

Interakcija proteina IqgC i Rab5A u amebi *Dictyostelium discoideum*

Ćutić, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:122699>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tamara Čutić

Interakcija proteina IqgC i Rab5A u amebi

Dictyostelium discoideum

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Tamara Čutić

**Interaction between *Dictyostelium*
discoideum proteins IqgC and Rab5A**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu dinamiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Vedrane Filić Mileta i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Ovaj rad je dijelom financiran Hrvatsko-Švicarskim programom 2017-2023, a dijelom ga je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-1572, „Regulacija endocitoze na velikoj skali pomoću IQGAP proteinima srodnih proteina IqgC i IqgD“. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvale

Prije svega, zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Vedrani Filić Mileta na neizmjernej pomoći pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada. Hvala Vam na povjerenju, strpljenju, prenesenom znanju, rješenju za svaki problem te mentorstvu u pravom smislu te riječi.

Puno hvala i Dariji Putar za svu pomoć prilikom rada u laboratoriju i tijekom pisanja ovog rada. Hvala ti na ugodnoj atmosferi i tome što si uvijek imala vremena i strpljenja za moja pitanja. Također, hvala Luciji Mijanović, Anji Privari i Mariji Šimić na priskakanju u pomoć kad god je to bilo potrebno i na prekrasnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima i bratu na strpljenju, ljubavi i podršci tijekom studiranja.

Hvala mom malom krugu velikih ljudi, mojim prijateljima, na razumijevanju, podršci i svim predivnim trenucima.

I na kraju, hvala ti Toni što si moja neizmjerne podrška u svakom trenutku. Hvala ti na ljubavi, pozitivni i strpljenju. Evo, uspjela sam :)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Interakcija proteina IqgC i Rab5A u amebi

Dictyostelium discoideum

Tamara Čutić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Protein IqgC iz amebe *Dictyostelium discoideum* sudjeluje u makropinocitozi, neselektivnom unosu izvanstanične tekućine, kao negativni regulator proteina RasG. Protein RasG je mala GTPaza koju protein IqgC inaktivira poticanjem hidrolize vezanog GTP-a, odnosno IqgC djeluje kao njen GAP (engl. *GTPase activating protein*). Proteini IqgC i RasG su tijekom makropinocitoze smješteni na makropinocitotsku čašicu i novonastali makropinosom, ali IqgC ostaje na makropinosomu i nakon što je RasG disocirao. To sugerira da IqgC na makropinosomu zadržava interakcija s drugim proteinskim i/ili fosfolipidnim partnerom. Iz objavljenog interaktoma IqgC probrani su potencijalni proteini kandidati na temelju njihove uloge u sazrijevanju ranog makropinosoma te su preliminarni pokusi pokazali da se mala GTPaza Rab5A nalazi u kompleksu s IqgC. Cilj ovog rada bio je istražiti je li interakcija proteina IqgC i Rab5A izravna te usporediti prostorno-vremenske raspodjele ova dva proteina tijekom makropinocitoze. Metodom *GST-pull-down* potvrdili smo da se pročišćeni protein IqgC izravno veže na Rab5A. Koristeći konfokalnu mikroskopiju, pokazali smo da IqgC i Rab5A kolokaliziraju na makropinosomima, pri čemu IqgC disocira s vezikule znatno prije nego što Rab5A dosegne maksimalni intenzitet. Za razjašnjavanje fiziološke uloge ove interakcije potrebna su daljnja istraživanja.

(52 stranice, 11 slika, 2 tablice, 145 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: IQGAP, RasGAP, GTPaza, endocitoza, makropinocitoza

Voditelj: dr. sc. Vedrana Filić Mileta, zn. sur., IRB Zagreb

Suvoditelj: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

Ocjenitelji:

dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

dr. sc. Biljana Balen, prof.

dr. sc. Petra Peharec Štefanić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 10.02.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Interaction between *Dictyostelium discoideum* proteins IqgC and Rab5A

Tamara Čutić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dictyostelium discoideum IqgC protein interacts with the small GTPase RasG and promotes its GTP-hydrolytic activity, i.e. acts as its GAP (*GTPase activating protein*). By suppressing Ras activity, it negatively regulates macropinocytosis, the bulk uptake of extracellular fluid. During macropinocytosis, both IqgC and RasG localize to macropinocytic cup and newly formed macropinosome, but IqgC remains on the nascent macropinosome even after RasG dissociates. This suggests that another protein and/or phospholipid interactor engages with IqgC on the macropinosome. Few potential protein candidates have been selected from the published IqgC interactome, based on their known functions during early endosome maturation. Among them was the small GTPase Rab5A that was shown to exist in a complex with IqgC. In this work, we aimed to explore whether this interaction between IqgC and Rab5A is direct and to compare spatio-temporal distributions of these proteins during macropinocytosis. We performed a GST-Rab5A-pull-down assay and confirmed that purified IqgC binds directly to Rab5A. Using confocal microscopy, we demonstrated colocalization of Rab5A and IqgC on macropinosomes with IqgC leaving the vesicle well before Rab5A reached maximal intensity. Deciphering the physiological significance of this interaction requires further investigation.

(52 pages, 11 figures, 2 tables, 145 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: IQGAP, RasGAP, GTPase, endocytosis, macropinocytosis

Supervisor: Dr. Vedrana Filić Mileta, Research Associate IRB Zagreb

Co-supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Dr. Biljana Balen, Prof.

Dr. Petra Peharec Štefanić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 10.02.2022.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Proteini IQGAP.....	1
1.2. Proteini srodni proteinima IQGAP u amebi <i>D. discoideum</i>	3
1.3. Natporodica proteina Ras.....	6
1.3.1. Porodica proteina Rab.....	7
1.3.1.1. Protein Rab5A.....	8
1.4. Makropinocitoza.....	9
1.5. <i>Dictyostelium discoideum</i> kao modelni organizam.....	11
2. Cilj istraživanja.....	13
3. Materijali i metode.....	14
3.1. Materijali.....	14
3.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterija <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.3. Korišteni sojevi <i>E. coli</i>	15
3.1.4. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA.....	15
3.1.5. Početnice.....	16
3.1.6. Plazmidi.....	16
3.1.7. Materijali korišteni za elektroforezu u denaturirajućem gelu i metodu Western blot.....	19
3.1.8. Materijali korišteni za afinitetno pročišćavanje GST-rekombinantnih proteina i metodu <i>GST-pull-down</i>	20
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Manipulacija staničnom kulturom <i>Dictyostelium discoideum</i>	21
3.2.2. Konfokalna mikroskopija.....	22
3.2.3. Manipulacija bakterijskom kulturom <i>E. coli</i>	22
3.2.4. Tehnike rekombinantne DNA.....	23

3.2.5. Metode proteinske biokemije	26
3.2.5.1. Optimizacija ekspresije proteina i afinitetno pročišćavanje GST- Rab5A_ΔCCN	26
3.2.5.2. Testiranje interakcije proteina IqgC i Rab5A_ΔCCN metodom <i>GST-pull-</i> <i>down</i>	27
3.2.5.3. Metoda Western blot	28
4. Rezultati	29
4.1. Proteini IqgC i Rab5A kolokaliziraju u stanicama <i>D. discoideum</i>	29
4.2. Proteini IqgC i Rab5A se izravno vežu	30
4.2.1. Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina Rab5A	30
4.2.2. Optimizacija uvjeta ekspresije i odabir rekombinantnog proteina GST- Rab5A_ΔCCN za afinitetno pročišćavanje	31
4.2.3. Proteini Rab5A_ΔCCN i IqgC stupaju u izravnu interakciju	32
5. Rasprava	35
6. Zaključak	38
7. Literatura	39
8. Životopis	52

Popis kratica

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat, engl. *cyclic adenosine monophosphate*

CDE – endocitoza ovisna o klatrinu, engl. *clathrin-dependent endocytosis*

Domena CH – domena homologna kalponinu, engl. *calponin homology domain*

EGFR – receptor za epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*

ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalima, engl. *extracellular signal-regulated kinase*

GAP – protein aktivator GTPaza, engl. *GTPase activating protein*

GDI – inhibitor disocijacije gvanin-nukleotida, engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*

GDP – gvanozin-difosfat, engl. *guanosine diphosphate*

GEF – faktor izmjene gvanin-nukleotida, engl. *guanine nucleotide exchange factor*

Domena GRD – domena srodna katalitičkoj domeni proteina RasGAP, engl. *GAP-related domain*

GST – glutation-S-transferaza

GTP – gvanozin-trifosfat, engl. *guanosine triphosphate*

GTPaza – gvanozin-trifosfataza, engl. *guanosine triphosphatase*

Innp5b – inozitol polifosfat 5-fosfataza b

IQGAP – proteini srodni proteinima GAP koji sadrže motive IQ, engl. *IQ motif containing GTPase activating proteins*

MEK – mitogenom aktivirana proteinska kinaza kinaza, engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*

mRFP – crveni fluorescentni protein, engl. *monomeric red fluorescent protein*

OCRL – okulo-cerebro-renalni sindrom, engl. *Oculocerebrorenal syndrome of Lowe*

PCR – lančana reakcija polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*

PI – fosfatidilinozitol, engl. *phosphatidylinositol*

PIP₂ – fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat, engl. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PIP₃ – fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat, engl. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*

PI3K – fosfoinozimid-3 kinaza, engl. *phosphoinositide 3-kinase*

PI3P – fosfatidilinozitol 3-fosfat, engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*

PI4P – fosfatidilinozitol 4-fosfat, engl. *phosphatidylinositol 4-phosphate*

REP – engl. *Rab escort protein*

Domena RGct – C-terminalna domena RasGAP, engl. *RasGAP C-terminal domain*

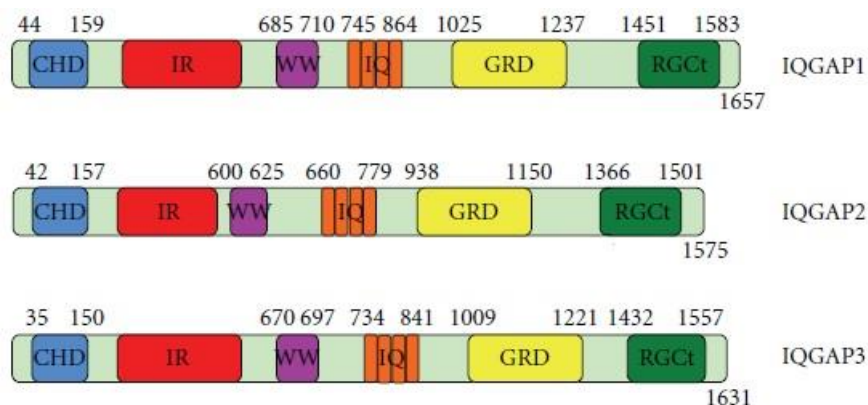
V-ATPaza – adenzin-trifosfataza vakuolarnog tipa, engl. *vacuolar adenosine triphosphatase*

YFP – žuti fluorescentni protein, engl. *yellow fluorescent protein*

1. Uvod

1.1. Proteini IQGAP

Proteini IQGAP čine evolucijski konzerviranu porodicu proteina koji stupaju u interakcije s proteinima citoskeleta i signalnim proteinima te čine kostur tih multimolekularnih kompleksa (Shannon 2012). Na taj način sudjeluju u brojnim staničnim procesima uključujući adheziju, migraciju, signalizaciju, egzocitozu, endocitozu, citokinezu i tumorigenezu (Machesky 1998; Mateer i sur. 2003; Noritake i sur. 2005; White i sur. 2009, 2012). Zajednička karakteristika proteina IQGAP je posjedovanje niza interakcijskih domena neophodnih za stvaranje proteinskih kompleksa. Većina kraljeznjaka eksprimira tri izoforme proteina IQGAP (Hedman i sur., 2015., *Slika 1.*). Oni na N-terminalnom dijelu sadrže domenu CH (engl. *calponin homology domain*), koja veže filamentozni (F-) aktin, i tandemska ponavljanja IR (engl. *IQGAP repeats*) koja omogućuju dimerizaciju proteina IQGAP (Fukata i sur. 1997). Potom slijedi domena WW koja veže ERK 1 i ERK 2 (Roy i sur. 2004, 2005). Nadalje, prema C-terminalnom dijelu nalaze se četiri motiva IQ koji vežu kalmodulin (Hart i sur. 1996). Na C-terminalnom dijelu smještene su domena srodna katalitičkoj domeni proteina RasGAP, nazvana GRD (engl. *GAP-related domain*), i domena RGCT (engl. *RasGAP C-terminal domain*) koja veže β -katenin i E-kadherin (Kuroda i sur. 1998). Naziv proteina IQGAP, izveden iz naziva motiva IQ i domene GRD, ne odražava u potpunosti ulogu proteina IQGAP. Naime, proteini GAP (engl. *GTPase activating protein*) stimuliraju intrinzičnu GTPaznu aktivnost malih GTPaza i time ih inaktiviraju (Bos i sur. 2007). Domena GRD proteina IQGAP ne veže GTPaze porodice Ras, a iako veže male Rho GTPaze Cdc42 i Rac1, prema njima ne pokazuje aktivnost GAP (Brill i sur. 1996; Hart i sur. 1996; Morgan i sur. 2019; Wang i sur. 2007). Štoviše, IQGAP1 i IQGAP2 inhibiraju hidrolizu GTP-a i stabiliziraju aktivno stanje Cdc42 i Rac1 (Brill i sur. 1996; Hart i sur. 1996; McCallum i sur. 1996). Nedostatak aktivnosti GAP proteina IQGAP posljedica je mutacija u regijama esencijalnim za katalitičku aktivnost. Naime, Wang i suradnici (1991.) identificirali su motiv FLR...PA...P (F – fenilalanin, L – leucin, R – arginin, P – prolin, A – alanin, . – bilo koja aminokiselina) koji je karakterističan isključivo za proteine GAP. Kod domene GRD proteina IQGAP taj motiv je mutiran te su aminokiseline fenilalanin i leucin zamijenjene s dva tirozina (Adachi i sur. 1997; Faix i sur. 1998; Kurella i sur. 2009; Weissbach i sur. 1994). Druga ključna mutacija je supstitucija katalitičkog argininskog prsta treoninom što smanjuje aktivnost GAP čak 2000 puta (Kurella i sur. 2009).



Slika 1. Interakcijske domene humanih proteina IQGAP. Brojevi označavaju aminokiseline koje čine granice domena. Preuzeto i prilagođeno prema: Shannon, 2012.

Kod ljudi, kao i kod većine kralježnjaka, postoje tri proteina porodice IQGAP (White i sur. 2009). IQGAP1 je prvi identificiran (Weissbach i sur. 1994). IQGAP2 je identificiran dvije godine kasnije, dok je IQGAP3 izoliran 2007. godine (Brill i sur. 1996; Wang i sur. 2007). Protein IQGAP1 prisutan je u svim tkivima, IQGAP2 je najviše eksprimiran u jetri, dok je ekspresija proteina IQGAP3 karakteristična za mozak i za proliferirajuće stanice (Hedman i sur. 2015; Nojima i sur. 2008). Bez obzira što ove tri izoforme sadrže sve ranije spomenute domene, funkcionalno se razlikuju (**Slika 1.**).

Protein IQGAP1 je najbolje istražen član porodice IQGAP te je od njegovog otkrića identificirano preko 100 proteina interaktora putem kojih sudjeluje u brojnim staničnim ulogama (Smith i sur. 2015). Jedna od njih je organizacija citoskeleta. Naime, IQGAP1 ima sposobnost umrežavanja aktinskih filamenata tako što ih veže pomoću domene CH i potom sam dimerizira pomoću tandemskih ponavljanja. Nadalje, vezanjem malih GTPaza Cdc42 i Rac1 u aktivnom stanju dolazi do oligomerizacije i usnopljavanja aktinskih filamenata (Fukata i sur. 1997; Watanabe i sur. 2015). Uz aktinske filamente, IQGAP1 djeluje i na mikrotubule putem interakcije s proteinom CLIP-170. Interakciju osnažuju aktivne GTPaze Cdc42 i Rac1, a rezultat je polarizacija mikrotubula i stanice (Fukata i sur. 2002). Roy i suradnici su 2005. godine pokazali da IQGAP1 izravno veže komponente signalnog puta MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*). Potvrdili su interakciju s kinazama MEK 1/2 i ERK 1/2 i time definirali IQGAP1 kao okosnicu tog signalnog puta. Dvije godine kasnije potvrđena je interakcija s kinazom B-Raf, a potom i interakcija s receptorom za epidermalni faktor rasta (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*) te je pokazano da je IQGAP1 neophodan za njegovu potpunu aktivaciju potaknutu ligandom EGF (McNulty i sur. 2011; Ren i sur. 2007). IQGAP1 je uključen i u procese proliferacije, migracije, adhezije i invazije stanica te je zbog

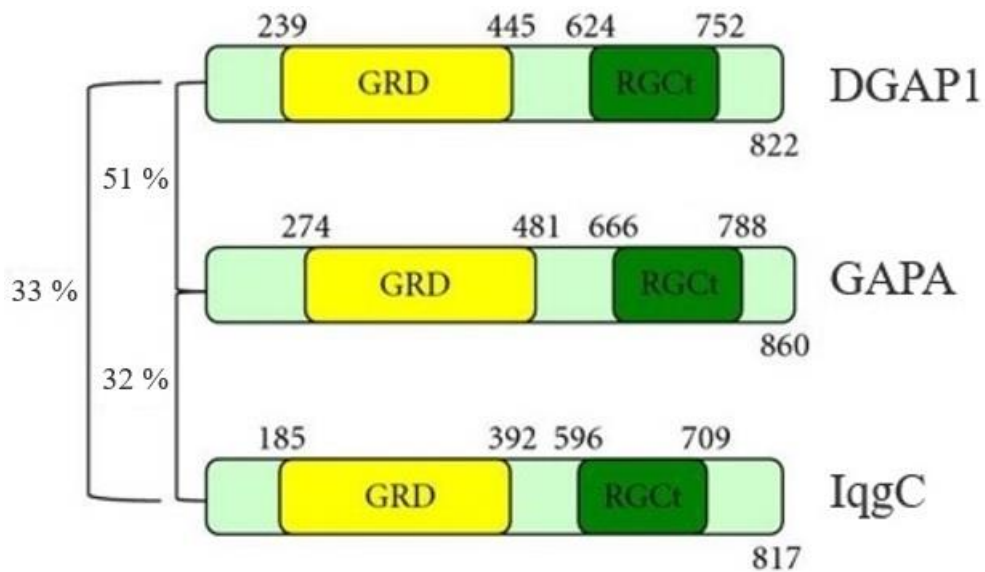
toga istraživani u kontekstu tumorigeneze (Hebert i sur. 2020; Kuroda i sur. 1998; White i sur. 2009).

