Karakterizacija proteina sharpina

Medić, Nenad

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:764078

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nenad Medić

Karakterizacija proteina sharpina

Diplomski rad

Zagreb, prosinac 2009.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za biologiju tumora na Mediteranskom institutu za istraživanje života, pod vodstvom prof.dr. Ivana Đikića predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dip.ing. biologije, smjer molekularna biolgija.

Zahvale

Zahvaljujem se Fondu Jedinstvo uz pomoć znanja (3 B potpora „Reintegracija“, glavni istraživač: Vanja Nagy) koji me je stipendirao i financirao potrošni materijal za izradu ovog rada.

Veliko hvala profesoru Đikiću na ukazanom povjerenju i potpori.

Dr. Vanji Nagy, koja je direktno nadgledala moj rad, neizmjerno sam zahvalan na svemu što me naučila. I na kritičnosti i istovremenoj ogromnoj posvećenosti - što ju čini izuzetnim mentorom.

Hvala svim članovima Laboratorija za biologiju tumora MedILS-a na susretljivosti, pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.

I na koncu, hvala mojim prijateljima i obitelji koji su mi bili podrška tijekom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Karakterizacija proteina sharpina

NENAD MEDIĆ

Mediteranski institut za istraživanje života,

Meštrovićevo šetalište bb, Split, Hrvatska

Sharpin, protein prvotno otkriven u postsinaptičkoj gustoći štakora, posjeduje homologe kod miša i čovjeka te je eksprimiran u varirajućim količinama i u drugim organima osim mozga. Konkretna uloga i funkcija sharpina još nije razjašnjena, ali dosadašnja istraživanja upućuju na ulogu u sinaptičkoj funkciji te u signalnom putu NFκB. Recentna istraživanja također upućuju na sharpinovu povezanost s ubikvitinsko-proteosomskim sustavom. U neuronima hipokampusa, te u HeLa stanicama, u kojima je endogeno eksprimiran, sharpin je prisutan i u citoplazmi i u jezgri. Bioinformatički alati koji na temelju dosad poznatih konsenzusnih jezgrinih lokalizacijskih signala (NLS), odnosno jezgrinih izlaznih sekvenci (NES) predviđaju postojanje istih dali su pretpostavku o prisutnosti hidrofobnog, leucinom bogatog NES-a unutar sharpinove primarne sekvence. Mutacijom triju leucina unutar konsenzusne izlazne sekvence zamijećeno je nakupljanje sharpina u jezgri. Isti učinak postignut je tretiranjem stanica leptinomicinom B, specifičnim inhibitorom jezgrinog eksporta proteina koji posjeduju leucinom bogatu izlaznu sekvencu. Ovi rezultati govore o prisutnosti leucinom bogate jezgrene izlazne sekvence kod sharpina te o njezinoj ulozi u regulaciji sharpinove jezgrene lokalizacije.

(49 stranica, 17 slika, 4 tablice, 31 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: sharpin, jezgrin lokalizacijski signal (NLS), jezgrina izlazna sekvenca (NES), leptinomicin B, ubikvitin.

Voditelji: Dr. Ivan Đikić, prof.

Dr. Maja Matulić, doc.

Ocjenitelji: Dr.Mirjana Kalafatić, prof.

Dr. Maja Matulić, doc.

Dr.Nada Oršolić, prof.

Rad prihvaćen 11.11.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of science

Department of Biology

Graduation thesis

The characterization of the protein sharpin

NENAD MEDIĆ

Mediterranean Institute for Life Sciences

Meštrovićevo šetalište bb, Split, Hrvatska

Sharpin, originally discovered as a novel protein of the rat postsynaptic density, has both human and mouse homologues and is expressed in varying amounts in other organs, besides the brain. Its function has not yet been clearly resolved, however, research performed so far suggest sharpin's role in the synaptic function and the NFκB signalling pathway. Recent research also implies a possible connection to the ubiquitin-proteasome system. In hippocampal neurons, as well in HeLa cells, which express it endogenously, sharpin is present in both the cytoplasm and the nucleus. Bioinformatical tools, based on consensus sequences from all known nuclear localization signals (NLSs) and nuclear export sequences (NESs) are able to predict such sequences in protein primary structures. This kind of a bioinformatical analysis found no known NLS in sharpin but predicted the existence of a hydrophobic, leucine rich NES. Using site directed mutagenesis, we mutated three leucines in the predicted consensus sequence into alanines. As a result, we noticed an increase in the nuclear localization of sharpin, as compared to the control. We obtained similar results after incubating HeLa cells with leptinomycin B, a known inhibitor of leucine-rich sequence dependant nuclear export. These results suggest the presence of leucine-rich NES in sharpin, and its role in regulating sharpin's nuclear localization.

(49 pages, 17 figures, 4 tables, 31 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Keywords: sharpin, nuclear localization signal (NLS), nuclear export sequence (NES), leptinomycin B, ubiquitin.

Supervisors: Dr. Ivan Đikić, Professor

Dr. Maja Matulić, Associate Professor

Reviewers: Dr. Mirjana Kalafatić, Professor

Dr. Maja Matulić; Associate Professor

Dr. Nada Oršolić, Professor

Thesis accepted 11.11.2009.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Ubikvitin 1

1.2. Sharpin 4

1.2.1. Struktura sharpina 5

1.3. RBCK1 6

1.4. Jezgreno- citoplazmatski promet 7

1.6. Cilj istraživanja 10

2. Materijali i metode 11

2.1. Materijali 11

2.1.1. Konstrukti 13

2.1.2. Puferi 14

2.1.3. Otopine i ploče 16

2.1.4. Gelovi 16

2.2. Metode 18

2.2.1. Bioinformatički alati 18

2.2.2. *In sit*u mutageneza 19

2.2.3. Transformacija bakterija DH5α 21

2.2.4. Izolacija plazmidne DNA te sekvenciranje 22

2.2.5. Stanična kultura 22

2.2.6. Transfekcija HeLa stanica 22

2.2.7. Tretman HeLa stanica leptinomicinom B.....23

2.2.8. Tretman HeLa stanica staurosporinom.....24

2.2.9. Priprava ukupnog staničnog lizata.....24

2.2.10. Razdvajanja jezgrine od citoplatmatske frakcije proteina.....25

2.2.11. Elektroforeza u SDS poliakrilamidnom gelu i Western Blotting.....25

2.2.12. Imunocitokemija.....26

3. Rezultati.....27

3.1. Lokalizacija endogenog sharpina.....27

3.2. Endogeni sharpin prisutan u jezgri i citoplazmi različite je veličine.....28

3.3. Sharpin posjeduje predviđenu jezgrenu izlaznu sekvencu (NES).....28

3.4. Imunocitokemija HeLa stanica nakon tretmana leptinomicinom B.....30

3.4.1. Tretman LMB-om dovodi do nakupljanja endogenog sharpina u jezgri , i to u granularnim strukturama.....30

3.4.2. Tretman LMB-om dovodi do nakupljanja GFP-sharpina u granularnim strukturama u jezgri.....31

3.4.3. HA-sharpin u HeLa stanicama tretiranim LMB-om i NESmut HA-sharpin pokazuju nakupljanje u jezgri na Western blotu.....32

3.4.4. Tretman stanica staurosporinom.....33

4. Rasprava.....35

5. Zaključak.....39

6. Literatura.....40

1. Uvod

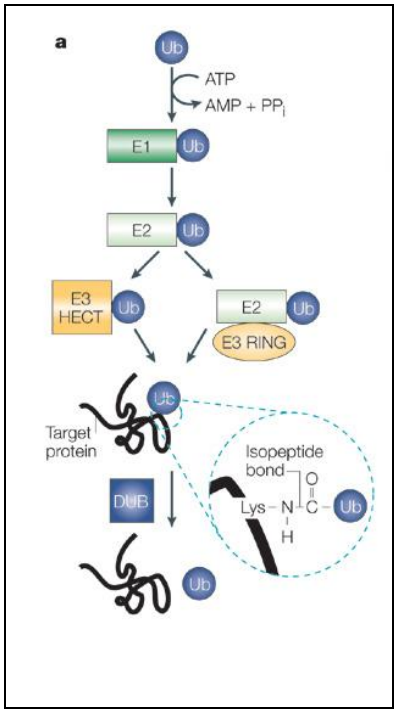
1.1. Ubikvitin

Ubikvitinacija je reverzibilna post-translacijska modifikacija koja rezultira konjugacijom ubikvitina (Ub), proteina od 76 aminokiselina, na ciljni protein. Iako je isprva bila opisana isključivo kao signal za proteosomsku degradaciju, danas je poznato da je ubikvitinacija sveprisutan mehanizam u stanici uključen u regulaciju mnogih bioloških procesa, kao što su transkripcija gena, progresija staničnog ciklusa, popravak DNA, apoptoza, endocitoza posredovana receptorima i mnogi drugi. (Hicke i sur. 2005).

Konjugacija Ub-a na ciljni protein regulirana je slijedom djelovanja triju enzima (slika 1). C-terminalni glicin Ub-a aktivira se ATP-om pomoću ubikvitin-aktivirajućeg (E1) enzima, čime nastaje intermedijer Ub-adenilat te se otpušta difosfat. U sljedećem koraku dolazi do vezanja Ub-a na cistein enzima E1 pomoću tioesterske veze, uz otpuštanje AMP-a. Aktivirani Ub potom se prebacuje na cisteinski ostatak unutar aktivnog mjesta ubikvitin-konjugirajućeg (E2) enzima. U trećem koraku kojeg katalizira ubikvitin ligaza (E3), Ub se veže svojim C-terminalnim krajem amidnom izopeptidnom vezom na ε- amino grupu lizinskog ostatka ili na amino- terminalni kraj ciljanog proteina.

Tri su vrste E3 ligaza: HECT (eng. *Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)* za koje je karakteristično da u aktivnom mjestu vežu aktivirani ubikvitin te se on s njih prenosi na na ciljni protein. Za razliku od HECT tipa E3 ligaza, RING (eng. *Really Interesting New Gene*) i E3 ligaze koje sadrže U kutiju (eng. *U-box containig E3 ligase*) ne vežu direktno ubikvitin na sebe, već dovode Ub-E2 i ciljni protein u pogodnu međusobnu orijentaciju za prijenos Ub-a na ciljni protein (Hershko i Ciechanover 1998). Dok malen broj gena kodira za E1 enzime (oko 10 kod ljudi), veći je broj E2 enzima (oko 100 kod ljudi). E3 enzima je najviše (kod ljudi broj se kreće oko tisuću) - smatra se da su oni odgovorni za specifično prepoznavanje i vezanje supstrata (Hicke i sur. 2005).

Poput procesa fosforilacije i defosforilacije, ubikvitinacija je također reverzibilni proces; cijepanje ubikvitina od ciljnih proteina provode deubikvitinirajući enzimi (DUB-ovi) (Hochstrasser 1995).



Slika 1 Grafički prikaz enzimski kataliziranih koraka u kovalentnom vezivanju ubikvitina na ciljni protein. U prvom koraku, djelovanjem enzima E1, ubikvitin se aktivira. Aktivirani ubikvitin se potom prenosi na ubikvitin konjugirajući enzim E2. Enzim E3 katalizira vezanje ubikvitina na ciljni protein. (Preuzeto iz: Hicke i sur. 2005)

Ubikvitinacija može rezultirati stabilizacijom ili destabilizacijom strukture nativnog proteina, otvaranjem ili zatvaranjem određenih vezivnih mjesta, prekidanjem ili stvaranjem nove protein-protein interakcije. Dodatak ubikvitina također omogućuje interakciju ciljanog proteina s ubikvitin vezujućim domenama (UBD, eng. *Ubiquitin Binding Domain*), na taj način dajući ubikvitinu signalnu ulogu u stanici.

UBD-ovi se nalaze u enzimima koji kataliziraju ubikvitinaciju ili deubikvitinaciju ili u ubikvitinskim receptorima koji prepoznaju i interpretiraju signale ubikvitina konjugiranog s ciljnim proteinom. Strukturno, UBD-ovi su prilično različiti i nalaze se u proteinima koji imaju različite biološke funkcije. Prisustvo UBD-a u proteinu upućuje da taj protein interagira s ubikvitinom ili s ubikvitiniranim proteinom, ili da je na neki način reguliran ubikvitinsko-proteosomskim sustavom. UBD-ovi mogu se klasificirati u više različitih obitelji; trenutno, više od deset takvih obitelji je poznato (Dikic, i sur. 2009)

Više je vrsta modifikacija ubikvitinom: najjednostavnija je monoubikvitinacija kod koje je ciljni protein konjugiran samo s jednim ubikvitinom. Ciljni protein može biti označen s monomerom ubikvitina, ali na više lizinskih ostataka– ovakav oblik modifikacije zove se multiubikvitinacija. Poliubikvitinacija označava modifikaciju kod koje se ciljni protein označuje s lancima ubikvitina. Naime, budući da sam ubikvitin posjeduje sedam lizinskih ostataka (K6, K11, K27, K29, K33, K48 i K63), moguć je nastanak ubikvitinskog lanca dodatkom ubikvitina na već postojeći konjugirani ubikvitin. Precizni enzimski mehanizam koji određuje nastanak određenog tipa poliubikvitinskog lanca nije u potpunosti poznat. Smatra se da ključnu ulogu u određivanju tipa lanca koji će nastati imaju E2 enzimi (Ikeda i Dikic 2008).

Ova karakteristika ubikvitinskog sustava naročito povećava mogućnosti regulacije- postoje varijacije u duljini i strukturi ubikvitinskog lanca kao i razlike u lizinskom ostatku na kojeg je konjugiran proksimalni ubikvitin (ubikvitin koji je ishodište lanca).

