



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Modrić

**KARAKTERIZACIJA PROTEINA DRG1 IZ
SPUŽVE *Eunapius subterraneus***

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2020. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Helene Četković i neposrednim voditeljstvom mag. ing. agr. Silvestra Beljana. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom "Geni spužvi povezani s nastankom raka – CanSponGE" (IP-2019-04-5382).

Zahvale

Najveća zahvala ide mojoj mentorici dr. sc. Heleni Četković na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici. Hvala Vam na prijateljskom pristupu, vodstvu, savjetima i vremenu uloženom u ovaj diplomski rad.

Hvala svim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković i ostalima s kojima sam se svakodnevno susretala tijekom izrade diplomskog rada. Hvala na prijateljstvu, ugodnoj radnoj atmosferi i savjetima. Posebno hvala Silvestru Beljanu, mag. ing. agr. koji je bio uz mene svaki dan i odgovarao na sva moja pitanja.

Hvala doc. dr. sc. Morani Dulić, nastavnici ovog diplomskog rada, na pomoći prilikom izrade diplomskog rada. Hvala Vam na svemu što ste me naučili proteklih godina.

Hvala mojim prijateljima i obitelji koji su bili uz mene za vrijeme studiranja i bez kojih ovo ne bih uspjela ostvariti. Hvala na potpori i pomoći ovih godina.

Sadržaj

SAŽETAK	VII
ABSTRACT	VIII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Spužve	2
2.1.1. <i>Ogulinska špiljska spužvica.....</i>	<i>3</i>
2.2. DRG1 (engl. <i>Developmentally Regulated GTP binding protein 1</i>).....	5
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	9
3.1. Materijali.....	9
3.1.1. <i>Osnovni materijali</i>	<i>9</i>
3.1.2. <i>Osnovne kemikalije</i>	<i>9</i>
3.1.3. <i>Korišteni puferi.....</i>	<i>9</i>
3.1.4. <i>Proteini, enzimi i koenzimi</i>	<i>10</i>
3.1.5. <i>Korištene boje.....</i>	<i>10</i>
3.1.6. <i>Plazmidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline.....</i>	<i>10</i>
3.1.7. <i>Hranjive podloge za uzgoj i oporavak bakterija.....</i>	<i>11</i>
3.1.8. <i>Bakterijski sojevi.....</i>	<i>11</i>
3.1.9. <i>Ostali materijali.....</i>	<i>11</i>
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Ugradnja cDNA koja kodira za spužvin protein DRG1 u ekspresijski vektor pET28b.....	12
3.2.1.1. <i>Dizajniranje početnica</i>	<i>12</i>
3.2.1.2. <i>Umnažanje kodirajućih sljedova lančanom reakcijom polimeraze.....</i>	<i>14</i>
3.2.1.3. <i>Agarozna gel elektroforeza.....</i>	<i>15</i>
3.2.1.4. <i>Pročišćavanje produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze.....</i>	<i>16</i>
3.2.1.5. <i>Sekvenciranje produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze</i>	<i>17</i>
3.2.1.6. <i>Umnažanje DRG1 fragmenta lančanom reakcijom polimeraze s početnicama koje sadrže mjesto za djelovanje restrikcijskih enzima</i>	<i>18</i>
3.2.1.7. <i>Razgradnja produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze i vektora pET28b restrikcijskim enzimima.....</i>	<i>20</i>
3.2.1.8. <i>Pročišćavanje razgrađenog produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze</i>	<i>21</i>
3.2.1.9. <i>Ligacija.....</i>	<i>22</i>
3.2.1.10. <i>Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom.....</i>	<i>23</i>
3.2.1.11. <i>Lančana reakcija polimerazom na kolonijama.....</i>	<i>23</i>

3.2.1.12. Izolacija i razgradnja rekombinantnog plazmida	25
3.2.2. Prekomjerna ekspresija proteina DRG1	26
3.2.2.1. Kemijska transformacija bakterija	26
3.2.2.2. Priprema medija i postav noćne kulture	27
3.2.2.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnim gelovima	28
3.2.2.4. Mali uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije	29
3.2.2.5. Sonikacija	31
3.2.2.9. Tehnika western blotting	31
3.2.2.6. Veliki uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije	34
3.2.2.7. Afinitetna kromatografija	34
3.2.2.8. Ukoncentriravanje proteina	36
3.2.3. Biokemijska karakterizacija proteina DRG1	36
3.2.3.1. GTPazna aktivnost proteina DRG1	36
3.2.3.2. Gel-filtracija proteina DRG1	38
3.2.4. Bioinformatičke metode	40
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	41
4.1. Ugradnja cDNA koja kodira spužvin protein DRG1 u ekspresijski vektor pET28b	41
4.1.1. Umnažanje sljedova lančanom reakcijom polimeraze	41
4.1.2. Umnažanje DRG1 fragmenta lančanom reakcijom polimeraze s početnicama koje sadrže mjesto za djelovanje restrikcijskih enzima	42
4.1.3. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama nakon elektroporacije	43
4.1.4. Razgradnja rekombinantnog plazmida restrikcijskim enzimima	45
4.1.5. Sekvenciranje i analiza rekombinantnog plazmida	46
4.2. Prekomjerna ekspresija spužvinog proteina DRG1	51
4.2.1. Kemijska transformacija i analiza transformiranih bakterija lančanom reakcijom polimeraze na kolonijama	51
4.2.2. Mali uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije	52
4.2.3. Western blotting tehnika	54
4.2.4. Veliki uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije	55
4.2.5. Ukoncentriravanje proteina i promjena pufera	57
4.3. Biokemijska karakterizacija proteina DRG1	59
4.3.1. GTPazna aktivnost proteina DRG1	59
4.3.2. Gel-filtracija proteina DRG1	64
§ 5. ZAKLJUČAK	68
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	69
§ 7. LITERATURNI IZVORI	71

§ 8. ŽIVOTOPIS IX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA PROTEINA DRG1 IZ SPUŽVE *Eunapius subterraneus*

Matea Modrić

Spužve, morfološki jednostavne životinje bez tkiva i organa koje se nalaze na samoj bazi filogenetskog stabla Metazoa, predstavljaju dobar model za objašnjenje evolucijskih obrazaca razvoja životinja. Važne su za proučavanje karakteristika homologa kod pretka svih Metazoa prije odvajanja i specijalizacije ovih gena u razvijenijim životinjama i za razumijevanje osnovne fiziološke funkcije gena povezanih s nastankom raka kod jednostavnijih životinja. U okviru diplomskog rada okarakteriziran je protein iz slatkovodne špiljske spužve *Eunapius subterraneus* čiji je homolog kod čovjeka DRG1 (engl. *Developmentally Regulated GTP binding protein 1*) povezan s nastankom raka. Cilj je dobiti što bolji uvid u evoluciju ovog supresora metastaziranja. cDNA koja kodira za protein DRG1 uspješno je uklonirana u ekspresijski vektor pET28b te je napravljena prekomjerna ekspresija koja je potvrđena *western blotting* tehnikom. Protein DRG1 ima GTPaznu aktivnost koja je testirana mjerenjem količine neiskorištenog GTP-a nakon reakcije hidrolize. Osim toga, protein je podvrgnut metodi gel-filtracije kako bi se procijenila njegova molekularna masa.

(75 stranica, 33 slike, 20 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: DRG1, gel-filtracija, GTPazna aktivnost, spužve

Mentor: dr. sc. Helena Četković, zn. savj., IRB

Neposredni voditelj: Silvestar Beljan, mag. ing. agr.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić

2. prof. dr. sc. Nives Galić

3. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Datum diplomskog ispita: 28. listopada 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Characterization of sponge *Eunapius subterraneus* DRG1 protein

Matea Modrić

Sponges, morphologically simple animals without tissues and organs and possibly the earliest branching animal phylum, represent a good model for explaining the evolutionary patterns of animal development. They are important for studying homologous characteristics in the ancestor of all Metazoa prior to separation and specialization of these genes in more complex animals and for understanding the basic physiological function of cancer-related genes in simpler animals. The thesis characterizes the protein from the freshwater cave sponge *Eunapius subterraneus*, whose homologue in humans DRG1 (*Developmentally Regulated GTP binding protein 1*) is associated with cancer. The goal is to gain a better insight into the evolution of this metastatic suppressor. The cDNA encoding the DRG1 protein was successfully cloned into the pET28b expression vector and overexpression was performed. The DRG1 protein has GTPase activity that was tested by measuring the amount of unused GTP after the hydrolysis reaction. In addition, the protein was subjected to a gel filtration method to estimate its molecular weight.

(75 pages, 33 figures, 20 tables, 55 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: DRG1, gel filtration, GTPase activity, sponges

Mentor: Dr. Helena Četković, Research Associate

Assistant mentor: Silvestar Beljan, mag. ing. agr.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

2. Dr. Nives Galić, Professor

3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Date of exam: 28 October 2020

§ 1. UVOD

Većina gena povezanih s ljudskim bolestima, osobito rakom, razvila se za vrijeme dvije glavne evolucijske tranzicije – pojave jednostaničnih organizama i prijelaza u višestanične organizme. Stoga se proučavanje ljudskih bolesti oslanja i na analizu gena i proteina koji uzrokuju određenu bolest pomoću organizama koji pripadaju evolucijskoj razini na kojoj su ti geni nastali. Spužve se smatraju najjednostavnijim višestaničnim životinjama koje su se vjerojatno prve odvojile od razvojnog stabla životinja te se nisu puno mijenjale u posljednjih 800 milijuna godina.¹ Usprkos jednostavnoj morfologiji, posjeduju kompleksan genom u kojem je većina gena uključena u sofisticirane procese i signalne puteve povezane s višim životinjama, stoga su spužve idealan modelni organizam za takva istraživanja.¹ Protein DRG1 (engl. *Developmentally Regulated GTP binding protein 1*) povezan je s nastankom raka. Otkrivena je njegova uloga supresora metastaziranja koji regulira ekspresiju gena odgovornih za angiogenezu. Točan mehanizam regulacije još nije poznat, no povezuje ga se s poznatim tumor supresorima PTEN (engl. *Phosphatase and TENsin homolog*) i p53 (engl. *Cellular tumor antigen p53*). Osim toga, protein DRG1 sudjeluje u polimerizaciji mikrotubula, dinamici diobenog vretena te posjeduje svojstvenu GTPaznu aktivnost.

Cilj istraživanja diplomskog rada bio je okarakterizirati protein DRG1 iz slatkovodne špiljske spužve *Eunapius subterraneus* u svrhu boljeg razumijevanja osnovne fiziološke funkcije ovog proteina povezanog s nastankom raka prije njegove diversifikacije i specijalizacije. Pritom su korištene brojne metode poput lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR), određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA, kloniranje cDNA koja kodira za protein DRG1 u ekspresijski sustav bakterije *Escherichia coli* pomoću specifično dizajniranih početnica, njegovu prekomjernu ekspresiju, pročišćavanje rekombinantnog proteina te njegovu biokemijsku karakterizaciju koja obuhvaća test GTPazne aktivnosti i gel-filtraciju.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Spužve

Spužve, lat. *Porifera*, čine zasebno koljeno unutar carstva životinja te su jedne od najjednostavnijih višestaničnih životinja (*Metazoa*). Većina opisanih vrsta spužvi nastanjuje morska dna, a manji broj vrsta živi u slatkim vodama. Spužve ne posjeduju prava tkiva i organe već imaju nakupine specijaliziranih stanica. Morfološki izgled im je najčešće asimetričan, a mogu biti različitih oblika, veličina i boja. Na površini tijela imaju brojne pore po kojima su dobile naziv "nosači pora" ili lat. *Porifera*.² Za ove višestanične životinje karakterističan je sjedilački način života. Hrane se filtriranjem hranjivih tvari iz vode pomoću bičastih stanica hoanocita kojima stvaraju strujanje vode. Voda ulazi u tijelo spužve preko sitnih pora te putuje kanalicima kroz spužvu i izlazi iz tijela spužve kroz veliki otvor na vrhu spužve (oskulum). Tijelo spužve sastoji se od vanjskih epitelnih stanica (pinakoderma) i unutrašnjih bičastih epitelnih stanica (koanoderma). Između ova dva tanka sloja stanica nalazi se mezohil koji sadrži pokretne stanice i materijal za skelet.³

Unatoč jednostavnoj morfologiji, genomi spužvi su složeni, a brojni spužvini geni pokazuju veliku sličnost s homolozima kralježnjaka te sadrže većinu gena čiji su ljudski homolozi povezani s nastankom raka. Istraživanje gena povezanih s nastankom ljudskih bolesti na jednostavnim životinjama bez tkiva i organa, poput spužvi, može pomoći u razumijevanju složenijih signalnih puteva njihovih homologa kod viših životinja.¹ Zbog važnog evolucijskog položaja spužvi na samoj bazi filogenetskog stabla životinja svako novo saznanje o funkciji njihovih homologa povezanih s nastankom raka može poboljšati razumijevanje ove bolesti kod ljudi. Stoga spužve predstavljaju važan model, ne samo za proučavanje karakteristika homologa kod pretka svih *Metazoa* prije odvajanja i specijalizacije ovih gena u razvijenijim životinjama, već i za razumijevanje osnovne fiziološke funkcije gena povezanih s nastankom raka kod jednostavnijih životinja.¹

2.1.1. Ogulinska špiljska spužvica

Ogulinska špiljska spužvica, lat. *Eunapius subterraneus*, jedinstvena je podzemna slatkovodna spužva koja živi samo u Hrvatskoj. Nastanjena je isključivo u podzemnim vodenim staništima špilja, a njen boravak potvrđen je na šest lokaliteta od kojih je pet u okolici grada Ogulina, te jedan u Lici. Raste na stijenama gdje je strujanje vode minimalno, na području plitkog krša. Sve pronađene populacije ove spužvice žive pri temperaturama od 7,2 °C do 11 °C. Spužvica je pronađena u dva morfološka oblika, jajolikom ili valjkastom do široko koničnom ili krpastom. Bijele je boje, vrlo rahle i mekane strukture. Poznate su dvije podvrste špiljske spužvice, tipska ogulinska špiljska spužvica (lat. *E.s. subterraneus*) i rudnička špiljska spužvica (lat. *E.s. mollisparpanis*).⁴ Vrste pronađene u špiljama: Tounjčica špilja, Mikašinovića špilja, Špilja u kamenolomu Tounj, Rudnica Špilja VI, Mandelaja i Crnačka Špilja su od jajolikog do cilindričnog oblika, veličine 1-8 cm i nepravilne naborane površine (slika 1).⁵



Slika 1. Ogulinska špiljska spužvica, morfološki tip: nepravilne naborane površine, jajolikog do cilindričnog oblika⁵

Vrste pronađene u Špiljskom sustavu Đulin ponor-Medvedica i na Izvor špilji Gojak imaju široku bazu i stožasti oblik s oskulumom na vrhu te glatku površinu (slika 2). Iako su različitog morfološkog oblika, navedene vrste pripadaju istoj podvrsti špiljske spužvice, lat. *E.s. subterraneus*. Čimbenici poput okoliša i faza životnog ciklusa utječu na razvoj i oblik spužvice. Rasplodna tijela (gemule) svih vrsta su žuto-smeđe i sfernog ili polusfernog oblika, a smještene su na dno spužvice.⁵ Nedostaju im mikrosklere, a megasklere su blago zakrivljene i prekrivene bodljikama.⁶ Iako većina morfoloških karakteristika ovu vrstu svrstava u rod *Eunapius*, postoji razlika u strukturi gemula i gemulosklera, te u prisutnosti i obliku mikrosklera, a to su najvažnija obilježja za klasifikaciju slatkovodnih spužvi.⁶ Taksonomski položaj *E. subterraneus* pokušali su razriješiti pomoću molekularnih markera: 18S rDNA, ITS2 (engl. *Internal transcribed spacer 2*) i COI (citokrom-oksidaza I). Rezultati filogenetske analize smještaju *E. subterraneus* izvan roda *Eunapius* i pokazuju visoku razinu odstupanja između klasifikacije slatkovodne spužve na temelju morfologije i molekularnih podataka. To ukazuje na to da *E. subterraneus* vjerojatno dijeli novijeg zajedničkog pretka s drugim rodovima slatkovodnih spužvi. Daljnje analize s većim setovima podataka o sekvenci i pokrivenosti vrsta trebale bi biti izvedene kako bi se dobili što točniji rezultati o filogeniji slatkovodnih spužvi.⁶



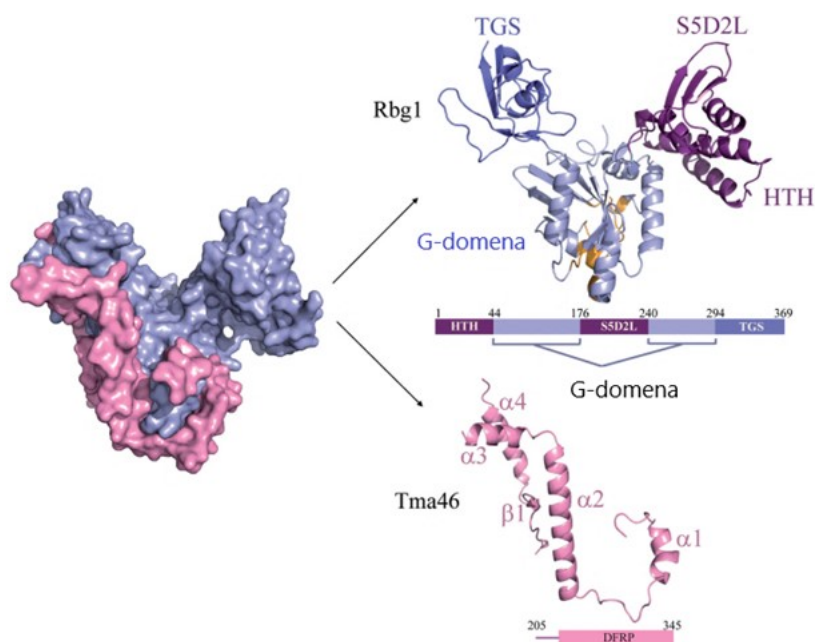
Slika 2. Ogulinska špiljska spužvica, morfološki tip: glatke površine, stožastog oblika sa širokom bazom⁵

Nedostatak pigmenta, usporen metabolizam, promijenjen način razmnožavanja te fiziologija stanica i cijelog organizma najvjerojatnije su posebnosti ovog organizma u odnosu na nadzemnog srodnika.⁷ Ogulinska špiljska spužvica smještena je u kategoriju ugroženih vrsta prema IUCN-u (engl. *The International Union for Conservation of Nature*) jer postoji rizik da

će izumrijeti te je zbog toga potrebno zaštititi ogulinsko podzemlje i jedinstvenu podzemnu faunu.

2.2. DRG1 (engl. *Developmentally Regulated GTP binding protein 1*)

Proteini DRG (engl. *Developmentally Regulated GTP-binding protein*) visoko su očuvani u arhejama, gljivama, biljkama i životinjama. Arheje sadrže samo jedan gen *drg*, dok eukariotski genomi kodiraju za proteine DRG1 i DRG2.⁸ Proteini DRG iz gotovo svih organizama sadrže 365–370 aminokiselina s nekoliko domena (slika 3): N-terminalna domena HTH (engl. *helix-turn-helix*), kanonska GTP-vezujuća domena, insercijska domena S5D2L i mala C-terminalna domena TGS (skraćenica potiče od engl. *ThrRS*, *GTPase*, *SpoT*; TGS domene nalaze se u mnogim drugim GTPazama zajedno s treonil-tRNA sintetazama (*ThrRS*) i gvanozin-polifosfat-fosfohidrolazama/sintetazama (*SpoT/RelA*)). Kanonska GTP-vezujuća domena građena je poput klasičnih GTPaza s pet G regija i dvije *switch* regije.⁹



Slika 3. Struktura kvašćevog proteina DRG (Rbg1, engl. *Ribosome-interacting GTPase 1*; označeno ljubičastom bojom) u kompleksu sa C-terminalnom domenom njegova partnera DRFP (Tma46, engl. *Translation machinery-associated protein 46*; označeno ružičastom bojom)⁸. Protein DRG sadrži N-terminalnu domenu HTH, kanonsku GTP-vezujuću domenu, insercijsku domenu S5D2L i malu C-terminalnu domenu TGS (*ThrRS*, *GTPase*, *SpoT*). Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 8.

Visoka očuvanost proteina DRG u gotovo svim eukariotima ukazuje na njegovu važnu ulogu. Iako proteini DRG1 i DRG2 posjeduju slično organizirane domene, imaju različite funkcije.¹⁰ Ovi proteini usko su povezani s proteinima DFRP (engl. *DRG Family Regulatory Proteins*). DFRP1 asocira specifično s DRG1, dok se DFRP2 preferencijalno veže s DRG2.⁸ Kompleksi DRG-DFRP smješteni su u citoplazmi stanica sisavaca gdje heterodimer DRG1-DFRP1 sudjeluje u ribosomskoj podjedinici za vrijeme sinteze proteina, dok DRG2 i DFRP2 nisu pronađeni u frakcijama ribosoma.^{8,10} Proteini DFRP stabiliziraju proteine DRG i sprječavaju njihovu ubikvitinaciju i degradaciju u proteasomima.¹¹ Filogenetska i biokemijska istraživanja ukazuju na povezanost proteina DRG s translacijom, diferencijacijom i proliferacijom.⁸

Proteini DRG pripadaju OBG (engl. *spoOB-associated GTP-binding protein*) obitelji GTPaza. GTPaze hidroliziraju GTP do GDP-a, odnosno, imaju intrinzičnu GTPaznu aktivnost. Sudjeluju u brojnim staničnim procesima poput stanične signalizacije, proliferacije, diferencijacije, te u sintezi proteina, transportu proteina između citoplazme i jezgre, organizaciji i dinamici aktina, stvaranju obloženih vezikula i fuziji s ciljnim membranama.^{10,11} GTPazni proteini postoje u dvije forme, aktivnoj i neaktivnoj. Kada je na protein vezan GTP, tada je u aktivnoj formi te ostvaruje interakciju s ciljnim proteinima i regulira njihovu aktivnost, a kada je na protein vezan GDP, tada je u neaktivnoj formi. Konformacija proteina mijenja se prilikom izmjene ta dva oblika odnosno izmjenom GTP-a i GDP-a.¹² Aktivnost enzima ovisi o brzini intrinzične GTPazne aktivnosti, stoga GTPazna aktivnost djeluje kao okidač za kontrolu ovih proteina. GTPaze su inače neefikasni enzimi, stoga većina tih proteina asocira sa specifičnim regulatornim faktorima – GEF (engl. *GDP – GTP exchange factors*) i GAP (engl. *GTP – hydrolysis activating proteins*). Faktori koji reguliraju pretvorbu neaktivnih GTPaza u aktivne su GEF faktori, a za zaustavljanje aktivnosti zaslužni su GAP proteini.⁹ GTPaze se dijele u dva razreda. Najbolje opisan razred nazvan je TRAFAC (engl. *TRAnslation FACtors*) jer sadrži GTPaze koje su uključene u translaciju, no osim translacijskih faktora sadrži i trimerne GTPaze koje sudjeluju u signalnoj transdukciji. TRAFAC razred GTPaza podijeljen je u nekoliko superobitelji, a to su klasični translacijski faktori, Bms1-like, HflX i OBG obitelj kojoj pripada DRG.⁸ DRG1 ima svojstvenu GTPaznu aktivnost, no ne treba pomoć GEF ili GAP faktora kao što je uobičajeno za većinu GTPaza.¹¹ GTPaznu aktivnost DRG1 stimuliraju kalijevi ioni i DFRP1, no nije jasno funkcionira li DFRP1 kao GAP protein.

