

Evolucijska, biokemijska i biološka karakterizacija proteina DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus*

Beljan, Silvestar

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:982937>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

SILVESTAR BELJAN

**Evolucijska, biokemijska i biološka
karakterizacija proteina DRG1 iz spužve
*Eunapius subterraneus***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

SILVESTAR BELJAN

**Evolucijska, biokemijska i biološka
karakterizacija proteina DRG1 iz spužve
*Eunapius subterraneus***

DOKTORSKI RAD

Mentori:
dr. sc. Helena Četković
prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

SILVESTAR BELJAN

**Evolutionary, biochemical and
biological characterization of sponge
Eunapius subterraneus DRG1 protein**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
dr. sc. Helena Četković
prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček

Zagreb, 2022.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku, Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Helene Četković i u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Heleni Četković koja mi je pružila priliku za izradu doktorske disertacije u svome laboratoriju na Institutu Ruđer Bošković. Zahvalan sam na njenom strpljenju, prijateljskom pristupu, konstruktivnim kritikama i najviše na pomoći u izazovnijim trenucima doktorata.

Zahvaljujem se i svome drugom mentoru dr.sc. Kristianu Vlahovičeku što me je primio u svoj laboratorij na Prirodoslovno matematičkom fakultetu i omogućio mi sudjelovanje u pokusima sekvenciranja nove generacije. Takvo sudjelovanje mi je pomoglo dodatnom razumijevanju najnovijih tehnologija u znanosti.

Veliko hvala kolegama iz Laboratorija za molekularnu genetiku i Laboratorija za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku na ugodnoj radnoj atmosferi, svim zanimljivim raspravama, nezaboravnim trenucima te pomoći i podršci.

Zahvaljujem kolegama iz Grupe za bioinformatiku Prirodoslovno matematičkog fakulteta na ugodnoj atmosferi, pristupačnosti, korisnim savjetima i pomoći. Dali su mi alate i znanje za još dublje razumijevanje bioinformatike.

Na kraju hvala mojoj obitelji koja mi je pružila veliku pomoć i podršku!

Evolucijska, biokemijska i biološka karakterizacija proteina DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus*

SILVESTAR BELJAN

Laboratorij za molekularnu genetiku, Zavod za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Spužve su jedna od najstarijih skupina životinja koja je evolucijski gotovo nepromijenjena. Premda jednostavne građe, spužve imaju bogat genom s mnoštvom gena koji su pronađeni i u genomima kompleksnih životinja od kojih su mnogi povezani s nastankom bolesti kod ljudi. Jedan od gena povezanih s nastankom raka koji je očuvan od spužve do čovjeka je *drg1*. Protein DRG1 pripada skupini GTPaza čija je razina u stanici uvjetovana proteinom DFRP1. Bioinformatičke analize su potvrdile visoku evolucijsku očuvanost gena i proteina DRG1. Biokemijska karakterizacija proteina DRG1 čovjeka i spužve pokazala je sličnu razinu intrinzične GTPazne aktivnosti, sposobnost nespecifičnog vezanja DRG1 na DNA i RNA te omjer proteina heterooligomernog proteinskog kompleksa DRG1:DFRP1 1:3 ili 1:4. Biološka karakterizacija ljudskog i spužvinog DRG1:DFRP1 u stanicama HeLa dodatno je potvrdila kolokalizaciju u citosolu, a prekomjerna ekspresija DRG1:DFRP1 povećala je migraciju. Ovi rezultati doprinijeli su boljem razumijevanju funkcije DRG1 prije njegove diverzifikacije i specijalizacije kod ljudi.

(93 stranice / 39 slika / 4 tablice / 117 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: GTPaze, DRG1, kompleks DRG1:DFRP1, rak, evolucija, Porifera

Mentori: dr. sc. Helena Četković, znanstvena savjetnica, IRB
prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, redoviti profesor u trajnom zvanju, PMF
Ocjenjivači: dr. sc. Andreja Mikoč, znanstveni suradnik, IRB
dr. sc. Maja Herak Bosnar, znanstveni savjetnik/izvanredni profesor, IRB
dr. sc. Rosa Karlič, znanstveni suradnik/docent, PMF

**Evolutionary, biochemical and biological characterization of sponge *Eunapius*
subterraneus DRG1 protein**

SILVESTAR BELJAN

Laboratory for Molecular Genetics, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute,
Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Division of Molecular Biology, Faculty of Science,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Sponges are one of the oldest groups of animals that changed little during evolution. Although morphologically simple, their genomes are complex and contain many genes associated with human diseases. One of these cancer-associated genes conserved from sponges to humans is *drg1*. The DRG1 protein is a GTPase whose intracellular levels are regulated by the DFRP1 protein. Bioinformatical analyses confirmed a high evolutionary conservation of the DRG1 gene and protein. Biochemical characterisation of the human and sponge DRG1 proteins revealed similar GTPase activity, nonspecific DNA and RNA binding ability, and a ratio of DRG1:DFRP1 in the heterooligomeric protein complex of 1:3 or 1:4. Biological characterization of sponge and human DRG1:DFRP1 confirmed colocalization in the cytosol of human HeLa cells, while overexpression of DRG1:DFRP1 increased cell migration. These results contribute to a better understanding of DRG1 function before its diversification and specialization in humans.

(93 pages / 39 figures / 4 tables / 117 references / original in Croatian)

Keywords: GTPases, DRG1, DRG1:DFRP1 complex, cancer, evolution, Porifera

Supervisors: dr. sc. Helena Četković, Senior Scientist, IRB

prof. dr. sc. Kristian Vlahoviček, Full Professor, PMF

Reviewers: dr. sc. Andreja Mikoč, Research Associate, IRB

dr. sc. Maja Herak Bosnar, Senior scientist/Associate Professor, IRB

dr. sc. Rosa Karlić, Research Associate/Assistant Professor, PMF

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1 Spužve (Porifera)	4
2.1.1 Opće karakteristike	4
2.1.2 Istraživanja na modelu spužve	5
2.1.3 Slatkovodna špiljska spužva <i>Eunapius subterraneus</i>	7
2.1.4 Istraživanja homologa gena iz spužvi povezanih s nastankom raka kod ljudi	8
2.2 Protein DRG1 (<i>Developmentally Regulated GTP-binding protein</i>)	10
2.2.1 Osnovne karakteristike i podjela GTPaza	10
2.2.2 Podporodica DRG GTPaza	11
2.2.3 Struktura proteina DRG1	13
2.2.4 Proteini DFRP i njihova uloga u funkciji proteina DRG	13
2.2.5 GTPazna aktivnost proteina DRG1	15
2.3 Uloga proteina DRG1 u stanici	17
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1 Materijali	21
3.1.1 Standardne kemikalije	21
3.1.2 Boje i biljezi	21
3.1.3 Enzimi, proteini, nukleinske kiseline i antibiotici	21
3.1.4 Komercijalni kompleti	22
3.1.5 Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija <i>E. coli</i>	22
3.1.6 Bakterijski sojevi i plazmidi	22
3.1.7 Ostali materijali	24
3.2 Metode	24
3.2.1 Bioinformatičke metode	24
3.2.2 Prikupljanje uzoraka	24
3.2.3 Izolacija spužvinih stanica	25
3.2.4 Izolacija genomske DNA i ukupne RNA te sinteza cDNA	25
3.2.5 Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu	26
3.2.6 Početnice	26
3.2.7 Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom	28
3.2.8 Kloniranje u ekspresijske vektore	28
3.2.9 Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama	32
3.2.10 Ligacija DNA pomoću DNA-ligaze T4	32
3.2.11 Transformacija bakterije <i>E. coli</i>	32

3.2.12	Biokemijske metode	34
3.2.12.1	Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina.....	34
3.2.12.2	Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na TALON agarozima.....	35
3.2.12.3	Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	36
3.2.12.4	Vizualizacija proteina westernskom metodom otiska.....	36
3.2.12.5	Gel-filtracija	37
3.2.12.6	Ultrafiltracija.....	37
3.2.12.7	Određivanje koncentracije proteina	38
3.2.12.8	Test s glutaraldehydom	38
3.2.12.9	GTPazni esej	39
3.2.12.10	Test nespecifičnog vezanja proteina na RNA.....	39
3.2.12.11	Test nespecifičnog vezanja proteina na DNA	40
3.2.13	Biološke metode	40
3.2.13.1	Stanična kultura i prolazna transfekcija stanica.....	40
3.2.13.2	Unutarstanični smještaj	41
3.2.13.3	Test zacjeljivanja rane.....	41
3.2.13.4	Transfekcija spužvinih stanica u kulturi	42
4.	REZULTATI	43
4.1	Identifikacija homologa proteina DRG1 iz spužve i analiza njegove evolucijske prošlosti	43
4.2	Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve <i>Eunapius subterraneus</i>	51
4.3	Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina DRG1 i DFRP1 u bakterijama	53
4.4	Biokemijska karakterizacija proteina DRG1	56
4.4.1	Prekomjerna ekspresija proteina DRG1 i DFRP1	56
4.4.2	Proizvodnja i pročišćavanje rekombinantnih proteina	58
4.4.3	Kvaterna struktura proteina DRG1	60
4.4.4	GTPazna aktivnost proteina DRG1	64
4.4.5	Vezanje proteina DRG1 na RNA	68
4.4.6	Vezanje proteina DRG1 na DNA	70
4.5	Biološka karakterizacija proteina DRG1	71
4.5.1	Konstrukcija vektora i ekspresija DRG1 u kulturi ljudskih tumorskih stanica..	71
4.5.2	Lokalizacija proteina DRG1 u stanicama HeLa.....	71
4.5.3	Utjecaj prekomjerno eksprimiranog proteina DRG1 na staničnu migraciju.....	72
4.5.4	Lokalizacija proteina DRG1 u spužvinim stanicama u kulturi	74
5.	RASPRAVA	76
6.	ZAKLJUČCI	84
7.	LITERATURA	86

8. ŽIVOTOPIS.....	95
--------------------------	-----------

1. UVOD

Spužve (koljeno Porifera) se smatraju jednim od najjednostavnijih životinja koje su se odvojile od drugih Metazoa prije više od 800 milijuna godina (Love i sur., 2009). Većina opisanih vrsta spužvi nastanjuje morska dna, a manji broj vrsta živi u slatkim vodama. Nemaju pravih tkiva ni organa, ali zato stanice imaju visok stupanj neovisnosti. Iako jednostavne građe i fiziologije, spužve posjeduju kompleksan genom (Srivastava i sur., 2010; Kenny i sur., 2020) s velikim brojem gena koji pokazuju visoku evolucijsku očuvanost s homologima kod viših životinja (Harcet i sur., 2010a). Ove karakteristike ih čine odličnim modelnim organizmom za dobivanje uvida u svojstva genoma i proteoma pretka svih Metazoa (Harcet i sur., 2010a; Srivastava i sur., 2010; Četković i sur., 2018a).

S pojavom višestaničnosti, razvojem pravih tkiva i organa došlo je do pojave brojnih patoloških stanja, uključujući rak. Usporednim analizama genoma i proteoma mnogih organizama potvrđeno je da se veliki broj gena i proteina, povezanih s nastankom raka, pojavio tijekom rane evolucije Metazoa (Domazet-Lošo i sur., 2008; Domazet-Lošo i sur., 2010). Stoga, proučavanje gena povezanih s nastankom raka u jednostavnijem modelnom sustavu, kao što je spužva, može pružiti uvid u njihove osnovne stanične funkcije. Iako su višestanične, prema dosadašnjim saznanjima spužve ne obolijevaju od raka (Athena Aktipis i sur., 2015). Međutim, već je dulje vrijeme poznato kako su spužve dobar modelni organizam za takve studije jer imaju širok repertoar gena za koje se zna da su uključeni u složene procese i signalne puteve kod viših životinja. Biokemijska svojstva i biološke funkcije spužvinih gena povezanih s nastankom raka kod ljudi istraživani su samo sporadično i tek ih treba razjasniti (Müller i sur., 1987; Gramzow i sur., 1989; Koziol i sur., 1998; Wiens i sur., 2000; Wiens i sur., 2003; Perina i sur., 2011a; Perina i sur., 2011b; Perina i sur., 2012 a; Perina i sur., 2015; Ehara i sur., 2015; Caria i sur., 2017; Četković i sur., 2018a; Četković i sur., 2018b).

Jedan od proteina povezan s nastankom raka, a identificiran je u spužvama, je *Developmentally regulated GTP-binding 1 protein* (DRG1) (Sazuka i sur., 1992a; Sazuka i sur., 1992b). Eukarioti posjeduju dva gena *drg* (*drg1* i *drg2*), dok arheje posjeduju samo jedan gen *drg* (Westrip i sur., 2021). Gen *drg1* visoko je eksprimiran u različitim tkivima (skeletnim mišićima, srcu i bubrezima) odraslih jedinki, ali i u aktivno rastućim tkivima i reproduktivnim organima biljaka (Etheridge i sur., 1999; Li i sur., 2000; Ishikawa i sur., 2003). Istraživanja očuvanosti gena *drg1* između homologa kod životinja, biljaka, gljiva i arheja dovela su do zaključka da je gen *drg1* visokoočuvan u svim navedenim organizmima (Li i sur., 2000; Westrip i sur., 2021). Evolucijska očuvanost gena je indikacija važnosti njegove uloge u staničnim funkcijama.

Protein DRG1 pripada porodici DRG (*developmentally regulated GTP-binding protein*) koja je član podporodice Obg GTPaza (Leipe i sur., 2002). Proteini DRG1 i DRG2 imaju evolucijski očuvane vezne partnere iz skupine DFRP (engl. *DRG family regulatory protein*). Protein DRG1 stvara kompleks s proteinom DFRP1, a DFRP2 je vezni partner proteina DRG2 (Ishikawa i sur., 2005). Proteini iz porodice DFRP su, vjerojatno, kroz evoluciju doprinijeli razlici u strukturi i funkciji proteina DRG1 i DRG2 (Daugeron i sur., 2011). Premda oskudna, istraživanja na proteinu DRG1 pokazala su da DRG1 ima ulogu u translaciji, regulaciji mikrotubula te staničnom rastu (Westrip i sur., 2021). Naime, pokazano je da proteinski kompleks DRG1:DFRP1 kosedimentira s polisomima te se pretpostavlja da sudjeluje u translaciji ili ima funkciju povezanu s ribosomima (Ishikawa i sur., 2009; Wout i sur., 2009; Daugeron i sur., 2011; Francis i sur., 2012). Osim toga, protein DRG1 se nespecifično veže na molekulu RNA što također ide u prilog pretpostavci da sudjeluje u translaciji u eukariotskim stanicama (Kim i sur., 2003 b; Francis i sur., 2012). Nadalje, DRG1 ima ulogu u mehanizmu povezanom s nastajanjem snopova mikrotubula te njihovom polimerizacijom i stabilizacijom (Schellhaus i sur., 2017). To je indikacija da DRG1 ima ulogu u staničnoj proliferaciji. Upravo je patološka proliferacija stanica jedno od glavnih obilježja raka. Uloga proteina DRG1 u inicijaciji i progresiji raka je nerazjašnjena, ali je iz literature poznato da je velika ekspresija DRG1 potvrđena u melanomu (Kiniwa i sur., 2015), osteosarkomu (Ling i sur., 2020) i adenokarcinomu pluća (Lu i sur., 2016) te u nekim tumorskim staničnim linijama (Li i sur., 2000). Naime, utišavanje ekspresije gena *drg1* u staničnim linijama (HeLa, A549 i H1299) rezultira inhibicijom rasta u fazi M staničnog ciklusa, dok prekomjerna ekspresija rezultira nepravilnom segregacijom kromosoma. To bi značilo da prekomjerna ekspresija DRG1 pridonosi nekontroliranoj staničnoj proliferaciji, a time i nastanku raka (Lu i sur., 2016). Osim što sudjeluje u mitozu, DRG1 interagira i s drugim proteinima koji su povezani s nastankom raka. Istraživanja u miševima su pokazala da neregulirana ekspresija gena *drg1* zajedno sa *c-myc* i *ras* stimulira staničnu transformaciju fibroblasta (Mahajan i sur., 1996) te je uočeno da je DRG1 povezan sa onkogenim transkripcijskim faktorima SCL/TAL1 (Mahajan i sur., 1996; Zhao i sur., 1998). Sva ova saznanja ukazuju na uključenost proteina DRG1 u mehanizme nastanka i progresije raka.

Svrha, cilj i opseg rada

Iako je rak jedna od najistraživanijih pojava u biologiji koja se javlja u gotovo svim životinjama (Domazet-Lošo i sur., 2014; Athena Aktipis i sur., 2015), istraživanje nastanka i svojstava raka u kontekstu evolucije dobilo je relativno malo pozornosti. Opće je prepoznato da napredak u liječenju i prevenciji raka ovisi o dubljem razumijevanju biologije raka (Weinberg, 2014). Proučavanje ljudskih bolesti korištenjem životinja kao eksperimentalnih modela smatra se ključnim za razumijevanje uzroka, biologije i prevencije bolesti. Posljednjih godina svjedoci smo sve većeg zanimanja za proučavanje evolucije gena povezanih s nastankom bolesti jer je širok repertoar tih gena bio prisutan već u genomima morfološki jednostavnih životinja. Međutim, malo se zna o genima povezanima s nastankom raka kod beskralješnjaka, osobito kod jednostavnih životinja bez bilateralne simetrije – bazalnih Metazoa. Stoga, kako bismo lakše razjasnili mehanizme djelovanja gena povezanih s nastankom raka treba ih promatrati u širem kontekstu koji uzima u obzir homologe morfološki jednostavnih životinja, poput spužvi, koje su se prve odvojile od zajedničkog stabla životinja. Upravo činjenica da se spužve nalaze na samoj bazi filogenetskog stabla Metazoa, omogućava nam istraživanje raka iz evolucijske perspektive. Ovakvo istraživanje uključuje: 1) identifikaciju gena povezanih s rakom kod ljudi i praćenje njihove evolucijske prošlosti; 2) proučavanje svojstva gena pretka i analizu promjena homologa kod životinja; 3) razjašnjenje njihovih složenih interakcija i prepoznavanje okidača koji mogu dovesti do malignosti.

Iako postoje brojne spoznaje o proteinu DRG1 od otkrića, njegova točna biološka funkcija te uloga u nastanku i progresiji raka, još nije u potpunosti razjašnjena. Evolucijska očuvanost proteina DRG1 te povezanost s osnovnim staničnim procesima i uloga u raku, čine DRG1 zanimljivom temom istraživanja.

Stoga je cilj istraživanja doktorske disertacije bio okarakterizirati protein DRG1 na modelu jedinstvene podzemne slatkovodne spužve koja živi samo u Hrvatskoj, *Eunapius subterraneus* (Porifera, Spongillidae, Sket i Velikojna 1984), u svrhu boljeg razumijevanja osnovne fiziološke funkcije ovog proteina povezanog s nastankom raka. To ćemo postići identifikacijom i analizom evolucijske prošlosti, te biokemijskom i biološkom karakterizacijom spužvinog homologa DRG1 te usporedbom s ljudskim DRG1. Ovim pristupom dobiti ćemo obuhvatniji uvid u ulogu DRG1 prije njegove diverzifikacije i specijalizacije kod ljudi.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Spužve (Porifera)

2.1.1 Opće karakteristike

Spužve (Porifera) su koljeno životinja iz skupine beskralješnjaka koje su se među prvima odvojile od glavne razvojne linije višestaničnih životinja, Metazoa, te evolucijski predstavljaju slijepu granu. Svrstava ih se u zasebni odjeljak Parazoa, tj. životinja bez pravih tkiva, u koji pored spužvi spada i koljeno Placozoa. Spužve se danas dijele u 4 razreda, 25 redova, 128 porodica, 680 rodova i trenutno opisanih 9488 vrsta (Hooper i sur., 2003; De Voogd i sur., 2022). Četiri razreda spužvi čine: Hexactinellida (staklače), Demospongiae (kremenorožnjače), Calcarea (vapnjenjače) i Homoscleromorpha, koje su se do nedavno svrstavale u kremenorožnjače (Wörheide i sur., 2012).

Smatra se da su spužve jedna od najstarijih skupina životinja. Rani neoproterozoik, geološka era koja je trajala od prije milijarde do prije 542 milijuna godina bila je puna klimatskih ekstrema i intenzivnih evolucijskih događaja koji su rezultirali pojavom životinja, uključujući spužve (Peterson i sur., 2008; Love i sur., 2009). Teško je točno odrediti vrijeme kada su se spužve prvi puta pojavile jer se rijetko mogu naći fosilizirani mekani dijelovi spužvi. Spikule, skeletne elemente, teško je izolirati iz sedimentnih stijena, a neke spužve uopće na posjeduju mineralni kostur. Pa ipak, Love i suradnici su 2009. godine dokazali prisutnost „molekularnih fosila“ spužvi u sedimentnim stijenama starim oko 635 milijuna godina. Pronađeni lipidni biomarkeri su geološki stabilni oblici 24- izopropilkolesterola, karakteristični za staničnu membranu kremenorožnjača. Nedavno su otkriveni novi fosilni ostaci stari oko 890 milijuna godina, a pronađene fosilizirane vermiformne mikrostrukture su identične mikrostrukturama današnjih spužvi, kremenorožnjačama (Turner, 2021). Pretpostavlja se da je to, za sada, najstariji izravni dokaz postojanja životinja.

Spužve su isključivo vodene životinje i danas su najzastupljeniji organizmi u ekosustavu morskog bentosa (od plitkog do dubokog) (Slattery i sur., 2011). Samo mali broj spužvi, podred Spongillina, žive u slatkim vodama. Odrasle jedinke su sesilni organizmi koji se hrane tako da usisavaju goleme količine vode iz koje filtriraju hranjive tvari (Koopmans i sur., 2010). Voda u spužvu ulazi kroz mnogobrojne sitne pore (ostie) na vanjskoj stijenci spužve, prolazi kroz sustav kanalića i komora u tijelu spužve i izlazi kroz jedan veći otvor (oskulum) koji se obično nalazi na gornjoj strani spužve. Osim što se ubrajaju među najstarije, spužve su i među najjednostavnijim životinjama koje ne posjeduju prave organe ni tkiva.

Izgrađene su od nekoliko različitih vrsta specijaliziranih stanica koje imaju specifičnu funkciju. Tako pinakociti, pločaste stanice, oblažu vanjsku stranu spužve kao i sustav kanala i komorica u njezinoj unutrašnjosti. Hoanociti su bičaste stanice koje okružuju šupljine te uzrokuju strujanje vode kroz spužvu. U mezohilu, središnjem sloju tijela, nalaze se archeociti, totipotentne stanice iz kojih se mogu razviti svi ostali stanični tipovi i sklerociti koji stvaraju anorganske potporne elemente, spikule. Uz navedene, u spužvi postoje i drugi tipovi stanica kao što su granulociti, oociti, spermociti i dr. (Simpson, 1984; Van Soest i sur., 2012; Schippers, 2013). Spužve mogu biti različitih veličina, oblika i konzistencije ovisno o njihovom skeletu. Skelet može biti izgrađen od silikonskih ili vapnenastih elemenata, spikula i/ili organskih kolagenskih vlakana, spongina (Van Soest i sur., 2012). Neke spužve ne posjeduju kostur. Spužve se razmnožavaju spolno i nespolno. Prilikom spolnog razmnožavanja nastaje ličinka koja pliva prije nego li se pričvrsti za podlogu i razvije u odraslu jedinku. Nespolno se spužva razmnožava fragmentacijom, pupanjem i stvaranjem gemule (Schippers, 2013).

2.1.2 Istraživanja na modelu spužve

Postoji niz izazova u istraživanjima spužvi. Neki od njih su sistematika, klasifikacija, filogenija i evolucija spužvi koje nisu dovoljno razjašnjene. Dio izazova predstavlja i činjenica što i dalje nema dovoljno informacija iz genomskih i transkriptomskih studija. Tradicionalna klasifikacija spužvi temelji se na klasičnim morfološkim obilježjima poput oblika skeletnih elemenata, spikula. Ovakva klasifikacija je upitna zbog nedovoljnog broja morfoloških značajki kod ovih jednostavnih organizama, kao i zbog činjenice da značajke ovise i o uvjetima okoliša u kojem spužva živi. Zbog toga ista vrsta može pokazivati različite značajke. Novija istraživanja koja se baziraju na molekularno biološkim metodama često daju različite rezultate u odnosu na tradicionalnu klasifikaciju (Harcet i sur., 2010b; Van Soest i sur., 2012). Već je od 19. stoljeća poznato da su spužve srodne drugim životinjama (Grant, 1836). Zbog nedostatka probavnog i živčanog sustava, kao i pravih tkiva, spužve su smještene u zasebnu kategoriju - Parazoa (Sollas, 1888) za razliku od životinja s pravim tkivima (Eumetazoa) (Hyman, 1940). Istraživanja na jednostavnim organizmima poput spužvi, za koje se smatra da su očuvale mnoge značajke pretka životinja, uvelike su pridonijela razjašnjavanju podrijetla višestaničnih procesa kao i razjašnjavanju filogenetskih odnosa između drugih bazalnih skupina životinja. Isto tako, uočena je velika strukturalna ali i funkcionalna očuvanost spužvinih gena u usporedbi sa složenijim članovima Metazoa, uključujući i kralješnjake (Müller i sur., 2004).

Do nedavno, jedina spužva čiji je genom u potpunosti sekvenciran je bio iz morske spužve kremenorožnjače *Amphimedon queenslandica*. Njegova veličina iznosi 166 Mb (mega baza) i sadrži oko 40 000 gena koji kodiraju za proteine. Osim kodirajućih regija, analizama navedenog genoma otkriveno je da su strukture gena (faze i pozicije introna) očuvane kroz evoluciju životinja. Dodatno, uočena je značajna sličnost organizacije genoma (sintenijske) spužve u usporedbi s ostalim životinjama (Srivastava i sur., 2010). Usporedbom veličine genoma između životinja, primijećeno je da je genom spužve među manjima premda je genom nekih vrsta spužvi iste veličine kao i genom životinja s kompleksnijom građom tijela, kao što su prvouste (Jeffery i sur., 2013). Genom spužve *A. queenslandica* sadrži 166 Mb, a genom spužve *Tethya wilhelma* oko 125 Mb što se ne razlikuje značajno od genoma mušice *Drosophila melanogaster* koja ima genom veličine 175 Mb (Renard i sur., 2018). Nedavno objavljeni genom spužve *Ephydatia mulleri* pokazuje da je genom ove spužve 326 Mb, dvostruko veći od genoma spužve *A. queenslandica* (166 Mb), ali slične veličine genomu spužve *Sycon ciliatum* (357 Mb) (Kenny i sur., 2020). Ovi rezultati idu u prilog konceptu C-paradoksa jer: 1) različite spužve sa sličnom razinom složenosti tijela pokazuju različitu veličinu genoma i 2) iako relativno anatomske jednostavne, spužve sadrže genom koji je po veličini sličan genomu nekih kompleksnijih beskralješnjaka (Elliott i sur., 2015). Kako bi se dobio još detaljniji uvid u raznolikost i taksonomiju spužvi, 2012. godine započeo je projekt *Sponge Barcoding Project* čiji je krajnji cilj kreirati bazu podataka genetičkih markera koji će pridonijeti identifikaciji i klasifikaciji spužvi (Vargas i sur., 2012). Zadnja klasifikacija spužvi iz *Sponge Barcoding Project*-a bazira se na osnovi molekularnih markera citokrom oksidaze I i 28S rDNA spužve *Dendrilla lacunosa* (Vacelet i sur., 2019). Osim za potrebe što točnije klasifikacije, otkriće genoma spužve *E. mulleri* dodatno je doprinijelo razumijevanju rane evolucije višestaničnih životinja. Analizom genoma spužve uočeno je prisustvo velikog broja gena koji su povezani s „pravim“ višestaničnim životinjama (Eumetazoa). Neki od tih gena povezani su s formacijom bazalne membrane i pravoga epitela (kolagen tipa IV, kontaklin, laminin, PAR3/6, perlekan i nidogen) (Kenny i sur., 2020). Spužve imaju složenije genome od bliskih jednostaničnih srodnika životinja po čemu se da zaključiti da se kompleksnost genoma povećala upravo na razini spomenutog ranog pretka Metazoa (Harcet i sur., 2010a). Isto tako, uočeno je da su mnogi geni spužvi eksprimirani u ranoj fazi razvoja i prilikom razvoja sustava za filtraciju vode dok se geni kod ostalih eukariota eksprimiraju u različitim stadijima razvoja (Kenny i sur., 2020). Sekvenciranje i analiza genoma spužvi od velikog su značaja jer daju uvid u ranu evoluciju i podrijetlo velikog broja gena. Stoga, pitanje „Koja je uloga toliko velikog broja gena/proteina u tako jednostavnom organizmu?“ sve više dobiva odgovor (Harcet i sur., 2010a).

2.1.3 Slatkovodna špiljska spužva *Eunapius subterraneus*

Kao modelni organizam u našem istraživanju koristili smo ogulinsku špiljsku spužvicu *Eunapius subterraneus*. *E. subterraneus* jedini je poznati predstavnik slatkovodnih špiljskih spužvi u svijetu, a prvi su ju opisali Sket i Velikonja 1984. godine. Svrstava se u razred kremenorožnjače, podred Spongillina, rod *Eunapius*. Danas je poznato samo šest staništa spužvice od kojih je jedno u Velikoj Kapeli, a pet staništa je u okolici grada Ogulina (Tounjčica špilja, Mikašinovića špilja, Rudnica špilja VI, Mandelaja, Crnačka špilja i Izvor špilja Gojak). Spužvica nije pigmentirana (bijelega je boje), veoma je mekana i rahle je građe (slika 1.).



Slika 1. Ogulinska špiljska spužvica (*Eunapius subterraneus*). Preuzeto i prilagođeno iz <https://www.hbsd.hr/old/Spuzva/>.

Morfološki oblik spužvi varira s obzirom na okolišne utjecaje i fazu životnog ciklusa, može biti od jajastog do cilindričnog oblika, naborane površine tijela i veličine od 1 do 8 cm (Bilandžija i sur., 2007). *E. subterraneus* je registrirana u crvenom popisu špiljske faune Hrvatske pod IUCN kategorijom ugroženosti: EN (engl. *endangered*) što znači da je rizik izumiranja vrste visok (Ozimec i sur., 2009). Prvobitna klasifikacija ove spužvice možda nije u potpunosti točna. Prema rezultatima analiza molekulskih biljega (ITS2, mitohondrijske citokrom oksidaze I i 18S rDNA), ova spužvica je odvojena od drugih pripadnika roda *Eunapius* i bliže skupini s pripadnicima iz roda *Ephydatia* s nekoliko drugih vrsta slatkovodnih spužvi (Harcet i sur., 2010b).

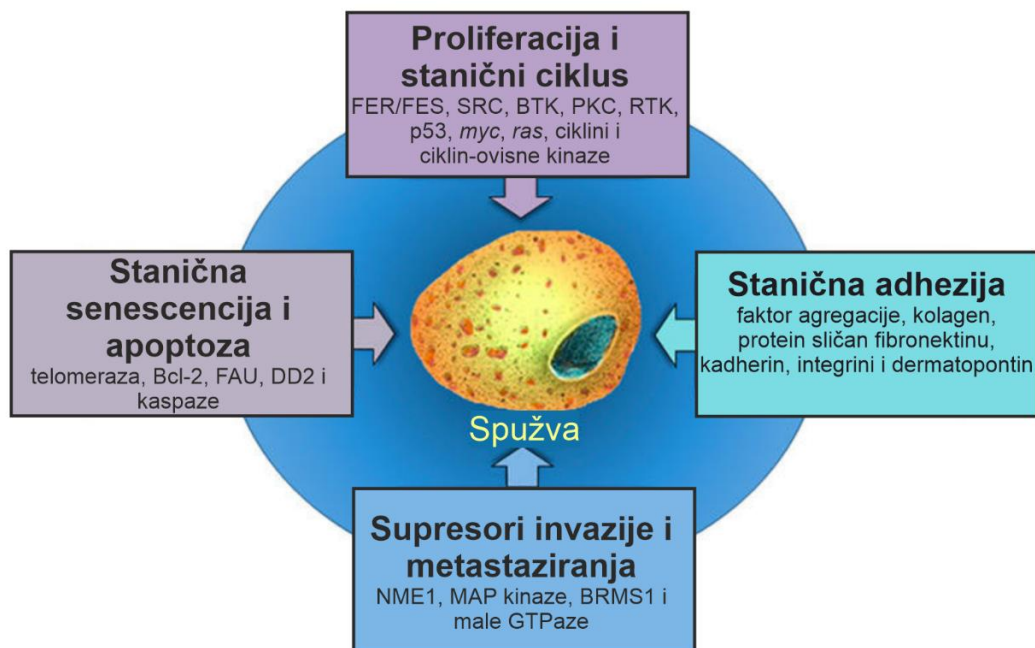
Dodatno, Pleše i suradnici (Pleše i sur., 2012) usporedili su 12 gena koji kodiraju za proteine iz genoma mitohondrijske DNA spužve *E. subterraneus* (GenBank: GU086203) s ostalim predstavnicima Porifera. Rezultat ove analize dodatno potvrđuje da se *E. subterraneus* smješta u skupinu s *E. mulleri* i *Lubomirska baikalenskiis*. Također, zbog bliskog grupiranja u filogenetskom stablu može se zaključiti da su ove tri spužve potekle od bliskog zajedničkog pretka te da se diverzifikacija od zajedničkog pretka desila relativno nedavno (Pleše i sur., 2012).

2.1.4 Istraživanja homologa gena iz spužvi povezanih s nastankom raka kod ljudi

Karakteristika višestaničnosti suradnja je među stanicama s ciljem razvoja, održavanja i reprodukcije organizma. Kompleksna višestaničnost podrazumijeva postojanje specijaliziranih tipova stanica, tkiva, organa, i organskih sustava. Nekoliko je glavnih prednosti višestaničnosti prema jednostaničnosti; specijalizirane stanice učinkovitije su u obavljanju svojih uloga, a organizmi mogu narasti do većih dimenzija i dulje živjeti. Jednu od negativnih strana višestaničnosti predstavljaju oboljenja koja su posljedica „sebičnih stanica“ tj. nastanak tumora (Athena Aktipis i sur., 2015). Budući da se tumor pojavio upravo prilikom prijelaza na višestaničnost, za bolje razumijevanje bolesti ključno je proučavanje gena/proteina odgovornih za procese međustanične komunikacije, kontrolu diobe stanica i nastanak višestaničnosti (Davies i sur., 2011). Proučavanje takvih gena/proteina bazira se većinom na usporednim analizama proteina i gena „ranih“ i „pravih“ višestaničnih životinja. Rezultati ovakvih analiza pružili su brojne vrijedne podatke koji idu u prilog teoriji da se velika većina gena/proteina pojavila upravo tijekom rane evolucije životinja (Metazoa) (Domazet-Lošo i sur., 2008; Domazet-Lošo i sur., 2010; Četković i sur., 2018b).

Daljnje analize gena povezanih s nastankom raka potvrdile su njihovu prisutnost u genomu i transkriptomu spužve (slika 2.) te visoku sačuvanost u usporedbi sa homologima iz viših Metazoa, uključujući čovjeka. Očuvanost ovih proteina je uočena u predviđenoj primarnoj, sekundarnoj i tercijarnoj strukturi, što upućuje na slične ili identične biokemijske i biološke funkcije (Kruse i sur., 1996; Četković i sur., 1998; Četković i sur., 2004; Četković i sur., 2007; Perina i sur., 2006; Perina i sur., 2012b; Hargett i sur., 2010a; Četković i sur., 2014; Beljan i sur., 2020). Analize primarne strukture, biokemijskih i bioloških karakteristika proteina Nme1, Fau i tirozin-kinaze Btk iz spužve pokazale su sva slična svojstva koja su uočena kod ljudskih homologa (Perina i sur., 2011b; Perina i sur., 2012b; Perina i sur., 2015).

Protein Nme1 iz spužve nalazi se u istoj aktivnoj heksamernoj formi, posjeduje istu sposobnost vezanja molekule DNA i istu NDP-kinaznu aktivnost kao i ljudski homolozi Nme1 i Nme2. Također, spužvin protein Nme1 stvara heterologne multimerne zajedno s ljudskim proteinima Nme1 što znači da se homolozi iz spužve i čovjeka prepoznaju kao partneri za vezanje. Isto tako, biološka karakterizacija spužvinog proteina Nme1 pokazala je da kolokalizira sa ljudskim homolozima i značajno smanjuje migraciju tumorskih stanica u kulturi (Perina i sur., 2011b). Prilikom karakterizacije tirozin kinaze Btk uočeno je da su kinazne aktivnosti spužvinog i ljudskog enzima slične (Perina i sur., 2012b). Nadalje, biološka karakterizacija spužvinog proteina Fau pokazala je isto tako da kolokalizira s ljudskim homolozima i da posjeduje proapoptotičku aktivnost što je poznato kod homologa iz čovjeka (Perina i sur., 2015). Na primjeru ovih spužvinih proteina koji su povezani sa nastankom raka potvrđeno je da su se njihove sadašnje biokemijske i biološke funkcije u čovjeku pojavile vrlo rano u evoluciji životinja i to čak prije pojave pravih tkiva i organa, pa tako i prije pojave tumora. Ove su karakteristike ostale očuvane od jednostavnih „ranih“ Metazoa pa sve do kompleksnih Metazoa, uključujući i čovjeka.