Protein IQGAP2 identificiran je kao protein koji se specifično eksprimira u jetri (Brill i sur. 1996). Daljnja istraživanja potvrdila su njegovu prisutnost i u prostati, bubrezima, štitnjači, želucu, testisima, trombocitima i žlijezdama slinovnicama (Cupit i sur. 2004; Schmidt i sur. 2003; Wang i sur. 2007). Kao i protein IQGAP1, IQGAP2 veže GTPaze Cdc42 i Rac1 te ih stabilizira u aktivnom stanju. Međutim, dok IQGAP1 pokazuje preferenciju za aktivne varijante, IQGAP2 ima podjednak afinitet za GTPaze vezane za GTP i GDP (Brill i sur. 1996; Hart i sur. 1996). Distribucija proteina IQGAP2 u aktiviranim trombocitima sugerirala je da bi, kao i IQGAP1, mogao imati sličnu ulogu u organizaciji aktinskog citoskeleta (Schmidt i sur. 2003). Rezultati istraživanja identificirali su IQGAP2 kao okosnicu koja kroz interakciju s Cdc42 i Rac1 sudjeluje u stvaranju kompleksa Arp 2/3 i aktina i unutarstaničnoj raspodjeli aktinskog citoskeleta. Uloga proteina IQGAP2 kao tumor supresora dosad je evidentirana kod hepatocelularnog karcinoma, karcinoma želuca, prostate te raka dojke (Jin i sur. 2008; Kumar i sur. 2021; White i sur. 2010; Xie i sur. 2015).

Protein IQGAP3 je najslabije istražena izoforma proteina IQGAP kralježnjaka što ne čudi s obzirom da je posljednji identificiran. Okarakteriziran je kao efektor malih GTPaza Cdc42 i Rac1 te, poput IQGAP1, pokazuje preferenciju za njihove GTP-oblike. Kao i drugi članovi porodice, IQGAP3 putem svoje domene CH izravno veže aktinske filamente te regulira organizaciju citoskeleta neophodnu za razvoj neurona (Wang i sur. 2007). U kontekstu tumorigeneze, protein IQGAP3 djeluje kao onkoprotein (Jinawath i sur. 2020; Kumar i sur. 2017; Yang i sur. 2014).

1.2. Proteini srodni proteinima IQGAP u amebi *D. discoideum*

U amebi *Dictyostelium discoideum* postoje četiri proteina srodna proteinima IQGAP: DGAP1 (DdIQGAP1), GAPA (DdIQGAP2), IqgC (DdIQGAP3) i IqgD (DdIQGAP4). Dosad su okarakterizirani DGAP1, GAPA i IqgC (Adachi i sur. 1997; Faix i Dittrich 1996; Marinović i sur. 2019). Za razliku od proteina IQGAP kralježnjaka, ovi proteini sadrže samo domene GRD i RGCT te slabo konzervirane motive IQ za koje nije poznato jesu li funkcionalni (Rivero i Xiong, 2016., *Slika 2.*). Izuzetak je IqgD koji na N-terminalnom dijelu sadrži i dvije domene CH (Friedberg i Rivero 2010).



Slika 2. Domene proteina DGAP1, GAPA i IqgC amebe *D. discoideum*. Brojevi označavaju aminokiseline koje čine granice domena, a postotci označavaju identičnost između pojedinih proteina. Preuzeto i prilagođeno prema: Shannon, 2012.

Čim je DGAP1 identificiran te su fenotipski opisane stanice genetički deficijentne za DGAP1 kao i stanice koje ga prekomjerno ekspimiraju, bilo je jasno da DGAP1 regulira procese ovisne o aktinskom citoskeletu. Naime, stanice koje nisu ekspimirale DGAP1 pokazivale su brži rast, ali i razvoj atipičnih višestaničnih struktura i rasplodnih tijela. Stanice s povećanom ekspresijom ovog proteina imale su defekt citokineze koji je rezultirao nastankom stanica s više jezgara (Faix i Dittrich 1996). Daljnja fenotipizacija je pokazala da nedostatak DGAP1 uzrokuje nastanak brojnih filopodija, velikih vodećih rubova i nabora membrane, dok višak proteina rezultira smanjenim stvaranjem ovih struktura. U skladu s tim je zabilježena obrnuta korelacija ekspresije DGAP1 i pokretljivosti stanica (Faix i sur. 1998). Biokemijski pristupi pokazali su da DGAP1 regulira aktinski citoskelet putem interakcije s GTPazom Rac1A (Faix i sur. 1998, 2001). Aktivna GTPaza Rac1 dovodi DGAP1 u kompleks s korteksilinima I i II te je pokazano da taj tetramerni kompleks ima ključnu ulogu u stvaranju funkcionalne diobene brazde tijekom citokineze (Faix i sur. 2001). Korteksilini su aktin-vezujući proteini koji umrežuju i organiziraju aktinske filamente (Faix i sur. 1996). U nedostatku proteina DGAP1, stanice ne pokazuju citokinetski defekt zbog toga što DGAP1 u spomenutom tetramernom kompleksu može biti zamijenjen proteinom GAPA (Dumontier i sur. 2000; Faix i sur. 2001). Nadalje, tijekom istraživanja uloge citoskeleta u kemotaksiji, uočeno je da stanice deficijentne za DGAP1 stvaraju više lateralnih pseudopodija te je potvrđeno da kompleks Rac1, DGAP1 i korteksilina ima važnu ulogu u regulaciji usmjerenog staničnog gibanja kroz ograničavanje njihovog nastanka (Lee i sur. 2010). Također, DGAP1 i korteksilini

smješteni su u stražnje i bočne dijelove korteksa polariziranih stanica *D. discoideum* gdje privremeno uklanjaju Rac1 i time smanjuju populaciju Rac1 raspoloživog u prednjim dijelovima korteksa za stvaranje pseudopodija (Filić i sur. 2012, 2014). Osim interakcije s GTPazom Rac1A, potvrđene su i interakcije s Rac1B, Rac1C, RacE i s humanom GTPazom Rac1, pri čemu DGAP1 pokazuje preferencijalno vezanje GTP-oblika GTPaza Rac1 (Dumontier i sur. 2000; Faix i sur. 1998). Kao i ostali članovi porodice IQGAP, DGAP1 ima mutiran katalitički argininski prst i motiv FLR te sukladno tome ne pokazuje aktivnost GAP (Faix i sur. 1998).

Protein GAPA je 51 % identičan u slijedu aminokiselina s proteinom DGAP1 i također ima supstituirane aminokiseline ključne za aktivnost RasGAP (Adachi i sur. 1997; Faix i sur. 1998). Identificiran je kao gen deletiran u mutiranim stanicama *D. discoideum* koje su u kulturi rasle kao iznimno velike i multinukleirane, što je pokazalo da je GAPA, kao i DGAP1, uključen u regulaciju citokineze. Specifično, GAPA je ključan za finalne stadije diobe u kojima dolazi do cijepanja središnjeg tijela i odvajanja dviju stanica kćeri. Stanice deficijentne za protein GAPA stvarale su rasplodna tijela s vijabilnim sporama poput stanica divljeg tipa što je indiciralo da GAPA nije uključen u razvoj *D. discoideum* (Adachi i sur. 1997). Kao i DGAP1, GAPA ulazi u kompleks s Rac1A i korteksilinima te tako regulira citokinezu (Faix i sur. 2001; Mondal i sur. 2010). Prilikom citokineze protein GAPA je potreban za ispravno usmjeravanje korteksilina u diobenu brazdu s obzirom da u stanicama deficijentnim za DGAP1 i GAPA, korteksilini nisu smješteni u diobenu brazdu. Uz to, GAPA je u regulaciju citokineze uključen putem interakcije s filaminom koju ostvaruje pomoću domene GRD. Osim s filaminom i GTPazom Rac1A, GAPA stupa u interakciju i s drugim GTPazama Rac iz *D. discoideum* kao i s humanom GTPazom Rac1 (Mondal i sur. 2010). Što se tiče uloge u kemotaksiji, kao i kod stanica deficijentnih za DGAP1, stanice koje ne ekspimiraju protein GAPA imaju smanjenu usmjerenost uslijed prekomjernog stvaranja lateralnih pseudopodija (Lee i sur. 2010). U prilog ulogama proteina DGAP1 i GAPA u regulaciji aktinskog citoskeleta ide i promijenjeni sadržaj F-aktina u mutantima i ekspresorima, iako su promjene u suprotnim smjerovima. Tako je u *gapA*⁻ stanicama razina F-aktina snižena u odnosu na stanice divljeg tipa, dok je u slučaju prekomjerne ekspresije razina F-aktina povišena (Mondal i sur. 2010). Kod stanica *dgap1*⁻ učinak je suprotan te one imaju povišenu razinu F-aktina u odnosu na stanice divljeg tipa, dok je razina F-aktina snižena prilikom prekomjerne ekspresije DGAP1 (Faix i sur. 1998). Kee i suradnici su 2012. godine pokazali da prilikom mehaničkog stresa dolazi do inicijacije stvaranja diobene brazde u čemu sudjeluju i proteini DGAP1 i GAPA. Pri tome, GAPA ima ulogu u

odgovoru na mehanosenzorne signale uslijed kojih omogućuje dovođenje kinezina-6 i unutarnjeg centromernog proteina (INCENP) na mjesto nastanka diobene brazde. Suprotno tome, protein DGAP1 pokazuje odgovor na biokemijske signale i djeluje inhibitorno na ispravno smještanje miozina II pri čemu tu inhibiciju suprimira GAPA.

Karakterizacija proteina IqgC pokazala je da se IqgC značajno razlikuje od DGAP1 i GAPA i proteina IQGAP općenito. Naime, IqgC ne stupa u interakcije s GTPazama Rac, ali stupa s aktivnim oblikom GTPaze RasG (Marinović i sur. 2019). Nadalje, IqgC pokazuje aktivnost RasGAP prema RasG što je u skladu s očuvanim motivom argininskog prsta te djelomično očuvanim motivom FLR (LLR kod IqgC). U stanicama *D. discoideum* IqgC je smješten na dijelove membrane iz kojih se oblikuju makropinosomi te ostaje na makropinosomu tijekom njegova formiranja, zatvaranja i još neko vrijeme nakon unosa vezikule. IqgC pokazuje isti smještaj i prilikom fagocitoze velikih čestica s time da je na fagosomu prisutan slabijim intenzitetom. Funkcionalni testovi sa stanicama deficitarnim za IqgC i sa stanicama koje prekomjerno ekspimiraju IqgC pokazali su da je IqgC negativni regulator makropinocitoze i fagocitoze (Marinović i sur. 2019), što je u skladu s njegovom ulogom u inaktivaciji GTPaze RasG, koja je uz RasS, glavni pozitivni regulator makropinocitoze u stanicama *D. discoideum* (Williams i sur. 2019). IqgC kolokalizira s aktivnom GTPazom Ras na makropinosomu, ali Ras disocira s unesene vezikule prije IqgC. Tijekom kemotaksije, *iqgC*⁻ stanice ponašaju se slično stanicama divljeg tipa s obzirom na brzinu kretanja, usmjerenost i polimerizaciju aktina (Lee i sur. 2010).

1.3. Natporodica proteina Ras

Članovi natporodice proteina Ras su prema strukturi i ulozi podijeljeni u 5 porodica: Ras, Rho, Arf/Sar, Ran i Rab. Kod ljudi je identificirano 167 proteina, pri čemu porodica Rab sadrži najviše članova (65), a zatim slijede porodice Ras s 39, Arf s 30, Rho s 22 i Ran s 1 članom (Rojas i sur. 2012). Ove male monomerne GTPaze, karakterizirane prisutnošću G domene, djeluju kao molekularni prekidači koji kruže između aktivnog stanja, vezanog za GTP, i neaktivnog stanja, vezanog za GDP, i ovisno o tome reguliraju razne procese putem svojih efektor (Vetter i Wittinghofer 2001). G domena ima ulogu vezanja GTP-a i GDP-a, a sastoji se od 5 konzerviranih G motiva, veličine je oko 20 kDa i ima konzerviranu strukturu i biokemiju koju dijele svi članovi natporodice Ras (Wennerberg i sur. 2005). Male GTPaze natporodice Ras imaju visok afinitet vezanja GTP-a i GDP-a te, u pravilu, slabe intrinzične aktivnosti njihove izmjene te hidrolize GTP-a (Wennerberg i sur. 2005). Stoga za konverziju između GTP-

i GDP-stanja zahtijevaju aktivnost regulatornih proteina GAP i GEF (engl. *guanine nucleotide exchange factor*). Kao što je ranije spomenuto, proteini GAP inaktiviraju GTPaze tako što stimuliraju hidrolizu GTP-a. Suprotno, proteini GEF aktiviraju GTPaze tako što potiču izmjenu GDP-a za GTP (Vetter i Wittinghofer 2001). Uz to, proteini porodica Rho i Rab regulirani su i trećom klasom proteina, GDI (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*). Proteini GDI vežu neaktivne GTPaze Rho i Rab, inhibiraju otpuštanje GDP-a i tako održavaju stabilnu populaciju neaktivnih GTPaza u citosolu (Garcia-Mata i sur. 2011; Seabra i Wasmeier 2004). Većini članova natporodice proteina Ras zajednička je i posttranslacijska modifikacija lipidima. Naime, članovi porodica Ras, Rho i Rab na C-terminalnom dijelu imaju karakteristične motive koje prepoznaju različite transferaze koje potom kataliziraju dodatak izoprenoida¹ na cisteinski ostatak tih motiva (Cox i Der 2002; Goody i sur. 2014; Wennerberg i sur. 2005). Neki članovi porodice Arf su modificirani na N-terminalnom dijelu miristinском kiselinom. Ove modifikacije su ključne za interakciju članova natporodice Ras s ciljnim membranama (Wennerberg i sur. 2005).

Proteini porodice Ras (*Rat sarcoma*) reguliraju gensku ekspresiju, proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje stanica (Cox i Der 2010). Proteini porodice Rho (*Ras homology*) također djeluju kao regulatori signalnih puteva te sudjeluju u regulaciji organizacije aktina, endocitozi, pokretljivosti i polarnosti stanica (Hall 2012). Od 22 člana, najbolje su istraženi RhoA, Rac1 i Cdc42 (Ridley 2015). Proteini porodice Arf (*ADP ribosylation factor*) kontroliraju membranski transport, metabolizam lipida, pokretljivost i diobu stanica, apoptozu i regulaciju transkripcije (Sztul i sur. 2019). Protein Ran (*Ras-like nuclear*) sudjeluje u dvije različite stanične funkcije, a to su transport molekula između jezgre i citoplazme i regulacija progresije staničnog ciklusa organiziranjem diobenog vretena (Boudhraa i sur. 2020). Što se tiče proteina Rab (*Ras-like protein in brain*), uključeni su u regulaciju gotovo svih aspekata membranskog transporta poput nastanka, transporta, sidrenja i fuzije i fisije vezikula (Homma i sur. 2021).

1.3.1. Porodica proteina Rab

Porodica proteina Rab u ljudi broji preko 60 članova, a u amebi *D. discoideum* i preko 70 članova (Forbes i sur. 2021; Homma i sur. 2021). Proteini Rab nalaze se na različitim membranskim odjeljcima i reguliraju specifičnost i usmjerenost membranskog transporta (Zhen

¹ Izoprenoidi su skupina organskih spojeva koji nastaju kondenzacijom izoprenskih jedinica od 5 C atoma.

i Stenmark 2015). Za potpunu aktivnost, proteini Rab moraju u obliku vezanom za GTP biti umetnuti u ciljnu membranu. Prvi korak prema asocijaciji s membranama je prenilacija proteina Rab na C-terminalnom dijelu u čemu važnu ulogu ima protein REP (engl. *Rab escort protein*). Naime, proteini Rab imaju nekoliko različitih C-terminalnih motiva (CC, C.C, CC..., C...; C – cistein, . – bilo koja aminokiselina) i protein REP omogućava njihovo prepoznavanje od strane geranilgeranil-transferaze (Andres i sur. 1993; Goody i sur. 2014). Ovisno o motivu, geranilgeranil-transferaza dodaje jednu ili dvije geranilgeranil skupine, izoprenoid od 20 C atoma, na cisteinske ostatke i tako modificirani proteini Rab u kompleksu s proteinom REP dolaze do ciljnih membrana (Seabra i Wasmeier 2004). Tamo, proteini GEF vrše izmjenu GDP-a za GTP što uzrokuje disocijaciju kompleksa proteina Rab i REP i omogućuje inserciju proteina Rab u membrane (Wu i sur. 2010). Po inaktivaciji, proteini GDI izvlače proteine Rab iz membrana, održavaju ih u neaktivnom obliku u citosolu i potom transportiraju do membrana gdje kompleks ponovno disocira djelovanjem proteina GEF i proteini Rab su spremni za novi ciklus aktivnosti (Seabra i Wasmeier 2004; Wu i sur. 2010). U regulaciju proteina Rab uključeni su i proteini GAP, ali u manjoj mjeri nego proteini GEF, s obzirom da proteini Rab imaju relativno visoku intrinzičnu aktivnost hidrolize GTP-a (Barr i Lambright 2010). Proteini Rab reguliraju promet vezikula putem različitih efektora koji uključuju kinaze, fosfataze, molekularne motore i faktore privezivanja (Gillingham i sur. 2014). Tijekom nastanka klatrinskih vezikula, proteini Rab uključeni su u sastavljanje omotača vezikula, selekciju tereta i pupanje vezikula (Carroll i sur. 2001; McLauchlan i sur. 1998). Također su uključeni i u uklanjanje omotača vezikula. Primjerice, protein Rab5 zajedno sa svojim proteinom GEF koordinira uklanjanje klatrinskog omotača s vezikule poticanjem defosforilacije proteina AP2 (Semerdjieva i sur. 2008). Putem interakcija s molekularnim motorima (miozini, kinezini, dineini), koje mogu biti direktne ili indirektno putem efektora, proteini Rab reguliraju promet vezikula duž mikrotubula i aktinskih filamenata (Horgan i McCaffrey 2011; Wu i sur. 2002). U krajnjim fazama vezikularnog transporta, proteini Rab uključeni su u inicijalni kontakt membrane vezikule i ciljne membrane, kao i u fuziju dviju membrana (Cao 1998; Simonsen i sur. 1998).

1.3.1.1. Protein Rab5A

U stanicama sisavaca postoje tri izoforme proteina Rab5: Rab5a, Rab5b i Rab5c (Gurkan i sur. 2005). Iako je za sve tri izoforme poznato da su uključene u regulaciju endocitoze, Rab5a je najviše istraživana izoforma s dobro definiranim ulogama i brojnim identificiranim efektorima (Bucci i sur. 1995; Homma i sur. 2021; Yuan i Song 2020).

