

Pročišćavanje i kristalizacija proteinskog kompleksa SPRTN:p97

Bezjak, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:838249>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Tea Bezjak

Pročišćavanje i kristalizacija proteinskog kompleksa SPRTN:p97

Diplomski rad

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

Zagreb, 2023 godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Nives Ivić.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc Marko Močibob.

Zahvale

Od srca hvala mentorici dr. sc. Nives Ivić na pruženoj prilici i povjerenju u izradi diplomskog rada na Institutu Ruđer Bošković. Iznimno cijenim konstantnu podršku, neizmjereno strpljenje i pomoć koja mi je pružena u svakodnevnome radu. Tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada, dobiveno iskustvo i preneseno znanje dali su mi hrabrost i snažan temelj za izgradnju vlastite karijerne budućnosti i na tome ću Vam zauvijek ostati zahvalna.

Najiskrenije hvala voditeljici projekta dr. sc. Marti Popović koja me uključila u dio svog istraživačkog tima. U našoj suradnji pokazali ste mi Vašu stručnost i strast za istraživanjem, a samim time i svaki susret s Vama je bio moja daljnja motivacija pri pisanju rada. Ovom suradnjom ste potvrdili i moju strast prema znanosti. Ujedno hvala i članovima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na prijateljskoj i pozitivnoj radnoj atmosferi prilikom svakog našeg susreta.

Veliko hvala mentoru na fakultetu doc. dr. sc. Marku Močibob na smjernicama u vezi pisanja diplomskog rada, kao i na znanju stečenome tijekom preddiplomskog i diplomskog studija. S Vašim predavanjima sam i otkrila svoju ljubav prema biokemiji.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama. Uvijek ste bili moja najveća podrška.

Contents

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Oštećenje i putevi popravka DNA	2
2.2. Unakrsno vezanje DNA i proteina.....	3
2.3. Popravak unakrsnog vezanja DNA i proteina.....	5
2.4. AAA+ ATPaza Cdc48/p97/VCP	15
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Standardne kemikalije.....	20
3.1.2. Boje	20
3.1.3. Markeri veličine	20
3.1.4. Nukleinske kiseline i nukleotidi.....	21
3.1.5. Proteini, enzimi i antitijela.....	21
3.1.6. Kromatografska punila, kolone i membrane.....	21
3.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA.....	21
3.1.8. Materijali korišteni u kristalizaciji.....	22
3.1.9. Komercijalni kompleti za kristalizaciju proteinskog kompleksa.....	22
3.1.10. Instrumenti.....	22
3.1.11. Plazmidni vektori i sojevi bakterije <i>E. coli</i>	22
3.2. Metode rada s rekombinantnom DNA	25
3.2.1. Lančana reakcije polimeraze	25
3.2.2. Dizajniranje početnica.....	25
3.2.3. Inverzna lančana reakcija polimeraze	26
3.2.4. Agarozna gel-elektroforeza.....	27
3.2.5. Ligacija fragmenata DNA pomoću T4 DNA-ligaze	28
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA	29
3.2.7. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina	29
3.2.8. Sekvenciranje plazmidne DNA.....	29
3.3. Metode rada s bakterijama	29
3.3.1. Priprava mikrobioloških medija za uzgoj bakterija.....	29
3.3.2. Priprava kompetentnih bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	30

3.3.3. Transformacija bakterije <i>E. coli</i> i priprava prekonocne kulture	30
3.3.4. Priprava glicerolskih štokova	31
3.4. Metode rada s proteinima	31
3.4.1. Prekomjerna ekspresija proteina	31
3.4.2. Liza bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	32
3.4.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima	33
3.4.4. Cijepanje histidinskog privjeska i prekonocna dijaliza proteina	34
3.4.5. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza	35
3.4.6. Kromatografija ionske izmjene	37
3.4.7. Gel-filtracija	38
3.4.9. Ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom	40
3.4.10. Određivanje koncentracije proteina	40
3.4.11. Analiza kompleksa SPRTN:p97 metodom povlačenja proteina	40
3.4.12. Nativna gel-elektroforeza	41
3.4.13. Western-analiza	42
3.5. Kristalografske metode	43
3.5.1. Proteinska kristalografija	43
3.5.2. Kristalizacija metodom difuzije para otapala	46
3.5.3. Optimizacija kristalizacijskih uvjeta	47
3.5.4. Metoda mikrosijanjanja	48
3.5.5. Priprema kristala za difrakciju rentgenskog zračenja na monokristalu	50
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	51
4.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za prekomjernu ekspresiju krnjeg i mutiranog oblika humanog proteina HsSPRTN	51
4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina	52
4.2.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukata za kristalizacijske eksperimente	52
4.2.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje SPRTN _{FL} za biokemijske pokuse	63
4.2.3. Priprava kompleksa SPRTN:p97 gel-filtracijom	65
4.2.6. Testiranje aktivnosti proteaze SPRTN _{FL} i konstrukta SPRTN ₁₋₂₆₈	72
4.2.7. Kristalizacija kompleksa SPRTN:p97	74
§ 5. ZAKLJUČAK	XIV
§ 6. LITERATURNI IZVORI	XV
§ 7. ŽIVOTOPIS	XIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Pročišćavanje i kristalizacija proteinskog kompleksa SPRTN:p97

Tea Bezjak

DNA-ovisna metaloproteaza Spartan (SPRTN) održava genomski integritet sudjelujući u popravku križnih veza DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC), čestog tipa oštećenja DNA. Citotoksičnost DPC-ova pripisuje se ometanju staničnih procesa koji uključuju DNA (replikacija, transkripcija i popravak) te predstavljaju prepreku u održavanju genomske stabilnosti. Pokazano je da SPRTN sudjeluje u vezanju AAA+ ATP-aze p97, čija je najpoznatija uloga odmotavanje ubikvitinitanih proteina. Rješavanje kristalne strukture kompleksa SPRTN:p97 i njegova strukturna karakterizacija omogućila bi dublje razumijevanje uloge p97 u popravku DPC oštećenja. Stoga su humani SPRTN i p97 te njihovi skraćeni konstrukti, prekomjerno eksprimirani i pročišćeni kromatografskim metodama. Metodom povlačenja proteina okarakterizirana je interakcija navedenog kompleksa. Kako bi se pokušalo odrediti stehiometriju nastalog kompleksa napravljena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima. Kompleks proteina SPRTN i p97 kristaliziran je metodom difuzije para u svrhu rješavanja njihove kristalne strukture. Inicijalni kristalizacijski uvjeti su detaljno optimizirani kako bi se pripremili monokristali zadovoljavajuće veličine i kvalitete, što bi u konačnici omogućilo rješavanje kristalne strukture kompleksa SPRTN:p97.

(78 + 19 stranica, 29 slika, 13 tablica, 99 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: popravak DNA, unakrsna veza DNA-protein, metaloproteaza Spartan, AAA+ ATP-aza p97, kristalizacija proteina, pročišćavanje proteina

Mentor: dr. sc. Nives Ivić, znanstveni suradnik

Nastavnik: doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob
2. doc. dr. sc. Adriana Kendel
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 23. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Purification and crystallization of the protein complex SPRTN:p97

Tea Bezjak

The DNA-dependent metalloprotease Spartan (SPRTN) functions in maintaining genomic integrity by participating in the repair of DNA-protein crosslinks (DPCs), a common type of DNA damage. The cytotoxicity of DPCs is attributed to the disruption of cellular processes involving DNA (e.g. replication, transcription and repair) and poses a challenge in the maintenance of genomic stability. It was shown that SPRTN participates in the binding of the AAA+ ATPase p97, well known for its function in unwinding of ubiquitinated proteins. Solving the crystal structure of the SPRTN:p97 complex and its functional characterization would allow a deeper understanding of the p97 role in DPC damage repair. Therefore, human SPRTN and p97, as well as several of their deletion mutants were overexpressed and purified by standard chromatography techniques. Subsequently, complex formation between SPRTN and p97 was tested and characterized via pull-down assays. To estimate the stoichiometry of the complex, native polyacrylamide gel electrophoresis was applied. SPRTN and p97 complex was subjected to crystallization by vapor diffusion method. Initial crystallization conditions were further optimized with the aim to obtain larger and higher quality diffracting crystals. Taken together, this set the stage for obtaining the structure of the SPRTN:p97 complex.

(78 + 19 pages, 29 figures, 13 tables, 99 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: DNA repair, DNA-protein crosslink, Sprtn metalloprotease, AAA+ ATP-ase p97, protein crystallization, protein purification

Mentor: Dr. Nives Ivić, Research Associate

Supervisor: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Reviewers: 1. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

2. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

3. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor

Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor

Date of exam: 23rd February 2023

§ 1. UVOD

Unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink, DPC*) je tip oštećenja DNA koje nastaje uslijed kovalentnog i ireverzibilnog vezanja DNA i proteina. Kompleksnost DPC-ova uvelike ovisi o veličini i fizikalno-kemijskim svojstvima proteina te tipu i broju ostvarenih kemijskih veza nastalih izlaganjem endogenim ili egzogenim uzročnicima vezanja. Općenito, DPC-ovi se svrstavaju u dvije skupine: (1) neenzimski DPC-ovi koji nastaju vezanjem proteina u neposrednoj blizini DNA u prisutnosti DPC-inducirajućih agensa te (2) enzimski DPC-ovi nastali vezanjem enzima (Topoizomeraza 1 i 1, DNA polimeraza β , poli(ADP-riboza) polimeraza 1) tijekom njihovog normalnog enzimskog ciklusa.¹ DPC-ovi svojom veličinom onemogućuju nesmetano odvijanje osnovnih staničnih procesa koji uključuju DNA (replikacija, transkripcija i popravak). Takvo narušavanje genetskog integriteta posljedično dovodi do nastanka tumora, neurodegenerativnih bolesti, imunodeficijencije, kardiovaskularnih bolesti i preuranjenog starenja.^{1,2} Kako bi se osigurala stabilnost genetskog materijala, stanice su razvile odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA damage-response, DDR*) kojim signaliziraju prisutnost lezija i potiču njihov popravak.³ Mehanizmi kojima stanice popravljaju DPC oštećenja uključuju proteolitičku razgradnju pomoću specifičnih proteaza, nukleaze koje cijepaju DNA komponentu DPC-ova i hidrolizu unakrsne veze DNA i proteina.⁴ Hipoteza o proteolitičkom popravku DPC-ova kao zasebnog mehanizma popravka oštećenja DNA potvrđena je otkrićem dviju proteaza: Wss1 kod kvasca i Spartan (SPRTN) kod eukariota. Obje proteaze karakterizira metaloproteazno aktivno mjesto očuvano u filogenetski različitim domenama: WLM domena u Wss1 i SprT u SPRTN proteazi.^{1,5} Jedan od čimbenika za koje pretpostavljamo da sudjeluje u popravku DPC-ova je i p97, AAA+ ATP-aza, čija je najpoznatija uloga odmotavanje ubikvitiniranih proteina i njihova priprema za proteolizu u proteasomu.^{6,7} Poznato je da SPRTN ostvaruje interakciju s p97 preko SHP domene⁶, no nedostaje detaljnija biokemijska i strukturna karakterizacija o interakciji ovih dvaju proteina.

Cilj ovog diplomskog rada je detaljno okarakterizirati interakciju p97 i proteaze SPRTN te pripremiti i kristalizirati protein:protein kompleks SPRTN:p97 u svrhu njihove strukturne karakterizacije. Uz to, biokemijski će se ispitati njihova interakcija metodom povlačenja proteina (engl. *pull-down assay*) i elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u nativnim uvjetima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oštećenje i putevi popravka DNA

DNA je izvor genetske informacije potrebne stanici za rast, diferencijaciju, preživljavanje i razmnožavanje, stoga je održavanje njezinog integriteta esencijalno za svaki živi organizam. DNA molekula je podložna desecima tisuća lezija dnevno koje obično nastaju kao posljedica odvijanja normalnih fizioloških procesa u stanici. Primjerice, mogu se dogoditi spontane pogreške prilikom replikacije DNA koje rezultiraju umetanjem krivo sparenih baza u novosintetiziranu DNA.⁸ Spontane deaminacije u kojima dolazi do izravne pretvorbe jedne baze u drugu događaju se tijekom procesa replikacije, transkripcije i rekombinacije. U ljudskim stanicama, ekstremni pH uvjeti i visoke temperature također doprinose generaciji abazičnih mjesta.⁹ Nadalje, DNA je konstanto izložena različitim endogenim i egzogenim uzročnicima oštećenja. Nusprodukti staničnog metabolizma poput reaktivnih kisikovih (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) pri povišenim koncentracijama endogeni su uzročnici nastanka apurinskih/apirimidinskih mjesta, različitih supstitucija baza, unakrsnih veza DNA i proteina te jednolančanih i dvolančanih lomova.^{3,8} Pod egzogene uzročnike oštećenja ubrajaju se ionizirajuće zračenje, kozmička radijacija, ultraljubičasto (UV) zračenje te različiti kemijski mutageni (alkilirajući agensi, aromatski amini i policiklički aromatski ugljikovodici).^{8,9} Ultraljubičasto zračenje smatra se najzastupljenijim kancerogenom koje narušava integritet genoma i utječe na normalne životne procese svih organizama. UV-B zračenje dovodi do kemijskih modifikacija DNA i nastanka lezija poput ciklobutanskih primidinskih dimera (engl. *cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD) i 6-4 fotoprodukata (engl. *pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts*, (6-4) PP) koji mijenjaju molekulsku strukturu DNA. Ovakve lezije blokiraju transkripciju i replikaciju čime dolazi do nastanka oštećenja najtoksičnijeg za stanicu, dvolančanog loma DNA.¹⁰ Obzirom na velik broj različitih vrsta oštećenja, ne postoji univerzalan način popravka DNA.¹¹ Kako bi osigurale stabilnost genetskog materijala stanice su razvile sofisticiran skup mehanizama pod nazivom odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA damage-response*, DDR).⁴ Ekscizijski popravak baza (engl. *base excision repair*, BER) usmjeren je na popravak manjih oštećenja DNA nastalih kao posljedica staničnog metabolizma

§ 2. Literaturni pregled

poput deaminiranih i alkiliranih baza, baza oštećenih kisikovim radikalima te abazičnih mjesta.¹¹ Ekscizijski popravak nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER) uklanja veća oštećenja nastala UV zračenjem (poput CPD-a i 6-4 PP-a) i uslijed djelovanja kemoterapeutka.⁹ Prilikom NER popravka izrezuje se kratak slijed nukleotida s lezijom kako bi nastala jednolančana DNA koju potom DNA polimeraza koristi kao kalup za sintezu komplementarnog lanca prije same ligacije. Popravak pogrešno sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR) uklanja pogrešno sparene baze te insercijske i delecije nastale proklizavanjem ponavljajućih baza tijekom replikacije ili rekombinacije.¹¹ Za popravak dvolančanog loma stanice koriste mehanizme homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination*, HR) i nehomolognog spajanja krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ). NHEJ popravak odvija se u svim fazama staničnog ciklusa i sklon je pogreškama jer se procesiranje DNA krajeva odvija na mjestu prekida koje može rezultirati manjim delecijama ili insercijama nukleotida. Homologna rekombinacija ograničena je na S i G2 fazu staničnog ciklusa kada su prisutne sestrinske kromatide koje služe kao kalup za vjernu sintezu novog lanca.^{3,12} Uz spomenute puteve popravka oštećenja DNA, stanica posjeduje čitav niz mehanizama kojima održava integritet genoma ugroženog endogenim i okolišnim agensima. Iako su strukture i mehanizmi popravka za različite vrste lezija opsežno proučavani, jedna kategorija DNA oštećenja ostaje nedovoljno istražena, a to je unakrsno vezanje DNA i proteina (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC).¹³ U nastavku, veća pozornost biti će usmjerena na opis i mehanizme popravka spomenutog tipa oštećenja.

2.2. Unakrsno vezanje DNA i proteina

Interakcije DNA i proteina neophodne su za odvijanje uobičajenih staničnih procesa poput stanične diobe, transkripcije i replikacije. Kako bi se osiguralo da se takvi procesi uspješno provedu u vremenski i prostorno reguliranome okviru potrebno je da interakcije nastalih kompleksa DNA i proteina budu reverzibilne i dinamične.¹⁴ Međutim, prilikom izlaganja endogenim i egzogenim agensima proteini mogu ostati kovalentno vezani za DNA. Ovakvo kovalentno i ireverzibilno vezanje proteina i molekule DNA zove se unakrsno vezanje DNA-protein te se smatra toksičnom za stanicu jer blokira sve procese u kojima sudjeluje DNA.^{1,14}

Svaki jezgrin protein u neposrednoj blizini DNA može ostati vezan za nju te ovisno o svojstvima vezanog proteina razlikuju se enzimski i neenzimski DPC-ovi.¹⁴ Tijekom enzimskih reakcija nastaju nestabilni intermedijeri u kojima enzimi stvaraju prolazne kovalentne veze s

§ 2. Literaturni pregled

DNA. U određenim uvjetima takva veza može postati ireverzibilna čime proteini trajno ostaju zarobljeni za DNA molekulu. Primjer enzimskih DPC oštećenja su DNA topoizomeraze 1 i 2 (engl. *Topoisomerase 1 and 2 cleavage complexes*, TOP1-cc, TOP2-cc), DNA-polimeraza β (Pol- β), poli(ADP-ribozil)-polimeraza 1 (PARP1).¹ Topoizomeraza 1 (TOP1) je enzim koji relaksira dvostruku uzvojnici DNA stvarajući jednolančani lom. Kovaletno se veže na nastali 3' kraj i omogućuje rotaciju slobodnog 5' hidroksilnog kraja oko intaktnog lanca DNA. Topoizomeraza 2 (TOP2) odmotava superzavoje molekule DNA generiranjem dvolančanih lomova i vezanjem na 5' krajeve svakog lanca. Nakon smanjenja torzijskog stresa, TOP1 i TOP2 vrše ligaciju lomova te disociraju s molekule DNA.^{14,15} Kako bi se uspješno provela ligacija, krajevi lanaca moraju biti ispravno poravnani u kompleksu DNA-enzim. Odstupanja od uobičajene strukture DNA poput abazičnih (AP) mjesta ili krivo sparenih baza mogu dovesti do ireverzibilnog vezanja topoizomeraza i nastanka stabilnog DPC-ova na mjestu loma.¹⁵ Također, kemoterapeutici poput kamptotecina (engl. *camptothecin*, CPT) i njegovih derivata djeluju kao inhibitori topoizomeraze 1 jer se vežu za kompleks DNA i enzima, te onemogućuju ligaciju DNA.¹⁴ Enzimska DPC oštećenja također mogu nastati tijekom ekscizijskog popravka baza (BER). DNA-glikozilaza generira abazična mjesta cijepanjem oštećene baze. U određenim uvjetima, takva mjesta podložna su oksidaciji slobodnim radikalima ili reaktivnim kisikovim vrstama. Pokazano je kako DNA polimeraza β (Pol β) sudjeluje u stvaranju DPC oštećenja s oksidiranim abazičnim mjestom 2-deoksi-ribonolaktonom.^{15,16}

Neenzimska DPC oštećenja nastaju kovalentnim vezanjem bilo kojeg proteina koji se nalazi u neposrednoj blizini DNA prilikom izlaganja uzročnicima DPC-ova.¹ Pod endogene uzročnike oštećenja ubrajaju se produkti staničnog metabolizma poput aldehida, slobodnih kisikovih radikala i reaktivnih dušikovih skupina. Tijekom demetilacije histona i peroksidacije lipida generira se genotoksični formaldehid koji uzrokuje DPC-ove formiranjem metilenskih mostova između baza DNA i nukleofilnih aminokiselinskih ostataka.¹⁴ Primjerice, reakcijom formaldehida i nukleofilnog bočnog ogranka cisteina ili lizina dolazi do nastanka intermedijera Schiffove baze koja stvara unakrsnu vezu s bazom molekule DNA.¹⁵ Reaktivne kisikove (ROS) vrste nastale tijekom staničnog disanja, imunološkog odgovora ili upale u reakcijama s bazama DNA i bočnim ograncima proteina stvaraju slobodne radikale koji potom s drugom biomolekulom uzrokuju DPC oštećenja.¹⁷ Prijelazni metali, ultraljubičasto (UV) i infracrveno (IR) zračenje te različiti kemoterapeutici spadaju u egzogene uzročnike DPC-ova. Utvrđeno je kako DPC oštećenja nastala IR i UV zračenjem uvelike ovise o koncentraciji kisika u stanicama.

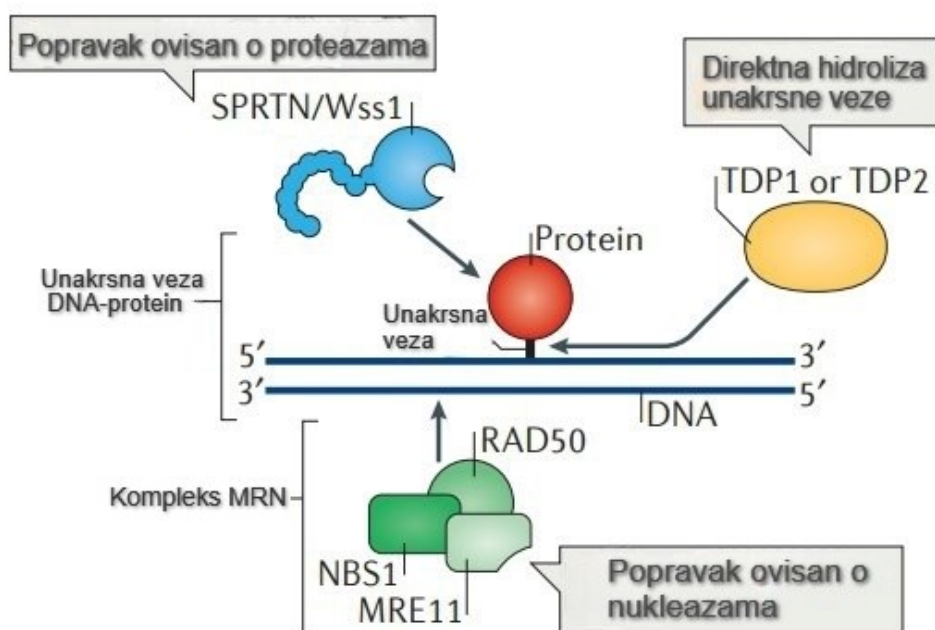
§ 2. Literaturni pregled

Primjerice, stanice podvrgnute IR zračenju stvaraju slobodne kisikove radikale koji u hipoksičnim uvjetima reagiraju s DNA i proteinima te dovode do nastanka ovih lezija.^{15,18} Izlaganje prijelaznim metalima poput nikla ili kroma također uzrokuje stanična DPC oštećenja. Nakon transporta u stanice, Cr(VI) se reducira u reaktivni Cr(III) koji potom stvara koordinacijske komplekse s fosfatnim grupama i bazama DNA, a vezanjem proteina generira DPC oštećenje.¹⁷

Ovisno o tome na kojem lancu se nalaze, DPC oštećenja različito utječu na progresiju replikacijske rašlje. U eukariotima, DPC-ovi na vodećem lancu inhibiraju replikativnu helikazu i blokiraju replisom. Nasuprot tome, ako su smješteni na zaostajućem lancu, replikativna helikaza nije zaustavljena, već je progresija DNA-polimeraze inhibirana.¹⁹ Zaključno, neovisno o tipu i načinu nastanka, ireverzibilno i kovalentno vezanje molekule DNA i proteina je genotoksično za stanicu jer predstavlja fizičku prepreku esencijalnim procesima poput transkripcije i replikacije DNA. Nemogućnost popravka DPC-ova u odgovarajućem vremenskom okviru dovodi do kromosomskih aberacija, štetnih mutacija te u konačnici stanične smrti.¹³ Kako bi se održala genomska stabilnost, stanice su morale razviti specijalizirane mehanizme detekcije i popravka ovakvog tipa lezija.

2.3. Popravak unakrsnog vezanja DNA i proteina

Obzirom na svoju kemijsku i strukturnu raznolikost ne postoji jedan, specijaliziran način signalizacije i popravka unakrsne veze DNA i proteina.¹⁴ Ovisno o tome na koju je komponentu DPC oštećenja određeni mehanizam usmjeren, razlikuje se nekoliko zasebnih puteva popravka: (1) proteolitički popravak djeluje pomoću specijaliziranih DPC proteaza koje uklanjaju proteinsku komponentu DPC-ova, (2) nukleolitički put popravka koji uključuje ekscizijski popravak baza (NER) i nukleazu MRE11 usmjeren na cijepanje molekule DNA koja nosi unakrsno vezani protein i (3) popravak usmjeren na hidrolizu kovalentne veze DNA i proteina (slika 1).⁴



TDP1-tirozil-DNA fosfodiesteraza 1, TDP2-tirozil-DNA fosfodiesteraza 2, MRN-Mre11-Rad50-Nsb1 kompleks

Slika 1. Shematski prikaz mehanizama i ključnih faktora uključenih u popravak DPC oštećenja (preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

2.3.1. Popravak ovisan o nukleazama

Biokemijska i genetička istraživanja u različitim organizmima dovela su do spoznaje o ulozi ekscizijskog popravka baza (NER) i homologne rekombinacije (HR) u toleranciji i popravku DPC oštećenja. Ispitivanjem utjecaja DPC inducirajućih agensa, otkriveno je kako su *uvrA* i *recA* mutanti bakterije *E. coli* s ugašenim NER i HR popravkom osjetljivi na modelni DPC agens, formaldehid. Nasuprot tome, osjetljivost na 5-azacitidin (engl. *5-azacytidine*, 5-azaC) pokazivali su samo *recA* mutanti.^{20,21} Naime, 5-azaC stvara specifična DPC oštećenja sa zarobljenom DNA-metiltransferazom (engl. *DNA methyltransferase*, DNMT) relativne molekulske mase 53×10^3 , što je sugeriralo da učinkovitost UvrABC u NER popravku ovisi o veličini unakrsno vezanog proteina. Prva biokemijska istraživanja pokazala su kako prokariotski kompleks UvrABC stvara ureze na 5' i 3' položajima lanca na kojem je DPC oštećenje sa zarobljenim proteinima manje molekulske mase (do 16×10^3).²² Nasuprot tome, DPC-ovi s većim proteinima u bakterijama procesirani su pomoću enzima RecB mehanizmom homologne rekombinacije (HR).²⁰ Tijekom NER popravka proteini velike mase mogu utjecati na efikasnost vezanja faktora UvrB čime se može smanjiti uspješnost cijepanja molekule DNA

§ 2. Literaturni pregled

nastalim kompleksom UvrABC.¹⁴ Nadalje, *in vitro* i *in vivo* analiza NER i HR puta popravka u sisavcima istaknula je kako stanice koriste HR kao mehanizam tolerancije DPC oštećenja, dok je NER mogao popraviti samo male DPC-ove (8–10 kDa).²³ Smanjenje efikasnosti popravka DPC oštećenja dodatkom inhibitora proteosoma *in vivo* sugeriralo je uključenost proteosoma u eliminaciji DPC-ova. Kako bi se uklonili DPC-ovi putem NER popravka potrebno je prethodno proteolitičko procesiranje velikih proteina. Direktni dokazi dali su Baker et al. (2007.) pokazavši kako NER može ukloniti DPC-ove reducirane veličine *in vivo*, kao i smanjenu efikasnost NER puta popravka u Xpg-deficijentnim stanicama.²⁴ Uz to, DNMT-DPC oštećenja inducirana 5-aza-deoksicitidinom doprinijela su akumulaciji dvolančanih lomova i enzima RAD51 te povećanoj izmjeni sestrinskih kromatida što ukazuje na uključenost HR u popravku DPC lezija.²⁵

Pokazano je kako se DPC oštećenja na krajevima dvolančanih lomova sa unakrsno vezanim proteinima Top2 i Spo11 procesiraju djelovanjem nukleaze Mre11²⁶. Iako nije sigurno djeluje li Mre11 ovisno ili neovisno o HR putu popravka, pokazano je kako navedena nukleaza u humanim stanicama uklanja TOP2 DPC oštećenja.¹ Mre11 s endo- i egzonukleaznom aktivnošću dio je kompleksa Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) esencijalnog za popravak dvolančanih lomova. Jednom kada je protein zarobljen na 5'-kraju DNA, Mre11 endonukleaznom aktivnošću stvara jednolančani lom 15-20 parova baza nizvodno od TOP2 DPC oštećenja. Drugi korak uključuje 3'-5' egzonukleaznu aktivnost koja razgrađuje lanac DNA stvarajući jednolančane praznine. Posljednja endonukleazna aktivnost radi urez u komplementarnome lancu kojim se uklanja DPC oštećenje. Nastala DNA sa slobodnim stršećim krajem popravljiva se nizvodnim putevima popravka HR ili NHEJ.^{27,28} Slično TOP2 DPC oštećenjima, pokazano je kako homolog MRN kompleksa u kvascu, Mre11/Rad50/Xrs2 endonukleaznom aktivnošću uklanja dvolančane lomove nastale tijekom mejoze oslobađajući Spo11 s vezanim oligonukleotidom na 3'-kraju.^{28,29}

Zaključno, putevi popravka poput HR i NER sudjeluju u uklanjanju DPC oštećenja nukleaznim cijepanjem DNA u blizini zarobljenog proteina. Veliki proteini (> 8–10 kDa) blokiraju faktore NER popravka i smanjuju efikasnost cijepanja, stoga iziskuju prethodno proteolitičko procesiranje. Nadalje, za HR popravak DPC-oštećenja potrebno je prethodno stvaranje dvolančanog loma. Na kraju, DPC-ove na krajevima dvolančanih lomova DNA prepoznaje MRN kompleks.^{1,14}

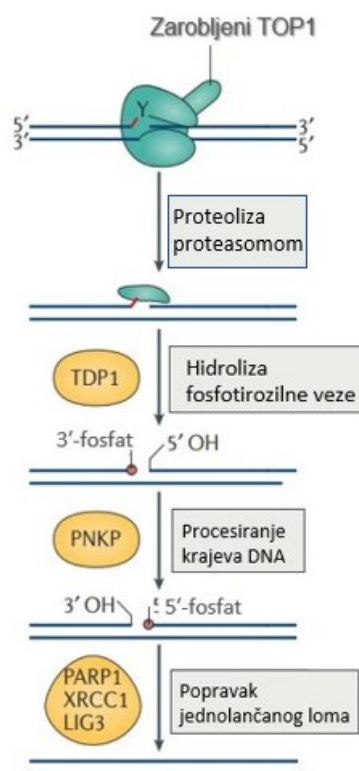
§ 2. Literaturni pregled

2.3.2. Hidroliza kovalentne veze DNA i proteina

Iako su prisutne različite vrste unakrsnih veza DNA i proteina, stanice su razvile nekolicinu enzima specifičnih za hidrolizu kemijskih veza učestalih tipova DPC oštećenja. Jedan od primjera su tirozil-DNA-fosfodiesteraza 1 i 2 (engl. *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and 2*, TDP1, TDP2) važne za popravak TOP1 i TOP2 DPC oštećenja.¹⁴

TDP1 prvotno je otkriven u kvascu na temelju hidrolitičke aktivnosti kojom uklanja kovalentnu vezu između tirozina u enzimu TOP1 i 5' fosfata molekule DNA.³⁰ Ortolozi TDP1 prisutni su u svim eukariotima, a gubitak enzimske aktivnosti rezultira osjetljivošću na inhibitore enzima TOP1.³¹ Mutacije u katalitičkoj domeni proteina TDP1 rezultiraju nakupljenjem intermedijera TDP1-DNA te dovode do rijetkog neurodegenerativnog poremećaja spinocerebelarne ataksije s aksonskom neuropatijom (engl. *Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy*, SCAN1).¹⁴ Mnogi lijekovi za liječenje tumora, poput kamptotecina i etopozida, oslanjaju se na inhibiciju aktivnosti enzima TDP1 s ciljem zaustavljanja proliferacije tumora ili indukcije stanične smrti. Stoga je razumijevanje mehanizma popravka TOP DPC oštećenja važno za daljnji razvoj kemoterapeutika.³¹ Pokazano je kako TDP1 nije u mogućnosti ukloniti čitav TOP1 u TOP1 DPC oštećenju, već je potrebna prethodna proteoliza.³² TDP1 procesira svoje supstrate formiranjem prolaznog kovalentnog kompleksa. Nakon hidrolize nastale fosfotirozilne veze između TOP1 i DNA nastali 3'-fosfatni krajevi uklanjaju se bifunkcionalnom polinukleotid-kinazom-3'-fosfatazom (engl. *polynucleotide kinase 3'-phosphatase*, PNKP). Uklanjanjem fosfata s 3'-kraja, PNKP simultano fosforilira 5'-hidroksilni kraj. Nastali jednolančani lom popravljaju se kanonskim DDR putem popravka pomoću enzima PARP1, XRCC1 i LIG3 (slika 2).⁴

