30min na 4°C. Nakon toga u talog je dodavano 5mL 70% etanola i smeša centrifugirana 10 min na 8000rpm/4°C. Talog je sušen na vazduhu 10-30min, rastvoren u 200μL *endotoxin-free* pufera TE i nakon merenja koncentracije plazmidna DNK je čuvana na -20°C.

Kultivacija permanentnih ćelijskih linija

Prema referenci [169]

Za gajenje permanentnih ćelijskih linija Cos-7, HepG2 i HeLa korišćen je medijum DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories*) sa L-glutaminom i glukozom u koncentraciji 4,5 g/L, obogaćen sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, *Gibco*) i antibiotikom gentamicinom u finalnoj koncentraciji 50µg/mL. Zasejavanje ćelija je vršeno brzim odmrzavanjem alikvota ćelija i resuspendovanjem u kompletnom medijumu zagrejanom na 37°C. Ćelije su gajene u odgovarajućim sterilnim sudovima u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO₂ na temperaturi od 37°C. Pasažiranje ćelija je vršeno pri konfluentnosti od približno 80%, tako što im je nakon ispiranja puferom PBS (137mM NaCl; 3,4mM KCl; 1,8mM KH₂PO₄; 10mM Na₂HPO₄ pH 7,2) dodavan rastvor tripsina i EDTA (0,05% tripsin i 0,02% EDTA). Nakon kraćeg delovanja enzima (3-5min), reakcija je zaustavljena dodavanjem medijuma sa serumom u odnosu 1:1 prema dodatoj količini tripsina. Ćelije su resuspendovane, a zatim brojane pod mikroskopom pomoću hemocitometra. Broj ćelija određivan je brojanjem dva dijagonalna polja i pomoću jednačine:

$$\text{Broj ćelija/mL} = \text{broj ćelija} / 2 \times 10^4$$

Nakon brojanja, ćelije su zasejavane u odgovarajućem razblaženju ili zamrzavane.

U cilju zamrzavanja, ćelije su prvo centrifugirane 10min na 1200rpm, nakon čega su ćelije resuspendovane u medijumu za zamrzavanje (10% dimetilsulfoksid (DMSO) u FBS-u). DMSO ima krioprotektivnu ulogu, jer obezbeđuje vezivanje vode i time smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Suspenzija ćelija je razdeljivana u kriotube i postupno zamrzavana: -20°C (4-8h), -80°C (16-24h), nakon čega su ćelije čuvane u tečnom azotu (-198°C).

Transfekcija cos-7 ćelijske linije plazmidnom DNK

[protokol za *PolyFect Transfection Reagent-QIAGEN*]

Za transfekciju permanentne ćelijske linije cos-7 korišćen je reagens *Polyfect (Qiagen)*. *Polyfect* je molekul sferične arhitekture sa "granama" koje se radijalno pružaju iz centralnog dela sfere i završavaju naelektrisanim aminogrupama za koji se vezuje DNK. Ovako nastali, pozitivno naelektrisani kompleks se vezuje za negativno

naelektrisane receptore na membrani ćelije, čime se omogućava ulazak plazmidne DNK u ćeliju.

Za eksperimente transfekcije 4×10^5 cos-7 ćelija je zasejavano u T-25 flask i gajeno pod standardnim uslovima 24h. Odgovarajući plazmidi, koji su izolovani po protokolu za *EndoFree* izolaciju, su najpre podvrgnuti digestiji restrikcionim enzimom *NotI* u trajanju od 16h. Linearizacija plazmida je vršena da bi se omogućila lakša integracija plazmidne DNK u genom ćelija. Linearizovani plazmidi su prečišćavani na koloni (*QIAquick PCR Purification kit*, *Qiagen*) i rastvarani u puferu TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0). 2,5 μ g plazmidne DNK je rastvoreno u 150 μ L medijuma DMEM (bez seruma i antibiotika, jer oni ometaju stvaranje kompleksa). Po dodavanju 15 μ L *PolyFect* reagensa i vorteksovanja, smeša je inkubirana 5-10min na sobnoj temperaturi kako bi se oformili kompleksi između *Polyfect*-a i plazmidne DNK. Zatim su kompleksi pomešani sa 1mL kompletnog medijuma i celokupna smeša je prebacivana u flask sa ćelijama, kojima je pre toga dodato 3mL svežeg kompletnog medijuma. Ćelije su zatim gajene pod standardnim uslovima 48h.

Kultivacija stabilnih transfektanata cos-7 ćelija

Četrdeset osam sati nakon transfekcije odgovarajućim plazmidnim vektorom, ćelije su pasažirane, prebacivane u novi flask sud sa 10 puta većom zapreminom (T-175) i gajene u standardnom kompletnom medijumu kome je dodavan antibiotik G418 u finalnoj koncentraciji 1mg/mL. Paralelno sa transfekovanim ćelijama, pod istim uslovima su gajene i kontrolne ćelije, kojima je u procesu transfekcije dodat samo medijum, bez plazmidne DNK. Ćelijama je po potrebi menjan medijum ili su pasažirane. Nakon prve nedelje, pod ovim uslovima gajenja, kontrolne ćelije nisu preživljavale, dok su transfekovane ćelije formirale ostrvca deljenjem ćelija koje su rezistentne na antibiotik. Ćelije su gajene 4-5 nedelja u prisustvu antibiotika, do postizanja fluktuentnog rasta, a zatim zamrzavane i čuvane u tečnom azotu (-198°C).

Kultivacija stabilnih transfektanata poreklom od pojedinačnih ćelija

Cos-7 ćelije stabilno transfekovane odgovarajućim plazmidnim vektorom, sejane su brzim odmrzavanjem i resuspendovanjem u kompletnom medijumu sa dodatkom 1mg/mL antibiotika G418. Zarad gajenja ćelijskih klonova, koji su poreklom od

pojedinačnih stabilno transfekovanih ćelija, 3×10^4 ćelija sejano je u Petri šolje 150/22mm sa 25mL medijum. Na taj način je omogućeno stvaranje kolonija oko izdvojenih, pojedinačnih ćelija. Ćelije su gajene dok kolonije nisu postale vidljive okom (oko mesec dana). Svaka ćelijska kolonija je prebacivana u bunar mikrotitar ploče sa 96 bunara na sledeći način: u nastavak je sipano 10 μ L rastvora tripsina, tripsin je ispuštan i usisavan direktno nad odabranom ćelijskom kolonijom, uz blago grebanje, čime se kolonija odvaja sa podloge i prebacuje direktno u bunar mikrotitar ploče u koji je prethodno sipano 200 μ L kompletnog medijuma. Ćelije su u mikrotitar pločama gajene do dostizanja visoke konfluentnosti, a nakon toga su sukcesivno subkultivisane u sudove sve veće površine, do finalne kultivacije u T-175 flasku. Nakon dostizanja visoke konfluentnosti, deo ćelija je zamrzavan, a $\sim 10^6$ ćelija izdvojeno za izolaciju DNK pomoću *QIAampDNAMiniKit* (QIAGEN), prema uputstvu proizvođača. Za merenje koncentracije DNK je korišćen spektrofotometar *NanoVue* (GE Healthcare, Life sciences), po uputstvu za rad na aparatu.

Određivanje broja kopija inserata u ćelijskim klonovima

Prema referenci [170]

a) Esej qfPCR-kapilarna elektroforeza

Za potrebe određivanja broja kopija inserata u ćelijskim klonovima standardizovan je esej baziran na relativnoj kvantifikaciji fluorescetno obeleženih PCR produkata (qfPCR) detektovanih pomoću kapilarne elektroforeze. U ovom eseju, fragment ciljnog gena je koamplifikovan sa internom genomskom kontrolom u istoj tubi, da bi svi faktori koji utiču na količinu PCR produkta podjednako uticali na ciljni fragment i internu kontrolu. Za umnožavanje ciljnog protrombinskog fragmenta korišćeni su prajmeri dizajnirani tako da se jedan nalazi na egzon-egzon spoju (uključuju delove egzona 13 i 14 protrombinskog gena), čime se umnožavaju samo regioni protrombinske cDNK sa plazmidnih inserata, dok umnožavanje sa genomske DNK nije moguće. Kao kontrola, korišćen je fragment gena za eukariotsku 18S rRNK, koji se može koristiti za sve sisarske ćelijske linije. Prajmerski parovi su dizajnirani tako da imaju iste temperature topljenja, što olakšava bipleks PCR reakciju. Po jedan prajmer

iz svakog prajmerskog para je obeležen fluorescentnom bojom FAM, odnosno NED. Dužine PCR produkata date su u Tabeli 2.

Tabela 2. Dužine PCR produkata ciljnog dela protrombinskog gena i endogene kontrole

Prajmerski parovi	Dužina PCR produkta (bp)
F13/14 FAM Pt2	280
18sRNKeurF 18sRNKeurR	99

Ciljni fragment protrombinskog gena i interna kontrola su umnožavani u istoj mikrotubi. Sastav PCR smeše, finalne zapremine 25 μ L, bio je sledeći.

200 ng DNK	
10xKapa Taq pufer B	2,5 μ L
2mM dNTPovi	2,5 μ L
10pmol/ μ L F13/14 FAM	0,5 μ L
10pmol/ μ L Pt2	0,5 μ L
1pmol/ μ L 18sRNKeurF	1 μ L
1pmol/ μ L 18sRNKeurR	1 μ L
5U/ μ L Kapa Taq polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

94°/5min

(94°/1min, 62°/1min, 70°C)x 37 ciklusa

72°/10min

Svaki uzorak je umnožavan u triplikatu, u tri nezavisne PCR reakcije.

Po 1 μ L PCR produkta je rastvoren u 20 μ L HiDi formamida sa 0,25 μ L *GeneScanTM-500 LIZTM* standarda (*Applied Biosystems*) i celokupna smeša je nanošena na aparat za automatsko sekvenciranje *3130 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). Rezultati su analizirani korišćenjem *Gene Mapper 4.0* softvera. Detekcija PCR produkata vršena je pomoću kapilarne elektroforeze, merenjem relativne fluorescencije PCR produkata odgovarajućih dužina. Izmerena visina pika srazmerna je količini PCR produkta. Normalizacija rezultata vršena je tako što je visina pika ciljnog fragmenta deljena visinom pika interne kontrole. Tako dobijene vrednosti za sve klonove su međusobno poređene, da bi se identifikovali klonovi koji imaju isti broj inserata.

b) Verifikacija eseja qfPCR-kapilarna elektroforeza metodom *real-time* PCR

Prema referencama [171] i [172]

Metoda *real-time* PCRa je bazirana na reakciji lančanog umnožavanja polimerazom (PCR), pri čemu je zahvaljujući reagensima koji se koriste i optičkim karakteristikama aparata omogućeno praćenje kinetike ove reakcije. Kvantifikacija količine produkta koji je nastao PCR reakcijom omogućava kvantifikaciju količine početne matrice (DNK, cDNK, RNK) sa koje se vrši umnožavanje. Obzirom da se detekcija količine nastalog produkta vrši tokom odvijanja reakcije, *real-time* PCR metoda obezbeđuje širok linearni dinamički opseg, visoku senzitivnost i kvantitativnost. Dva osnovna pristupa za detekciju su: 1) korišćenje reagensa (fluorescentne boje) koji emituje fluorescentni signal nakon vezivanja za molekul dvolančane DNK. Signal koji se dobija je srazmeran količini dvolančanog produkta PCR reakcije i nije zavisao od primarne sekvence umnoženog DNK fragmenta. Najčešće korišćeni reagens iz ove grupe je *SYBR-Green*, koji se interkalira između baznih parova i fluorescira onda kada je vezan za dvolančanu DNK, 2) korišćenjem oligonukleotidnih proba koje su obeležene fluorescentnom bojom, a komplementarne su delu sekvence koja se umnožava. Na taj način se signal detektuje samo pri specifičnom umnožavanju. Najčešće se koriste *Taq Man* obeležene probe. U kvantifikaciji (DNK, RNK, cDNK) metodom *real-time* PCRa postoje dva pristupa: 1) apsolutna kvantifikacija, gde se fluorescentni signal poredi sa signalima dobijenim od seta standarda poznatih koncentracija i 2) relativna kvantifikacija, gde se rezultat iskazuje u odnosu na vrednosti dobijene za uzorak odabran kao kalibrator. Uporedo sa umnožavanjem sa sekvence ciljnog gena vrši se i

umnožavanje referentnog gena (endogene kontrole). To omogućava normalizaciju rezultata dobijenih za ciljni gen.

Potvrda rezultata dobijenih novom metodom za određivanje broja kopija inserata-qfPCR-kapilarnom elektroforezom, vršena je za odabrane klonove pomoću *real-time* PCR, korišćenjem *SYBR-Green* pristupa na 7500 *real-time* PCR sistemu (*Applied Biosystems*). Kao ciljni gen korišćen je isti fragment protrombinskog gena koji je korišćen u eseju qfPCR-kapilarna elektroforeza (prajmeri dati u Tabeli 1), dok je kao referentni gen korišćen fragment gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), umnožavan prajmerima M1: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' i M2: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'. Sastav reakcione smeše u finalnoj zapremini od 10 μ L bio je sledeći:

150ng DNK	
2xBrilliant II SYBR Green QPCR Master Mix	5 μ L
10pmol/ μ L F13/14	0,5 μ L
10pmol/ μ L Pt2	0,5 μ L
10pmol/ μ L M1	0,5 μ L
10pmol/ μ L M2	0,5 μ L

Temperaturni profil *real-time* PCR reakcije bio je sledeći:

50°C/2min

95°C/10min

(95°C/15s, 60°C/1min)x 40 ciklusa

Za oba prajmerska para je izvršena analiza krive topljenja, korišćenjem *ABI PRISM 7500 softvera* (*Applied BioSystems*), da bi se isključila mogućnost nespecifičnog umnožavanja. Da bi se procenila efikasnost umnožavanja, za oba para prajmera konstruisane su standardne krive korišćenjem serijskih razblaženja DNK matrice izolovane iz *cos-7* ćelija transfekovanih pCIneo Δ SV40Pt+50 plazmidom. Efikasnost *real-time* PCR reakcije je izračunata korišćenjem formule $E=10^{(-1/S)}$ (E-efikasnost reakcije, S-nagib standardne krive). Za izračunavanje srednjih C_t vrednosti (engl. *threshold cycle value*) i standardnih devijacija (SD) korišćen je makro konstruisan u

programu *Microsoft Office Excel*, koji na osnovu dobijenih podataka o efikasnosti reakcija vrši korekciju rezultata. Količina amplifikovanog ciljnog gena normalizovana je u odnosu na referentni gen. Svaki uzorak je umnožavan u tri nezavisne PCR reakcije i na 7500 *real-time* PCR aparat nanošen u triplikatu.

Izolacija celokupne RNK iz ćelija u kulturi

[protokol za *RNeasy Plus Mini Kit-QIAGEN*]

Po 2×10^5 odabranih klonova stabilno transfekovanih cos-7 ćelija je zasejavano u 1mL standardnog kompletnog medijuma uz dodatak 1mg/mL antibiotika G418. Ćelije su gajene na 5%CO₂/37°C/ 48h, a zatim su lizirane dodavanjem 350μL pufera RLT Plus. Lizat je homogenizovan na *QIAshredder* koloni, centrifugiranjem 2min na 13000rpm. Da bi se izbegla DNK kontaminacija, homogenizovani lizat je nanošen na *gDNA Eliminator* kolonu i centrifugiran 30s na 13000rpm. Nakon toga je u eluat dodavano po 350μL 70% etanola i celokupna zapremina prebacivana na *RNeasy* kolonu za koju se vezuje RNK. Ova kolona je centrifugirana 15s na 13000rpm, a zatim je dodavano 700μL pufera RW1 i kolona ponovo centrifugirana 15s na 13000rpm. U narednom koraku je RNK ispirana dva puta sa po 500μL pufera RPE. Kolona je centrifugirana 2min na 13000rpm, a nakon toga još jednom 1min, kako bi se uklonili svi tragovi pufera. RNK je sa kolone eluirana sa 50μL sterilne vode (*Rnase-free* voda), centrifugiranjem 1 min na 13000rpm. Prinos i kvalitet izolata RNK je proveravan horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu i merenjem koncentracije na spektrofotometru *NanoVue*. Izolati RNK su čuvani na -20°C.

Prečišćavanje RNK

[protokol za *DNA-free Kit-AMBION*]

Za analizu RNK metodom *real-time* PCRa, veoma je važno da izolovana RNK nije kontaminirana sa DNK. Iz tog razloga su RNK izolati prečišćavani *DNA-free kitom* (*Ambion*). U izolate je dodavan *DNase* pufer u odgovarajućoj zapremini i 1μL enzima *rDNaseI*. Smeše su inkubirane 20-30min na 37°C. Zatim je enzim inaktiviran dodavanjem 0,1 volumena *DNase I* inaktivirajućeg agensa. Nakon 2min na sobnoj temperaturi, smeše su centrifugirane 1,5min na 13000rpm. Prečišćena RNK, koja se nalazi u supernatantu, je prebacivana u novu epruvetu.

Sinteza cDNK

[protokol za *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit- Applied Biosystems*]

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit sadrži reverznu transkriptazu i nasumične (engl. *random*) prajmere dizajnirane tako da omogućavaju prevođenje celokupne iRNK u cDNK. Ovako dobijena cDNK se može dalje koristiti za kvantifikaciju metodom *real-time* PCRa.

Kao matrica za reakcije reverzne transkripcije korišćeni su uzorci RNK izolovani iz odabranih klonova stabilno transfekovanih *cos-7* ćelija.

Reakcije reverzne transkripcije, rađene u zapremini od 20 μ L, bile su sledećeg sastava:

10xRT Buffer	2 μ L
25xdNTP Mix	0,8 μ L
10x <i>random</i> prajmeri	2 μ L
MultiScribe reverzna transkriptaza	1 μ L
RNK	1 μ g

Temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije:

25°C/25min

37°C/120min

85°C/5s

4°C/ ∞

Uzorci cDNK su čuvani na -20°C.

Kvantifikacija iRNK metodom real-time PCR

[protokol za *TaqMan Gene Expression Assays-Applied Biosystems*]

Reakcije *real-time* PCRa rađene su na aparatu *7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*. Za praćenje uticaja prisustva genske varijante C20068T na ekspresiju gena za protrombin u odabranim ćelijskim klonovima korišćen je *TaqMan* pristup uz metod relativne kvantifikacije. Za detekciju ciljnog molekula-protrombina korišćen je *TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)*. Kao referentni gen, odnosno endogena kontrola, izabran je gen za neomicin-N-transferazu, koji omogućava rezistenciju na

antibiotik G418. On se eksprimira u svim transfekovanim ćelijama pod istim uslovima, jer njegova ekspresija ne zavisi od prisustva genske varijante C20068T. Takođe, količina raspoložive iRNK za neomicin-N-transferazu je direktno srazmerna broju insertovanih kopija konstrukta u genom ćelija, čime je ova endogena kontrola u isto vreme i kontrola uspešnosti transfekcije, jer se u vektoru nalazi u odnosu 1:1 sa protrombinskom iRNK, čija se ekspresija prati.

Real-time PCR je rađen je u multipleks reakciji, ukupne zapremine 10 μ L sledećeg sastava:

2x Univerzalni PCR MasterMix	5 μ L
20x TaqMan Gene Expression Assays (900nM prajmeri i 250nM FAM TaqMan MGB proba)	0,5 μ L
18pmol/ μ L RT418a prajmer	0,5 μ L
18pmol/ μ L RT418b prajmer	0,5 μ L
250nM G418 proba	0,5 μ L
cDNK	1,5 μ L

Temperaturni profil reakcije bio je sledeći:

50°C/2 min

95°C/10 min

(95°C/15s, 60°C/1min)x 40 ciklusa.

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je *7500 System Software (Applied Biosystems)*.

In silico predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068

Nukleotidna zamena C>T nalazi se na poziciji 20068 u poslednjem egzonu protrombinskog gena, koji je veoma značajan u procesima obrade 3'kraja, iskrajanja introna, poliadenilacije itd. Da bi se usmerila dalja funkcionalna analiza uticaja ove genske varijante na ekspresiju protrombina, urađene su *in silico* analize koje su podrazumevale proveru uticaja prisustva C20068T genske varijante na upotrebu kodona, sekundarnu strukturu iRNK i moguće interakcije sa miRNK. U svim

pretragama na izabranim serverima korišćena je sekvenca poslednjeg egzona protrombinskog gena dužine 144 bp, u okviru koga se nalazi mesto 20068 na kome se dešava C>T bazna zamena.

Upotreba kodona (engl. *codon usage*) je procenjena pomoću *GenScript* servera i alata *Rare Codon Analysis*. Uticaj odabira određenog kodona meri se paramtrom CAI (engl. *Codon Adaptation Index*) koji predstavlja odstupanje ciljne protein kodirajuće sekvence gena u odnosu na sekvence seta referentnih gena. CAI vrednost je u direktnoj korelaciji sa nivoom ekspresije datog gena.

Predikcija sekundarne strukture urađena je pomoću dva softverska paketa-*RNAfold* i *Mfold*. Osnovna karakteristika na osnovu koje rade oba servera za predikciju sekundarne strukture je minimalna slobodna energija sparivanja (ΔG). Ovaj metod kreće od pretpostavke da je nativna sekundarna struktura ona koja ima najmanju vrednost slobodne energije, što je čini termodinamički najstabilnijom. Algoritmi za izračunavanje minimalne vrednosti slobodne energije date sekundarne strukture uzimaju u obzir komplementarno sparivanje baza unutar linearne sekvence, kao i potencijalno nekomplementarno sparivanje baza i nekanonske sekundarne strukture poput pseudočvorova.

Predikcija uticaja prisustva C>T bazne zamene na mogućnost vezivanja mikroRNK procenjena je pomoću servera *MiRBase*.

Određivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama transfekovanim wt i C20068T konstruktima

Prema referenci [173]

Jedan od eksperimentalnih pristupa za određivanje stabilnosti iRNK zasniva se na dodavanju inhibitora transkripcije, čime se zaustavlja sinteza iRNK, a zatim se prati kinetika degradovanja ciljne iRNK. Uzorci RNK se sakupljaju u određenim vremenskim tačkama, nakon čega se određuje količina preostale ciljne iRNK u svakoj od njih. Količina preostale iRNK se može određivati korišćenjem više različitih metoda, ali se najčešće koriste *Northern blot* analiza i *real-time PCR*.

Kao inhibitor transkripcije u ovoj studiji korišćen je aktinomicin D, polipeptidni antibiotik koji se vezuje za DNK na mestu transkripcionog inicijacionog kompleksa i sprečava elongaciju transkripcije od strane RNK polimeraze.

Za eksperimente određivanja stabilnosti iRNK za protrombin, korišćene su cos-7 ćelije stabilno transfekovane wt i 20068T plazmidnim konstruktima. Ćelije su podignute i gajene u odgovarajućem kompletnom medijumu do konfluentnosti. Nakon dva ciklusa pasažiranja, po 2×10^5 ćelija je sejano u 6-well plejtove i gajeno tokom 24h. Nakon 24h ćelije su tretirane aktinomicinom D, rastvorenim u DMSO, u finalnoj koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$. Da bi se ispitaio mogući efekat DMSOa na količinu ciljne iRNK, pored netretiranih ćelija, kao kontrola gajene su i ćelije tretirane $1 \mu\text{L/mL}$ DMSOom. U određenim vremenskim intervalima (6, 18 i 24h) ćelije su sakupljane i iz njih je izolovana RNK prema goreopisanom protokolu. Izolovana RNK je korišćena kao matrica za sintezu cDNK i kvantifikaciju iRNK pomoću *real-time* PCRa, prema goreopisanim protokolima. U eksperimentu su korišćeni ćelije stabilno transfekovane wt i 20068T plazmidnim konstruktima, dobijene iz tri nezavisne transfekcije. Za sve od njih, eksperiment je rađen u triplikatu za svaki vremenski interval, za ćelije tretirane aktinomicinom D, tretirane DMSOom i netretirane ćelije.

Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK izolovane iz cos-7 ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima modifikovanom 3'RACE metodom

Prema referencama [174] i [175]

Metod brzog umnožavanja krajeva cDNK (engl. *Rapid Amplification of cDNA Ends*-RACE) se koristi za utvrđivanje celokupne sekvence 5'/3' krajeva RNK transkripata: 5'RACE ili 3'RACE. U 3'RACE metodi koristi se prajmer specifičan za poli(A) rep. U prvom koraku, iRNK se prevodi u cDNK pomoću reverzne transkriptaze i oligo-dT prajmera. U drugom koraku se koristi gen-specifični prajmer koji se vezuje za egzonsku sekvencu i adapterski prajmer koji se vezuje za region poli(A) repa. Na ovaj način je sekvenca 3'kraja ciljne iRNK ograničena egzonskim i poli(A) prajmerom, što omogućava njeno umnožavanje u PCR reakciji i sekvenciranje.

Da bi se utvrdilo da li prisustvo 20068T varijante utiče na izbor mesta iskrajanja primarnog transkripta i time dovodi do stvaranja iRNK sa različitim dužinama 3'kraja primenjena je metoda modifikovanog 3'RACE. Kao početna matrica u ovoj metodi korišćena je cDNK iz cos-7 ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima. U prvoj PCR reakciji korišćen je jedan prajmer, specifičan za egzon-egzon spoj protrombinske cDNK. Dobijeni produkt iz prve PCR reakcije je korišćen kao matrica za

umnožavanje u drugoj PCR reakciji korišćenjem prajmera iz poslednjeg egzona koji je fluorescentno obeležen i poli(T) prajmera. Fluorescentno obeleženi prajmer omogućava detekciju umnoženih transkripata kapilarnom elektroforezom i fragment analizu.

Iz cos-7 ćelija, stabilno transfekovanih wt i 20068T plazmidnim konstruktima, izolovana je ukupna RNK i sintetisana cDNK, prema goreopisanim protokolima. Umožavanje 3'krajeva urađeno je u dve sukcesivne PCR reakcije. U prvoj PCR reakciji, korišćen je F13/14 prajmer koji se nalazi na egzon-egzon spoju između egzona 13 i 14 protrombinskog gena.

Sastav PCR smeše, finalne zapremine 25 μ L, bio je sledeći:

cDNK	1 μ L
10x PCR pufer	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTPs	2,5 μ L
10 pmol/ μ L F13/14	2 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

95°C/10min

(95°C/1min, 64°C/1min, 72°C/1min)x 35 ciklusa

72°C/10min

Dobijeni PCR produkt korišćen je kao matrica za umnožavanje u narednoj PCR reakciji. Sastav PCR smeše, finalne zapremine 25 μ L, bio je sledeći:

PCR produkt	1 μ L
10x PCR pufer	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTPs	2,5 μ L
10 pmol/ μ L FAM-Pt1	0,5 μ L
10 pmol/ μ L Poly(T)	0,5 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

95°C/10min

(95°C/30s, 64°C/30, 72°C/30)x 35 ciklusa

72°C/10min

Eksperiment je rađen u tri nezavisna PCR umnožavanja, iz cDNK dobijene izolacijom RNK iz tri nezavisne stabilne transfekcije.

PCR produkti dobijeni u drugoj reakciji su rastvoreni u 20µL *HiDi* formamida sa 0,25µL *GeneScanTM-500 LIZTM* standarda (*AppliedBiosystems*) i nanošeni na kapilarnu elektroforezu. Analiza dužina dobijenih fragmenata rađena je u softveru *Gene Mapper 4.0*.

3.3.3.1. Metode za ispitivanje DNK-protein interakcija

Izolacija jedarnih proteina iz HepG2 i HeLa ćelija

Prema referenci [176]

HepG2 i HeLa ćelije su posle ispiranja u PBS puferu mehanički odvajane od podloge i centrifugirane 5min na 1300rpm. Nakon taloženja centrifugiranjem ćelije su resuspendovane u 2 volumena pufera A (0,25M saharoza; 10mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5mM DTT; 0,5mM PMSF; 1µg/mL leupeptina; 1µg/mL pepstatina i 1µg/mL antipaina) i inkubirane 10 minuta na ledu. Ćelije su lizirane homogenizacijom u staklenom homogenizeru uz dodavanje NP-40 (0,05%). Jedra su staložena centrifugiranjem (2000rpm, 10 minuta, +4°C), a zatim resuspendovana i homogenizovana u puferu C (20mM HEPES pH 7,9; 25% glicerol; 0,42M NaCl; 1,5mM MgCl₂; 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT; 0,5mM PMSF; 1µg/mL leupeptina; 1µg/mL pepstatina i 1µg/mL antipaina). Nakon mešanja 30min na +4°C suspenzija proteina je centrifugirana (20000rpm, 30min, +4°C). Supernatant je dijaliziran u puferu D (20mM HEPES pH 7,9; 20% glicerol; 0,1M KCl; 0,2mM EDTA; 0,5mM DTT I 0,5mM PMSF) 4-5h na +4°C. Nakon dijalize rastvor je centrifugiran (20000rpm, 20min, +4°C). Dobijeni supernatant koji sadrži jedarne proteine je alikvotiran i čuvan u tečnom azotu. Koncentracija izolovanih jedarnih proteina iz HepG2 i HeLa ćelija određivana je pomoću *Quick Start Bradford Protein Assay* reagensa (*BioRad*) prema uputstvu proizvođača.