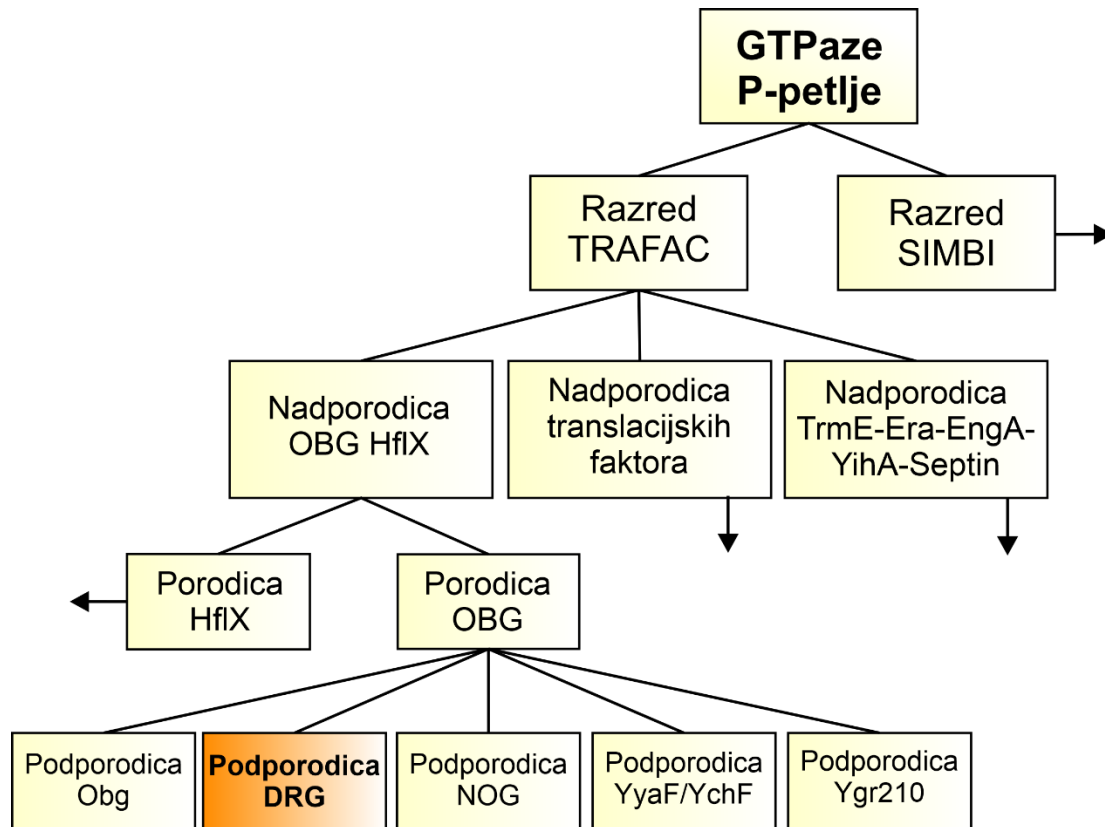
Slika 2. Shematski prikaz opisanih homologa gena/proteina iz spužve povezanih s nastankom raka kod ljudi. Preuzeto i prilagođeno iz Četković i sur., 2018a.

2.2 Protein DRG1 (*Developmentally Regulated GTP-binding protein*)

2.2.1 Osnovne karakteristike i podjela GTPaza

GTPaze su proteini koji sudjeluju u brojnim staničnim procesima kao što su sinteza proteina, prijenos signala, prijenos proteina kroz membranu, transport vezikulama, kontrola proliferacije i diferencijacije stanica te organizacija citoskeleta (Verstraeten i sur., 2011). Provedene strukturalne i genomske studije su identificirale veliki broj GTPaza čija je zajednička karakteristika sposobnost vezanja molekule GTP i hidroliza iste u GDP. Zbog sposobnosti da kruže između inaktivnog oblika, kada je na njih vezan GDP, i aktivnog oblika, kada vežu GTP, GTPaze su nazvane molekularnim prekidačima. GTP se veže na specifično mjesto na proteinu koje se naziva G-domena. G-domenu čini pet G-motiva (G1-G5) koji imaju karakteristične evolucijski očuvane aminokiselinske sljedove. Tako je za motiv G1 karakterističan slijed GXXXXGK[T/S], motiv G2 slijed X(T/S)X, motiv G3 slijed DXXG, motiv G4 slijed [N/T]KXD i motiv G5 slijed [C/S]A[K/L/T]) (Schenker i sur., 1994).

Ovisno o strukturi i ulozi u stanici GTPaze se dijele u dva razreda TRAFAC (*TRAnslation FACTor-related*) i SIMBI (*Signal recognition GTPases*, MinD i BioD) (Leipe i sur., 2002; Verstraeten i sur., 2011). U razredu TRAFAC, u koji spada većina GTPaza, nalazi se nadporodica OBG-HflX kojoj pripada porodica OBG. Porodicu OBG čini pet podporodica: Obg, Ygr210, YyaF/YchF, NOG i DRG (slika 3.) (Leipe i sur., 2002). Točna uloga i mehanizam djelovanja proteina koji čine porodicu OBG i dalje nisu poznati, ali nova istraživanja polako rasvjetljavaju njihovu ulogu (Koller-Eichhorn i sur., 2007).



Slika 3. Klasifikacija razreda TRAFAC GTPaza s fokusom na porodicu OBG. Strelicama su označena grananja koja nisu relevantna za rad. Preuzeto i prilagođeno iz Verstraeten i sur., 2011.

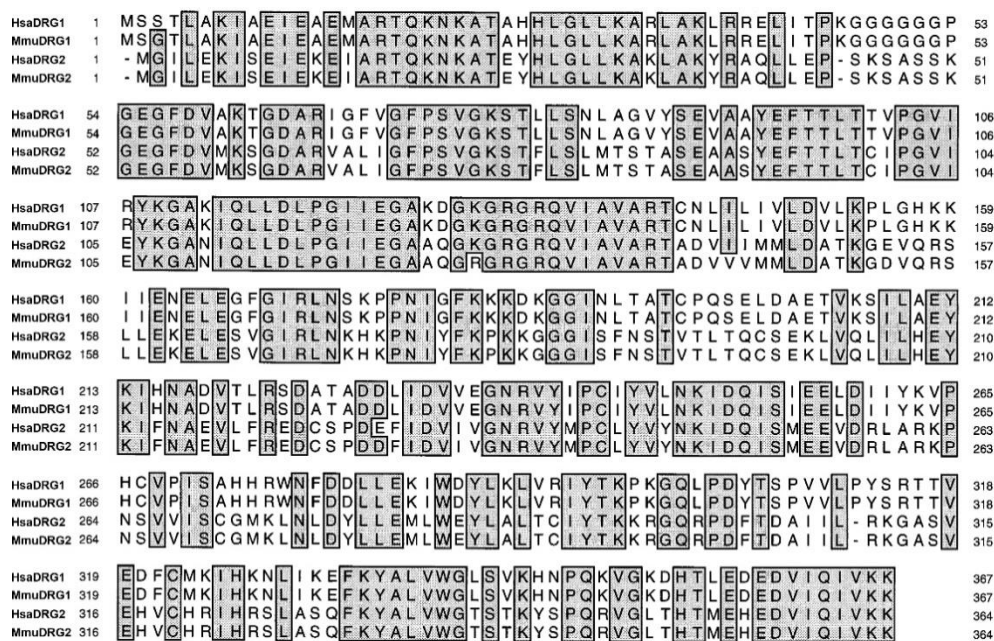
2.2.2 Podporodica DRG GTPaza

Podporodica DRG (*Developmentally regulated GTP-binding protein*) GTPaza je relativno neistražena grupa proteina (Leipe i sur., 2002), koji, osim što posjeduju G-domenu ključnu za vezanje GTPa, pokazuju vrlo malo sličnosti s drugim GTPazama (Schenker i sur., 1994). Članovi podporodice DRG su uz proteine iz podporodice NOG jedini pripadnici porodice OBG pronađeni u arhejama i eukariotima. Dosadašnje filogenetske analize su pokazale da arheje sadrže samo jedan protein DRG dok su kod eukariota identificirana dva proteina DRG, DRG1 i DRG2 (Leipe i sur., 2002). Neke biljke kao što je *Arabidopsis thaliana* posjeduju tri proteina DRG što je posljedica duplikacije gena *drg2* (O'Connell i sur., 2009; Westrip i sur., 2021). Gen *drg* je prvotno identificiran u mišjim embrijima kao gen koji je prekomjerno eksprimiran tijekom ranog razvoja mozga te je zbog te karakteristike dobio naziv *Neural precursor cells-Expressed Developmentally Down-regulated gene 3* (NEDD3) (Kumar i sur., 1992), a kasnije je preimenovan u *Developmentally Regulated GTP-binding gene/protein* (DRG) (Sazuka i sur., 1992a). Daljnja istraživanja su pokazala da miš i čovjek posjeduju dva različita proteina DRG.

Iz tog je razloga prvi okarakterizirani gen imenovan *drg1* (Sazuka i sur., 1992a; Sazuka i sur., 1992b), a novootkriveni gen, njegov paralog, nazvan je *drg2* (Li i sur., 2000). Mapiranjem gena *drg1* i *drg2* na ljudskim kromosomima uočeno je da se gen *drg1* nalazi na kromosomu 22q12-q13.1, a *drg2* na kromosomu 17p12-p13 (Li i sur., 2000).

Proteini DRG iz različitih organizama pokazuju visoku međusobnu sličnost, što ukazuje da imaju važnu ulogu u biološkim procesima (Li i sur., 2000). Tako je ljudski protein DRG1 gotovo 100% identičan homologu iz miša, a isto vrijedi i za ljudski protein DRG2 i njegov mišji homolog (slika 4.). U tom kontekstu interesantno je spomenuti da proteini DRG iz čovjeka pokazuju visoki stupanj homologije i s proteinima DRG iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* s kojima dijele 66% identičnosti i 80% sličnosti.

Osim međusobne sličnosti svih DRG1 ili DRG2 proteina iz različitih vrsta, postoji visoka sličnost između proteina DRG1 i DRG2 iz istog organizma. Tako ljudski DRG1 i DRG2 međusobno pokazuju 57 % identičnosti i 66 % sličnosti, a isto vrijedi i za DRG1 i DRG2 iz miša (Li i sur., 2000).



Slika 4. Višestruko poravnanje proteinskih sekvenci DRG1 i DRG2 iz čovjeka (Hsa) i miša (Mmu). Identični aminokiselinski slijed je označen sivim okvirom. Preuzeto i prilagođeno iz Li i sur., 2000.

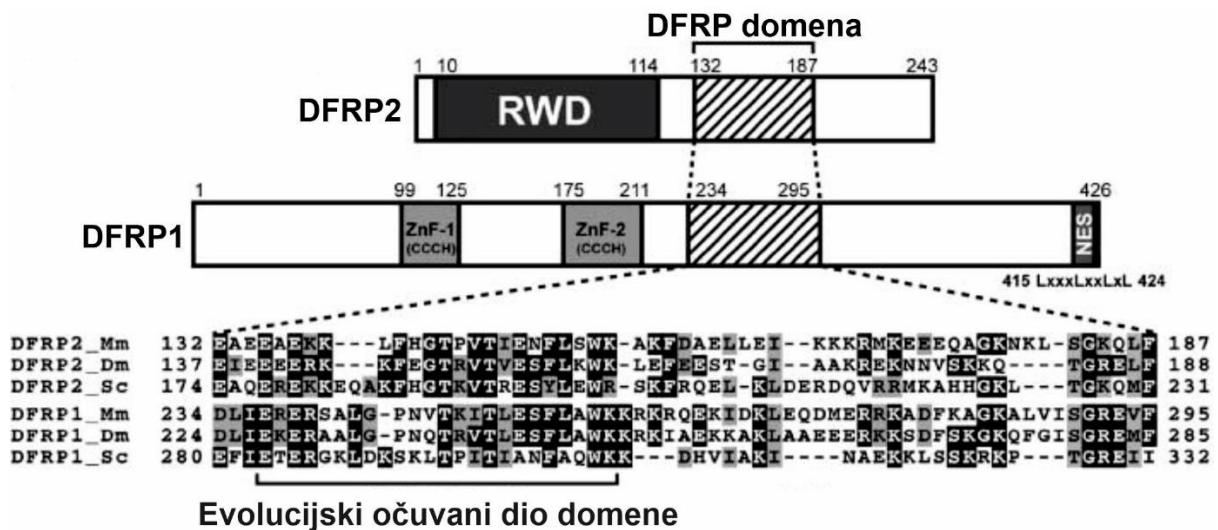
2.2.3 Struktura proteina DRG1

Sastav i organizacija domena proteina DRG1 okarakterizirana je na temelju analize kristalne strukture homologa DRG1 iz kvasca (Rbg1). Na N-terminalnom kraju se nalazi HTH-domena nakon koje slijedi G1 motiv, G2 motiv, G3 motiv, S5D2L-domena, G4 motiv, G5 motiv i na C-terminalnom kraju se nalazi TGS-domena (Francis i sur., 2012). Od svih GTPaza samo neki pripadnici porodice OBG sadrže evolucijski očuvanu TGS domenu pa se pretpostavlja se da je TGS-domena bila prisutna u strukturi prvotnih proteina porodice OBG.

Pokazano je i da se između G3 i G4 motiva nalazi regija dužine 65 aminokiselina koja nije uočena u drugim proteinima porodice OBG te nije homologna niti jednoj poznatoj domeni (Wout i sur., 2009). Ova regija se smatra zasebnom domenom koja izlazi iz G-domene i nazvana je S5D2L-domena (*ribosomal protein S5 domain 2-like*) (Francis i sur., 2012).

2.2.4 Proteini DFRP i njihova uloga u funkciji proteina DRG

Evolucijski očuvana podporodica DRG ima specifične vezne partnere iz podporodice DFRP (DRG family regulatori protein) koju čine proteini DFRP1 i DFRP2 (Leipe i sur., 2002). Proteini DRG1 i DRG2 su slične primarne strukture dok su njihovi vezni partneri DFRP1 i DFRP2 međusobno veoma različiti. Protein DFRP1 ima 48 kDa dok DFRP2 ima samo 28 kDa (slika 5.) (Ishikawa i sur., 2005).

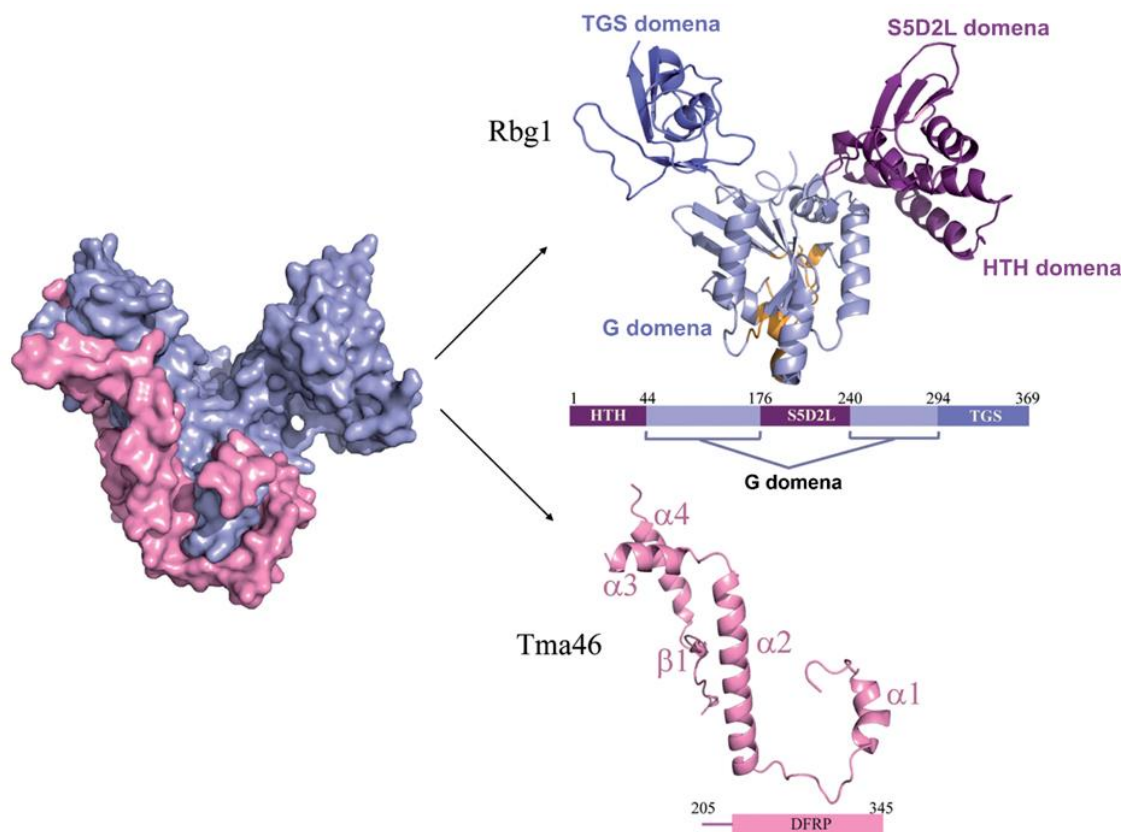


Slika 5. Sastav domena proteina DFRP1 i DFRP2 s označenom DFRP domenom i višestruko poravnanje očuvanog dijela primarnog slijeda aminokiselina proteina DFRP1 i DFRP2 iz organizama *M. musculus* (Mm), *D. melanogaster* (Dm) i *S. cerevisiae* (Sc) s označenim evolucijski očuvanim dijelom DFRP-domene. Preuzeto i prilagođeno iz Ishikawa i sur., 2005.

Jedina sličnost između proteina DFRP1 i DFRP2 je očuvana DFRP-domena kojom se specifično vežu za svoje partnere iz porodice DRG. Tako DFRP1 stvara kompleks s DRG1, a DFRP2 s DRG2. Osim DFRP domene, protein DFRP1 posjeduje dvije očuvane domene cinkova prsta (ZnF-1 i ZnF-2) koji najčešće stupaju u interakciju s RNA. Također, na C-kraju proteina DFRP1 nalazi se jezgrin izlazni signal (NES, engl. *nuclear export signal*). Protein DFRP2 pak na svome N-terminalnom kraju sadrži RWD domenu (slika 5.) čija funkcija nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da sudjeluje u proteinskim interakcijama (Doerks i sur., 2002). Pretpostavlja se da je navedena strukturna razlika između proteina DFRP1 i DFRP2 uzrokovala funkcionalnu razliku između proteina DRG1 i DRG2. Ovu pretpostavku potvrđuje činjenica da se DFRP1 veže isključivo na DRG1, a DFRP2 na DRG2. U pokusima u kojima su DRG1 i DFRP2 prekomjerno eksprimirani uočena je njihova slaba interakcija, ali ovaj se rezultat smatra artefaktom metode (Wout i sur., 2009; Ishikawa i sur., 2013).

Smatra se da je jedna od uloga proteina DFRP stabilizacija partnerskog DRG proteina na način da sprječava njegovu ubikvitinilaciju i razgradnju u proteasomu (Ishikawa i sur., 2005). Tome u prilog ide činjenica da protein DFRP1 sadrži dvije domene cinkova prsta koje vjerojatno stupaju u interakcije s ubikvitinom, a RWD-domena proteina DFRP2 slični enzimima koji konjugiraju ubikvitin (E2). Imunoprecipitacijom je pokazano da 26S inhibitor proteasoma uzrokuje nakupljanje poliubikvitiniranog DRG1 i DRG2 što se pak blokira povećanjem količine DFRP1 i DFRP2 u reakciji (Ishikawa i sur., 2003, 2005).

Pokusi na stanicama su pokazali da utišavanje genske ekspresije DFRP1 ili DFRP2 rezultira smanjenom razinom proteina DRG1 ili DRG2 u stanici (Ishikawa i sur., 2009; Ishikawa i sur., 2013). Isto tako prekomjerna ekspresija DRG1 i DRG2 nije moguća bez DFRP1 i DFRP2 (Ishikawa i sur., 2005) što bi značilo da proteini DRG i DFRP prvenstveno egzistiraju u kompleksu jedan s drugim (Daugeron i sur., 2011). Nadalje, analiza smještaja proteina DRG1 i DFRP1 u stanici nakon kotransfekcije pokazala je da proteini kolokaliziraju (Sazuka i sur., 1992b; Sommer i sur., 1994; Ishikawa i sur., 2005; Markolovic i sur., 2018). Pročišćavanje koeksprimiranih proteina DRG1 i DFRP1 nakon prekomjerne ekspresije u bakteriji *E.coli* od kojih samo jedan nosi histidinski privjesak rezultira elucijom oba proteina s kolone što dokazuje da DRG1 i DFRP1 tvore heterodimer (Francis, 2012).



Slika 6. Protein Rbg1 je prikazan svjetlo plavom bojom, a na njega vezani C terminalni fragment proteina Tma46 je prikazan ružičastom bojom (slika lijevo). Desno gore su prikazane individualne domene proteina Rbg1. G-domena je prikazana svjetlo plavom bojom, HTH i S5D2L-domena ljubičastom, a TGS-domena tamno plavom bojom. Desno dolje je prikazan C-terminalni fragment proteina Tma46. DFRP-domena je prikazana ružičastom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz Francis i sur., 2012.

Kristalografska analiza trodimenzionalne strukture proteina DRG1 iz kvasca (Rbg1) koja uključuje i C-terminalni fragment kvašćevog DFRP1 proteina (Tma46) (Slika 6.) otkriva da DFRP domena proteina Tma46 stupa u interakciju s TGS i GTPaznom domenom proteina Rbg1 (Francis i sur., 2012). Heterodimer kvašćevih proteina Rbg1:Tma46 se sastoji od jednog monomera svakog proteina (Francis i sur., 2012).

2.2.5 GTPazna aktivnost proteina DRG1

Kao što je već spomenuto, protein DRG1 posjeduje evolucijski očuvanu GTPaznu domenu, izgrađenu od 5 G-motiva koji su odgovorni za koordinaciju vezanja i hidrolizu GTP-a (Bourne i sur., 1991; Francis i sur., 2012). GTPazna aktivnost proteina DRG1 prvi je puta potvrđena u istraživanjima na biljci *Arabidopsis thaliana*. Rezultati su pokazali da i DRG1 i DRG2 iz A.

thaliana imaju sposobnost vezanja i hidrolize GTPa, koja je vrlo spora (O'Connell i sur., 2009). Naknadno je pokazano da sličnu aktivnosti ima i protein DRG1 iz drugih organizama kao što su čovjek i kvasac (Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013). Smatra se da DRG1 ima intrinzičnu GTPaznu aktivnost bez potrebe za dodatnim faktorima kao što su proteini GAP (*GTPase-activating proteins*) i GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) koji ubrzavaju hidrolizu i izmjenu vezanog GTPa/GDPa (Bos i sur., 2007; Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim na drugim predstavnicima porodice OBG GTPaza koji također nemaju potrebu za gore navedenim regulatornim proteinima (Verstraeten i sur., 2011). Naime, članovi OBG porodice GTPaza imaju brži mehanizam izmjene GTP/GDP-a što može biti dodatni razlog zašto im nije potreban GEF (Verstraeten i sur., 2011).

DRG1 je aktivan u velikom rasponu pH i temperature. Tako se raspon pH u kojem DRG1 pokazuje enzimatsku aktivnost kreće između 6.5 i 9, a optimalna aktivnost je između 8 i 9. Iznenadjenje je da se GTPazna aktivnost proteina DRG1 drastično povećava pri temperaturama između 37 i 50 °C, a optimalnu aktivnost pokazuje na relativno visokih 42 °C. Ovakvo termofilno ponašanje dovodi do pretpostavke da DRG1 sudjeluje u odgovoru na temperaturni stres (Pérez-Arellano i sur., 2013). Poznato je da ioni kalija i natrija mogu ubrzati enzimsku aktivnost nekih GTPaza. Doista, pokazano je da GTPazna aktivnost proteina DRG1 raste s dodatkom iona kalija u reakcijsku smjesu dok je potpuno neovisna o natriju (Ash i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013).

Osim pri višim temperaturama i višoj koncentraciji iona kalija zapaženo je povećanje GTPazne aktivnosti proteina DRG1 kada se u reakciji nalazi DFRP1 i to u molarnom omjeru 1:1 (Pérez-Arellano i sur., 2013). Tako je aktivnost DRG1 oko četiri puta veća u prisutnosti DFRP1. Smatra se da je razlog tome što DFRP1 povećava afinitet DRG1 za ione kalija. Također, DFRP1 ima ulogu u termalnoj stabilizaciji proteina DRG1 što je potvrđeno testiranjem GTPazne aktivnosti DRG1 na 60 °C. Rezultati su pokazali da mu je enzimaska aktivnost na ovoj temperaturi sedam puta veća kada se nalazi u kompleksu s DFRP1 (Pérez-Arellano i sur., 2013). Točni mehanizmi kojima DFRP1 pojačava GTPaznu aktivnost DRG1 još uvijek nisu razjašnjeni. Smatra se samo da DFRP1 ne djeluje kao GAP jer veže DRG1 u odsutnosti GTP-a i jer se ne veže se na aktivno mjesto u GTPaznoj domeni (Francis i sur., 2012).

2.3 Uloga proteina DRG1 u stanici

Uloga proteina DRG1 u stanici nije sasvim razjašnjena, ali se zbog njegove visoke evolucijske očuvanosti smatra da ima ulogu u osnovnim biološkim procesima. Prvotno je okarakteriziran kao gen koji ima ulogu u razvoju zbog visoke razine ekspresije u mozgu mišjih embrija, a sličan obrazac je pokazan i u razvoju središnjeg živčanog sustava žabe *Xenopus laevis* (Sazuka i sur., 1992b; Kumar i sur., 1993). Kasnije se pokazalo da je DRG1 na različitim razinama eksprimira u većini tkiva odraslih jedinki, velikom broju normalnih i tumorskih staničnih linija kao i u reproduktivnim organima i aktivno rastućem tkivu biljaka (Etheridge i sur., 1999; Li i sur., 2000; Ishikawa i sur., 2003). Budući da DRG1 ima sposobnost vezanja RNA i kosedimentira s polisomima predloženo je da ima ulogu u translaciji ili neku drugu funkciju vezanu uz ribosome (Ishikawa i sur., 2003; Ishikawa i sur., 2009; Wout i sur., 2009; Daugeron i sur., 2011; Francis i sur., 2012). Nadalje, DRG1 identificiran je kao protein koji sudjeluje u formiranju, polimerizaciji i stabilizaciji mikrotubula te kao potencijalni faktor u dekondenzaciji kromatina (Schellhaus i sur., 2017), a uočeno je da ima ulogu u ciliogenezi te proliferaciji (Devitt i sur., 1999; Lu i sur., 2016; Lee i sur., 2019).

Za većinu članova porodice OBG GTPaza karakteristično je da su smještene u jezgri i sudjeluju u biogenezi ribosoma (Kallstrom i sur., 2003). Međutim, proteini iz podporodice DRG nisu smješteni u jezgri već u citoplazmi i samo manjim dijelom u jezgri (Lu i sur., 2016; Markolovic i sur., 2018). Nadalje, delecija proteina DRG ne uzrokuje smanjenje broja ribosoma što dovodi do zaključka da proteini DRG nemaju ulogu u biogenezi ribosoma, već u regulaciji translacije (Daugeron i sur., 2011). Naime, kompleks DRG1:DFRP1 iz miša kolokalizira s polisomima (Ishikawa i sur., 2009), a isto je pokazano za kompleks Rbg1:Tma46 iz kvasca (Daugeron i sur., 2011) kao i za DRG1 kod biljaka (Nelson i sur., 2009). Pokusi na kvascu pokazali su da se Tma46 veže na ribosom, točnije uz podjedinicu 40S pomoću cinkovih prstiju, a Rbg1 stupa u interakciju s Tma46 putem TGS-domene (Francis i sur., 2012; Zeng i sur., 2021). Naime, delecija TGS-domene rezultira disocijacijom proteina Rbg1 i Tma46 dok Tma46 ostaje vezan na ribosom (Francis i sur., 2012).

Precizna uloga DRG1 u translaciji nije do kraja razjašnjena. Poznato je da delecija pojedinačnih proteina DRG ili DFRP, kao ni delecija oba DRG i DFRP ne uzrokuje značajniju promjenu u rastu deletanata. Međutim, nedavno je pokazano da delecija očuvane RNA helikaze Slh1 kod kvasca u kombinaciji s delecijom Rbg1/2 ili Tma46/Gir2 značajno reducira rast što sugerira da ovi trostruki deletanti imaju defekt u translaciji (Daugeron i sur., 2011).

Za Slh1 kod kvasca kao i za njegov ljudski homolog ASCC3 poznato je da imaju ulogu u regulaciji translacije (Searfoss i sur., 2001; Matsuo i sur., 2017). Zeng i suradnici su pokazali da je elongacija translacije u soju u kojem su deletirani Rbg1, Rbg2 i Slh1 sporija u odnosu na soj u kojem je mutiran samo Rbg1 (Zeng i sur., 2021). S obzirom na dobivene rezultate, predložili su da kompleks DRG:DFRP djeluje tako da potiče elongaciju na mjestu u mRNA koja je bogata kodirajućim nizom za aminokiseline lizin i arginin, takav redosljed baza u mRNA inače uzrokuje zastoj ribosoma. Kada je DRG:DFRP kompleks inaktiviran, Slh/ASCC3 kao dodatni faktor može potaknuti elongaciju koja je zastala na ribosomu kroz poseban put kontrole kvalitete translacije (engl. *ribosome quality control pathway*). Ako su i DRG:DFRP kompleks i Slh/ASCC3 inaktivirani, stanica vjerojatno neće moći prevladati efekt zastoja ribosoma (Zeng i sur., 2021). Biokemijske studijama su identificirane molekularne interakcije važne za funkciju kompleksa Rbg1:Tma46 na ribosomu. Tako su za normalan rast kvaščevog soja s trostrukom delecijom *Arbg1Arbg2Aslh1* potrebne GTPazna, HTH i TGS domena proteina Rbg1, dok S5DL2 domena nema tako izraženo djelovanje. Za normalni rast trostrukog deletanta bitni su i cinkovi prsti proteina Tma46 pri čemu je pokazano da drugi cinkov prst ima nešto izraženiju ulogu (Francis i sur., 2012). Ovi rezultati su nedavno potvrđeni i strukturalnom studijom koja je pokazala da se Rbg1 veže na GTPazni centar na ribosomu pomoću GTPazne, HTH i TGS domene, dok S5DL2 domena stupa u interakciju s A mjestom tRNA. Tma46 pak stupa u kontakt s 40S podjedinicom ribosoma preko cinkovih prstiju (Zeng i sur., 2021).

Većina eksperimenata o ulozi proteina DRG u translaciji rađena je na kvascu, međutim zbog njihove visoke evolucijske očuvanosti smatra se da imaju istu ulogu i u višim eukariotima. Tako je pokazano da kompleks DRG1:DFRP1 iz miša kolokalizira s polisomoma (Ishikawa i sur., 2009), a DRG1 iz *X. laevis* ima sposobnost nespecifičnog vezanja RNA (Ishikawa i sur., 2003). Prekomjerna ekspresija proteina DRG1 u ljudskoj staničnoj liniji HeLa uzrokuje povećani broja stanica s granuliranom jezgrom kao i stanica sa zaostajućim kromosomima prilikom segregacije u odnosu na kontrolu (Lu i sur., 2016). Ovi rezultati navode na zaključak da prekomjerna ekspresija DRG1 uzrokuje nestabilnost mikrotubula i remeti regulaciju stanične diobe što uzrokuje kromosomsku nestabilnost pri čemu se stvaraju uvjeti za nastanak tumora. Mikrotubuli su dinamični elementi staničnog citoskeleta sastavljeni od heterodimera α i β tubulina, očuvanih GTPaza (Desai i sur., 1997). Mikrotubuli sudjeluju u brojnim procesima u stanici kao što su unutarstanični transport, regulacija polarnosti stanice, održavanje oblika stanice i segregacija kromosoma koja je ključna za pravilnu diobu stanice (Schellhaus i sur., 2017). Schellhaus i suradnici su potvrdili da se protein DRG1 veže za mikrotubule i sudjeluje u brojnim funkcijama povezanim s mikrotubulima (Schellhaus i sur., 2017). DRG1 tako

sudjeluje u formiranju mikrotubula, potiče njihovu polimerizaciju, stabilizira mikrotubule i utječe na dinamiku diobenog vretena u stanici te sudjeluje u dekonenzaciji kromatina. Tako HeLa stanice koje imaju smanjenu razinu proteina DRG1 sporije prelaze iz profaze u anafazu jer im je usporeno formiranje diobenog vretena (Schellhaus i sur., 2017). Bitno je naglasiti da proteinu DRG1 za brojne funkcije povezane s mikrotubulima nije potrebna GTPazna aktivnost, ali su mu potrebne sve domene kako bi se vezao s mikrotubulima. Mnogi proteini koji se vežu za mikrotubule sadrže visoko pozitivno nabijene regije kojima se vežu za negativno nabijeni C-terminalni kraj tubulina. DRG1 posjeduje veoma pozitivno nabijenu površinu koja se proteže preko GTPazne, TGS, HTH i S5D2L-domene pa se smatra da na taj način ostvaruje interakciju s mikrotubulima (Schellhaus i sur., 2017).

Nedavno je pokazano da protein DRG1 sudjeluje u ciliogenezi kroz interakciju s Wnt signalnim aktivatorom Dishevelled (Dvl). DRG1 i Dvl pak stupaju u interakciju s proteinom Daam1 (*Dishvelled-associated activator of mutagenesis 1*) što potiče nastanak aktinske mreže koja je potrebna za adekvatnu lokalizaciju bazalnog tijela i formiranje cilija. Cilije su mali citoplazmatski izdanci na površini stanica koje imaju važnu ulogu u organogenezi i održavanju tkivne homeostaze (Goetz i sur., 2010). Iako je njihova uloga u signalnim putevima kao što je *Headgehog* (Hh), Wnt, Hippo, PDFGR i mTOR dobro opisana još uvijek se ne zna puno o proteinima uključenim u regulaciju ciliogeneze (Mani i sur., 2017). Bitno je još napomenuti da je uloga DRG1 u ciliogenezi neovisna o njegovoj GTPaznoj aktivnosti (Lee i sur., 2019).

Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na vezu između razine ekspresije proteina DRG1 i proliferacije stanica. DRG1 je jako eksprimiran tijekom embrionalnog razvoje miša i žabe kao i u aktivno rastućim tkivima i reproduktivnim organima biljaka (Sazuka i sur., 1992b; Kumar i sur., 1993; Etheridge i sur., 1999). Nadalje, različite tumorske i normalne stanične linije pokazuju značajnu razinu ekspresije DRG1 (Li i sur., 2000). Sve je više radova koji povezuju DRG1 s proliferacijom tumorskih stanica što je indikacija da DRG1 posjeduje onkogenu ulogu. Tako je DRG1 pojačano eksprimiran u stanicama melanoma, dok utišavanje njegove ekspresije reducira proliferaciju stanica i formiranje kolonija (Kiniwa i sur., 2015). Nadalje, povećane razine DRG1 su uočene u adenokarcinomu pluća, dok je slabo eksprimiran u susjednom normalnom tkivu. Isto tako, utišavanje genske ekspresije DRG1 u staničnim linijama raka pluća uzrokuje smanjenje stanične proliferacije i zastoj staničnog ciklusa u fazi M (Lu i sur., 2016). Isti efekt je uočen i u osteosarkomu kod kojeg je viša razina ekspresije DRG1 u izravnoj vezi s veličinom tumora i lošijom prognozom ishoda bolesti.

Dodatno je pokazano da je ekspresija DRG1 u osteosarkomima ovisna o N6-metiladenozin modifikaciji DRG1 mRNA jer utišana genska ekspresija METTL3 metiltransferaze uzrokuje smanjenu ekspresiju DRG1 (Ling i sur., 2020).

Onkogeno djelovanje proteina DRG1 bi moglo biti povezano s jednom od njegovih uloga u stanici što uključuje translaciju, regulaciju citoskeleta i diobenog vretena te stanični rast. Kao što je već spomenuto, smatra se da DRG1 ima ulogu u formiranju diobenog vretena (Schellhaus i sur., 2017). Smanjena ekspresija DRG1 uzrokuje zastoje u fazi M staničnog ciklusa u tumorskim stanicama HeLa, A549 i H1299, dok prekomjerna ekspresija DRG1 dovodi do abnormalne segregacije kromosoma (Lu i sur., 2016). Uz ulogu u mitozu, DRG1 vjerojatno sudjeluje u karcinogenezi i kroz interakciju s onkogenim proteinima. Na primjer, otkrivena je njegova interakcija s onkogenim transkripcijskim faktorom SCL/TAL1 (*T-cell acute lymphoblastic leukemia protein 1*) koji je povezan s nastankom nekoliko tipova leukemije (Mahajan i sur., 1996; Zhao i sur., 1998). Nadalje, kada je koekspimiran sa *c-myc* i *ras*, *drg1* potiče transformaciju mišjih fibroblasta (Mahajan i sur., 1996).

Uz DRG1 smatra se i da DFRP1 ima onkogenu ulogu. Prekomjerno je ekspimiran u karcinomu jetre gdje je povećana ekspresija DFRP1 povezana s lošijom prognozom ishoda bolesti, a utišavanje genske ekspresije DFRP1 uzrokuje smanjenje stanične proliferacije i pojačanu apoptozu (Jiang i sur., 2016). DFRP1 je prekomjerno ekspimiran i u akutnoj mijeloidnoj leukemiji (AML) gdje je uočena njegova interakcija s proteinom TRAF2, E3 ubikvitinskom ligazom koja ima ulogu u staničnoj signalizaciji i apoptozu (Capalbo i sur., 2013; Jiang i sur., 2016).

S obzirom na navedene rezultate koji sugeriraju da DRG1:DFRP1 imaju onkogenu ulogu predloženo je da bi navedeni proteini mogli poslužiti kao potencijalna meta za razvoj antitumorskih lijekova. Kako bi se to postiglo potrebna su dodatna istraživanja koja bi definirala točnu ulogu DRG1 i DFRP1 u tumorogenezi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Standardne kemikalije

Trikloroetena kiselina (Gram-mol), glicin (Sigma-Aldrich), Tris baza (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), apsolutni etanol (Gram-mol), 96%-tni etanol (Gram-mol), kalcijev klorid dihidrat (Kemika), natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich), kompleksal III (Kemika), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Merck), bezvodni dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika), magnezijev klorid heksahidrat (Kemika), agaroza (Sigma-Aldrich), bacto agar (BD), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich), akrilamid:bisakrilamid umreženja 29:1 (Sigma-Aldrich), metanol (Kemika), 96%-tna octena kiselina (Gram-mol), 2-propanol (Gram-mol), redestilirani glicerol (Kemika), β -merkaptioetanol (Merck), izopropil- β -tiogalaktozid, IPTG (Sigma-Aldrich), ditiotreitrol, DTT (Sigma-Aldrich), N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonskakiseline, HEPES (USB Corporation), Imidazol (Sigma-Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose, DMEM (Sigma-Aldrich), fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum* FBS, Capricorn Scientific), neesencijalne aminokiseline (Sigma-Aldrich), Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), 50%-tni glutaraldehid (Sigma-Aldrich).

