

Kloniranje i ekspresija ljudskog proteina BACH2 u bakterijskim i animalnim stanicama

Ivanković, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:317542>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Ivanković

Kloniranje i ekspresija ljudskog proteina BACH2 u
bakterijskim i animalnim stanicama

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš i neposrednim vodstvom dr. sc. Melanije Posavec Marjanović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

KLONIRANJE I EKSPRESIJA LJUDSKOG PROTEINA BACH2 U BAKTERIJSKIM I ANIMALNIM STANICAMA

Nina Ivanković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ljudski protein BACH2 transkripcijski je faktor specifično eksprimiran u makrofagima, limfocitima T i B. U limfocitima B, BACH2 regulira ranu diferencijaciju limfocita B iz zajedničkog multipotentnog progenitora i terminalnu diferencijaciju plazma stanice iz zrelog limfocita B. Cjelogenomske asocijacijske studije (GWAS) povezale su gen *BACH2* s *N*-glikozilacijom imunoglobulina G (IgG) te s nekim upalnim bolestima poput upalnih bolesti crijeva, reumatodnog artritisa i sistemskog lupusa eritematodesa. Alternativna glikozilacija antitijela IgG određuje njegovu funkciju – dodatak galaktoze i sijalinske kiseline na glikansku strukturu daje antiupalno djelovanje ovom antitijelu. Gen *BACH2* također je uključen u imunostazu i imunosenescenciju, a poznato je da tijekom imunosenescencije antitijelo IgG postaje proupalno. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP) u genu *BACH2* povezan je s galaktozilacijom glikana na antitijelu IgG, što čini ovu molekulu proupalnom. Stoga su potrebne detaljne funkcionalne studije koje bi utvrdile točnu ulogu gena *BACH2* u glikozilaciji IgG-a povezanu s njegovom funkcijom u upalnim bolestima te u imunosenescenciji. Cilj istraživanja provedenih u sklopu ovog diplomskog rada bilo je klonirati i eksprimirati protein BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* te prekomjerno eksprimirati ovaj protein u animalnim stanicama *HEK293T*.

(58 stranice, 29 slika, 12 tablica, 34 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: BACH2, transkripcija, glikani, upalne bolesti

Voditelj: dr. sc. Vlatka Zoldoš, prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Melanija Posavec Marjanović, poslijedoktorand

Ocjenitelji: dr. sc. Vlatka Zoldoš, prof., dr. sc. Nada Oršolić, prof., dr. sc.

Damjan Franjević, izv. prof.

Rad prihvaćen: 8. 6. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN BACH2 PROTEIN IN BACTERIAL AND ANIMAL CELLS

Nina Ivanković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Human protein BACH2 is a transcription factor specifically expressed in macrophages and T and B lymphocytes. In B lymphocytes, BACH2 regulates early differentiation of B lymphocyte from common multipotent progenitor and terminal differentiation of plasma cells from naive B lymphocyte. Genome-wide association studies (GWAS) associated *BACH2* gene with N-glycosylation of immunoglobulin G (IgG), as well as with some inflammatory diseases such as inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Alternative glycosylation of IgG defines its function – addition of galactose and sialic acid on glycan structure regulates antiinflammatory function of the antibody. The *BACH2* gene is shown to be implicated in immune homeostasis and immunosenescence, during which IgG becomes proinflammatory. Single nucleotide polymorphisms (SNP) in *BACH2* gene have been associated with galactosylation of glycans on IgG which makes this molecule proinflammatory. To unravel the exact role of *BACH2* gene in glycosylation of IgG associated with its function in inflammatory diseases and immunosenescence, more detailed functional studies are needed. The goal of the investigations conducted within this graduation thesis was to clone and to express BACH2 protein in bacterial cells *Rosetta* and to overexpress the same protein in animal *HEK293T* cells.

(58 pages, 29 figures, 12 tables, 34 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: BACH2, transcription, glycans, inflammatory disease

Supervisor: dr. sc. Vlatka Zoldoš, prof.

Assistant Supervisor: dr. sc. Melanija Posavec Marjanović, postdoctoral student

Reviewers: dr. Vlatka Zoldoš, Prof., dr. Nada Oršolić, Prof., dr. Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 8. 6. 2017.

Sadržaj

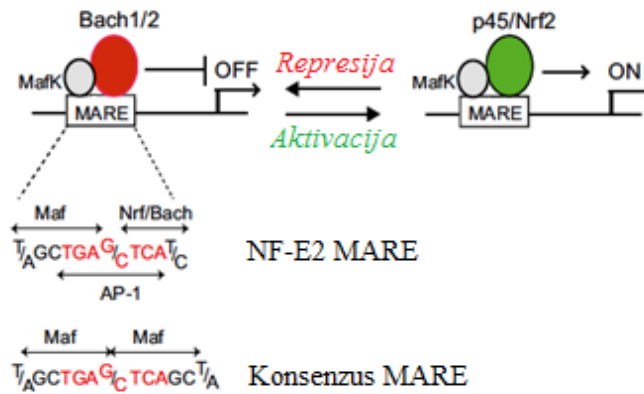
1. Uvod	1
1.1. Transkripcijski faktor <i>BACH2</i>	1
1.2. Biološka uloga proteina <i>BACH2</i>	3
2. Cilj istraživanja	8
3. Materijal i metode	9
3.1. Plazmidi i bakterijske stanice <i>XL10 Gold</i> i <i>Rosetta</i>	9
3.2. Kloniranje sekvence <i>BACH2</i> u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG	11
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom	11
3.2.2. Izolacija DNA fragmenata iz agaroznog gela	13
3.2.3. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama	13
3.2.4. Pročišćavanje DNA iz reakcija enzimatske razgradnje	14
3.2.5. Ugradnja sekvence <i>BACH2</i> u vektore	14
3.2.6. Transformacija stanica <i>XL10 Gold</i>	15
3.2.7. Identifikacija pozitivnih klonova	15
3.2.7.1. Lančana reakcija polimerazom u bakterijskim klonovima	15
3.2.7.2. Umnažanje i izolacija plazmidne DNA	16
3.2.7.3. Restrikcijska analiza plazmidne DNA	17
3.2.7.4. Sekvenciranje	18
3.3. Ekspresija proteina <i>BACH2</i> u bakterijskim stanicama	20
3.3.1. Transformacija bakterijske kulture <i>Rosetta</i>	20
3.3.2. Indukcija sinteze proteina 6xHis- <i>BACH2</i>	20
3.4. Prekomjerna ekspresija proteina <i>BACH2</i> u animalnim stanicama	21
3.4.1. Uzgoj animalnih stanica i priprema za transfekciju	21
3.4.2. Transfekcija i sakupljanje taloga animalnih stanica	22
3.5. Detekcija proteina	23
3.5.1. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza	23
3.5.2. Detekcija proteina 6xHis- <i>BACH2</i>	24
3.5.3. Transfer i detekcija proteina FLAG- <i>BACH2</i>	24
4. Rezultati	26
4.1. Provjera ugradnje kodirajućeg slijeda gena <i>BACH2</i> u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG	26
4.2. Provjera ekspresije proteina u bakterijskim i animalnim stanicama	45
4.2.1. Provjera ekspresije proteina 6xHis- <i>BACH2</i>	45
4.2.2. Provjera prekomjerne ekspresije proteina FLAG- <i>BACH2</i>	46
5. Rasprava	48
6. Zaključak	51
7. Literatura	52
8. Životopis	58

1. Uvod

1.1. Transkripcijski faktor BACH2

Ljudski protein *BTB domain and CNC homolog 2* (BACH2) kodiran je genom *BACH2* pozicioniranim na šestom kromosomu (baza podataka *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)). Transkripcija protein kodirajućeg gena *BACH2* regulirana je epigenetički (Kuwahara i sur. 2014) i omogućava sintezu glasničke RNA s 2526 nt dugom kodirajućom sekvencom gena *BACH2* (baza podataka NCBI). Translacijom kodirajuće sekvence nastaje ljudski protein BACH2 veličine 92,5 kDa (baza podataka *UniProt*) koji se sastoji od dvije podjedinice, *Broad-Complex*, *Tramtrack and Bric a brac* (BTB) i *Cap 'n' collar* (CNC).

Unutar konzervirane domene CNC motiv osnovnog leucinskog zatvarača omogućava interakciju proteina BACH2 s transkripcijskim faktorima iz obitelji MAF, specifično MAFF, MAFG i MAFK koji pripadaju skupini malih proteina MAF. S malim proteinima MAF BACH2 prepoznaje i veže se na DNA element Maf duljine 13 bp konsenzus sekvence 5'-TGC-TGA^G/_CTCA-GCA-3' (Slika 1) (Igarashi i sur. 2014). Na elementu DNA Maf mali proteini MAF prepoznaju i vežu se na dinukleotid GC, a BACH2 prepoznaje i veže se na podcrtani dio sekvence, DNA element TPA (od engl. *Tetradecanoylphorbol 13-acetate*, Kurokawa i sur. 2009). DNA element Maf nalazi se u promotoru (Huang i sur. 2014) ili regiji pojačivača (Muto i sur. 1998, Roychoudhuri i sur. 2016) brojnih protein kodirajućih gena čija je transkripcija regulirana proteinom BACH2.



Slika 1. BACH1/2 i p45/Nrf2 heterodimeri s malim proteinom MAF, MafK, prepoznaju i vežu se na DNA element Maf (MARE) te inhibiraju odnosno aktiviraju ekspresiju gena. Postoje dva tipa MARE, NF-E2 i konsenzus koji sadrže DNA element TPA. DNA element TPA uz navedene heterodimere prepoznaju i vežu se na proteini AP-1 (dimeri proteina Jun-Fos). Preuzeto iz Igarashi i sur. 2014.

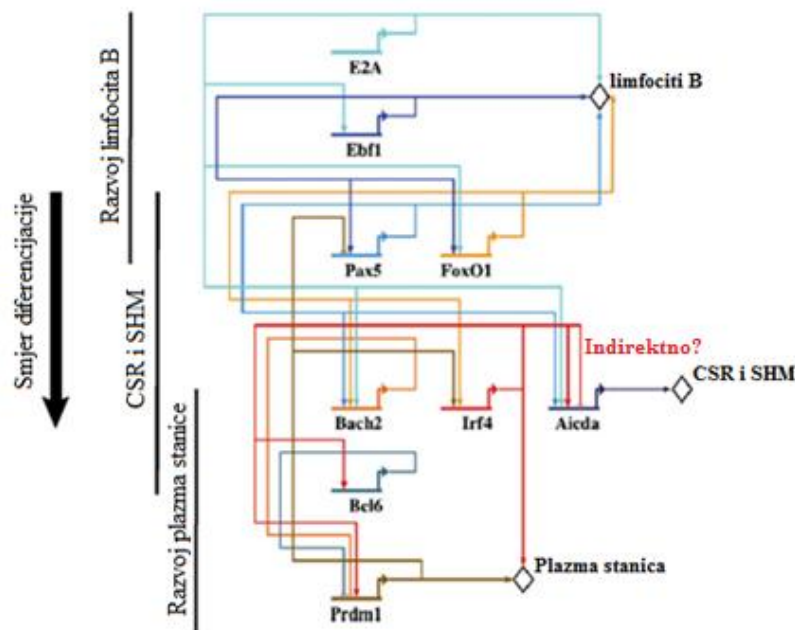
Za uspješnu aktivaciju ili inhibiciju transkripcije određenih gena, BACH2 putem domene BTB ostvaruje dodatne proteinske interakcije sa specifičnim kofaktorima. Transkripcijski kofaktori koji aktiviraju transkripciju gena nisu identificirani, ali su zato poznati proteini NCoR1 (od engl. *Nuclear Receptor Corepressor 1*) i/ili NCoR2, Rif1 (od engl. *Replication Timing Regulatory Factor 1*) te Arid1a (od engl. *AT-Rich Interaction Domain 1A*) i Smarcd2 (od engl. *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2*, baza podataka *Gene Cards*) koji dodatnim interakcijama inhibiraju transkripciju gena *PRDM1* u zrelih limfocitima B. Proteini NCoR1 i/ili NCoR2 dodatnom interakcijom s HDAC3 (od engl. *Histone deacetylase 3*) i Rif1 dodatnom interakcijom s NAD⁺ ovisnim histonskim deacetilazama Sirt3 (od engl. *sirtuin 3*) i Sirt7 te histonskom metiltransferazom Setdb1 (od engl. *SET Domain Bifurcated 1*, baza podataka *Gene Cards*) inhibiraju transkripciju gena *PRDM1* deacetilacijom lizina na položaju 9 histona 3 (H3K9). Deacetilacijom H3K9 omogućava se njegova metilacija koja dovodi do promjene u strukturi kromatina iz transkripcijski aktivne u transkripcijski inaktivnu (Wang i sur. 2008, Tanaka i sur. 2016.). Uz epigenetičke promjene na H3K9, BACH2 interakcijom s Arid1a i Smarcd2, koji su dio proteinskog kompleksa SWI/SNF koji remodelira kromatin, inhibira transkripciju gena *PRDM1* remodeliranjem kromatina (Tanaka i sur. 2016).

1.2. Biološka uloga proteina BACH2

Biološka uloga proteina BACH2 je, pored interakcije BACH2 s malim proteinima MAF i transkripcijskim kofaktorima, definirana specifičnom ekspresijom proteina BACH2. U čovjeka protein BACH2 je eksprimiran u plućima, specifično plućnim makrofagima (Nakamura i sur. 2013), te u limfnim organima, specifično hematopoetskim matičnim stanicama i multipotentnim progenitorima (Itoh-Nakadai i sur. 2017), progenitorskim, prekursorskim i zrelim limfocitima B (Muto i sur. 1998) te pomoćničkim i citotoksičnim limfocitima T (Tsukumo i sur. 2013).

Protein BACH2 ekspresijom u hematopoetskim matičnim stanicama i multipotentnim progenitorima inhibira ekspresiju gena potrebnih za održavanje matičnosti multipotentnih progenitora te za diferencijaciju i održavanje identiteta stanica mijeloidne linije, a aktivira gene potrebne za diferencijaciju zajedničkog limfoidnog progenitora i progenitorskih limfocita B (Itoh-Nakadai i sur. 2017).

Uz ranu diferencijaciju progenitorskih limfocita B, protein BACH2 je odgovoran za terminalnu diferencijaciju zrelih limfocita B u plazma stanice. Nakon primarne imunizacije limfociti B prolaze kroz niz dioba tijekom kojih protein BACH2 direktnim produljivanjem ekspresije gena *Pax5*, indirektnom aktivacijom gena *Aicda* koji kodira za citidin deaminazu AID, direktnom inhibicijom gena *PRDM1* (uz protein Bcl6, Huang i sur. 2014), i indirektnom inhibicijom ekspresije *Irf4* omogućava rekombinaciju teškog imunoglobulinskog lanca (Muto i sur. 2010). Uz rekombinaciju teškog imunoglobulinskog lanca BACH2 je odgovoran i za somatsku hipermutaciju (Muto i sur. 2004), za koju nije istražen molekularni mehanizam, ali koja je potrebna za prepoznavanje i vezanje antitijela na strani antigen različitim afinitetom (Slika 2) (Andreis i sur. 2010).

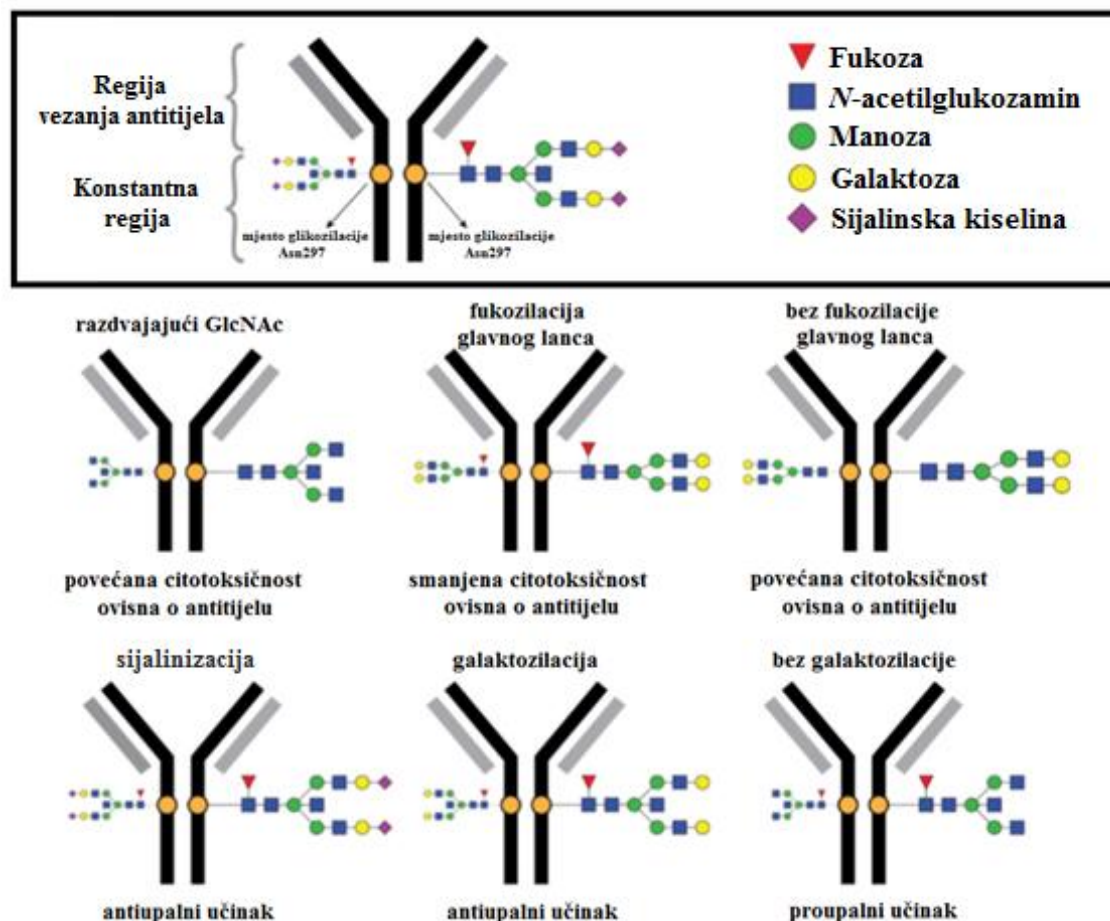


Slika 2. Genska regulatorna mreža potrebna za razvoj limfocita B, rekombinaciju teškog imunoglobulinskog lanca (CSR) i somatsku hipermutaciju (SHM) te razvoj plazma stanice. Preuzeto iz Igarashi i sur. 2014.

Rekombinacijom teškog imunoglobulinskog lanca u plazma stanicama se sintetiziraju imunoglobulini (antitijela) klase A, E i G, a izostankom rekombinacije u plazma stanicama se proizvode imunoglobulini klase D i M (Andreis i sur. 2010). Izostanak rekombinacije tijekom diferencijacije limfocita B posljedica je lokalizacije proteina BACH2 u citosolu (Muto i sur. 2010) do koje dolazi fosforilacijom proteina BACH2 (Yoshida i sur. 2007).

Najzastupljeniji imunoglobulin u ljudskom serumu i glavni imunoglobulin sekundarne imunizacije je imunoglobulin G. Biološka uloga IgG-a definirana je konstantnom domenom (Fc), a podrazumijeva neutralizaciju virusa i bakterijskih toksina, aktiviranje komplementa i povećavanje efikasnosti fagocitoze patogena njihovom opsonizacijom (Andreis i sur. 2010). Imunoglobulin G poznat je po specifičnoj *N*-glikozilaciji asparagina na poziciji 297 (Asn297) domene Fc IgG-a, ali i po glikozilaciji Fab domene. Osnovna struktura *N*-glikana na Asn297 sastoji se od *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i manoze na koje se naknadno dodaju fukoza, razdvajajući GlcNAc, galaktoza i/ili sijalinska kiselina (Slika 3) (Bondt i sur. 2014). Fukozilacijom imunoglobulina G smanjuje se broj interakcija između domene Fc i receptora Fc γ te citotoksičnost ovisna o antitijelu (Shields i sur. 2002). Veća citotoksičnost ovisna o antitijelu primijećena je dodatkom razdvajajućeg GlcNAc (Shinkawa i sur. 2003) dok se

galaktozilacijom blokira upala aktivirana komplementom (Karsten i sur. 2012). Dodatkom sijalinske kiseline na galaktozu inhibira se vezanje domene Fc s receptorom Fcγ, ali se i održava antiupalna aktivnost imunoglobulina G (Slika 3) (Kaneko i sur. 2006).