Interakcija proteina Rab5a s VPS34, fosfoinozimid 3-kinazom (PI3K) klase III, ključna je za regulaciju ranih faza endocitoze (Li i sur. 1995). Naime, Rab5a interakcijom s kinazom VPS34 usmjerava stvaranje fosfatidilinozitol 3-fosfata (PI3P) na određenom dijelu membrane endosoma kako bi se mogli vezati drugi efektori Rab5a (Christoforidis i sur. 1999). Jedan od njih je EEA1 (engl. *early-endosome antigen 1*), odgovoran za privezivanje i fuziju ranih endosoma (Simonsen i sur. 1998). Na isti način na endosome dolazi još jedan efektor proteina Rab5a, Rabenozin-5, također uključen u fuziju endosoma i fuziju klatrinskih vezikula s endosomima (Nielsen i sur. 2000). U ove procese uključen je i Rab5a efektor Rabaptin-5 koji se nalazi u kompleksu s proteinom Rabex-5 koji je GEF za protein Rab5a (Horiuchi i sur. 1997; Stenmark i sur. 1995). Rabaptin-5 potiče aktivnost GEF proteina Rabex-5 i na taj način Rab5 pozitivnom povratnom spregom promovira daljnje dovođenje Rab5 na membranu endosoma (Lippé i sur. 2001). Protein Rab5a sudjeluje i u unošenju u stanicu i transportu raznih receptora čime je indirektno uključen u regulaciju proliferacije, preživljenja i diferencijacije stanica. Jedan od tih receptora je EGFR, za čije je unošenje nakon vezanja liganda i aktivacije neophodan protein Rab5a (Barbieri i sur. 2000).

Protein Rab5A u amebi *D. discoideum* za sada nije istraživan. Poznato je jedino da se Rab5A smješta na određen tip fagocitotskih vezikula. Naime, tijekom infekcije bakterijom *Legionella pneumophila* nastaje specifičan membranski odjeljak, LCV (engl. *Legionella-containing vacuole*), vezikula s unešenom bakterijom koja joj omogućuje neometanu replikaciju. Analiza proteoma takvih vezikula izoliranih iz *D. discoideum* te lokalizacijske studije uz upotrebu fluorescentno obilježenog Rab5A pokazale su da se protein Rab5A smješta na njih (Hoffmann i sur. 2014). Također, tijekom ranijih stadija infekcije patogenom *Mycobacterium marinum*, protein Rab5A smješten je na fagosom u kojem se nalazi bakterija (Barisch i sur. 2015).

1.4. Makropinocitoza

Različiti procesi unosa tekućine, otopljenih tvari, makromolekula, čestica i komponenti plazmatske membrane obuhvaćeni su pojmom endocitoza, a događaju se invaginacijom plazmatske membrane i stvaranjem vezikula putem fuzija i fisija membranskih odjeljaka (Huotari i Helenius 2011). Putevi unosa u stanicu se tradicionalno dijele na endocitozu ovisnu o klatrinu (CDE, engl. *clathrin-dependent endocytosis*) i endocitotske puteve neovisne o klatrinu (CIE, engl. *clathrin-independent endocytic pathways*), dok se novija podjela temelji na ovisnosti odcjepljivanja vezikule s plazmatske membrane o dinaminu (Thottacherry i sur.

2019). Jedan od puteva neovisnih o klatrinu i dinaminu je makropinocitoza, proces neselektivnog unosa tekućine i otopljenih tvari u stanicu u obliku velikih endocitotskih vezikula, makropinosoma (Stow i sur. 2020). Makropinosomi su primarne endocitotske vezikule promjera 0,2 – 10 μm koje mogu nastati spontano ili kao odgovor na stimulaciju faktorima rasta (Kay 2021; Stow i sur. 2020; Swanson 2008). Kod većine stanica kralježnjaka makropinocitozu je moguće inducirati faktorima rasta, dok specijalizirane stanice, poput makrofaga i dendritičkih stanica, provode konstitutivnu makropinocitozu (Redka i sur. 2018; Sallusto i sur. 1995; Stow i sur. 2020). Kod amebe *D. discoideum* makropinocitoza je također konstitutivan proces s obzirom da je ovom protistu makropinocitoza način unosa hranjivih tvari iz okoline (Kay i sur. 2019; King i Kay 2019). Sudbina makropinosoma ovisi o tipu stanice. Tako će kod nekih stanica, primjerice A431, sadržaj makropinosoma biti gotovo u potpunosti recikliran na površinu stanice (Hewlett i sur. 1994), dok kod stanica koje prezentiraju antigene, sadržaj makropinosoma podliježe degradaciji u lizosomima kako bi se strani antigeni mogli prezentirati stanicama imunskog sustava putem molekula glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) klase I i II (Norbury i sur. 1995; Sallusto i sur. 1995). *D. discoideum* također ima degradativne makropinosome kako bi mogao ekstrahirati nutrijente važne za rast.

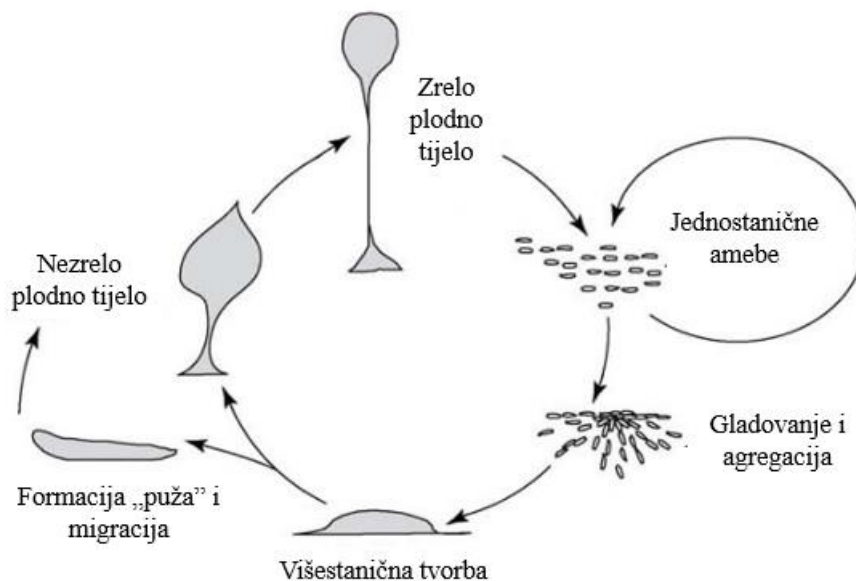
Nastanak makropinocitotske čašice zahtijeva opsežnu deformaciju stanične membrane koja započinje usmjerenom polimerizacijom aktina potaknutom kompleksom Arp2/3, nukleatorom aktinskih filamenata. GTPaza Rac1 stimulira polimerizaciju aktina aktivacijom fosfatidilinozitol-4-fosfat 5-kinaze (PIP5K) i proteina WAVE/Scar1 koji potom aktiviraju kompleks Arp2/3 (Kerr i Teasdale 2009; Miki i sur. 1998; Toliaš i sur. 2000). Osim kompleksa Arp2/3 koji uzrokuje stvaranje dendritičke mreže aktina i na taj način uzrokuje izbočenje membrane u distalnim rubovima makropinocitotske čašice, za njeno oblikovanje je bitna i aktinska polimeraza formin G, odgovorna za polimerizaciju linearnih filamenata u bazi čašice (Buckley i King 2017; Junemann i sur. 2016). Aktivnost formina G regulira GTPaza RasG, koja je ključna i za aktivaciju fosfoinozitol-3 kinaza klase I (Hoeller i sur. 2013; Junemann i sur. 2016). Naime, dijelovi membrane iz kojih se oblikuju makropinosomi obogaćeni su fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfatom (PIP₃) koji sintetiziraju PI3K1 i 2 (Hoeller i sur. 2013; Veltman i sur. 2016). Kako bi iz makropinocitotske čašice nastao makropinosom, mora doći do fuzije distalnih rubova čašice i njenog zatvaranja (engl. *cup closure*), nakon čega se zatvorena vezikula otkida od membrane. Za ovu posljednju fazu stvaranja makropinosoma ključna je PI3K4 koju regulira GTPaza RasS (Hoeller i sur. 2013). Također mora doći do inaktivacije

GTPaza Rac1 (Fujii i sur. 2013; Yoshida i sur. 2009) i Ras (Williams i sur. 2019) i defosforilacije fosfoinozitida PIP₃ i PIP₂ do PI3P i PI (Maekawa i sur. 2014). Nakon ulaska u citoplazmu, dolazi do opsežnog remodeliranja makropinosoma koje rezultira smanjenjem vezikule zbog gubitka tekućine te dolaskom proteina s domenom BAR (engl. *Bin/amphiphysin/Rvs*), poput proteina iz porodice SNX (sortirajući neksini, engl. *sorting nexins*), koji dovode do deformacije membrane makropinosoma u cjevaste strukture (Kerr i sur. 2006). S obzirom na to da se tijekom makropinocitoze u stanicu nespecifično unese velika količina membranskih komponenti, u ranoj fazi sazrijevanja potrebno je brzo recikliranje tih komponenti kako bi stanica mogla normalno funkcionirati (Steinman i sur. 1976). Pokazano je da su u stanicama *D. discoideum* i makrofagima sisavaca za sortiranje i recikliranje komponenata stanične membrane odgovorni kompleks WASH (engl. *WASP and SCAR homolog*) i retromerni kompleks (Buckley i sur. 2016). Paralelno s ranim recikliranjem započinje sazrijevanje makropinosoma koji prolazi kroz fuzije s drugim vezikulama endocitotskog sustava i na taj način stječe komponente važne za zakiseljavanje i razgradnju unesenih hranjivih sastojaka duž endosomalno-lizosomalnog puta. Ovaj promet vezikula koordiniraju GTPaze iz porodice Rab, a prva koja se pojavljuje tijekom ranog sazrijevanja makropinocitotske vezikule je Rab5 koja aktiviranjem kinaze VPS34 omogućuje dovođenje daljnjih efektora Rab5 (vidi poglavlje 1.3.1.1.) i nastavak sazrijevanja ranog endosoma.

1.5. *Dictyostelium discoideum* kao modelni organizam

Dictyostelium discoideum je „društvena“ ameba koja spada u supergrupu *Ameobozoa*, razred *Dictyostelia* (Schaap 2011). Tradicionalno, „društvene“ amebe su prema morfologiji rasplodnog tijela klasificirane u tri roda: *Dictyostelium*, *Polysphondylium* i *Acytostelium*. Nove klasifikacije temelje se na filogenetskoj analizi sekvenci RNA male podjedinice ribosoma i dijele razred *Dictyostelia* na dva reda (*Dictyosteliales* i *Acytosteliales*), četiri porodice (*Dictyosteliaceae*, *Raperosteliaceae*, *Acytosteliaceae* i *Cavenderiaceae*) i 12 rodova (Sheikh i sur. 2018). Ameba *D. discoideum* u prirodi živi u tlu kao jednostanični organizam, dijeli se mitozom i hrani fagocitozom bakterija. U nedostatku hrane, stanice luče cAMP koji uzrokuje kemotaksiju i agregaciju i do 10⁵ pojedinačnih stanica (Dormann i sur. 2000). Nastaje višestanična tvorba koja se oblikuje u „puža“ koji se kreće prema svjetlosti i toplini. Iz „puža“ će potom nastati zrelo plodno tijelo koje se sastoji od stalka i sorsa koji sadrži brojne spore. Iz zrelih spora će se u povoljnim uvjetima razviti pojedinačne vegetativne stanice (*Slika 3.*). Razvojni ciklus je kratak i traje oko 24 h (Schaap, 2011.). Genom amebe *D. discoideum* velik je oko 34 Mb, bogat parovima baza AT (77,57 %), raspoređen na šest kromosoma i kodira

preko 12 000 gena (<http://dictybase.org>, Eichinger i sur., 2005.). Osim sekvenciranog genoma i kratkog razvojnog ciklusa, jednostavnost uzgoja, dostupni molekularno-genetički alati i haploidnost stanica čine *D. discoideum* dobrim modelnim organizmom (Schaap 2011; Williams i sur. 2006). U laboratorijskom radu uglavnom se koriste aksenični sojevi *D. discoideum* koji mogu rasti u tekućem hranjivom mediju u odsutnosti bakterija. Takvi sojevi imaju povećan unos tekućine makropinocitozom, a za taj fenotip su velikim dijelom odgovorne mutacije gena *axeB* koji kodira protein neurofibromin (Bloomfield i sur. 2015). Ovisno o uvjetima uzgoja, takvi sojevi imaju generacijsko vrijeme između 8 i 12 sati, dok stanice uzgajane u prisutnosti bakterija imaju generacijsko vrijeme 3 do 4 sata (<http://dictybase.org>). Kao modelni organizam *D. discoideum* se koristi za istraživanje procesa kemotaksije, citokineze, pokretljivosti stanica, endocitoze, vezikularnog transporta i signalizacije (Schaap 2011). Brojna saznanja o ulozi malih GTPaza u procesima migracije stanica i makropinocitoze proizlaze iz istraživanja provedenih na amebi *D. discoideum* (Filić i sur. 2021; Rivero i Xiong 2016; Williams i sur. 2019). Također, s obzirom da genom ove amebe sadrži gene homologne genima koji uzrokuju razne bolesti kod ljudi, koristi se i kao model u biomedicinskim i farmakološkim istraživanjima (Eichinger i sur. 2005; Schaf i sur. 2019; Williams i sur. 2006).



Slika 3. Životni ciklus amebe *Dictyostelium discoideum*. Preuzeto i prilagođeno prema: Williams i sur., 2006.

2. Cilj istraživanja

Protein IqgC iz amebe *D. discoideum* je RasGAP koji specifično inaktivira malu GTPazu RasG potičući njenu vlastitu aktivnost hidrolize GTP-a. S obzirom da je RasG u aktivnom obliku ključan za stvaranje makropinosoma, inhibiranjem aktivnosti RasG, IqgC negativno regulira proces makropinocitoze. Proteini IqgC i RasG kolokaliziraju na membrani tijekom stvaranja makropinosoma. Međutim, IqgC ostaje na zatvorenom makropinosomu i nakon što je RasG disocirao što upućuje na postojanje drugih proteinskih i/ili fosfolipidnih interaktora koji ga zadržavaju na membrani makropinosoma. S ciljem otkrivanja novih proteinskih interaktora, pristupilo se analizi interaktoma proteina IqgC dobivenog masenom spektrometrijom. Između potencijalnih kandidata, identificiran je protein Rab5A, mala GTPaza prisutna na ranom endosomu, ključna za regulaciju endocitoze (Yuan i Song 2020). Preliminarni rezultati dobiveni metodom ko-imunoprecipitacije pomoću protutijela anti-IqgC pokazali su da se GTPaza Rab5A nalazi u kompleksu s proteinom IqgC. Za razjašnjenje uloge proteina IqgC primarno je odrediti stupaju li ova dva proteina u izravnu interakciju. Stoga su ciljevi ovog rada:

1. Usporediti prostorno-vremenske raspodjele proteina IqgC i Rab5A u živim stanicama *D. discoideum* upotrebom konfokalne mikroskopije;
2. Testirati stupaju li proteini IqgC i Rab5A u izravnu interakciju metodom *GST-pull-down*.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica *Dictyostelium discoideum*

Mediji, puferi i antibiotici:

HL5 medij za uzgoj stanica:

22 g/l HL5 medij bez glukoze, obogaćen vitaminima i mikroelementima (Formedium)

18 g/l maltoza (Sigma-Aldrich)

Antibiotici:

50 µg/ml ampicilin (Sigma-Aldrich)

40 µg/ml streptomycin (Fluka)

10-20 µg/ml geneticin (G418, Gibco)

Otopine za transfekciju stanica:

Pufer za elektroporaciju:

10 mM K-fosfatni pufer, pH = 6,1

50 mM glukoza (Roth)

Sørensen fosfatni pufer, pH 6,0:

0,3555 g/l Na₂HPO₄ (Kemika)

1,99 g/l KH₂PO₄ (Kemika)

Otopina za oporavak stanica nakon elektroporacije:

100 mM CaCl₂ (Kemika)

100 mM MgCl₂ (Kemika)

3.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterija *Escherichia coli*

Mediji, podloge i antibiotici:

Medij Luria-Bertani (LB):

5 g/l ekstrakt kvasca (Biolife)

10 g/l tripton (Biolife)

5 g/l NaCl (Kemika)

Obogaćeni medij Luria-Bertani (LB):

8 g/l ekstrakt kvasca (Biolife)

16 g/l tripton (Biolife)

5 g/l NaCl (Kemika)

5 mM K-fosfatni pufer, pH 7,3

Kruta podloga LB: u medij LB dodaje se 15 g/l agara (Roth)

SOC medij:

0,5 % ekstrakt kvasca (Biolife)
2 % tripton (Biolife)
10 mM NaCl (Kemika)
10 mM MgCl₂ x 6H₂O (Kemika)
2,5 mM KCl (Kemika)
20 mM MgSO₄ x 7H₂O (Kemika)
20 mM glukoza (Roth)

Antibiotici:

100 µg/ml ampicilin (Sigma-Aldrich)
35 µg/ml kloramfenikol (Sigma-Aldrich)

3.1.3. Korišteni sojevi *E. coli*

NEB 10-beta (New England Biolabs - NEB) – soj visoke transformacijske efikasnosti pogodan za kloniranje velikih plazmida. Derivat je soja DH10B i sadrži mutaciju gena *fhuA* što ga čini otpornim na fag T1. Ima smanjenu stopu rekombinacije i degradacije klonirane DNA zahvaljujući mutacijama gena *recA1* i gena za nespecifičnu endonukleazu I (*endA1*).

Rosetta 2 (Merck) – derivat soja BL21 dizajniran za poboljšanu ekspresiju eukariotskih proteina čije mRNA sadrže kodone rijetko korištene u *E. coli*. Plazmid pRARE2 sadrži gen za otpornost na kloramfenikol i omogućuje „univerzalnu“ translaciju zbog toga što sadrži gene za tRNA za spomenute, rijetko korištene kodone (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA i CGG).