Osim toga, protein DRG1 je polimeraza mikrotubula, stabilizira mikrotubule, pomaže u stvaranju snopova mikrotubula i sudjeluje u dinamici diobenog vretena u ljudskim stanicama. GTPazna aktivnost proteina DRG1 nije nužna za obavljanje funkcija vezanih uz mikrotubule, no potrebne su sve domene DRG1 kako bi bila moguća stabilizacija i polimerizacija mikrotubula. Smanjena ekspresija proteina DRG1 u stanicama usporava progresiju iz profaze u anafazu jer je formacija diobenog vretena usporena.¹¹ Praćenjem kinetike ljudskog proteina DRG1 ustanovljeno je da je reakcija katalize spora reakcija, no ipak je brža od drugih GTPaza koje pripadaju OBG obitelji. Enzim je stabilan u širokom rasponu pH, a optimalan pH je između 8 i 9, dok je optimalna temperatura za katalizu relativno visoka i iznosi 42 °C.⁹

Protein DRG1 supresor je metastaziranja koji regulira ekspresiju gena odgovornih za angiogenezu.¹³ Supresori metastaziranja uključeni su u regulaciju jednog ili nekoliko koraka metastatske kaskade, a njihova ekspresija u primarnom tumoru obično je manja nego u odgovarajućim metastazama. Ključno obilježje gena koji suzbija metastaze je da njegova ekspresija inhibira metastaziranje, ali ne utječe na primarni rast tumora. Zanimljivo je da je protein DRG1 prvi put identificiran kao supresor tumora u karcinomu mokraćnog mjehura i gušterače, dok je daljnjim istraživanjima karcinoma dojke, prostate i debelog crijeva otkrivena njegova aktivnost supresora metastaziranja.¹⁴ Istraživanjem raka prostate i njegovih metastaza otkriveno je da DRG1 u potpunosti inhibira kolonizaciju visoko metastatskih stanica karcinoma u plućima bez utjecaja na rast primarnih tumora.¹⁵ Gen *drg1* suzbija metastaziranje tumora na životinjskim modelima raka prostate i debelog crijeva, a ekspresija ovog gena značajno se smanjuje s napredovanjem karcinoma prostate i dojke u kliničkim uvjetima.¹⁶ Zabilježena je inverzna korelacija između ekspresije proteina DRG1 i metastatskog potencijala stanica karcinoma,¹⁷ te se čini da DRG1 ima različite regulatorne učinke u različitim karcinomima.¹⁸ Molekularni mehanizam suzbijanja metastaza pomoću DRG1 potrebno je još istražiti, no smatra se da je DRG1 dio regulacijskog puta koji uključuje PTEN i p53 koji su poznati kao negativni regulatori angiogeneze.¹⁵

Nekontrolirana ekspresija proteina DRG1 može potaknuti staničnu transformaciju ili zastoj staničnog ciklusa,¹⁹ te uzrokovati pogrešnu segregaciju kromosoma²⁰ zbog čega je otkrivanje gena odgovornih za suzbijanje metastaziranja značajno.²¹ Takva otkrića doprinose razumijevanju mehanizama metastaziranja i daju prognostičke markere i terapijske ciljeve u kliničkom liječenju raka. Stoga, razjašnjenje fizioloških funkcija proteina DRG1 i

identifikacija njihovih regulatornih molekula može dovesti do otkrića novog staničnog mehanizma na kojem se temelji stanični rast.¹⁴

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovni materijali

Ogulinska špiljska spužvica (lat. *Eunapius subterraneus*) prikupljena na lokalitetu špilje Tounjčica

3.1.2. Osnovne kemikalije

Korištene kemikalije: agar (Difco), agaroza (Sigma), Akrilamid/bisakrilamid (19:1; 40 % (m/V); Sigma), amonijev persulfat (APS; Serva), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma), etanol (Kemika), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG; Thermo Scientific), kanamicin (Sigma), *N,N'*-metilbisakrilamid (Merck), β -merkptoetanol (β -ME; BIO RAD), methanol (Kemika), natrijev dodecilsulfat (SDS; Sigma), *N,N,N',N'*-tetraetilendiamin (TEMED; Sigma), glicerol (Merck)

3.1.3. Korišteni puferi

- Q5 pufer za PCR–reakciju (NEB)
- TAE (40 mmol/L Tris pH 8,3, 20 mmol/L CH₃COOH, 1 mmol/L EDTA pH 8, 0,2 μ g/mL etidij bromid)
- 10x FastDigest pufer (bezbojni i zeleni, Thermo Scientific)
- TBST (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % polisorbitat 20)
- pufer za proteine (25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 50 mmol/L NaCl, 10 % glicerol, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA)
- pufer za elektrotransfer (3,03 g Tris, 14,4 g glicin, 200 mmol/L metanol)
- 10x pufer za elektroforezu na SDS-poliakrilamidnom gelu (30 g/L Tris, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS; prije upotrebe pufer je potrebno razrijediti 10 puta)

- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina, 10 mmol/L (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazol)
- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina, 20 mmol/L (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazol)
- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina, 40 mmol/L (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 40 mmol/L imidazol)
- pufer za eluciju specifično vezanih proteina, 200 mmol/L (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L imidazol)
- pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel 4x (0,6 mL (1 mol/L) Tris-HCl pH 6,8, 1 mL glicerol, 5 mg bromfenol plavo, 2 mL 10% SDS, 6,4 mL ReH₂O; na 1 mL pufera doda se 50 µL β-merkaptoetanol (14,2 mol/L))
- pufer za nanošenje uzoraka na agarozni gel 5x (2,5 mL (1 mol/L) Tris pH 6,8; 4,0 mL 100% glicerol; 2,0 mL β-merkaptoetanol; 0,005 g bromfenol plavo)
- *electroligase reaction buffer* (NEB)
- pufer za odbojavanje poliakrilamidnog gela (250 mL metanol, 70 mL 100% octena kiselina, 680 mL ReH₂O)

3.1.4. Proteini, enzimi i koenzimi

Q5 DNA-polimeraza (NEB), *FastDigest BamHI* (Thermo Scientific), *FastDigest NdeI* (Thermo Scientific), *Ex Taq* premix (TaKaRa), proteinski biljeg *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards* (BIO RAD), *ElectroLigase* (NEB)

3.1.5. Korištene boje

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), etidijev bromid (Roche)

3.1.6. Plazmidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline

- Vektor pET28b (dio ekspresijskog sustava vektora pET; Novagen)
- dNTP Mixture (TaKaRa)

- *GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, *MassRuler™ DNA Ladder Mix* (Termo Fischer Scientific)
- Početnice za umnažanje cDNA lančanom reakcijom polimeraze:
5' ATGCCTACGATACTTGAAAAG 3'
5' CAATTAGATTTTCTTAACGAGTTGAACGAC 3'
- Početnice s mjestima za djelovanje restriksijskih enzima *NdeI* i *BamHI*:
5' GTCTAGCATATGCCTACGATACTTGAAAAG 3'
5' CTAGACGGATCCTTAGATTTTCTTAACGAGTTG 3'

3.1.7. Hranjive podloge za uzgoj i oporavak bakterija

- LB tekući medij (5 g/L kvašev ekstrakt, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl)
- LB kruta podloga (12 g/L agara, 5 g/L kvašev ekstrakt, 10 g/L tripton, 5 g/L NaCl)
- TB tekući medij (24 g/L kvašev ekstrakt, 20 g/L tripton, 4 mL glicerol)
- SOC medij (2 % tripton, 0,5 % kvašev ekstrakt, 10 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L glukoza)

3.1.8. Bakterijski sojevi

One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli elektrokompetentne stanice (Termo Fischer Scientific), *Rosetta-gami™ 2(DE3) pLysS Competent Cells* s CaCl₂ za kemijsku transformaciju

3.1.9. Ostali materijali

- T100™ Termal Cyler (BIO RAD)
- za izolaciju plazmidne DNA: *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN)
- za pročišćavanje DNA fragmenta iz agaroznog gela: *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN)
- za pročišćavanje i koncentriranje proteina: *Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices* (Milipore)

- za sekvenciranje DNA: *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit*
- za *western blotting* tehniku: nitrocelulozna membrana (GE Healthcare), Blotting-Grade Blocker (BIO RAD), *Amersham ECL Select Western Blot Detection Reagents* (GE Healthcare)
- za GTPaznu analizu: *Promega GTPase-Glo Assay* (Termo Fischer Scientific), *Nunc™ MicroWell™ 96-Well* (Termo Fisher), Spektrofluorimetar za mikroploče Tecan M200
- za gel-filtraciju: *Superdex™ 200 Increase 10/300 GL* kolona, *Gel Filtration Standard* (BIO RAD)

3.2. Metode

3.2.1. Ugradnja cDNA koja kodira za spužvin protein DRG1 u ekspresijski vektor pET28b

3.2.1.1. Dizajniranje početnica

Početnice korištene za umnažanje i kloniranje gena *drg1* dizajnirane su na temelju djelomično sekvenciranog genoma i transkriptoma spužve *Eunapius subterraneus* kao rezultat zajedničkog projekta bioinformatičke grupe prof. dr. sc. Kristiana Vlahovičeka (PMF Zagreb) i članova Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković. U laboratoriju je prethodno izolirana RNA uz pomoć komercijalno dostupnog paketa *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) i sintetizirana je dvolančana cDNA pomoću komercijalno dostupnog paketa *SuperScript IV VILO Master Mix* (Invitrogen). Sintetizirana cDNA spužve *Eunapius subterraneus* korištena je kao kalup za umnožavanje i kloniranje cDNA koja kodira za protein DRG1. U svrhu umnažanja cDNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) dizajnirane su početnice na temelju dobivene sekvence transkriptoma. Umnoženi fragment DRG1 sekvenciran je i nakon što je potvrđena ispravnost sekvence, ugrađen je u vektor pET28b pomoću početnica s mjestima za djelovanje restrikcijskih enzima *NdeI* i *BamHI*. Specifično dizajnirane početnice s mjestima za djelovanje restrikcijskih enzima omogućuju uvođenje restrikcijskih mjesta na krajeve PCR produkta.

Nukleotidna sekvenca proteina DRG1 prevedena je u proteinsku sekvencu pomoću ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<https://www.expasy.org/>) i opcije *Translate*. Proteinska sekvenca proteina DRG1 započinje aminokiselinom metioninom čiji je kodon AUG, a završava stop kodonom UAA. cDNA koja kodira za protein DRG1 ima 1101 parova baza (protein DRG1 sastoji od 366 aminokiselina). Na slici 4. prikazana je nukleotidna i proteinska sekvenca sa sivo označenim početnim i krajnjim kodom te podvučenom regijom koja se koristila za dizajn početnica.

```

atgcctacgatacttgaaaagatagcggaaatcgagaccgagatggcccggactcaacga
M P T I L E K I A E I E T E M A R T Q R
aacaaggcaacggcctatcaccttgggtgtcttaaaaggcacgttagcaaaactgagacgt
N K A T A Y H L G V L K A R L A K L R R
gagctcat tacgccaaagggtggaggggtacaggagaaggctttgacgt agcta aaact
E L I T P K G G G G T G E G F D V A K T
ggagatgcaagaataggctttgtgggtttccgtcagtaggtaagtcaaccttactgaca
G D A R I G F V G F P S V G K S T L L T
aacgtcgcctggagctctatcttgaggttgcgagatgacttca ccaactctcagcactgtg
N V A G V Y S E V A E Y D F T T L T V
cctgggttatccggttacaagggcgcaaaaatacaactccttgacctcccaggcaccatt
P G V I R Y K G A K I Q L L D L P G I I
gaaggtgcaaaagatggcaaaaggctcagggcgtcaggtgtagcagtggttagaacctgt
E G A K D G K G R G R Q V I A V A R T C
ggccttattcattatattgga cgtgctaaaa cctttggagcacaagcaccatcattgag
G L I F I I L D V L K P L E H K H I I E
agagaaactggaaggctttggaat acgcctcaacaaaggccaccaaacatagtttcaag
R E L E G F G I R L N K R P P N I V F K
aagaaaagagaaggaggaaatcaaacctcaactgtacgggtgcaacagtcaaatctcgatctg
K K E K G G I N L T C T V Q Q S N L D L
gagctctgttcgcagcattcttgcagaat acagaatgca caatgctgatgtgacctgcca
E S V R S I L A E Y R M H N A D V T L R
tgtgatgcgaccgttgatgacct aattgatggtat tgaggggaatagagtttatgtacca
C D A T V D D L I D V I E G N R V Y V P
gctatttacgtgctgaataagatcgatcaaaatactgttgaggagttggatatcgtat ac
A I Y V L N K I D Q I S V E E L D I V Y
aagatcccacatgcagtgccaatttcagctcatcataa atggaat tttgatgatctat tg
K I P H A V P I S A H H K W N F D D L L
gagaagatgtggcagtat ttgaaacttaataagaatatacacc aaccaaaggacagctg
E K M W Q Y L N L I R I Y T K P K G Q L
cctgactactccacacctggtgtactggaccagaa caagagctctggtgagaacctatgc
P D Y S T P V V L D Q N K S S V E D L C
aataacatccacaaaagtattctcaagaattcaaacatgcactagtggtgggtcttca
N N I H K S I L K E F K H A L V W G S S
gtgaagcacaatccacagaaaagtggaaggaaatgtat tgtgtgatgaagatgctggtt
V K H N P Q K V G K E H V L C D E D V V
caactcgttaagaaaatcctaattg
Q L V K K I -

```

Slika 4. Nukleotidna i proteinska sekvenca proteina DRG1 dobivena pomoću ExPASy web poslužitelja. Start i stop kodon označeni su sivom bojom, a podvučene regije korištene su za dizajn početnica.

Početnice za umnažanje cDNA lančanom reakcijom polimeraze:

- 5' ATGCCTACGATACTTGAAAAG 3'
- 5' CAATTAGATTTTCTTAACGAGTTGAACGAC 3'

Početnice s mjestima za djelovanje restrikcijskih enzima *NdeI* i *BamHI* za ugradnju u ekspresijski vektor pET28b:

- 5' GTCTAGCATATGCCTACGATACTTGAAAAG 3'
- 5' CTAGACGGATCCTTAGATTTTCTTAACGAGTTG 3'

3.2.1.2. Umnažanje kodirajućih sljedova lančanom reakcijom polimeraze

cDNA koja kodira homolog DRG1 iz spužve umnožena je lančanom reakcijom polimeraze u svrhu kloniranja gena. PCR je jednostavna metoda kojom se uz korištenje kalupa, para početnica, dNTP-ova (deoksiribonukleozid-trifosfata) i DNA-polimeraze *in vitro* umnaža specifičan odsječak DNA. Postupak umnažanja temelji se na tri koraka koja se ponavljaju, a to su: toplinska denaturacija DNA, sljepljivanje početnica na komplementarne dijelove DNA i sinteza komplementarnih lanaca pomoću DNA-polimeraze. Početnice su oligonukleotidi duljine najčešće između 17 i 30 nukleotida, a mogu biti i dulje. Nastaju dvije nove dvolančane DNA molekule koje se denaturiraju i na koje se vežu početnice nakon čega slijedi sinteza komplementarnih lanaca DNA. Treći ciklus stvara dvije dvolančane DNA molekule koje sadrže upravo ciljno područje. Ponavljanjem tih koraka dolazi do eksponencijalnog stvaranja željenog fragmenta.²² PCR zahtijeva termostabilnu DNA-polimerazu jer bi se u suprotnom enzim denaturirao nakon svakog pojedinačnog ciklusa. DNA-polimeraza prvenstveno katalizira reakciju prijenosa fosforilne grupe u 5'→3' smjeru, za što su potrebni kalup, početnice i dNTP-ovi.²³

Za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina DRG1 korištena je *Premix Ex Taq* (TaKaRa) odnosno smjesa koja sadržava *Ex Taq* polimerazu, reakcijski pufer *Ex Taq* i dNTP-ove. Dizajnirana je za brzu i jednostavnu pripremu reakcijske smjese za PCR.²⁴ Osim toga, potrebne su uzvodna (engl. *forward*) početnica 5' ATGCCTACGATACTTGAAAAG 3' i nizvodna (engl. *reverse*) početnica 5' CAATTAGATTTTCTTAACGAGTTGAACGAC 3'. Korištena je negativna kontrola koja sadrži sve komponente reakcijske smjese u navedenim

količinama osim kalupa, a pozitivna kontrola sadrži početnice za citokrom-oksidadzu. Reakcijska smjesa pripremi se prema podacima u tablici 1.

Tablica 1. Priprema reakcijske smjese za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina DRG1 lančanom reakcijom polimeraze

Komponentne reakcije	Volumen / μL	Konačna koncentracija
Kalup (cDNA)	0,5	< 100 ng
<i>Premix Ex Taq</i> (2X)	5	1X
Uzvodna početnica (10 $\mu\text{mol/L}$)	0,3	0,3 $\mu\text{mol/L}$
Nizvodna početnica (10 $\mu\text{mol/L}$)	0,3	0,3 $\mu\text{mol/L}$
Voda bez nukleaza (engl. <i>nuclease free water</i> ; NFW)	4	-

Pripremljena reakcijska smjesa konačnog volumena 10 μL stavi se u PCR uređaj (BIO RAD) kojem su postavljeni odgovarajući uvjeti (tablica 2).

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina DRG1

Korak	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	1 min	1
Denaturacija	94	30 s	30
Sparivanje početnica	60	45 s	30
Produljenje	72	1 min	30
Završno produljenje	72	5 min	1

3.2.1.3. Agarozna gel elektroforeza

Agaroznom gel elektroforezom određuje se veličina DNA fragmenata uspoređivanjem fragmenta nepoznate veličine s poznatim standardom veličine.²⁵ DNA migrira kroz visoko umreženi agarozni matriks pod utjecajem električne struje i to tako da manji fragmenti migriraju brže nego veći fragmenti DNA. Molekula DNA negativno je nabijena zbog mnoštva fosfatnih grupa te migrira prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Na brzinu migracije kroz gel utječe veličina DNA, konformacija DNA i ionska snaga pufera.²⁶ Najčešće se koristi 1 %

(m/V) agarozni gel, a za postizanje bolje rezolucije potrebna je veća koncentracija agaroze.²⁷ Fragmenti nukleinskih kiselina detektiraju se interkalirajućom bojom, etidijevim bromidom, nakon čega slijedi vizualizacija pod ultraljubičastim svjetlom.²⁸

Za pripremu 1 % agaroznog gela potrebno je izvagati 0,5 g agaroze i otopiti u 50 mL pufera TAE (1x) koji sadrži etidijev bromid. Tikvica s otopinom pufera i agarozom stavi se u mikrovalnu pećnicu i zagrijava dok se sva agarozna ne otopi (otprilike 1:30 min). Kad se otopi sva agarozna, smjesa se malo ohladi i izlije u kadicu za izradu agaroznih gelova. Nakon izlijevanja gela u kadicu stavi se češljčić kako bi se formirale jažice/bunarići.

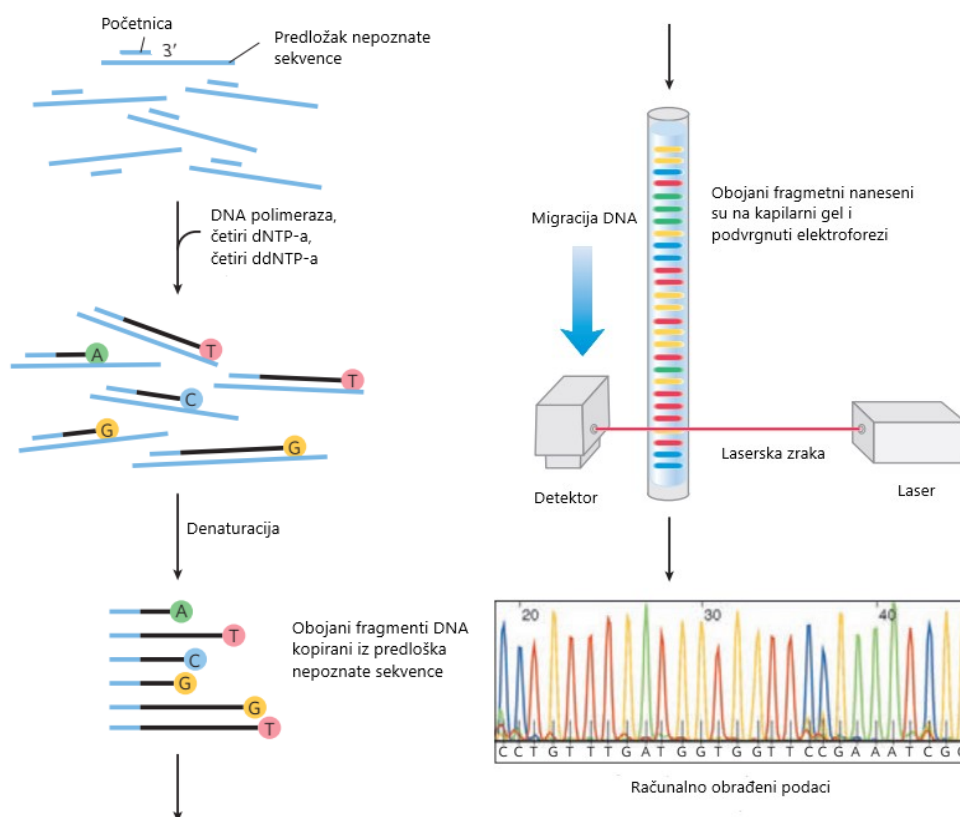
Svakom uzorku doda se pufer za nanošenje uzoraka (5x) te se uzorci i marker *MassRuler™ DNA Ladder Mix* (7,5 µL) nanese na gel. Elektroforeza se provodi pri 50 V.

3.2.1.4. Pročišćavanje produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze

Za pročišćavanje produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze iz agaroznog gela koristi se komercijalni komplet *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Ovom metodom može se pročistiti do 10 µg DNA (70 pb-10 kb). DNA fragment izreže se iz agaroznog gela pomoću oštrog, čistog skalpela. Izrezani fragment gela izvaže se u prozirnoj tubici od 2 mL. Doda se 3 puta veći volumen BQ pufera na 1 volumen gela (100 mg ~ 100 µl). Za > 2% agarozne gelove doda se 6 volumena pufera BQ. Uzorci se inkubiraju na 50 °C 10 min ili dok se sav gel ne otopi. Nakon što se gel otopio provjeri se je li boja otopine žuta (slična BQ puferu). Ako je boja otopine ljubičasta ili narančasta doda se 10 µL natrijevog acetata (3 mol/L, pH 5) i promiješa se. Zatim se uzorcima doda 1 volumen izopropanola i promiješa se. *QIAquick* kolonice stavi se u tubicu od 2 mL. Da bi se DNA vezala, uzorak se prebaci u *QIAquick* kolonicu i centrifugira se 1 min pri 13000 okretaja po minuti (rpm). Nevezana frakcija se baci, a kolonica se vrati u istu tubicu od 2 mL. Doda se 500 µL pufera BQ u kolonicu i centrifugira 1 min. Za ispiranje, doda se 750 µL pufera PE u kolonicu, pusti da stoji 2-5 min te nakon toga centrifugira 1 min. Nevezana frakcija se baci. Centrifugira se opet 1 min kako bi se uklonili ostaci pufera za ispiranje. *QIAquick* kolonica stavi se u čistu mikrotubicu od 1,5 mL. Da bi se eluirala DNA doda se 30 µL EB pufera na središnji dio *QIAquick* membrane. Pusti se da stoji 10 min na sobnoj temperaturi te se centrifugira 1 min. Eluat je pročišćeni fragment. Nakon pročišćavanja fragmenti su provjereni određivanjem slijeda nukleotida u molekuli DNA (sekvenciranjem) Sangerovom dideoksi metodom.

3.2.1.5. Sekvenciranje produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze

Sangerovom dideoksi metodom sekvenciranja određuje se slijed nukleotida u molekuli DNA. Metoda se temelji na zaustavljanju enzimske reakcije sinteze DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-trifosfata (ddNTP-a).³⁰ Molekula DNA koja se sekvencira je predložak i na nju se sljepljuje početnica koja je fluorescentno označena. Sinteza lanca odvija se uz pomoć DNA-polimeraze u 5'→3' smjeru. Umetanjem ddNTP-a umjesto dNTP-a zaustavlja se elongacija lanca jer nedostaje 3'-OH kraj koji inače reagira s nadolazećim dNTP-om. U reakcijsku smjesu dodaju se sva četiri ddNTP-a označena različitim fluorescentnim bojama. Nastaju obojeni DNA fragmenti koji se odvajaju po veličini kapilarnom elektroforezom. Svi fragmenti određene duljine migriraju kroz kapilarni gel u jednom piksu, a boja povezana sa svakim piksom detektira se pomoću laserske zrake (slika 5).²³

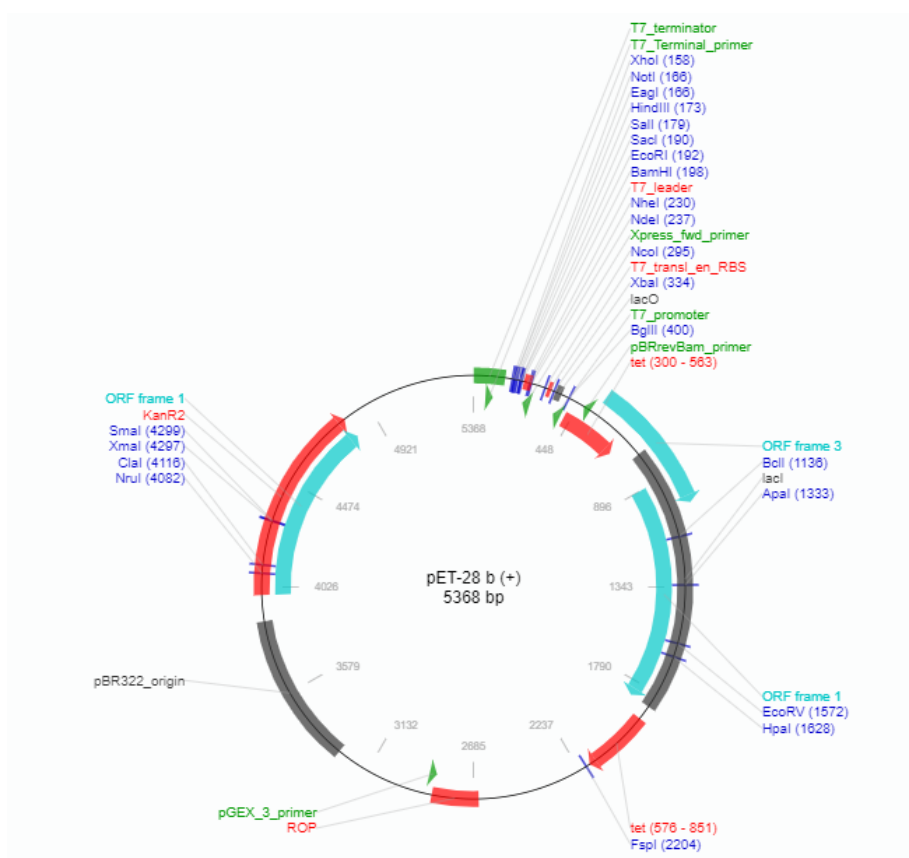


Slika 5. Metoda sekvenciranja DNA obilježavanjem dideoksiribonukleozid-trifosfata (ddNTP-a) s četiri fluorescentne boje uz primjenu automatskih kapilarnih uređaja. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 23.