Razlike u trodimenzionalnoj strukturi pojedinih ubikvitinskih lanaca čine osnovu za diskriminaciju lanaca od strane ubikvitin-vezujućih domena: K48 lanci su marker za proteosomsku degradaciju, dok su K63 lanci uključeni u popravak DNA, endocitozu i aktivaciju protein kinaza (Komander i sur. 2009; Hoeller i sur. 2006). Mnoubikvitinacija je uključena u regulaciju endocitoze, endosomskog sortiranja te također popravka DNA. Multiubikvitinacija je najčešće povezana s regulacijom endocitoze.

Najrecentnije opisani tip ubikvitinskih lanaca su linearni ubikvitinski lanci čije povezivanje katalizira kompleks ligaze tzv. LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) (s ulogom u signalnom putu NFκB). Proksimalni Ub je i u ovom slučaju konjugiran na amino grupu lizina supstrata izopeptidnom vezom. Sljedeći Ub u lancu je vezan peptidnom vezom između C-terminalnog glicina te N-terminalnog metionina prethodnog Ub-a (Kirisako i sur. 2006).

Konzervirana trodimenzionalna struktura ubikvitina, u obliku ubikvitinu slične domene (ULD, eng. *ubiquitin like domain*), prisutna je unutar brojnih proteina. ULD-ovi, osim što mogu utjecati na konformaciju dotičnog proteina, mogu također i sudjelovati u interakcijama s proteinima koji posjeduju ubikvitin vezujuće domene (Su i Lau 2009).

1.2. Sharpin

Sharpin (Shank-associated RH domain-interacting protein) je opisan 2001. kao novootkriveni protein postsinaptičke gustoće štakora (Lim i sur. 2001). Sharpin posjeduje UBL i UBD domene. Konkretna funkcija ovog proteina do danas nije razjašnjena, ali sudeći prema dostupnim podacima, sharpin igra ulogu u sinaptičkoj funkciji i/ili NFκB signalnom putu.

Postsinaptička gustoća (PSD, od eng. *postsynaptic density*) predstavlja dio citoskeleta neuronskih sinapsa; naziv potječe od načina otkrića. Naime, prvotno je identificirana pod elektronskim mikroskopom kao elektronski gusta regija uz membranu postsinaptičkih neurona. Sastoji se od glutamatnih receptora, njihovih proteina skela (eng. *scaffold proteins*), adhezijskih molekula i drugih signalnih proteina. Postsinaptičke gustoće variraju u veličini i sastavu između različitih regija mozga.

Funkcija PSD-a jest koncentracija i organizacija neurotransmiterskih receptora kako bi mogli brzo reagirati na oslobođeni neurotransmiter. PSD-ovi se posebno proučavaju u kontekstu sinaptičke plastičnosti koja je stanični model učenja i memorije (Ziff 1997).

Mnogi proteini unutar PSD-a uključeni su u regulaciju sinaptičke funkcije. Za sada je poznato nekoliko stotina PSD proteina (što varira ovisno o regiji mozga). Mnogi od PSD proteina sadrže PDZ[1] domene. Jedan od značajnijih proteinskih obitelji PSD-a je PSD95 obitelj proteina te obitelj shank proteina (također poznatih pod imenom CortBP/ProSAP/synamon) (Lim et al. 2001).

Lim i sur. (2001) su, koristeći kao mamac ankirinska ponavljanja shanka, identificirali sharpin metodom dva hibrida u kvascu nad cDNA bibliotekom mozga štakora. Homolozi sharpina pronađeni su u ljudskim i mišjim EST klonovima, što upućuje da je sharpin protein s funkcijama specijaliziranima za više organizme.

Seymour i sur. (2007) su otkrili dvije nezavisne spontane mutacije u mišjem genu za sharpin, *cpdm* i *cpdmDem*. *cpdm/cpdm* i *cpdmDem/cpdmDem* miševi pokazuju vrlo sličan fenotip: defektan razvoj sekundarnih limfnih organa, upalu više organa posredovanu T_{H2}

[1] PDZ domena je strukturna domena sastavljena od 80-90 aminokiselina koja ima ulogu u usidravanju transmembranskih proteina u citoskelet. Naziv je akronim triju proteina kod kojih je isprva otkrivena –PSD95, DlgA (Drosophila disc large tumor suppressor) te zo-1 (zonula occludens-1 protein).

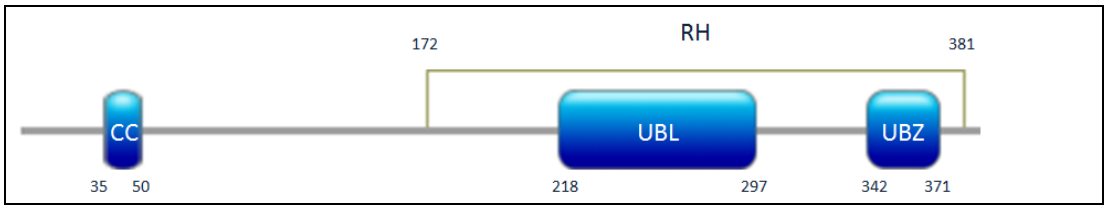
citokinima, dermatitis, smanjenu plodnost i kraći životni vijek. Ovaj fenotip mogao bi upućivati na deregulaciju signalnog puta NFκB. Spomenute mutacije su nonsense mutacije, cpdm uzrokuje prekid translacije iza 68. aminokiseline, a cpdmDem još prije, iza 44. aminokiseline. Do danas nije poznata niti jedna bolest koja bi se povezivala s mutacijama u ljudskom SHARPIN-u.

Lim i sur. (2001) opisuju lokalizaciju sharpina unutar postsinaptičke gustoće hipokampusnih neurona. Iz rezultata njihove imunocitokemijske analize vidljivo je da je sharpin prisutan i u jezgri neurona.

1.2.1. Struktura sharpina

Na C-terminalnoj dijelu sharpina (ak 172-381) nalazi se regija koja pokazuje sličnost u sekvenci s N-terminalnom regijom proteina RBCK1 te se naziva RH (eng. *RBCK1 homology*). Na N-terminalnom dijelu je motiv (ak 35- 50) za koju autori pretpostavljaju da ima strukturu zavijene zavojnice (Lim et al. 2001).

Kao što je već rečeno, sharpin posjeduje ubikvitinu sličnu domenu (UBL) (ak 218-297); a također je prisutna i ubikvitin vezujuća domena tipa Zn-finger[2] (ak 342-371). Seymour i sur. (2007). su ovu domenu opisali kao Zn-finger domenu kakva se nalazi u Ran-vezujućem proteinu (RanBP, od eng. *Ran Binding Protein*). U Ran-BP, ova domena se veže za Ran-GDP te je povezana s jezgrenim prometom.



Slika 2 Modularna građa sharpina. Na N- terminalnom dijelu je pretpostavljena motiv zavijene zavojnice (ak 35- 50), dok veliki dio C-kraja proteina (ak 172- 381) pokazuje homologiju s proteinom RBCK1, pa se zato cijela ta regija naziva RH (*RBCK1 homology*). Unutar regije RH nalaze se i UBL (ak 218- 297) te UBZ (ak 342- 371) domene.

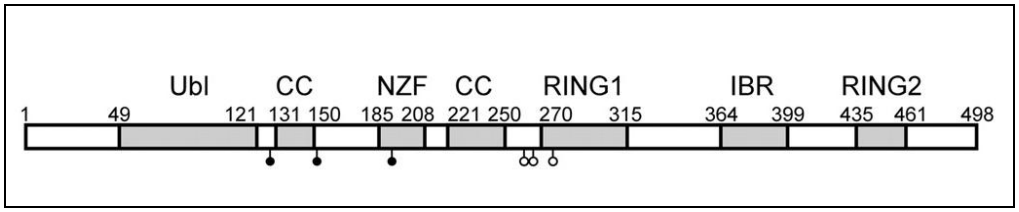
Sharpin homomultimerizira preko svoje N-terminalnog dijela, dok C- terminalna polovica sharpina interagira sa shankom (Lim i sur. 2001).

[2] Ubikvitin-vezujuća Zinc finger domena je subklasa ubikvitin-vezujućih domena koja posjeduje Zinc-finger i ima ulogu u popravku DNA..

1.3. RBCK1

Protein RBCK1 (RBCC protein interacting with PKC1) je identificiran metodom dva hibrida u kvascu skeniranjem cDNA biblioteke štakorskog mozga koristeći kao mamac protein kinazu C β (PKCβ) (naknadno je pokazano da također interagira i s PKCζ). C- kraj sharpina, nazvan RH (RBCK1 Homology) homologan je N dijelu proteina RBCK1.

Kao što je vidljivo sa slike 3, RBCK1 se sastoji od ubikvitinu-slične domene, zavijene zavojnice, Zn finger motiva, još jedne zavijene uzvojnice, te RING-IBR domene (idući od N prema C kraju).



Slika 3 Modularna organizacija proteina RBCK1. Na N-terminalnom kraju prisutna je UBL domena na koju se nastavljaju dvije zavijene uzvojnice (CC), razdvojene tzv. novom Zn-finger domenom (NZF). Na C-termimalnom kraju prisutne su dvije RING domene , između kojih se nalazi IBR domena. Točkice s donje strane predstavljaju položaje na kojima je protein fosforiliran od strane PKCβ (preuzeto iz: Tatematsu i sur. 2008).

Za RBCK1 je utvrđeno da je transkripcijski faktor – njegova RING-IBR domena interagira s DNA fragmentima bogatim TGG sekvencama. RBCK2, transkripcijska varijanta RBCK1 kojoj nedostaje C-terminalna polovina RBCK1 (što uključuje spomenutu RING-IBR domenu) veže RBCK1 i suprimira njegovu transkripcijsku aktivnost. Kao posljedica ovog vezivanja RBCK1 ostaje u citoplazmi i ne može izvršiti svoju ulogu transkripcijskog faktora. Još nije utvrđeno koji tip modifikacije se događa na RBCK1 ili RBCK2 nakon koje dolazi do translokacije RBCK1 u jezgru (Tatematsu i sur. 2008).

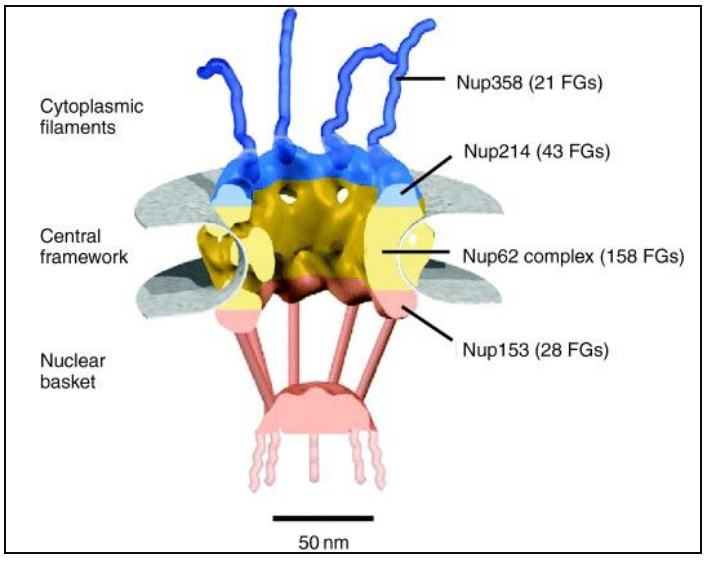
Isti autori (Tatematsu i sur. 2005) su istraživali unutarstaničnu lokalizaciju proteina RBCK1. Endogeni RBCK1 pronađen je u citoplazmi i u jezgri. U jezgri je bio lokaliziran u granularnim strukturama. Overeksprimirani RBCK1 su detektirali isključivo u citoplazmi. Kad su stanice tretirali leptinomicinom B (LMB), specifičnim inhibitorom jezgrinog eksporta, overeksprimirani RBCK1 akumulirao se u jezgrinim tjelešcima. Na ovaj način su pokazali da RBCK1 posjeduje signalnu sekvencu odgovornu za eksport iz jezgre. Ovo su također pokazali i mutacijom pretpostavljene jezgrine izlazne sekvence. Nadalje, pokazali su da RBCK1

interagira s proteinima unutar jezgrinih tjelešaca, CREB- vezujućim proteinom (CBP) te proteinom promijelocitne leukemije (PML).

Overekspresija proteina RBCK1 negativno regulira TNF-om i IL-1-om inducirani signalni put NF-κB. Nasuprot tome, *knock-down* istog proteina snažno potiče istim ligandima aktiviran NF-κb signalni put. Pokazano je da RBCK1 interagira s određenim adaptorskim proteinima TAB2/3 unutar NF-κB puta i olakšava degradaciju istih na način ovisan o proteasomu. RBCK1 je dakle uključen u negativnu regulaciju upalne reakcije potaknute TNF-om i IL-1-om (Tian i sur. 2007).

1.4. Jezgreno- citoplazmatski promet

Kompleks jezgrine pore sastoji se od cilindrične centralne strukture, osam citoplazmatskih filamenata i jezgrene košare. Ukupno je sastavljen od tridesetak različitih proteina, tzv. nukleoporina. Nukleoporini su prisutni u više kopija što u konačnici dovodi do brojke od 500 do 1000 nukleoporina po kompleksu jezgrine pore (Peters 2005). Jedna trećina nukleoporina sadrži ponavljajuće FG, FXFG ili GLFG sekvence (ili skupnim imenom: FG ponavljanja) povezane hidrofilnim poveznicama (eng. *linkers*) od 200 do 700 polarnih ili nabijenih aminokiselina (Strawn i sur. 2004).



Slika 4 Građa kompleksa jezgrine pore: cilindrična centralna struktura, osam citoplazmatskih filamenata i jezgrina košara (preuzeto iz: Peters 2005).