Esej promenjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)

Prema referenci [177]

EMSA (engl. *electrophoretic mobility shift assay*) predstavlja jednu od metoda za ispitivanje DNK-protein ili RNK-protein interakcija. Ovom metodom moguće je odrediti da li se neki od proteina iz odabranog proteinskog ekstrakta vezuje za određeni DNK ili RNK region. Esej se zasniva na činjenici da DNK/RNK-protein kompleks migrira drugačije od slobodnih DNK/RNK fragmenata u nenedenurišućem poliakrilamidnom gelu. Radioaktivno ili fluorescentno obeležen ciljani DNK/RNK region (DNK/RNK proba) se inkubira sa željenom proteinskom frakcijom (jedarna, citoplazmatska, itd.), nakon čega se vrši razdvajanje fragmenata na poliakrilamidnom gelu pod nenedenurišućim uslovima. Posle elektroforeze vrši se detekcija signala. Ukoliko postoji interakcija ponuđenih proteina sa DNK/RNK probom, signal se detektuje na drugačijoj poziciji u gelu u odnosu na signal slobodne, nevezane probe, jer proba različito putuje kada su za nju vezani proteini.

U EMSA reakcijama korišćene su wt i 20068T mutirana proba u dužini od 82 bp, dobijene PCR umnožavanjem dela zadnjeg egzona gena za protrombin u regionu oko mesta 20068. Probe su umnožavane u PCR reakciji, u finalnoj zapremini 100 μ L, a kao matrice za umnožavanje korišćeni su izolovani plazmidi pCIneo Δ SV40Pt+50bp i pCIneo Δ SV40Pt+50bp-20068T. Sastav reakcione smeše bio je sledeći:

Plazmidna DNK (30 ng/ μ L)	1 μ L
10x PCR pufer	10 μ L
25mM MgCl ₂	10 μ L
2mM dNTPs	10 μ L
10 pmol/ μ L FIIpsm	1 μ L
10 pmol/ μ L Pt2	1 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,4 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

95°C/5min

(94°C/30s, 56°C/30s, 72°C/30s)x 39 ciklusa

72°C/10min

Za proveru specifičnosti formiranih kompleksa, kao nespecifična proba korišćen je PCR produkt u dužini od 99 bp, dobijen umnožavanjem dela promotora za PAI-1 gen. Sastav PCR smeše, finalne zapremine 25 μ L, bio je sledeći:

DNK (5-10ng/ μ L)	3 μ L
10x PCR pufer	2,5 μ L
25mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTPs	2,5 μ L
10 pmol/ μ L PAI-1a	0,5 μ L
10 pmol/ μ L PAI-1b	0,5 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,4 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

94°C/5 min

(94°C/30 sec, 61°C/30 sec, 72°C/30 sec)x 33 ciklusa

72°C/10min

Umnožene probe su precipitirane preko noći, dodavanjem glikogena i 3M Na-acetata (pH5,2) u 95% etanolu. Nakon uparavanja do suvog, probe su rastvorene u 300 μ L sterilne ddH₂O i prečišćene korišćenjem *PureLink PCR Purification* kita (*Invitrogen*), prema uputstvu proizvođača. U uzorak je dodavano 4 volumena B2 pufera za vezivanje. Uzorak je nanošen na *PureLink Spin* kolonu i centrifugiran na 13000rpm/1min. Zatim je u kolonu dodavano 650 μ L pufera za pranje, nakon čega je kolona centrifugirana na 13000rpm/1min. Kolona je dodatno centrifugirana na maksimalnoj brzini tokom 3min, da bi se uklonili tragovi pufera za pranje. Kolona je zatim prebačena u sterilnu tubu od 1,5mL, u nju je dodato 50 μ L sterilne voda, nakon čega je inkubirana 1min na sobnoj temperaturi i centrifugirana na 13000rpm/2min. Kvalitet probe nakon prečišćavanja proveren je elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu, a koncentracije su izmerene korišćenjem aparata *NanoVue*, prema uputstvu za rad na aparatu.

Pre radioaktivnog obeležavanja, uzorci probe su defosforilisani korišćenjem SAP enzima (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, USB), prema uputstvu proizvođača.

Deproteinizacija uzoraka vršena je dodavanjem smeše fenol/hlorofom u odnosu 1:1, nakon čega je vršeno centrifugiranje na 13000rpm tokom 3min. Gornja faza je prebačena u novu mikrotubu, nakon čega je ponovo urađena precipitacija etanolom.

Reakcija obeležavanja je sadržala 1µg oligonukleotidnih proba, 5µL PNK pufera (USB), 1,6µL T4 polinukleotid kinaze (3U/µL), 2µL [γ -³²P]dATP (6000Ci/mmol) uz dodatak dH₂O do 50µL. Nakon 30min inkubacije na 37°C, reakcija je zaustavljena inkubacijom tokom 10min na 65°C. Neugrađeni radioaktivni nukleotidi su uklanjani iz reakcije metodom molekuskog sejanja kroz G-25 sefadeks kolonice (*GE Healthcare*). Kvalitet obeležavanja oligonukleotidnih proba proveren je merenjem na scintilacionom brojaču (LKB). Svi uzorci su nakon merenja rastvoreni do 2500cpm/µL.

EMSA reakcije su rađene sa 12µg jedarnih proteina, izolovanih iz HepG2 ili HeLa ćelijskih linija, 4µL obeleženih proba, u puferu za vezivanje (5mM Tris-HCl pH 7,9; 10mM KCl; 1,25mM MgCl₂; 2% glicerol; 0,1mM EDTA pH 8,0; 0,1mM DTT i 1µg poly(dIdC)) u finalnom volumenu od 34µL, tokom 60 minuta na 37°C. Za kompeticiju (hlađenje), korišćene su neobeležene probe u molarnom višku od 100 puta. Uparedo su rađene reakcije specifičnog hlađenja i nespecifičnog hlađenja (neobeleženom PAI-1 probom).

Razdvajanje fragmenata vršeno je elektroforezom na 5% poliakrilamidnom gelu u TBE puferu, na +4°C, tokom 1h 15min (180V, ~20mA). Signali su detektovani eksponiranjem na radiografskim filmovima. Ekspozicija je trajala od jedne nedelje do mesec dana.

Masena spektrometrija na Orbitrap LTQ XL

Prema referenci [178]

Masena spektrometrija je analitička tehnika koja omogućava dobijanje spektara masa atoma i molekula prisutnih u uzorku. Tehnika podrazumeva da se komponente uzorka degraduju u naelektrisane fragmente, nakon čega se vrši njihovo razdvajanje shodno odnosu masa/naelektrisanje (m/z odnos). Razdvajanje fragmenata se vrši njihovim ubrzavanjem u električnom ili magnetnom polju, pri čemu se fragmenti sa istim m/z odnosom detektuju istovremeno. Jedna od primena masene spektrometrije je u identifikaciji proteina u datom uzorku. Proteini se prvo digeriraju na peptidne fragmente pomoću tripsina, nakon čega se vrši njihova masena spektrometrija, čime se dobija

maseni spektar, karakterističan za svaki protein. Dobijeni spektar se poredi sa deponovanim spektrima u bazama podataka (engl. *peptide mass fingerprinting*), čime se vrši identifikacija proteina.

Ovaj pristup korišćen je da bi se identifikovali proteini prisutni u formiranim kompleksima u EMSA esejima. Zarad identifikacije proteina koji formiraju kompleks sa ponuđenim wt i 20068T probama, delovi poliakrilamidnog gela u regionu identifikovanog kompleksa su isecani u sterilnim uslovima (da bi se sprečila kontaminacija uzorka) i čuvani na -80°C do dalje analize. Položaj DNK-protein kompleksa na gelu određivan je na osnovu položaja nevezane probe i markera dužine. Kao kontrole, isecani su delovi gela sa položaja koji odgovaraju pozicijama kompleksa, a na koje su nanošeni uzorci samo proteina i samo probe. Pre analize na masenom spektrometru, vršena je *in gel* digestija formiranih kompleksa. Svrha *in gel* digestije je *in situ* enzimaska hidroliza proteina prisutnih u uzorku, nakon čega se nastali peptidi pasivnom difuzijom ekstrahuju iz samog gela. Digestija u gelu uključuje nekoliko koraka pranja samog gela, čime se vrši oslobađanje od potencijalnih kontaminanata. Nakon toga se proteini prisutni u uzorku tretiraju pomoću ditionitrola (DTT), redukujućeg agensa koji raskida disulfidne veze u proteinu i jodoacetamida, koji vrši alkilovanje cisteina i sprečava ponovno formiranje disulfidnih mostova. Digestija proteina se vrši sekvencno-specifičnim proteolitičkim enzimom (tripsin), koji generiše peptide koji pasivno difunduju iz gela. Nastali peptidi se analiziraju masenom spektrometrijom.

Za pranje uzoraka i digestiju u gelu koriste se sledeće komponente, rastvorene u *MilliQ* vodi:

50mM i 25mM NH_4HCO_3

10mM DTT

55mM jodoacetamid

Acetonitril

25mM NH_4HCO_3 /50% acetonitril

Apsolutni etanol

15ng/ μL Tripsin (svinjski)

Isečeni region gela u kome se nalazi kompleks je najpre usitnjen sterilnim skalpelom do veličine 2-3mm². Usitnjeni gel je ispiran tokom jednog sata vorteksovanjem na 600rpm sa 100μL 25mM NH₄HCO₃. Supernatant je uklonjen, a gel ispiran 45 minuta sa 100μL smeše 25mM NH₄HCO₃/acetonitril u odnosu 1:1, nakon čega je supernatant ponovo uklonjen. Zatim je dodato 100μL DTT-a i smeša je inkubirana u mraku, na 57°C tokom jednog sata. Smeša je kratko centrifugirana, supernatant je uklonjen i u tube dodato 100μL acetonitrila, nakon čega je smeša vorteksovana 6 minuta. Supernatant je uklonjen, u smešu dodato 100μL jodacetoamida, nakon čega je smeša inkubirana na sobnoj temperaturi, u mraku, tokom 45 minuta, a na kraju je supernatant uklonjen. U drugoj seriji pranja, u tube je dodato 100μL 25mM NH₄HCO₃, a smeša je vorteksovana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a u tube je dodato 100μL 25mM NH₄HCO₃/50% acetonitril u odnosu 1:1, nakon čega je supernatant ponovo uklonjen. U tube je dodato 100μL 100% acetonitrila, smeša je vorteksovana 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant uklonjen.

Digestija uzoraka urađena je dodavanjem 10μL tripsina (15ng/μL) i inkubacijom preko noći na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,1% mravlje kiseline, a digestije su čuvane na -20°C do dalje analize.

Analiza digeriranih uzoraka urađena je tačnom hromatografijom kuplovanom sa masenom spektrometrijom na aparatu *Easy NanoLC-Orbitrap LTQ XL (Thermo Scientific)*.

Separacija peptidnih fragmenata urađena je tačnom hromatografijom na *EasySpray* koloni (i.d. 75μm, veličina čestica 1,8μm, dužina kolone 15cm) kuplovanom sa čeličnim emiterom (15μm) sa *EasyLC front-end* uređajem. Protok rastvarača bio je 300nL/min, korišćeni su sledeći gradijenti: A-0,1% HCOOH u H₂O i B-0,1% HCOOH u 98% acetonitrilu. Vremenski profil tečne hromatografije bio je sledeći: 0-5min 5% rastvarač B, 5-50min linearni gradijent do 70% rastvarača B, 50-60min 95% linearni gradijent rastvarača B, 60-70min 95% rastvarač B, 70-75min 5% linearni gradijent rastvarača B, 75-80min 5% rastvarač B. Zapremina nanetog uzorka bila je 4μL.

Prekolona je ekvilibrisana pomoću 6,2μL, a kolona pomoću 7μL 5% rastvarača B. Uzorci su jonizovani pomoću *EasySpray nanoESI* izvora u pozitivnom modusu,

napon emitera bio je 2,4 kV, napon kapilare bio je 8V, dok je temperatura kapilare bila 275°C.

Sakupljanje podataka je urađeno u *data-dependant* modusu sa dinamičkom ekskluzijom. Pet najzastupljenijih peptida u svakom skeniranju je analizirano nakon fragmentacije na 35% normalizovanoj kolizionoj energiji, korišćenjem automatskih funkcija uređaja. Dinamička ekskluzija je nameštena na vremenski okvir od 90s i *list size* 500. *Orbitrap LTQ XL* je namešten na opseg masa 300-2000 m/z, sa rezolucijom od 30000.

Analiza dobijenih podataka urađena je pomoću *Xcalibur 2.2* softvera, a analiza dobijenih peptida pomoću softverskih paketa *Proteome Discoverer 1.3* i *X!Tandem*. Identifikacija dobijenih peptida urađena je poređenjem sa humanom *UniProt* bazom podataka.

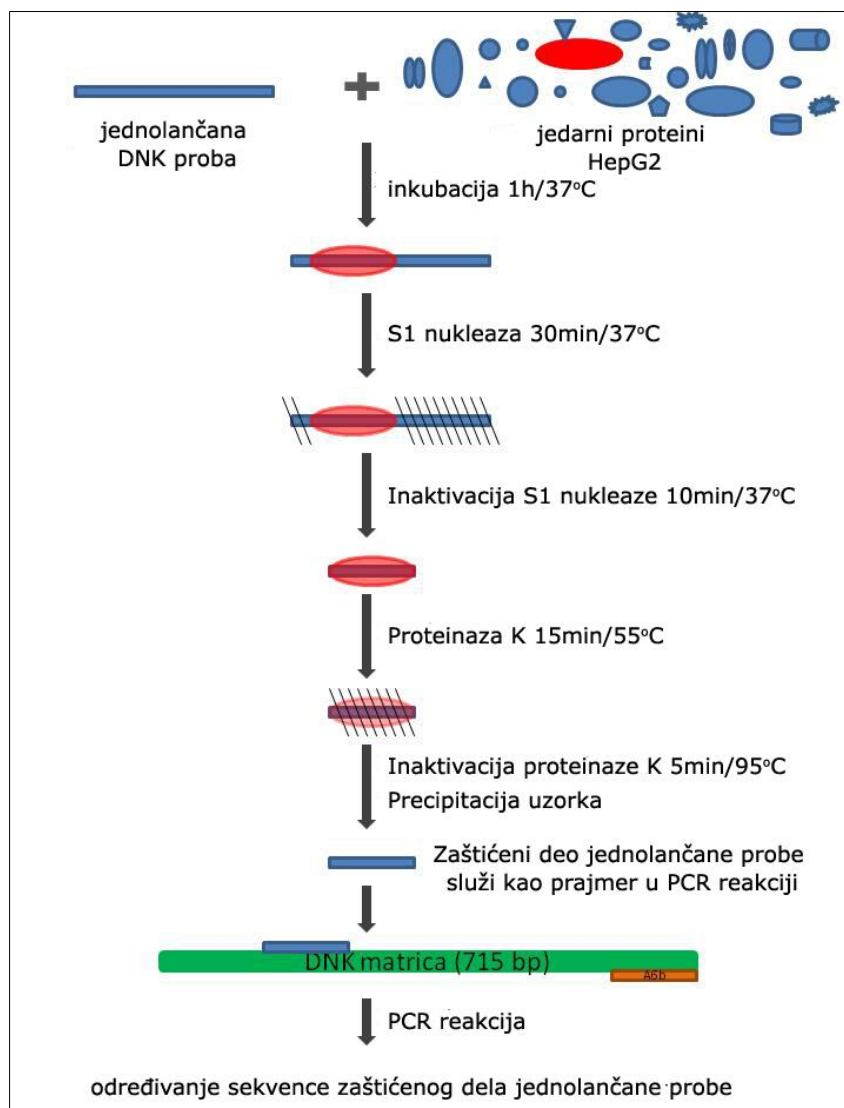
Veživanje proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija za jednolančane wt i mutirane 20068T probe-esej Footprinting Primer-PCR (FP-PCR)

DNK "footprinting" metoda ima za cilj ispitivanje DNK/protein interakcija. Metoda se bazira na činjenici da ukoliko postoji vezivanje proteina za ciljnu sekvencu ona će biti sačuvana od delovanja nukleaza i na taj način moguće je utvrditi da li postoji mesta vezivanja proteina za sekvencu od interesa. Modifikacija metode, koja je primenjena u ovoj studiji, sastoji u tome da je region DNK koji je ostao zaštićen vezanim proteinima korišćen kao prajmer u PCR reakciji, što je omogućilo njegovu identifikaciju (FP-PCR). Shema eseja data je na Slici 15.

Jednolančane wt i 20068T mutirana probe, dužine 33bp, inkubirane su sa proteinima jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija. Reakciona smeša, finalnog volumena 40µL, za vezivanje proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija i jednolančanih proba bila je sledećeg sastava:

wt/20068T jednolančane probe (100 pmol/µL)	1µL
proteini jedarnog ekstrakta HepG2 (0,7µg/µL)	17µL
4x pufer za vezivanje	10µL

Smeša je inkubirana tokom 1h na 37°C.



Slika 15. Shematski prikaz eseja *Footprinting Primer-PCR* (FP-PCR).

Sastav pufera za vezivanje je bio: 5mM Tris-HCl pH 7,9; 10mM KCl; 1,25mM MgCl₂; 2% glicerol; 0,1mM EDTA pH 8,0; 0,1mM DTT i 1μg poly(dIdC).

Nakon toga, u reakcionu smešu, je dodavana S1 nukleaza, koja specifično iseca jednolančane DNK ili RNK molekule, prema sledećem protokolu:

5xS1 pufer	12μL
S1 nukleaza (2U/μL)	0,5μL
reakciona smeša	40μL

Smeša, finalnog volumena 60μL je inkubirana 30 minuta na 37°C, nakon čega je S1 nukleaza inaktivirana na 70°C tokom 10 minuta. U narednom koraku, u reakcionu

smešu je dodato 10 μ L proteinaze K (*Fermentas*), a smeša je inkubirana tokom 15 minuta na 55°C. Inaktivacija proteinaze K vršena je kuvanjem uzorka na 95°C tokom 10 minuta. Preostali jednolančani fragmenti su iz smeše prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom. U 70 μ L smeše je dodavano 350 μ L 0,1M Na-acetata pH 5,2, rastvorenog u etanolu. Zatim je vršeno centrifugiranje na 13000rpm u toku 10min, uz odlivanje supernatanta. Talog je ispiran dva puta sa po 200 μ L 70% etanola, uz centrifugiranje 13000rpm/10min i odlivanje supernatanta. Uzorak je finalno rastvoren u 50 μ L H₂O.

Nakon tretmana S1 nukleazom i proteinazom K, u uzorku ostaje samo jednolančani fragment početne DNK probe koji je tokom tretmana S1 nukleazom bio zaštićen proteinima koji su za njega bili vezani. Dobijeni jednolančani fragment korišćen je kao jedan prajmer u PCR reakciji dok je kao drugi prajmer korišćen A6 prajmer. Kao matrica, korišćen je 715bp dug region 3'-kraja protrombinskog gena, dobijen umnožavanjem pomoću F13a i A6b prajmera.

PCR smeša finalne zapremine 25 μ L sadržala je sledeće komponente:

715 bp DNK matrica	10ng
10xPCR pufer	2,5 μ L μ L
25 mM MgCl ₂	2,5 μ L
2mM dNTP	2,5 μ L
jednolančani prajmer	4,5 μ L
10pmol/ μ L A6b	0,5 μ L
5U/ μ L <i>Taq</i> polimeraza	0,2 μ L

Temperaturni profil PCR reakcije bio je sledeći:

(97°C/2min, 55°C/3min)x3 ciklusa

(95°C/15s, 61°C/15s, 72°C/15s)x38 ciklusa

72°C/10min

Dobijeni PCR produkti su analizirani elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu, a zatim klonirani u pJET1.2/blunt vektor, kako bi se sekvenciranjem inserta odredila sekvenca regiona koji je bio zaštićen proteinima.

a) Kloniranje PCR produkta u pJET1.2/blunt vektor

[protokol za *CloneJet PCR Cloning Kit*, Thermo Scientific]

Na ledu je postavljena reakcija poravnavanja krajeva PCR produkta. Reakciona smeša, finalnog volumena 18 μ L sadržala je:

<i>2xReaction Buffer</i>	10 μ L
PCR produkt	5 μ L
<i>nuclease free H₂O</i>	2 μ L
<i>DNA Blunting</i> enzim	1 μ L

Smeša je kratko vorteksovana i centrifugirana, nakon čega je inkubirana tokom 5min na 70°C. Reakcija ligacije postavljena je na ledu, dodavanjem 1 μ L pJET1.2/blunt vektora (50ng/ μ L) i 1 μ L T4 DNK ligaze. Smeša je inkubirana tokom 1h na sobnoj temperaturi i preko noći na +4°C.

b) Kultivacija bakterija

Bakterije soja *E. coli* DH5 α su gajene u tečnom LB medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar). Svi korišćeni medijumi su sterilisani autoklaviranjem.

Bakterije su gajene na temperaturi od 37°C. U tečne i u čvrste medijume dodavan je ampicilin u finalnoj koncentraciji od 100 μ g/mL.

c) Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju

Ova metoda ima za cilj da se ćelijska membrana bakterija učini propustljivijom, kako bi se omogućilo „ubacivanje“ strane DNK, odnosno transformisale bakterijske ćelije odgovarajućim vektorom.

Pripremanje kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju toplotnim šokom: Sveže, pojedinačne bakterijske kolonije, korišćene su za inokulisanje 10mL medijuma LB u kome su zatim gajene preko noći na 37°C na 180rpm. Sa 2mL ove prekonodne kulture inokulisano je 200mL LB medijuma. Kultura je gajena na 37°C na 200rpm dok nije dostigla OD₆₀₀>0,3. Po dostizanju odgovarajućeg OD₆₀₀, kultura je centrifugirana 10min na 2500rpm/4°C. Dobijeni talog je resuspendovan u 10mL 0,1M

CaCl₂ i inkubiran na ledu 15min. Nakon toga je suspenzija ponovo centrifugirana 10min na 2500rpm/4°C. Talog je resuspendovan u 2mL rastvora RF2 (10mM MOPS; 1mM RbCl; 75mM CaCl₂; 15% glicerol) i inkubiran na ledu 15min. Po 50-200µL smeše je alikvotirano hladnim nastavcima u hladne epruvete na ledu i zamrznuto na -80°C.

d) Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija

Ovom metodom se u bakterijske ćelije ubacuje strana DNK. Zahvaljujući činjenici da bakterije replikuju podjednako efikasno kako sopstvenu tako i ubačanu plazmidnu DNK, ova metoda obezbeđuje velike količine plazmidne DNK. U okviru ove studije korišćene su metode transformacije toplotnim šokom.

Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija toplotnim šokom:

U smešu kompetentnih bakterijskih ćelija (200µL) dodavano je 20µL ligacione smeše. Smeša je inkubirana jedan sat na ledu, a zatim izlagana toplotom šoku: 42°C (2min), led (5min). Ovako transformisanim ćelijama dodavano je po 500µL LB medijuma bez antibiotika i njihov oporavak je favorizovan gajenjem na 37°C u toku jednog sata. Nakon toga 100-500µL bakterijske kulture je utrljavano na čvrstu LB podlogu. Bakterijske ćelije su gajene na čvrstoj podlozi preko noći na 37°C. Iz pojedinačnih kolonija su izolovani ciljni plazmidi.

e) Izolovanje plazmidne DNK na maloj skali

[protokol za *GeneJet plasmid miniprep kit-Fermentas*]

Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5mL tečnog LB medijuma sa ampicilinom i inkubirane preko noći na 37°C/180rpm. Prekonoćna kultura je centrifugirana 2min na 13000rpm, i dobijeni bakterijski talog je resuspendovan vorteksovanjem u 250µL rastvora za resuspendovanje. U resuspendovani talog dodavano je 250µL rastvora za lizu i 350µL rastvora za neutralizaciju uz mešanje invertovanjem. Nakon toga je smeša centrifugira na 13000rpm u trajanju od 5min. Supernatant je prebacivan na *GeneJet* kolonu, koja je centrifugirana na 13000rpm u toku 1min. Na ovaj način je DNK vezana za kolonu, i u naredna dva koraka prečišćavana dodavanjem 0,5mL rastvora za pranje i centrifugiranjem na 13000rpm u trajanju od 1 minuta. Da bi se odstranili i poslednji tragovi pufera, kolona je ponovo

centrifugirana na 13000rpm u trajanju od 1 min. DNK je eluirana sa kolone dodavanjem 50 μ L sterilne vode i centrifugiranjem na 13000rpm u trajanju od 1 minuta.

Izolovana plazmidna DNK je korišćena kao matrica u reakciji sekvenciranja, pri čemu su korišćeni prajmeri specifični za sekvencu plazmida pJET1.2 *forward sequencing primer* i pJET1.2 *reverse sequencing primer*. Reakciona smeša, finalne zapremine 8 μ L, bila je sledećeg sastava:

-210ng plasmid pJET1.2 sa insertom
-3,2pmol pJET1.2 F/R prajmer F113a
-2 μ L <i>Ready Reaction Mix (Applied Biosystem)</i>

Nakon reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom i sekvencirani na *3130 Genetic Analyser* aparatu (*Applied Biosystems*) prema već opisanom protokolu.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje učestalosti genske varijante C20068T

Prvi deo ove studije obuhvatao je određivanje učestalosti genske varijante C20068T u poslednjem egzonu gena za protrombin kod 797 ispitanika (606 pacijenata i 191 ispitanik kontrolne grupe).

Na osnovu kriterijuma opisanih u poglavlju Materijal i metode, iz baze podataka od 4000 pacijenata koji su upućeni u Laboratoriju za molekularnu biologiju, IMGGI, na testiranja na trombofilne markere, selektovana je grupa od 606 pacijenata (starost $37 \pm 12,11$ godina; ♂223 i ♀383) koji su uključeni u studiju: 443 pacijenata (starost $38 \pm 13,84$ godina; ♂223 i ♀220) sa različitim trombotičkim manifestacijama i 163 pacijentkinje (starost $33 \pm 5,20$ godina) sa spontanim pobačajima (SP) nepoznatog uzroka. Pacijenti uključeni u studiju su imali ukupno 1008 trombotičkih događaja (prosečno 1,66 trombotičkih događaja/pacijentu), a njih 203 (44,91%) je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu. Da bi se utvrdio značaj koji genska varijanta C20068T može imati za različite trombotičke pojave, pacijenti su podeljeni u grupe, u zavisnosti od trombotičkog poremećaja od kog su oboleli. Grupu pacijenata sa cerebrovaskularnim insultima (CVI) činilo je 106 pacijenata (starost $35 \pm 15,38$ godina; ♂41 i ♀65), grupu sa izolovanim plućnim embolizmom (PE) činio je 101 pacijent (starost $43 \pm 14,23$ godina; ♂56 i ♀45), grupu sa trombozom dubokih vena (TDV) 175 pacijenata (starost $37 \pm 11,64$ godina; ♂90 i ♀85), dok je 61 pacijent imao kombinovane trombotičke poremećaje (KTP) (starost $41 \pm 11,48$ godina; ♂36 i ♀25).

Opštu kontrolnu grupu činilo je 191 zdravi ispitanik (starost $38 \pm 10,31$ godina; ♂84 i ♀106), dok je kontrolnu grupu za pacijentkinje sa spontanim pobačajima činilo 75 zdravih žena (starost $38 \pm 9,42$ godina) koje nisu imale spontane pobačaje, sa barem jednom uspešnom trudnoćom. Kontrolne grupe su po polu i starosti odgovarale grupama pacijenata.

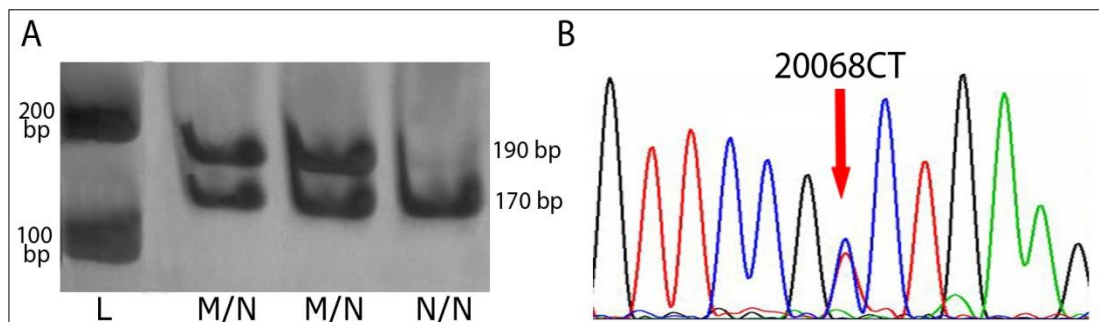
Karakteristike ispitanika koji su uključeni u studiju date su u Tabeli 3.

Tabela 3. Karakteristike učesnika u studiji.