Slika 3. Alternativna *N*-glikozilacija imunoglobulina G određuje njegovu funkciju. U pravokutniku je prikazano antitijelo s *N*-glikanom kovalentno povezanim za asparagin na poziciji 297 sa kombinacijom ugljikohidrata čije su oznake također navedene u pravokutniku. Ispod pravokutnika prikazana su antitijela specifične strukture *N*-glikana i spomenut je njihov učinak na citotoksičnost ovisnu o antitijelu i upalni odgovor. GlcNAc je oznaka za *N*-acetilglukozamin, Asn297 je oznaka za mjesto glikozilacije, aminokiselinu asparagin na poziciji 297. Preuzeto iz Lauc i sur. 2016.

Antiupalan učinak galaktozilacije Asn297 u imunoglobulinu G zamijećen je u određenim upalnim bolestima pa je tako razina galaktozilacije, ali i sijalinizacije, imunoglobulina G smanjena u upalnim bolestima crijeva, Crohnoj bolesti i ulcerativnom kolitisu (Trbojević Akmačić i sur. 2015), i u autoantitijelima u reumatoidnom artritisu i to čak 3,5 godina prije pojave simptoma bolesti (Ercan i sur. 2010). U reumatoidnom artritisu smanjena

galaktozilacija uzrokuje aktivaciju komplementa vezanjem proteina MBP (od engl. *mannose-binding protein*) na domenu Fc antitijela (Malhotra i sur. 1995). Do smanjene galaktozilacije dolazi i u autoimunoj bolesti sistemskom lupusu eritematodesu, a povećani broj simptoma odnosno komplikacija poput upale perikarda i proteinurije korelira sa smanjenim udjelom glikana sa galaktozom, sijalinskom kiselinom te povećanim udjelom glikana s razdvajajućim *N*-acetilglukozaminom u oboljelih osoba (Vučković i sur. 2015).

Osim u gore navedenim bolestima, do smanjenja razine galaktozilacije dolazi i tijekom starenja. Razina galaktozilacije IgG povećana je u djetinjstvu i adolescenciji (Pučić i sur. 2012) dok se u srednjim ili kasnim dvadesetim godinama se počinje kontinuirano snižavati, i do 50 %, a najviše smanjenje izraženo je u žena predmenopauzne dobi (Krištić i sur. 2014). Smanjenom razinom galaktozilacije tijekom starenja povećava se razina proupalnih imunoglobulina G koji potiču nastanak i održavanje upalnog odgovora, jedne od karakteristika starenja imunološkog sustava (De Martinis i sur. 2005).

Lauc i sur. su 2013. godine cjelogenomskom asocijacijskom studijom povezali galaktozilaciju IgG-a s *BACH2*, a uloga *BACH2* je identificirana provedbom GWAS na oboljelima od Crohnove bolesti (Franke i sur. 2010) i sistemskog lupusa eritematodesa (Yang i sur. 2013). Pošto do smanjene razine galaktozilacije u IgG dolazi i tijekom starenja (Krištić i sur. 2014) još je veća važnost otkrića molekularnog mehanizma kojim se regulira glikozilacija IgG, a time i biološka uloga *BACH2* u regulaciji upalnog odgovora. Uloga *BACH2* u inhibiciji upale već je utvrđena u pomoćničkim limfocitima T u kojima se uklanjanjem gena *BACH2* pojačano luče proupalni citokini i proangiogeni faktori i povećava aktivnost β -galaktozidaze povezane sa starenjem (od engl. *Senescence Associated β -galactosidase*) (Kuwahara i sur. 2014).

U grupi prof. Zoldoš intenzivno se istražuje je li *BACH2* uključen u *N*-glikozilaciju imunoglobulina G. Bioinformatička analiza napravljena u grupi otkrila je potencijalne ciljne gliko-gene (gene uključene u *N*-glikozilaciju) za vezanje *BACH2*. U interesu je eksperimentalno dokazati interakciju ovih gena s *BACH2* kako bi se utvrdila njegova uloga transkripcijskog faktora u regulaciji ekspresije određenih galakoziltransferaza (kodiraju dodavanje galaktoze na antene postojeće glikanske strukture) (Tablica 1).

Tablica 1. Vežanje proteina AP1, NF-E2 i BACH2 na gene β -1,4-galaktoziltransferaza 1-7 (B4galt1-7) potencijalno uključene u *N*-glikozilaciju.

	gen	AP1	NF-E2	BACH2
1	B4galt1	1	1	0
2	B4galt2	2	0	1
3	B4galt3	0	0	0
4	B4galt4	0	1	1
5	B4galt5	2	0	0
6	B4galt6	0	0	0
7	B4galt7	0	0	0

2. Cilj istraživanja

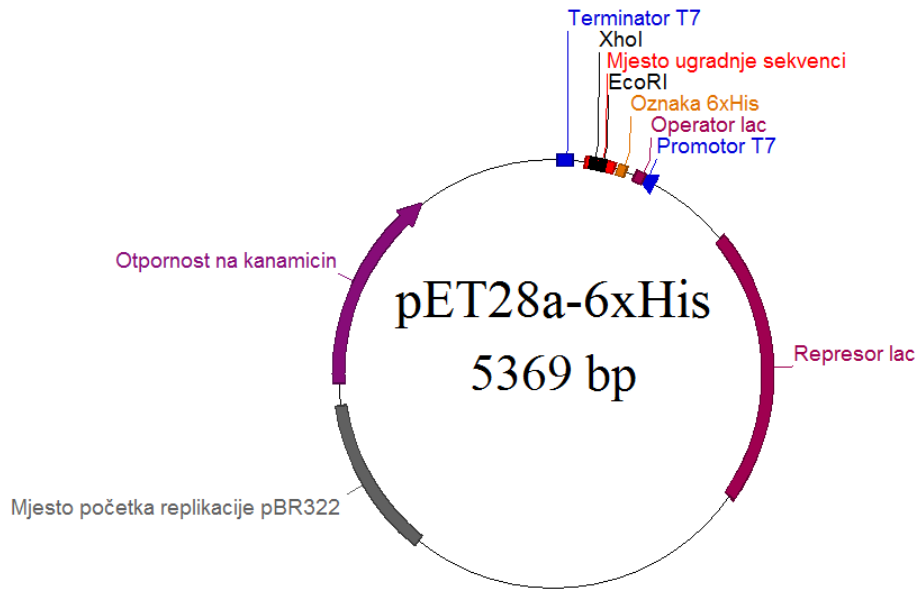
Cjelogenomska asocijacijska studija glikoma IgG povezala je gen *BACH2* s nekim aspektima glikozilacije imunoglobulina G (galaktozilacijom i sijalinizacijom) koje čine ovo antitijelo antiupalnim. Također, studije GWA su povezale ovaj gen s brojnim autoimunim i upalnim bolestima povezanim sa starenjem, sugerirajući time da bi *BACH2* mogao biti uključen u regulaciju glikozilacije antitijela IgG, te je na taj način *BACH2* i impliciran u upalne bolesti povezane sa starenjem. Bioinformatička analiza identificirala je nekoliko galaktoziltransferaza, a koje imaju ciljne sekvence za vezanje transkripcijskog faktora *BACH2*.

Kao dio opsežnijeg istraživanja proveden je ovaj diplomski rad sa specifičnim ciljem ekspresije proteina *BACH2* u bakterijskim stanicama *Rosetta* te prekomjerne ekspresije ovog proteina u animalnim stanicama *HEK293T* u svrhu korištenja u daljnim istraživanjima koja uključuju traženje interakcijskih partnera *BACH2*.

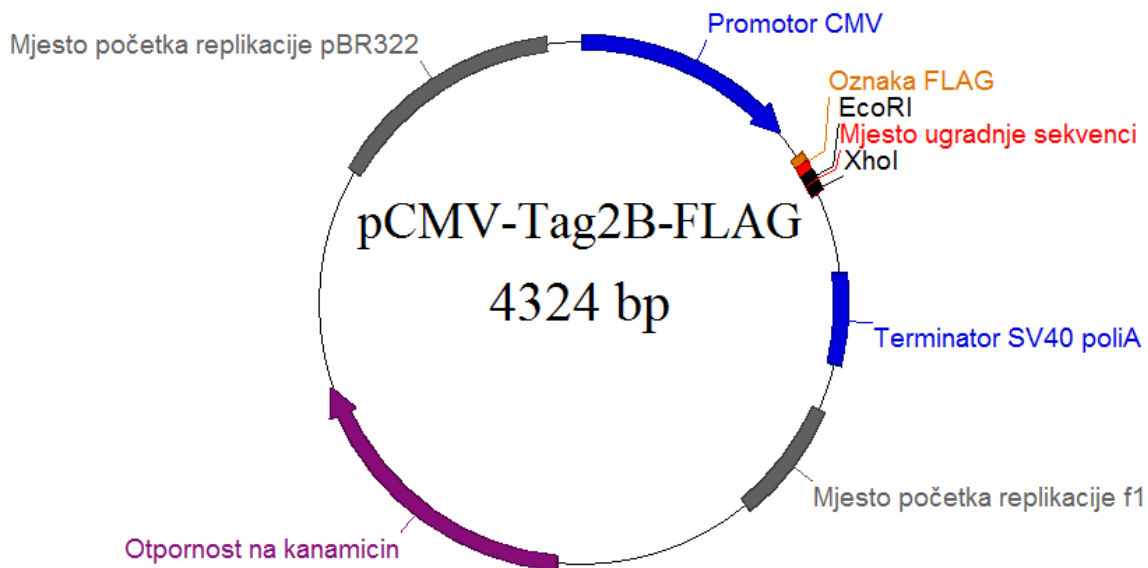
3. Materijal i metode

3.1. Plazmidi i bakterijske stanice *XL10 Gold* i *Rosetta*

Kodirajuća sekvenca gena *BACH2* ugrađena je u ekspresijske vektore pET28a-6xHis (Slika 4) i pCMV-Tag2B-FLAG (Slika 5) (poklon dr.sc. Marcusa Buschbecka, Barcelona).



Slika 4. Prikaz vektora pET28a-6xHis. Plazmid se replicira u bakterijskim stanicama putem mjesta početka replikacije pBR322. Transkripcija ugrađene sekvence započinje s promotora T7 reguliranog represorom *lac* nakon transformacije bakterija koje transformacijom postaju otporne na kanamicin. Protein BACH2 sintetizira se s N-terminalnom oznakom 6xHis sa sekvence pozicionirane uzvodno od ugrađene. Vektor je napravljen u programu *A plasmid Editor* prema sekvenci i vektorskoj mapi pohranjenima u bazi podataka vektora *Addgene*.



Slika 5. Prikaz plazmida pCMV-Tag2B-FLAG. Transformacijom bakterija navedenim vektorom bakterije postaju otporne na kanamicin te se s mjesta početka replikacije pBR322 replicira plazmid. S mjesta početka replikacije f1 vektor se replicira u animalnim stanicama u kojima dolazi do transkripcije uzvodne sekvence za oznaku FLAG i ugrađene sekvence s poliA repom putem promotora CMV (skraćeno od engl. *Cucumber Megalovirus*) i terminatora SV40 (skraćeno od *Simian virus 40*) sa sekvencom poliA. Shema vektora napravljena je na temelju sekvence i vektorske mape pohranjene u bazi podataka *Addgene* u programu *A plasmid Editor*.

Stanice *XL10 Gold* transformirane ekspresijskim vektorima pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG uzgojene su u prekononočnoj kulturi u tekućem mediju *Luria-Bethani* (LB: 1 % triptona (BD), 0,5 % ekstrakta kvasca (BD), 170 mM natrijeva klorida (Gram-Mol)) ili na krutoj podlozi LB (tekući medij LB s 1,5 % agara (BD)) uz dodatak kanamicin sulfata (Gibco) u koncentraciji 25 µg/ml.

Za sintezu proteina 6xHis-BACH2 s plazmida pET28a-6xHis s ugrađenim genom *BACH2* korištene su kemijski kompetentne stanice *Rosetta* (Novagen). Za pravilnu sintezu proteina 6xHis-BACH2, stanice *Rosetta* sadrže vektor pRARE s kodirajućom sekvencom za otpornost na kloramfenikol i kodirajućom sekvencom za transportne RNA s kodonima rijetko prisutnim u stanici. Zbog plazmida pRARE bakterijske stanice *Rosetta* su uzgojene na krutoj podlozi i u tekućem mediju LB s kanamicin sulfatom u navedenoj koncentraciji i kloramfenikolom (SIGMA) u koncentraciji 34 µg/ml.

3.2. Kloniranje sekvence *BACH2* u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG

3.2.1. Lančana reakcija polimerazom

Za umnažanje kodirajuće sekvence *BACH2* s restrikcijskim mjestima za restrikcijske endonukleaze *EcoRI* i *XhoI* korištene su napredna i nazadna početnica (Macrogen, Tablica 2), DNA polimeraza *Herculase II Fusion* brzine sinteze 1 kb/min i ostale komponente kompleta za lančanu reakciju polimerazom (*Herculase II Fusion with dNTP`s Combo*, Agilent tech.) te dvije komplementarne DNA iz limfoblastoidnih stanica NALM-1. Jedna komplementarna DNA sintetizirana je nasumičnim heksamerima, a druga početnicama oligo(dT).

Tablica 2. Sekvence i temperature taljenja (T_m) napredne i nazadne početnice korištene u lančanoj reakciji polimerazom. Dio sekvence početnica odgovoran za specifično umnažanje sekvence *BACH2* označen je crvenom bojom dok je plavom bojom označeno restrikcijsko mjesto za restrikcijsku endonukleazu *EcoRI* u naprednoj odnosno restrikcijsko mjesto restrikcijske endonukleaze *XhoI* u nazadnoj početnici.

Početnica	Sekvenca	$T_m / ^\circ\text{C}$
Napredna	5`CGGGAATTCAGTCTGTGGATGAGAAGCCTGACTC3`	60
Nazadna	5`GCGCTCGAGCTAGGTATAATCTTTCCTGGGCTGTTC3`	57

Radi provjere uspješnosti umnažanja *BACH2* u uvjetima korištenja različitih komplementarnih DNA i različitih temperatura prijanjanja početnica pripremljene su tri reakcije u volumenu od 50 μl (Tablica 3). U prvu reakciju dodane su dvije komplementarne DNA, jedna sintetizirana nasumičnim heksamerima, a druga početnicom oligo(dT). U drugu i treću reakciju dodana je komplementarna DNA sintetizirana početnicom oligo(dT). Za prvu i drugu reakciju umnažanja *BACH2* korištena je temperatura prijanjanja početnica od 53 $^\circ\text{C}$, a za treću reakciju temperatura prijanjanja od 56 $^\circ\text{C}$. Umnažanje je provedeno u termobloku (*ProFlex PCR Systems*, Life Technologies), a potpuni program umnažanja *BACH2* nalazi se u Tablici 4.

Tablica 3. Koncentracije komponenata pripremljenih lančanih reakcija polimerazom.

Komponente reakcije	Radna koncentracija
Komplementarna DNA	100 ng/reakcija
Napredna početnica	0,25 μ M
Nazadna početnica	0,25 μ M
dNTP	1 mM (250 μ M svaki dNTP)
Pufer za polimerazu	1 x
<i>Herculase II Fusion</i>	5 U/reakcija
<i>MiliQ</i> voda	/

Tablica 4. Program za lančanu reakciju polimerazom.

Proces	Temperatura / °C	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
	95	2 min	1 ciklus
Denaturacija	95	20 s	30 ciklusa
Prijanjanje početnica	53	30 s	
	56		
Elongacija	68	2 min i 45 s	
Terminacija	72	5 min	1 ciklus
	10	∞	

Nakon lančane reakcije polimerazom, produkti umnažanja pomiješani su s fluorescentnom zelenom bojom (*SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain*, Invitrogen) i nanešeni na 0,8 %-tni agarozni gel (*Agarose*, SIGMA). Za elektroforezu je korišten pufer koji sadrži 40 mM Tris-hidroksimetilaminometan (Tris-HCl, Fisher Chemical) pH 8,3 i 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA, ROTH)). U pojedinu jažicu gela je radi potvrde uspješnosti reakcije umnažanja ispipetirana 1/10 ukupnog volumena, a za izrezivanje sekvence *BACH2* veličine 2,5 kb iz gela 9/10 ukupnog volumena pojedine reakcije. Na gel je uz uzorke nanesen i marker za DNA (*MassRuler DNA Ladder Mix*, Thermo Fisher Scientific).

Fluorescentna zelena boja omogućava vizualizaciju DNA izlaganjem gela plavoj i ultraljubičastoj svjetlosti. Plava svjetlost u usporedbi sa 100 %-tnom ultraljubičastom svjetlosti izaziva manje mutacija u DNA zbog manje količine energije te je stoga korištena za izrezivanje umnožene *BACH2* iz gela dok je radi fotografiranja gel izložen 100 %-tnoj ultraljubičastoj svjetlosti.

3.2.2. Izolacija DNA fragmenata iz agaroznog gela

Iz tri izrezana fragmenta agaroznog gela umnožena sekvenca *BACH2* je izolirana kompletom za izolaciju DNA iz agaroznog gela (*GenElute Gel Extraction Kit*, SIGMA). Postupak izolacije sastoji se od 4 glavna koraka. (1) Na gel je u svrhu razgradnje dodana otopina za razgradnju gela u volumenu tri puta većem od težine uzoraka te je gel razgrađen tijekom 10 min pri temperaturi od 50 °C. (2) Tijekom razgradnje gela vezujuće kolone su aktivirane dodatkom 500 µl otopine za aktivaciju vezujuće kolone i centrifugiranjem kolona pri maksimalnoj brzini centrifuge u trajanju od 1 min. (3) Na razgrađeni gel je radi taloženja DNA dodan 100 %-tni izopropanol (ROTH) u volumenu jednakom početnoj težini uzoraka, uzorci su vorteksirani i naneseni na vezujuće kolone te je provedeno centrifugiranje od 1 min i 30 s. Radi boljeg uklanjanja gela i drugih nečistoća kolone s DNA isprane su sa 700 µl otopine za ispiranje i centrifugirane 1 min. Pošto otopina za ispiranje također smanjuje čistoću prikupljene DNA, za njeno što bolje uklanjanje ponovljeno je centrifugiranje praznih kolona. (4) Za prikupljanje DNA na kolone je dodano 50 µl pufera za otapanje adsorbirane DNA prethodno zagrijanog na 65 °C. Radi prikupljanja što veće količine DNA kolone su prije centrifugiranja od 2min inkubirane 1 min u puferu. Koncentracija DNA izmjerena je spektrofotometrom (*NanoVue Plus Spectrophotometer*, GE Healthcare Life Sciences), a vrijednosti izmjerenih koncentracija normalizirane su puferom za otapanje adsorbirane DNA.

3.2.3. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

500 ng izolirane *BACH2* te 475 ng vektora pET28a-6xHis i 600 ng pCMV-Tag2B-FLAG razgrađeno je u pojedinačnim reakcijama od 30 µl restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* (NEB) i *XhoI* (NEB) koncentracije 1 U/reakcija u 1 x puferu NEB3.1 (NEB). Razgradnja DNA je provedena na temperaturi od 37 °C tijekom 90 min, a za inaktivaciju restrikcijskih endonukleaza reakcije su inkubirane 20 min pri 65 °C.