3.1.2 Boje i biljezi

Boje: Bromfenol-plavo (Serva), briljantno modriilo Coomassie R-250 (Merck), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), 6 \times Gel Loading Dye, Purple (Thermo Fisher Scientific), RNA Loading Dye (BioLabs), 4 \times pufer za nanošenje proteinskih uzoraka (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 40% glicerol, 4% β -merkaptioetanol, 50 mM EDTA, 0.08 % bromfenol-plavo).

Markeri: 1 kb DNA Ladder (NEB), GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific), Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

3.1.3 Enzimi, proteini, nukleinske kiseline i antibiotici

Albumin iz goveđeg seruma, BSA (NEB), DNAaza I - oslobođena od RNAaza (NEB), benzonaza (Sigma-Aldrich), lizozim (Sigma-Aldrich), Premix ExTaq (Takara), Q5 High-Fidelity DNA polimeraza (NEB), ElectroLigase (NEB), restrikcijske endonukleaze s pripadajućim puferima (Thermo Fisher Scientific), poliuridilna kiselina vezana na matriks

agaroze, poli(U) agaroza (Sigma-Aldrich), poliuridilna kiselina, poli(U) (Sigma-Aldrich), Ampicilin (Sigma-Aldrich), kloramfenikol kristalizirani (Sigma-Aldrich), kanamicin sulfat (Sigma-Aldrich) otopina antibiotika i antimikotika (engl. *antibiotic/antimycotic solution* (100x), Capricorn Scientific).

3.1.4 Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmidne DNA, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova, RNeasy Mini Kit (Qiagen) za izolaciju ukupne RNA, Genomic-tips i Genomic DNA Buffer Set (Qiagen) za izolaciju genomske DNA velike molekulske mase, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) za sintezu cDNA i GTPase-Glo Assay (Promega) za mjerenje intrinzične GTPazne aktivnosti.

3.1.5 Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija *E. coli*

Za pripremu hranjivih podloga korišteni su sljedeći proizvodi: LB Broth, Miller (Luria-Bertani, BD), Terrific Broth (BD), tripton (HIMEDIA) i ekstrakt kvasca (engl. *yeast extract*, Liofilchem). Za uzgoj bakterija *E. coli* korištene su tekuće i krute hranjive podloge. Za uzgoj bakterija u tekućim hranjivim podlogama korišteni su komercijalno dostupni hranjivi mediji: LB (5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl) ili TB (11.8 g/L peptona 140, 23.6 g/L kvašćev ekstrakt, 9.4 g/L dikalijev fosfat, 2.2 g/L monokalijev fosfat, 8 mL/L glicerol). Za uzgoj bakterija na krutim LB podlogama korištene su podloge koje sadržavaju 5 g/L kvašćev ekstrakt, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl i 12 g/L agar. Podloge su sterilizirane i u svrhu selekcije dodan im je odgovarajući antibiotik.

3.1.6 Bakterijski sojevi i plazmidi

Sojevi *E. coli*

Komercijalno dostupni soj One Shot® TOP10 Electrocomp™ genotipa *hsdR*, *mcrA*, *lacZAM15*, *endA1*, *recA1* rutinski je korišten u svrhu kloniranja zbog velike efikasnosti transformacije i stabilnog umnažanja velikog broja kopija plazmidne DNA.

Soj BL21 CodonPlus (DE3) rutinski je korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u ekspresijski vektor koji sadrži promotor T7 (pET serija vektora). Soj sadrži gen za T7 RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom koji je pod kontrolom promotora *lacUV5*, koji

se inducira dodatkom IPTG-a. Soj je deficijentan za proteaze Lon i OmpT što osigurava stabilnost proizvedenog proteina.

Soj Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS je varijanta soja BL21 koji je komercijalno optimiziran za ekspresiju eukariotskih proteina, s kodonima koji se rijetko koriste u bakteriji *E. coli*. Soj sadrži gen za T7 RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom koji je pod kontrolom promotora *lacUV5*, koji se inducira dodatkom IPTG-a.

Plazmidi

pET28b je plazmid iz serije vektora pET, rutinski korišten za prekomjernu ekspresiju proteina u *E. coli*, a klonirani gen je pod kontrolom inducibilnog promotora T7/*lac*. Gen *lacI* proizvodi represor koji sprječava ekspresiju kloniranog gena u neinduciranim uvjetima. Prekomjerna ekspresija se odvijala u sojevima bakterija *E. coli* (BL21, Rosetta-gami 2) koji na kromosomu imaju gen za RNA polimerazu bakteriofaga T7 koji je pod kontrolom promotora *lac*. Taj promotor se inducira pomoću IPTG-a te nastaje RNA polimeraza T7 koja prepisuje ciljanu DNA na plazmidu što dovodi do prekomjerne proizvodnje željenog proteina. pET28b omogućava ekspresiju rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom na N- ili C-terminalnom kraju s ciljem pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na TALON agarozu. Plazmid ima mali broj kopija i nosi gen za rezistenciju na kanamicin. Korišten je za ekspresiju rekombinantnog ljudskog i spužvinog proteina DRG1 ili DFRP1.

pcDNA3 je plazmid iz serije pcDNA, rutinski korišten vektor za transfekciju ljudskih stanica. Klonirani gen je pod kontrolom promotora ljudskog citomegalovirusa (CMV) i ne posjeduje proteinski privjesak.

pEGFP-N1 je plazmidni vektor za ekspresiju gena u ljudskim stanicama koji je pod kontrolom promotora ljudskog citomegalovirusa (CMV). Dizajniran je za ekspresiju proteina koji će na C-terminalnom kraju nositi proteinski privjesak EGFP. EGFP je fluorescentni protein podrijetlom iz meduze *Aequorea victoria* koji omogućuje analizu smještaja proteina *in vivo*.

pmCHERRY-C1 je plazmidni vektor za ekspresiju gena u ljudskim stanicama koji je pod kontrolom promotora ljudskog citomegalovirusa (CMV). Dizajniran je za ekspresiju proteina koji će na N-terminalnom kraju nositi proteinski privjesak mCHERRY. mCHERRY je mutirani fluorescentni protein koji omogućuje analizu smještaja proteina *in vivo*.

3.1.7 Ostali materijali

Filter nastavci za šprice, 0.22 µm (Fisher Scientific), TALON smola (Takara), centrikoni Amicon Ultra centrifugal filters (Milipore).

Materijali za westernsku metodu otiska: nitrocelulozna membrana (GE Healthcare), nemasno mlijeko u prahu za blokiranje (engl. *Blotting-Grade Blocker*, BIO RAD), otopina za detekciju (Amersham ECL Select Western Blot Detection Reagents, GE Healthcare).

3.2 Metode

3.2.1 Bioinformatičke metode

Homoloji proteina DRG1 identificirani su iz baze NCBI (*National Center for Biotechnology Information database*) korištenjem algoritma blastp. Dodatno su pretražene baze genoma Ensembl (Cunningham i sur., 2022) i TAIR (Lamesch i sur., 2012). Višestruko poravnanje aminokiselinskih sekvenci proteina DRG1 (engl. *multiple sequence alignment*) napravljeno je pomoću algoritma MUSCLE (Edgar, 2004).

Filogenetsko stablo konstruirano je prema metodi najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood*) pomoću programskog paketa MEGA7 (Kumar i sur., 2016) korištenjem substitucijskog modela LG+G+I (Le i sur., 2008). Najbolji substitucijski model je određen prema rezultatima testa programskog paketa ProtTest (Darriba i sur., 2017). Statistička podrška za grananja unutar filogenetskog stabla određena je na temelju 1000 replikacija (*bootstrap* ponavljanja).

Za provjeru sličnosti i identičnosti aminokiselinskih sljedova proteina DRG1 korišten je programski paket MatGAT2.01 (Campanella i sur., 2003) prema matrici BLOSUM62. U programskom paketu Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) vizualiziran je postotak sličnosti/identičnosti kao toplinska karta (engl. *heatmap*).

3.2.2 Prikupljanje uzoraka

Ogulinska špiljska spužvica *Eunapius subterraneus* prikupljena je na lokaciji Tounj, Ogulin (iz špilje Tounjčica). Spužva je u špiljskoj vodi transportirana u laboratorij i smještena u inkubator na 8 °C uz povremenu aeraciju.

3.2.3 Izolacija spužvinih stanica

Za dobivanje stanica spužve korištena je spužva *E. subterraneus*. Prvi korak je bila homogenizacija spužve pomoću ručnog homogenizatora u laminaru, gdje je rađen i cijeli postupak izolacije stanica. Nakon toga slijedilo je odvajanje spužvinih stanica od ostalih dijelova spužve kroz sita s porama različitih veličina. Prvo kroz pore veličine 200 μm , zatim 100 μm i na kraju 40 μm . Sita su dodatno isprana filtriranom špiljskom vodom, a profiltrirane stanice su puštene da se slegnu na dno tubice pod utjecajem gravitacije u trajanju oko 30 minuta na 4 °C. Nakon što su se stanice istaložile, supernatant je pažljivo uklonjen pipetom te im je dodana nova sterilna špiljska voda. Postupak je ponavljan sve dok supernatant nije postao bistar. Na kraju je supernatant uklonjen pipetom, a talog koji sadrži stanice je prebačen u sterilnu tubicu. 100 μL stanične suspenzije je uzeto u svrhu brojanja stanica, a ostatak stanica je odgovarajuće razrijeđen te prebačen u pločicu s 12 bunarića uz dodatak sterilne špiljske vode. Stanice su na kraju bile smještene u inkubator na 8 °C.

3.2.4 Izolacija genomske DNA i ukupne RNA te sinteza cDNA

Za izolaciju ukupne genomske DNA iz stanica spužve *E. subterraneus* korišten je komercijalno dostupni komplet (Qiagen Genomic tips 20/G i Qiagen Genomic DNA Buffer Set), a izolacija je rađena prema uputama proizvođača. Kvaliteta izolirane DNA provjerena je gel-elektroforezom u 0.7% agaroznom gelu. Koncentracija nukleinskih kiselina određivana je korištenjem spektrofotometra DeNovix DS-11, mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini od 260 nm.

Za izolaciju ukupne RNA iz stanica spužve korišten je komercijalno dostupni komplet (Qiagen RNeasy Kit) prema uputama proizvođača. Izolacija ukupne RNA je rađena u okruženju s minimalnom mogućnosti kontaminacije uzorka ribonukleazama (RNAazama), u sterilnom kabinetu sa sterilnim priborom ili priborom koji je bio dobro očišćen reagensom za uklanjanje RNAaza (RNaseZAP, Sigma-Aldrich,). Kvaliteta izolirane ukupne RNA provjerena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu na 50 V. Također je provjereno je li izolirana RNA kontaminirana genomskom DNA. U tu je svrhu napravljena lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s početnicama za citokrom oksidazu. Odsutnost umnoženog fragmenta citokrom oksidaze nakon elektroforeze u agaroznom gelu bila je potvrda da izolirana RNA nije kontaminirana genomskom DNA.

cDNA je sintetizirana korištenjem svježe izolirane ukupne RNA pomoću kompleta za reverznu transkripciju RNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems)

prema uputama proizvođača. Uspješnost sinteze cDNA je provjerena PCR reakcijom s početnicama za citokrom oksidazu. U ovom slučaju, prisutnost umnoženog fragmenta citokrom oksidaze nakon elektroforeze u agaroznom gelu dokazala je uspješnost sinteze komplementarne DNA.

3.2.5 Elektroforeza nukleinskih kiselina u agaroznom gelu

Sastav gelova koji su korišteni za elektroforezu je bio 0.7 - 1 % agaroze (ovisno o veličini fragmenta) u TAE puferu (1 mM Tris baza, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0) uz dodatak etidijevog bromida (0.005 µg/mL). Nukleinske kiseline su se zatim razdvajale u električnom polju, pri naponu 30-50 V (izvor napajanja je uređaj PowerPac 300, BioRad). Etidijev bromid koji se interkalira u DNA fluorescira pod UV-svjetlom (312 nm) što je omogućilo vizualizaciju DNA na uređaju Syngene G:BOX.

3.2.6 Početnice

Početnice korištene u svrhu umnažanja fragmenta DNA metodom PCR naručene su od komercijalnog proizvođača (Metabion), dok su početnice za kloniranje u ekspresijski vektor dizajnirane na način da osim nukleotidnog slijeda za amplifikaciju gena od interesa sadrže i sekvence na koje djeluju odabrane restrikcijske endonukleaze.

Tablica 1. Popis konstrukata korištenih u izradi disertacije. U tablici su navedeni izvori korišteni za amplifikaciju fragmenata koji su uklonirani u navedene vektore pomoću odgovarajućih početnica. U tablici je dodatno navedeno je li proteinski privjesak prisutan te na kojem se kraju proteina (C- ili N-) nalazi, isto kao i organizam domaćin u koji će se konstrukt unijeti.

Ime konstrukta / Organizam	Korišteni konstrukt za amplifikaciju fragmenta	Za kloniranje u vektor	Sekvenca oligonukleotida/ Mjesto za djelovanje restrikcijskih enzima	Privjesak	Domaćin ekspresije
EsuDRG1 <i>E. subterraneus</i>	Esu cDNA	/	5'- ATGCCTACGATACTTGAAAAAGATAGCG -3' 5'- CAATTAGATTTTCTTAACGAGTTGAACGAC -3'	/	/
EsuDFRP1 <i>E. subterraneus</i>	Esu cDNA	/	5'- GAATGCCACCGAAGAAAGGTGCGC -3' 5'- CTCAATCTTACCAGCCTCATCGTC -3'	/	/
EsuDRG1-His <i>E. subterraneus</i>	EsuDRG1	pET28b	NdeI 5'- GTCTAGCATATGCCTACGATACTTGAAAAAG -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCTTAGATTTTCTTAACGAGTTG -3'	6xHis N- kraj	<i>E. coli</i>
EsuDFRP1-His <i>E. subterraneus</i>	EsuDFRP1	pET28b	NdeI 5'- GTCTAGCATATGCCACCGAAGAAAGGTGCGCAAGC -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCTCAATCTTACCAGCCTCATCGTC -3'	6xHis N- kraj	<i>E. coli</i>
EsuDRG1-GFP <i>E. subterraneus</i>	EsuDRG1-His	pEGFP-N1	XhoI 5'- GTCTAGCTCGAGATGCCTACGATACTTGAAAAAG -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCCAGGAGATTTTCTTAACGAGTTG -3'	GFP C- kraj	ljudske stanice
EsuDFRP1-CHERRY <i>E. subterraneus</i>	EsuDFRP1-His	pmCherry-C1	XhoI 5'- GTCTAGCTCGAGGCATGCCACCGAAGAAAGGTGCG -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCTCAATCTTACCAGCCTCATCG -3'	Cherry N- kraj	ljudske stanice
EsuDRG1-FLAG <i>E. subterraneus</i>	EsuDRG1-His	pcDNA3	BamHI 5'- GTCTAGGGATCCACGAGATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGCCTACGAT ACTTG -3' XhoI 5'- CTAGACCTCGAGTTAGATTTTCTTAACGAG -3'	FLAG N- kraj	ljudske stanice
EsuDFRP1-MYC <i>E. subterraneus</i>	EsuDFRP1-His	pcDNA3	BamHI 5'- GTCTAGGGATCCACGAGATGCCACCGAAGAAAGGTGCG -3' XhoI 5'- CTAGACCTCGAGTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTCTGCTCGGAATCTTACCA GCCTC -3'	Myc C- kraj	ljudske stanice
HsaDRG1-His <i>H. sapiens</i>	DRG1 pPB-N-His abm	pET28b	NdeI restriction enzyme XhoI restriction enzyme	6xHis N- kraj	<i>E. coli</i>
HsaDFRP1-His <i>H. sapiens</i>	HG23194-CM SinoBiological	pET28b	NdeI 5'- GTCTAGCATATGATGCCCCCAAGAAACAGGCTCAGGCCG -3' EcoRI 5'- CTAGACGAATTCTTATTCTTCTAAATCAAGTGATTTAATTC -3'	6xHis N- kraj	<i>E. coli</i>
HsaDRG1-GFP <i>H. sapiens</i>	HG14741-NF SinoBiological	pEGFP-N1	XhoI 5'- GTCTAGCTCGAGATGAGCAGCACCTTAGCTAAG -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCTGGACTTCTTACAATTTG -3'	GFP C- kraj	ljudske stanice
HsaDFRP1-CHERRY <i>H. sapiens</i>	HG23194-CM SinoBiological	pmCherry-C1	XhoI 5'- GTCTAGCTCGAGCCATGCCCCCAAGAAACAGG -3' BamHI 5'- CTAGACGGATCCTTATTCTTCTAAATCAAGTG -3'	Cherry N- kraj	ljudske stanice
HsaDRG1-FLAG <i>H. sapiens</i>	HG14741-NF SinoBiological	pcDNA3	BamHI 5'- GTCTAGGGATCCACGAGATGGACTACAAGGACGACGACGATAAGATGAGCAGCAC CTTAGCTAAG -3' XhoI 5'- CTAGACCTCGAGTCACTTCTTACAATTTG -3'	FLAG N- kraj	ljudske stanice
HsaDFRP1-MYC <i>H. sapiens</i>	HG23194-CM SinoBiological	pcDNA3	BamHI 5'- GTCTAGGGATCCACGAGATGCCCCCAAGAAACAGGC -3' XhoI 5'- CTAGACCTCGAGTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTCTGCTCGGATTCTTCTAAA TC -3'	Myc C- kraj	ljudske stanice

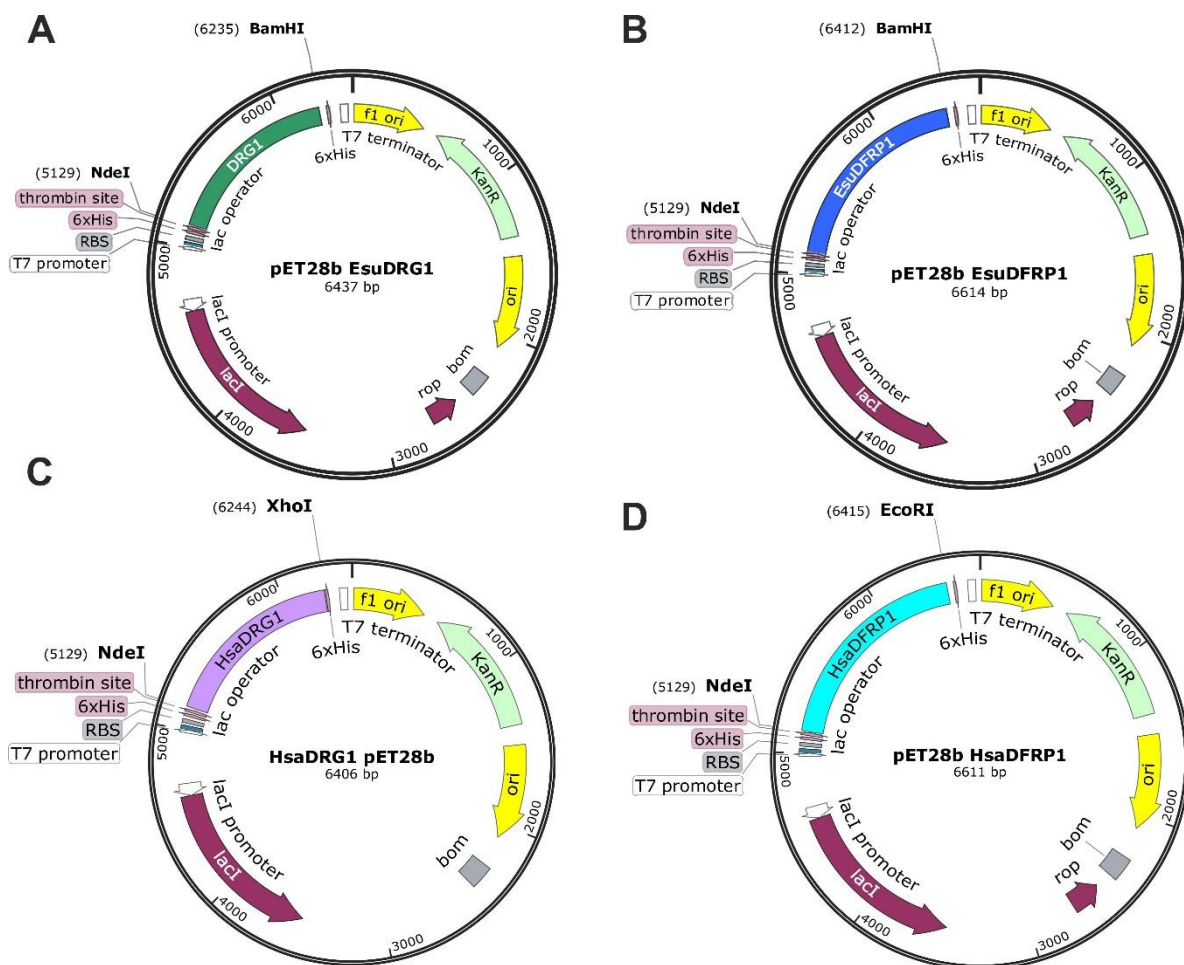
3.2.7 Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerazom

Za umnažanje cDNA koja kodira za protein DRG1 i DFRP1 korišten je PCR. Reakcijska smjesa sadržavala je odgovarajući par početnica (svaka konačne koncentracije 0.5 μ M), DNA kalup (mase 500-1000 ng) te komercijalno dostupni komplet koji sadržava polimerazu Q5 i pufer s unaprijed dodanim nukleotidima i magnezijem (Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, BioLabs). Reakcijska smjesa pripremljena je prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu od 25 μ L. Reakcija se provodila na uređaju za PCR (BioRad T100 Thermal Cycler), kroz 25 termalnih ciklusa denaturacije, sparivanja početnica te elongacije. Uspješnost PCR provjerena je elektroforezom u 0.8 % agaroznom gelu.

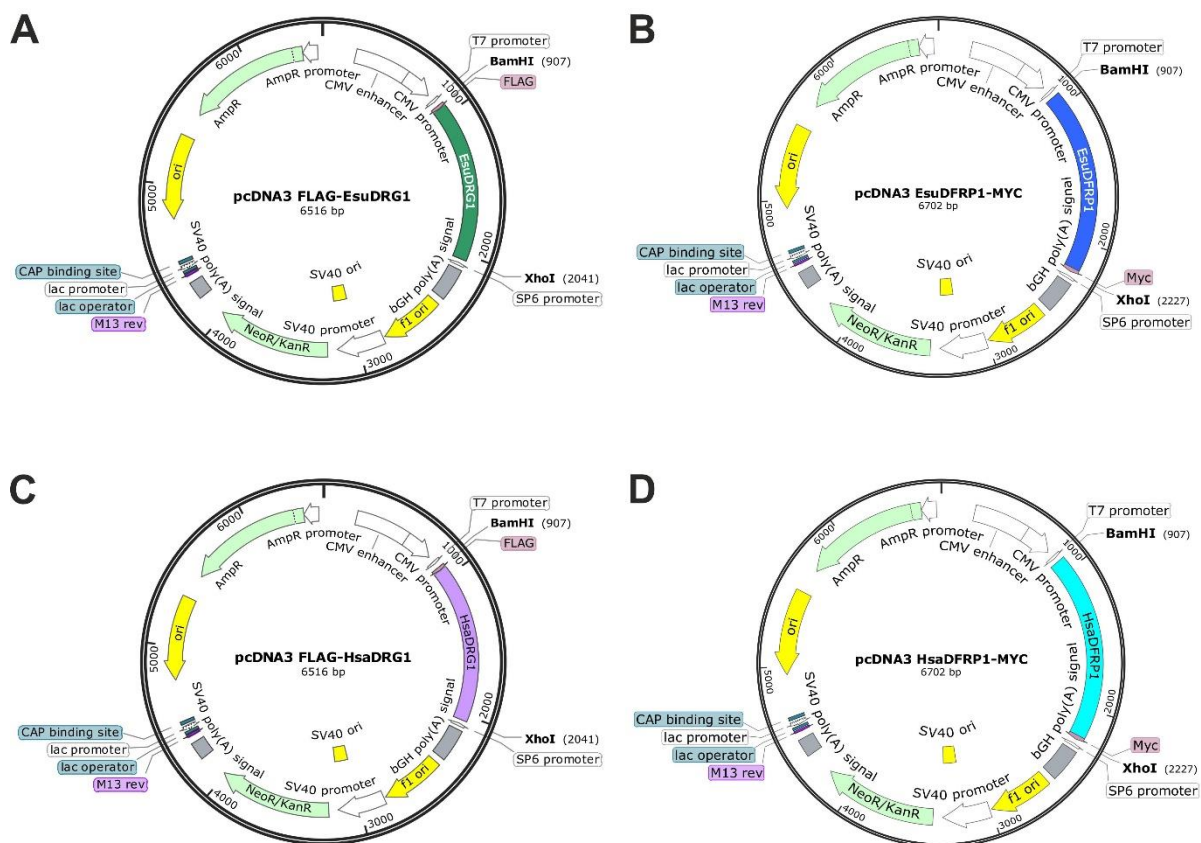
3.2.8 Kloniranje u ekspresijske vektore

S ciljem biokemijske i biološke karakterizacije proteina DRG1 cDNA koja kodira za DRG1 i DFRP1 iz spužve i čovjeka klonirana je u odgovarajuće ekspresijske vektore. U svrhu ekspresije i proizvodnje spužvinih proteina DRG1 i DFRP1 umnožena je cDNA koja kodira za protein DRG1 ili DFRP1 pomoću odgovarajućih početnica (tablica 1.). cDNA koja kodira za ljudski protein DRG1 i DFRP1 preklonirana je iz komercijalno dostupnih plazmidnih vektora (DRG1, cat. no. 186010210200, ABM) i (DFRP1 cat. no. HG23194-CM, BIOZOL) u ekspresijski vektor pET28b (slika 7.). Dobiveni konstrukti korišteni su za ekspresiju rekombinantnih ljudskih i spužvinih proteina DRG1 i DFRP1 u ekspresijskom soju bakterije *E.coli*.

cDNA koja kodira za spužvin i ljudski protein DRG1 i DFRP1 umnožena je pomoću specifičnih početnica koje su konstruirane tako da sadrže nukleotidne sljedove za privjeske MYC ili FLAG prije START ili poslije STOP kodona (EsuDRG1-FLAG, HsaDRG1-FLAG, EsuDFRP1-MYC i HsaDFRP1-MYC) (tablica 1.) i klonirana u ekspresijski vektor pcDNA3 (Slika 8.). Dobiveni konstrukti su korišteni za ekspresiju rekombinantnih ljudskih i spužvinih proteina DRG1 i DFRP1 u ljudskim stanicama.

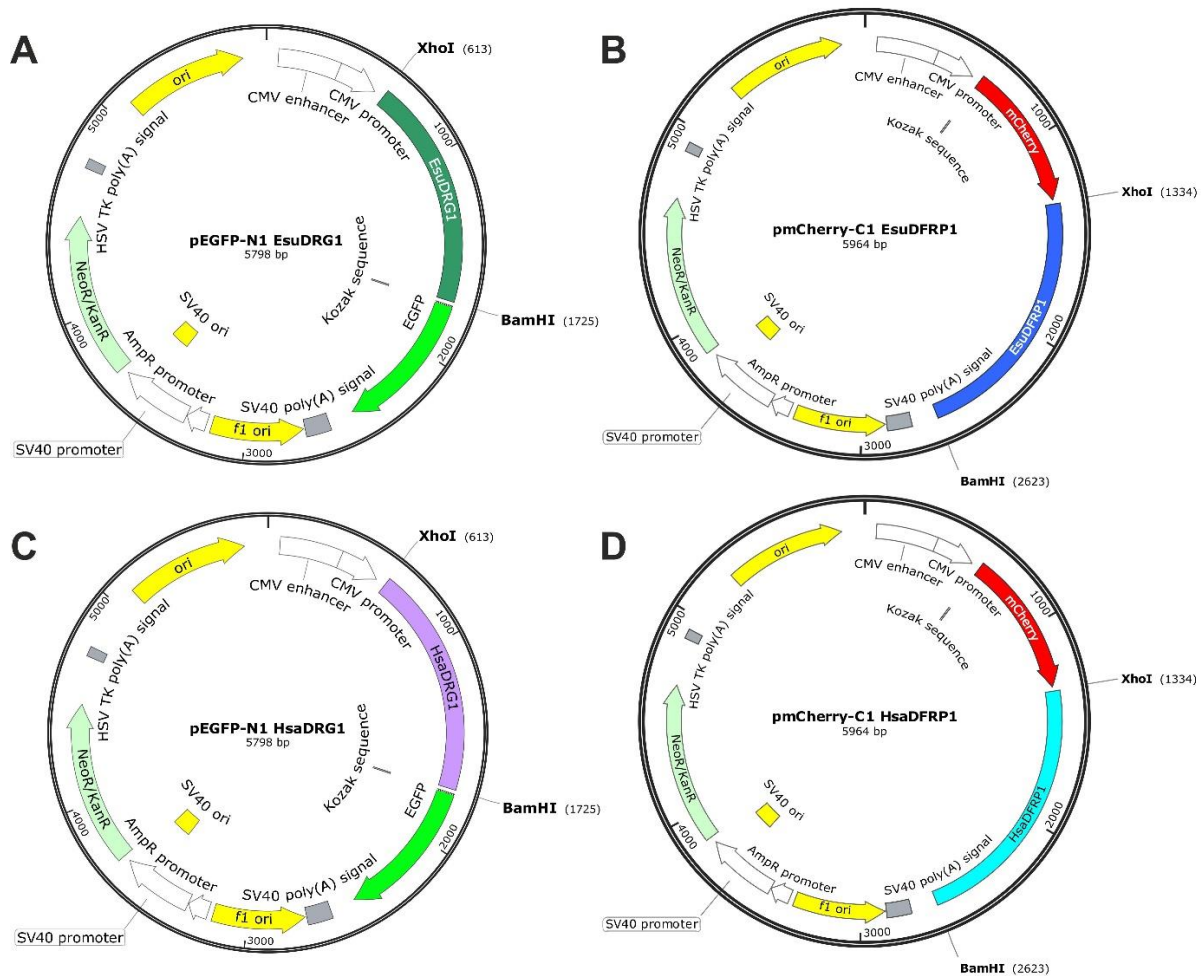


Slika 7. Prikaz plazmidnih vektora pET28b. U plazmidni vektor pET28b uklonirana je cDNA koja kodira za spužvin (A) i ljudski DRG1 (C) te spužvin (B) i ljudski (D) DFRP1. Ekspimirani protein na svom N- kraju je sadržavao heksahistidinski privjesak. Shematski prikaz je napravljen korištenjem programskog paketa SnapGene (Insightful Science; snapgene.com)



Slika 8. Prikaz plazmidnih vektora pcDNA3. U plazmidni vektor pcDNA3 uklonirana je cDNA koja kodira za spužvin (A) i ljudski DRG1 (C) koji će na svome N- kraju sadrži FLAG privjesak, te spužvin (B) i ljudski (D) DFRP1 koji će na svome C- kraju sadrži MYC privjesak. Shematski prikaz je napravljen korištenjem programskog paketa SnapGene (Insightful Science; snapgene.com).

U svrhu analize lokalizacije rekombinantnih spužvinih i ljudskih proteina DRG1 i DFRP1 u ljudskim stanicama, korišteni su plazmidni vektori pmCHERRY-C1 i pEGFP-N1 (slika 9.). Kako bi cDNA za spužvin ili ljudski protein DRG1 bili u istom okviru čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) kao EGFP s plazmidnog vektora pEGFP-N1, dizajnirane su početnice tako da je STOP kodon promijenjen u TCC (koji kodira za aminokiselinu serin), nakon kojeg su dodana još dva nukleotida (tablica 1.). Kako bi spužvin ili ljudski protein DFRP1 bio u istom okviru čitanja kao fluorescentni privjesak s plazmidnog vektora pmCherry-C1 dizajnirane su početnice kojima su dodana dva nukleotida prije START kodona.



Slika 9. Prikaz plazmidnih vektora pEGFP-N1 i pmCherry-C1. U plazmidni vektor pEGFP-N1 uklonirana je cDNA koja kodira za spužvin (A) i ljudski DRG1 (C), a u plazmidni vektor pmCherry-C1 uklonirana je cDNA koja kodira za spužvin (B) i ljudski (D) DFRP1. Shematski prikaz je napravljen korištenjem programskog paketa SnapGene (Insightful Science; snapgene.com).

Svi umnoženi fragmenti pocijepani su odgovarajućim restriksijskim nukleazama i ligirani u gore navedene ekspresijske vektore (tablica 1.). Plazmidna DNA izolirana je iz bakterijske kulture pomoću komercijalnog kompleta (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen), a izolacija je provedena prema uputama proizvođača. Dobiveni rekombinantni plazmidi dodatno su provjereni sekvenciranjem po Sangeru.

3.2.9 Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama korištena je kako bi se specifično pocijepali krajevi PCR produkata i plazmidni vektor. Nakon reakcije razgradnje ostaju 5'- ili 3'- stršeci krajevi koji omogućuju njihovo sparivanje te potom ligaciju s ciljem stvaranja rekombinantnog vektora. Popis korištenih restrikcijskih endonukleaza nalazi se u tablici 1.

Reakcijska smjesa za razgradnju PCR produkta ili vektora sadržavala je 1 µg DNA, komercijalni pufer FastDigest Buffer (10×) i po 1 µL oba restrikcijska enzima. Reakcija razgradnje se odvijala 1 sat na 37 °C. Smjesa razgrađenog vektora je nanosena na agarozni gel iz kojeg je izrezan linearni produkt odgovarajuće veličine te pročišćen komercijalnim kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova. Istim kompletom je pročišćena razgrađena smjesa PCR produkta (bez potrebe za agaroznom elektroforezom).

3.2.10 Ligacija DNA pomoću DNA-ligaze T4

DNA ligaza T4 (ElectroLigase) korištena je prema uputama proizvođača s odgovarajućim komercijalno dostupnim puferom. Pocijepani i pročišćeni PCR produkti (insert) i odgovarajući vektor ligirani su u molarnom omjeru 3:1, izračunato prema jednadžbi (jednadžba 1.). Reakcija ligacije razgrađenog vektora i inserta rađena je u volumenu od 11 µL, u trajanju od 1 sat na 25 °C. Slijedila je termalna inaktivacija ligaze 15 minuta na 65 °C nakon čega je ligacijska smjesa stavljena na led. 1.5 µL ligacijske smjese elektroporirano je u bakterijski soj *E.coli* OneShot TOP10.

$$m(\text{insert}, ng) = \frac{m(\text{vektor}, ng) * \text{duljina}(\text{insert}, kb)}{\text{duljina}(\text{vektor}, kb)} * 3$$

Jednadžba 1. Jednadžba korištena za izračun mase pocijepanog i pročišćenog PCR produkta (inserta) u ligacijskoj smjesi za molarni omjer inserta i vektora 3:1.

3.2.11 Transformacija bakterije *E. coli*

Transformacija elektroporacijom u elektrokompetentne stanice OneShot TOP10

U ovom procesu djelovanjem jakog električnog polja kratkotrajno se povećava propusnost stanične stijenke za DNA. Korišten je uređaj Gene Pulser (Bio-Rad), a parametri su postavljeni na napon 2500 V i kapacitet 25 µL, te uređaj za nadzor pulsa (Pulse Controller, Unit Bio-Rad)

s otporom 200 Ω . Kivete za elektroporaciju s razmakom između elektroda od 0.2 cm, nosač kiveta i reakcijske smjese prethodno su ohlađeni kako bi se povećalo preživljenje stanica. Komercijalno dostupnim elektrokompetentnim stanicama OneShot TOP10 dodano je 50 ng plazmidne DNA ili 1.5 μL ligacijske smjese te je primijenjen električni impuls jačine 2,5 kV cm^{-1} . Vrijeme pražnjenja kondenzatora bilo je 4 - 4,5 milisekunde. Neposredno nakon elektroporacije stanicama je dodan medij SOC (*super optimal broth*) prethodno zagrijan na 37 $^{\circ}\text{C}$ te je slijedila inkubacija na 37 $^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 1 sat. Zatim je odgovarajući volumen bakterijske suspenzije nasađen na krute LB hranjive podloge s dodatkom odgovarajućeg antibiotika. Bakterije su rasle 16 sati na 37 $^{\circ}\text{C}$.

Kemijska transformacija s CaCl_2 u ekspresijske sojeve BL21 CodonPlus (DE3) i Rosetta gami 2 (DE3) pLysS

U ovome se procesu korištenjem pufera za transformaciju (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2) i temperaturnim šokom pri 42 $^{\circ}\text{C}$ stvaraju pore na membrani bakterijskih stanica, a kalcijevi ioni se vežu na staničnu membranu bakterija neutralizirajući naboj stanice te smanjuju odbijanje negativno nabijene molekule DNA i membrane bakterijske stanice čime se omogućava unos egzogene DNA u stanice. U smjesu kemijski kompetentnih stanica (Rosetta gami 2 ili BL21 codon plus) volumena 100 μL dodano je 50 μL pufera za transformaciju i do 50 ng DNA. Nakon 5 minutna inkubacije smjese na ledu slijedio je temperaturni šok na 42 $^{\circ}\text{C}$ u trajanju točno 30 sekundi nakon čega su se stanice ponovno inkubirale 2 minute na ledu. Postupak oporavka bakterija bio je isti kao i nakon elektroporacije. Zatim je odgovarajući volumen bakterijske suspenzije nasađen na krute LB hranjive podloge s dodatkom odgovarajućeg antibiotika. Bakterije su rasle 16 sati na 37 $^{\circ}\text{C}$.