3.1.4. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA

Komercijalni kompleti:

Komplet za izolaciju plazmidne DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN)
Komplet za pročišćavanje PCR-produkata (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN)
Komplet za pročišćavanje odsječaka DNA iz gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)

Enzimi: BamHI HF (NEB), SalI HF (NEB), BglII (NEB), DNA polimeraza Phusion HF (NEB), T4 DNA ligaza (Thermo Scientific)

DNA standardi: DNA bakteriofaga λ (Fermentas) porezana enzimom HindIII, 1 kb DNA standard (NEB), 100 bp DNA standard (NEB)

Boja za nanošenje DNA na gel, 10x:	TAE pufer 50x, pH = 8,5:
1,25 % (w/v) ksilen-cijanol	242 g/l Tris-baza (Roth)
1,25 % (w/v) bromfenol plavo	57,1 ml/l octena kiselina
0,625 % (v/v) SDS ²	50 mM EDTA
62,5 % (v/v) glicerol	

Otopine za izolaciju plazmidne DNA metodom alkalne lize:

Otopina za resuspendiranje bakterija:	Otopina za lizu:	Otopina za neutralizaciju:
50 mM Tris-Cl, pH = 8,0	200 mM NaOH	3 M kalij acetat, pH = 5,5
10 mM EDTA	1 % SDS	11,44 % octena kiselina
100 µg/ml RNaza A (QIAGEN)		

3.1.5. Početnice

Početnice korištene za konstrukciju vektora za ekspresiju GST-Rab5A_{FL} i GST-Rab5A_{ΔCCN}³ u bakteriji *E. coli*:

Rab5A_{BamHI-F1} 5' – ATTGGATCCATGAATAATAATAAGATATTTTC – 3'

Rab5A_{FL_SalI-R1} 5' – TAAGTCGACTTAGTTACAACATTTGTTTTTC – 3'

Rab5A_{dCCN_SalI-R1} 5' – TAAGTCGACTTATTTGTTTTTCTTTCCAGTG – 3'

Početnica korištena za sekvenciranje ukloniranih varijanti proteina Rab5A:

pGEX_{5'}_seq 5' – GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG – 3'

3.1.6. Plazmidi

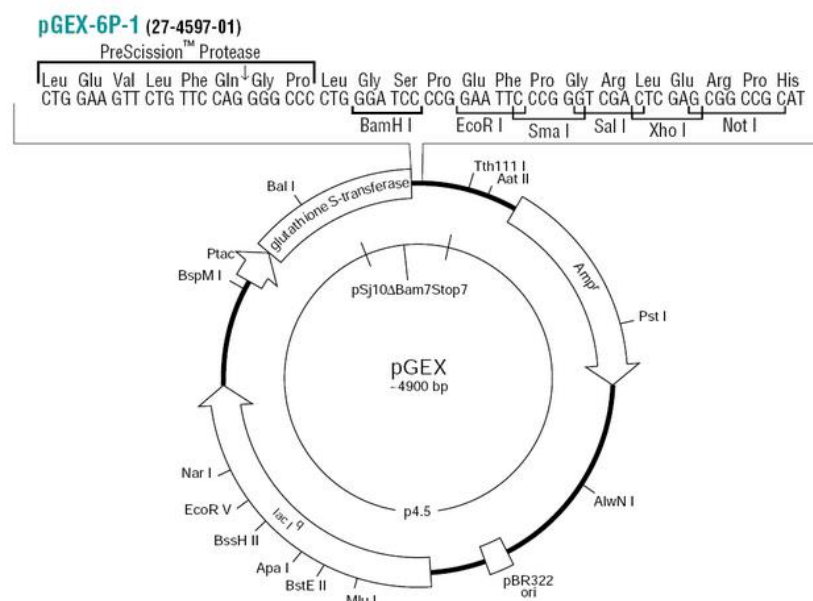
Za ekspresiju rekombinantnih proteina u bakterijskim stanicama *E. coli* korišten je vektor pGEX-6P-1 (GE Healthcare, **Slika 4.**). Ovaj ekspresijski vektor sadrži *tac* promotor i *laqI^q* gen koji omogućuju inducibilnu ekspresiju fuzioniranih proteina. Pod kontrolom promotora nalaze se gen za glutation-S-transferazu (GST) i višestruko mjesto kloniranja sa šest jedinstvenih restrikcijskih mjesta. Kodirajuća sekvenca proteina od interesa unosi se u vektor ligiranjem u ta restrikcijska mjesta i u konačnici ekspresija rezultira proteinom koji na N-

² Natrij dodecil-sulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*

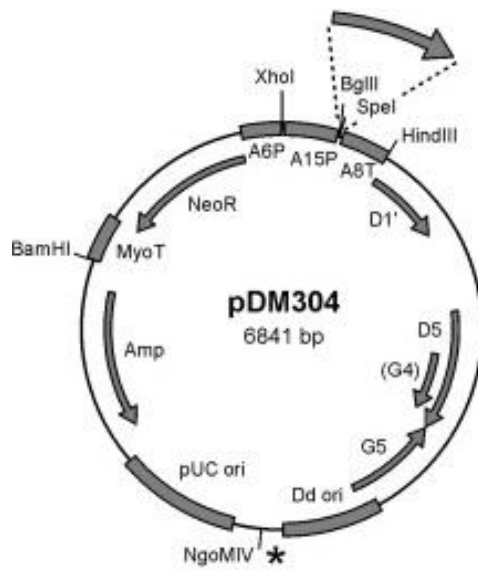
³ Varijanta proteina Rab5A kojem nedostaju 3 C-terminalne aminokiseline.

terminalnom dijelu sadrži GST. Vektor također sadrži gen za rezistenciju na ampicilin što omogućuje selekciju uspješno transformiranih klonova.

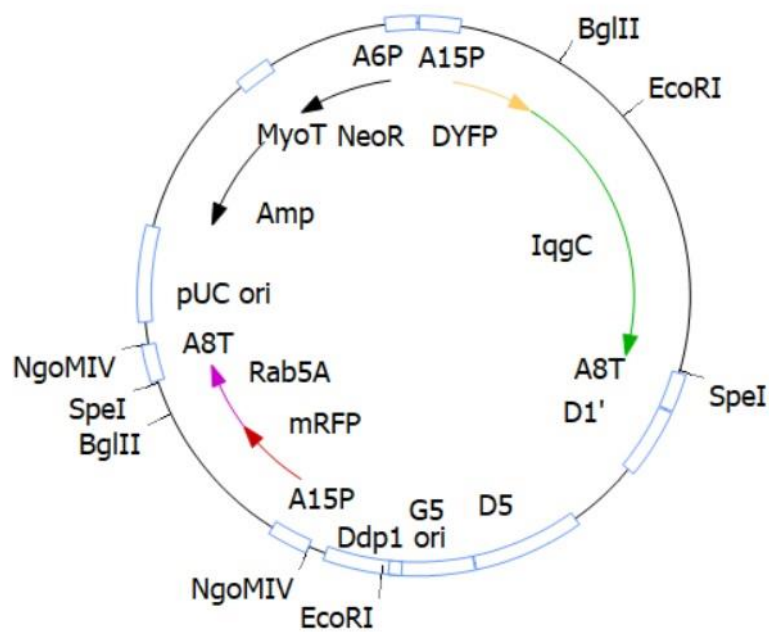
Za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *D. discoideum* korišten je derivat vektora pDM304 (Veltman i sur., 2009., **Slika 5**). Vektor pDM304 ima dva ishodišta replikacije (pUC ori i Dpd1 ori) koja mu omogućuju propagaciju u stanicama *E. coli* i u stanicama *D. discoideum*. Sadrži i gene za rezistenciju na ampicilin i geneticin. Restriksijska mjesta BglII i SpeI omogućuju ukloniravanje željene sekvence čija je transkripcija tada pod kontrolom act15 promotora i act8 terminatora. Uz to, vektor sadrži i restriksijsko mjesto NgoMIV pomoću kojeg se u vektor može unijeti još jedna ekspresijska kazeta. Na taj način omogućena je istovremena ekspresija dvaju gena pod kontrolom identičnih, ali odvojenih promotora i terminatora, što rezultira sličnim razinama ekspresije uz upotrebu samo jednog antibiotika za održavanje vektora u stanici (Veltman i sur. 2009). Upravo ta značajka iskorištena je prilikom konstrukcije vektora pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A korištenog za promatranje smještaja proteina IqgC i Rab5A (**Slika 6**). Ovaj ekspresijski vektor je ranije konstruiran u laboratoriju i to tako da je ekspresijska kazeta mRFP-Rab5A pomoću NgoMIV restriksijskog mjesta unesena u postojeći vektor pDM304_YFP-IqgC.



Slika 4. Ekspresijski vektor pGEX-6P-1 korišten za ekspresiju rekombinantnih proteina u bakterijskim stanicama *E. coli*. Preuzeto iz: lifescience-market.com.



Slika 5. Osnovni ekspresijski vektor pDM304 korišten za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *D. discoideum*. Preuzeto iz: Veltman i sur. 2009.



Slika 6. Ekspresijski vektor pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A korišten za istovremenu ekspresiju rekombinantnih proteina YFP-IqgC i mRFP-Rab5A u stanicama *D. discoideum*.

3.1.7. Materijali korišteni za elektroforezu u denaturirajućem gelu i metodu Western blot

12 % SDS poliakrilamidni gelovi:

Gel za razdvajanje:

41,5 % akrilamid/bisakrilamid 30 %/0,8 %
0,38 M Tris/0,1 % SDS pH = 8,8
1 mM EDTA⁴, pH= 7,2
0,025 % TEMED⁵ (Fluka)
0,23 % APS⁶ (Roth)

Gel za sabijanje:

11,14 % akrilamid/bisakrilamid 30 %/0,8 %
0,12 M Tris/0,1 % SDS, pH = 6,8
1 mM EDTA, pH= 7,2
0,05 % TEMED (Fluka)
0,3 % APS (Roth)

Proteinski standardi: nebojani - PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific),
unaprijed obojani - PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

SDS boja za nanošenje uzoraka na gel 2x:

100 mM Tris/0,4 % SDS, pH = 6,8
20 % glicerol
1,93 % SDS (Roth)
2 % β-merkaptoetanol
0,2 % bromfenol plavo (Kemika)

SDS pufer za elektroforezu 10x, pH = 8,8:

30,25 g/l Tris (Roth)
142,5 g/l glicin (Roth)
1 % SDS (Roth)

Otopina za bojanje gelova (Coomassie briljant plavo):

1 g/l Brilliant blue G 250 (Roth)
1 g/l Brilliant blue R 250 (Roth)
50 % metanol
10 % octena kiselina

Otopina za odbojavanje gelova:

10 % etanol
7 % octena kiselina

PVDF⁷ membrana (GE Healthcare)

100 % metanol (Kemika) za aktivaciju membrane

⁴ Etilendiamintetraoctena kiselina

⁵ N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin – katalizator polimerizacije poliakrilamidnih gelova

⁶ Amonij peroksidisulfat – inicijator polimerizacije poliakrilamidnih gelova

⁷ Polivinilidenfluorid

Pufer za elektroprijenos:

2,93 g/l glicin
5,81 g/l Tris
0,0375 % SDS
20 % metanol

Pufer za ispiranje:

1x PBS
0,05 % Tween 20 (Sigma Aldrich)

Otopina za blokiranje membrane: 5 % BSA⁸ (Fluka) u puferu za ispiranje

Protutijela:

Primarno protutijelo – anti-IqgC poliklonsko protutijelo (ranije priređeno u laboratoriju)

Sekundarno protutijelo – na zečja IgG protutijela, proizvedeno u kozi, konjugirano s peroksidazom iz hrena (Bio-Rad)

Supstrati za peroksidazu iz hrena za kemiluminiscენტnu detekciju (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad)

3.1.8. Materijali korišteni za afinitetno pročišćavanje GST-rekombinantnih proteina i metodu *GST-pull-down*

IPTG⁹ (Roth), Extran AP33 (Merck), lizozim (Fluka), smjesa inhibitora proteaza bez EDTA (Roche)

Pufer za kolonu i metodu *pull-down*:

1x PBS, pH = 7,2
1 mM EGTA¹⁰, pH = 7,3
1 mM DTT¹¹
1 mM PMSF¹² (Sigma Aldrich)
6,6 mM benzamidin (Sigma Aldrich)

Proteini: IqgC (ranije pročišćen u laboratoriju), GST-Rab5A_ΔCCN (ovaj rad)

Glutation-agaroz (Thermo Scientific)

⁸ Albumin iz goveđeg seruma

⁹ Izopropiltiogalaktozid – induktor *lac* operona

¹⁰ Etilen glikol bis (2-aminoetil) tetraoctena kiselina

¹¹ Ditiotreitol – reducirajući agens

¹² Fenilmetilsulfonil fluorid – inhibitor serinskih proteaza

3.2. Metode

3.2.1. Manipulacija staničnom kulturom *Dictyostelium discoideum*

U ovom radu koristila sam AX2 soj *D. discoideum* koji može rasti u HL5 tekućem hranjivom mediju. U svrhu sprječavanja kontaminacije u medij sam dodala ampicilin i streptomycin u koncentracijama 50 µg/ml i 40 µg/ml. Stanice sam uzgajala pričvršćene za podlogu u Petrijevoj zdjelici u inkubatoru-tresilici (Innova 4230, New Brunswick) pri temperaturi od 22 °C te optimalno osvijetljene. Sterilne uvjete za rad sa stanicama ostvarila sam korištenjem laminara (Telstar Bio-II-A). Prilikom uzgoja stanica pazila sam da uvijek budu u eksponencijalnoj fazi rasta, tako da sam stanice svakodnevno razrjeđivala i održavala ih u gustoći manjoj od 4×10^6 stanica po ml. Stanice u kulturi koristila sam 3-4 tjedna nakon čega bih uzgojila nove kako bi se izbjeglo eventualno nakupljanje neželjenih mutacija. Nove kulture uzgojila sam iz prethodno pohranjenih spora koje se čuvaju na -80 °C tako da sam u 10 ml HL5 medija s odgovarajućim antibioticima dodala 200-500 µl spora.

Transfekciju stanica *D. discoideum* provodila sam elektroporacijom na sljedeći način. Subkonfluentne stanice prikupljene s Petrijeve zdjelice centrifugirala sam 3 minute na 700 g pri 4 °C nakon čega sam odlila supernatant, a talog resuspendirala u 30 ml hladnog fosfatnog pufera i ponovno centrifugirala pri istim uvjetima. Ponovno sam odlila supernatant i talog resuspendirala u 30 ml hladnog pufera za elektroporaciju i centrifugirala 3 minute na 700 g pri 4 °C. Nakon odlijevanja supernatanta, talog sam resuspendirala u 700 µl hladnog pufera za elektroporaciju. U hladnu kivetu za elektroporaciju sa žlijebom od 4 mm (Bio-Rad), dodala sam volumen plazmidne DNA koji sadrži 2-5 µg plazmida i na to sam dodala resuspendirane stanice *D. discoideum*. Stanice sam transfecirala metodom elektrošoka koristeći elektroporator (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) prema prethodno postavljenom protokolu za *D. discoideum*. Uvjeti elektroporacije su dva pulsa pravokutnih valova u trajanju od 1 ms s razmakom od 5 s, pri naponu od 1000 V i kapacitetu od 10 µF. Po završetku elektroporacije, stanice sam prebacila u Petrijevu zdjelicu i inkubirala ih 15 minuta na rotacijskoj tresilici (Unimax 1010, Heidolph) pri brzini trešnje od 100 rpm¹³ i temperaturi od 22 °C. Nakon 15 minuta, stanicama sam dodala određeni volumen otopine za oporavak stanica tako da su konačne koncentracije CaCl₂ i MgCl₂ 2 mM te ih ponovno inkubirala 15 minuta na rotacijskoj tresilici u istim uvjetima.

¹³ Broj okretaja u minuti, engl. *revolutions per minute*

Na kraju sam stanicama dodala 10 ml HL5 medija i inkubirala ih na 22 °C. Nakon 5 sati stanicama sam dodala selekcijski antibiotik G418 u koncentraciji od 10 µg/ml.

3.2.2. Konfokalna mikroskopija

Za praćenje prostorno-vremenske raspodjele fluorescentnih proteina u živim stanicama *D. discoideum* koristila sam fluorescencijski konfokalni mikroskop Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems). Kako bih pripremila stanice za mikroskopiranje, u posudicu za stanične kulture promjera 3,5 cm sa staklenim dnom (MatTek) dodala sam 2 ml stanične kulture. Tako priređene stanice ostavila sam najmanje 30 minuta pri 22 °C kako bi adherirale za podlogu prije mikroskopiranja. Valne duljine koje sam koristila za pobudu fluorofora YFP i mRFP su redom 511 i 587 nm, dok je emisija fluorescencije detektirana u rasponu 519-568 nm za YFP i 595-640 nm za mRFP.

3.2.3. Manipulacija bakterijskom kulturom *E. coli*

U svrhu konstruiranja i propagacije vektora za ekspresiju rekombinantnih proteina u *E. coli* koristila sam komercijalni soj NEB 10-beta. Bakterije sam transformirala metodom toplinskog šoka prema uputama proizvođača nakon čega sam ih nasađivala na krutu podlogu LB s dodatkom ampicilina u koncentraciji 100 µg/ml i inkubirala ih preko noći na 37 °C. Kako bih pronašla klon koji sadrži željeni vektor, narasle kolonije nasađivala sam u 4 ml tekućeg medija LB s dodatkom ampicilina u istoj koncentraciji i također ih inkubirala na 37 °C preko noći pri brzini trešnje od 250 rpm.

U svrhu ekspresije i pročišćavanja rekombinantnih proteina, elektroporacijom sam transformirala elektrokompetente bakterije soja Rosetta 2 koje su prethodno pripremljene u laboratoriju, alikvotirane po 40 µl i pohranjene na -80 °C. Bakterije sam transformirala na sljedeći način. Nakon otapanja na ledu, bakterijama sam u sterilnim uvjetima dodala 1 µl plazmida što odgovara količini od 15 ng. Smjesu sam potom prebacila u ohlađenu kivetu za elektroporaciju sa žlijebom od 2 mm (Bio-Rad) i elektroporirala bakterije na elektroporatoru (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad), prema prethodno postavljenom protokolu za *E. coli*. Uvjeti elektroporacije su jedan puls pravokutnih valova u trajanju od 2,5 ms pri naponu od 2500 V i kapacitetu od 25 µF. Po završetku elektroporacije u kivetu sam dodala 1 ml medija SOC, kivetu inverzno promiješala nekoliko puta i sadržaj prebacila u epruvetu za centrifugiranje od 1,5 ml. Bakterije sam potom inkubirala u termobloku (ThermoMixer C, Eppendorf) na 37 °C pri brzini trešnje od 300 rpm 1 sat. Nakon sat vremena, bakterije sam prikupila centrifugiranjem 2 minute

na 12 000 g i resuspendirala ih u malom volumenu medija SOC te ih nanijela na krutu podlogu LB koja sadrži ampicilin i kloramfenikol u koncentracijama 100 µg/ml i 35 µg/ml. Krutu podlogu LB s bakterijama sam stavljala u inkubator preko noći na 37 °C.