Trombotički poremećaj	n	Prosečna starost (godine \pm SD)	Odnos polova		Pozitivna porodična anamneza (%)	Broj TD	Prosečan broj TD	
			♂	♀				
PACIJENTI	CVI	106	35 \pm 15,38	41	65	43 (51,81)	130	1,23
	PE	101	43 \pm 14,23	56	45	41 (48,81)	111	1,10
	TDV	175	37 \pm 11,64	90	85	49 (44,95)	260	1,49
	KTP	61	41 \pm 11,48	36	25	26 (52,00)	TDV/SP 9, TDV/PE 33, TDV/ CVI 2, TDV/ IM 2, SP/PE 1, SP/ CVI 1	
	TP	443	38 \pm 13,84	223	220	159 (48,77)	501	1,13
	SP	163	33 \pm 5,20	0	163	44 (34,92)	459	2,82
	Σ	606	37 \pm 12,11	223	383	203 (44,91)	1008	1,66
KONTROLNA GRUPA	OKG	191	38 \pm 10,31	84	106	/	/	/
	KG-SP	75	38 \pm 9,42	0	75	/	/	/

n-broj pacijenata/ispitanika u grupi, SD-standardna devijacija, ♂-muški pol, ♀-ženski pol, TD-trombotički događaj, CVI-cerebrovaskularni insult, PE-plućni embolizam, TDV-tromboza dubokih vena, KTP-kombinovani trombotički poremećaji, SP-spontani pobačaji, Σ -ukupan broj pacijenata, OKG-opšta kontrolna grupa, KG-SP-kontrolna grupa za spontane pobačaje

Detekcija genske varijante C20068T vršena je PCR-RFLP metodom ili sekvenciranjem DNK. PCR je rađen direktno iz krvi ili iz izolovane DNK. U slučaju kada je detekcija prisustva genske varijante C20068T rađena PCR-RFLP metodom, umnožavan je fragment dužine 190bp (190bp-20068T mutirani alel, 170+20bp-*wild type* (wt) alel), a kada je detekcija prisustva genske varijante C20068T rađena sekvenciranjem DNK, umnožavan je i sekvenciran region 3'kraja protrombinskog gena dužine 715 bp (Slika 16).



Slika 16. Detekcija C20068T genske varijante.

A: PCR-RFLP analiza. L: marker molekularskih dužina; N-wt alel, M-mutirani alel. B: Deo sekvence 3'kraja gena za protrombin sa C20068T varijantom u heterozigotnom obliku.

Detektovane učestalosti genske varijante C20068T kod pacijenata i kontrola dati su u Tabeli 4.

Tabela 4. Učestalost genske varijante C20068T kod pacijenata sa trombofilijom i zdravih ispitanika.

Trombotički poremećaj		C20068T			P	OR (95% CI)
		n (%)				
		N/N	M/N	M/M		
PACIJENTI	CVI (n=106)	103 (97,17)	3 (2,83)	/	0,130	5,53 0,57-53,88
	PE (n=101)	98 (97,03)	3 (2,97)	/	0,120	5,81 0,60-56,65
	TDV (n=175)	169 (96,57)	6 (3,43)	/	0,057	6,74 0,80-56,60
	KTP (n=61)	58 (95,08)	3 (4,92)	/	0,045	9,83 1,00-96,30
	PTP (n=443)	428 (96,61)	15 (3,39)	/	0,049	6,66 0,87-50,78
	SP (n=163)	159 (97,55)	4 (2,45)	/	0,310	4,26 0,23-80,15
	Σ (n=606)	587 (96,86)	19 (3,14)	/	0,059	6,15 0,82-46,25
KONTROLNA GRUPA	OKG (n=191)	190 (99,48)	1 (0,52)	/		
	KG-SP (n=75)	75 (100)	0 (0,00)	/		

n-broj pacijenata u grupi, SD-standardna devijacija, TD-trombotički događaj, CVI-cerebrovaskularni insult, PE-plućni embolizam, TDV-tromboza dubokih vena, KTP-kombinovani trombotički poremećaji, PTP-pacijenti sa trombotičkim poremećajima, SP-spontani pobačaji, Σ-ukupan broj pacijenata, OKG-opšta kontrolna grupa, KG-SP-kontrolna grupa za spontane pobačaje, N-wt alel, M-mutirani alel, P-statistička značajnost, OR-Odds Ratio, CI-interval poverenja

Genska varijanta C20068T u heterozigotnoj formi detektovana je u svim grupama ispitanika sa trombotičkim poremećajima sa učestalošću 2,45-4,92%, dok je u kontrolnoj grupi detektovan jedan heterozigotni nosilac (0,52%). U kontrolnoj grupi ispitanica koje nisu imale spontane pobačaje nije detektovan nijedan nosilac C20068T. Homozigotni nosioci ove genske varijante nisu detektovani u studiji. Sve testirane grupe su bile u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži, izuzev kontrolne grupe pacijentkinja koje nisu imale spontane pobačaje. Za ovu grupu nije bilo moguće izračunati χ^2 -vrednost obzirom da u njoj nije detektovan ni jedan nosilac 20068T alela.

Učestalost C20068T varijante bila je povećana u svim ispitivanim grupama pacijenata u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu.

Među 443 pacijenta sa trombotičkim manifestacijama, njih 15 su bili nosioci C20068T varijante (3,39%), što je u odnosu na kontrolnu grupu statistički značajno povećanje učestalosti ($P=0,049$).

U grupi pacijenata sa CVI tri ispitanika su imala 20068CT genotip (2,83%). Učestalost C20068T varijante u ovoj grupi je povećana u odnosu na kontrolnu grupu, ali povećanje učestalosti nije dostiglo statističku značajnost. Slični rezultati dobijeni su i u grupama pacijenata sa izolovanim PE, gde su detektovana 3 nosioca (2,97%) i u grupi pacijentkinja sa SP, gde su detektovana 4 nosioca (2,45%) ove genske varijante. Iako je u ovim grupama detektovano povećanje učestalosti C20068T genske varijante, u odnosu na kontrolnu grupu, to povećanje nije bilo statistički značajno. U grupi pacijenata sa TDV detektovano je 6 nosilaca ove varijante i njeno prisustvo povećava rizik za pojavu TDV skoro sedam puta ($P=0,057$). Takođe, učestalost C20068T genske varijante bila je statistički značajno povećana u KTP grupi pacijenata ($P=0,045$). Ovu grupu činili su pacijenti kod kojih se javljalo više različitih trombotičkog oboljenja. Pacijenti u ovoj grupi su imali TDV u kombinaciji sa PE, SP, CVI ili infarktom miokarda.

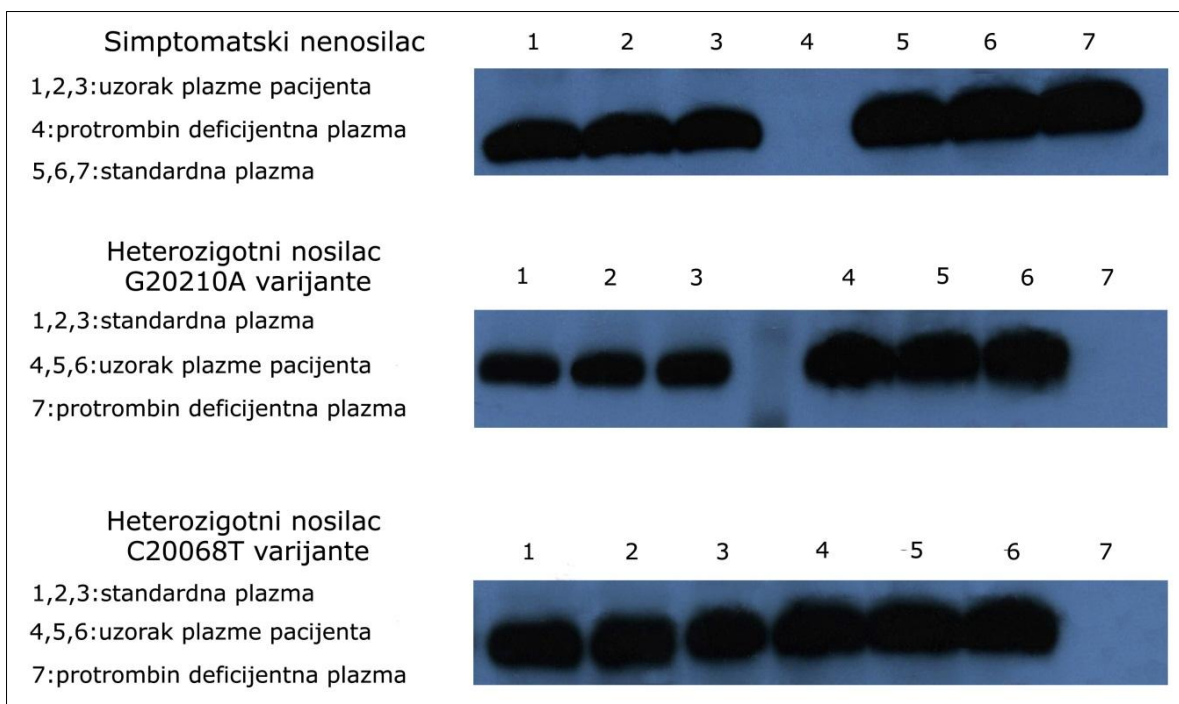
4.2. Kvantifikacija količine protrombina u plazmi

Kod pacijenata koji su nosioci C20068T genske varijante kvantifikovana je količina protrombina u uzorcima plazme. U tu svrhu je korišćen metod relativne kvantifikacije signala dobijenog *Western blot* analizom. Kao kontrolni uzorak korišćena je komercijalno dostupna standardna plazma u odnosu na koju su izražene dobijene vrednosti količine protrombina u plazmi pacijenata. Kao dodatni kontrolni uzorci korišćene su plazme pacijenata heterozigotnih nosilaca FII G20210A genske varijante za koju je pokazano da dovodi do povišenog nivoa protrombina, kao i plazma pacijenta za koga je sekvenciranjem 3'kraja protrombinskog gena utvrđeno da nije nosilac nijedne genske varijante u ovom regionu-simptomatski nenosilac. Kao negativna kontrola korišćena je protrombin deficitarna plazma. Plazma korišćena za relativnu kvantifikaciju dobijena je od 6 nosilaca genske varijante C20068T koji su detektovani u asocijativnoj studiji. Dva pacijenta su imala CVI, dve pacijentkinje su imale ponovljene SP, dok je po jedan analizirani pacijent imao TDV i PE. Nijedan od pacijenata u periodu uzimanja uzoraka nije bio na antikoagulantnoj terapiji.

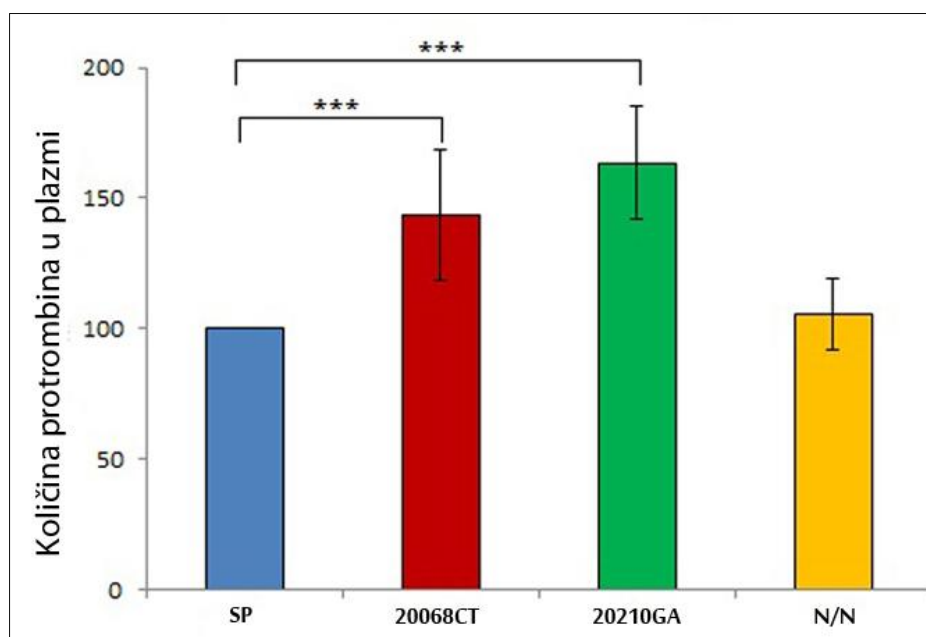
Nakon razdvajanja elektroforezom i transfera na membranu, proteini uzoraka su inkubirani antitelima. Detekcija je vršena na fotosenzitivnom filmu (Slika 17). Da bi se povećala preciznost kvantifikacije, svaki uzorak pacijenata i kontrola je na SDS-poliakrilamidni gel nanošen u triplikatu, u tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti dobijene za pacijente su iskazane u odnosu na rezultate dobijene za standardnu plazmu kojoj je dodeljena referentna vrednost 100.

Relativna kvantifikacija signala koji odgovara količini proteina vršena je pomoću softvera *Image Studio Lite (LI-COR Biosciences – GmbH)*.

U odnosu na standardnu plazmu, u plazmi pacijenata nosilaca C20068T varijante detektovan je statistički značajno povišen nivo protrombina ($143,65 \pm 28,8$). Nosioci G20210A mutacije su takođe imali povišen nivo protrombina u plazmi ($163,64 \pm 21,8$), dok kod simptomatskog nenosioca nije detektovan povišen nivo protrombina ($105,49 \pm 13,5$). Grafički prikaz nivoa protrombina dat je na Slici 18.



Slika 17. Western blot analiza nivoa protrombina u plazmi pacijenata.



Slika 18. Relativna kvantifikacija količine protrombina u plazmi.

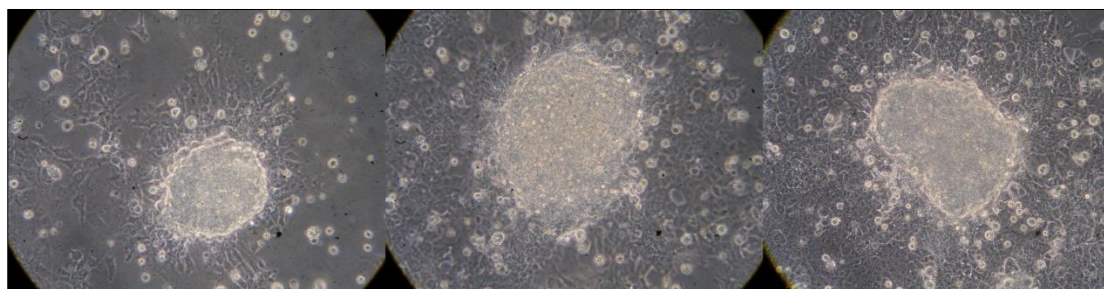
SP-standardna plazma; 20068CT-količina protrombina u plazmi pacijenata heterozigotnih nosilaca C20068T varijante; 20210GA-količina protrombina u plazmi pacijenata heterozigotnih nosilaca G20210A mutacije; N/N-količina protrombina u plazmi simptomatskog nenosioca

4.3. Funkcionalna analiza genske varijante C20068T

4.3.1. Kultivacija stabilnih transfektanata poreklom od pojedinačnih ćelija

Zarad gajenja ćelijskih klonova, koji su poreklom od pojedinačnih transfekovanih ćelija korišćena je heterogena populacija prethodno dobijenih stabilnih transfektanata sa wt i 20068T konstruktom. Wt konstrukt je dobijen tako što je u pCIneo vektor sa deletiranim SV40 poliadenilacionim signalom (pCIneo Δ SV40 vektor) uklonirana celokupna cDNK za protrombin, produžena za 50bp 3'FR sekvence protrombinskog gena nizvodno od mesta iskrajanja (pCIneo Δ SV40Pt+50bp). Za 20068T konstrukt u ovaj vektor je metodom *in situ* mutageneze uvedena zamena C u T na mestu 20068 (pCIneo Δ SV40Pt+50bp-20068T).

Ćelije su retko sejane u Petri šolje i kultivisane mesec dana uz periodične promene medijuma, do formiranja ćelijskih kolonija vidljivih golim okom (Slika 19). Pojedinačne kolonije su sukcesivno pasažirane u veće sudove. Finalno je dobijeno 8 klonova sa wt konstruktom i 12 klonova sa 20068T konstruktom.

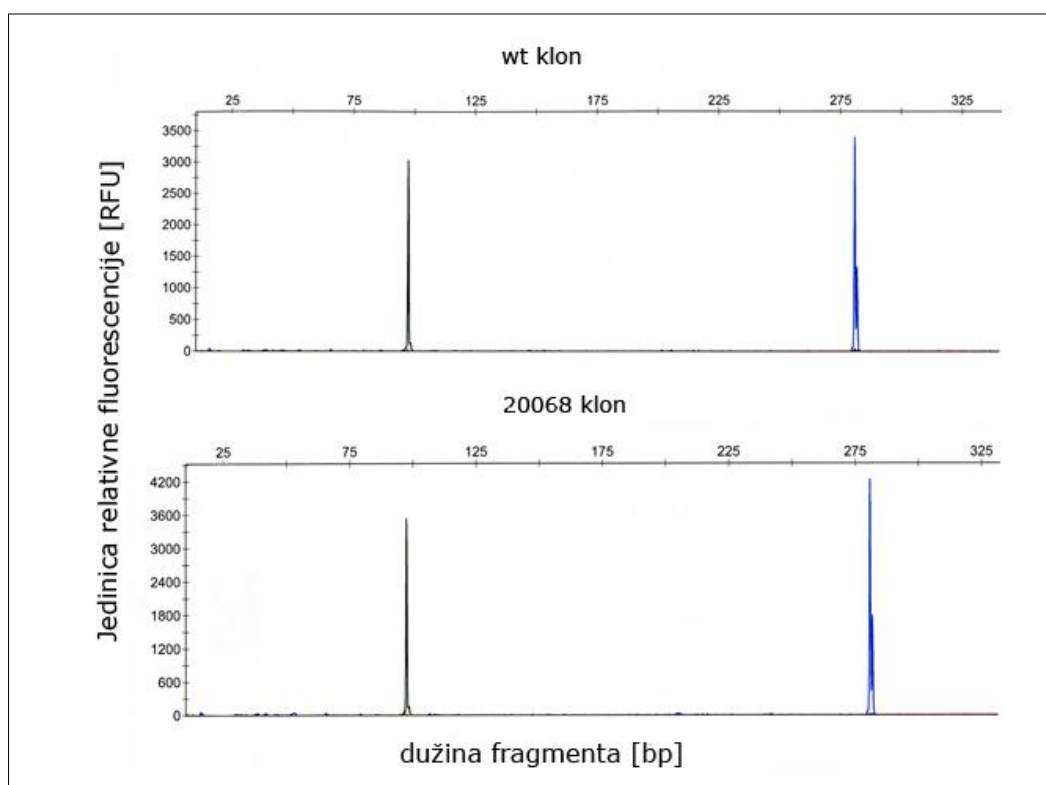


Slika 19. Pojedinačne kolonije *cos-7* ćelija u drugoj nedelji gajenja.

4.3.2. Određivanje broja kopija inserata protrombinskog gena u ćelijskim klonovima

Esej qfPCR (kvantitativni fluorescentni PCR)-kapilarna elektroforeza je prvi put standardizovan za potrebe određivanja broja kopija inserata protrombinskog gena u *cos-7* ćelijskim klonovima u okviru ove doktorske disertacije [170]. Iz dobijenih klonova izolovana je DNK koja je korišćena kao matrica za umnožavanje u PCR reakcijama. Obzirom da se kao matrica za umnožavanje u PCR reakciji koristi genomska DNK, da bi se obezbedilo specifično umnožavanje sa konstrukta insertovanog u genom korišćen je prajmer koji se nalazi na egzon-egzon spoju između egzona 13 i 14 protrombinskog

gena. Kao interna kontrola PCR reakcije, koja je korišćena za normalizaciju rezultata dobijenih kapilarnom elektroforezom, izabran je fragment gena za sisarsku 18S rRNK. Po jedan prajmer iz svakog prajmerskog para bio je fluorescentno obeležen. Ciljna protrombinska sekvenca i interna kontrola su koamplifikovane u triplikatu, u tri nezavisne PCR reakcije. Nakon amplifikacije, PCR produkti su razdvajani kapilarnom elektroforezom, nakon čega je vršena analiza dobijenih fragmenata (Slika 20).



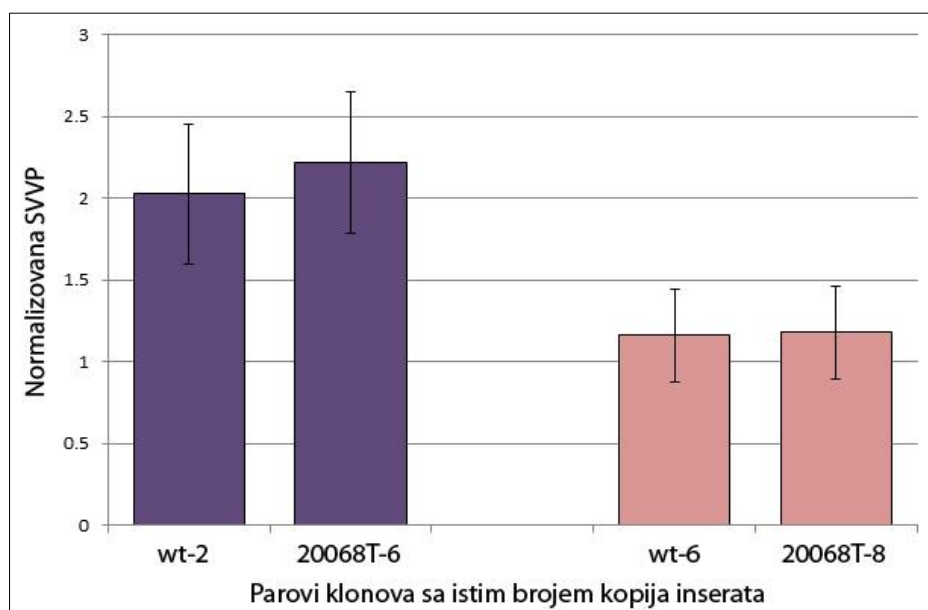
Slika 20. PCR fragmenti ciljnog dela protrombinskog gena i endogene kontrole razdvojeni kapilarnom elektroforezom.

Crni pik: endogena kontrola; Plavi pik: protrombinski fragment

Visina dobijenog pika odgovara količini umnoženog PCR produkta, što je proporcionalno i početnoj količini DNK matrice u PCR reakciji. Za svaki od 18 dobijenih klonova izračunata je srednja vrednost visine pika (SVVP) koji odgovara ciljnoj protrombinskoj sekvenci i SVVP interne kontrole. Normalizovana SVVP dobijena je deljenjem SVVP protrombinskog fragmenta i SVVP interne kontrole. Za svaki testirani klon određivana je normalizovana SVVP vrednost i njena standardna devijacija.

Među 18 testiranih klonova, detektovana su dva wt-20068T para sa odgovarajućim normalizovanim SVVP vrednostima (Slika 21). Prvi par činili su klonovi wt-2 i 20068T-6, čije su normalizovane SVVP vrednosti iznosile $2,03 \pm 0,43$ i $2,22 \pm 0,43$ redom. Drugi par činili su klonovi wt-6 i 20068T-8, čije su normalizovane vrednosti iznosile $1,16 \pm 0,28$ i $1,18 \pm 0,28$.

Na osnovu dobijenih rezultata parovi klonova wt-2/20068T-6 i wt-6/20068T-8 imaju međusobno odgovarajući broj kopija inserata.

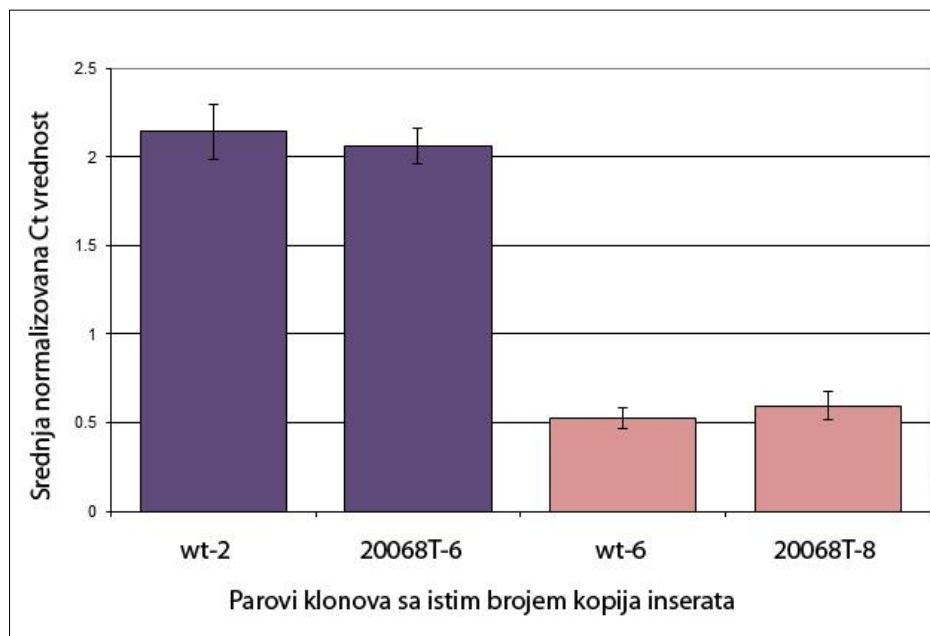


Slika 21. Određivanje broja kopija inserata protrombinskog gena esejem qfPCR-kapilarna elektroforeza.

wt-klonovi transfekovani pCIneo Δ SV40Pt+50bp konstruktom; 20068T-klonovi transfekovani pCIneo Δ SV40Pt+50bp-20068T konstruktom; SVVP: srednja vrednost visine pika.

Validacija rezultata dobijenih u eseju qfPCR-kapilarna elektroforeza za dva odabrana para klonova vršena je metodom *real-time* PCR korišćenjem *SYBR-Green*. U ovom eseju kao referentna kontrola korišćen je gen za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR). Specifičnost umnožavanja je potvrđena analizom krive topljenja u *ABI PRISM 7500* softveru i izračunate su efikasnosti amplifikacije, koje su za ciljani i referentni gen imale približno iste vrednosti ($S_t = -3,02$ i $R_t^2 = 0,97$ za ciljani gen; $S_t = -3,06$ i $R_t^2 = 0,98$ za referentni gen). Srednje C_t vrednosti za par wt-2 i 20068T-6 iznosile su

2,14±0,15 i 2,06±0,1 redom. Srednje Ct vrednosti za par wt-6 i 20068T-8 iznosile su 0,53±0,06 i 0,59±0,08 redom (Slika 22).



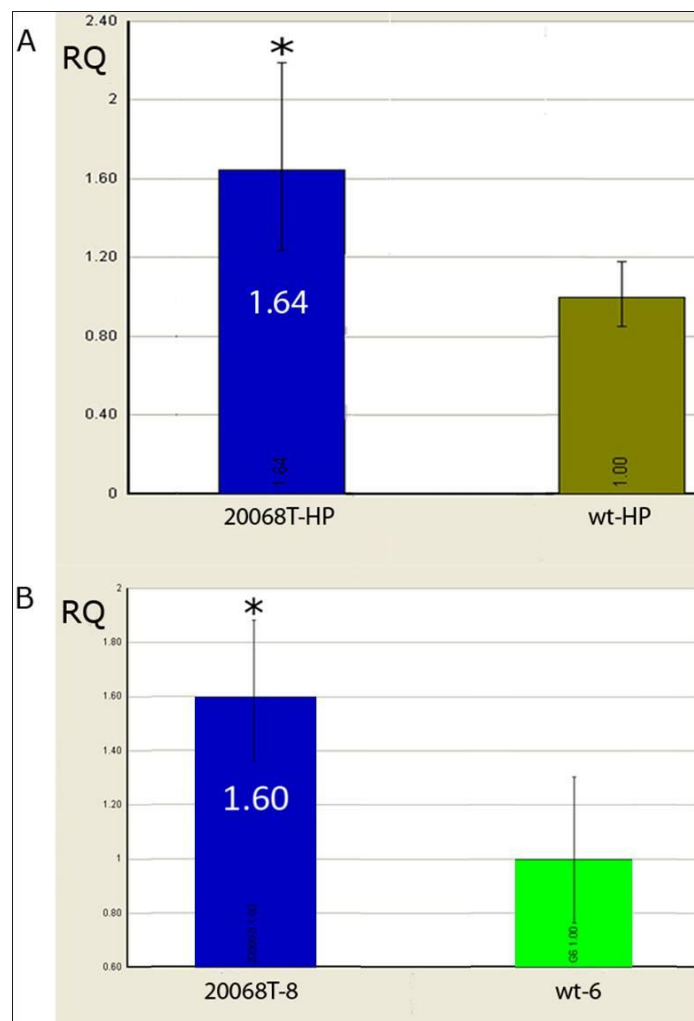
Slika 22. Određivanje broja kopija inserata protrombinskog gena metodom *real-time* PCR.

wt-klonovi transfekovani pCIneoΔSV40Pt+50bp konstruktom; 20068T-klonovi transfekovani pCIneoΔSV40Pt+50bp-20068T konstruktom.