Uspješnost ugradnje inserta u vektor potvrđena je izolacijom plazmida iz kolonija koje su narasle na podlogama s odgovarajućim antibiotikom, nakon čega je slijedila restrikcijska analiza konstrukta i analiza nukleotidnih sljedova sekvenciranjem. Restrikcijska analiza je provedena pomoću enzima koji su korišteni za kloniranje specifičnog fragmenta u odgovarajući vektor (tablica 1.). Reakcijske smjese su sadržavale do 1 μg plazmidne DNA te po 1 μL svakoga restrikcijskog enzima (FastDigest) uz odgovarajući pufer FastDigest. Smjese su inkubirane 45 minuta na 37 $^{\circ}\text{C}$, te su analizirane elektroforezom u agaroznom gelu. Konačna potvrda ugradnje željenih inserata u vektor je dobivena sekvenciranjem po Sangeru. Za provjeru ugradnje gena u vektore pET28b, pEGFP-N1, pmCHERRY-C1 i pcDNA3 sekvenciranjem, korištene su komercijalno dostupne početnice koje su komplementarne sljedovima prije i poslije mjesta

ugradnje inserta na vektor. Sekvenciranje je provedeno na Institutu Ruđer Bošković na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer.

3.2.12 Biokemijske metode

3.2.12.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Za određivanje optimalnih uvjeta prekomjerne ekspresije gena EsuDRG1, HsaDRG1, EsuDFRP1 i HsaDFRP1 koji se nalaze u plazmidnom vektoru pET28b napravljena je indukcija u malom volumenu pri različitim koncentracijama IPTG-a, temperature i vremena indukcije bakterija. Uzgoji su napravljeni u tekućem hranjivom mediju LB i TB. Ukratko, kolonija ekspresijskog soja *E. coli* koja nosi gen od interesa inokulirana je u hranjivi medij s kanamicinom konačne koncentracije 35 µg/mL te stavljena na uzgoj preko noći na 37 °C uz trešnju (250 rpm). Nakon prekonocnog uzgoja kultura je razrijeđena u svježem mediju uz dodatak kanamicina i uzgajana do optičke gustoće (OD₆₀₀) od 0.6 do 0.8. Potom je nastavljen uzgoj 3 sata na 30 °C uz dodatak 0.8 mM IPTG-a ili preko noći na 16 °C uz dodatak 0.1 mM IPTG-a. Nakon indukcije bakterijska kultura je pretaložena centrifugiranjem 30 minuta na 3160×g pri temperaturi od 4 °C, talogu je dodano 500 µL pufera koji sadrži 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) i 500 mM NaCl te su uzorci sonicirani 8 puta po 30 sekundi pri amplitudi 40. Slijedilo je centrifugiranje 20 minuta 14000×g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja izdvojeno je 60 µL supernatanta kojem je dodano 20 µL 4×pufera za nanošenje uzoraka (200 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8 % SDS, 0.4 % bromfenol-plava, 40 % glicerol, 500 mM β-merkaptioetanol), a talogu je dodano 250 µL 1×pufera za nanošenje uzoraka. Talози i supernatanti su potom denaturirani kuhanjem 5 minuta na temperaturi 95 °C i analizirani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu.

Tablica 2. Optimalni uvjeti prekomjerne ekspresije gena u ekspresijskom soju *E. coli*

Gen za ekspresiju	Ekspresijski soj <i>E. coli</i>	Uvjeti optimalne prekomjerne ekspresije proteina	Optimalni hranjivi medij
EsuDRG1	Rosetta Gami 2	0.1 mM IPTG, 18 sati, 16 °C	TB
HsaDRG1	BL21 kodon plus	0.1 mM IPTG, 18 sati, 16 °C	TB
EsuDFRP1	BL21 kodon plus	0.1 mM IPTG, 18 sati, 16 °C	TB
HsaDFRP1	Rosetta Gami 2	0.1 mM IPTG, 18 sati, 16 °C	TB

U svrhu biokemijske karakterizacije ljudskih i spužvinih proteina EsuDRG1, HsaDRG1, EsuDFRP1 i HsaDFRP1 napravljena je prekomjerna ekspresija pod optimalnim uvjetima ustanovljenima testnom indukcijom (tablica 2.). Ekspresijski sojevi stanica *E. coli* transformirani željenim plazmidom uzgojeni su preko noći u tekućem mediju LB s dodatkom kanamicina (35 µg/mL) pri 37 °C. Prekonoćna kultura je razrijeđena u svježem selektivnom mediju TB u omjeru 1:100. Tako inokulirana bakterijska kultura je uzgajana na 37 °C uz trešnju do optičke gustoće (OD₆₀₀) 0.6-0.8. Slijedila je prekomjerna ekspresija proteina koja se inducirala dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije od 0.1 mM. Uzgoj u inducirajućim uvjetima je trajao 18 sati na 16 °C, nakon čega su bakterije pretaložene centrifugiranjem 10 minuta pri 6000×g i 4 °C. Talog je ispran u puferu (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 10 mM imidazol) i pohranjen na -80 °C do korištenja. Nakon odmrzavanja, bakterijski talog je resuspendiran u puferu sastava 50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 10 mM imidazol, inhibitor proteaza (cOmplet Protease Inhibitor Cocktail), Benzonase Nuclease (25 000 jedinica/mL) i lizozim (50 mg/mL) te inkubiran 30 minuta na ledu. Bakterijske stanice su razbijene ultrazvukom na uređaju ultrasonic processor 130 watt (Cole-Parmer) 8 puta po 30 sekundi na amplitudi 40 u razmacima od 1 minute pri čemu je suspenzija inkubirana na ledu. Stanični lizat je centrifugiran 40 minuta pri 14000×g na 4 °C, a supernatant profiltriran kroz sterilni filter veličine pora 0.2 µm. Prekomjerno ekspimirani proteini iz profiltriranog supernatanta pročišćeni su afinitetnom kromatografijom na TALON agarozima.

3.2.12.2 Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na TALON agarozima

Svi ekspimirani rekombinantni proteini sadrže heksahistidinski privjesak na N-terminalnom kraju, što protein čini pogodnim za primarno pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na TALON agarozima. TALON agarozna sadrži vezani Co²⁺ i ima sposobnost vezanja dva bočna ogranka histidinskog privjeska. U tu svrhu, na kolonu je nanjena TALON agarozna te ekvilibrirana s 10 mL pufera (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 10 mM imidazol). Svi daljnji koraci su rađeni na 4 °C. Nakon ekvibracije supernatant je nanjen na kolonu i pušten da prođe kroz agarozu djelovanjem gravitacijske sile. Postupak propuštanja ponovljen je 2 puta kako bi se što više proteina od interesa vezalo na agarozu. Nevezani proteini su ispirani s 20 mL pufera A (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 10 mM imidazol), zatim 20 mL pufera B (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 20 mM imidazol), nakon

čega je slijedilo ispiranje s 15 mL pufera C (50 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 400 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 10% glicerol i 40 mM imidazol).

U zadnjem koraku, proteini vezani na TALON agarozu su eluirani pomoću pufera koji sadrži visoku koncentraciju imidazola (50 mM HEPES pH 7.4, 400 mM NaCl, i 150 mM imidazol) i analizirani elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu.

3.2.12.3 Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Elektroforeza proteina rađena je u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima. Proteini iz uzoraka su denaturirani dodatkom anionskog sredstva (SDSa) koji oblažu protein, a postupak je pospješćen kuhanjem na temperaturi od 95 °C u trajanju od 5 minuta. Negativno nabijeni proteini su se u električnom polju razdvajali prema molekularnoj veličini. Za raspoznavanje proteina od interesa od ukupnog proteinskog profila u uzorku korišteni su komercijalno dostupni standardi (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad). Gelovi za elektroforezu sastojali su se od dva dijela: gornjeg (za sabijanje) i donjeg dijela (za razdvajanje). Gel za razdvajanje je bio 12%-tni akrilamid/bisakrilamid umreženja 29:1 u puferu sastava 0.4 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% amonijev persulfat i 0.1% TEMED. Gel za sabijanje je bio 4%-tni akrilamid/bisakrilamid umreženja 29:1 u puferu sastava 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.05% amonijev persulfat i 0.1% TEMED. Pufer u kojem se odvijala elektroforeza je sastava: 25 mM Tris baza, 192 mM glicina i 0.1% SDS. Elektroforeza se provodila pri naponu 80 V (sabijanje) i 120 V (razdvajanje). Nakon završetka gel elektroforeze, gel za sabijanje je uklonjen, a gel za odvajanje obojen u otopini koja sadrži 0.1% briljantnog modrila Coomassie i 10%-tnu octenu kiselinu. Višak boje s gela uklonjen je odbojavanjem u otopini sastava 25% metanola i 7% octene kiseline.

3.2.12.4 Vizualizacija proteina westernskom metodom otiska

Westernskom metodom otiska napravljena je detekcija induciranih proteina u ukupnoj proteinskoj smjesi. Proteini koji su razdvojeni elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu preneseni su na nitroceluloznu membranu u puferu za prijenos (25 mM Tris baza, 129 mM glicin, 20% metanol). Prijenos je trajao 60 minuta pri 100 V ili preko noći pri 40 V uz hlađenje. Nakon prijenosa membrane su inkubirane jedan sat u puferu za blokiranje (TBST s 5% otopine sredstva za blokiranje) nakon čega je slijedilo ispiranje, tri puta po 5 minuta u puferu TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Slijedila je inkubacija s komercijalno dostupnim pročišćenim anti-6xHis primarnim antitijelima iz miša u trajanju od sat vremena na sobnoj

temperaturi uz trešnju te inkubacija sa sekundarnim antimišnjim antitijelima također sat vremena uz trešnju. Nevezana primarna i sekundarna antitijela su isprana tri puta po 5 minuta u TBST puferu. Nakon ispiranja je na membranu dodana otopina komercijalno dostupnog reagensa za detekciju (ECL Western Blotting Select Detection Reagent) koji omogućuje detekciju kemiluminiscencijom na uređaju Uvitec Alliance Q5 mini.

3.2.12.5 Gel-filtracija

Proteini od interesa pročišćeni afinitetnom kromatografijom dodatno su pročišćeni gel-filtracijskom kromatografijom jer je prilikom pročišćavanja afinitetnom kromatografijom uočeno prisustvo drugih proteina iz bakterijskog ekstrakta koji bi mogli dovesti u pitanje točnost biokemijske karakterizacije. Gel-filtracija rekombinantnih proteina (EsuDRG1, HsaDRG1, EsuDFRP1 i HsaDFRP1) je provedena na koloni Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) korištenjem sistema Äkta avant 25 (GE Healthcare). Kolona je predekvilibrirana fosfatnim puferom, pH 7.4 i 140 mM NaCl, te ekvilibrirana s Bio-Rad gel filtracijskim standardima: tireoglobulin (670 kDa), γ -globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), mioglobin (17 kDa), i vitamin B21 (1.35 kDa). Uzorak ukupnog volumena 500 μ L je prije nanošenja na kolonu centrifugiran 10 minuta pri 10000 \times g, kako bi se izbjeglo nanošenje krutih nečistoća na kolonu. Kromatografija se provodila u fosfatnom puferu, pH 7.4 i 140 mM NaCl pri temperaturi od 4 °C, pri protoku od 0.5 mL/2 min ili 0.5 mL/1 min. Razdvajanje uzorka je spektrofotometrijski praćeno pri valnoj duljini 260 i 280 nm. Nakon frakcioniranja proteina iz uzorka, dio volumena je alikvotiran, denaturiran 5 minuta na 95 °C te je čistoća frakcija provjerena gel elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu.

3.2.12.6 Ultrafiltracija

Željeni protein se nalazi u frakcijama, frakcije su ukoncentrirane ultrafiltracijom pomoću centrikona te im je pufer izmijenjen u pufer za skladištenje (25 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM DTT i 10% glicerol). Centrikoni sadrže membranu sa porama kroz koje ne prolaze čestice manje od 10 kDa. Ultrafiltracija je rađena prema uputama proizvođača na 4 °C (Amicon Ultra centrifugal filters 10k), a ukoncentrirani uzorci su pohranjeni na -80 °C.

3.2.12.7 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorku je određena na spektrofotometru DeNovix DS-11, mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Pri tome su korišteni podaci o molekulskoj masi proteina i njihovi ekstinkcijski koeficijenti koji su određeni pomoću programa ExPASy protPARAM (<https://web.expasy.org/protparam/>) (tablica 3.).

Tablica 3. Molekulska masa i ekstinkcijski koeficijent rekombinantnih proteina sa heksahistidinskim privjeskom.

Naziv proteina	Molekulska masa (Daltona, Da)	Ekstinkcijski koeficijent ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
6xHis-EsuDRG1	43184	33140
6xHis-HsaDRG1	42994	34630
6xHis-EsuDFRP1	50266	32805
6xHis-HsaDFRP1	50897	31315

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu komercijalno dostupnim Bradford reagensom (Quick Start Bradford 1×Dye Reagent, Bio-Rad). Apsorbancija uzoraka izmjerena je pri valnoj duljini od 595 nm na spektrofotometru (Ultrospec 2100 pro, Biochrom).

Koncentracija proteina određena je pomoću jednadžbe baždarnog pravca pri čemu je BSA (engl. *bovine serume albumin*) korišten kao standard.

3.2.12.8 Test s glutaraldehydom

Test s glutaraldehydom se koristi za nepovratno unakrsno povezivanje slobodnih lizinskih krajeva proteina što omogućava vizualizaciju potencijalnog proteinskog kompleksa. Reakcija povezivanja proteina s glutaraldehydom provedena je prema protokolu (Kim i sur., 2003a; Perina i sur., 2011b) sa sljedećim modifikacijama. Reakcijska smjesa koja je sadržavala 1 μg proteina DRG1 ili 2 μg svakog od proteina DRG1 i DFRP1 je predinkubirana u fosfatnom puferu 15 minuta. Slijedila je 5 minutna inkubacija proteina DRG1 s 0.063%, 0.0125% i 0.025% glutaraldehyda. Reakcijska smjesa koja je sadržavala proteine DRG1 i DFRP1 inkubirana je 30 minuta, a koncentracija glutaraldehyda je iznosila 0.125%, 0.25% i 0.5%. Dodatkom Tris-HCl (pH 7.4) do konačne koncentracije 200 mM i inkubacijom od 15 minuta reakcija je prekinuta. Svi koraci su se provodili na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije,

uzorci su prokuhani 5 minuta na 95 °C u puferu za nanošenje uzoraka, nakon čega je slijedila analiza elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu. Vizualizacija proteina na gelu je napravljena bojanjem s briljantnim modrilom Coomassie, a višak boje je ispran u puferu za ispiranje (45% metanol i 7% octena kiselina).

3.2.12.9 GTPazni esej

Intrinzična GTPazna aktivnost spužvinog i ljudskog proteina DRG1 određena je pomoću GTPase-Glo esejja (Promega) prema uputama proizvođača. U ovom testu, GTP koji zaostaje u otopini nakon završetka GTPazne reakcije je pretvoren u ATP, koji se zatim koristio u reakciji luciferaze za proizvodnju bioluminiscencije koja se detektira pomoću luminometra. Za optimizaciju količine proteina u esejju protein DRG1 je serijski razrjeđivan u GTPase/GAP puferu uz dodatak 2 μM GTP-a. Reakcije su se inkubirale 120 minuta pri 37 °C. Luminiscencija je mjerena u bijelim pločicama s 384 bunarića i ravnim dnom (Greiner) na uređaju Infinite M200 plate reader (Tecan). Kako bi se testirao utjecaj proteina DFRP1 na GTPaznu aktivnost proteina DRG1 napravljena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 1.2 μM proteina EsuDRG1 i 1.2 μM proteina EsuDFRP1. Reakcija je provedena u istim uvjetima kao što je prethodno opisano te je mjerena luminiscencija.

3.2.12.10 Test nespecifičnog vezanja proteina na RNA

Svojstvo proteina DRG1 iz spužve da nespecifično veže RNA ispitano je kao što je opisano u radu Kim i suradnika (Kim i sur., 2003 b; Francis, 2012). Reakcija je temeljena na vezanju proteina na poli(U)agarozu (poliuridilna kiselina vezana na matriks agaroze) ili slobodnu poli(U) (poliuridilnu kiselinu). Ukratko, 0.5 mg proteina je inkubirano u 100 μL hladnog reakcijskog pufera (10 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 3 mM DTT) sa slobodnom poli(U) (Sigma-Aldrich) koncentracije 0, 0.1 i 1 mg/mL. Reakcijska smjesa je inkubirana 30 minuta na 4 °C na rotatoru. Nakon inkubacije, u reakciju je dodano 10 μL 50% poli(U)agaroze (Sigma-Aldrich) otopljene u reakcijskom puferu te je reakcijska smjesa ponovno inkubirana 30 minuta na 4 °C na rotatoru. Slijedilo je ispiranje u reakcijskom puferu i centrifugiranje 1 minutu na 14 000×g na 4 °C pri čemu je uklonjena slobodna poli(U) i protein koji je ostao nevezan za matriks poli(U)agaroze. Postupak je ponovljen šest puta. Proteini vezani za poli(U)agarozu su eluirani dodatkom pufera za nanošenje na gel i denaturirani kuhanjem 6 minuta na 95 °C. Uzorci su analizirani

elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu, a vizualizacija proteina na gelu je napravljena bojanjem s briljantnim modrilom Coomassie. Višak boje je ispran u puferu za ispiranje.

3.2.12.11 Test nespecifičnog vezanja proteina na DNA

Sposobnost nespecifičnog vezanja spužvinog proteina DRG1 na molekulu DNA ispitana je elektroforezom zaostajanja u gelu (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) kao što je opisano u radu Četković i suradnika (Galvão i sur., 2004; Perina i sur., 2011a; Četković i sur., 2018b). Ukratko, reakcijska smjesa sadržavala je 200 ng jednolančane cirkularne DNA bakteriofaga Φ X174 (NEB) ili dvolančane cirkularne DNA bakteriofaga Φ X174 (NEBS) kojoj je dodan spužvin ili ljudski protein DRG1 u količini od 100 do 1600 ng. Reakcija je provedena u reakcijskom puferu (40 mM Tris-acetat pH 7.5, 1 mM EDTA) u ukupnom volumenu od 20 μ L. Reakcija je inkubirana 30 minuta na 37 °C nakon čega je dodana boja za nanošenje uzoraka na gel (6 \times Gel Loading Dye, Purple, Fisher Scientific). Slijedila je elektroforeza u 0.5% agaroznom gelu s dodatkom etidijevog bromida u puferu za elektroforezu (40 mM Tris-acetat pH 7.5, 1 mM EDTA) pri jakosti struje od 3 V po centimetru gela u trajanju od 3 sata. Vizualizacija DNA je napravljena na uređaju Syngene G:BOX.

3.2.13 Biološke metode

3.2.13.1 Stanična kultura i prolazna transfekcija stanica

U istraživanjima su korištene ljudske stanice raka grlića maternice HeLa (ATCC cat. No. CCL-2). Stanice su uzgajane u modificiranom minimalnom mediju Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Capricorn Scientific), 1% neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich) i 1% otopine antibiotika/antimikotika (Capricorn Scientific) u vlažnoj komori pri 37 °C i 5% CO₂.

Za pokuse transfekcije stanicama je odstranjen hranjivi medij, stanice su isprane u PBS-u i tripsinizirane u 0.25%-tnoj otopini tripsina 5 minuta pri 37 °C. Nakon odvajanja stanica od podloge, tripsinizacija je zaustavljena dodatkom medija sa serumom koji inhibira aktivnost tripsina. Stanice su potom resuspendirane i brojane na brojaču stanica (LUNA) i određen im je srednji ukupni broj. Odgovarajući broj stanica nasađen je u pločice s 24 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transfecirane s Lipofectaminom 3000 (Thermo Fisher Scientific) prema uputama proizvođača te inkubirane sljedeća 24 sata. Stanice su transfecirane s odgovarajućim

plazmidnim vektorima (pcDNA3, pmCherry-C1 ili pEGFP-N1) bez ili sa insertom (za ljudski ili spužvin DRG1 ili DFRP1), ovisno o vrsti pokusa.

3.2.13.2 Unutarstanični smještaj

Za analizu unutarstaničnog smještaja stanice HeLa (2×10^4 stanica po bunariću) su nasadene na pokrovna stakalca u pločice s 24 bunarića. Nakon 24 sata stanice su bile 70% konfluentne te su transfecirane s fluorescentno obilježenim DRG1 iz spužve (EsuDRG1-GFP) ili čovjeka (HsaDRG1-GFP) zajedno sa DFRP1 iz spužve (EsuDFRP1-CHERRY) ili čovjeka (HsaDFRP1-CHERRY). Za kontrolu transfekcije korišteni su plazmidni vektori pEGFP-N1 i pmCherry-C1, bez inserta. 24 sata nakon transfekcije stanicama je uklonjen medij i isprane su tri puta u $1 \times$ PBS nakon čega je slijedila fiksacija u 4%-tnoj otopini paraformaldehida tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga stanice su isprane tri puta u $1 \times$ PBS te bojane bojom Hoechst (Thermo Fischer Scientific). Pri tome su pokrovna stakalca inkubirana 10 minuta u 60 μ l boje Hoechst (konačne koncentracije 5 μ g/ml) otopljene u $1 \times$ PBSu te isprana tri puta u $1 \times$ PBS i tri puta u mqH_2O . Na kraju su uklopljena na predmetna stakalca pomoću medija za uklapanje (Fluoromount Aqueous mounting medium, Sigma, Sigma-Aldrich). Unutarstanični smještaj vizualiziran je na konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopu Leica TCS SCP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka). Dodatno uređivanje slika je napravljeno u programu Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated).

3.2.13.3 Test zacjeljivanja rane

U pokusu zacjeljivanja korištene su stanice HeLa (5×10^4 stanica po bunariću) koje su nasadene na pločice sa 24 bunarića i transfecirane sa ekspresijskim vektorom pcDNA3 za spužvin (EsuDRG1-FLAG) ili ljudski (HsaDRG1-FLAG) protein DRG1 s proteinskim privjeskom FLAG te za spužvin (EsuDFRP1-MYC) ili ljudski (HsaDFRP1-MYC) protein DFRP1 s proteinskim privjeskom MYC. Dvadeset četiri sata nakon transfekcije stanice su zagrebene pomoću sterilnog nastavka (100 μ L) praveći dva ravna okomita pravca, te isprane s novim medijem i inkubirane 48 sata. Mjerenjem udaljenosti stanica od jedne do druge strane "ogrebotine" praćena je migracija stanica na pet mjesta u svakom bunariću. Stanice su analizirane pod $100 \times$ invertnim mikroskopom (Olympus CKX41, Tokio, Japan). Udaljenost nakon 48 sata je kvantificirana korištenjem programa NIH ImageJ (National Institutes of Health, USA) i uspoređena s udaljenosti neposredno nakon "grebanja" na istome mjestu u bunariću.

3.2.13.4 Transfekcija spužvinih stanica u kulturi

Za analizu unutarstaničnog smještaja ljudskog i spužvinog proteina DRG1 i DFRP1 korištene su stanice spužve *E. subterraneus*. Spužvine stanice su izolirane iz tkiva spužve kao što je opisano u poglavlju 3.2.3 i brojane na brojaču stanica (LUNA). Stanice su razrijeđene u 500 μ l svježe špiljske vode te je 1×10^6 stanica nasadeno u petrijevke podijeljene na 4 bunarića sa pokrovnicom na dnu (Cellvis, D35C4-20-1.5-N). Za transfekciju stanica korišten je Turbofect (Thermo Fisher scientific, R0533) prema uputama proizvođača za transfekciju *in vivo*. Stanice su transfecirane u transfekcijskim parovima kojeg čine plazmidni vektori sa insertom za spužvin (EsuDRG1-GFP i EsuDFRP1-MYC) ili ljudski (HsaDRG1-GFP i HsaDFRP1-MYC) DRG1 i DFRP1, nakon čega su inkubirane 24 sata pri 8 °C. Jezgre su obilježene bojom Hoechst (Thermo Fischer Scientific) pri čemu je 100 μ L boje (konačne koncentracije 35 μ g/ml) dodano u svaki bunarić i inkubirano 30 minuta na 8 °C. Nakon 30 minuta inkubacije unutarstanični smještaj je vizualiziran na konfokalnom laserskom pretražnom mikroskopu Leica TCS SCP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka). Dodatno uređivanje slika je napravljeno u programu Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated).

4. REZULTATI

4.1 Identifikacija homologa proteina DRG1 iz spužve i analiza njegove evolucijske prošlosti

S ciljem identifikacije DRG1 iz spužve pretražena je neobjavljena baza genoma i transkriptoma spužve *E. subterraneus* (Esu) iz koje je identificiran DRG1 homolog (GenBank: OL692370). Protein DRG1 ima 366 aminokiselina, počinje aminokiselinom metionin čiji kodon je kodiran tripletom AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UAA. Na slici 10. su usporedno prikazane nukleotidna i proteinska sekvenca DRG1 iz spužve s označenim startnim i stop kodonima.

```
ATG cct acg ata ctt gaa aag ata gcg gaa atc gag acc gag atg gcc cgg act caa cga
M P T I L E K I A E I E T E M A R T Q R
aac aag gca acg gcc tat cac ctt ggt gtc tta aag gca cgt tta gca aaa ctg aga cgt
N K A T A Y H L G V L K A R L A K L R R
gag ctc att acg ccc aaa ggt gga ggg ggt aca gga gaa ggc ttt gac gta gct aaa act
E L I T P K G G G G T G E G F D V A K T
gga gat gca aga ata ggc ttt gtg ggt ttt ccg tca gta ggt aag tca acc tta ctg aca
G D A R I G F V G F P S V G K S T L L T
aac gtc gct gga gtc tat tct gag gtt gcc gag tat gac ttc acc act ctc acg act gtg
N V A G V Y S E V A E Y D F T I L T T V
cct ggg gtt atc cgt tac aag ggc gca aaa ata caa ctc ctt gac ctc cca ggc atc att
P G V I R Y K G A K I Q L L D L P G I I
gaa ggt gcc aaa gat ggc aaa ggt cga ggg cgt gag gtg ata gca gtg gct aga acc tgt
E G A K D G K G R G R Q V I A V A R T C
ggc ctt atc ttc att ata ttg gac gtg cta aaa cct ttg gag cac aag cac atc att gag
G L I F I I L D V L K P L E H K H I I E
aga gaa ctg gaa ggc ttt gga ata cgc ctc aac aag agg cca cca aac ata gtt ttc aag
R E L E G F G I R L N K R P P N I V F K
aag aaa gag aag gga gga atc aac ctc act tgt acg gtg caa cag tca aat ctc gat ctg
K K E K G G I N L T C T V Q Q S N L D I
gag tct gtt cgc agc att ctt gca gaa tac aga atg cac aat gct gat gtg acc ttg cga
E S V R S I L A E Y R M H N A D V T L R
tgt gat gcg acc gtt gat gac cta att gat gtt att gag ggg aat aga gtt tat gta cca
C D A T V D D L I D V I E G N R V Y V P
gct att tac ctg ctg aat aag atc gat caa ata tct gtt gag gag ttg gat atc gta tac
A I Y V L N K I D Q I S V E E L D I V Y
aag atc cca cat gca gtg cca att tca gct cat cat aaa tgg aat ttt gat gat cta ttg
K I P H A V P I S A H H K W N F D D L L
gag aag atg tgg cag tat ttg aac tta ata aga ata tac acc aaa cca aaa gga cag ctg
E K M W Q Y L N L I R I Y T K P K G Q I
cct gac tac tcc aca cct gtt gta ctg gac cag aac aag agc tct gtt gaa gac cta tgc
P D Y S T P V V L D Q N K S S V E D L C
aat aac atc cac aaa agt att ctc aaa gaa ttc aaa cat gca cta gtg tgg ggt tct tca
N N I H K S I L K E F K H A L V W G S S
gtg aag cac aat cca cag aaa gtg gga aag gaa cat gta ttg tgt gat gaa gat gtc gtt
V K H N P Q K V G K E H V L C D E D V V
caa ctc gtt aag aaa atc TAA
Q L V K K I -
```

Slika 10. Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence DRG1 iz spužve *E. subterraneus* s označenim startnim i stop kodonima te regijama karakterističnim za protein. Startni i stop kodoni označeni su podebljanim slovima, HTH-domena je označena žutom bojom, pet G-motiva koji zajedno čine G-domenu sivom bojom, Switch I i Switch II domene crvenom bojom,

S5D2L-domena zelenom bojom, a TGS domena je označena svijetlo plavom bojom. Za izradu slike korišten je bioinformatički alat Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>).

S obzirom da je iz literature poznato da je za aktivnost ljudskog proteina DRG1 potreban protein DFRP1 (*Zinc Finger CCCH-Type Containing 15, DRG Family-Regulatory Protein 1, ZC3H15, LEREPO4*) koji se veže na DRG1 čime ga stabilizira i sprječava njegovu poliubiktivaciju, te samim time i razgradnju u proteasomu (Ishikawa i sur., 2005), pretražen je transkriptom spužve *E. subterraneus* kako bi se vidjelo postoji li u spužvi homolog DFRP1. Spužvin protein DFRP1 je uspješno identificiran (GenBank: OL692371) i analiziran. Pokazano je da je ima 426 aminokiselina, počinje aminokiselinom metionin tj. tripletom AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UGA. Na slici 11. je prikazana usporedna nukleotidna i proteinska sekvenca DFRP1 iz spužve s označenim startnim i stop kodonima.

```

ATG cca ccg aag aaa ggt gcg caa gct cag ggg agc aag aaa acg cag gag aag aag aag
M P P K K G A Q A Q G S K K T Q E K K K
gat aaa gtc atc gag gac aaa act ttc ggc ctg aag aac aag aag ggg aaa aaa caa cag
D K V I E D K T F G L K N K K G K K Q Q
cag ttc ata cag cag gtc aca agc caa gtg aag tat gga caa caa agt tta caa aag aaa
Q F I Q Q V T S Q V K Y G Q Q S L Q K K
aag gcc gaa gaa ata gaa aaa aag aaa aag aaa gaa gaa gaa gac aag cag aag gct gaa
K A E E I E K K K K E E E D K Q K A E
ctc aac tct ctc ttg aag cca gtg gcc cag gcc cag aaa gtg tcc gct ggt gct gat cca
L N S L L K P V A Q A Q K V S A G A D P
aag tcc gtt ctg tgt gtg ttc aag cag ggc caa tgt ggc aaa gga gac aag tgc aag
K S V L C V F F K Q G Q C G K G D K C K
ttc tcc cac gat ctc tcc ctg gag ggg aaa gca gaa aag agg agc atg tat gtc gac gcc
F S H D L S L E G K A E K R S M Y V D A
aga gac atg gaa gac gat aca atg gac aag tgg gat gaa gag aag ctg aag gag gtt gtg
R D M E D D T M D K W D E E K L K E V V
aag aag aag cac gac gag gag ggc aaa ccc aag aca gag att gtc tgc aag ttc ttc ctg
K K K H D E E G K P K T E I V C K F F L
cag gcc ata gag aag ggg ctg tac gga tgg ttc tgg gag tgc cct aat ggc ggt gac aag
Q A I E K G L Y G W F W E C P N G G D K
tgc atg tac aga cac gcc ctt cct ccc ggg ttt gtg ttg aag cag aag aag aag gat ggg
C M Y R H A L P P G F V L K Q K K K D G
gag gag gag gag cag acc atc tcg ctg gag gag ctt gtg gag cag gag cgt cag aag ctt
E E E E Q T I S L E E L V E Q E R Q K L
gca tcc tca gga gtg cct ctc aca aag gtg acc ttg gag acc ttc ttg gca tgg aag gac
A S S G V P L T K V T L E T F L A W K D
aga aag atc aaa gag agg agg gag aag gat act gct gag tcg gag gag aag aag gaa gca
R K I K E R R E K D T A E S E E K K E A
ttc aaa gca ggt cga act gtt ggg att agc ggt cga gag atg ttt gaa ttt aac ctt gat
F K A G R T V G I S G R E M F E F N P E
ctg gtt gga gag gac gac ctt gat gag gaa ggt gca gag gtg gtg tac aag aga gag gag
L V G E D D L D E E G A E V V Y K R E E
gag cag ggt gat gag cag gag gcc cta gac gtc acc ctc atc aag gcc gtt gca gac aca
E Q G D E Q E A L D V T L I K A V A D T
ccc aac ccc ctg ggt cca atc aag ctg tct gaa ccc aga cta gcg ggg gca gtg ggc aga
P N P L G P I K L S E P R L A G A V G R
gct gtg ggt gga gat gac ggg ttc aat cct tat gac caa gag tac cat tca tca gac gag
A V G G D D G F N P Y D Q E Y H S S D E
agc gaa ggt gaa ggt gac gag agg gag aat agt gat ggg gac cag caa gag gag gag
S E G E G D E R E N S D G D Q Q E E E
ggg gta ccc gtt gac gag gcc ctc ttt gat gca gaa gag ttg gat gct ttg cat ata gac
G V P V D E A L F D A E E L D A L H I D
gat gag gct ggt gaa gat TGA
D E A G E D -

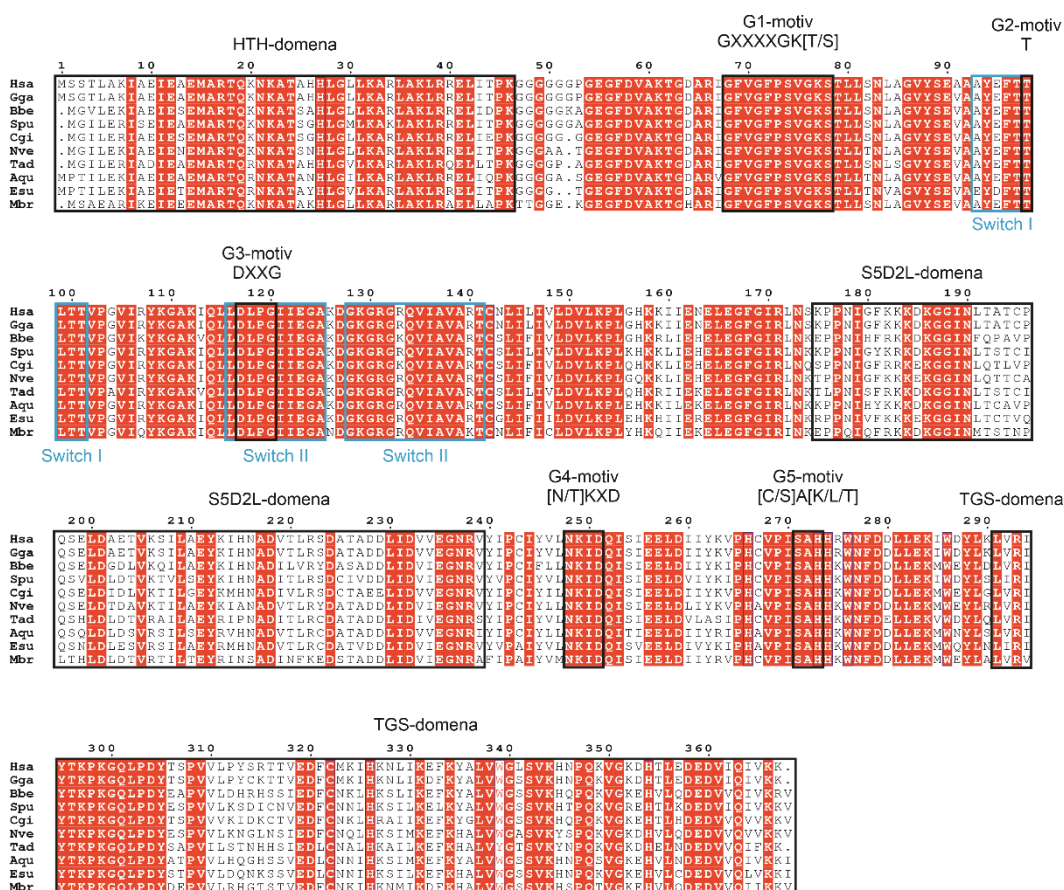
```

Slika 11. Usporedni prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina DFRP1 iz spužve *E. subterraneus* s označenim startnim i stop kodonima te regijama karakterističnim za protein. Startni i stop kodoni označeni su podebljanim slovima, domene dva cinkova prsta označene su

sivom bojom, a DFRP domena svijetlo plavom bojom. Za izradu slike korišten je bioinformatički alat Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>).

Kako bi se identificirale domene i motivi karakteristični za proteine iz porodice DRG napravljena je pretraga u BLAST bazi podataka te su identificirani homolozi proteina DRG1 iz odabranih predstavnika Metazoa kao i bliskih jednostaničnih srodnika. Na temelju višestrukog poravnanja proteinskih sekvenci vidljivo je da proteini DRG1 iz odabranih predstavnika Metazoa i Protista sadrže pet G motiva (G1-G5) i dvije “Switch” regije (Switch I i Switch II), kao i HTH, S5D2L i TGS domenu. Motiv G1 sadrži aminokiselinski slijed Gly-Phe-Pro-Ser-Val-Gly-Lys-Ser koji čini karakterističnu petlju važnu za vezanje fosfata. Motiv G2 sadrži samo jednu aminokiselinu, Thr, koja je sačuvana unutar superobitelji, a preklapa se sa regijom Switch I. Motiv G3 sadrži slijed Asp-Leu-Pro-Gly i djelomično se preklapa s regijom Switch II, dok motiv G4 sadrži slijed Asn-Lys-Ile-Asp. Motiv G5 umjesto karakterističnog slijeda (Cys/Ser)Ala[Lys-Leu-Thr] u aminokiselinskoj sekvenci sadrži slijed Ser-Ala-His tj. umjesto karakterističnog završetka motiva s aminokiselinom Lys, Leu ili Thr sadrži His.