3.2.4. Tehnike rekombinantne DNA

U svrhu konstrukcije vektora za ekspresiju i pročišćavanje rekombinantnih proteina GST-obilježenog Rab5A pune dužine, GST-Rab5A_FL, i GST-obilježenog Rab5A kojem nedostaju 3 C-terminalne aminokiseline, GST-Rab5A_ΔCCN, prvo sam kodirajuće sekvence tih proteina umnožila lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Kao kalup za reakciju sam koristila plazmid pDM304_YFP-Rab5A, prethodno pripremljen u laboratoriju, kojeg sam priredila u koncentraciji 5 ng/µl. Za umnažanje sekvence Rab5A_FL koristila sam nizvodnu početnicu Rab5A_FL_SalI-R1, a za umnažanje sekvence Rab5A_ΔCCN koristila sam nizvodnu početnicu Rab5A_ΔCCN_SalI-R1. Za obje sekvence koristila sam istu uzvodnu početnicu Rab5A_BamHI-F1. Sastav reakcijske smjese za PCR obje sekvenci prikazan je u **Tablici 1**.

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za PCR prilikom umnažanja kodirajućih sekvenci proteina Rab5A_FL i Rab5A_ΔCCN.

Komponenta	Volumen (µl)
redestilirana voda	13,4
5x Phusion HF pufer (NEB)	4
10 mM deoksiribonukleotidi	0,4
10 µM smjesa uzvodne i nizvodne početnice	1
DNA kalup (5 ng/µl)	1
DNA polimeraza Phusion HF (NEB)	0,2
Ukupno	20

Lančanu reakciju polimerazom provela sam u PCR uređaju (Mastercycler personal, Eppendorf) prema istom programu za oba konstrukta (**Tablica 2**).

Tablica 2. Program za PCR za umnažanje kodirajućih sekvenci proteina Rab5A_FL i Rab5A_ΔCCN.

Korak PCR programa	Temperatura (°C)	Vrijeme	
Početna denaturacija	98	30 s	
Denaturacija	98	10 s	x 32
Prianjanje početnica	57	20 s	
Produljenje	72	30 s	
Završno produljenje	72	10 min	
Kraj	16	∞	

Uspješnost PCR reakcije provjeravala sam elektroforezom u gelu agaroze. U tu svrhu koristila sam 1 % (w/v) agarozne gelove koje sam priredila tako da sam u 1x TAE puferu s dodanim 0,5 µg/ml etidij bromidom (Sigma Aldrich) otopila odgovarajuću količinu agaroze (Roth). Prije nanošenja uzoraka na gel pomiješala sam ih s bojom za nanošenje DNA. Elektroforezu sam provodila u kadici za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad) pri naponu od 5 V/cm u 1x TAE puferu. Nakon elektroforeze, DNA u gelu sam vizualizirala pomoću UV transiluminatora (G:box, Syngene), a pomoću kamere povezane s računalom sam dokumentirala slike gelova. Veličinu i količinu odsječaka DNA na gelu procjenjivala sam uspoređujući ih s različitim DNA standardima.

Nakon optimizacije uvjeta PCR reakcije, PCR-produkte sam umnožila u većoj količini te sam ih pročistila izrezivanjem iz gela agaroze. Nakon izrezivanja, komadić gela koji sadrži željeni odsječak DNA sam otopila i DNA pročistila korištenjem Kompleta za pročišćavanje DNA iz gela (QIAGEN), prema uputama proizvođača. Nakon pročišćavanja, kvalitetu i koncentraciju pročišćene DNA utvrdila sam agaroznom elektroforezom te mjerenjem apsorbanacije pri 260 i 280 nm na spektrofotometru (NanoPhotometer, Implen).

Pročišćene PCR-produkte Rab5A_FL i Rab5A_ΔCCN sam potom porezala s restrikcijskim enzimima kako bi ih mogla ligirati s vektorom. Oba fragmenta na krajevima sadrže restrikcijska mjesta za enzime BamHI i SalI koja su uvedena pomoću početnica za PCR. Koristila sam HF (engl. *high-fidelity*) varijante enzima (NEB), koje imaju smanjenu nespecifičnu aktivnost, te sam digestiju PCR-produkata provodila preko noći inkubiranjem DNA s oba enzima istovremeno u puferu CutSmart (NEB) na 37 °C. Nakon digestije DNA fragmente sam pročistila kompletom za pročišćavanje PCR produkata (QIAGEN) prema uputama proizvođača te sam uspješnost pročišćavanja potvrdila elektroforezom u agaroznom gelu.

Tako priređene inserte ligirala sam u prethodno priređen vektor pGEX-6P-1 porezan enzimima BamHI i SpeI. Količinu inserta potrebnu za ligiranje s određenom količinom vektora izračunala sam prema sljedećoj formuli:

$$\text{insert (ng)} = \frac{\text{vektor (ng)} \times \text{insert (kb)}}{\text{vektor (kb)}} \times \text{molarni omjer inserta i vektora.}$$

Nakon izračuna, za oba inserta pripremila sam ligacijske smjese koje su sadržavale: 1 µl vektora (oko 100 ng), 8 µl inserta, 2 µl T4 DNA ligacijskog pufera, 10x, 2 µl 50 % PEG 4000, 0,7 µl T4 DNA ligaze (Thermo Scientific) i vode bez nukleaza do ukupnog volumena

od 20 μ l. Ligacijske smjese su inkubirane 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega sam s 2 μ l svake ligacijske smjese transformirala NEB 10-beta *E. coli* (vidi poglavlje 3.2.3.).

Kako bih provjerila uspješnost kloniranja i identificirala kolonije koje sadrže plazmide pGEX-6P-1_Rab5A_FL i pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN izolirala sam plazmide metodom alkalne lize na sljedeći način. U epruvetama za centrifugiranje od 2 ml centrifugiranjem 2 minute na 12 000 g istaložila sam 4 ml prekonoćne bakterijske kulture. Potom sam resuspendirala talog bakterija u 200 μ l hladne otopine za resuspendiranje i nakon toga u smjesu dodala 200 μ l otopine za lizu te inverzno promiješala sadržaj epruvete. Uzorak sam ostavila inkubirati 4 minute na sobnoj temperaturi pri čemu se liziraju stanice te denaturiraju DNA i proteini. Nakon isteka vremena u smjesu sam dodala 200 μ l otopine za neutralizaciju i ponovno inverzno promiješala sadržaj epruvete nekoliko puta. Otopina za neutralizaciju omogućuje renaturaciju plazmidne DNA i precipitaciju staničnih ostataka i jezgrine DNA. Sadržaj epruvete sam potom centrifugirala 10 minuta na 17 900 g nakon čega sam supernatant, u kojem se nalazi plazmidna DNA, prebacila u čistu, 1,5 ml epruvetu za centrifugiranje. Kako bih istaložila plazmidnu DNA u smjesu sam dodala 400 μ l izopropanola, inverzno promiješala sadržaj epruvete i centrifugirala ga 10 minuta na 17900 g. Potom sam talog plazmidne DNA isprala s 500 μ l etanola (70 %) i ponovno centrifugirala 5 minuta na 17900 g. Kako bih u potpunosti uklonila etanol, talog sam sušila 10 minuta u uređaju za ugušćivanje uzoraka (Savant DNA SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific) nakon čega sam ga otopila u 20 μ l redestilirane vode. Uspješnost izolacije plazmida provjeravala sam elektroforezom u agaroznom gelu.

Nakon izolacije plazmida potrebno je utvrditi koji plazmidi sadrže željene inserte i zbog toga sam provela restrikcijsku digestiju s enzimom BglIII. U ovom slučaju digestija se odvijala 1,5 sat na 37 °C, a produkte digestije sam analizirala elektroforezom u agaroznom gelu. Na temelju broja i veličine fragmenata dobivenih digestijom identificirala sam klonove koji sadrže željene plazmide. Odabrane bakterijske kolonije nasadila sam u 4 ml tekućeg medija LB s dodatkom ampicilina i inkubirala ih preko noći na 37 °C pri brzini trešnje od 250 rpm. Iz prekonoćne kulture sam potom, prema uputama proizvođača, izolirala plazmide koristeći komplet za izolaciju plazmidne DNA (QIAGEN). Kako bih provjerila nukleotidnu sekvencu ukloniranih odsječaka DNA, izolirane plazmide sam priredila za sekvenciranje tako da sam u epruvetu za centrifugiranje dodala 500-800 ng plazmidne DNA, 5 μ l početnice za sekvenciranje (5 μ M) te redestilirane vode do ukupnog volumena od 10 μ l. Nakon sekvenciranja, dobivene sekvence analizirala sam pomoću programa BioEdit.

3.2.5. Metode proteinske biokemije

3.2.5.1. Optimizacija ekspresije proteina i afinitetno pročišćavanje GST-Rab5A_ΔCCN

Kako bih optimizirala uvjete ekspresije rekombinantnih proteina GST-Rab5A_FL i GST-Rab5A_ΔCCN, bakterije soja Rosetta 2 transformirala sam s konstruiranim plazmidima pGEX-6P-1_Rab5A_FL i pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN (vidi poglavlje 3.2.3.). Od svake transformacije po dva klona sam nasadila u tekući medij LB s dodanim ampicilinom i kloramfenikolom. Nakon inkubacije na 37 °C pri brzini trešnje od 250 rpm preko noći, narasle kulture sam nasadila u omjeru 1:100 u 20 ml obogaćenog medija LB s dodanim antibioticima. Tako nasadene kulture rasle su na 37 °C pri brzini trešnje od 150 rpm do optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}) 0,5-0,7. Pri toj gustoći inducirala sam ekspresiju proteina s 0,75 mM IPTG-om i nastavila inkubirati bakterije na 21 °C. Tijekom ispitivanja optimalnih uvjeta ekspresije testirala sam vremena indukcije od tri sata te preko noći. Potom sam prikupila uzorke neinduciranih i induciranih kultura, pomiješala sam ih s bojom za nanošenje uzoraka (2x) u omjeru 1:1 te ih kuhala pet minuta u vodenoj kupelji. Tako pripremljene uzorke sam analizirala elektroforezom u 12 %-tnom denaturirajućem SDS poliakrilamidnom gelu koristeći sustav za vertikalnu elektroforezu (Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad). U jažice sam nanosila po 10 μl pripremljenih uzoraka i 10 μl neobojenog proteinskog standarda. Elektroforezu sam provela u 1x SDS puferu za elektroforezu pri naponu od 12 V/cm do trenutka dok se uzorak nije sabio, a kada su uzorci ušli u gel za razdvajanje napon sam podigla na 15 V/cm. Po završetku elektroforeze, proteine na gelu sam vizualizirala bojanjem u boji Coomassie briljant plavo uz zagrijavanje do vrenja te hlađenje pet minuta uz laganu trešnju. Nakon bojanja, gel sam odbojala pomoću otopine za odbojavanje također zagrijavanjem do vrenja i hlađenjem i tako tri do četiri puta. Na kraju sam gel isprala redestiliranom vodom i dokumentirala ga pomoću uređaja za skeniranje.

Nakon što sam usporedila ekspresije dviju varijanti proteina GST-Rab5A, nastavila sam s pročišćavanjem rekombinantnog proteina GST-Rab5A_ΔCCN iz većeg volumena bakterijske kulture. U tu svrhu sam u jednu litru obogaćenog medija LB s antibioticima nasadila 10 ml prekonoćne bakterijske kulture i pri tome sam pazila da ukupan volumen suspenzije ne prijeđe 20 % volumena tikvice. U suspenziju sam dodala i Extran AP33 (Merck) u konačnoj koncentraciji 0,06 % kako bih spriječila pjenjenje suspenzije i time denaturaciju proteina. Priređenu kulturu sam inducirala IPTG-om na prethodno opisan način te je nastavila inkubirati preko noći u prethodno utvrđenim uvjetima temperature od 21 °C i brzine trešnje 150 rpm. Sljedeći dan bakterije sam prikupila centrifugiranjem 20 minuta na 4500 g pri 4 °C. Talog

bakterija sam resuspendirala u hladnom puferu za kolonu i u suspenziju dodala 0,2 mg/ml lizozima (Fluka) i smjesu inhibitora proteaza (Roche) u količini prema uputama proizvođača. Suspenziju sam potom miješala 10 minuta na magnetnoj miješalici u hladnoj sobi pri temperaturi od 8 °C. Nakon toga sam na uređaju za sonikaciju (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer) suspenziju uronjenu u ledenu kupelj sonicirala dva puta po 3 minute pri frekvenciji od 20 kHz i amplitudi 60 s razmakom od 5 minuta između soniciranja. Dobiveni lizat sam potom centrifugirala 1 sat na 16 000 g pri temperaturi od 4 °C. Za to vrijeme sam pripremila kolonu s glutation-agarozom za afinitetno pročišćavanje proteina u hladnoj sobi na sljedeći način. U plastičnu kolonu sam dodala nekoliko ml suspenzije glutation-agaroze koju sam potom isprala s oko 150 ml hladne redestilirane vode, a zatim ekvilibrirala s oko 250 ml hladnog pufera za kolonu. Nakon centrifugiranja lizata, supernatant sam profiltrirala kroz filter s veličinom pora 0,45 µm (Sartorius) i potom sam ga nanijela na pripremljenu glutation-agarozu. Kolonu sam povezala u zatvoren sustav pomoću cijevi i pokrenula spori protok (oko 3 ml/min) pomoću peristaltičke pumpe (Pump P-1, GE Healthcare). Protein je na glutation-agarozu navezivan preko noći. Sljedeći dan kolonu sam isprala s oko 200 ml hladnog pufera za kolonu. Tako dobivenu glutation-agarozu s vezanim proteinom GST-Rab5A_ΔCCN koristila sam za testiranje izravne interakcije proteina metodom *GST-pull-down*.

3.2.5.2. Testiranje interakcije proteina IqgC i Rab5A_ΔCCN metodom *GST-pull-down*

Za analizu interakcije proteina IqgC i Rab5A_ΔCCN koristila sam metodu *GST-pull-down* koja se zasniva na vezanju jednog ili više proteina interaktora na protein koji je pomoću GST privjeska imobiliziran na koloni glutation-agaroze. U ovom slučaju rekombinantni protein GST-Rab5A_ΔCCN je imobiliziran, a pročišćeni protein IqgC je potencijalni „plijen“ čije izravno vezanje na Rab5A_ΔCCN istražujem. Glutation-agarozu s imobiliziranim proteinom GST-Rab5A_ΔCCN sam priredila kako je ranije opisano, dok sam GST, prethodno pročišćen u laboratoriju, a koji sam koristila kao negativnu kontrolu, navezala na glutation-agarozu prije samog *pull-down*-a. U epruvetu za centrifugiranje od 2 ml dodala sam 250 µl suspenzije glutation-agaroze i 1 ml pufera za kolonu, invertirala epruvetu nekoliko puta i centrifugirala smjesu 2 minute na 700 g. Potom sam pažljivo uklonila većinu pufera mikropipetom, na zrnca dodala novih 1 ml pufera za kolonu i ponovila postupak. Glutation-agarozu sam tako isprala 5 puta kako bih u potpunosti uklonila etanol u kojem se pohranjuje. Na ispranu glutation-agarozu sam potom dodala 400 µl proteina GST i 1 ml pufera za kolonu te navezivala GST na rotatoru u hladnoj sobi na 8 °C 1 sat. Potom sam glutation-agarozu s navezanim GST isprala 3 puta i ponovno dodala 400 µl proteina GST i 1 ml pufera za kolonu te nastavila s navezivanjem još 1

sat kako bi se zrnca u potpunosti zasitila s proteinom GST. Nakon navezivanja sam glutation-agarozu isprala 5 puta s puferom za kolonu. Od priređenih glutation-agarozu s navezanim proteinima GST i GST-Rab5A_ΔCCN uzela sam uzorke koje sam pomiješala s bojom za nanošenje te ih kuhala 5 minuta u vodenoj kupelji. Za GST- i GST-Rab5A_ΔCCN-pull-down u epruvete za centrifugiranje od 2 ml dodala sam po 100 μl glutation-agaroze s navezanim odgovarajućim proteinom te dodala po 50 μl proteina IqgC i 1 ml pufera za kolonu. Sadržaj sam inkubirala u hladnoj sobi uz rotiranje 2 sata. Nakon proteka vremena, zrnca sam isprala 5 puta s puferom za kolonu te ih pomiješala sa SDS bojom za nanošenje i skuhalo. Svi uzorci analizirani su denaturirajućom gel elektroforezom i metodom Western blot uz korištenje anti-IqgC protutijela.

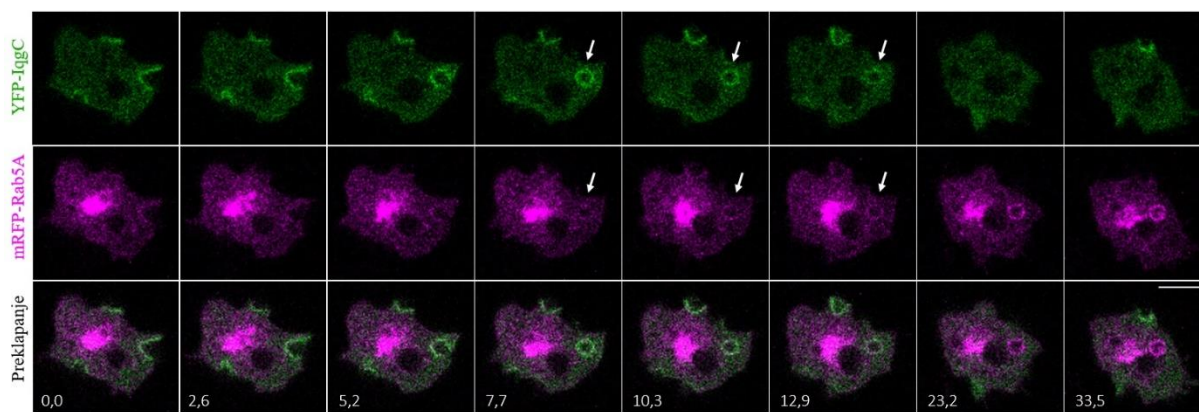
3.2.5.3. Metoda Western blot

Uzorke iz metode *GST-pull-down* analizirala sam metodom Western blot kako bih provjerila je li se IqgC vezao na Rab5A_ΔCCN. Nakon provođenja elektroforeze u denaturirajućem gelu, pripremila sam sustav za polumokri elektroprijenos proteina s gela na PVDF membranu. PVDF membrana ima visok afinitet za proteine i izrazito je hidrofobna stoga se prije transfera aktivira kratkim uranjanjem u metanol. Nakon aktivacije membrane složila sam stog koji se sastojao redom od: filter papira, membrane, gela i još jednog filtera papira, sve prethodno natopljeno puferom za elektroprijenos. Prijenos sam provela pri naponu od 12 V u trajanju od 1,5 h. Po završetku transfera membranu sam kratko ekvilibrirala u puferu za ispiranje uz lagano miješanje, a potom sam je blokirala otopinom za blokiranje tijekom jednog sata uz laganu trešnju. Membranu je potrebno blokirati kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon blokiranja na membranu sam dodala primarno protutijelo i inkubirala je sat vremena uz laganu trešnju. Po isteku inkubacije membranu sam isprala s puferom za ispiranje 5 puta po 5 minuta i na nju dodala sekundarno protutijelo razrijeđeno u puferu za ispiranje u omjeru 1:5000. Nakon inkubacije od sat vremena isprala sam membranu 6 puta i potom sam vizualizirala proteinske vrpce metodom kemiluminiscencije. Na membranu sam nanijela smjesu supstrata za peroksidazu iz hrena prema uputama proizvođača (Bio-Rad) te dokumentirala rezultate pomoću sustava UVItec Cambridge (Alliance 4.7.).