Rezultati dobijeni pomoću *real-time* PCRa su potvrdili rezultate eseja qfPCR-kapilarna elektroforeza, za oba para klonova. Za dalju analizu odabran je par G6 i 20068-8, zbog manjih razlika i varijabilnosti standardnih devijacija.

4.3.3. Praćenje ekspresije gena za protrombin relativnom kvantifikacijom iRNK

Rezultati dobijeni u prethodnoj studiji [159], u kojoj je ekspresija gena za protrombin praćena u heterogenoj populaciji ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima, pokazali su da mutirani konstrukt dovodi do 1,64 puta povećane ekspresije protrombina u odnosu na wt. Obzirom da ekspresija protrombina u ovako postavljenom eksperimentu zavisi od broja kopija inserata, određivanje ekspresije je urađeno i na klonovima sa istim brojem kopija, da bi se isključio eventualni uticaj različitog broja inserata na dobijeni rezultat.



Slika 23. Relativna kvantifikacija ekspresije gena za protrombin metodom *real-time* PCR.

A-ekspresija protrombina u heterogenoj populaciji (HP) ćelija. Kalibrator wt-HP; **B**-ekspresija protrombina u pojedinačnim kolonijama. Kalibrator wt-6. wt-ćelije transfekovane wt konstruktom; 20068T-ćelije transfekovane 20068T konstruktom. RQ-*relative quantification*

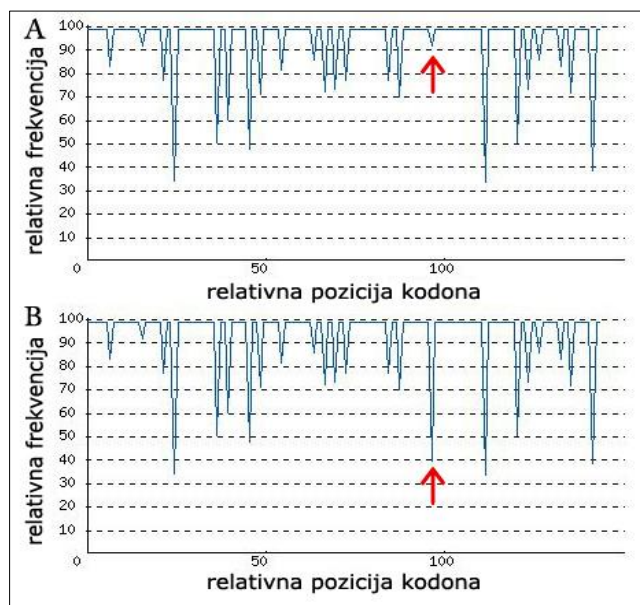
Iz odabranih wt-6 i 20068-8 klonova je izolovana RNK koja je korišćena kao matrica za dobijanje cDNK, koja je zatim korišćena u reakcijama *real-time* PCRa, prema protokolu opisanom u poglavlju Materijal i Metode. Dobijeni uzorci cDNK su analizirani u triplikatu, a detekcija signala za protrombin i referentni gen (neomicin-fosfotransferazu) rađena je na istoj cDNK matrici. Rezultati su obrađeni korišćenjem *7500 System Software*, a kao kalibrator je korišćen uzorak wt-6, kome je dodeljena RQ (*Relative Quantification*) vrednost 1. U odnosu na wt-6 klon, 20068-8 klon pokazuje 1,6

puta veću ekspresiju protrombina ($P < 0,05$). Dobijeni rezultati pokazuju da prisustvo 20068T varijante dovodi do povećanja ekspresije protrombina od ~60% u odnosu na wt varijantu, bez obzira da li se u eksperimentu koriste monoklonalne kolonije sa istim brojem inserata ili heterogena populacije ćelija (Slika 23).

4.3.4. *In silico* predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068

Prethodni rezultati su pokazali da C20068T varijanta dovodi do povećane ekspresije protrombina. Da bi se dobio uvid o potencijalnom mehanizmu kojim ova varijanta dovodi do povećanja ekspresije, najpre su urađene *in silico* predikcije uticaja C>T zamene na mestu 20068 u protrombinskom genu.

Rezultati dobijeni pomoću *GenScript* servera pokazuju da učestalost upotrebe CGC (wt sekvenca) kodona u genomu čoveka iznosi 10,9/1000 nukleotida, dok se CGT kodon koristi sa učestalošću 4,7/1000 nukleotida, što ga čini ređe odabiranim kodonom. Distribucija upotrebe kodona u slučaju wt i 20068T sekvence poslednjeg egzona protrombinskog gena data je na Slici 24, a strelicom je označena pozicija kodona u kome se dešava C>T zamena.

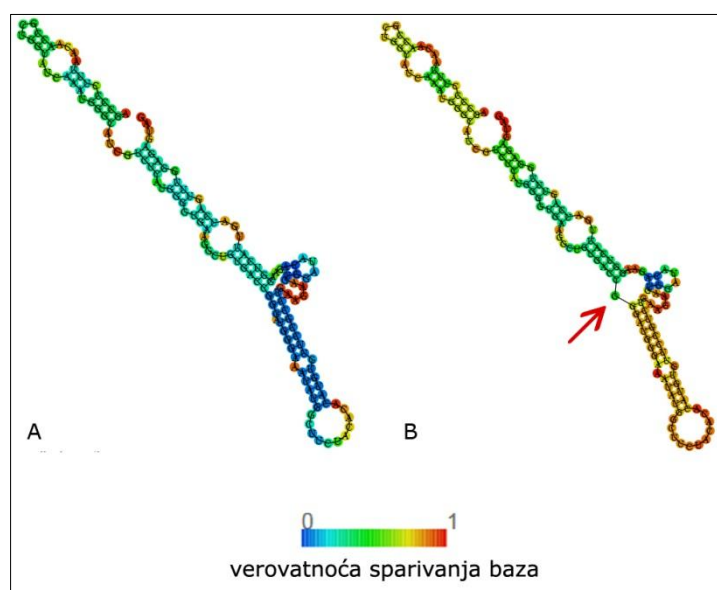


Slika 24. Distribucija frekvencije upotrebe kodona u poslednjem egzonu protrombinskog gena.

A-wt sekvenca egzona 14 protrombinskog gena; **B**-20068T sekvenca egzona 14 protrombinskog gena

Rezultati predikcije upotrebe kodona na poziciji bazne zamene pokazuju da se, u poređenju sa setom referentnih gena, CGC kodon daleko češće bira u odnosu na CGT, koji predstavlja ređe upotrebljavani kodon za aminokiselinu arginin. Iako je CGT kodon koji se ređe bira, CAI (engl. *Codon Adaptation Index*) vrednosti za wt sekvencu egzona 14 protrombinskog gena iznosila je 0,82, dok je CAI vrednost za 20068T sekvencu iznosila 0,80.

Rezultati predikcije sekundarne strukture egzona 14 pomoću *RNAfold* softvera pokazuju da uvođenje C>T zamene na poziciji 20068 dovodi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi ovog egzona. Minimalna slobodna energija u odsustvu zamene iznosi -32,40 kcal/mol, dok u prisustvu bazne zamene iznosi -34,40 kcal/mol. Takođe, prisustvo T na mestu 20068 dovodi do povećanja verovatnoće komplementarnog sparivanja baza unutar ove sekvence, što sekundarnu strukturu egzona čini stabilnijom i najverovatnijom u nativnim uslovima (Slika 25).

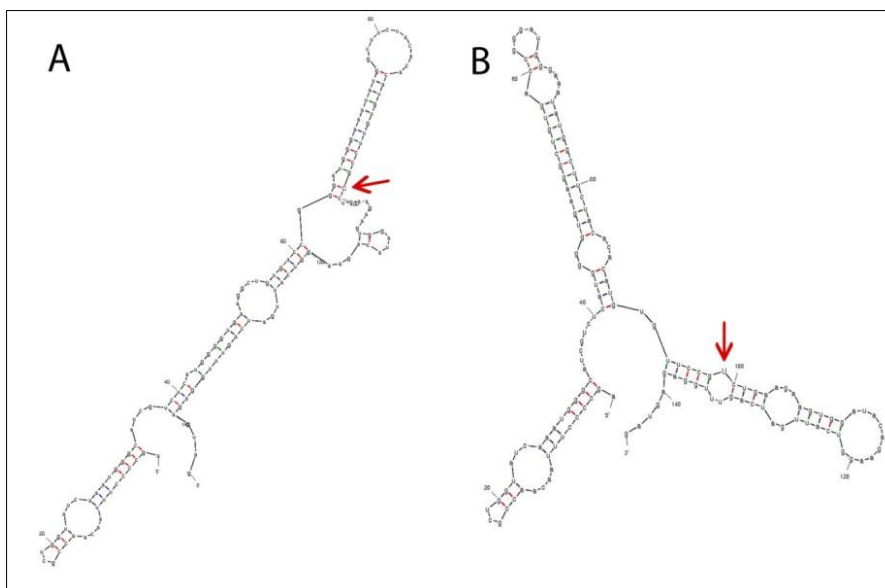


Slika 25. Predikcija sekundarne strukture egzona 14 protrombinske iRNK pomoću *RNAfold* softvera.

A-wt sekvencu; **B**-20068T sekvencu. Strelicom je označena promena u sekundarnoj strukturi do koje dovodi prisustvo T na poziciji 20068

Prema rezultatima predikcije sekundarne strukture pomoću *Mfold* softvera, minimalna slobodna energija wt sekvence poslednjeg egzona iznosi 31,44 kcal/mol, a u

prisustvu C>T bazne zamene na poziciji 20068 -36 kcal/mol. Citozin na poziciji 20068 se komplementarno sparuje sa G u blizini jednonančane petlje, dok zamena timinom na istoj poziciji dovodi do restrukturiranja sekundarne strukture u kojoj se uracil na poziciji 20068 nalazi u okviru jednonančane strukture (Slika 26).



Slika 26. Predikcija sekundarne strukture egzona 14 protrombinske iRNK pomoću *Mfold* softvera.

A-predikcija wt sekvence; **B**-predikcija 20068T sekvence. Strelicom je označena promena u sekundarnoj strukturi do koje dovodi prisustvo T na poziciji 20068

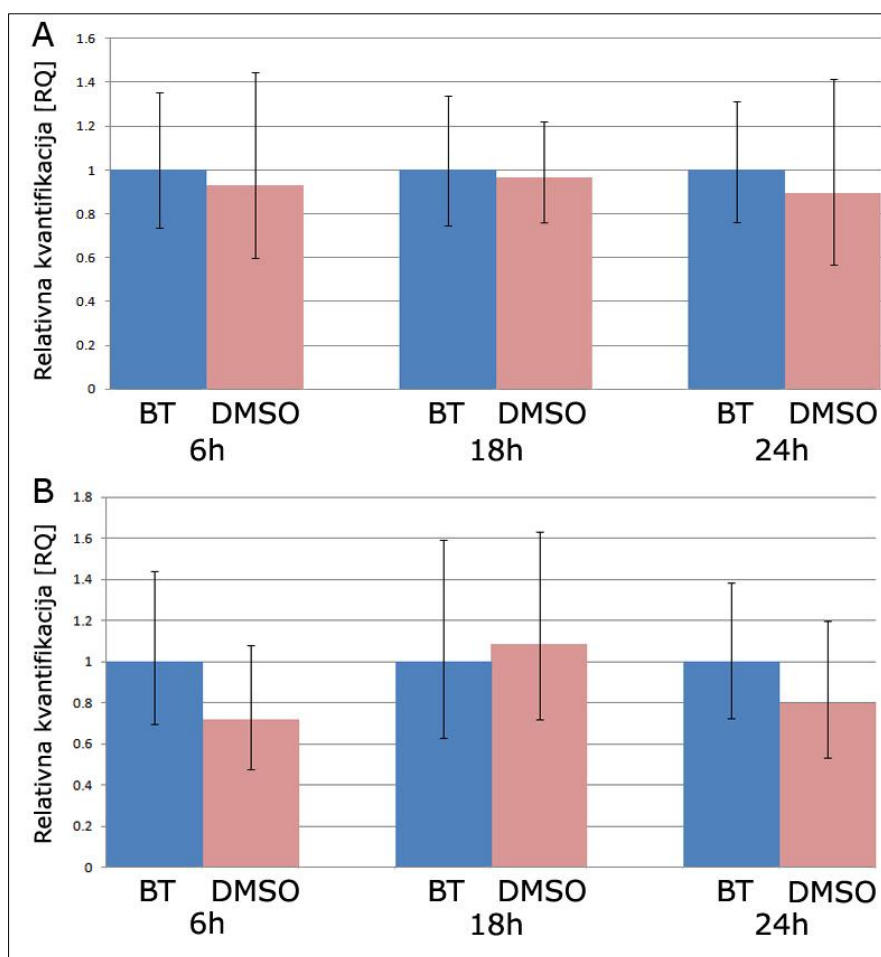
Rezultati obe predikcije sekundarne strukture pokazuju da prisustvo C>T bazne zamene smanjuje minimalnu slobodnu energiju i doprinosi formiraju stabilnije sekundarne strukture egzona 14 protrombinske iRNK.

Pretraživanje *MiRBase* baze podataka je pokazalo da se za ovaj region protrombinskog gena, i u wt formi i kada je prisutna C u T zamena na mestu 20068, ne vezuje nijedna do sada opisana mikroRNK.

4.3.5. Ispitivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama transfekovanim wt i 20068T konstruktima

Stabilnost iRNK ispitivana je praćenjem kinetike degradacije iRNK za protrombin u stabilno transfekovanim cos-7 ćelijama tretiranim aktinomycinom D. U određenim vremenskim tačkama nakon početka tretmana (6, 18 i 24h) iz ćelija je izolovana RNK koja je korišćena za kvantifikaciju iRNK za protrombin metodom *real-time* PCRa.

Korišćeni aktinomycin D je rastvoren u DMSO, pa je paralelno vršen i tretman ovim rastvaračem, kako bi se isključio njegov mogući uticaj na ekspresiju protrombina. Paralelno, pod istim uslovima, gajene su i kontrolne ćelije koji nisu tretirane.



Slika 27. Uticaj DMSO na ekspresiju protrombinske iRNK tokom vremena.

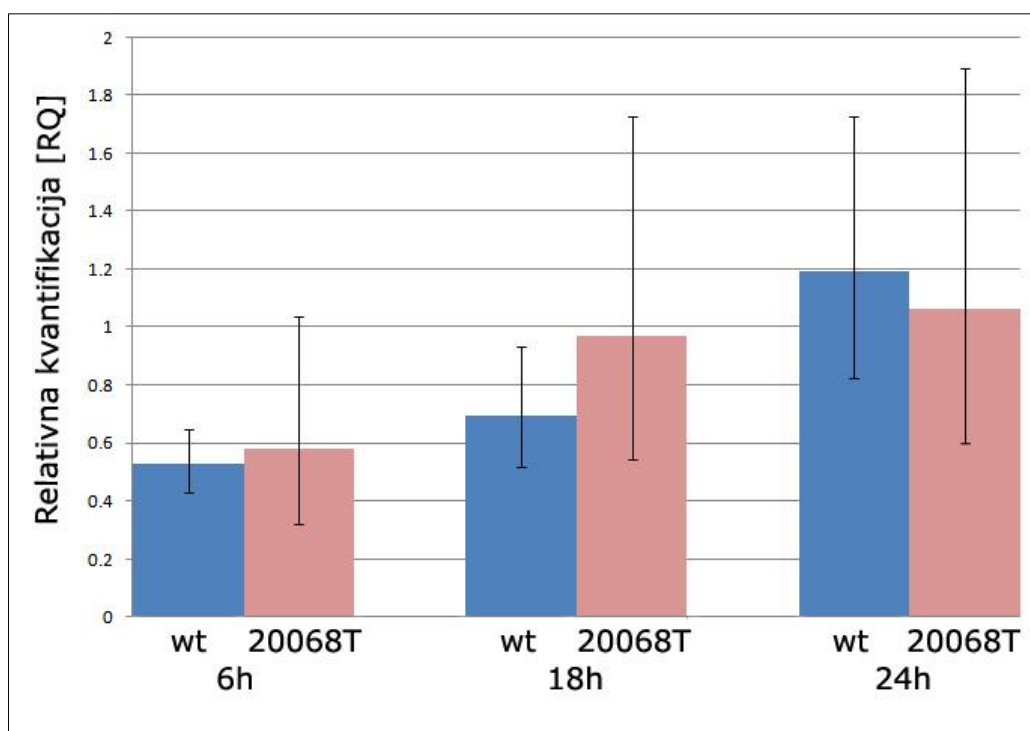
A-ćelije transfekovane wt konstruktom; **B**-ćelije transfekovane 20068T konstruktom.

BT-kontrolne, netretirane ćelije, DMSO-dimetil sulfoksid

Svi rezultati su normalizovani na referentni gen-neomicin fosfotransferazu, a kao kalibrator su korišćene odgovarajuće RQ vrednosti dobijene za netretirane ćelije. Rezultati su za svaku vremensku tačku iskazivani u odnosu na netretirane ćelije kojima za svaku tačku merenja dodeljivana vrednost 1.

Dobijeni rezultati su pokazali da DMSO ne dovodi do statistički značajne razlike u ekspresiji protrombinske iRNK, i kod ćelija sa wt, i kod ćelija sa 20068T konstruktom u odnosu na netretirane ćelije (Slika 27).

Rezultati eksperimenta tretmana ćelija aktinomicinom D su pokazali da prisustvo T na mestu 20068 ne dovodi do statistički značajne razlike u količini detektovane iRNK u odnosu na wt konstrukt ni u jednoj vremenskoj tački (Slika 28).



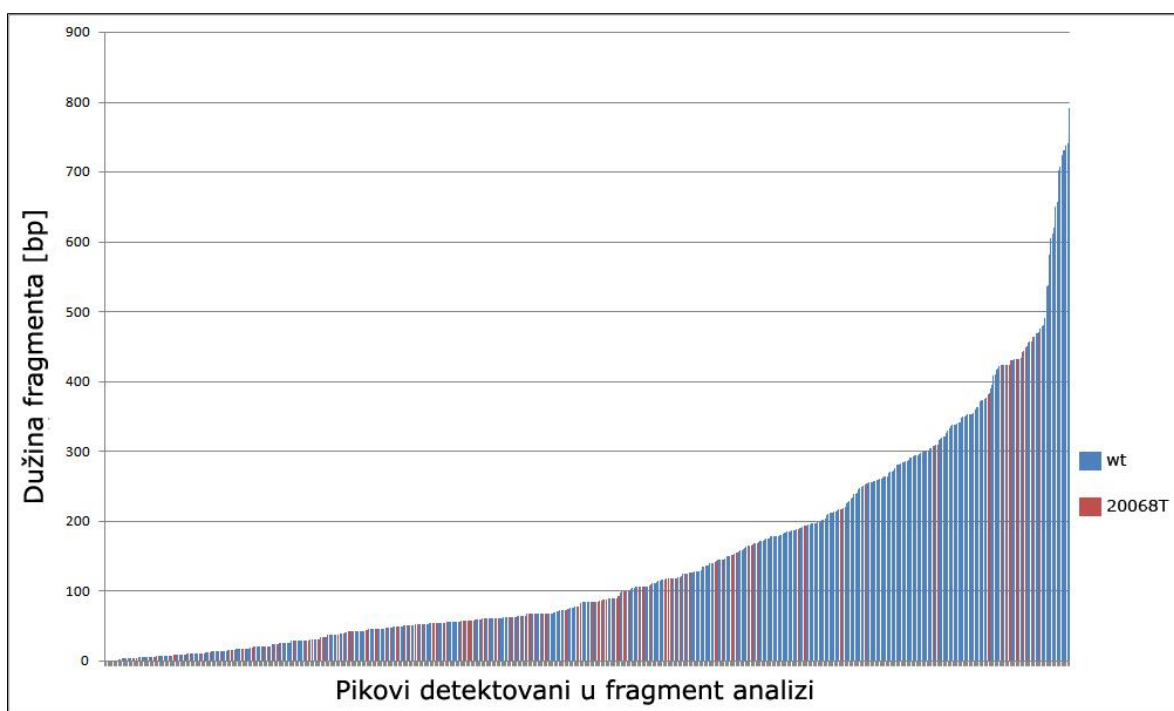
Slika 28. Uticaj aktinomicina D na ekspresiju protrombinske iRNK tokom vremena. wt-ćelije transfekovane wt konstruktom; 20068T-ćelije transfekovane 20068T konstruktom

4.3.6. Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK

U ovoj studiji primenjena je modifikovana metoda 3'RACE u cilju praćenja efekta 20068T varijante na izbor mesta iskrajanja iRNK i dužinu 3'UTRa. Specifičnost umnožavanja 3'kraja protrombinske iRNK obezbeđena je u dve sukcesivne PCR

reakcije. U prvoj PCR reakciji, umnožavanje je vršeno jednim prajmerom, koji se nalazi na egzon-egzon spoju egzona 13 i 14 protrombina. U drugoj PCR reakciji, specifičnost umnožavanja je povećana korišćenjem fluorescentno obeleženog prajmera, specifičnog za protrombinsku sekvencu i poly(T) prajmera, koji prepoznaje sekvencu poli(A) repa. Kao matrica korišćena je cDNK dobijena cos-7 ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima. PCR umnožavanje je rađeno u triplikatu za tri nezavisne stabilne transfekcije. Nakon PCR reakcija, uzorci dobijeni amplifikacijom svih wt uzoraka su pomešani međusobno nanešeni na kapilarnu elektroforezu. Isto je urađeno i sa uzorcima dobijenim amplifikacijom 20068T uzoraka. Detekcija dobijenih produkata vršena je kapilarnom elektroforezom, a dobijeni fragmenti su analizirani pomoću *Gene Mapper 4.0* softvera.

Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da postoji ravnomerna raspodela u populaciji kraćih fragmenata (Slika 29). Značajne razlike postoje u populaciji dugih fragmenata, koji su predominantno prisutni u wt uzorcima.



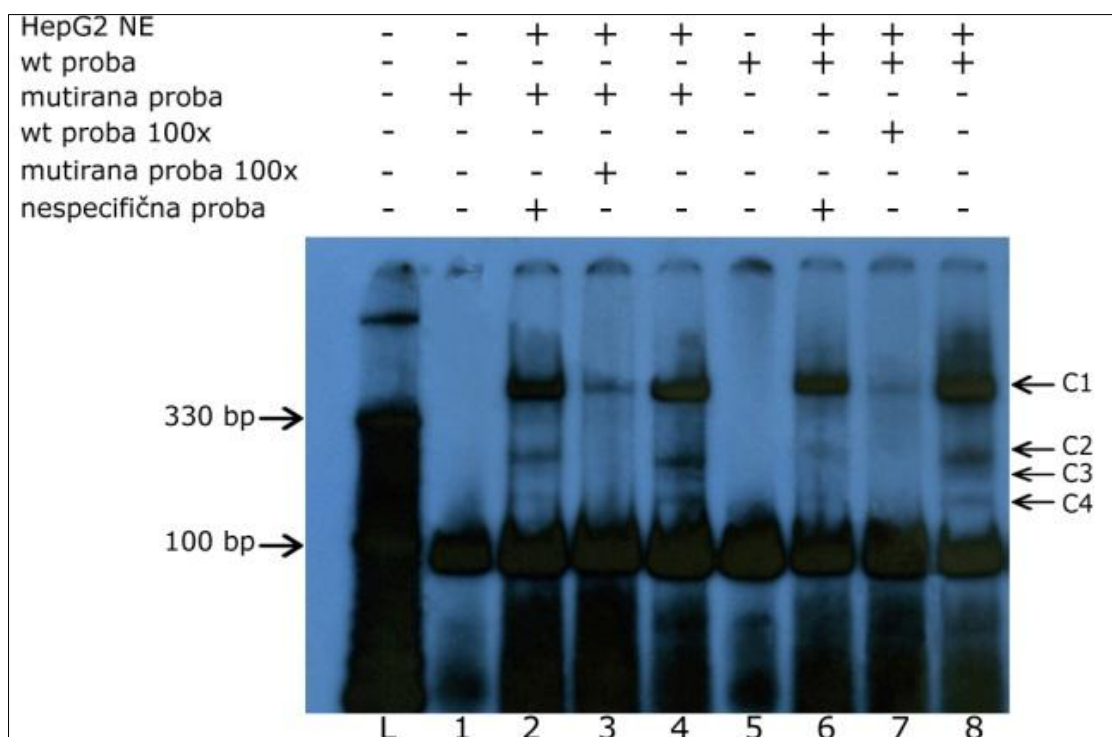
Slika 29. Rezultati fragment analize nakon umnožavanja dela 3' kraja cDNK metodom modifikovanog 3'RACE.

wt-ćelije transfekovane wt konstruktom; C20068T-ćelije transfekovane 20068T konstruktom

4.3.7. DNK-protein interakcije

a) Ispitivanje interakcije jedarnih proteina HepG2 i HeLa ćelija sa wt i 20068T probom

Da bi se ispitao efekat prisustva 20068T varijante na interakcije sa DNK-vezujućim proteinima, primenjen je esej promenjene elektroforetske mobilnosti (EMSA). Generisane su wt i 20068T dvolančane probe, dužine 82 bp, u čijoj se sredini nalazi mesto 20068. Probe su inkubirane sa ekstraktima jedarnih proteina, izolovanih iz ćelijskih linija HepG2 i HeLa (Slike 30 i 31).

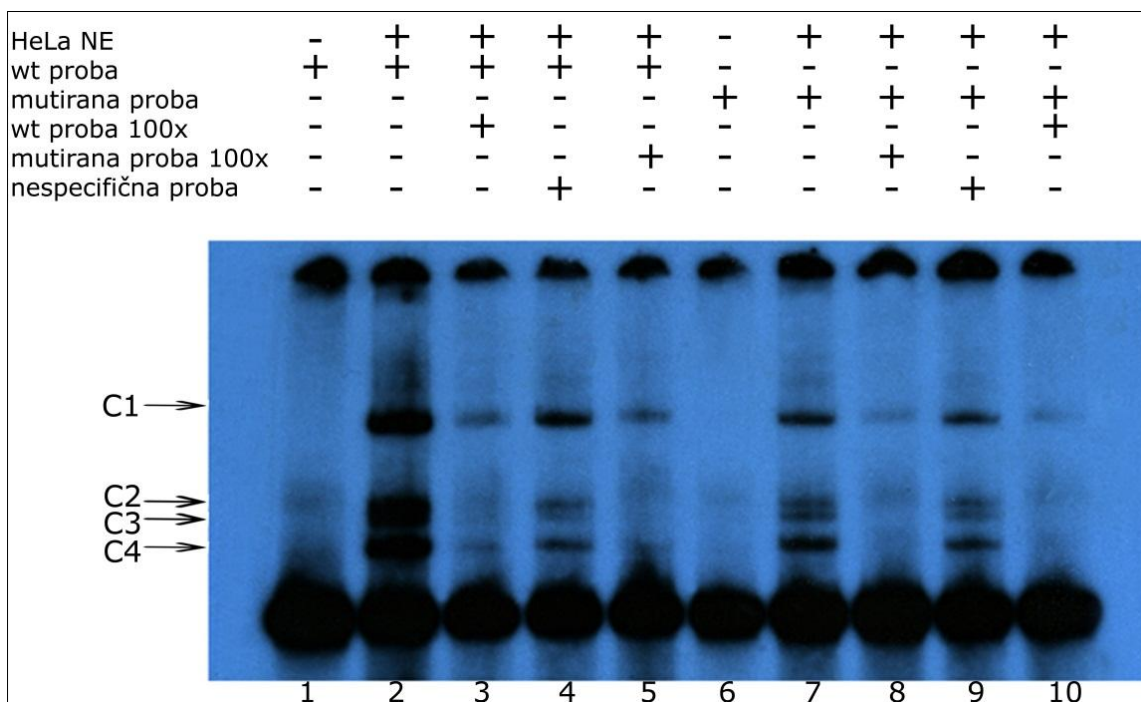


Slika 30. EMSA esej wt i 20068T probe sa jedarnim proteinima poreklom iz HepG2 ćelija.

L-marker molekulske dužine (10 bp); NE-jedarni proteini; 1- slobodna 20068T proba; 2- kompeticija (hlađenje) kompleksa nespecifičnom PAI-1 probom, 3- kompeticija (hlađenje) kompleksa neobeleženom 20068T probom; 4-inkubacija 20068T probe sa HepG2 NE; 5- slobodna wt proba; 6- kompeticija (hlađenje) kompleksa nespecifičnom PAI-1 probom, 7- kompeticija (hlađenje) kompleksa neobeleženom wt probom; 8- inkubacija wt probe sa HepG2 NE.