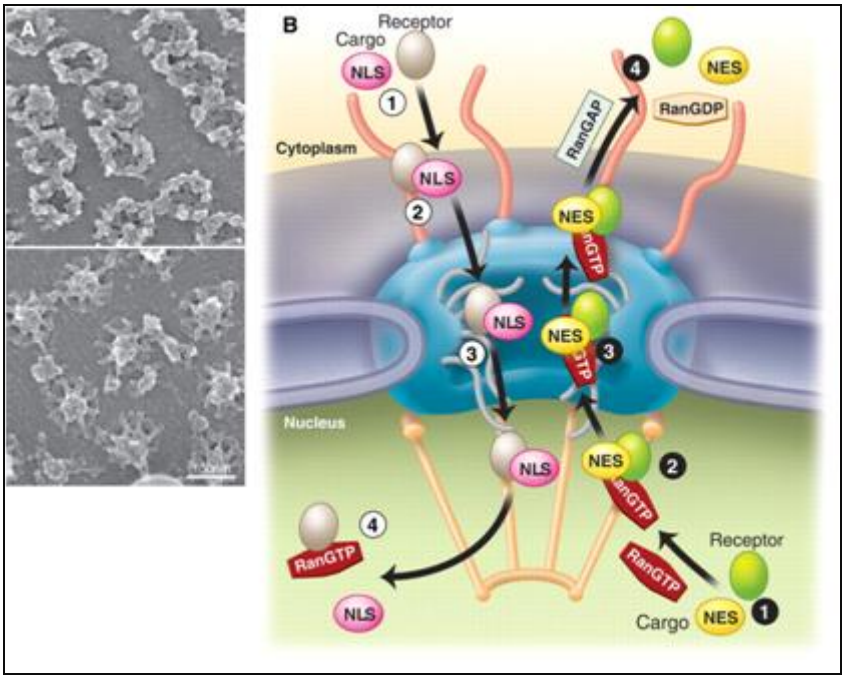
Nukeoporini s ponavljajućim FG sljedovima pripadaju skupini nativno nesmotanih proteina koje karakterizira ukupno mala hidrofobnost, nedostatak sekundarne strukture te

visoka fleksibilnost. Utvrđeno je da je delecija FG motiva u nukleoporinima cilindrične centralne strukture letalna za kvasce, što daje naslutiti značajnu ulogu ovih sljedova. Naime, olakšana difuzija kroz kompleks jezgrine pore posljedica je interakcije određenih struktura na difundirajućim proteinima s FG ponavljanjima, što navodi na zaključak da upravo FG sljedovi čine propusnu barijeru jezgrine pore (Denning i sur. 2003).

Ioni, metaboliti i druge male molekule prolaze kroz jezgrinu poru pasivnom difuzijom dok translokacija molekula većih od 40 kDa (Panté i Kann 2002) zahtijeva interakciju specifičnih jezgrinih transportnih receptora (NTR-ovi, od eng. *Nuclear Transport Receptors*) na proteinima s FG ponavljanjima nukleoporina. Spomenute male molekule koje pasivno difundiraju kroz jezgrinu poru zapravo prolaze kroz prolaz promjera 8-10 nm i otprilike 45 nm duljine (Paine i sur. 1975). Za molekule koje se vežu za FG motive, jezgrina pora izgleda da sadrži 40 nm (Panté i Kann 2002) širok kanal koji dopušta brzu translokaciju (Ribbeck i Görlich 2001).

Selektivna barijera pasivnoj difuziji stvorena je od hidrofilnih poveznica između FG ponavljanja. Vezanje NTR- ova za hidrofobne klastere kompetira nekovalentnim vezama između hidrofilnih poveznica i na taj način trenutno stvara otvoreniju konformaciju jezgrine pore. Olakšana difuzija NTR-ova osnova je selektivnog transporta između jezgre i citoplazme (Peters 2005).

Proteini koji posjeduju jezgrin lokalizacijski signal (NLS, prema eng. *Nuclear Localization Signal*) vežu se za importine, tako tvoreći importni kompleks, importni kompleks potom difundira kroz poru te disocira u jezgri interakcijom s Ran-GTP- om. Nadalje, protein koji sadrži jezgrin izlazni signal (NES, prema eng. *Nuclear Export Sequence*) tvori trimerni eksportni kompleks s eksportinom i Ran-GTP-om, koji potom difundira kroz poru i disocira u citoplazmi kao posljedica hidrolize Ran– vezanog GTP-a. Direkcionalnost transporta osigurana je asimetričnom raspodjelom Ran-GTP-a i Ran-GTP/GDP izmjenjivačkog faktora koji se nalazi u jezgri te Ran-GDP-a i aktivirajućeg proteina GTP-aze koji se nalaze u citoplazmi (Terry i sur 2007). Shematski prikaz jezgreno-citoplazmatskog prometa prikazan je na slici 5.



Slika 5 Bidirekcionalni jezgreno - citoplazmatski promet. (A) Slike elektronskog mikroskopa kompleksa jezgrine pore s citoplazmatske strane (gornja slika) i jezgrene strane (donja slika) oocite vrste *Xenopus laevis.* B) Prijenos ciljnog proteina posredovan receptorima kroz jezgrinu poru sastoji se od više koraka. Transportni receptor prepoznaje protein koji posjeduje odgovarajući signal te tvori kompleks receptor-ciljni protein. (1) Kompleks receptor-ciljni protein se veže za proksimalni dio kompleksa jezgrine pore (2) nakon čega dolazi do njegove translokacije koja se ostvaruje preko niza interakcija niskog afiniteta s nukleoporinima (3) Na distalnom dijelu kompleksa jezgrine pore, kompleks receptor-ciljni protein disocira (4). Za import posredovan proteinima obitelji Kapβ, disocijacija kompleksa je inicirana vezanjem RanGTP-a na receptor s jezgrene strane. Za eksport proteina posredovanih proteinskom obitelji Kapβ, RanGTP prisutan u eksport kompleksu receptor-ciljni protein je hidroliziran do RanGDP-a na citoplazmatskoj strani pomoću proteina RanGAP. Protein RanGEF prisutan je u jezgri, za razliku od RanGAP-a (Preuzeto iz: Terry i sur. 2007).

Postavlja se pitanje na koji način ograničen broj importina prenosi iznimno veći broj različith tereta koji sadrže NLS ? Strukturne studije importina otkrivaju različite konformacije koje akomodiraju različite supstrate koji nemaju nikakve sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci njihovih NLS-ova. Jezgrine lokalizacijske signale teško je eksperimentalno otkriti, odnosno potvrditi. U velikom broju slučajeva česte su pozitivno nabijene aminokiseline unutar jezgrinih lokalizacijskih signala, budući da se neki od ovih pozitivno nabijenih aminokiselina vežu za importine. Mutiranje pozitivno nabijenih aminokiselina jedan je od način sprječavanja jezgrinog importa i utvrđivanja postojanja NLS-a. Nadalje, postoje NLS motivi bogati glicinom, a siromašni pozitivno nabijenim aminokiselinama. Također, NLS-ovi mogu biti prilično veliki (NLS M9 u u proteinu hnRNP A1 ima 38 aminokiselina), što govori o značaju trodimenzionalne strukture za prepoznavanje od strane importina.

Najčešći jezgrin izlazni signal (NES) je hidrofobna sekvenca bogata leucinom LxxLxxLxL koja je pronađena u svih eukariota te je posjeduju mnogi transkripcijski faktori i regulatori staničnog ciklusa. Ovu hidrofobnu sekvencu prepoznaje eksportin Crm1, koji je

inhibiran leptinomicinom B. Za razliku od ovog tipa izlazne sekvence, proteini s drugačijom izlaznom sekvencom eksportiraju se interakcijom sa specifičnim eksportinima.

.

1.6. Cilj istraživanja

Kako bi se istražila unutarstanična lokalizacija sharpina u dijelećim stanicama, imunocitokemijski smo promatrali njegovu lokalizaciju u HeLa staničnoj liniji, u kojoj je endogeno eksprimiran. Utvrđena je prisutnost sharpina i u citoplazmi i u jezgri HeLa stanica. Štoviše, odvajanjem citoplazmatske frakcije proteina od jezgrene, te Western blotom, ustanovljeno je postojanje manje sharpinove vrpce (35 kDa) u jezgri, dok je u citoplazmi bila prisutna vrpca veličine 45k kDa (istu veličinu opisuju i Lim i sur.(2001)).

Sharpin kao protein od 45 kDa nije sposoban pasivno difundirati kroz kompleks jezgrine pore. Njegova jezgrena lokalizacija vjerojatno je posljedica reguliranog procesa. Najučestaliji način regulacije jegrene lokalizacije je postojanje jezgrine lokalizacijske sekvence (NLS) i ponekad, jezgrine izlazne sekvence (NES). Bioinformatički alat koji na osnovi dosad eksperimentalno utvrđenih NLS-ova pretražuje primarnu sekvencu proteina nije predvidio postojanje NLS-a u sharpinu. Obično je vrlo teško identificirati jezgrin lokalizacijski signal, naime više je potencijalnih konsenzusnih sekvenci prepoznatih od importina, a i u određenim slučajevima veliki su fragmenti proteina identificirani kao NLS, što upućuje da i trodimenzionalna struktura cijele molekule igra ulogu u prepoznavanju od strane importina. Za razliku od NLS-a, jedan od najčešćih jezgrinih izlaznih sekvenci je leucinom bogati konsenzusni motiv LxxLxL. Uzimajući u obzir postojanje NES-a kod proteina RBCK1, koji je dijelom svoje sekvence homologan sharpinu, kao i predikciju postojanja jezgrine izlazne sekvence u sharpinu (bioinformatički alat NetNES), pretpostavka je da sharpin posjeduje jezgrinu izlaznu sekvencu. I da ona sudjeluje u regulaciji jezgrene lokalizacije sharpina.

Opažena vrpca manje molekularne težine u jezgri mogla bi se objasniti kao sharpinova transkripcijska varijanta ili produkt njegovog posttranslacijskog proteolitičkog cijepanja. Prema predikciji (bioinformatički alat CASVM) sharpin posjeduje mjesto cijepanja kaspazom. Predviđeno cijepanje kaspazom kao posljedicu imalo bi nastank manjeg fragmenta

sharpina, koji bi time, sukladno hipotezi o postojanju NES-a, cijepanjem izgubio dio sekvence koja sadrži NES, i lokalizirao u jezgri. Sličan način regulacije jezgrene lokalizacije posjeduje protein MST1 (Ura i Masayuma, N 2001).

Ciljevi:

- Utvrditi posjeduje li sharpin NES.

  a) Tretmanom stanica s leptinomicinom B (LMB-om), specifičnim inhibitorom jezgrinog eksporta ovisnog o hidrofobnoj leucinom bogatoj jezgrinoj izlaznoj sekvenci. U slučaju postojanja hidrofobnog, leucinom bogatog NES-a, očekuje se nakupljanje sharpina unutar jezgre.

  b) Konstrukcijom HA-sharpina koji ima mutiranu pretpostavljenu hidrofobnu leucinom bogatu jezgrenu izlaznu sekvencu. Također u slučaju postojanja hidrofobnog, leucinom bogatog NES-a, zbog nemogućnosti interakcije s eksportinom Crm1, očekuje se nakupljanje sharpina unutar jezgre.

- Utvrditi ima li staurosporin, induktor apoptoze, a time i aktivator kaspaza, utjecaj na količinu malog fragmenta sharpina, originalno detektiranog u jezgri. Ako je manji fragment endogenog sharpina prisutan u jezgri posljedica kaspaznog cijepanja većeg fragmenta sharpina, tad se očekuje progresivno povećanje količine malog fragmenta s povećanjem vremena inkubacije sa staurosporinom, odnosno smanjivanje većeg fragmenta. U protivnom, ostaju dvije mogućnosti: da je mali fragment posljedica proteolitičkog cijepanja drugih proteolitičkih enzima, ili da je transkripcijska varijanta sharpina, čije je postojanje opisano u prijašnjim radovima (Lim i sur. 2001; Seymour i sur. 2007).

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Amersham Biosciences (GE Healthcare Life Sciences) (Engleska):

- Sekundardno protu-mišje protutijelo

Sljedeći proizvodi kupljeni su od AppliChem Co. (Njemačka):

- Otopina 40% akrilamid / 0.8% bisakrilamid
- Glicerol
- Natrijev-dodecilsulfat (SDS)
- Tris baza i Tris-Hcl

Sljedeći proizvodi kupljeni su od BD Biosciences-Clontech (SAD):

- Difco agar

Sljedeći proizvodi kupljeni su od BIO-Rad Co. (SAD):

- Sva aparatura potrebna za SDS poliakrilamidnu gel-elektroforezu
- Proteinski marker Precision plus proteinTM Dual color standards
- Sljedeći proizvodi kupljeni su od GIBCO Co. (SAD):
- Penicilin- streptomicin
- Sljedeći proizvodi kupljeni su od Invitrogen Co. (SAD)
- Agaroza
- Kemijski kompetentne stanice *Escherichia coli,* soj DH5α
- Lipofectamine 2000

Sljedeći proizvodi kupljeni su od New England Biolabs Inc. (SAD):

- *Dpn*I restrikcijski enzim i njegov pufer

Sljedeći proizvodi kupljeni su od ROTH Co. (Njemačka)

- Ampcilin
- B- merkaptoetanol
- BSA
- Bromfenolno plavilo
- Etidij -bromid
- Fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF)
- Ponceau S
- Natrijev acetat
- N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Triton X-100

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Roche Co (Švicarska):

- Deoksinukleozid-trifosfati (dNTP-ovi)

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Sigma- Aldrich (SAD):

- Amonijev persulfat (APS)
- Aprotinin
- Dimetil-sulfoksid (DMSO)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- Hidroksietil-piperazinetansulforična kiselina (HEPES)

- Leupeptin
- Natrijev ortovanadat

Sljedeći proizvodi kupljeni su od STRATGENE Co. (SAD):

- DNA polimeraza Pfu Ultra High Fidelity s pripadajućim puferom

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Santa Cruz Biotechnology (SAD)

- Pojačivač kemiluminiscencije

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Riedel-deHaen Co. (Njemačka)

- EDTA

Sljedeći proizvodi kupljeni su od PAA Co. (Austrija)

- Fetalni goveđi serum (FBS)

Sljedeći proizvodi kupljeni su od

- Stanična linija HeLa

Sljedeći proizvodi kupljeni su od Osmonics Co. (SAD)