4. Rezultati

4.1. Proteini IqgC i Rab5A kolokaliziraju u stanicama *D. discoideum*

Od ranije je poznato da se protein IqgC zadržava na zatvorenom makropinosomu duže nego njegov interakcijski partner RasG (Marinović i sur. 2019). Za razjašnjavanje dodatnih uloga proteina IqgC potrebno je identificirati proteine koji stupaju u interakciju s IqgC na zatvorenom makropinosomu, nakon što je RasG disocirao s vezikule. Analizom interaktoma proteina IqgC dobivenog masenom spektrometrijom, uočen je protein Rab5A kao jedan od potencijalnih interaktora. Naime, poznato je da je kod ljudi protein Rab5A marker ranih endosoma koji ima ključnu ulogu u endocitozi i membranskom transportu (Yuan i Song 2020). Upravo zbog toga je odabran za daljnju analizu interakcije s proteinom IqgC. Preliminarni rezultati u laboratoriju dobiveni metodom ko-imunoprecipitacije potvrdili su da se proteini Rab5A i IqgC nalaze u kompleksu. Stoga smo najprije odlučili usporediti prostorno-vremenske raspodjele ova dva proteina u živim stanicama. U tu svrhu, stanice *D. discoideum* su transfecirane s prethodno konstruiranim vektorom pDM304_YFP-IqgC_mRFP-Rab5A, koji omogućuje istovremenu ekspresiju dva fluorescentna proteina pod kontrolom identičnih promotora s jednog vektora. Praćenje smještaja oba proteina u živim stanicama tijekom makropinocitoze upotrebom konfokalne mikroskopije pokazalo je da IqgC i Rab5A kolokaliziraju na zatvorenom makropinosomu (*Slika 7.*). Vidljivo je da je signal YFP-IqgC izražen na području membrane gdje nastaje makropinosom te ostaje na makropinosomu tijekom njegovog zatvaranja i ulaska u unutrašnjost stanice. Postepeno, intenzitet signala YFP-IqgC slabi dok potpuno ne nestane s endosoma. S druge strane, signal mRFP-Rab5A se pojavljuje tek nakon zatvaranja makropinosoma i jača s vremenom. Preklapanje dvaju signala je vidljivo u fazama u kojima prisutnost IqgC na makropinosomu slabi, a Rab5A se tek pojavljuje i pojačava. Do trenutka kada signal Rab5A dosegne maksimum, IqgC je potpuno disocirao.



Slika 7. Kolokalizacija proteina IqgC i Rab5A na zatvorenom makropinosomu. Bijele strelice označavaju zatvoreni makropinosom na kojem je vidljiv smještaj oba proteina. Vrijeme je izraženo u sekundama, a oznaka veličine prikazuje 5 μm . Snimljeno na fluorescencijskom konfokalnom mikroskopu.

4.2. Proteini IqgC i Rab5A se izravno vežu

4.2.1. Konstrukcija vektora za ekspresiju proteina Rab5A

Nakon što smo pokazali da proteini IqgC i Rab5A zaista kolokaliziraju na ranom endosomu, sljedeći cilj je bio ispitati je li interakcija ova dva proteina izravna ili ih u kompleksu drži treći partner. S obzirom da smo u laboratoriju već imali pročišćen protein IqgC, bilo je potrebno afinitetno pročititi GST-Rab5A kako bismo mogli testirati vezanje IqgC na Rab5A metodom *GST-pull-down*. Prvo smo pristupili konstrukciji ekspresijskog vektora koji će omogućiti afinitetno pročišćavanje rekombinantnog proteina GST-Rab5A iz bakterijskog lizata. Pročišćavanje proteina općenito je jednostavnije ako je protein topiv pa nakon centrifugiranja bakterijskog lizata ostane u supernatantu, a ne u talogu staničnih ostataka bakterija. Poznato je da je jedna od glavnih posttranslacijskih modifikacija humanih proteina Rab5 prenilacija C-terminalnog motiva CCSN (C – cistein, S – serin, N – asparagin), koju vrši Rab geranilgeranil-transferaza, odgovorna za inserciju proteina Rab5 u endosomalne membrane humanih stanica (Goody i sur. 2014). Stoga smo najprije usporedili aminokiselinske sekvence humanih proteina Rab5 i proteina Rab5A iz amebe *D. discoideum*, iz čega je vidljivo da Rab5A iz *D. discoideum* na samom C-kraju sadrži motiv CCN koji se vjerojatno geranilgeranilira (**Slika 8**). S obzirom na prisutnost gena koji kodiraju enzime uključene u sintezu izoprenoida i prenilaciju u genomu *E. coli* (Marakasova i sur., 2013.; <https://ecocyc.org/>), ne možemo u potpunosti isključiti mogućnost nekog oblika lipidacije Rab5A. Zbog toga smo, osim konstruiranja vektora za ekspresiju GST-Rab5A pune dužine, Rab5A_FL, odlučili konstruirati i vektor za ekspresiju skraćenog proteina kojem nedostaje

motiv odgovoran za umetanje u membrane. U tu svrhu smo dizajnirali početnice pomoću kojih smo umnožili dva fragmenta DNA; Rab5A_FL i Rab5A kojem nedostaju tri aminokiselinska ostatka s C-kraja, Rab5A_ΔCCN. Početnice su na krajevima sadržavale restriksijska mjesta kako bismo fragmente nakon digestije mogli uklonirati u vektor pGEX-6P-1. Na taj način dobili smo ekspresijske vektore pGEX-6P-1_Rab5A_FL i pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN koje smo koristili za daljnje analize.

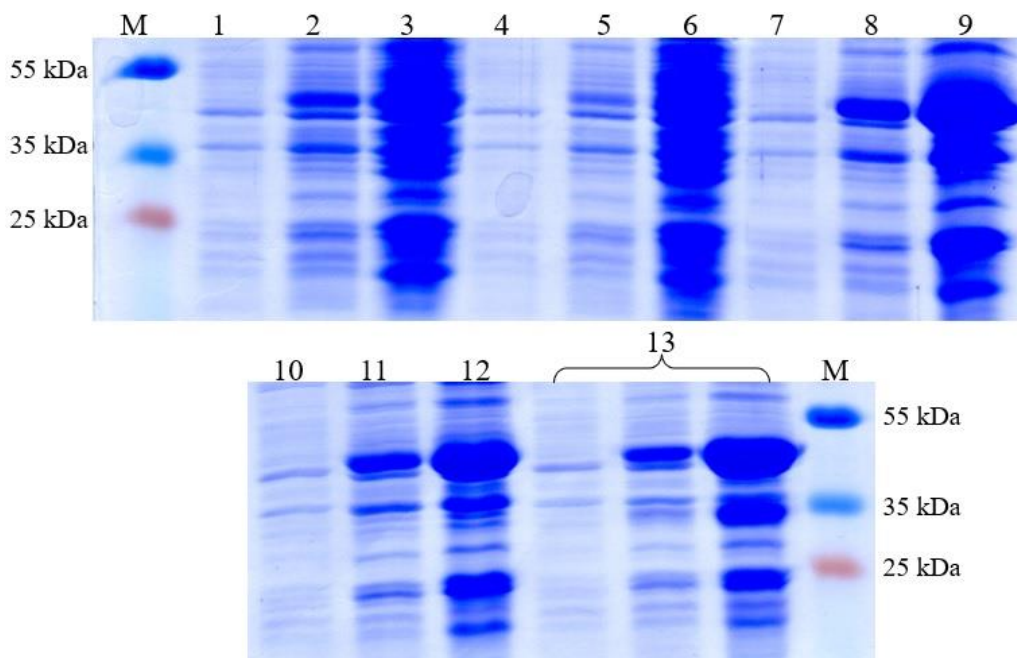
DdRab5A	-----MNNNKIFQFKLVLLGEAAVGKSSLVLRFVRGHFLDYQESTIGAAFLA	48
HsRab5a	-MASRGATRPNGPNTGNKICQFKLVLLGESAVGKSSLVLRFVKGFHEFQESTIGAAFLT	59
HsRab5b	-MTRSRSTARPNQGPQASKICQFKLVLLGESAVGKSSLVLRFVKGFHEFQESTIGAAFLT	59
HsRab5c	MAGRGGAAPNGPAAGNKICQFKLVLLGESAVGKSSLVLRFVKGFHEFQESTIGAAFLT	60
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	
DdRab5A	QTVCLNDTTVKFEIWDTAGQERYHTLAPMYRGAQAAIVVYDIRSEDSFERAIKWKELQ	108
HsRab5a	QTVCLDDTTVKFEIWDTAGQERYHSLAPMYRGAQAAIVVYDITNEESFARAKNWKELQ	119
HsRab5b	QSVCLDDTTVKFEIWDTAGQERYHSLAPMYRGAQAAIVVYDITNQETFARAKTWKELQ	119
HsRab5c	QTVCLDDTTVKFEIWDTAGQERYHSLAPMYRGAQAAIVVYDITNTDTFARAKNWKELQ	120
	* : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	
DdRab5A	RQGSPIVIALAGNKLDLAAKRVETAEAQQYAEENGLLFMETSAKTSQNVNELFVEIAK	168
HsRab5a	RQASPIVIALSGNKADLANKRAVDFQEAQSYADDNSLLFMETSAKTSMNVNEIFMAIAK	179
HsRab5b	RQASPSIVIALAGNKADLANKRMVEYEEAQAYADDNSLLFMETSAKTAMNVNDFLAIK	179
HsRab5c	RQASPIVIALAGNKADLASKRAVEFQEAQAYADDNSLLFMETSAKTAMNVNEIFMAIAK	180
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	
DdRab5A	KLPKTPTRPGSGR--VAIAPIDNGTGKKNKCCN*	201
HsRab5a	KLPKNEPQNPANSARGRVDLLEPTQPTRNQCCSN	215
HsRab5b	KLPKSEPNLGGAAGRSRGVDLHEQSQQNKSQCCSN	215
HsRab5c	KLPKNEPQNTGAPGRNRGVDLQENNPASRSQCCSN	216
	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :	

Slika 8. Poravnate proteinske sekvence proteina Rab5A iz *D. discoideum* i humanih proteina Rab5. Za poravnavanje sekvenci korišten je program Clustal Omega.

4.2.2. Optimizacija uvjeta ekspresije i odabir rekombinantnog proteina GST-Rab5A_ΔCCN za afinitetno pročišćavanje

Nakon konstrukcije ekspresijskih vektora bilo je potrebno pronaći optimalne uvjete za ekspresiju rekombinantnih proteina GST-Rab5A_FL i GST-Rab5A_ΔCCN. U tu svrhu smo bakterije *E. coli* soja Rosetta 2 transformirali s priređenim plazmidima pGEX-6P-1_Rab5A_FL i pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN i odabrali po dva klon od svake transformacije za ispitivanje ekspresije. Krenuli smo s testiranjem trajanja indukcije tako da smo po indukciji ekspresije proteina IPTG-om, uzorke bakterijskih kultura skupljali nakon tri sata i nakon cijele noći. Ukupne proteine iz lizata neinduciranih i induciranih uzoraka bakterijskih kultura analizirali smo elektroforezom u denaturirajućim uvjetima i bojanjem gelova bojom Coomassie briljant plavo. Rezultati su prikazani na **Slici 9**. U jažicama koje sadrže inducirane uzorke može se uočiti deblja vrpca između vrpce 35 kDa i 55 kDa proteinskog standarda, a koja odgovara očekivanoj poziciji s obzirom na izračunate molekularne mase fuzijskih proteina GST-

Rab5A_FL i GST-Rab5A_ΔCCN koje iznose redom 49,1 kDa i 48,8 kDa. Ekspresija proteina vidljivo je snažnija kod indukcije koja traje preko noći u odnosu na onu koja traje tri sata te smo zaključili da dodatne optimizacije nisu potrebne. Također, protein GST-Rab5A_ΔCCN pokazuje bolju ekspresiju nakon indukcije (jažice 8, 9, 11 i 12) nego protein GST-Rab5A_FL (jažice 2, 3, 5 i 6). S obzirom na to i na pretpostavku da će protein kojem su deletirane aminokiseline potrebne za prenilaciju potencijalno biti bolje topiv, odlučeno je da će se bakterije koje eksprimiraju GST-Rab5A_ΔCCN, uz indukciju preko noći, koristiti za afinitetno pročišćavanje preko glutation-agaroze.

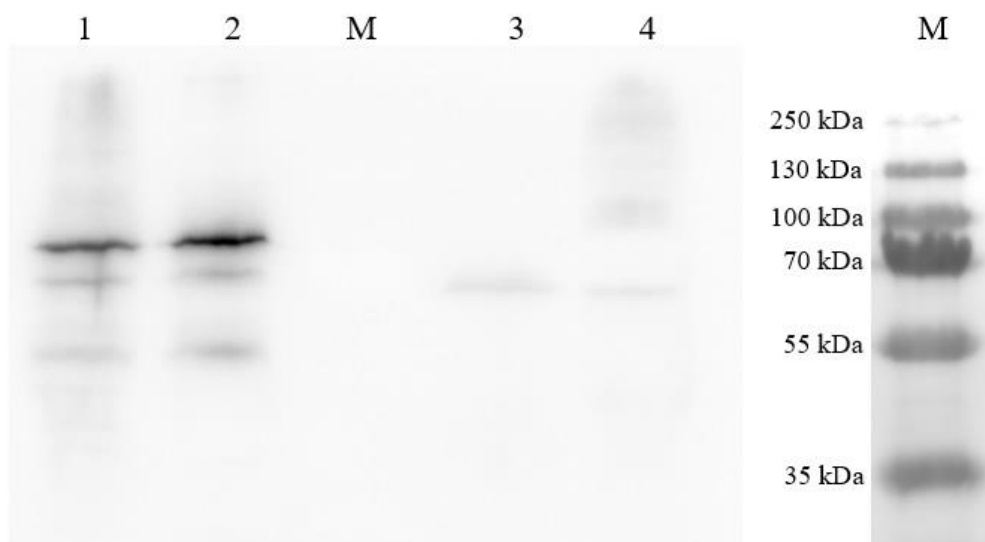


Slika 9. Ekspresija proteina GST-Rab5A_FL i GST-Rab5A_ΔCCN pri različitim trajanjima indukcije ekspresije analizirana elektroforezom u denaturirajućem gelu. Uzorci u jažicama: M – proteinski standard, 1-3 – klon 1 od transformacije s pGEX-6P-1_Rab5A_FL; neinducirani uzorak (1), uzorak induciran 3h (2) i preko noći (3); 4-6 – klon 2 od transformacije s pGEX-6P-1_Rab5A_FL; neinducirani uzorak (4), uzorak induciran 3h (5) i preko noći (6); 7-9 – klon 1 od transformacije s pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN; neinducirani uzorak (7), uzorak induciran 3h (8) i preko noći (9); 10-12 – klon 2 od transformacije s pGEX-6P-1_Rab5A_ΔCCN; neinducirani uzorak (10), uzorak induciran 3h (11) i preko noći (12); 13 – nerelevantno za ovaj rad. Istaknute molekulske mase odnose se na proteinski standard.

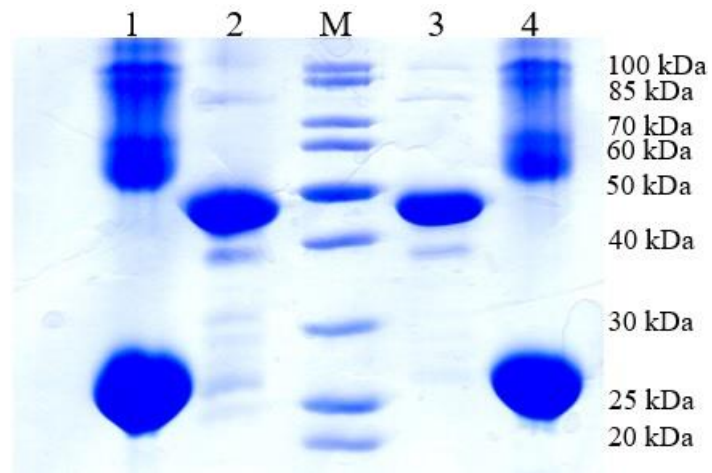
4.2.3. Proteini Rab5A_ΔCCN i IqgC stupaju u izravnu interakciju

Protein GST-Rab5A_ΔCCN pročišćen afinitetnom kromatografijom preko kolone glutation-agaroze, korišten je za ispitivanje interakcije s proteinom IqgC metodom *GST-pull-down*. Kao negativna kontrola korištena je pročišćena glutation-S-transferaza koja je na glutation-agarozu navezana kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.5.2. Pročišćeni protein

IqgC je dodan na kolone s navezanim GST-Rab5A_ΔCCN i GST, te su nakon inkubacije i ispiranja, proteini skuhan i analizirani metodom Western blot uz upotrebu anti-IqgC protutijela (**Slika 10.**). U jažici 2 vidi se intenzivna vrpca koja veličinom odgovara proteinu IqgC (91,8 kDa) što znači da se IqgC vezao na Rab5A_ΔCCN. Također, u jažici 1 je prisutna vrpca iste veličine, ali slabijeg intenziteta od one u jažici 2, što znači da se IqgC vezao i na sam GST. U jažicama 3 i 4 su uzorci sa skuhanih glutation-agarozu s navezanim GST i GST-Rab5A_ΔCCN proteinima kojima nije dodavan IqgC. Odsustvo vrpce karakteristične za IqgC u ovim uzorcima govori nam da se anti-IqgC protutijelo ne veže nespecifično ni na jednu od kolona. Ono što je problematično je da se IqgC očito veže i na sam GST. Stoga smo proteine iz istih uzoraka ponovno razdvojili elektroforezom u denaturirajućem gelu te smo gel pobojali bojom Coomassie briljant plavo (**Slika 11.**). U jažicama 1 i 4 vidljiva je debela vrpca na poziciji koja odgovara veličini proteina GST od oko 26 kDa. Izračunata veličina rekombinatnog proteina GST-Rab5A_ΔCCN iznosi 48,8 kDa što odgovara istaknutim vrpčama u jažicama 2 i 3. Iz količina GST-Rab5A_ΔCCN i GST proteina na gelu, vidljivo je da proteina GST ima više vezanog po volumenu glutation-agarozu nego GST-Rab5A_ΔCCN. Također, s obzirom da je GST navezivan na glutation-agarozu 2 puta, možemo pretpostaviti da je glutation-agarozu u slučaju GST maksimalno zasićena. S obzirom da je intenzitet vrpce IqgC oko dva puta jači u jažici 2 nego u jažici 1 na membrani na **Slici 10.**, zaključujemo da se IqgC veže na Rab5A_ΔCCN.



Slika 10. Western blot s anti-IqgC protutijelom za ispitivanje interakcije proteina Rab5A_ΔCCN i IqgC. Uzorci u jažicama: 1 – proteini skinuti s GST-glutation-agarozu nakon metode *pull-down* s proteinom IqgC, 2 – proteini skinuti s GST-Rab5A_ΔCCN-glutation-agarozu nakon metode *pull-down* s proteinom IqgC, M – proteinski standard, 3 – proteini skinuti s GST-Rab5A_ΔCCN-glutation-agarozu, 4 – proteini skinuti s GST-glutation-agarozu. Istaknute molekulske mase odnose se na proteinski standard.



Slika 11. Denaturirajuća gel-elektroforeza uzoraka korištenih u metodi *GST-pull-down* s proteinima GST-Rab5A_ΔCCN i IqgC. Uzorci u jažicama: 1 – proteini skinuti s GST-glutation-agaroze, 2 – proteini skinuti s GST-Rab5A_ΔCCN-glutation-agaroze, M – proteinski standard, 3 – proteini skinuti s GST-Rab5A_ΔCCN-glutation-agaroze nakon metode *pull-down* s proteinom IqgC, 4 – proteini skinuti s GST-glutation-agaroze nakon metode *pull-down* s proteinom IqgC. Istaknute molekulske mase odnose se na proteinski standard.

5. Rasprava

IqgC je atipičan protein IQGAP koji veže i inaktivira malu GTPazu RasG i na taj način negativno regulira proces makropinocitoze (Marinović i sur. 2019). RasG je do sada jedini potvrđeni interaktor proteina IqgC i oba proteina smještaju se na dijelove stanične membrane iz kojih će nastati makropinosomi i ostaju na zatvorenom makropinosomu nakon unosa u stanicu. Ipak, aktivni protein Ras ranije doseže maksimum vezanja i ranije započinje disocijaciju s makropinocitotske vezikule nego fluorescentno obilježeni IqgC, što je u skladu s ulogom IqgC u inaktivaciji RasG. Zadržavanje proteina IqgC na vezikuli u odsutnosti GTPaze RasG sugerira moguće druge, do sada nepotvrđene, proteinske ili fosfolipidne interaktore IqgC. U prethodnom istraživanju su pomoću spektrometrije masa identificirani svi proteini „uhvaćeni“ na rekombinantni protein GST-IqgC iz lizata stanica AX2 metodom *GST-pull-down* (Marinović i sur. 2019). Dinamika pojave fluorescentno obilježenog proteina IqgC sugerira uključenost u faze ranog sazrijevanja makropinosoma; recikliranje s novonastalog makropinosoma i/ili donošenje komponenti tipičnih za rani endosom (Vines i King 2019). Identifikacija dodatnih interaktora pomogla bi razjasniti nove, neistražene uloge IqgC koje su neovisne o RasG. Detaljnim pregledom cijelog interaktoma zaista su pronađeni potencijalni proteini kandidati za koje se zna da su uključeni u rane faze sazrijevanja makropinocitotskih vezikula poput GTPaza iz porodice Rab ili podjedinica V-ATPaze (Clarke i sur. 2010; Egami 2016). Preliminarni rezultati u laboratoriju potvrdili su da se IqgC nalazi u kompleksu s GTPazom Rab5, a cilj ovog rada bio je istražiti je li ta interakcija izravna. U tu svrhu opet smo se odlučili za metodu *GST-pull-down*, ali s pročišćenim proteinima. Metoda Western blot pokazala je da se pročišćeni IqgC veže na GST-Rab5A afinitetno pročišćen na koloni glutation-agaroze. S obzirom na nespecifično vezanje proteina IqgC i na kolonu s proteinom GST (vidi *Sliku 10.*), u budućnosti bi bilo od interesa pokazati interakciju IqgC i Rab5 još nekom metodom. Osim što smo utvrdili da je Rab5A izravni interaktor IqgC, konfokalnom mikroskopijom živih stanica, koje koeksprimiraju fluorescentno obilježene proteine IqgC i Rab5A, utvrdili smo da oni kolokaliziraju na makropinocitotskoj vezikuli nakon njenog zatvaranja (vidi *Sliku 7.*).

Što se tiče smještaja Rab5a u stanicama sisavaca, kod CDE Rab5a dolazi na zatvorene primarne endocitotske vezikule tijekom njihova sazrijevanja u rani endosom (He i sur. 2017). S druge strane, tijekom makropinocitoze potaknute faktorima rasta, na više staničnih linija je pokazano da se Rab5a smješta već u nabore plazmatske membrane iz kojih nastaju makropinosomi (Lanzetti i sur. 2004; Maxson i sur. 2021; Yoshida i sur. 2009). Također je opće

prihvaćeno da je aktivni Rab5a potreban za makropinocitozu, dok ekspresija dominantno negativnog oblika ove GTPaze značajno inhibira unos tekućine (Lanzetti i sur. 2004; Maxson i sur. 2021). U prilog pozitivnoj ulozi Rab5a u nastanku makropinosoma govori i činjenica da prekomjerna ekspresija njegovog efektora rabankirina-5, koji se također smješta na makropinosome, povećava njihov broj i stimulira unos tekućine (Schnatwinkel i sur. 2004). Aktivnost Rab5a tijekom makropinocitoze regulirana je proteinima RabGAP-5 i RN-tre koji ga inaktiviraju, te proteinom ALS2 koji aktivira Rab5a. Promjena njihove ekspresije dovodi do inhibicije stvaranja nabora membrane, destabilizacije i sprječavanja ranog sazrijevanja makropinosoma što sve upućuje na potrebu ispravno reguliranog proteina Rab5a za ranu fazu sazrijevanja makropinosoma (Feliciano i sur. 2011; Lanzetti i sur. 2004; Morishita i sur. 2018).

Detaljnija analiza dinamike vezanja Rab5a na nastajućim makropinosomima isprva je dala kontradiktorne rezultate. U COS-7 stanicama, koje u nestimuliranom stanju sadrže Rab5-pozitivne endosome raspoređene po citosolu i u određenom dijelu perinuklearno, stimulacija EGF-om dovodi do pojavljivanja Rab5a na novonastajućim makropinosomima na periferiji. Međutim, usporedba s probom za PIP₂ pokazala je da Rab5a dolazi tek na zatvorene makropinosome nakon deplecije PIP₂ s membrane (Porat-Shliom i sur. 2008). Suprotno tome, kasnija istraživanja na istim stanicama, ali i na makrofagima koštane srži, pokazala su postepen dolazak Rab5a i stvaranje PI3P još prije zatvaranja makropinocitotske čašice, sugerirajući da bi Rab5a mogao imati ulogu u njihovu zatvaranju (Morishita i sur. 2018; Yoshida i sur. 2009). Zaista, recentno istraživanje potvrdilo je ovu pretpostavku. Maxson i suradnici (2021.) su na A431 stanicama stimuliranim epidermalnim faktorom rasta pokazali da Rab5a dolazi na nastajuće kružne nabore membrane i otvorene makropinocitotske čašice u obliku Rab5a-pozitivnih endocitotskih vezikula koje se, posredovanjem kompleksa SNARE (engl. *SNAP receptor*), fuzioniraju s plazmatskom membranom. Tamo aktivni Rab5a aktivira inozitol polifosfat 5-fosfataze Inpp5b i OCRL, koje defosforiliraju PIP₂ prisutan u membrani u PI4P, što je esencijalno za zatvaranje makropinocitotske čašice i završavanje makropinocitoze (Welliver i Swanson 2012).

U literaturi nema podataka o smještaju Rab5A iz amebe *Dictyostelium* na makropinosome. Do sada je samo pokazano prisustvo Rab5A na fagocitotskim vezikulama (Barisch i sur. 2015; Hoffmann i sur. 2014). U ovom radu smo, tijekom praćenja prostorno-vremenske raspodjele YFP-IqgC i mRFP-Rab5A u živim stanicama, uočili vezanje Rab5A na već zatvorene makropinosome, vjerojatno nakon ili oko perioda u kojem s vezikule disocira RasG. Naime, s obzirom da aktivni Ras disocira nešto prije IqgC, a IqgC se djelomično preklapa

s Rab5A na makropinosomu, moguće je i vremensko preklapanje s RasG. Zanimljivo je da je u nekim stanicama Rab5A bio prisutan od početka makropinocitoze na membrani, da bi se po unosu izgubio te kasnije ponovno pojavio i nastavio progresivno pojačavati. Za sada još nismo sigurni je li prisutnost Rab5A na membrani odraz prekomjerne ekspresije ili ima i fiziološku ulogu kao u stanicama sisavaca. Osim smještaja na makropinosomima, Rab5A iz amebe *Dictyostelium* je, kao i Rab5a sisavaca, prisutan na velikom broju endocitotskih vezikula u citosolu. Također je snažno prisutan u perinuklearnom području gdje je vidljiv u toliko jačem intenzitetu u odnosu na perifernu lokalizaciju da omjer tih intenziteta daleko nadmašuje dinamički raspon detektora konfokalnog mikroskopa. Zbog toga je perinuklearni signal tijekom praćenja makropinosoma gotovo uvijek u zasićenju (vidi **Sliku 7.**). Perinuklearni smještaj Rab5a na velikim vezikulama opisan je i u stanicama sisavaca (Ali i sur. 2004; Bucci i sur. 1992; Lanzetti i sur. 2004; Porat-Shliom i sur. 2008).

Fiziološki značaj interakcije IqgC i Rab5A je za sada nepoznat i o njemu možemo samo spekulirati. S obzirom da se radi o izravnoj interakciji s malom GTPazom iz natporodice Ras, prva pomisao je da bi ovaj RasGAP mogao utjecati i na GTPaznu aktivnost Rab5A. Ipak, iako su iz literature poznati primjeri proteina RasGAP koji pokazuju aktivnost GAP prema GTPazama Ras i Rap (Krapivinsky i sur. 2004; Kupzig i sur. 2006), do sada nema primjera dvostruke aktivnosti GAP prema GTPazama iz porodica Ras i Rab. Ono što se čini kao realističnija mogućnost je da vezanje Rab5A na IqgC utječe na aktivnost GAP proteina IqgC prema RasG. Primjerice, humani p120GAP, koji je protein RasGAP, osim GTPaze H-Ras veže i Rap1A, također preferencijalno u GTP-formi, ali ne stimulira GTPaznu aktivnost Rap1A (Cullen i sur. 1995; Frech i sur. 1990). U tom smislu je moguće da se RasG i Rab5A natječu za vezanje na IqgC ili da vezanje Rab5A utječe na aktivnost RasGAP proteina IqgC. Ova hipoteza je donekle u skladu s prostorno-vremenskom raspodjelom Rab5A čiji se intenzitet na makropinosomu pojavljuje i započinje progresivno pojačavati istovremeno sa slabljenjem IqgC signala, te netom prije, i RasG signala. Konačno, moguće je i da IqgC koji, unatoč svojoj aktivnosti GAP, sadrži GRD-RGCT organizaciju domena tipičnu za proteine IQGAP (Van Dam i sur. 2011), djeluje kao tipični IQGAP te tvori okosnicu na kojoj se integriraju Ras i Rab signalni putevi tijekom ranog sazrijevanja makropinocitotske vezikule. Kako bilo, razjašnjavanje značaja ove interakcije zahtijeva dodatne eksperimente, kako biokemijske pristupe *in vitro* tako i konfokalnu mikroskopiju *in vivo* s dodatnim molekularnim markerima u stanicama divljeg tipa, ali i mutantima *iqgC* i *rab5A*.

6. Zaključak

Cilj ovog rada bio je usporediti prostorno-vremenske raspodjele proteina IqgC i Rab5A u živim stanicama *D. discoideum* te ispitati prirodu njihove interakcije. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Proteini IqgC i Rab5A kolokaliziraju na zatvorenom makropinosomu pri čemu IqgC disocira s makropinosoma znatno prije nego što Rab5A dosegne maksimalni intenzitet.

2. Protein IqgC se izravno veže na protein Rab5A.

Iako smo pokazali da proteini IqgC i Rab5A kolokaliziraju u stanicama *D. discoideum* te da stupaju u izravnu interakciju, za razjašnjavanje fiziološkog značaja ove interakcije potrebna su daljnja istraživanja.

7. Literatura

- Adachi H., Takahashi Y., Hasebe T., Shirouzu M., Yokoyama S., Sutoh K. (1997). Dictyostelium IQGAP-related Protein Specifically Involved in the Completion of Cytokinesis. *J Cell Biol* **137**: 891–898.
- Ali B.R., Wasmeier C., Lamoreux L., Strom M., Seabra M.C. (2004). Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**: 6401–6412.
- Andres D.A., Seabra M.C., Brown M.S., Armstrong S.A., Smeland T.E., Cremers F.P.M., Goldstein J.L. (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**: 1091–1099.
- Barbieri M.A., Roberts R.L., Gumusboga A., Highfield H., Alvarez-Dominguez C., Wells A., Stahl P.D. (2000). Epidermal growth factor and membrane trafficking: EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a. *J Cell Biol* **151**: 539–550.
- Barisch C., López-Jiménez A.T., Soldati T. (2015). Live imaging of Mycobacterium marinum infection in Dictyostelium discoideum. *Methods Mol Biol* **1285**: 369–385.
- Barr F., Lambright D.G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 461–470.
- Bloomfield G., Traynor D., Sander S.P., Veltman D.M., Pachebat JA., Kay RR. (2015). Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in Dictyostelium. *Elife* **2015**: 1–25.
- Bos J.L., Rehmann H., Wittinghofer A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* **129**: 865–877.
- Boudhraa Z., Carmona E., Provencher D., Mes-Masson A-M. (2020). Ran GTPase: A Key Player in Tumor Progression and Metastasis. *Front Cell Dev Biol* **8**: 1–16.
- Brill S., Li S., Lyman C.W., Church D.M., Wasmuth J.J., Weissbach L., Bernards A., Snijders A.J. (1996). The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol Cell Biol* **16**: 4869–4878.
- Bucci C., Lütcke A., Steele-Mortimer O., Olkkonen V.M., Dupree P., Chiariello M., Bruni C.B., Simons K., Zerial M. (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three RAB5 isoforms. *FEBS Lett* **366**: 65–71.

- Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**: 715–728.
- Buckley C.M., Gopaldass N., Bosmani C., Johnston S.A., Soldati T., Insall R.H., King J.S. (2016). WASH drives early recycling from macropinosomes and phagosomes to maintain surface phagocytic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E5906–E5915.
- Buckley C.M., King J.S. (2017). Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. *FEBS J* **284**: 3778–3790.
- Cao X. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* **17**: 2156–2165.
- Carroll K.S., Hanna J., Simon I., Krise J., Barbero P., Pfeffer S.R. (2001). Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* **292**: 1373–1376.
- Christoforidis S., Miaczynska M., Ashman K., Wilm M., Zhao L., Yip S-C., Waterfield M.D., Backer J.M., Zerial M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**: 249–252.
- Clarke M., Maddera L., Engel U., Gerisch G. (2010). Retrieval of the vacuolar H⁺-ATPase from phagosomes revealed by live cell imaging. *PLoS One* **5**: 1–14.
- Cox A.D., Der C.J. (2002). Ras family signaling: Therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther* **1**: 599–606.
- Cox A.D., Der C.J. (2010). Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**: 2–27.
- Cullen P.J., Hsuan J.J., Truong O., Letcher A.J., Jackson T.R., Dawson A.P., Irvine R.F. (1995). Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family. *Nature* **376**: 527–530.
- Cupit L.D., Schmidt V.A., Miller F., Bahou W.F. (2004). Distinct PAR/IQGAP expression patterns during murine development: Implications for thrombin-associated cytoskeletal reorganization. *Mamm Genome* **15**: 618–629.
- Van Dam T.J.P., Bos J., Snel B. (2011). Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators. *Small GTPases* **2**: 4–16.
- Dormann D., Vasiev B., Weijer C.J. (2000). The control of chemotactic cell movement during

- Dictyostelium morphogenesis. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* **355**: 983–991.
- Dumontier M., Höcht P., Mintert U., Faix J. (2000). Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in Dictyostelium. *J Cell Sci* **113**: 2253–2265.
- Egami Y. (2016). Molecular imaging analysis of Rab GTPases in the regulation of phagocytosis and macropinocytosis. *Anat Sci Int* **91**: 35–42.
- Eichinger L., Pachebat J.A., Glöckner G., Rajandream M-A., Sucgang R., Berriman M., et al. (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**: 43–57.
- Faix J., Clougherty C., Konzok A., Mintert U., Murphy J., Albrecht R., Mühlbauer B., Kuhlmann J. (1998). The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility. *J Cell Sci* **111**: 3059–3071.
- Faix J., Dittrich W. (1996). DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in Dictyostelium discoideum. *FEBS Lett* **394**: 251–257.
- Faix J., Steinmetz M., Boves H., Kammerer R.A., Lottspeich F., Mintert U., Murphy J., Stock A., Aebi U., Gerisch G. (1996). Cortexillins, Major Determinants of Cell Shape and Size, Are Actin-Bundling Proteins with a Parallel Coiled-Coil Tail. *Cell* **86**: 631–642.
- Faix J., Weber I., Mintert U., Köhler J., Lottspeich F., Marriott G. (2001). Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J* **20**: 3705–3715.
- Feliciano W.D., Yoshida S., Straight S.W., Swanson J.A. (2011). Coordination of the Rab5 Cycle on Macropinosomes. *Traffic* **12**: 1911–1922.
- Filić V., Marinović M., Faix J., Weber I. (2012). A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J Cell Sci* **125**: 387–398.
- Filić V., Marinović M., Faix J., Weber I. (2014). The IQGAP-related protein DGAP1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequester of Rac1 GTPases. *Cell Mol Life Sci* **71**: 2775–2785.
- Filić V., Mijanović L., Putar D., Talajić A., Četković H., Weber I. (2021). Regulation of the

- Actin Cytoskeleton via Rho GTPase Signalling in Dictyostelium and Mammalian Cells: A Parallel Slalom. *Cells* **10**: 1–39.
- Forbes G., Schilde C., Lawal H., Kin K., Du Q., Chen Z., Rivero F., Schaap P. (2021). Interactome and evolutionary conservation of Dictyostelid small GTPases and their direct regulators. *Small GTPases* **13**: 239–254.
- Frech M., John J., Pizon V., Chardin P., Tavitian A., Clark R., McCormick F., Wittinghofer A. (1990). Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product. *Science* **249**: 169–171.
- Friedberg F., Rivero F. (2010). Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in Dictyostelium discoideum: An inventory. *Mol Biol Rep* **37**: 2853–2862.
- Fujii M., Kawai K., Egami Y., Araki N. (2013). Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Sci Rep* **3**: 1–10.
- Fukata M., Kuroda S., Fujii K., Nakamura T., Shoji I., Matsuura Y., Okawa K., Iwamatsu A., Kikuchi A., Kaibuchi K. (1997). Regulation of Cross-linking of Actin Filament by IQGAP1, a Target for Cdc42. *J Biol Chem* **272**: 29579–29583.
- Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**: 873–885.
- Garcia-Mata R., Boulter E., Burridge K. (2011). The “invisible hand”: Regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 493–504.
- Gillingham A.K., Sinka R., Torres I.L., Lilley K.S., Munro S. (2014). Developmental Cell Resource Toward a Comprehensive Map of the Effectors of Rab GTPases. *Dev Cell* **31**: 358–373.
- Goody R.S., Wu Y., Itzen A. (2014). Prenylation of RabGTPases, Their Delivery to Membranes, and Rab Recycling. *Ras Superfamily Small G Proteins Biol Mech* **2** 3–16.
- Gurkan C., Lapp H., Alory C., Su A.I., Hogenesch J.B., Balch W.E. (2005). Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: The membrome. *Mol Biol Cell* **16**: 3847–3864.