Utvrđeno je da dolazi do formiranja više DNK-protein kompleksa u interakciji wt i 20068T probe sa ekstraktom jedarnih proteina HepG2 ćelija (kolone 4 i 8, Slika 30). Raspored uočenih kompleksa se nije razlikovao za wt i za 20068T probu. Najintezivniji kompleks (označen sa C1) je ujedno imao i najmanju elektroforetsku pokretljivost. Kako bi se potvrdila specifičnost formiranih kompleksa, urađena je kompeticija neobebeženom wt (kolona 7, Slika 30) i 20068T probom (kolona 3, Slika 30) u 100x većem molarnom odnosu. Rezultati su pokazali da u oba slučaja dolazi do "hlađenja" formiranih kompleksa. Eksperiment kompeticije nespecifičnom PAI-1 probom je pokazao da dodavanje nespecifične probe ne dovodi do "hlađenja" nastalih kompleksa, čime je njihova specifičnost dodatno potvrđena (kolone 2 i 6, Slika 30).

U cilju analize vezivanja jedarnih proteina iz HeLa ćelijske linije, wt i 20068T proba su inkubirane sa jedarnim ekstraktom izolovanim iz ovih ćelija. Rezultati su pokazali da i u ovom slučaju dolazi do formiranja više DNK-protein kompleksa, kao i u slučaju inkubacije sa jedarnim proteinima iz HepG2 ćelija, što je prikazano na Slici 31 (kolone 2 i 7). Raspored uočenih kompleksa je odgovarao rasporedu kompleksa koji je uočen za proteine iz HepG2 ćelija. Kompeticija neobebeženim wt i 20068T probama dovodi do "hlađenja" ovih kompleksa (kolone 3 i 8, Slika 31). Takođe je urađeno i unakrsno "hlađenje" wt probe mutiranom probom i obrnuto (kolone 5 i 10, Slika 31), koje je pokazalo da wt proba jače "hladi" DNK-proteinske komplekse nastale inkubacijom mutirane probe sa jedarnim proteinima, što ukazuje da wt proba formira stabilnije komplekse u odnosu na 20068T probu usled povećanog afiniteta vezivanja proteina za probu. Dodavanje nespecifične, neobebežene probe u višku ne dovodi do "hlađenja" nastalih kompleksa (kolone 4 i 9, Slika 31).



Slika 31. EMSA esej wt i 20068T probe sa jedarnim proteinima poreklom iz HeLa ćelija.

NE-jedarni proteini. 1-slobodna wt proba; 2- inkubacija wt probe sa HeLa NE; 3-kompeticija (hlađenje) kompleksa neobebeženom wt probom; 4-kompeticija (hlađenje) kompleksa nespecifičnom PAI-1 probom; 5-kompeticija (hlađenje) kompleksa neobebeženom mutiranom 20068T probom; 6-slobodna 20068T proba; 7-inkubacija mutirane 20068T probe sa HeLa NE; 8- kompeticija (hlađenje) kompleksa neobebeženom C20068T probom; 9-kompeticija (hlađenje) kompleksa nespecifičnom PAI-1 probom; 10-kompeticija (hlađenje) kompleksa neobebeženom wt probom.

b) Identifikacija proteina masenom spektrometrijom

U cilju identifikacije proteina koji se vezuju za wt i mutiranu probu, korišćene u eksperimentima promenjene elektroforetske pokretljivosti, uočeni kompleks C1 je isecan sa gela i podvrgnut digestiji tripsinom. Dobijeni peptidi su identifikovani pomoću masene spektrometrije, poređenjem sa *UniProt* bazom humanih jedarnih proteina, što je prikazano u Tabeli 5.

U kompleksu koji sa jedarnim proteinima HepG2 formira wt proba identifikovano je 11 različitih proteina, dok su u kompleksu sa mutiranom probom identifikovana 3 različita proteina.

Tabela 5. Proteini identifikovani u kompleksu sa wt i mutiranom probom

Identifikovani proteini	
wt proba	Mutirana proba
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i> <i>OS</i>
<i>Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	<i>Calreticulin</i>
<i>cDNA FLJ51586, moderately similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	
<i>cDNA FLJ58832, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	
<i>Protein disulfide-isomerase</i>	
<i>E3 SUMO-protein ligase CBX4</i>	
<i>ELAV-like protein 1</i>	
<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34</i>	

Karakteristike proteina dobijene su pretraživanjem *UniProt* baze podataka, a date su u Tabeli 6.

Tabela 6. Opšte karakteristike proteina detektovanih u kompleksima

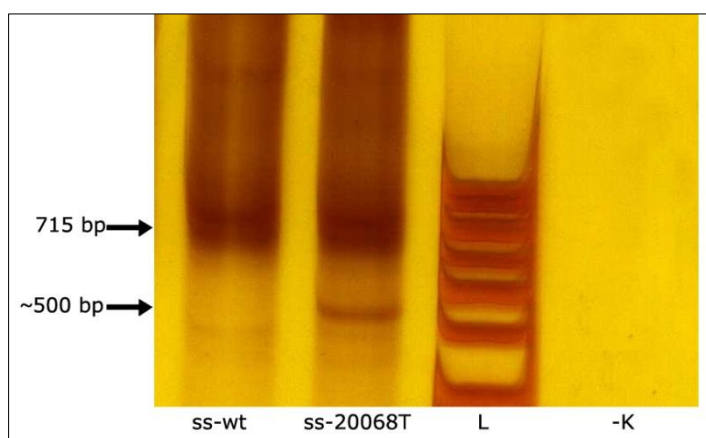
Protein	Odlike proteina
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	~72kDa, lokalizovan u citoplazmi i endoplazmatičnom retikulumu, ATP- i nukleotid-vezujući protein
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1</i>	~37kDa, lokalizovan u nukleusu i citoplazmi, RNK-vezujući protein, uključen u procese iskrajanja i obrade iRNK
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>	~30,5kDa, pretpostavljeni protein predikovan na osnovu rezultata sekvenciranja genoma. Pretpostavlja se da je protein koji interaguje sa nukleinskim kiselinama
<i>cDNA FLJ51586, moderately similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	~26,5kDa, ribonukleoprotein. Pretpostavlja se da je protein koji interaguje sa nukleinskim kiselinama.
<i>cDNA FLJ58832, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	~34,2kDa, ribonukleoprotein. Pretpostavlja se da je protein koji interaguje sa nukleinskim kiselinama.
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	Ribonukleoprotein sa 5 različitih izoformi, različitih molekulskih masa. Uključen u RNK obradu, iskrajanje i regulaciju translacije. Može biti lokalizovan u nukleusu, citoplazmi, endoplazmatičnom retikulumu, mikrozomu i splajsozomu. Vezuje se sa RNK molekule i poli(A)
<i>Protein disulfide-isomerase</i>	~57kDa, najčešće lokalizovan u endoplazmatičnom retikulumu i ćelijskoj membrani, uključen u metaboličke procese

Protein	Odlike proteina
<i>E3 SUMO-protein ligase CBX4</i>	~61,4kDa, lokalizovan pretežno u nukleusu, uključen u procese transkripcije i regulacije transkripcije, sumoilacije proteina i regulaciju apoptoze. DNK, RNK i protein vezujući protein.
<i>ELAV-like protein 1</i>	~36kDa, lokalizovan u citoplazmi i nukleusu, uključen u 3'kraj stabilizaciju iRNK, regulaciju genske ekspresije, procese RNK metabolizma, regulaciju translacije. Vezuje se za dvolančane RNK molekule i AU-bogate regione 3'kraja iRNK
<i>Polypyrimidine tract binding protein 1</i>	~57kDa, lokalizovan u nukleusu, RNK-vezujući protein, uključen u procese iskrajanja i obrade splajsovanja i procesovanja iRNK
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34</i>	~404kDa, protein uključen u pozitivnu regulaciju kanonskog <i>Wnt</i> signalnog puta i proces ubikvitinacije
<i>Calreticulin</i>	~48kDa, lokalizovan u većem broju ćelijskih kompartmana, sa velikim brojem različitih funkcija. Protein interaguje sa RNK, iRNK, hormonima, receptorima i proteinima.

c) Vezivanje proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija za jednolančane wt i 20068T probe

Da bi se ispitala interakcija jednolančane wt i mutirane probe (ss-wt i ss-20068T) sa proteinima, dizajniran je i standardizovan *Footprinting Primer-PCR* (FP-PCR) esej. U ovom eseju jednolančani region za koga se vezuju proteini, ostaje zaštićen od delovanja S1 nukleaze i u daljem toku se koristi kao prajmer u PCR reakciji. Kao matrica za umnožavanje korišćen je wt fragment 3'kraja protrombinskog gena, u okviru koga se nalazi i mesto 20068. Pod navedenim eksperimentalnim uslovima proteini iz jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija se ne vezuju za ss-wt probu, tako da ona nije zaštićena od delovanja S1 nukleaze i biva degradovana u potpunosti. Sa druge strane, deo ss-20068T probe ostaje zaštićen proteinima tokom tretmana S1 nukleazom i u PCR reakciji

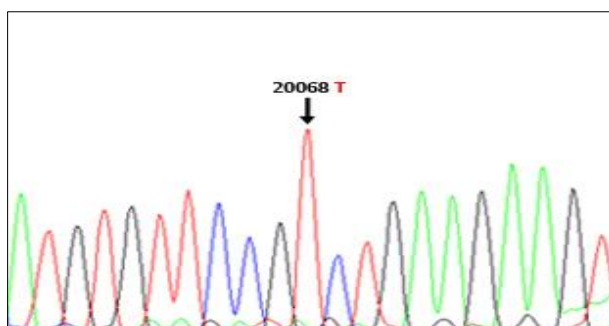
učestvuje kao prajmer, pri čemu nastaje produkt PCR reakcije dužine od oko 500 bp (Slika 32).



Slika 32. PCR produkt dobijen korišćenjem zaštićenog regiona DNK probe kao prajmera u PCR reakciji.

L-marker molekulskih dužina (50bp)

Da bi se potvrdilo da je dobijeni 20068T PCR produkt specifičan, prvo je ukloniran u pJET1.2/blunt plazmidni vektor, a zatim sekvenciran, korišćenjem prajmera koji su specifični za plazmidnu sekvencu. Deo dobijene sekvence je prikazan na Slici 33. Analiza dobijene sekvence je pokazala da se radi o specifičnom PCR produktu i da je u PCR reakciji umnožen region 3'kraja gena u kome se nalazi mesto 20068. Da je taj region zaista poreklom iz regiona koji je zaštićen proteinima od delovanja S1 nukleaze dokazuje prisutvo T nukleotida na mestu 20068 u sekvenci, bez obzira što je matrica sa koje je umnožavanje vršeno imala C nukleotid na tom mestu.



Slika 33. Deo sekvence PCR produkta dobijenog korišćenjem zaštićenog regiona ss-20068T probe kao prajmera u PCR reakciji sa A6b prajmerom.

Naši rezultati pokazuju da nukleotidna zamena C>T na poziciji 20068 dovodi do stvaranja mesta vezivanja nekih od proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija, dok to mesto ne postoji u wt probi.

5. DISKUSIJA

Prvi deo ovog istraživanja imao je za cilj određivanje učestalosti genske varijante C20068T kod pacijenata sa različitim trombotičkim poremećajima, pacijentkinja sa spontanim pobačajima, kao i u kontrolnoj, zdravoj populaciji. Kod ispitanika koji su nosioci 20068CT genotipa, određen je nivo protrombina u plazmi, da bi se utvrdilo da li ova varijanta dovodi do povećanja nivoa protrombina, što predstavlja dobro definisan faktor rizika za trombofilije.

Drugi deo istraživanja obuhvatio je funkcionalnu analizu genske varijante C20068T u *in vitro* eksperimentima, sa ciljem da se rasvetli mehanizam kojim ova genska varijanta dovodi do povećane ekspresije protrombina. Uticaj prisustva C20068T varijante praćen je na nivou ekspresije i stabilnosti iRNK, praćen je uticaj na izbor mesta iskrajanja pre-iRNK, kao i DNK-protein interakcije. *In silico* analizom utvrđen je uticaj na odabir kodona i sekundarnu strukturu poslednjeg egzona protrombinskog gena u kome se C20068T varijanta nalazi.

5.1. Učestalost genske varijante C20068T

Genska varijanta C20068T predstavlja sinonimnu varijantu u poslednjem egzonu gena za protrombin, koja dovodi do zamene CGC kodona za arginin u CGT kodon koji takođe kodira arginin na poziciji 608 u proteinu. Ova genska varijanta je u bazi podataka *dbSNP* (engl. *The Single Nucleotide Polymorphism database*) zavedena pod referentnim brojem rs3136532.

U okviru prethodne studije [159] C20068T genska varijanta je prvi put detektovana kod pacijentkinje koja je razvila masovnu trombozu nakon porođaja. U grupi od 100 pacijenata sa različitim trombotičkim manifestacijama, ova genska varijanta je detektovana kod 3 pacijenta, dok je od 100 ispitanika kontrolne grupe jedan bio heterozigotni nosilac C20068T varijante. Učestalost C20068T varijante bila je povećana u grupi pacijenata, ali to povećanje nije dostiglo statističku značajnost ($P=0,687$) [159].

Analiza učestalosti genske varijante C20068T u ovoj studiji obuhvatila je 606 pacijenata obolelih od različitih trombotičkih poremećaja i 191 ispitanika kontrolne grupe.

U kontrolnoj grupi od 191 ispitanika, detektovan je jedan heterozigotni nosilac C20068T genske varijante (0,52%). *PGA-European-Panel* grupa (*PGA-Programs for Genomic Applications*) je među 22 testirana ispitanika bele rase detektovala jednog heterozigotnog nosioca ove genske varijante (4,5%). *HapMap* grupa (deo internacionalnog *Haplotype Map* projekta) je analizom 60 ispitanika iz Evrope detektovala ovu gensku varijantu kod jednog ispitanika (1,7%). U okviru *PGA-African-Panel* grupe, koja je obuhvatila 21 ispitanika, C20068T varijanta nije detektovana. *HapMap* grupa, takođe, nije detektovala ovu gensku varijantu na uzorku od 90 ispitanika iz Azije i 60 iz Afrike. Kao i u okviru naše studije, homozigotni nosioci varijante nisu detektovani ni u jednoj od ovih studija. Učestalost C20068T varijante u zdravoj populaciji ispitanika uključenih u našu studiju je niža u odnosu na rezultate dobijenih u *PGA* i *HapMap* projektima. Međutim, ovi projekti su uključili veoma mali broj ispitanika (od 21 do 90), usled čega dobijeni rezultati ne predstavljaju pouzdan pokazatelj učestalosti ove genske varijante u ispitivanim grupama. U odnosu na učestalosti najčešćih trombofilnih markera: FV Leiden mutacije i FII G20210A varijante u zdravim populacijama, detektovana učestalost C20068T varijante je nešto niža: učestalost FV Leiden mutacije je ~5% u beloj populaciji [22], dok je učestalost FII G20210A varijante ~3% [24]. Prema dosadašnjim podacima, C20068T varijanta je, slično FV Leiden i FII G20210A, učestalija u beloj populaciji.

Naši rezultati pokazuju da je učestalost C20068T varijante povećana približno sedam puta kod pacijenata sa trombotičkim poremećajima u poređenju sa kontrolnom grupom. U grupi pacijenata sa trombotičkim poremećajima detektovano je 19 heterozigotnih nosilaca (3,39%), dok je u kontrolnoj grupi detektovan jedan heterozigotni nosilac (0,52%). Prisustvo 20068CT genotipa predstavlja statistički značajan faktor rizika za pojavu trombotičkih poremećaja (OR 6,66; 95%CI 0,87-50,78; P=0,049). U poređenju sa FV Leiden i FII G20210A, koji su najučestaliji genetički faktori rizika za trombofiliju, rezultati ove studije pokazuju da je C20068T varijanta potencijalno vrlo značajan trombofilni marker. U odnosu na učestalost FV Leiden mutacije, koja kod pacijenata sa trombofilijom iznosi 15-50% [179], učestalost C20068T varijante je niža, ali je rizik za dobijanje tromboze približno isti. FV Leiden u heterozigotnoj formi povećava rizik za tromboze 3-8 puta, dok C20068T varijanta povećava rizik oko 7 puta [28, 179]. FII G20210A varijanta je prisutna kod 6-18%

pacijenata sa trombozom i povećava rizik za trombozu oko 4 puta [153, 179, 180]. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da C20068T genska varijanta može biti uključena u standardni dijagnostički panel za trombofilije, naročito kada su kod pacijenata prisutne tromboze nepoznate etiologije.

Da bi se analizirao značaj koji genska varijanta C20068T može imati kao novi marker za trombofilije, odabrani pacijenti podjeljeni su u grupe, shodno poremećaju od kog su bolovali. U grupi pacijenata sa trombotičkim poremećajima bilo je 443 pacijenta, od čega 106 sa CVI, 101 pacijent sa PE, 175 pacijenata sa TDV i 61 pacijent sa KTP, dok je u grupi pacijentkinja sa SP bilo 163 ispitanica.

U grupi pacijenata sa CVI detektovana su tri heterozigotna nosioca (2,83%). I u ovoj grupi postoji povećana učestalost 20068CT genotipa u odnosu na kontrolnu grupu. CVI predstavlja veoma kompleksan trombotički poremećaj koji obuhvata različita stanja sa širokim spektrom manifestacija [181]. U ISCVT (engl. *International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis*) studiji, u 34% slučajeva trombofilija je predstavljala faktor rizika za CVI, dok je nasledna trombofilija bila faktor rizika u 22% slučajeva [182]. Nasledni faktori rizika za CVI nisu u potpunosti rasvetljeni. Najučestaliji faktori rizika su FV Leiden mutacija, koja je prisutna kod 10-25% pacijenata sa CVI, dok je FII G20210A varijanta prisutna kod 20% pacijenata sa CVI [183]. Naši rezultati pokazuju da je C20068T varijanta u odnosu na FV Leiden mutaciju i FII G20210A varijantu, ređe prisutna kod pacijenata sa CVI, ali imajući u vidu da je ova varijanta oko 5 puta učestalija kod pacijenata sa CVI u odnosu na kontrolnu grupu, ona može predstavljati značajni faktor rizika. Obzirom da je u ovu studiju uključeno samo 106 pacijenata sa CVI, da bi se u potpunosti rasvetlila uloga koju ova varijanta može imati u njegovoj patogenezi, potrebno je studiju sprovesti na većem broju pacijenata.

Zapažen je trend povećanja učestalosti heterozigotnih nosilaca C20068T genske varijante i u grupi pacijenata sa PE (2,97%) i TDV (3,43%) u odnosu na kontrolnu grupu. Iako se smatralo da PE i TDV imaju istu etiologiju, nedavna istraživanja su pokazala da se faktori rizika koji dovode do ova dva trombotička poremećaja značajno razlikuju [184]. Nasledne trombofilije su prisutne kod 30-40% pacijenata sa TDV [185], dok su podaci vezani za izolovane PE kontradiktorni. Desmarais i saradnici su prvi put primetili da je učestalost rezistencije na aktivirani protein C, u čijoj osnovi je FV Leiden

mutacija, niža kod pacijenata sa izolovanim PE [186]. Kasnije studije su potvrdile da se učestalosti FV Leiden mutacije razlikuju kod pacijenata sa izolovanim PE i TDV. Manten i saradnici su pokazali da je FV Leiden mutacija prisutna kod 9% pacijenata sa izolovanim PE i kod 17% pacijenata sa TDV [180]. Ovaj rezultat, koji je nazvan "FV Leiden paradoks", je potvrđen i u studiji Martineli i saradnika [187] i Grifoni i saradnika [188]. Sa druge strane, značaj G20210A varijante kao faktora rizika za PE i TDV nije u potpunosti rasvetljen. Margaglione i saradnici su pokazali da je FII G20210A učestalija kod pacijenata sa TDV (14,2%), dok je učestalost u grupi pacijenata sa PE bila niža (8,7%) [189]. Martineli i saradnici su pokazali da FIIG20210A predstavlja značajan faktor rizika za izolovane PE [190]. Naši rezultati su pokazali da je učestalost C20068T varijante veća u grupi pacijenata sa TDV u odnosu na pacijente sa PE, što doprinosi hipotezi o različitim faktorima rizika koji su u osnovi patologije TDV i izolovanog PE. Kada je u pitanju FV Leiden mutacija, njeno prisustvo povećava rizik za TDV 4,5 puta, dok u slučaju izolovanog PE predstavlja blag faktor rizika (OR 1,7) [191]. Prisustvo G20210A varijante povećava rizik za TDV oko 3 puta [189], a studije nisu dale jasne rezultate o riziku koji G20210A predstavlja za izolovane PE. Naša studija je pokazala da C20068T varijanta može predstavljati značajni faktor rizika (OR 6,74, P=0,057) za TDV, dok je za izolovane PE taj rizik manji (OR 5,81; P=0,12). Da bi se rasvetlio značaj C20068T varijante za ove trombotičke poremećaje, potrebno je studiju proširiti na veći broj pacijenata.

Kada su u pitanju kombinovani trombotički poremećaji, učestalost 20068CT genotipa je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolnu grupu (4,92%; P<0,005). U literaturi ne postoji mnogo podataka o naslednim faktorima rizika za KTP. Najučestalije manifestacije KTP su TDV praćene sa PE. Studije su pokazale da su i FV Leiden i FII G20210A veoma značajni faktori rizika u slučajevima kada su TDV komplikovane sa PE [188-190, 192]. Naši rezultati su pokazali da je C20068T varijanta značajni faktor rizika (OR 9,83; 95% CI 1,00-96,30; P=0,045) za nastanak KTP, čak i ako je studija obuhvatila ovako malu grupu pacijenata (samo 61). Ove rezultate je potrebno potvrditi u većim studijama.

U grupi pacijentkinja sa SP detektovana su 4 heterozigotna nosioca C20068T genske varijante (2,45%), dok u kontrolnoj grupi od 75 žena, koje nisu imale spontane pobačaje i imale bar jednu uspešnu trudnoću, nije detektovan nijedan nosilac. Međutim,

ta razlika u učestalosti nije dostigla statističku značajnost (OR 4,26; 95%CI 0,23-80,15; P=0,31). Trudnoća sama po sebi predstavlja hiperkoaguabilno stanje koje se karakteriše porastom koncentracije faktora koagulacije, koje omogućava zaštitu majke tokom porođaja. Trombofilija, nakon hromozomskih abnormalnosti, predstavlja drugi najčešći uzrok SP, naročito u prvom trimestru trudnoće. Uloga naslednih trombofilnih faktora rizika u etiologiji SP nije u potpunosti razjašnjena, a rezultati asocijativnih studija su kontradiktorni. Reznikoff-Etievan i saradnici su pokazali da FV Leiden i FII G20210A predstavljaju značajne faktore rizika za rane spontane pobačaje, pre desete nedelje gestacije [193]. U ovoj studiji, heterozigotni nosioci FV Leiden i FII G20210A imali su skoro tri puta povećan rizik od SP. U studiji Finana i saradnika, 41% žena sa ponovljenim SP je bilo nosilac FV Leiden mutacije, dok je ~14% žena imalo FII G20210A [194]. Sa druge strane, Dajli i saradnici nisu našli statistički značajno povećanje učestalosti FV Leiden i FII G20210A kod pacijentkinja sa ponovljenim SP [195]. Učestalost C20068T varijante u našoj studiji je niža od učestalosti u gorepomenutim studijama, međutim naši rezultati pokazuju da prisustvo ove genske varijante u mnogo većoj meri, skoro 4,5 puta, povećava rizik za pojavu SP. Obzirom na vrlo kompleksnu i nerazjašnjenu etiologiju SP, prisustvo C20068T varijante treba posmatrati kao dodatni faktor rizika koji doprinosi patologiji SP. Imajući u vidu da je u ovu studiju uključeno samo 75 ispitanica kontrolne grupe, kod kojih nije detektovano prisustvo C20068T varijante, dobijene rezultate bi trebalo potvrditi u studijama koji će uključiti veći broj ispitanica.

Rezultati ove studije predstavljaju prve podatke o učestalosti C20068T u različitim trombotičkim poremećajima i ukazuju na značaj ove varijante kao novog trombofilnog markera. Važno je naglasiti da su u ovu studiju uključeni samo pacijenti kod kojih nisu prisutni najznačajniji genetski faktori rizika: FV Leiden mutacija, FII G20210A varijanta i deficijencije proteina C, proteina S i antitrombina. Kombinacija FV Leiden mutacije i FII G20210A varijante je prisutna kod više od dve trećine pacijenata sa trombofilijom, dok deficijencije proteina C, proteina S i antitrombina, iako predstavljaju manje učestale faktore rizika, imaju značajnu ulogu u patogenezi trombofilije. Na ovaj način mogli smo da analiziramo ulogu C20068T varijante u patogenezi trombofilije i njen potencijalni značaj kao trombofilnog markera nezavisno od drugih genetskih faktora rizika. Rezultati naše asocijativne studije pokazuju da je

učestalost C20068T varijante u kontrolnim grupama niža od 1%, dok u definisanim grupama pacijenata sa trombotičkim poremećajima i spontanim pobačajima postoji trend višestruko povećane učestalosti. Prisustvo 20068CT genotipa povećava rizik za pojavu trombotičkih poremećaja od 4,26 do čak 9,83 puta, što je bio slučaj u grupi pacijenata sa KTP. Na osnovu dobijenih rezultata C20068T varijanta predstavlja značajan trombofilni marker kod pacijenata kod kojih nisu prisutni drugi genetski faktori rizika. Njegovo uključivanje u standardni trombofilni paket bi omogućilo dijagnostikovanje nasledne trombofilije kod više od 3% pacijenata, kod kojih uzrok tromboza nije utvrđen, što bi u značajnoj meri doprinelo pravilnom terapijskom pristupu i poboljšalo prevenciju rekurentnosti oboljenja kod ovih pacijenata.

5.2. Kvantifikacija količine protrombina

Prethodne studije su pokazale da je povišeni nivo protrombina u plazmi sam po sebi faktor rizika za nastanak tromboza [24], ali mehanizam kojim dovodi do formiranja patoloških trombova nije sasvim razjašnjen. Smatra se da povišeni nivo protrombina može dovesti do disbalansa u regulaciji prokoagulantnog, antikoagulantnog i fibrinolitičkog sistema. Visoke koncentracije protrombina dovode do povećanog stvaranja trombina, što može uticati na povećan stepen koagulacije i stvaranja fibrinskih ugrušaka. Faktori koji dovode do povećanja nivoa protrombina u plazmi nisu u potpunosti poznati. Sve mutacije koje su do sada opisane u kodirajućem delu gena za protrombin dovode do njegove smanjene aktivnosti i/ili smanjene količine proteina u plazmi. Međutim, u poslednje dve decenije opisan je veći broj genskih varijanti u 3' regionu protrombinskog gena koje doprinose povećanju nivoa protrombina. Poort i saradnici su pokazali da je G20210A varijanta udružena sa povišenim nivoom protrombina i da nosioci 20210A alela imaju značajno povišen nivo protrombina u odnosu na nenosiocce [24]. Ovi rezultati su potvrđeni kasnijim studijama od strane Simionija i Selija (1,05 U/mL kod nenosilaca u odnosu na 1,32 U/mL kod nosilaca FIIIG20210A) [153, 196]. Seli i saradnici su takođe pokazali da genska varijanta A19911G dovodi do blagog povećanja nivoa protrombina u plazmi. Nosioci GG genotipa, imaju nivo protrombina od 107,2 U/dL u odnosu na 99,0 U/dL koliko je izmereno kod nosilaca AA genotipa. Takođe, prisustvo A19911G varijante kod nosilaca 20210A alela dovodi do dodatnog povećanja nivoa protrombina [153]. FII C20221T

genska varijanta opisivana je sporadično kod nekoliko pacijenata sa različitim trombotičkim poremećajima i takođe je udružena sa povišenim nivoom protrombina [127].

Uticaj prisustva 20068CT genotipa na nivo protrombina ispitivan je relativnom kvantifikacijom količine protrombina u plazmi pacijenata za koje je utvrđeno da su heterozigotni nosioci ove varijante. Relativna kvantifikacija rađena je nakon detekcije signala *Western blot* analizom u odnosu na komercijalno dostupnu standardnu plazmu. Kao kontrolni, određivani su nivoi protrombina kod heterozigotnih nosilaca G20210A varijante i kod pacijenta za koga je pokazano da nije nosilac nijedne genske varijante u 3'regionu protrombinskog gena (označen kao simptomatski nenosilac). Rezultati pokazuju da prisustvo 20068CT genotipa dovodi do statistički značajnog povećanja količine protrombina u plazmi pacijenta ($143,65 \pm 28,8$ u odnosu na 100, kolika je dodeljena referentna vrednost standardne plazme). Detektovano povećanje je vrlo slično onom dobijenom za 20210GA genotip ($163,64 \pm 21,8$), dok su vrednosti dobijene za simptomatskog nenosioca odgovarale vrednostima za standardnu plazmu.

Dobijeni rezultati predstavljaju prve podatke o uticaju genske varijante C20068T, na nivo protrombina kod pacijenata sa trombofilijom. U daljim studijama, koje bi obuhvatile veći broj učesnika, potrebno je pratiti nivo protrombina u dužem vremenskom periodu, da bi se ovi rezultati potvrdili.