Uz navedene reakcije, istovremeno su pripremljene i provedene kontrolne reakcije s nepocijepanim vektorima pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG i s jednostruko pocijepanim plazmidom pCMV-Tag2B-FLAG radi potvrde enzimatske aktivnosti upotrijebljenih restrikcijskih endonukleaza. Za jednostruko cijepanje plazmida pCMV-Tag2B-FLAG korištene su spomenute restrikcijske endonukleaze.

5 µl pojedine reakcije pomiješane s 2 µl boje za nanošenje uzoraka na gel (*Coral Load Dye*, QIAgen) i marker za DNA (*MassRuler DNA Ladder Mix*, Thermo Fisher Scientific) ispipetirano je na 0,8 %-tni agarozni gel. Radi vizualizacije DNA gel je nakon elektroforeze inkubiran u otopini etidij bromida koncentracije 5 µg/ml i fotografiran pri 100%-tnoj ultraljubičastoj svjetlosti.

3.2.4. Pročišćavanje DNA iz reakcija enzimatske razgradnje

Prije ugradnje *BACH2* u vektore, *BACH2* i vektori razgrađeni restrikcijским endonukleazama *EcoRI* i *XhoI* pročišćeni su od komponenata reakcija razgradnje kompletom za pročišćavanje DNA (*High Pure PCR Cleanup Micro Kit*, Roche) u 3 koraka. (1) U pojedini uzorak je do 100 µl dodana *MiliQ* voda te je za poboljšavanje vezanja DNA na kolonu u uzorke dodano 200 µl pufera za vezanje DNA i 200 µl pufera za poboljšano vezanje DNA na kolonu. Nakon nanošenja uzorka na kolone i centrifugiranja na 8000 rpm u trajanju od 1 min (2) kolone su dvaput isprane s 400 µl pufera za ispiranje, a prazne kolone su potom dodatno centrifugirane pri maksimalnoj brzini centrifuge radi prikupljanja DNA veće čistoće. (3) Za prikupljanje DNA, na kolonu je dodano 20 µl pufera za otapanje adsorbirane DNA te su kolone inkubirane u puferu 1 min prije centrifugiranja pri brzini od 8000 rpm. Pufer za otapanje adsorbirane DNA korišten je za normalizaciju koncentracije DNA izmjerene spektrofotometrom.

3.2.5. Ugradnja sekvence *BACH2* u vektore

Za ugradnju pročišćene sekvence *BACH2* veličine 2,5 kb u vektore pET28a-6xHis veličine 5,4 kb (Slika 4) i pCMV-Tag2B-FLAG veličine 4,3 kb (Slika 5) pripremljene su reakcije ugradnje molarnog omjera *BACH2* i vektora 3:1 s enzimom DNA ligaza T4 i puferom za DNA ligazu (TaKaRa). Kontrolne reakcije pripremljene su identično reakcijama ugradnje, osim što nisu sadržavale dodan *BACH2*. Navedene reakcije od 20 µl (Tablica 5) inkubirane su 1 h na sobnoj temperaturi.

Tablica 5. Koncentracije komponenata dodanih u pojedine reakcije.

Komponente reakcije	Radna Koncentracija
<i>BACH2</i>	39,5 ng
Vektor	25 ng
Enzim T4 ligaza	1,25 U/reakcija
Pufer za ligazu	1 x
<i>AccuGene</i> voda	/

3.2.6. Transformacija stanica *XL10 Gold*

Reakcije ugradnje i kontrolne reakcije pripremljene u prethodnom koraku korištene su u transformaciji kemijski kompetentne bakterijske kulture *XL10 Gold*. Spomenute reakcije su nakon temperiranja dodane u stanice *XL10 Gold* u omjeru volumena 1:10, a potom transformirane temperaturnim šokom prema protokolu u tablici 6. Za oporavak membrane u bakterije je dodano 450 µl medija za oporavak bakterija (2 % triptona, 0,5 % ekstrakta kvasca, 20 mM glukoze (GramMol), 10 mM natrijeva klorida, magnezijeva klorida (Kemika) i magnezijeva sulfata (Kemika) te 2,5 mM kalijeva klorida (Kemika), pH podešena na 7).

Tablica 6. Transformacija bakterijske kulture *XL10 Gold*.

Proces	Trajanje inkubacije	Mjesto inkubacije
Temperiranje bakterijske kulture	5 min	Led
Unos vektora u bakterije	10 min	Led
	40 s	Vodena kupelj 42 °C
	3 min	Led
Oporavak transformiranih bakterija	45 min	Inkubator 37 °C, trešnja 300 rpm

3.2.7. Identifikacija pozitivnih klonova

3.2.7.1. Lančana reakcija polimerazom u bakterijskim klonovima

Za identifikaciju pozitivnih klonova uzgojene su stanice *XL10 Gold* transformirane reakcijama ugradnje s *BACH2* i vektorom pET28a-6xHis odnosno pCMV-Tag2B-FLAG. Od naraslih kolonija upiknut je određeni broj kolonija za svaki konstrukt te je dio odabrane kolonije korišten u lančanoj reakciji polimerazom, a dio je uzgojen na novim hranjivim podlogama za daljnje potrebe eksperimenta.

Lančanom reakcijom polimeraze u bakterijskim klonovima je umnožena sekvenca *BACH2* ugrađena u plazmide pET28-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG. Reakcije volumena 25 µl uz dio kolonije sadrže 0,2 µM naprednih i nazadnih početnica već korištenih za specifično umnažanje sekvence *BACH2* i 1 x reakcijske smjese s DNA polimerazom brzine sinteze 1 kb/min (*EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix*, TaKaRa). Uz navedene reakcije pripremljena je kontrolna reakcija u koju nije dodan dio kolonije. Umnažanje *BACH2* ugrađene u plazmidnu DNA provedeno je prema zadanom programu (Tablica 7).

Za detekciju DNA na 1 %-tnom agaroznom gelu reakcije su pripremljene na isti način kao i u razgradnji DNA restrikcijskim endonukleazama.

Tablica 7. Provedeni program umnažanja za lančane reakcije polimerazom u bakterijskim klonovima.

Proces	Temperatura / °C	Vrijeme trajanja	Broj ciklusa
	98	2 min	1 ciklus
Denaturacija	98	20 s	30 ciklusa
Prianjanje početnica	53	30 s	
Elongacija	72	2 min 45 s	
Terminacija	72	2 min	1 ciklus
	4	∞	

3.2.7.2. Umnažanje i izolacija plazmidne DNA

Kolonije stanica *XL10 Gold* transformirane plazmidima s ugrađenom *BACH2* prethodno uzgojene na krutoj podlozi tijekom pripreme lančanih reakcija polimerazom u bakterijskim klonovima, uzgojene su u tekućem mediju radi sinteze dovoljne količine plazmidne DNA potrebne u daljnjem eksperimentalnom radu.

Iz uzgojenih bakterija plazmidna DNA je izolirana u 6 koraka kompletno za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, QIAgen). (1) 1 ml pojedine kulture je centrifugiran 1 min pri 13000 rpm te je dobiveni talog resuspendiran u 250 µl pufera za resuspenziju stanica u koji je potom dodan jednak volumen pufera za razgradnju stanica. Uzorci su dobro promiješani invertiranjem i inkubirani do maksimalno 5 min. (2) Za prekid razgradnje dodano je 350 µl pufera za prekid razgradnje te su uzorci invertirani 4 do 6 puta. Nakon invertiranja uzorci su radi taloženja denaturiranih dijelova stanica centrifugirani 12 min pri 12000 rpm. (3) Prikupljeni supernatant s plazmidnom DNA dodan je na vezujuće kolone i centrifugiran tijekom 1 min. (4) Kolone s DNA su potom jedanput isprane s 500 µl

pufera koji potpuno narušava aktivnost preostalih nukleaza i (5) s 750 μ l pufera koji sadrži etanol koji služi uklanjanju soli. Kako bi se uspješno uklonio sav etanol te osigurala što veća čistoća prikupljene DNA, prazne kolone dodatno su centrifugirane 1 min pri maksimalnoj brzini centrifuge. (6) DNA je prikupljena dodavanjem 50 μ l *AccuGene* vode u kojoj su kolone, radi prikupljanja veće količine DNA, najprije inkubirane 1 min, a potom centrifugirane 1 min. *AccuGene* voda upotrijebljena je za normalizaciju koncentracija izmjerenih spektrofotometrom.

3.2.7.3. Restriksijska analiza plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolirana iz bakterijskih klonova i vektori pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG korišteni su u restriksijskoj analizi. Pripremljena su tri seta reakcija. Navedeni plazmidi su u setu reakcija *EcoRI/XhoI* razgrađeni restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *XhoI* (NEB) za detekciju 2,5 kb velike sekvence *BACH2*, u setu *BamHI* razgrađeni restriksijskom endonukleazom *BamHI* (NEB) za dodatnu potvrdu pravilne ugradnje *BACH2*, a u setu \emptyset navedeni plazmidi su nepocijepani. Reakcije su rađene u volumenu od 15 μ l (Tablica 8), a sama razgradnja provedena je na identičan način kao u razgradnji DNA restriksijskim endonukleazama.

Način pripreme uzoraka za vizualizaciju DNA, detekciju DNA na gelu i fotografiranje gela je identičan postupku opisanom u razgradnji DNA restriksijskim endonukleazama, osim što su u ovom slučaju marker za DNA i uzorci nanoseni na 1 %-tni agarozni gel.

Tablica 8. Koncentracija pojedine komponente pripremljenih reakcija.

Komponente reakcije	Radna Koncentracija
Klon pET28a-6xHis-BACH2	200 ng/reakcija
Klon pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2	100 ng/reakcija
pET28a-6xHis	120 ng/reakcija
pCMV-Tag2B-FLAG	500 ng/reakcija
Enzim <i>BamHI</i>	5 U/reakcija
Enzim <i>EcoRI</i>	5 U/reakcija
Enzim <i>XhoI</i>	5 U/reakcija
Pufer NEB3.1	1 x

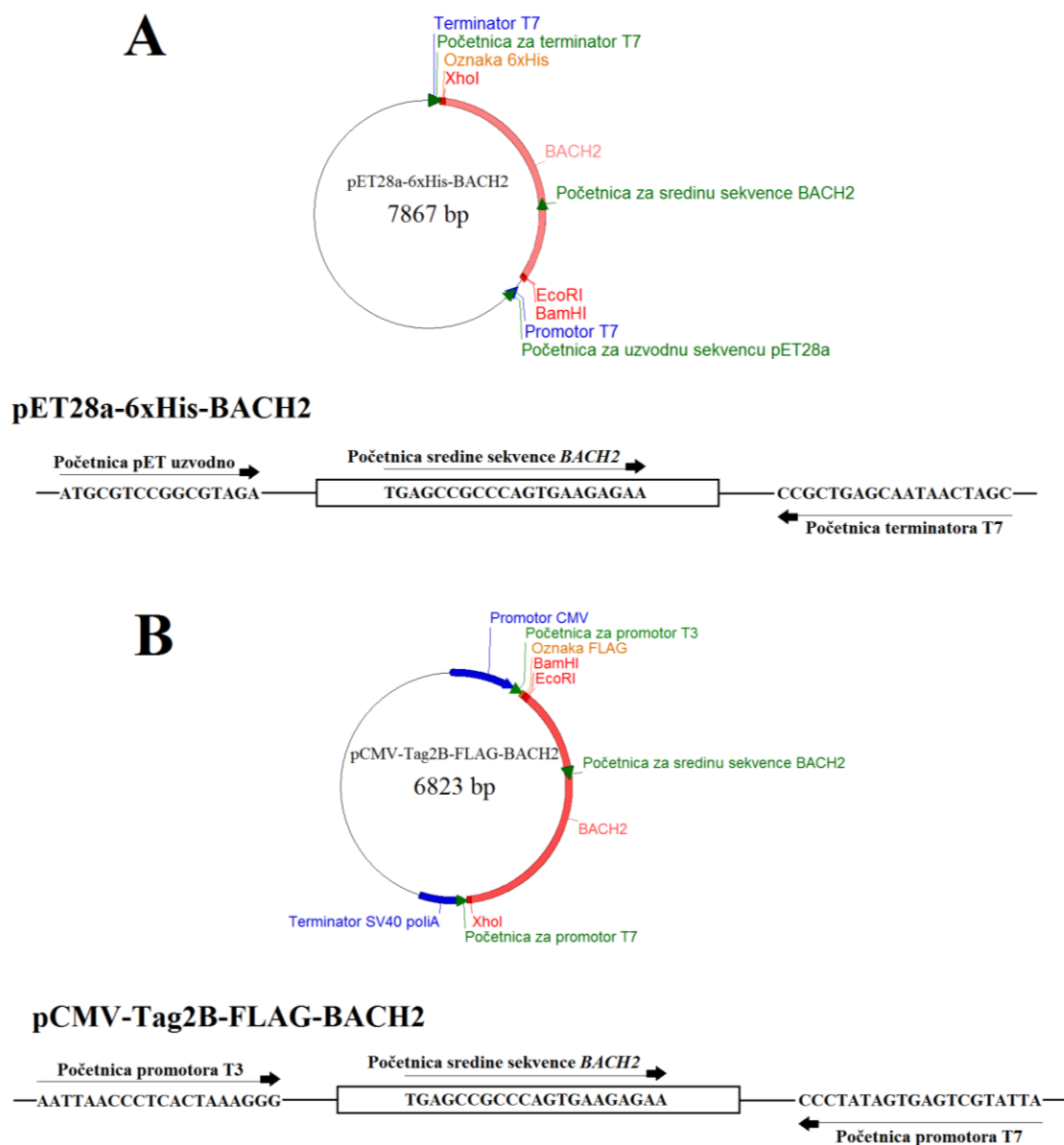
3.2.7.4. Sekvenciranje

Restriksijskom analizom identificirana su dva pozitivna klon pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 i tri pozitivna klon pET28a-6xHis-BACH2. Plazmidna DNA spomenutih klonova poslana je na sekvenciranje u servis *MacroGen* radi dokazivanja prisutnosti sekvence *BACH2* i ispravnosti njenog aminokiselinskog slijeda. Plazmidi pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 sekvencirani su početnicama za promotor T3, sredinu sekvence *BACH2* i promotor T7, a plazmidi pET28a-6xHis-BACH2 početnicama za uzvodnu sekvencu pET28a (pET uzvodno), sredinu sekvence *BACH2* i terminator T7 (Slika 6). Komponente potrebne za sekvenciranje poslana su u servis u koncentraciji navedenoj u Tablici 9.

Tablica 9. Koncentracija pojedine komponente potrebne za sekvenciranje.

Komponente sekvenciranja	Radna koncentracija
Klon (pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 i pET28a-6xHis-BACH2)	250 ng/reakcija
Početnica promotora T3	0,1 μ M/reakcija
Početnica sredine sekvence <i>BACH2</i>	0,1 μ M/reakcija
Početnica promotora T7	0,1 μ M/reakcija
Početnica pET uzvodno	0,1 μ M/reakcija
Početnica sredine sekvence <i>BACH2</i>	0,1 μ M/reakcija
Početnica terminatora T7	0,1 μ M/reakcija

Analiza dobivenih sekvenci provedena je u programu *A plasmid Editor* u kojem su sekvencirane sekvence poravnate sa referentnom sekvencom *BACH2* preuzetom iz baze podataka *NCBI* naredbom *Tools/Align Sequences*. Prije poravnanja sekvence dobivene početnicama koje prijanjaju na promotor T7 i terminator T7 pretvorene su u obrnutu komplementarnu sekvencu naredbom *Edit/Reverse-Complement*.



Slika 6. Prikaz plazmida pET28a-6xHis-BACH2 i pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 s naznačenim pozicijama i sekvencama korištenih početnica. **A** Na gornjoj slici početnica za uzvodnu sekvencu pET pranja na plazmid pET28a-6xHis-BACH2 220 bp uzvodno od *BACH2*, početnica za sredinu sekvence *BACH2* 830 bp od početka *BACH2* i nazadna početnica za terminator T7 75 bp nizvodno od kraja *BACH2*. Uz poziciju početnica, na donjoj slici je u području pranja početnica prikazana nekodirajuća sekvenca plazmida. **B** U plazmidu pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 početnica za promotor T3 se nalazi 100 bp uzvodno od *BACH2*, početnica za sredinu sekvence *BACH2* 830 bp od početka *BACH2* i nazadna početnica za promotor T7 60 bp nizvodno od kraja *BACH2* (gornja slika). Na donjoj slici u području pranja početnica prikazana je nekodirajuća sekvenca plazmida pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2. U obje donje slike nekodirajuća sekvenca *BACH2* prikazana je kao pravokutnik, a dio vektora kao linije.

3.3. Ekspresija proteina BACH2 u bakterijskim stanicama

3.3.1. Transformacija bakterijske kulture *Rosetta*

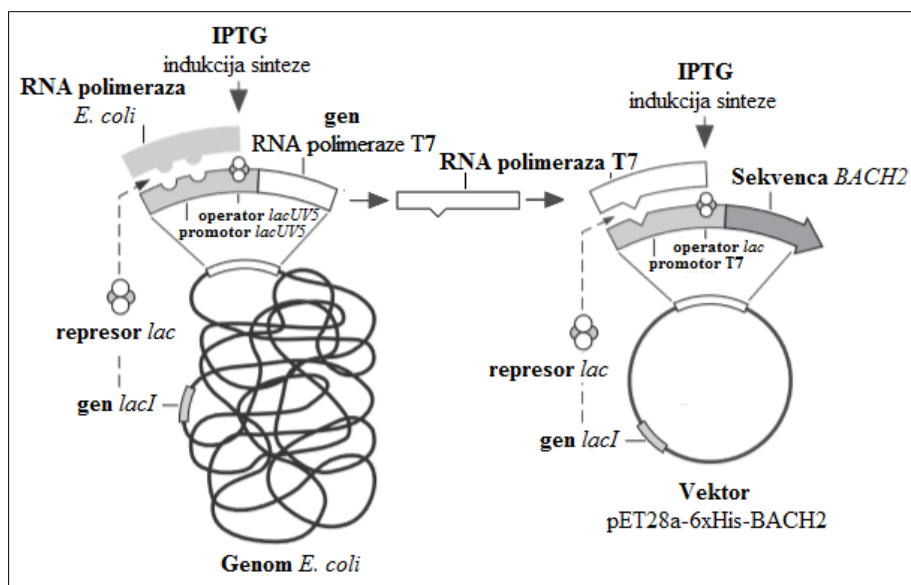
S 28 ng plazmida pET28a-6xHis-BACH2 potvrđene ispravnosti sekvence *BACH2* transformirana je bakterijska kultura *Rosetta* volumena 50 µl. Transformacija stanica provedena je na isti način kao i transformacija stanica *XL10 Gold* uz jednu razliku, nakon dodatka plazmida stanice su prema uputama proizvođača za uspješniju transformaciju inkubirane 30 min na ledu. Za oporavak stanica korišteno je 300 µl medija za oporavak bakterija. Dio transformiranih bakterija *Rosetta* uzgojen je na selektivnoj podlozi LB radi umnažanja klonova s plazmidom pET28a-6xHis-BACH2, a ostatak je uzgojen u tekućem selektivnom mediju s ciljem uzgoja dovoljne količine stanica za indukciju sinteze proteina 6xHis-BACH2.

3.3.2. Indukcija sinteze proteina 6xHis-BACH2

Prekonoćne kulture uzgojene u tekućem selektivnom mediju LB razrijeđene su u omjeru 1:10 s istim tekućim medijem LB te je bakterijska kultura uzgajana uz trešnju od 300 rpm pri 37 °C do postizanja vrijednosti optičke gustoće od 0,79 pri kojoj se stanice nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta i mogu uspješno sintetizirati egzogeni protein 6xHis-BACH2. Optička gustoća bakterijske kulture izmjerena je pri valnoj duljini od 600 nm (OD₆₀₀) spektrofotometrom (*Ultrospec 10*, Amersham Biosciences) nakon normalizacije tekućim medijem LB.

Za indukciju sinteze proteina 6xHis-BACH2 u bakterijsku kulturu je dodan izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, AppliChem-Biochemica, Slika 7) u koncentraciji od 0,3 mM i 0,6 mM kako bismo se osigurali da će bar u jednom uzorku doći do zadovoljavajuće indukcije sinteze proteina. IPTG nije dodan u kontrolnu kulturu.