Slijed nukleotida u pročišćenim umnoženim DRG1 fragmentima određen je u DNA servisu IRB-a pomoću kompleta "ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit" na automatskom kaliparnom sekvenatoru prve generacije ABI3100 Avant Genetic Analyser. Sekvence su obrađeni računalnim programom ABI PRISM AB DNA Sequencing Analysis Software v 5.1.1.

3.2.1.6. Umnažanje DRG1 fragmenta lančanom reakcijom polimeraze s početnicama koje sadrže mjesto za djelovanje restrikcijskih enzima

S ciljem ekspresije proteina DRG1 kodirajući slijed za protein DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* bilo je potrebno ugraditi između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *BamHI* ekspresijskog vektora pET28b. Vektor pET28b (slika 6) omogućuje visoku bakterijsku ekspresiju i nastajanje ciljnih proteina s histidinskim privjeskom na N-kraju ili C-kraju proteina. Sadrži 5368 parova baza i bakterijsku otpornost na kanamicin, a osim za bakterijsku ekspresiju koristi se za *in vitro* transkripciju, stvaranje višestrukih mjesta za kloniranje i proizvodnju ssDNA.



Slika 6. Mapa vektora pET28b³¹

Višestruka mjesta za kloniranje vektora pET28b prikazana su na slici 7. Ondje su označeni T7-promotor, T7-terminator, histidinski privjesak te restrikcijska mjesta za djelovanje brojnih enzima.



Slika 7. Višestruka mjesta za kloniranje vektora pET28b³²

Smjesa za PCR pripremi se prema podacima u tablici 3. Za umnažanje fragmenta DRG1 koristi se uzvodna početnica koja sadrži mjesto za djelovanje restrikcijskog enzima *NdeI* i nizvodna početnica koja sadrži mjesto za djelovanje restrikcijskog enzima *BamHI*:

- Uzvodna početnica: 5' GTCTAGCATATGCCTACGATACTTGAAAAG 3'
- Nizvodna početnica: 5' CTAGACGGATCCTTAGATTTTCTTAACGAGTTG 3'

Enzim, Q5 polimeraza, termostabilna je polimeraza koja ima 3'→5' egzonukleaznu aktivnost i koja osigurava visoku razinu umnažanja i niske stope pogreške.³³ Kalup je fragment DRG1 prethodno izoliran.

Tablica 3. Komponente potrebne za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina DRG1 u vektor pET28b lančanom reakcijom polimeraze

Komponente reakcije	Konačne koncentracije	Volumen
5x Q5 reakcijski pufer	1x	5 µL
Kalup	< 1000 ng	3 µL
Početnica uzvodna 10 µmol / L	0,5 µmol / L	1,25 µL
Početnica nizvodna 10 µmol / L	0,5 µmol / L	1,25 µL
10 mmol /L dNTP	800 µmol / L	2 µL
Q5 polimeraza	0,02 U / µL	0,5 µL
Voda bez nukleaza	-	12 µL

Pripremljena smjesa se promiješa i stavi u PCR uređaj (BIO RAD) kojem su postavljeni uvjeti za PCR reakciju (tablica 4).

Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje kodirajućeg slijeda proteina DRG1 u vektor pET28b

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30 s	1
Denaturacija	98	10 s	30
Sparivanje početnica	62	20 s	30
Produljenje	72	30 s	30
Završno produljenje	72	2 min	1

Nakon završene PCR reakcije uzorci se analiziraju agaroznom gel-elektroforezom.

3.2.1.7. Razgradnja produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze i vektora pET28b restrikcijskim enzimima

Kako bi se ugradio fragment DRG1 u vektor pET28b metodom ligacije potrebno je prethodno razgraditi fragment DRG1 i vektor pET28b restrikcijskim endonukleazama *NdeI* i *BamHI*. Restrikcijske endonukleaze tipa II enzimi su koji prepoznaju palindromski slijed odnosno ciljani slijed od 4 do 8 parova baza (pb) koji ima dvostruku os rotacijske simetrije i unutar tog slijeda cijepaju vezu. Cijepanjem veze mogu nastati tupi ili ljepljivi krajevi koji imaju stršeće 5' ili 3' krajeve koji se mogu međusobno spariti.²²

Reakcijska smjesa za razgradnju produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze pripremi se prema podacima u tablici 5. Zatim se pripremljena otopina inkubira 60 min na 37 °C bez treskanja nakon čega se inkubacijom 5 min na 80 °C zaustave restrikcijski enzimi.

Tablica 5. Priprema reakcijske smjese za razgradnju produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze

Komponente	Volumen
Fragment DRG1 (pročišćen iz gela)	29,5 µL
<i>Fast Digest</i> pufer (bezbojni)	3,5 µL
Restrikcijski enzim <i>NdeI</i>	1 µL
Restrikcijski enzim <i>BamHI</i>	1 µL
Ukupan volumen	35 µL

Prema tablici 6 pripremi se reakcijska smjesa za razgradnju vektora pET28b restrikcijskim enzimima. Nakon toga se smjesa inkubira 60 min pri 37 °C bez treskanja, a zatim se restrikcijski enzimi zaustave inkubacijom 5 min na 80 °C.

Tablica 6. Razgradnja vektora pET28b restrikcijskim enzimima

Komponente	Početne koncentracije	Volumen
Vektor pET28b	0,4 µg/ µL	5 µL
Restrikcijski enzim <i>NdeI</i>	20 U/ µL	1 µL
Restrikcijski enzim <i>BamHI</i>	20 U/ µL	1 µL
<i>Fast Digest</i> pufer (zeleni)	10x	4 µL
Voda bez nukleaza	-	29 µL

3.2.1.8. Pročišćavanje razgrađenog produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze

Za pročišćavanje razgrađenog produkta dobivenog lančanom reakcijom polimeraze koristi se komercijalni komplet *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN) prema uputama napisanim u odjeljku 3.2.4. Odmah se doda tri puta veći volumen QG pufera i jedan puta veći volumen

izopropanola, no bez inkubacije na 50 °C. Odredi se masena koncentracija otopine pročišćenog fragmenta DRG1 spektrofotometrijski na uređaju Nanophotometer N60 (Implen).

3.2.1.9. Ligacija

Reakcijom ligacije povezuju se restrikcijskim enzimima razgrađeni vektor pET28b i fragment DRG1 dobiven PCR reakcijom u svrhu nastajanja rekombinantnog plazmida. Povezivanje se odvija pomoću *ElectroLigase*[®] (NEB) koja sadrži T4-DNA-ligazu i 2x reakcijski pufer. Navedena kombinacija napravljena je za promicanje ligacije svih vrsta DNA krajeva (tupih, ljepljivih). Izravno je kompatibilan s elektrokompetentnim stanicama koje se koriste za transformaciju elektroporacijom.³⁴ Za reakciju ligacije pripremi se ligacijska smjesa prema podacima iz tablice 7.

Tablica 7. Priprema ligacijske smjese za povezivanje vektora pET28b i PCR produkta s *ElectroLigase*[®] (NEB)

Komponente ligacijske smjese	Volumen
Razgrađeni i pročišćeni vektor pET28b	1,5 µL
Razgrađeni i pročišćeni fragment DRG1	3 µL
Pufer za elektroligazu	5 µL
Elektroligaza	1 µL
Voda bez nukleaza	0,5 µL

Preporučeno je koristiti 20–100 ng vektora s trostrukim molarnim viškom *inserta* (PCR produkta). Volumen vektora izračuna se prema formuli: $V(\text{vektor}) = \frac{m(\text{vektor})}{\gamma(\text{vektor})}$, a masa *inserta* prema formuli $m(\text{insert}) = \frac{3 \times m(\text{vektor}) \times N(\text{baza inserta}) \times M_{\text{prosječna}}(\text{baza})}{N(\text{baza vektora}) \times M_{\text{prosječna}}(\text{baza})}$. Izračunata masa zatim se uvrsti u formulu za volumen *inserta*: $V(\text{insert}) = \frac{m(\text{insert})}{\gamma(\text{insert})}$.

Ligacijska smjesa promiješa se pipetiranjem 7–10 puta i inkubira 30 min na 25 °C, a zatim 15 min na 65 °C kako bi se inaktivirao enzim. Nakon toga smjesa se stavi na led.

3.2.1.10. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Transformacija je proces u kojem stanica prima molekulu strane DNA, a metode transformacije dijele se na fizikalne i kemijske metode. Elektroporacija je fizikalna metoda transformacije stanica pri kojoj stanice bivaju izložene jakom, ali kratkotrajnom električnom polju. Pod utjecajem električnog polja dolazi do povećanja permeabilnosti membrane jer električni impuls poremeti fosfolipidni dvosloj i nastaju privremene pore. Električni potencijal kroz staničnu membranu istodobno raste kako bi se nabijene molekule poput DNA mogle provući kroz pore na način sličan elektroforezi.³⁵

Ligacijska smjesa elektroporirana je u elektrokompetentne stanice *One Shot*[®] *TOP10 Electrocomp*[™] *E. coli*. Kiveta za elektroporaciju i stalak za kivetu stavi se na hlađenje na -20 °C. Uzme se 25 μ L elektrokompetentnih stanica *One Shot*[®] *TOP10 Electrocomp*[™] *E. coli* te se stave na led da se otope. Tim stanicama doda se 1,5 μ L ligacijske reakcije i promiješa se kvrcanjem. Zatim se priređena smjesa prebaci u ohlađenu elektroporacijsku kivetu i elektroporira se pri 2500 V na elektroporatoru. Odmah po završetku, u kivetu se doda 500 μ L SOC medija za oporavak bakterija i promiješa se. Stanice se inkubiraju 1 sat na 37 °C pri 300 rpm, a nakon toga se smjesa prelije na LB/Kan ploče (50 μ g /mL). Na jednu ploču stavljeno je 400 μ L smjese, a na drugu 50 μ L smjese. Ostatak se spremi na 4 °C. Ploče se kratko osuše u laminaru i stave se na uzgoj preko noći na 37 °C.

3.2.1.11. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama

Uspješnost transformacije bakterijskih stanica elektroporacijom provjerena je lančanom reakcijom polimeraze na kolonijama (engl. *colony PCR*). PCR-om na kolonijama moguće je brzo identificirati kolonije kvasca ili bakterija koje su izrasle na selektivnim podlogama nakon koraka transformacije, kako bi se potvrdilo da je prisutan željeni genetski konstrukt.³⁶ Nasumičnim odabirom odrede se kolonije koje su rasle preko noći na LB/Kan pločama.

Pripremi se zajednička reakcijska smjesa za PCR na kolonijama prema podacima u tablici 8.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za analizu transformiranih bakterija lančanom reakcijom polimeraze na kolonijama. Podaci odgovaraju volumenima za jednu reakciju.

Komponente reakcije	Volumen
Piknuta DNA	-
<i>Premix Ex Taq</i>	5 μ L
Početnica T7P-F	0,3 μ L
Početnica T7T-R	0,3 μ L
NFW	4,4 μ L
Ukupan volumen	10 μ L

Podaci u tablici odgovaraju volumenima za jednu reakciju i trebaju se pomnožiti s odgovarajućim brojem reakcija. Zajednička reakcijska smjesa raspipetira se u tubice za PCR, a zatim se u smjesu doda biomasa bakterijske kolonije uzeta vrhom sterilnog nastavka. Uzvodna početnica je T7-promotor vektora (T7P-F): 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', a nizvodna je T7-terminator vektora (T7T-R): 5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3'. Pripremljena reakcijska smjesa stavi se u PCR uređaj (BIO RAD) kojem su postavljeni uvjeti za provođenje lančane reakcije polimerazom na kolonijama prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Uvjeti za provođenje lančane reakcije polimerazom na kolonijama

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 s	30
Sparivanje početnica	50	45 s	30
Produljenje	72	1 min	30
Završno produljenje	72	5 min	1

Kada reakcija u PCR uređaju završi uzorci kojima je dodan pufer za nanošenje uzoraka (5x) i marker *GeneRulerTM DNA Ladder Mix* nanesu se na 0,8 % agarozni gel koji se uključi na 55 V. Na temelju rezultata agarozne gel elektroforeze odaberu se kolonije koje sadrže

rekombinantni plazmid te se biomasa bakterijske kolonije uzme sterilnim nastavkom i stavi na prekonadni uzgoj na 37 °C pri 800 rpm u 3 mL LB medija koji sadrži 3 µL kanamicina.

3.2.1.12. Izolacija i razgradnja rekombinantnog plazmida

Odgovarajući rekombinantni plazmidi pročiste se pomoću kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit-a* (QIAGEN). Prekonadna bakterijska kultura prelije se u mikroeprevetu i centrifugira pri 13000 rpm. Supernatant se odlije u drugu *Falcon* tubicu. Postupak se ponavlja dok se sva bakterijska kultura ne prebaci u mikroeprevetu. Talog stanica resuspendira se u 250 µL pufera P1 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 10 mmol/L EDTA; 100 µg/mL RNaza). Zatim se doda 250 µL pufera P2 (200 mmol/L NaOH; 1 % SDS (m/V)) koji uzrokuje razaranje bakterijske stijenke, denaturaciju proteina i genomske DNA te oslobađanje plazmidne DNA u otopinu. Sadržaj mikroeprevete promiješa se 4–6 puta okrećući mikroeprevete gore-dolje te se inkubira na sobnoj temperaturi najviše 5 min. Liza stanica ne smije trajati duže od 5 min. Nakon lize stanica doda se 350 µL pufera N3 (4,2 mol/L gvanidin-hidroklorid; 0,9 mol/L kalijev acetat; pH 4,8) i odmah se promiješa okrećući epruvete gore-dolje 4–6 puta. Puffer N3 neutralizira otopinu i uzrokuje taloženje kompleksa denaturiranih proteina, kalijevog dodecil-sulfata i denaturirane genomske DNA. Plazmidna DNA se renaturira i zaostaje u otopini zbog male veličine u odnosu na genomsku DNA. Zatim se centrifugira 10 min pri 13000 rpm. Supernatant se prelije u kolonicu i centrifugira se 60 s. Nevezana frakcija se baci. U kolonicu se doda 750 µL pufera PE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5; φ = 80 % etanol) i centrifugira se 60 s. Puffer PE sadrži etanol koji uzrokuje taloženje plazmidne DNA jer se smanjuje njena topljivost zbog slabljena interakcija plazmidne DNA s otapalom. Nevezana frakcija se baci i kolonica se stavi na centrifugu još 1 min. Nakon toga kolonica se stavi u čistu mikroeprevetu od 1,5 mL i doda se 50 µL pufera EB (10 mmol/L Tris-HCl pH 8,0) u kojem se talog plazmidne DNA otopi. Reakcija se pusti 10 min na termobloku na 55 °C i centrifugira se 1 min pri 13000 rpm. Dobiveni eluat je pročišćeni plazmid koji se razgradi restriktivnim enzimima kako bi se dodatno provjerila uspješnost ligacije i transformacije.

Reakcijska smjesa za razgradnju rekombinantnog plazmida pripremi se prema podacima u tablici 10. Nakon što se pripremi smjesa za razgradnju inkubira se 60 min na 37 °C bez treskanja.

Tablica 10. Razgradnja rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 restrikcijским enzimima *Bam*HI i *Nde*I

Komponente reakcije	Volumen / μ L
Rekombinantni plazmid	2
Restrikcijски enzim <i>Nde</i> I	0,5
Restrikcijски enzim <i>Bam</i> HI	0,5
<i>Fast Digest</i> pufer (zeleni)	1
NFW	6
Ukupno	10

Postojanje rekombinantnog plazmida provjereno je i određivanjem slijeda nukleotida u molekuli DNA (sekvenciranjem) Sangerovom dideoksi metodom.

3.2.2. Prekomjerna ekspresija proteina DRG1

3.2.2.1. Kemijska transformacija bakterija

Kemijska transformacija bakterija kombinacijom kemijskih tvari i fizičkih tretmana inducira ulazak strane DNA u kompetentnu stanicu, no točan mehanizam tog procesa nije poznat. Stanice se prvo ispiru otopinom hladnog CaCl_2 i inkubiraju na ledu. Zatim se dodaje plazmidna DNA i ponovi se inkubacija na ledu, a nakon toga slijedi kratkotrajan toplinski šok na 37 °C ili 42 °C. Smatra se da CaCl_2 djeluje na staničnu stijenkku i njenu permeabilnost, te utječe na vezanje DNA na staničnu površinu, dok toplinski šok destabilizira staničnu membranu i potiče unos DNA u stanicu.

S ciljem ekspresije i pročišćavanja proteina DRG1 s provjerenim rekombinantnim plazmidom pET28b_DRG1 (plazmid je prethodno potvrđen sekvenciranjem, odjeljak 3.2.1.12.) napravljena je transformacija odgovarajućih kompetentnih stanica. Korištene su kemijski kompetentne stanice *Rosetta-gami*TM 2(DE3) *pLysS* bakterije *E. coli* dizajnirane tako da omogućuju stvaranje disulfidnih veza i pojačanu ekspresiju eukariotskih proteina koji sadrže rijetke kodone. Oznaka DE3 znači da odgovarajući sojevi sadrže lizogen λ DE3 koji nosi gen za T7-polimerazu. Takvi sojevi pogodni su za proizvodnju proteina iz ciljnih gena

kloniranih u pET vektorima indukcijom s izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidom (IPTG).³⁷ Uzme se 100 μ L kemijski kompetentnih stanica *Rosetta-gami*TM 2(DE3) *pLysS* i tome se doda 1 μ L vektora pET28b u koji je ugrađen DRG1 i 50 μ L pufera za transformaciju s CaCl₂ (tablica 11).

Tablica 11. Priprema pufera za kemijsku transformaciju

Komponente	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen za 10 mL pufera
Tris-HCl pH 7,5	1 mol/L	10 mmol/L	100 μ L
MgCl ₂	1 mol/L	10 mmol/L	100 μ L
CaCl ₂	2 mol/L	10 mmol/L	50 μ L
ReH ₂ O	-	-	9,75 mL

Pripremljena otopina stavi se na led 5 min, a zatim se stavi 30 s na termoblok na 42 °C te opet na led 2 min. Nakon toga otopini se doda 1 mL SOC medija, koji je ugrijan na sobnu temperaturu, i inkubira se 60 min na 37 °C pri 300 rpm. Na jednu LB/Kan ploču nasadi se 50 μ L dobivene otopine, a na drugu ploču ostatak te se ploče ostave preko noći na 37 °C. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama provodi se kao što je objašnjeno u odjeljku 0. Pozitivna kontrola prethodno je uklonirana cDNA u vektor pET28b, a negativna kontrola sadrži 3 mL LB medija i 3 μ L kanamicina. Na temelju rezultata agarozne gel elektroforeze odaberu se kolonije koje se stave na prekonocni uzgoj prema uputama u odjeljku 3.2.2.2.

3.2.2.2. Priprema medija i postav noćne kulture

Pripremi se potrebna količina LB i TB medija za uzgoj proteina. Sastav medija nalazi se u odjeljku 3.1.7. Tekući LB i TB mediji autoklaviraju se zajedno s tikvicama. Tekući medij LB (3 ml) u koji je dodano 3 μ L antibiotika kanamicina (50 mg/mL) inokulira se s bakterijama koje su transformirane rekombinantnim plazmidima. Bakterije se inkubiraju preko noći na 37 °C u tresilici uz brzinu okretaja 200 rpm.

3.2.2.3. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnim gelovima

Elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu može se odrediti molekulska masa proteina mjerenjem pokretljivosti proteina u gelu pod utjecajem električnog polja. U prisutnosti detergenta SDS-a naboj kompleksa protein-SDS određen je isključivo nabojem SDS-a koji prekriva naboj bočnih lanaca proteina pa pokretljivost različitih proteina ovisi samo o njihovoj molekulskoj masi. Maksimalno razlučivanje pri odjeljivanju proteina postiže se korištenjem gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Gel za sabijanje je niže koncentracije i pripremljen je u puferu nižeg pH i ionske jakosti što doprinosi bržem gibanju molekula kroz gel i sabija ih na granici dvaju gelova. U gelu za razdvajanje dolazi do odvajanja proteina na temelju molekuskog sita. Veličina pora poliakrilamidnih gelova ovisi o sadržaju krutih tvari u gelu i stupnju umreženja, a da bi došlo do polimerizacije akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida koristi se APS kao inicijator reakcije i TEMED kao katalizator reakcije. Detekcija proteina u poliakrilamidnim gelovima provodi se inkubacijom gela u kiseloj otopini boje *Comassie Brilliant Blue R-250* nakon čega se nevezana boja ispere.³³

Za pripremu SDS-poliakrilamidnih gelova za elektroforezu koristi se aparatura *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO RAD). Pripremi se konstrukcija za izlivanje gela i otopine za gel prema podacima iz tablice 12.

Tablica 12. Priprema gela za SDS-poliakrilamidnu elektroforezu. Prikazani su volumeni za 1 gel i za jažice debljine 0,75 mm.

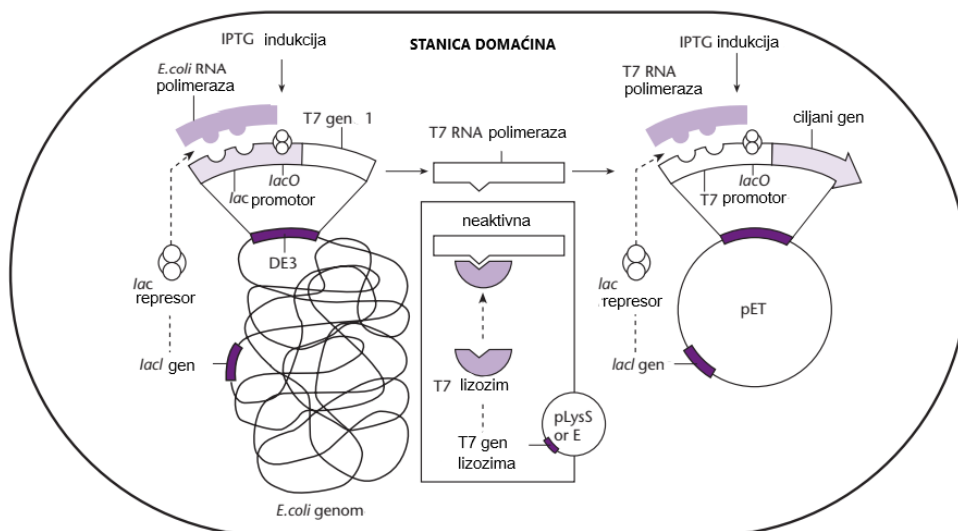
Komponente	12 % gel za razdvajanje	5 % gel za sabijanje
MiliQ H ₂ O	1,45 mL	1,03 mL
1,5 mol/L Tris pH 8,8	0,84 mL	/
0,5 mol/L Tris pH 6,8	/	0,42 mL
10 % SDS	33,33 µL	16,7 µL
40 % akrilamid	1 mL	0,21 mL
10 % APS	16,7 µL	8,33 µL
TEMED	3,33 µL	1,7 µL

APS i TEMED dodaju se neposredno prije izlivanja gela za inicijaciju polimerizacije akrilamida. Prvo se pripremi gel za razdvajanje i ulije u konstrukciju za izlivanje gelova. Zatim se doda propan-2-ol tako da pokrije površinu gela. Propan-2-ol omogućava jednoliku polimerizaciju gela za razdvajanje. Nakon što gel za razdvajanje polimerizira, propan-2-ol se odlije, ispere se destiliranom vodom i konstrukcija se do vrha napuni otopinom gela za sabijanje. Nakon toga pažljivo se umetne česalj. Uzorcima se prije stavljanja na gel doda pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel i uzorci se denaturiraju 5 min pri 95 °C, a zatim se zajedno s markerom *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards* (2,5 µL) nanese se na SDS-PAGE gel i provede se elektroforeza pri 120 V. Kada je elektroforeza gotova SDS-PAGE gel oboji se pomoću *Coomassie Brilliant Blue R-250* boje 20 min na tresilici pri 200 rpm, a nakon toga se gel odboji u puferu za odbojavanje.

3.2.2.4. Mali uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije

U interesu tehnologije rekombinantne DNA dobiti je zamjetne količine proteina zbog proučavanja njihovih svojstava ili pak zbog komercijalne vrijednosti, no prekomjerna ekspresija proteina vrši metabolički pritisak na stanicu i usporava njen rast. Kako bi se smanjili problemi povezani s prekomjernom ekspresijom uobičajeno je koristiti vektor u kojem je klonirani gen pod kontrolom reguliranog promotora. S druge strane, neke proteine je teško proizvesti u velikim količinama. Problemi prekomjerne ekspresije riješeni su posebno dizajniranim sustavom pET vektora koji osigurava kloniranje i ekspresiju rekombinantnih proteina u *E. coli*. Ovaj sustav utemeljen je na genetičkim elementima iz bakteriofaga T7 i bakterijskog *lac*-operona. U vektor pET ugrađen je gen za ciljni protein pod kontrolom T7-promotora i *lac*-operona. T7-promotor specifično prepoznaje T7-RNA-polimerazu koja je procesivnija od bakterijske RNA-polimeraze. U prisutnosti induktora IPTG-a dolazi do ekspresije ciljnog gena. IPTG se veže na Lac-represor koji potom disocira s *lac*-promotora. Bakterijska RNA-polimeraza prepoznaje *Lac*-promotor te nakon indukcije može prepisati gen za T7-RNA-polimerazu. Nastaje T7-RNA-polimeraza koja zatim prepisuje ciljni gen ugrađen u pET vektor. Ekspresija proteina koji su izuzetno toksični za bakteriju *E. coli* može se dodatno reprimirati pomoću T7-lizozima koji je kodiran pLysS ili pLysE plazmidima. T7-lizozim inaktivira T7-RNA-polimerazu u odsutnosti induktora te se tako dodatno smanjuje ekspresija prije indukcije. U prisutnosti induktora nastaje dovoljna količina T7-RNA-

polimeraze te se nadvlada djelovanje T7-lizozima. Prisutnost *lac*-operatora između T7-promotora i ciljnog gena dodatno smanjuje transkripciju gena u odsutnosti induktora.²² Navedeni sustav pET vektora prikazan je na slici 8.



Slika 8. Regulacija ekspresije gena ukloniranog u pET vektor. U genom *E. coli* ugrađen je gen za T7-polimerazu koji se eksprimira u prisustvu IPTG induktora. T7-polimeraza tada transkribira gen kloniran u pET vektor. Ako je proteinski produkt ukloniranog gena toksičan, potrebno je smanjiti transkripciju ukloniranog gena prije indukcije. Plazmid pLysS kodira za T7 lizozim koji inaktivira T7-RNA polimerazu nastalu u odsustvu IPTG-a. Također, prisutnost *lac* operatora između T7-promotora i ukloniranog gena dodatno smanjuje transkripciju u odsustvu induktora.²² Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 22.

Uzorci prekonocne kulture koji sadrže rekombinantni plazmid pET28b_DRG1 prevode se u dnevnu kulturu s ciljem prekomjerne ekspresije proteina. Inokulira se 20 mL TB medija koji sadrži kanamicin s 1 mL prekonocne kulture koja sadrži rekombinantni plazmid. *Rosetta-gami 2(DE3) pLysS* stanice bez plazmida stavljene su TB/Kan medij na rast pri 37 °C te se taj uzorak koristio kao kontrola. Bakterije se inkubiraju u tresilici na 37 °C, a rast im se prati mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm (OD₆₀₀) na spektrofotometru. Odvoji se 1 mL kulture u kivetu i izmjeri se optička gustoća. Kad optička gustoća dosegne vrijednost od 0,5 do 0,8 doda se induktor IPTG (*stock* 1 mol/L). Induktor se dodaje u 5 mL bakterijske kulture tako da konačna koncentracija bude 0,8 mmol/L te se uzorak inducira na 30 °C 3h. U drugi alikvot kulture nakon postizanja željene vrijednosti optičke gustoće dodaje se IPTG (1 mol/L) tako da konačna koncentracija bude 0,1 mmol/L te se taj uzorak inducira na 16 °C preko noći. Nakon

indukcije stanice se obore (centrifugiraju), supernatant se baci, a talog se spremi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sljedećeg dana, kada je gotova indukcija pri $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije indukcije uzet je alikvot stanica kao kontrola. Stanice se obore centrifugiranjem, supernatant se baci, a talog se spremi na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

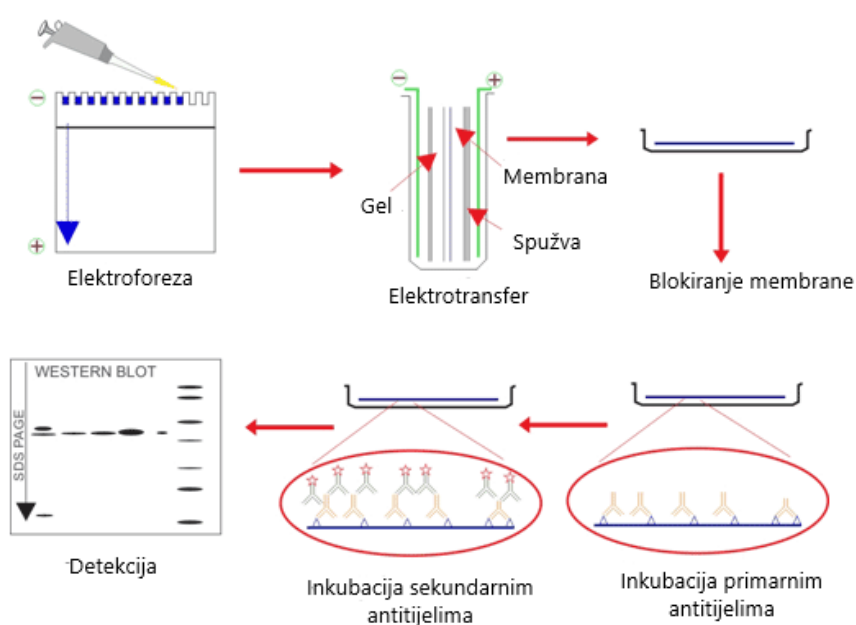
3.2.2.5. Sonikacija

Za izolaciju proteinskog staničnog ekstrakta potrebno je razoriti staničnu stijenu i membranu. To je moguće provesti osmotskom lizom, enzimskom razgradnjom stanične stijene, homogenizatorom, soniciranjem itd. Sonikacija je jedna od metoda fizičkog liziranja stanica pri čemu se koriste visokofrekventni zvučni valovi. Zvučni valovi nastaju pomoću vibracijske sonde koja je uronjena u suspenziju stanica.³⁸

Kako bi izolirali protein DRG1 nakon malog uzgoja i indukcije prekomjerne ekspresije potrebno je resuspendirati taloge dobivene nakon indukcije u $500\text{ }\mu\text{L}$ pufera za proteine. Pufer za proteine stoji cijelo vrijeme na ledu kao i uzorci. Zatim se uzorci naizmjenično soniciraju osam puta po 30 s pri amplitudi 50 te se nakon toga centrifugiraju 20 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri 13000 rpm. Nakon centrifugiranja prebaci se $60\text{ }\mu\text{L}$ supernatanta u tubicu i tome se doda $20\text{ }\mu\text{L}$ 4x pufera za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel. Suhom talogu doda se $250\text{ }\mu\text{L}$ 1x pufera za nanošenje uzoraka i resuspendira se. Uzorci se analiziraju SDS-PAGE elektroforezom.

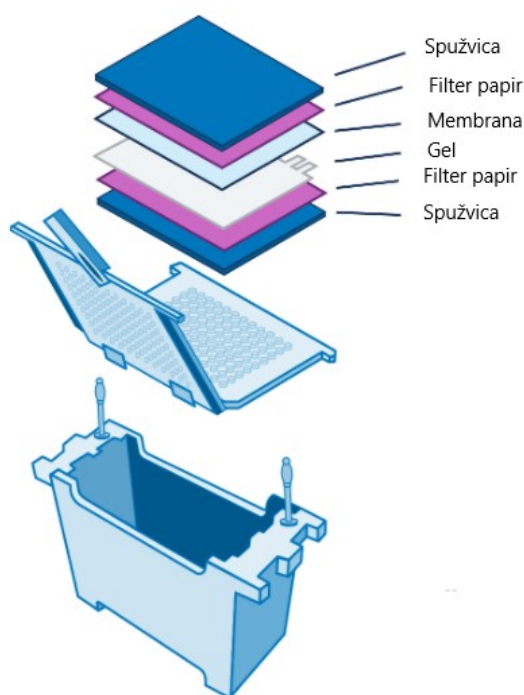
3.2.2.9. Tehnika western blotting

Tehnikom *western blotting*-a može se detektirati specifičan protein u smjesi proteina. Analiza uključuje prienos proteinskih pruga nakon elektroforeze s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu.²² Membrana se inkubira s otopinom koja sadrži neobilježena primarna antitijela koja prepoznaju antigen i koja se specifično vežu za željeni protein, a potom primarna antitijela ostvaruju interakciju s obilježenim sekundarnim antitijelima. Sekundarna antitijela vežu se na teški lanac primarnih antitijela tako da ne interferiraju odnos primarnog antitijela i antigena.³⁹ Na sekundarna antitijela vezan je enzim ili neki drugi ligand koji se može detektirati s velikom osjetljivošću.¹² U ovom slučaju detekcija kompleksa proteina i antitijela temelji se na kemiluminescenciji. Temelj kemiluminescencije je stvaranje svjetlosti u reakciji kemijskog supstrata i enzima te mjerenje intenziteta svjetlosti izlaganjem rendgenskom filmu.⁴⁰ Shematski prikaz opisane tehnike prikazan je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz tehnike *western blotting*. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 41.

Svi dijelovi konstrukcije za *western blotting* natope se u kadici s puferom za elektrotransfer koji je prethodno bio u ledenici. Nitrocelulozna membrana (GE Healthcare) odreže se tako da veličinom odgovara veličini gela. Aktivira se u metanolu oko 1 min i zatim se ispere destiliranom vodom. Pripreme se dva deblja filter papira, magnetič, stakleni štapić i stave se u puferu za elektrotransfer. Sve se radi pomoću pincete jer u suprotnom može doći do zagađenja membrane. Nakon SDS-PAGE elektroforeze gel se pažljivo odvoji od stakalca i složi se tako da se na katodu (negativna elektroda) redom slažu: spužvica, filter papir, gel, membrana, filter papir, spužvica (slika 10) te se poklopi dijelom konstrukcije koji odgovara anodi (pozitivna elektroda). Prilikom slaganja konstrukcije potrebno je istisnuti mjehuriće zraka pomoću staklenog štapića. Složena konstrukcija stavi se u kadicu za *western blotting* tako da se crni dio konstrukcije (katoda) okrene prema crnom dijelu u kadici. Zatim se u kadicu izlije sav pufer, doda se magnetič i stavi uložak za hlađenje. Cijela aparatura stavi se na miješalicu i uređaj se uključi na 100 V na 1h.



Slika 10. Shematski prikaz konstrukcije za provođenje *western blotting* tehnike. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 43.

Nakon toga, membrana se stavi u 5 % otopinu za blokiranje membrane (0,5 g sredstva za blokiranje membrane *Blotting-Grade Blocker* u 10 mL TBST pufera) na 1h uz ljuljanje na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremi se 10 mL 5 % otopine za blokiranje i u nju se dodaju primarna mišja anti-His antitijela (1:5000). Nakon inkubacije membrane od 1h u otopini za blokiranje, membrana se stavi u pripremljenu otopinu s primarnim antitijelima u ledenicu, na miješalicu, preko noći. Sljedeći dan membrana se ispere 3 puta po 5 min u TBST-u na miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga membrana se inkubira u otopini sekundarnog kozjeg protumišnjeg antitijela u otopini za blokiranje (razrjeđenje sekundarnih antitijela 1:10000 u 5 mL 5 % otopine za blokiranje) tijekom 1h na sobnoj temperaturi na miješalici. Otopina se izlije i membrana se ispere 3 puta po 5 min u TBST-u. Zatim se membrana uzme pincetom i izlije se sve iz posude te se na membranu doda detekcijski reagens ECL (GE Healthcare; 500 μ L otopine luminola i 500 μ L otopine peroksida)⁴² i ostavi se 2-3 min u mračnoj ladici. U sobi za razvijanje filma pripreme se tri kadice koje sadrže: otopinu razvijачa, vodu i otopinu fiksatora te štoperica, pinceta, škare i marker. U sobi za razvijanje radi se u mraku. Membrana se stavi u kazetu za razvijanje filma. Film se izreže tako da veličinom odgovara veličini membrane. Dobro je označiti markerom na foliji do kud

ide membrana kako bi se film lakše prislonio na membranu. Izrezani film stavi se u kazetu s membranom i pusti se 15 s. Nakon ekspozicije film se uzme pincetom i uroni u otopinu razvijaa, zatim u vodu pa u otopinu fiksatora. Kad je to gotovo film se ispere u kadici s vodom.

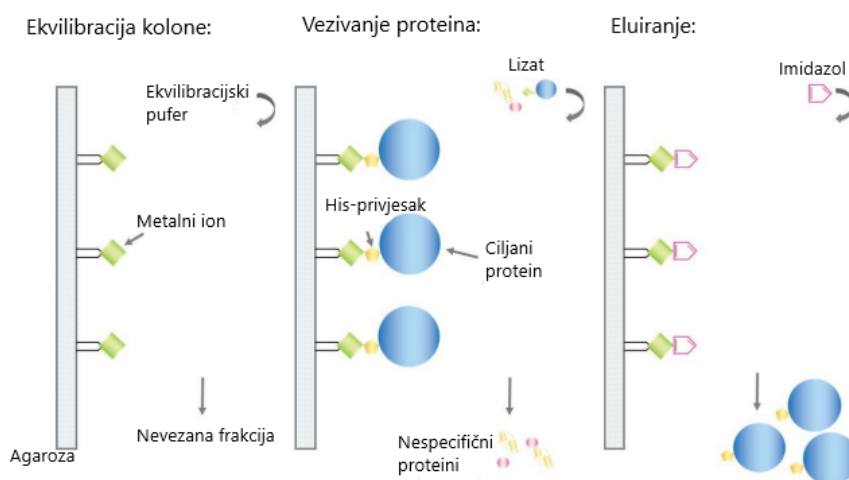
3.2.2.6. Veliki uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije

Uzorak DRG1_*Rosetta-gami 2(DE3) pLysS* iz glicerolskog stocka stavljen je u 15 mL LB/Kan medija na prekonoćni uzgoj na 37°C pri 250 rpm. U dvije tikvice odvoji se 7,5 mL prekonoćne kulture koje sadrži rekombinantni plazmid i 500 mL TB/Kan medija i uzgaja se na tresilici dok se ne postigne vrijednost optičke gustoće (OD_{600}) od 0,4 do 0,8. Nakon što se postigne željena vrijednost optičke gustoće doda se 50 μ L IPTG-a (1 mol/L) tako da konačna koncentracija IPTG-a bude 0,1 mmol/L. Uzorci se induciraju na 16 °C preko noći nakon čega se centrifugiraju na 4 °C 30 min pri 4300 rpm. Talog se resuspendira u puferu 1 (2,5 mL 25 mmol/L Tris-HCl, MiliQ H₂O do 100 mL) i centrifugira na 4 °C 5 min pri 8500 rpm. Nastali talog resuspendira se u 20 mL pufera 2 (1,25 mL 25 mmol/L Tris-HCl, 5 mL 500 mmol/L NaCl, 0,1 mL 10 mmol/L imidazol, MiliQ H₂O do 50 mL) kojem se dodan 1 mg/mL lizozima. Ostaviti otopinu da lizira na ledu 5-10 min. Nakon toga se uzorci naizmjenično soniciraju 5 puta po 30 s na amplitudi 40 te centrifugiraju na 4 °C 30 min pri 12500 rpm. Supernatant iz prvog centrifugiranja prebaci se u drugu Falcon tubicu i ponovi se centrifugiranje s tim supernatantom, a dio taloga se pospremi na –20 °C.

3.2.2.7. Afinitetna kromatografija

Fuzijski protein pročisti se afinitetnom kromatografijom s imobiliziranom metalom na nosaču (engl. *Immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC). Metoda se temelji na interakciji proteina i iona prijelaznog metala (najčešće Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺) imobiliziranog na čvrsti nosač.^{44,45} U ovom slučaju pročišćavanje se odvija pomoću iona kobalta koji ostvaruju interakciju s histidinskim privjeskom fuzijskog proteina. Afinitetni privjesak egzogeni je slijed aminokiselina s visokim afinitetom za specifični kemijski ili biološki ligand. Vektor pET28b kodira za histidinski privjesak na N–kraju proteina, a privjesak se sastoji od 6 uzastopnih histidina i najčešće je korišteni privjesak. Kromatografsko punilo je

nitrilotriocetna kiselina-agaroza (NTA–agaroza) na koju je imobiliziran ion kobalta koji ima 6 koordinacijskih mjesta. NTA se veže na 4 od 6 koordinacijskih veznih mjesta iona, a na preostala dva mjesta veže se histidinski privjesak.⁴⁶ Pročišćavanje je moguće u denaturirajućim i nativnim uvjetima, a fuzijski protein eluira se imidazolom pri čemu dolazi do kompeticije imidazola iz pufera i imidazalnog prstena histidina. IMAC metoda popularna je i visoko učinkovita metoda, te se često koristi za pročišćavanje proteina i peptida.⁴⁷ Shematski prikaz metode nalazi se na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz afinitetne kromatografije s metalom imobiliziranom na nosaču. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru pod brojem 44.

U plastičnoj kolonici ekvilibrira se 750 μL agaroze (*TALON Metal Affinity Resin*, TaKaRa) s 5 mL 10 mmol/L pufera za ispiranje nespecifično vezanih proteina. Pročišćavaju se uzorci nakon velikog uzgoja i indukcije prekomjerne ekspresije. Pusti se da lizat prođe kroz kolonicu, no prethodno ga je poželjno pročititi pomoću filtera s porama veličine 0,22 μm da se ne začepi kolonica. Zatim se kolonica ispiru s 10 mL pufera IMI 10 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazol), s 10 mL pufera IMI 20 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L imidazol) te s 5 mL pufera IMI 40 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 40 mmol/L imidazol). Sve frakcije sakupljaju se u zasebne *Falcon* tubice i označe. Nakon toga se kolonica eluira s 1 mL pufera IMI 200 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 500 mmol/L NaCl, 200 mmol/L imidazol). Postupak eluiranja ponavlja se tri puta, a frakcije se sakupljaju i označe kao eluati. Sakupljeni uzorci analiziraju se SDS-PAGE elektroforezom.

3.2.2.8. Ukoncentriravanje proteina

Pomoću *Amicon*[®] *Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices* (centrikon) moguće je provesti ukoncentriravanje bioloških uzoraka, promjenu pufera, odsoljavanje ili diafiltraciju. Metoda je korištena za ukoncentriravanje uzoraka proteina DRG1 nakon velikog uzgoja i indukcije prekomjerne ekspresije kako bi se dobio koncentrat proteina. U centrikon (tubica s filterom čija je nominalna granica molekularne težine, u ovom slučaju, 10000 Da) koji se nalazi u odgovarajućoj tubici za centrifugu doda se 500 µL uzorka. Uzorci se centrifugiraju 10 min pri 14000×g pri 4°C. Sakuplja se sadržaj unutar centrikona, kao i nevezane frakcije koje se prebace u označene *Falcon* tubice. Nakon posljednjeg centrifugiranja centrikon koji sadrži koncentrat proteina naopako se stavi u čistu tubicu i centrifugira 2 min pri 1000×g pri 4 °C kako bi se koncentrat proteina prebacio u čistu tubicu. Kako bi se promijenio pufer koncentrat se stave u centrikon i eluiraju puferom za proteine te centrifugiraju 15 min pri 14000×g pri 4°C. Postupak centrifugiranja s puferom za proteine ponovi se tri puta. Eluati se sakupljaju u čiste *Falcon* tubice. Nakon posljednjeg centrifugiranja centrikon se okrene naopako u čistu tubicu i centrifugira 2 min pri 1000×g pri 4 °C kako bi u čistu tubicu prebacio ukoncentrirani protein s promijenjenim puferom. Dobiveni koncentrat i eluati analiziraju se SDS-PAGE elektroforezom, te im se spektrofotometrijski izmjeri koncentracija pomoću uređaja *Nanodrop* (*Thermo Scientific*).

3.2.3. Biokemijska karakterizacija proteina DRG1

3.2.3.1. GTPazna aktivnost proteina DRG1

Intrinzična GTPazna aktivnost proteina DRG1 određena je pomoću *GTPase-Glo*TM testa detektirajući količinu neiskorištenog GTP-a nakon reakcije hidrolize GTP-a u GDP. Neiskorišteni GTP prevodi se u ATP u reakciji s *GTP-Glo*TM reagensom, a nastali ATP se zatim detektira bioluminescencijom uz pomoć odgovarajuće termostabilne luciferaze. Količina proizvedene svjetlosti i GTPazna aktivnost obrnuto su proporcionalne. Visoko aktivna GTPaza hidrolizira više GTP-a, smanjujući količinu ATP-a proizvedenog iz GTP-a i smanjujući svjetlosni učinak. Manje aktivna GTP-aza hidrolizira manje GTP-a, ostavljajući veću količinu GTP-a koji se pretvara u ATP i stvara više svjetla.⁴⁸

Test GTPazne aktivnosti proveden je pri 8 °C, 25 °C i pri 42 °C pri sljedećim koncentracijama proteina: 200 ng/μL, 1000 ng/μL, 3000 ng/μL, 4500 ng/μL, 6000 ng/μL i 7500 ng/μL. U tablici 13. nalaze se volumeni otopina potrebni za provođenje testa GTPazne aktivnost.

Tablica 13. Volumeni otopina potrebni za provođenje testa GTPazne aktivnosti. Omjer volumena komponenti reakcije mora biti 1:1:2.

Komponentne	Volumen
GTPazna reakcija	25 μL
GTP-Glo reagens	25 μL
Detekcijski reagens	50 μL

Pripremi se 2x GTP otopina koja sadrži 10 μmol/L GTP-a i 1 mmol/L ditiotreitola (DTT) u GTPaznom/GAP puferu prema podacima u tablici 14. Ukupan volumen GTPazne reakcije je 25 μL.

Tablica 14. Priprema 2x GTP otopine (10 μmol/L GTP, 1 mmol/L ditiotreitola (DTT)) za provođenja testa intrinzične GTPazne aktivnosti proteina DRG1. Navedeni volumeni pomnože se s odgovarajućim brojem reakcija. Napomena: budući da je minimalni volumen pipete 0,2 μL onda se u 200 μL GTP/GAP pufera treba dodati 0,2 μL 10 mmol/L rGTP-a za konačnu koncentraciju 10 μmol/L. Od 200 μl takve otopine uzme se volumen koji je potreban za željeni broj reakcija te se u taj volumen se doda odgovarajuća količina DTT-a.

Komponentne otopine	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Za jednu reakciju
rGTP	10 mmol/L	10 μmol/L	0,0125 μL
DTT	100 mmol/L	1 mmol/L	0,125 μL
GTP/GAP pufer	-	-	12,36 μL
ukupno	-	-	12,5 μL

Protein DRG1 razrijedi se u GTP/GAP puferu tako da se dobiju željene koncentracije proteina i da volumen bude 12,5 μL po jažici. Reakcija se inicira dodatkom 12,5 μL pripremljene 2x GTP otopine (ukupan volumen reakcije 25 μL) i inkubira se na 8 °C, 25 °C i na 42 °C tijekom 120 min. Neposredno prije upotrebe pripremi se GTP-Glo reagens (tablica 15) pri čemu se reagens ne smije vorteksirati ni zamrzavati. Reagens se ekvilibrira na sobnu

temperaturu. Doda se 25 μL pripremljenog GTP-Glo reagensa u jažice (tj. u završenu GTPaznu reakciju), promiješa se i inkubira miješanjem 30 min pri sobnoj temperaturi. Zatim se doda 50 μL detekcijskog reagensa, inkubira 5-10 min pri sobnoj temperaturi i izmjeri se luminescencija.

Tablica 15. Priprema GTP-Glo reagensa za provjeru GTPazne aktivnosti proteina DRG1

Komponente	Volumen
GTP-Glo reagent 500x	2 μL
ADP, 10 mmol/L	0,5 μL
GTP-Glo pufer	998 mL
Ukupan volumen:	1 mL

3.2.3.2. Gel-filtracija proteina DRG1

Gel-filtracija ili kromatografija isključenjem (engl. *Size Exclusion Chromatography*) analitička je metoda kojom je moguće odvojiti manje molekule, peptide, proteine ili oligonukleotide na temelju njihove veličine.⁴⁹ Stacionarnu fazu unutar kolone čine porozni materijali sfernih čestica koji su stabilni, inertni i nemaju adsorpcijska svojstva. Kolona izrađena od takvih kuglica ima dva mjerljiva volumena tekućine, vanjski volumen koji se sastoji od tekućine između zrna i unutarnji volumen koji se sastoji od tekućine unutar pora zrna. Velike molekule će se uravnotežiti samo s vanjskim volumenom, dok će se male molekule uravnotežiti s vanjskim i s unutarnjim volumenom. Molekule koje su veće od pora stacionarne faze, odnosno čiji je hidrodinamički promjer veći od prosječnog promjera pora zrnaca izlaze prve iz kolone, dok molekule čiji je hidrodinamički promjer manji od prosječnog promjera pora zrnaca pristupaju cijelom unutarnjem volumenu i zaostaju u koloni.⁵⁰ Za razliku od afinitetne kromatografije, kod gel-filtracije molekule se ne vežu za kromatografski medij pa sastav pufera koji ispunjava kolonu ne utječe izravno na razlučivanje. To je prednost ove metode jer se uvjeti mogu mijenjati ovisno o vrsti uzorka ili zahtjevima daljnjeg pročišćavanja.⁵¹ Gel-filtracijom moguće je odrediti molekularnu veličinu, odvojiti komponente smjese, promijeniti pufer ili ukloniti soli⁴⁹, a prikladna je za analizu biomolekula koje su osjetljive na promjene pH, koncentracije metalnih iona ili kofaktora. Odvajanje se može provesti u prisutnosti

esencijalnih iona ili kofaktora, deterdženata, uree, gvanidin hidroklorida, pri visokoj ili niskoj ionskoj čvrstoći, na 37 °C ili u hladnoj prostoriji u skladu sa zahtjevima eksperimenta.⁵¹

Gel-filtracijom moguće je odrediti molekulsku masu proteina DRG1. Analiza je provedena na uređaju ÄKTA-FPLC korištenjem kolone *SuperdexTM 200 Increase 10/300 GL* za volumen uzorka od 120 µL. Preporučeno je za ovu kolonu koristiti 25–500 µL uzorka koncentracije do 10 mg/mL, tj. volumen nanesenog uzorka treba biti 0,4–2 % volumena kolone. Prije nanošenja uzorka proteina kolona je isprana s MiliQ vodom (redestilirana i profiltrirana voda s provodljivošću do 18,2 mΩ) te ekvilibrirana puferom sastava: 25 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol/L NaCl. Pufer i voda su prije gel-filtracije filtrirani kroz filter veličine pora 0,45 µm te su odzračeni 10 min pomoću ultrazvučne kupelji. Uzorak proteina otopljen je u korištenom eluensu (25 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol/L NaCl) i profiltriran kroz filter s porama veličine 0,22 µm ili centrifugiran pri 10000×g 10 min. Gel-filtracija provedena je na 21 °C uz konstantan protok 1,0 mL min⁻¹. Kroz kolonu su prvo provedeni odgovarajući gel-filtracijski standardi (BIO RAD) (volumena 120 µL), zatim plavi dekstran koncentracije 5 mg/mL za određivanje praznog volumena stupca (V_0), a zatim je uzorak proteina (120 µL) izokratno eluiran. Tijek pročišćavanja praćen je UV detektorom pri valnoj duljini 280 nm. Dobivene proteinske frakcije spojene su i analizirane SDS-PAGE elektroforezom i tehnikom *western blotting*-a. Iz volumena elucija gel-filtracijskih standarda u ovisnosti o parametru $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ izrađena je standardna krivulja na osnovu koje se određuje molekulska masa proteina DRG1. Parametar K_{av} izračunat je prema navedenoj formuli gdje je V_e volumen elucije, V_0 je volumen prazne kolone koji je jednak volumenu elucije molekula koje ostaju u puferu jer su veće od najvećih pora matrice i stoga prolaze ravno kroz kolonu, a V_t je ukupan volumen kolone.

3.2.4. Bioinformatičke metode

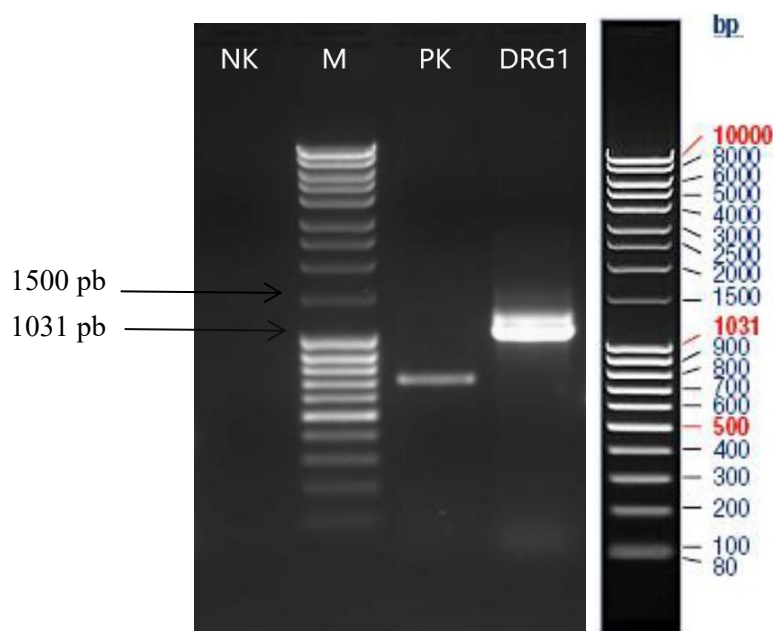
Istraživanje proteinskih i nukleotidnih sekvenci te analiza proteinskih domena od velike je važnosti za razumijevanje funkcije proteina. Pritom se koriste brojne bioinformatičke metode. NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) je web poslužitelj koji omogućuje pretraživanje baza podataka važnih za biotehnologiju i biomedicinu. Glavne baze podataka uključuju *GenBank* (za sekvence DNA) i *PubMed* (bibliografsku bazu podataka za biomedicinsku literaturu). Dio tog web poslužitelja je algoritam BLAST koji omogućuje pretraživanje baze podataka pomoću nukleotidnog ili proteinskog slijeda. Program je korišten za prikupljanje proteinskih sekvenci različitih organizama i njihovu usporedbu s proteinskom sekvencom *Eunapius subterraneus*. Za poravnavanje nukleotidnih i proteinskih sekvenci koristili su se programi MEGA i *ClustalX2* te opcija *Aligment*, a poravnate sekvence obradile su programom GeneDoc. Pomoću tog programa napravljena je statistička analiza sekvenci odnosno određen je udio sličnih i identičnih aminokiselina između nekoliko različitih organizama. Za prevođenje nukleotidne sekvence u proteinsku korišten je web poslužitelj ExPASy (engl. *the Expert Protein Analysis System*) i opcija *Translate*. ExPASy je globalni web poslužitelj koji omogućuje pristup različitim bazama podataka i analitičkim alatima posvećenim proteinima i proteomici.⁵² Osim toga, korišten je i njegov alat *ProtParam* za analizu proteina i određivanje fizikalnih i kemijskih parametara proteina.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ugradnja cDNA koja kodira spužvin protein DRG1 u ekspresijski vektor pET28b

4.1.1. Umnažanje sljedova lančanom reakcijom polimeraze

Kodirajući slijed nukleotida za protein DRG1 umnožen je PCR metodom koristeći sintetiziranu cDNA špiljske spužvice *Eunapius subterraneus* kao kalup (cDNA sintetizirana je prethodno u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković). Pri tome su korištene početnice dizajnirane na temelju sekvenciranog transkriptoma spužve (odjeljak 3.2.1.1). Ispravnost PCR reakcije provjerila se upotrebom pozitivne i negativne kontrole. Pozitivna kontrola sadržavala je cDNA koja je kodirala za citokrom-oksidadazu, a negativna kontrola sadržavala je sve komponente reakcijske smjese osim kalupa. Rezultati dobiveni umnažanjem kodirajućeg slijeda PCR-om prikazani su na slici 12.

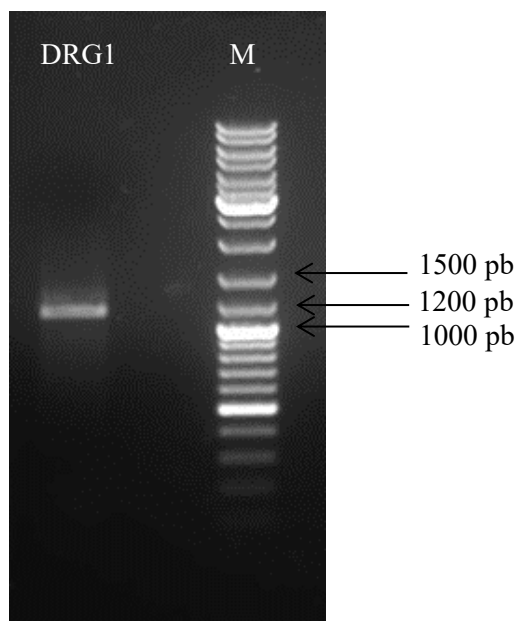


Slika 12. Umnoženi nukleotidni slijed veličinom odgovara veličini fragmenta DRG1. Nukleotidni slijed dobiven je lančanom reakcijom polimeraze, a analiziran je agaroznom gel elektroforezom. Na slici desno prikazan je marker *MassRuler DNA Ladder Mix*. **NK** – negativna kontrola bez kalupa, **M** – marker *MassRuler DNA Ladder Mix*, **PK** – pozitivna kontrola, **DRG1** – umnoženi fragment DRG1

Na gel je nanjena negativna kontrola koja ne sadži kalup, a zatim redom idu marker *MassRuler DNA Ladder Mix*⁵³, pozitivna kontrola i umnoženi fragment DRG1. Nedostatak pruge kod negativne kontrole je u skladu s očekivanim jer u tom uzorku nema kalupa pa se nema što ni umnožiti. Kada bi se pojavila pruga u uzorku negativne kontrole to bi ukazivalo na kontaminaciju reakcijske smjese ili na nespecifično sljepljivanje početnica. Pozitivna kontrola dala je prugu između 700 i 800 pb što je potvrdilo ispravnost komponenti PCR reakcije i uvjete postavljene na uređaju za PCR. Nedostatak pruge pozitivne kontrole ukazivao bi da nešto nije u redu s uvjetima reakcije. Uspoređivanjem veličine fragmenta DRG1 s markerom vidjelo se da se fragment nalazio na odgovarajućoj veličini između 1031 pb i 1500 pb. Umnoženi fragment DRG1 dodatno je potvrđen sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom i analizom sekvence pomoću bioinformatičkih programa navedenih u odjeljku 3.2.4.

4.1.2. Umnažanje DRG1 fragmenta lančanom reakcijom polimeraze s početnicama koje sadrže mjesto za djelovanje restriksijskih enzima

Umnoženi fragment DRG1 podvrgnut je PCR reakciji s početnicama koje sadrže mjesta za djelovanje restriksijskih enzima *NdeI* i *BamHI* u svrhu ugradnje restriksijskih mjesta na krajeve fragmenta DRG1. Restriksijska mjesta potrebno je dodati PCR reakcijom na krajeve kako bi se cDNA koja kodira spužvin protein DRG1 mogla ugraditi u ispravan okvir čitanja ekspresijskog vektor pET28b. Vektor pET28b odabran je jer posjeduje jak promotor (T7-promotor) koji omogućuje proizvodnju velike količine proteina. T7-promotor reguliran je *lac* operatorom i *lac* represorom čime se sprječava ekspresija proteina prije indukcije. Osim toga, vektor pET28b posjeduje velik broj restriksijskih mjesta. Restriksijska mjesta za enzime *NdeI* i *BamHI* nalaze se upravo ispred T7-promotora i odabrana su jer cDNA koja kodira za DRG1 ne sadži mjesta za djelovanje tih restriksijskih enzima. Bitno je da se ne koriste restriksijski enzimi koji mogu razgraditi kodirajući slijed za protein DRG1. Uspješnost umnažanja DRG1 fragmenta PCR metodom provjerila se agaroznom gel-elektroforezom. Na gel je nanjen uzorak DRG1, a zatim marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*⁵⁴.



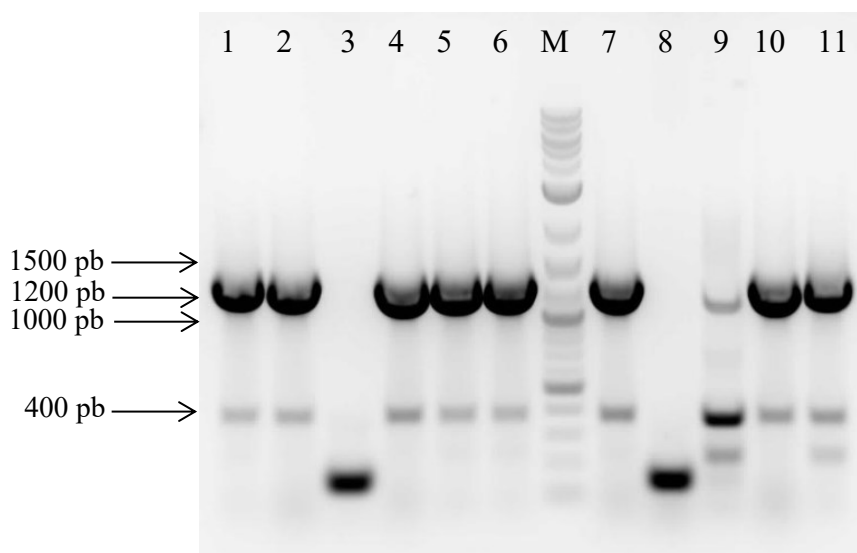
Slika 13. Umnoženi DNA fragment DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus*. Fragment je umnožen lančanom reakcijom polimeraze s početnicama koje su sadržavale mjesta za djelovanje restrikcijskih enzima *NdeI* i *BamHI*. Rezultati PCR-a prikazani su na agaroznom gelu. **DRG1** – umnoženi fragment DRG1, **M** – marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*

Rezultat agarozne gel-elektroforeze (slika 13) prikazuje jednu prugu. Usporedbom pruge s markerom procijenjena je njezina veličina između 1000 pb i 1200 pb što odgovara umnoženom fragmentu DRG1 koji sadrži mjesta za djelovanje restrikcijskih enzima. Izmjerena koncentracija pročišćenog i restrikcijskim enzimima razgrađenog fragmenta DRG1 iznosi 15,88 ng/ μ L.

4.1.3. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama nakon elektroporacije

Fragment DRG1 s ugrađenim mjestima za djelovanje restrikcijskih enzima i vektor pET28b razgrađeni su restrikcijskim enzimima *NdeI* i *BamHI* te su povezani reakcijom ligacije i elektroporirani u elektrokompetentne stanice *One Shot[®] TOP10 ElectrocompTM E. coli*. Te stanice odabrane su zbog visoke učinkovitosti kloniranja. Dokaz uspješnosti elektroporacije je rast bakterijskih kolonija na LB ploči s kanamicinom. Na selektivnoj LB/Kan ploči narasle su samo one bakterijske kolonije u kojima je transformacija uspješno provedena jer vektor pET28b ima otpornost na kanamicin. Nasumično su odabrane kolonije koje su analizirane PCR-om na kolonijama kako bi se provjerilo sadrže li te kolonije rekombinantni plazmid

pET28b_DRG1. Rezultat PCR-a na kolonijama prikazan je na agaroznom gelu (slika 14). Na gel je nanesen marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, te uzorci kolonija DRG1_1, DRG1_2, DRG1_3, DRG1_4, DRG1_5, DRG1_6, DRG1_7, DRG1_8, DRG1_9, DRG1_10, DRG1_11.



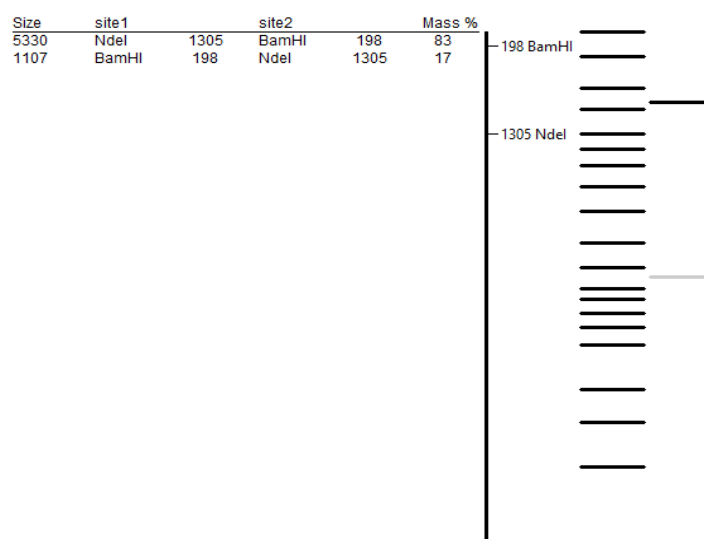
Slika 14. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama nakon elektroporacije ligacijske smjese u stanice *One Shot® TOP10 Electrocomp™ E. coli* potvrdila je uspješnost transformacije. **1** – kolonija DRG1_1, **2** – kolonija DRG1_2, **3** – kolonija DRG1_3, **4** – kolonija DRG1_4, **5** – kolonija DRG1_5, **6** – kolonija DRG1_6, **M** – marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, **7** – kolonija DRG1_7, **8** – kolonija DRG1_8, **9** – kolonija DRG1_9, **10** – kolonija DRG1_10, **11** – kolonija DRG1_11.

Uzorci kolonija DRG1_1, DRG1_2, DRG1_4, DRG1_5, DRG1_6, DRG1_7, DRG1_9, DRG1_10, DRG1_11 ukazuju na uspješnost elektroporacije rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 u elektrokompetentne stanice. Gornja pruga tih uzoraka izraženijeg je intenziteta i nalazila se pri otprilike 1200 pb što odgovara veličini fragmenta DRG1 umnoženog s T7T i T7P početnicama. Donja pruga slabijeg intenziteta nalazila se na veličini od otprilike 400 pb te je najvjerojatnije posljedica nastanka nespecifičnog produkta. Uzorci kolonija DRG1_3 i DRG1_8 nisu ukazivali na postojanje rekombinantnog plazmida, ali je u tim uzorcima uočen fragment praznog vektora što znači da je PCR bio dobro postavljen, no bakterijska kolonija transformirana je praznim plazmidom.

Na slici 14. izražen je "smile" efekt koji je javlja kao posljedica zagrijavanja sustava uslijed otpora koji se javlja prilikom prolaska struje kroz gel i pufer. Efekt je izraženiji iznad 1000 pb jer je tijekom elektroforeze pojačana jakost električnog izvora.

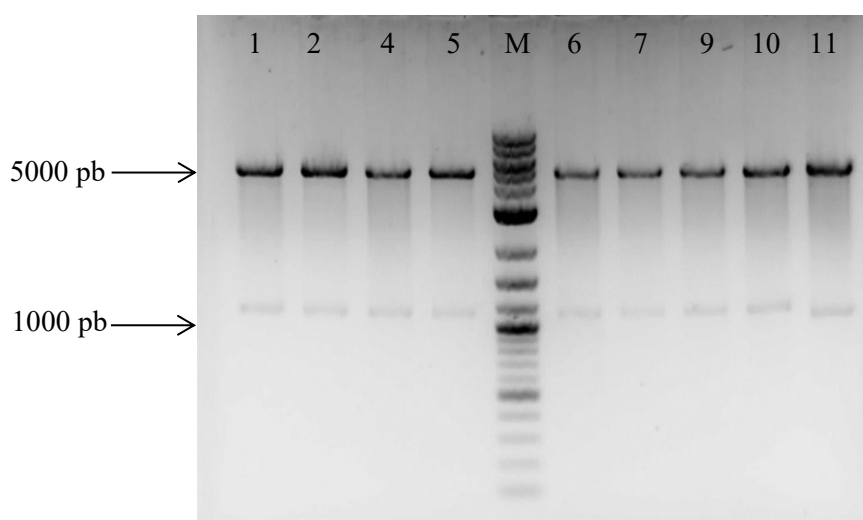
4.1.4. Razgradnja rekombinantnog plazmida restriksijskim enzimima

Na temelju rezultata PCR-a na kolonijama odabrani su uzorci koji sadrže rekombinantne plazmide pET28b_DRG1 koji su potom izolirani i razgrađeni restriksijskim enzimima. Vektor pET28 u koji je ugrađen kodirajući slijed za protein DRG1 razgrađen je restriksijskim enzimima *NdeI* i *BamHI* kako bi se provjerilo je li to doista rekombinantan plazmid. Pomoću programa ApE dobila se predikcija slike gela nakon razgradnje rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 restriksijskim enzimima *NdeI* i *BamHI*. U prozor programa kopirao se nukleotidni slijed rekombinantnog plazmida, te su uz opciju *Enzymes* odabrani željeni enzimi. Nakon toga se uz opciju *Digestion* otvorio novi prozor programa koji je prikazao izgled gela (slika 15). Prema programu ApE gornja pruga na slici 15. sadržavala je 5330 pb, a donja pruga 1107 pb.



Slika 15. Razgradnja rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 restriksijskim enzimima *NdeI* i *BamHI* dobivena pomoću programa ApE. Veličina gornje pruge iznosila je 5330 pb, a veličina donje pruge iznosila je 1107 pb.

Rezultat razgradnje rekombinantnog plazmida restrikcijским enzimima prikazan je na agaroznom gelu (slika 16). Na gel su nanesti uzorci rekombinantnih plazmida pET28b_DRG1_1, pET28b_DRG1_2, pET28b_DRG1_4, pET28b_DRG1_5, marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, pET28b_DRG1_6, pET28b_DRG1_7, pET28b_DRG1_9, pET28b_DRG1_10, pET28b_DRG1_11. Dobiveni rezultati prikazali su dvije pruge na odgovarajućim veličinama, iznad 5000 pb i iznad 1000 pb te poklapaju s dobivenim rezultatima prikazanim na slici 15.



Slika 16. Razgradnja rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 restrikcijским enzimima *NdeI* i *BamHI*. Dobivene pruge na agaroznom gelu potvrdile su postojanje rekombinantnog plazmida. Gornja pruga veličinom je odgovarala vektoru pET28b, a donja pruga *insertu*. **1** – plazmid pET28b_DRG1_1, **2** – plazmid pET28b_DRG1_2, **4** – plazmid pET28b_DRG1_4, **5** – plazmid pET28b_DRG1_5, **M** – marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, **6** – plazmid pET28b_DRG1_6, **7** – plazmid pET28b_DRG1_7, **9** – plazmid pET28b_DRG1_9, **10** – plazmid pET28b_DRG1_10, **11** – plazmid pET28b_DRG1_11.

4.1.5. Sekvenciranje i analiza rekombinantnog plazmida

Metode PCR na kolonijama i razgradnje rekombinantnog plazmida pET28b_DRG1 restrikcijским enzimima korištene su za provjeru ugradnje *inserta* u vektor, no za provjeru mogućih mutacija, određivanje orijentacije i ispravnosti ugradnje *inserta* bilo je potrebno odrediti slijed nukleotida rekombinantnog plazmida. Dobivena sekvenca analizirana je programima MEGA, *Clustal X2* i GeneDoc. Dobivena nukleotidna sekvenca rekombinantnog plazmida prevedena je u proteinsku sekvencu pomoću ExPASy programa (opcija *Translate*).

Sekvenca je prikazana usporedno s proteinskom na slici 17., a započeta je histidinskim privjeskom koji je označen plavom bojom.

```

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

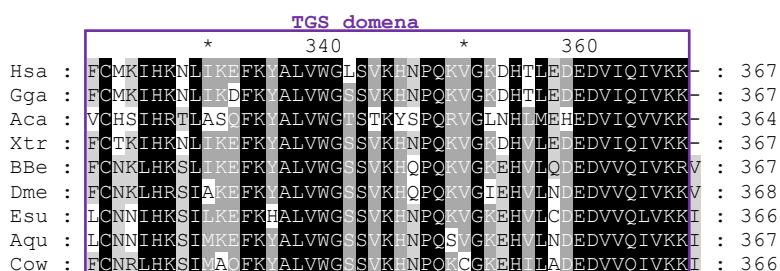
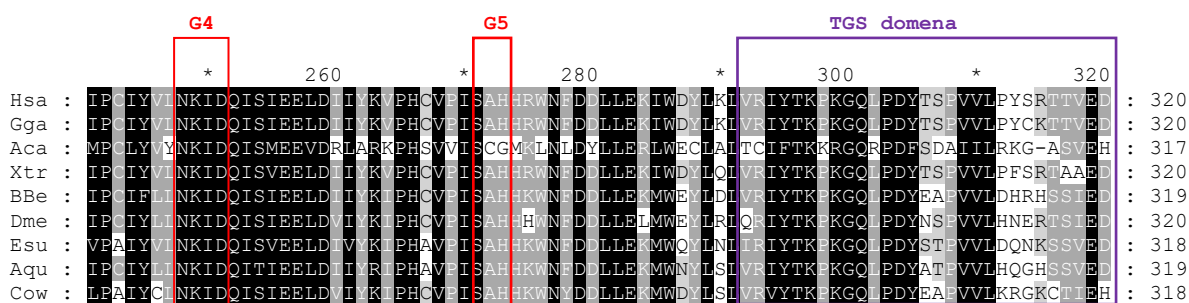
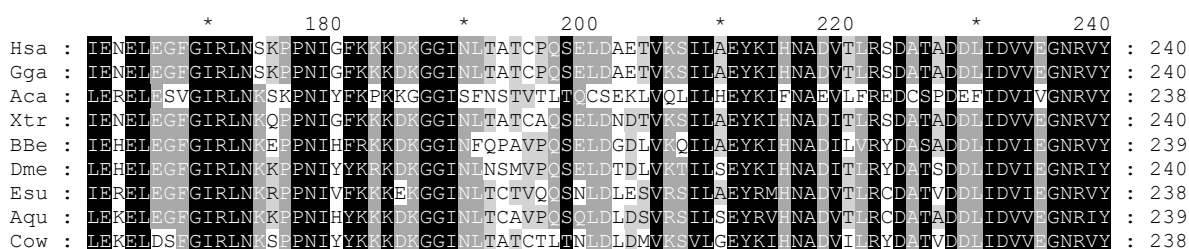
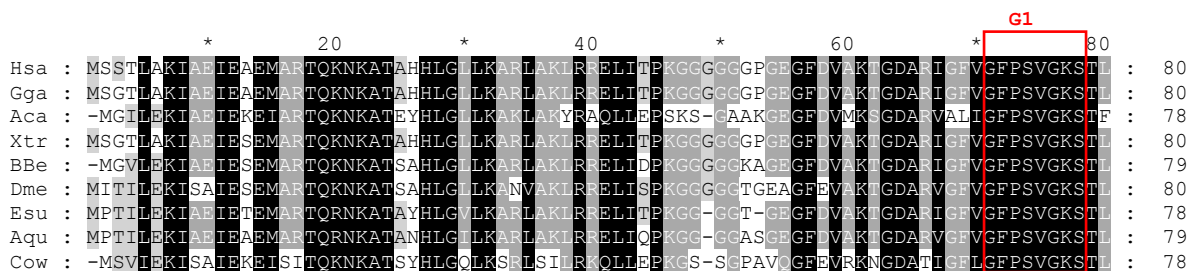
```

Slika 17. Nukleotidna i proteinska sekvenca proteina DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* označenim očuvanim karakterističnim regijama za protein. Žutom bojom označeni su kodoni za početak i kraj proteina, crvenom bojom označeno je pet *G box* regija, sivom su označene regije *Switch I* i *Switch II*, a ljubičastom bojom označena je domena TGS.

Na slici 17. su žutom bojom označeni kodoni za početak i kraj proteina kao i očuvane regije proteina DRG1. Očuvane regije, njihov položaj i primarna struktura pronađene su pomoću internetske stranice NCBI koja omogućuje pretraživanje baza podataka važnih za biotehnologiju i biomedicinu. Pomoću alata BLAST pronađena su područja sličnosti između bioloških sekvenci i uspoređena je proteinska sekvenca s bazom podataka. Pronađeno je pet *G box* očuvanih regija koje su označene crvenom bojom na slici 17. i dvije *Switch* regije koje su označene sivom bojom. TGS domena označena je ljubičastom bojom, a pronađena je pomoću internetske stranice SMART (engl. *Simple Modular Architecture Research Tool*,

<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Motiv G1 sadrži aminokiselinski slijed Gly-Phe-Pro-Ser-Val-Gly-Lys-Ser što čini karakterističnu petlju za vezanje fosfata. Motiv G2 preklapa se sa *Switch I* regijom i sadrži samo jednu aminokiselinu, Thr, koja je sačuvana unutar superobitelji. Aminokiseline Asp-Leu-Pro-Gly sastavni su dio motiva G3 koji se preklapa sa *Switch II* regijom. Motiv G4 sadrži Asn-Lys-Ile-Asp aminokiseline, a motiv G5 Ser-Ala-His aminokiseline. Regija *Switch I* naziva se još i efektor regija, te čini jednu od dvije petlje koje podliježu konformacijskim promjenama nakon vezivanja GTP-a. Građena je od 10 aminokiselina, a to su Ala-Glu-Tyr-Asp-Phe-Thr-Thr-Leu-Thr-Thr. Druga petlja koja podliježe konformacijskim promjenama uslijed vezivanja GTP-a je regija *Switch II* koju čine Leu-Asp-Leu-Pro-Gly-Ile-Ile-Glu-Gly-Ala-Lys-Asp-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly-Arg-Gln-Val-Ile-Ala-Val-Ala-Arg-Thr aminokiseline. Domena TGS nalazi se na C-kraju proteina. Ima 75 aminokiselina, a započinje aminokiselinom izoleucin koja se nalazi na 290. položaju i proteže se do 364. položaja gdje se nalazi lizin.

Navedene sačuvane regije prikazane su i na slici 18. koja prikazuje proteinske sekvence devet različitih modelnih organizama: čovjeka, *Homo sapiens* (Hsa); divlje kokoši, *Gallus gallus* (Gga); zelene anole, *Anolis carolinensis* (Aca); tropske pandžaste žabe, *Xenopus tropicalis* (Xtra); kopljače, *Branchiostoma belcheri* (Bbe); vinske mušice, *Drosophila melanogaster* (Dme); Ogulinske špiljske spužvice, *Eunapius subterraneus* (Esu); morske spužve, *Amphimedon queensladica* (Aqu) i ameboidnog protista *Capsaspora owczarzaki* (Cow). Sekvence navedenih organizama pronađene su pomoću proteinske sekvence proteina DRG1 i alata BLAST, a poravnate su programom *Clustal X2*. Nakon poravnavanja sekvence su obrađene programom GeneDoc. Prema slici 18. uočena je visoka razina očuvanosti navedenih regija. Motivi G1, G2, G3 i G4 u potpunosti su očuvani u svim organizmima, dok se motiv G5 razlikuje kod vrste *Anolis carolinensis* (Aca) za dvije aminokiseline.



Slika 18. Usporedba primarne strukture proteina DRG1 iz vrste *Eunapius subterraneus* s primarnom strukturom osam različitih organizama. Crno su označene aminokiseline sačuvane kod svih organizama, tamno sivo su označene aminokiseline sačuvane kod većine organizama, a svijetlosivo označene aminokiseline očuvane su kod manjeg broja vrsti. Crvenom bojom označeno je pet motiva G, sivom su označene regije *Switch I* i *II*, a ljubičastom domena TGS.

Regije *Switch I* i *Switch II* također su visoko očuvane u navedenim organizmima. Ovdje malo odstupa vrsta *Eunapius subterraneus* koja u regiji *Switch I* umjesto alanina ima glutamat, te ima aspartat umjesto glutamata. U programu GeneDoc napravljena je statistička analiza sekvenci za devet različitih organizama (tablica 16). Dobiveni podaci pokazali su udio sličnih (neoznačeno) i identičnih (sivo označeno) aminokiselinskih ostataka. Prema tim rezultatima vrsta *Eunapius subterraneus* (Esu) ima najveći udio identičnih aminokiselinskih ostataka s vrstom *Gallus gallus* (Gga) i on iznosi 81 %, dok najmanji udio identičnih aminokiselina ima s vrstom *Anolis carolinensis* (Aca) i on iznosi 55 %. Najveću sličnost aminokiselinskih ostataka *Eunapius subterraneus* ima s vrstama *Homo sapiens* (Hsa) i *Xenopus tropicalis* (Xtr), a najmanju sličnost ima s vrstom *Anolis carolinensis* i ona iznosi 74 %. Uspoređivanjem *Eunapius subterraneus* i *Homo sapiens* uočena je velika sličnost aminokiselina, čak 91 %, dok je udio identičnih aminokiselina 80 %.

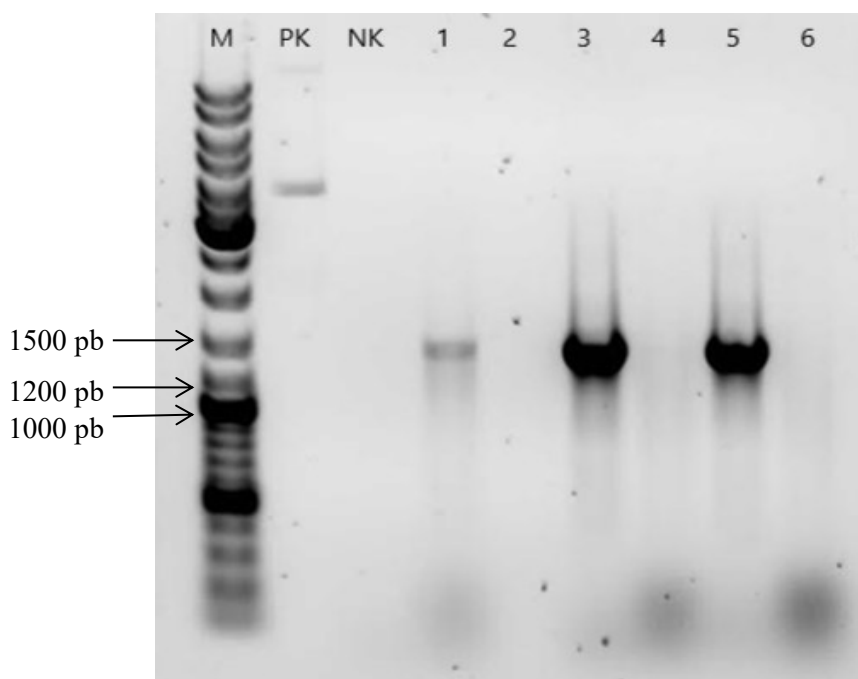
Tablica 16. Udio sličnih (neoznačeno) i identičnih (sivo označeno) aminokiselinskih ostataka za devet različitih organizama dobiven statističkom analizom u programu GeneDoc.

	Hsa	Gga	Aca	Xtr	Bbe	Dme	Esu	Aqu	Cow
Hsa		98 %	56 %	95 %	82 %	80 %	80 %	82 %	71 %
		99 %	73 %	97 %	91 %	90 %	91 %	91 %	84 %
Gga			56 %	95 %	82 %	79 %	81 %	82 %	71 %
			73 %	97 %	92 %	90 %	90 %	90 %	84 %
Aca				55 %	56 %	55 %	55 %	55 %	54 %
				73 %	74 %	73 %	74 %	75 %	75 %
Xtr					83 %	80 %	80 %	81 %	71 %
					92 %	90 %	91 %	91 %	84 %
Bbe						83 %	79 %	82 %	72 %
						92 %	90 %	92 %	85 %
Dme							76 %	81 %	72 %
							89 %	90 %	84 %
Esu								87 %	70 %
								94 %	86 %
Aqu									72 %
									86 %

4.2. Prekomjerna ekspresija spužvinog proteina DRG1

4.2.1. Kemijska transformacija i analiza transformiranih bakterija lančanom reakcijom polimeraze na kolonijama

Uzorak za koji je sekvenciranjem potvrđeno da sadrži ispravno ugrađen *insert* DRG1 u ekspresijski vektor pET28b podvrgnut je kemijskoj transformaciji u *Rosetta-gami*TM 2(DE3) *pLysS* kompetentne stanice. Te stanice su se koristile jer su dizajnirane tako da pojačavaju ekspresiju eukariotskih proteina koji sadrže rijetke kodone. Također, sojevi stanica DE3 sadrže gen za T7-polimerazu koja se specifično veže za T7-promotor i pogodni su za proizvodnju proteina iz ciljnih gena kloniranih u pET vektorima indukcijom s IPTG-om. Kolonije koje su narasle na selektivnom LB/Kan mediju analizirane su PCR-om na kolonijama, a dobiveni rezultati prikazani su na agaroznom gelu (slika 19). Cilj analize PCR-om na kolonijama bio je provjeriti uspješnost transformacije. Na gel je nanesen marker *GeneRuler DNA Ladder Mix*, pozitivna kontrola koja sadrži prethodno ukloniran plazmid DRG1_pET28b, negativna kontrola bez kalupa te redom kolonije od jedan do šest.



Slika 19. Lančana reakcija polimerazom na kolonijama nakon kemijske transformacije stanica s rekombinantnim plazmidom pET28b_DRG1. Uzorci u jažicama tri i pet ukazuju na postojanje inserta DRG1 u vektoru pET28b. **M** – marker *GeneRuler*TM *DNA Ladder Mix*, **PK** – pozitivna kontrola, **NK** – negativna kontrola, **1-6** – kolonije

Pozitivna kontrola sadržavala je prugu slabog intenziteta visoko na gelu što se ne slaže s očekivanom veličinom pruge, a to može biti posljedica pogreške prilikom pripreme uzoraka za PCR. Nedostatak pruge očekivan je za uzorak negativne kontrole jer ona nije sadržavala nikakav kalup. Rezultati agarozne gel elektroforeze koji su upućivali na uspješnost kemijske transformacije i postojanje rekombinantnog plazmida su oni u jažicama označenim brojevima tri i pet. Navedene jažice imale su pruge između 1200 pb i 1500 pb što je veličinom odgovaralo umnoženom fragmentu DRG1 veličine 1383 pb te su ti uzorci odabrani za provođenje prekomjerne ekspresije. Uzorak koji odgovara prvoj koloniji dao je prugu odgovarajuće veličine no jako slabog intenziteta.

4.2.2. Mali uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije

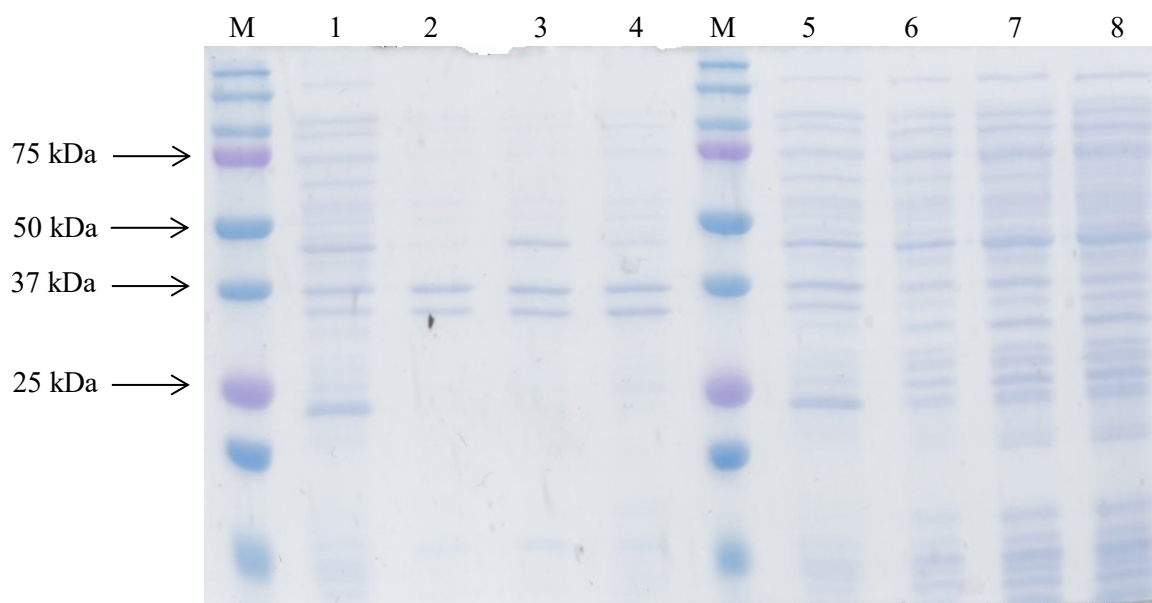
Nakon kemijske transformacije stanica *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) *pLysS* s rekombinantnim plazmidom *pET28b_DRG1* napravljena je indukcija ekspresije proteina DRG1. Ekspresija proteina DRG1 inducirana je dodatkom IPTG-a, a proteini su uzgajani pri 30 °C u trajanju od 3h i pri 16 °C preko noći. Masa fuzijskog proteina DRG1 s His-privjeskom izračunata je pomoću *ExpPASy* web poslužitelja i alata *ProtParam* i iznosila je 42,69 kDa. Proteinska sekvenca tog proteina (slika 20) dobivena je pomoću *ExpPASyTranslateTool*-a i na navedenoj slici započinje His-privjeskom.

```
HHHHHSSGLVPRGSHMPTILEKIAE IETEMARTQ RNKATAYHLGVLKARLAKLRRELI TPK
GGGGTGE GFDVAKTGDARIGFVGFPSVGKSTLLTNVAGVYSEVAEYDFTTLLTTPGVIRYKG
AKIQLLDLPGIIEGAKDGKGRGRQVI AVARTCGLIF IILDV LKPLEHKH IERELEGFGIRL
NKRPPNIVFKKKEKGGINLTCTVQQSNLDLESVRSILAEYRMHNADVTLRCDATVDDLIDVI
EGNRVYVPAIYVLNKIDQISVEELDIVYKIPHAVPISAHHKWNFDDLLEKMWQYLNLIRIYT
KPKGQLPDYSTPVLVDQNKSSVEDLCNNIHKSILKEFKHALVWGSSSVKHNPKQVKGKEHVLCD
EDVVQLVKKI-
```

Slika 20. Proteinska sekvenca proteina DRG1 s His-privjeskom veličine 42,69 kDa dobivena pomoću *ExpPASyTranslateTool*-a. Bojom označeno područje odgovara ORF-u (engl. *Open reading frame*) i sadrži 366 aminokiselina.

Nakon indukcije prekomjerne ekspresije stanice su sonicirane i centrifugirane te su nastali talozi i supernatanti analizirani SDS-PAGE elektroforezom. Na SDS-poliakrilamidni gel (slika 21) nanese je marker *Precision Plus Protein*TM *Dual Color Standards*⁵⁵, a zatim stanice

*Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) *pLysS* bez plazmida. Nakon toga je na gel stavljen talog bakterija prije indukcije, talog proteina nakon indukcije na 30 °C, talog proteina nakon indukcije na 16 °C, marker, stanice *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) *pLysS* bez plazmida, supernatant prije indukcije, supernatant nakon indukcije na 30 °C te supernatant nakon indukcije na 16 °C.



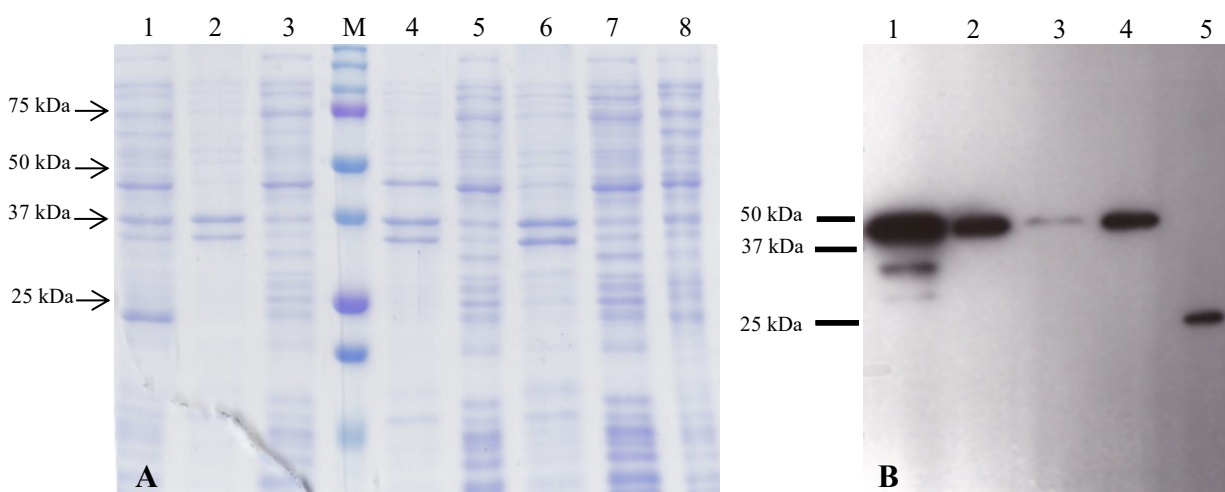
Slika 21. Mali uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije proteina DRG1. Protein je uzgajan 3h na 30 °C indukcijom s 0,8 mmol/L IPTG-om i preko noći pri 16 °C indukcijom s 0,1 mmol/L IPTG-om. **M** – marker *Precision Plus Protein*TM *Dual Color Standards*, **1,5** – stanice *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) *pLysS* bez plazmida, **2** – talog bakterija prije indukcije, **3** – talog proteina nakon indukcije na 30 °C, **4** – talog proteina nakon indukcije na 16 °C, **6** – supernatant prije indukcije, **7** – supernatant nakon indukcije na 30 °C, **8** – supernatant nakon indukcije na 16 °C

Stanice *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) bez plazmida koristile su se kako bi se vidjela razlika proteina koje proizvodi *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) i induciranog proteina koji se očekuje između 37 i 50 kDa. Uzorak taloga bakterija prije indukcije sadržavao je dvije pruge, a uzorak taloga nakon indukcije na 30 °C imao je, osim te dvije pruge, prugu koja odgovara veličinom proteinu DRG1. Ta pruga nalazila se na odgovarajućoj veličini no poklapala se s prugom stanica *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*), pa se nije moglo sa sigurnošću reći da odgovara proteinu DRG1. Talog nakon indukcije na 16 °C imao je izražene dvije pruge kao i talog prije indukcije, a na očekivanoj veličini vidjela se jako slaba pruga. U uzorcima označenim brojevima sedam i osam koji sadrže supernatante nakon indukcije uočeno je zadebljanje pruga na odgovarajućoj

veličini. Te pruge mogu odgovarati proteinu DRG1 no na toj veličini postoji i pruga u uzorku supernatanta prije indukcije.

4.2.3. Western blotting tehnika

Rezultati SDS-PAGE elektroforeze nisu bili dovoljni za potvrdu uspješnosti prekomjerne ekspresije proteina DRG1, stoga je napravljena *western blotting* tehnika s anti-His antitijelima. *Western blotting* tehnikom moguće je specifično detektirati proteine. Uzorci su ponovno nanoseni na gel i provedena je SDS-PAGE elektroforeza. Nakon elektroforeze uzorci su preneseni na membranu i napravljen je *western blotting*. Rezultati *western blotting*-a prikazani su na slici 22.

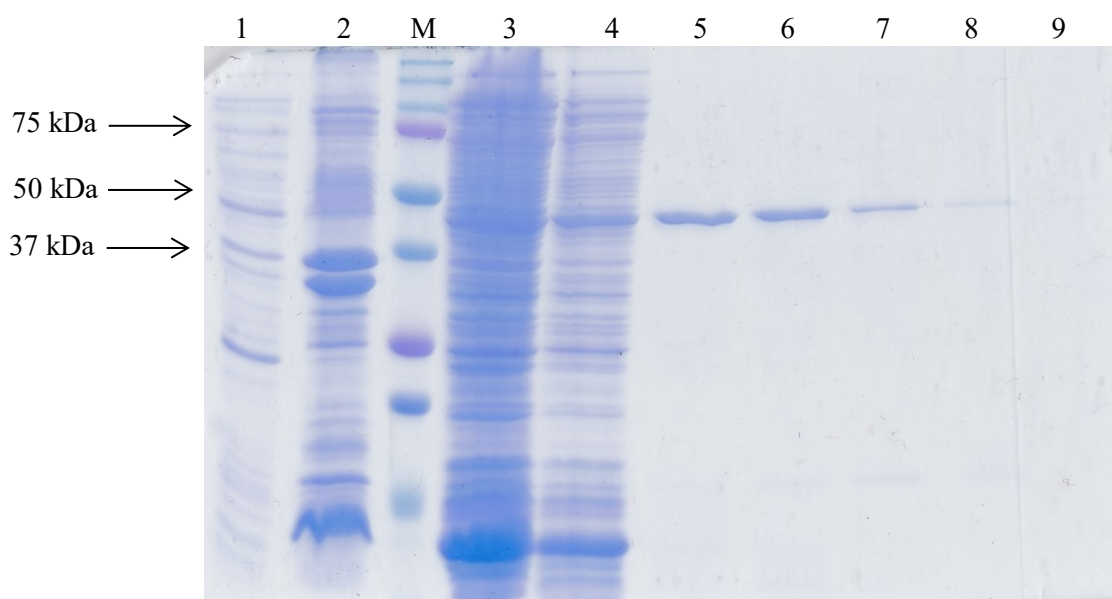


Slika 22. A) Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu nakon malog uzgoja i indukcije prekomjerne ekspresije proteina DRG1. Gel je korišten za elektrotransfer prije *western blotting* tehnike. **1** – stanice *Rosetta-gami*TM 2(DE3) bez plazmida, **2** – talog bakterija prije indukcije, **3** – supernatant prije indukcije, **M** – marker *Precision Plus Protein*TM Standards, **4** – talog proteina nakon indukcije na 30 °C, **5** – supernatant nakon indukcije na 30 °C, **6** – talog proteina nakon indukcije na 16 °C, **7** – supernatant nakon indukcije na 16 °C, **8** – pozitivna kontrola koja sadrži protein Nme6; **B)** *Western blotting* tehnika potvrđuje uspješnost prekomjerne ekspresije proteina DRG1. Rendgenski film bio je izložen membrani 15 s. Lijevo su označene pruge markera *Precision Plus Protein*TM Standards. **1** – talog proteina nakon indukcije na 30 °C, **2** – supernatant nakon indukcije na 30 °C, **3** – talog proteina nakon indukcije na 16 °C, **4** – supernatant nakon indukcije na 16 °C, **5** – pozitivna kontrola koja sadrži protein Nme6

Na gel su nanoseni: stanice *Rosetta-gami*TM 2(DE3) bez plazmida, talog bakterija prije indukcije, supernatant prije indukcije, marker *Precision Plus Protein*TM Standards, talog proteina nakon indukcije na 30 °C, supernatant nakon indukcije na 30 °C, talog proteina nakon indukcije na 16 °C, supernatant nakon indukcije na 16 °C i pozitivna kontrola koja sadrži protein Nme6 (engl. *Non-metastatic cells 6*). Protein Nme6 pripada nukleozid difosfat kinazama i ima His-privjesak pa su za *western blotting* korištena primarna anti-His antitijela. Pozitivna kontrola korištena je kako bi se provjerila ispravnost *western blotting* tehnike. Protein DRG1 potvrđen je na odgovarajućoj veličini od 42,69 kDa na oba stupnja indukcije ekspresije, no najizraženija pruga koja veličinom odgovara proteinu DRG1 pripadala je talogu proteina nakon indukcije pri 30 °C. Unutar tog istog uzorka uočena je jedna manja pruga ispod 37 kDa koja bi mogla biti posljedica raspada proteina. Najmanja ekspresija proteina uočena je kod uzorka taloga proteina nakon indukcije pri 16 °C jer je ondje pruga najslabijeg intenziteta. U oba supernatanta uočene su pruge otprilike jednakih intenziteta. Dakle, protein DRG1 više zaostaje u talogu nakon indukcije pri 30 °C nego pri 16 °C, stoga je odlučeno raditi veliki uzgoj i indukciju prekomjerne ekspresije pri 16 °C preko noći.

4.2.4. Veliki uzgoj i indukcija prekomjerne ekspresije

Indukcija prekomjerne ekspresije proteina DRG1 ponovljena je pri 16 °C preko noći s 0,1 mmol/L IPTG-om u većem volumenu. Nakon provedene indukcije supernatant u kojem su se nalazili stanični proteini pročišćen je na afinitetnoj koloni agaroze Co-NTA na kojoj su se zadržali rekombinantni proteini s histidinskim privjeskom jer je imidazolni prsten histidina ostvario interakcije s metalnim ionom. Dobivene frakcije analizirale su SDS-PAGE elektroforezom. Na SDS-PAGE gel nanosene su stanice *Rosetta-gami*TM 2(DE3) bez plazmida, talog bakterija prije pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, marker *Precision Plus Protein*TM Standards, lizat stanica, proteinski ekstrakti nakon tri ispiranja kolone te eluati. Stanice *Rosetta-gami*TM 2(DE3) bez plazmida opet su korištene u svrhu usporedbe proteina koje one proizvode i proteina nastalog indukcijom IPTG-om. Rezultati SDS-PAGE elektroforeze prikazani su na slici 23.

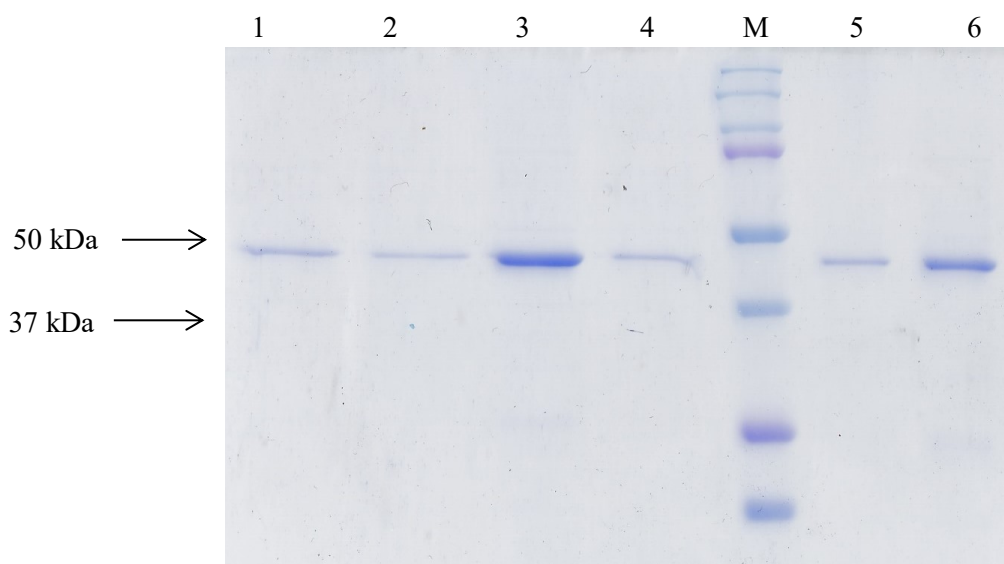


Slika 23. Veliki uzgoj bakterija i indukcija prekomjerne ekspresije proteina DRG1 pri 16 °C preko noći s 0,1 mmol/L IPTG-om. **1** - stanice *Rosetta-gami*TM 2(*DE3*) bez plazmida, **2** – talog bakterija prije pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, **M** – marker *Precision Plus Protein*TM *Standards*, **3** – lizat stanica, **4** – proteinski ekstrakt nakon prvog ispiranja kolone, **5** – proteinski ekstrakt nakon drugog ispiranja kolone, **6** – proteinski ekstrakt nakon trećeg ispiranja kolone, **7** – eluat jedan, **8** – eluat dva, **9** – eluat tri

U uzorku taloga bakterija prije pročišćavanja afinitetnom kromatografijom nije uočena pruga na željenoj veličini. Pruge koje su se nalazile na odgovarajućoj veličini između 37 kDa i 50 kDa uočene su u uzorcima nakon ispiranja proteinskih ekstrakta i u uzorcima eluata jedan i dva. Uzorci koji su sadržavali proteinske ekstrakte nakon ispiranja kolone imali su pruge izraženijeg intenziteta u odnosu na eluate. Proteinski ekstrakt nakon prvog ispiranja sadržavao je mnoštvo pruga koje je teško razlikovati. Frakcija staničnog lizata koji je samo propušten kroz kolonicu sadržavala je nespecifično vezane stanične ekstrakte. Odlučeno je zasebno ukoncentrirati proteinski ekstrakt nakon drugog ispiranja, a uzorke proteinskog ekstrakta nakon trećeg ispiranja te eluate jedan i dva zajedno ukoncentrirati.

4.2.5. Ukoncentriravanje proteina i promjena pufera

Uzorci proteinskog ekstrakta i eluati nakon pročišćavanja proteina DRG1 afinitetnom kromatografijom ukoncentrirani su pomoću *Amicon*[®] *Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices*. Navedeni uzorci nakon ukoncentriravanja analizirani su SDS-PAGE elektroforezom (slika 24). Uzorak proteinskog ekstrakta nakon drugog ispiranja ukoncentriran je zasebno, dok su uzorci nakon trećeg ispiranja i eluati jedan i dva ukoncentrirani zajedno. Na gel je nanesen filtrat uzorka proteina nakon drugog ispiranja, filtrat uzoraka koji sadrži eluate i proteinski ekstrakt nakon trećeg ispiranja, a zatim slijede isti uzorci nakon promjene pufera, marker *Precision Plus Protein*[™] *Standards* i koncentracije uzoraka.



Slika 24. Ukoncentriravanje proteina DRG1 pomoću *Amicon*[®] *Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices*. **1** – filtrat proteinskog ekstrakta nakon drugog ispiranja, **2** – filtrat proteinskog ekstrakta nakon trećeg ispiranja + eluati, **3** – proteinski ekstrakt nakon drugog ispiranja s promijenjenim puferom, **4** – proteinski ekstrakt nakon trećeg ispiranja + eluati s promijenjenim puferom, **M** – marker *Precision Plus Protein*[™] *Standards*, **5** – koncentrat proteinskog ekstrakta nakon trećeg ispiranja + eluati, **6** – koncentrat proteinskog ekstrakta nakon drugog ispiranja

Svi analizirani uzorci imali su pruge na odgovarajućoj veličini između 37 i 50 kDa, no uzorci filtrata ne bi smjeli sadržavati pruge. To ukazuje na curenje proteina iz centrikona (nominalna granica molekularne težine bila je 10000 Da) prilikom ukoncentriravanja. Uzorak proteinskog ekstrakta nakon drugog ispiranja s promijenjenim puferom sadržavao je najizraženiju prugu.

Koncentrat proteina DRG1 nakon drugog ispiranja također je rezultirao intenzivnom prugom što je potvrđeno izmjerenom koncentracijom koja je iznosila 0,604 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (tablica 17). Dakle, prema ovim rezultatima većina proteina izašla je s kolone nakon drugog ispiranja.

Tablica 17. Koncentracije uzoraka DRG1 proteina iz vrste *Eunapius subterraneus* nakon velike indukcije pri 16 °C preko noći

Uzorak proteina:	Koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$):	Omjer apsorbancija pri 260 nm i 280 nm
Koncentrat proteinskog ekstrakta nakon drugog ispiranja	0,604	1,8
Koncentrat proteinskog ekstrakta nakon trećeg ispiranja + eluati	0,157	2,6

4.3. Biokemijska karakterizacija proteina DRG1

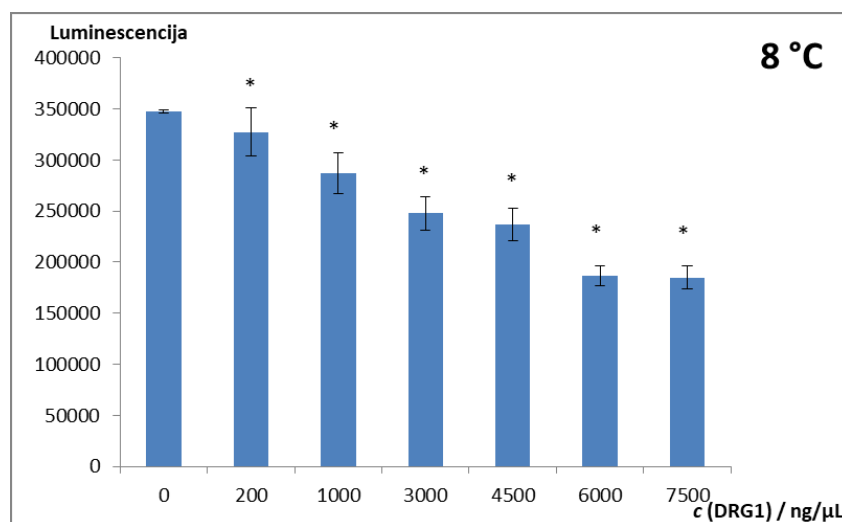
4.3.1. GTPazna aktivnost proteina DRG1

GTPazna aktivnost DRG1 proteina analizirana je pomoću testa *GTPase-Glo*TM. Detektirala se količina neizreagiranog GTP-a mjerenjem bioluminescencije ATP-a koji je nastao iz neiskorištenog GTP-a. Mjerenja su provedena pri različitim koncentracijama proteina: 200 ng/μL, 1000 ng/μL, 3000 ng/μL, 4500 ng/μL, 6000 ng/μL i 7500 ng/μL i pri različitim temperaturama: pri 8 °C, 25 °C i pri 42 °C. Rezultati mjerenja prikazani su tablično te su statistički analizirani (tablica 18). Za izračun statističke značajnosti rezultata korišten je Studentov t-test pri čemu su vrijednosti luminescencije pri različitim koncentracijama uspoređene s kontrolom koja nije sadržavala protein DRG1 (0 ng/μL). Na temelju tablice 18. napravljene su slike 25-30 koje prikazuju GTPaznu aktivnost proteina DRG1 pri različitim temperaturama.

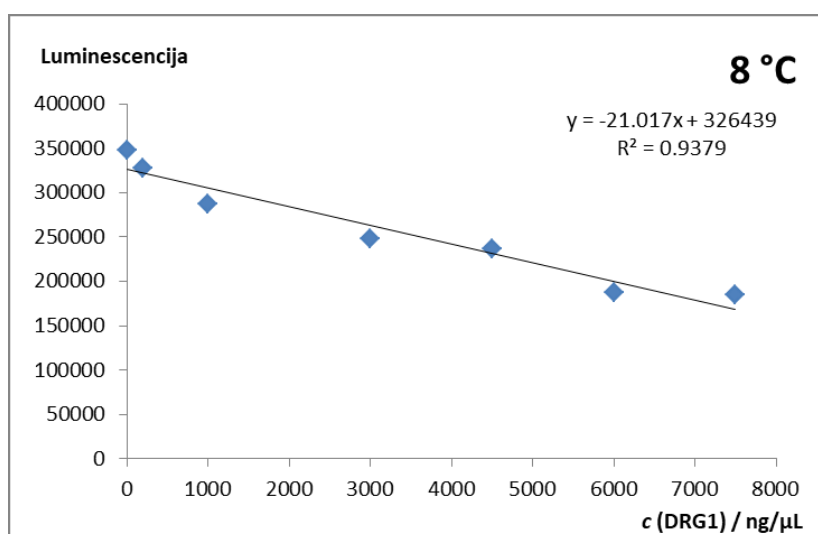
Tablica 18. GTPazna aktivnost proteina DRG1 izmjerena na tri različite temperature – 8 °C, 25 °C i 42 °C. Mjerena je količina neizreagiranog GTP-a koja se prevela u ATP pomoću reagensa GTP-Glo. Nastali ATP detektira se mjerenjem bioluminescencije. Iz dobivenih vrijednosti (napravljeno je 6 mjerenja, n=6) izračunata je standardna devijacija. Studentovim t-testom izračunata je statistička značajnost između pojedinog uzorka i kontrole (0 ng/μL) na istoj temperaturi. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

<i>c</i> (DRG1) / ng/μL		0	200	1000	3000	4500	6000	7500
Luminescencija	8 °C	347432	327329	287050	247582	237212	186899	184980
	25 °C	944171	835352	648515	409455	136571	97566	61965
	42 °C	674270	647736	474531	143569	198330	96052	53105
Standardna devijacija, σ	8 °C	1467	23699	19940	16799	15899	9973	10911
	25 °C	11508	23728	113564	28937	1648	845	354
	42 °C	11359	6134	5600	1343	8866	6094	2623
t-test	8 °C	/	5.74×10^{-7}	4.78×10^{-7}	4.37×10^{-7}	4.13×10^{-7}	1.14×10^{-7}	2.08×10^{-7}
	25 °C	/	5.02×10^{-5}	5.70×10^{-2}	5.09×10^{-4}	5.64×10^{-7}	6.16×10^{-7}	5.84×10^{-7}
	42 °C	/	3.50×10^{-3}	7.81×10^{-11}	3.70×10^{-8}	3.65×10^{-12}	8.83×10^{-11}	7.89×10^{-9}

Slika 25. prikazuje GTPaznu aktivnost proteina DRG1 pri 8°C i različitim koncentracijama proteina. Vrijednosti dobivene t-testom ukazale su na statistički značajnu razliku između svakog uzorka i kontrole, te su takvi podaci označeni zvjezdicom na grafu. Slika 26. prikazuje ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 8 °C zajedno s izračunatim koeficijentom determinacije (R^2) koji iznosi 0,9379. Regresijski model je reprezentativniji što je koeficijent determinacije bliži 1 i govori koliko je prihvatljivo donositi predviđanja na temelju tog modela.

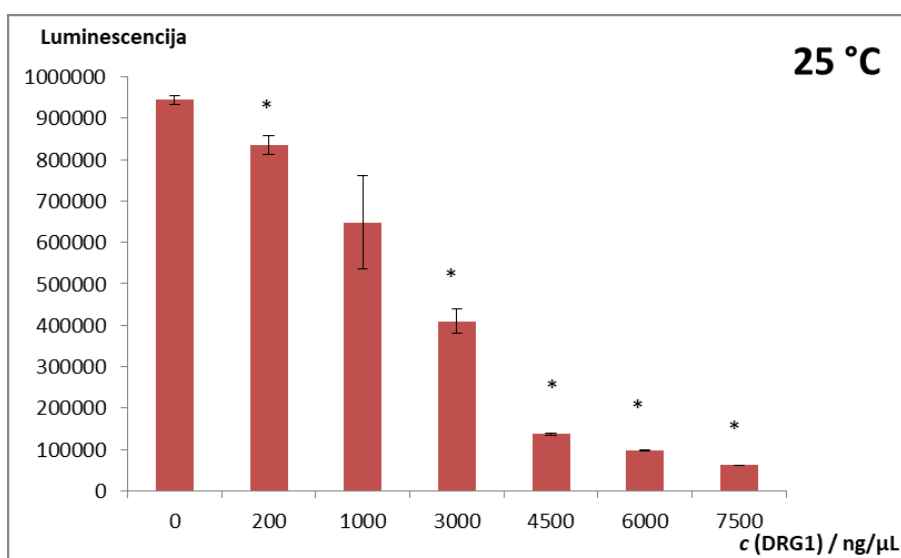


Slika 25. GTPazna aktivnost proteina DRG1 pri 8 °C i različitim koncentracijama proteina. Mjerena je luminescencija koja je odgovarala količini neiskorištenog GTP-a. Uzorak koji nije sadržavao protein DRG1 služio je kao kontrola. Na slici su zvjezdicama označene vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od kontrole, dok su vertikalnim crticama označene standardne devijacije. Napravljeno je 6 mjerenja ($n=6$), a razina statističke značajnosti postavljena je na $p<0,05$.

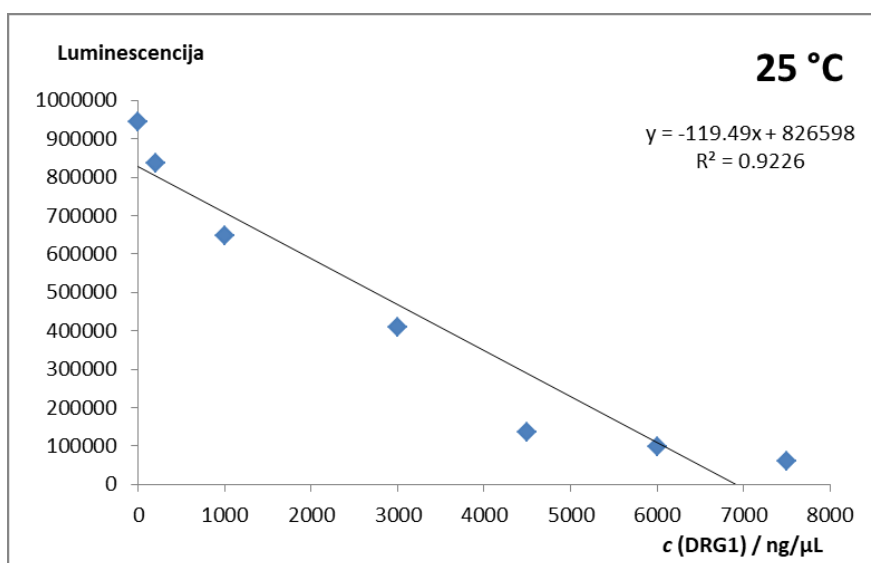


Slika 26. Ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 8 °C je linearna. Na grafu je prikazan koeficijent determinacije R^2 . Što je R^2 bliži 1 model je reprezentativniji.

Slika 27. prikazuje GTPaznu aktivnost proteina DRG1 pri 25 °C gdje su statistički značajni podaci označeni zvjezdicom. Statističkom analizom pokazano je da se uzorak 1000 ng/μL pri 25 °C statistički ne razlikuje od kontrole jer je p-vrijednost veća od 0,05. Slika 28. prikazuje ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina pri 25 °C prikazujući jednadžbu reakcije i R^2 koji iznosi 0,9226.

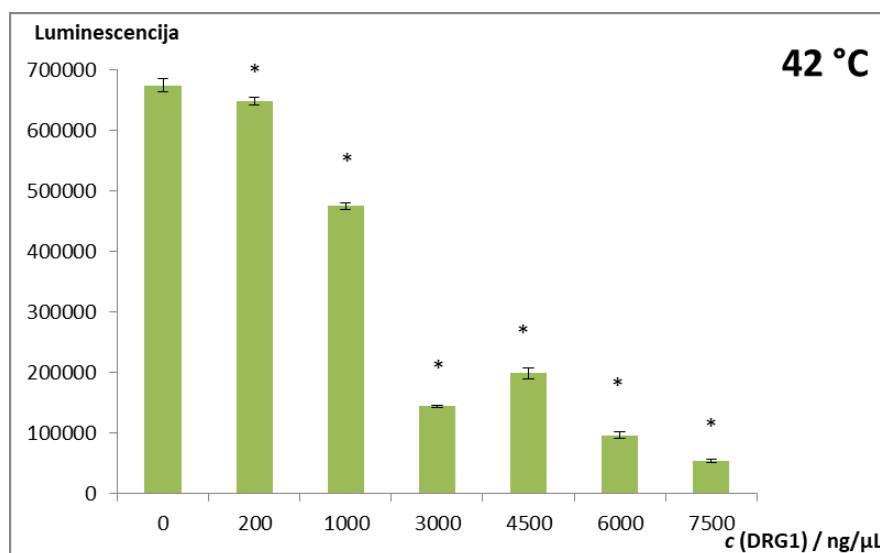


Slika 27. GTPazna aktivnost proteina DRG1 pri 25 °C i različitim koncentracijama proteina. Mjerena je luminescencija koja je odgovarala količini neiskorištenog GTP-a. Uzorak koji nije sadržavao protein DRG1 služio je kao kontrola. Na slici su zvjezdicama označene vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od kontrole, dok su vertikalnim crticama označene standardne devijacije. Napravljeno je 6 mjerenja (n=6), a razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

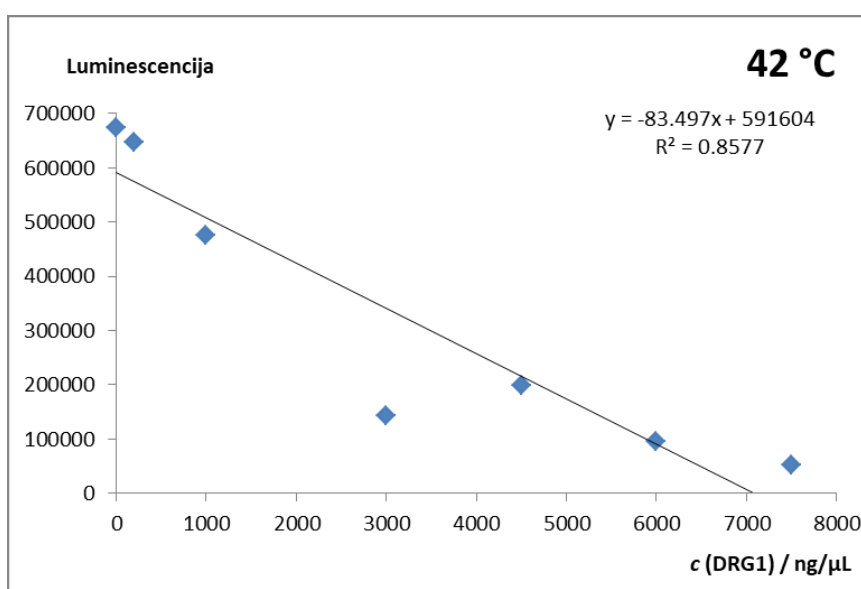


Slika 28. Ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 25 °C. Na grafu je prikazan koeficijent determinacije R^2 . Što je R^2 bliži 1 model je reprezentativniji.

Slika 29. prikazuje GTPaznu aktivnost proteina DRG1 pri 42 °C gdje su svi uzorci statistički značajni u usporedbi s kontrolom i označeni su zvjezdicom na grafu. Ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 prikazana je na slici 30. gdje izračunata vrijednost koeficijenta determinacije iznosi 0,8577.



Slika 29. GTPazna aktivnost proteina DRG1 pri 42°C i različitim koncentracijama proteina. Mjerena je luminescencija koja je odgovarala količini neiskorištenog GTP-a. Uzorak koji nije sadržavao protein DRG1 služio je kao kontrola. Na slici su zvjezdicama označene vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od kontrole, dok su vertikalnim crticama označene standardne devijacije. Napravljeno je 6 mjerenja (n=6), a razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.



Slika 30. Ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 42 °C. Na grafu je prikazan koeficijent determinacije R^2 . Što je R^2 bliži 1 model je reprezentativniji.

Usporedbom slika 26., 28. i 30. uočeno je da najveću vrijednost koeficijena determinacije ima graf ovisnosti luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 8 °C. Navedeni graf prikazuje linearnu ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina. Najmanju vrijednost koeficijenta determinacije ima graf ovisnosti luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 42 °C gdje se uočavaju veća odstupanja izmjerenih vrijednosti u odnosu na druge grafove. Dakle, prema koeficijentu determinacije najprihvatljivije je koristiti ovisnost luminescencije o koncentraciji proteina DRG1 pri 8 °C za predviđanje ponašanja proteina.

Najmanja vrijednost izmjerene luminescencije odgovara najvećoj GTPaznoj aktivnosti proteina. Ukoliko se gleda udio nepotrošenog GTP-a u odnosu na kontrolu, manji udio nepotrošenog GTP-a znači da je veći udio GTP-a potrošen što pak označava visoku aktivnu GTPazu. Visoko aktivna GTPaza troši više GTP-a što znači da ostaje manje GTP-a koji se preveo u ATP i koji se detektirao pomoću reagensa GTP-Glo što se pak detektira manjom vrijednosti luminescencije.

GTPazna aktivnost proteina izmjerena je na sobnoj temperaturi pri 25 °C, pri 8 °C budući da vrsta *Eunapius subterraneus* živi na temperaturama do 11 °C, te na 42 °C jer je ta temperatura, prema rezultatima I. Pérez-Arellanoa i suradnika, optimalna temperatura enzima. Unutar iste temperaturne skupine luminescencija se smanjivala kako je rasla koncentracija proteina. Odnosno, GTPazna aktivnost unutar iste temperaturne skupine rasla je porastom koncentracije proteina DRG1. Pri 8 °C najveća GTPazna aktivnost odgovarala je najvećoj koncentraciji pri kojoj je luminescencija iznosila 53 % od kontrole, odnosno udio hidroliziranog GTP-a iznosio je 47 % (tablica 19). Očekivano, najmanja GTPazna aktivnost izmjerena je pri najnižoj koncentraciji gdje je udio hidroliziranog GTP-a iznosio 6 %. Unutar skupine uzoraka kojoj je luminescencija izmjerena pri 8 °C nema značajnije promjene luminescencije s obzirom na koncentraciju proteina što je potvrđeno slikom 26. Pri 6000 ng/μL i 7500 ng/μL na toj temperaturi udio hidroliziranog GTP-a razlikuje se za 1 %. Dakle, pri 8 °C GTPazna aktivnost proteina DRG1 je nije jako izražena.

Tablica 19. Udio hidroliziranog GTP-a u odnosu na kontrolu dobivenog praćenjem GTPazne aktivnosti proteina DRG1 pri različitim koncentracijama i temperaturama uz test *GTPase-Glo*TM.

<i>c</i> (DRG1) / ng/μL		200	1000	3000	4500	6000	7500
Udio hidroliziranog GTP-a / %	8 °C	6 %	17 %	29 %	32 %	46 %	47 %
	25 °C	12 %	31 %	57 %	86 %	90 %	93 %
	42 °C	4 %	30 %	79 %	71 %	86 %	92 %

Pri 25 °C i 7500 ng/μL luminescencija je iznosila 7 % od kontrole, što je značilo da je 93 % GTP-a hidroliziralo. Udio hidroliziranog GTP-a raste značajnije porastom koncentracije proteina nego pri 8 °C. Izmjerena luminescencija pri 42 °C i 7500 ng/μL iznosila je 8 % od kontrole koja nije sadržavala DRG1 protein, odnosno 92 % GTP-a je hidroliziralo. Najmanja aktivnost odgovara najmanjoj koncentraciji i 200 ng/μL gdje je udio hidroliziranog GTP-a iznosio 4 %. Na grafu koji odgovara GTPaznoj aktivnosti pri 42 °C uočen je pad luminescencije porastom koncentracije proteina, osim pri 4500 ng/μL gdje je izmjerena manja vrijednost luminescencije od očekivane.

Usporedbom dobivenih rezultata i grafova, najizraženija GTPazna aktivnost izmjerena je pri najvećoj koncentraciji na temperaturama od 25 °C i 42 °C gdje je udio hidroliziranog GTP-a iznosio 92 % i 93 %, dok je najmanja GTP-azna aktivnost izmjerena pri 200 ng/μL i temperaturama 8 °C i 42 °C gdje je udio hidroliziranog GTP-a iznosio 6 % odnosno 4 %.

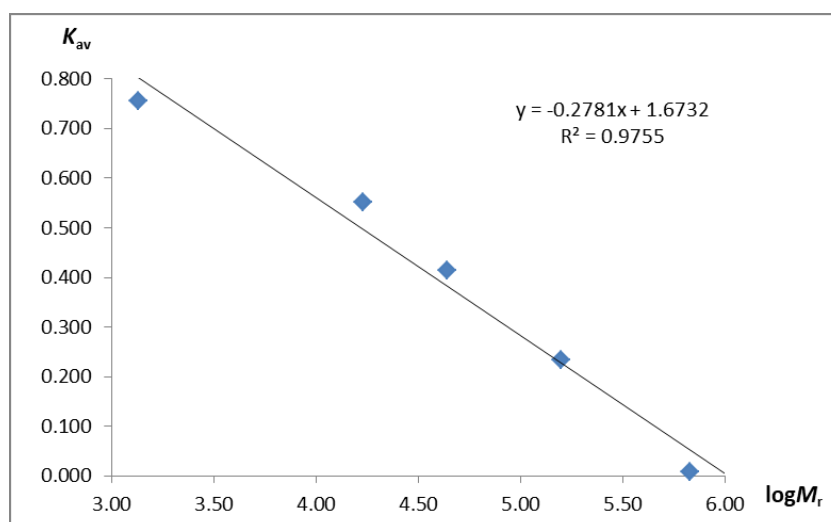
4.3.2. Gel-filtracija proteina DRG1

Pročišćeni uzorak proteina DRG1 propušten je kroz *SuperdexTM 200 Increase 10/300 GL* kolonu na uređaju AKTA-FPLC kako bi se odredila masa proteina. Pritom su korišteni molekularni standardi prikazani u tablici 20.

Tablica 20. Molekularni standardi za gel-filtraciju proteina DRG1. Prikazane su molekularne težine standarda, elucijski volumeni V_e i izračunat je parametar $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$. V_0 je volumen elucije plavog dekstrana i iznosi 7,83 mL, a V_t je ukupan volumen kolone i iznosi 24 mL.

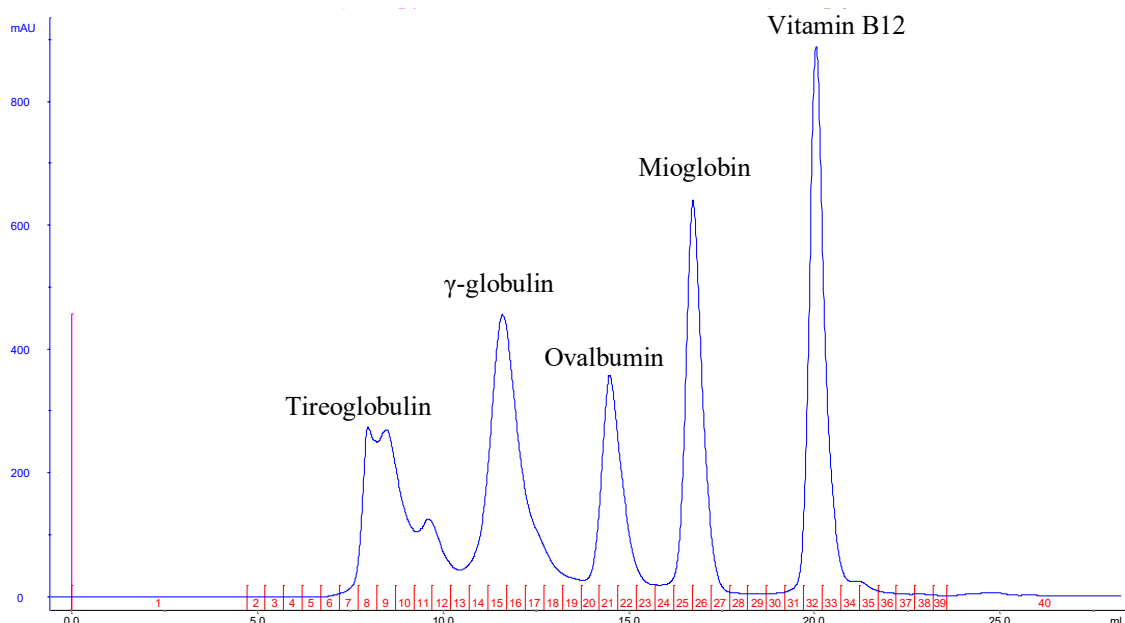
Protein	M_r	$\log M_r$	V_e / mL	K_{av}
Tireoglobulin (goveđi)	670 000	5,83	7,98	0,009
γ-globulin (goveđi)	158 000	5,20	11,6	0,233
Ovalbumin (kokošji)	44 000	4,64	14,51	0,413
Mioglobin (konjski)	17 000	4,23	16,74	0,551
Vitamin B12	1 350	3,13	20,05	0,756
Plavi dekstran	2 000 000	6,30	7,83	/

Pomoću ExPASy servera (*ProtParam tool*) moguće je izračunati neke fizikalne i kemijske parametre proteina, pa je tako izračunata molekularna težina proteina s His-privjeskom iznosila 42,691 kDa. Prema tom podatku protein DRG1 očekivano bi trebao eluirati u elucijskom volumenu između V_e za ovalbumin i mioglobin (tablica 20), tj. između volumena elucije od 14,51 do 16,74 mL. Elucijski volumeni gel-filtracijskih standarda kao i dobivena baždarna krivulja prikazani su u tablici 20 te na slici 31.

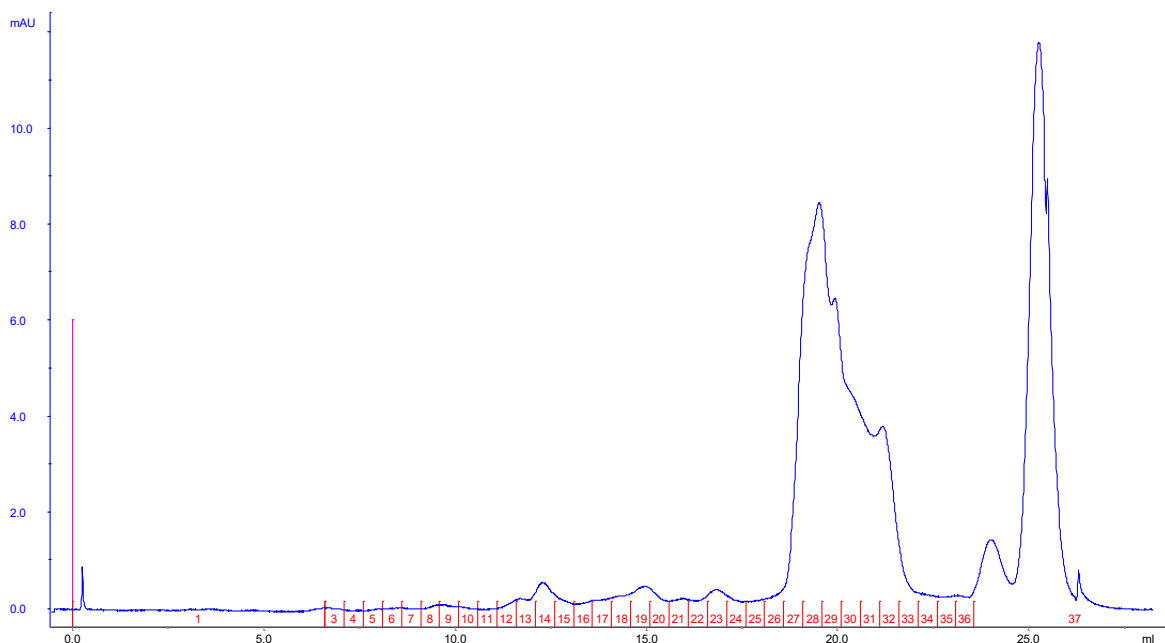


Slika 31. Baždarni pravac molekularnih standarda (BIO RAD) za gel-filtraciju proteina DRG1. Na osi ordinata označen je parametar K_{av} , a na osi apcisa označen je logaritam molekularne težine, $\log M_r$. Pravac je dobiven pomoću molekularnih težina tireoglobulina, γ -globulina, ovalbumina, mioglobina i vitamina B12 te njihovih volumena elucije, V_e . Izračunat je paramter $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$, gdje je V_0 volumen elucije plavog dekstrana, a V_t ukupan volumen kolone.

Rezultati gel-filtracije proteina DRG1 prikazani su na slici 33, dok slika 32 prikazuje kromatogram molekularnih standarda.



Slika 32. Kromatogram molekularnih standarda (BIO RAD) nakon gel-filtracije na uređaju ÄKTA-FPLC. Korištena je kolona *Superdex™ 200 Increase 10/300 GL* uz protok $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Na kolonu je nanoseno $120 \text{ }\mu\text{L}$ standarda. Plava linija označava molekularne standarde, a crvenom bojom označene su frakcije.



Slika 33. Kromatogram DRG1 proteina dobiven gel-filtracijom na uređaju ÄKTA-FPLC uz *Superdex™ 200 Increase 10/300 GL* kolonu i protok $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Na kolonu je nanoseno $120 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka. Pufer za eluciju sadržavao je 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol/L NaCl. Plava linija označava propušteni uzorak proteina DRG1, a crvenom bojom označene su frakcije.

Protein DRG1 očekivan je u skupu frakcija 17-21. Prema slici 33. na tom području vidi se jako mali pik. Osim toga, u kromatogramu uzorka proteina u skupu frakcija 12-15 i 22-24 javljaju se mali pikovi koji veličinom ne odgovaraju proteinu DRG1, te izraženiji pikovi u frakcijama 27-33 i 37. U izraženim pikovima koji odgovaraju frakcijama 27-33 i 37 SDS-PAGE elektroforezom i *western blotting*-om nije utvrđeno postojanje proteina DRG1.

Metodom gel-filtracije, uz korištenje odgovarajućih molekularnih standarda, moguće je odrediti molekularnu masu proteina, ali u ovom slučaju nije utvrđen pik/frakcija koja bi odgovarala proteinu DRG1. Mogući razlozi toga su mala koncentracija proteina, prisutnost drugih primjesa/proteina, oligomerizacije proteina, narušene stabilnosti proteina te ionske ili hidrofobne interakcije između proteina i matrice. Trebalo bi provesti neki oblik pročišćavanja prije gel-filtracije, npr. ionsku izmjenu, kako bi se gel-filtracijom mogla razlučiti molekulska masa proteina DRG1.

§ 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog diplomskog rada doneseni su sljedeći zaključci.

1. Uspješno je klonirana cDNA koja kodira za protein DRG1 iz Ogulinske špiljske spužvice, lat. *Eunapius subterraneus*.
2. cDNA koja kodira za protein DRG1 iz Ogulinske špiljske spužvice, lat. *Eunapius subterraneus* uspješno je ugrađen u ekspresijski vektor pET28b s ciljem ekspresije proteina DRG1.
3. Protein DRG1 uspješno je eksprimiran i izoliran iz *Rosetta-gami*TM 2(DE3) *pLysS* stanica što je potvrđeno tehnikom *western blotting*. Ekspresija proteina uspješno je provedena indukcijom na 16 °C i 30 °C.
4. Usporedbom proteina DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* s homolognim proteinima drugih vrsta uočena je visoka razina sačuvanosti domena.
5. Protein DRG1 iz spužve *Eunapius subterraneus* pokazuje najveću sličnost s proteinskim homolozima iz čovjeka (*Homo sapiens*) i žabe (*Xenopus tropicalis*) koja iznosi 91 %.
6. Potvrđena je GTPazna aktivnost proteina DRG1. Rezultati ukazuju na visoku aktivnost enzima pri 25 °C i 42 °C.
7. Metodom gel-filtracije nije uspješno određena molekularna masa proteina DRG1. Mogući razlozi toga su mala koncentracija proteina, prisutnost drugih primjesa/proteina, oligomerizacije proteina, narušena stabilnost proteina te ionske ili hidrofobne interakcije između proteina i matrice.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

APS	amonijev persulfat
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
COI	citokrom oksidaza I
ddNTP	dideoksiribonukleozid-trifosfat
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DRG1	engl. <i>developmentally regulated GTP-binding protein</i>
DFRP	engl. <i>DRG family regulatory proteins</i>
EDTA	etilendiaminotrioctena kiselina
ExPASy	engl. <i>Expert Protein Analysis System</i>
GAP	engl. <i>GTP – hydrolysis activating proteins</i>
GEF	engl. <i>GDP – GTP exchange factors</i>
GTP	gvanozin-trifosfat
HTH	engl. <i>helix-turn-helix</i>
IMAC	engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
ITS2	engl. <i>internal transcribed spacer 2</i>
IUCN	engl. <i>International Union for Conservation of Nature</i>
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
NCBI	engl. <i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NFW	engl. <i>nuclease free water</i>
NTA	nitrilo-trioctena kiselina
OBG	engl. <i>spoOB-associated GTP-binding protein</i>
p53	engl. <i>cellular tumor antigen p53</i>
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
PCR	lančana reakcija polimerazom

PTEN	engl. <i>phosphatase and TENsin homolog</i>
RAS	engl. <i>proto-oncogene protein P21</i>
Rbg1	engl. <i>ribosome-interacting GTPase 1</i>
rDNA	engl. <i>ribosomal DNA</i>
RNA	ribonukleinska kiselina
rpm	engl. <i>revolution per minute</i>
SDS	natrijev dodecilsulfat
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SMART	engl. <i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
ssDNA	engl. <i>single-stranded DNA</i>
TAE	tris-acetatni EDTA puffer
TB	engl. <i>terrific broth</i>
TBST	engl. <i>tris-buffered saline + Polysorbate 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetraetilendiamin
ThrRS	treonil-tRNA sintetaza
Tma46	engl. <i>translation machinery-associated protein 46</i>
TRAFAC	engl. <i>TRAnslation FACTors</i>

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. H. Četković, M. Halasz, M. Herak Bosnar, Sponges: A Reservoir of Genes Implicated in Human Cancer, *Mar. Drugs* **16** (2018), <https://www.mdpi.com/1660-3397/16/1/20/html> (datum pristupa 16. rujna 2020.)
2. P. R. Bergquist, *Sponges*, University of California Press, London, 1978, str. 9–17.
3. <https://web.archive.org/web/20190926205031/https://www.qm.qld.gov.au/microsites/bio-discovery/03sponges-and-corals/structure-of-sponges.html> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
4. J. Bedek, H. Bilandžija, B. Jalžić, Ogulinska špiljska spužvica *Eunapius subterraneus* Sket et Velikonja, 1984, rasprostranjenost i ekologija vrste i staništa, *Modruš. zb.* **2** (2008) 103–130.
5. H. Bilandžija, J. Bedek, B. Jalžić, S. Gottstein, The morphological variability, distribution patterns and endangerment in the Ogulin cave sponge *Eunapius subterraneus* Sket & Velikonja, 1984 (Demospongiae, Spongillidae), *Nat. Croat.* **16** (2007) 1–17.
6. M. Harcet, H. Bilandžija, B. Bruvo-Madarić, H. Četković, Taxonomic position of *Eunapius subterraneus* (Porifera, Spongillidae) inferred from molecular data – A revised classification needed?, *Mol. Phylogenet. Evol.* **54** (2010) 1021–1027.
7. J. Bedek, Ogulinska špiljska spužvica, *Subterr. Croat.* **2** (2004) 46–49.
8. S. M. Francis, M. Gas, M. Daugeron, J. Bravo, B. Séraphin, Rbg1–Tma46 dimer structure reveals new functional domains and their role in polysome recruitment, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 11100–11114.
9. I. Pérez-Arellano, M. Spínola-Amilibia, J. Bravo, Human Drg1 is a potassium-dependent GTPase enhanced by Lerepo4, *FEBS J.* **280** (2013) 3647–3657.
10. K. Ishikawa, T. Akiyama, K. Ito, K. Semba, J. Inoue, Identification of DRG family regulatory proteins (DFRPs): specific regulation of DRG1 and DRG2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390** (2009) 552–556.
11. A. K. Schellhaus, D. Moreno-Andres, M. Chugh, H. Yokoyama, A. Moschopoulou, S. De, F. Bono, K. Hipp, E. Schäffer, W. Antonin, Developmentally Regulated GTP binding protein 1 (DRG1) controls microtubule dynamics, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1–16.

12. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and company, New York, 2013, str. 89–90.
13. C. E. Horak, J. H. Lee, J. Marshall, S. M. Shreeve, P. S. Steeg, The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy, *APMIS* **116** (2008) 586–601.
14. H. Četković, M. Harcet, M. Roller, M. Herak Bosnar, A survey of metastasis suppressors in Metazoa, *Lab. Invest.* **98** (2018) 554–570.
15. S. Bandyopadhyay, S. K. Pai, S. C. Gross, S. Hirota, S. Hosobe, K. Miura, K. Saito, T. Commes, S. Hayashi, M. Watabe, K. Watabe, The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer, *Cancer Res.* **63** (2003) 1731–1736.
16. S. Bandyopadhyay, S. K. Pai, S. Hirota, S. Hosobe, T. Tsukada, K. Miura, Y. Takano, K. Saito, T. Commes, D. Piquemal, M. Watabe, S. Gross, Y. Wang, J. Huggenvik, K. Watabe, PTEN Up-Regulates the Tumor Metastasis Suppressor Gene Drg-1 in Prostate and Breast Cancer, *Cancer Res.* **64** (2004) 7655–7660.
17. R. M. Baig, A. J. Sanders, M. A. Kayani, W. G. Jiang, Association of Differentiation-Related Gene-1 (DRG1) with Breast Cancer Survival and in Vitro Impact of DRG1 Suppression, *Cancers* **4** (2012) 658–672, <https://www.mdpi.com/2072-6694/4/3/658/htm>
18. Z. Ling, L. Chen, J. Zhao, m6A-dependent up-regulation of DRG1 by METTL3 and ELAVL1 promotes growth, migration, and colony formation in osteosarcoma, *Biosci. Rep.* **40** (2020) 1–12.
19. K. Ishikawa, S. Azuma, S. Ikawa, K. Semba, J. Inoue, Identification of DRG family regulatory proteins (DFRPs): specific regulation of DRG1 and DRG2, *Genes Cells* **10** (2005) 139–150.
20. L. Lu, Y. Lv, J. Dong, S. Hu, R. Peng, DRG1 is a potential oncogene in lung adenocarcinoma and promotes tumor progression via spindle checkpoint signaling regulation, *Oncotarget* **7** (2016) 72795–72806.
21. J. Yan, Q. Yang, Q. Huang, Metastasis Suppressor Genes, *Histol. Histopathol.* **28** (2013) 285–292.
22. S. B. Primose, R. M. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell Publishing, Oxford, 2006, str. 26–27, 36–41, 85–86.
23. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and company, New York, 2000, str. 304, 327–330.

24. <https://www.takarabio.com/products/pcr/pcr-master-mixes/diverse-samples/ex-taq-premix> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
25. L. G. Davis, M. D. Dibner, J. F. Battey, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, 1986. str. 58–61, <https://www.sciencedirect.com/book/9780444010827/basic-methods-in-molecular-biology> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
26. S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, T. Bera, *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Academic press, 2015, str. 121–156, <https://www.sciencedirect.com/book/9780128022214/modern-applications-of-plant-biotechnology-in-pharmaceutical-sciences> (datum pristupa 12. kolovza 2020.)
27. R. Stringer, *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, str. 356–363, <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123693976/encyclopedia-of-analytical-science> (datum pristupa 12. kolovoza 2020)
28. I. Dotti, S. Bonin, *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2011, str. 75–79.
29. F. H. Stephenson, *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*, Elsevier, 2003, str. 97–128, <https://www.sciencedirect.com/book/9780128022115/calculations-for-molecular-biology-and-biotechnology> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
30. <https://www.bib.irb.hr/306313> (datum pristupa: 11. kolovoza 2020.)
31. <https://www.addgene.org/vector-database/2566/> (datum pristupa 7. kolovoza 2020.)
32. Protokol za Viši praktikum biokemije, "Od gena do proteina", Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2019.
33. <https://nebiolabs.com.au/-/media/catalog/datacards-or-manuals/m0491datasheet-lot0041207.pdf> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
34. <https://international.neb.com/products/m0369-electroligase#Product%20Information> (datum pristupa 18. kolovoza 2020.)
35. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html> (datum pristupa 1. rujna 2020.)
36. M. Bergkessel, C. Guthrie, *Laboratory Methods in Enzymology*, Elsevier, 2013, str. 299–309, <https://www.sciencedirect.com/bookseries/methods-in-enzymology/vol/529/suppl/C> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)

37. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/71351m?lang=en®ion=HR> (datum pristupa 8. srpnja 2020.)
38. <https://patents.google.com/patent/US7541166B2/en> (datum pristupa 1. rujna 2020.)
39. <https://www.prosci-inc.com/resources/antibody-development-guide/primary-and-secondary-antibodies/> (datum pristupa 2. rujna 2020.)
40. <https://blog.benchsci.com/western-blot-detection-methods>. (datum pristupa 2. rujna 2020.)
41. <https://www.cusabio.com/m-244.html> (datum pristupa 11. kolovoza 2020.)
42. <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/protein-analysis/blotting-and-detection/blotting-standards-and-reagents/amersham-ecl-select-western-blotting-detection-reagent-p-06263#tech-spec-table> (datum pristupa 18. kolovoza 2020.)
43. https://www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer_options (datum pristupa 19. kolovoza 2020.)
44. <https://www.goldbio.com/documents/1047/Affinity%20His-Tag%20Purification%20Utilizing%20Chelating%20Agarose%20Beads.pdf> (datum pristupa 10. kolovoza 2020.)
45. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/immobilized-metal-affinity-chromatography> (datum pristupa: 8. kolovoza 2020.)
46. I. Zonjić, *Identifikacija, kloniranje i ekspresija gena myc iz spužve Eunapius subterraneus*, diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 35.
47. C. Jiang, J. B. Wechuck, W. F. Goins, Immobilized Cobalt Affinity Chromatography Provides a Novel, Efficient Method for Herpes Simplex Virus Type 1 Gene Vector Purification, *J. Virol.* **17** (2004) 8994–9006.
48. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/gtpase-glo-assay-protocol.pdf?la=en> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
49. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-chromatography/gel-filtration-chromatography.html> (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
50. E. Stellwagen, *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, Elsevier, 2009, str. 373–385,
https://www.academia.edu/27325090/Guide_to_Protein_Purification_Methods_in_Enzymology (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)

51. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-gel-filtration.pdf (datum pristupa 12. kolovoza 2020.)
52. E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* **31** (2003) 3784–3788.
53. <https://eshop.biogen.cz/massruler-dna-ladder-mix-ready-to-use> (datum pristupa 19. kolovoza 2020.)
54. <https://www.fishersci.no/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-dna-ladder-mix/11803983> (datum pristupa 19. kolovoza 2020.)
55. <https://www.bio-rad.com/en-uk/sku/1610374edu-precision-plus-protein-dual-color-standards?ID=1610374EDU> (datum pristupa 19. kolovoza 2020.)

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Matea Modrić

Datum rođenja: 30. listopada 1995.

Mjesto rođenja: Zadar

Obrazovanje

2002–2009	Osnovna škola Stanovi, Zadar
2009–2010	Osnovna škola Zadarski otoci, Zadar
2010–2014	Gimnazija Franje Petrića, Zadar
2014–2018	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2018–2020	Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015	Otvoreni dan kemije (Dan i noć PMF-a)
------	---------------------------------------