Naši rezultati pokazuju da je C20068T funkcionalna varijanta i da dovodi do povećanja količine protrombina u plazmi. To povećanje odgovara rezultatima dobijenim za G20210A varijantu, za koju je u većem broju studija potvrđeno da dovodi do povišenog nivoa protrombina [24, 153]. Obzirom da prisustvo C20068T varijante ima funkcionalne posledice, u vidu povećanja nivoa protrombina u plazmi, za koji je već utvrđeno da je trombofilni faktor rizika, ovi rezultati potvrđuju da ona predstavlja novi i značajan marker za trombofilije koga treba uključiti u rutinski panel trombofilnih testova.

5.3. Funkcionalna analiza genske varijante C20068T

5.3.1. Određivanje broja kopija inserata u ćelijskim klonovima esejem qfPCR-kapilarna elektroforeza

Ćelijske linije predstavljaju nezamenljiv model sistem za biomedicinsku primenu [197]. Sisarske ćelije se koriste prilikom ispitivanja genske funkcije, ekspresije i mehanizama regulacije zbog sposobnosti da sintetišu, procesuju, pravilno saviju i modifikuju sekretovane humane proteine. Ćelijske linije mogu se transfekovati tranzijentno ili stabilno, u zavisnosti od vrste eksperimenta i analize koja se vrši. Tranzijentna transfekcija se koristi za analizu kratkoročnog uticaja transfekovanog konstrukta, bez njegove integracije u genom ćelije domaćina. Stabilna transfekcija podrazumeva integraciju gena od interesa u genom ćelije domaćina, što omogućava dugoročnu analizu proteinske ekspresije i mehanizama regulacije ciljnog gena. Međutim, na transgenu ekspresiju u stabilno transfekovanim sisarskim ćelijama utiče veći broj faktora, od kojih je broj kopija transgena koji su insertovani u genom jedan od najznačajnijih.

Broj kopija inserata transgena u stabilno transfekovanim sisarskim ćelijama je tradicionalno određivan metodom *Southern blot* [198]. Poslednjih godina razvijene su nove metode za semikvantitativno ili kvantitativno određivanje broja kopija transgena. *Real-time* PCR predstavlja metodu izbora kada je u pitanju determinacija broja kopija inserata u transfekovanim ćelijama, obzirom na širok dinamički opseg moguće kvantifikacije i malu količinu polaznog materijala [199]. Međutim, *real-time* PCR ima i određena ograničenja, kao što su cena fluorescentno obeleženih proba za svaki ciljani gen i otežana standardizacija multipleks reakcija za veći broj referentnih gena [200].

U okviru ove doktorske teze standardizovan je esej za određivanje broja kopija inserata koji se zasniva na upotrebi fluorescentno obeleženih prajmera i detekciji signala nakon kapilarne elektroforeze [170]. U ovoj metodi, ciljani protrombinski fragment se koamplifikuje sa internom genomskom kontrolom u istoj mikrotubi, čime se obezbeđuje kontrola varijabilnosti, jer svi faktori koji utiču na prinos PCR reakcije, utiču u istoj meri na kontrolu i ciljani fragment. Kao interna kontrola korišćen je fragment gena za 18S rRNK. Produkti PCR reakcije su razdvajani kapilarnom elektroforezom, a detekcija signala vršena je *Gene Mapper 4.0* softverom. Korišćenjem ovog pristupa, detektovani

su wt i 20068T ćelijski klonovi koji sadrže odgovarajući broj kopija. Ovi ćelijski klonovi su korišćeni u eksperimentima određivanja ekspresije protrombinske iRNK u odsustvu i prisustvu mutacije.

Rezultati dobijeni ovim esejem su potvrđeni korišćenjem *real-time* PCRa kao standardne metode. Za potrebe naše studije uticaja prisustva 20068T varijante na ekspresiju protrombina, bilo je potrebno identifikovati ćelijske klonove koji imaju isti broj kopija inserata, bez preciziranja broja inserata. Standardizovani esej je semikvantitativan i ne može se koristiti za određivanje apsolutnog broja kopija inserata bez određenih modifikacija. U poređenju sa drugim metodama, opisani esej je brz i precizan, potrebne su male količine DNK matrice, ne zahteva dodatno prečišćavanje nakon PCR reakcije, te se može koristiti kao brz metod za relativnu determinaciju broja kopija u velikom broju transfekovanih ćelija [170].

5.3.2. Praćenje ekspresije gena za protrombin u odabranim klonovima relativnom kvantifikacijom iRNK

Prethodna studija sprovedena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, IMGGI pokazala je da prisustvo 20068T varijante dovodi do povećane ekspresije iRNK za protrombin 1,64 puta u odnosu na wt varijantu [159]. Takođe, u prethodnoj studiji je pokazano da je to povećanje količine iRNK srazmerno povećanju do koga dovodi prisustvo 20210A alela (1,65 puta), koji je već poznati faktor rizika za trombofiliju i dokazano je da dovodi do povećanog nivoa protrombina [24]. Međutim, ova studija je rađena na heterogenoj populaciji ćelija, u kojoj su prisutne ćelije sa različitim brojem insertovanih kopija transgena [159]. Prednost ovakvog pristupa je u tome što se prilikom transfekcije heterogena populacija ćelija eksperimentalno lakše propagira, jer ne postoji korak selekcije klonova sa određenim brojem kopija inserta. Ali upravo zbog odsustva ove selekcije, ćelije u heterogenoj populaciji imaju različit broj kopija inserta, što teorijski može uticati na dobijene rezultate.

Da bi se potvrdilo da uočeno povećanje ekspresije iRNK nije posledica neravnomerne zastupljenosti ćelija sa različitim brojem kopija transgena u heterogenim populacijama ćelija, ekspresija protrombinske iRNK je praćena u wt i 20068T ćelijskim klonovima za koje je utvrđeno da imaju isti broj kopija. Naši rezultati su pokazali da prisustvo 20068T varijante dovodi do povećane ekspresije protrombinske iRNK i u

ćelijama sa istim brojem kopija inserta. Detektovano povećanje (1,60 puta) odgovara povećanju koje je dobijeno u heterogenoj populaciji ćelija (1,64 puta), čime je pokazano da dobijeni rezultat nije posledica neravnomerne distribucije ćelija sa povećanim brojem kopija transgena u 20068T ćelijskoj populaciji. Na osnovu pregleda literature, ovo je prva studija u kojoj su za praćenje ekspresije korišćeni i pristup sa heterogenom populacijom ćelija i pristup sa ćelijskim klonovima sa istim brojem kopija inserta. Naša studija pokazuje da oba eksperimentalna pristupa daju iste rezultate.

5.3.3. *In silico* predikcije uticaja prisustva C>T nukleotidne zamene na poziciji 20068

Prethodni rezultati su pokazali da je C20068T funkcionalna varijanta, čije prisustvo dovodi do povećane količine protrombina u plazmi i povećane ekspresije na nivou iRNK. Da bi se usmerila dalja istraživanja u pravcu rasvetljavanja mehanizma kojim C20068T varijanta dovodi do promena u ekspresiji protrombina, urađene su *in silico* predikcije da bi se utvrdilo na kom nivou regulacije ekspresije bi ova varijanta mogla imati potencijalnu ulogu.

Studije frekvence SNPova u humanom genomu pokazale su da se 60% SNPova nalazi van kodirajućih regiona genoma [201]. Od preostalih 40%, preko 90% se dešava u intronima, dok se u kodirajućem delu genoma događa oko 1,5% nesinonimnih zamena i 1,1% sinonimnih zamena, ukazujući na činjenicu da je kodirajući deo genoma pod velikim evolutivnim pritiskom očuvanja funkcionalne sekvence. Najčešće promene koje se dešavaju u kodirajućem genomu su tranzicije (C>T, T>C, A>G, G>A) i pretpostavlja se da se u kodirajućem genomu dešavaju sa višom frekvencijom [202]. Za sinonimne mutacije se smatralo da su "tihe" i kao takve, trebalo bi da imaju višu stopu mutiranja u odnosu nesinonimne. Međutim, frekvence sinonimnih i nesinonimnih zamena u kodirajućem genomu su slične. Štaviše, pokazano je da je frekvencija nesinonimnih zamena veća od frekvencije sinonimnih zamena, što može biti posledica različitih frekvencija nukleotida na svakoj od tri pozicije u kodonu. Kada su u pitanju sinonimne zamene, sinonimni kodoni se najčešće razlikuju u nukleotidu na trećoj poziciji u kodonu. Analiza je pokazala da je sa 17%, timin najređi nukleotid na trećoj poziciji, kada su u pitanju sinonimni polimorfizmi [201].

Naši rezultati su pokazali da je CGT kodon, nastao uvođenjem C u T zamene na mestu 20068 u protrombinskom genu, najređe upotrebljavani kodon za arginin. Na osnovu ove predikcije 20068T varijanta bi trebalo da dovodi do smanjene ekspresije protrombina. Međutim, poređenje CAI (engl. *Codon Adaptation Index*) za CGC i CGT kodone je pokazalo vrlo bliske vrednosti. CAI vrednost predstavlja meru adaptivnosti upotrebe kodona u kontekstu efikasne ekspresije gena. Na osnovu svega ovog, predikcija je pokazala da izbor kodona najverovatnije nije uzrok povećane ekspresije protrombina u prisustvu C20068T varijante.

Sekundarna struktura iRNK je u najvećoj meri determinisana primarnom nukleotidnom sekvencom. Nedavna istraživanja pokazuju da su sinonimne zamene u genomu pod snažnim evolutivnim pritiskom zbog činjenice da utiču na stabilnost sekundarnih struktura u molekulu iRNK kod sisara [201, 203]. Sinonimne zamene ne menjaju samo *stem-loop* strukture u iRNK, već utiču i na stepen degradacije iRNK i translacije, što može biti povezano sa patološkim stanjima [204]. Bioinformatičke analize su pokazale da sekundarne strukture iRNK značajno utiču i na proces iskrajanja i alternativnog iskrajanja introna, kroz sastavljanje splajsozomalne mašinerije i interakcije sa RNK-vezujućim proteinima [205].

Liu i saradnici su pokazali da 3'kraj gena za protrombin ispoljava značajnu heterogenost u sekvenci koja može da se odražava na različitosti u iskrajanju 3'kraja i poliadenilaciji. Za FII G20210A varijantu je pokazano da nema značajnih uticaja na lokalnu sekundarnu strukturu, obzirom da i 20210G i 20210A alel formiraju homologe strukture ukosnica [206].

Da bismo ispitali uticaj koji C20068T varijanta može imati na sekundarnu strukturu egzona u kome se nalazi, uradili smo predikciju sekundarne strukture pomoću *RNAfold* i *Mfold* programa i utvrdili da prisustvo C>T zamene dovodi do formiranja energetski povoljnijih sekundarnih struktura u odnosu na wt sekvencu. *RNAfold* programski paket je pokazao da T na mestu 20068 dovodi do povećanja verovatnoće komplementarnog sparivanja baza unutar egzona i smanjuje minimalnu slobodnu energiju za 2 kcal/mol. *Mfold* program je pokazao da T na mestu 20068 dovodi do restrukturiranja sekundarne strukture egzona, u kojoj je T u okviru asimetrične jednolančane petlje, za razliku od wt sekvence egzona, u kojoj se C na poziciji 20068

nalazi u blizini *bulge* petlje (Slika 26). Ovaj program je potvrdio povećanje minimalne slobodne energije sekundarne strukture sa timinom na mestu 20068.

Prve dokaze da sinonimni polimorfizmi utiču na sekundarnu strukturu iRNK dali su Nakli i saradnici [207], u studiji na haplotipovima katehol-O-metiltransferaze (COMT). Postoje tri različita haplotipa *COMT* gena (LPS, APS i HPS haplotipovi), koji čine 4 SNPa, od čega su dva sinonimna polimorfizma. Sinonimne zamene prisutne su u LPS i HPS haplotipovima. Predikcije sekundarnih struktura haplotipova pokazale su da je LPS haplotip asociran sa najvećom slobodnom energijom i najmanje stabilnom strukturom ukosnice, dok je HPS haplotip bio asociran sa najstabilnijom ukosnicom i najmanjom minimalnom slobodnom energijom. Eksperimentalno je pokazano da je HPS haplotip takođe udružen sa najmanjom enzimskom aktivnošću COMT i najmanjom količinom proteina. Prisustvo sinonimnih polimorfizama u LPS i APS haplotipu dovelo je do povećanja aktivnosti i količine proteina, ali i stvaranja manje stabilnih sekundarnih struktura [207].

Suprotno tome, C20068T varijanta dovodi veće stabilnosti sekundarne strukture egzona 14, ali i do povećanja količine protrombina. Obzirom da *in silico* analiza sekundarne strukture ne može da predvidi fiziološke efekte koje sinonimni polimorfizmi imaju na ekspresiju gena, funkcionalnim analizama potrebno je potvrditi da je promena sekundarne strukture poslednjeg egzona zaista deo mehanizma kojim ova genska varijanta doprinosi povećanju količine protrombina.

Pretraživanje *MiRBase* baze podataka je pokazalo da prisustvo mutacije ne utiče na vezivanje mikroRNK. Međutim, kako je u pitanju deo gena sa nekanonskom organizacijom i vrlo dinamičnom ulogom u procesima regulacije ekspresije protrombina, potrebno je pretragu proširiti na veći broj baza i *in vitro* studije.

Prethodno urađena *in silico* predikcija vezivanja proteina koji se vezuju za region 3'kraj gena za protrombin uz pomoć *SpliceAid* baze podataka, pokazala je da prisustvo 20068T varijante ukida mesto vezivanja za SRP-40 protein (SFRS5, engl. *splicing factor, arginine/serine-rich-5*), koji ima ulogu u iskrajanju transkripta [159, 208]. Za ovaj region (wt i 20068T) se vezuju i ETR-3 (engl. *Elav-type ribonucleoprotein*) i CUG-BP (engl. *CUG binding protein*), koji učestvuju u alternativnoj obradi pre-iRNK [209]. Ova predikcija pokazuje da C20068T varijanta najverovatnije utiče na interakcije proteina sa nukleinskim kiselinama.

5.3.4. Određivanje stabilnosti iRNK za protrombin u ćelijama stabilno transfekovanim wt i 20068T konstruktima

Stabilnost iRNK je veoma značajna za gensku ekspresiju. Faktori koji utiču na stabilnost transkripta mogu se podeliti u dve kategorije: *cis* faktori, odnosno karakteristike samog transkripta i *trans* faktori poput faktora rasta, RNaza, RNK-vezujućih proteina, jona, kiseonika itd [173]. Sinonimni polimorfizmi u tom smislu predstavljaju *cis* faktore i deluju na stabilnost iRNK preko više mehanizama. Za sinonimne polimorfizme *CDSN* gena, koji kodira protein korneodezmozin, koji je overekspimiran kod pacijenata sa psorijazom, pokazano je da dovode do povećanja stabilnosti iRNK [210]. Takođe, sinonimni polimorfizmi u ovom genu menjaju i afinitet vezivanja transkripta sa citoplazmatskim RNK-vezujućim proteinima. Za sinonimne polimorfizme koji se dešavaju u *ABCC2* genu, asociiranom sa Dubim-Džonsonovim sindromom, je pokazano da povećavaju stabilnost iRNK, što za posledicu ima povišenu ekspresiju proteinskog produkta [211]. Heterozigotni nosioci sinonimnog polimorfizma ispoljavaju različitu farmakokinetiku pravastatina, leka koji se primenjuje protiv povišenog nivoa holesterola u krvi, a koji je supstrat za delovanje *ABCC2* [212]. Sa druge strane, sinonimni polimorfizmi u humanom dopaminskom receptoru D2 dovode do smanjene stabilnosti iRNK i stope translacije [213].

Da bismo ispitali uticaj C20068T genske varijante na stabilnost protrombinske iRNK, ćelije transfekovane wt i 20068T konstruktima tretirane su aktinomicinom D, globalnim inhibitorom transkripcije. Ovaj metodološki pristup podrazumeva merenje stope degradacije date iRNK tokom vremena, od trenutka kada se njena transkripcija inhibira. Naši rezultati su pokazali da konstrukti sa T na mestu 20068 ne pokazuju statistički značajne promene stabilnosti protrombinske iRNK u odnosu na wt transkripte. iRNK za wt i mutirani konstrukt su pokazale sličan obrazac degradacije tokom trajanja čitavog tretmana aktinomicinom D.

Iako se 6h nakon tretmana detektuje smanjenje količine iRNK, tokom 18 i 24h je detektovan naizgled paradoksalni porast količine iRNK za protrombin i u wt u 20068T konstruktima. Ovaj fenomen je najverovatnije posledica brže stope degradacije i kraćeg polu-života iRNK za neomicin-fosfotransferazu, koja je korišćena kao endogena kontrola u odnosu na koju je normalizovana ekspresija protrombinske iRNK. Ovo bi se moglo prevazići time što bi u budućim eksperimentalnim postavkama, kao

endogena kontrola, bio uključen neki od gena čije iRNK ima dugačak poluživot, kao što su, geni koji kodiraju proteine uključene u metabolizam, formiranje citoskeleta ili ekstracelularnog matriksa.

Dobijeni rezultati nisu potvrdili rezultat *in silico* predikcije, koja je pokazala da postoji povećana stabilnost iRNK u prisustvu 20068T varijante, ali ne isključuju mogućnost da sinonimna C20068T varijanta deluje, bar delimično, preko menjanja stabilnosti iRNK. Obzirom da ispitivanje stabilnosti iRNK putem inhibicije aktinomicinom D predstavlja sistem sa najmanjom osetljivošću, osetljiviji sistem, poput upotrebe plazmida sa tetraciklin inducibilnim promotorima, usmeren isključivo na ciljanu protrombinsku iRNK, dao bi uvid u potencijalni mehanizam fine regulacije ekspresije protrombina preko regulacije stabilnosti iRNK [173].

5.3.5. Određivanje razlika u mestu iskrajanja protrombinske iRNK izolovane iz ćelija stabilno transfekovanih wt i 20068T konstruktima

Poslednjih godina, sve je veći broj dokaza o značaju alternativne poliadenilacije (APA) u regulaciji ekspresije gena i dužine 3'UTRa. *Genome-wide* studije izvedene na algama, biljkama, kvascima, crvima, miševima i čoveku su pokazale da broj gena sa kojih se prepisuju transkripti sa alternativnim poli(A) mestima varira od 10% kod *S.cerevisiae* do preko 50% kod čoveka. Alternativnom poliadenilacijom nastaju transkripti različitih dužina i funkcija, čime se obezbeđuje fina vremensko-zavisna i tkivno-specifična ekspresija gena [214]. Postoje dva osnovna tipa alternativne poliadenilacije. CR-APA (*coding region-APA*), podrazumeva da su alternativna mesta poliadenilacije smeštena u okviru egzona i introna i dovodi do stvaranja različitih izoformi proteina. Sa druge strane, u najvećem broju slučajeva, alternativna poliadenilaciona mesta smeštena su u 3'UTRu gena, čime nastaju transkripti sa različitim dužinama 3'regiona, ali istom proteinskom sekvencom i funkcijom (UTR-APA). APA koja se dogodi u kodirajućem regionu utiče na proteinsku funkciju kvalitativno, dok APA koja se dogodi u netranslatirajućem regionu utiče kvantitativno na nivo proteina [215].

Kao što je opisano u poglavlju Uvod, 3'kraj protrombinskog gena ima nekanonsku organizaciju [128]. On poseduje aktivni uzvodni regulatorni element (*USE*), neefikasno mesto iskrajanja i manje aktivni nizvodni regulatorni element (*DSE*).

Dankvart i saradnici su pokazali da 3'kraj protrombinskog gena poseduje jedinstvenu arhitekturu koja ga čini osetljivim na trombofilne *gain of function* mutacije [127].

Naša studija je obuhvatila određivanje potencijalnih razlika u mestu iskrajanja između protrombinskih iRNK dobijenih iz ćelija transfekovanih wt i 20068T konstruktima, metodom modifikovanog 3'RACE. Rezultati su pokazali da prisustvo 20068T varijante dovodi do stvaranja transkripata sa manjom dužinom 3'kraja u poređenju sa wt transkriptima.

Obzirom na nekanonsku organizaciju protrombinskog 3'kraja, moguće je da dodatni uracil na poziciji 20068 dodatno stabilizuju USE element, koji je od ključnog značaja za poliadenilaciju protrombinske iRNK i dovodi do aktiviranja alternativnih mesta poliadenilacije lociranih uzvodno od pozicije 20210, za koju je pokazano da je glavno mesto iskrajanja u protrombinskoj iRNK [161, 216, 217].

U 3'UTRu se nalaze mnogobrojne regulatorne sekvence, uključujući ARE sekvence i vezivna mesta za mikroRNK. Duži 3'kraj gena znači da se u njemu češće nalaze ovi regulatorni signali i stoga je iRNK podložnija negativnoj regulaciji [218, 219]. Takođe, dužina 3'kraja negativno je korelisana sa količinom proteina, tako da iRNK transkripti sa kraćim 3'UTRom generišu veće količine proteina, što je pokazano u slučaju kancera i proliferišućih ćelija [220, 221], a što je slučaj i sa 20068T varijantom u okviru ove studije.

5.3.6. DNK-protein interakcije

a) Analiza DNK-protein interakcija i identifikacija vezanih proteina

Za utvrđivanje DNK-protein interakcija korišćen je EMSA metod sa dvolančanim DNK probama (wt i 20068T).

Rezultati su pokazali da dolazi do formiranja više specifičnih kompleksa, i u slučaju HepG2 i u slučaju HeLa jedarnog ćelijskog ekstrakta. Formirani kompleksi su uspešno hlađeni dodavanjem wt i mutirane probe u višku, a dodavanje nespecifične probe nije dovodilo do gubitka formiranih kompleksa. Takođe je utvrđeno da se jedarni proteini sa većim afinitetom vezuju za wt probe, što ukazuje na mogućnost da prisustvo T na poziciji 20068 utiče na interakcije proteina sa ovim regionom protrombinskog gena. Ovi rezultati dobijeni su korišćenjem dve kancerske ćelijske linije, tako da bi u

buduća istraživanja trebalo uključiti i primarnu ćelijsku liniju hepatocita, da bi se dobio jasniji uvid u interakcije DNK i proteina.

U cilju identifikacije proteina vezanih u kompleksu sa probama, region gela u kome se nalazio kompleks C1 (Slika 30) isecan je sa gela za uzorke wt i 20068T probe, koji su inkubirani sa proteinima jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija, a kao kontrolni uzorci su paralelno isecani odgovarajući regioni za uzorke slobodnih proba koje nisu inkubirane sa proteinima, kao i odgovarajući region za uzorak koji je sadržao samo proteine jedarnog ekstrakta, bez DNK proba. Isecani regioni su podvrgnuti digestiji tripsinom, nakon čega su dobijeni peptidi analizirani masenom spektrometrijom pomoću *Orbitrap LTQ XL* aparata. Detekcija peptida rađena je pod rigoroznim uslovima, sa analizom 5 najzastupljenijih peptida u svakom skeniranju.

Iz dalje analize su najpre eliminisani svi proteini koji su detektovani u kontrolama. To su pre svega bili keratini, koji su najčešći kontaminanti prilikom masene spektrometrije. Dodatno, u uzorku u kome su se nalazi samo proteini jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija, detektovan je nukleolin, koji je takođe izuzet iz daljeg razmatranja.

Naši rezultati pokazuju da postoji značajna razlika u broju detektovanih proteina, vezanih za wt i mutiranu probu (Tabela 5). U kompleksu sa wt probom je detektovan veći broj proteina, iako se kompleksi detektovani u eksperimentima vezivanja nalaze na istoj visini u gelu. Ovakav rezultat može biti posledica različitog afiniteta vezivanja proteina za wt i mutiranu probu, usled čega su proteini vezani za mutiranu probu bili ispod praga detekcije masenog spektrometra.

Protein koji se vezuje za polipirimidinski trakt (engl. *Polypyrimidine tract binding protein 1-PTBPI*) detektovan je samo u kompleksu koji formira wt proba, a ne i mutirana proba, kao i heterogeni nuklearni ribonukleoproteini (hnRNP) A2/B1, H, A3 i Q, HuR i 4 proteina koji pripadaju proteinima endoplazmatičnog retikuluma, dok je u oba uzorka detektovan hnRNP A1 protein. U kompleksu sa mutiranom probom detektovan je i kalretikulin, koji nije prisutan u kompleksu sa wt probom.

PTBP-1 protein se preferencijalno vezuje za polipirimidinske delove nukleinskih kiselina [222]. Ovaj protein ima sposobnost transporta između nukleusa i citoplazme [223], čime učestvuje u većem broju različitih procesa, kao što su splajsovanje [224, 225], obrada i poliadenilacija 3'kraja [226, 227], stabilnost iRNK [228] i inicijacija translacije [229]. Smatra se da je PTBP-1 šaperon koji ima sposobnost da se vezuje za

RNK, vrši njeno restruktuiranje i time deluje kao aktivator ili represor drugih proteina [230]. PTBP-1 je protein od 57kDa i poseduje 4 RRM motiva (engl. *RNA recognition motifs*) koji mogu da se vezuju za različite delove molekula RNK [231]. Takođe, na N-terminalnom kraju proteina se nalaze signali za lokalizaciju u jedro i eksport iz jedra. PTBP-1 deluje kao represor alternativnog splajsovanja, favorizujući preskakanje alternativnih egzona. Pokazano je da PTPB-1 istovremeno favorizuje i inhibira isecanje 3'kraja iRNK. Vezivanjem za USE element, PTBP-1 stimuliše poliadenilaciju, a inhibiciju poliadenilacije vrši kroz kompeticiju sa CstF proteinom. PTPB-1 povećava stabilnost iRNK, tako što vezivanjem za 3'UTR sprečava vezivanje proteina uključenih u degradaciju iRNK [222]. U literaturi ne postoje podaci da ovaj protein može da se veže za dvolančanu DNK i njegova direktna uloga u regulaciji transkripcije nije poznata.

Familiju hnRNP proteina čini najmanje 20 visoko zastupljenih hnRNP i veći broj manje zastupljenih proteina [232, 233]. Svi članovi familije imaju iste modularne strukture koje čine RNK-vezujući domeni-RRM (engl. *RNA recognition motifs-RRM*) [232, 234]. Ovi motivi učestvuju u opštim i specifičnim interakcijama sa nukleinskim kiselinama i drugim proteinima. Osim RRM, prisutni su i drugi strukturni domeni poput RGG *boxes*, koji predstavljaju Arg-Gly-Gly-ponovke i KH (*K-homology*) domeni [234]. Funkcionalna specifičnost pojedinačnih članova ove proteinske familije, njihova subćelijska lokalizacija i protein-protein interakcije regulisane su domenima bogatim glicinom, prolinom ili kiselim aminokiselinama [235]. Rezultati naše studije su pokazali da se za wt probu vezuju hnRNP A2/B1, A1, A3, H i Q, dok je u kompleksu sa mutiranom probom detektovan hnRNP A1.

hnRNP A2/B1, A1 i A3 pripadaju subfamiliji hnRNP A/B proteina [236, 237]. Iako se članovi ove subfamilije preferencijalno vezuju za RNK [238], nedavna istraživanja pokazuju da se ovi proteini specifično vezuju za promotorske sekvence različitih gena i time učestvuju u regulaciji transkripcije [236]. hnRNP A1 je najzastupljeniji protein ove familije, njegov N-terminus čine dva RRM domena, dok se na C-terminusu nalaze RGG *box* i sekvenca za lokalizaciju u jedro [239]. Za ovaj protein je pokazano da se vezuje za promotore gena *c-myc* [240], *APOE* [241], timidin kinaze [242], γ -fibrinogena [243] i receptora za vitamin D [244]. hnRNPA2/B1 se, slično A1, vezuje za promotore *c-myc*, *APOE* i receptora za vitamin D [240, 241, 244],

a takođe je pokazano da interaguje sa promotorima *BRCA1* [245] i gonadotropin-oslobađajućeg hormona 1 [246]. hnRNPA3 se vezuje za regulatorne regione u promotoru *Hoxc8* gena. Istraživanja pokazuju da su sekvence za koje se hnRNPA/B proteini vezuju po svom sastavu veoma heterogene [236]. One uključuju ATTT motiv u promotoru timidin kinaze, TGCTCTC *box* u promotoru γ -fibrinogena, a A3 prepoznaje GGGGCC ponovke u promotoru gena *C9orf72* [247]. Uticaj sposobnosti vezivanja za različite motive na ekspresiju ovih gena nije u potpunosti jasan. Literaturni podaci pokazuju da vezivanje ovih hnRNP može dovesti i do aktivacije i do represije transkripcije [236]. Sami mehanizmi kojima hnRNPA/B proteini regulišu transkripciju nisu razjašnjeni. Pretpostavlja se da regulaciju mogu vršiti direktno, interakcijom sa samim promotorima ili indirektno, interakcijom sa drugim proteinima asociranim sa DNK, kao što su histoni [248]. Nedavno je pokazano da hnRNPA2/B1 interaguje sa p53, koji predstavlja transkripcioni faktor koji se vezuje za veći broj ciljnih gena [249]. Takođe se pretpostavlja da hnRNPA/B familija proteina ima ulogu i u terminaciji transkripcije, kao što je pokazano na hnRNP proteinima kvasca-Npl3 i Hrp1, koji stimulišu prepoznavanje kriптиčnih mesta za poliadenilaciju [250]. Do danas nije pokazana uloga humanih hnRNPA/B proteina u terminaciji transkripcije, niti njihovo potencijalno vezivanje za regione 3'kraja. Naša studija je prva koja je pokazala da se ovi proteini potencijalno vezuju za 3'kraj i da prisustvo C20068T varijante potencijalno može dovesti do promena u vezivanju/afinitetu vezivanja regulatornih proteina za ovaj region. Međutim, da bi se ovaj rezultat potvrdio, potrebno je eksperimentalno pokazati da do vezivanja ovih proteina zaista dolazi i da ovaj rezultat ne predstavlja artefakt u datim eksperimentalnih uslovima.