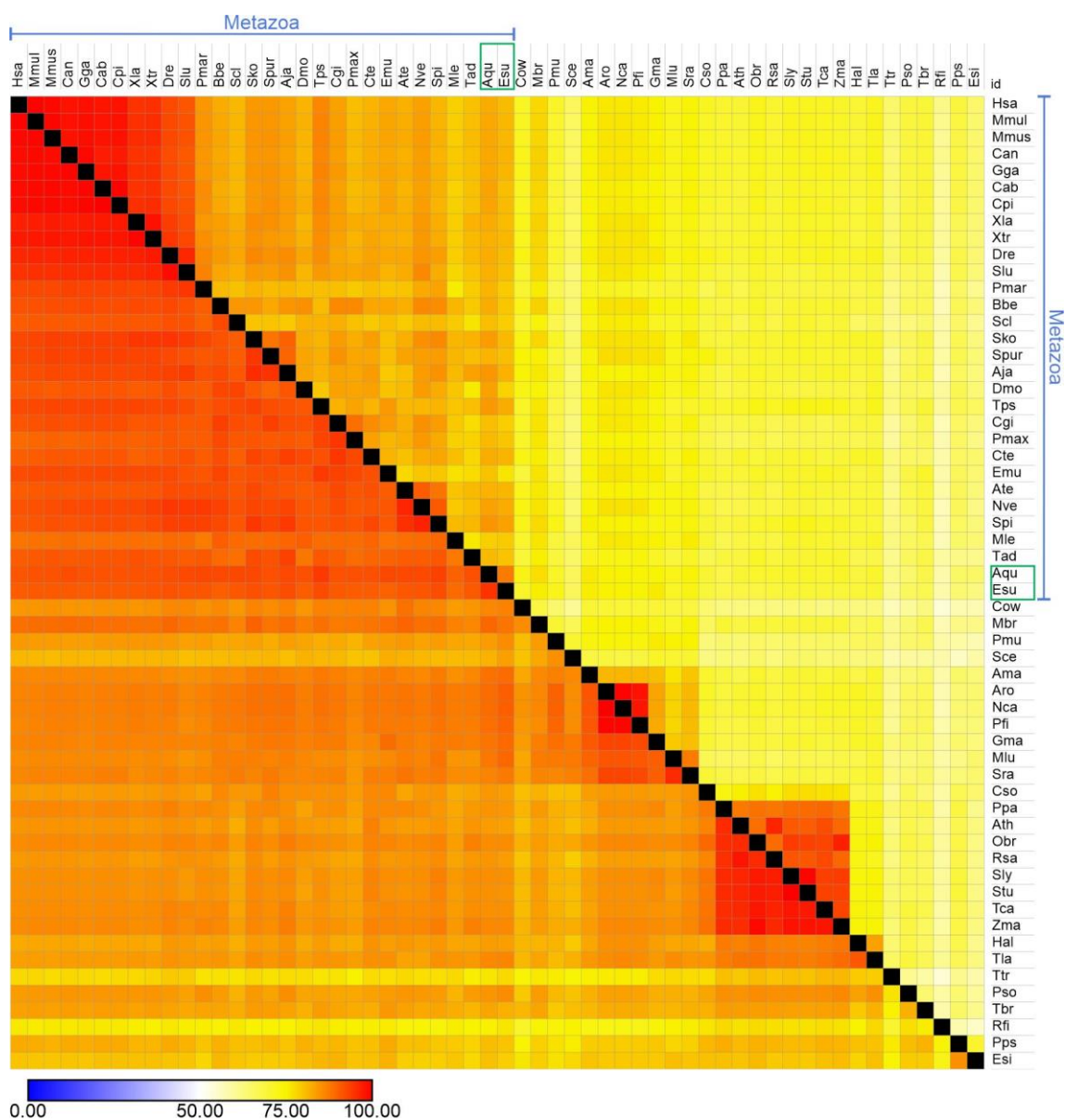
Svih pet G motiva u potpunosti je očuvano kod spužvi i čovjeka. Regija Switch I naziva se još i efektor regija te čini jednu od dvije petlje koje podliježu konformacijskim promjenama nakon vezanja GTP-a. Druga takva petlja je regija Switch II. Za regiju Switch II je karakteristično da je u potpunosti očuvana kod spužvi i čovjeka, dok se regija Switch I kod vrste *E. subterraneus* razlikuje za dvije aminokiseline, umjesto alanina ima glutamat (na 93. mjestu u aminokiselinskoj sekvenci) te aspartat umjesto glutamata (na 95. mjestu u aminokiselinskoj sekvenci). Domena TGS nalazi se na C-kraju proteina, sastoji se od 78 aminokiselina kod spužvi dok kod čovjeka sadrži 77 aminokiselina (slika 12.).



Slika 12. Višestruko poravnanje proteinskih sekvenci homologa DRG1 iz odabranih predstavnika Metazoa te njihovih bliskih jednostaničnih srodnika. Sačuvane domene i motivi proteina DRG1 označene su crnim okvirom s nazivom iznad okvira. U poravnanju je uočena (od N-terminalne strane prema C-terminalnoj); HTH-domena, G1-motiv, G2-motiv, G3-motiv, S5D2L-domena, G4-motiv, G5-motiv i na kraju TGS-domena. Višestruko poravnanje sekvenci izvedeno je korištenjem programskog paketa MUSCLE (Edgar RC (2004)). Slika poravnanja napravljena je korištenjem bioinformatičkog alata ESPrict 3.0 (<https://esprict.ibcp.fr>).

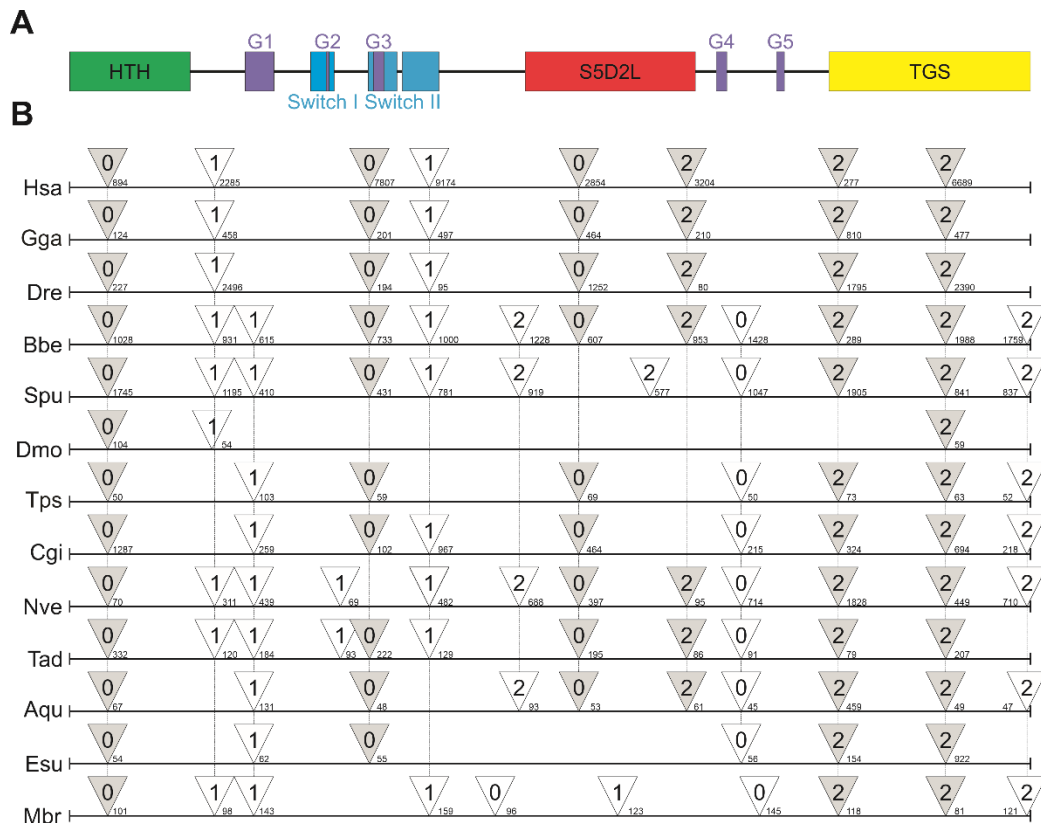
Kako bi se dobio uvid u filogenetske odnose između homologa proteina DRG iz odabranih predstavnika, konstruirano je filogenetsko stablo metodom Maximum Likelihood (MEGA 7). U filogenetskom stablu (slika 13.) jasno je definirano grananje između odabranih homologa proteina DRG1 i DRG2 (*bootstrap* vrijednosti 99% i 97%). Unutar podskupina DRG1 i DRG2, analiza je pokazala grupiranje za životinje, biljke i gljive (podržano visokim *bootstrap* vrijednostima), dok podskupinu DRG čine isključivo predstavnici Archaea. Evolucijska analiza sugerira da su homolozi proteina DRG1 kod Metazoa blisko srodni. Oni formiraju definiranu granu, s kladama koje uglavnom odgovaraju taksonomskim skupinama kojima pripadaju. Jedinstveno grananje uočljivo je kod većine predstavnika skupine bazalnih Metazoa koju čine žrnjaci (*Actinia tenebrosa*, Ate; *Nematostella vectensis*, Nve i *Stylophora pistollata*, Spi),

Analiza sličnosti i identičnosti proteina DRG1 pokazala je visok postotak homologije (75.7 – 100%) kod Metazoa, dok je homologija kod organizama iz ostalih skupina nešto niža. Svi analizirani proteini DRG1 pokazuju sličnost i identičnost iznad 50% kao što je i vidljivo na toplinskoj karti (slika 14.). Visoki postotak homologije upućuje da je riječ o evolucijski sačuvanom proteinu. Homolog proteina DRG1 iz čovjeka pokazuje visoki postotak sličnosti i identičnosti s homologizima iz spužve *A. queenslandica* (91.3% i 82.3%) i *E. subterraneus* (90,5% i 80.7%).



Slika 14. Na osnovu vrijednosti sličnosti i identičnosti proteina DRG1 napravljena je toplinska karta pomoću programa Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>), gdje gornji trokut predstavlja vrijednosti identičnosti, a donji trokut predstavlja vrijednosti sličnosti. Visoki

+2 unutar tripleta ATA koji kodira za aminokiselinu izoleucin (Ile, I) koja je na 292. mjestu u sekvenci. Šesti intron, duljine 922 nukleotida, nalazi se u fazi +2 unutar tripleta CAT koji kodira za aminokiselinu histidin (His, H), a nalazi se na 333. mjestu u aminokiselinskoj sekvenci. Nadalje, identificirani su, analizirani i međusobno uspoređeni geni koji kodiraju za protein DRG1 kod nekoliko modelnih organizama, uključujući spužve *E. subterraneus* i *A. queenslandica* te su određene pozicije, faze i duljine introna (slika 16.).



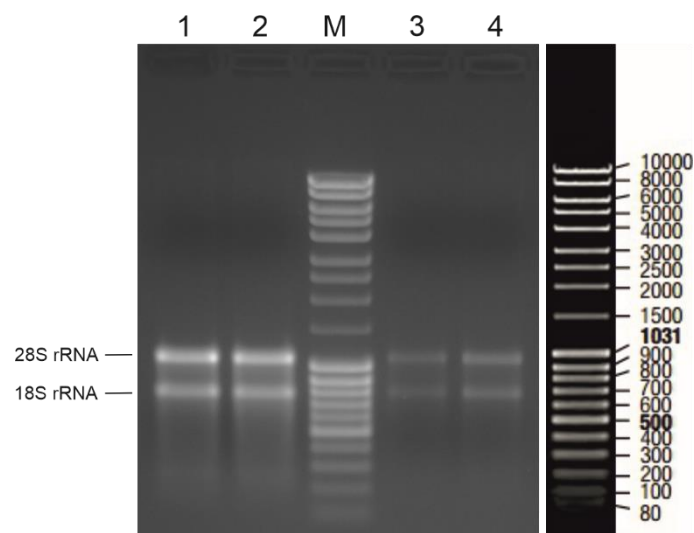
Slika 16. Shematski prikaz ljudskog proteina DRG1 te faza i pozicija introna u genima *drg1* iz odabranih predstavnika. **A** Ljudski protein DRG1 se sastoji od HTH-domene (zeleno), S5D2L-domene (crveno) i TGS-domene (žuto), pet G-motiva (ljubičasto) i dvije Switch-domene (svijetlo plavo). **B** Shematski prikaz pozicije i faze introna *drg1* gena iz predstavnika Metazoa i Protista. Pozicija introna je prikazana trokutima gdje je brojem u trokutu prikazana faza introna, pokraj trokuta je označena veličina introna. Crnim isprekidanim linijama su označeni introni koji se nalaze u istim fazama i pozicijama, nakon višestrukog poravnjanja aminokiselinskih sekvenci. Introni koji su prisutni u ljudskom genu i predstavniku Protista označeni su zvjezdicom, a introni čije su faze i pozicije očuvane od čovjeka do spužve označeni su svijetlo sivim obojenjem trokuta. Javno dostupne sekvence gena koje su korištene u ovoj analizi preuzete su iz NCBI baze genoma (engl. *NCBI's genomic database*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>).

Geni *drg1* iz spužvi *A. queenslandica* i *E. subterraneus* razlikuju se u broju introna što ukazuje na vrsnu specifičnost. Gen iz *A. queenslandica* ima deset introna, a iz *E. subterraneus* šest introna na istim pozicijama i fazama kao i introni iz spužve *A. queenslandica*. Na temelju usporedbe pozicije i faze introna gena *drg1* iz spužve *A. queenslandica* s odabranim homolozima vrsta iz drugih koljena Metazoa može se zaključiti da je pozicija i faza čak 6 introna (označeno sivim trokutima) u potpunosti očuvana kod spužve i čovjeka. Analiza sekvenci pokazuje da se jedan intron nalazi u HTH-domeni u istoj fazi i poziciji kod svih odabranih organizmima. Ljudski homolog sadrži dva introna u S5D2L-domeni koji su također prisutni u homlogu iz spužve i to u istoj poziciji i fazi. U TGS domeni nalaze se dva introna koji pokazuju visoku očuvanost kod svih odabranih predstavnika Metazoa kao i kod odabranog predstavnika Protista (*Monosiga brevicollis*, Mbr).

4.2 Izolacija RNA i sinteza cDNA iz spužve *Eunapius subterraneus*

Nakon što je detaljnom bioinformatičkom analizom pokazano da spužve posjeduju gene koji kodiraju za proteine DRG1 i DFRP1 uslijedilo je njihovo kloniranje u odgovarajuće ekspresijske vektore s ciljem biokemijskih i bioloških analiza.

Prvi korak je bila izolacija RNA iz spužve *E. subterraneus*. Uzorci izolirane RNA nanoseni su na agarozni gel kako bi im se provjerila kvaliteta i čistoća. RNA je uspješno izolirana iz spužvinih stanica kao što je prikazano na slici 17. Na gelu su jasno vidljive pruge koje odgovaraju 28S i 18S podjedinicama ribosomske RNA koje prevladavaju u uzorku ukupne RNA. Također, gel ukazuje na to da u uzorcima nema kontaminacije genomskom DNA jer bi se vidjela kao pruga velike molekulske mase, isto kao da nije došlo do raspada RNA koja bih se vidjela kao pruga niske molekulske mase. Nadalje, izmjerena je koncentracija izolirane RNA na uređaju Nanophotometer N60 (Implen). Koncentracija te vrijednosti omjera apsorbancije A260/A280 nm te A260/A230 nm prikazani su u tablici 4. Svi analizirani parametri su pokazali da je uzorak RNA pogodan za daljnje korištenje.

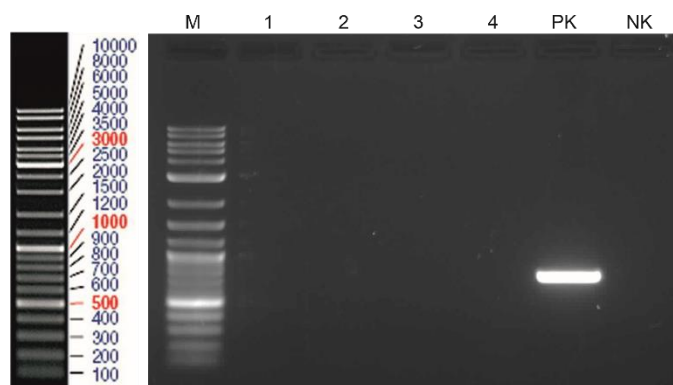


Slika 17. RNA iz spužve *E. subterraneus* razdvojena elektroforezom u agaroznom gelu. Brojevima od 1 do 4 su označeni uzorci izolirane RNA komercijalno dostupnim paketom RNeasy Mini Kit (QIAGEN), (M) MassRuler biljeg. Na slici desno su naznačene veličine pruga u biljegu MassRuler u parovima baza.

Tablica 4. Koncentracije uzoraka RNA s vrijednostima omjera absorbancije A260/A280 te A260/A230

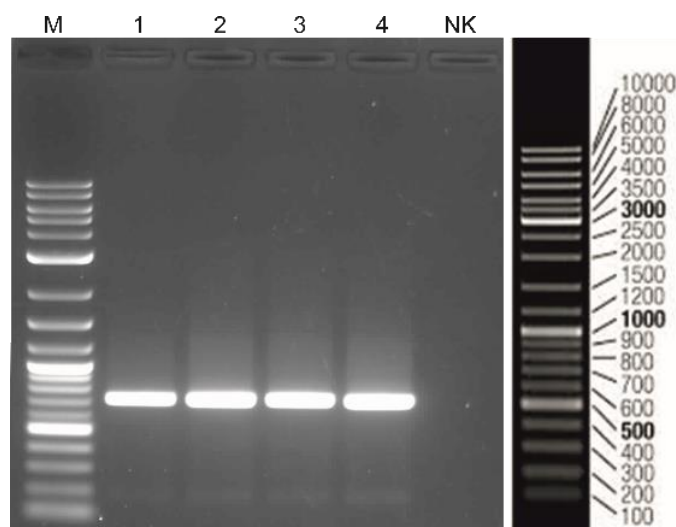
Naziv uzorka	Koncentracija RNA	A260/A280 nm	A260/A230 nm
1	50.32 ng/uL	2.215	1.406
2	51.59 ng/uL	2.168	1.352
3	26.32 ng/uL	2.215	2.570
4	35.44 ng/uL	2.105	1.143

Slijedila je sinteza cDNA pri čemu je kao kalup u reakciji korištena prethodno izolirana RNA. Kako bi se potvrdilo da u uzorku RNA nema tragova zaostale genomske DNA napravljen je PCR s početnicama za citokrom oksidazu. Rezultati PCR reakcije prikazani su na slici 18. Pozitivna kontrola (PK) je sadržavala genomsku DNA te je jasno vidljiva pruga koja molekulskom težinom odgovara umnoženom genu citokrom oksidaze (veličine 710 pb). Negativna kontrola (NK) nije sadržavala genomsku DNA te tamo nema signala koji bi odgovarao umnoženom fragmentu citokrom oksidaze. Isto tako, umnoženih fragmenata citokrom oksidaze nema ni u uzorcima izolirane RNA što dokazuje da uzorci nisu kontaminirani genomskom DNA.



Slika 18. PCR na uzorcima RNA - testiranje kontaminacije s gDNA. Od 1 do 4 su uzorci RNA nakon PCR reakcije pomoću početnica za citokrom oksidazu, (NK) negativna kontrola, (PK) pozitivna kontrola, (M) biljeg GeneRuler DNA. Na slici lijevo su naznačene veličine pruga u biljegu GeneRuler u parovima baza.

Uspješnost sinteze cDNA provjerena je PCR reakcijom pomoću početnica za citokrom oksidazu gdje je kao kalup služila novosintetizirana cDNA (slika 19.). Nakon PCR reakcije uzorci su nanoseni na agarozni gel te je vidljivo da je gen za citokrom oksidazu umnožen u svim testiranim uzorcima (1-4). Kao negativna kontrola je služila reakcija bez cDNA (NK).

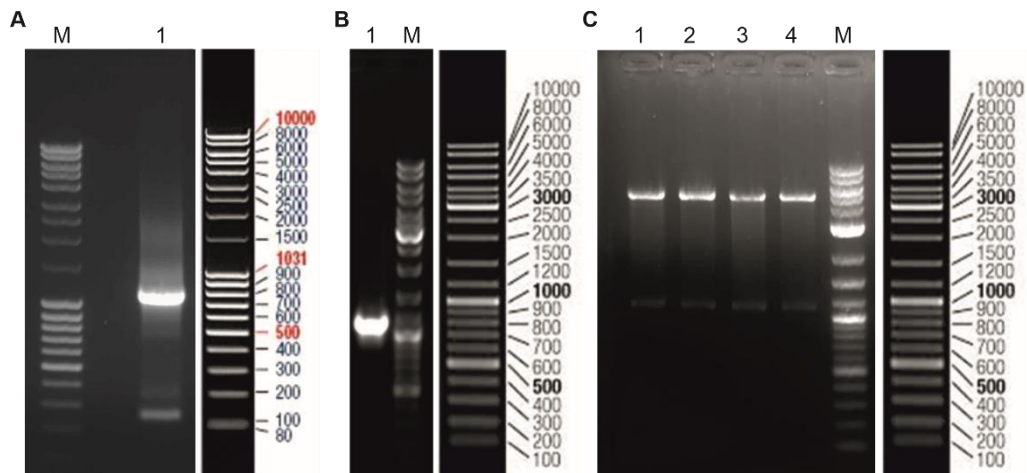


Slika 19. Testiranje uspješnosti sinteze cDNA PCR reakcijom pomoću početnica za citokrom oksidazu (od 1 do 4), (NK) negativna kontrola (M) biljeg GeneRuler DNA. Na slici desno su naznačene veličine pruga u biljegu GeneRuler u parovima baza.

4.3 Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina DRG1 i DFRP1 u bakterijama

Novosintetizirana cDNA špiljske spužvice *E. subterraneus* poslužila je kao kalup za umnažanje slijeda nukleotida koji kodira za protein DRG1 metodom PCR (slika 20.). Pri tome su korištene

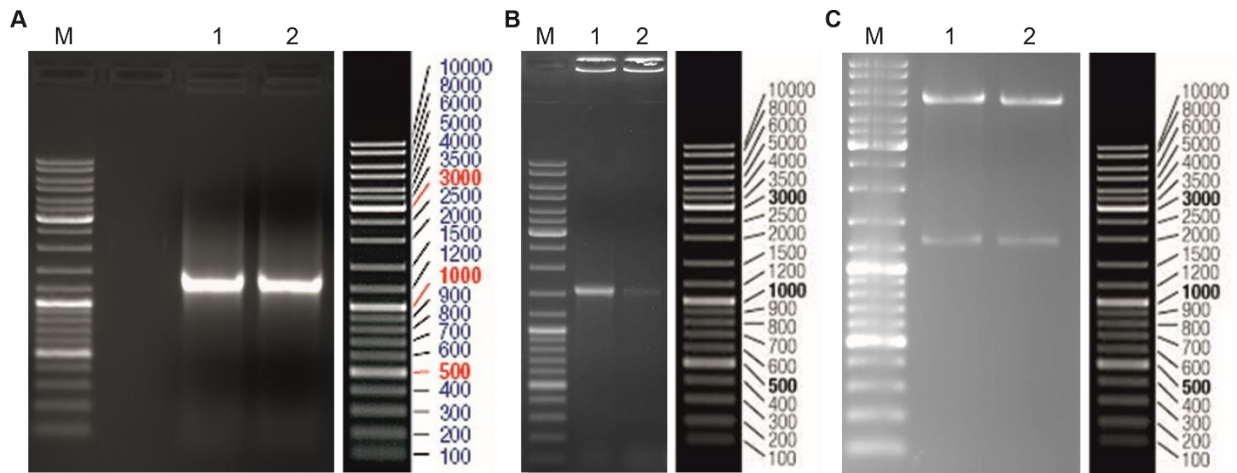
početnice dizajnirane na temelju sekvenciranog transkriptoma spužve *E. subterraneus* (slika 10.), a kojima su u svrhu ugradnje u ekspresijski vektor pET28b dodana mjesta za djelovanje restrikcijskih enzima *NdeI* i *BamHI*.



Slika 20. **A** Umnoženi cDNA fragment (1) koji kodira za DRG1 iz spužve *E. subterraneus*; **B** PCR reakcija na selektiranim kolonijama (1) korištenjem početnica T7 i T7t; **C** Razgradnja rekombinantnog plazmida pET28b (od 1 do 4), s ukloniranom cDNA koja kodira za spužvin DRG1, restrikcijskim enzimima *NdeI* i *BamHI*. Desno od svake slike naznačene su veličine pruga biljege u parovima baza: **A** MassRuler ili **B** i **C** GeneRuler.

Na isti način su dizajnirane početnice za DFRP1 s ciljem ugradnje u vektor pET28b (slika 21.). Nakon što je uspješno umnožena cDNA koja kodira za DRG1 i DFRP1 iz spužve, dobiveni fragmenti su izrezani i pročišćeni iz agaroznog gela te razgrađeni restrikcijskim endonukleazama *NdeI* i *BamHI*. Istim endonukleazama razgrađen je i vektor pET28b. Slijedila je ligacija vektora i inserta te transformacija kemijski kompetentnih bakterija ligacijskom smjesom. Budući da plazmid pET28b nosi gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin bakterije su nakon transformacije nasađene na krutu podlogu s kanamicinom kao selekcijskim markerom. Prisutnost plazmida s ukloniranim odsječkom DNA u odabranim bakterijskim kolonijama potvrđena je PCR reakcijom pomoću početnica T7 i T7t koje su komplementarne slijedovima pET28 vektora. Prisutnost pruge odgovarajuće veličine (1347 pb za EsuDRG1 i 1524 za EsuDFRP1) nakon elektroforeze PCR reakcije u agaroznom gelu dokaz je uspješne ugradnje DRG1 ili DFRP1 u vektor pET28b. Za dodatnu potvrdu uspješnosti kloniranja plazmida su izolirani iz selektiranih bakterija i razgrađeni s *NdeI* i *BamHI* restrikcijskim endonukleazama. Prisutnost dvije pruge nakon razgradnje rekombinantnih vektora, a koje svojom veličinom odgovaraju insertu i vektoru (za EsuDRG1 to su pruge veličine 1107 pb i

5330 pb, a za EsuDFRP1 pruge veličine 1284 pb i 5330 pb.) dodatni su dokaz su uspješne ugradnje cDNA za DRG1 ili DFRP1 u vektor pET28b. Uspješnost kloniranja potvrđena je i sekvenciranjem.



Slika 21. **A** Umnoženi cDNA fragment koji kodira za DFRP1 iz spužve *E. subterraneus* (1 i 2); **B** PCR na selektiranim kolonijama (1 i 2) korištenjem početnica T7 i T7t; **C** Razgradnja rekombinantnog plazmida pET28b (1 i 2), s ukloniranom cDNA koja kodira za spužvin DFRP1, restriksijskim enzimima *NdeI* i *BamHI*. Desno od svake slike su naznačene veličine pruga u bilježu GeneRuler u parovima baza.

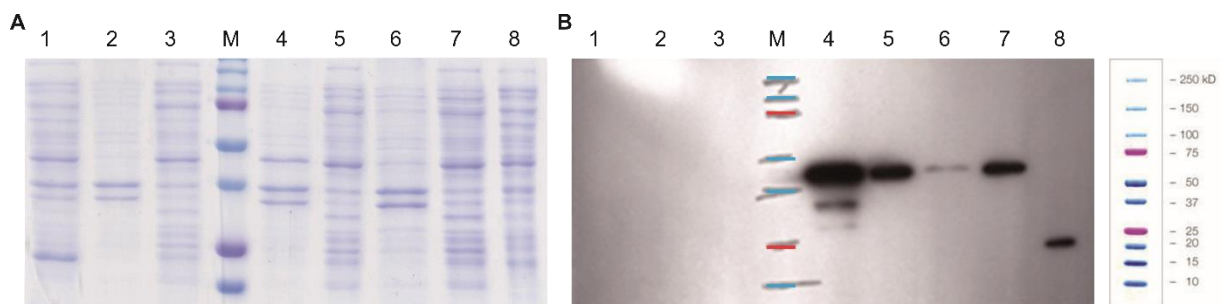
U svrhu usporedbe spužvinih proteina DRG1 i DFRP1 s ljudskim homolozima kupljen je komercijalno dostupni ljudski DRG1 cDNA klon (GenBank: BC020803; pPB-N-His; Applied Biological Materials Inc, abm). cDNA koja kodira za ljudski protein DRG1 pomoću restriksijskih enzima *NdeI* i *BamHI* izrezana je iz vektora pPB-N-His te preklonirana u ekspresijski vektor pET28b. Prekloniranje je napravljeno jer razina ekspresije proteina DRG1 iz komercijalnog vektora nakon indukcije nije bila zadovoljavajuća. S obzirom da je iz literature poznato da je za aktivnost ljudskog proteina DRG1 potreban protein DFRP1, naručen je i cDNA klon ljudskog DFRP1 (GenBank: NM_018471.2) proizvođača Sino Biological, koji je uspješno prekloniran u ekspresijski vektor pET28b. Uspješnost kloniranja potvrđena je sekvenciranjem.

4.4 Biokemijska karakterizacija proteina DRG1

4.4.1 Prekomjerna ekspresija proteina DRG1 i DFRP1

U svrhu biokemijske karakterizacije spužvinog proteina DRG1 i usporedbe s ljudskim homologom proizvedeni su rekombinantni proteini EsuDRG1 i HsaDRG1. S obzirom da je iz literature poznato da je za aktivnost ljudskog proteina DRG1 potreban protein DFRP1 proizvedeni su i rekombinantni proteini EsuDFRP1 i HsaDFRP1. Svi navedeni proteini uklonirani su u ekspresijski vektor pET28b na način da im je na N-terminalni kraj dodan heksahistidinski privjesak kako bi se mogli pročistiti afinitetnom kromatografijom. Plazmidi koji su nosili željeni insert su kemijskom transformacijom uneseni u ekspresijske bakterijske sojeve Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS (EsuDRG1 i HsaDFRP1) te soj BL21-CodonPlus (HsaDRG1 i EsuDFRP1). Navedeni sojevi su pogodni su za proizvodnju proteina iz ciljnih gena kloniranih u vektor pET indukcijom s IPTG-om.

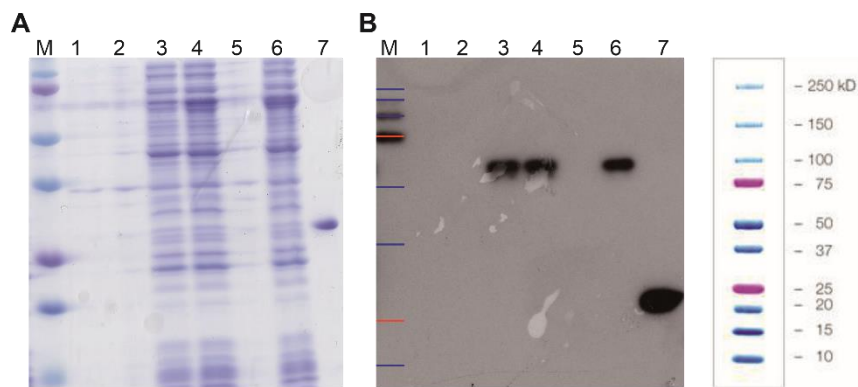
U svrhu utvrđivanja optimalnih uvjeta ekspresije ljudskih i spužvinih proteina DRG1 i DFRP1, u ekspresijskom soju *E.coli*, napravljena je indukcija proteina u malom volumenu sa uzgojem u hranjivom mediju TB, u dva standardizirana uvjeta uzgoja. Prvi uzgoj je trajao 3 sata na 30 °C, s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.8 mM, a drugi preko noći na 16 °C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.1 mM. Nakon indukcije izvršena je analiza proteinskog profila induciranih i neinduciranih bakterija gel elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu (slika 22. i slika 23.).



Slika 22. Prekomjerna ekspresije proteina DRG1 u malom volumenu. **A** Bakterije su uzgajane 3 sata na 30°C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.8 mM i 16 sati na 16°C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.1 mM. **1** bakterija Rosetta-gami 2(DE3) pLysS bez plazmida, **2** talog bakterija prije indukcije, **3** supernatant prije indukcije, **M** biljeg Precision Plus Protein Dual Color Standards, **4** talog nakon indukcije na 30°C, **5** supernatant nakon indukcije 30°C, **6** talog nakon indukcije na 16°C, **7** supernatant nakon indukcije na 16°C, **8** pozitivna kontrola westernske metode otiska koja sadrži RRas2-His protein **B** Westernskom metodom otiska

provjerena je uspješnost prekomjerne ekspresije proteina DRG1. Ekspozicija je trajala 15 sekundi. **1** bakterija Rosetta-gami 2(DE3) pLysS bez plazmida, **2** talog bakterija prije indukcije, **3** supernatant prije indukcije, **M** biljeg Precision Plus Protein Dual Color Standards, **4** talog nakon indukcije na 30°C, **5** supernatant nakon indukcije na 30°C, **6** talog nakon indukcije na 16°C, **7** supernatant nakon indukcije na 16°C, **8** pozitivna kontrola westernske metode otiska koja sadrži RRas2-His protein. Na slici desno su naznačene molekulske težine pruga u biljegu Precision Plus Protein Standards.

Utvrđeno je da se najveći udio eksprimiranih proteina nalazi u topivoj frakciji (slika 22. B7 i slika 23. B6) prilikom uzgoja u hranjivom mediju TB na 16°C preko noći i pri konačnoj koncentraciji IPTG-a 0.1 mM. Nadalje, prilikom analize topivih i netopivih frakcija westernskom metodom otiska primijećeno je da se dio eksprimirani proteina nalazi i u netopivim inkluzijskim tijelima (slika 22. B4, B6 i slika 23. B3).



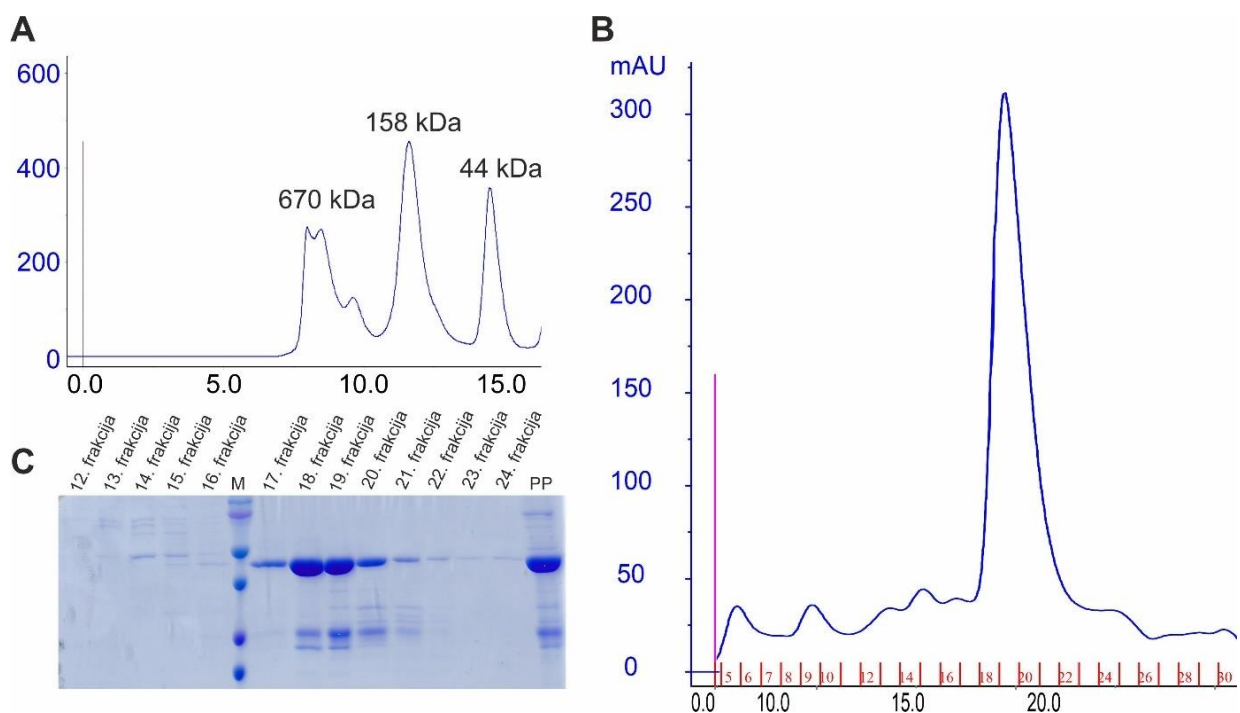
Slika 23. Prekomjerna ekspresije proteina DFRP1 u malom volumenu. **A** Bakterije su uzgajane 3 sata na 30°C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.8 mM i 16 sati na 16°C s konačnom koncentracijom IPTG-a 0.1 mM. **M** biljeg Precision Plus Protein Dual Color Standards, **1** bakterija Rosetta-gami 2(DE3) pLysS bez plazmida, **2** talog i supernatant bakterija prije indukcije, **3** talog nakon indukcije na 30°C, **4** supernatant nakon indukcije na 30°C, **5** talog nakon indukcije 16°C, **6** supernatant nakon indukcije na 16°C, **7** pozitivna kontrola westernske metode otiska koja sadrži RRas2-His protein. **B** Westernskom metodom otiska provjerena je uspješnost prekomjerne ekspresije proteina DFRP1. Ekspozicija je trajala 15 sekundi. **M** biljeg Precision Plus Protein Dual Color Standards, **1** bakterija Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS bez plazmida, **2** talog i supernatant bakterija prije indukcije, **3** talog nakon indukcije na 30°C, **4** supernatant nakon indukcije na 30°C, **5** talog nakon indukcije 16°C, **6** supernatant nakon indukcije na 16°C, **7** pozitivna kontrola westernske metode otiska koja sadrži RRas2-His

protein. Na slici desno su naznačene molekulske težine pruga u bilježu Precision Plus Protein Standards.