- Hall A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* **40**: 1378–1382.
- Hart M.J., Callow M.G., Souza B., Polakis P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J* **15**: 2997–3005.
- He K., Marsland III R., Upadhyayula S., Song E., Dang S., Capraro B.R., Wang W., Skillern W., Gaudin R., Ma M., Kirchhausen T. (2017). Dynamics of phosphoinositide conversion in clathrin-mediated endocytic traffic. *Nature* **552**: 410–414.
- Hebert J.D., Tian C., Lamar J.M., Rickelt S., Abbruzzese G., Liu X., Hynes R.O. (2020). The scaffold protein IQGAP1 is crucial for extravasation and metastasis. *Sci Rep* **10**: 1–10.
- Hedman A.C., Smith J.M., Sacks D.B. (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Rep* **16**: 427–446.
- Hewlett L., Prescott A., Watts C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol* **124**: 689–703.
- Hoeller O., Bolourani P., Clark J., Stephens L.R., Hawkins P.T., Weiner O.D., Weeks G., Kay R.R. (2013). Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. *J Cell Sci* **126**: 4296–4307.
- Hoffmann C., Finsel I., Otto A., Pfaffinger G., Rothmeier E., Hecker M., Becher D., Hilbi H. (2014). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* **16**: 1034–1052.
- Homma Y., Hiragi S., Fukuda M. (2021). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J* **288**: 36–55.
- Horgan C.P., McCaffrey M.W. (2011). Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem Soc Trans* **39**: 1202–1206.
- Horiuchi H., Lippé R., McBride H.M., Rubino M., Woodman P., Stenmark H., Rybin V., Wilm M., Ashman K., Mann M., Zerial M. (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**: 1149–1159.
- Huotari J., Helenius A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* **30**: 3481–3500.
- Jin S.H., Akiyama Y., Fukamachi H., Yanagihara K., Akashi T., Yuasa Y. (2008). IQGAP2

- inactivation through aberrant promoter methylation and promotion of invasion in gastric cancer cells. *Int J cancer* **122**: 1040–1046.
- Jinawath N., Shiao M.S., Chanpanitkitchote P., Svasti J., Furukawa Y., Nakamura Y. (2020). Enhancement of migration and invasion of gastric cancer cells by IQGAP3. *Biomolecules* **10**: 1–18.
- Junemann A., Filić V., Winterhoff M., Nordholz B., Litschko C., Schwellenbach H., Stephan T., Weber I., Faix J. (2016). A Diaphanous-related formin links Ras signaling directly to actin assembly in macropinocytosis and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E7464–E7473.
- Kay R.R. (2021). Macropinocytosis: Biology and mechanisms. *Cells Dev* 1–10.
- Kay R.R., Williams T.D., Manton J.D., Traynor D., Paschke P. (2019). Living on soup: macropinocytic feeding in amoebae. *Int J Dev Biol* **63**: 473–483.
- Kee Y.S., Ren Y., Dorfman D., Iijima M., Firtel R., Iglesias P.A., Robinson D.N. (2012). A mechanosensory system governs myosin II accumulation in dividing cells. *Mol Biol Cell* **23**: 1510–1523.
- Kerr M.C., Lindsay M.R., Luetterforst R., Hamilton N., Simpson F., Parton R.G., Gleeson P.A., Teasdale R.D. (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J Cell Sci* **119**: 3967–3980.
- Kerr M.C., Teasdale R.D. (2009). Defining Macropinocytosis. *Traffic* **10**: 364–371.
- King J.S., Kay R.R. (2019). The origins and evolution of macropinocytosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **374**: 1–12.
- Krapivinsky G., Medina I., Krapivinsky L., Gapon S., Clapham D.E. (2004). SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. *Neuron* **43**: 563–574.
- Kumar D., Hassan M.K., Pattnaik N., Mohapatra N., Dixit M. (2017). Reduced expression of IQGAP2 and higher expression of IQGAP3 correlates with poor prognosis in cancers. *PLoS One* **12**: 1–23.
- Kumar D., Patel S.A., Hassan M.K., Mohapatra N., Pattanaik N., Dixit M. (2021). Reduced IQGAP2 expression promotes EMT and inhibits apoptosis by modulating the MEK-ERK

- and p38 signaling in breast cancer irrespective of ER status. *Cell Death Dis* **12**: 1–14.
- Kupzig S., Deaconescu D., Bouyoucef D., Walker S.A., Liu Q., Polte C.L., Daumke O., Ishizaki T., Lockyer P.J., Wittinghofer A., Cullen P.J. (2006). GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins. *J Biol Chem* **281**: 9891–9900.
- Kurella V.B., Richard J.M., Parke C.L., LeCour L.F., Bellamy H.D., Worthylake D.K. (2009). Crystal Structure of the GTPase-activating Protein-related Domain from IQGAP1. *J Biol Chem* **284**: 14857–14865.
- Kuroda S., Fukata M., Nakagawa M., Fujii K., Nakamura T., Ookubo T., Izawa I., Nagase T., Nomura N., Tani H., Shoji I., Matsuura Y., Yonehara S., Kaibuchi K. (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**: 832–835.
- Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G., Di Fiore P.P. (2004). Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* **429**: 309–314.
- Lee S., Shen Z., Robinson D.N., Briggs S., Firtel R.A. (2010). Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol Biol Cell* **21**: 1810–1824.
- Li G., D’Souza-Schorey C., Barbieri M.A., Roberts R.L., Klippel A., Williams L.T., Stahl P.D. (1995). Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10207–10211.
- Lippé R., Miaczynska M., Rybin V., Runge A., Zerial M. (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* **12**: 2219–2228.
- Machesky L.M. (1998). Cytokinesis: IQGAPs find a function. *Curr Biol* **8**: R202–R205.
- Maekawa M., Terasaka S., Mochizuki Y., Kawai K., Ikeda Y., Araki N., Skolnik E.Y., Taguchi T., Arai H. (2014). Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E978–E987.
- Marakasova E.S., Akhmatova N.K., Amaya M., Eisenhaber B., Eisenhaber F., Van Hoek

- M.L., Baranova A.V. (2013). Prenylation: From bacteria to eukaryotes. *Mol Biol* **47**: 622–633.
- Marinović M., Mijanović L., Šoštar M., Vizovišek M., Junemann A., Fonović M., Turk B., Weber I., Faix J., Filić V. (2019). IQGAP-related protein IqgC suppresses Ras signaling during large-scale endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 1289–1298.
- Mateer S.C., Wang N., Bloom G.S. (2003). IQGAPs: Integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery, and signaling networks. *Cell Motil Cytoskeleton* **55**: 147–155.
- Maxson M.E., Sarantis H., Volchuk A., Brumell J.H., Grinstein S. (2021). Rab5 regulates macropinocytosis by recruiting the inositol 5-phosphatases OCRL and Inpp5b that hydrolyse PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci* **134**: 1–13.
- McCallum S.J., Wu W.J., Cerione R.A. (1996). Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *J Biol Chem* **271**: 21732–21737.
- McLauchlan H., Newell J., Morrice N., Osborne A., West M., Smythe E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* **8**: 34–45.
- McNulty D.E., Li Z., White C.D., Sacks D.B., Annan R.S. (2011). MAPK scaffold IQGAP1 binds the EGF receptor and modulates its activation. *J Biol Chem* **286**: 15010–15021.
- Miki H., Suetsugu S., Takenawa T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* **17**: 6932–6941.
- Mondal S., Burgute B., Rieger D., Müller R., Rivero F., Faix J., Schleicher M., Noegel A.A. (2010). Regulation of the Actin Cytoskeleton by an Interaction of IQGAP Related Protein GAPA with Filamin and Cortexillin I. *PLoS One* **5**: 1–13.
- Morgan C.J., Hedman A.C., Li Z., Sacks D.B. (2019). Endogenous IQGAP1 and IQGAP3 do not functionally interact with Ras. *Sci Rep* **9**: 1–13.
- Morishita S., Wada N., Fukuda M., Nakamura T. (2018). Rab5 activation on macropinosomes requires ALS2, and subsequent Rab5 inactivation through ALS2 detachment requires active Rab7. *FEBS Lett* **593**: 230–241.
- Nielsen E., Christoforidis S., Uttenweiler-Joseph S., Miaczynska M., Dewitte F., Wilm M., Hoflack B., Zerial M. (2000). Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with

- hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* **151**: 601–612.
- Nojima H., Adachi M., Matsui T., Okawa K., Tsukita S., Tsukita S. (2008). IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **10**: 971–978.
- Norbury C.C., Hewlett L.J., Prescott A.R., Shastri N., Watts C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* **3**: 783–791.
- Noritake J., Watanabe T., Sato K., Wang S., Kaibuchi K. (2005). IQGAP1: A key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* **118**: 2085–2092.
- Porat-Shliom N., Kloog Y., Donaldson J.G. (2008). A Unique Platform for H-Ras Signaling Involving Clathrin-independent Endocytosis. *Mol Biol Cell* **19**: 765–775.
- Redka D.S., Gütschow M., Grinstein S., Canton J. (2018). Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis. *Mol Biol Cell* **29**: 53–65.
- Ren J.G., Li Z., Sacks D.B. (2007). IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10465–10469.
- Ridley A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**: 103–112.
- Rivero F., Xiong H. (2016). Rho Signaling in Dictyostelium discoideum. *Int Rev Cell Mol Biol* **322**: 61–181.
- Rojas A.M., Fuentes G., Rausell A., Valencia A. (2012). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* **196**: 189–201.
- Roy M., Li Z., Sacks D.B. (2004). IQGAP1 Binds ERK2 and Modulates Its Activity *. *J Biol Chem* **279**: 17329–17337.
- Roy M., Li Z., Sacks D.B. (2005). IQGAP1 Is a Scaffold for Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Mol Cell Biol* **25**: 7940–7952.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major

- histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**: 389–400.
- Schaap P. (2011). Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Development* **138**: 387–396.
- Schaf J., Damstra-Oddy J., Williams R.S.B. (2019). Dictyostelium discoideum as a pharmacological model system to study the mechanisms of medicinal drugs and natural products. *Int J Dev Biol* **63**: 541–550.
- Schmidt V.A., Scudder L., Devoe C.E., Bernards A., Cupit L.D., Bahou W.F. (2003). IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization. *Blood* **101**: 3021–3028.
- Schnatwinkel C., Christoforidis S., Lindsay M.R., Uttenweiler-Joseph S., Wilm M., Parton R.G., Zerial M. (2004). The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol* **2**: 1363–1380.
- Seabra M.C., Wasmeier C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 451–457.
- Semerdjieva S., Shortt B., Maxwell E., Singh S., Fonarev P., Hansen J., Schiavo G., Grant B.D., Smythe E. (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol* **183**: 499–511.
- Shannon K.B. (2012). IQGAP Family Members in Yeast, Dictyostelium, and Mammalian Cells. *Int J Cell Biol* **2012**: 1–14.
- Sheikh S., Thulin M., Cavender J.C., Escalante R., Kawakami S., Lado C., Landolt J.C., Nanjundiah V., Queller D.C., Strassmann J.E., Spiegel F.W., Stephenson S.L., Vadell E.M., Baldauf S.L. (2018). A New Classification of the Dictyostelids. *Protist* **169**: 1–28.
- Simonsen A., Lippe R., Christoforidis S., Gaullier J-M., Brech A., Callaghan J., Toh B-H., Murphy C., Zerial M., Stenmark H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**: 494–498.
- Smith J.M., Hedman A.C., Sacks D.B. (2015). IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus. *Trends Cell Biol* **25**: 171–184.
- Steinman R.M., Brodie S.E., Cohn Z.A. (1976). Membrane flow during pinocytosis: A

- stereologic analysis. *J Cell Biol* **68**: 665–687.
- Stenmark H., Vitale G., Ullrich O., Zerial M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**: 423–432.
- Stow J.L., Hung Y., Wall A.A. (2020). Macropinocytosis: Insights from immunology and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **65**: 131–140.
- Swanson J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 639–649.
- Sztul E., Chen P.W., Casanova J.E., Cherfils J., Dacks J.B., Lambright D.G., Lee F.J.S., Randazzo P.A., Santy L.C., Schürmann A., Wilhelmi I., Yohe M.E., Kahn R.A. (2019). Arf GTPases and their GEFs and GAPs: Concepts and challenges. *Mol Biol Cell* **30**: 1249–1271.
- Thottacherry J.J., Sathe M., Prabhakara C., Mayor S. (2019). Spoiled for Choice: Diverse Endocytic Pathways Function at the Cell Surface. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**: 55–84.
- Tolias K.F., Hartwig J.H., Ishihara H., Shibasaki Y., Cantley L.C., Carpenter C.L. (2000). Type I α phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* **10**: 153–156.
- Veltman D.M., Akar G., Bosgraaf L., Van Haastert P.J.M. (2009). A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**: 110–118.
- Veltman D.M., Williams T.D., Bloomfield G., Chen B.C., Betzig E., Insall R.H., Kay R.R. (2016). A plasma membrane template for macropinocytic cups. *Elife* **5**: 1–24.
- Vetter I.R., Wittinghofer A. (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **294**: 1299–1304.
- Vines J.H., King J.S. (2019). The endocytic pathways of *Dictyostelium discoideum*. *Int J Dev Biol* **63**: 461–471.
- Wang S., Watanabe T., Noritake J., Fukata M., Yoshimura T., Itoh N., Harada T., Nakagawa M., Matsuura Y., Arimura N., Kaibuchi K. (2007). IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci* **120**: 567–577.
- Wang Y., Boguski M., Riggs M., Rodgers L., Wigler M. (1991). Sari, a gene from

- Schizosaccharomyces pombe encoding a protein that regulates ras1. *CELL Regul* **2**: 453–465.
- Watanabe T., Wang S., Kaibuchi K. (2015). IQGAPs as key regulators of actin-cytoskeleton dynamics. *Cell Struct Funct* **40**: 69–77.
- Weissbach L., Settleman J., Kalady M.F., Snijders A.J., Murthy A.E., Yan Y.X., Bernards A. (1994). Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem* **269**: 20517–20521.
- Welliver T.P., Swanson J.A. (2012). A growth factor signaling cascade confined to circular ruffles in macrophages. *Biol Open* **1**: 754–760.
- Wennerberg K., Rossmann K.L., Der C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**: 843–846.
- White C.D., Brown M.D., Sacks D.B. (2009). IQGAPs in cancer: A family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* **583**: 1817–1824.
- White C.D., Erdemir H.H., Sacks D.B. (2012). IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cell Signal* **24**: 826–834.
- White C.D., Khurana H., Gnatenko D.V., Li Z., Odze R.D., Sacks D.B., Schmidt V.A. (2010). IQGAP1 and IQGAP2 are Reciprocally Altered in Hepatocellular Carcinoma. *BMC Gastroenterol* **10**: 1–10.
- Williams R.S.B., Boeckeler K., Gräf R., Müller-Taubenberger A., Li Z., Isberg R.R., Wessels D., Soll D.R., Alexander H., Alexander S. (2006). Towards a molecular understanding of human diseases using Dictyostelium discoideum. *Trends Mol Med* **12**: 415–424.
- Williams T.D., Paschke P.I., Kay R.R. (2019). Function of small GTPases in Dictyostelium macropinocytosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **374**: 1–11.
- Wu X.S., Rao K., Zhang H., Wang F., Sellers J.R., Matesic L.E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Hammer J.A. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* **4**: 271–278.
- Wu Y.W., Oesterlin L.K., Tan K.T., Waldmann H., Alexandrov K., Goody R.S. (2010). Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes. *Nat Chem Biol* **6**: 534–540.

- Xie Y., Kapoor A., Peng H., Cutz J.C., Tao L., Tang D. (2015). IQGAP2 displays tumor suppression functions. *J Anal Oncol* **4**: 86–93.
- Yang Y., Zhao W., Xu Q.W., Wang X.S., Zhang Y., Zhang J. (2014). IQGAP3 promotes EGFR-ERK signaling and the growth and metastasis of lung cancer cells. *PLoS One* **9**: 1–10.
- Yoshida S., Hoppe A.D., Araki N., Swanson J.A. (2009). Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages. *J Cell Sci* **122**: 3250–3261.
- Yuan W., Song C. (2020). The Emerging Role of Rab5 in Membrane Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Biochem Res Int* **2020**: 1–10.
- Zhen Y., Stenmark H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **128**: 3171–3176.

<http://dictybase.org>

<https://ecocyc.org/>

lifescience-market.com

8. Životopis

Rođena sam 25. kolovoza 1997. godine u Zagrebu gdje sam završila Osnovnu školu kralja Tomislava te stekla zvanje farmaceuskog tehničara u Zdravstvenom učilištu. Po završetku srednje škole upisala sam preddiplomski studij Eksperimentalne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja, dvije godine sam primala STEM stipendiju za izvrsnost. 2019. godine upisala sam diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studiranja bila sam demonstrator na kolegiju Kralježnjaci te sam sudjelovala u manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ u sklopu radionice „Bioakustika“. Aktivno se služim engleskim jezikom.