U kompleksu sa wt probom su detektovani i hnRNP Q i H. Literaturni podaci pokazuju da su ovi proteini uključeni u procese alternativnog splajsovanja i regulacije translacije proteina, preko vezivanja za iRNK, ali njihova uloga u regulaciji ekspresije gena na nivou transkripcije nije do sada opisana [251, 252].

ELAV-like protein 1 (HuR protein) je protein od 36kDa, koji pripada ELAV familiji proteina (engl. *embryonic lethal abnormal vision*). Ovaj protein poseduje tri RRM, za koje je pokazano da se vezuju za ARE sekvence i poli(A) rep ciljnih iRNK [253]. Iako je u najvećoj meri prisutan u jedru, njegova uloga u tom ćelijskom kompartmanu nije potpuno jasna. Ovaj protein ima sposobnost transporta u citoplazmu,

gde reguliše polu-život kratkoživećih iRNK koje poseduju ARE sekvence [254]. Nedavno je pokazano da HuR interaguje sa različitim hnRNP proteinima, kako u jedru, tako i u citoplazmi, a pretpostavlja se da najverovatnije reguliše procese alternativnog splajsovanja, poliadenilacije i eksporta određenih iRNK iz jedra u citoplazmu [255]. Do sada nije pokazano da se HuR može vezivati za DNK, međutim kako postoji njegova interakcija sa hnRNP, nije isključeno da u kompleksu sa ovom proteinskom familijom HuR protein može učestvovati i u regulaciji ekspresije na nivou transkripcije.

U kompleksu sa wt detektovana su 4 proteina koji pripadaju proteinima endoplazmatičnog retikuluma i uglavnom su uključeni u procese savijanja proteina i kontrole kvaliteta u endoplazmatičnom retikulumu. Detektovani BiP (GRP-78) i protein-disulfid izomeraze predstavljaju šaperone endoplazmatičnog retikuluma, sa signalnim sekvencama koje omogućavaju njihovu lokalizaciju u ovu organelu [256-258]. Iako su ovi proteini ekspimirani u hepatocitima, u literaturi ne postoje podaci o njihovoj ulozi u regulaciji ekspresije gena. *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34* je protein pretežno uključen u regulaciju Wnt signalnog puta [259]. Ovaj enzim prepoznaje i hidrolizuje peptidne veze na C-terminalnom glicinu ubikvitina [260]. Takođe je uključen u procesovanje poliubikvitinovnih prekursora i ubikvitinovanih proteina, a podaci o potencijalnoj ulozi u regulaciji ekspresije gena ne postoje u literaturi. Sa druge strane, za *E3 SUMO-protein ligase CBX4* je, osim uloge u sumoilaciji proteina, pokazano da predstavlja deo PRC1-sličnog multiproteinskog kompleksa, koji održava transkripciono reprimirano stanje mnogih gena tokom razvića [261]. Ovaj kompleks učestvuje u procesima hromatinskog remodelovanja i modifikaciji histona [262]. Obzirom da su ovi proteini detektovani u kompleksu sa wt probom, njihov potencijalni značaj trebalo bi da bude predmet budućih ispitivanja.

U kompleksu sa mutiranom probom detektovan je kalretikulin. Ovaj protein je pretežno lociran u endoplazmatičnom retikulumu, gde se vezuje za nepravilno savijene proteine i sprečava njihov transport iz endoplazmatičnog retikuluma u Goldžijev aparat [263, 264]. Kalretikulin može biti prisutan i u jedru, što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u regulaciji transkripcije. Iako ne poseduje sposobnost direktnog vezivanja za DNK, kalretikulin interaguje sa DNK-vezujućim domenima različitih hormonskih receptora, čime sprečava interakciju hormona sa hormon-vezujućim DNK elementima [265].

Dalje analize bi trebalo usmeriti u pravcu eksperimentalnog potvrđivanja vezivanja ovih proteina osetljivijim metodama, a zatim i utvrđivanja njihovih eventualnih funkcija u regulaciji ekspresije 3'kraja protrombinskog gena, obzirom da su do sada opisane samo uloge u regulaciji ekspresije vezivanjem za promotorske regione gena.

b) Interakcija proteina jedarnog ekstrakta HepG2 ćelija sa jednolančanim wt i 20068T probama-esej FP-PCR

DNK *footprinting* esej zasniva se na zaštiti DNK fragmenta od delovanja nukleaza pomoću proteina koji se vezuju za taj fragment. Razlike u obrascu isecanja od strane DNaze ukazuju na regione DNK fragmenta za koje se proteini vezuju. Ovaj metod se može koristiti za ispitivanje DNK-protein interakcija [266], kao i utvrđivanje konsenzus mesta za koje se proteini vezuju. U ovom radu je primenjen *Footprinting Primer-PCR* (FP-PCR), koji se bazira na DNA *footprinting* eseju, a prvi put je standardizovan u našoj laboratoriji. Ovaj esej je osmišljen sa ciljem da se utvrdi da li postoje razlike u vezivanju proteina u slučaju kada je na mestu 20068 prisutan T. U našem eseju korišćene su jednolančane wt i mutirane probe (ss-wt i ww-20068T) koje su inkubirane sa jedarnim proteinim HepG2 ćelija. Ukoliko su za ponuđene probe vezani proteini, taj region je tokom tretmana nukleazama bio zaštićen vezanim proteinima i u narednom koraku je korišćen kao prajmer u PCR reakciji. Kao matrica u PCR reakciji korišćen je region od 715 bp 3'kraja protrombinskog gena čija je sekvenca bila wt. Kloniranjem dobijenog PCR produkta moguće je njegovo direktno sekvenciranje i utvrđivanje sekvence zaštićenog regiona. Velika prednost eseja je što je brz, tehnički jednostavan i informativan kada se prati efekat prisustva određene mutacije na interakciju sa ponuđenim proteinima, obzirom da se nakon PCR reakcije dobija informacija da li je region u kome je mutacija zaštićen vezanim proteinima. Nedostatak ovog eseja je to što, obzirom da se zaštićeni region koristi kao prajmer u PCR reakciji, sekvenciranjem dobijenog PCR produkta može da se odredi samo jedan kraj sekvence zaštićenog regiona. Određivanje cele sekvence zaštićenog regiona moglo bi se postići korišćenjem većeg broja proba koje su sukcesivno skraćene za jedan nukleotid. Takođe, ovaj esej ne može dati informaciju da li se za zaštićeni region vezuje jedan protein ili više njih u kompleksu.

Naši rezultati su pokazali da u slučaju wt probe ne postoji zaštita proteinima, pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Sa druge strane, dobijeni rezultati su pokazali da deo ss-20068T probe ostaje zaštićen tokom enzimskih tretmana i u PCR reakciji daje produkt dužine ~500bp. Sekvenciranje dobijenog PCR produkta je pokazalo da se na mestu 20068 nalazi T, što pokazuje da zaštićeni region sadrži mesto 20068 i ponaša se kao prajmer za PCR-PSM reakciju, uvodeći C>T zamenu u sekvenci. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da prisustvo T na mestu 20068 dovodi do stvaranja vezivnog mesta za protein/proteinski kompleks, koji štiti ovaj region od delovanja S1 nukleaze. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa predikcijom vezivanja proteina pomoću *SpliceAid* softvera, u kojoj je pokazano da T na mestu 20068 ukida mesto vezivanja sa Sp-40 proteinom [159]. Dalja istraživanja trebalo bi da obuhvate utvrđivanje tačne sekvence konsenzusnog vezivnog mesta, kao i identifikaciju proteina koji se vezuju za region koji sadrži 20068T, što će omogućiti dalje rasvetljavanje mehanizma kojim C20068T genska varijanta utiče na ekspresiju gena za protrombin.

5.4. Sinonimne genske varijante u regulaciji genske ekspresije

Sinonimne zamene nukleotida omogućene su osobinom degenerisanosti genetičkog koda, prema kojoj jednu aminokiselinu može kodirati više različitih kodona [267]. Pokazano je kod različitih organizama da postoji preferencijalno korišćenje određenih kodona za jednu aminokiselinu (engl. *codon usage bias*) koje značajno utiče na regulacije ekspresije jednog gena. Prema "neutralnoj teoriji" dugo je važilo pravilo da preferencijalni odabir kodona postoji zahvaljujući razlikama u mutabilnosti kodona i da se sinonimne zamene dešavaju slučajno i stoga nemaju uticaj na fitnes organizama. Međutim, nedavna istraživanja pokazuju da sinonimne zamene utiču na regulaciju translacije i iskrajanja, da su sinonimna mesta pod selektivnim pritiskom i da se odabir kodona održava ravnotežom između selekcije, mutacija i genetičkog drifta. Na odabir određenog kodona značajno utiče GC-sastav. Kod *D.melanogaster* i *C.elegans* je pokazano da se na poslednjoj poziciji u kodonima koji se češće koriste u najvećem broju slučajeva nalaze G ili C. Kod sisara, sinonimna mesta u prvim egzonima su GC-bogata u odnosu na sinonimna mesta poslednjih egzona gena, dok se introni međusobno ne razlikuju u GC-sastavu [268]. Odabir sinonimnih kodona kod različitih organizama nije slučajan i može usmeravati translaciju, obzirom da su tRNK za preferencijalne kodone

prisutne u većoj količini u citoplazmi ćelije, a takvi kodoni su češće prisutni kod visoko ekspimiranih gena. Regulacija ekspresije gena kroz odabir kodona je česta kod nižih organizama poput prokariota i arhea, dok je kod sisara pokazana mala korelacija između odabira čestih kodona i genske ekspresije. Sa druge strane, odabir retkih kodona je bitan za usporavanje translacije, čime se omogućava da translatirani region proteina bude pravilno savijen. Pokazano je da su češće birani kodoni asocirani sa struktuiranim domenima proteina (α -heliks), a retki kodoni su karakteristični za nestruktuirane regione proteina i β -ploče [269]. Česti kodoni se koriste za kodiranje delova proteina koji su esencijalni za njegovu funkciju, tako da brza translacija sprečava greške u savijanju proteina i smanjuje mogućnost gubitka njegove funkcije [267].

Na nivou iRNK, sinonimne zamene mogu imati različite uticaje. iRNK molekuli su jednolančani i kroz intramolekularno sparivanje baza formiraju različite sekundarne strukture. Formiranje sekundarne strukture iRNK i pre-iRNK zavisi od primarne sekvence i okoline u kojoj se molekul nalazi, a komplementarne interakcije se dešavaju među udaljenim nukleotidima. Pokazano je da se start i stop kodoni najčešće nalaze u nesparenim petljama relaksiranih struktura RNK, što ih čini lako dostupnim za proteine translacione mašinerije. Sa druge strane, netranslatirajući regioni formiraju *stem-loop* strukture, komplementarnim sparivanjem unutar sebe. Prisustvo sinonimnih zamena može uticati na sekundarnu strukturu iRNK, kroz stvaranje novih stabilnijih struktura (*hairpin loops*). Kroz regulaciju formiranja sekundarnih struktura, sinonimne zamene utiču i na translaciju, jer formiranje stabilnih sekundarnih struktura odlaže inicijaciju translacije i otežava translaciju ribozoma sa jedne strane, a sa druge strane formiranje relaksiranih struktura ubrzava translaciju [267].

Sinonimne zamene ispoljavaju značajan uticaj i kroz interakciju sa drugim RNK molekulima. Dugo se smatralo da tokom translacije dolazi isključivo do interakcija komplementarnog sparivanja iRNK i tRNK, kao i interakcija između rRNK i ribozom vezujućih mesta na iRNK. Međutim, pokazano je da postoje *clinger* elementi na rRNK molekulima koji se komplementarno vezuju sa različitim delovima iRNK, formirajući duplekse koji služe za pravilno pozicioniranje iRNK tokom translacije. Ovakvi elementi su identifikovani u sekvenci 5S, 18S i 28S rRNK, a eksperimentalno je pokazano da imaju različite afinitete vezivanja za količinski različito zastupljene iRNK. Jedan od faktora koji značajno utiče na afinitet vezivanja rRNK i iRNK je nukleotidni sastav na

sinonimnim pozicijama. C-bogata sinonimna mesta u okviru grupe visoko zastupljenih iRNK imaju veći afinitet za vezivanje rRNK, te se takve iRNK brže translatiraju [267].

Odabir sinonimnih kodona je vrlo značaj mehanizam regulacije vezivanja miRNK za iRNK. Analizom biljnih genoma je pokazano da postoji trend izbegavanja G i C bogatih kodona u regionima koji okružuju mesta vezivanja miRNK, čime se postiže relaksiranija lokalna struktura i omogućava pristupačnost vezivnog mesta. Na ovaj način, sinonimni kodoni u blizini mesta vezivanja miRNK se selektuju tako da omogućavaju lakše vezivanje miRNK. Slični rezultati dobijeni su i u studijama na sisarima i insektima. Sinonimne mutacije na miRNK-vezujućim mestima onemogućavaju vezivanje miRNK i mogu dovesti do pojave različitih oboljenja [267].

Značaj sinonimnih zamena u patogenezi je vrlo malo poznat. Kimči-Sarvati i saradnici su 2007. godine prijavili sinonimni polimorfizam u MDR1 (engl. *multidrug resistance 1*) genu koji dovodi do generisanja retkog kodona koji utiče na pravilno savijanje proteina i modulira supstratnu specifičnost [270]. Sinonimni polimorfizam u genu za humani dopaminski receptor D2 dovodi do promena u sekundarnoj strukturi iRNK, što za posledicu ima smanjenje stabilnosti iRNK i stope translacije i promenjenu osetljivost D2 receptora na dopamin [213]. *Genome wide* studije su pokazale asocijaciju sinonimnih polimorfizama sa promenama u RNK degradaciji i stepenu translacije koje su povezane sa β -talasemijom [271], cističnom fibrozom [272], Dušenovom mišićnom distrofijom [273] i kancerom. Sinonimni polimorfizam u humanom *IRGM* genu onemogućava vezivanje miR-196 i dovodi do tkivno-specifičnog poremećaja regulacije IRGM-zavisne ksenofagije, što pacijenta predisponira ka Kronovoj bolesti [274].

Do danas nisu opisane sinonimne promene u 3'kraju humanih gena koje dovode do povećane genske ekspresije. Naša studija je pokazala da C20068T genska varijanta predstavlja funkcionalnu gensku varijantu, koja dovodi do povećane ekspresije protrombinske iRNK i povišenog nivoa protrombina u plazmi pacijenata koji su nosioci 20068CT genotipa. Funkcionalna analiza je pokazala da prisustvo C20068T varijante do promena u ekspresiji protrombina dovodi na više nivoa regulacije ekspresije. Prisustvo T na mestu 20068 dovodi do promena u sekundarnoj strukturi iRNK, stvaranja transkripata sa kraćim 3'krajem, utiče na intenzitet interakcija proteina sa DNK i dovodi do stvaranja mesta vezivanja proteina za jednolančanu DNK. Ove funkcionalne posledice prisustva 20068T pokazuju da postoji njihovo sinergističko delovanje koje

kao krajnji efekat ima povećanu ekspresiju protrombina, što dovodi do hiperkoagulacije i sklonosti ka trombozama. Rezultati ove studije pokazuju da mehanizam kojim C20068T genska varijanta dovodi do promene u ekspresiji gena za protrombin veoma složen i potrebe dalje studije da bi se on detaljno rasvetlio.

6. ZAKLJUČCI

1. U grupi pacijenata sa trombofilijom i u kontrolnoj grupi su određene učestalosti C20068T varijante:
 - a. učestalost C20068T varijante u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika iznosi 0,52%
 - b. učestalost C20068T varijante kod pacijenata sa cerebrovaskularnim insultom iznosi 2,83% (OR 5,53; P=0,13)
 - c. učestalost C20068T varijante kod pacijenata sa izolovanim plućnim embolizmom iznosi 2,97% (OR 0,12; P=0,12)
 - d. učestalost C20068T varijante kod pacijenata sa trombozom dubokih vena iznosi 3,43% (OR 6,66; P=0,057)
 - e. učestalost C20068T varijante kod pacijenata sa kombinovanim trombotičkim poremećajima iznosi 4,92% (OR 9,83; P= 0,045)
 - f. zbirna učestalost C20068T varijante kod pacijenata sa svim trombotičkim poremećajima iznosi 3,39% (OR 6,66; P= 0,049)
 - g. učestalost C20068T varijante kod pacijentkinja sa spontanim pobačajima iznosi 2,45% (OR 4,26; P=0,31).
2. Prisustvo C20068T varijante dovodi do povećanja količine protrombina u plazmi pacijenata koji su heterozigotni nosioci ove varijante. U odnosu na standardnu plazmu (referentna vrednost 100), kvantifikovana količina protrombina u plazmi pacijenata iznosila je $143,65 \pm 28,8$; $P < 0,05$.
3. C20068T varijanta predstavlja novi značajni trombofilni marker koga treba uključiti u rutinski panel trombofilnih testova.
4. Za potrebe funkcionalne analize varijante C20068T, prvi put je standardizovan esej za određivanje broja kopija inserata u stabilno transfekovanim ćelijama-qfPCR-kapilarna elektroforeza i esej za određivanje mesta vezivanja proteina za jednolančanu DNK-esej *Footprinting Primer-PCR* (FP-PCR).

5. Na sistemu stabilno transfekovanih ćelija koje imaju isti broj kopija inserata je pokazano da 20068T varijanta dovodi do 1,60 puta povećane ekspresije protrombinske iRNK u odnosu na wt.
6. *In silico* predikcije su pokazale da prisustvo C20068T ne dovodi do promena u odabiru kodona. Predikcija sekundarne strukture poslednjeg egzona je pokazala da prisustvo T na mestu 20068 dovodi do promena u sekundarnoj strukturi egzona koja može uticati na stabilnost iRNK. Pretraživanje *MiRBase* baze podataka je pokazalo da se za ovaj region protrombinskog gena ne vezuje nijedna do sada opisana mikroRNK.
7. Ćelije stabilno transfekovane konstruktom sa T na mestu 20068 ne pokazuju statistički značajne promene u stabilnosti protrombinske iRNK u odnosu na ćelije transfekovane wt konstruktom. iRNK za wt i mutirani konstrukt su pokazale sličan obrazac degradacije tokom trajanja tretmana aktinomycinom D.
8. Ispitivanje razlika u mestu iskrajanja kod wt i 20068T konstrukata je pokazalo da prisustvo 20068T varijante dovodi do stvaranja transkripata sa manjom dužinom 3'kraja u poređenju sa wt transkriptima.
9. Ispitivanje interakcije dvolančane DNK probe sa proteinima jedarnog ekstrakta HepG2 i HeLa ćelija EMSA esejem je pokazalo da dolazi do formiranja više specifičnih kompleksa. Jedarni proteini se sa većim afinitetom vezuju za wt probe, što ukazuje na mogućnost da prisustvo T na poziciji 20068 utiče na interakcije proteina sa ovim regionom protrombinskog gena.
10. Identifikacija proteina prisutnih u kompleksu C1, masenom spektrometrijom, je pokazala da se za wt probu vezuje 11 proteina, dok se C20068T probu vezuju 3 proteina. U kompleksu sa wt probom detektovani su uglavnom proteini koji pripadaju familiji heterogenih nuklearnih ribonukleoproteina. U kompleksu sa 20068T probom je detektovan kalretikulin, koji nije prisutan u kompleksu sa wt probom.

11. Jednolančana 20068T proba u interakciji sa jedarnim proteinima HepG2 ćelija biva zaštićena od delovanja S1 nukleaze. Korišćenjem FP-PCR eseja je pokazano da prisustvo T na mestu 20068 dovodi do stvaranja vezivnog mesta za protein ili proteinski kompleks koji se ne vezuje za wt varijantu.

12. C20068T predstavlja funkcionalnu sinonimnu gensku varijantu, čiji mehanizam delovanja do sada nije opisan.

7. REFERENCE

- [1] Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S. Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. fifth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [2] Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996;47: 315-31.
- [3] Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85: 958-65.
- [4] Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep* 2005;4: 391-6.
- [5] De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002;100: 1310-7.
- [6] George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355: 1531-9.
- [7] McMichael M. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med* 2012;27: 40-5.
- [8] Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003;16: 17-20.
- [9] Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27: 1687-93.
- [10] Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost* 2006;32 Suppl 1: 32-8.
- [11] Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1: 95-101.
- [12] Whinna HC, Church FC. Interaction of thrombin with antithrombin, heparin cofactor II, and protein C inhibitor. *J Protein Chem* 1993;12: 677-88.
- [13] Degen JL. Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems. *Thromb Haemost* 2001;86: 130-7.
- [14] Rasche H. Haemostasis and thrombosis: an overview. *European Heart Journal Supplements* 2001;3: Q3-Q7.

- [15] Elezović I. Urođene i stečene trombofilije. Bilten za transfuziologiju 2000;Suppl: 16-25.
- [16] März W, Nauck M, Wieland H. The molecular mechanisms of inherited thrombophilia. *Z Kardiol* 2000;89: 575-86.
- [17] Djordjevic V, Pruner I, Radojkovic D. Molecular Basis of Thrombophilia. 2014;33: 22-27.
- [18] Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13: 516-30.
- [19] Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68: 1370-3.
- [20] Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984;311: 1525-8.
- [21] Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 1004-8.
- [22] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369: 64-7.
- [23] Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994;269: 31869-80.
- [24] Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88: 3698-703.
- [25] Biguzzi E, Merati G, Liaw PC, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, Gu JM, Fétique R, Esmon CT, Mannucci PM, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001;86: 945-8.
- [26] Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001;109: 369-84.
- [27] Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, Iacoviello L. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic

PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost* 1998;79: 354-8.

[28] Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009;7 Suppl 1: 301-4.

[29] Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tired L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 2009;113: 5298-303.

[30] Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999;93: 906-8.

[31] De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, Casorelli I, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol* 2001;113: 630-5.

[32] Franchini M. The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med* 2013: 1-3.

[33] Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987;26: 6165-77.

[34] Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987;13: 285-92.

[35] Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, Bar-Even A, Horn-Saban S, Safran M, Domany E, Lancet D, Shmueli O. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 2005;21: 650-9.

[36] Bancroft JD, Schaefer LA, Degen SJ. Characterization of the Alu-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive cis-acting element that regulates liver-specific expression. *Gene* 1990;95: 253-60.

- [37] Chow BK, Ting V, Tufaro F, MacGillivray RT. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Biol Chem* 1991;266: 18927-33.
- [38] Bancroft JD, McDowell SA, Degen SJ. The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells. *Biochemistry* 1992;31: 12469-76.
- [39] Ceelie H, Spaargaren-Van Riel CC, De Jong M, Bertina RM, Vos HL. Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *J Thromb Haemost* 2003;1: 1688-98.
- [40] Morris R, Winyard PG, Blake DR, Morris CJ. Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53: 72-9.
- [41] Stiernberg J, Redin WR, Warner WS, Carney DH. The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb Haemost* 1993;70: 158-62.
- [42] Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA. Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 1996;22: 267-71.
- [43] Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost* 2004;30: 63-9.
- [44] Baykal D, Schmedtje JF, Runge MS. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75: 82B-87B.
- [45] Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 7597-602.
- [46] Sun WY, Coleman MJ, Witte DP, Degen SJ. Rescue of prothrombin-deficiency by transgene expression in mice. *Thromb Haemost* 2002;88: 984-91.
- [47] Day K, Krishnegowda N, Jagadeeswaran P. Knockdown of prothrombin in zebrafish. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32: 191-8.
- [48] Day KR, Jagadeeswaran P. Microarray analysis of prothrombin knockdown in zebrafish. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43: 202-10.
- [49] Mullins ES, Kombrinck KW, Talmage KE, Shaw MA, Witte DP, Ullman JM, Degen SJ, Sun W, Flick MJ, Degen JL. Genetic elimination of prothrombin in adult

mice is not compatible with survival and results in spontaneous hemorrhagic events in both heart and brain. *Blood* 2009;113: 696-704.

[50] Lancellotti S, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency. *Semin Thromb Hemost* 2009;35: 367-81.

[51] Akhavan S, De Cristofaro R, Peyvandi F, Lavoretano S, Landolfi R, Mannucci PM. Molecular and functional characterization of a natural homozygous Arg67His mutation in the prothrombin gene of a patient with a severe procoagulant defect contrasting with a mild hemorrhagic phenotype. *Blood* 2002;100: 1347-53.

[52] Henriksen RA, Owen WG. Characterization of the catalytic defect in the dysthrombin, Thrombin Quick. *J Biol Chem* 1987;262: 4664-9.

[53] Henriksen RA, Mann KG. Substitution of valine for glycine-558 in the congenital dysthrombin thrombin Quick II alters primary substrate specificity. *Biochemistry* 1989;28: 2078-82.

[54] Morishita E, Saito M, Kumabashiri I, Asakura H, Matsuda T, Yamaguchi K. Prothrombin Himi: a compound heterozygote for two dysfunctional prothrombin molecules (Met-337-->Thr and Arg-388-->His). *Blood* 1992;80: 2275-80.

[55] Iwahana H, Yoshimoto K, Shigekiyo T, Shirakami A, Saito S, Itakura M. Detection of a single base substitution of the gene for prothrombin Tokushima. The application of PCR-SSCP for the genetic and molecular analysis of dysprothrombinemia. *Int J Hematol* 1992;55: 93-100.

[56] Miyata T, Morita T, Inomoto T, Kawauchi S, Shirakami A, Iwanaga S. Prothrombin Tokushima, a replacement of arginine-418 by tryptophan that impairs the fibrinogen clotting activity of derived thrombin Tokushima. *Biochemistry* 1987;26: 1117-22.

[57] Rabiet MJ, Furie BC, Furie B. Molecular defect of prothrombin Barcelona. Substitution of cysteine for arginine at residue 273. *J Biol Chem* 1986;261: 15045-8.

[58] Lefkowitz JB, Haver T, Clarke S, Jacobson L, Weller A, Nuss R, Manco-Johnson M, Hathaway WE. The prothrombin Denver patient has two different prothrombin point mutations resulting in Glu-300-->Lys and Glu-309-->Lys substitutions. *Br J Haematol* 2000;108: 182-7.

[59] Rouy S, Vidaud D, Alessandri JL, Dautzenberg MD, Venisse L, Guillin MC, Bezeaud A. Prothrombin Saint-Denis: a natural variant with a point mutation resulting

in Asp to Glu substitution at position 552 in prothrombin. *Br J Haematol* 2006;132: 770-3.

[60] Poort SR, Michiels JJ, Reitsma PH, Bertina RM. Homozygosity for a novel missense mutation in the prothrombin gene causing a severe bleeding disorder. *Thromb Haemost* 1994;72: 819-24.

[61] Sanford DG, Kanagy C, Sudmeier JL, Furie BC, Furie B, Bachovchin WW. Structure of the propeptide of prothrombin containing the gamma-carboxylation recognition site determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1991;30: 9835-41.

[62] Hubbard BR, Ulrich MM, Jacobs M, Vermeer C, Walsh C, Furie B, Furie BC. Vitamin K-dependent carboxylase: affinity purification from bovine liver by using a synthetic propeptide containing the gamma-carboxylation recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86: 6893-7.

[63] Park CH, Tulinsky A. Three-dimensional structure of the kringle sequence: structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry* 1986;25: 3977-82.

[64] Soriano-Garcia M, Park CH, Tulinsky A, Ravichandran KG, Skrzypczak-Jankun E. Structure of Ca²⁺ prothrombin fragment 1 including the conformation of the Gla domain. *Biochemistry* 1989;28: 6805-10.

[65] Kotkow KJ, Deitcher SR, Furie B, Furie BC. The second kringle domain of prothrombin promotes factor Va-mediated prothrombin activation by prothrombinase. *J Biol Chem* 1995;270: 4551-7.

[66] Downing MR, Butkowski RJ, Clark MM, Mann KG. Human prothrombin activation. *J Biol Chem* 1975;250: 8897-906.

[67] Aronson DL, Stevan L, Ball AP, Franza BR, Finlayson JS. Generation of the combined prothrombin activation peptide (F1-2) during the clotting of blood and plasma. *J Clin Invest* 1977;60: 1410-8.

[68] Rosing J, Zwaal RF, Tans G. Formation of meizothrombin as intermediate in factor Xa-catalyzed prothrombin activation. *J Biol Chem* 1986;261: 4224-8.

[69] Krishnaswamy S. The transition of prothrombin to thrombin. *J Thromb Haemost* 2013;11 Suppl 1: 265-76.