4.4.2 Proizvodnja i pročišćavanje rekombinantnih proteina

Prema optimalnim uvjetima utvrđenim indukcijom u malom volumenu proizvedeni su i izolirani proteini EsuDRG1-His, EsuDFRP1-His, HsaDRG1-His i HsaDFRP1-His koji su korišteni u daljnjim pokusima. Prilikom izolacije proteina, osim lizozima i inhibitora proteaza, bakterijskoj suspenziji je dodana i benzonaza kako bi se dodatno razgradile nukleinske kiseline u uzorku. Ekspimirani proteini su pročišćeni afinitetnom kromatografijom na TALON agarozu koja specifično veže proteine koji nose histidinski privjesak.

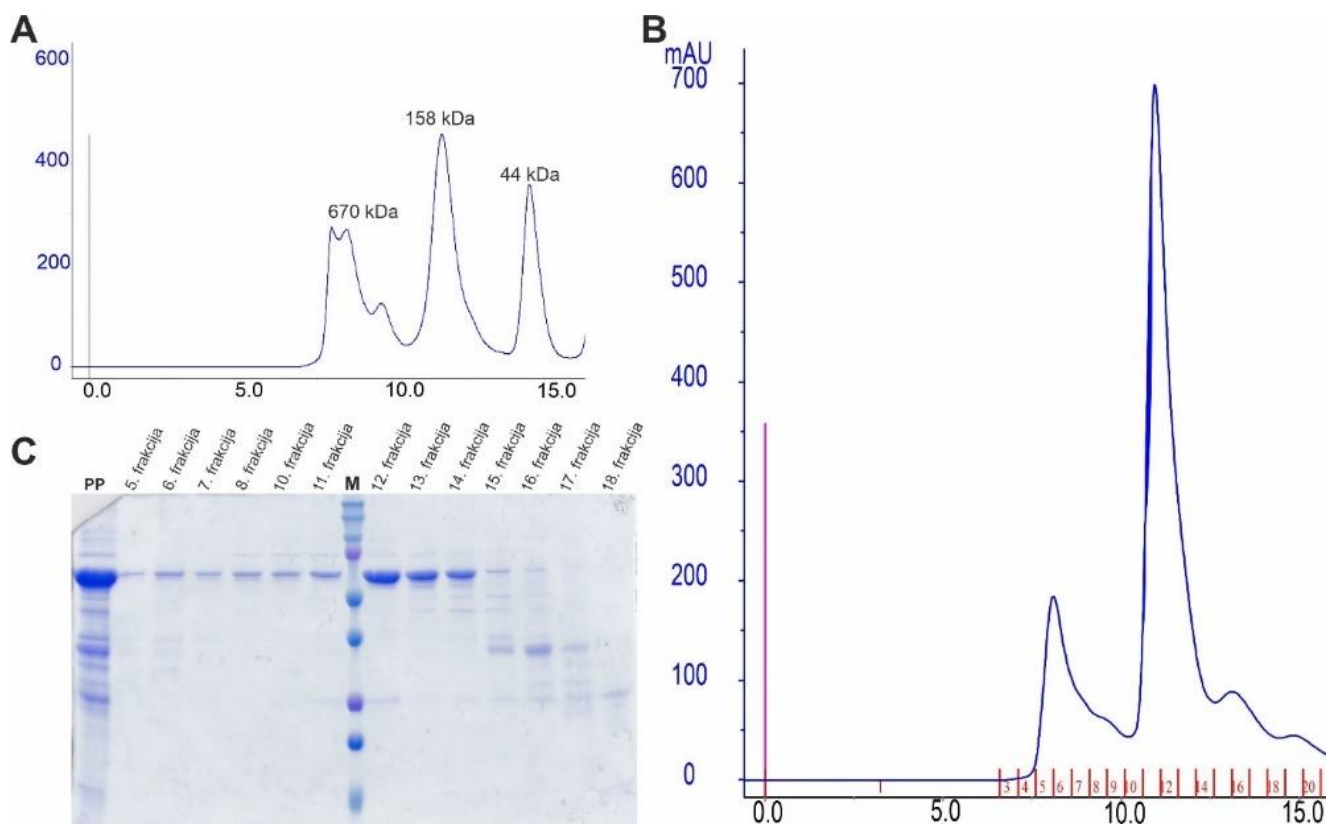
Slijedilo je dodatno pročišćavanje proteina gel filtracijom kako bi se uklonile zaostale nečistoće u uzorku, kao i proteini koji nisu od interesa. Metoda gel filtracije je provedena kao servisna usluga u BIOCentru u Zagrebu. Tijek i uspješnost pročišćavanja praćen je na kromatogramu nakon čega je slijedila analiza eluiranih frakcija elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu (slika 24. i slika 25.). Prilikom pročišćavanja uzoraka gel filtracijom uočeno je da ljudski i spužvini proteini DRG1 izlaze u frakciji koja prema proteinskom standardu odgovara molekulske težini od 43 kDa odnosno monomeru proteina DRG1 (slika 24.).



Slika 24. Pročišćavanje spužvinog proteina DRG1 gel filtracijom. **A** Kromatogram proteinskih standarda korištenih za kalibraciju kolone. Kao standardi korišteni su tireoglobulin (670 kDa), gama-globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa). **B** Kromatogram proteina DRG1 dobiven gel-

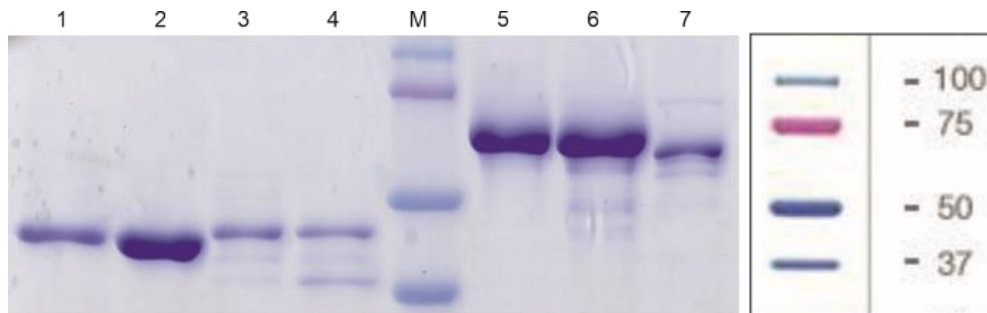
filtracijom na SuperdexTM 30 Increase 10/300 GL koloni, gdje su crvenom bojom označene sakupljene frakcije. **C** Analiza odabranih frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu. Redoslijed nanošenja frakcija na gel označen je brojevima iznad slike gela. (PP) je nepročišćeni uzorak koji je služio kao kontrola pročišćavanja, a (M) proteinski biljeg.

Prilikom pročišćavanja proteina DFRP1 uočeno je da proteini izlaze u frakcijama koje prema proteinskom standardu odgovaraju molekularnoj težini (slika 25. A) oko 158 kDa, što je prva indicacija da protein DFRP1 tvori homooligomere budući da je monomer proteina DFRP1 50.27 kDa.



Slika 25. Pročišćavanje spužvinog proteina DFRP1 gel filtracijom. **A** Kromatogram proteinskih standarda korištenih za kalibraciju kolone. Kao standardi korišteni su tireoglobulin (670 kDa), gama-globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa). **B** Kromatogram proteina DFRP1 dobiven gel-filtracijom na SuperdexTM 30 Increase 10/300 GL koloni, gdje su crvenom bojom označene sakupljene frakcije. **C** Analiza odabranih frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu. Redoslijed nanošenja frakcija na gel označen je brojevima iznad slike gela. (PP) je nepročišćeni uzorak koji je služio kao kontrola pročišćavanja, a (M) proteinski biljeg.

Analiza pročišćenih i ukoncentriranih proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu pokazala je da su rekombinantni proteini EsuDRG1-His, HsaDRG1-His, EsuDFRP1-His i HsaDFRP1-His uspješno izolirani i pročišćeni (slika 26.).

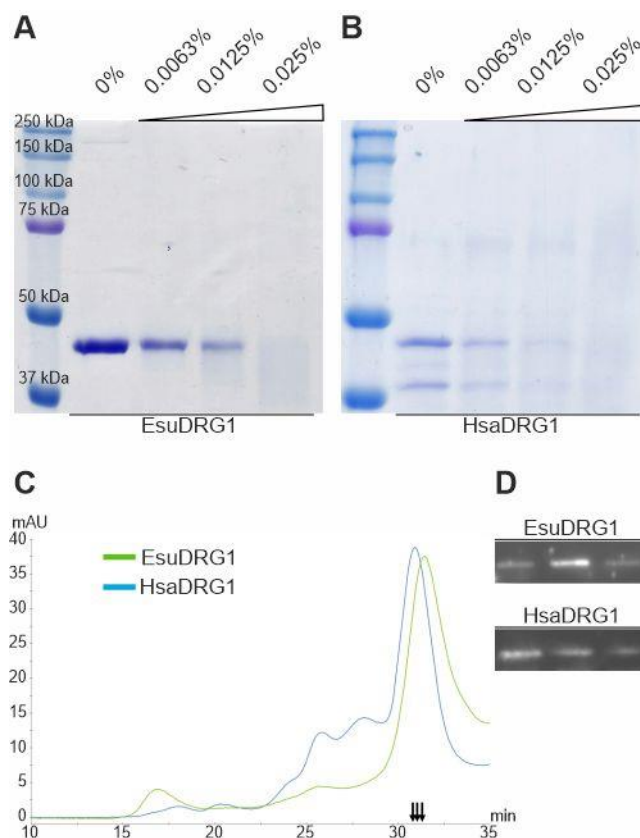


Slika 26. Pročišćene i ukoncentrirane frakcije proteina EsuDRG1-His, HsaDRG1-His, EsuDFRP1-His i HsaDFRP1-His. Na SDS-poliakrilamidni gel nanoseni su redom: **1 i 2** EsuDRG1-His, **3 i 4** HsaDRG1-His, **5 i 6** EsuDFRP1-His te **7** HsaDFRP1-His. (M) označava proteinski biljeg Precision Plus Protein Standards, a slici desno su naznačene molekulske težine pruga u biljegu.

4.4.3 Kvaterna struktura proteina DRG1

S ciljem biokemijske karakterizacije proteina EsuDRG1 prvo je analizirana njegova kvaterna struktura. U tu svrhu korišten je test unakrsnog vezanja s glutaraldehidom, a dobiveni rezultati su dodatno potvrđeni i gel filtracijom. Ljudski protein DRG1 je služio za usporedbu budući da je iz literature poznato da se on nalazi u formi monomera i da tvori kompleks s proteinom DFRP1.

SDS-PAGE analiza koja je uslijedila nakon reakcije unakrsnog vezanja proteina EsuDRG1 s glutaraldehidom je potvrdila da se spužvin protein DRG1 nalazi u formi monomera (slika 27. A). Isti rezultat je uočen u pokusu u kojem je korišten ljudski DRG1 protein (slika 27. B). Monomerno stanje ljudskog i spužvinog proteina DRG1 je dodatno potvrđeno gel filtracijom. Na kromatogramu je vidljiv dominantni vrh krivulje u (slika 27. C) retencijskom vremenu karakterističnom za monomer veličine 44 kDa. Retencijsko vrijeme je određeno prema proteinskim standardima. Westernska metoda otiska odabranih frakcija nakon gel filtracije potvrdila je da su dominantni pikovi na kromatogramu doista DRG1 protein (slika 27. D).

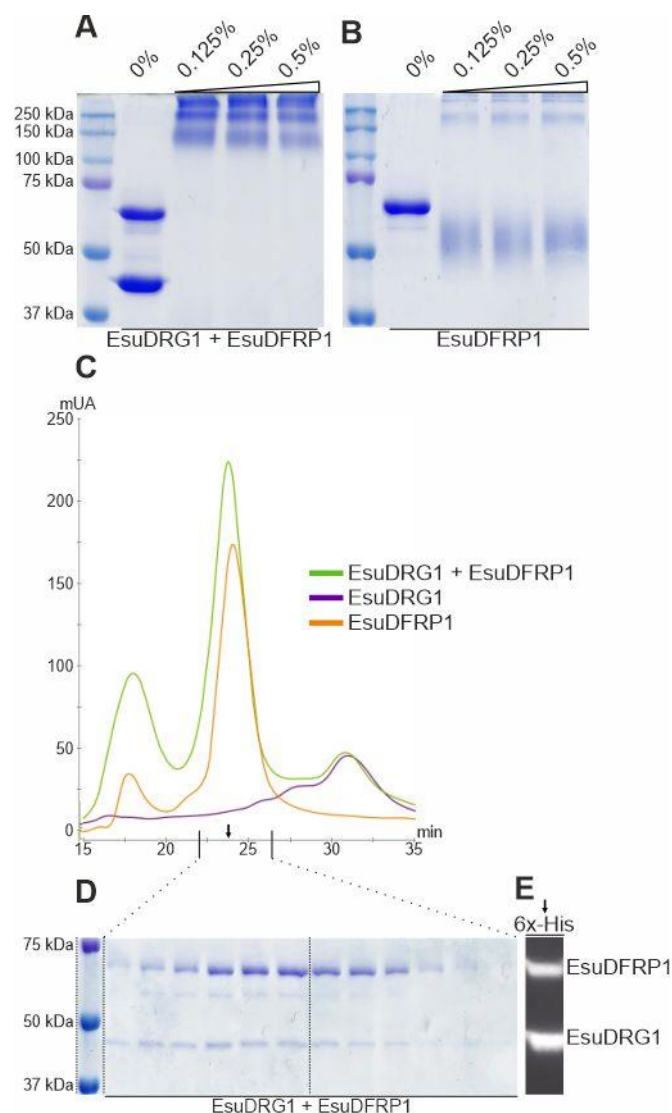


Slika 27. Protein DRG1 iz spužve i čovjeka nalaze se isključivo u formi monomera. Unakrsno vezivanje proteina EsuDRG1 (A) i HsaDRG1 s glutaralhidom (B). Proteini su inkubirani s rastućim koncentracijama glutaralhida 5 minuta na 25 °C. (C) Gel filtracija je provedena nanošenjem pročišćenih rekombinantnih proteina EsuDRG1 (zeleno) i HsaDRG1 (plavo) na Superdex 200 Increase 10/300 GL kolonu, koja je prethodno kalibrirana serijom proteinskih standarda. (D) Westernskom metodom otiska analizirane su odabrane frakcije (označeno strelicama) s anti-His antitijelima.

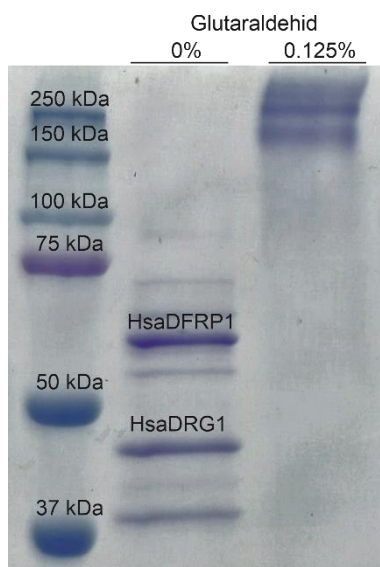
Nakon potvrde da se DRG1 nalazi u formi monomera, napravljen je test unakrsnog vezanja s glutaralhidom u kojem je reakcijska smjesa sadržavala ekvimolarnu količinu spužvinih proteina DRG1 i DFRP1. SDS-PAGE analiza otkrila je samo pruge visoke molekulske težine (>130 kDa) što ukazuje da EsuDRG1 doista tvori komplekse s EsuDFRP1 (slika 28. A). Sličan rezultat uočen je za smjesu rekombinantnih proteina HsaDRG1 i HsaDFRP1 (slika 29.).

Budući da je molekulska težina EsuDRG1 proteina 42 kDa, a EsuDFRP1 proteina 50 kDa bilo je za očekivati da će molekulska težina kompleksa ta dva proteina biti oko 92 kDa ako je njihov odnos 1:1. Formiranje kompleksa veće molekulske težine od očekivane može ukazivati na prisustvo više od dva monomera. S ciljem detaljnijeg uvida u razinu oligomerizacije napravljena je gel-filtracija kompleksa EsuDRG1:EsuDFRP1. Analizom kromatograma uočen

je dominantni vrh u retencijskom vremenu 23.27 minuta što odgovara molekularnoj veličini 184 kDa. To bi značilo da kompleks DRG1:DFRP1 sadrži u sebi 4 do 5 monomera (slika 28. C) SDS-PAGE dominantnog kromatogramskog vrha pokazala je da omjer proteina DRG1:DFRP1 u dobivenom kompleksu može biti 1:3 ili 1:4, ali ne 1:1 kako se ranije pretpostavljalo (Pérez-Arellano i sur., 2013). Westernska metoda otiska istih uzoraka je potvrdila da su dvije pruge na gelu doista DRG1 i DFRP1 te da su eluirani u istoj frakciji. Kako bi se dodatno razjasnio ovaj rezultat, napravljen je test umrežavanja s glutaraldehydom za EsuDFRP1 i pokazano je da DFRP1 sam tvori oligomere (slika 28. B), a gel filtracija je pokazala da DFRP1 postoji pretežno kao tetramer (slika 28. C). Također se pokušalo usporediti formiranje kompleksa HsaDRG1:HsaDFRP1, ali HsaDFRP1 nije bilo moguće dobiti u odgovarajućoj količini i kvaliteti za analizu gel filtracijom. Umjesto toga je kao vezni partner ljudskom DRG1 proteinu korišten spužvin protein DFRP1. Gel filtracija smjese HsaDRG1 i EsuDFRP1 dala je gotovo isti omjer monomera 1:3 ili 1:4 HsaDRG1:EsuDFRP1 u formiranom kompleksu te pokazala visoku evolucijsku sačuvanost proteina DRG1 od spužve do čovjeka.



Slika 28. Spužvini proteini DRG1 i DFRP1 tvore heterooligomere. Unakrsno vezanje proteina EsuDRG1 i EsuDFRP1 (**A**) i samog proteina EsuDFRP1 s glutaralhidom (**B**). Proteini su inkubirani s rastućim koncentracijama glutaralhida kao što je naznačeno na slici. Reakcije su inkubirane 30 minuta na 25 °C. (**C**) Gel filtracija proteina EsuDGR1 (ljubičasta linija), proteina EsuDFRP1 (narančasta linija) te smjese proteina EsuDRG1 i EsuDFRP1 (zelena linija). (**D**) Odabrane frakcije potencijalnog kompleksa DRG1 i DFRP1 (u retencijskom vremenu 22-26 minuta) su analizirane bojanjem s Coomassie briljantnim modrilom. (**E**) Westernska metoda otiska odabranih frakcija kompleksa EsuDRG1:EsuDFRP1 (naznačeno strelicom) s anti-His antitijelima.

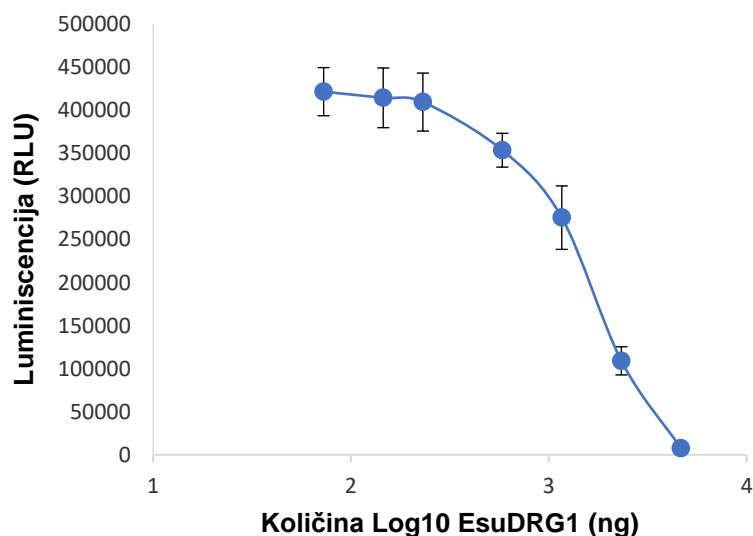


Slika 29. Ljudski proteini DRG1 i DFRP1 tvore heterooligomere. Unakrsno vezanje ljudskog proteina DRG1 i DFRP1 s glutaralhidom. Glutaralhid je dodan u reakciju u konačnoj koncentraciji 0.125%. Reakcija je inkubirana 30 minuta na 25 °C.

4.4.4 GTPazna aktivnost proteina DRG1

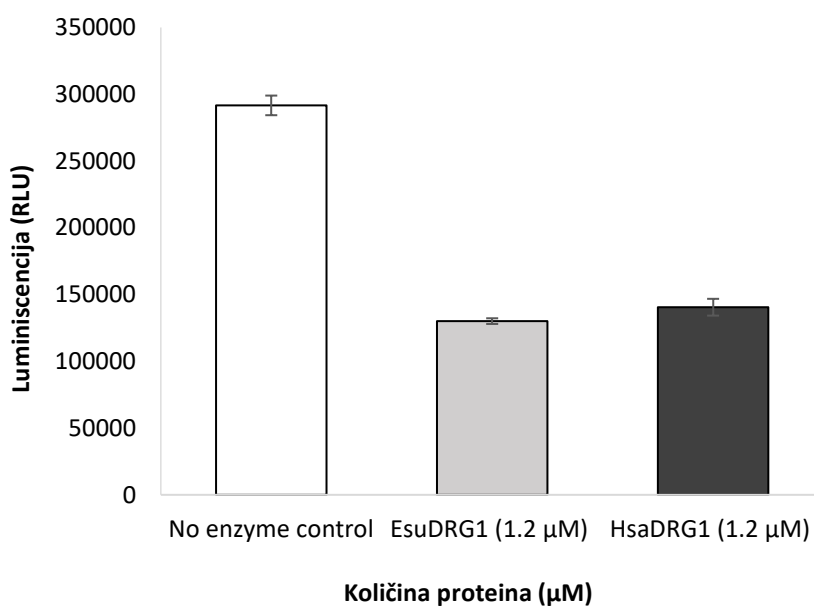
Od ranije je poznato da protein DRG1 iz drugih organizama posjeduje intrinzičnu sposobnost vezanja i hidrolize molekule gvanozin-trifosfata (GTP) koja se pojačava nakon formiranja kompleksa DRG1:DFRP1 (Pérez-Arellano i sur., 2013). Kako bi se provjerilo ima li spužvin protein DRG1 istu sposobnost, napravljen je test hidrolize GTPa. Prvi korak bila je optimizacija koncentracije GTP-a u reakciji. Serijskim razrjeđenjima GTP-a počevši od 5 μ M dodavana je ista količina spužvinog proteina DRG1. Mjerenjem luminiscencije nakon GTPazne reakcije zaključeno je da je optimalna koncentracija GTP-a u reakciji 2 μ M.

Kako bi se provjerilo ima li EsuDRG1 intrinzičnu GTPaznu aktivnost, serijska razrjeđenja proteina EsuDRG1 inkubirana su s 2 μ M GTP-a. Mjerenjem luminiscencije nakon dva sata primijećeno je smanjenje signala u korelaciji s povećanjem koncentracije EsuDRG1. Ovaj rezultat potvrđuje da protein EsuDRG1 ima intrinzičnu GTPaznu aktivnost (slika 30.).



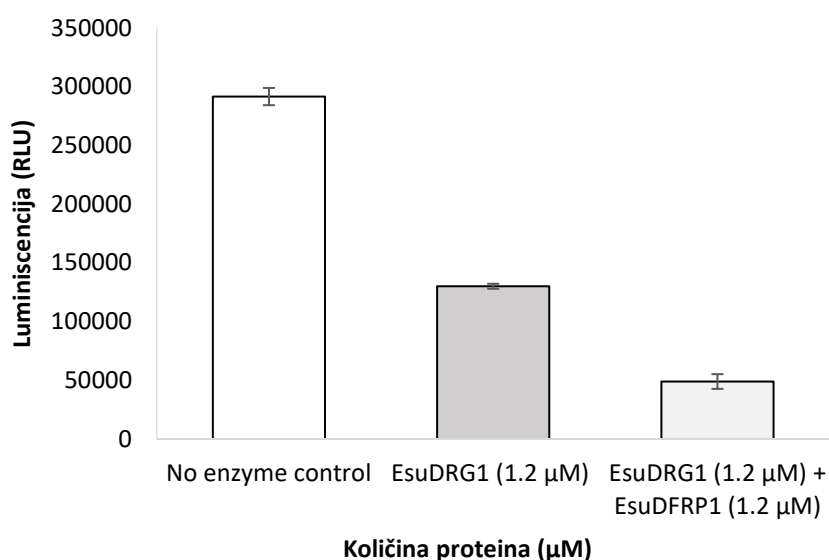
Slika 30. Spužvin protein DRG1 ima intrinzičnu GTPaznu aktivnost. Serijska razrjeđenja EsuDRG1 proteina u GTPase/GAP puferu su inkubirana s fiksnim koncentracijama GTP-a ($2 \mu\text{M}$) dva sata nakon čega je mjerena luminiscencija. Standardna devijacija je naznačena na krivulji (prosjek \pm SD, $n = 3$). RLU (engl. *relative light unit*).

Nadalje, usporedbom intrinzične GTPazne aktivnosti ljudskog i spužvinog proteina DRG1 (slika 31.) pokazano je da im je aktivnost slična što je indicacija da je GTPazna aktivnost proteina DRG1 evolucijski očuvana od spužve do čovjeka.



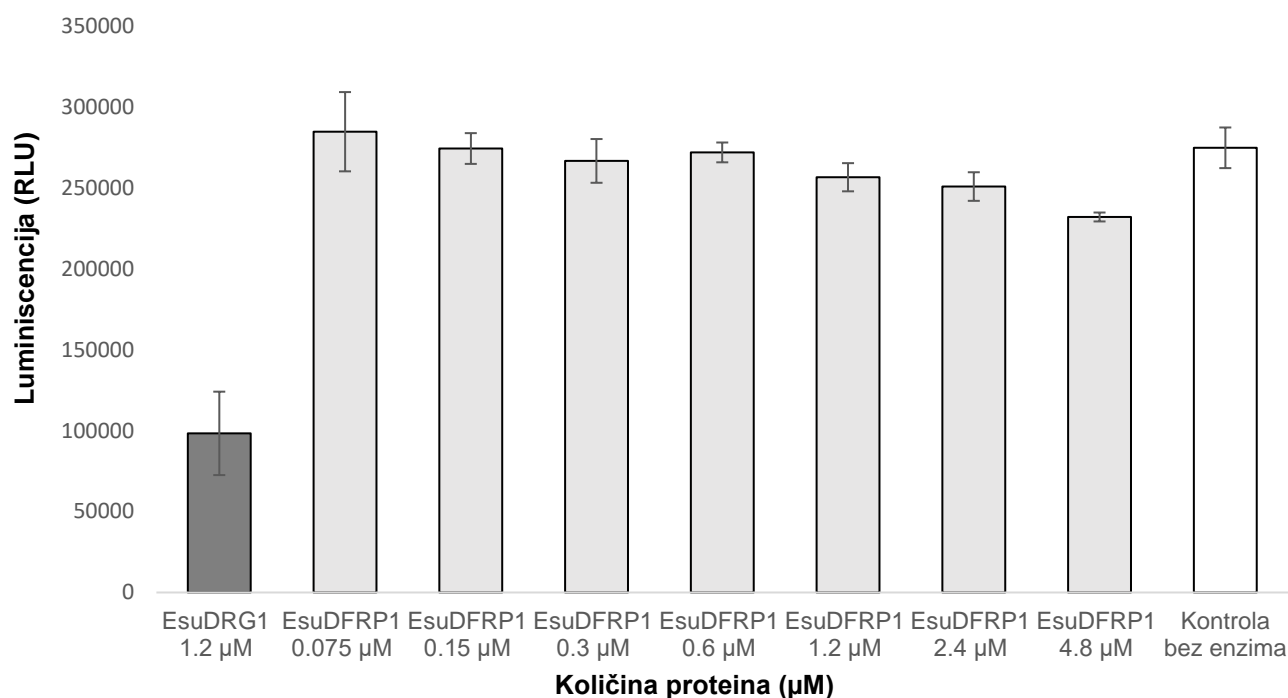
Slika 31. Intrinzična GTPazna aktivnost spužvinog i ljudskog proteina DRG1. Koncentracija svakog proteina u reakciji je $1.2 \mu\text{M}$. Kontrola sadrži samo GTP/GAP pufer. RLU (engl. *relative light unit*). Standardna devijacija je naznačena na stupiću (prosjek \pm SD, $n = 3$).

Kako bi se dokazalo da se katalitička aktivnost proteina EsuDRG1 pojačava uz prisutnost njegovog partnera EsuDFRP1, napravljena je reakcija s ekvimolarnim količinama oba proteina te je očitana luminiscencija. Dobiveni rezultat je pokazao da je GTPazna aktivnost proteina EsuDRG1 2.5 puta veća kada je u reakciji bio i EsuDFRP1 protein u odnosu na reakciju u kojoj je samo EsuDRG1 (slika 32.). Ova karakteristika je također uočena i u drugim organizmima što ide u prilog očuvanoj funkciji proteina DRG1 od spužve do čovjeka.



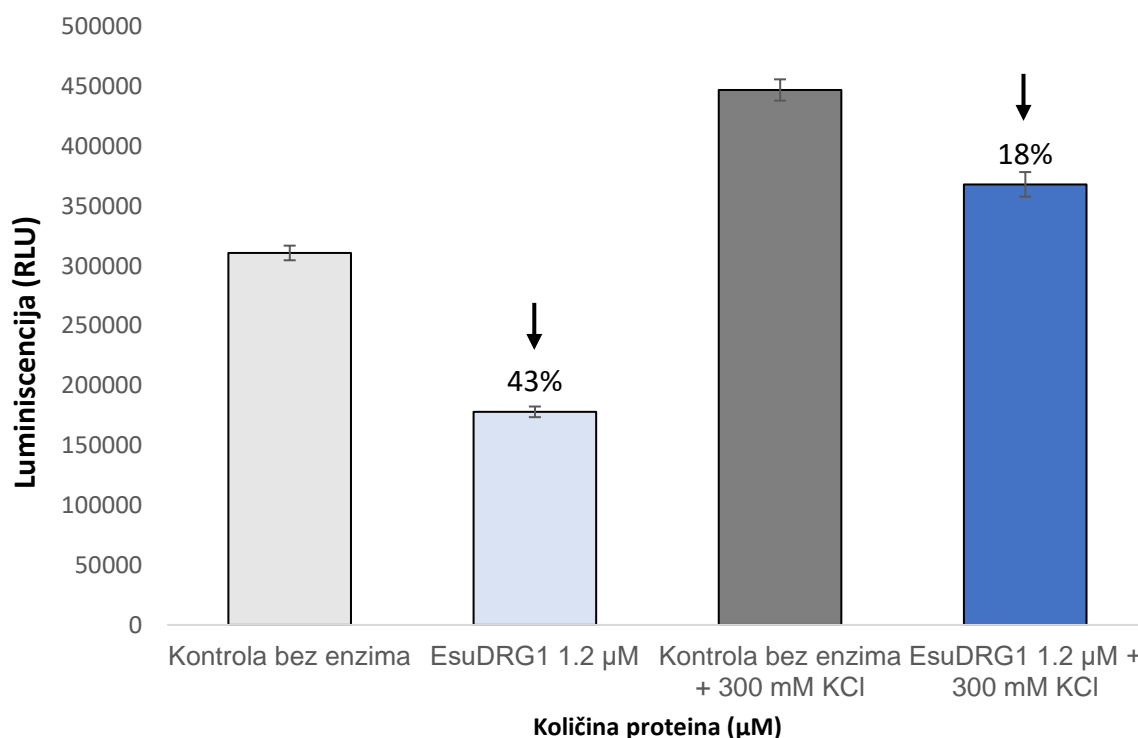
Slika 32. DFRP1 povećava katalitičku aktivnost spužvinog proteina DRG1. Koncentracija svakog proteina korištenog u reakciji je 1.2 μM. Kontrola sadrži samo GTPase/GAP puffer. Standardna devijacija je naznačena na stupiću (prosjeak ± SD, n = 3). RLU (engl. *relative light unit*).

Kako bi se potvrdilo da je dobiveni rezultat uistinu posljedica vezanja EsuDRG1 s EsuDFRP1, analizirana je GTPazna aktivnost proteina EsuDFRP1. S obzirom da protein EsuDFRP1 ne posjeduje G-domenu ne bi trebao imati sposobnost vezanja i hidrolize GTP-a. Nakon inkubacije serijskih razrjeđenja proteina EsuDFRP1 s 2 μM GTP-a, primijećeno je da signal luminiscencije u svim uzorcima ostaje na razini kontrole koja sadrži samo GTPase/GAP puffer bez dodanog proteina. Ovaj rezultat potvrđuje da protein EsuDFRP1 nema GTPaznu aktivnost, te da je pojačana GTPazna aktivnost proteina DRG1 koja je uočena nakon formiranja kompleksa DRG1:DFRP1 posljedica njihove interakcije.



Slika 33. Analiza GTPazne aktivnosti spužvinog proteina DFRP1 (svijetlo sivo). Serijski razrijeđivan protein EsuDFRP1 u puferu GTPase/GAP se inkubirao s fiksnim koncentracijama GTP-a (2 µM) dva sata nakon čega je mjerena luminiscencija. Kao pozitivna kontrola služio je spužvin protein DRG1 (tamno sivo), a negativna kontrola sadrži samo GTPase/GAP pufer bez proteina. Standardna devijacija je naznačena na stupiću (prosjek ± SD, n = 3). RLU (engl. *relative light unit*).

Iz literature je poznato da se aktivnost proteina ljudskog DRG1 povećava dodatkom kalijevih iona (Pérez-Arellano i sur., 2013). Kako bi se utvrdilo pojačavaju li kalijevi ioni GTPaznu aktivnost spužvinog proteina DRG1 napravljen je GTPazni test uz dodatak 300 mM KCl. Reakcija bez KCl služila je za usporedbu. Primijećeno je da KCl u reakciji uzrokuje smanjenje GTPazne aktivnosti spužvinog proteina DRG1 kao i povećanu luminiscenciju same kontrole bez proteina. Udio hidroliziranog GTP-a u reakcijskoj smjesi kojoj nije dodan KCl je iznosila 43%, dok je u reakcijskoj smjesi s dodatkom KCl hidrolizirano samo 18% GTP-a što je smanjenje GTPazne aktivnosti proteina DRG1 od 25% (slika 34.). Isto je primijećeno i za ljudski protein DRG1. Ovaj rezultat je suprotan od očekivanog i može se objasniti nekompatibilnošću pufera GTPase/GAP iz komercijalno dostupnog kompleta GTP Glo Kit (Promega) s KCl.

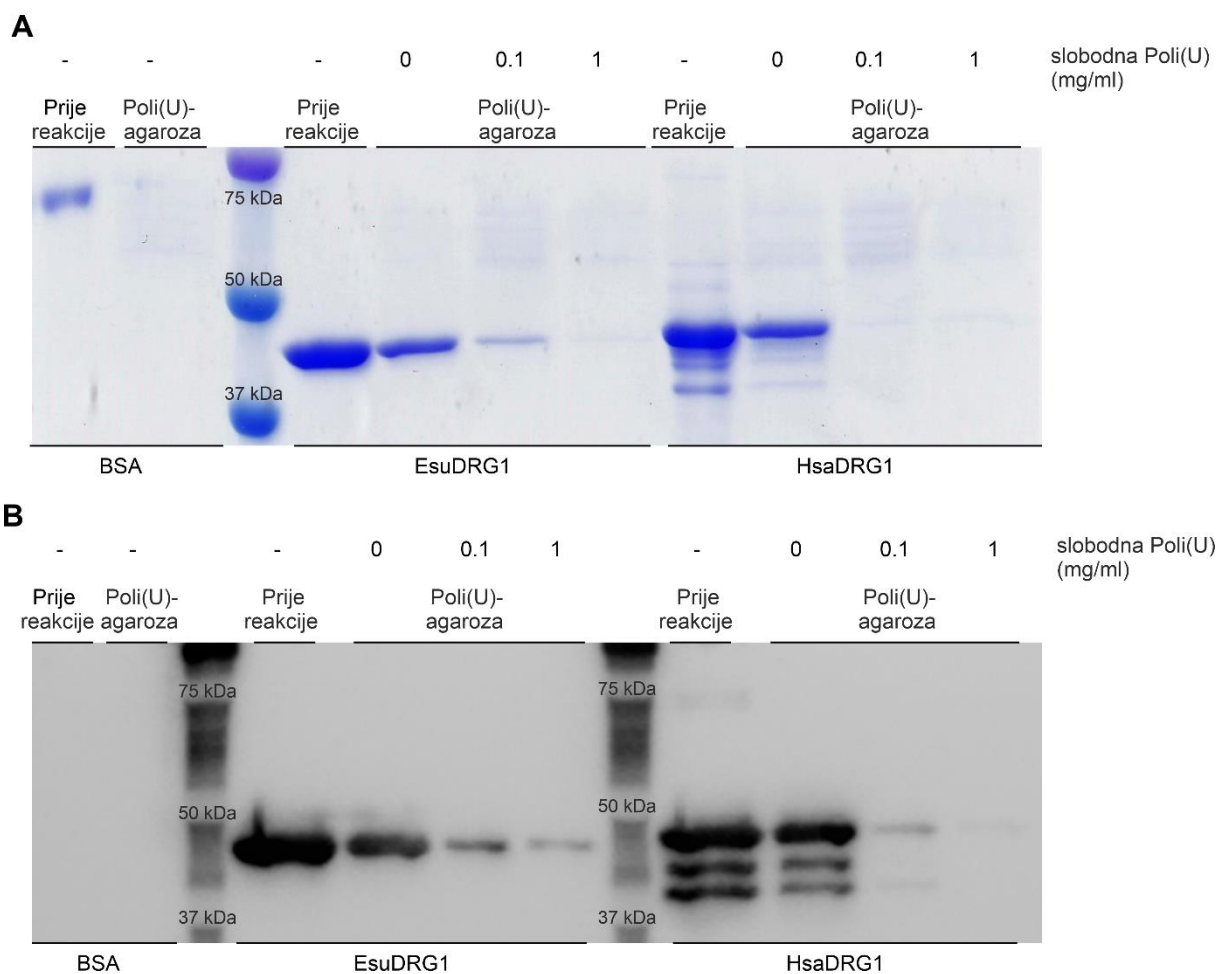


Slika 34. Utjecaj KCl na GTPaznu aktivnost EsuDRG1 proteina. Reakcija bez KCl je sadržavala EsuDRG1 koncentracije 1.2 µM (svijetlo plava boja). Udio hidroliziranog GTP-a u reakciji bez dodanog KCl izračunat je s obzirom na luminiscenciju GTPase/GAP pufera bez enzima (svijetlo siva boja). Reakcija s KCl je sadržavala 300 mM KCl i 1.2 µM EsuDRG1 (tamno plava boja). Udio hidroliziranog GTP-a u reakciji izračunat je s obzirom na luminiscenciju GTPase/GAP pufera bez enzima kojem je dodan 300mM KCl (tamno siva boja). Nakon dodatka KCl u reakciju primijećeno je smanjenje GTPazne aktivnosti DRG1 proteina. Standardna devijacija je naznačena na stupiću (prosjeak ± SD, n = 3). RLU (engl. *relative light unit*).