Za optimalnu sintezu proteina bakterijske kulture su inkubirane 3 h uz trešnju od 300 rpm te su radi taloženja stanica i uklanjanja medija LB kulture centrifugirane 10 min na 1200 rpm. Talozi bakterija pohranjeni su na -80 °C do izolacije proteina.



Slika 7. Shematski prikaz regulacije sinteze proteina u bakterijskim stanicama *Rosetta* transformiranim vektorom pET28a-6xHis-BACH2. U genom *E. coli* i u vektor ugrađen je gen za represor *lac* koji vezanjem za operator inhibira transkripciju RNA polimeraze T7 s promotora *lacUV5* i transkripciju sekvenca *BACH2* s promotora T7. Dodatkom IPTG uklanja se represor i omogućava se transkripcija i sinteza RNA polimeraze T7 koja transkribira sekvenca *BACH2*. Shema je napravljena prema slici u priručniku za sustav pET (*pET System Manual*, Novagen, str. 11).

3.4. Prekomjerna ekspresija proteina BACH2 u animalnim stanicama

3.4.1. Uzgoj animalnih stanica i priprema za transfekciju

Za prekomjernu ekspresiju proteina FLAG-BACH2 u animalnim stanicama korištene su ljudske embrionalne stanice bubrega *HEK293T*. Stanice *HEK293T* uzgajane su u mediju *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza) kompletiranom s 10 % seruma govedeg fetusa (Gibco), 2 mM glutamina i 1 mM mješavine penicilina i streptomicina (Lonza). Za tripsinizaciju, stanice su isprane puferom 1 X PBS (137 mM natrijeva klorida, 2,7 mM kalijeva klorida, 10 mM natrijeva hidrogenfosfata-12-hidrata (Kemika) i 1,8 mM kalijeva hidrogenfosfata (Kemika), pH 7,4) te je nakon toga dodan 1 ml 0,25 %-tnog tripsina (Lonza) po jednoj Petrijevoj zdjelici od 100 mm. Tripsinizacija je nakon 3 minute prekinuta dodavanjem 3 ml kompletiranog staničnog medija. Radi boljeg odvajanja stanica, stanice su propuhane kroz serološku pipetu od 10 ml. Za određivanje koncentracije stanica 10 μ l suspenzije pomiješano je s tripanskim modrilom (Carl Roth) u omjeru 1:1 i dodano na Bürker-Türk predmetnicu na kojoj su prebrojene žive stanice. Koncentracija stanica po mililitru određena je prema sljedećoj formuli:

$$c(\text{stanica/ml}) = 2 \times \frac{\text{br. živih stanica}}{\text{br. polja}} \times \frac{1}{V(\text{polja})}, \quad V(\text{polja}) = 0,1\text{mm}^3 = 10^{-4}\text{ml}$$

S obzirom na izračunatu koncentraciju stanica, uzet je alikvot stanica za nasađivanje 1 milijun stanica u 2 ml kompletiranog medija po bunariću u pločicu sa šest bunarića. Stanice su nasađene ujutro na dan transfekcije.

3.4.2. Transfekcija i sakupljanje taloga animalnih stanica

Stanice *HEK293T* transfektirane su 4 h nakon nasađivanja u pločicu s bunarićima kako bi se u međuvremenu stanice priljepile za podlogu. Smjese za transfekciju pripremljene su u ukupnom volumenu od 200 μl budući da transfekcijska smjesa ne smije prekoračiti 10 % ukupnog volumena medija u kojem su nasađene stanice jer je u protivnom transfekcijska smjesa toksična za stanice.

U volumenu od 100 μl pomiješano je 250 mM kalcijeva klorida (Kemika) (nakon miješanja s puferom HBS konačna koncentracija kalcijeva klorida je 125 mM) i 2 μg /reakciji plazmidne DNA. U jednu smjesu dodan je plazmid pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 izoliran iz jednog klona, a u drugu smjesu isti plazmid izoliran iz drugog klona s ispravnom sekvencom *BACH2* radi sinteze proteina FLAG-BACH2. Plazmid s oznakom FLAG i kodirajućom sekvencom za histonsku varijantu makroH2A1.1 (M1.1) koji omogućava sintezu proteina FLAG-M1.1 (poklon dr.sc. Marcusa Buschbecka, Barcelona) dodan je u treću smjesu, a služi kao pozitivna kontrola prepoznavanja oznake FLAG. U četvrtu smjesu dodan je vektor pCMV-Tag2B-FLAG (poklon dr.sc. Marcusa Buschbecka, Barcelona) koji služi kao negativna kontrola sinteze proteina BACH2, a u petu pcDNA3 s ugrađenom sekvencom za *zeleni fluorescentni protein* (engl. *green fluorescent protein*, Addgene) kojim se određuje uspješnost transfektiranih stanica.

Pripremljene smjese pomiješane su, uz stalno vorteksiranje, sa 100 μl pufera HBS (u 500 ml destilirane vode dodano je 8 g natrijeva klorida, 1,5 mM natrijeva hidrogenfosfata-12-hidrata, 6,5 g HEPES (GramMol), pH 7). Ukupan volumen reakcije od 200 μl ispipetiran je kap po kap u odgovarajući bunarić sa staničnom kulturom *HEK293T*.

Transficirana kultura uzgojena je preko noći te je idući dan na inverznom mikroskopu pod plavim svjetlom detektirano 60 do 70 % transfeciranih stanica, potrebnih za sintezu dovoljne količine proteina. Postojeći medij promijenjen je s novim hranjivim medijem i ponovljen je prekonoćni uzgoj s ciljem sakupljanja što većeg broja stanica.

Stanice su nakon uzgoja dobro isprane puferom 1 X PBS te su sakupljene struganjem u istom puferu. Prikupljene stanice centrifugirane su 5 min pri 1200 rpm u svrhu taloženja stanica. Uklonjen je višak pufera 1 X PBS, a talozi su pohranjeni na -80°C do izolacije proteina.

3.5. Detekcija proteina

3.5.1. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza

Otopljena su tri taloga bakterijskih stanica i četiri taloga animalnih stanica te je u njih dodano 450 odnosno 250 µl pufera za nanošenje na gel (10 % β-merkaptioetanol (JT Baker), 20 % glicerola (BD), 4 % natrij dodecilsulfata (SDS, SIGMA), 0,0004 % boje bromfenol plave (ROTH), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, proteazni inhibitori (*cOmplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Coctail*, ROCHE)). Uzorci su kratko vorteksirani, a stanice su sonicirane ručnom sondom pri 40 % izlazne energije do trenutka kad su uzorci prestali biti viskozni. Za potpunu denaturaciju proteina uzorci su inkubirani 5 min pri 95 °C.

Za vizualizaciju proteina 10 i 30 µl uzoraka s proteinima eksprimiranim u bakterijskim stanicama *Rosetta* nanoseno je na pripremljeni diskontinuirani poliakrilamidni gel (gel za razdvajanje s 8 % otopine akrilamida/bis-akrilamida (*30% Acrylamide/Bis Solution*, 37,5:1 BIORAD), 0,8 % amonijeva persulfata (APS, SIGMA), 0,1 % SDS, 0,08 % TEMED (SIGMA), 375 mM Tris-HCl i gel za sabijanje s 4 % otopine akrilamida/bis-akrilamida, 1 % APS, 0,1 % SDS, 0,1 % TEMED, 60 mM Tris-HCl). U istu svrhu 15 µl uzoraka s proteinima eksprimiranim u stanicama *HEK293T* ispipetirano je na kontinuirani 4-20 %-tni poliakrilamidni gel (*4-20% Tris-Glycine polyacrylamide gel*, ROTH). Uz uzorke na gel je dodan marker za proteine (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific) radi određivanja veličine proteina.

Denaturirajuća gel elektroforeza provedena je u puferu za denaturirajuću elektroforezu (25 mM Tris-HCl i 190 mM glicina (Fisher Chemical), 0,1 % SDS). Na diskontinuiranom gelu

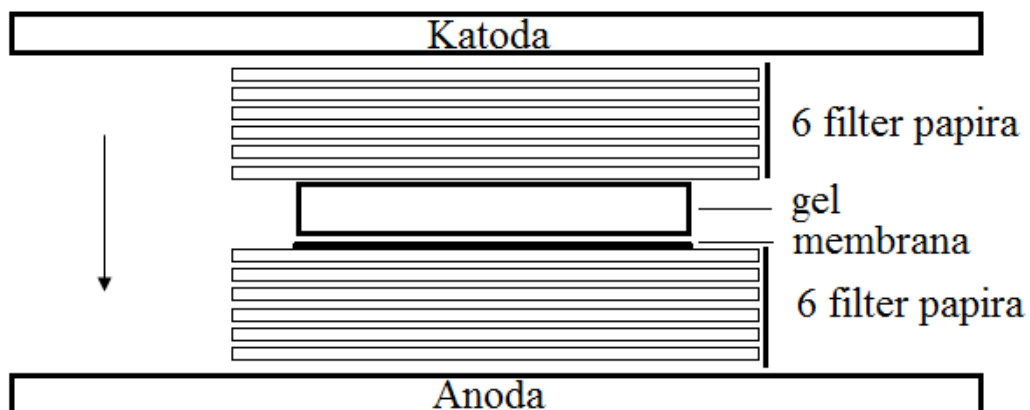
elektroforeza je provedena na jakosti struje od 30 mA, a dolaskom uzoraka do gela za razdvajanje jakost struje je povećana na 35 mA. Radi bolje detekcije proteina obje elektroforeze prekinute su dolaskom vrpce veličine 25 kDa u markeru za proteine do kraja gela.

3.5.2. Detekcija proteina 6xHis-BACH2

Za detekciju proteina 6xHis-BACH2 na diskontinuiranom gelu, gel je tijekom 90 min inkubiran u boji za poliakriamidne gelove (*Coomassie Brilliant Blue*, ROTH) pri trešnji od 30 rpm, ispran u vodi i fotografiran.

3.5.3. Transfer i detekcija proteina FLAG-BACH2

Za detekciju proteina FLAG-BACH2, proteini iz kontinuiranog gela su polusuhim transferom (ROTH) preneseni na nitroceluloznu membranu (Amersham). Pripremljen je sendvič u kojem su donjih 6 filter papira i nitrocelulozna membrana inkubirani u anodnom puferu (48 mM Tris-HCl i 39 mM glicina s 10 % metanola (JT Baker)), a na njega se stavljaju gel i idućih 6 filter papira inkubiranih u katodnom puferu (48 mM Tris-HCl i 39 mM glicina) (Slika 8). S obzirom na poveću veličinu proteina BACH2, transfer je vožen 2 h na 175 mA.



Slika 8. Priprema polusuhog transfera. Na anodu je posloženo 6 filter papira i nitrocelulozna membrana natopljenih u anodnom puferu te gel i 6 filter papira natopljenih u katodnom puferu. Transfer se provodi u smjeru strelice.

Nakon završenog transfera nitrocelulozna membrana je prvo obojana bojom *Ponceau* za vizualizaciju prenešenih proteina na membranu, a nakon toga temeljito isprana destiliranom

vodom. Zatim je membrana blokirana 30 min na sobnoj temperaturi pri trešnji od 30 rpm u 3 % nemasnom mlijeku u prahu (*Powdered milk, blotting grade*, ROTH) otopljenom u puferu PBS-T (Pufer PBS s 0,05 % deterdženta (*Tween 20*, Fluka)). Prije inkubacije u primarnom antitijelu membrana je prerezana posred jažice s markerom u dvije membrane. Blokirana membrana kratko je isprana u puferu PBS-T prije inkubacije membrana u primarnom antitijelu.

Obje membrane inkubirane su u primarnom antitijelu preko noći pri trešnji od 30 rpm. Jedna membrana inkubirana je u primarnom antitijelu anti-BACH2 (dobivenom imunizacijom zeca, Cell Signaling Technology), a druga membrana u primarnom antitijelu anti-FLAG (dobivenom imunizacijom miša, SIGMA) pripremljenima u puferu 1X PBS-T u omjeru 1:1000. Za pripremu primarnih antitijela anti-BACH2 korišten je pufer 1X PBS s 0,05 % deterdženta (*Tween 20*, Fluka), dok je za membranu inkubiranu u antitijelu anti-FLAG pripremljen pufer 1X PBS s 0,1 % deterdženta. Nakon prekonoćne inkubacije, membrane su za uklanjanje antitijela najprije u tri navrata kratko isprane pa zatim ostavljene na ispiranju u puferu PBS-T s 0,05 % deterdženta *Tween 20* dodatnih 30 minuta.

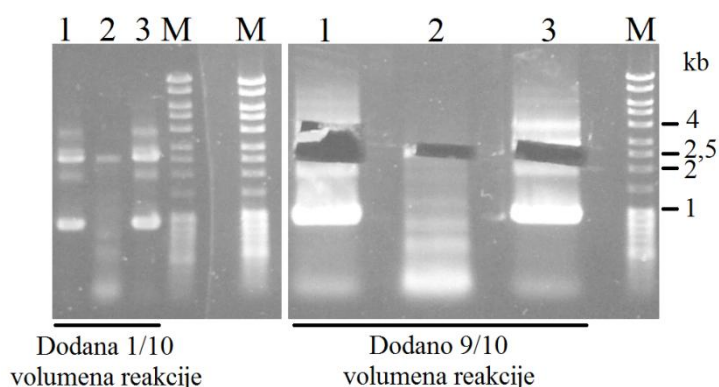
Membrane su potom 90 min inkubirane u pripadajućem sekundarnom anti-zečjem odnosno anti-mišjem antitijelu (DAKO). Sekundarno anti-zečje antitijelo pripremljeno je u puferu 1X PBS-T u omjeru 1:3000, a sekundarno anti-mišje antitijelo u istom puferu u omjeru 1:4000. Nakon inkubacije u sekundarnim antitijelima, membrane su 3 puta isprane i inkubirane u istom puferu kao i ranije.

Za detekciju proteina i oznake FLAG metodom kemiluminiscencije membrane su inkubirane 1 min u otopini u kojoj su otopina peroksida i luminola, dio kompleta za pojačanu kemiluminiscenciju (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Fisher Scientific), dodani u volumnom omjeru 1:1. Fotografski filmovi (GE Healthcare Amersham) su razvijeni inkubacijom u razvijaču (*GBX Developer and Replenisher*, Carestream Dental), ispiranjem u vodi i fiksacijom u fiksatoru (*GBX Fixer and Replenisher*, Carestream Dental). Filmovi su nakon fiksiranja osušeni i označen je marker uz pomoć same membrane.

4. Rezultati

4.1. Provjera ugradnje kodirajućeg slijeda gena *BACH2* u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je uzgoj bakterijskih stanica s egzogenom ekspresijom proteina *BACH2* i animalnih stanica s povećanom ekspresijom istog proteina. Zato je sekvenca *BACH2* umnožena pomoću specifičnih početnica i cDNA prepisane iz NALM-1. Umnožena kodirajuća sekvenca gena *BACH2* veličine 2,5 kb detektirana je na gelu s nespecifičnim DNA fragmentima zbog kojih je vrpca gena *BACH2* izrezana iz desnih jažica (Slika 9). Iz izrezanih vrpca je korištenjem kompleta za pročišćavanje DNA pročišćena umnožena sekvenca gena *BACH2*. Koncentracije pročišćenih umnoženih sekvenci gena *BACH2* prikazane su u Tablici 10.



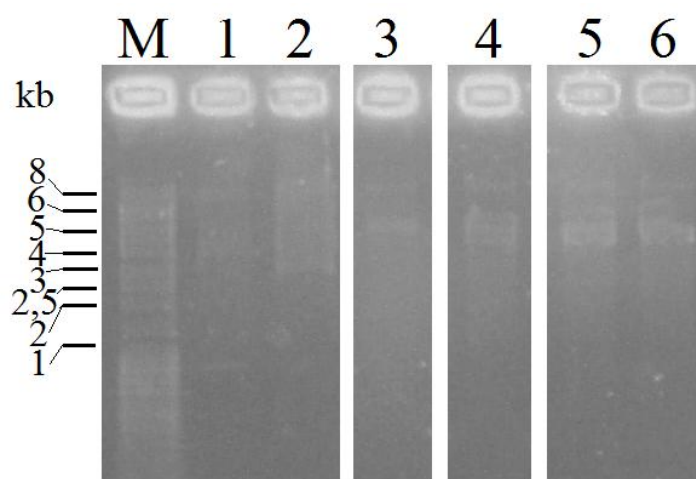
Slika 9. Prikaz agaroznog gela nakon provedene lančane reakcije polimerazom. U jažice M dodan je marker za DNA (unutar priručnika *MassRuler DNA Ladder Mix, ready to use* na stranici proizvođača Thermo Fisher Scientific). U jažice 1, 2 i 3 nanosena je 1/10 pa 9/10 ukupnog volumena pripremljenih reakcija s istim oznakama. Reakcija 1 kao kalup za umnažanje koristi komplementarnu DNA dobivenu početnicom oligo(dT) i nasumičnim heksamerima, a reakcije 2 i 3 komplementarnu DNA sintetiziranu početnicom oligo(dT). Reakcije 1 i 2 provedene su na temperaturi prijanjanja početnica od 53 °C, a reakcija 3 na temperaturi od 56 °C.

Tablica 10. Izmjerena koncentracija sekvence *BACH2* pročišćene iz agaroznog gela. Broj reakcije odgovara broju jažice iz koje je izrezana DNA.

Br. reakcije	Koncentracija / ng/ μ l
1	47
2	18,5
3	11,9

S ciljem ugradnje pročišćenog gena *BACH2* u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG, provedena je razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* i *XhoI* (Slika 10). Nepocijepani plazmidi pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG prikazuju se na gelu kao dvije vrpce nejednake veličine gdje vrpca veće veličine odgovara opuštenoj kružnoj molekuli vektora, a vrpca manje veličine odgovara superzavojitom vektoru. Cijepanjem navedenih plazmida restrikcijskim endonukleazama DNA postaje linearna. Pocijepana DNA vektora pET28a-6xHis veća je od 5 kb, a plazmida pCMV-Tag2B-FLAG veća od 4 kb, što odgovara njihovim stvarnim veličinama. Linearne DNA jednostruko pocijepanog vektora pCMV-Tag2B-FLAG također su veće od 4 kb.

BACH2 i vektori pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG pocijepani s obje restrikcijske endonukleaze pročišćeni su od komponenata reakcije razgradnje te im je izmjerena koncentracija (Tablica 11).



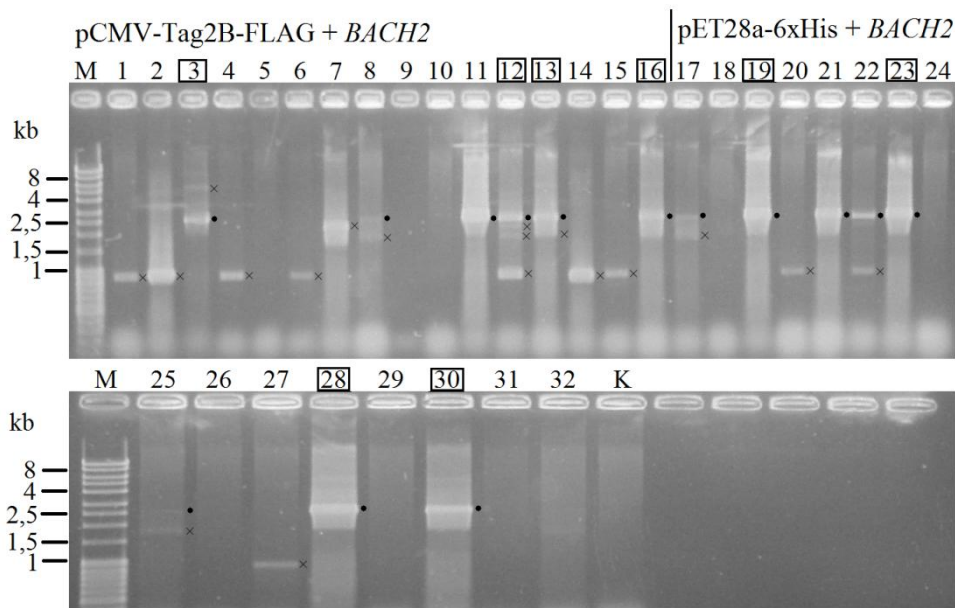
Slika 10. Provjera uspješnosti razgradnje DNA restrikcijskim endonukleazama na agaroznom gelu. U jažici 1 i 2 nalaze se nepocijepani vektori pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG. Vektor pET28a-6xHis u jažici 3 i pCMV-Tag2B-FLAG u jažici 4 pocijepani su restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* i *XhoI*. Restrikcijskom endonukleazom *EcoRI* u jažici 5 i restrikcijskom endonukleazom *XhoI* u jažici 6 razgrađen je plazmid pCMV-Tag2B-FLAG. Za određivanje veličine vrpce korišten je marker za DNA (jažica M, skala veličina unutar priručnika *MassRuler DNA Ladder Mix, ready to use* sa stranice proizvođača markera Thermo Fisher Scientific).

Tablica 11. Izmjerene koncentracije pocijepanih uzoraka *BACH2*, pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG pročišćenih od komponenata reakcija razgradnje restrikcijskim endonukleazama.

Uzorak	Koncentracija / ng/ μ l
<i>BACH2</i>	7,9
pET28a-6xHis	11,5
pCMV-Tag2B-FLAG	20,5

Nakon razgradnje restrikcijskim endonukleazama, pripremljene su reakcije ugradnje sa sekvencom *BACH2* i vektorom pET28a-6xHis odnosno pCMV-Tag2B-FLAG kojim su transformirane bakterije *XL10 Gold*. Za identifikaciju klonova koji sadrže konstrukt pET28a-6xHis-BACH2 to jest pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 provedena je lančana reakcija polimerazom u bakterijskim klonovima kojom je u određenim klonovima umnožena 2,5 kb velika sekvenca *BACH2* (oznaka •, Slika 11). Uz umnažanje skvence *BACH2* na slici 11 se u određenim klonovima umnažaju i nespecifični fragmenti (oznaka X) koji nisu rezultat onečišćenja kemikalija nego nespecifičnog prijanjanja početnica koje su korištene u ovoj reakciji i u reakciji umnažanja sekvence *BACH2* gdje su također dobiveni slični produkti (Slika 9).

Odabrani klonovi 3, 12, 13 i 16 potencijalno transformirani plazmidom pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 te klonovi 19, 23, 28 i 30 potencijalno transformirani plazmidom pET28a-6xHis-BACH2 (broj klona označen u kvadratu, Slika 11) uzgojeni su u prekončnoj kulturi te im je izolirana plazmidna DNA. Izmjerena koncentracija izolirane plazmidne DNA nalazi se u Tablici 12 iz koje je vidljivo da vektor pCMV-Tag2B-FLAG veličine 4,3 kb daje 4 puta veći prinos od pET28a-6xHis veličine 5,4 kb.



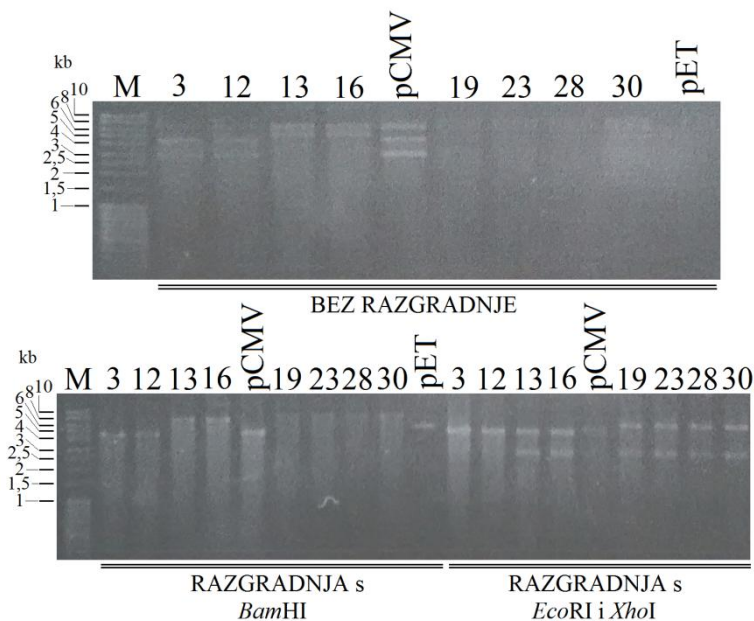
Slika 11. Prikaz rezultata lančane reakcije polimerazom na agaroznom gelu. Jažice broj 1 do 16 potencijalno sadrže plazmide pCMV-Tag2B-FLAG s ugrađenom kodirajućom sekvencom gena *BACH2* veličine 2,5 kb (pCMV-Tag2B-FLAG + *BACH2*), a jažice 17 do 32 potencijalno sadrže plazmide pET28a-6xHis s ugrađenom *BACH2* (pET28a-6xHis + *BACH2*). U jažici K nalazi se kontrolna reakcija bez dodane bakterijske kolonije, a u svim jažicama prisutni su dimeri početnica. Veličina umnožene DNA određena je markerom za DNA (jažica M, unutar priručnika *MassRuler DNA Ladder Mix, ready to use* sa stranice proizvođača markera Thermo Fisher Scientific). Oznakom • na gelu je označena umnožena sekvenca *BACH2*, a X-om umnoženi nespecifični fragmenti. Klonovi označeni u kvadratu korišteni su u restrikcijskoj analizi.

Tablica 12. Izmjerene koncentracije plazmidne DNA izolirane iz 8 klonova.

	Klon	Koncentracija / ng/μl
pCMV-Tag2B-FLAG + <i>BACH2</i>	3	200
	12	194
	13	225
	16	248,5
pET28a-6xHis + <i>BACH2</i>	19	46,5
	23	57
	28	65
	30	52,5

Plazmidna DNA odabranih klonova i vektora pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG podvrgnuta je restrikcijskoj analizi. Restrikcijskom analizom utvrđen je veći nepocijepani plazmid u klonovima 13 i 16 u usporedbi s vektorom pCMV-Tag2B-FLAG te su u jednostruko pocijepanim plazmidima klonova 13 i 16 opažene linearne DNA veličine iznad 6

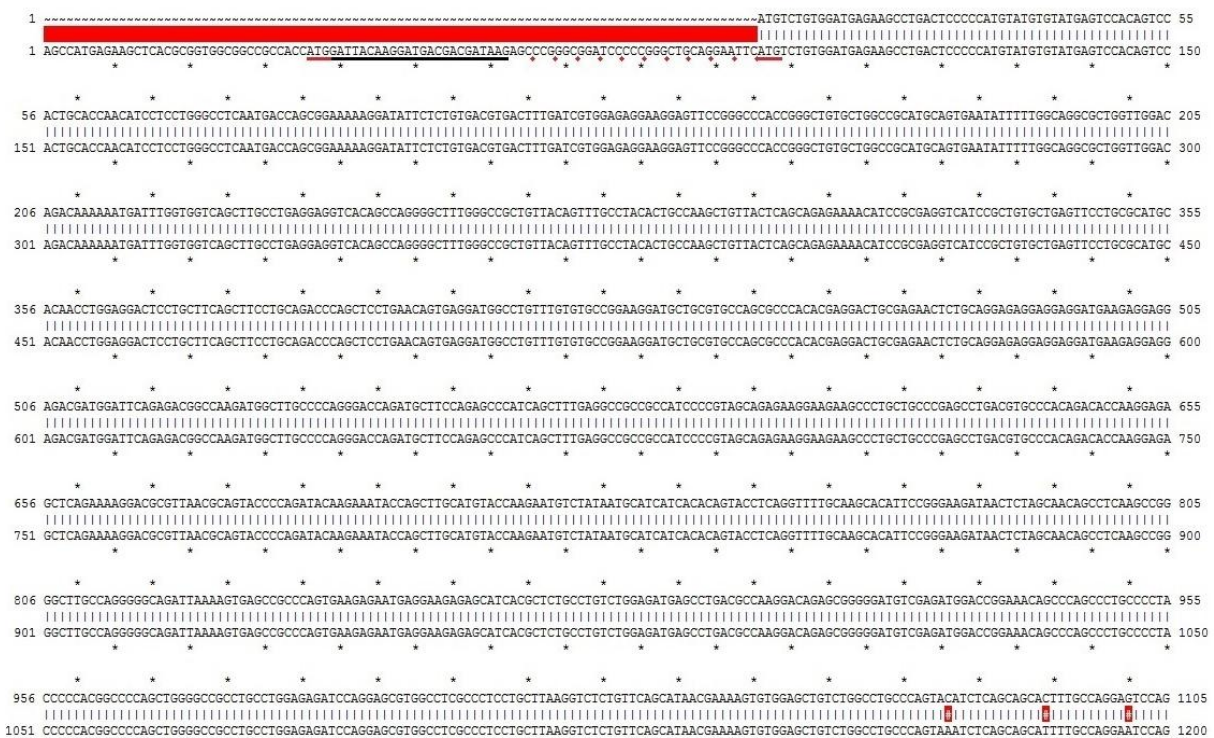
kb, a kod klonova 19, 23, 28 i 30 opažene su linearne DNA veličine oko 8 kb, što su očekivane veličine linearne DNA plazmida pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 tj. pET28a-6xHis-BACH2. Uz spomenuto, u plazmidima klonova 13, 16, 19, 23, 28 i 30 pocijepanima s obje restriksijske endonukleaze prisutna je 2,5 kb velika kodirajuća sekvenca gena *BACH2* (Slika 12).



Slika 12. Razgradnja plazmidne DNA klonova 3, 12, 13, 16, 19, 23, 28 i 30 te vektora pET28a-6xHis (oznaka pET) i pCMV-Tag2B-FLAG (oznaka pCMV). Navedene plazmidne DNA u području BEZ RAZGRADNJE nisu razgrađene restriksijskim endonukleazama, u području RAZGRADNJA s *Bam*HI DNA su pocijepane restriksijskom endonukleazom *Bam*HI, a u području RAZGRADNJA s *Eco*RI i *Xho*I DNA su razgrađene restriksijskim endonukleazama *Eco*RI i *Xho*I. U jažici M nalazi se marker za DNA (iz priručnika *MassRuler DNA Ladder Mix, ready to use* sa stranice proizvođača markera Thermo Fisher Scientific).

Plazmidne DNA izolirane iz klonova 13, 16, 19, 28 i 30 za koje je restriksijskom analizom utvrđeno da sadrže gen *BACH2*, poslone su na sekvenciranje u servis *Macrogen*. Pojedini konstrukt, pET28a-6xHis-BACH2 i pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 sekvenciran je trima početnicama (Slika 6). Radi utvrđivanja ispravnog aminokiselinskog slijeda i ugradnje *BACH2* u plazmide u okviru čitanja s početnim kodonom za translaciju, dobivene sekvence su poravnate s referentnom sekvencom *BACH2* (baza podataka *NCBI*) u programu *A plasmid Editor*.

Sekvenca *BACH2* ugrađena u plazmid pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 izoliranog iz klona 13 identična je referentnoj sekvenci *BACH2* (Slika 13, 14 i 15). Na slici 13 vidljiva je ugradnja *BACH2* u plazmid u ispravnom okviru čitanja s kodonom za početak translacije i oznakom FLAG sekvence 5'-GATTACAAGGATGACGACGATAAG-3' aminokiselinskog slijeda Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys. Sve sekvence sintetizirane pojedinom početnicom imaju mutacije, ali budući da iste mutacije nisu prisutne u području sekvence *BACH2* sintetizirane drugom početnicom zaključujemo da su opažene mutacije nastale tijekom sekvenciranja, greškom DNA polimeraze. Greške DNA polimeraze najčešće se događaju pri kraju sinteze sekvence i to obično oko 1000. nukleotida sekvenciranog DNA polimerazom.



- 1. red - referentna sekvenca *BACH2*
- 2. red - sekvenca dobivena početnicom za promotor T3

Slika 13. Prikaz sekvence dobivene prijanjanjem početnice na promotor T3 kodiranog u plazmidu pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 izoliranog iz klona 13. Sintetizirana sekvenca prikazana je od 95. nt nizvodno od početka referentne sekvence *BACH2* do 1105. nt referentne *BACH2* kojoj je dobivena sekvenca identična od 1. do 1075. nt. Radi provjere ugradnje *BACH2* u plazmid u ispravnom okviru čitanja crvenim su rombovima označeni tripleti nukleotida od oznake FLAG (sekvenca podcrtana crnom crtom), u okviru čitanja s kodonom za početak translacije (podcrtan crvenom crtom), do početnog kodona *BACH2* (podcrtanog crvenom crtom).


```

751 TCAGGTTTTCAGACACATTCGGGAAAGATAACTCTAGCAACAGCCTCAAGCCGGGGCTTGCCAGGGGACAGATTAAAGTGAGCCGCCAGTGAAGGAATGAGGAAGAGACATCAGCTCTGCCTGTCTGGAGATGACCTGACGCC 900
3 ---GGT-----AAG-----GATCAGCTCTGCCTGTCTGGAGATGACCTGACGCC 46
901 AAGGACAGAGCGGGGGATGTCGAGATGGACCGGAACAGCCAGCCCTGACCCACCGGCCAGCTGGGGCGCCTGCTGGAGAGATCCAGGAGCGTGGCCCTCGCCCTCTGCTTAAGGCTCTGTTTCAGCATACGAAAAGT 1050
47 AAGGACAGAGCGGGGGATGTCGAGATGGACCGGAACAGCCAGCCCTGACCCACCGGCCAGCTGGGGCGCCTGCTGGAGAGATCCAGGAGCGTGGCCCTCGCCCTCTGCTTAAGGCTCTGTTTCAGCATACGAAAAGT 196
1501 GTGGAGCTGTTGGCCCTGCCCAGTACATCTCAGCAGCAGCTTGGCCAGAGTCCAGCCTGGCCCTTTGACAAGGGGATCACTCAGGGTGACCTTAAAACTGACTACACCCCTTTCACAGGAAATTATGGACAGCCACCGTGGCCAGAAG 1200
197 GTGGAGCTGTTGGCCCTGCCCAGTACATCTCAGCAGCAGCTTGGCCAGAGTCCAGCCTGGCCCTTTGACAAGGGGATCACTCAGGGTGACCTTAAAACTGACTACACCCCTTTCACAGGAAATTATGGACAGCCACCGTGGCCAGAAG 346
1201 GAGGTGTCAACTTCAACATGGGGTGGCCCTCAGGGGGCTGGGTGGAGGCTCTCTGTAACAGGAGGGAGAGTGGACCGGAGGCGTGAICTTCTCCAGCGCTTGTGACCAAGTGAACCTCGGTGCAITCTTATCTGGG 1350
347 GAGGTGTCAACTTCAACATGGGGTGGCCCTCAGGGGGCTGGGTGGAGGCTCTCTGTAACAGGAGGGAGAGTGGACCGGAGGCGTGAICTTCTCCAGCGCTTGTGACCAAGTGAACCTCGGTGCAITCTTATCTGGG 496
1351 GTGAGCAGTTTGGCAAAGACCTCTCTGAGCCGGTCCAAAGGGTCTGTGGGTGGGAGCCGGCAGTCCCTCCCCAGCTCGCAGCCCTACTCCACGGTGGGCTGATGGCCGACCACTTGCAGGAAGGATCGGGCCACACAGCTGC 1500
497 GTGAGCAGTTTGGCAAAGACCTCTCTGAGCCGGTCCAAAGGGTCTGTGGGTGGGAGCCGGCAGTCCCTCCCCAGCTCGCAGCCCTACTCCACGGTGGGCTGATGGCCGACCACTTGCAGGAAGGATCGGGCCACACAGCTGC 646
1501 CCGGTACCAATCAAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACCAGGACAGGACTTCCAGCTCTGCTCTTCTATTCTAAGCGGAGACGGGAGCGGGGGCTCACCTCGAGCCCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 1650
647 CCGGTACCAATCAAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACCAGGACAGGACTTCCAGCTCTGCTCTTCTATTCTAAGCGGAGACGGGAGCGGGGGCTCACCTCGAGCCCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 796
1651 TCCCAGGGAGCCAGATTCTTGCACAGAACATCAGGAACCCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTGGCCGCCAAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGGAACCAACTCCAGTGAAGATCCGGATGCTTCTCGAAGCAGAC 1800
797 TCCCAGGGAGCCAGATTCTTGCACAGAACATCAGGAACCCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTGGCCGCCAAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGGAACCAACTCCAGTGAAGATCCGGATGCTTCTCGAAGCAGAC 946
1801 AGTGAGTCTGTTCTGTGTCAGGACAGGGGCCAGGAGGTAATACTTCTTTTCTGTAGATCAAAATCAGAGATCTTCCAGGAAACGATTTCAGATGATGATTAAATGCACAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATTATGATGTC 1950
947 AGTGAGTCTGTTCTGTGTCAGGACAGGGGCCAGGAGGTAATACTTCTTTTCTGTAGATCAAAATCAGAGATCTTCCAGGAAACGATTTCAGATGATGATTAAATGCACAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATTATGATGTC 1096
1951 CGACGGCCGACAGAACCGCATCGCGGCCAGCGCTGCCGCAAAAGGAACTGGACTGTATTGAGAAITTAGAATGTGAAATCCGCAAAATGGTGTGTGAGAAAGAGAACTGTTGTGAGAGGAACTCAACTGAAAGCATGATGGGG 2100
1097 CGACGGCCGACAGAACCGCATCGCGGCCAGCGCTGCCGCAAAAGGAA-CTGGACTGTAT-CAGAAATTAGAATG-GGAATCCGCAAAATGGTG-GTGGAAAAAAAATGTTGTGAAA-AGAATC-ACTGAAA-CAITGATGGGG 1239

```

1. red - referentna sekvenca *BACH2*
2. red - sekvenca dobivena početnicom za sredinu sekvence *BACH2*

Slika 14. Dio sekvence *BACH2* sintetizirane prijanjanjem početnice na sredinu sekvence *BACH2* ugrađene u plazmid pCMV-Tag2B-BACH2 izoliranog iz klon 13. Usporedbom dobivene sekvence s referentnom sekvencom *BACH2* vidljivo je da je sintetizirana sekvenca identična referentnoj od 863. do 2000. nt.


```

1 ----- 1
1 CATTITTAARAGACGGAAACATTCCTCTAGATAATAATTTTGGTTAACTTTAAGAGGAGATATACCATGGCCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTCCCGCGGGCAGCCATATGCTAGCATGACTGGTGGACAGCA 150
* * * * *
1 -----ATGTCTGTGGATGAGAAGCCTGACTCCCCATGTATGTATGAGTCCACATCCACTGCACCAACATCTCTG66CCTCAATGACCAGCGGAAAAAGGATATTCTCTGTGACGTGACTTTGATCGT 128
151 AATGGGTGCGGATCCGAATTCATGCTGTGGATGAGAAGCCTGACTCCCCATGTATGTATGAGTCCACATCCACTGCACCAACATCTCTG66CCTCAATGACCAGCGGAAAAAGGATATTCTCTGTGACGTGACTTTGATCGT 300
* * * * *
129 GGAGAGAAAGAGTTCGCGGCCACCGGGCTGTGCTGCGCATGCAAGTAAATAATTTGGCAGGCGCTGGTGGACAGACAAAAAATGATTTGGTGGTCAAGCTTGCCTGAGGAGGTACAGCCAGGGGCTTTGGGCGCTGTTACAGTT 278
301 GGAGAGAAAGAGTTCGCGGCCACCGGGCTGTGCTGCGCATGCAAGTAAATAATTTGGCAGGCGCTGGTGGACAGACAAAAAATGATTTGGTGGTCAAGCTTGCCTGAGGAGGTACAGCCAGGGGCTTTGGGCGCTGTTACAGTT 450
* * * * *
279 TGCCTACACTGCAAGCTGTTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGGTCAATCGCTGTGCTGAGTTCCTGCGCATGCACACCTGGAGGACTCCTGCTTCAAGCTTCTGCGAGCCAGCTCCTGAACAGTGGAGATGGCTGTTGTGTG 428
451 TGCCTACACTGCAAGCTGTTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGGTCAATCGCTGTGCTGAGTTCCTGCGCATGCACACCTGGAGGACTCCTGCTTCAAGCTTCTGCGAGCCAGCTCCTGAACAGTGGAGATGGCTGTTGTGTG 600
* * * * *
429 CGGAAAGATGCTGCTGCGCCAGCCACACAGAGACTGCGAGAACTCTGCGAGAGAGAGAGATGAGAGGAGAGAGAGATGGATTTCAGAGACGCGCAGATGGCTTGCCTCCAGAGCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGA 578
601 CGGAAAGATGCTGCTGCGCCAGCCACACAGAGACTGCGAGAACTCTGCGAGAGAGAGAGATGAGAGGAGAGAGAGATGGATTTCAGAGACGCGCAGATGGCTTGCCTCCAGAGCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGA 750
* * * * *
579 GCGCCCGCCATCCCGCTGCGAGAGAAAGAGAGCCCTGCTGCCAGAGCTGACTGCCACAGACACCAAGGAGAGCTCAGAAAAGAGCGGTTAACCCAGTACCCAGATACAGAAATACCAGCTTGCATGACCAAGAAATGCTA 728
751 GCGCCCGCCATCCCGCTGCGAGAGAAAGAGAGCCCTGCTGCCAGAGCTGACTGCCACAGACACCAAGGAGAGCTCAGAAAAGAGCGGTTAACCCAGTACCCAGATACAGAAATACCAGCTTGCATGACCAAGAAATGCTA 900
* * * * *
729 TAATGCATCATCAGCAGTACCTCAGGTTTTGCAAGCAGATTCGCGGAGATAAATCTAGCAACAGCTCAAGCCGGGGCTTCCAGGGGGCAGATTAAGTGAAGCCCGCAGTGAAGAGAGAGCATCAGCTCTGCT 878
901 TAATGCATCATCAGCAGTACCTCAGGTTTTGCAAGCAGATTCGCGGAGATAAATCTAGCAACAGCTCAAGCCGGGGCTTCCAGGGGGCAGATTAAGTGAAGCCCGCAGTGAAGAGAGAGCATCAGCTCTGCT 1050
* * * * *

```

1. red - referentna sekvenca *BACH2*
2. red - sekvenca dobivena početnicom za uzvodnu sekvencu pET28a

Slika 19. Prikaz sekvence dobivene početnicom koja pranja na uzvodnu sekvencu pET28a plazmida pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klona 19 od 173. nt uzvodno od početka *BACH2* (podcrtano crvenom crtom) do 878. nt referentne sekvence *BACH2*. Sintetizirana sekvenca identična je referentnoj sekvenci od 1. do 844. nt, a radi potvrde ugradnje *BACH2* u plazmid u ispravnom okviru čitanja crvenim rombovima su označeni tripleti nukleotida od početnog kodona translacije do početka sekvence *BACH2* (podcrtani crvenom linijom). Na slici je također crnom crtom podcrtana sekvenca oznake 6xHis.


```

* * * * *
751 TCAGGTTTTGCAAGCACAATCCGGGAAGATAACTCTAGCAACAGCCTCARGCCGGGGCTTGCAGGGGGCAGATTAAAAAGTGAGCCGCGCAGTGAAGGAATGAGGAAGAGAGCATCACGCTCTGCCTGTCTGGAGATGAGCCTGACGCC 900
1
-----TCTGCCTGTCTGGAGATGAGCCTGACGCC 45
* * * * *

901 AAGGACAGAGCGGGGGATGTCGAGATGGACCGGAAACAGCCAGCCTGCCCTACCCCCACGGCCCGAGCTGGGGCCGCTGCCTGGAGAGATCCAGGAGCGTGGCCTCGCCCTCTGCTTAAGGTCTCTGTTCAGCATAACGAAAAGT 1050
46 AAGGACAGAGCGGGGGATGTCGAGATGGACCGGAAACAGCCAGCCTGCCCTACCCCCACGGCCCGAGCTGGGGCCGCTGCCTGGAGAGATCCAGGAGCGTGGCCTCGCCCTCTGCTTAAGGTCTCTGTTCAGCATAACGAAAAGT 195
* * * * *

1051 GTGGAGCTGTCTGGCTGCCAGTACATCTCAGCAGCACTTTGCCAGGAGTCCAGCCTGCCCTTTGACAAGGGGATCACTCAGGGTGACCTTAAAACTGACTACACCCCTTTCACAGGAAITATGGACAGCCCGCAGTGGGCGAGAAG 1200
196 GTGGAGCTGTCTGGCTGCCAGTACATCTCAGCAGCACTTTGCCAGGAGTCCAGCCTGCCCTTTGACAAGGGGATCACTCAGGGTGACCTTAAAACTGACTACACCCCTTTCACAGGAAITATGGACAGCCCGCAGTGGGCGAGAAG 345
* * * * *

1201 GAGGTGTCAACTTCACCATGGGTCGCCCTCAGGGGCTGGGTGGAGGCTCTCTGTAACAGGAGGAGAGCTGGACCGGAGGAGCGTGATCTTCTCTCCAGCGCTTGTGACCAAGTGAGCACCTCGGTGCAITCTTATCTGGG 1350
346 GAGGTGTCAACTTCACCATGGGTCGCCCTCAGGGGCTGGGTGGAGGCTCTCTGTAACAGGAGGAGAGCTGGACCGGAGGAGCGTGATCTTCTCTCCAGCGCTTGTGACCAAGTGAGCACCTCGGTGCAITCTTATCTGGG 495
* * * * *

1351 GTGACAGTTTTGACAAGAGCCTCTCTGAGCCGGTCCAAAGGGTCTGTGGGTGGAGCCGCGCAGTCCCTCCCGAGCTCGCAGGCTACTCCACGCTGGGCTGATGGCCGACACTTCCAGGAAGATGGGCCACACCCAGCTGC 1500
496 GTGACAGTTTTGACAAGAGCCTCTCTGAGCCGGTCCAAAGGGTCTGTGGGTGGAGCCGCGCAGTCCCTCCCGAGCTCGCAGGCTACTCCACGCTGGGCTGATGGCCGACACTTCCAGGAAGATGGGCCACACCCAGCTGC 645
* * * * *

1501 CCGGTACCAATCAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACAGSACCAGGACTTCAGACTCTGCTCTTCTTATTCTACGCGAGSACGGGAGCGGGGCTGACCTGCAAGCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 1650
646 CCGGTACCAATCAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACAGSACCAGGACTTCAGACTCTGCTCTTCTTATTCTACGCGAGSACGGGAGCGGGGCTGACCTGCAAGCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 795
* * * * *

1651 TCCAGGGAGCCAGATTCCTTGCACAGAACATCAGGAACCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTGCGGCCCAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGSAACCACTCCAGTGACGAATCCGGATCGTTCTCGGAAGCAGAC 1800
796 TCCAGGGAGCCAGATTCCTTGCACAGAACATCAGGAACCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTGCGGCCCAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGSAACCACTCCAGTGACGAATCCGGATCGTTCTCGGAAGCAGAC 945
* * * * *

1801 AGTGAGTCGTCTCTGTGCGAGGACAGGGGCCAGGAGTAAACTTCCTTTTCTGTAGATCAAATCAGATCTTCCAGGAACGATTTCCAGATGATGATTAATAATGCACAAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATTCAATGATGTC 1950
946 AGTGAGTCGTCTCTGTGCGAGGACAGGGGCCAGGAGTAAACTTCCTTTTCTGTAGATCAAATCAGATCTTCCAGGAACGATTTCCAGATGATGATTAATAATGCACAAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATTCAATGATGTC 1095
* * * * *

1951 CGACGCGCAGCAGAAACCGCATCCCGCCCGCCTGCCCAAAGGAACTGGACTGTATTGAGAAITTAGAATGGAAATCCGCAAAATGGTGTTGAGAAAGAGAACTGTTGTCAGAGAGGAATCAACTGAAGCATGCAATGGGG 2100
1096 CGACGCGCAGCAGAAACCGCATCCCGCCCGCCTGCCCAAAG-AAACTGGACTGTATTGAGAAITTAGAATGGGAAATCCGCAAAATGGTG-GTGGAAAAGAAAACCTGTTGTCAA-AGGAATCAACTG-AACCATGCAATGGGG 1241
* * * * *

```

1. red - referentna sekvenca *BACH2*
2. red - sekvenca dobivena početnicom za sredinu sekvence *BACH2*

Slika 20. S referentnom sekvencom *BACH2* poravnata je sekvenca dobivena početnicom koja u plazmidu pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klona 19 prijanja na sredinu sekvence *BACH2*, a koja je identična referentnoj od 862. do 1975. nt.

```

1501 CCGGTACCAATCAAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACCAGGACAGGACTTCCAGTCTCTGCTCTTCTTCTACGGGAGGACGGGAGCGGGGGCTCACCTGCAGCCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 1650
|||||
357 CCGGTACCAATCAAAGTCTGCCCTCGCTCACCCCTTGGAGACCAGGACAGGACTTCCAGTCTCTGCTCTTCTTCTACGGGAGGACGGGAGCGGGGGCTCACCTGCAGCCTCCCTCTCTGTGAGTCTCTCTCGCCCTGT 506
|||||

1651 TCCAGGGAGCCAGATTCCTTCCACAGAACATCAGGAACCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTCGGGCCCAAAATAAATGTGAGCAGTCTTATGGAACCAACTCCAGTGACGAATCCGGATCGTTCTCGGAAGCAGAC 1800
|||||
507 TCCAGGGAGCCAGATTCCTTCCACAGAACATCAGGAACCAGGCTGATGGGAGATGGAATGTACAACCAAGTCGGGCCCAAAATAAATGTGAGCAGTCTTATGGAACCAACTCCAGTGACGAATCCGGATCGTTCTCGGAAGCAGAC 656
|||||

1801 AGTGAGTCTGTCTGTGCGAGGACAGGGCCAGAGGTAATAACTTCTTTTCTGTAGATCAAAATCACAGATCTTCCAAAGAACGATTTCAGATGATGATTAATAATGCACAAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATCATGATGTC 1950
|||||
657 AGTGAGTCTGTCTGTGCGAGGACAGGGCCAGAGGTAATAACTTCTTTTCTGTAGATCAAAATCACAGATCTTCCAAAGAACGATTTCAGATGATGATTAATAATGCACAAGCTAACCTCAGAACAGTTAGAGTTTATCATGATGTC 806
|||||

1951 CGACGGCCAGCAAGAACCGCATCGGGCCCGCCTGCCGAAAAGGAAACTGGACTGTATTGAGAAATTTAGAAATGTGAAATCCGAAATTTGGTGTGTGAGAAAGAGAAACTGTTGTCAGAGAGGAATCAACTGAAAGCATCATGGGG 2100
|||||
807 CGACGGCCAGCAAGAACCGCATCGGGCCCGCCTGCCGAAAAGGAAACTGGACTGTATTGAGAAATTTAGAAATGTGAAATCCGAAATTTGGTGTGTGAGAAAGAGAAACTGTTGTCAGAGAGGAATCAACTGAAAGCATCATGGGG 956
|||||

2101 GAAGTGTGGACAACTTCTCTGCTTTCCACAGAAAGTTTGCAGAGACATCCAGAGCCCGAGCAGATCCAGGCCCTGATCGGTATTGCCCTGCTCCTCAGACCCATGGACTTGGCCACGGCTCCAGTATTAAACCTTGC6CCCTTGGGT 2250
|||||
957 GAAGTGTGGACAACTTCTCTGCTTTCCACAGAAAGTTTGCAGAGACATCCAGAGCCCGAGCAGATCCAGGCCCTGATCGGTATTGCCCTGCTCCTCAGACCCATGGACTTGGCCACGGCTCCAGTATTAAACCTTGC6CCCTTGGGT 1106
|||||

2251 GCTGAGCAGAACATTGCGGCTCCCAATGCGCAGTGGGGGAAAACGTCGCTGCTTGGAGCCAGGCGGGCTCCCCCGGACCCCTTGGGCACCCAGCAACACCTCCGAGAATTGTACCTCTGGGAGGAGACTAGAAGCACTGAC 2400
|||||
1107 GCTGAGCAGAACATTGCGGCTCCCAATGCGCAGTGGGGGAAAACGTCGCTGCTTGGAGCCAGGCGGGCTCCCCCGGACCCCTTGGGCACCCAGCAACACCTCCGAGAATTGTACCTCTGGGAGGAGACTAGAAGCACTGAC 1256
|||||

2401 CCGGAACTTCTCAGAGAGAGGACCTCCTCTTGAACCCAGGAGCCAAACAGTGACCGTGGACTTCTGCCAGGAAATGACTGATAAGTGTACAACCTGACGAACAGCCAGGAAAGATTATACCTAG~~~~~ 2526
|||||
1257 CCGGAACTTCTCAGAGAGAGGACCTCCTCTTGAACCCAGGAGCCAAACAGTGACCGTGGACTTCTGCCAGGAAATGACTGATAAGTGTACAACCTGACGAACAGCCAGGAAAGATTATACCTAGCTCGAGCACCACCACCACCAC 1406
|||||

2526 ~~~~~ 2526
1407 TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAARAGCTAAATTTCTAAG 1453
|||||

```

1. red - referentna sekvenca *BACH2*
2. red - sekvenca dobivena početnicom za terminator T7

Slika 21. Sekvenca sintetizirana početnicom za terminator T7 koja prijanja na pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klona 19 prikazana je od 70. nt nizvodno od kraj sekvenca *BACH2* (kodona za kraj *BACH2* podcrtan je crvenom crtom) do 1501. nt referentne sekvenca. Dobivena sekvenca identična je referentnoj od kraja sekvenca *BACH2* do 1562. nt referentne sekvenca.

Plazmidna DNA pET28a-6xHis-BACH2 izolirana iz klona 28 također je poslana na sekvenciranje. Pojedine sekvence dobivene sekvenciranjem (Slika 22, 23 i 24) sadrže mutacije koje nisu prisutne u sekvencama sintetiziranim dvjema različitim početnicama te su stoga nastale tijekom sekvenciranja kao greška DNA polimeraze. Sintetizirane sekvence poravnate su s referentnom sekvencom *BACH2* te je potvrđena ugradnja sekvenca *BACH2* u plazmid u ispravnom okviru čitanja (Slika 22).

```

1 ----- 1
1 GCCTGAACGGGAACATTCCTCTAGATAAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGGCCGCGGCAAGCCATATGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATG 150
* * * * *
1 -----ATGTCTGTGGATGAGAAGCCTGACTCCCCCATGTATGTATGATGCCAGTCCACTGCACCAACATCCTCCTGGGCTCAATGACCAGCGAAAAAGGATATTTCTGTGACGTGACTTTGATCGTGGAG 132
* * * * *
151 GTTCCGGATCCGAATTCATGTCTGTGGATGAGAAGCCTGACTCCCCCATGTATGTATGATGCCAGTCCACTGCACCAACATCCTCCTGGGCTCAATGACCAGCGAAAAAGGATATTTCTGTGACGTGACTTTGATCGTGGAG 300
* * * * *
133 AGGAAGGAGTCCGGGCCACCGGCTGTGCTGGCCGATGCAAGTAAATATTTTGGCAGGGCTGGTTGGACAGACAAAAATGATTTGGTGGTCAAGTTGGCTGAGGAGGTACAGCCAGGGGCTTTGGGCCCTGTTACAGTTTGCC 282
* * * * *
301 AGGAAGGAGTCCGGGCCACCGGCTGTGCTGGCCGATGCAAGTAAATATTTTGGCAGGGCTGGTTGGACAGACAAAAATGATTTGGTGGTCAAGTTGGCTGAGGAGGTACAGCCAGGGGCTTTGGGCCCTGTTACAGTTTGCC 450
* * * * *
283 TAGACTGCCAAGCTGTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGGTCATCCGCTGTGCTGAGTTCCTGGCATGCACAACTGGAGGACTCCTGCTTCAAGTTCCCTGCAGACCCAGCTCCTGAACAGTGGAGTGGCTGTTGTGCGCG 432
* * * * *
451 TAGACTGCCAAGCTGTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGGTCATCCGCTGTGCTGAGTTCCTGGCATGCACAACTGGAGGACTCCTGCTTCAAGTTCCCTGCAGACCCAGCTCCTGAACAGTGGAGTGGCTGTTGTGCGCG 600
* * * * *
433 AAGGATGCTCCGTCGCAGCGCCACACAGAGACTGCGAGAACTCTGCAGGAGAGGAGGATGAAGAGGAGGAGACGATGGATTACAGAGCGGCCAAGATGGCTTGGCCCGAGGACCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGAGGCG 582
* * * * *
601 AAGGATGCTCCGTCGCAGCGCCACACAGAGACTGCGAGAACTCTGCAGGAGAGGAGGATGAAGAGGAGGAGACGATGGATTACAGAGCGGCCAAGATGGCTTGGCCCGAGGACCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGAGGCG 750
* * * * *
583 GCCGCTATCCCGTAGCAGAGAAGGAAGCCCTGCTGCCGAGCCTGACGTGCCACAGACACCAAGGAGGACTCAGAAAAGGACCGCTTAACGCAAGTACCCAGATACCAAGAAATACCAGCTTGCATGTACCAAGAAATGTCTATAAT 782
* * * * *
751 GCCGCTATCCCGTAGCAGAGAAGGAAGCCCTGCTGCCGAGCCTGACGTGCCACAGACACCAAGGAGGACTCAGAAAAGGACCGCTTAACGCAAGTACCCAGATACCAAGAAATACCAGCTTGCATGTACCAAGAAATGTCTATAAT 900
* * * * *
733 GCATCATCACAGTACCTCAGGTTTTTGCAGCACATTCGGGAAGATAAAGTCTAGCAACAGCCTCAAGCCGGGGCTTGGCCAGGGGCGAGATAAAAGTGAGCCGCCAAGTGAAGAGAAATGAG-GAAGAGAGCATACGCTCTGCCTGTC 881
* * * * *
901 GCATCATCACAGTACCTCAGGTTTTTGCAGCACATTCGGGAAGATAAAGTCTAGCAACAGCCTCAAGCCGGGGCTTGGCCAGGGGCGAGATAAAAGTGAGCCGCCAAGTGAAGAGAAAT-AGAAAAAGAGCATACGCTCTGCCTGTC 1049
* * * * *

```

- 1. red - referentna sekvenca BACH2
- 2. red - sekvenca dobivena početnicom za uzvodnu sekvencu pET28a

Slika 22. Usporedba sekvence dobivene prijanjanjem početnice za uzvodnu sekvencu pET28a na konstrukt pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klon 28 i referentne sekvence *BACH2*. Sintetizirana sekvenca identična je referentnoj sekvenci *BACH2* od 1. do 846. nt te su crvenim rombovima, radi utvrđivanja ugradnje *BACH2* u plazmid u ispravnom okviru čitanja, označeni tripleti nukleotida od kodona za početak translacije proteina do kodona koji označava početak sekvence *BACH2* (podcrtane crvenom linijom). Na slici je crnom crtom podcrtana sekvenca oznake 6xHis.


```

1501 CCGGTACCAATCAAAGTCTGCCCTCACCCTCCCTTGGAGACCAGGACCCAGGACTTCAGACTCCCTGCTCTTTCCTAATCTCTACGGGAGGACGGGAGCGGGGGCTCACCTCGAGCTCCCTCTCTGTGAGTTCTCTCTCGCCCTGT 1650
|||||
317 CCGGTACCAATCAAAGT-TGCCCTCGTTACCCCTCCCTTGGAGACCAGGACCCAGGACTTCAGACTCCCTGCTCTTTCCTAATCTCTACGGGAGGACGGGAGCGGGGGCTCACCTCGAGCTCCCTCTCTGTGAGTTCTCTCTCGCCCTGT 464
*
*
*
1651 TCCGAGGAGCCAGATTCCTTCCACAGAACATCAGGAACAGGCTGATGAGGATGSAATGTACAAACAGTCCGAGCCCAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGGAACCACTCCAGTACAGAAATCCGATCGTTCTCGGAAGCAGAG 1800
465 TCCGAGGAGCCAGATTCCTTCCACAGAACATCAGGAACAGGCTGATGAGGATGSAATGTACAAACAGTCCGAGCCCAATTAAGTGTGAGCAGTCTTATGGAACCACTCCAGTACAGAAATCCGATCGTTCTCGGAAGCAGAG 614
*
*
*
1801 AGTGTGCTGTCTCTGTGAGGACAGGGCCAGGAGTAAACTTCCTTTTCTGTAGATCAAATCAGAGATCTTCCAGGAACGATTTCCAGATGATGATTAAGTGCACAACTACAGACAGTTAGAGTTTATTCAATGATGTC 1950
615 AGTGTGCTGTCTCTGTGAGGACAGGGCCAGGAGTAAACTTCCTTTTCTGTAGATCAAATCAGAGATCTTCCAGGAACGATTTCCAGATGATGATTAAGTGCACAACTACAGACAGTTAGAGTTTATTCAATGATGTC 764
*
*
*
1951 CGACGGCCAGCAGAAACCGCATCGCGCCCGAGCTGCCCAAAGGAAACTGGACTGTATTGAGAAATAGAAATCGCAAAATGGTGTGTGAGAAAGAGAAACTGTTGTGAGAGGAAATCAACTGAAAGCATGATGAGG 2100
765 CGACGGCCAGCAGAAACCGCATCGCGCCCGAGCTGCCCAAAGGAAACTGGACTGTATTGAGAAATAGAAATCGCAAAATGGTGTGTGAGAAAGAGAAACTGTTGTGAGAGGAAATCAACTGAAAGCATGATGAGG 914
*
*
*
2101 GAAGTGTGAGCAACTTCTCTGCTTCCAGGAAATTTGCCAGAGACATCCAGAGCCCGAGCAGATCCAGGCCCTGCATCGTATTGCCCTGTCTCAGACCCATGGACTTGCACAGGCTCCAGTATTAACTGCGCCCTTGGGT 2250
915 GAAGTGTGAGCAACTTCTCTGCTTCCAGGAAATTTGCCAGAGACATCCAGAGCCCGAGCAGATCCAGGCCCTGCATCGTATTGCCCTGTCTCAGACCCATGGACTTGCACAGGCTCCAGTATTAACTGCGCCCTTGGGT 1064
*
*
*
2251 GCTGAGCAACATTGCGGCTCCCAATGCGAGTGGGGGAAACGTCCTGCTGCTTGGAGCCAGGCGGGCTCCCGCCGACCCCGCTGGGACCCAGCAACACTCCGGAATTTGACTCTTGGGAGGAGACTAGAGGCATGAGC 2400
1065 GCTGAGCAACATTGCGGCTCCCAATGCGAGTGGGGGAAACGTCCTGCTGCTTGGAGCCAGGCGGGCTCCCGCCGACCCCGCTGGGACCCAGCAACACTCCGGAATTTGACTCTTGGGAGGAGACTAGAGGCATGAGC 1214
*
*
*
2401 CCGGAAACCTTCTCAGAGAGGACCTCCTTTGAAACCCAGGAGCCAAACAGTGAACCTGGACTTCTGCCAGGAAATGACTGATAAGTGTACAACTGACGAACAGCCAGGAAAGATTATACCTAG----- 2526
1215 CCGGAAACCTTCTCAGAGAGGACCTCCTTTGAAACCCAGGAGCCAAACAGTGAACCTGGACTTCTGCCAGGAAATGACTGATAAGTGTACAACTGACGAACAGCCAGGAAAGATTATACCTAG----- 1364
*
*
*
2526 ----- 2526
1365 TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAGGCGGATTCGCCAAAC 1414

```

1. red - referentna sekvenca *BACH2*
2. red - sekvenca dobivena početnicom za terminator T7

Slika 24. Prikaz sekvence sintetizirane početnicom koja pranja na terminator T7 u plazmidu pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klon 28 i referentne sekvence *BACH2*. Dobivena sekvenca počinje sa sintezom 73 nt nakon kodona za kraj sekvence *BACH2* (podcrtan crvenom linijom), a identična je referentnoj sekvenci *BACH2* od njenog kraja do 1626. nt.

Sekvenciranjem plazmidne DNA pET28a-6xHis-BACH2 izolirane iz klon 30 dobivene su tri sekvence koje su poravnate s referentnom sekvencom *BACH2* (baza podataka *NCBI*). Sekvenca dobivena pranja početnice na uzvodnu sekvencu plazmida pET28a-6xHis dokazuje da se kodirajuća sekvenca gena *BACH2* ugradila u vektor u ispravnom okviru čitanja s kodonom početka translacije i sekvencom za oznaku 6xHis (Slika 25). U navedenoj sekvenci i u druge dvije sekvence su, kao i u sekvencama sintetiziranim sekvenciranjem plazmida izoliranog iz klon 13, prisutne mutacije nastale greškom DNA polimeraze što potvrđuje izostanak mutacija u sekvencama sintetiziranim s dvije različite početnice (Slika 25, 26 i 27).

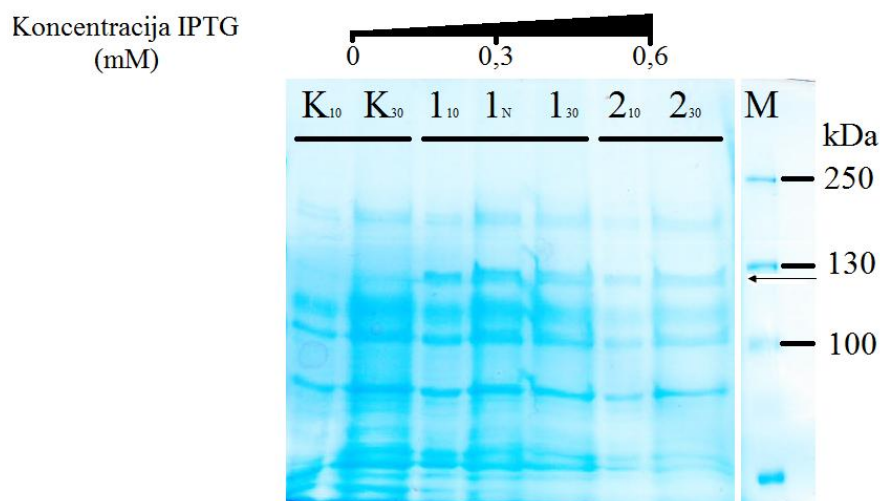

```

1 ----- 1
1 GACTGAACGCTCATTCCCTCTAGATAATTTTGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCGACGACCAICATCAICATCACAGCAGCGGCTGGTGGCCGCGGCGAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATGGG 150
* * * * *
1 -----ATGTCCTGGGATGAGAAGCTGACTCCCCATGTATGTATGAGTCCACAGTCCACTGCAACCACTCTCTGGGCTCAATGACCAGCGAAAAGGATATCTCTGTGACGTGACTTTGATCGTGGAGAG 134
151 TCGCGAATCGGAATTCATGTCCTGGGATGAGAAGCTGACTCCCCATGTATGTATGAGTCCACAGTCCACTGCAACCACTCTCTGGGCTCAATGACCAGCGAAAAGGATATCTCTGTGACGTGACTTTGATCGTGGAGAG 300
* * * * *
135 GAAGGAGTTCGGGGCCACCAGGCTGTGCTGGCCGATGCAAGTGAATATTTTGGCAGGCGCTGGTTGGACAGACAAAAATGATTTGGTGGTCACTTGCCTGAGGAGTCCAGCCAGGGGCTTTGGGCGCTGTACAGTTGCTTA 284
301 GAAGGAGTTCGGGGCCACCAGGCTGTGCTGGCCGATGCAAGTGAATATTTTGGCAGGCGCTGGTTGGACAGACAAAAATGATTTGGTGGTCACTTGCCTGAGGAGTCCAGCCAGGGGCTTTGGGCGCTGTACAGTTGCTTA 450
* * * * *
285 CACTGCCAAGCTGTTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGTCACTCCGCTGTGCTGAGTTCCTGGCATGCACAACTGGAGACTCTGCTTCACTTCCCTGACAGCCAGCTCTGTAACAGTGGAGATGGCTTTTGTGGCGGAA 434
451 CACTGCCAAGCTGTTACTCAGCAGAGAAAACATCCGCGAGTCACTCCGCTGTGCTGAGTTCCTGGCATGCACAACTGGAGACTCTGCTTCACTTCCCTGACAGCCAGCTCTGTAACAGTGGAGATGGCTTTTGTGGCGGAA 600
* * * * *
435 GSATGCTGGTCCAGCGCCACAGGAGACTGCGAAGACTCTGCGAGAGAGGAGGATGAAGAGGAGGAGACGATGATTCAGAGACGGCCAGATGGCTTCCCCAGGACCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGAGGCCGC 584
601 GSATGCTGGTCCAGCGCCACAGGAGACTGCGAAGACTCTGCGAGAGAGGAGGATGAAGAGGAGGAGACGATGATTCAGAGACGGCCAGATGGCTTCCCCAGGACCCAGATGCTTCCAGAGCCCATCAGCTTTGAGGCCGC 750
* * * * *
585 CCGCATCCCCGTAGCAGAGAGGAGAGCCCTGCTGCCGAGCCTGACGTGCCACAGACACCAAGGAGAGCTCAGAAAAGGACGCGTTAACGCGATACCCAGATACAGAAATACCAGCTTGCATGTACCAAGAAATGCTATAATGC 734
751 CCGCATCCCCGTAGCAGAGAGGAGAGCCCTGCTGCCGAGCCTGACGTGCCACAGACACCAAGGAGAGCTCAGAAAAGGACGCGTTAACGCGATACCCAGATACAGAAATACCAGCTTGCATGTACCAAGAAATGCTATAATGC 900
* * * * *
735 ATCATCACAGTACCTCAGGTTTTGCAAGCACATCCGGGAAGATACTCTAGCAACAGCCTCAAGCCGGGCTTGGCAGGGGCGAGATTAAGAGTACCCGAGTAAAGAGATGAGGAGAGAGCATCACGCTCTGCCTGTCTGG 884
901 ATCATCACAGTACCTCAGGTTTTGCAAGCACATCCGGGAAGATACTCTAGCAACAGCCTCAAGCCGGGCTTGGCAGGGGCGAGATTAAGAGTACCCGAGTAAAGAGATGAGGAGAGAGCATCACGCTCTGCCTGTCTGG 1050
* * * * *
885 AGATGAGCCTGACGCCAAGGACAGAGCGGGGATGTGAGATGGACCGGAAACAGCCAGCCAGCTGCCCCACCCGCGCCAGCTGGGGCCGCTGCTGGAGAGATCCAGAGCGTGGCTCGCCCTCCTGCTTAAGGTCTCTGTT 1034
1051 AGATGAGCCTGACGCCAAGGACAGAGCGGGGATGTGAGATGGACCGGAAACAGCCAGCCAGCTGCCCCACCCGCGCCAGCTGGGGCCGCTGCTGGAGAGATCCAGAGCGTGGCTCGCCCTCCTGCTTAAGGTCTCTGTT 1198

```

- 1. red - referentna sekvenca *BACH2*
- 2. red - sekvenca dobivena početnicom za uzvodnu sekvencu pET28a

Slika 25. Prikaz referentne sekvence *BACH2* uspoređene sa sekvencom dobivenom prijanjanjem početnice za uzvodnu sekvencu vektora pET28a na pET28a-6xHis-BACH2 izoliranog iz klona 30. Sintetizirana sekvenca počinje 166 nt prije početka sekvence *BACH2*, a prikazuje položaj kodona za početak translacije i početak sekvence *BACH2* (podcrtane crvenom crtom) te sekvencu oznake 6xHis (podcrtana crnom crtom). Od kodona za početak translacije do kodona za početak *BACH2* su, radi potvrde ugradnje *BACH2* u konstrukt u ispravnom okviru čitanja, crvenim rombovima označeni tripleti nukleotida. Ugrađena sekvenca *BACH2* identična je referentnoj od 1. do 947. nt referentne sekvence.

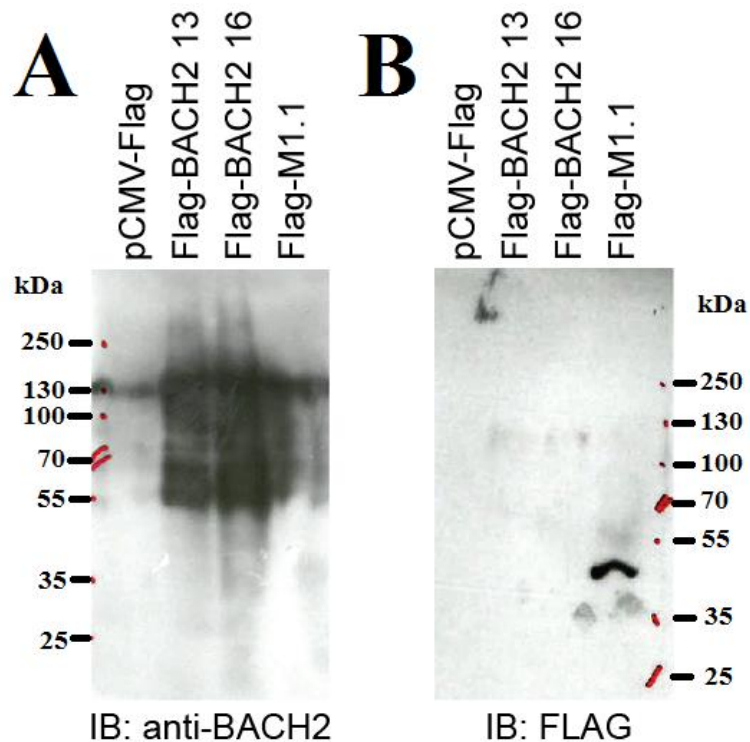


Slika 28. Za ekspresiju fuzijskog proteina 6xHis-BACH2 korištene su bakterijske stanice *Rosetta* koje su inducirane IPTG-om. Lizati bakterija razdvojeni su na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu. Na gel su nanosene razgrađene stanice s denaturiranim proteinima u volumenu 10 i 30 μ l, a u jažicu oznake 1N uzorak je nanosen u nepoznatom volumenu. Protein 6xHis-BACH2 veličine oko 130 kDa (označen strelicom) je sintetiziran s vektora pET28a-6xHis-BACH2 klon 19 nakon indukcije IPTG-om u koncentraciji 0,3 (oznaka 1) i 0,6 mM (oznaka 2). Protein 6xHis-BACH2 nije sintetiziran u kontrolnoj bakterijskoj kulturi (oznaka K) ili je pak sintetiziran u puno manjoj količini koju nije moguće detektirati ovom metodom. Na gel je dodan marker za proteine (oznaka M, *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific) čija je skala veličina preuzeta s internetske stranice proizvođača.

4.2.2. Provjera prekomjerne ekspresije proteina FLAG-BACH2

Protein FLAG-BACH2 eksprimiran je s plazmida pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 klonova 13 i 16 u ljudskim embrionalnim stanicama bubrega *HEK293T* u kojima je protein BACH2 endogeno eksprimiran (baza podataka *THE HUMAN PROTEIN ATLAS*). Očekivana veličina proteina FLAG-BACH2 je 94,7 kDa (prema alatu za računanje molekularne težine proteina na *Science Gateway*), a očekivana veličina proteina BACH2 detektiranog korištenim antitijelom anti-BACH2 130 kDa (u podacima o proizvodu na stranici *Cell Signaling Technology*). Uz protein BACH2 u uzorcima su detektirani dodatni proteini što ukazuje na nespecifičnost antitijela za protein BACH2. Na fotografskom filmu nitrocelulozne membrane inkubirane u antitijelu anti-FLAG detektirana je oznaka FLAG u histonskoj varijanti macroH2A1.1 s oznakom FLAG veličine oko 45 kDa te slab signal proteina FLAG-BACH2 veličine 130 kDa u jažici s plazmidom izoliranim iz klon 13 i 16 (Slika 29). Slabiji signal proteina FLAG-BACH2 u usporedbi sa signalom proteina FLAG-macroH2A1.1 moguća je posljedica slabije

ekspresije proteina FLAG-BACH2 s konstrukta pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2. Signal proteina FLAG-BACH2 može biti slabiji i zato jer je navedeni protein veći od proteina FLAG-macroH2A1.1 pa je i veća vjerojatnost greške tijekom transkripcije i translacije koja dovodi do razgradnje nefunkcionalnih proteina.



Slika 29. Prikaz rezultata analize *Western blot*. **A** Fotografski film membrane inkubirane u primarnom antitijelu protiv oznake BACH2 (IB: anti-BACH2). **B** Prikaz membrane inkubirane u primarnom antitijelu protiv oznake FLAG (IB: anti-FLAG). pCMV-Flag je oznaka za uzorak stanica *HEK293T* transficiranih plazmidom pCMV-Tag2B-FLAG, Flag-BACH2 13 i 16 su oznake za stanice transficirane plazmidom pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 klonova 13 i 16, a Flag-M1.1 oznaka za stanice transficirane plazmidom s oznakom FLAG i kodirajućom sekvencom gena za histonsku varijantu macroH2A1.1. Skala veličina napravljena je prema markeru za proteine (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific) sa skalom veličine proteina preuzetom s internetske stranice proizvođača.

5. Rasprava

Cjelogenomske asocijacijske studije otkrile su pleiotropnost povezanosti gena *BACH2* s *N*-glikozilacijom IgG-a te s brojnim autoimunim i upalnim bolestima povezanim sa starenjem. Ovakvi rezultati sugeriraju da bi gen *BACH2* mogao biti uključen u regulaciju glikozilacije antitijela IgG, te da bi alternativna glikozilacija mogla biti uključena u razvoj i tijek upalnih bolesti povezanih sa starenjem. Bioinformatička analiza provedena u grupi prof. Zoldoš identificirala je nekoliko gena za galaktoziltransferaze, a koje imaju DNA element Maf za vezanje transkripcijskog faktora *BACH2*. Istraživanje provedeno u okviru ovog diplomskog rada dio je opsežnijeg istraživanja uloge gena *BACH2* u glikozilaciji IgG-a. Specifični cilj bio je klonirati i eksprimirati protein *BACH2* u bakterijskim stanicama *Rosetta* te prekomjerno eksprimirati ovaj proteina u animalnim stanicama *HEK293T*.

Kloniranje kodirajuće sekvence gena *BACH2* u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG preduvjet je za ekspresiju proteina *BACH2* u bakterijskim i animalnim stanicama, a započinje umnažanjem kodirajuće sekvence gena *BACH2* s restrikcijskim mjestima za restrikcijske endonukleaze *EcoRI* i *XhoI*. Umnažanje *BACH2* popraćeno je sintezom nespecifičnih fragmenata radi kojih je *BACH2* veličine 2,5 kb (baza podataka *NCBI*) izrezana direktno iz gela iz kojeg je potom pročišćena. Najveća koncentracija pročišćene *BACH2* izmjerena je nakon lančane reakcije polimerazom u koju je dodana komplementarna DNA pripremljena početnicom oligo(dT) i nasumičnim heksamerima i koja je provedena pri temperaturi prijanjanja početnica od 53 °C. Pročišćena sekvenca *BACH2* je, kao i vektori pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG, razgrađena restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* i *XhoI*. Korištene restrikcijske endonukleaze u sekvenci *BACH2* i vektorima stvaraju tzv. „ljepljive krajeve“ i omogućavaju ugradnju *BACH2* u vektore na temelju komplementarnosti baza. Radi provjere ispravne ugradnje gena *BACH2* u vektore transformirane su stanice *XL10 Gold*. U transformiranim stanicama umnožena je plazmidna DNA onih klonova u kojima je lančanom reakcijom polimeraze u bakterijskim klonovima umnožena 2,5 kb velika sekvenca *BACH2*, a na sekvenciranje su poslone one plazmidne DNA za koje je restrikcijskom analizom u plazmidima utvrđena ugradnja gena *BACH2*. Sekvenciranjem dijela plazmidne DNA oko ugrađene sekvence *BACH2* dokazan je njen ispravan nukleotidni slijed i njena ugradnja u vektore u okviru čitanja s početnim kodonom za translaciju, sekvencom za oznaku 6xHis kodiranom u vektoru pET28a-6xHis odnosno sekvencom za oznaku FLAG kodiranom u pCMV-Tag2B-FLAG te kodonom za STOP.

Plazmid pET28a-6xHis-BACH2 omogućava ekspresiju proteina 6xHis-BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* nakon dodatka IPTG u koncentraciji 0,3 i 0,6 mM. Očekivana veličina proteina iznosi 96,4 kDa prema alatu za računanje molekularne težine proteina na *Science Gateway*. Međutim nakon denaturirajuće poliakrilamidne gel elektroforeze, kojom se proteini razdvajaju na temelju mase, u uzorcima s denaturiranim proteinima izoliranim iz stanica s dodanim IPTG-om detektirana je veličina proteina od 130 kDa. Ovakva razlika u očekivanoj i detektiranoj veličini proteina moguća je posljedica aminokiselinskog slijeda zbog kojeg se stvara određeni naboj na proteinu uslijed oblaganja proteina SDS-om te uzrokuje promijenjenu pokretljivost proteina u gelu. Također je moguće da protein stvori kompleks, unatoč denaturirajućim uvjetima. Literaturni podaci također svjedoče o promijenjenoj pokretljivosti proteina BACH2 na denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima, pa se stoga ovakav rezultat uklapa u poznate rezultate drugih grupa (Ochiai i sur. 2008, Roychoudri i sur. 2016).

Prekomjernom ekspresijom proteina FLAG-BACH2 u stanicama *HEK293T*, detektiran je protein FLAG-BACH2 veličine od 130 kDa. Detektirana veličina odudara od očekivane veličine proteina FLAG-BACH2 od 94,7 kDa, ali je identična očekivanoj veličini proteina BACH2 detektiranog antitijelom anti-BACH2 (u podacima o proizvodu na stranici *Cell Signaling Technology*) koja pak odudara od očekivane veličine proteina BACH2 od 92,5 kDa (baza podataka *UniProt*). Razlika u očekivanoj i detektiranoj veličini proteina nije posljedica detekcije proteina antitijelom već provedbe denaturirajuće gel elektroforeze.

Prema svemu gore navedenom uspješno je provedeno kloniranje kodirajuće sekvence gena *BACH2* kao i ekspresija proteina 6xHis-BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* i prekomjerna ekspresija proteina FLAG-BACH2 u kulturi ljudskih embrionalnih stanica bubrega *HEK293T*. Uspješnost ovog eksperimenta omogućava provedbu daljnjih eksperimenata. Proteinom 6xHis-BACH2 mogli bi se identificirati interakcijski partneri proteina BACH2 putem afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu u uvjetima *in vitro* i direktna vezujuća mjesta proteina BACH2 kojim on ostvaruje interakcije s drugim proteinima. Plazmid pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2, koji omogućava ekspresiju proteina FLAG-BACH2, u animalnim stanicama poput pomoćničkih i citotoksičnih limfocita T i progenitorskih, prekursorskih i zrelih limfocita B u kojima je BACH2 prirodno eksprimiran (Muto i sur. 1998, Tsukumo i sur. 2013) može poslužiti za vraćanje funkcije proteina BACH2 nakon uklanjanja gena *BACH2* iz genoma stanica ili prekomjernu ekspresiju proteina BACH2 u navedenim stanicama. Prekomjernom ekspresijom ili povratkom funkcije proteina BACH2

mogli bi identificirati njegove interakcijske proteine, mjesto vezanja u genomu. Specifično, u istraživanjima koja se provode u grupi prof. Zoldoš u interesu je identificirati interakcijske glikoziltransferaze kako bi se otkrila uloga BACH2 u glikozilaciji IgG-a koja vodi njegovom proupalnom karakteru zabilježenom u različitim upalnim bolestima poput reumatoidnog artritisa (Ercan i sur. 2010), sistemskog lupusa eritematodesa (Vučković i sur. 2015) i upalnih bolesti crijeva (Trbojević Akmačić i sur. 2015). Također, smatra se da bi uloga BACH2 u senescenciji imunog sustava i upalnom odgovoru, već otkrivena u pomoćničkim limfocitima T (Kuwahara i sur. 2014), mogla teći kroz regulaciju alternativne glikozilacije IgG-a.

6. Zaključak

U sklopu ovog diplomskog rada provedeno je kloniranje i ekspresija ljudskog proteina BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* te prekomjerna ekspresija istog proteina u animalnim stanicama *HEK293T*. Tijekom kloniranja, specifično lančane reakcije polimerazom, utvrđeno je bolje umnažanje kodirajuće sekvence gena *BACH2* uz korištenje komplementarne DNA dobivene iz limfoblastoične linije NALM-1 početnicama oligo(dT) i nasumičnim heksamerima uz umnažanje *BACH2* pri temperaturi prijanjanja početnica od 53 °C ili uz korištenje cDNA dobivene početnicama oligo(dT) uz umnažanje *BACH2* pri temperaturi od 56 °C. Umnožena kodirajuća sekvenca gena *BACH2* ugrađena je u vektore pET28a-6xHis i pCMV-Tag2B-FLAG restriksijskim endonukleazama te je sekvenciranjem rekombinantnih DNA dokazana ugradnja *BACH2* u plazmide u ispravnom okviru čitanja s kodonom za početak translacije i oznakom 6xHis tj. FLAG te je dokazan ispravan nukleotidni, a time i aminokiselinski, slijed ugrađene *BACH2*. Odabrane rekombinantne DNA korištene su za ekspresiju proteina BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* i za njegovu prekomjernu ekspresiju u animalnim stanicama *HEK293T*. Nakon ekspresije u bakterijskim stanicama denaturirajućom gel elektroforezom detektirana je veličina proteina BACH2 od 130 kDa koja odudara od očekivane veličine proteina, ali je u skladu s poznatim rezultatima drugih istraživačkih grupa koji svjedoče o promijenjenoj pokretljivosti proteina BACH2 na denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima. Zbog promijenjene pokretljivosti proteina BACH2 na denaturirajućim poliakrilamidnim gelovima je i nakon ekspresije proteina u animalnim stanicama i provedbe analize *Western blot* na nitroceluloznoj membrani antitijelima anti-BACH2 i anti-FLAG detektirana veličina proteina BACH2 od 130 kDa. Analizom *Western blot* dodatno je utvrđena nespecifičnost antitijela anti-BACH2 koje, uslijed velike konzerviranosti područja detektiranog u ljudskom proteinu BACH2, na nitroceluloznoj membrani detektira i druge stanične proteine.

Na temelju gore navedenog možemo zaključiti da je kloniranje, kao i ekspresija ljudskog proteina BACH2 u bakterijskim stanicama *Rosetta* i prekomjerna ekspresija proteina BACH2 u animalnim stanicama *HEK293T*, uspješno provedeno te da pripremljene konstrukte pET28a-6xHis-BACH2 i pCMV-Tag2B-FLAG-BACH2 kao i egzogeno uzgojene proteine 6xHis-BACH2 i FLAG-BACH2 možemo koristiti u daljnjim istraživanjima.

7. Literatura

1. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. 2010. Genska pozadina sinteze i različitosti protutijela. U: Taradi M. (ur.) *Imunologija* (sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje). Zagreb, Medicinska naklada, str. 80-98.
2. Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. 2010. Humoralna imunost. U: Taradi M. (ur.) *Imunologija* (sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje). Zagreb, Medicinska naklada, str. 208-224.
3. Bondt A., Rombouts Y., Selman M. H. J., Hensbergen P. J., Reiding K. R., Hazes J. M. W., Dolhain R. J. E. M., Wuhrer M. 2014. Immunoglobulin G (IgG) Fab Glycosylation Analysis Using a New Mass Spectrometric High-throughput Profiling Method Reveals Pregnancy-associated Changes. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**, 3029–3039.
4. De Martinis M., Franceschi C., Monti D., Ginaldi L. 2005. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Letters* **579**, 2035-2039.
5. Ercan A., Cui J., Chatterton D. E. W., Deane K. D., Hazen M. H., Brintnell W., O'Donnell C. I., Derber L. A., Weinblatt M. E., Shadick N. A., Bell D. A., Cairns E., Solomon D. H., Holers V. M., Rudd P. M., Lee D. M. 2010. IgG galactosylation aberrancy precedes disease onset, correlates with disease activity and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* **62**, 2239–2248.
6. Franke A., McGovern D. P. B., Barrett J. C., Wang K., Radford-Smith G. L., Ahmad T., Lees C. W., Balschun T., Lee J., Roberts R., Anderson C. A., Bis J. C., Bumpstead S., Ellinghaus D., Festen E. M., Georges M., Haritunians T., Jostins L., Latiano A., Mathew C. G., Montgomery G. W., Prescott N. J., Rotter J. I., Schumm P., Sharma Y., Simms L. A., Taylor K. D., Whiteman D., Wijmenga C., Baldassano R. N., Barclay M., Bayless T. M., Brand S., Buning C., Cohen A., Colombel J.-F., Cottone M., Stronati L., Denson T., De Vos M., D'Inca R., Dubinsky M., Edwards C., Florin T., Franchimont D., Gearry R., Glas J., Van Gossum A., Guthery S. L., Halfvarson J., Hommes D., Hugot J.-P., Laukens

- D., Lawrance I., Lemann M., Levine A., Libioulle C., Louis E., Mowat C., Newman W., Panés J., Phillips A., Proctor D. D., Regueiro M., Rutgeerts P., Sanderson J., Sans M., Seibold F., Steinhart A. H., Stokkers P. C. F., Torkvist L., Kullak Ublick G., Raychaudhuri S., Green T., Walters T., Targan S. R., Brant S. R., Rioux J. D., D'Amato M., Weersma R., Kugathasan S., Griffiths A. M., Mansfield J. C., Vermeire S., Duerr R. H., Silverberg M. S., Satsangi J., Schreiber S., Cho J. H., Annese V., Hakonarson H., Daly M. J., Parkes M. 2010. Meta-Analysis Increases to 71 the Tally of Confirmed Crohn's Disease Susceptibility Loci. *Nature Genetics* **42**, 1118–1125.
7. Huang C., Geng H., Boss I., Wang L., Melnick A. 2014. Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation. *Blood* **123**, 1012-1020.
 8. Igarashi K., Ochiai K., Itoh-Nakadai A., Muto A. 2014. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunological Reviews* **261**, 116–125.
 9. Itoh-Nakadai A., Matsumoto M., Kato K., Sasaki J., Uehara Y., Sato Y., Ebina-Shibuya R., Morooka M., Funayama R., Nakayama K., Ochiai K., Muto A., Igarashi K. 2017. A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Reports* **18**, 2401-2414.
 10. Kaneko Y., Nimmerjahn F., Ravetch J. V. 2006. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **313**, 670-673.
 11. Karsten C. M., Pandey M. K., Figge J., Kilchenstein R., Taylor P. R., Rosas M., McDonald J. U., Orr S. J., Berger M., Petzold D., Blanchard V., Winkler A., Hess C., Reid D. M., Majoul I. V., Strait R. T., Harris N. L., Köhl G., Wex E., Ludwig R., Zillikens D., Nimmerjahn F., Finkelman F. D., Brown G. D., Ehlers M., Köhl J. 2012. Galactosylated IgG1 links FcγRIIB and Dectin-1 to block complement-mediated inflammation. *Nature Medicine* **18**, 1401–1406.
 12. Krištić J., Vučković F., Menni C., Klarić L., Keser T., Beceheli I., Pučić-Baković M., Novokmet M., Mangino M., Thaqi K., Rudan P., Novokmet N., Šarac J., Missoni S.,

- Kolčić I., Polašek O., Rudan I., Campbell H., Hayward C., Aulchenko Y., Valdes A., Wilson J. F., Gornik O., Primorac D., Zoldoš V., Lauc G. 2014. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *Journals of Gerontology: Biological Sciences* **69**, 779-789.
13. Kurokawa H., Motohashi H., Sueno S., Kimura M., Takagawa H., Kanno Y., Yamamoto M., Tanaka T. 2009. Structural Basis of Alternative DNA Recognition by Maf Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 6232-6244.
14. Kuwahara M., Suzuki J., Tofukuji S., Yamada T., Kanoh M., Matsumoto A., Maruyama S., Kometani K., Kurosaki T., Ohara O., Nakayama T., Yamashita M. 2014. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nature communications* **5**, 1-12.
15. Lauc G., Huffman J. E., Pučić M., Zgaga L., Adamczyk B., Mužinić A., Novokmet M., Polašek O., Gornik O., Krištić J., Keser T., Vitart V., Scheijen B., Uh H., Molokhia M., Patrick A. L., McKeigue P., Kolčić I., Lukić I. K., Swann O., van Leeuwen F. N., Ruhaak L. R., Houwing-Duistermaat J. J., Slagboom P. E., Beekman M., de Craen A. J. M., Deelder A. M., Zeng Q., Wang W., Hastie N. D., Gyllensten U., Wilson J. F., Wuhler M., Wright A. F., Rudd P. M., Hayward C., Aulchenko Y., Campbell H., Rudan I. 2013. Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLOS Genetics* **9**, e1003225.
16. Lauc G., Pezer M., Rudan I., Campbell H. 2016. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta* **1860**, 1574-1582.
17. Malhotra R., Wormald M. R., Rudd P. M., Fisher P. B., Dweh R. A., Sim R. B. 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the manose-binding protein. *Nature Medicine* **1**, 237-243.
18. Muto A., Hoshino H., Madisen L., Yanai N., Obinata M., Karasuyama H., Hayashi N., Nakauchi H., Yamamoto M., Groudine M., Igarashi K. 1998. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 39 enhancer. *The EMBO Journal* **17**, 5734-5743.

19. Muto A., Tashiro S., Nakajima O., Hoshino H., Takahashi S., Sakoda E., Ikebe D., Yamamoto M., Igarashi K. 2004. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* **429**, 566-571.
20. Muto A., Ochiai K., Kimura Y., Itoh-Nakadai A., Calame K.L., Ikebe D., Tashiro S., Igarashi K. 2010. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *The EMBO Journal* **29**, 4048–4061.
21. Nakamura A., Ebina-Shibuya R., Itoh-Nakadai A., Muto A., Shima H., Saigusa D., Aoki J., Ebina M., Nukiwa T., Igarashi K. 2013. Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *The Journal of Experimental Medicine* **210**, 2191-2204.
22. Pučić M., Mužinić A., Novokmet M., Škledar M., Pivac N., Lauc G., Gornik O. 2012. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology* **22**, 975–982.
23. Roychoudri R., Clever D., Li P., Wakabayashi Y., Quinn K. M., Klebanoff C. A., Ji Y., Sukumar M., Eil R. L., Yu Z., Spolski R., Palmer D. C., Pan J. H., Patel S. J., Macallan D. C., Fabozzi G., Shih H., Kanno Y., Muto A., Zhu J., Gattinoni L., O’Shea J. J., Okkenhaug K., Igarashi K., Leonard W. J., Restifo N. P. 2016. BACH2 regulates CD8+ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nature Immunology* **17**, 851-860.
24. Shields R. L., Lai J., Keck R., O’Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H. A., Presta L. G. 2002. Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 26733–26740.
25. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N., Shitara K. 2003. The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting N-Acetylglucosamine of Human

- IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 3466–3473.
26. Tanaka H., Muto A., Shima H., Katoh Y., Sax N., Tajima S., Brydun A., Ikura T., Yoshizawa N., Masai H., Hoshikawa Y., Noda T., Nio M., Ochiai K., Igarashi K 2016. Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 6316–6330.
27. Trbojević Akmačić I., Ventham N. T., Theodoratou E., Vučković F., Kennedy N. A., Krištić J., Nimmo E. R., Kalla R., Drummond H., Štambuk J., Dunlop M. G., Novokmet M., Aulchenko Y., Gornik O., Campbell H., Pučić Baković M., Satsangi J., Lauc G. 2015. Inflammatory Bowel Disease Associates with Proinflammatory Potential of the Immunoglobulin G Glycome. *Inflammatory Bowel Disease* **21**, 1237-1247.
28. Tsukumo S., Unno M., Muto A., Takeuchia A., Kometani K., Kurosaki T., Igarashi K., Saito T. 2013. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *PNAS* **110**, 10735-10740.
29. Vučković F., Krištić J., Gudelj I., Teruel M., Keser T., Pezer M., Pučić-Baković M., Štambuk J., Trbojević-Akmačić I., Barrios C., Pavić T., Menni C., Wang Y., Zhou Y., Cui L., Song H., Zeng Q., Guo X., Pons-Estel B. A., McKeigue P., Patrick A. L., Gornik O., Harjaček M., Alarcon-Riquelme M., Molokhia M., Wang W., Lauc G. 2015. Association of Systemic Lupus Erythematosus With Decreased Immunosuppressive Potential of the IgG Glycome. *Arthritis & Rheumatology* **67**, 2978-2989.
30. Wang Z., Zang C., Rosenfeld J. A., Schones D. E., Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T., Peng W., Zhang M. Q., Zhao K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics* **40**, 897-903.
31. Yang W., Shen N., Ye D.-Q., Liu Q., Zhang Y., Qian X.-X., Hirankarn N., Ying D., Pan H.-F., Mok C. C., Chan T. M., Wong R. W. S., Lee K. W., Mok M. Y., Wong S. N., Leung A. M. H., Li X.-P., Avihingsanon Y., Wong C.-M., Lee T. L., Ho M. H. K., Lee P. P. W., Chang Y. K., Li P. H., Li R.-J., Zhang L., Wong W. H. S., Ng I. O. L., Lau C. S., Sham P. C., Lau Y. L. 2010. Genome-Wide Association Study in Asian Populations

Identifies Variants in ETS1 and WDFY4 Associated with Systemic Lupus Erythematosus. PLOS Genetics **6**, e1000841.

32. Yoshida C., Yoshida F., Sears D. E., Hart S. M., Ikebe D., Muto A., Basu S., Igarashi K., Melo J. V. 2007. Bcr-Abl signaling through the PI3/S6 kinase pathway inhibits nuclear translocation of the transcription factor Bach2, which represses the antiapoptotic factor heme oxygenase-1. Blood **109**, 1211-1219.
33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60468> (baza podataka *NCBI*)
34. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYV9> (baza podataka *UniProt*)

8. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime Nina Ivanković
Datum i mjesto rođenja 6. lipanj 1992., Zagreb
Adresa stanovanja Ladislava Šabana 24, 10360 Sesvete
E-mail nina_ivankovic@hotmail.com

Obrazovanje

rujan 2014. – do sada Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Biološki odsjek, Diplomski studij molekularne biologije
rujan 2011. – rujan 2014. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Biološki odsjek, Preddiplomski studij molekularne biologije
rujan 2007. – srpanj 2011. X. gimnazija „Ivan Supek“, opći smjer

Osobne vještine

Strani jezik Engleski jezik razina B2
Njemački jezik razina B1
Računalne vještine Korištenje MS Office

Dodatne informacije

travanj – kolovoz 2016. Diplomski rad na temu „Kloniranje i ekspresija ljudskog proteina BACH2 u bakterijskim i animalnim stanicama“
Zavod za molekularnu biologiju, prof. Vlatka Zoldoš
ožujak – lipanj 2015. Laboratorijska stručna praksa u Kulturi animalnih stanica,
Zavod za molekularnu biologiju, izv. prof. Maja Matulić
rujan 2014. Seminarski rad na temu „Uloga metilacije DNA u embrionalnom razvoju sisavaca“
Zavod za animalnu fiziologiju, prof. Gordana Lacković-Venturin