- [70] Wood JP, Silveira JR, Maille NM, Haynes LM, Tracy PB. Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood* 2011;117: 1710-8.
- [71] Bradford HN, Micucci JA, Krishnaswamy S. Regulated cleavage of prothrombin by prothrombinase: repositioning a cleavage site reveals the unique kinetic behavior of the action of prothrombinase on its compound substrate. *J Biol Chem* 2010;285: 328-38.
- [72] Haynes LM, Bouchard BA, Tracy PB, Mann KG. Prothrombin activation by platelet-associated prothrombinase proceeds through the prethrombin-2 pathway via a concerted mechanism. *J Biol Chem* 2012;287: 38647-55.
- [73] Krishnaswamy S, Mann KG, Nesheim ME. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction. *J Biol Chem* 1986;261: 8977-84.
- [74] Tans G, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, van Zonneveld AJ, Pannekoek H, Rosing J. Activation of human factor V by meizothrombin. *J Biol Chem* 1994;269: 15969-72.
- [75] Hackeng TM, Tans G, Koppelman SJ, de Groot PG, Rosing J, Bouma BN. Protein C activation on endothelial cells by prothrombin activation products generated in situ: meizothrombin is a better protein C activator than alpha-thrombin. *Biochem J* 1996;319 (Pt 2): 399-405.
- [76] Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci* 1992;1: 426-71.
- [77] Di Cera E, Page MJ, Bah A, Bush-Pelc LA, Garvey LC. Thrombin allostery. *Phys Chem Chem Phys* 2007;9: 1291-306.
- [78] Di Cera E. Thrombin. *Mol Aspects Med* 2008;29: 203-54.
- [79] Bock PE, Panizzi P, Verhamme IM. Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1: 81-94.
- [80] Huntington JA. How Na⁺ activates thrombin--a review of the functional and structural data. *Biol Chem* 2008;389: 1025-35.
- [81] Di Cera E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1: 196-202.

- [82] Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost* 2005;3: 1861-72.
- [83] Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005;3: 1894-904.
- [84] Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)--how does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med* 2006;38: 378-88.
- [85] Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1: 1504-14.
- [86] Esmon CT, Lollar P. Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of factor V and factor VIII. *J Biol Chem* 1996;271: 13882-7.
- [87] Baglia FA, Badellino KO, Li CQ, Lopez JA, Walsh PN. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem* 2002;277: 1662-8.
- [88] Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3: 1800-14.
- [89] Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL, Phillips DR. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 1823-8.
- [90] Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993;70: 29-35.
- [91] Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell* 2002;108: 439-51.
- [92] Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 2003;72: 449-79.
- [93] West AG, Fraser P. Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1: R101-11.
- [94] Bártoová E, Kozubek S. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol Cell* 2006;98: 323-36.
- [95] McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108: 465-74.

- [96] Stees JS, Varn F, Huang S, Strouboulis J, Bungert J. Recruitment of Transcription Complexes to Enhancers and the Role of Enhancer Transcription. *Biology (Basel)* 2012;1: 778-793.
- [97] Gaston K, Jayaraman PS. Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2003;60: 721-41.
- [98] Reynolds N, O'Shaughnessy A, Hendrich B. Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. *Development* 2013;140: 505-12.
- [99] Mata J, Marguerat S, Bähler J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* 2005;30: 506-14.
- [100] Gu M, Lima CD. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15: 99-106.
- [101] Patel AA, Steitz JA. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4: 960-70.
- [102] De Conti L, Baralle M, Buratti E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4: 49-60.
- [103] Stasinopoulos S, Sachchithanathan M, Medcalf R. The Role of the 3' UTR in Regulated Post-Transcriptional Gene Expression. *AUSTRALIAN BIOCHEMIST* 2005;36: 13-16.
- [104] Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63: 405-45.
- [105] Elkon R, Ugalde AP, Agami R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 2013;14: 496-506.
- [106] Sheets MD, Ogg SC, Wickens MP. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990;18: 5799-805.
- [107] Mandel CR, Kaneko S, Zhang H, Gebauer D, Vethantham V, Manley JL, Tong L. Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature* 2006;444: 953-6.
- [108] Danckwardt S, Hartmann K, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol* 2006;115: 192-7.

- [109] Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 2007;8: 533-43.
- [110] Wu X, Brewer G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* 2012;500: 10-21.
- [111] Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 2003;28: 91-8.
- [112] Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 2005;123: 1133-46.
- [113] Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 2012;69: 3613-34.
- [114] Gingerich TJ, Feige JJ, LaMarre J. AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev* 2004;5: 49-63.
- [115] Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4: 457-67.
- [116] Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004;32: D109-11.
- [117] Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009;101: 251-62.
- [118] Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J* 2008;27: 482-98.
- [119] Gu LH, Kim SC, Ichiki Y, Park J, Nagai M, Kitajima Y. A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. *J Invest Dermatol* 2003;121: 482-5.
- [120] Gu LH, Ichiki Y, Sato M, Kitajima Y. A novel nonsense mutation at E106 of the 2B rod domain of keratin 14 causes dominant epidermolysis bullosa simplex. *J Dermatol* 2002;29: 136-45.
- [121] Müller FB, Anton-Lamprecht I, Küster W, Korge BP. A premature stop codon mutation in the 2B helix termination peptide of keratin 5 in a German epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara case. *J Invest Dermatol* 1999;112: 988-90.

- [122] Chao LY, Huff V, Strong LC, Saunders GF. Mutation in the PAX6 gene in twenty patients with aniridia. *Hum Mutat* 2000;15: 332-9.
- [123] Chao LY, Mishra R, Strong LC, Saunders GF. Missense mutations in the DNA-binding region and termination codon in PAX6. *Hum Mutat* 2003;21: 138-45.
- [124] Prior JF, Lim E, Lingam N, Raven JL, Finlayson J. A moderately severe alpha-thalassemia condition resulting from a combination of the alpha2 polyadenylation signal (AATAAA-->AATA- -) mutation and a 3.7 Kb alpha gene deletion in an Australian family. *Hemoglobin* 2007;31: 173-7.
- [125] Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol* 2007;211: 590-7.
- [126] Reamon-Buettner SM, Cho SH, Borlak J. Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD). *BMC Med Genet* 2007;8: 38.
- [127] Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 2004;104: 428-35.
- [128] Danckwardt S, Kaufmann I, Gentzel M, Foerstner KU, Gantzert AS, Gehring NH, Neu-Yilik G, Bork P, Keller W, Wilm M, Hentze MW, Kulozik AE. Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals. *EMBO J* 2007;26: 2658-69.
- [129] Moreira A, Takagaki Y, Brackenridge S, Wollerton M, Manley JL, Proudfoot NJ. The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 1998;12: 2522-34.
- [130] Brackenridge S, Proudfoot NJ. Recruitment of a basal polyadenylation factor by the upstream sequence element of the human lamin B2 polyadenylation signal. *Mol Cell Biol* 2000;20: 2660-9.
- [131] Hall-Pogar T, Zhang H, Tian B, Lutz CS. Alternative polyadenylation of cyclooxygenase-2. *Nucleic Acids Res* 2005;33: 2565-79.
- [132] Natalizio BJ, Muniz LC, Arhin GK, Wilusz J, Lutz CS. Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals. *J Biol Chem* 2002;277: 42733-40.

- [133] Djordjević V, Rakićević L, Radojković D. An overview of genetic risk factors in thrombophilia. *Srp Arh Celok Lek* 2010;138 Suppl 1: 79-81.
- [134] Chamouard P, Pencreach E, Maloisel F, Grunebaum L, Ardizzone JF, Meyer A, Gaub MP, Goetz J, Baumann R, Uring-Lambert B, Levy S, Dufour P, Hauptmann G, Oudet P. Frequent factor II G20210A mutation in idiopathic portal vein thrombosis. *Gastroenterology* 1999;116: 144-8.
- [135] Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Djordjevic V, Savic O, Mandic V, Rakicevic LJ, Antonijevic N, Radojkovic D. Thrombophilia in women with pregnancy-associated complications: fetal loss and pregnancy-related venous thromboembolism. *Gynecol Obstet Invest* 2010;69: 233-8.
- [136] Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340: 9-13.
- [137] Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86: 112-23.
- [138] Brenner B, Aharon A. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol* 2007;34: 527-41, v.
- [139] Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, Sandmann W, Zotz RB. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 2000;342: 374-80.
- [140] Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res* 2009;123 Suppl 3: S16-21.
- [141] de Moerloose P, Boehlen F. Inherited thrombophilia in arterial disease: a selective review. *Semin Hematol* 2007;44: 106-13.
- [142] Boekholdt SM, Kramer MH. Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2007;33: 588-96.
- [143] Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79: 706-8.

- [144] Warshawsky I, Hren C, Sercia L, Shadrach B, Deitcher SR, Newton E, Kottke-Marchant K. Detection of a novel point mutation of the prothrombin gene at position 20209. *Diagn Mol Pathol* 2002;11: 152-6.
- [145] Hooper WC, Roberts S, Dowling N, Austin H, Lally C, Whitsett C. The prevalence of the prothrombin gene variant C20209T in African-Americans and Caucasians and lack of association with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2006;118: 767-8.
- [146] van der Putten HH, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. Functional analysis of two prothrombin 3'-untranslated region variants: the C20209T variant, mainly found among African-Americans, and the C20209A variant. *J Thromb Haemost* 2006;4: 2285-7; author reply 2288-9.
- [147] Danckwardt S, Hartmann K, Katz B, Hentze MW, Levy Y, Eichele R, Deutsch V, Kulozik AE, Ben-Tal O. The prothrombin 20209 C->T mutation in Jewish-Moroccan Caucasians: molecular analysis of gain-of-function of 3' end processing. *J Thromb Haemost* 2006;4: 1078-85.
- [148] Tag CG, Schifflers MC, Mohnen M, Gressner AM, Weiskirchen R. Atypical melting curve resulting from genetic variation in the 3' untranslated region at position 20218 in the prothrombin gene analyzed with the LightCycler factor II (prothrombin) G20210A assay. *Clin Chem* 2005;51: 1560-1.
- [149] Flaujac C, Conard J, Horellou MH, Le Flem L, Samama MM. Atypical mutations of the prothrombin gene at positions 20,209 and 20,218, and a novel mutation at position 20,219. Report on 10 patients. *J Thromb Haemost* 2007;5: 1064-8.
- [150] Wylenzek M, Geisen C, Stapenhorst L, Wielckens K, Klingler KR. A novel point mutation in the 3' region of the prothrombin gene at position 20221 in a Lebanese/Syrian family. *Thromb Haemost* 2001;85: 943-4.
- [151] Balim Z, Kosova B, Falzon K, Bezzina Wettinger S, Colak Y. Budd-Chiari syndrome in a patient heterozygous for the point mutation C20221T of the prothrombin gene. *J Thromb Haemost* 2003;1: 852-3.
- [152] Schrijver I, Lenzi TJ, Jones CD, Lay MJ, Druzin ML, Zehnder JL. Prothrombin gene variants in non-Caucasians with fetal loss and intrauterine growth retardation. *J Mol Diagn* 2003;5: 250-3.

- [153] Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 2001;85: 1066-70.
- [154] Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, González-Conejero R, Vicente V. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 2002;118: 610-4.
- [155] Martinelli I, Battaglioli T, Toso A, Legnani C, Sottile L, Ghiotto R, Mannucci PM. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2006;4: 2582-6.
- [156] Martinelli I, Bucciarelli P, De Stefano V, Passamonti SM, Menegatti M, Tormene D, Toso A, Mannucci PM. Effect of prothrombin 19911 A>G polymorphism on the risk of cerebral sinus-venous thrombosis. *Eur J Neurol* 2010;17: 1482-5.
- [157] Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* 2012;366: 2390-6.
- [158] Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, Pruner I, Francuski D, Kojima T, Radojkovic D. A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia - the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* 2013;11: 1936-9.
- [159] Đorđević V. Analiza uticaja 3' kraja humanog protrombinskog gena na njegovu ekspresiju i patogenezu trombofilije. In. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2010.
- [160] Djordjevic V, Pruner I, Rakicevic L, Kovac M, Mikovic D, Miljic P, Antonijevic N, Radojkovic D. V Leiden, FII G20210A and MTHFR C677T Mutations in Patients with Lower Or Upper Limb Deep Vein Thrombosis. *Genetika* 2011;43: 371-380.
- [161] Sachchithananthan M, Stasinopoulos SJ, Wilusz J, Medcalf RL. The relationship between the prothrombin upstream sequence element and the G20210A polymorphism: the influence of a competitive environment for mRNA 3'-end formation. *Nucleic Acids Res* 2005;33: 1010-20.

- [162] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
- [163] Dieffenbach CW, Dveksler GS. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
- [164] Bartlett JMS, Stirling D. *PCR Protocols*: Springer; 2003.
- [165] Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem* 2000;46: 883-4.
- [166] Kwok PY, Duan S. SNP discovery by direct DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 2003;212: 71-84.
- [167] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112: 195-203.
- [168] Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969;244: 4406-12.
- [169] Davis JM. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. Second ed: Oxford University Press, Incorporated; 2002.
- [170] Pruner I, Djordjevic V, Gvozdenov M, Tomic B, Radojkovic D. Determination of Transgene Copy Number in Stably Transfected Mammalian Cells by PCR-Capillary Electrophoresis Assay. *Biochem Genet* 2014;52: 159-65.
- [171] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29: e45.
- [172] Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002;30: 503-12.
- [173] Chen CY, Ezzeddine N, Shyu AB. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods Enzymol* 2008;448: 335-57.
- [174] Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA. 3' end cDNA amplification using classic RACE. *Nat Protoc* 2006;1: 2742-5.
- [175] Frohman MA. 3'-End cDNA Amplification Using Classic RACE. *CSH Protoc* 2006;2006.

- [176] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11: 1475-89.
- [177] Carey MF, Peterson CL, Smale ST. Experimental strategies for the identification of DNA-binding proteins. *Cold Spring Harb Protoc* 2012;2012: 18-33.
- [178] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1: 2856-60.
- [179] Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 1-12.
- [180] Manten B, Westendorp RG, Koster T, Reitsma PH, Rosendaal FR. Risk factor profiles in patients with different clinical manifestations of venous thromboembolism: a focus on the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 1996;76: 510-3.
- [181] Piazza G. Cerebral venous thrombosis. *Circulation* 2012;125: 1704-9.
- [182] Ferro JM, Canhão P, Stam J, Boussier MG, Barinagarrementeria F, Investigators I. Prognosis of cerebral vein and dural sinus thrombosis: results of the International Study on Cerebral Vein and Dural Sinus Thrombosis (ISCVT). *Stroke* 2004;35: 664-70.
- [183] Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998;338: 1793-7.
- [184] van Langevelde K, Flinterman LE, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Broadening the factor V Leiden paradox: pulmonary embolism and deep-vein thrombosis as 2 sides of the spectrum. *Blood* 2012;120: 933-46.
- [185] Lippi G, Franchini M. Pathogenesis of venous thromboembolism: when the cup runneth over. *Semin Thromb Hemost* 2008;34: 747-61.
- [186] Desmarais S, de Moerloose P, Reber G, Minazio P, Perrier A, Bounameaux H. Resistance to activated protein C in an unselected population of patients with pulmonary embolism. *Lancet* 1996;347: 1374-5.
- [187] Martinelli I, Cattaneo M, Panzeri D, Mannucci PM. Low prevalence of factor V:Q506 in 41 patients with isolated pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 1997;77: 440-3.

- [188] Grifoni E, Marcucci R, Ciuti G, Cenci C, Poli D, Mannini L, Liotta AA, Miniati M, Abbate R, Prisco D. The thrombophilic pattern of different clinical manifestations of venous thromboembolism: a survey of 443 cases of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2012;38: 230-4.
- [189] Margaglione M, Brancaccio V, De Lucia D, Martinelli I, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest* 2000;118: 1405-11.
- [190] Martinelli I, Battaglioli T, Razzari C, Mannucci PM. Type and location of venous thromboembolism in patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and in those with no thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2007;5: 98-101.
- [191] van Stralen KJ, Doggen CJ, Bezemer ID, Pomp ER, Lisman T, Rosendaal FR. Mechanisms of the factor V Leiden paradox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28: 1872-7.
- [192] de Moerloose P, Reber G, Perrier A, Perneger T, Bounameaux H. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2000;110: 125-9.
- [193] Reznikoff-Etiévan MF, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG* 2001;108: 1251-4.
- [194] Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population. *Am J Hematol* 2002;71: 300-5.
- [195] Dilley A, Benito C, Hooper WC, Austin H, Miller C, El-Jamil M, Cottrell S, Benson J, Evatt BL, Patterson-Bamett A, Eller D, Philipp C. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11: 176-82.
- [196] Simioni P, Tormene D, Manfrin D, Gavasso S, Luni S, Stocco D, Girolami A. Prothrombin antigen levels in symptomatic and asymptomatic carriers of the 20210A prothrombin variant. *Br J Haematol* 1998;103: 1045-50.
- [197] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004;22: 1393-8.

- [198] Fourney RM, Aubin R, Dietrich KD, Paterson MC. Determination of foreign gene copy number in stably transfected cell lines by southern transfer analysis. *Methods Mol Biol* 1991;7: 381-95.
- [199] D'haene B, Vandesomepele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* 2010;50: 262-70.
- [200] Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat* 2004;23: 413-9.
- [201] Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* 2009;578: 23-39.
- [202] Keller I, Bensasson D, Nichols RA. Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. *PLoS Genet* 2007;3: e22.
- [203] Chamary JV, Hurst LD. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome Biol* 2005;6: R75.
- [204] Chen JM, Férec C, Cooper DN. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Hum Genet* 2006;120: 301-33.
- [205] Shepard PJ, Hertel KJ. Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing. *RNA* 2008;14: 1463-9.
- [206] Liu X, Jiang Y, Russell JE. A potential regulatory role for mRNA secondary structures within the prothrombin 3'UTR. *Thromb Res* 2010;126: 130-6.
- [207] Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskyi O, Makarov SS, Maixner W, Diatchenko L. Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006;314: 1930-3.
- [208] Martinez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset JF, Revil T, Chabot B. hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol* 2007;623: 123-47.
- [209] Lu X, Timchenko NA, Timchenko LT. Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 1999;8: 53-60.

- [210] Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN, Trembath RC. A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* 2004;13: 2361-8.
- [211] Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 682-99.
- [212] Niemi M, Arnold KA, Backman JT, Pasanen MK, Gödtel-Armbrust U, Wojnowski L, Zanger UM, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT, Lang T. Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16: 801-8.
- [213] Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003;12: 205-16.
- [214] Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 2005;33: 201-12.
- [215] Di Giammartino DC, Nishida K, Manley JL. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol Cell* 2011;43: 853-66.
- [216] Carter AM, Sachchithanathan M, Stasinopoulos S, Maurer F, Medcalf RL. Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism. *Thromb Haemost* 2002;87: 846-53.
- [217] Pollak ES, Lam HS, Russell JE. The G20210A mutation does not affect the stability of prothrombin mRNA in vivo. *Blood* 2002;100: 359-62.
- [218] Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 2005;33: 7138-50.
- [219] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010;79: 351-79.
- [220] Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 2009;138: 673-84.
- [221] Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 2008;320: 1643-7.

- [222] Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* 2008;36: 641-7.
- [223] Li B, Yen TS. Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem* 2002;277: 10306-14.
- [224] Shen H, Kan JL, Ghigna C, Biamonti G, Green MR. A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *RNA* 2004;10: 787-94.
- [225] Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S, Martínez C, Castelo R, Guigó R, Bilbao D, Valcárcel J. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell* 2005;19: 475-84.
- [226] Lou H, Helfman DM, Gagel RF, Berget SM. Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol* 1999;19: 78-85.
- [227] Castelo-Branco P, Furger A, Wollerton M, Smith C, Moreira A, Proudfoot N. Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation. *Mol Cell Biol* 2004;24: 4174-83.
- [228] Tillmar L, Welsh N. Hypoxia may increase rat insulin mRNA levels by promoting binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the pyrimidine-rich insulin mRNA 3'-untranslated region. *Mol Med* 2002;8: 263-72.
- [229] Jackson RJ. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 2005;33: 1231-41.
- [230] Song Y, Tzima E, Ochs K, Bassili G, Trusheim H, Linder M, Preissner KT, Niepmann M. Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* 2005;11: 1809-24.
- [231] Oh YL, Hahm B, Kim YK, Lee HK, Lee JW, Song O, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Nomoto A, Jang SK. Determination of functional domains in polypyrimidine-tract-binding protein. *Biochem J* 1998;331 (Pt 1): 169-75.
- [232] Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993;62: 289-321.
- [233] Piñol-Roma S, Choi YD, Matunis MJ, Dreyfuss G. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev* 1988;2: 215-27.

- [234] Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11: 363-71.
- [235] Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* 2010;430: 379-92.
- [236] He Y, Smith R. Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci* 2009;66: 1239-56.
- [237] Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci* 2013;14: 18999-9024.
- [238] Nadler SG, Merrill BM, Roberts WJ, Keating KM, Lisbin MJ, Barnett SF, Wilson SH, Williams KR. Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions. *Biochemistry* 1991;30: 2968-76.
- [239] Barraud P, Allain FH. Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: how the relative orientation between RRM s influences the nucleic acid binding topology. *J Biomol NMR* 2013;55: 119-38.
- [240] Takimoto M, Tomonaga T, Matunis M, Avigan M, Krutzsch H, Dreyfuss G, Levens D. Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J Biol Chem* 1993;268: 18249-58.
- [241] Campillos M, Lamas JR, García MA, Bullido MJ, Valdivieso F, Vázquez J. Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity. *Nucleic Acids Res* 2003;31: 3063-70.
- [242] Lau JS, Baumeister P, Kim E, Roy B, Hsieh TY, Lai M, Lee AS. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as regulators of gene expression through interactions with the human thymidine kinase promoter. *J Cell Biochem* 2000;79: 395-406.
- [243] Xia H. Regulation of gamma-fibrinogen chain expression by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *J Biol Chem* 2005;280: 13171-8.
- [244] Chen H, Hewison M, Hu B, Adams JS. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) binding to hormone response elements: a cause of vitamin D resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 6109-14.
- [245] Thakur S, Nakamura T, Calin G, Russo A, Tamburrino JF, Shimizu M, Baldassarre G, Battista S, Fusco A, Wassell RP, Dubois G, Alder H, Croce CM.

Regulation of BRCA1 transcription by specific single-stranded DNA binding factors. *Mol Cell Biol* 2003;23: 3774-87.

[246] Zhao S, Korzan WJ, Chen CC, Fernald RD. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B and G inhibits the transcription of gonadotropin-releasing-hormone 1. *Mol Cell Neurosci* 2008;37: 69-84.

[247] Mori K, Lammich S, Mackenzie IR, Forné I, Zilow S, Kretzschmar H, Edbauer D, Janssens J, Kleinberger G, Cruts M, Herms J, Neumann M, Van Broeckhoven C, Arzberger T, Haass C. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta Neuropathol* 2013;125: 413-23.

[248] Vera J, Jaumot M, Estanyol JM, Brun S, Agell N, Bachs O. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. *Oncogene* 2006;25: 260-70.

[249] Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14: 3-15.

[250] Henry M, Borland CZ, Bossie M, Silver PA. Potential RNA binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae* identified as suppressors of temperature-sensitive mutations in NPL3. *Genetics* 1996;142: 103-15.

[251] Caputi M, Zahler AM. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *J Biol Chem* 2001;276: 43850-9.

[252] Svitkin YV, Yanagiya A, Karetnikov AE, Alain T, Fabian MR, Khoutorsky A, Perreault S, Topisirovic I, Sonenberg N. Control of translation and miRNA-dependent repression by a novel poly(A) binding protein, hnRNP-Q. *PLoS Biol* 2013;11: e1001564.

[253] Ma WJ, Chung S, Furneaux H. The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25: 3564-9.

[254] Pullmann R, Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Yang X, Gorospe M. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Mol Cell Biol* 2007;27: 6265-78.

- [255] Papadopoulou C, Patrino-Georgoula M, Guialis A. Extensive association of HuR with hnRNP proteins within immunoselected hnRNP and mRNP complexes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804: 692-703.
- [256] Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10: 465-72.
- [257] Noiva R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10: 481-93.
- [258] Argon Y, Simen BB. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10: 495-505.
- [259] Lui TT, Lacroix C, Ahmed SM, Goldenberg SJ, Leach CA, Daulat AM, Angers S. The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2011;31: 2053-65.
- [260] Quesada V, Díaz-Perales A, Gutiérrez-Fernández A, Garabaya C, Cal S, López-Otín C. Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314: 54-62.
- [261] Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 2003;113: 127-37.
- [262] Vandamme J, Völkel P, Rosnoblet C, Le Faou P, Angrand PO. Interaction proteomics analysis of polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 2011;10: M110.002642.
- [263] Nauseef WM, McCormick SJ, Clark RA. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1995;270: 4741-7.
- [264] Zhu Y, Zhang W, Veerapen N, Besra G, Cresswell P. Calreticulin controls the rate of assembly of CD1d molecules in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2010;285: 38283-92.
- [265] Perrone L, Tell G, Di Lauro R. Calreticulin enhances the transcriptional activity of thyroid transcription factor-1 by binding to its homeodomain. *J Biol Chem* 1999;274: 4640-5.
- [266] Galas DJ, Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 1978;5: 3157-70.

- [267] Shabalina SA, Spiridonov NA, Kashina A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Res* 2013;41: 2073-94.
- [268] Kondrashov FA, Ogurtsov AY, Kondrashov AS. Selection in favor of nucleotides G and C diversifies evolution rates and levels of polymorphism at mammalian synonymous sites. *J Theor Biol* 2006;240: 616-26.
- [269] Thanaraj TA, Argos P. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Sci* 1996;5: 1973-83.
- [270] Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315: 525-8.
- [271] Galanello R, Cao A. Relationship between genotype and phenotype. *Thalassemia intermedia. Ann N Y Acad Sci* 1998;850: 325-33.
- [272] Bartoszewski RA, Jablonsky M, Bartoszewska S, Stevenson L, Dai Q, Kappes J, Collawn JF, Bebok Z. A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *J Biol Chem* 2010;285: 28741-8.
- [273] Day JW, Ranum LP. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2005;15: 5-16.
- [274] Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hébuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hofman P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011;43: 242-5.

Elektronske baze podataka

1. *Online Mendelian Inheritance in Man*: <http://www.omim.org/>
2. *HapMap project*: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. *PubMed*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
4. *dbSNP/NCBI*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
5. *Programs for Genomic Applications*: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/pga/>
6. *GenScript*: <http://www.genscript.com/>
7. *RNAfold*: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>
8. *Mfold*: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>
9. *MiRBase*: <http://www.mirbase.org/>
10. *UniProt*: <http://www.uniprot.org/>

BIOGRAFIJA

Iva B. Pruner je rođena 27. juna 1984. godine u Beogradu. Diplomirala je 2009. godine u grupi za Molekularnu biologiju i fiziologiju, smer Eksperimentalna biomedicina, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2010. do 2012. bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, a od 2012. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije je upisala 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija. Ima devet radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu domaćeg značaja, kao i 14 kongresnih saopštenja.

Spisak izabranih radova:

1. **Pruner I**, Djordjevic V, Gvozdenov M, Tomic B, Radojkovic D. Determination of transgene copy number in stably-transfected mammalian cells by PCR-capillary electrophoresis assay. *Biochem Genet* 2014;52(3-4):159-65.
2. Djordjevic V, **Pruner I**, Radojkovic D. Molecular basis of thrombophilia. *J Med Biochem* 2014; 33(1):22-27.
3. Djordjevic V, **Pruner I**, Tomic B, Nestorovic A, Gvozdenov M, Kovac M, Radojkovic D. The 3' prothrombin gene variants in patients with different thrombotic events. *Lab Med* 2014, *in press*.
4. Djordjevic V, Kovac M, Miljic P, Murata M, Takagi A, **Pruner I**, Francuski DJ, Kojima T, Radojkovic D. A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia-the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10):1936-1939.
5. Djordjevic V, Mitic G, **Pruner I**, Kovac M, Radojkovic D. Are thrombophilia more multifactorial than we thought: report of mosaicism for FII G20210A and novel FII T20061C gene variants. *J Thromb Haemost* 2012; 10:301-303.

Tokom svog rada bila je uključena u dva nacionalna i jedan međunarodni projekat. Član je Društva genetičara Srbije i Internacionalnog društva za trombozu i hemostazu (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ива Б. Прунер _____

број индекса _____ М3012/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом


Функционална анализа генске варијанте С20068Т у 3'крају гена за протромбин

човека и њена улога у патогенези тромбофилије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 23.04.2014.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ива Б. Прунер

Број индекса М3012/2009

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Функционална анализа генске варијанте С20068Т у 3'крају гена за протромбин човека и њена улога у патогенези тромбофилије

Ментор др Валентина Ђорђевић и проф. др Душанка Савић Павићевић

Потписани/а Ива Б. Прунер

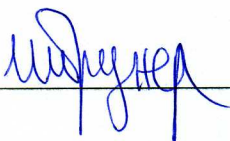
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 23.04.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционална анализа генске варијанте C20068T у 3'крају гена за протромбин
човека и њена улога у патогенези тромбофилије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

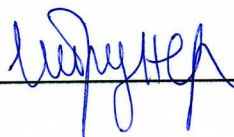
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.04.2014.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.