4.4.5 Vezanje proteina DRG1 na RNA

Budući da je od ranije poznato da protein DRG1 iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) i žabe (*Xenopus laevis*) nespecifično veže RNA (Ishikawa i sur., 2003; Francis, 2012) provjereno je ima li spužvin DRG1 protein istu sposobnost. Za testiranje vezanja DRG1 na RNA korištena je poli(U) agarozna kao što je prethodno opisano (Ishikawa i sur., 2003). Rezultati pokazuju da se EsuDRG1 veže na poli(U) agarozu, dok se BSA, koja je služila kao negativna kontrola, ne veže. Kako bi se vidjelo je li vezanje specifično za RNA, korišten je slobodni poli(U) kao vezni kompetitor. Postupno povećanje koncentracija slobodnog poli(U) prije dodavanja poli(U) agaroze rezultiralo je smanjenjem vezanja proteina DRG1 na poli(U) agarozu ovisno o dozi.

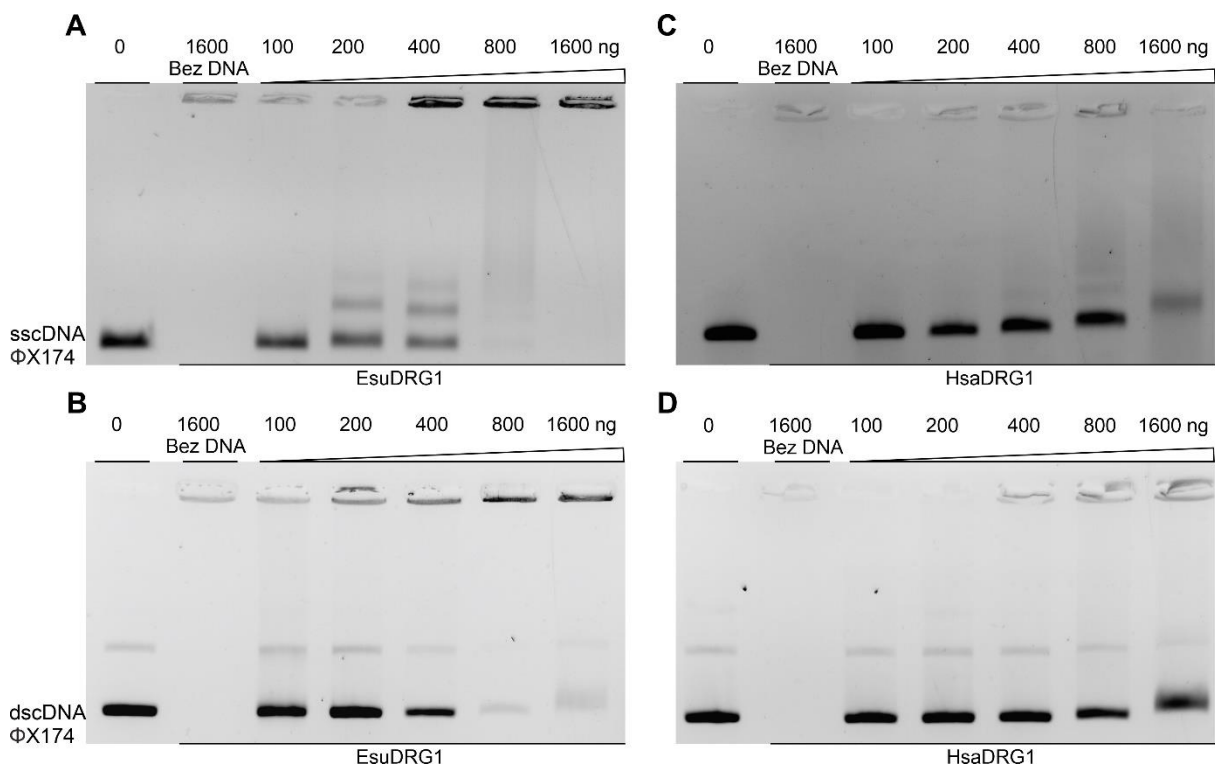
Rezultat je posljedica saturacije veznog mjesta na proteinu DRG1 slobodnim poli(U) što onemogućava da se DRG1 veže na poli(U) agarozu. Ljudski protein DRG1, koji smo koristili za usporedbu, pokazao je isti uzorak vezivanja. Ovaj rezultat potvrđuje da protein EsuDRG1 ima sposobnost vezanja RNA. Potrebno je naglasiti da je reakcija vezanja na poli(U) agarozu napravljena bez prisustva GTP-a i proteina DFRP1 što je indicacija da DRG1 proteinu ne treba ni GTP niti DFRP1 kako bi se vezao na RNA u stanici (slika 35. A). Kako bi dodatno potvrdili da je za poli (U) agarozu vezan protein DRG1 pokus je ponovljen, a gel je analiziran westernskom metodom otiska. Rezultati westernske metode otiska dodatno potvrđuju se spužvin i ljudski DRG1 veže za poli(U) agarozu (slika 35. B).



Slika 35. Nespecifično vezanje proteina DRG1 na molekulu RNA. Spužvin i ljudski protein DRG1 (500 ng) je predinkubiran u rastućim koncentracijama slobodne poli(U). Nakon predinkubacije slijedila je inkubacija sa 50%-tnom poli(U) agarozom. BSA je služio kao negativna kontrola. Uzorci su analizirani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu te obojani sa briljantnim modrilom Coomassie (A) ili analizirani westernskom metodom otiska (B).

4.4.6 Vežanje proteina DRG1 na DNA

Budući da EsuDRG1 ima evolucijski očuvane S5D2L-domene i TGS-domene, koje se obično nalaze u proteinima koji vežu RNA/DNA testirana je sposobnost EsuDRG1 da se nespecifično veže na molekulu DNA. U tu svrhu provedena je analiza usporavanja gela. Pokazano je da se pročišćeni EsuDRG1 i HsaDRG1 mogu nespecifično vezati na jednolančanu kružnu DNA (sscDNA) i dvolančanu kružnu DNA (dscDNA). Povećanje količine EsuDRG1 ili HsaDRG1 proteina dok količina DNA u reakciji ostaje ista mijenjaju način putovanja DNA kroz gel, što ukazuje na stvaranje kompleksa protein-DNA. Za EsuDRG1 učinak je vidljiv na 200 ng proteina u reakciji sa sscDNA (slika 36. A) i na 800 ng proteina u reakciji s dscDNA (slika 36. B). Količine EsuDRG1 proteina iznad 800 ng tvore velike komplekse proteina i sscDNA koji zaostaju u jažicama jer ne mogu proći kroz matriks agaroznog gela (slika 9b). Sličan učinak uočen je za HsaDRG1, ali pri većim količinama proteina (slika 36. C i D) što može biti posljedica kontaminacije s drugim proteinima prilikom izolacije.



Slika 36. Nespecifično vežanje proteina DRG1 na molekulu DNA. Reakcijska smjesa u kojoj se nalazi protein EsuDRG1, u količinama kao što je označeno na slici, (100 – 1600 ng) i 200 ng jednolančane cirkularne DNA viriona Φ X174 (A) ili dvolančane cirkularne DNA viriona Φ X174 RFI (B). Reakcije su analizirane na 0.5% agaroznom gelu s etidijevim bromidom. C i D Isto je ponovljeno s proteinom HsaDRG1 koji je služio za usporedbu.

4.5 Biološka karakterizacija proteina DRG1

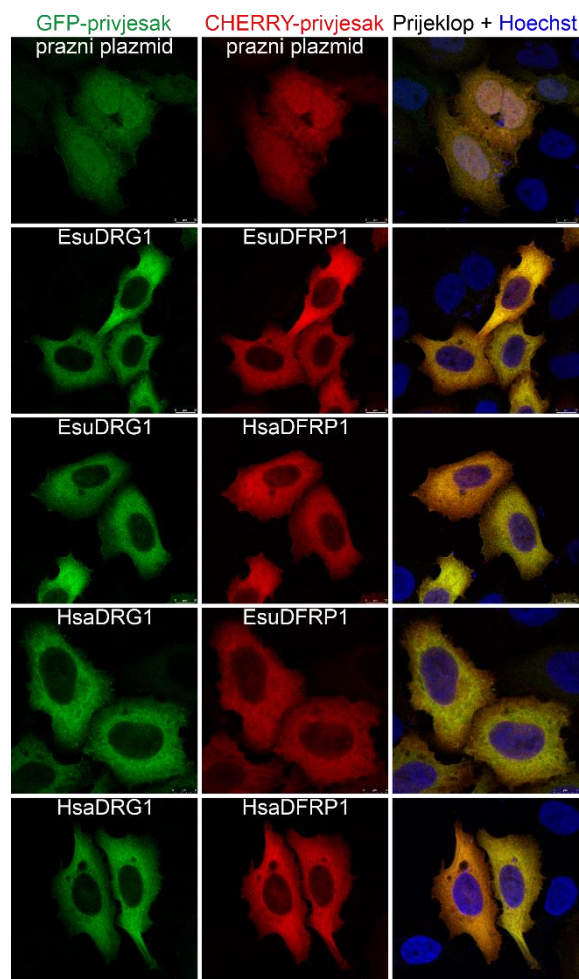
4.5.1 Konstrukcija vektora i ekspresija DRG1 u kulturi ljudskih tumorskih stanica

Za potrebe biološke karakterizacije u stanicama, kodirajući sljedovi nukleotida za spužvine i ljudske proteine DRG1 i DFRP1 uspješno su uklonirani u vektore pcDNA3, pEGFP-N1 i pmCherry-C1. Postupak je opisan u poglavlju 3.2.9. u materijalima i metodama (slika 8. i slika 9.). Uspješnost kloniranja je potvrđena sekvenciranjem.

Ljudske tumorske stanice HeLa transfecirane su vektorima koji nose EsuDRG1 ili HsaDRG1 označen GFP ili FLAG privjeskom i/ili EsuDFRP1 ili HsaDFRP1 označen MYC ili CHERRY privjeskom.

4.5.2 Lokalizacija proteina DRG1 u stanicama HeLa

U svrhu analize unutarstanične lokalizacije spužvinih i ljudskih proteina DRG1 te lokalizacije kompleksa DRG1:DFRP1 u stanicama HeLa konstruirani su plazmidni vektori s insertom za ljudski (HsaDRG1-GFP) ili spužvin (EsuDRG1-GFP) protein DRG1 označen s zelenim fluorescentnim privjeskom GFP. Budući da GFP signal nije detektiran u stanicama HeLa koje su transfecirane samo sa EsuDRG1-GFP ili HsaDRG1-GFP konstruirani su vektori za protein EsuDFRP1 i HsaDFRP1 označen s crvenim fluorescentnim privjeskom CHERRY. Kotransfekcija je napravljena u četiri različite kombinacije koje su uključivale kotransfekcijske parove iz istih i iz različitih organizama i to EsuDRG1-GFP ili HsaDRG1-GFP s EsuDFRP1-CHERRY ili HsaDFRP1-CHERRY. U sve četiri kombinacije DRG1 i DFRP1 uočena je potpuna kolokalizacija DRG1 i DFRP1 u citosolu stanica HeLa, dok u jezgri nije uočen signal (slika 37.). Osim očuvanog vezanja između DRG1 i DFRP1, ovi rezultati također potvrđuju identičnu lokalizaciju spužvinih i ljudskih proteina u stanici što je indikacija slične funkcije spužvinog homologa u ljudskim tumorskim stanicama.

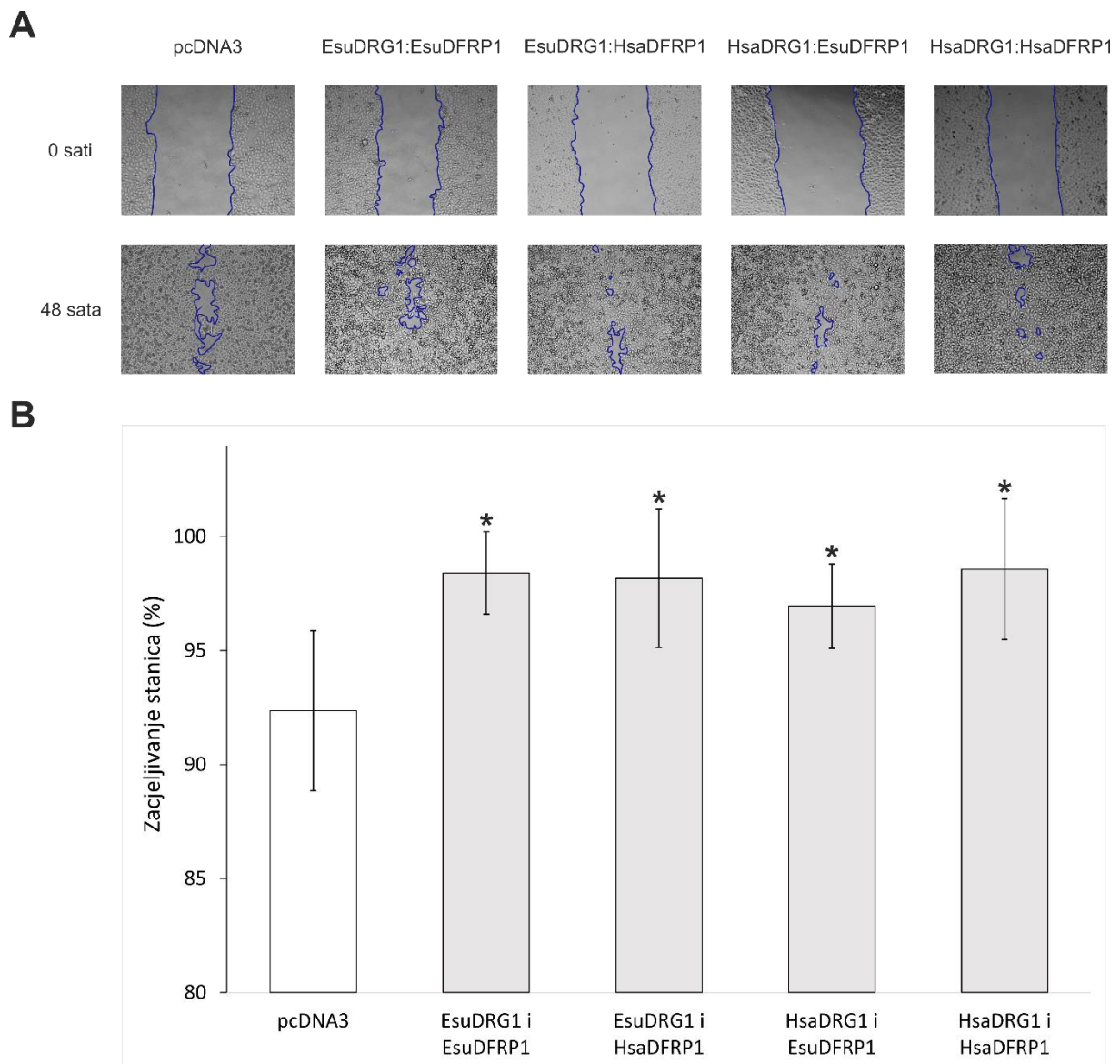


Slika 37. Unutarstanična lokalizacije ljudskog i spužvinog DRG1 i DFRP1 u stanicama HeLa. Ljudski i spužvin DRG1 su fluorescentno obilježeni sa GFP (zeleno), a ljudski i spužvin DFRP1 su fluorescentno obilježeni sa CHERRY (crveno). Kolokalizaciju DRG1 i DFRP1 u prijeklopu označava žuta boja, a Hoechs se koristio za bojanje jezgri (plavo). Stanice HeLa su analizirane konfokalnom mikroskopijom.

4.5.3 Utjecaj prekomjerno eksprimiranog proteina DRG1 na staničnu migraciju

Ranija istraživanja su pokazala da su proteini DRG1 i DFRP1 uključeni u migraciju stanica različitih tumorskih linija (Ling i sur., 2020). Kako bi se analizirala uloga EsuDRG1 i HsaDRG1 u migraciji stanica korišten je test zacjeljivanja rane (slika 38. A). Ukratko, tumorske stanice HeLa su kotransfecirane s plazmidnim vektorima u četiri kombinacije (EsuDRG1-FLAG:EsuDFRP1-MYC, HsaDRG1-FLAG:HsaDFRP1-MYC, EsuDRG1-FLAG:HsaDFRP1-MYC, i HsaDRG1-FLAG:EsuDFRP1-MYC). U sva četiri uzorka u usporedbi sa kontrolom (stanice transfecirane s praznim pcDNA3) je dokazano statistički značajno povećanje migracije stanica (slika 38. B). Statistički značajno zacjeljivanje u usporedbi sa kontrolom iznosi redom: EsuDRG1:EsuDFRP1 ($p=0.0038$), HsaDRG1:EsuDFRP1 ($p=0.0032$), EsuDRG1:HsaDFRP1

($p=0.012$) i HsaDRG1:HsaDFRP1 ($p=0.027$). Ovakvi rezultati potvrđuju očuvanu funkciju ljudskog DRG1 i njegovog homologa iz spužve u procesima povezanim s rakom.



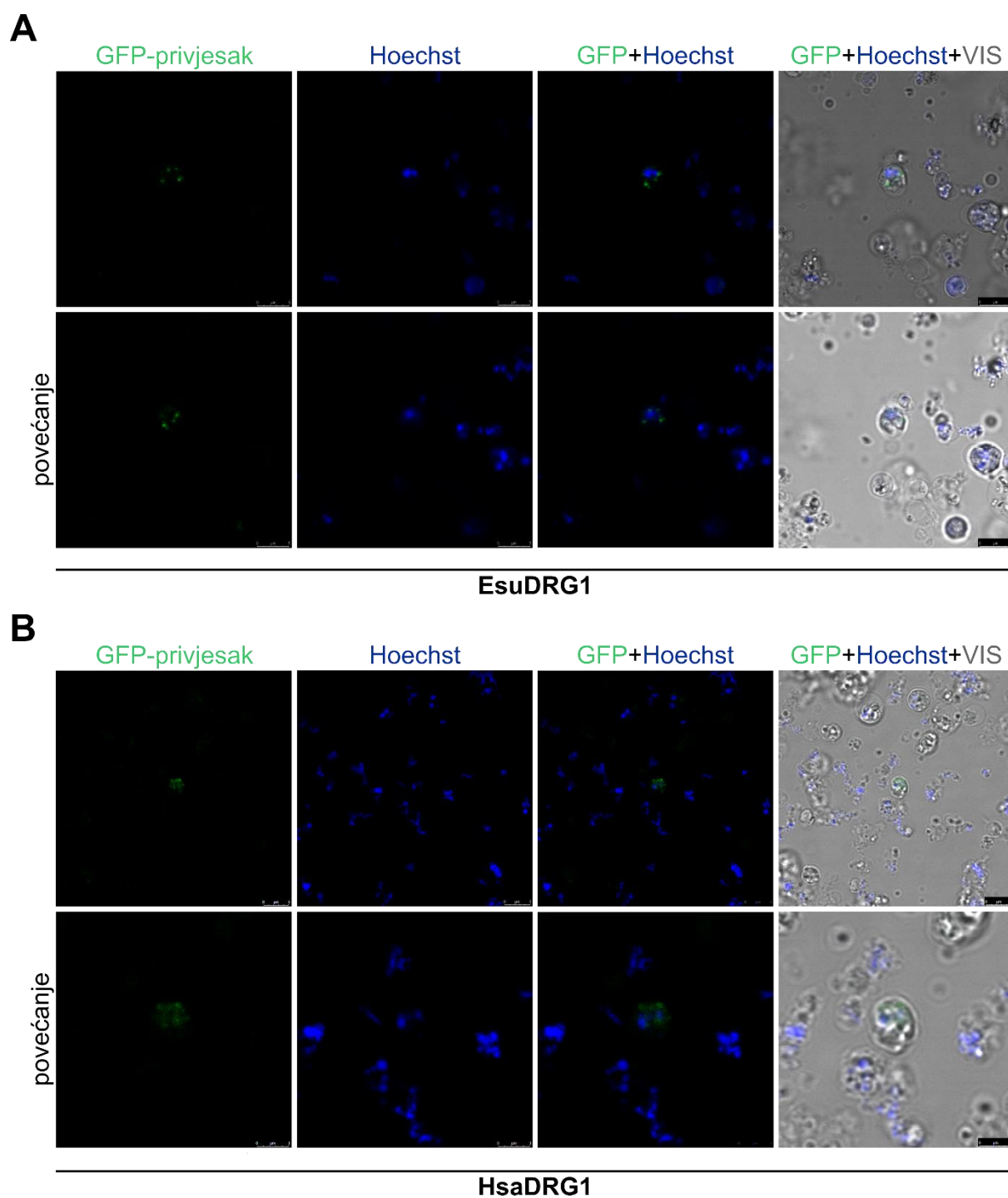
Slika 38. Test zacjeljivanja rane HeLa kotransfecirane ili spužvinim ili ljudskim DRG1 u svim kombinacijama sa ili spužvinim ili ljudskim DFRP1 (siva boja stupića) gdje su kontrolu migracije činile stanice transfecirane sa praznim plazmidnim vektorom pcDNA3. Pod invertnim mikroskopom s povećanjem od $100\times$ stanice su slikane neposredno nakon grebanja i nakon 48 sati inkubacije, plavim crtama je označena površina koju stanice prekrivaju. Ukupna površina nakon 48 sati je kvantificirana korištenjem ImageJ i prikazana u postocima gdje bi 100% značilo kompletno zarastanje **A**. Svaki od rezultata uspoređen je s kontrolnim stanicama (pcDNA3) koristeći studentov t-test gdje je razina statističke značajnosti postavljena na $p<0,05$.

Statistički signifikantna razlika je prikazana sa zvjezdicom (*) iznad stupića. Standardna devijacija je naznačena na stupiću, prosjek \pm SD **B**.

4.5.4 Lokalizacija proteina DRG1 u spužvinim stanicama u kulturi

U svrhu analize unutarstanične lokalizacije spužvinih i ljudskih proteina DRG1 u spužvinim stanicama u kulturi konstruirani su plazmidni vektori s insertom za ljudski (HsaDRG1-GFP) ili spužvin (EsuDRG1-GFP) protein DRG1 označen zelenim fluorescentnim privjeskom GFP.

Kotransfekcija je napravljena u dvije kombinacije koje su uključivale kotransfekcijske parove iz istih organizama i to EsuDRG1-GFP s EsuDFRP1-MYC i HsaDRG1-GFP s HsaDFRP1-MYC. Uočeno je da spužvin i ljudski DRG1 lokaliziraju u spužvinim stanicama izvan jezgre (slika 39.).



Slika 39. Unutarstanična lokalizacija spužvinog (A) i ljudskog (B) DRG1 u spužvinim stanicama *E. subterraneus*. Spužvin i ljudski DRG1 su fluorescentno obilježeni sa GFP (GFP-privjesak, zeleno). Lokalizaciju EsuDRG1 i HsaDRG1 označava zelena boja, a Hoechst se koristio za bojanje jezgri (plavo). Na desnoj strani je mikroskopska slika stanica spužve pod vidljivom svjetlosti (VIS) sa signalom za GFP i Hoechst. Stanice spužve su analizirane konfokalnom mikroskopijom.

5. RASPRAVA

Glavni cilj ove disertacije bio je okarakterizirati protein DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* (EsuDRG1), životinje bez bilateralne simetrije s jednostavnom morfologijom i složenim genomom, kako bi razjasnili evoluciju proteina DRG1 te njegovu funkcija, posebno u podrijetlu životinja.

Iako oskudna, dosadašnja saznanja o DRG1 jasno pokazuju da se radi o proteinu koji ima ulogu u važnim procesima životnog ciklusa stanice. Istraživanja su pokazala da je ovaj protein uključen u normalni rast, diferencijaciju i proliferaciju stanica te u normalnom rastu i razvoju embrija (Zeng i sur., 2021). Poremećaj fiziološke razine proteina DRG1 u stanici povezan je s nastankom raka kod životinja, uključujući i čovjeka (Li i sur., 2000). Razina proteina DRG1 u stanici regulirana je vezanjem specifičnog veznog partnera - DFRP1, koji ima ulogu u stabilizaciji i zaštiti DRG1 od razgradnje u proteasomu (Ishikawa i sur., 2005). Oba proteina su identificirana u skupini životinja koja je zanimljiva za istraživanje složenih procesa i signalnih puteva, spužvama (Porifera). Činjenica da spužve ne obolijevaju od raka može pomoću u razjašnjavanju prvotne funkcije proteina DRG1.

Protein DRG1 je evolucijski očuvana GTPaza. Ta karakteristika gena i proteina DRG1 prepoznata je i prilikom njegove identifikacije (Sazuka i sur., 1992a) gdje je analizama primarne strukture proteina uočena specifična sačuvana arhitektura G-domene koja je sastavljena od pet G-motiva (Schenker i sur., 1994). Kasnije studije, koje su uključivale analizu kristalne strukture homolognog kompleksa DRG1:DFRP1 iz kvasca (Rbg1:Tma46), su otkrile da je protein DRG1 građen od idućeg slijeda domena, od N-terminalnog kraja: HTH-domene, G-domene koja se sastoji od pet karakterističnih G-motiva, S5D2L-domene i C-terminalne TGS-domene (Francis i sur., 2012). Analiza primarne strukture u sklopu ove disertacije dodatno je potvrdila da su sve domene evolucijski očuvane kod svih odabranih predstavnika životinja (uključujući spužve *E. subterraneus* i *A. queenslandica*) i protista. Jedina razlika je uočena u G5-motivu (karakterističnog slijeda ([C/S]A[K/L/T])) koji kod svih identificiranih proteina DRG1 završava s aminokiselinom histidin (His, H) umjesto aminokiselinama lizin (Lys,K), leucin (Leu, L) ili treonin (Thr, T) (slika 12.).

Evolucijska očuvanost kao i sama očuvanost sadržaja domena upućuje na visoki postotak sličnosti i identičnosti homologa proteina DRG1 te je potvrđena i u ostalim znanstvenim radovima (Sazuka i sur., 1992b; Devitt i sur., 1999; Li i sur., 2000; Ishikawa i sur., 2005). Wei Dongwang i suradnici u svom radu pokazuju visok postotak sličnosti i identičnosti (više od 85%) između homologa proteina DRG1 ribe (*Danio rerio*), miša (*Mus musculus*), čovjeka

(*Homo sapiens*), vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), oblića (*Caenorhabditis elegans*) i žabe (*Xenopus laevis*) (Wei i sur., 2004). Ovako visok postotak uočen je i analizom napravljenom u ovoj disertaciji gdje su uspoređeni proteini DRG1 iz odabranih predstavnika životinja, protista, gljiva, biljaka i arheja. Točnije, utvrđen je visoki postotak sličnosti između proteina unutar Metazoa (75.7 – 100%) dok je homologija između Metazoa i drugih skupina nešto niža. Iako je homologija između ostalih carstva manja, svi proteini DRG1 i dalje pokazuju sličnost i identičnost iznad 50% što ukazuje da protein DRG1 ima važnu funkciju u stanici. Usporedbom homologa proteina DRG1 čovjeka i spužvi uočen je visoki postotak sličnosti/identičnosti sa spužvom *A. queenslandica* iznosi 91.3%/82.3%, a s *E. subterraneus* 90.% i 80.7% Slika (slika 14.).

U ovoj disertaciji napravljena je opsežna filogenetska analiza potporodice DRG koja uključuje predstavnike arheja, životinja, biljaka, gljiva i protista. Pregledom literature uočeno je da ovakva detaljna analiza dosad nije rađena, iako su preliminarne filogenetske analize objavljene (Li i sur., 2000; Mittenhuber, 2001; Wei i sur., 2004; Koller-Eichhorn i sur., 2007; Westrip i sur., 2021). Dobiveno filogenetsko stablo je snažno podržano i pokazuje duboko grananje između podskupine DRG1 i DRG2, budući da svi analizirani proteini eukariota jasno ulaze u jednu od ovih skupina, što ukazuje na divergenciju duplikacijom gena *drg* koja se vjerojatno dogodila tijekom pojave eukariota. Evolucijski odnosi općenito su bili dobro razriješeni, s definiranim granama za životinje, gljive i biljke. Analiza u sklopu ove disertacije je također pokazala da su proteini DRG ostali visoko očuvani tijekom evolucije. Spužve su, očekivano, postavljene u podnožje životinjskog stabla zajedno s predstavnicima ostalih bazalnih Metazoa (Cnidaria, Ctenophora i Placozoa). Istraživanja u sklopu ove disertacije su potvrdila filogenetske odnose za nekoliko skupina Protista (slika 13.). Pretragom genoma biljaka, kod nekih su predstavnika identificirana tri proteina DRG. Kod biljke *A. thaliana* identificirana su tri gena *drg* te se za protein AthDRG1 pretpostavlja da je homolog DRG1, a da su AthDRG2 i AthDRG3 homolozi DRG2 (Nelson i sur., 2009). Filogenetska analiza u sklopu ove disertacije dodatno je pokazala da se doista AthDRG1 grupira s ostalim predstavnicima DRG1 kod biljaka, a proteini DRG2 i DRG3 iz *A. thaliana* nedvojbeno pripadaju podskupini DRG2. Isto je utvrđeno i za tri proteina DRG iz biljaka *Raphanus sativus*, *Solanum lycopersicum* i *Solanum tuberosum*, što je vrlo vjerojatno posljedica duplikacija specifičnih za vrstu. Uočeno je da su proteini DRG2 iz biljaka (uključujući zelene alge) duži od ostalih proteina DRG2 (365-370 aminokiselina) kao posljedica dužih C-krajeva (Nelson i sur., 2009). Otkriveno je da i neki protisti (*Phytophthora pseudosyringae*, *Paramecium sonneborni* i *Ectocarpus siliculosus*) također imaju dodatak na C-krajevima proteina DRG2.

U sklopu ove doktorske disertacije po prvi put je napravljena detaljna analiza gena tj. introna unutar gena *drg1* iz odabranih predstavnika životinja, gdje su identificirane i analizirane faze, pozicije i veličine introna (slika 16.). Analiza strukture introna/egzona pokazala je da su pet introna pronađenih u genima *drg1* metazoa najvjerojatnije vrlo stari, jer su također prisutni u homolozima hoanoflagelata, što sugerira da je gen *drg1* predak metazoa bio bogat intronima. Prilikom analize broja introna primijećeno je da *Drosophila* sadrži manji broj introna. Takav gubitak introna je opisan i u literaturi (Raible i sur., 2005) te se pretpostavlja da je to posljedica ubrzane evolucije u ovoj razvojnoj liniji. Nadalje, primijećena je razlika u broju introna između gena iz spužvi *Aqu* i *Esu*. Osim toga, potvrđeno je da geni *drg1* iz spužvi imaju značajno kraće introne od ljudskog homologa, dok su duljine eksona prilično slične. Isto je prethodno pokazano za nekoliko drugih gena spužve (Müller i sur., 2002; Srivastava i sur., 2010; Perina i sur., 2012a).

Francis je u sklopu svoje doktorske disertacije uspješno ekspimirao protein DRG1 iz kvasca i čovjeka u bakteriji *E.coli* i naknadno ga pročistio (Francis, 2012). No nije uspio prekomjerno ekspimirati homologa proteina DFRP1 iz kvasca (Tma46) u *E. coli* vjerojatno zbog brze razgradnje u stanici, čak i prilikom pokušaja koekspresije s homologom DRG1 iz kvasca (Rbg1), ali je za svoje eksperimente koristio protein Tma46 koji sadrži samo DFRP regiju. Za razliku od njega, za eksperimente u sklopu ove doktorske disertacije uspješno su prekomjerno ekspimirani cjeloviti proteini DRG1 i DFRP1 iz spužve i čovjeka u bakteriji *E. coli*. Ljudski proteini DRG1 i DFRP1 ekspimirani su u manjoj količini te su se pokazali izazovnijim za pročišćavanje od spužvinih homologa (slika 26.).

S obzirom na to da su prethodna istraživanja na homolozima proteina DRG1 iz čovjeka i kvasca (Rbg1) pokazala da protein DRG1 ne formira kompleks s drugim proteinom DRG1 već da se isključivo nalazi u formi monomera (Francis, 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013) u sklopu ove doktorske disertacije istraženo je tvori li homolog proteina DRG1 iz spužve potencijalne homooligomere ili se također nalazi u formi monomerna. U tu svrhu napravljena su dva pokusa: test s glutaraldehydom i gel filtracija. Rezultati eksperimenata su pokazali da se spužvin protein DRG1 nalazi u formi monomera (slika 27. A) kao i ljudski DRG1 (slika 27. B). Monomerno stanje spužvinog DRG1 dodatno je potvrđeno gel filtracijom gdje protein izlazi kao monomer veličine 44 kDa.

Nadalje, od interesa je bilo analizirati stvaraju li proteini EsuDRG1 i EsuDFRP1 proteinski kompleks (EsuDRG1:EsuDFRP1) kao što ih tvore homolozi iz čovjeka i kvasca (Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013) i to u proteinskom omjeru 1:1 (Pérez-Arellano i sur., 2013) što bi činilo kompleks molekulske mase 92 kDa (42 kDa:50 kDa). Za razliku od zaključka

Perez-Arellano i suradnika (Pérez-Arellano i sur., 2013), u doktorskoj disertaciji Schellhaus Anna Katharina je pokazano da gel-filtracijom proteina DRG1 i DFRP1 žabe nastaje vrh u kromatografskom stupcu na veličini od 180 kDa (Schellhaus, 2017). S obzirom na različite rezultate iz proučene literatute odlučeno je napraviti analizu proteinskog kompleksa metodom gel-filtracije koja uključuje protein EsuDRG1 zajedno s EsuDFRP1 te isto tako HsaDRG1 zajedno s EsuDFRP1. Gel-filtracijom se uočava vrh u retencijskom vremenu 23.27 minuta što odgovara molekulskoj masi 184 kDa (slika 28. C). Dodatno, analizom frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu i bojanja briljantnim modrilom Coomassie primijećena je veća koncentracija proteina EsuDFRP1 od proteina EsuDRG1. Prema rezultatima vizualizacije na SDS-poliakrilamidnom gelu zaključuje se da je omjer proteina u kompleksu DRG1:DFRP1 ili 1:3 ili 1:4 (slika 28. D), ali nikako 1:1. Kako bi se dodatno razjasnilo stvara li DRG1 proteinski kompleks s DFRP1 napravljen je test umrežavanja s glutaraldehydom gdje je u reakciju stavljena proteinska smjesa koja je sadržavala ili EsuDRG1 i EsuDFRP1 ili HsaDRG1 i HsaDFRP1. Rezultati testa s glutaraldehydom pokazuju da uistinu dolazi do formacije oligomernog kompleksa (slika 28. A i slika 29.).

Dodatno, prilikom pročišćavanja proteina DFRP1 spužve i čovjeka na kromatogramu je uočen dominantni vrh koji sadrži proteine molekularne mase oko 158 kDa. Na osnovu rezultata gel-filtracije zaključeno je da protein DFRP1 čovjeka i spužve tvori homooligomere što je dodatno potvrđeno testom umrežavanja s glutaraldehydom gdje su na SDS-poliakrilamidnom gelu uočljivi oligomerni kompleksi velikih molekularnih masa (slika 28. B).

Kao GTPaza, protein DRG1 posjeduje intrinzičnu GTPazu aktivnost što znači da proteinu za aktivaciju GTPazne aktivnosti nije potreban protein GAP isto kao što mu nije potreban ni protein GEF koji nakon hidrolize izmjenjuje vezanu molekulu GDPa s novim GTPom. Iako posjeduje intrinzičnu aktivnost, njegova je GTPazna aktivnost je povećana prilikom vezanja u kompleks s proteinom DFRP1 (O'Connell i sur., 2009; Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013). S obzirom na navedene karakteristike napravljena je analiza intrinzične aktivnosti proteina spužve, a homolog iz čovjeka je poslužio kao pozitivna kontrola aktivnosti i kao usporedna točka količine utrošenog GTP-a. Rezultati intrinzične aktivnosti proteina DRG1 upućuju na to da: 1) spužvin protein DRG1 posjeduje intrinzičnu GTPaznu aktivnost i 2) da je aktivnosti jednaka homologu iz čovjeka. Ovakva identičnosti intrinzične GTPazne aktivnosti upućuje na evolucijsku očuvanost još jedne od karakteristika proteina iz spužve. Osim intrinzične aktivnosti proteina DRG1 Francis, Sandra M. i sur. su uočili da je njegova aktivnost značajno povećana kada se u reakciji nalazi njegov vezni partner DFRP1 (Francis i sur., 2012). Pretpostavili su da DRG1 u prisutnosti DFRP1 ima stabilniju strukturu te je upravo to razlog

povećanja GTPazne aktivnosti (Francis i sur., 2012). Usporedbom rezultata GTPazne aktivnosti reakcijske smjese s EsuDRG1:EsuDFRP1 i rezultatom GTPazne aktivnosti reakcijske smjese samo EsuDRG1 uočeno je da uistinu dolazi do povećanja aktivnosti spužvinog proteina DRG1 u prisutnosti EsuDFRP1. Aktivnost proteina DRG1 izmjerena u reakciji u koju je dodan EsuDFRP1 je veća (za 2.5 puta) u odnosu na aktivnost reakcije bez DFRP1 što je dokaz stimulirajuće sposobnosti proteina DFRP1 kao što je uočeno i u literaturi (Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013).