- Nitrocelulozna membrana

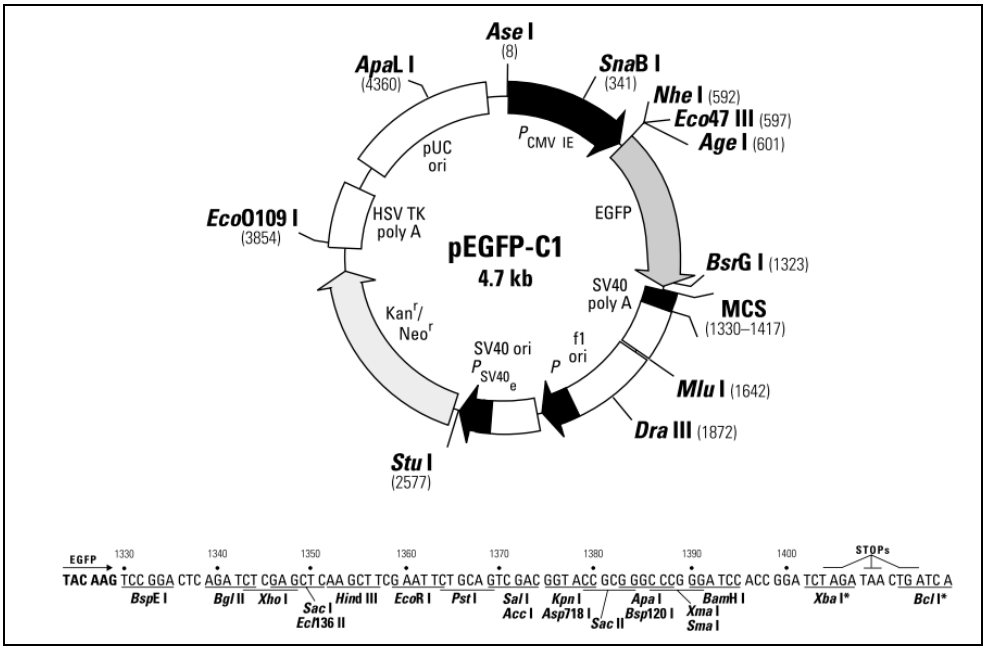
Sljedeći proizvodi kupljeni su od Whatman Co. (SAD)

- „Whatman“ filter papir

2.1.1. Konstrukti

HA-sharpin ukloniran je unutar pGW1 vektora (priređeno u laboratoriju Ivana Đikića)

GFP- sharpin ukloniran je unutar pEGFP-C1 vektora (priređeno u laboratoriju Ivana Đikića)



Slika 6 Ekspresijski vektor pEGFP-C1 (Clontech). Specifična mjesta prikazana su na cirkularnoj mapi, a na dnu slike je prikazana klonirajuća regija. Preuzeto s http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3028-5.pdf

2.1.2. Puferi

50x TAE pufer

Tris	2 M
EDTA	0.5 M
Octena kiselina	1 M

10x DNA loading pufer

Glicerol	50%
EDTA	0.1 M
SDS	1 %
Bromfenolno plavilo	0.2 %
Ksilen cijanol	0.2 %

Pufer za lizu, pH 7.5

HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
NaF	25 mM
Triton X-100	1 %
Glicerol	10 %
$ZnCl_2$	10 µg

Proteazni inhibitori

PMSF	1 mM
Leupeptin	2 µg/mL
Aprotinin	10 µg/mL

Inhibitori fosfataza

Natrijev ortovanadat	1 mM

Pufer za gel za razdvajanje

Tris-HCl, pH 8.8	1.5 M
SDS	0.4 %

Pufer za gel za sabijanje

Tris-HCl, pH 6.8	0.5 M
SDS	0.4 %

2x Laemmli pufer

Tris, pH 6.8	25 mL
Glicerol	20 mL
SDS, 10 %	20 mL
Bromfenolsko plavilo	1 mg
B- merkaptoetanol	5 mL

10x PBS (Phosphate-Buffered Saline), pH 7.3

NaCl	80 g
KCl	2 g
$NaH_2PO_4x\ 7H_2O$	11.5 g
KH_2PO_4	2 g

10 x Running pufer

Tris	30 g
Glicin	144 g
SDS	10 g
dH_2O	do 1 L

10 x Transfer pufer

Tris	22,3 g
Glicin	105 g
dH_2O	do 1 L

20 x TBS (Tris-Buffered Saline), pH 7.6

Tris	201.17 mM
NaCl	1.198 M

Otopina Ponceau S

Ponceau S	0.5 g
Octenaa kiselina	10 mL
dH_2O	do 100 mL

2.1.3. Otopine i ploče

Blokirajuća otopina za Western blot, pH 7.5

1 x TBS

BSA 5%

Natrijev azid 0,1%

Otopina 1 %-tne BSA (goveđi serumski albumin) u PBS-u, pH 7.5

Tekući i kruti LB medij je autoklaviran na 121 °C, 15 min

Baktotripton 10 g

Bakto ekstrakt kvasca 5 g

NaCl 5 g

Difco agar (samo za ploče) 15 g

dH_2O do 1 L

Ampicilin 100 μg/ml (dodano nakon autoklaviranja, kad se smjesa ohladila na pedesetak stupnjeva)

2.1.4. Gelovi

SDS-poliakrilamidni gelovi pripremljeni su prema receptu danom u priloženim tablicama. Navedeni volumeni dostatni su za izlijevanje dva gela (Biorad stakalca).

Tablica 1 SDS poliakrilamidni gel za razdvajanje

	5 %	8 %	10 %	12 %	15 %
40 % akrilamid/ 0.8 % bisakrilamid (mL)	1.5	2.4	3	3.6	4.5
Pufer za razdvajanje (mL)	3	3	3	3	3
dH_2O (mL)	7.5	6.6	6	5.4	4.5
10 % APS (μL)	60	60	60	60	60
TEMED (μL)	6	6	6	6	6

Tablica 2 SDS poliakrilamidni gel za sabijanje

40 % akrilamid / 0.8 % bisakrilamid (mL)	0.4
Pufer za sabijanje (mL)	1
dH_2O (mL)	2.6
10 % APS (μL)	4.8
TEMED (μL)	40

2.2. Metode

2.2.1. Bioinformatički alati

2.2.1.1. Predikcija jezgrene izlazne sekvence

NetNES 1.1 online sever (la Cour i sur. 2004) predviđa leucinom bogate nuklearne izlazne sekvence u proteinima eukariotskih stanica koristeći kompleksne računalne modele umjetnih neuronskih mreža (ANN) i skrivenih Markovljevih signala (HMM). Dostupan je na adresi: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/.

NetNES 1.1 korišten je za predikciju jezgrene izlazne sekvence štakorskog proteina sharpina (UniProtKB/Swiss-Prot Q9EQL9).

2.2.1.2. Predikcija mjesta cijepanja kaspaza

Kaspaze su cisteinske proteaze koje cijepaju supstrate na specifičnim tetrapeptidnim mjestima (u literaturi označenima kao P_4-P_3-P_2-P_1) s konzerviranim aspartatom na položaju P_1. Wee i sur. (2006) uspostavili su CASVM server 1.0 za predviđanje kaspaznih mjesta cijepanja unutar proteina. Alat se zasnovan na *Support Vector Machine* (SVM) sustavu za kojeg je pomoću različitih statističkih testova pokazano da je vrlo efikasna i osjetljiva metoda. Autori su također pokazali da se točnost predikcije može poboljšati uzimajući u obzir prvu i drugu aminokiselinu nizvodno od tetrapeptida (P_1' i P_2'). Ove aminokiseline izvan tetrapeptida mogu utjecati na cijepanje supstrata, te SVM algoritam uzima u obzir i njih prilikom predikcije mjesta cijepanja. Server je dostupan na adresi: http://www.casbase.org/casvm/server/index.html.

CASVM 1.0 korišten je za predikciju postojanja kaspaznog mjesta cijepanja unutar štakorskog proteina sharpina (UniProtKB/Swiss-Prot Q9EQL9).

2.2.1.3. Sravnjivanje nukleotidnih i proteinskih sekvenci

BLAST (Basic Local Alignement Search Tool) omogućuje usporedbu aminokiselinskih sekvenci različitih proteina ili nukelotidnih sekvenci sa sekvencama pohranjenim u genskoj banci podataka ili identifikaciju sekvence koja sliči traženoj sekvenci. Temelji se na algoritmima koji prednost daju brzini, a ne osjetljivosti, što je vrlo praktično s obzirom na ogromnu količinu podataka koja je danas dostupna. Server je dostupan na adresi: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

BLAST je korišten za sravnjenje rezultata sekvenciranja klonova HA-sharpina s mutiranom pretpostavljenom jezgrinom izlaznom sekvencom (NESmut HA-sharpin) s divljim tipom cDNA sharpina

.

2.2.2. *In situ* mutageneza

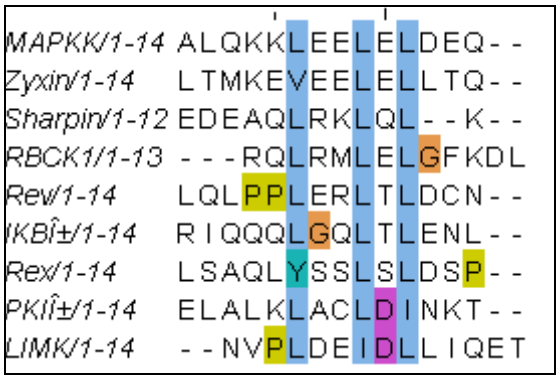
Procedura koristi superzavijenu dvolančanu DNA (vektor s insertom) i 2 sintetske oligonukleotidne početnice koje sadrže željenu mutaciju. Početnice trebaju biti konstruirane tako da sadrže komplementarnu sekvencu dugu 10 do 15 nukleotida s obje strane mutacije, te da preferencijalno završavaju s gvaninom ili citozinom. Ukupna duljina početnica trebala bi iznositi od 25 do 40 nukleotida, te bi GC sadržaj trebao biti veći od 40 %.

Ugradnja oligonukleotidnih početnica stvara plazmid koji sadrži željenu mutaciju. Po završetku lanačne reakcije polimerazom, produkt se tretira enzimom *Dpn*I. *Dpn*I je endonukleaza koja specifično cijepa metiliranu DNA te se dakle u ovom slučaju koristi za cijepanje roditeljskog DNA lanca. Na ovaj način sačuvan je novosinteizirani lanac DNA u koje je ugrađena mutacija. (DNA izolirana iz bakterije *Escherichia coli* je *dam* metilirana, što je čini podložnom razgradnji s endonukleazom *Dpn*I. Dakle, u 100 µL produkta lančane reakcije polimerazom dodano je 1 µL enzima *Dpn*I te inkubirano 1 h na 37°C.

Kao kalup za *in situ* mutagenezu korišten je HA-sharpin. Novonastali konstrukt nazvan je NESmut HA-sharpin.

2.2.2.1. Konstrukcija početnica

Pretpostavljena hidrofobna leucinom bogata nuklearna izlazna sekvenca ima konsenzusnu sekvencu LxxLxL. Smisao mutacije je konstrukcija sharpina koji neće posjedovati ovu konsenzusnu sekvencu. Leucine iz konsenzusne sekvence mutirao sam istodobno u alanine, i to L40, L43 i L45 (slika 7).



Slika 7 Rezultat BLAST sravnjivanja proteina koji posjeduju hidrofobnu leucinom bogatu NES (Tatematsu i sur.. 2005) sa sharpinom.

Sekvenca početnica korištenih za amplifikaciju, (crvenom bojom označeni su mutirani nukleotidi) :

NES_sh_3ptmut for GAC GAA GCG CAG **GC**G CGA AAG **GC**G CAG **GC**G AAA GCC GAC CCT GAG

NES_sh_3ptmut rev CTC AGG GTC GGC TTT C**GC** CTG C**GC** CTT TCG C**GC** CTG CGC TTC GTC

Tablica 3 Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerazom.

DNA kalup (HA-sharpin)	100 ng
10X PFU pufer	10 µL
dNTP-ovi (10 mM)	2 µL
NES_sh_5ptmut (20 pmol/µL)	1.25 µL
NES_sh_3ptmut (20 pmol/µL)	1.25 µL
DMSO	5 µL
PFU polimeraza	2 µL
Destilirana voda	Dopuniti do 100 µL

Tablica 4 Program za lančanu reakciju polimerazom.

SEGMENT	CIKLUSI	TEMPERATURA	VRIJEME
1	1	95°C	3 min
2	18	95°C	1 min
		55°C	1 min
		68°C	12 min
3	1	68°C	12 min
4	1	4°C	∞

2.2.3. Transformacija bakterija DH5α

Produkt lančane reakcije polimerazom tretiran enzimom *Dpn*I transformiran je u bakterije DH5α.

Transformacija bakterijskih stanica provođena je metodom *heat-shocka*. Ukratko, 15 µL produkta lančane reakcije polimerazom tretiranog enzimom *Dpn*I je pomiješano s 50 µL

kompetentnih DH5α bakterijskih stanica. Smjesa je potom držana na ledu 30 min. Toplinski šok se sastoji u izlaganju smjese bakterija i DNA 45 sekundi temperaturi od 42°C, što je provođeno u termobloku. Bakterije su potom ponovno držane na ledu, i to 2 minute. Zatim im je dodano 1 mL LB medija (bez antibiotika) te je ova smjesa inkubirana 1h na 37°C uz miješanje. Nakon inkubacije, smjesa je centrifugirana (4000 rpm, 5 min) te je odstranjeno 900 µL supernatanta. Talog je resuspendiran u preostalom supernatantu i nasađen na LB ploče s ampicilinom. Ploče su inkubirane preko noći na 37 °C.

2.2.4. Izolacija plazmidne DNA te sekvenciranje

Pojedinačne bakterijske kolonije su izolirane s bakterijskih ploča te resuspendirane u 5 mL LB medija uz dodatak ampicilina, inkubirane su preko noći na temperaturi 37°C uz miješanje. Sutradan je izolirana plazmidna DNA miniprep kitom (Sigma) slijedeći upute proizvođača.

Koncentracija plazmidne DNA određena je spektrofotometrijski (EppendorfBiophotometer). Sekvenciranje je provela kompanija MWG BIOTECH u Martinsriedu, Njemačka (https://ecom.mwgdna.com/services/home.tc) koristeći komercijalno dostupne početnice za pGW1 plazmid. Zaprimljena sekvenca uspoređena je s originalnom sekvencom koristeći bioinformatički alat za sravnjivanje, BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.2.5. Stanična kultura

Stanice HeLa su uzgajane u inkubatoru za staničnu kulturu, u atmosferi s 5% CO_2 te temperaturi 37°C , u DMEM mediju s 10% fetalnim govođim serumom (FBS). U medij su dodani antibiotici penicilin (100 U/mL) te streptomicin (100 µL/g). Pasažiranje je provođeno svaka 2-3 dana.

2.2.6. Transfekcija stanica HeLa

Transfekcija stanica HeLa provođena je pomoću Lipofectamina 2000. Dan prije transfekcije stanice su pasažirane slijedeći upute proizvođača (količina stanica u odnosu na relativnu površinu posude za staničnu kulturu). Ukratko, stanice su transfecirane u omjeru DNA (µg) :

Lipofectamine 2000 (μL) 1:2. Za 60 mm ploče korišteno je 2 μg DNA, a za ploče s 12 jažica korišteno je 0.5 μg DNA. Slijedeći upute proizvođača, priređena je smjesa A: Lipofectamine 2000 je pomiješan s DMEM-om bez dodanog seruma (proizvođač također preporučuje i bez dodatka antibiotika) i inkubiran 5 minuta. Smjesa B sastojala se od DNA otopljene također u mediju bez seruma, i to istog volumena kao za smjesu A . Nakon inkubacije od 5 minuta, razrijeđena DNA je pomiješana s razrijeđenim Lipofectaminom 2000. Smjesa je nježno pomiješana i inkubirana 30 minuta. Prije dodatka ove smjese na stanice, zamijenjen im je medij s DMEM-om bez seruma i bez antibiotika. Po završetku inkubacije od 30 min, transfekcijska smjesa je dodana stanicama te su posude nježno miješane u križnoj kretnji kako bi se transfekcijska smjesa ravnomjerno rasporedila po ploči. Transfekcija je zaustavljena 4-6 h poslije zamijenivši medij bez seruma i antibiotika s medijem sa serumom i s antibioticima.

Pri transfekciji 60 mm ploča , za pojedinačnu ploču je korišteno 2.5 mL DMEM medija bez FBS-a te bez antibiotika. Od toga je 2 mL dodano stanicama odmah nakon odsisavanja standardnog medija, a 250 μL korišteno je za smjesu A, te isti volumen za smjesu B. Analogno, prilikom transfekcije ploča s 12 jažica, za svaku jažicu korišteno je 0.5 mL medija bez FBS-a i antibiotika, od čega je 400 μL dodano stanicama odmah nakon odsisavanja standardnog medija, a 100 μL je korišteno za pripravu smjese A, odnosno B.

2.2.7. Tretman stanica HeLa leptinomicinom B

Leptinomicin B (LMB) je metabolit roda *Streptomyces* koji inhibira funkciju proteina Crm1, koji služi kao receptor za hidrofobnu, leucinom bogatu jezgrenu izlaznu sekvencu (NES) (Kudo i sur. 1998). Stanice HeLa tretirane su LMB za potrebe dva tipa eksperimenta: za biokemijsko (Western blot) određivanje lokalizacije sharpina kao i imunocitokemijsko praćenje lokalizacije sharpina.

Za potrebe eksperimenta koji je rezultirao Western blotom, HeLa stanice su tretirane s LMB-om na sljedeći način: nakon što je stanicama odsisan postojeći medij, dodan im je medij koji je sadržavao LMB. On je pripravljen na sljedeći način: u 2.5 mL DMEM-a (po 60 mm ploči) otopljen je LMB do koncentracije od 20 nM te FBS u konačnom udjelu od 2 %. Smanjeni udio seruma izgladnjuje stanice te se smatra da više akumuliraju LMB nego što bi ga akumulirale imajući standardni udio seruma u mediju. Kontrolne stanice su tretirane DMEM-om s istim udjelom FBS-a te s dodatkom 70 %-tnog metanola (budući da je LMB

otopljen u 70 %-tnom metanolu), i to volumena (na 2.5 mL medija) istog kao i LMB u prethodnoj smjesi. Nakon određenih vremenskih intervala medij je odsisan, stanice su isprane PBS-om, te zamrznute. Po završetku eksperimenta, stanice su lizirane, i pristupilo se odvajanju citoplazmatske od jezgrine frakcije proteina.

Za potrebe imunocitokemijskog praćenja lokalizacije sharpina, HeLa stanice su uzgajane u pločama s 12 jažica na način opisan pododjeljku Imunocitokemija. Ukratko, postojeći medij je odsisan te zamijenjen medijem s LMB-om. On je priređen na sljedeći način: u 1 mL DMEM-a (po jednoj jažici ploče s 12 jažica) otopljen je LMB do koncentracije 20 nM te FBS u konačnom udjelu od 2 %. Kontrolne stanice tretirane su DMEM-om s istim udjelom FBS-a, u koje je još dodan, kao i gore, 70 %-tni metanol volumena istog kao i LMB. Nakon određenih vremenskih intervala medij je odsisan te se pristupilo pripravi stanica za imunocitokemiju.

2.2.8. Tretman stanica HeLa staurosporinom

Staurosporin se koristi kao induktor apoptoze (a time i aktivator kaspaza), inhibitor je protein kinaze C i većine ostalih kinaza, također inhibira topizomerazu II direktno blokirajući prijenos fosfodiesterske veze s DNA na tirozinski ostatak unutar aktivnog mjesta .

Stanice HeLa tretirane su staurosporinom na sljedeći način: u 2.5 mL DMEM-a (po 60 mm ploči) otopljen je staurosporin u konačnoj koncentraciji od 0.3 μM te FBS u konačnom udjelu od 2 % (smanjeni udio seruma iz istih razloga i kod tretmana s LMB-om). Kontrolne stanice tretirane su istom smjesom izostavivši staurosporin te zamijenivši ga DMSO-om (budući da je staurosporin otopljen u DMSO-u). Nakon određenih vremenskih intervala stanicama je odsisan medij, oprane su PBS-om te lizirane (priređen je ukupni stanični lizat).

2.2.9. Priprava ukupnog staničnog lizata

Za pripravu ukupnog staničnog lizata (*total cell lysate*, TCL) stanica HeLa uzgojenih u 60 mm pločama stanice su lizirane pri konfluenciji od 90-100 %. Stanicama je odsisan medij te su oprane PBS-om. Svi sljedeći koraci izvođeni su na ledu. Na ploče je dodano 0.5 mL pufera za lizu u kojeg je prethodno dodan koktel proteaznih inhibitora. Stanice su sastrugane s

plastičnom strugalicom („rubber policeman“), resuspendirane te prebačene u ohlađene tubice. Tubice su inkubirane na ledu 10 min. Zatim je uslijedilo centrifugiranje u ohlađenoj centrifugi,i to 10 min, na 13200 rpm (maksimalna brzina centrifuge). Supernatant predstavlja totalni stanični lizat je od njega uzeto 75 µL i pomiješano s istim volumenom 2x Sample bufferom. Ova smjesa je potom kuhana 2 min na 95°C u termo bloku. Alikvot ovako priređenog uzorka nanošen je na 10 %-tni poliakrilamidni gel.

2.2.10. Razdvajanja jezgrine od citoplatmatske frakcije proteina

Razdvajanje jezgrine od citoplazmatske frakcije stanica provođeno je pomoću kita Nuclear Extract Kit (Active Motif) slijedeći upute proizvođača. Ukratko, stanice su, kao i prethodno, uzgajane u 60 mm pločama. Odsisan im je medij te isprane jednom u PBS-u. Potom su sastrugane u ledeno-hladnom PBS-u u prisusutnosti inhibitora fosfataza kako bi se onemogućile daljnje proteinske modifikacije (ekspresija, proteoliza, defosforilacija itd.). Uslijedila je resuspenzija u hipotoničnom puferu što je prouzročilo naticanje plazmatske membrane čime je ona postala donekle narušena i osjetljiva. Dodatak detergenta uzrokovao je istjecanje citoplazmatskih proteina u supernatant. Nakon odstranjenja citoplazmatske frakcije, jezgre su lizirane i proteini jezgre otopljeni u puferu za lizu (poseban pufer za lizu unutar kita) u prisutnosti koktela proteaznih inhibitora. Kao i prethodno, uzorci su su pomiješani s odgovarajućim volumenom 2x Sample Buffera, kuhani na 95 °C 2 min, te je odgovarajući alikvot nanesen na 10 %-tni SDS poliakrilamidni gel.

2.2.11. Elektroforeza u SDS poliakrilamidnom gelu i Western Blotting

Uzorci su priređeni kao što je prethodno opisano, potom su razdvojeni elektroforezom u 10 %-tnom SDS poliakrilamidnom gelu (90 V za gornji gel te 120 V za donji gel) te preneseni na nitrocelulozu membranu (200 mA, 90 min) u 1x prijenosnom puferu, u kojeg je dodan 20 %-tni (v/v) metanol. Efikasnost prijenosa potvrđena je vrlo kratkom (nekoliko minuta) inkubacijom membrane u otopini Ponceau S.

2.2.12. Imunocitokemija

Stanice su nasađene na sterilnim okruglim stakalcima na pločama s 12 jažica tako da je dodana 1 kapljica stanične suspenzije u 1 mL medija (razrijeđenje 1:5). Nakon 24 h (ili nakon završetka tretmana s LMB-om), medij je odsisan, i stanice su isprane s PBS-om. Potom je uslijedila fiksacija stanica (5 minuta) u otopini koja je sadržavala 2 %-tni paraformaldehid, 1 % -tnu saharozu i 0.15 %-tni Triton X-100 u PBS-u. Stanice su po fiksaciji isprane 3 puta s PBS-om. Fiksirane stanice su potom blokirane u otopine 3 % BSA u PBS-u (blokirajuća otopina) tijekom 20 minuta. Uslijedila je inkubacija stanica s primarnim poliklonalnim sharpinovim protutitijelom razrijeđenim 1000 puta u blokirajućoj otopini. Inkubacija je trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi (moguće je inkubaciju provoditi i preko noći na 4°C). Stanice su isprane od nevezanog primarnog protutijela inkubacijom od 5 minuta s PBS-om, uz miješanje; ispiranje je ponovljeno ukupno 3 puta. Uslijedila je inkubacija (45 minuta) sa sekundarnim protu- zečjim protutijelom obilježenim FITC-om, razrijeđenim 1:400 u blokirajućoj otopini.

Nakon ove inkubacije stanice se ispiru 3 puta s PBS-om. Stakalca s fiksiranim stanicama potom se suše te uklapaju pomoću Vectashield-a (Vector Laboratories Inc.) na predmetna stakla. Stakalca se oko rubova učvršćuju lakom (lak za nokte) na predmetna stakla.

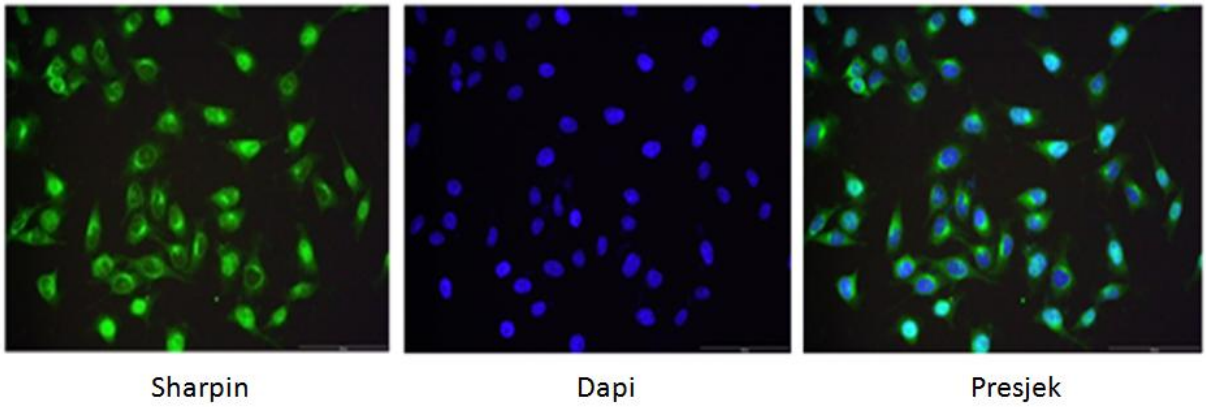
Kod fluoresencijskog praćenja unutarstanične lokalizacije GFP-sharpina protutijela nisu bila potrebna. Stanice su samo fiksirane i blokirane.

Uzorci su promatrani pod fluorscentnim mikroskopom Zeiss.

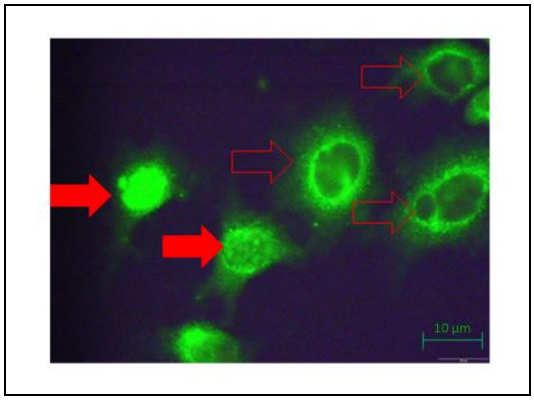
3. Rezultati

3.1. Lokalizacija endogenog sharpina

Sharpin je lokaliziran u postsinaptičkoj gustoći neurona hipokampusa (Lim i sur. 2001). Iz rezultata njihove citokemijske analize također je vidljiva i jaka jezgrina lokalizacija sharpina, iako autori u raspravi posebno ne spominju ovu činjenicu. S ciljem određivanja unutarstanične lokalizacije sharpina u dijelećim stanicama, proveli smo sličan imunocitokemijski eksperiment, koristeći isto primarno protutijelo kao i spomenuti autori. Za naš eksperiment izabrali smo HeLa staničnu liniju. Na naše iznenađenje, zamijetili smo difuznu lokalizaciju endogenog sharpina u citoplazmi kao i jaku jezgrinu lokalizaciju endogenog sharpina HeLa stanica (slike 8 i 9). Boja Dapi specifično boji kromatin te je korištena kao marker jezgre.



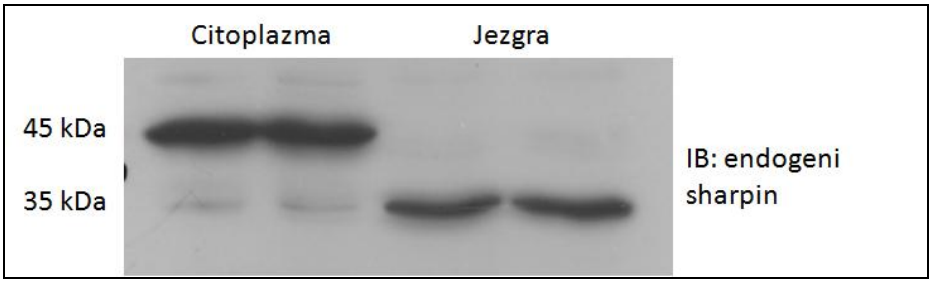
Slika 8 Lokalizacija sharpina u stanicama HeLa; uz protutijelo za endogeni sharpin, korištena je i boja Dapi koja specifično boja kromatin (povećanje 40X).



Slika 9 Veće povećanje (100X). Vidlljivo je da sharpin pokazuje i jezgrenu i citoplazmatsku lokalizaciju. Pune strelice ukazuju na stanice HeLa u kojima je sharpin lokaliziran u jezgri, dok prazne strelice ukazuju na sharpinovu citoplazmatsku lokalizaciju.

3.2. Endogeni sharpin prisutan u jezgri i citoplazmi različite je veličine

Kako bi biokemijski potvrdili unutarstaničnu lokalizaciju sharpina utvrđenu imunocitokemijom, provedeno je razdvajanje jezgrine i citoplazmatske frakcije proteina stanica HeLa, nakon kojeg je uslijedila SDS poliakrilamidna elektroforeza i Western blotting koristeći protu-sharpin protutijelo. Western blot je potvrdio da je sharpin zaista prisutan i u jezgri i u citoplazmi stanica HeLa (slika 10). Međutim, kao što je vidljivo sa slike, citoplazmatskoj frakciji odgovara vrpca veće duljine (45 kDa) dok jezgrinoj frakciji odgovara manja vrpca (35 kDa). Zanimljiva sharpinova jezgrena lokalizacija, kao i postojanje manje sharpinove varijante u jezgri potiče pitanje o mogućoj ulozi sharpina u jezgri, razloga zbog kojeg je prisutan u jezgri u manjoj varijanti, i na koji je način regulirana njegova jezgrina lokalizacija.

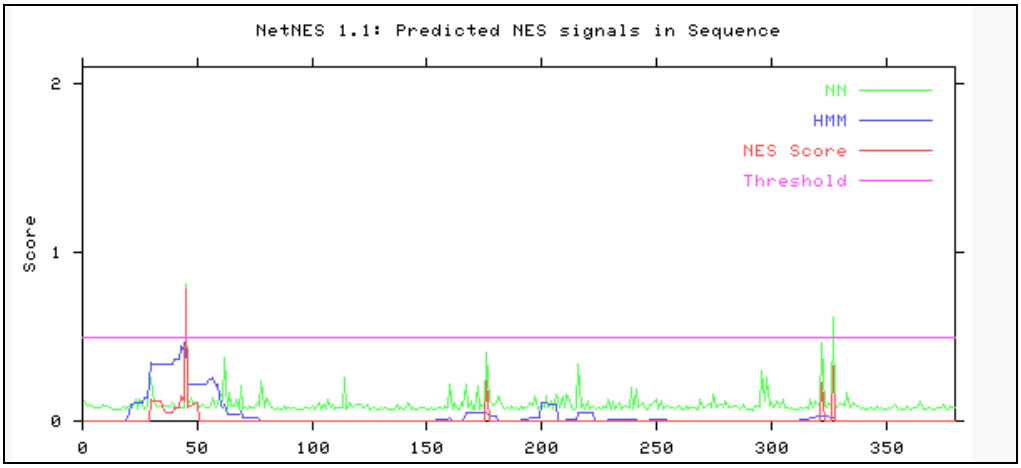


Slika 10 Western blot endogenog sharpina u citoplazmi i jezgri stanica HeLa. Primjetno je postojanje vrpce od 45 kDa u citoplazmi te vrpce od 35 kDa u jezgri.

3.3. Sharpin posjeduje predviđenu jezgrenu izlaznu sekvencu (NES)

Kako bi utvrdili je li sharpinova jezgrena lokalizacija posljedica postojanja jezgrinog lokalizacijskog signala (NLS-a) ili jezgrine izlazne sekvence (NES-a), bioinformatičkim smo alatima analizirali njihovu prisutnost u sharpinovoj sekvenci. Bioinformatički alati za predikciju NLS-a nisu predvidjeli postojanje NLS-a u sharpinu sličnog dosad utvrđenim NLS-ovima. NetNES 1.1 server korišten je za predikciju jezgrene izlazne sekvence (NES) unutar aminokiselinske sekvence štakorskog proteina sharpina (UniProtKB/Swiss-Prot Q9EQL9). Ovaj program predvidio je postojanje hidrofobnog, leucinom bogatog NES-a na aminokiselinskom položaju 40-45 (slika 11 i 12). Ovakav tip NES-a veže se za protein Crm1 koji je moguće inhibirati leptinomicinom B. Ukupna NES vrijednost dana programom presjek

je rezultata korištenja dvaju algoritama: skrivenih Markovljevih modela (HMM) i umjetnih neuronskih mreži (ANN). Program predviđa postojanje NES-a jedino ako je ukupna NES vrijednost veća od praga. Kao što je vidljivo na slici 12, oko položaja 325 rezulat umjetnih neuronskih mreža je iznad praga međutim, ukupna NES vrijednost nije iznad praga pa program nije predvidio postojanje jezgrene izlazne sekvence na ovom položaju.



Slika 11 Grafički prikaz predikcije NES-a programom NetNES 1.1. Na aminokiselinskom položaju 45 ukupna NES vrijednost veća je od praga, na osnovu čega je predviđen NES na aminokiselinskom položaju 40-45.

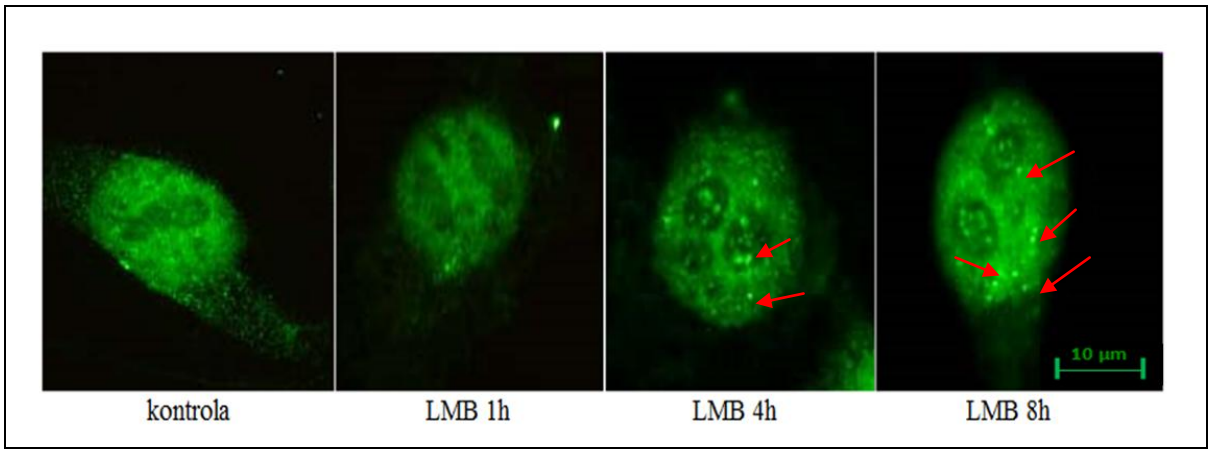
#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
Sequence-39-Q	0.105	0.339	0.053	-
Sequence-40-L	0.090	0.370	0.083	-
Sequence-41-R	0.070	0.367	0.075	-
Sequence-42-K	0.089	0.368	0.075	-
Sequence-43-L	0.076	0.442	0.146	-
Sequence-44-Q	0.082	0.412	0.114	-
Sequence-45-L	0.817	0.522	0.783	Yes
Sequence-46-K	0.086	0.219	0.080	-

Slika 12 Tablični prikaz predikcije NetNES 1.1. programa. Vidljive su vrijednosti umjetnih neuronskih mreža (ANN), skrivenih Markovljevih modela (HMM) kao i ukupna NES vrijednost.

3.4. Imunocitokemija stanica HeLa nakon tretmana leptinomicinom B

3.4.1. Tretman LMB-om dovodi do nakupljanja endogenog sharpina u jezgri , i to u granularnim strukturama

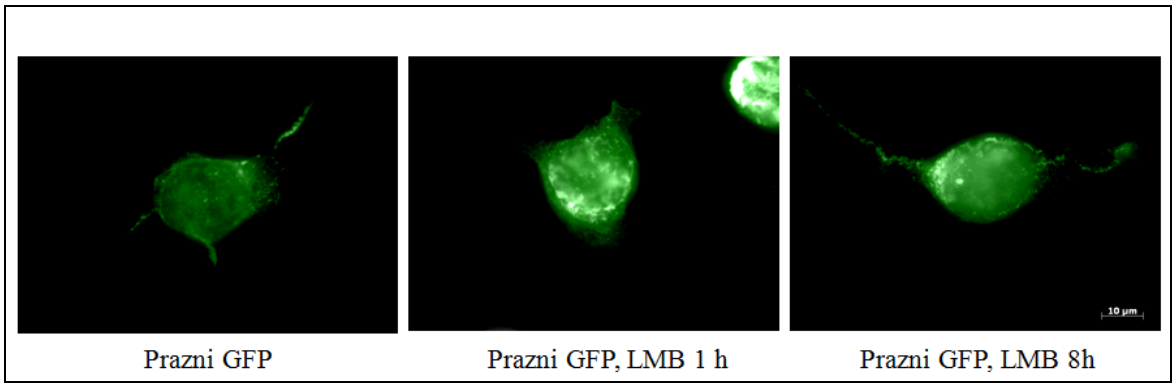
Kako bi istražili postojanje leucinom bogatog NES-a ovisnog o eksportinu Crm1, tretirali smo stanice HeLa s leptinomicinom B, inhibitorom Crm1-ovisnog jezgrinog eksporta. Ako je pretpostavka o postojanju leucinom bogatog NES-a bila točna, po tretmanu LMB-om očekivali smo nakupljanje sharpina u jezgri. Imunocitokemijski, koristeći poliklonsko primarno antitijelo za endogeni sharpin te sekundarno protu-zečje protutijelo obilježeno FITC-om, pratili smo lokalizaciju sharpina u stanici u ovisnosti o tretmanu leptinomicinom B. Kao što je vidljivo na slici 13, kod kontrolne skupine, netretirane LMB-om, sharpin je lokaliziran i u jezgri i u citoplazmi. Primjećuje se da je signal difuzan. Vremenski raspon inkubacije stanica s LMB-om pokazuje da dolazi do nakupljanja sharpina u jezgri te da se difuznost signala smanjuje. Uz smanjenjenje difuznosti, primjetno je i nakupljanje proteina unutar granularnih struktura, koje postaju posebne istaknute nakon osmosatne inkubacije s LMB-om.



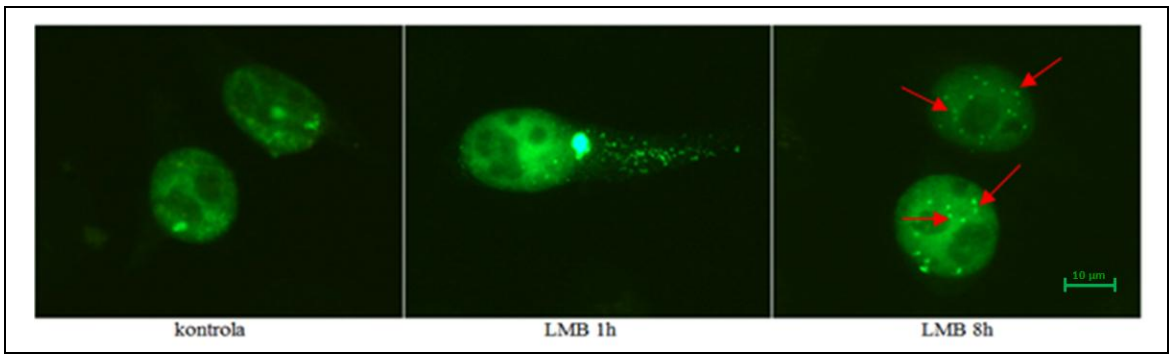
Slika 13 Imunocitokemiski prikaz (povećanje 100X) lokalizacije endogenog sharpina u stanicama HeLa; kontrola i stanice nakon tretman LMB-om od 1, 4 i 8 sati. Nakon tretmana s LMB-om od 4 i 8 sata, primjećuju se granularne strukture u jezgri. Primjer granularnih struktura označen je strelicama.

3.4.2. Tretman LMB-om dovodi do nakupljanja GFP-sharpina u granularnim strukturama u jezgri

Prisutnost leucinom bogatog NES-a htjeli smo provjeriti i promatranjem lokalizacije GFP-om obilježenog sharpina po tretmanu s LMB-om. Stanice HeLa su transfecirane GFP sharpinom, te je fluorescencijskom mikroskopijom praćena lokalizacije GFP sharpina nakon tretmana s LMB-om. GFP sharpin pokazivao je izraženiju jezgrenu lokalizaciju od endogenog sharpina. Kod razmatranja ovog podatka, treba uzeti u obzir i činjenicu da je prazni GFP također lokalizirao u jezgri (slika 14). Po tretmanu stanica s LMB-om također se zamjećuje nakupljanje GFP sharpina u jezgri, i to također unutar određenih granularnih struktura, slično kao kod endogenog sharpina tretiranog LMB-om (slika 15).



Slika 14 Imunocitokemijski prikaz (povećanje 100X) lokalizacije praznog GFP vektora u stanicama HeLa; kontrola te stanice tretirane LMB-om nakon 1 i 8 sati.

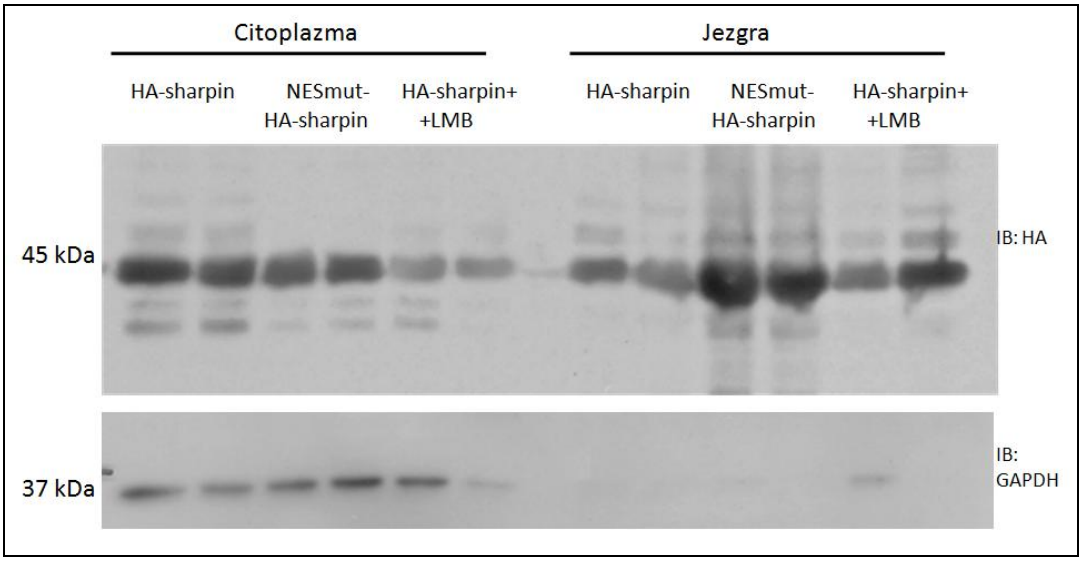


Slika 15 Imunocitokemijski prikaz (povećanje 100X) lokalizacije GFP-sharpina u HeLa stanicama; kontrola kao i stanice tretirane LMB-om nakon 1 i 8 sati. Poput endogenog sharpina, GFP sharpin također po tretmanu lokalizira u jezgri, i također unutar granularnih struktura. Primjer granularnih struktura označen je crvenim strelicama.

3.4.3. HA-sharpin u stanicam HeLa tretiranim LMB-om i NESmut HA-sharpin pokazuju nakupljanje u jezgri na Western blotu

Kako bi pokazali da je za efikasan eksport sharpina iz jezgre potreban intaktan leucinom bogat NES, mutirali smo tri leucina u alanine unutar konsenzusne NES sekvence. Očekivali smo, u tom slučaju, nakupljanje NES mutanta unutar jezgre.

Stanice HeLa su za ovu svrhu transfecirane HA-sharpinom i HA-sharpinom koji ima mutiranu pretpostavljenu jezgrenu izlaznu sekvencu, tzv. NES-mut HA sharpinom. 3 su serije stanica uzgajane u 60 mm pločama, svaka u 2 replike. Kontrolna skupina transfecirana je s HA-sharpinom, te uzgajana u standardnim uvjetima. Sljedeća serija stanica također je transfecirana s HA-sharpinom, uzgajana u mediju s LMB-om, i to u periodu od 8 sati. Treća serija stanica transfecirana je s NES-mut HA sharpinom te uzgajana u standardnim uvjetima. Stanice su lizirane, odvojena im je citoplazmatska od jezgrine frakcije. Uzorci proteina su voženi na SDS poliakrilamidnom gelu te preneseni na nitrocelulozu membranu (Western blot). Membrane su inkubirane s monoklonskim mišjim primarnim protu-HA protutijelom te sekundarnim protu-mišjim protutijelom. Kao *loading* kontrola, korišteno je protu GAPDH protutijelo koje detektira enzim glukozu-6-fosfat dehidrogenazu, prisutnu jedino u citoplazmi. *Loading* kontrola je potvrdila efikasno razdvajanje jezgrene i citoplazmatske frakcije proteina; u jezgrinoj frakciji nisu bili prisutni citoplazmatski proteini. Kao što je vidljivo s Western blota (slika 16), stanice tretirane LMB-om i stanice transfecirane NES-mut HA- sharpinom ponašaju se vrlo slično. Stanice uzgajane u standardnim uvjetima, dakle kontrolna skupina, pokazuju veću količinu proteina u citoplazmatskoj nego u jezgrenoj frakciji. Nasuprot tome, stanice tretirane LMB-om, kao i stanice uzgajane u standardnim uvjetima, ali transfecirane s NESmut HA-sharpinom pokazuju veću količinu sharpina u jezgrenoj frakciji nego u citoplazmatskoj frakciji. Tretman s LMB-om, kao i mutiranje NES-a za posljedicu ima nakupljanja sharpina u jezgri, što potvrđuje imunocitokemijske eksperimente.

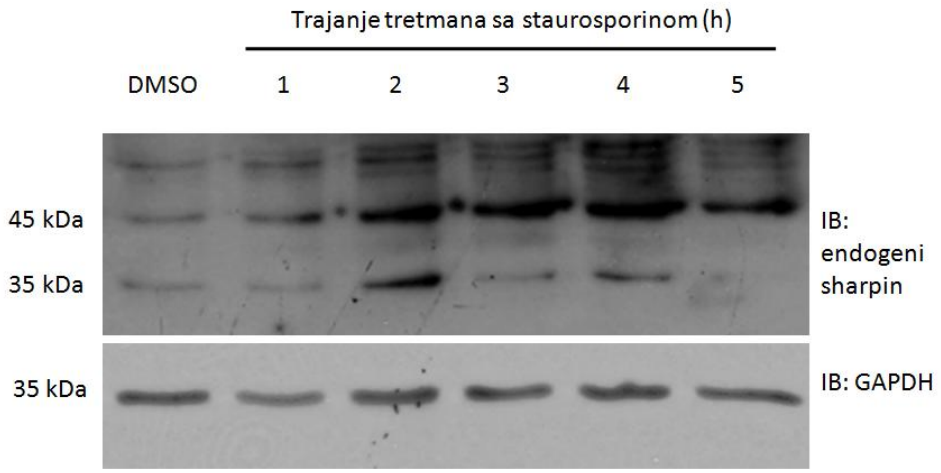


Slika 16 Western blot citoplazmatske i jezgrene frakcije HA-sharpina, NESmut HA-sharpina eksprimiranih u stanicama HeLa, kao i stanica HeLa transformiranih HA-sharpinom te treiranih LMB-om u trajanju od 8 sati. Kao *loading* kontrola korišten je protutijelo na GAPDH, enzim prisutan jedino u citoplazmi.

3.4.4. Tretman stanica staurosporinom

Budući da je CASVM server pretpostavio postojanje kaspaznog mjesta cijepanja unutar sharpinove sekvence, ovu pretpostavku odlučili smo testirati, potaknuvši aktiavciju kaspaza. Budući da do aktivacije kaspaza dolazi tijekom apoptoze, HeLa stanice transfecirane HA sharpinom tretirane su staurosporinom, induktorom apoptoze.

Tretman staurosporinom provođen je na opisani način, dok je kontrolnim stanicama bio dodan isti volumen DMSO-a (jer je staurosporin otopljen u DMSO-u). Stanice su nakon određenih vremenskih razdoblja (1, 2, 3, 4, 5 h) lizirane te je priređen ukupan stanični lizat (TCL). Uzorci su voženi na 10 %-tnom SDS poliakrilamidnom gelu i preneseni na nitroceluloznu membranu. Kao što je vidljivo na Western blotu (slika 17), do pojave intenzivnije vrpce od 35 kDa dolazi nakon 2 h tretman ss staurosporinom. Poslije tog vremena, kao i prije, vrpca od 35 kDa pokazuje manji intenzitet. Kao *loading* kontrola korišteno je protu- GAPDH protutijelo. Budući da tretman sturosporinom nije rezultirao povećanjem udjela manje sharpinove vrpce, ne možemo zaključiti da je ona posljedica proteolitičkog cijepanja apoptozom induciranih kaspaza.



Slika 17 Western blot ukupnog staničnog lizata stanica HeLa; kontrola (tretirana s DMSO) te stanica tretiranih sa staurosporinom, u trajanju od 1, 2, 3, 4, 5 sata. Protutijelo za GAPDH korišteno je kao *loading* kontrola.

4. Rasprava

Preliminarni rezultati fluorescencijske mikroskopije pokazali su prisutnost sharpina u citoplazmi i u jezgri stanica HeLa. Sharpin kao protein od 45 kDa ne može pasivno difundirati u jezgru ((Panté i Kann 2002), i dakle njegov ulazak, i eventualni ponovni izlazak je vjerojatno reguliran. Regulacija se najčešće sastoji u postojanju jezgrenog lokalizacijskog signala i eventualne jezgrene izlazne sekvence, ali i u dostupnosti ovih signala i mogućnosti prepoznavanja od strane proteina transportina, odnosno direktno u pojedinim slučajevima od strane nukleoporina koji tvore kompleks jezgrine pore. Jedna od najčešćih izlaznih sekvenci je hidrofobna leucinom bogata jezgrina izlazna sekvenca (Sorokin i sur. 2007). Tatematsu i sur. (2005). opisali su postojanje jezgrine izlazne sekvence u RBCK1, proteinu čiji je N kraj homologan C kraju sharpina.

Postojanje učestale konzesusne leucinom bogate izlazne sekvence omogućilo je predviđanje postojanja NES-a bioinformatičkim programom NETNes (la Cour i sur. 2004) dostupnim na internetu. Postojanje jezgrene izlazne sekvence potvrđeno je biokemijskom analizom (Western blot) lokalizacije HA-sharpina iz stanica tretiranih LMB-om i HA sharpina s mutiranom jezgrenom izlaznom sekvencom. Imunocitokemijskim promatranjem lokalizacije endogenog sharpin i GFP sharpina nakon tretmana s LMB-om dovelo je do istog zaključka o postojanju leucinom bogatog NES-a.

Tatematsu i sur (2005). imunocitokemijom su promatrali RBCK1 obilježen GFP-om nakon tretmana LMB-om. RBCK1-GFP se gotovo u potpunosti nalazio u citoplazmi kod netretiranih stanica. Već 1 h nakon tretmana s LMB-om došlo je do translokacije većine RBCK1 u jezgru. Nakon 8 h primjetili su lokalizaciju proteina u jezgri, i to u obliku malih granularnih struktura. Valja također istaknuti da je kod kontrolnih stanica transfeciranih praznim GFP vektorom GFP signal bio prisutan i u jezgri i u citoplazmi.

Za razliku od RBCK1-GFP-a, netretirani endogeni sharpin lokalizirao je i u jezgri, i u citoplazmi. Tretmanom s LMB-om, kao i u slučaju RBCK1, došlo je do nakupljanja sharpina unutar jezgre, štoviše, također unutar granularnih struktura. Granularne strukture posebno su postale vidljive nakon osmosatnog tretmana LMB-om.

Naši rezultati pokazali su lokalizaciju GFP sharpina pretežno u jezgri za razliku od endogenog sharpina koji je bio prisutan i u jezgri i u citoplazmi. Prazni GFP vektor također je lokalizirao u jezgri pa se onda jezgrena lokalizacija djelomično može pripisati snažno eksprimiranom GFP vektoru. Međutim, i u ovom slučaju, analogno s RBCK1, došlo je do nakupljanja sharpina u granularnim strukturama unutar jezgre.

Granularne strukture u jezgri opisali su i Crosetto i sur (2008). promatrajući jezgrenu lokalizaciju Wrnip1 (Werner helicase-interacting protein 1), proteina uključenog u translezijsku replikaciju DNA. Granularne strukture kolokaliziraju s PCNA, markerom replikacijskih vilica te su također detektirane unutar PML jezgrinih tjelešaca. Prisutnost UBZ domene (uz sposobnost oligomerizacije posredovane njegovim C-krajem) je nužna za lokalizaciju Wrnip1 unutar jezgrenih granularnih struktura. Ove granularne strukture postaju izraženije nakon tretmana koji oštećuju DNA (kao što je UV zračenje). Zanimljivo bi bilo istražiti potencijalnu kolokalizaciju sharpina unutar jezgrenih granularnih struktura s PCNA i PML jezgrinim tjelešcima.

Poput Wrnip1, sharpin posjeduje UBZ domenu. RanBP2 Zn-finger domena koju opisuju Seymour i sur (2007). ujedno je i UBZ domena. RanBP je nukleoporin koji veže Ran GTP/GDP. Pokazano je također da RanBP2 Zn-finger veže eksportin Crm1, te da je nužan za jezgrin izlazak. RanBP2 posjeduje mehanizam izlaska iz jezgre neovisan o LMB-u i ovisan o postojanju Zn-fingera (Singh i sur. 1999). Nameće se pitanje ima li sharpin potencijalno, uz hidrofobni NES osjetljiv na LMB i mehanizam jezgrenog eksporta neovisan o leucinom bogatom NES-u (i neosjetljivom na LMB)? Ova hipoteza mogla bi se istražiti konstrukcijom delecijskog mutanta ΔUBZ HA-sharpina te promatranjem njegove jezgrene lokalizacije prilikom tretmana s LMB-om kao i promatranjem jezgrene lokalizacije dvostrukog mutanta NESmut ΔUBZ HA- sharpina. Za potonjeg mutanta, u slučaju ispravnosti pretpostavke o dvostrukom mehanizmu jezgrinog eksporta, očekivali bismo izraženiju jezgrinu lokalizaciju nego za samog NESmut HA-sharpina.

Budući da HA-sharpin nije moguće promatrati imunocitokemijom (HA tag nije prikladan za imunocitokemiju), ne posjedujemo imunocitokemijske podatke o lokalizaciji NESmut-HA sharpina. No njegovu lokalizaciju bilo je moguće promatrati razdvajanjem jezgrene i citoplazmatske frakcije proteina te prijenosom na nitrocelulozu membranu, što je komplementiralo rezultate imunocitokemije. Western blot je pokazao smanjenje količine NESmut HA-sharpina u citoplazmi, i povećanje u jezgri, jednako kao i HA-sharpina

tretiranog LMB-om. LMB nije prouzrokovao isključivo nakupljanje sharpina u jezgri. To se može protumačiti činjenicom da je sinteza proteina dinamičan proces koji se zbiva u citoplazmi stanice. Doduše, također je moguće postojanje i neovisnog mehanizma eksporta neosjetljivog na LMB. Ovo bi se moglo provjeriti testiranjem lokalizacije NESmut HA-sharpina/HA-sharpina tretiranog LMB-om u stanicam HeLa koje ne eksprimiraju HA-sharpin, već je on unesen u njihovu jezgru mikronjekcijom. U slučaju da postoji samo jedan mehanizam jezgrenog eksporta, tad bismo očekivali apsolutnu jezgrenu lokalizaciju NESmut HA-sharpina/ HA sharpina tretiranog LMB-om.

Preliminarni Western blot lokalizacije endogenog sharpina pokazao je postojanje manjeg fragmenta u jezgri, što samom imunocitokemijom nije bilo moguće detektirati, jer imunocitokemija ne može pokazati veličinu proteina koji je detektiran protutijelom konjugiranim s fluoroforom. Zanimljivo je da isti eksperiment provođen sa stanicama transfeciranima HA-sharpinom nije dao isti rezultat već je i u citoplazmi i u jezgri detektirana vrpca iste veličine, dovodeći u pitanje specifičnost manje vrpce. Opažena vrpca manje molekularne težine mogla bi biti sharpinova transkripcijska varijanta ili produkt njegovog postranslacijskog proteolitičkog cijepanja.

Poput sharpina, kod još jednog proteina s dokazanom NES sekvencom u jezgri je bila prisutna manja varijanta. Protein MST1 posjeduje dvije NES sekvence na C kraju, i podložan je cijepanju kaspazama (Ura i Masayuma, 2001). Naime, nakon cijepanja proteina kaspazom, veći produkt cijepanja ostaje bez NES-a nakon čega ovaj fragment i dalje može ulaziti u jezgru, ali potom više iz nje ne može izaći jer ne posjeduje NES. U slučaju da se slična situacija odvija kod sharpina, sharpin bi također nakon pretpostavljenog cijepanja kaspazama ostao bez NES-a, i posljedično, lokalizirao kao manji fragment u jezgri.

Rezultati tretmana staurosporinom su dvojbeni, i na osnovu njih se ne može zaključiti o podrijetlu manjeg fragmenta u jezgri. Naime, do povećanja količine manjeg fragmenta dolazi nakon 2 h tretmana staurosporinom, a onda intenzitet vrpce opet pada na istu razinu. Je li moguće da nakon 2 sata, apoptozom inducirani degradacijski procesi u stanici počinju značajnije napredovati, a posebno unutar jezgre? Poznato da je jedan od ranih događaja u apoptozi dezintegracija jezgre, koja uključuje i proteine prisutne u njoj. Ova hipoteza mogla bi objasniti bržu degradaciju malog fragmenta, lokaliziranog u jezgri, u odnosu na citoplazmatske proteine. Svakako, i dalje vrijedi mogućnost da je opaženi fragment transkripcijska varijanta sharpina.

Manju sharpinovu vrpcu u jezgri monoklonsko sharpin protutijelo nije detektiralo na Western blotu (neobjavljeni podaci). Postoji mogućnost da poliklonsko protutitijelo nespecifično prepoznaje određeni protein koji nije sharpin. Također je pak moguće da monoklonsko protutijelo prepoznaje epitop koji nije prisutan na manjem fragmentu sharpina . Monoklonsko protutijelo je produkt jedne B stanice, i reagira samo s jednim epitopom, dok je poliklonsko protutijelo mješavina protutitijela koji reagiraju s više epitopa, jer su nastali od različitih B stanica, a ne samo od jedne. Lim i sur (2001). su opisali, uz postojanje glavne vrpce sharpina (45 kDa) i prisutnost druga 2 vrpce sharpina na Western blotu: 47 i 35 kDa u slezeni i plućima štakora. Međutim, sva tri poliklonska protutijela koja su priredili u trima različitim zečevima (od kojih je jedno korišteno i u ovom istraživanju) pokazali su isti uzorak, što upućuje da se ipak vjerojatno radi o sharpinovim polipeptidima, a ne o nespecifičnim vrpcama. Vrpce sharpina <37 kDa i >40 kDa, kao kod štakorskog sharpina također su utvrđene i kod divljeg tipa odraslog miša u eksperimentima koje su proveli Seymour i sur. (2007). Vrpca >40 kDa vjerojatno je nespecifična jer je vidljiva u odraslog cpdm/cpdm miša i kontroli, te jedva vidljiva u miševa mlađih od 2 tjedna. Vrpca <37 kDa nije pronađena u mladog mutantnog miša, i jedva je detektirana u odraslih mutanata, što upućuje da ova sharpinova vrpca nije nespecifična (Seymour i sur. 2007). Hibridizacija po Southernu te sekvenciranje manje sharpinove vrpce izrezane s gela pomogli bi u razjašnjenju njenog podrijetla; poglavito bi odgovorili na pitanje je li ova vrpca zaista sharpinova transkripcijska varijanta. Svakako, isključili smo mogućnost da je manja sharpinova vrpca, detektirana na našim blotovima u jezgri, produkt proteolitičkog cijepanja kaspaza, jer nije uslijedio odgovor na sturosporinski tretman na način koji smo očekivali niti je bila detektirana u egzogenom overekspresijskom sustavu.

5. Zaključak

Endogeni sharpin eksprimiran u staničnoj liniji HeLa prisutan je i u citoplazmi i jezgri stanica. Unutar jezgre lokalizira manja varijanta sharpina čije podrijetlo nije utvrđeno, i ostaje mogućnost da se radi o sharpinovoj transkripcijskoj varijanti ili posljedici posttranslacijskog proteolitičkog cijepanja drugih proteolitičkih enzima različitih od kaspaza.

Bioinformatička analiza nije pronašla unutar sharpinove sekvence niti jedan dosad poznati jezgrin lokalizacijski signal (NLS), što ostavlja otvorenu mogućnost da sharpin posjeduje netipični NLS.

Bioonformatičkom analizom predviđeno je postojanje hidrofobne leucinom-bogate jezgrene izlazne sekvence (NES) proteina sharpina. Mutagenezom te eksprimiranjem mutiranog sharpina za NES u HeLa stanicama, kao i tretmanom HeLa stanica s LMB-om potvrđeno je postojanje hidrofobne leucinom-bogate izlazne sekvence na aminokiselinskom položaju 40-45.

Osim uloge u postsinaptičkoj gustoći neurona, sharpin je prisutan i u jezgri, i iz koje izlazi, što je pokazano u ovom radu, na reguliran način. Najznačajnije pitanje koje proizlazi iz ovog saznanja odnosi se na ulogu sharpina u jezgri. Prema dosad objavljenim rezultatima, postoje indicije o uključenosti sharpina u signalni put NFκB. Promatranje sharpinove jezgrene lokalizacije po induciranju signalnog puta NFκB, testirajući i njegovu potencijalnu aktivnost transkripcijskog faktora, u budućim bi eksperimentima moglo rasvijetliti sharpinovu ulogu u jezgri.

.

6. Literatura

la Cour, T, Kiemer, L, Mølgaard, A, Gupta, R et al. 2004, "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, vol. 17, no. 6, pp. 527-536.

Crosetto, N, Bienko, M, Hibbert, RG, Perica, T et al. 2008, "Human Wrnip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 50, pp. 35173-35185.

Denning, DP, Patel, SS, Uversky, V, Fink, AL & Rexach, M 2003, "Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 5, pp. 2450-2455.

Dikic, I, Wakatsuki, S & Walters, KJ 2009, "Ubiquitin-binding domains [mdash] from structures to functions." *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 10, no. 10, pp. 659-671.

Hershko, A & Ciechanover, A. 1998. "The ubiquitin system." Annual Review of Biochemistry, vol.67, pp. 425-479.

Hicke, L, Schubert, HL & Hill, CP 2005, "Ubiquitin-binding domains." *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no. 8, pp. 610-621.

Hochstrasser, M 1995, "Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation." *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 7, no. 2, pp. 215-223.

Hoeller, D, Crosetto, N, Blagoev, B, Raiborg, C et al. 2006, "Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination." *Nature Cell Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 163-169.

Ikeda, F & Dikic, I 2008, "Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series." *EMBO Reports*, vol. 9, no. 6, pp. 536-542.

Kirisako, T, Kamei, K, Murata, S, Kato, M et al. 2006, "A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains." *The EMBO Journal*, vol. 25, no. 20, pp. 4877-4887.

Komander, D, Reyes-Turcu, F, Licchesi, JDF, Odenwaelder, P et al. 2009, "Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains." *EMBO Reports*, vol. 10, no. 5, pp. 466-473.

Kudo, N, Wolff, B, Sekimoto, T, Schreiner, EP et al. 1998, "Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1." *Experimental Cell Research*, vol. 242, no. 2, pp. 540-547.

Lim, S, Sala, C, Yoon, J, Park, S et al. 2001, "Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins." *Molecular and Cellular Neurosciences*, vol. 17, no. 2, pp. 385-397.

Paine, PL, Moore, LC & Horowitz, SB 1975, "Nuclear envelope permeability." *Nature*, vol. 254, no. 5496, pp. 109-114.

Panté, N & Kann, M 2002, "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 425-434.

Peters, R 2005, "Translocation Through the Nuclear Pore Complex: Selectivity and Speed by Reduction‐of‐Dimensionality." *Traffic*, vol. 6, no. 5, pp. 421-427.

Ribbeck, K & Görlich, D 2001, "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes." *The EMBO Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 1320-1330.

Seymour, RE, Hasham, MG, Cox, GA, Shultz, LD et al. 2007, "Spontaneous mutations in the mouse Sharpin gene result in multiorgan inflammation, immune system dysregulation and dermatitis." *Genes Immun*, vol. 8, no. 5, pp. 416-421.

Singh, BB, Patel, HH, Roepman, R, Schick, D & Ferreira, PA 1999, "The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1." *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 52, pp. 37370-37378.

Sorokin, AV, Kim, ER & Ovchinnikov, LP 2007, "Nucleocytoplasmic transport of proteins." *Biochemistry. Biokhimiĭa,* vol. 72, no. 13, pp. 1439-1457.

Strawn, LA, Shen, T, Shulga, N, Goldfarb, DS & Wente, SR 2004, "Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport." N*ature Cell Biology,* vol. 6, no. 3, pp. 197-206.

Su, V & Lau, AF 2009, "Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation." C*ellular and Molecular Life Sciences: CMLS,* vol. 66, no. 17, pp. 2819-2833.

Tatematsu, K, Yoshimoto, N, Koyanagi, T, Tokunaga, C et al. 2005, "Nuclear-cytoplasmic shuttling of a RING-IBR protein RBCK1 and its functional interaction with nuclear body proteins." T*he Journal of Biological Chemistry,* vol. 280, no. 24, pp. 22937-22944.

Tatematsu, K, Yoshimoto, N, Okajima, T, Tanizawa, K & Kuroda, S 2008, "Identification of ubiquitin ligase activity of RBCK1 and its inhibition by splice variant RBCK2 and protein kinase Cbeta." T*he Journal of Biological Chemistry,* vol. 283, no. 17, pp. 11575-11585.

Terry, LJ, Shows, EB & Wente, SR 2007, "Crossing the Nuclear Envelope: Hierarchical Regulation of Nucleocytoplasmic Transport." S*cience,* vol. 318, no. 5855, pp. 1412-1416.

Tian, Y, Zhang, Y, Zhong, B, Wang, Y et al. 2007, "RBCK1 negatively regulates tumor necrosis factor- and interleukin-1-triggered NF-kappaB activation by targeting TAB2/3 for degradation." T*he Journal of Biological Chemistry,* vol. 282, no. 23, pp. 16776-16782.

Ura, S (last) & Masayuma, N 2001, "Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation." Retrieved October 5, 2009, from http://www.pnas.org.gate2.inist.fr/content/98/18/10148.long

Wee, LJK, Tan, TW & Ranganathan, S 2006, "SVM-based prediction of caspase substrate cleavage sites." B*MC Bioinformatics,* vol. 7 Suppl 5, p. S14.

Ziff, EB 1997, “Enlightening the Postsynaptic Density.” N*euron,* vol. 19, no. 6, pp. 1163-1174.