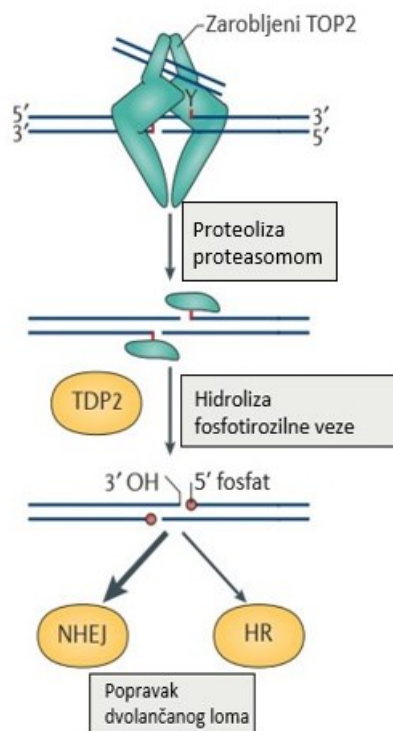
TDP2 hidrolizira 5'-fosfotirozilne veze između zarobljenog enzima TOP2 i molekule DNA, a stanice s inaktivnim TDP2 pokazuju osjetljivost na tretman inhibitorima TOP2.³³ Za razliku od TDP1, TDP2 zahtjeva dva dvovalentna metala za svoju katalitičku aktivnost te ne formira kovalentni katalitički intermedijer sa supstratom DNA.³⁴ Pokazano je kako pročišćeni TDP2 nije u mogućnosti procesirati nativna TOP2 DPC oštećenja *in vitro* ukoliko TOP2 nije prethodno proteoliziran ili denaturiran.³⁵ Također, N-terminalna vezna domena za ubikvitin (engl. *ubiquitin-associated domain*, UBA) je potrebna za optimalnu aktivnost TDP2 u popravku TOP2 DPC oštećenja.³⁶ Hidrolizom fosfotirozilne veze nastaje dvolančani lom s 5'-fosfatnim i 3'-hidroksilnim krajevima koji se najčešće popravljaju putem NHEJ ili rjeđe HR (slika 3).¹⁸



TDP1-tirozil-DNA fosfodiesteraza 1, PNKP-polinukleotid kinaza 3'-fosfataza, PARP1-poli(ADP-ribozil)-polimeraza 1, LIG3- DNA ligaza 3

Slika 2. Shematski prikaz mehanizma popravka TOP1-DNA oštećenja enzimom TDP1 (preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

Nedavno je otkriveno kako SUMO ligaza ZATT (ZNF451) pomaže enzimu TDP2 u popravku TOP2 DPC oštećenja *in vitro*. ZNF451 direktnim vezanjem za SUMOilirana TOP2 DPC oštećenja mijenja konformaciju TOP2 i omogućuje hidrolizu 5'-fosfotirozilne veze neovisno o proteolizi.³⁷ Osim proteolitičke razgradnje proteasomom, pokazano je kako proteaza SPRTN djeluje na proteine TOP1 i TOP2 čime omogućuje hidrolizu peptidnog ostatka pomoću TDP1 i TDP2.¹ Istraživanja u mišjim embrionskim fibroblastima (MEF) pokazala su da se TOP1 DPC-ovi akumuliraju nakon inhibicije proteina SPRTN (engl. *SprT-like N-terminal domain*) u odsustvu TOP1 DPC agensa sugerirajući uključenost SPRTN-a u održavanju niskih koncentracija TOP1 DPC oštećenja.³⁸ Kako je već navedeno, kompleks MRN sudjeluje u popravku TOP2 DPC oštećenja. No, nije još u potpunosti razlučeno sudjeluje li SPRTN u putu popravka TOP2 DPC oštećenja ovisnom o kompleksu MRN, ili je dio zasebnog puta popravka zajedno s TDP1 i TDP2.¹



TDP2-tirozil-DNA fosfodiesteraza 2, NEHJ nehomologno spajanje krajeva, HR-homologna rekombinacija

Slika 3. Shematski prikaz mehanizma popravka TOP2-DNA oštećenja pomoću TDP2 (preuzeto i prilagođeno prema ref. 4)

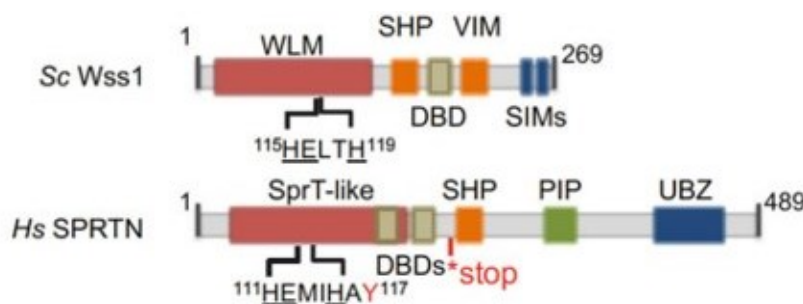
2.3.3. Popravak DPC-ova ovisan o proteolizi

S obzirom da proteinski dio DPC oštećenja predstavlja fizičku smetnju faktorima popravka DNA, za uspješno uklanjanje potrebna je proteolitička razgradnja proteinskog adukta. Proteolitičko cijepanje velikih DPC-ova može se postići djelovanjem metaloproteaza poput Wss1 (engl. *weak suppressor of Smt3*), SPRTN/DVC1 (engl. *SprT-like N-Terminal domain*) i ACRC (engl. *acidic repeat containing protein*).¹³ Također, određena istraživanja sugeriraju uključenost proteasoma u uklanjanju DPC-ova.^{32,35} Nakon razgradnje proteinskog dijela DPC-ova zaostaje manji peptidni ostatak kovalentno vezan za lanac DNA. Time je popravnim faktorima olakšan pristup mjestu oštećenja kako bi dovršili popravak oštećenog dijela lanca DNA. Osim popravka, nastali peptidni fragmenti mogu se zaobići translezijskom sintezom DNA (engl. *translesion DNA synthesis*, TLS) pomoću odgovarajućih translezijskih polimeraza, što nije povoljno za stanicu, jer je većina TLS polimeraza sklona greškama.^{1,13}

Hipoteza o proteolizno-ovisnom popravku DPC oštećenja potvrđena je otkrićem DNA-ovisne metaloproteaze Wss1 u kvascu 2014. godine. Wss1 promovira genomsku stabilnost tako

§ 2. Literaturni pregled

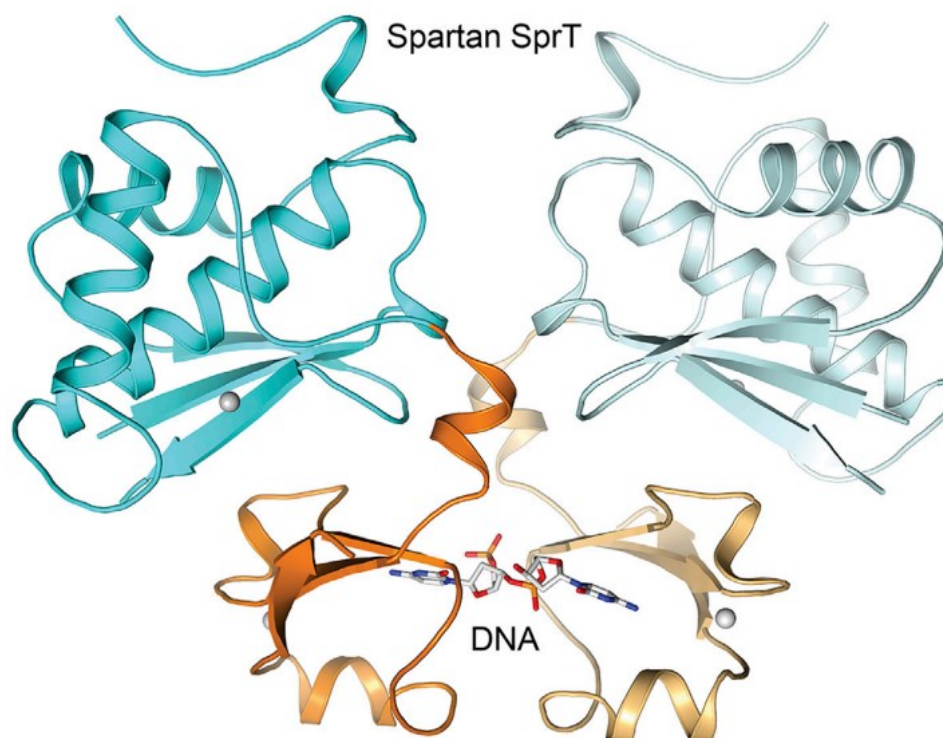
da djeluje specifično na proteinsku komponentu DPC oštećenja. Wss1 cijepa supstrate Top1, histon H1 i HMG-1 (engl. *High mobility group 1 protein*) u manje peptidne fragmente i omogućuje translezijsku sintezu DNA s rizikom ugradnje krivih nukleotida. Nedostatak enzima Wss1 ($\Delta wss1$) u kvašćevim stanicama uzrokuje osjetljivost na formaldehid, a uz inaktivaciju Tdp1 ($\Delta wss1 \Delta tdp1$) stanice izrazito sporo rastu i pokazuju osjetljivost na tretman kamptotecinom.³⁹ Nekoliko studija identificiralo je metaloproteazu SPRTN kao važan čimbenik popravka DPC oštećenja.^{40,41} Filogenetska analiza pokazala je kako se radi o funkcionalnim homolozima sa sličnošću aminokiselinskih sekvenci ograničenom unutar proteaznih domena na N-kraju, WLM (Wss1) i SprT (SPRTN) te oko aktivnog centra.⁵ Minimalna funkcionalna regija proteaze SPRTN uključuje domenu SprT i neposredno nakon bazičnu regiju BR (engl. *basic region*) kojima obje doprinose vezanju DNA.⁴² Objе proteaze sadrže konzervirani motiv HEXXH u aktivnome centru, uobičajeno svojstvo superporodice metaloproteaza ovisnih o cinku. Za interakciju s AAA+ ATP-azom p97/Cdc48, SPRTN i Wss1 posjeduju motiv SHP (engl. *suppressor of high copy PPI*) odnosno VIM (engl. *VCP-interacting motif*). Kako bi se spriječila neželjena proteoliza slobodnih proteina u jezgri stanice, obje proteaze sadrže domenu za vezanje i aktivaciju jednolančanom i dvolančanom DNA (engl. *DNA binding domain*, DBD). C-terminalnu regiju proteina SPRTN čini 276 aminokiselina te uključuje regiju PIP za vezanje PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) i motiv za vezanje ubikvitina UBZ (engl. *ubiquitin-binding zinc finger*). Nasuprot tome, C-terminalna regija proteina Wss1 sastoji se od 48 aminokiselina te uključuje dva kratka motiva SIM (engl. *small ubiquitin-like modifier*) za interakciju sa SUMO (slika 4.).^{1,5}



Slika 4. Strukturna organizacija domena DPC proteaza *ScWss1* i *HsSPRTN*. Domene i motivi za interakciju su obilježeni različitim bojama; proteazne domene (crveno), domena za interakciju s p97/Cdc48 (narančasto), motiv za interakciju s PCNA (zeleno), domena za vezanje DNA (oker), motivi za ubikvitin/SUMO/proteasom interakciju (plavo), (preuzeto i prilagođeno prema ref. 5)

§ 2. Literaturni pregled

Prije otkrića njegove uloge u popravku DPC oštećenja, SPRTN je najprije okarakteriziran kao protein uključen u translezijsku sintezu. Otkriveno je kako se SPRTN veže za ubikvitinirani PCNA putem regija PIP i UBZ. Također, potiče asocijaciju E3 ubikvitin ligaze Rad18 s kromatinom, monoubikvitinaciju PCNA i lokalizaciju DNA polimeraze η (TLS polimeraza) na mjesta oštećenja uzrokovana UV zračenjem.⁴³ Nasljedne mutacije u *SPRTN*-u uzrokuju Rujis-Aalfsov sindrom, autosomalni recesivni poremećaj okarakteriziran genomskom nestabilnošću i preuranjenom pojavom hepatocelularnog karcinoma.¹⁴ Kod pacijenata s navedenim sindromom u domeni SprT pronađene su mutacije koje rezultiraju preuranjenim stop-kodonom i gubitkom dijela proteina na C-kraju (ΔC , 1–249 ak) te heterozigotne mutacije sa supstitucijom tirozina cisteinom (*Y117C*) i preuranjenim stop-kodonom uz nastali skraćeni protein (ΔC , 1–246 ak).² Smatra se da mutacija *Y117C* u Rujis-Alfsovom sindromu ometa hidrofobne interakcije katalitičke domene čime narušava strukturni integritet i uzrokuje smanjenu aktivnost proteaze.⁴² U stanicama sisavaca, smanjenje ekspresije (engl. *knockdown*) gena *SPRTN* pomoću molekule siRNA rezultirala je osjetljivošću na formaldehid, a ličinke oblića *Caenorhabditis elegans* bez funkcionalnog SPRTN-a pokazivale su ekstremnu osjetljivost na akutnu izloženost formaldehidu.⁴¹ Navedeni rezultati sugerirali su uključenost SPRTN-a u popravku DPC oštećenja. Pokazano je kako SPRTN efikasno cijepa histone H2A, H2B, H3, linker histon H1, HMG1, TOP1, TOP2, PARP1, FAN1, HLTF te kvašćev Rad5 u prisutnosti DNA, no ne i proteine PCNA, BSA i RFC koji ne vežu DNA.^{40,41,42,44,45} Kristalna struktura humane domene SprT (26-214 ak) u kompleksu s kratkom ssDNA (5 nukleotida) otkrila je dvije poddomene SprT; metaloproteaznu poddomenu (engl. *metalloprotease sub-domain*, MPD, 26–166 ak) i veznu poddomenu za Zn^{2+} (engl. *Zn²⁺ binding sub-domain*, ZBD), u kojima svaka veže po jedan cinkov kation. Bazična regija SPRTN-a ostvaruje interakciju sa ssDNA i dsDNA, dok poddomena ZBD preferira interakciju sa ssDNA zahvaljujući aromatskome džepu koji specifično prepoznaje nesparene baze ssDNA te efikasno pozicionira domenu SprT za cijepanje DPC-ova. U kristalnoj rešetki SPRTN dimerizira u prisutnosti ssDNA, što ukazuje kako bi funkcionalna jedinica proteaze mogla biti dimer SPRTN-a (slika 5).⁴²



Slika 5. Kristalna struktura humane domene SprT (aminokiseline 26-214) vezane za pet nukleotida ssDNA (engl. *oligonucleotide-deoxycytosine*, oligo-dC). Poddomene su označene različitim bojama; metaloproteazna poddomena, MPD (plavo), vezna poddomena za Zn^{2+} , ZBD (narančasto), cinkovi atomi prikazani su kao sive sfere, DNA je prikazana štapićima (preuzeto i prilagođeno prema ref. 42)

Slično kao i Wss1, SPRTN pokazuje ovisnost cijepanja supstrata i autoproteolize o prisutnosti DNA *in vivo* i *in vitro*.^{15,41,42} *In trans* autoproteoliza aktivna je u SPRTN_{FL} i SPRTN_{ΔC}, no ne i kod mutanata SPRTN_{E112Q} i SPRTN_{Y117C}.^{40,41,42} Smatra se da je samocijepanje dio regulatornog mehanizma SPRTN-a kojim se sprječava neželjena proteoliza drugih supstrata na kromatinu.⁴² Kao i kod Wss1, katalitički centar aktivnog mjesta HEXXH u proteazi SPRTN izložen je otapalu bez određene šupljine za vezanje supstrata, što ukazuje na nespecifičnost procesiranja supstrata i opasnost od proteolize neciljnih proteina.^{41,42} Iako ne pokazuje specifičnost prema točno određenim sekvencama supstrata, SPRTN preferencijalno cijepa proteine vezane za DNA u slabo strukturiranim regijama bogatima aminokiselinama poput serina, arginina i lizina.⁵ Nadalje, pokazano je kako se mogu pocijepati samo supstrati s dugačkim, fleksibilnim regijama koje mogu biti provučene kroz uski utor formiran između poddomena MPD i ZBD.⁴² Vezanje DNA inducira konformacijsku promjenu koja otvara aktivno mjesto SPRTN-a za interakciju sa supstratima.^{40,41} U prisutnosti DNA, vezna domena

§ 2. Literaturni pregled

za DNA i aktivno mjesto manje su izloženi otapalu. Nasuprot tome, C-terminalni kraj proteina pokazuje veću izloženost otapalu u prisutnosti DNA.^{41,42} Proteolitička aktivnost SPRTN-a dodatno je regulirana posttranslacijskom modifikacijom monoubikvitinacije. SPRTN je prisutan u stanicama u dva oblika, nemodificiranom i monoubikvitiniranom. U monoubikvitiranoj formi SPRTN se ne veže na kromatin. Jednom kada su detektirana DPC oštećenja, SPRTN postaje deubikvitiran čime je omogućeno njegovo vezanje na kromatin.⁴¹

Eksperimentima *in vitro*, u ekstraktu *Xenopus* jajašaca, pokazano je kako je za nastavak replikacije u prisutnosti DPC-ova potrebno procesirati DPC oštećenja u manje peptidne fragmente, neovisno o tome nalazi li se DPC oštećenje na vodećem ili tromom lancu.⁴⁶ Mjerenjem ekspresije SPRTN-a u humanim stanicama mokraćnog mjehura T24 s usklađenim staničnim ciklusom utvrđena je njegova odsutnost u fazi G0, dok je najveća zabilježena u S fazi.⁴⁰ SPRTN svojim proteolitičkim djelovanjem smanjuje akumulaciju DPC-ova u stanici čime u konačnici sprječava zaustavljanje replikacijske rašlje i nastanak dvolančanih lomova. Na taj način SPRTN osigurava održavanje genomske stabilnosti u proliferativnim humanim stanicama.⁴⁰ Precizan mehanizam popravka DPC oštećenja ovisnog o replikaciji ostaje nepoznat, uključujući faktore koji procesiraju zaostale peptidne ostatke te mogućnost popravka izvan S faze staničnog ciklusa.¹

ACRC ili GCNA (engl. *germ cell nuclear antigen*) je nedavno otkrivena potencijalna proteaza koja sudjeluje u uklanjanju DPC oštećenja kod metazoa. ACRC je pretežno eksprimiran u germinativnim stanicama i ranim embrionalnim stadijima gdje sudjeluje u regulaciji genomske stabilnosti. Humani ACRC posjeduje proteaznu domenu SprT i intrinzično neuređenu regiju (engl. *intrinsically disordered region*, IDR).⁴⁷ Analizom sekvenci humanog ACRC-a u N-terminalnome dijelu otkrivena su najmanje četiri potencijalna motiva SIM za vezanje SUMO. Za uklanjanje neenzimskih DPC-ova induciranih formaldehidom te DNMT1-DPC-ova potrebna je SUMOilacija. Pokazano je kako su ovakva SUMOilirana DPC oštećenja supstrati ACRC-u.⁴⁸ Gubitak aktivnosti ACRC-a rezultira akumulacijom DPC oštećenja u germinativnim stanicama i ranim embrijima vinske mušice, oblića i zebrice.⁴⁷ U stanicama oblića *C. elegans* ACRC i TOP-2 međusobno djeluju i kolokaliziraju tijekom mitoze, a mutanti ACRC-a pokazuju osjetljivost na TOP2 inhibitore. Također u stanicama miša ACRC međusobno djeluje s TOP2, a mutanti ACRC-a pokazuju abnormalnosti sukladne nemogućnosti procesiranja DPC oštećenja.⁴⁹ Mutanti *dvc-1* (ortolog SPRTN-a) i *gcna-1* (ortolog ACRC-a) u

§ 2. Literaturni pregled

embrijima *C.elegans* podjednako su osjetljivi na tretman formaldehidom, što ukazuje na uključenost i SPRTN-a i ACRC-a u popravku DPC oštećenja.⁴⁹

Nedavno je predloženo da proteaze FAM111A i FAM111B te DDI1 i DDI2 sudjeluju u popravku DPC oštećenja tijekom replikacije, no ova hipoteza kao i njihova interakcija sa SPRTN-om koji je također specifično replikativna proteaza treba biti dodatno razjašnjena. Postojanje više proteaza moglo bi stanicama osigurati različite načine u borbi protiv toksičnosti uzrokovane raznovrsnim DPC oštećenjima.⁵

Uključenost proteasoma kao stanične mašinerije za degradaciju ubikvitiniranih i odmotanih proteina testirana je u popravku DPC oštećenja. Utvrđeno je kako su ubikvitinirana Top1 DPC i Top2 DPC oštećenja uklonjeni mehanizmom ovisnim o proteasomu.^{50,51} Također, pokazana je akumulacija ubikvitiniranih Pol β -DPC oštećenja nakon tretmana Pol β inhibitorom proteasoma MG132.⁵² U ljudskim stanicama inhibicija proteasoma laktacistinom omela je popravak neenzimskih DPC oštećenja induciranih formaldehidom.⁵³ Naprotiv, određene istraživačke grupe objavile su kako proteasom ne utječe na popravak neenzimskih DPC oštećenja.^{23,46} Inhibicija proteasoma u ekstraktu *Xenopus* jajašaca nije imala značajnijeg učinka na popravak DPC-ova *in vitro*. No, primijećeno je kako nedostatak ubikvitina inhibira popravak. Iz navedenih rezultata nije bilo moguće egzaktno razlučiti je li proteasom direktno uključen u razgradnji DPC oštećenja ili je ključno prethodno obilježavanje ubikvitinom.⁴⁶ Degradacija DPC oštećenja proteasomom potvrđena je inhibicijom ubikvitinacije metilacijom lizina koja je spriječila aktivnost proteasoma u razgradnji DPC-ova. U degradaciji proteasomom ovisnoj o replikaciji susret replisoma s DPC oštećenjem na vodećem lancu zaustavlja replikativnu helikazu CMG te pokreće ubikvitinaciju proteinskog dijela DPC-ova pomoću E3-ubikvitin protein ligaze TRAIP. Nakon poliubikvitinacije TRAIP-om, zaustavljena replikativna helikaza zaobilazi proteinski adukt kojeg proteasom potom degradira. Nasuprot tome, u proteoliznom popravku ovisnom o proteazi SPRTN, DPC oštećenja su procesirana neovisno o prethodnoj poliubikvitinaciji.⁵⁴

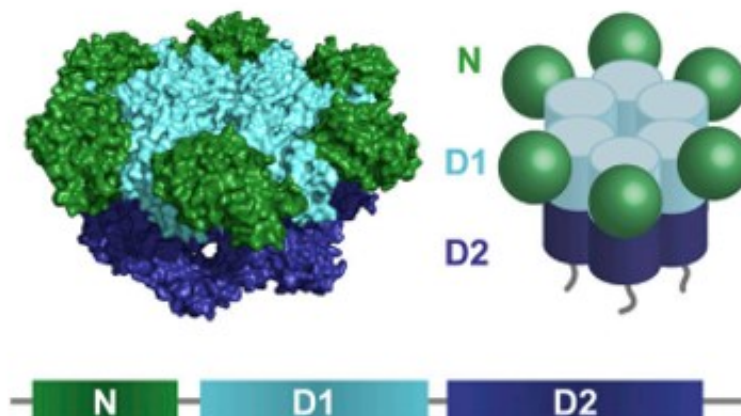
2.4. AAA+ ATPaza Cdc48/p97/VCP

Protein koji sadrži valozin (engl. *valosin-containing protein*, VCP/p97/Cdc48) pripada AAA+ obitelji ATPaza koja koristi energiju hidrolize ATP-a kako bi translocirala ili strukturno remodelirala molekule.⁵⁵ p97 je eksprimiran u svim eukariotskim stanicama te se ubraja u jedne od najzastupljenijih proteina u stanici.⁵⁶ Kao topivi protein, primarno se nalazi u citosolu, no

§ 2. Literaturni pregled

dio je prisutan na membranama organela uključujući endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, mitohondrij i endosome.⁵⁷ p97 sudjeluje u različitim staničnim putevima uključenim u regulaciji stanične homeostaze, membranske fuzije, vezikularnog transporta te procesa povezanih s kromatinom.⁵⁸ Većina identificiranih supstrata proteina p97 konjugirana je s lancima poliubikvitina i ciljana za degradaciju proteasomom 26S.⁵⁷ Važna karakteristika sustava za degradaciju potpomognutog s p97 je mogućnost prepoznavanja ubikvitiniliranih supstrata pomoću različitih kofaktora i adaptora.⁵⁶ p97 posjeduje afinitet za vezanje ubikvitina, no većinom se veže za ubikvitinilirane supstrate putem proteina adaptora koji sadrže domene ili motive za vezanje ubikvitina.⁵⁹ Smatra se da p97 djeluje kao molekularni šaperon u sustavu ubikvitin-proteasom tako da odvaja poliubikvitinirane od nemodificiranih proteina i nosi ih do proteasoma.⁶⁰ Za odmatanje proteina ovisno o p97, ubikvitinilirani supstrati prepoznati su adaptorskim kompleksom Ufd1-Npl4 vezanim za p97. Ufd1-Npl4 nakon hidrolize ATP-a provlači ubikvitin i vezani supstrat kroz središnju poru heksamernog p97 i time ga odmotava za degradaciju proteasomom.⁶¹ Mutacije p97 povezuju se s humanim neurodegenerativnim proteinopatijama.⁶² Povišena ekspresija p97 uobičajena je kod mnogih vrsta raka, stoga prisutan je stalni interes za razvoj inhibitora p97 i njegovih adaptora u terapiji raka.⁶³

p97 posjeduje dvije ATPazne domene D1 i D2, regulatornu N-domenu smještenu na periferiji prstena D1 te C-terminalni nastavak (engl. *C-terminal extension*, CTE).⁵⁹ Domene D1 i D2 organizirane su kao dva prstena naslagana jedan na drugi sa središnjom porom i povezane kratkom polipeptidnom poveznicom (engl. *D1–D2 linker*) (slika 6). Iako su domene strukturno vrlo slične, ostvaruju različite funkcije: domena D1 služi za heksamerno slaganje p97, a domena D2 doprinosi cjelokupnoj ATPaznoj aktivnosti. N-terminalna domena i domena D1 povezane su fleksibilnim polipeptidnim segmentom (engl. *N-D1 linker*) (slika 6).^{57,64} N domena prepoznaje različite adaptore za vezanje supstrata, uključujući kompleks Ufd1–Npl4 koji prepoznaje ubikvitinilirane lance i metaloproteazu SPRTN. C-terminalni kraj sudjeluje u vezanju dodatnih kofaktora p97/Cdc48, no njegova točna uloga u hidrolizi ATP-a i odmotavanju supstrata ostaje nerazjašnjena.⁶⁵

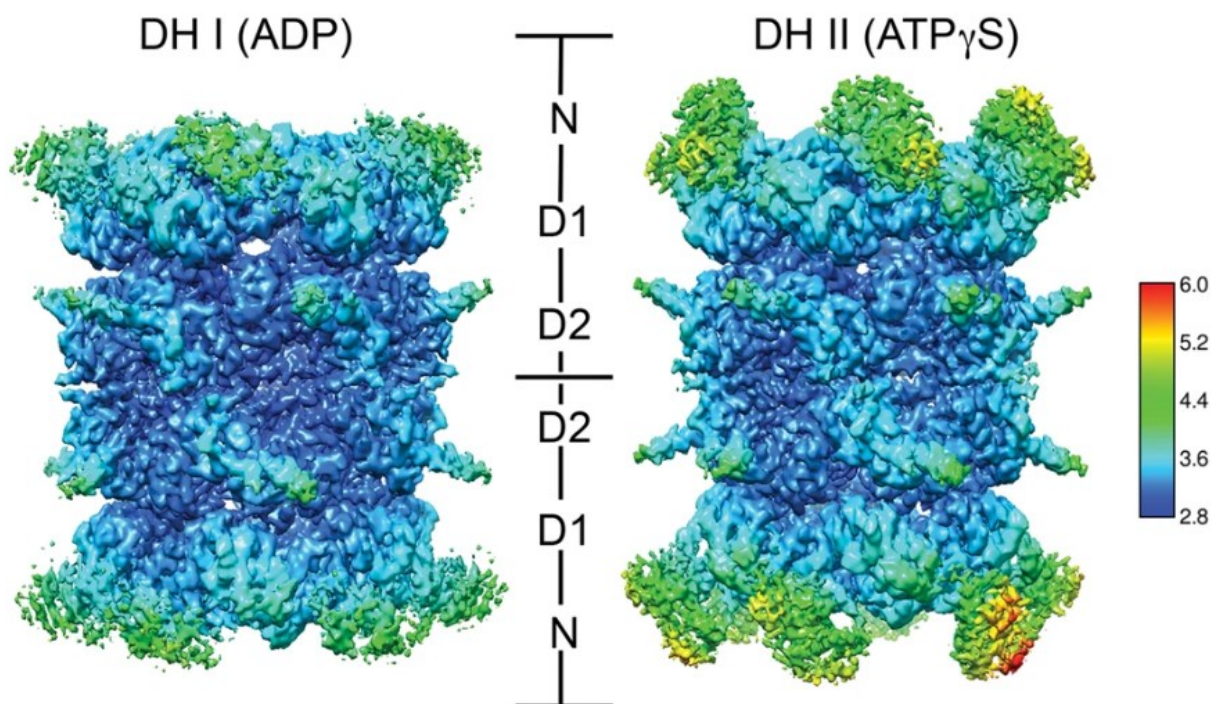


Slika 6. Heksamerna struktura humanog p97. Svaka monomerna podjedinica homoheksamernog p97 sadrži globularnu N domenu (zeleno) i dvije ATPazne domene D1 (svjetlo plavo) i D2 (tamno plavo) (preuzeto i prilagođeno prema ref. 58)

Tijekom vezanja i hidrolize ATP-a, p97 prolazi kroz konformacijske promjene koje se prenose od domene D2 sve do domene N. Spoznaje o p97 dobivene mikroskopijom atomskih sila pokazale su ponavljajuća naprijed-natrag rotacijska kretanja prstena ND1 nakon vezanja ATP-a za domenu D2. Smatra se kako su rotacijska kretanja p97 povezana s mehanizmom pretvorbe kemijske energije dobivene hidrolizom ATP-a u mehaničku silu potrebnu za remodeliranje supstrata.⁶⁶ Trenutna otkrića o p97 podupiru model prema kojemu u odsutnosti ATP-a, središnja pora nalazi se u zatvorenoj konformaciji koja onemogućuje vezanje supstrata. Vezanje ATP-a inducira konformacijske promjene dovodeći do otvaranja pore u domeni D2.⁶⁷ Strukture kompleksa ATPaze Cdc48 i njegovog kofaktora Ufd1-NpI4 s poliubikvitiniranim supstratom dobivene krio-elektronskom mikroskopijom pokazale su kako kompleks inicira procesiranje supstrata odmotavajući molekulu ubikvitina. Samo odmotavanje ubikvitina potaknuto je njegovim vezanjem za kompleks i ne iziskuje vezanje ili hidrolizu ATP-a pomoću ATPaze. Odmotani ubikvitin veže se za NpI4 i provlači svoj N-terminalni segment kroz oba ATPazna prstena. Nakon umetanja u poru, N-terminalni segment ubikvitina postavljen je u položaj za interakciju s aminokiselinskim bočnim ograncima petlji pora domene D2. Petlje pora tada koriste energiju hidrolize ATP-a za povlačenje N-terminalnog dijela kroz centralnu poru. Stepnasta struktura koju formiraju petlje pora domene D2 djeluje poput pokretne trake za povlačenje svake peptidne veze polipeptidnog lanca kroz centralnu poru. Provlačenje polipeptidnog lanca generirano je rotacijskim mehanizmom vezanja i hidrolize ATP-a u šest ATPaznih domena D2 prstena.⁶⁸ Također, pokazano je kako humani p97 te kvašćev Cdc48

§ 2. Literaturni pregled

stvaraju dvostruke heksamere (engl. *double-hexamers*, DH) *in vitro* te kao takve djeluju kao aktivne ATP-aze.⁶⁵ Najnovija istraživanja krio-elektronskom mikroskopijom predočila su strukturu dvostrukog heksamera humanog p97 u aktivnom stanju ATPaze s uređenim petljama za interakciju sa supstratima. Dvostruki heksamer p97 sastoji se od dva identična, pojedinačna heksamera s domenama D2 u izravnome kontaktu.⁶⁵ Prethodna saznanja ukazivala su da vezanje ATP-a u ATP-aznome mjestu domene D1 favorizira tzv. „*up*” konformaciju u kojoj je N domena pozicionirana iznad prstena D1, za razliku od „*down*” konformacije u kojoj N domena zauzima položaje koplanarne prstenu.⁶⁹ No, saznanja o humanom p97 dobivena krio-elektronskom mikroskopijom upućuju kako konformacije N domene nisu nužno povezane sa specifičnim stanjima nukleotida u domeni D1 (slika 7). Prema slici 7. također je vidljivo kako N-domena u „*down*” konformaciji je vrlo neuređena (gotovo nije ni vidljiva), dok je vidljiva u „*up*” konformaciji te puno fleksibilnija nego ostatak proteina (tamno plavo).⁶⁵ Ostaje pitanje kako supstrat prolazi kroz takav dodekamer, te moraju li prvo disocirati.



Slika 7. Mapa lokalne rezolucije konfomera I (lijevo) i II (desno) dodekamera humanog p97. D1 domene oba konfomera nalaze se u konformacijama s vezanim ATP-om. Domena D2 u konfomeru I posjeduje vezani ADP, dok konfomer II veže ATP. N domene konfomera I su u „*down*” konformaciji, dok u konfomeru II su prisutne u „*up*” konformaciji (preuzeto i prilagođeno prema referenci 59)

§ 2. Literaturni pregled

O funkciji p97 u popravku unakrsnog vezanja proteina i molekule DNA ne zna se mnogo. Istraživanja u kvascu utvrdila su kako se Wss1 treba povezati s Cdc48 za uklanjanje TOP1 DPC oštećenja.³⁹ Pokazano je kako u humanim stanicama SPRTN procesira TOP1 DPC oštećenja pomoću p97 i kofaktora TEX264 (engl. *testis-expressed protein 264*). TEX264 prepoznaje nemodificirane i SUMOilirane TOP1 te inicira popravak regrutiranjem p97 i SPRTN-a.⁷⁰ Smatra se da je za proteolitičku degradaciju SPRTN-om nužna prethodna modifikacija proteinskog dijela pomoću p97. Također, pokazano je kako proteoliza DPC-oštećenja SPRTN-om ovisi o odmatanju supstrata pomoću p97 i označavanju ubikvitinskim adapterom Ufd1-Npl4. Navedeno sugerira kako interakcija s p97 iziskuje proteinski interaktor, iako SPRTN posjeduje domenu za vezanje ubikvitina i domenu za interakciju s p97.⁶¹

Kao što je već spomenuto, SPRTN posjeduje motiv SHP za interakciju s p97. Mutacija ove sekvence, no ne i drugih konzerviranih regija u potpunosti onemogućuje interakciju SPRTN-a i p97.⁵ Nadalje, pokazano je kako putem motiva SHP, SPRTN regrutira p97 do mjesta oštećenja DNA.^{6,7} Jednom regrutiran na zaustavljenim replikacijskim rašljama, p97 bi mogao ukloniti TLS polimerazu (Pol η) s oštećene DNA i time spriječiti pretjeranu translezijsku sintezu DNA.^{6,7}

Uloga p97 u popravku DPC-ova koji nisu TOP1 DPC-ovi trenutno nije poznata. Precizan mehanizam procesiranja DPC oštećenja i popravka nastalih oštećenja DNA ostaje nerazjašnjen. Potrebno je identificirati dodatne kofaktore proteina p97 te proteine za prepoznavanje supstrata koji djeluju zajedno sa SPRTN-om u popravku DPC oštećenja. Detaljan uvid u molekularan mehanizam proteolitičkog puta popravka DPC-ova objasnio bi kako stanice održavaju genomsku stabilnost tijekom nastanka DPC oštećenja te omogućio razvoj inhibitora SPRTN-a i p97 kojima bi se poboljšao ishod ciljanih kliničkih terapija.^{1,15,61}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*BD Difco*), agarozna (*Sigma*), 30 %-tni akrilamid/bisakrilamid, 29:1 (*Carl Roth*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Carl Roth*), borna kiselina (H_3BO_3) (*Kemika*), cinkov sulfat (*Sigma*), ditiotreitrol (DTT) (*Sigma*), elektroporacijski sustav *Gene Pulser Xcell* (*Bio-Rad*), etanol (*Gram-Mol*), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Gram-Mol*), glicin (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-(etansulfonska kiselina) (HEPES) (*Carl Roth*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Carl Roth*), kanamicin (*Sigma*), kloramfenikol (*Carl Roth*), klorovodična kiselina (HCl) (*Kemika*), Luria-Bertani, LB medij (*BD Difco*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), β -merkaptioetanol (*Sigma*), metanol (*Gram-Mol*), mlijeko u prahu (*Carl Roth*), natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) (*Carl Roth*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Merck*), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (*Sigma*), natrijev klorid (NaCl) (*Carl Roth*), octena kiselina (*Kemika*), *N,N,N,N'*-tetrametiletilendiamin TEMED (*Sigma*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Carl Roth*), polietilenglikol 3350 (PEG 3350), polietilenglikol 4000 (PEG 4000), Tween (*Sigma*)

3.1.2. Boje

6 \times Blue/Orange Loading Dye (*Promega*), Sybr Green I (*Invitrogen*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Thermo Scientific*)

3.1.3. Markeri veličine

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (*Thermo Scientific*), Prestained Protein Marker (*Proteintech*), Precision Plus Protein Dual Color Standards (*Bio-Rad*), Gene Ruler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*)

§ 3. Eksperimentalni dio

3.1.4. Nukleinske kiseline i nukleotidi

Adenozin-trifosfat (ATP) (*Sigma*), oligonukleotidi korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze (tablica 2) te oligonukleotid 5'-CCCCC-3' korišten u kristalizaciji kompleksa naručeni su od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*), rašljasta struktura molekule DNA (engl. *splayed DNA duplex*) (OD1+OD3) korištene u testu aktivnosti (tablica 1).

Tablica 1. Sekvence DNA korištene u testiranju katalitičke aktivnosti SPRTN_{FL} i SPRTN₁₋₂₆₈

Naziv sekvence	Nukleotidni slijed
OD1	ATCGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGC
OD3	GCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTCCACC

3.1.5. Proteini, enzimi i antitijela

Dpn I (*Thermo Scientific*), humani histon H3.3 (*New England Biolabs*), *Phusion* Master Mix 2× (*Thermo Scientific*), poliklonska antitijela kunića na histon H3 (*Cell Signaling Technology*), sekundarna antitijela na antitijela kunića konjugirana s peroksidazom iz hrena (*Sigma*), T4 DNA-ligaza (*Thermo Scientific*), T4 polinukleotidna kinaza (PNK) (*Thermo Scientific*), TEV proteaza (*pripremljena u laboratoriju*).

3.1.6. Kromatografska punila, kolone i membrane

Centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Millipore*), kromatografske kolone (*HiLoad 16/600 Superdex 75 pg*, *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg*, *HiTrap Q HP 1 mL*, *Superdex 200 Increase 10/300 GL*,) (*Cytiva*), membrane za dijalizu *Spectrum Standard RC Dry Dialysis Kits 12–14 kDa* (*Fisher Scientific*), Ni-NTA agarozna (*Protino, Jena Bioscience*), nativni poliakrilamidni gelovi 4–15 % *Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels* (*Bio-Rad*), PD-10 *Desalting Columns* (*GE Healthcare*), PVDF membrana (*Millipore*).

3.1.7. Komercijalni kompleti za pročišćavanje DNA

Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (*New England Bio Labs*) za pročišćavanje DNA iz reakcijskih smjesa lančane reakcije polimeraze, *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (*Sigma*) za izolaciju plazmidne DNA iz *E. coli*.

§ 3. Eksperimentalni dio

3.1.8. Materijali korišteni u kristalizaciji

Okrugla silikonizirana pokrovna stakalca promjera 22 mm, ploče za tri kapi s 96 spremnika *Swissci* (*Hampton Research*), ploče s 24 spremnika VDX (*Hampton Research*), PTFE kuglice *Seed Bead* (*Hampton Research*).

3.1.9. Komercijalni kompleti za kristalizaciju proteinskog kompleksa

Za kristalizaciju proteinskog kompleksa SPRTN:p97 korišteni su slijedeći kristalizacijski uvjeti: *JBScreen Classic HTS I*, *JBScreen Classic HTS II*, *JBScreen Nuc-Pro HTS*, *JBScreen PACT ++ HTS*, *JBScreen PEG/Salt HTS* (*Jena Bioscience*), *The LMB Crystallization Screen HT-96* (*Molecular Dimensions*), *Morpheus® HT-96* (*Molecular Dimensions*), *NeXtal DWBlock ProComplex Suite 96x1,5 mL* (*QIAGEN Sciences*).

3.1.10. Instrumenti

Analitička vaga PM400 (*Mettler Toledo*), aparatura za prijenos proteina *Western blotting Mini Trans-Blot* (*Bio-Rad*), centrifuge *Hettich Universal 320R* (*DJB Labcare Ltd*), *Minispin plus* (*Eppendorf*), *Sorvall RC-5B* (*Sorvall*), *Sorvall LYNX 4000 Superspeed* (*Thermo Scientific*), elektroforetski sustav *Horizon 58* (*Biometra*), homogenizator za razbijanje stanica *Emulsiflex C3* (*Avestin*), izvori napajanja *Standard Power Pack P25* (*Biometra*), *PowerPac™* (*Bio-Rad*), jednostavna digitalna laboratorijska vaga EMB (*Kern*), magnetska miješalica s pločom za grijanje MS-H280-Pro (*Toption*), robot za postavljanje kristalizacije Oryx8LCP (*Douglas Instruments*), sustav za brzu tekućinsku kromatografiju *ÄKTA Pure* (*Cytiva*), sustav za SDS-PAGE *Mini-Protean Tetra Cell* (*Bio-Rad*), svjetlosni mikroskop (*Olympus SZX12*), pH metar pH 526 *MultiCal* (*WTW*), termoblok *Thermocycler T-Gradient ThermoBlock* (*Biometra*), tresilica s termoblokom *Thermomixer 5350* (*Eppendorf*), uređaj za vizualizaciju vrpce na gelu *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*), UV-Vis spektrofotometar *BioSpec-nano* (*Shimadzu*), *Biodrop Duo* (*Biochrom Ltd*).

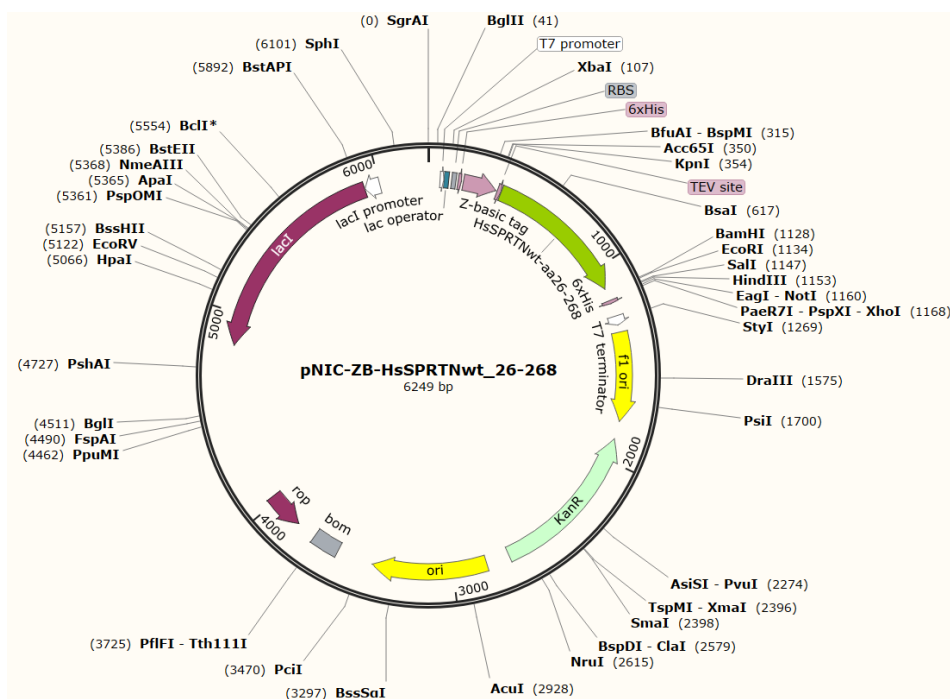
3.1.11. Plazmidni vektori i sojevi bakterije *E. coli*

Plazmidi za ekspresiju proteina u *E. coli*

pNic-Zb je plazmidni vektor koji kodira N-terminalnu ekspresijsku kazetu (His)₆-Z-basic-TEV te negativni selekcijski marker SacB za pročišćavanje rekombinantnih proteina. Navedeni

§ 3. Eksperimentalni dio

vektor služi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*.⁷¹ Heksahistidinski privjesak ((His)₆) pripada jednom od najčešće korištenih afinitetnih privjesaka koji lako koordiniraju s imobiliziranim prijelaznim ionima poput Ni²⁺ ili Co²⁺. Metalni ioni imobilizirani su vezama poput Ni(II)-nitrilotrioctene kiseline (Ni-NTA) ili Co²⁺-karboksimetil-aspartata na rezinu ili kuglicama dostupnim putem mnogobrojnih komercijalnih proizvođača.⁷² Zb privjesak (engl. *Z-basic tag*) predstavlja pozitivno nabijenu proteinsku domenu koja se može koristiti kao opći privjesak za pročišćavanje rekombinantnih proteina kromatografijom kationske izmjene pri fiziološkim uvjetima pH. Domena Z sastoji se od 58 aminokiselina proteina deriviranog iz domene stafilokoknog proteina A.⁷³ Prisutnost fuzijskog privjeska može interferirati s funkcijama pročišćavanog proteina i utjecati na kristalizaciju proteina, stoga plazmid sadrži mjesto za cijepanje proteazom TEV (engl. *tobacco etch virus*). Nadalje, pNic-Zb je plazmid malog broja kopija u stanici te sadrži gen za rezistenciju na antibiotik kanamicin.⁷¹ U ovome radu navedeni plazmid korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina *HsSPRTN*_{FL,WT}, *HsSPRTN*_{FL,E122A}, *HsSPRTN*_{1-268,WT}, *HsSPRTN*_{1-268,E122A}, *HsSPRTN*_{26-268,WT}, *HsSPRTN*_{26-268,E122A}. Primjer plazmida za prekomjernu ekspresiju *HsSPRTN*_{26-268,WT} prikazan je na slici 8.



Slika 8. Mapa plazmida pNic-Zb_ *HsSPRTN*_{26-268,WT} korištenog za prekomjernu ekspresiju proteina *HsSPRTN*_{26-268,WT}. Slika napravljena pomoću komercijalnog programa *SnapGene*

§ 3. Eksperimentalni dio

pET-24d(+) plazmidni vektor pripada obitelji pET vektora. Služi za prekomjernu ekspresiju proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac*. Radi pročišćavanja rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, navedeni plazmid služi za dobivanje rekombinantnog proteina s N-terminalnom sekvencom privjeska T7 ili C-terminalnom sekvencom privjeska (His)₆. Plazmid je malog broja kopija u stanici te nosi kanamicinsku rezistenciju. U radu za prekomjernu ekspresiju korišten je modificirani pET-24d(+) vektor koji kodira N-terminalni heksahistidinski privjesak nakon kojeg slijedi sekvenca za cijepanje proteazom TEV. Navedenim plazmidom prekomjerno su ekprimirani proteini p97_{FL,WT} te p97_{N_D1,WT}.⁷⁴

Sojevi *E. coli*

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA Hte* (*argU ileY leuW Cam*^r)) (*Agilent Technologies*) je soj bakterije *E. coli* za ekspresiju proteina s rijetkim kodonima AGG/AGA (arginin), AUA (izoleucin) i CUA (leucin). Navedene kemijski kompetentne stanice nose rezistenciju na antibiotik kloramfenikol te su deficitarne za proteaze *lon* i *ompT*. Gen za T7 RNA-polimerazu integriran u genomskoj DNA je pod kontrolom promotora *lacUV5*, a ekspresija proteina inducirana je IPTG-om.⁷⁵

Rosetta 2 (DE3) (F⁻ *ompT hsdS*_B(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R)) (*Novagen*) je derivat soja BL21 *lacZY* dizajniran za poboljšanu ekspresiju eukariotskih proteina s rijetkim kodonima AGG/AGA/CGG (arginin), AUA (izoleucin), CUA (leucin), CCC (prolin), GGA (glicin) u *E. coli*. Soj nosi rezistenciju na antibiotik kloramfenikol te je deficitaran za proteaze *lon* i *ompT*. Gen za T7 RNA-polimerazu je pod kontrolom promotora *lacUV5*. Ekspresija proteina je inducirana IPTG-om.⁷⁶

XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI*^qΔ*M15 Tn10* (Tet^r)]) su kompetentne stanice za rutinska kloniranja koristeći plazmidne i lambda vektore. Posjeduju mutaciju gena *endA* čime je spriječena neželjena degradacija plazmida. Mutacija gena *hsdR* sprječava cijepanje klonirane DNA endonukleaznim sustavom EcoK. Također, mutiranim genom *recA* poboljšana je stabilnost inserta. Soj se može koristiti za plavo-bijelu selekciju.⁷⁷

§ 3. Eksperimentalni dio

XL10-Gold ($Tet^r\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ [$F'proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r$]) (*Agilent Technologies*) su ultrakompetentne stanice dizajnirane za učinkovitu transformaciju velikih konstrukata, uključujući ekspresijske vektore i genomsku DNA te su idealne za konstrukciju knjižnica plazmidne DNA stvarajući veći broj kolonija za reprezentativniju knjižnicu. Navedeni soj je deficijentan u endonukleazi I (*endA*) čime poboljšava kvalitetu izolirane, pročišćene DNA (*Miniprep* DNA). Stabilnost inserta osigurana je nedostatkom proteina *recA* važnog za rekombinaciju. Osim visoke efikasnosti transformacije te visokog prinosa DNA kao rezultat *recA endA* mutacija, ovaj soj također ne sadrži gen za T7 RNA-polimerazu, čineći ga idealnim za stvaranje rekombinantnih plazmida u neekspresijskim uvjetima. Uz odgovarajući plazmid, soj se može koristiti za plavo-bijelu selekciju rekombinantnih plazmida.⁷⁷

3.2. Metode rada s rekombinantnom DNA

3.2.1. Lančana reakcije polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda eksponencijalne amplifikacije željenog fragmenta DNA *in vitro*. Metoda se temelji na ponavljanju tri koraka reakcije u 25 do 35 ciklusa. Prvi korak obuhvaća razdvajanje lanaca DNA toplinom. Potom slijedi sljepljivanje (engl. *annealing*) komplementarnih početnica omeđujući onaj segment DNA koji se želi umnožiti. U zadnjem koraku odvija se sinteza komplementarnih lanaca DNA pomoću termostabilne DNA-polimeraze. Uz tri ponavljajuća koraka, prisutni su i koraci početne denaturacije i završne elongacije čije trajanje je uobičajeno nešto dulje od ponavljajućih reakcija kako bi se osiguralo potpuno odvajanje lanaca i sinteza DNA. Neizostavni elementi reakcijske smjese za PCR su termostabilna DNA-polimeraza, kalup DNA, dNTP-ovi, oligonukleotidne početnice te pufer s magnezijevim ionima.⁷⁸

3.2.2. Dizajniranje početnica

Za uspješno provedenu PCR reakciju, jedan od ključnih koraka je pravilan odabir početnica. Početnice su kraći oligonukleotidi koji služe kao ishodišta za sintezu DNA. Prilikom dizajna važna je specifičnost i komplementarnost prema željenim sekvencama kalupa DNA. Optimalan postotak GC sadržaja trebao bi iznositi između 40 i 60 %. Obzirom da su GC parovi termodinamički stabilniji i omogućuju jače sparivanje početnica s kalupom DNA poželjno je

§ 3. Eksperimentalni dio

da krajevi oligonukleotida završavaju gvaninom ili citozinom. Optimalna duljina oligonukleotida trebala bi biti između 16 i 28 nukleotida. Također, nužno je da strukture početnica budu jednostavne, bez sekundarnih struktura, autokomplementarnosti i komplementarnosti između početnica. Važno je da temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*, T_m) bude između 55 i 70°C te da razlika u temperaturi mekšanja početnica nije veća od 5°C.⁷⁹ U ovome radu dizajnirane su početnice za kloniranje proteinskih konstrukata *HsSPRTN*_{26-268,WT} i *HsSPRTN*_{26-268,E122A} (tablica 2), a kao kalup korišteni su plazmidi pNic-Zb_*HsSPRTN*_{1-268,WT} i pNic-Zb_*HsSPRTN*_{1-268,E122A}.

Tablica 2. Nukleotidni slijed početnica uzvodnih (engl. *forward*, F) i nizvodnih (engl. *reverse*, R) početnica korištenih u inverznoj lančanoj reakciji polimeraze

Naziv početnice	Nukleotidni slijed (5'→3')	T_m / °C	GC / %
pNic-Zb- <i>HsSPRTN</i> _{26-268_F}	CAGGAGTCCCTGTCGCTAGTG	60	62
pNic-Zb- <i>HsSPRTN</i> _{26-268_R}	CATGGATTGGAAGTACAGGTTCTC	56	46

3.2.3. Inverzna lančana reakcija polimeraze

Za kloniranje skraćenih konstrukata *HsSPRTN*_{26-268,WT} i *HsSPRTN*_{26-268,E122A} korištena je metoda inverznog PCR-a. U iPCR-u umnožava se čitav plazmid s genom od interesa uz deleciju odabranog segmenta kodirajuće sekvence proteina. Kako bi se deletirao željeni segment, potrebno je dizajnirati početnice koje su komplementarne 5' krajevima kalupa s obje strane ciljane zone delecije. Jednom kada je umnoženi linearni produkt fosforiliran i ligiran, novi konstrukt neće sadržavati izbačenu regiju. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,5 µL uzvodne (10 µmol L⁻¹) i nizvodne (10 µmol L⁻¹) početnice (prikazane u tablici 2), 0,2 µL plazmida pNic-Zb (50 ng mL⁻¹), 3,8 µL sterilne vode te 5 µL otopine 2x *Master Mix* koja sadrži Taq-DNA-polimerazu, dNTP-ove, MgCl₂ i reakcijski pufer potreban za efikasnu PCR reakciju. iPCR je proveden u uređaju *T-Gradient* (*Biometra*), a uvjeti reakcije prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti inverzne lančane reakcije polimeraze

Korak	T / °C	T / sec	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	30	1
Denaturacija	95	15	28
Sparivanje početnica	60	15	28
Produljenje	72	180	28
Završno produljenje	72	300	1
Pohrana	12	∞	1

3.2.4. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozni gelovi koriste se u horizontalnoj elektroforezi za odvajanje fragmenata nukleinskih kiselina od 100 pb do 20 kb. Fosfatne skupine nukleinskih kiselina su negativno nabijene, stoga će tijekom elektroforeze ukupno negativno nabijena molekula DNA putovati prema pozitivnome električnome polu. Obzirom da je omjer mase i naboja jednak za sve polinukleotide, brzina putovanja nukleinskih kiselina ovisiti će samo o obliku i veličini. Za molekule jednakih molekulskih masa, kretanje u gelu uvjetovano je njihovim oblikom, stoga najbrže putuju superzavijene, a najsporije kružne relaksirane molekule DNA.

Produkti iPCR reakcije analizirani su na 0,8 % agaroznome gelu pripremljenom otapanjem 0,4 g agaroze u 50 mL pufera 1x TAE (tablica 4). Smjesa je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici do potpunog otapanja agaroze. Elektroforeza je provođena u puferu 1x TAE pri 120 V. Radi lakšeg nanošenja i praćenja tijekom elektroforeze, 1,5 µL uzorka iPCR reakcije pomiješano je s 1 µL sterilne vode i 1 µL pufera za nanošenje uzorka 6x *Blue/Orange* (*Promega*) u koju je prethodno dodana boja *SYBR Green* za detekciju DNA. Za određivanje veličine umnoženih fragmenata u prvu jažicu gela nanoseno je 1,5 µL markera *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*). Vizualizacija DNA vrpca u agaroznome gelu provela se pomoću uređaja *ChemiDoc XRS+ System* (*Bio-Rad*). Uspješno dobiveni produkti iPCR reakcije pročišćeni su pomoću komercijalno dostupnog kompleta *Monarch PCR & DNA Cleanup Kit* (*New England Biolabs*) prema uputama proizvođača.

Tablica 4. Sastav korištenog pufera TAE

Sastojci	Koncentracija
Tris	40 mmol dm ⁻³
Octena kiselina	20 mmol dm ⁻³
EDTA	1 mmol dm ⁻³

3.2.5. Ligacija fragmenata DNA pomoću T4 DNA-ligaze

Posljednji korak konstrukcije rekombinantnog plazmida uključuje ligaciju pomoću T4 DNA-ligaze. Navedeni enzim katalizira nastanak kovalentne fosfodiesterne veze između 5'-fosfata i 3'-hidroksilne skupine uz utrošak molekule ATP-a. Prije ligacije potrebno je fosforilirati 5'-kraj iPCR produkta pomoću T4 polinukleotid-kinaze (PNK). PNK katalizira prijenos γ -fosfatne skupine s ATP-a na 5'-OH kraj jednolančanih i dvolančanih lanaca DNA i RNA, oligonukleotida te nukleozid 3'-monofosfata.⁸⁰ Posljednji korak uključuje dodatak restriktivnog enzima Dpn I koji cijepa metilirane i hemimetilirane lance DNA. Time će se sačuvati DNA umnožena *in vitro* pomoću PCR-a, a početni kalup dobiven i metiliran *in vivo* će se razgraditi. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska smjesa bez PNK i T4 DNA-ligaze.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za fosforilaciju, ligaciju i cijepanje restriktivnim enzimom Dpn I

Sastav	V / μ L
Pročišćeni iPCR produkt	10
10x pufer za T4 DNA-ligazu	2
T4 polinukleotid-kinaza, PNK	0,5
Sterilna voda	6,5
T4 DNA-ligaza	0,5
Dpn I	0,5

Pročišćeni iPCR produkt inkubiran je u sterilnoj vodi s PNK i puferom za T4 DNA-ligazu 30 minuta na 37°C. Zatim je reakcijskoj smjesi dodana T4 DNA-ligaza uz inkubaciju sat vremena pri sobnoj temperaturi. U zadnjem koraku nakon dodatka Dpn I smjesa je inkubirana sat vremena na 37°C. Dobivena DNA transformirana je u soj *E. coli* XL10-Gold metodom toplinskog šoka detaljnije opisanog u poglavlju 3.2.3.

§ 3. Eksperimentalni dio

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmide DNA iz *E. coli* korišten je komercijalni komplet *GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma)* prema uputama proizvođača. Iz prekonoćne kulture bakterije su istaložene višekratnim centrifugiranjem te podvrgnute alkalnoj-SDS lizi. Plazmidna DNA potom je vezana za mikrokolonu sa stacionarnom fazom na bazi silicijevog oksida u prisutnosti kaotropnih soli. Nakon višestrukih ispiranja onečišćenja s kolone, plazmidna DNA je eluirana ultračistom vodom.⁸¹

3.2.7. Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracija izolirane plazmidne DNA određivana je spektrofotometrijski na uređaju *BioSpec-nano (Shimadzu)*. Nakon mjerenja slijepe probe (ultračista voda), 1 μL izoliranog uzorka nanesen je na uređaj te mu je koncentracija određivana mjerenjem apsorbancije pri $\lambda=260\text{ nm}$.

3.2.8. Sekvenciranje plazmidne DNA

Prisutnost mutacija u kodirajućem slijedu nije moguće utvrditi agaroznom gel elektroforezom, stoga je uspješnost kloniranja povjerena sekvenciranjem. Rekombinantni plazmidi s početnicama T7P i T7T sekvencirani su servisom tvrtke *Macrogen*, Nizozemska. Sekvencirani nukleotidni sljedovi analizirani su alatom *Clustal Omega* (engl. *Multiple Sequence Alignment*) usporedbom s nukleotidnim sljedovima dostupnima u bazi podataka.

3.3. Metode rada s bakterijama

3.3.1. Priprava mikrobioloških medija za uzgoj bakterija

Za pripravu tekućih hranjivih podloga otopljeno je 25 g/L LB (*Luria-Bertani*) medija (γ (kvašćev ekstrakt) = 5 g dm^{-3} , γ (tripton) = 10 g dm^{-3} , γ (NaCl) = 10 g dm^{-3}) u destiliranoj vodi. Pripravljene LB medij steriliziran je u autoklavu 20 minuta pri 120°C. Po potrebi dodani su kanamicin i kloramfenikol u radnim koncentracijama γ (kanamicin) = 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, γ (kloramfenikol) = 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Kod priprave čvrste hranjive podloge, u tekući LB medij dodaje se agar koji se prilikom autoklaviranja otapa, a potom hlađenjem očvrstne u gel. Otopljeno je 25 g/L LB medija i 15 g/L agara u destiliranoj vodi nakon čega se medij podvrgne sterilizaciji u autoklavu 20 minuta pri 120°C. Nakon hlađenja otopine do sobne temperature u hranjivi

§ 3. Eksperimentalni dio

medij dodan je odgovarajući antibiotik. Kruti medij se dobro promiješa te izlije tako da prekrije dno posudice za uzgoj bakterijske kulture. Nakon sušenja podloge se skladište u plastičnim vrećicama pri 4°C.

3.3.2. Priprava kompetentnih bakterijskih stanica *E. coli*

Kemijski kompetentne stanice su stanice pogodne za unos strane DNA kemijskom transformacijom. Stanice se inkubiraju se na ledu, a potom podvrgavaju toplinskome šoku na 42°C. Sam mehanizam ulaska strane DNA u stanicu pri navedenim uvjetima nije razjašnjen, no smatra se da izlaganje temperaturnome šoku povećava propusnost stanične stjenke bakterija te time omogućava ulazak molekule DNA u stanicu.⁸² Prekonoćna kultura bakterija *E. coli* soja *Rosetta 2* (DE3) uzgojena je u 5 mL LB medija. 5 mL prekonoćne kulture razrijeđeno je 100 puta, tako da je za inokulaciju korišteno 500 mL LB medija uz dodatak kloramfenikola (34 µg mL⁻¹). Stanice su uzgajane na 37°C uz trešnju od 250 okretaja po minuti (engl. revolutions per minute, rpm) do vrijednosti optičke gustoće pri valnoj duljini 600 nm (OD₆₀₀) u rasponu 0,6-0,8. Potom je stanična kultura ohlađena 15 minuta na ledu te istaložena centrifugiranjem pri 5000 rpm i 4°C u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a talog stanica resuspendiran u 250 mL ohlađene otopine 0,1 M CaCl₂. Resuspendirane stanice inkubirane su 30 minuta na ledu. Zatim su ponovno centrifugirane 10 minuta pri 5000 rpm i 4°C. Nakon završnog taloženja, supernatant je odbačen, a stanice resuspendirane u 25 mL ohlađene otopine 0,1 M CaCl₂ i 15 % glicerola. Na kraju, pripremljeni su alikvoti stanica od 100 i 200 µL, ohlađeni tekućim dušikom i pohranjeni pri -80 °C.

3.3.3. Transformacija bakterije *E. coli* i priprava prekonoćne kulture

Provedena je kemijska metoda transformacije te metoda transformacije stanica elektroporacijom. Za razliku od kemijske transformacije, elektroporacija zahtijeva poseban elektroporacijski uređaj pomoću kojeg se uzorak stanica sa stranom DNA izlaže jakom i kratkotrajnom električnom polju. Primijenjenim električnim šokom otvaraju se pore na membrani za unos strane DNA.

Uzorak kemijski kompetentnih stanica *Rosetta 2* (DE3) pohranjenih na -80°C odmrznut je u ruci te držan na ledu. Alikvotu stanica volumena 25 µL dodano je 0,2 µL plazmida kojim se žele transformirati stanice. Najprije je alikvot bakterija s plazmidom držan na ledu 15 minuta.

§ 3. Eksperimentalni dio

Potom je uzorak inkubiran u termobloku zagrijanom na 42°C u trajanju od 45 sekundi. Naposljetku, stanice su držane na ledu 2 minute.

Za transformaciju elektroporacijom uzorak stanica *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL sa željenim plazmidom prebačen je u elektrokivetu te izložen kratkotrajnom električnom pulsu od 2,5 kV cm⁻¹ pomoću uređaja *Gene Pulser (Bio-Rad)*.

Za oporavak bakterijskih stanica dodano je 500 µL tekućeg LB medija bez antibiotika. Dobivena suspenzija inkubirana je 1 sat u termobloku na 37°C uz trešnju na 600 rpm. Za pripremu prekonoćne predkulture u 20 mL LB medija s antibioticima kanamicinom i kloramfenikolom dodano je 250 µL transformiranih bakterijskih stanica. Ostavljene su preko noći u tresilici na 37°C i 225 rpm.

U slučaju transformacije produkta iPCR-a u 50 µL stanica XL10-Gold dodano je 5 µL reakcijske smjese. Daljnji koraci provedeni su na prethodno opisani način metodom toplinskoga šoka. Nakon završne inkubacije 250 µL transformiranih stanica razmazano je na LB ploče s kanamicinom u sterilnim uvjetima. S nasađene kanamicinske podloge odabrane su pojedinačne kolonije te sterilnim nastavkom automatske pipete nacijepnjene u 6 mL LB medija s kanamicinom i kloramfenikolom. Bakterije su uzgajane preko noći na 37°C i 225 rpm.

3.3.4. Priprava glicerolskih štokova

Priređene su glicerolske kulture za bakterijske kolonije transformirane željenim plazmidom. 800 µL prekonoćne predkulture ohlađene na 4°C pomiješano je s 800 µL sterilnog 50 % glicerola te pohranjeno na -80°C.

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Prekomjerna ekspresija proteina

U ovome istraživanju prekomjerno su eksprimirani proteini *HsSPRTN*_{FL,WT}, *HsSPRTN*_{1-268,WT}, *HsSPRTN*_{26-268,WT} i njihovi mutanti te *Hsp97*_{FL,wt} i *Hsp97*_{N_D1,wt}. Kodirajući sljedovi za proteine uklonirani su u plazmidne vektore pNic-Zb i pET-24d(+) koji se koriste u sustavu prekomjerne ekspresije proteina temeljene na genetičkim elementima bakteriofaga T7 i bakterijskog operona lac u sojevima bakterije *E. coli*. Za uspješnu ekspresiju, pripravljeni genetički konstrukti transformirani su u ekspresijski soj bakterija *Rosetta 2 (DE3)*. Navedeni soj posjeduje ugrađeni gen za selektivnu T7 RNA-polimerazu koja je pod kontrolom lac promotora i lac operatora.

§ 3. Eksperimentalni dio

Bakterijska RNA-polimeraza prepoznaje lac promotor, a T7 RNA-polimeraza prepoznaje promotor T7 ugrađenog u plazmidni vektor. Važno svojstvo ovakvog sustava za prekomjernu ekspresiju proteina je održavanje ciljnih gena transkripcijski utišanima u neinduciranome stanju. U uvjetima bazalne transkripcije kada je represor vezan za lac operator, reprimirana je ekspresija gena za T7 RNA-polimerazu u genomu i vektoru. Dodatkom IPTG-a lac represor disocira s lac operatora, a bakterijska RNA-polimeraza započinje transkripciju gena za T7 RNA-polimerazu koja prepoznaje promotor T7 i kreće u transkripciju ciljnoga gena u plazmidu.^{83,84} Za konstrukte *HsSPRTN*₂₆₋₂₆₈ transformacija je prvotno provedena i u soju *RIL (DE3)* za koje je kasnije pokazano kako nema razlike u ekspresiji proteina u odnosu na soj *Rosetta 2 (DE3)*, stoga su svi daljnji uzgoji nastavljeni sa stanicama *Rosetta 2 (DE3)*.

2 L LB medija s kanamicinom i kloramfenikolom inokulirano je s 20 mL zasićene prekonocne kulture stanica. Stanice su uzgajane na 37°C i 225 rpm do OD₆₀₀= 0,4-0,6. Nakon što su stanice dosegle zadovoljavajuću vrijednost OD₆₀₀, temperatura je spuštena na 18°C. Ohlađenoj bakterijskoj kulturi dodan je induktor IPTG (konačne koncentracije 0,5 mmol dm⁻³). Dodatno, stanicama sa SPRTN-om dodan je i ZnSO₄ (konačne koncentracije 100 μmol dm⁻³). Za prekomjernu ekspresiju proteina inducirane stanice ostavljene su preko noći na 18°C i 125 rpm.

3.4.2. Liza bakterijskih stanica *E. coli*

Nakon ekspresije stanice su istaložene centrifugiranjem 10 min pri 4000 rpm i 4 °C. Dobiveni talog stanica s *Hsp97*_{N_{D1}}, *HsSPRTN*₁₋₂₆₈ i *HsSPRTN*₂₆₋₂₆₈ resuspendiran je na ledu u malom volumenu pufera A, a potom do konačnog volumena od 150 mL (sastav pufera A prikazan je u tablici 6). Suspenzija staničnog taloga provučena je kroz špricu uz dodatak inhibitora serinskih proteaza PMSF-a (konačne koncentracije 0,1 mmol dm⁻³). Za razbijanje stanica korišten je visokotlačni homogenizator *Avestin Emulsoflex C3* pazeći da pulsni tlak ne prijeđe 160 MPa. Nakon propuštanja uzorka dva puta kroz homogenizator, lizat je dodatno razbistren centrifugiranjem u trajanju od 20 minuta uz vrtnju pri 11 000 rpm i 4 °C. Time je proteinski ekstrakt razdvojen od taloga agregiranih i netopljivih proteina.

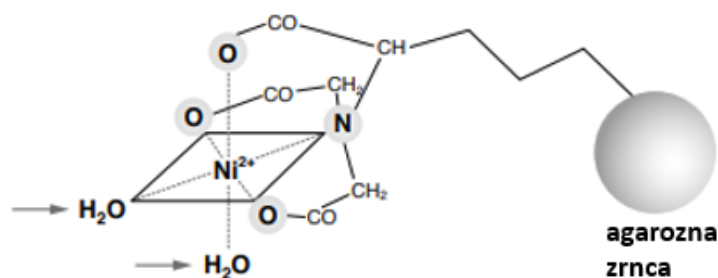
Bakterijske stanice s proteinom *HsSPRTN*_{FL,WT} i *HsSPRTN*_{FL,E122A} razorene su ultrazvučnom sonikacijom. Nakon početnog centrifugiranja (10 min pri 4000 rpm i 4 °C) i resuspendiranja taloga, suspenziji je dodan MgCl₂, lizozim, DNaza I te PMSF (0,1 mmol dm⁻³

§ 3. Eksperimentalni dio

³). Sonikacija je provođena u ledenoj kupelji u trajanju 10 minuta s periodima od 4 sekunde i 4 sekunde pauze. Dobiveni lizat je centrifugiran 20 minuta uz vrtnju pri 11 000 rpm i 4 °C.

3.4.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu

Prekomjerno eksprimirani proteini pročišćeni su afinitetnom kromatografijom temeljenoj na interakciji rekombinantnog proteina i stacionarne faze kromatografske kolone. Jedno od često primjenjivanih kromatografskih punila je Ni-NTA agaroz u kojem nitrilotriocetna kiselina okupira četiri od šest koordinacijskih mjesta iona nikla. Ostala dva koordinacijska mjesta zauzeta su molekulama vode koja se mogu lako zamijeniti dušikovim atomima polihistidinskog privjeska rekombinantnog proteina (slika 9). Za eluciju vezanih proteina koriste se puferi s visokom koncentracijom imidazola ($>100 \text{ mmol dm}^{-3}$) koji je u kompeticiji s rekombinantnim proteinom za slobodna vezna mjesta Ni^{2+} -iona. Puferi korišteni tijekom lize stanica/ekvilibracije kolone i puferi za ispiranje sadrže niže koncentracije imidazola (20-40 mmol dm^{-3}) kako bi smanjile nespecifična vezanja neželjenih proteina. Kapacitet korištene smole *Protino* Ni-NTA (Macherey-Nagel) izrazito ovisi o karakteristikama rekombinantnog proteina poput molekulske mase, aminokiselinskog sastava, trodimenzionalne strukture te sklonosti oligomerizaciji.⁸⁵



Slika 9. Koordinacija iona nikla s Ni-NTA nosačem. Preostala dva koordinacijska mjesta stupaju u interakciju s molekulama vode te omogućuju čvrste, ali reverzibilne interakcije s rekombinantnim proteinima (preuzeto i prilagođeno prema referenci 85)

Za pročišćavanje proteina korištena su tri pufera: A, B i C sastava prikazanog u tablici 6. Kolona je napunjena s 1,5 mL punila Ni-NTA, isprana tri puta redestiliranom vodom te uravnotežena puferom A. Pročišćavanje proteina provođeno je pri 4°C. 1,5 mL ekvilibrirane smole pomiješano je s proteinskim ekstraktom uz inkubaciju smjese 20 minuta. Smola je oborena centrifugiranjem 5 minuta pri 5000 rpm i 4°C, nakon čega je slijedilo ispiranje tri puta

§ 3. Eksperimentalni dio

s 50 mL pufera A uz centrifugiranja od 5 minuta pri 5000 rpm i 4°C. Smola je zatim prebačena u kolonu te isprana sa 6 mL pufera B. Elucija ciljnog proteina s kolone provela se s 15 mL pufera C. Kako bi se provjerila uspješnost pročišćavanja, u svakom koraku uzet je uzorak frakcije za analizu SDS poliakrilamidnom gel-elektroforezom. Nakon korištenja, kolona s Ni-NTA punilom isprana je imidazolom (1 mol dm⁻³, pH 8,0), tri puta redestiliranom vodom te 20 % etanolom u kojem se agarozna čuva na 4°C.

Tablica 6. Sastav pufera A, B i C korištenih u pročišćavanju prekomjerno eksprimiranih proteina afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Za konstrukte *Hsp97_{N_{D1}}* i *HsSPRTN₂₆₋₂₆₈* korišten je fosfatni pufer, a Hepes za sve ostale rekombinantne proteine

Reagens		Pufer A	Pufer B	Pufer C
NaPO ₄ (pH=8,0)	Hepes (pH=7,5)	50 mmol dm ⁻³	50 mmol dm ⁻³	50 mmol dm ⁻³
NaCl		500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³
Glicerol		10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
β-merkaptotanol		200 μL/L	10 μL/L	20 μL/L
Imidazol (pH=8,0)		20 mmol dm ⁻³	40 mmol dm ⁻³	350 mmol dm ⁻³

3.4.4. Cijepanje histidinskog privjeska i prekonoćna dijaliza proteina

Heksahistidinski privjesci rekombinantnih proteina *HsSPRTN* i *Hsp97* uklonjeni su proteolitičkim cijepanjem pomoću proteaze TEV. Za izmjenu pufera, proteini su podvrgnuti dijalizi pri 4°C preko noći u membrani za dijalizu s veličinom pora 12–14 kDa. Na temelju koncentrijskog gradijenta male molekule difundiraju preko polupropusne membrane iz područja veće koncentracije u područje niže koncentracije. Istovremeno u suprotnome smjeru ulaze molekule okolnog pufera za dijalizu sve do postignute ravnoteže između uzorka i dijalizata. Sastav korištenih pufera za dijalizu prikazan je u tablici 7.

§ 3. Eksperimentalni dio

Tablica 7. Sastav pufera korištenih u dijalizi pri 4°C

<i>Reagens</i>	<i>Hsp97_{FL}, Hsp97_{N_DI}</i>	<i>HsSPRTN_{FL}</i>	<i>HsSPRTN₁₋₂₆₈</i>	<i>HsSPRTN₂₆₋₂₆₈, Hsp97_{N_DI}</i>
<i>NaCl</i>	150 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³	300 mmol dm ⁻³	250 mmol dm ⁻³
<i>Hepes (pH 7,5)</i>	15 mmol dm ⁻³	15 mmol dm ⁻³	15 mmol dm ⁻³	-
<i>Tris/HCl (pH 8,5)</i>	-	-	-	15 mmol dm ⁻³
<i>Glicerol</i>	5 % (v/v)	5 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
<i>DTT</i>	1 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³

15 mL elucijske frakcije proteina razrijeđeno je s 5 mL pufera za dijalizu uz dodatak proteaze TEV. Količina dodane proteaze određena je na temelju procijenjene količine proteina u elucijskoj frakciji koja je analizirana pomoću SDS-PAGE (omjer TEV proteaza:protein je 1:80–100). Nakon dijalize pocijepani protein pročitao se od proteaze TEV i zaostalog nepocijepanog proteina sekundarnom kromatografijom na Ni-NTA smoli. Uzorak proteina inkubiran je pri 4°C s 1,5 mL ekvilibrirane smole uz dodatak imidazola (pH = 8,0) konačne koncentracije 20 mmol dm⁻³. Nakon inkubacije u trajanju 15 minuta, propuštena otopina s pocijepanim proteinom skupljena je kao nevezna frakcija. Elucija zaostalog vezanog proteina provela se s 3 mL pufera C. Uspješnost cijepanja afinitetnog privjeska od proteina također je provjerena metodom SDS-PAGE.

3.4.5. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza

Indukcija, prekomjerna ekspresija i uspješnost pročišćavanja proteina provjerena je gel-elektroforezom na poliakrilamidnom gelu uz prisustvo natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Proteini u reakciji s anionskim deterdžentom stvaraju negativno nabijeni kompleks SDS-protein. Molekule SDS-a vezanjem denaturiraju proteine i daju ukupan negativni naboj koji maskira njihov intrinzični naboj. Otprilike jedna molekula SDS-a veže se za dvije aminokiseline. Kako svi proteini poprimaju izduženi oblik s jednakim omjerom mase i naboja, migracija kompleksa SDS-protein u električnome polju ovisi o molekulskoj masi proteina. Veći proteini kretati će se sporije kroz pore gela koji djeluje kao molekulsko sito za razdvajanje proteina. Molekulska masa ciljnoga proteina može se odrediti iz gela usporedbom s markerom veličine poznatih molekulskih masa.⁸⁶

§ 3. Eksperimentalni dio

Za pripremu gelova korištena je aparatura za vertikalnu elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra* (Bio-Rad). Sastav pripremljenog gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje prikazan je u tablici 8. Kako bi se spriječila prijevremena kataliza polimerizacije, APS i TEMED dodaju se neposredno prije izlivanja smjese za gelove. Smjesa gela za razdvajanje izliva se do 0,5–1 cm od gornjeg ruba nižeg stakla te se do vrha izliva gel za sabijanje uz umetanje češljica od 1 mm za formiranje jažica. Nakon polimerizacije gelovi su pohranjeni na 4°C.

Tablica 8. Komponente za pripremu poliakrilamidnih gelova za denaturirajuću elektroforezu

Reagens	Gel za sabijanje	Gel za razdvajanje	
Postotak gela	4 %	15 %	18 %
30 % akrilamid/bis-akrilamid	1,3 mL	10 mL	12 mL
4 × pufer za sabijanje (4 g dm⁻³ SDS, 0,5 mol dm⁻³ Tris-HCl pH 6,8)	2,5 mL	-	-
4 × pufer za razdvajanje (4 g dm⁻³ SDS, 1,5 mol dm⁻³ Tris-HCl pH 8,8)	-	5 mL	5 mL
50 % glicerol	-	2 mL	2 mL
10 % amonijev persulfat, APS	50 µL	70 µL	70 µL
tetrametiletilendiamin, TEMED	8 µL	10 µL	10 µL
Sterilna voda	6,2 mL	3 mL	1 mL
Σ	10 mL	20 mL	20 mL

Kako bi se analizirala uspješnost uzgoja, ekspresije i pročišćavanja proteina, alikvoti uzoraka prikupljeni tijekom preparacije proteina (5–15 µL) pomiješani su s 5 µL 4× SDS-PAGE pufera za nanošenje uzorka. Proteini su denaturirani inkubacijom u termobloku 5 minuta na 95 °C. U slučaju analize neinduciranih stanica, kada je prilikom uzgoja kulture postignuta vrijednost OD₆₀₀ između 0,4-0,6, uzet je alikvot stanica i istaložen centrifugiranjem 1 min pri 12 000 rpm. Supernatant je odbačen, a talog neinduciranih stanica resuspendiran u 50 µL 1× SDS-PAGE pufera za nanošenje uzorka uz zagrijavanje u termobloku na 95 °C. Elektroforeza je provedena pri sobnoj temperaturi u puferu 1x SDS-PAGE sastava: 14,4 g dm⁻³ glicina, 3,0 g dm⁻³ Tris-a (pH= 8,3), 1,0 g dm⁻³ SDS-a. Prvotno su uzorci sabijani u gelu za sabijanje pri naponu od 180 V, a potom razdvajani u gelu za razdvajanje pri 220 V. Proteini su vizualizirani bojanjem pomoću *Coomassie Brilliant Blue R-250* 15 minuta uz miješanje na rotacijskoj

§ 3. Eksperimentalni dio

platformi, nakon čega je slijedilo uklanjanje nespecifično vezane boje kuhanjem u kipućoj destiliranoj vodi 15 minuta.

3.4.6. Kromatografija ionske izmjene

Kromatografija ionske izmjene je metoda razdvajanja biomolekula na temelju njihove razlike u ukupnome naboju pri određenome pH. Za uspješno razdvajanje, kontrolirane su reverzibilne interakcije između nabijenih molekula i suprotno nabijenog punila kolone kako bi se favoriziralo vezanje ili elucija ciljnog proteina. Punila kolone sadrže matricu s vezanim funkcionalnim skupinama koje mogu biti pozitivno ili negativno nabijene. Pri pH vrijednosti iznad izoelektrične točke (pI), protein se veže za pozitivno nabijeno punilo (anionski izmjenjivač), a pri pH ispod pI, protein se veže za punilo s negativno nabijenim skupinama (kationski izmjenjivač). Prvi korak ionske izmjene uključuje uravnoteženje stacionarne faze. Jednom kada je medij ekvilibriran, sve nabijene grupe stacionarne faze vezane su s izmjenjivim protuionima, poput Na^+ ili Cl^- . Za ekvibraciju odabire se pufer one pH vrijednosti i ionske jakosti koji će osigurati vezanje ciljnog proteina prilikom nanošenja uzorka na kolonu, uz što manje vezanje ostalih nečistoća. Nakon uravnoteženja kolone, slijedi nanošenje uzorka i ispiranje početnim puferom tako da su svi nevezajući proteini prošli kroz kolonu. Elucija se provodi povećanjem ionske jakosti pufera. Kako raste koncentracija soli, ioni kompetiraju s vezanim proteinima za nabijene skupine stacionarne faze. Što je veći ukupni naboj proteina, biti će potrebna veća ionska jakost pufera za njegovu eluciju. Krajnje ispiranje s puferom visoke ionske jakosti služi za regeneraciju kolone i uklanjanje zaostalih vezanih molekula.⁸⁷

Kromatografija anionske izmjene provedena je prilikom pročišćavanja proteina *HsSPRTN*_{1-268,wt} i njegovog katalitičkog mutanta. Korištena je kolona *HiTrap Q HP (Cytiva)* s punilom Q sefarozum čija je funkcionalna skupina kvaterna amino grupa vezana za matricu kemijski stabilnim eterskim vezama. Kolona je spojena na uređaj za brzu tekućinsku kromatografiju proteina (engl. *fast protein liquid chromatography*, FPLC) *ÄKTA pure (Cytiva)*. 20 mL prikupljene nevezane frakcije nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije nanoseno je dva puta na kolonu tako da je po 10 mL uzorka razrijeđeno do 50 mL (konačne koncentracije soli 60 mmol dm^{-3}) početnim puferom A sastava: 15 mmol dm^{-3} Hepes (pH=7,5), 1 mM DTT, 10 % glicerol. Za eluciju primijenjen je gradijent pufera A i pufera B sastava: 15 mmol dm^{-3} Hepes (pH=7,5), 1 mM DTT, 10 % glicerol, 1 mol dm^{-3} NaCl. Prikupljena je frakcija od 1 mL te

§ 3. Eksperimentalni dio

ovisno o čistoći je pohranjena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili podvrgnuta sljedećem koraku pročišćavanja gel-filtracijom.

3.4.7. Gel-filtracija

Kromatografija isključenjem (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) ili gel-filtracija razdvaja makromolekule na temelju njihove razlike u veličini. Punilo kolone sastoji se od porozne matrice s inertnim sfernim česticama različitih veličina koje minimiziraju adsorpciju biomolekula. Jednom nanešene na kolonu, molekule veće od pora ne mogu difundirati u čestice punila te su najprije eluirane. Molekule manjih veličina ulaze u veći broj pora, sporije se kreću i duže zadržavaju na koloni. Za razliku od ionske izmjene, molekule se gel-filtracijom ne vežu za stacionarnu fazu kolone, što znači da sastav pufera ne utječe direktno na rezoluciju. Prednost gel-filtracije je mogućnost odvajanja biomolekula u uvjetima pogodnim za održavanje stabilnosti uzorka. Uzorci se eluiraju izokratno, stoga nema potrebe za korištenjem različitih pufera tijekom razdvajanja. Gel-filtracija također omogućava određivanje molekulske mase nativnog ili denaturiranog proteina u različitim uvjetima pH, ionske jakosti i temperature, kao i detekciju i ispitivanje nastanka kompleksa proteina.⁸⁸ Kada se gel-filtracija u ovome istraživanju koristila u preparativne svrhe, uvijek je korištena u završnom koraku pročišćavanja proteina, nakon što je većina kontaminacija već bila uklonjena. Njome su se uklonili agregati ciljnoga proteina i manji peptidni ostatci nakon cijepanja proteazama uz prevođenje u pufer u kojem je pročišćeni protein pohranjen.

U ovome radu gel-filtracija je provedena kao korak pročišćavanja nakon afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu. Za pročišćavanje korišten je sustav ÄKTA pure s kolonama i puferima prikazanim u tablici 9. Kolona je isprana ultračistom vodom, pa uravnotežena puferom za gel-filtraciju. Prije uporabe, ultračista voda i puferi su ohlađeni te profiltrirani i degazirani kroz membranu s porama veličine $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Korištenje degaziranih pufera uz održavanje konstantne temperature sprječava ulazak zraka u stupac kolone. Nakon korištenja kolonu je potrebno isprati ultračistom vodom, a zatim pohraniti u etanolu ($\varphi = 20\%$). Kako bi se produljio radni život kolone, rutinska čišćenja uključuju ispiranje s $0,2\text{ mol dm}^{-3}$ NaOH nakon svakih dvadesetak kromatografija.

Uzorci nevezane frakcije proteina nakon pročišćavanja sekundarnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu su ukoncentrirani do volumena 2 mL metodom ultrafiltracije opisane u sljedećem poglavlju. Netom prije nanošenja na kolonu, uzorci su centrifugirani 3 min pri 13

§ 3. Eksperimentalni dio

000 rpm i 4 °C kako bi se odvojili od čestica agregata ili precipitata. Sukladno karakteristikama kolone, podešeni su odgovarajući tlakovi i protok uz praćenje apsorbancije pri 280 nm. Prikupljane su frakcije od 0,5 ili 2 mL te analizirane SDS-PAGE metodom.

Tablica 9. Kolone i puferi korišteni za pročišćavanje različitih proteina tehnikom gel-filtracije

Protein	Kolona	Pufer
p97_{FL, WT}	<i>Superose 6 10/300 GL</i>	150 mmol dm ⁻³ NaCl, 15 mmol dm ⁻³ HEPES (pH 7,5), 1 mmol dm ⁻³ DTT
p97_{N_DI, WT}	<i>HiLoad 16/600 Superdex 75 pg</i>	
p97_{N_DI, WT}	<i>HiLoad 16/600 Superdex 200 pg</i>	150 mmol dm ⁻³ NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8,5), 1 mmol dm ⁻³ DTT
SPRTN_{FL, WT} , SPRTN_{FL, E122A}	<i>HiLoad 16/600 Superdex 200 pg</i>	500 mmol dm ⁻³ NaCl, 15 mmol dm ⁻³ HEPES (pH 7,5), 1 mmol dm ⁻³ DTT, 5 % glicerol
SPRTN_{1-268, E122A}	<i>HiLoad 16/600 Superdex 75 pg</i>	300 mmol dm ⁻³ NaCl, 15 mmol dm ⁻³ HEPES (pH 7,5), 1 mmol dm ⁻³ DTT, 5 % glicerol
SPRTN_{26-268, WT} , SPRTN_{26-268, E122A}	<i>HiLoad 16/600 Superdex 75 pg</i>	300 mmol dm ⁻³ NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8,5), 1 mmol dm ⁻³ DTT, 5 % glicerol
p97_{N_DI, WT} + SPRTN_{1-268, WT} ,	<i>Superdex 200 Increase 10/300 GL</i>	15 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl and 1 mM DTT
p97_{N_DI, WT} + SPRTN_{26-268, E122A}	<i>Superdex 200 Increase 10/300 GL</i>	15 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl and 1 mM DTT

3.4.8. Priprava kompleksa SPRTN:p97 gel-filtracijom

Osим kao metoda pročišćavanja proteina, prije samih kristalizacijskih eksperimenata, gel-filtracijska kromatografija pokušala se iskoristiti za ispitivanje nastanka kompleksa SPRTN:p97 (detaljnije opisano u poglavlju 4.2.3.). Prvotno je pokušano prirediti kompleks skraćenog konstrukta SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_DI}. Kako nije bilo naznaka o mogućem omjeru pri kojem bi došlo do stvaranja kompleksa, odlučeno je da će se pomiješati po 200 µg svakog od pročišćenih proteina. Za nanošenje uzoraka na kolonu, prvo je potrebno prirediti njihova razrjeđenja. Prije priprave samog kompleksa, napravljena su razrjeđenja uzoraka pojedinačnih konstrukata i nanosena na kolonu. Uzet je alikvot pročišćenog proteina SPRTN_{1-268, WT} (200 µg) i razrijeđen do konačnog volumena od 500 µL u puferu sastava: 15 mmol dm⁻³ Hepes 7,5 i 1 mmol dm⁻³ DTT. Isto tako je priređen i uzorak konstrukta p97_{N_DI} samo što je za njegovo razrjeđenje do 500 µL korišten pufer sastava: 100 mmol dm⁻³, 15 mmol dm⁻³ Hepes i 1 mmol

§ 3. Eksperimentalni dio

dm⁻³ DTT. Za sam uzorak kompleksa pomiješano je po 200 µg svakog od konstrukata uz dodatak pufera (15 mmol dm⁻³ Hepes/NaOH pH 7,5, 1 mmol dm⁻³ DTT) do konačnog volumena 500 µL. Netom prije nanošenja na kolonu *Superdex 200 Increase 10/300 GL*, uzorci su centrifugirani 2 minute pri 12 000 rpm.

Na jedanak način pokušano je prirediti kompleks SPRTN:p97 i s konstruktom SPRTN_{26-268,E122A}. Za razliku od prethodnog primjera pripreme uzorka kompleksa, nisu priređena razrjeđenja uzorka već je uzet alikvot od 50 µL p97_{N_D1} (550 µg) i pomiješan sa konstruktom SPRTN_{26-268,E122A} u omjeru 1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi i pola sata na ledu, uzorak volumena 110 µL je nanesen na kolonu *Superdex 200 Increase 10/300 GL*. Za navedenu gel-filtraciju korišten je pufer sastava 100 mmol dm⁻³ NaCl, 15 mmol dm⁻³ Hepes pH 7,5 i 1 mmol dm⁻³ DTT.

3.4.9. Ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom

Nakon analize SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom frakcije proteina sa zadovoljavajućom čistoćom ukoncentrirane su ultrafiltracijom. Korišteni su centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (Millipore) s veličinama pora graničnih vrijednosti 30 i 50 kDa, ovisno o molekulskoj masi proteina. Frakcije proteina centrifugirane su u ciklusima od 5 minuta pri 5000 rpm i 4°C do postignute željene koncentracije. Ukoncentrirani uzorak proteina je zatim prebačen u polipropilensku mikroeprevetu, centrifugiran 3min pri 13000 i 4°C, alikvotiran (50µl) i zamrznut hlađenjem u tekućem dušiku, te čuvan na -80 C.

3.4.10. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija pročišćenih proteina određivana je spektrofotokemijski na uređaju *Biodrop Duo* (*Biochrom Ltd*). Za mjerenje potrebno je unijeti molarnu masu proteina i njegov ekstincijski koeficijent (za reducirani oblik proteina) izračunatih pomoću web-servera *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>). Nakon anuliranja uređaja puferom u kojem se nalazio otopljeni protein, nanešeno je 2 µL uzorka uz mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 280 nm.

3.4.11. Analiza kompleksa SPRTN:p97 metodom povlačenja proteina

Karakterizacija interakcije pročišćenih proteina provedena je metodom povlačenja proteina (eng. *pull-down assay*). Navedena biokemijska metoda služi za *in vitro* detekciju i potvrdu potencijalnih interakcija između proteina. Pročišćeni proteini SPRTN₁₋₂₆₈ i SPRTN₂₆₋₂₆₈

§ 3. Eksperimentalni dio

označeni N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom služe kao protein mamac za potencijalni interaktor p97_{N_{D1}}. Jednom kada je p97_{N_{D1}} inkubiran s konstruktima SPRTN₁₋₂₆₈ i SPRTN₂₆₋₂₆₈ imobiliziranim na Ni-NTA agarozu, a nakon ispiranja nevezanih proteina, vezani proteini eluiraju se odgovarajućim puferom i analiziraju pomoću SDS-PAGE. Proteini bez afinitetnog privjeska ne vežu se na Ni-NTA agarozu, osim ako ne stvaraju kompleks s vezanim proteinom mamcem. Kako bi se dokazalo da potvrđena interakcija nije artefakt, napravljena je negativna kontrola vezanja samog p97_{N_{D1}} na Ni-NTA agarozu. 5 µg SPRTN-a pomiješano je s 16,5 µg p97 u puferu za ekvilibraciju (20 mmol dm⁻³ Hepes, 100 mmol dm⁻³ NaCl, 40 mmol dm⁻³ imidazol pH=8,0) do konačnog volumena 200 µL (tablica 9).

35 µL 50 % smole centrifugirano je 2 minute pri 2700 rpm. Tekućina iznad smole je uklonjena, a smola isprana tri puta s 300 µL vode uz centrifugiranje 2 minute pri 2700 rpm. Potom je smola uravnotežena ispiranjem dva puta s 200 µL pufera za ekvilibraciju uz centrifugiranje 3 minute pri 3000 rpm. Nakon što je smola ekvilibrirana, uzeto je 180 µL priređene otopine proteina (engl. *input*) i inkubirano sa smolom 15 minuta u termobloku pri 25°C i 950 rpm. Slijedilo je centrifugiranje od 2 minute pri 2700 rpm, nakon čega je nevezana frakcija (engl. *flow-through*) iznad smole odbačena. Smola je dobro ispirana tri puta puferom za ekvilibraciju uz centrifugiranje (180 µL, 3 min, 3000 rpm). Vezani proteini eluirani su s 25 µL pufera za eluciju (50 mmol dm⁻³ NaPO₄ pH 8,0, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 400 mmol dm⁻³ imidazol pH 8,0, 200 µL/L β-merkaptetanol).

3.4.12. Nativna gel-elektroforeza

U nativnoj elektroforezi proteini su odvajani na temelju ukupnoga naboja, veličine i oblika njihove nativne strukture. Proteini s ukupnim negativnim nabojem putovati će prema anodi, dok proteini s pozitivnim nabojem prema katodi. Istovremeno poliakrilamidni gel djeluje poput molekuskog sita koji regulira razdvajanje proteina ovisno o njihovoj veličini i trodimenzionalnoj strukturi. Kako bi se održala stabilnost proteina, elektroforezu je potrebno provoditi pri 4°C. Općenito, potrebno je izbjegavati ekstremne pH vrijednosti koje dovode do ireverzibilne denaturacije i agregacije ciljnoga proteina.⁸⁹

Elektroforezom u nativnim uvjetima određivan je omjer proteina pri kojem dolazi do nastanka kompleksa. Neposredno prije pripreve kompleksa, proteini p97_{N_{D1}},WT ($\gamma = 11,0$ mg/mL) i SPRTN₁₋₂₆₈,WT ($\gamma = 2,9$ mg/mL) su pažljivo odmrznuti i centrifugirani 3 minute pri 13 000 rpm i 4°C. p97_{N_{D1}},WT (1,5 µg) titriran je sa SPRTN₁₋₂₆₈,WT u puferu sastava: 150 mmol

§ 3. Eksperimentalni dio

dm^{-3} NaCl, 15 mmol dm^{-3} Hepes ($\text{pH} = 7,5$), 1 mmol dm^{-3} DTT. Za pripremu reakcijskih smjesa količina SPRTN_{1-268,WT} (0,45 μg do 22,6 μg) se proporcionalno povećavala kako se povećavao omjer p97_{N_DI,WT}: SPRTN_{1-268,WT} (1:0,5–1:25) pri konstantnoj količini p97_{N_DI,WT}. Inkubacija proteina trajala je 15 minuta pri 25°C u ukupnome volumenu 5 μL . Radi lakšeg praćenja tijekom elektroforeze smjesi je dodan 1 μL boje *Native Gel-Loading Buffer*. Također je praćen utjecaj ATP-a na nastanak kompleksa. 1,5 μg p97_{N_DI,WT} prethodno inkubiran s ATP-om (30 mmol dm^{-3}) titriran je sa SPRTN_{1-268,WT} (1:0,5–1:25) u puferu (150 mmol dm^{-3} NaCl, 15 mmol dm^{-3} Hepes ($\text{pH} = 7,5$), 1 mmol dm^{-3} DTT, 5 mM MgCl₂) do konačnog volumena smjese 5 μL .

Uzorci su nanoseni na 4–15 % poliakrilamidni gel *Mini-Protean TGX (Bio-Rad)*. Prije nanošenja uzoraka, jažice gela pročišćene su resuspendiranjem pipetom. Gel je ispran predelektroforezom u puferu TBE (90 mmol dm^{-3} Tris, 90 mmol dm^{-3} H₃BO₃, 2 mmol dm^{-3} Na₂EDTA) na 80 V 15 minuta. Elektroforeza je trajala 90 minuta uz konstantan napon od 120 V pri 4°C u aparaturi za vertikalnu elektroforezu *Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)*. Proteini su vizualizirani inkubacijom gela s *Coomassie* bojom uz miješanje na rotacijskoj platformi 15 minuta, nakon čega je višak boje uklonjen kuhanjem gela u vrućoj destiliranoj vodi.

3.4.13. Western-analiza

Enzimsku aktivnost pročišćenog SPRTN_{FL,WT} i njegovog skraćenog konstrukta SPRTN_{1-268,WT} okarakterizirana je *in vitro* testom aktivnosti cijepanja supstrata H3.3. Western-analiza je metoda detekcije i analize proteina koja se temelji na ostvarenim interakcijama proteina i specifičnog antitijela. Postupak uključuje razdvajanje proteina na temelju molekulske mase gel-elektroforezom, uz prijenos odvojenih proteina na membranu za njihovu daljnju analizu. Nakon blokiranja neželjenih interakcija, membrana je inkubirana s antitijelima specifičnima za ciljni protein. Nevezana antitijela su isprana, a ciljni kompleks antitijela i proteina detektiran. Primjenom navedene metode potvrđuje se prisutnost ciljnoga proteina uz determinaciju molekulske mase proteina usporedbom s markerom poznate molekulske mase.⁹⁰

Enzimске reakcije provedene su u puferu (150 mmol dm^{-3} NaCl, 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl $\text{pH} 7,4$) preko noći pri 37°C . Reakcijski volumen smjese bio je 10 μL , a sadržavao je 2,5 pmol supstrata H3.3 (0,05 mg/mL) u različitim omjerima (1:1,5–1:6) naprema SPRTN_{FL,wt} (0,5 mg/mL) i SPRTN_{1-268,WT} (0,2 mg/mL) u prisutnosti DNA (0,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Kao negativna kontrola testirano je cijepanje 2,5 pmol H3.3 katalitički neaktivnim SPRTN_{FL,E122A} (0,5 mg/mL) u omjeru 1:3. Idući dan uzorci su oboreni uz dodatak 2,5 μL 4x SDS-PAGE pufera za nanošenje

§ 3. Eksperimentalni dio

uzorka. Denaturacija je trajala tri minute pri 95°C, a na 5–18 % poliakrilamidni gradijent gel nanešeno je po 8 µL priređenih reakcijskih smjesa. U prvu jažicu naneseno je 3 µL markera veličina *Prestained Protein Marker* 10–180 kDa (*Proteintech*). Elektroforeza je provedena pri 180 V u puferu 1x SDS-PAGE. Prije transfera filter papiri, spužvice i gel namočeni su u ohlađenom puferu za transfer (25 mmol dm⁻³ Tris, 192 mmol dm⁻³ glicin, 20 % metanol, 0,10 % SDS) uz aktivaciju PVDF membrane (*Milipore*) u metanolu 1 minutu. Mokri prijenos proteina trajao je 75 minuta pri 100 V u aparaturi *Western blotting Mini Trans-Blot* (*Bio-Rad*) koji osigurava prijenos negativno nabijenih proteina s gela na membranu.

Za blokiranje nespecifičnih vezanja antitijela, membrana je inkubirana u 5 % otopini mlijeka u prahu u puferu TBST (20 mmol dm⁻³ Tris, 150 mmol dm⁻³ NaCl, 0,10 % Tween 20) sat vremena uz miješanje na rotacijskoj platformi. Nakon blokiranja, membrana je isprana dva puta po 5 minuta u puferu TBST. Primarna antitijela kunića na histon H3 u 5 % otopini mlijeka u prahu u razrjeđenju 1:3000 inkubirana su s blokiranom membranom preko noći pri 4°C. Višak je ispran s puferom TBST tri puta po pet minuta. Sekundarna antitijela konjugirana peroksidazom iz hrena u puferu TBST (1:100 000) inkubirana su s membranom sat vremena. Nakon ispiranja membrane tri puta po 10 minuta puferom TBST te 5 minuta puferom TBS (200 mmol dm⁻³ Tris, 150 mmol dm⁻³ NaCl, pH=7,6) slijedila je detekcija sekundarnih antitijela kemiluminiscencijom. Netom prije detekcije, membrana je lagano isprana destiliranom vodom za uklanjanje Tweena-20. U omjeru 1:1 pomiješane su dvije otopine iz kompleta za detekciju *Clarity and Clarity Max ECL Western Blotting Substrates* (*Bio-Rad*). Sekundarno antitijelo konjugirano je peroksidazom iz hrena koja katalizira reakciju oksidacije luminola u prisutnosti vodikova peroksida. Navedena kemiluminiscentna reakcija zabilježena je pomoću uređaja *ChemiDoc XRS+* (*Bio-Rad*).

3.5. Kristalografske metode

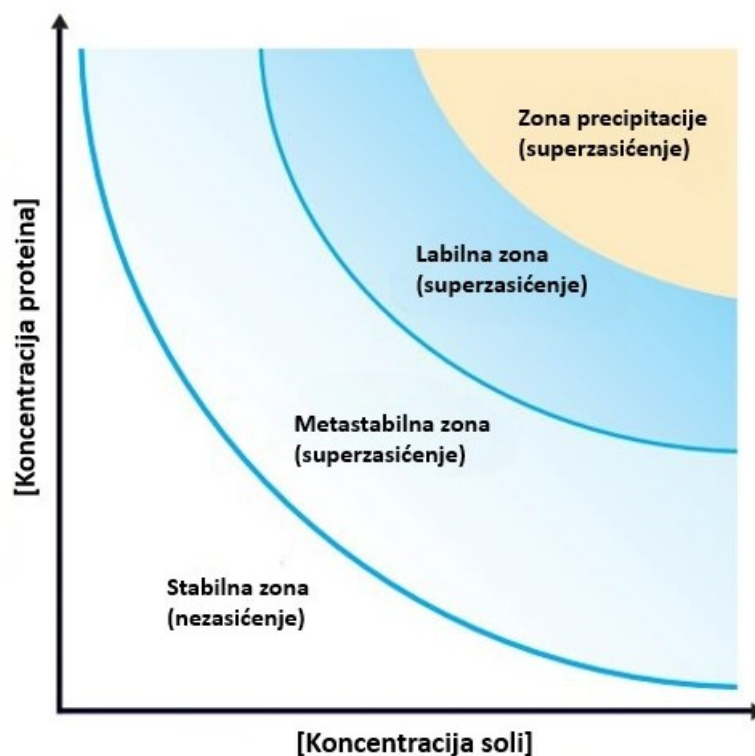
3.5.1. Proteinska kristalografija

Rješavanje trodimenzionalne strukture bioloških makromolekula omogućilo je razumijevanje osnovnih mehanizama uključenih u životne procese. Budući da je funkcija proteina određena njegovom trodimenzionalnom strukturom, proteinska kristalografija uvelike je doprinijela razumijevanju bioloških sustava na molekularnoj razini.⁹¹ Određivanje trodimenzionalne strukture rendgenskom difrakcijom zahtijeva pročišćavanje proteina, potragu inicijalnih uvjeta

§ 3. Eksperimentalni dio

kristalizacije uz njihovu daljnju optimizaciju, prikupljanje difrakcijskih podataka, određivanje i doradu trodimenzionalne strukture te analizu postavljenog modela.⁹² Kristalizacija bioloških makromolekula poput proteina ili nukleinskih kiselina ovisi o postizanju otopine koja je prezasićena ciljnom biomolekulom u uvjetima koji neće značajno narušiti njeno nativno stanje. Takvo stanje prezasićenosti postignuto je uvođenjem agensa za precipitaciju poput neutralnih soli ili polimera uz manipulaciju parametara temperature, pH vrijednosti i ionske jakosti. Na kristalizaciju utječu i metalni ioni, inhibitori, supstrati, različiti kofaktori, deterdženti, posttranslacijske modifikacije i vibracije.⁹³ Faze kristalizacije molekula obuhvaćaju nukleaciju, rast kristala i prestanak rasta kristala. Tijekom nukleacije molekule asociraju u tri dimenzije i formiraju termostabilne agregate, tzv. jezgre kristala. Kristalni rast na jezgrama kristalizacije završava jednom kada otopina postane osiromašena proteinom, kada deformacije koje uzrokuju naprezanja kristala destabiliziraju kristalnu rešetku ili uslijed kontaminacije rastućeg kristala prisutnim onečišćenjima.⁹²

Kristalizacija započinje uzorkom proteina u stabilizirajućoj vodenoj otopini pufera, soli, reducirajućih agensa i drugih aditiva. U takvoj otopini nezasićenoj željenom makromolekulom nije moguća nukleacija, niti rast kristala iz sjemena kristalizacije. Dodatkom kristalizacijskog reagensa, smanjuje se topljivost proteina, a povećava zasićenost. U prvoj fazi stanja prezasićenosti (tzv. metastabilna zona) ne može se dogoditi spontana homogena nukleacija, no moguć je rast kristala iz kristalizacijskih jezgara. U sljedećoj, labilnoj zoni moguća je spontana nukleacija i rast kristala. U posljednjoj zoni stanja superzasićenosti dolazi do nastanka amorfnih precipitata, a nukleacija i rast kristala nisu mogući. Navedeni prijelazi mogu se predočiti faznim dijagramom kristalizacije prikazanim na slici 10.⁹⁴



Slika 10. Fazni dijagram kristalizacije (preuzeto i prilagođeno prema referenci 94)

Prvi izazov prilikom pripreve kristala je dobivanje otopine proteina zadovoljavajuće čistoće i koncentracije (5–15 mg/mL). Priprava ciljnih proteina prikladnima kristalizaciji poboljšana je metodama proteinskog inženjerstva pomoću kojih je moguće proizvesti fuzijske proteine s uklonjenim fleksibilnim krajevima i regijama između domena uz uvođenje željenih mutacija.⁹¹ Kako nije moguće predvidjeti kristalizacijske uvjete koji bi bili prigodni za određenu proteinsku strukturu ili obitelj, trenutačno nisu dostupne sistematične metode koje bi osigurale uspješno dobivanje uređenih trodimenzionalnih kristala proteina. Stoga za testiranje što većeg broja potencijalnih kristalizacijskih uvjeta koriste se komercijalno dostupni kompleti (engl. *crystallization screens*) u kojima se protein izlaže velikom broju različitih agensa. Kristalići, lagani precipitati i separacije faza upućuju na potencijalno obećavajući uvjet koji se dalje može optimizirati variranjem koncentracije proteina i precipitanta, temperature, pH vrijednosti ili dodatkom aditiva.^{91,92}

§ 3. Eksperimentalni dio

3.5.2. Kristalizacija metodom difuzije para otapala

U ovome istraživanju kao metoda kristalizacije odabrana je metoda difuzije para otapala tehnikama sjedeće (engl. *sitting drop*) i viseće kapi (engl. *hanging drop*). Navedene tehnike temelje se na postizanju ravnoteže prilikom koje su koncentracije reagensa u kapi približno jednake onima u spremniku. Prvotno kap koja se sastoji od smjese uzorka proteina i otopine za kristalizaciju, sadrži nižu koncentraciju reagensa u usporedbi sa spremnikom. Tijekom postizanja ravnoteže dolazi do difuzije para vode iz kapi u spremnik. Navedenim strujanjem para vode povećava se koncentracija proteina i reagensa u kapi čime dolazi do prezasićenja otopine i početka kristalizacije proteina.^{95,96}

Kristalizacija kompleksa SPRTN:p97 provedena je metodom difuzije para otapala tehnikom sjedeće kapi pomoću robota za postavljanje kristalizacije Oryx8LCP (*Douglas Instruments*). Korištene su kristalizacijske ploče s 96 spremnika *Swissci* (*Hampton Research*) na kojima je moguće istodobno postavljanje tri kapi. Za kristalizaciju pripremljene su različite varijacije kompleksa koji se razlikuju u omjeru pomiješanih proteina i prisutnosti oligonukleotida 5'-CCCCC-3' (dC₅). Jednom pomiješani proteini inkubirani su 1 minutu pri sobnoj temperaturi, a potom 1 minutu na ledu. Za komplekse kristalizirane u prisutnosti oligonukleotida, prvo je SPRTN inkubiran s dC₅ u omjeru 1:1,5 1 minutu na ledu, a potom je dodan p97. Nakon inkubacije uzorci su ugušćeni do konačnih koncentracija prikazanih u tablici 10.

Svaka pločica za kristalizaciju sadržavala je 12x8 bunarića s 40 µL otopine precipitata pojedinog kristalizacijskog uvjeta uz tri kapi dobivene miješanjem 150 nL uzorka proteina (I.-III.) i 150 nL otopine iz velikog spremnika. U slučaju uzoraka IV.-VI. za dobivanje kapi pomiješano je 200 nL otopine proteina i 200 nL kristalizacijskog uvjeta iz velikog spremnika. Popis korištenih komercijalnih kompleta naveden je u poglavlju 3.1.9. Nakon postavljanja kristalizacije, ploče su hermetički zatvorene transparentnom folijom i pohranjenje u termostatiranoj komori pri 18°C. Rast kristala praćen je mikroskopom jednom dnevno.

§ 3. Eksperimentalni dio

Tablica 10. Koncentracije ugušćenih uzoraka za kristalizaciju kompleksa SPRTN:97. Uzorci I.-III. priređeni su miješanjem proteina p97_{N_{DI,WT}} (11 mg/mL) i SPRTN_{26-268,E122A} (4 mg/mL). Za uzorke IV.-VI. korišteni su novi alikvoti proteina p97_{N_{DI,WT}} (30,28 mg/mL) i SPRTN_{26-268,E122A} (2,962 mg/mL).

Kompleks		γ (kompleks) / mg mL ⁻¹
I.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:3)	23,85
II.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:3) + dC ₅ (1:1,5)	28,60
III.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:1) + dC ₅ (1:1,5)	10,23
IV.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:3)	20,04
V.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:6)	36,21
VI.	p97 _{N_{DI,WT}} + SPRTN _{26-268,E122A} (1:6) + dC ₅ (1:1,5)	36,87

3.5.3. Optimizacija kristalizacijskih uvjeta

Nakon što su pretraživanjem pronađeni obećavajući kristali, provela se optimizacija kristalizacijskih uvjeta. Optimiziran je uvjet F11 komercijalnog kompleta *JBScreen* PACT++ (*Jena Bioscience*) korištenjem uzorka IV (20,04 mg/mL). U optimizaciji primijenjena je metoda difuzije para tehnikom viseće kapi na pločama s 24 spremnika. Na silikonizirano stakalce postavljene su kapi s 1 μ L proteinskog kompleksa uz varijacije volumena otopine iz spremnika od 700 μ L. Nakon postavljanja kapi, stakalcem je zatvoren veliki spremnik s otopinom što čini hermetički zatvoren sustav.

Početni uvjet u kojemu je pronađen kristal sadržavao je 20 % (w/v) PEG 3 350, 100 mmol dm⁻³ bis-tris propan (pH 6.5) i 200 mmol dm⁻³ trinatrijev citrat. Za pripremu štok (koncentriranih) otopina (50 % PEG-a i 1 mol dm⁻³ soli i pufera), krutine su otopljene u ultračistoj vodi i profiltrirane kroz filter s porama veličine 0,45 μ m. Za optimizaciju uvjeta F11 postotak PEG-a variran je u rasponu 10–30 % s variranim sastavima kapljica (1 μ L proteina + 1–3 μ L otopine spremnika). U prvih 12 bunarića provedena je optimizacija uvjeta F11, a u ostalih 12 bunarića provedena je metoda mikrosijanja za navedeni uvjet objašnjena u idućem poglavlju. Svi kristalizacijski eksperimenti provedeni su pri temperaturi od 18°C.

Također, postavljeni su kristalizacijski eksperimenti s uzorkom kompleksa IV (20,04 mg/mL) tako da mu je varirana koncentracija proteina (5, 10, 15 mg/mL). Razrjeđenja kompleksa priređena su puferom sastava: 150 mmol dm⁻³ NaCl, 15 mmol dm⁻³ Hepes, 1 mmol dm⁻³ DTT. Navedene kristalizacije provedene su u uvjetima E5 (25 % (w/v) PEG 4 000, 200 mmol dm⁻³ litijev sulfat, 100 mmol dm⁻³ Hepes (pH 7,5), 100 mmol dm⁻³ natrijev acetat) paketa

§ 3. Eksperimentalni dio

JBScreen Classic HTS I (*Jena Bioscience*) i B3 (10 % (w/v) PEG 4 000, 0,2 mol dm⁻³ natrijev acetat, 0,1 mol dm⁻³ natrijev citrat (pH 5,5)) paketa *NeXtal DWBlock ProComplex Suite* (*Qiagen*). Kristalizacijski eksperiment se proveo tehnikom viseće kapi tako da se kapljica sastojala od 1 µL otopine proteina i 1 µL otopine velikog spremnika uvjeta E5 i B3.

3.5.4. Metoda mikrosijanja

Kako bi se poboljšala nukleacija rastućih kristala provedena je metoda mikrosijanja (engl. *microseeding*) koja omogućuje rast kristala u metastabilnoj zoni (slika 10). Kako je već objašnjeno, u navedenoj zoni ne dolazi do spontane nukleacije, no moguć je rast kristala iz sjemena kristalizacije.⁹⁴ Time na prethodno oblikovanu pravilnu kristalnu površinu, molekule mogu agregirati na uređen način, i to generalno pri nižem stupnju prezasićenja nego što je potrebno za nukleaciju.⁹⁷ Upravo unosom sjemena ili zasićene otopine sjemena u kapljicu koja se nalazi u metastabilnoj zoni, moguće je uzgojiti veće pojedine kristale. Uz to, pripremom razrjeđenja koncentrirane otopine sjemena može se kontrolirati broj rastućih kristala u metastabilnoj kapljici.⁹⁴

Otopina za mikrosijanje priređena je razaranjem kapi sa željenim kristalićima uz dodatak otopine iz velikog spremnika odgovarajućeg uvjeta te prebacivanjem automatskom pipetom u mikroeprevetu s PTFE kuglicom *Seed Bead* (*Hampton Research*). Postupak prenošenja ponovljen je nekoliko puta tako da u mikroepreveti s kuglicom bude otprilike 50 µL otopine za mikrosijanje. Priređena otopina vorteksirana je tri minute uz kratke stanke svakih 30 sekundi kako bi se mikroepreveta ohladila na ledu. U dobivenu smjesu dodano je 450 µL stabilizirajuće otopine. Time je priređena koncentrirana (1x) otopina za mikrosijanje iz koje je napravljeno 10x razrjeđenje otopinom iz velikog spremnika.

Kristalizacijski eksperimenti metodom mikrosijanja provedeni su za uvjete F11, B3 i E5. Za uvjete B3 i E5 postavljene su kapljice od 1 µL razrjeđenja uzorka IV (5, 10, 15 mg/mL) i 1 µL otopine za mikrosijanje (1x ili 10x). U svim metodama mikrosijanja korištena je tehnika viseće kapi, a volumen velikog spremnika sadržavao je 700 µL odgovarajućeg uvjeta korištenog za rast kristala.

Za uvjet F11 kristalizacijski eksperiment je postavljen tako da su na silikolizirano stakalce postavljene po dvije kapi. Prva kap sastojala se od 1 µL razrjeđenja uzorka IV (5, 10, 15 mg/mL) i 1 µL otopine za mikrosijanje (1x ili 10x). Za drugu kap uzeto je 2 µL otopine za mikrosijanje

§ 3. Eksperimentalni dio

(1x ili 10x). Shema postavljenog kristalizacijskog eksperimenta metodom mikrosijanja prikazan je tablicom 11.

Tablica 11. Kristalizacijski eksperiment proveden metodom mikrosijanja za uvjet F11 paketa *JBScreen PACT++ (Jena Bioscience)* uz varirane koncentracije kompleksa IV (20,04 mg/mL) i sastava kapljica. Korištene su 1x i 10x otopine za mikrosijanje prikazane u zagradama

<i>Položaj kapi</i>	<i>Varirana komponenta (Koncentracija uzorka IV)</i>	<i>Sastav kapljica (Otopina proteina + otopina za mikrosijanje)</i>	
<i>C1</i>	20 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>C2</i>	5 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>C3</i>	5 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>C4</i>	10 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>C5</i>	10 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>C6</i>	15 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (1x)	1 μL + 2 μL (1x)
<i>D1</i>	5 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)
<i>D2</i>	5 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)
<i>D3</i>	10 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)
<i>D4</i>	10 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)
<i>D5</i>	15 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)
<i>D6</i>	15 mg mL ⁻¹	1 μL + 1 μL (10x)	1 μL + 2 μL (10x)

Idući dan pretraživanjem kristala pronađen je zadovoljavajući kristal u kapi na položaju C3 priređene iz 1 μL otopine kompleksa koncentracije 5 mg/mL i 1 μL otopine za mikrosijanje (1x). Iz nje proveden je novi kristalizacijski eksperiment metodom mikrosijanja. Iz navedene kapljice pripravljena je koncentrirana (1x) otopina za mikrosijanje i njeno razrjeđenje (10x) na prethodno objašnjen način. U daljnjim kristalizacijama korištene su i novo pripravljene otopine za mikrosijanje iz kapljice C3 kao i iz originalnog uvjeta F11. Priređene kapljice sastojale su se od 1 μL navedenih otopina za mikrosijanje i 1 μL kompleksa proteina (p97_{N-D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A} (1:3)) uz varijaciju njegove koncentracije (5, 10, 15 mg/mL). U velikom spremniku dodano je 700 μL uvjeta F11. Uz originalni uvjet korišten je i izmijenjeni uvjet F11 koji je uz izvorne supstance sadržavao glicerol u različitim postotcima (5, 10, 15, 20 %).

§ 3. Eksperimentalni dio

3.5.5. Priprema kristala za difrakciju rentgenskog zračenja na monokristalu

Kristali proteina vrlo su osjetljivi, stoga je potrebno pažljivo rukovanje kako se ne bi narušila njihova kristalna struktura isušivanjem. Prije hlađenja u tekućem dušiku, kristal je namakan nekoliko sekundi u otopini za kristalizaciju koja je sadržavala 20 % glicerol. Glicerol posjeduje ulogu krioprotektanta koji štiti kristal prilikom smrzavanja kako se u njemu ne bi formirali kristali leda koji mogu narušiti kristalnu rešetku kristala proteina i moć razlučivanja. Nakon namakanja, kristal je iz kapljice upecan u malu najlonsku omču i ohlađen u tekućem dušiku.

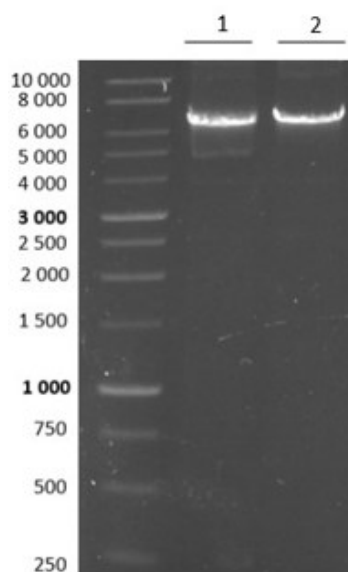
Za odabrane kristale istražena je kvaliteta kristalne strukture metodom difrakcije zračenja na monokristalu sinkrotronom Elletra Sincrotrone Trieste. Rotacijom kristala oko osi prikupljaju se difrakcijske slike različitih položaja kristala.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida za prekomjernu ekspresiju krnjeg i mutiranog oblika humanog proteina *HsSPRTN*

Iako je dokazana interakcija proteina SPRTN i p97 u stanicama⁶ i *in vitro*⁶¹, još uvijek nije detaljno razjašnjeno na koji način ova dva proteina čine kompleks. Rješavanje kristalne strukture kompleksa SPRTN:p97 i njegova strukturna karakterizacija uvelike bi doprinijela dubljem razumijevanju proteolitičkog popravka DPC oštećenja. Prilikom dizajna konstrukta za kristalografske svrhe bitno je detektirati strukturne domene važne za ostvarivanje interakcije s drugim proteinom te za samo održavanje funkcije proteina uz isključenje velikih, nestrukturiranih regija koje bi mogle negativno utjecati na formiranje kristala. U svrhu kristalizacijskih eksperimenata, prvotno su prekomjerno eksprimirani i pročišćeni skraćeni proteinski konstrukti *HsSPRTN*₁₋₂₆₈ i *Hsp97*_{N_D1}. Kako i nakon višestrukih pokušaja kristalizacije kompleksa navedenih konstrukata nije dobiven kristal zadovoljavajuće veličine i kvalitete, odlučena je priprema konstrukta SPRTN s 25 uklonjenih slabo konzerviranih N-terminalnih aminokiselina te uklonjenim neuređenim C-terminalnim dijelom. Navedeni konstrukt sadrži konzerviranu N-terminalnu domenu SprT te domenu SHP za interakciju s konstruktom p97_{N_D1}. Iako su konstruirani divlji tip i mutant, zbog mogućnosti autoproteolitičkog cijepanja divljeg tipa, za kristalizacijske eksperimente izabran je katalitički mutant *HsSPRTN*_{26-268,E122A}. Stoga u nastavku biti će detaljno objašnjeni koraci izolacije navedenog proteinskog konstrukta.

Kako bi se priredio SPRTN₂₆₋₂₆₈ provedena je metoda inverznog PCR-a s kalupom plazmida pNic-Zb koji je već sadržavao uklonirani gen za *HsSPRTN*. Popis korištenih početnica prikazan u tablici 2. naručen je od komercijalnog dobavljača kompanije *Macrogen*. Produkti iPCR reakcije analizirani su gel-elektroforezom na 0,8 % agaroznome gelu. Priređenim plazmidima pNic-Zb-*HsSPRTN*_{26-268,WT} i pNic-Zb-*HsSPRTN*_{26-268,E122A} spektrofotometrijski je određena koncentracija uz provjeru uspješnosti kloniranja sekvenciranjem s početnicama T7 promotor i T7 terminator. Slika 11. prikazuje eksperimentalno dobivenu veličinu iPCR produkta koja je u skladu s teorijski izračunatom željenom veličinom konstrukta od 6249 pb.



Slika 11. Analiza produkata inverzne PCR reakcije za krnje i mutirane konstrukte *HsSPRTN* elektroforezom na 0,8 % agaronom gelu. U prvoj jažici nalazi se marker molekulskih masa DNA *Gene Ruler* 1kb DNA (*Thermo Scientific*). Brojem jedan označen je divlji tip $SPRTN_{26-268,WT}$ a brojem dva njegov mutant $SPRTN_{26-268,E122A}$

4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina

U svrhu kristalizacije i određivanja trodimenzionalne strukture kompleksa, zasebno su prekomjerno eksprimirani i pročišćeni divlji tip i mutant krnjeg konstrukta $HsSPRTN_{1-268}$, $HsSPRTN_{26-268,E122A}$ te divlji tip $Hsp97_{N_{D1}}$. Navedeni konstrukti zadovoljavajuće čistoće također su iskorišteni za potrebe biokemijskih pokusa u potrazi za detaljnijim saznanjima o interakciji proteina SPRTN i p97. Uz navedeno, kako bi se okarakterizirala enzimska aktivnost proteina SPRTN, provela se prekomjerna ekspresija i pročišćavanje divljeg tipa cijelog proteina $SPRTN_{FL}$ i katalitičkog mutanta $SPRTN_{FL,E122A}$.

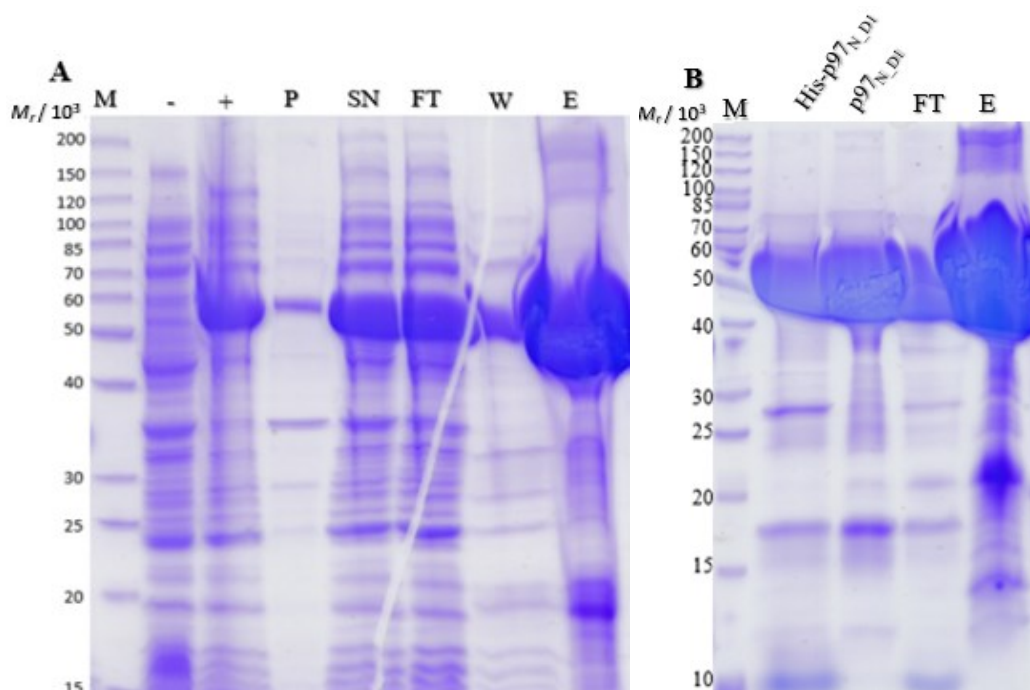
4.2.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukata za kristalizacijske eksperimente

Stanice *E. coli* soja *Rosetta 2 (DE3)* s transformiranim rekombinantnim plazmidima za konstrukte $p97_{N_{D1,WT}}$, $SPRTN_{26-268}$ i $SPRTN_{1-268}$ uzgajane su u 2 L LB medija s kloramfenikolom i kanamicinom uz indukciju ekspresije proteina IPTG-om. Bakterijske stanice su oborene, lizirane te su iz njih izolirani prekomjerno eksprimirani proteini s N-terminalnim heksahistidinskim privjeskom afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu. Protokol Ni-NTA afinitetne kromatografije detaljno je opisan u poglavlju Materijali i metode (3.4.1-3.4.3.).

§ 4. Rezultati i rasprava

Sastavi korištenih pufera prilikom pročišćavanja i dijalize proteina prikazani su u tablicama 6., 7. i 9. Za provjeru uspješnosti ekspresije i pročišćavanja, tijekom svih koraka skupljani su manji alikvoti uzoraka proteina i analizirani metodom SDS-PAGE.

Proteinski konstrukt p97_{N_{D1}} je uspješno nadeksprimiran u bakterijskim stanicama, te se većina proteina nalazi u topljivoj frakciji (SN) nakon centrifugiranja liziranih stanica (slika 12.A). To ukazuje da je protein vjerojatno pravilno strukturiran i funkcionalan. Prisutnost vrpce koja prema veličini odgovara p97_{N_{D1}} u uzorku taloga stanica (P) ukazuje kako je manja količina proteina završila u inkluzijskim tijelima ili agregatima krivo ili djelomično strukturiranih proteina. Također, postoji i mogućnost nepotpune lize stanica, te je dio proteina u neliziranim stanicama zaostao u frakciji taloga. Primijećena je značajna prisutnost proteina u uzorku nevezane frakcije (FT), što upućuje da se sav ciljani protein nije uspio vezati za Ni-NTA agarozu. Korištenje veće količine smole tijekom pročišćavanja omogućilo bi manji gubitak ciljnog proteina, ali pri tome bi se na agarozu nespecifično vezali i drugi proteini iz stanica. Kako je u frakciji elucije (E) utvrđena zadovoljavajuća količina priređenog p97_{N_{D1}}, nastavljen je postupak pročišćavanja. Eluat je dijaliziran preko noći u prisustvu proteaze iz TEV (engl. *Tobacco Etch Virus*) kako bi se pocijepao heksahistidinski privjesak. Privjesak His₆ je izuzetno koristan tijekom purifikacije, no može predstavljati smjetnju uspješnoj kristalizaciji proteina. Nakon cijepanja, His₆ privjesak i nepocijepani proteinski konstrukt su odvojeni od p97_{N_{D1}} sekundarnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu pri čemu se pocijepani p97_{N_{D1}} ne veže za agarozu i skuplja u nevezanoj frakciji (FT). Prema gelu na slici 12.B zbog velike količine nanesenog proteina i male razlike u molekulskoj masi teško je razlikovati vrpce pocijepanog ($M_r = 51\ 356$) i nepocijepanog ($M_r = 53\ 079$) p97_{N_{D1}} na gelu. Može se primijetiti kako je u frakciji elucije zaostalo jako puno proteina, najvjerojatnije nepocijepanog, što ukazuje kako proteaza TEV nije uspjela pocijepati sav protein koji se potom vezao za kolonu te isprao elucijskim puferom. Važno je napomenuti kako je volumen nevezane frakcije (FT) bio 20 mL, a volumen elucijske frakcije (E) 3 mL, te su na gel naneseni jednaki volumeni (15 μ L). To znači da u konačnici, iako se ne čini prema slici gela, u nevezanoj frakciji se nalazi puno veća količina proteina nego u eluatu.



Slika 12. Ekspresija i pročišćavanje proteina $(\text{His})_6\text{-TEV-Hsp97}_{\text{N_D1,WT}}$ kromatografijom na Ni-NTA agarozu

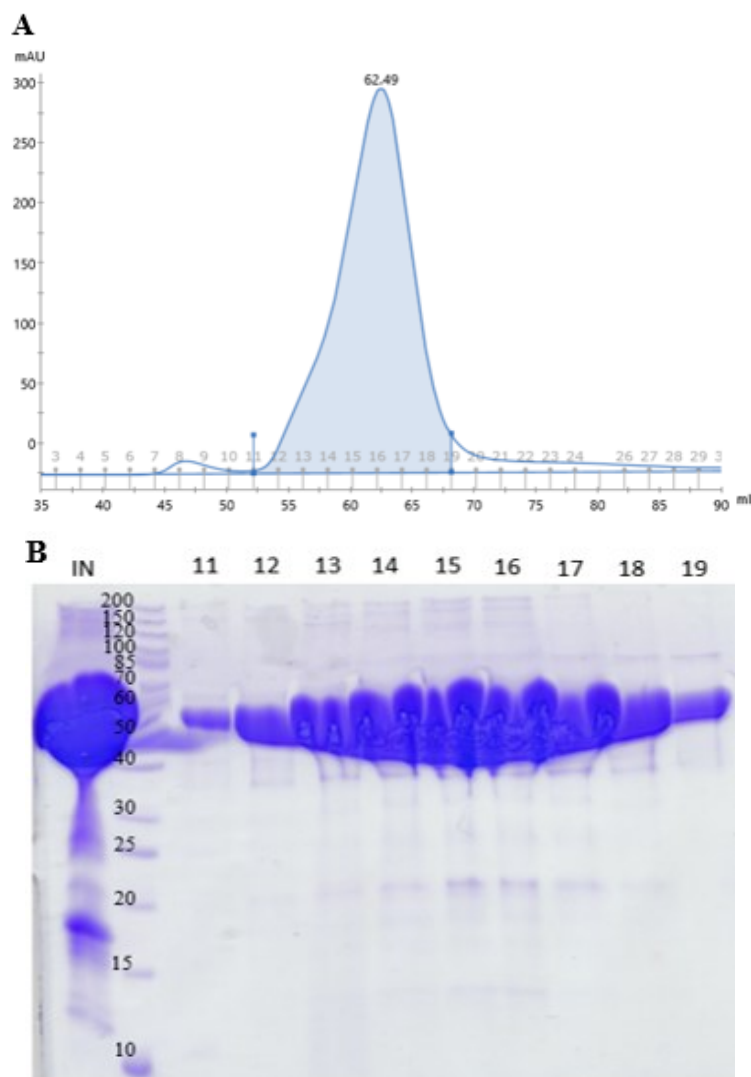
(A) Prikazani su alikvoti (10 μL) stanica prije indukcije (-), nakon indukcije IPTG-om (+), taloga nakon lize stanica (engl. *pellet*, P), supernatanta nakon lize stanica (SN), nevezne frakcije proteina (engl. *flow-through*, FT), ispiranja s puferom B (engl. *wash*, W), elucije puferom C (E). Korišten je marker molekulskih masa (M) *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*)

(B) Alikvoti (15 μL) proteinskih ekstrakata $\text{p97}_{\text{N_D1}}$ s histidinskim privjeskom, pocijepanim $\text{p97}_{\text{N_D1}}$, nevezane frakcije nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije (FT) i eluata (E)

Nevezana frakcija pocijepanog $\text{p97}_{\text{N_D1}}$ nije bila zadovoljavajuće čistoće za kristalizacijske eksperimente, stoga je ukoncentrirana do 3 mL i dalje pročišćena gel-filtracijom. Na slici 13.A prikazan je kromatogram ugušćene frakcije $\text{p97}_{\text{N_D1}}$ pročišćene na koloni *HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg* koja pokazuje odličnu selektivnost za proteine u rasponu relativnih molekulskih masa od 10 000 do 600 000. Korišten je pufer koji sadrži Tris/HCl (pH 8,5) sastava prikazanog u tablici 9., a jednako dobar prinos ostvaren je i puferom koji je sadržavao Hepes/NaOH (pH 7,5). Može se primijetiti kako krivulja nije simetrična, već postoji „rame“ s lijeve strane podnožja krivulje. Moguće je da se radi o različitim konformacijama ili oligomernim stanjima $\text{p97}_{\text{N_D1}}$ koji se eluiraju s kolone pri bliskim volumenima. Prema

§ 4. Rezultati i rasprava

kromatogramu odabrane su frakcije s najvećom količinom proteina te analizirane metodom SDS-PAGE (slika 13.B).



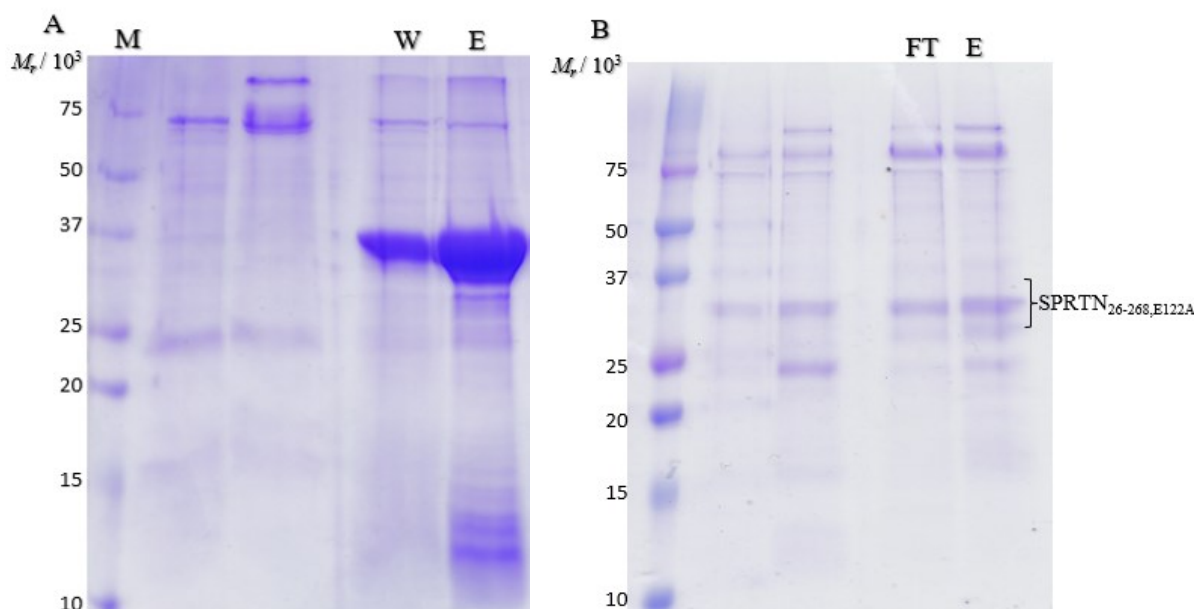
Slika 13. Kromatografsko pročišćavanje konstrukta p97_{N_D1}

- (A) Prikaz gel-filtracijskog kromatograma p97_{N_D1} na koloni *HiLoad*TM 16/600 *Superdex*TM 200 pg. Krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka. Sivo su označeni brojevi skupljenih frakcija
- (B) Poliakrilamidni gel analiziranih frakcija (15 μ L) metodom SDS-PAGE proteina p97_{N_D1} nakon pročišćavanja gel-filtracijom. Input (IN) označava uzorak proteina koji je nanesen na kolonu, a brojevima su označene frakcije gel-filtracije

§ 4. Rezultati i rasprava

Prema slici 13.B, frakcije 15–17 bile su najbogatije ciljnim proteinom uz zadovoljavajuću čistoću te nisu uključivale lijevo područje krivulje s „ramenom“. Navedene frakcije su prikupljene, ukoncentrirane do 500 μ L, alikvotirane, smrznute u tekućem dušiku i pohranjene na -80°C . Konačna izmjerena koncentracija iznosila je 30 mg/mL (15 mg).

U svrhu kristalizacije SPRTN:p97 kompleksa zatim je prekomjerno nadeksprimiran i pročišćen SPRTN_{26-268,E112A} iz stanica *E. coli* soja *Rosetta 2 (DE3)*. Nakon prvog koraka pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (slika 14), primijećeno je da se i u frakciji ispiranja puferom s 40 mM imidazolom (W) nalazi značajna količina željenog proteina, te je pripojena frakciji elucije u daljnjim koracima pročišćavanja. Elucijska frakcija ukazuje na manju količinu priređenog proteina SPRTN_{26-268,E122A} u usporedbi s p97_{N_{D1}}. Obje frakcije su odsoljene dijalizom preko noći uz dodatak proteaze TEV kako bi se uklonio heksahistidinski privjesak. Nakon toga provedena je još jedna Ni-NTA afinitetna kromatografija u svrhu odvajanja SPRTN-a od privjeska i nepocijepanog proteina (slika 14.B). Uz vrpce koja odgovara ciljnome proteinu zamijećene su i vrpce (oko 75×10^3) proteina iz *E. coli* koji su se nespecifično vezali za smolu. Također, u elucijskoj frakciji uz onečišćenja, prisutna je i vrpca za pocijepani SPRTN_{26-268,E122A}, što bi značilo da je dio proteina ostao nepocijepan.

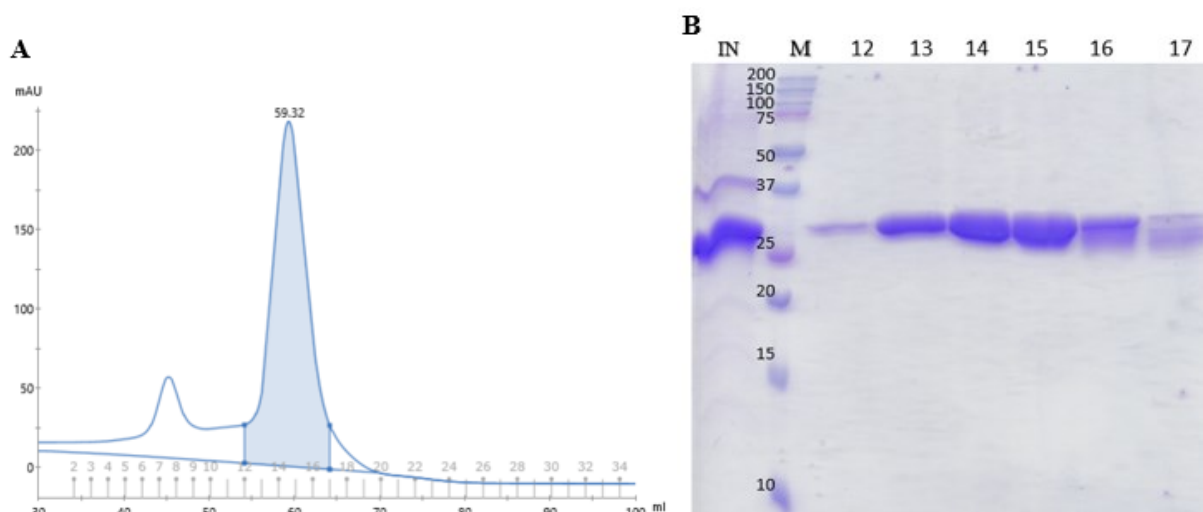


Slika 14. Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog proteina $(\text{His})_6\text{-Zb-TEV-HsSPRTN}_{26-268,\text{E122A}}$ ($M_r = 36\,969$) afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu

§ 4. Rezultati i rasprava

- (A) Prikazane su frakcije (10 μ L) ispiranja s puferom B (engl. *wash*, W) i elucije puferom C (E).
Korišten je marker (M) *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad)
- (B) Alikvoti (15 μ L) nevezane frakcije (FT) pocijepanog SPRTN_{26-268,E122A} ($M_r = 28\ 142$) nakon sekundarne Ni-NTA i frakcije elucije (E)

Za daljnje pročišćavanje uzeta je nevezana frakcija s pocijepanim proteinom i ukoncentrirana do 2 mL. Ukoncentrirana frakcija pročišćena je gel-filtracijom na koloni *HiLoad*TM 16/600 *Superdex*TM 75 pg u puferu s Tris/HCl (20 mmol dm⁻³, pH 8,5). Frakcije su prikupljene u području koje odgovara najvećim vrijednostima aposorbancije te su analizirane na gelu (slika 15). Usporedbom elucijskog profila proteina s kalibracijama kolone proizvođača (*Cytiva*)⁸⁷ može se zaključiti kako se vjerojatno radi o dimernom obliku proteina. Prema slici 15.B., u početnom uzorku osim pocijepanog SPRTN_{26-268,E122A} nalazi se i mala količina nepocijepanog proteina koji je uspješno odvojen gel-filtracijom. Prikupljene su frakcije 13–16 zadovoljavajuće čistoće i ukoncentrirane do 300 μ L konačne koncentracije 4 mg/mL (1,2 mg).

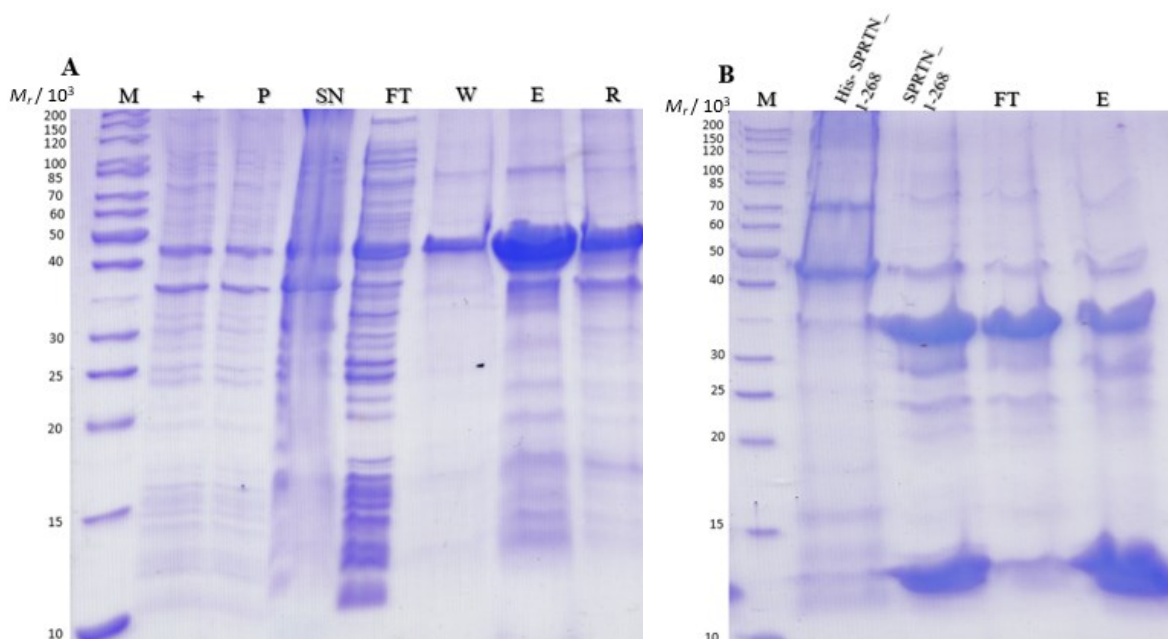


Slika 15. Kromatografsko pročišćavanje konstrukta SPRTN_{26-268,E122A}.

- (A) Prikaz gel-filtracijskog kromatograma proteina SPRTN_{26-268,E122A} na koloni *HiLoad*TM 16/600 *Superdex*TM 75 pg. Krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.
- (B) Poliakrilamidni gel analiziranih frakcija (15 μ L) metodom SDS-PAGE proteina SPRTN_{26-268,E122A} nakon pročišćavanja gel-filtracijom. Input (IN) označava uzorak proteina koji je nanesen na kolonu, a brojevima su označene frakcije gel-filtracije.

§ 4. Rezultati i rasprava

Iako se tijekom istraživanja nakon višestrukih kristalizacija konstrukata SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_DI} nije uspio prirediti zadovoljavajući kristal, skraćeni konstrukt SPRTN-a iskorišten je za potrebe biokemijskih eksperimenata. Kako bi se pomnije okarakterizirala protein:protein interakcija SPRTN:p97 prekomjerno je eksprimiran i pročišćen (His)₆-Zb-TEV-*Hs*SPRTN_{1-268,WT}. Uzorak nakon indukcije pokazuje vrpca veličine 40 x 10³ koja se pojavljuje u svim ostalim frakcijama, a koja odgovara rekombinantnom proteinu (slika 16.A). I tijekom ove izolacije određena količina proteina nakon lize i centrifugiranja zaostala je u netopivoj frakciji (P) u obliku inkluzijskih tijela, no ipak prisutna je intenzivna vrpca za rekombinantni protein u topivom dijelu uzorka (SN). U uzorku elucije (E) vidljiva je intenzivna vrpca rekombinantnog proteina, stoga je frakcija prikupljena i podvrgnuta prekonocnoj dijalizi s dodatkom TEV proteaze. Nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije skupljena je nevezana frakcija FT (slika 16.B) koja sadrži najviše pocijepanog proteina u odnosu na kontaminacije, te je korištena u daljnim koracima pročišćavanja.



Slika 16. Ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog proteina (His)₆-Zb-TEV-*Hs*SPRTN_{1-268,WT} ($M_r = 39\ 862$) kromatografijom na Ni-NTA agarozu

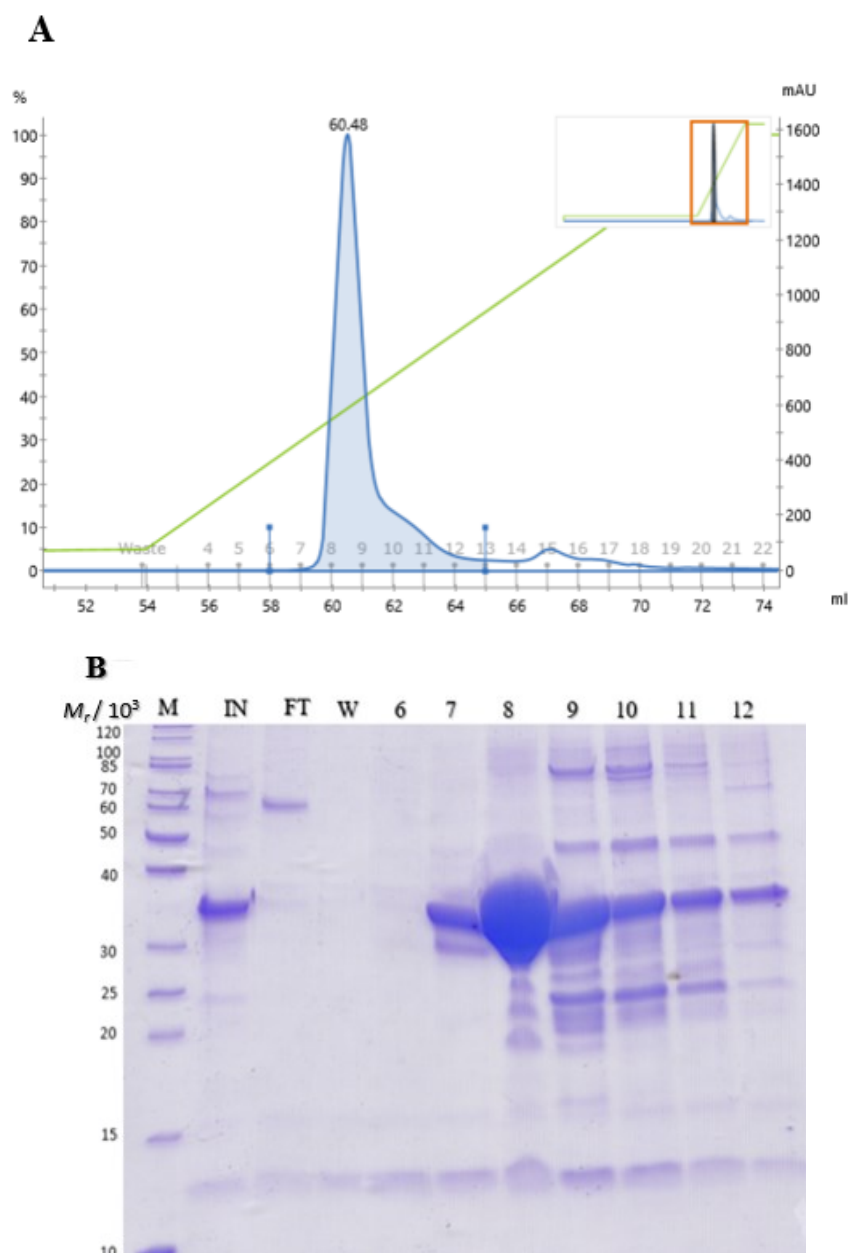
(A) Prikazani su alikvoti stanica nakon indukcije IPTG-om (+), taloga nakon lize stanica (P), supernatanta nakon lize stanica (SN), nevezane frakcije proteina (FT), ispiranja s puferom B (W), elucije puferom C (E) i proteina zaostalih na Ni-NTA agarozu (R). Korišten je marker molekulskih masa (M) *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific)

§ 4. Rezultati i rasprava

(B) Alikvoti (15 μ L) proteinskih ekstrakata SPRTN_{1-268,WT} s histidinskim privjeskom, pocijepanim SPRTN_{1-268,WT} ($M_r = 31\ 036$), nevezane frakcije nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije (FT) i frakcije elucije (E)

Kao sljedeći korak pročišćavanja navedenog konstrukta, provela se kromatografija anionske izmjene. Pročišćavanje kromatografijom ionske izmjene ovisi o ukupnom naboju proteina pri određenoj vrijednosti pH. Kako je tijekom izolacije i dijalize korišten pufer koji sadrži Hepes (pH 7,5), SPRTN₁₋₂₆₈ (pI 6,18) je nosio ukupan negativni naboj, stoga je za pročišćavanje odabrana kolona s pozitivno nabijenim skupinama (anionski izmjenjivač) *HiTrap Q HP* (*Cytiva*). Kako bi se spriječila elucija uzorka prije samog elucijskog gradijenta potrebno je prilagoditi ionsku jakost, odnosno smanjiti koncentraciju soli do one vrijednosti koja ne bi ometala vezanje proteina za kolonu. Stoga je nevezana frakcija s pocijepanim SPRTN₁₋₂₆₈ u puferu s 300 mM NaCl razrijeđena početnim puferom A bez prisustva soli (poglavlje 3.5.6.) do konačnog volumena 50 mL. Prije nanošenja na kolonu razrijeđeni uzorak je profiltriran kako bi se osigurala homogenost uzorka bez prisutnosti agregata i precipitata.

Analizom kromatograma na slici 17.A. odabrane su frakcije u području najveće visine pika i analizirane na gelu. Analizom nevezne frakcije FT i frakcije ispiranja (W) (slika 17.B) nije pronađena vrpca koja bi odgovarala ciljnome proteinu, što znači da su uvjeti ionske izmjene bili dobro prilagođeni za navedeni protein koji se u cijelosti vezao na kolonu. Eluirana frakcija broj 8 volumena 1 mL sadržavala je najveći udio proteina zadovoljavajuće čistoće, te je izmjerena koncentracija iznosila 3 mg/mL (3 mg). Prilikom ranijih pročišćavanja gel-filtracijom i ukoncentriravanja, navedeni konstrukt je precipitirao, stoga nisu poduzeti nikakvi daljnji koraci pročišćavanja niti ukoncentriravanja.

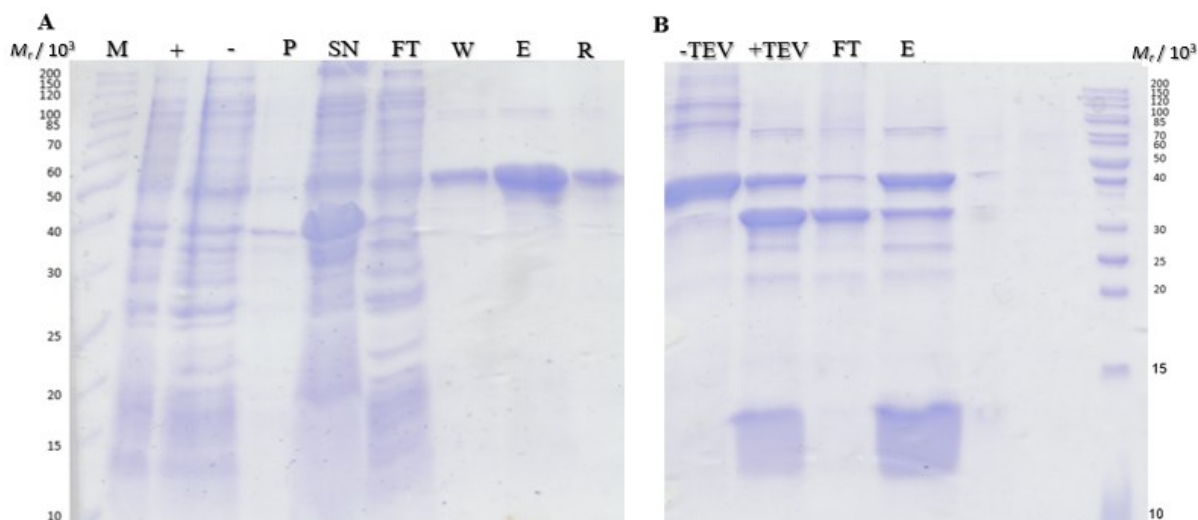


Slika 17. Pročišćavanje konstrukta *HsSPRTN*_{1-268,WT} kromatografijom anionske izmjene na koloni *HiTrap Q HP* (*Cytiva*)

- (A) Prikaz kromatograma *SPRTN*_{1-268,WT} nakon pročišćavanja ionskom izmjenom. Plava krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka. Zelena linija prikazuje gradijent pufera za eluciju B (0,05 – 1 M NaCl).
- (B) Poliakrilamidni gel analiziranih frakcija (15 μ L) metodom SDS-PAGE. Input (IN) predstavlja početni uzorak nanesen na kolonu. FT-nevezana frakcija, W -frakcija ispiranja 5 % puferom B (pufer s oko 50 mM NaCl), 6-12 – frakcije elucije ionske izmjene.

§ 4. Rezultati i rasprava

U pokušajima kristalizacija i biokemijskom eksperimentu povlačenja proteina (engl. *pull-down assays*) korišten je i katalitički mutant, stoga na sličan način kao što je opisano za divlji tip, iz 2 L kulture stanice pročišćen je i katalitički mutant SPRTN_{1-268,E112A}. Nakon Ni-NTA kromatografije (slika 18.A), eluirani protein (E) je postavljen na noćnu dijalizu uz dodatak 100 μ L proteaze TEV (1 mg/mL). U nevezanoj frakciji (slika 18.B, FT) uz pocijepani protein ($\approx 31 \times 10^3$) vidljive su vrpce nepocijepanog proteina (40×10^3) i zaostalih kontaminacija (≈ 25 i 70×10^3), stoga je sljedeći korak pročišćavanja uključivao kromatografiju ionske izmjene. Prije nanošenja na *HiTrap* Q HP kolonu, uzorak je razrijeđen do 60 mM soli početnim puferom A. Na slici 19.A prikazan je kromatogram ionske izmjene, te su frakcije s najvećom količinom proteina analizirane metodom SDS-PAGE (slika 19.B). Kao i u slučaju divljeg tipa proteina, frakcija 8 sadržavala je najveću količinu proteina, te je bila zadovoljavajuće čistoće. Kako bi odvojili potencijalne agregate iz uzorka koji mogu utjecati na kristalizaciju proteina, provedena je i gel-filtracija s kolonom *HiLoad*TM 16/600 *Superdex*TM 75 pg. Frakcije 14–16 (slika 19.D) pokazivale su zadovoljavajuću količinu i čistoću proteina te su ukoncentrirane do 250 μ L konačne koncentracije 2,5 mg/mL (0,625 mg).



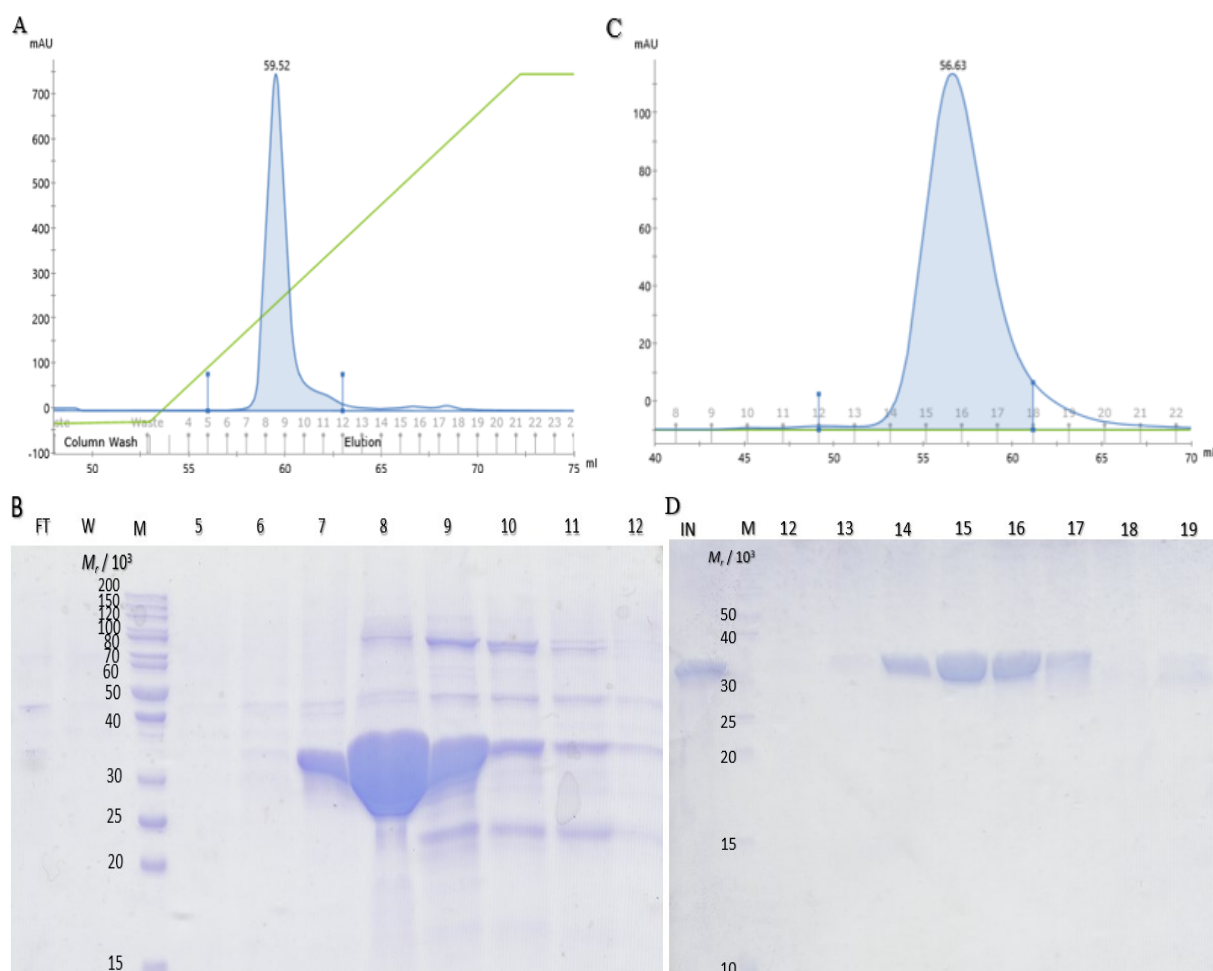
Slika 18. Ekspresija i pročišćavanje mutiranog rekombinantnog proteina (His)₆-Zb-TEV-

*Hs*SPRTN_{1-268,E112A} ($M_r = 39\,862$) kromatografijom na Ni-NTA agarozu

- (A) Prikazani su alikvoti stanica prije indukcije (-), nakon indukcije IPTG-om (+), taloga nakon lize stanica (P), supernatanta nakon lize stanica (SN), nevezane frakcije proteina (FT), ispiranja s puferom B (W), elucije puferom C (E) i proteina zaostalih na rezinu (R). Korišten je marker (M) *PageRuler*TM *Unstained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*)

§ 4. Rezultati i rasprava

(B) Alikvoti (15 μ L) proteinskih ekstrakata SPRTN_{1-268,WT} s histidinskim privjeskom, pocijepanim SPRTN_{1-268,WT} ($M_r = 31\ 036$), nevezane frakcije nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije (FT) i frakcije elucije (E).



Slika 19. Kromatografska pročišćavanja konstrukta SPRTN_{1-268,E122A}

(A) Kromatogram ionske izmjene na koloni *HiTrap Q HP*. Plava krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka. Zelena linija prikazuje rastuću koncentraciju soli pufera za eluciju B

(B) SDS-PAGE analiza frakcija (15 μ L) nakon ionske izmjene. Većina ciljnog proteina vidljiva je u frakciji 8

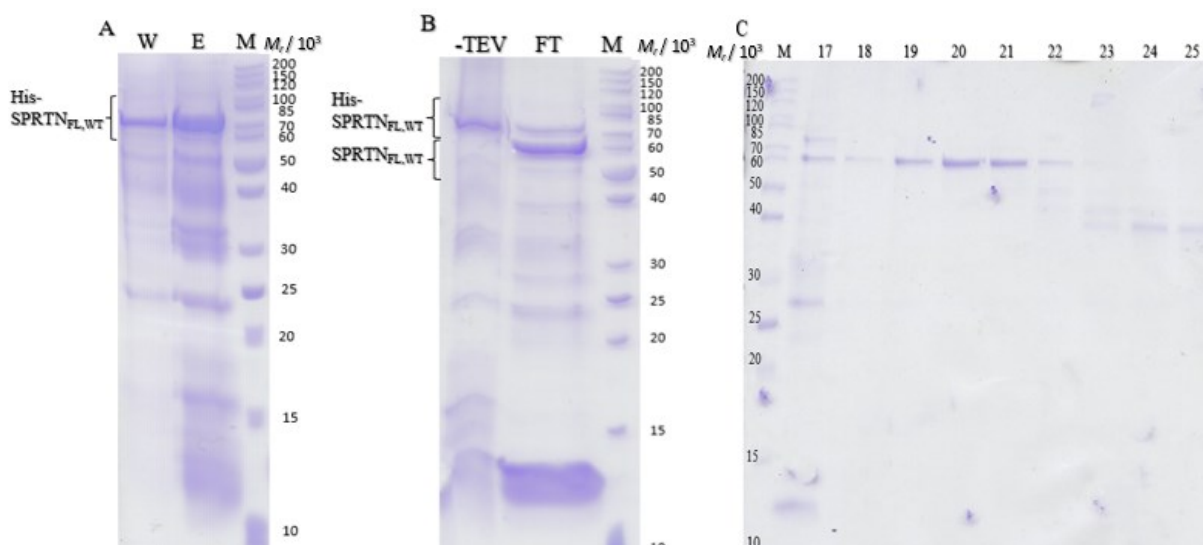
(C) Kromatogram provedene gel-filtracije na koloni *HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 75 pg*.

(D) Analizirane frakcije (15 μ L) nakon gel-filtracije. Frakcije 14-16 su skupljene i ukoncentrirane.

§ 4. Rezultati i rasprava

4.2.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje SPRTN_{FL} za biokemijske pokuse

Za potrebe testa katalitičke aktivnosti, pročišćen je cijeli protein SPRTN_{FL} i njegov katalitički mutant. Izolacija proteina provedena je iz soja *Rosetta (DE3)* uzgajanih u 2 litre LB medija s kloramfenikolom i kanamicinom. Koraci izolacije bili su jednaki kao i za skraćene konstrukte, osim što je liza stanica provedena postupkom sonikacije. Sastavi korištenih pufera prilikom pročišćavanja proteina prikazani su u tablicama 6., 7. i 9. Zbog vrlo malih prinosa, izolacija divljeg tipa je provedena u nekoliko pokušaja. Tijekom dijalize i ugušćivanja uzorak je često precipitirao, a nakon pročišćavanja pocijepanog proteina sekundarnom Ni-NTA kromatografijom dobiven je u malim količinama. Također, priređeni proteini često nisu pokazivali katalitičku aktivnost. Na slici 20. prikazan je primjer jednog pročišćavanja SPRTN_{FL} nakon kojeg je pročišćeni protein imao sposobnost cijepanja supstrata. U elucijskoj frakciji (slika 20.A) uz liniju ciljnog proteina vidljive su različite vrpce raspadnutih fragmenata koji su mogli nastati cijepanjem proteazama prisutnim u *E. coli* ili samocijepanjem divljeg tipa. Nakon cijepanja heksahistidinskog privjeska nevezana frakcija (FT) s pocijepanim proteinom (55 236) pročišćena je kolonom *HiLoad 16/600 Superdex 200* pg od nepocijepanog proteina (64 063) i zaostalih kontaminacija. U pročišćenim frakcijama (slika 20.C) vidljiva je znatno manja količina priređenog proteina nego što je dobiveno za skraćene konstrukte. Frakcije 19-21 su ukoncentrirane do 500 µL konačne koncentracije 0,8 mg/mL (0,4 mg).



Slika 20. Izolacija divljeg tipa proteina (His)₆-Zb-TEV-*Hs*SPRTN_{FL,WT} ($M_r = 64\ 063$)

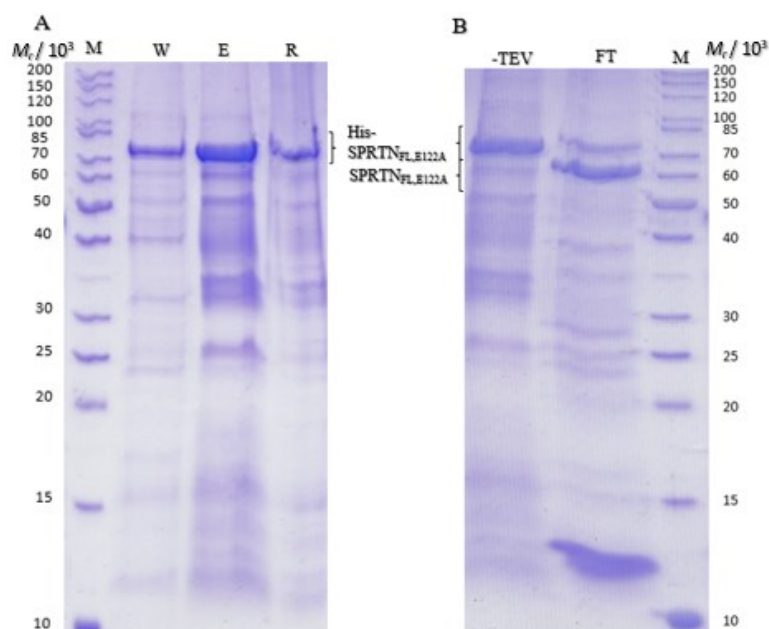
§ 4. Rezultati i rasprava

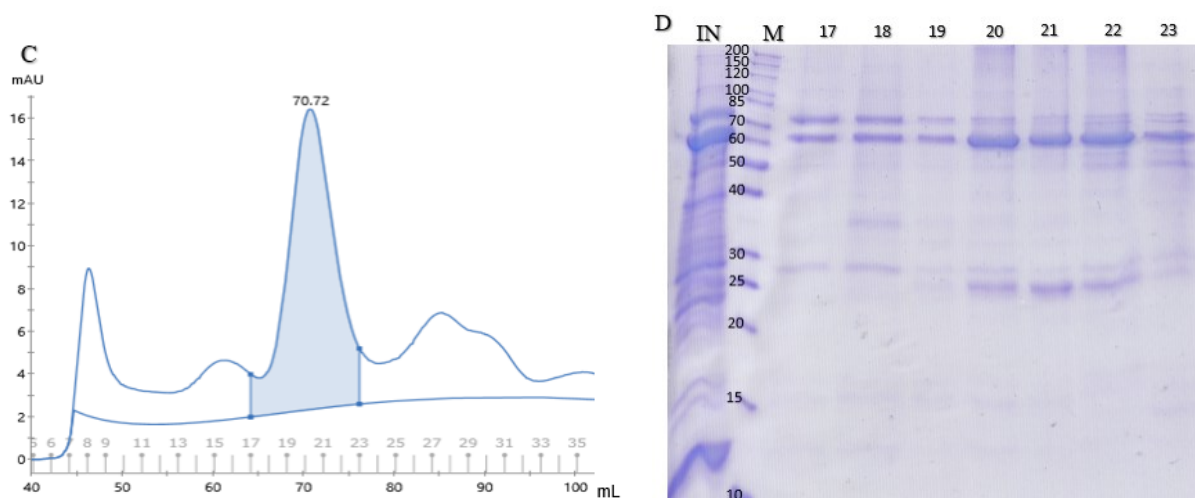
(A) Prikazani su uzorci ispiranja puferom B (W) i elucije puferom C (E) tijekom afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu. Skupljena je elucijska frakcija i inkubirana s proteazom TEV preko noći na 4°C. Korišten je marker (M) *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific)

(B) Gel s frakcijom prije inkubacije s TEV-om (-TEV) i nevezanom frakcijom nakon propuštanja kroz Ni-NTA kolonu (FT)

(C) Brojevima su označene frakcije nakon prolaska kroz kolonu *HiLoad 16/600 Superdex 200 pg*

Na identičan način pročišćen je SPRTN_{FL,E122A}. Iako tijekom pročišćavanja mutant nije precipitirao kao divlji tip, i dalje izolacijom nisu priređene velike količine proteina. Na slici 21. prikazani su provedeni koraci izolacije. Nevezna frakcija (slika 21,FT) nakon sekundarne Ni-NTA kromatografije pokazuje kako cijepanje proteazom nije bilo idealno jer je i dalje zaostala određena količina fuzijskog proteina s privjeskom. Na slici 21.D. prikazane su dobivene frakcije nakon gel-filtracijske kromatografije. Može se primijetiti kako se pocijepani mutant nije uspio u potpunosti odvojiti od fuzijskog proteina s privjeskom. No, kako za biokemijske pokuse nije bila nužna čistoća uzorka kao za kristalizacijske eksperimente, skupljene su frakcije 20-22 i ukoncentrirane do 400 µL konačne koncentracije 1,4 mg/mL (0,560 mg).





Slika 21. Izolacija proteina $(\text{His})_6\text{-Zb-TEV-}Hs\text{SPRTN}_{\text{FL,E122A}}$ ($M_r = 64\ 063$).

- (A) Prikazani su uzorci ispiranja puferom B (W), elucije puferom C (E) i proteina zaostalih na rezinu (R) tijekom afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu. Skupljena je elucijska frakcija i inkubirana s proteazom TEV preko noći na 4°C
- (B) Gel s frakcijom prije inkubacije s TEV-om (-TEV) i nevezanom frakcijom nakon propuštanja kroz Ni-NTA kolonu (FT)
- (C) Kromatogram provedene gel-filtracije na koloni *HiLoad 16/600 Superdex 200* pg. Plava krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka
- (D) Prikazan je alikvot uzorka s pocijepanim proteinom nanešenog na kolonu, a brojevima su označene pročišćene frakcije nakon prolaska kroz kolonu

4.2.3. Priprava kompleksa *SPRTN:p97* gel-filtracijom

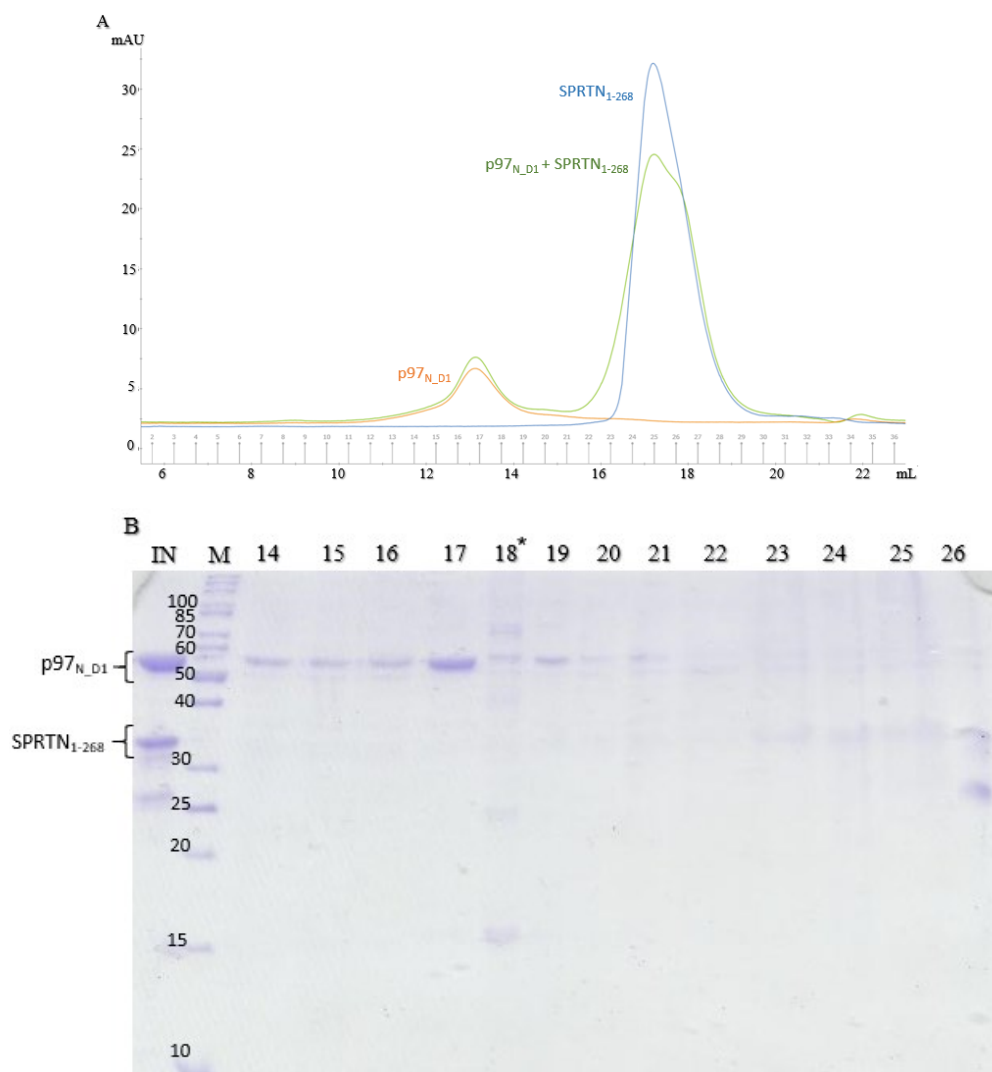
Kako na uspješnu pripravu proteinskog kompleksa utječu različiti čimbenici, poput zadovoljavajuće čistoće priređenih proteina, prikladan pufer i odgovarajući omjer pri kojem nastaje kompleks, prije kristalizacije ispitana je nastanak kompleksa gel-filtracijom. Gel-filtracija osim mogućnosti separacije proteina različitih veličina, također služi za funkcionalne studije proteinskih kompleksa. Kada se gel-filtracija koristi za detekciju ili potvrdu nastanka kompleksa proteina, molekulska masa formiranog kompleksa obično se uzima kao suma svakog od individualnih proteina. Stoga bi na kromatogramu uz pikove pojedinačnih proteina trebao biti vidljiv pik kompleksa pri različitome volumenu eluiranog uzorka u odnosu na individualne proteine. Pomoću standarada modelnih proteina i usporedbom s elucijskim profilima pojedinačnih proteina, mogao bi se odrediti omjer molekula koje čine kompleks. Za

§ 4. Rezultati i rasprava

pripravu kompleksa gel-filtracijom potrebno je uzeti u obzir sastav korištenih pufera koji bi trebali sadržavati 50–100 mM soli kako bi se spriječile agregacije proteina. No, istovremeno ne smiju se koristiti previsoke koncentracije soli koje bi poremetile međusobne interakcije proteina i dovele do raspada kompleksa.⁹⁸

Prvo je ispitan nastanak kompleksa SPRTN₁₋₂₆₈:p97_{N_D1}. Uzorak kompleksa je priređen miješanjem po 200 µg svakog od konstrukata uz dodatak pufera (15 mmol dm⁻³ Hepes/NaOH pH 7,5, 1 mmol dm⁻³ DTT) do konačnog volumena 500 µL. Nakon inkubacije od 15 minuta pri sobnoj temperaturi i 30 minuta na ledu, uzorak je nanesen na kolonu. Analizom gel-filtracijskog kromatograma i eluiranih frakcija metodom SDS-PAGE (slika 22) može se zaključiti da se ovim načinom nije uspio izolirati navedeni kompleks. Za uzorak pomiješanih proteina nanesenih na kolonu (zelena krivulja, SPRTN₁₋₂₆₈+p97_{N_D1}), kromatogram ne pokazuje pik koji bi odgovarao formiranome kompleksu, već samo pikove pojedinačnih proteina. Pošto je kompleks veće molekulske mase od pojedinačnih proteina, da je došlo do njegovog nastanka bila bi vidljiva apsorbancija pri eluiranome volumenu manjem od individualnih konstrukata. Također, prilikom izvedbe SDS-PAGE analize došlo je do tehničke pogreške te su na gelu su vrlo slabo vidljive vrpce koje bi molekulskom masom odgovarale konstruktu SPRTN₁₋₂₆₈, iako je na kromatogramu vidljiva njegova apsorbancija. Ovakav način pripreve kompleksa s konstruktom SPRTN₁₋₂₆₈ je još jednom ponovljen, no dobiven je isti rezultat kao i u prethodnom slučaju, stoga se odustalo od pripreve kompleksa gel-filtracijskom kromatografijom. Jedan od mogućih razloga nemogućnosti izolacije proteinskog kompleksa ovakvom metodom je nestabilnost priređenog kompleksa koji se tijekom same gel-filtracije raspada. Čini se kako su interakcije ovih dvaju proteinskih konstrukata preslabe za dobivanje protein:protein kompleksa navedenom metodom.

§ 4. Rezultati i rasprava



Slika 22. Priprema kompleksa gel-filtracijom.

(A) Zasebno pročišćeni SPRTN_{1-268} i $\text{p97}_{\text{N_D1}}$ inkubirani su 15 minuta na sobnoj temperaturi i pola sata na ledu te nanesceni na kolonu *Superdex 200 Increase 10/300 GL*. Kolona je ekvilibrirana u puferu sastava 100 mmol dm^{-3} NaCl, 15 mmol dm^{-3} Hepes pH 7,5 i 1 mmol dm^{-3} DTT.

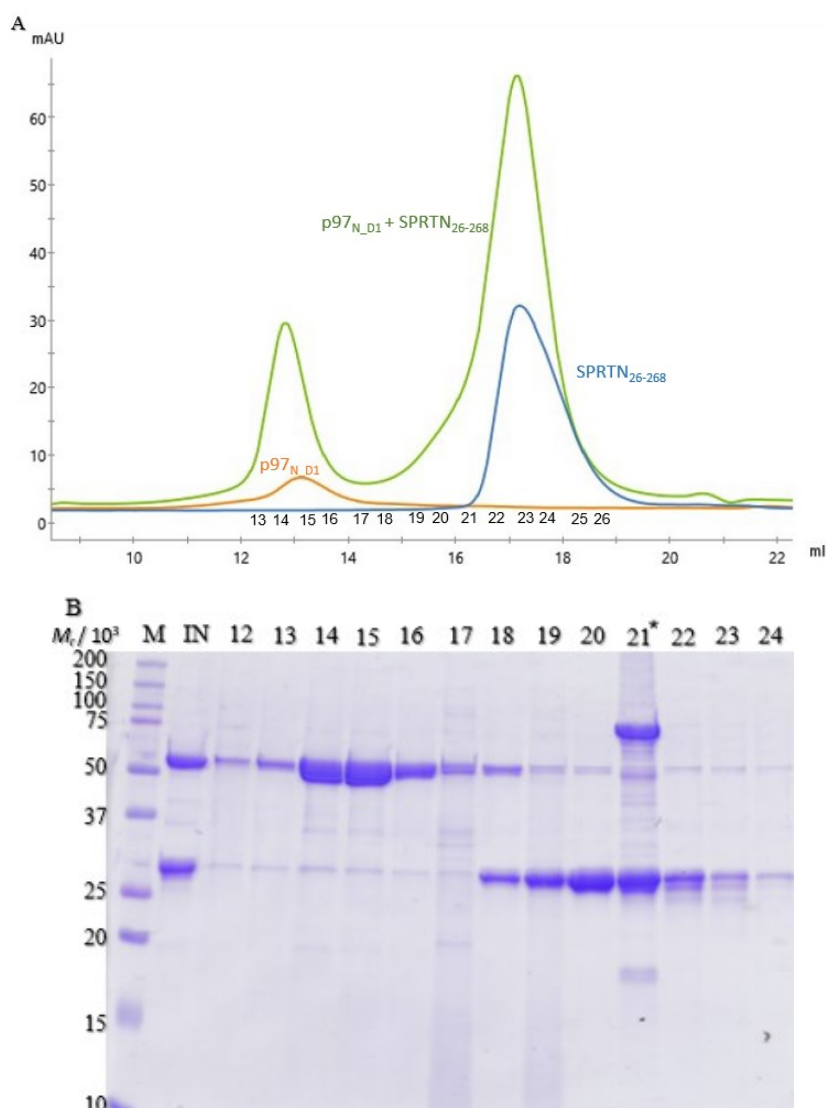
Narančasta i plava krivulja označavaju ovisnosti apsorbancije (280 nm) o eluiranome volumenu zasebnih proteina, a zelena krivulja ovisnost apsorbancije o eluiranome volumenu uzorka pomiješanih proteina.

(B) Alikvot uzorka ($10 \mu\text{L}$) pomiješanih proteina (IN) i eluirane frakcije (14-26, $20 \mu\text{L}$) analizirane metodom SDS-PAGE, 18*- tehnička pogreška prilikom nanošenja na gel, krivo nanesena frakcija

Na isti način ispitano je nastajanje kompleksa $\text{SPRTN}_{26-268}:\text{p97}_{\text{N_D1}}$, više koncentracije nego u prethodnom slučaju. Veća koncentracija proteina mogla bi pomaknuti ravnotežu prema

§ 4. Rezultati i rasprava

nastanku kompleksa. Uzorak kompleksa ukupnog volumena 110 μL (550 μg p97_{N_{D1}} i 240 μg SPRTN₂₆₋₂₆₈) je nanosen na kolonu *Superdex 200 Increase 10/300 GL* u puferu sastava NaCl 100 mmol dm^{-3} , 15 mmol dm^{-3} Hepes pH 7,5 i 1 mmol dm^{-3} DTT (detaljna priprava kompleksa opisana u poglavlju 3.4.8.). Prema slici 23. može se zaključiti kako navedeni kompleks nije detektiran, već su se proteini zasebno eluirali s kolone. Na gelu su vidljive vrpce koje odgovaraju eluiranim frakcijama u području kromatograma odvojenih konstrukata. Mali pomak pika za uzorak kompleksa (zelena krivulja, SPRTN₂₆₋₂₆₈:p97_{N_{D1}}) upućuje kako je možda nastalo malo kompleksa. Za konačnu potvrdu molekulske mase i oblika proteina bilo bi dobro napraviti SEC-MALS analizu. Intenzivna vrpca na gelu koja odgovara relativnoj molekulskoj masi 75×10^3 je posljedica tehničke pogreške (slika 23.B, 21*).



Slika 23. Analiza SPRTN₂₆₋₂₆₈ - p97_{N_{D1}} kompleksa gel-filtracijom koristeći kolonu *Superdex 200 Increase 10/300 GL*

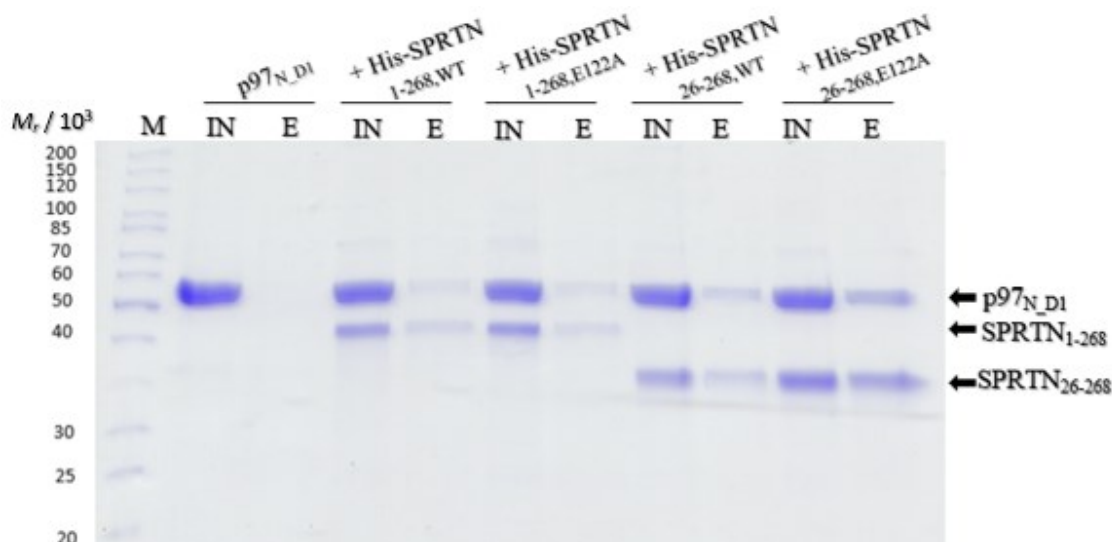
§ 4. Rezultati i rasprava

- (A) Usporedba kromatograma zasebnih SPRTN, p97 te kompleksa. Narančasta i plava krivulja označavaju ovisnosti apsorbancije (280 nm) o eluiranome volumenu zasebnih proteina, a zelena krivulja ovisnost apsorbancije o eluiranome volumenu uzorka pomiješanih proteina
- (B) Alikvot uzorka (10 μ L) pomiješanih proteina (IN) i eluirane frakcije (20 μ L) analizirane metodom SDS-PAGE, 21*- tehnička pogreška prilikom nanošenja na gel

Iako je gel-filtracija dobro zamišljena metoda kojom bi se priredio pročišćeni kompleks, provedenim eksperimentima nema snažnih indikacija o interakciji dvaju proteina *in vitro*. Nakon pokušaja pripreme kompleksa gel-filtracijom, odustalo se od navedene metode te je za kristalizacijske eksperimente odlučena priprava kompleksa miješanjem proteina u različitim omjerima i ugušćivanjem do koncentracije prikladne za kristalizaciju.

4.2.4. Biokemijska karakterizacija kompleksa SPRTN:p97 metodom povlačenja proteina

Nakon što gel-filtracijom nije uspješno izoliran SPRTN:p97 kompleks, za potvrdu interakcije pročišćenih konstrukata *in vitro* odabrana je metoda povlačenja proteina (engl. *pull-down assay*). Suspenzije fuzijskih proteina SPRTN₁₋₂₆₈ i SPRTN₂₆₋₂₆₈ s histidinskim privjeskom na N-kraju inkubirane su s neoznačenim p97_{N_{D1}}. Proteini imobilizirani na Ni-NTA agarozu eluirani su puferom koji je sadržavao 400 mmol dm⁻³imidazola te su analizirani metodom SDS-PAGE. Priprava inputa proteina i priprema smole odgovarajućim puferima detaljno je opisana u poglavlju 3.4.11.



Slika 24. Detekcija interakcije imobiliziranih SPRTN₁₋₂₆₈ i SPRTN₂₆₋₂₆₈ na Ni-NTA agarozu s p97_{N_D1} (bez His-privjeska). Uzorci priređenih inputa (IN) i elucije vezanih proteina (E) analizirani su na 15 % SDS-PAGE gelu. Ukoliko postoji interakcija, p97_{N_D1} se veže za smolu i eluira sa konstruktima SPRTN. Kako bi se potvrdilo da vezanje p97_{N_D1} nije artefakt, uvedena je negativna kontrola vezanja samog p97_{N_D1} na smolu

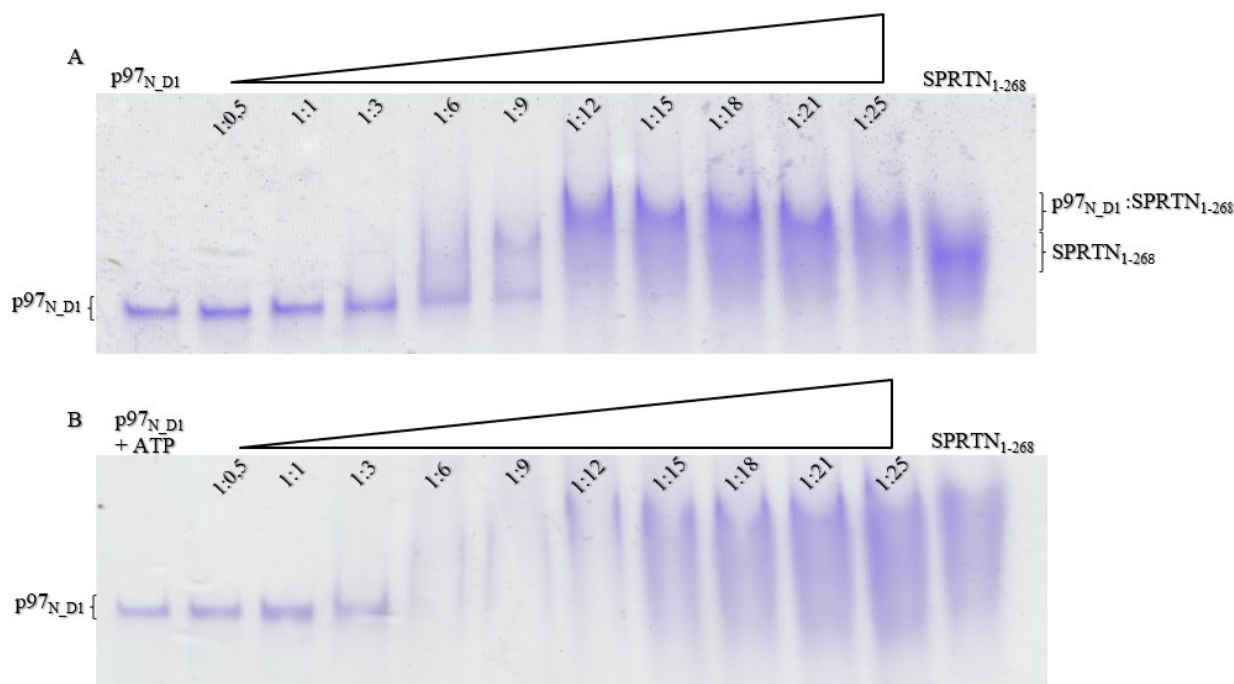
Prema slici 24., potvrđena je interakcija proteina *in vitro*; p97_{N_D1} stvara kompleks s vezanim SPRTN₁₋₂₆₈, a delecijom početnih 25 aminokiselina (SPRTN₂₆₋₂₆₈) nije došlo do gubitka interakcije. Da ne postoji interakcija, u frakcijama elucije sa konstruktima SPRTN ne bi bila vidljiva vrpca koja odgovara p97_{N_D1} jer se protein bez afinitetnog privjeska ne može se vezati na smolu. Potvrda toga je negativna kontrola sa samim p97_{N_D1} gdje u elucijskoj frakciji nema vidljive vrpce. Ovime je zaključeno da skraćeni oblici proteina SPRTN s domenama SprT i SHP mogu stvarati proteinski kompleks s p97 *in vitro*.

4.2.5. Nativna elektroforeza kompleksa proteina SPRTN:p97

Za ispitivanje vezne stehiometrije proteina pri kojem dolazi do nastanka kompleksa provedena je nativna gel-elektroforeza. Navedena metoda primjenjuje se kada je potrebno sačuvati nativnu strukturu proteina, međusobne interakcije podjedinica te interakcije s drugim proteinima. Ukoliko dođe do nastanka kompleksa, trebala bi biti vidljiva vrpca na različitim položajima u gelu u odnosu na pojedinačne proteine. Za pronalazak omjera, pri konstantnoj koncentraciji p97_{N_D1} titrirana je rastuća koncentracija SPRTN₁₋₂₆₈ te je reakcijska smjesa analizirana elektroforezom na 4–15 % poliakrilamidnom gelu *Mini-Protean TGX* u nativnim uvjetima

§ 4. Rezultati i rasprava

(slika 25.A). Na isti način promatran je nastanak kompleksa u prisustvu ATP-a (slika 25.B). Kako je p97_{N_{D1}} ATPaza koja za svoje zadaće koristi energiju hidrolize ATP-a (poglavlje 2.4.), pokušao se ispitati njegov utjecaj na nastanak kompleksa.



Slika 25. Nativna gel-elektroforeza za ispitivanje vezne stehiometrije SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_{D1}}.

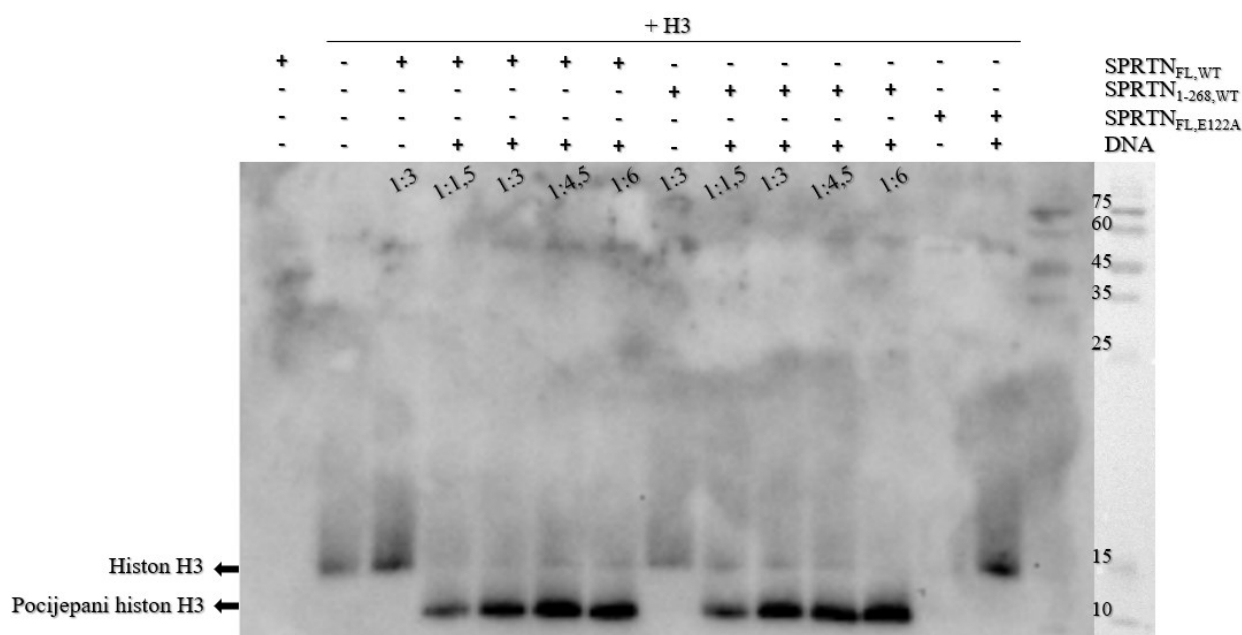
- (A) Titracija SPRTN₁₋₂₆₈ pri konstantnoj koncentraciji p97_{N_{D1}}. Prva i posljednja jažica sadrže uzorke pojedinačnih konstrukata, a na gelu su prikazani priređeni omjeri proteina (p97 (heksamer):SPRTN(monomer)). Kada su dva proteina prisutna u omjeru 1:12, donja vrpca u potpunosti nestaje, što ukazuje kako je sav p97_{N_{D1}} prisutan u kompleksu sa SPRTN₁₋₂₆₈.
 (B) Titracija SPRTN₁₋₂₆₈ pri konstantnoj koncentraciji p97_{N_{D1}} u prisutnosti ATP-a. Prva i posljednja jažica sadrže uzorke pojedinačnih konstrukata.

Prema rezultatima provedene nativne elektroforeze na slici 25.A, pri molarnome omjeru 1:12 (p97:SPRTN) može se primijetiti izostanak donje vrpce koja odgovara proteinu p97_{N_{D1}} što ukazuje kako se sav protein vezao u kompleks. Također, daljnjim porastom koncentracije SPRTN₁₋₂₆₈, za gornju vrpcu nastalog kompleksa ne povećava se intenzitet ni migracija na više položaje u gelu. Valja napomenuti kako u nativnoj gel-elektroforezi proteini se osim prema svojoj veličini razdvajaju i prema naboju. Iako je p97_{N_{D1}} protein veće molekulske mase, zauzima niže položaje u gelu jer putuje brže u odnosu na SPRTN₁₋₂₆₈ (pI=6,18) zahvaljujući svojem većem negativnom naboju (pI= 5,32) u navedenim uvjetima (Hepes pH 7,5). Pri

omjerima većim od 1:12, vrpce pokazuju veći razmaz (engl. *smear*) koji bi odgovarao višku SPRTN₁₋₂₆₈ koji je ostao nevezan. Iako je ova metoda dala okviran omjer pri kojem dolazi do nastanka kompleksa, teško je precizno zaključiti točnu stehiometriju vezanja, obzirom da SPRTN₁₋₂₆₈ ne putuje uniformno u gelu, već se njegova vrpca razmazuje. Ponekad razmaz vrpce u nativnoj gel-elektroforezi može nastati kao posljedica nehomogenog uzorka i nekonzistentnog primjenjenog napona, no navedene stavke su se provjerile tijekom eksperimenata, a isti rezultati su dobiveni i nakon više ponavljanja. Uzevši u obzir kako se najvjerojatnije radi o oligomernome obliku proteina p97_{N_{D1}} (zaključeno prema opisanim pročišćavanjima proteina gel-filtracijom), omjer 1:12 pri kojem dolazi do nastanka kompleksa odnosi se na omjer heksamernog p97_{N_{D1}} i monomernog SPRTN₁₋₂₆₈. Nadalje, nije se uspjelo u potpunosti zaključiti utječe li ATP na nastanak kompleksa. Pri omjerima 1:6 i 1:9, uzorak nije jasno vidljiv na gelu. Moguće je da prisutnost ATP-a utječe na nestabilnost proteina i potiče njihovu agregaciju te uzorci nisu u mogućnosti niti ući u gel. Pri omjeru 1:12 postoji indikacija male količine formiranog kompleksa, obzirom da se za SPRTN₁₋₂₆₈ očekuje pojava vrpce na nešto nižem položaju u gelu. No, nakon više ponovljenih pokušaja, slični rezultati nisu doveli do zaključka utječe li možda ATP na raniji/bolji nastanak kompleksa.

4.2.6. Testiranje aktivnosti proteaze SPRTN_{FL} i konstrukta SPRTN₁₋₂₆₈

Kako su za potrebe istraživanja više puta pročišćavani SPRTN i njegovi skraćeni konstrukti, htjela se provjeriti enzimska aktivnost priređenih proteina kao što je to pokazano u ranijoj literaturi.⁴⁰ Za karakterizaciju sposobnosti cijepanja supstrata, proveo se *in vitro* test aktivnosti koristeći pročišćeni SPRTN_{FL} i njegov skraćeni konstrukt SPRTN₁₋₂₆₈. Enzimske reakcije provedene su u različitim omjerima pročišćenih proteina naprema modelnom supstratu histonu H3 u prisutnosti DNA preko noći pri 37°C. Proteolitička aktivnost praćena je *Western Blot* metodom koristeći antitijelo specifično za histon H3. Detaljni postupci pripreve uzorka i provedbe *Western Blot* analize opisani su u poglavlju 3.4.13.



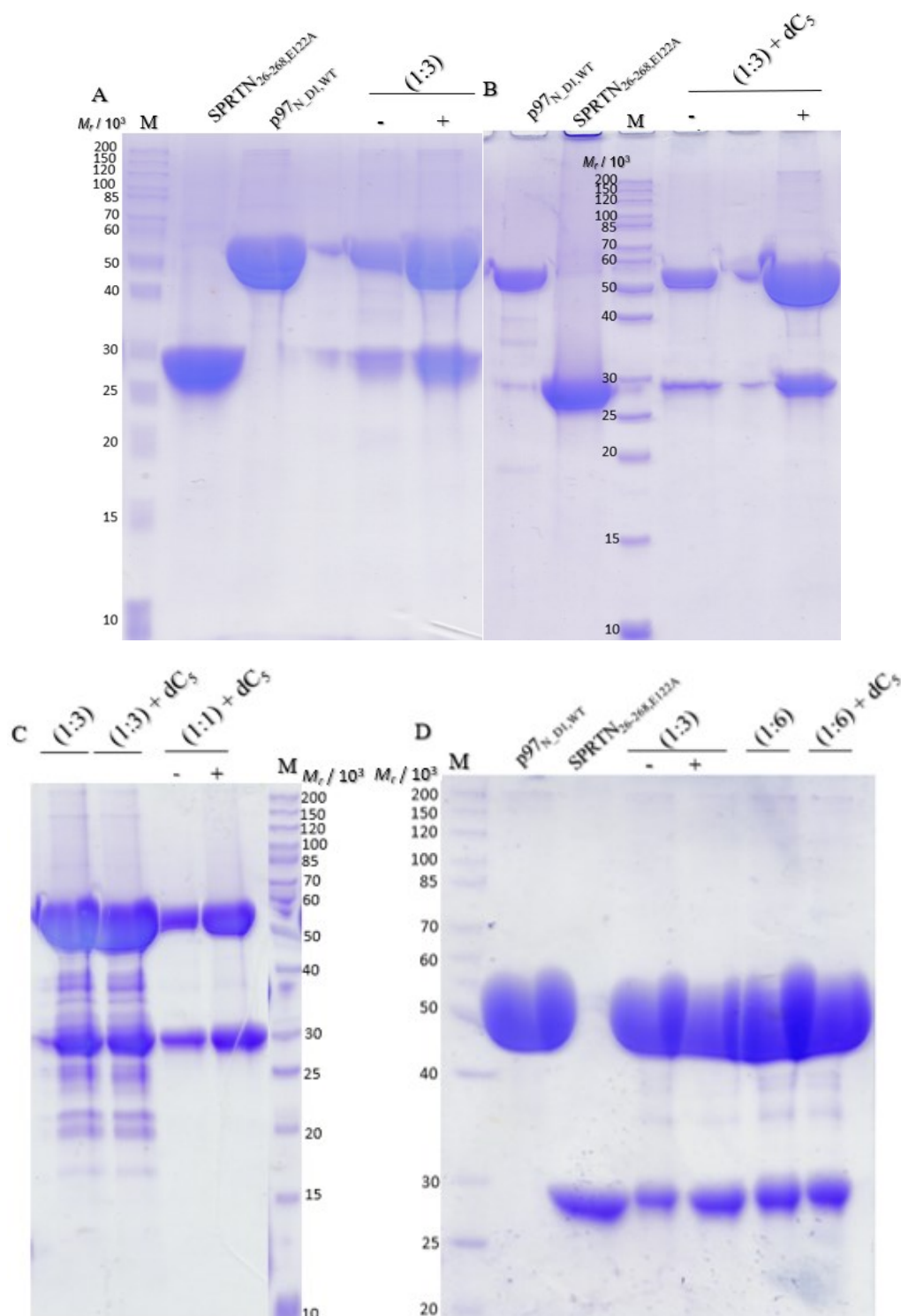
Slika 26. Analiza priređenih reakcijskih smjesa Western Blot metodom koristeći antitijelo specifično za histon H3 kako bi se testirala enzimsko aktivnost SPRTN_{FL} i krnjeg SPRTN₁₋₂₆₈ *in vitro* na modelnom supstratu histonu H3 u prisutnosti DNA. Na slici su označeni različiti omjeri supstrata H3 naprema divljem tipu proteaza (1:1,5–1:6). U zadnje dvije jažice nalaze se kontrolni uzorci supstrata H3 u omjeru 1:3 naprema katalitičkom mutantu

Enzimsko aktivnost SPRTN proteina potvrđena je *in vitro* (slika 26): SPRTN_{FL} cijepa supstrat H3 u prisutnosti DNA, kao i njegov skraćeni konstrukt. Prema očekivanjima, katalitički neaktivan SPRTN_{FL,E122A} nije cijepao histon H3. U jažici koja bi trebala sadržavati reakcijsku smjesu SPRTN_{FL,E122A} s histonom, vjerojatno zbog tehničke pogreške prilikom pipetiranja nije vidljiva vrpca koja bi odgovarala nepocijepanome histonu. Dobiveni rezultati sugeriraju kako je SPRTN_{FL} najaktivniji pri omjeru enzim:supstrat 1:4,5, dok je SPRTN₁₋₂₆₈ pokazao najizraženiju aktivnost pri omjeru 1:6. Jednom kada je potvrđena aktivnost SPRTN-a, ispitivao se utjecaj p97 na enzimsku aktivnost pročišćenih proteaza. Priređene reakcijske smjese s dodatnim p97 i ATP-om su analizirane *Western Blot* metodom, no rezultati testa više nisu pokazivali enzimsku aktivnost SPRTN-a, a time nije bilo mogućnosti provjere utjecaja p97. Jedna od mogućnosti neuspješnih pokušaja dokazivanja katalitičke aktivnosti SPRTN-a je nestabilnost pročišćenog proteina koji nakon kratkog vremena gubi svoju enzimsku aktivnost.

4.2.7. Kristalizacija kompleksa SPRTN:p97

Nakon pročišćavanja proteina i testiranja njihove interakcije različitim biokemijskim metodama, uslijedili su kristalizacijski eksperimenti. Kao što je već spomenuto, prvotno je odlučeno kristalizirati kompleks konstrukata p97_{N_D1} i SPRTN₁₋₂₆₈. Općenito, tijekom pročišćavanja SPRTN-a primijetilo se kako je protein sklon degradaciji te ga je bilo teško pripremiti u velikim količinama, stoga se pokušao osmisliti takav konstrukt koji bi pokazivao dovoljnu stabilnost i koncentraciju za pripremu željenog kompleksa. Kako nakon višestrukih pokušaja dobivanja zadovoljavajućeg kristala nisu opaženi željeni rezultati, pripremljen je novi konstrukt. Priređen je konstrukt SPRTN_{26-268,E112A} s delecijom početnih 25 slabo konzerviranih aminokiselina. Sama ideja o navedenom konstruktu proizašla je iz objavljenog rada u kojemu je okarakterizirana kristalna struktura konstrukta SPRTN₂₆₋₂₁₄ s oligonukleotidom dC₅.⁴² Priređeni SPRTN₂₆₋₂₆₈ u svojoj strukturi ima zadržanu konzerviranu domenu SprT i regiju SHP za koju je dokazano da služi za interakciju s p97. Također, zbog dokazane sposobnosti samocijepanja SPRTN-a *in trans*,⁴⁰ u kristalizacijama se koristio katalitički neaktivan mutant. Kako je metodom povlačenja proteina potvrđena njihova interakcija *in vitro*, krenulo se s pročišćenim konstruktima u kristalizacijske eksperimente.

Priređeno je šest uzoraka kompleksa SPRTN:p97 u različitim omjerima s ili bez oligonukleotida dC₅ navedenima u tablici 10. (slika 27). Kokristalizacija s dC₅ provedena je zbog mogućnosti stabilizacije kompleksa pomoću DNA. Uzorci kompleksa (slika 27) podvrgnuti su kristalizaciji metodom difuzije para otapala tehnikom sjedeće kapi pomoću robota za postavljanje kristalizacije *Oryx8LCP*. Također, i ručno su postavljeni kristalizacijski eksperimenti tehnikom viseće kapi. Kako bi se ispitao što veći broj potencijalnih uvjeta pri kojem bi moglo doći do nastanka kristala, korišteni su razni komercijalni kompleti za kristalizaciju navedeni u poglavlju 3.1.9.



Slika 27. Priprava kompleksa za kristalizaciju. Svi priređeni uzorci kompleksa poslije ukoncentriravanja iskorišteni su za kristalizacijske eksperimente

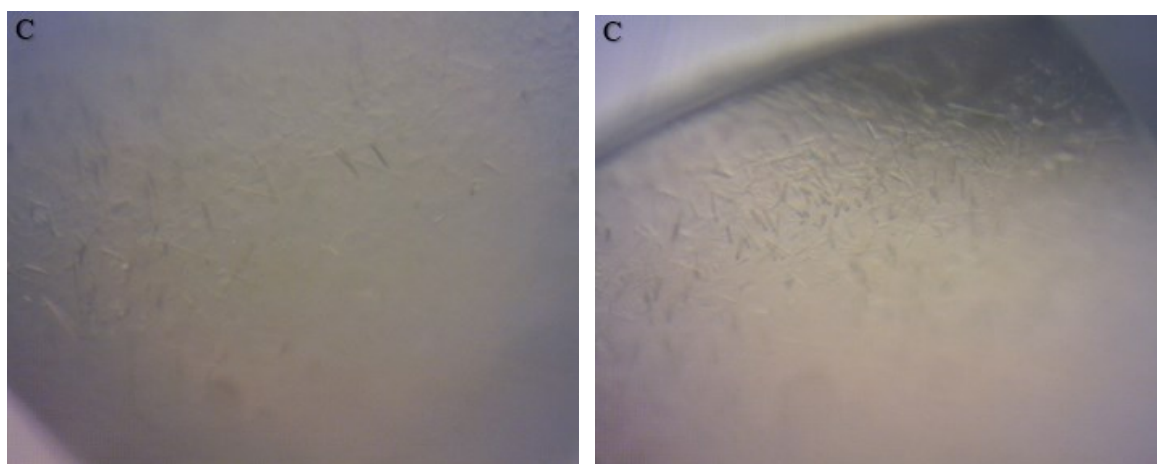
(A) Alikvoti (1 μL) pročišćenih proteina i uzorka kompleksa I. (p97_N_DI,WT + SPRTN₂₆₋₂₆₈,E122A (1:3)) prije (-) i nakon ukoncentriravanja (+)

§ 4. Rezultati i rasprava

- (B) Alikvoti (1 μ L) pročišćenih proteina i uzorka kompleksa II. ($p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:3) + dC_5) prije (-) i nakon ukoncentriravanja (+)
- (C) Alikvoti (1 μ L) ukoncentriranih kompleksa I. II te kompleksa III. ($p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:1) + dC_5) prije (-) i nakon (+) ukoncentriravanja
- (D) Alikvoti (1 μ L) pročišćenih proteina i kompleksa IV. ($p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:3)) prije (-) i nakon ukoncentriravanja (+), ukoncentriranog uzorka V. ($p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:6)) i ukoncentriranog uzorka VI. ($p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:6) + dC_5 (1:1,5))

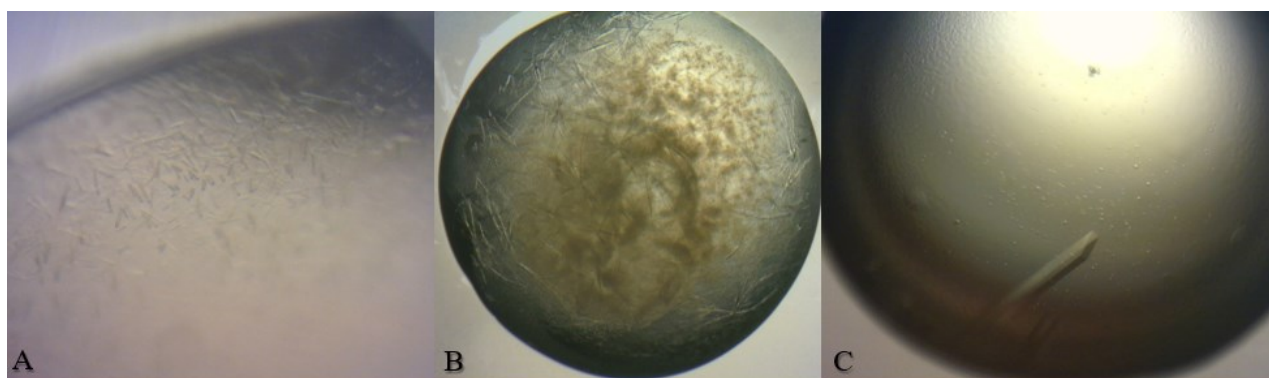
Unutar tjedan dana narasli su inicijalni kristali u uvjetima B3 (kompleks I., $p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:3), 23,85 mg mL⁻¹), E5 (kompleks I., $p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:3), 23,85 mg mL⁻¹), F11 (kompleks IV., $p97_{N_D1,WT} + SPRTN_{26-268,E122A}$ (1:3), 20,04 mg mL⁻¹). Uvjeti su optimizirani, tako da za E5 i B3 su mijenjane koncentracije kompleksa u rasponu 5-20 mg/mL, a za F11 je mijenjan postotak precipitanta PEG 3350 (10-20 %). Također, provedena je metoda mikrosijanja kojom je potaknut rast kristala prenošenjem klica kristala iz uvjeta F11, B3 i E5. Na slici 28. prikazani su početni kristali prije metode mikrosijanja za navedene uvjete.





Slika 28. Kapljice s inicijalnim kristalima naraslima u različitim kristalizacijskim uvjetima
 (A) Kristali nastali iz uzorka I. u uvjetu B3 (*NeXtal DWBlock ProComplex Suite, QIAGEN*)
 (B) Mikrokristali nastali iz uzorka kompleksa I. u uvjetu E5 (*HTS-1, Jena BioScience*)
 (C) Mikrokristali nastali iz uzorka kompleksa IV. u uvjetu F11 (*PACT++ HTS, Jena BioScience*)

Prenošenje klica kristala većinom je potaknulo uspješan rast kristala. Tijekom kristalizacijskih eksperimenata, metoda mikrosijanja je ponovljena više puta. Na slici 29.C prikazan je nastanak kristala nakon višestrukog mikrosijanja, koji je potom iskorišten za snimanje.



Slika 29. Rast kristala nakon višestrukog mikrosijanja iz uvjeta F11 (*PACT++ HTS, Jena BioScience*). Inicijalni kristal (A), nakon prvog mikrosijanja (B) te nakon drugog mikrosijanja (C) kojim je dobiven dovoljno velik i kvalitetan kristal za snimanje

Po nekoliko dobivenih kristala iz spomenutih uvjeta namakano je u kristalizacijskoj otopini s 20 %-tnim glicerolom, upecano u malu najlonsku omču i ohlađeno u dušiku. Kvaliteta difrakcije dobivenih kristala testirana je na sinkrotronu *Elletra Sincrotrone Trieste* (Italija).

§ 4. Rezultati i rasprava

Većina kristala je slabo difraktirala (4–10 Å), stoga se prikupljeni podaci nisu mogli dalje procesirati. Iako su dobiveni kristali zadovoljavajućeg izgleda, loša kvaliteta priređenih kristala s pojedinim neuređenim regijama proteina, slabim pakiranjem molekula u kristalu i velikim volumenom otapala uzrokovala je i lošom difrakcijom. Kako bi se priredio dovoljno stabilan SPRTN:p97 kompleks mogao bi se dizajnirati potpuno novi konstrukt SPRTN-a ili pak pokušati pročistiti protein od interesa iz nekog drugog ekspresijskog sustava umjesto *E. coli*. Također, postoji mogućnost pripreme stabilnog kompleksa pomoću dodatnog proteina adaptera poput kompleksa Ufd1-Npl4.⁶¹ Jedna od mogućnosti pripreme kristala zadovoljavajuće kvalitete je i primjena kemijskog umrežavanja (engl. *cross-linking*) proteina kristala pomoću glutaraldehida ili nekog drugog reagensa za umrežavanje kojom bi se mogla značajno povećati kemijska i mehanička stabilnost kristala. Pokazano je kako umrežavanje kristala povećava otpor mehaničkome stresu, smanjuje topljivost kristala te povećava kvalitetu difrakcije.⁹⁹ Za detaljnu strukturnu karakterizaciju kompleksa SPRTN:p97 koja bi doprinijela dubljem razumijevanju proteolitičkog popravka DPC-ova daljnji eksperimenti su u tijeku.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno je dizajniran i kloniran skraćeni konstrukt proteina *H. sapiens* SPRTN s aminokiselinama 26-268 i mutacijom E122A.
- Uspješno su eksprimirani i pročišćeni proteini SPRTN_{FL,WT}, SPRTN_{FL,E122A} kao i proteinski konstrukti p97_{N_D1}, SPRTN_{1-268,WT}, SPRTN_{1-268,E122A}, SPRTN_{26-268,WT} i SPRTN_{26-268,E122A}. Tijekom pročišćavanja SPRTN-a i njegovih konstrukata primijećena je razgradnja i precipitacija uzorka. Također, priređeni su u manjim prinosima u odnosu na p97_{N_D1}.
- Gel-filtracijskom kromatografijom nije detektiran kompleks SPRTN:p97.
- Metodom povlačenja proteina potvrđena je interakcija SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_D1} *in vitro*. Uklanjanje početnih 25 aminokiselina proteina SPRTN nije dovelo do gubitka interakcije.
- Nativna gel-elektroforeza također je potvrdila nastanak kompleksa SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_D1}. Nejednolika migracija SPRTN-a kroz gel onemogućila je određivanje stehiometrijskog omjera proteina u kompleksu. Nije utvrđen značajan utjecaj prisutnosti ATP-a na nastanak kompleksa proteina SPRTN₁₋₂₆₈ i p97_{N_D1}.
- Potvrđena je enzimska aktivnost pročišćenog SPRTN-a i njegovog skraćenog konstrukta SPRTN₁₋₂₆₈ *in vitro*.
- Dobiveni su kristali kompleksa p97_{N_D1}: SPRTN₁₋₂₆₈, čija se difrakcija do sada pokazala nezadovoljavajućom. Daljnji kristalizacijski eksperimenti za pripremu kvalitetnijih kristala su u tijeku.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. B.Vaz, M. Popovic, K. Ramadan, *Trends Biochem. Sci.* **42** (2017), 483–495.
2. D. Lessel, B. Vaz, S. Halder, P.J. Lockhart, I. Marinovic-Terzic, J Lopez Mosqueda et al., *Nat. Genet.* **46** (2014), 1239–1244.
3. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **461** (2009), 1071–1078.
4. J. Stingele, R. Bellelli, S. J. Boulton, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **18** (2017) 563–573.
5. A. Ruggiano, K. Ramadan, *Commun Biol.* **4** (2021)
6. A. Mosbech, I. Gibbs-Seymour, K. Kagias, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012), 1084–1092.
7. E. J. Davis, C. Lachaud, P. Appleton, T. J. Macartney, I. Näthke, J. Rouse, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012), 1093–1100.
8. A. Carusillo, C. Mussolino, *Cells* **9** (2020), 1665.
9. N. Chatterjee, G. C. Walker, *Environ Mol Mutagen.* **58** (2017), 235–263.
10. R.P Rastogi, Richa, A. Kumar, M.B. Tyagi, R.P. Sinha. *J. Nucleic Acids.* **2010** (2010)
11. J.H Hoeijmakers, *Nature* **411** (2001), 366–374.
12. A. Chakraborty, N. Tapryal, T. Venkova et al., *Nat Commun* **7** (2016)
13. N.L. Klages-Mundt, L. Li, *Sci. China Life Sci.* **60** (2017) 1065–1076.
14. H. Zhang, Y. Xiong, J. Chen, *Cell Biosci* **10** (2020)
15. M. Perry, G. Ghosal, *Front Mol Biosci.* **9** (2022)
16. J.S. Sung, M.S. DeMott, B. Demple, *J Biol Chem* **280** (2005), 39095–39103
17. N. Y. Tretyakova, A. Groehler, S. Ji, *Acc. Chem. Res.* **48** (2015), 1631–1644.
18. T. Nakano, X. Xu, A.M.H Salem, M.I. Shoukamy, H. Ide, *Free Radic Biol Med.* **107** (2017), 136–145.
19. J. Stingele, S. Jentsch, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (2015), 455–460.
20. T. Nakano, S. Morishita, A. Katafuchi et al. *Mol. Cell* **28** (2007), 147–158.
21. K. Takashi, T. Morita, Y. Kawazoe, *Mutat Res.* **156** (1985), 153–161.
22. I.G. Minko, Y. Zou, R.S. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (2002), 1905–1909
23. T. Nakano, A. Katafuchi, M. Matsubara et al. *J. Biol. Chem.* **284** (2009), 27065–27076.
24. D. J Baker, G. Wuenschell, L. Xia, et al., *J. Biol. Chem* **282** (2007), 22592–22604.
25. M.L Orta, J.M. Calderon-Montano, I. Dominguez, N. Pastor et al., *Nucleic Acids Res* **41** (2013), 5827– 5836.
26. M. Neale, J. Pan, S Keeney, *Nature* **436** (2005), 1053–1057.

§ 6. Literaturni izvori

27. R. A. Deshpande, J.-H. Lee, S. Arora, T.T. Paull, *Mol. Cell* **64** (2016), 593–606.
28. T. Aparicio, R. Baer, M. Gottesman, J. Gautier, *J Cell Biol.* **212** (2016), 399–408.
29. M.J. Neale, J. Pan, S. Keeney, *Nature* **436** (2005), 1053–1057.
30. S.W. Yang, Jr. A.B. Burgin, B.N Huizenga, C.A. Robertson, K.C. Yao, H.A. Nash, *Proc Natl Acad Sci.* **93** (1996), 11534–11539.
31. DR. Beidler, YC. Cheng, *Mol Pharmacol.* **47** (1995), 907–14
32. C.P. Lin, Y. Ban, Y.L. Lyu, S.D. Desai, L.F. Liu, *J. Biol. Chem.* **283** (2008), 21074–21083
33. F.C Ledesma, S.F. El Khamisy, M.C. Zuma, K. Osborn, K.W. Caldecot,t *Nature* **461** (2009), 674–678.
34. Y. Pommier, S. N. Huang, R. Gao, B.B. Das, J. Murai, C. Marchand, *DNA Repair* **19** (2014), 114–129.
35. R. Gao, M.J. Schellenberg, S.Y. Huang et al., *J. Biol. Chem.* **289** (2014), 17960–17969.
36. T. Rao, R. Gao, S. Takada et al., *Nucleic Acids Res.* **44** (2016), 10201–10215.
37. M.J. Schellenberg, J.A. Lieberman, A. Herrero-Ruiz, L.R. Butler et al., *Science* **357** (2017), 1412–1416.
38. R.S. Maskey, K.S. Flatten, C.J. Sieben, K.L Peterson, et al., *Nucleic Acids Res*, **45** (2017), 4564–4576.
39. J. Stingele, M.S. Schwarz, N. Bloemeke, P.G. Wolf, S. Jentsch, *Cell* **158** (2014), 327–338.
40. B. Vaz, M. Popovic, J. A. Newman, J. Fielden et al., *Mol. Cell* **64** (2016), 704–719.
41. J. Stingele, R. Bellelli, F. Alte et al., *Mol. Cell* **64** (2016), 688–703
42. F. Li, J.E. Raczynska, Z. Chen, H. Yu., *Cell Rep* **26** (2019), 3336–3346.
43. R. C. Centore, S.A Yazinski, A. Tse, L. Zou, *Mol. Cell* **46** (2012), 625–635.
44. L.K Saha, Y. Murai, S. Saha, U. Jo, M. Tsuda, S. Takeda et al., *Nucleic Acids Res.* **49** (2021), 10493–10506.
45. M. Mórocz, E. Zsigmond, R. Tóth, M. Z. Enyedi, L. Pintér, L. Haracska., *Nucleic Acids Res.* **45** (2017), 3172–3188.
46. J.P. Duxin, J.M. Dewar, H. Yardimci, J.C.Walter, *Cell* **159** (2014), 346–357
47. M. A. Carmell, G.A. Dokshin, H. Skaletsky, Y.C. Hu, J.C. van Wolfswinkel, K. Igarashi et al., *Elife* **5** (2016)
48. N. Borgermann, L. Ackermann, P. Schwertman, I.A. Hendriks, K. Thijssen, J.C. Liu et al., *EMBO J.* **38** (2019)
49. V. Bhargava, C.D. Goldstein, L. Russell, L. Xu, M. Ahmed, W. Li et al., *Dev. Cell* **52** (2020), 38–52.
50. S.D Desai, L.F. Liu, D. Vazquez-Abad, P. D'Arpa, *J. Biol. Chem* **272** (1997), 24159–24164.
51. Y. Mao, S.D. Desai, C.Y. Ting, J. Hwang, L.F. Liu, *J. Biol. Chem* **276** (2001), 40652–40658

§ 6. Literaturni izvori

52. J.L. Quinones, U. Thapar, K. Yu, Q. Fang, R.W. Sobol, B. Demple, *Proc Natl Acad Sci USA* **112** (2015), 8602-8607
53. G. Quievryn, A. Zhitkovich, *Carcinogenesis* **21** (2000), 1573–1580
54. U. Kühbacher, J.P. Duxin, *DNA Repair* **94** (2020)
55. J.P. Erzberger, J. M. Berger, *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **35** (2006), 93–114.
56. Y. Ye , *J. Struct. Biol.*, **156** (2006), 29–40.
57. Y. Ye, W.K. Tang, T. Zhang, D. Xia, *Front. Mol. Biosci.* **4** (2017).
58. P. Hänzelmann, H. Schindelin, *Front. Mol. Biosci.* **4** (2017)
59. H. Meyer, C.C. Wehl, *J. Cell Sci* **127** (2014), 3877–3883.
60. P. Kloppsteck, C.A. Ewens, A. Förster, X. Zhang, P.S. Freemont, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1823** (2012), 125–129.
61. A. Kröning, J. van den Boom, M. Kracht, A. F. Kueck, H. Meyer, *J. Biol. Chem.* **298** (2022)
62. W.K. Tang, D. Xia *Front. Mol. Biosci.* **3** (2016)
63. C. Li, Y. Huang, Y., Q. Fan, et al. *Cell Death Dis.* **12** (2021)
64. J. Van den Boom, H. Meyer, *Moll Cell* **69** (2018), 182–194.
65. H. Gao, F. Li, Z. Ji, et al., *Cell Disoc* **8** (2022)
66. K. Noi, D. Yamamoto, S. Nishikori, K. Arita-Morioka, T. Kato, T. Ando, T. Ogura, *Structure* **21** (2013), 1992-2002.
67. P. Hänzelmann, H. Schindelin, *Structure* **24** (2016), 127–139.
68. E. C. Twomey et al., *Science* **365** (2019), 1–19.
69. S. Banerjee et al., *Science* **351** (2016), , 871–875.
70. J. Fielden, K. Wiseman, I. Torrecilla, et al. *Nat. Commun.* **11** (2020), 1–16
71. https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=structural_genomics_vectors&plasmid=pNIC-Zb (datum pristupa: 23. rujna 2022.)
72. R. R. Burgess, M. P. Deutscher (ur.), *Guide to Protein Purification*, Vol. 463, Academic Press, 2009, str. 239-258.
73. M. Hedhammar, S. Hober, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007), 22-28.
74. [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-24d\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-24d(%2B)) (datum pristupa: 23. rujna 2022.)
75. *BL21-CodonPlus Competent Cells Instruction Manual*, 2015, Agilent Technologies
76. *Rosetta™(DE3) Competent Cell Brochure*, Novagen
77. *Competent Cells: Difficult Cloning, Protein Expression, and General Cloning Comp Cells Brochure*, 2016, Agilent Technologies

78. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5. izd., W. H. Freeman & Company, New York, 2008, str. 1066, 1075–1077
79. L.Y. Chuang, Y. H. Cheng, C. H. Yang, *Biotechnol. Lett.*, **35** (2013), 1541–1549.
80. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EK0031> (datum pristupa: 29. rujna 2022.)
81. *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit User Guide*, Sigma
82. A. Asif, H. Mohsin, R. Tanvir, Y. Rehman, *Front. Microbiol.* **8** (2017), 1–5.
83. pET System manual, 11th ed (2006), Novagen
84. R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer, R. E. Novy, *Methods Mol. Med.* **13** (1998), 257–292.
85. *Purification of His-tag Proteins, User Manual Protino Ni-NTA Agarose*, 2013, Macherey Nagel
86. B.J. Smith SDS, *Methods Mol Biol.* **1** (1984), 41-55.
87. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing, Principles and Methods Handbook*, 2021, Cytiva
88. *Size Exclusion Chromatography (SEC) Principles & Methods Handbook*, 2020, Cytiva
89. *Thermo Scientific Pierce Electrophoresis Technical Handbook Version 2*, 2010, Thermo Scientific
90. P.C. Yang, T. Mahmood, *North Am. J Med. Sci.*, **4** (2012), 429–434.
91. N. E. Chayen, E. Saridakis, *Nat. Methods* **5** (2008), 147–153.
92. I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Vergara, F. Sica, *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (2013), 11643–11691.
93. A. McPherson, J. A. Gavirab, *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* **70** (2014), 2–20.
94. *Sead Beed User Guide*, 2020, Hampton Research
95. *Hanging Drop Vapor Diffusion Crystallization User Guide*, 2021, Hampton Research
96. *Sitting Drop Vapor Diffusion Crystallization User Guide*, 2020, Hampton Research
97. E. A. Stura, I A. Wilson, *Methods*, **1** (1990), 38–49.
98. C. Meyerkord, H. Fu (ur.) *Methods Mol. Biol.*, Vol 1278. Humana Press, New York, 2015, str. 223-232.
99. B. Heras, J.L. Martin, *Acta Crystallogr. D*, **61** (2005), 1173–1180.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tea Bezjak

Datum rođenja: 22. rujna 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Augusta Šenoae, Zagreb

2012.–2015. VII. gimnazija, Zagreb

2016.–2020. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2020.-2023. Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2021-2022. *WorkIn' Science (WISe)*, Prirodoslovno-matematički fakultet