S obzirom da protein DFRP1 ne sadrži G-domenu, na koju bi se GTP vezao i hidrolizirao, pretpostavka je da nema ni GTPaznu aktivnost. Pregledom literature nije testirana moguća GTPazna aktivnost samog proteina DFRP1 (Ishikawa i sur., 2005; Francis i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013) što može biti zbog odsutnosti G-domene ili zato što nije bilo moguće eksprimirati cjeloviti protein. Ipak, u svrhu dokazivanja da povećana GTPazna aktivnost nije posljedica dodatne GTPazne aktivnosti proteina DFRP1 u kompleksu DRG1:DFRP1 testirana je i njegova GTPazna aktivnost. Rezultati analize potvrđuju da DFRP1 ne posjeduje GTPaznu aktivnost te da je njegova uloga u kompleksu DRG1:DFRP1 uistinu stabilizacija, ali isto tako da je ta uloga još jedna od očuvanih karakteristika homologa iz spužve. Jednako kao što je GTPazna aktivnost proteina DRG1 stimulirana kada se nalazi u kompleksu DRG1:DFRP1 dokazano je da se aktivnost dodatno povećava dodavanjem iona kalija (K^+) u reakcijsku smjesu (Ash i sur., 2012; Pérez-Arellano i sur., 2013). Kako bi se provjerilo ovakvo povećanje aktivnosti napravljena je reakcijska smjesa koja sadrži 300 mM KCl s proteinom EsuDRG1 i reakcijska smjesa bez KCl s proteinom EsuDRG1 nakon čega je izmjerena aktivnost. Usporedbom rezultata ove disertacije sa rezultatima Pérez-Arellano i sur. (Pérez-Arellano i sur., 2013) uočene su kontradikcije. Prema rezultatima u ovoj disertaciji uočeno je da se u prisustvu iona kalija GTPazna aktivnost značajno smanjila (25%) u usporedbi sa reakcijom gdje nije korišten KCl. Kontradiktorni rezultati se mogu objasniti korištenjem drugačijih metoda provjere enzimske aktivnosti. Može se pretpostaviti da GTPase/GAP pufer iz komercijalno dostupnog kompleta GTP Glo (Promega) nije kompatibilan s dodatkom KCl, a Pérez-Arellano i sur. (Pérez-Arellano i sur., 2013) su za mjerenja GTPazne aktivnosti koristili metodu kompatibilnu s dodavanjem KCl.

Osim opisane i istražene G-domene, proteini DRG1 posjeduju i evolucijski očuvane HTH i S5D2L-domene koje imaju ulogu u vezanju molekula DNA i RNA. S obzirom da je dokazano da se protein DRG1 iz kvasca i žabe nespecifično vežu na RNA (Ishikawa i sur., 2003; Francis, 2012) u sklopu ove disertacije napravljena je jednaka provjera proteina DRG1 iz spužve. U eksperimentu je korištena poli(U) agarozna te je kao dodatni kompetitor za protein DRG1

korištena slobodna poli(U). U reakcijskoj smjesi u kojoj se nalazila samo poli(U) agarozna bez slobodne poli(U) uočeno je potpuno vezanje proteina što je indikacija da uistinu i spužvin protein ima sposobnost vezanja na RNA kao što ga imaju i homolozi iz žabe, kvasca (Ishikawa i sur., 2003; Francis, 2012) i čovjeka. Westernskom metodom otiska je dodatno potvrđeno da su zaostali vezani proteini na poli(U) agarozu uistinu ljudski i spužvini protein DRG1 (slika 35. B). Korištenjem još jednog veznog kompetitora tj. slobodne poli(U) provjerena je specifičnost vezanja RNA. Rezultati testa pokazuju da povećavanjem koncentracije slobodne poli(U) opada količina vezanog proteina za poli(U) agarozu. Smanjivanje količine vezanog proteina za poli(U) agarozu se objašnjava saturacijom veznog mjesta sa slobodnom poli(U) koja dalje onemogućuje proteinima EsuDRG1 i HsaDRG1 da se vežu za poli(U) agarozu. Isto je primijećeno i kod homologa iz drugih organizama (Ishikawa i sur., 2003; Francis, 2012), i time se potvrđuje da proteini EsuDRG1 i HsaDRG1 posjeduju sposobnost nespecifičnog vezanja na molekulu RNA. Dodatno, uočeno je da je sposobnost vezanja na RNA moguća i bez veznih partnera (DFRP1) te isto tako da sposobnost vezanja proteina na RNA ne zahtijeva prisutnost GTP-a u reakciji.

Zato što je poznato da se protein DRG1 veže na molekulu RNA, u sklopu ove disertacije ispitano je posjeduje li DRG1 i sposobnost vezanja na molekulu DNA. Razlog provjere ove sposobnosti je njegov sastav domena tj. sadrži visoko očuvane S5D2L i TGS-domene koje su obilježje proteina koji vežu molekule RNA, ali i DNA (Westrip i sur., 2021). Prema podacima dostupnim u literaturi, test sposobnosti vezanja proteina DRG1 za molekulu DNA do sada nije napravljen te smo odlučili provjeriti posjeduje li DRG1 iz spužve i čovjeka tu aktivnost. U pokusu gdje se postupno povećavala količina proteina EsuDRG1 ili HsaDRG1 s fiksnom količinom DNA vizualizirano je kretanje DNA kroz gel. Rezultati pokazuju da uistinu DRG1 i DNA stvaraju kompleks protein:DNA što je vidljivo zbog zaostajanja DNA u agaroznom gelu. Pri najvišim koncentracijama proteina (1600 ng) dolazi do potpunog zaostajanja DNA u jažicama agaroznog gela što je vjerojatno posljedica nemogućnosti prolaska kroz matriks agaroze.

Za testiranje biološke funkcije spužvinog DRG1 i usporedbu s biološkom funkcijom ljudskog DRG1 napravljena je transfekcija ljudske tumorske stanične linije HeLa. Prilikom transfekcije stanica samo s DRG1 čovjeka ili spužve do ekspresije proteina nije došlo, jer je za uspješnu transfekciju potrebna kotransfekcija DRG1 s DFRP1 što je opisano i u drugim radovima (Sazuka i sur., 1992b; Mahajan i sur., 1996; Ishikawa i sur., 2005). Prilikom kotransfekcije spužvinog DRG1 s DFRP1 uočena je očekivana velika ekspresija egzogenog spužvinog i ljudskog DRG1 i DFRP1. Isto je opisano u literaturi gdje se navodi da DFRP1 stabilizira DRG1

tako što sprječava njegovu poliubikvintinaciju te naknadnu proteasomalnu razgradnju (Sazuka i sur., 1992b; Mahajan i sur., 1996; Ishikawa i sur., 2005). S obzirom na slične rezultate, pretpostavka je da je isti mehanizam prisutan i kod proteina spužve. Isto tako, ljudski DFRP1 prepoznaje spužvinog DRG1 kao veznog partnera, i obrnuto, spužvin DFRP1 veže ljudski DRG1 što dodatno potvrđuje evolucijsku očuvanost proteina.

Pregledom literaturnih izvora za informacije o unutarstaničnom smještaju proteina DRG1 uočeni su kontradiktorni rezultati. U nekim radovima pokazana je lokalizacija proteina u citosolu ljudskih tumorskih stanica HeLa S3, mišjih stanica 3T3 i stanica vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (Sazuka i sur., 1992b; Sommer i sur., 1994; Ishikawa i sur., 2005), neke studije pokazuju da je DRG1 smješten u jezgri H1299, A549 i stanica HeLa (Lu i sur., 2016), a neke čak da je smješten i u jezgri i u citosolu stanica HeLa (Markolovic i sur., 2018). Iako unutarstanična lokalizacija DRG1 može biti specifična za stanicu ili ovisna o staničnom ciklusu, zbog kontradiktornih rezultata korištene su stanice HeLa da bi se utvrdila lokalizacija spužvinog i ljudskog DRG1. Rezultati lokalizacije u ovoj disertaciji pokazuju da ljudski i spužvin DRG1 i DFRP1 lokaliziraju u citosolu stanica HeLa (slika 37.), isto kao u rezultatima nekih istraživanja (Sazuka i sur., 1992b; Sommer i sur., 1994; Ishikawa i sur., 2005). Do sada je opisano samo nekoliko pokušaja transfekcije spužvinih stanica s vrlo slabom efikasnošću (Pfannkuchen i sur., 2009; Schippers, 2013; Revilla-i-Domingo i sur., 2018). Preliminarni rezultati ove disertacije pokazuju da je moguće transformirati stanice spužve u kulturi, iako s niskom učinkovitošću. Ovaj korak je vrlo zahtjevan, budući da stanice spužvi slabo prijanjaju na površinu posude za kulturu stanica, čak i ako su posude obložene spojevima koji potiču vezanje stanica za podlogu, stoga je gotovo nemoguće odrediti preciznu lokalizaciju. Ipak, moguće je odrediti lokalizaciju proteina u staničnoj jezgri, citosolu i eventualno membrani. Rezultati ukazuju da spužvin i ljudski DRG1 lokaliziraju u spužvinim stanicama izvan jezgre što je indicacija da i ljudski homolog posjeduje sličnu funkciju u spužvinim stanicama *E. subterraneus*. U ovoj disertaciji je po prvi puta pokazana visoka očuvanost bioloških karakteristika DRG1 spužve i čovjeka.

DRG1 ima ulogu u staničnom rastu, proliferaciji, staničnoj migraciji i formaciji kolonija (Kiniwa i sur., 2015; Lu i sur., 2016; Ling i sur., 2020) u nekoliko vrsta tumora: melanoma, osteosarkoma, raka pluća i raznim tumorskim staničnim linijama. Prekomjerna ekspresija spužvinog i ljudskog DRG1 zajedno s DFRP1 iz istih ili različitih organizama statistički značajno povećava i migraciju stanica HeLa (slika 38.). To je u skladu s ranijim istraživanjima gdje utišavanjem genske ekspresije DRG1 dolazi do smanjene stanične migracije u stanicama osteosarkoma (Ling i sur., 2020). Uzevši u obzir sve rezultate pokusa, jasno je vidljivo da je

funkcija DRG1 očuvana od spužvi do čovjeka, a činjenica da spužve ne mogu oboljeti od raka dodatno naglašava da je prvotna i osnovna uloga DRG1 u reguliranju temeljnih staničnih procesa.

6. ZAKLJUČCI

- Sveobuhvatna filogenetska analiza pokazala je velika očuvanost proteina DRG1 tijekom evolucije Metazoa. Usporedbom proteina DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* s homolognim proteinima iz odabranih predstavnika Metazoa te njihovih bliskih jednostaničnih srodnika utvrđena je visoka evolucijska očuvanost ključnih domena i motiva.
- Analiza sličnosti i identičnosti proteina DRG1 pokazala je veliki postotak očuvanosti primarne strukture (75.7 – 100%) kod Metazoa. Svi analizirani proteini DRG1 pokazuju homologiju iznad 50% što upućuje da je riječ o evolucijski očuvanom proteinu kod eukariota.
- Usporedba pozicije i faze introna gena *drg1* iz spužvi s odabranim homolozima iz drugih skupina Metazoa pokazala je da je pozicija i faza čak 6 introna u potpunosti očuvana od spužve do čovjeka.
- Protein DRG1 iz spužve i čovjeka nalazi se u formi monomera, a u kompleksu s DFRP1 tvori heterooligomer u omjeru 1:3 ili 1:4.
- Analiza GTPazne aktivnosti spužvinog proteina DRG1 u odsutnosti DFRP1 pokazala je da DRG1 posjeduje intrinzičnu GTPaznu aktivnost na razini sličnoj ljudskom proteinu DRG1. GTPazna aktivnost spužvinog i ljudskog proteina DRG1 je povećana oko 2.5 puta kada je u reakciji prisutan vezni partner DFRP1.
- Spužvin i ljudski protein DRG1 ima sposobnost nespecifičnog vezanja molekule RNA te jednolančane i dvolančane molekule DNA. Za vezanje proteina DRG1 na molekulu RNA i DNA nije potreban DFRP1.
- Nakon transfekcije spužvinog proteina DRG1 u ljudske tumorske stanice nije bilo moguće detektirati egzogeni DRG1. Međutim nakon kontrtransfekcije spužvinog proteina DRG1 s DFRP1 detektirane su visoke razine proteina DRG1. Ovi rezultati potvrđuju da DFRP1 ima ulogu u stabilizaciji i zaštiti DRG1 od razgradnje u proteasomima. Isto je pokazano i za protein DRG1 iz čovjeka.
- Analiza lokalizacije proteina DRG1 iz spužve i čovjeka pokazala je isti unutarstanični smještaj proteina DRG1 iz spužve i čovjeka, u citosolu tumorskih stanica, što upućuje na očuvanost njihove unutarstanične funkcije.
- Isti unutarstanični smještaj proteina DRG1 i DFRP1 iz spužve i čovjeka u ljudskim tumorskim stanicama potvrđuje stvaranje kompleksa DRG1:DFRP1.

- Sličan unutarstanični smještaj proteina DRG1 spužve i čovjeka u stanicama spužve i ljudskim tumorskim stanicama dodatno upućuje na očuvanost njihove unutarstanične funkcije.
- Ljudski i spužvin protein DRG1 povećavaju migraciju u ljudskim tumorskim stanicama HeLa što upućuje na njihovu sličnu bazičnu ulogu.
- Identifikacijom te biokemijskom i biološkom karakterizacijom homologa proteina DRG1 iz spužve dobili smo uvid u evolucijsku prošlost proteina DRG1 te pridonijeli boljem razumijevanju njegovih osnovnih funkcija.

7. LITERATURA

- Ash MR, Maher MJ, Mitchell Guss J, Jormakka M (2012) The cation-dependent G-proteins: In a class of their own. *FEBS Letters* 586: 2218–2224.
- Athena Aktipis C, Boddy AM, Jansen G, Hibner U, Hochberg ME, Maley CC, Wilkinson GS (2015) Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370.
- Beljan S, Herak Bosnar M, Četković H (2020) Rho Family of Ras-Like GTPases in Early-Branching Animals. *Cells* 9: 1–26.
- Bilandžija H, Bedek J, Jalžić B, Gottstein S (2007) The morphological variability, distribution patterns and endangerment in the Ogulin cave sponge *Eunapius subterraneus* Sket & Velikonja, 1984 (Demospongiae, Spongillidae). *Natura Croatica* 16: 1–17.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 130: 865 – 877.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117–127.
- Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J (2003) MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4: 1–4.
- Capalbo G, Mueller-Kuller T, Koschmieder S, Klein HU, Ottmann OG, Hoelzer D, Scheuring UJ (2013) Characterization of ZC3H15 as a potential TRAF-2-interacting protein implicated in the NFκB pathway and overexpressed in AML. *International Journal of Oncology* 43: 246–254.
- Caria S, Hinds MG, Kvangsakul M, (2017) Structural insight into an evolutionarily ancient programmed cell death regulator - The crystal structure of marine sponge BHP2 bound to LB-Bak-2. *Cell Death and Disease* 8: 2543-2548.
- Četković H, Herak Bosnar M, Perina D, Mikoč A, Dezeljin M, Beluzic R, Bilandžija H, Ruiz-Trillo I, Harcet M (2018) Characterization of a group i Nme protein of *Capsaspora owczarzaki* - A close unicellular relative of animals. *Laboratory Investigation* 98: 304–314.
- Četković H, Grebenjuk VA, Müller WEG, Gamulin V (2004) Src proteins/src genes: From sponges to mammals. *Gene* 342: 251–261.
- Četković H, Halasz M, Herak Bosnar M (2018) Sponges: A Reservoir of Genes Implicated in Human Cancer. *Marine Drugs* 98: 304–314.
- Četković H, Mikoč A, Müller WEG, Gamulin V (2007) Ras-like small GTPases form a large family of proteins in the marine sponge *Suberites domuncula*. *Journal of Molecular Evolution* 64: 332–341.

Ćetković H, Müller IM, Müller, WEG, Gamulin V (1998) Characterization and phylogenetic analysis of a cDNA encoding the Fes/FER related, non-receptor protein-tyrosine kinase in the marine sponge *Sycon raphanus*. *Gene* 216: 77–84.

Ćetković H, Perina D, Harcet M, Mikoč A, Herak Bosnar M (2014) Nme family of proteins - Clues from simple animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388: 133–142.

Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Bennett R, Berry A i sur. (2022) Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research* 50: D988–D995

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2017) Europe PMC Funders Group ProtTest 3 : fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27: 1164–1165.

Daugeron MC, Prouteau M, Lacroute F, Séraphin B (2011) The highly conserved eukaryotic DRG factors are required for efficient translation in a manner redundant with the putative RNA helicase Slh1. *Nucleic Acids Research* 39: 2221–2233.

Davies PCW, Lineweaver CH (2011) Cancer tumors as Metazoa 1.0: Tapping genes of ancient ancestors. *Physical Biology* 8: 0–7.

Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 83–117.

Devitt ML, Maas KJ, Stafstrom JP (1999) Characterization of DRGs, developmentally regulated GTP-binding proteins, from pea and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 39: 75–82.

De Voogd NJ, Alvarez B, Boury-Esnault N, Carballo JL, Cárdenas P, Díaz MC, Dohrmann M, Downey R, Hajdu E, Hooper JNA i sur. (2022) World Porifera Database. World Porifera database. Available: <http://www.marinespecies.org/porifera>.

Doerks T, Copley RR, Schultz J, Ponting CP, Bork P (2002) Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Research* 12: 47–56.

Domazet-Lošo T, Klimovich A, Anokhin B, Anton-Erxleben F, Hamm MJ, Lange C, Bosch TCG (2014) Naturally occurring tumours in the basal metazoan *Hydra*. *Nature Communications* 5: 1–8.

Domazet-Lošo T, Tautz D (2008) An ancient evolutionary origin of genes associated with human genetic diseases. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2699–2707.

Domazet-Lošo T, Tautz D (2010) Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa. *BMC Biology* 8: 1–10.

Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.

Ehara H, Makino M, Kodama K, Konoki K, Ito T, Sekine SI, Fukuzawa S, Yokoyama S, Tachibana K (2015) Crystal Structure of Okadaic Acid Binding Protein 2.1: A Sponge Protein Implicated in Cytotoxin Accumulation. *ChemBioChem* 16: 1435–1439.

Elliott TA, Gregory TR (2015) What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370

Etheridge N, Trusov Y, Verbelen JP, Botella JR (1999) Characterization of ATDRG1, a member of a new class of GTP-binding proteins in plants. *Plant Molecular Biology* 39: 1113–1126.

Francis SM (2012) Molecular Structure-based characterization of the multi-modular Developmentally Regulated GTPase in complex with the DRG family regulatory protein. Universidad Autónoma de Madrid CSIC - Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), Doctoral thesis.

Francis SM, Gas ME, Daugeron MC, Bravo J, Séraphin B (2012) Rbg1-Tma46 dimer structure reveals new functional domains and their role in polysome recruitment. *Nucleic Acids Research*, 40: 11110–11114.

Galvão CW, Pedrosa FO, Souza EM, Yates MG, Chubatsu LS, Steffens MBR (2004) Expression, purification, and DNA-binding activity of the *Herbaspirillum seropedicae* RecX protein. *Protein Expression and Purification* 35: 298–303.

Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics* 11: 331–344.

Gramzow M, Schröder HC, Fritsche U, Kurelec B, Robitzki A, Zimmermann H, Friese K, Kreuter MH, Müller WEG (1989) Role of phospholipase A2 in the stimulation of sponge cell proliferation by homologous lectin. *Cell* 59: 939–948.

Grant RE (1836) *Animal Kingdom*. U: Todd RB (ed.), *The Cyclopaedia of Anatomy and Physiology*, 107-118.

Harcet M, Bilandžija H, Bruvo-Madarić B, Četković H (2010) Taxonomic position of *Eunapius subterraneus* (Porifera, Spongillidae) inferred from molecular data - A revised classification needed? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 1021–1027.

Harcet M, Roller M, Četković H, Perina D, Wiens M, Müller WEG, Vlahoviček K (2010) Demosponge EST sequencing reveals a complex genetic toolkit of the simplest metazoans. *Molecular Biology and Evolution* 27: 2747–2756.

Hooper JNA, Van Soest RWM (2003) *Systema Porifera. a Guide To the Classification of Sponges the End of a Beginning*. *Bollettino dei musei e degli istituti biologici dell'Universita di Genova* 68: 19–38.

Hyman LH (1940) *The Invertebrates: Protozoa Through Ctenophora*, McGraw-Hill Publications, New York.

Ishikawa K, Akiyama T, Ito K, Semba K, Inoue J. ichiro (2009) Independent stabilizations of polysomal Drg1/Dfrp1 complex and non-polysomal Drg2/Dfrp2 complex in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390: 552–556.

Ishikawa K, Azuma S, Ikawa S, Morishita Y, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Inoue JI (2003) Cloning and characterization of *Xenopus laevis* drg2, a member of the developmentally regulated GTP-binding protein subfamily. *Gene* 322: 105–112.

Ishikawa K, Azuma S, Ikawa S, Semba K, Inoue JI (2005) Identification of DRG family regulatory proteins (DFRPs): specific regulation of DRG1 and DRG2. *Genes to Cells* 10: 139–150.

Ishikawa K, Ito K, Inoue JI, Semba K (2013) Cell growth control by stable Rbg2/Gir2 complex formation under amino acid starvation. *Genes to Cells* 18: 859–872.

Jeffery NW, Jardine CB, Gregory TR (2013) A first exploration of genome size diversity in sponges. *Genome* 56: 451–456.

Jiang BG, Wan ZH, Huang J, Li LM, Liu H, Fu SY, Yang Y, Zhang J, Yuan SX, Wang RY, I sur. (2016) Elevated ZC3H15 increases HCC growth and predicts poor survival after surgical resection. *Oncotarget* 7: 37238–37249.

Kallstrom G, Hedges J, Johnson A (2003) The Putative GTPases Nog1p and Lsg1p Are Required for 60S Ribosomal Subunit Biogenesis and Are Localized to the Nucleus and Cytoplasm, Respectively. *Molecular and Cellular Biology* 23: 4344–4355.

Kenny NJ, Francis WR, Rivera-Vicéns RE, Juravel K, de Mendoza A, Díez-Vives C, Lister R, Bezares-Calderón LA, Grombacher L, Roller M, i sur. (2020) Tracing animal genomic evolution with the chromosomal-level assembly of the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. *Nature Communications* 11: 1–11.

Kim YI, Park S, Jeoung D, Lee H. (2003) “Point mutations affecting the oligomeric structure of Nm23-H1 abrogates its inhibitory activity on colonization and invasion of prostate cancer cells: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 281–289.

Kim YM, Watanabe T, Allen PB, Kim Young M, Lee SJ, Greengard P, Nairn AC, Kwon YG (2003) PNUTS, a protein Phosphatase 1 (PP1) NUClear Targeting Subunit: Characterization of its PP1 and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 13819–13828.

Kiniwa Y, Li J, Wang M, Sun C, Lee JE, Wang RF, Wang HY (2015) Identification of DRG-1 as a melanoma-associated antigen recognized by CD4+ Th1 cells. *PLoS ONE* 10: 1–14.

Koller-Eichhorn R, Marquardt T, Gail R, Wittinghofer A, Kostrewa D, Kutay U, Kambach C (2007) Human OLA1 defines an ATPase subfamily in the Obg family of GTP-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 282: 19928–19937.

Koopmans M, Martens D, Wijffels RH (2010) Growth efficiency and carbon balance for the sponge *haliclona oculata*. *Marine Biotechnology* 12: 340–349.

- Koziol C, Borojevic R, Steffen R, Muller WEG (1998) Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 100: 107–120.
- Kruse M, Gamulin V, Četković H, Pancer Z, Müller IM, Müller WEG (1996) Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 43: 374–383.
- Kumar S, Iwao M, Yamagishi T, Noda M, Asashima M (1993) Expression of GTP-binding protein gene drg during *Xenopus laevis* development. *International Journal of Developmental Biology* 37: 539–546.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M (1992) Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 185: 1155–1161.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, et al. (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research* 40: 1202–1210.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, Mcgettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Lee M, Hwang YS, Yoon J, Sun J, Harned A, Nagashima K, Daar IO (2019) Developmentally regulated GTP-binding protein 1 modulates ciliogenesis via an interaction with Dishevelled. *Journal of Cell Biology* 218: 2659–2676.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* 317: 41–72.
- Le SQ, Gascuel O (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1307–1320.
- Li B, Trueb B (2000) DRG represents a family of two closely related GTP-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1491: 196–204.
- Ling Z, Chen L, Zhao J (2020) M6A-dependent up-regulation of DRG1 by METTL3 and ELAVL1 promotes growth, migration, and colony formation in osteosarcoma. *Bioscience Reports* 40: 1–12.
- Love GD, Grosjean E, Stalvies C, Fike DA, Grotzinger JP, Bradley AS, Kelly AE, Bhatia M, Meredith W, Snape CE, et al. (2009) Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* 457: 718–721.

Lu L, Lv Y, Dong J, Hu S, Peng R (2016) DRG1 is a potential oncogene in lung adenocarcinoma and promotes tumor progression via spindle checkpoint signaling regulation. *Oncotarget* 7: 72795–72806.

Mahajan MA, Park ST, Sun XH (1996) Association of a novel GTP binding protein, DRG, with TAL oncogenic proteins. *Oncogene* 12: 2343–2350.

Mani M, Lee UH, Yoon NA, Yoon EH, Lee BJ, Cho WJ, Park JW (2017) Developmentally regulated GTP-binding protein 2 is required for stabilization of Rac1-positive membrane tubules. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493: 758–764.

Markolovic S, Zhuang Q, Wilkins SE, Eaton CD, Abboud MI, Katz MJ, McNeil HE, Leśniak RK, Hall C, Struwe WB (2018a) The Jumonji-C oxygenase JMJD7 catalyzes (3S)-lysyl hydroxylation of TRAFAC GTPases. *Nature Chemical Biology* 14: 688–695.

Matsuo Y, Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Becker T, Tanaka K, i sur. (2017) Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nature Communications* 8: 1–13.

Mittenhuber G (2001) Comparative genomics of prokaryotic GTP-binding proteins (the Era, Obg, EngA, ThdF (TrmE), YchF and YihA families) and their relationship to eukaryotic GTP-binding proteins (the DRG, ARF, RAB, RAN, RAS and RHO families). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3: 21–35.

Müller WEG, Böhm M, Grebenjuk VA, Skorokhod A, Müller IM, Gamulin V (2002) Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295: 299–309.

Müller WEG, Schröder HC, Wiens M, Perovic-Ottstadt S, Batel R, Müller IM (2004) Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II—The Benefits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1: 133–144.

Müller WEG, Sobel C, Diehl-Seifert B, Maidhof A, Schröder HC (1987) Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology* 36: 1489–1494.

Nelson BJ, Maas KJ, Dekeyser JL, Stafstrom JP (2009) Association of DRG1 and DRG2 with Ribosomes from Pea, Arabidopsis, and Yeast. *International Journal of Plant Sciences* 170: 834–844.

O’Connell A, Robin G, Kobe B, Botella JR (2009) Biochemical characterization of arabidopsis developmentally regulated G-proteins (DRGs). *Protein Expression and Purification*, 67: 88–95.

Ozimec R, Bedek J, Gottstein S, Jalžić B, Slapnik R, Štamol V, Bilandžija H, Dražina T, Kletečki E, Komerički A, i sur. (2009) *Crvena knjiga ŠPILJSKE FAUNE Hrvatske*. Ministry of Culture, State Institute for Nature Protection, Republic of Croatia.

Pérez-Arellano I, Spínola-Amilibia M, Bravo J (2013) Human Drg1 is a potassium-dependent GTPase enhanced by Lerepo4. *FEBS Journal* 280: 3647–3657.

- Perina D, Herak Bosnar H, Bago R, Mikoč A, Harcet M, Deželjin M, Četković H. (2011) Sponge non-metastatic Group I Nme gene/protein - Structure and function is conserved from sponges to humans. *BMC Evolutionary Biology* 11.
- Perina D, Herak Bosnar M, Mikoč A, Müller WEG, Četković H (2011) Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 384: 451–460.
- Perina D, Četković H, Harcet M, Premzl M, Lukić-Bilela L, Müller WEG, Gamulin V (2006) The complete set of ribosomal proteins from the marine sponge *Suberites domuncula*. *Gene* 366: 275–284.
- Perina D, Korolija M, Hadžija MP, Grbeša I, Belužić R, Imešek M, Morrow C, Marjanović MP, Bakran-Petricioli T, Mikoč A, Četković H (2015) Functional and structural characterization of FAU gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*. *Marine Drugs* 13: 4179–4196.
- Perina D, Korolija M, Mikoč A, Roller M, Pleše B, Imešek M, Morrow C, Batel R, Četković H (2012) Structural and functional characterization of ribosomal protein gene introns in sponges. *PLoS ONE* 7: 1–9.
- Perina D, Mikoč A, Harcet M, Imešek M, Sladojević D, Brcko A, Četković H (2012) Characterization of Bruton's Tyrosine Kinase Gene and Protein from Marine Sponge *Suberites domuncula*. *Croatica Chemica Acta* 85: 223–229.
- Peterson KJ, Cotton JA, Gehling JG, Pisani D (2008) The Ediacaran emergence of bilaterians: Congruence between the genetic and the geological fossil records. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 1435–1443.
- Pfannkuchen M, Brümmer F (2009) Heterologous expression of DsRed2 in young sponges (Porifera). *The International journal of developmental biology* 53: 1113–1117.
- Pleše B, Lukić-Bilela L, Bruvo-Madarić B, Harcet M, Imešek M, Bilandžija H, Četković H (2012) The mitochondrial genome of stygobitic sponge *Eunapius subterraneus*: MtDNA is highly conserved in freshwater sponges. *Hydrobiologia* 687: 49–59.
- Raible F, Tessmar-Raible K, Osoegawa K, Wincker P, Jubin C, Balavoine G, Ferrier D, Benes V, de Jong P, Weissenbach J, Bork P, Arendt D (2005) Evolution: Vertebrate-type intron-rich genes in the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *Science* 310: 1325–1326.
- Renard E, Leys SP, Wörheide G, Borchiellini C (2018) Understanding Animal Evolution: The Added Value of Sponge Transcriptomics and Genomics: The disconnect between gene content and body plan evolution. *BioEssays* 40: 1–10.
- Revilla-I-Domingo R, Schmidt C, Zifko C, Raible F (2018) Establishment of transgenesis in the demosponge *Suberites domuncula*. *Genetics* 210: 435–443.
- Sazuka T, Kinoshita M, Tomooka Y, Ikawa Y, Noda M, Kumar S (1992) Expression of DRG during murine embryonic development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189: 371–377.

Sazuka T, Tomooka Y, Ikawa Y, Noda M, Kumar S (1992) DRG: A novel developmentally regulated GTP-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189: 363–370.

Schellhaus AK (2017) The GTPase DRG1 controls microtubule dynamics and is involved in chromatin decondensation. 7 Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Doctoral thesis.

Schellhaus AK, Moreno-Andrés D, Chugh M, Yokoyama H, Moschopoulou A, De S, Bono F, Hipp K, Schäffer E, Antonin W (2017) Developmentally Regulated GTP binding protein 1 (DRG1) controls microtubule dynamics. *Scientific Reports* 7: 1–16.

Schenker T, Lach C, Kessler B, Calderara S, Truebs B, Trueb B, Truebs B, Trueb B (1994) A novel GTP-binding protein which is selectively repressed in SV40 transformed fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 269: 25447–25453.

Schippers KJ (2013) Sponge cell culture. Wageningen University. Doctoral thesis.

Searfoss A, Dever TE, Wickner R (2001) Linking the 3' Poly(A) Tail to the Subunit Joining Step of Translation Initiation: Relations of Pab1p, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4900–4908.

Simpson TL (1984) The cell biology of sponges. Springer-Verlag, New York

Slattery M, Lesser MP, Brazeau D, Stokes MD, Leichter JJ (2011) Connectivity and stability of mesophotic coral reefs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 408: 32–41.

Van Soest RWM, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, de Voogd NJ, Santodomingo N, Vanhoorne B, Kelly M, Hooper JNA (2012) Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS ONE* 7.

Sollas WJ (1888) “Report on the Tetractinellida collected by H.M.S. Challenger, during the years 1873-1876,” Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–76. *Zoology* 25

Sommer KA, Petersen G, Bautz EKF (1994) The gene upstream of DmRP128 codes for a novel GTP-binding protein of *Drosophila melanogaster*. *MGG Molecular & General Genetics* 242: 391–398.

Srivastava M, Simakov O, Chapman J, Fahey B, Gauthier MEA, Mitros T, Richards GS, Conaco C, Dacre M, Hellsten U, et al. (2010) The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature* 466: 720–726.

Turner EC (2021) Possible poriferan body fossils in early Neoproterozoic microbial reefs. *Nature* 596: 87–91.

Vacelet J, Erpenbeck D, Diaz C, Ehrlich H, Fromont J (2019) New family and genus for Dendrilla-like sponges with characters of Verongiida. Part I redescription of *Dendrilla lacunosa* Hentschel 1912, diagnosis of the new family Ernstillidae and *Ernstilla* n. g. *Zoologischer Anzeiger* 280: 14–20.

Vargas S, Schuster A, Sacher K, Büttner G, Schätzle S, Läubli B, Hall K, Hooper JNA, Erpenbeck D, Wörheide G (2012) Barcoding sponges: An overview based on comprehensive sampling. *PLoS ONE* 7: 1–7.

Verstraeten N, Fauvart M, Versées W, Michiels J (2011) The Universally Conserved Prokaryotic GTPases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 507–542.

Wei D, Yao J, Yang X, Cheng L, Lu D, Xue J (2004) Molecular cloning and expression of two closely related GTP-binding proteins from zebrafish. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping* 15: 246–250.

Weinberg RA (2014) *The Biology of Cancer*. 2nd, illustr edn. Garland Science, New York and London

Westrip CAE, Zhuang Q, Hall C, Eaton CD, Coleman ML (2021) Developmentally regulated GTPases : structure, function and roles in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78: 7219–7235.

Wiens M, Krasko A, Müller CI, Müller WEG (2000) Molecular evolution of apoptotic pathways: Cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships. *Journal of Molecular Evolution* 50: 520–531.

Wiens M, Mangoni A, D’Esposito M, Fattorusso E, Korchagina N, Schröder HC, Grebenjuk VA, Krasko A, Batel R, Müller IM, Müller WEG (2003) The Molecular Basis for the Evolution of the Metazoan Bodyplan: Extracellular Matrix-Mediated Morphogenesis in Marine Demosponges. *Journal of Molecular Evolution* 57: 60–75.

Wörheide G, Dohrmann M, Erpenbeck D, Larroux C, Maldonado M, Voigt O, Borchiellini C, Lavrov DV. (2012) Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera) *Advances in Marine Biology* 61: 1-78.

Wout PK, Sattlegger E, Sullivan SM, Maddock JR (2009) *Saccharomyces cerevisiae* Rbg1 protein and its binding partner gir2 interact on polyribosomes with Gen1. *Eukaryotic Cell* 8: 1061–1071.

Zeng F, Li X, Pires-Alves M, Chen X, Hawk CW, Jin H (2021) Conserved heterodimeric GTPase Rbg1/Tma46 promotes efficient translation in eukaryotic cells. *Cell Reports*, 37

Zhao XF, Aplan PD (1998) SCL binds the human homologue of DRG in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1448: 109–114.

8. ŽIVOTOPIS

Silvestar Beljan rođen je 20. veljače 1992. u Slavonskom Brodu gdje je završio osnovnu školu (Ivan Goran Kovačić) i srednju veterinarsku školu (Matija Antun Reljković). Godine 2010. je upisao preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2013. godine završio je preddiplomski studij i iste godine upisao diplomski studij Genetika i oplemenjivanje životinja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je u rujnu 2015. godine s temom “Genetička varijabilnost zeca (*Lepus europaeus*) u Republici Hrvatskoj”, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vlatke Čubrić Čurik. U studenom 2017. se zaposlio kao viši tehničar u Zavodu za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković.

U listopadu 2018. godine se zaposlio na radnom mjestu asistenta za rad na HRZZ “Projektu razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba doktora znanosti” pod vodstvom mentora dr. sc. Helene Četković i prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka. Iste godine je upisao doktorat te je poslove vezane za doktorat odrađivao u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković i u Zavodu za molekularnu biologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Tokom doktorata sudjelovao je u izradi dva diplomatska rada (od kojih je na jednom neposredni voditelj) te je vodio stručnu praksu studentima Agronomskog fakulteta i Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Prvi je autor jednog znanstvenog rada (**Beljan, S., Dominko, K., Talajić, A. i sur., (2022) Structure and function of cancer-related developmentally regulated GTP-binding protein 1 (DRG1) is conserved between sponges and humans. Scientific Reports**) i jednog preglednog znanstvenog rada (**Beljan, S., Herak Bosnar, M., Četković, H., (2020) Rho Family of Ras-Like GTPases in Early-Branching Animals. Cells**) u časopisima sa međunarodnom recenzijom. Također je koautor jednog znanstvenog rada (**Brajković, V., Beljan, S., Kaštelanac, I., Oršanić, M., Ugarković, D., Čurik, I., Čubrić-Čurik, V. (2017) DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of *Oryctolagus cuniculus* from Croatia. Agriculturae Conspectus Scientificus**) s međunarodnom recenzijom. Tokom studija je održavao vježbe u sklopu kolegija Bioinformatika i kolegija Računalna genomika na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB).