

Detekcija proteinskih interakcija domene MIU proteina SPRTN uslijed oštećenja DNA

Blažević, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:557104>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivan Blažević

**Detekcija proteinskih interakcija domene
MIU proteina SPRTN uslijed oštećenja DNA**

Diplomski rad

Zagreb, 2023

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje raka pri Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, pod mentorstvom Prof. dr. sc. Ivane Marinović Terzić, te komentorstvom Izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem svim članovima Laboratorija za istraživanje raka na velikodušnom prihvaćanju u svoje radno okruženje. Hvala na svim danim savjetima kao i vrhunskoj atmosferi u laboratoriju koja je omogućila da svaki dan proveden s Vama bude nezaboravan.

Veliko hvala mentorici, Prof. dr. sc. Ivani Marinović Terzić na ukazanom povjerenju, susretljivosti, razumijevanju, danim smjernicama te svom posvećenom vremenu.

Veliko hvala komentorici, Izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na podršci tokom pisanja ovog rada.

Hvala mag. chem Mateu Glumcu na pristupačnosti, početnom strpljenju, brojnim protokolima te svom prenesenom znanju i laboratorijskim vještinama.

Također hvala svim mojim prijateljima, bez vas bi se ovo petogodišnje studiranje doimalo kao vječnost.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima: bez vašeg strpljenja, razumijevanja te ljubavi i vjere u mene ovo ništa ne bi bilo moguće!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
rad

Diplomski

Detekcija proteinskih interakcija domene MIU proteina SPRTN uslijed oštećenja DNA

Ivan Blažević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nesmetano odvijanje osnovnih procesa poput replikacije, transkripcije te popravka DNA esencijalni su za opstanak stanice. Prisustvo specifičnog tipa oštećenja pod nazivom kovalentno vezanje proteina na DNA (engl. DNA-protein crosslink, DPC) onemogućava odvijanje osnovnih staničnih procesa, čime se narušava stanična homeostaza. Zato što akumulacija DPC u stanici doprinosi razvoju tumora te starenju, humana proteaza SPRTN, koja je usko vezana uz proteolitički popravak DPC, predmet je brojnih istraživanja. U ovom radu pozornost je stavljena na nekarakteriziranu domenu MIU proteina SPRTN. Testirali smo interakcijske partnere domene MIU, te time pokušali predvidjeti njenu funkciju koju obavlja za vrijeme proteolitičkog uklanjanja DPC. Tumorske stanične linije HeLa i HepG2 su tretirane formaldehidom i UV-zračenjem u svrhu indukcije DPC. Korištenjem metode *pulldown* ispitali smo interakciju domene MIU s proteinima XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 te proteinima koji su obilježeni s ubikvitinom ili SUMO-2/3 posttranslacijskom modifikacijom. Interakcija proteina je provjerena metodom *Western blot*. Domena MIU nije vezala ni jedan testirani protein. Protein XRCC1 te PMS2 su definirani kao novi C-terminalni interaktori proteina SPRTN dok je za CHK1 ustanovljeno da se veže za N-terminalni dio proteina SPRTN.

Ključne riječi: kovalentno vezanje proteina, starenje, proteinske interakcije, obaranje proteina (65 stranica, 20 slika, 5 tablica, 76 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Ivana Marinović Terzić

Komentor: Izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: (navesti datum sjednice Povjerenstva za diplomske radove na kojoj je rad prihvaćen)

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
thesis

Master

Detection of protein interactions of the MIU domain of SPRTN due to DNA damage

Ivan Blažević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The unobstructed performance of basic processes, such as DNA replication, transcription and repair, is essential for cell survival. The presence of a specific type of damage called DNA-protein crosslink (DPC) prevents the execution of basic cellular processes, thereby disrupting cellular homeostasis. Due to the fact that an accumulation of DPC in cells contributes to tumor development and aging, a human protease SPRTN, closely related to the proteolytic repair of DPC, is the subject of numerous studies. This study focuses on the MIU domain, an uncharacterized domain of SPRTN protein. We tested interaction partners of the MIU domain, and thereby tried to predict its function during the proteolytic removal of DPC. For the purpose of DPC induction, tumor cell lines HeLa and HepG2 were treated with formaldehyde and UV radiation. Using the pulldown method, we examined interactions of the MIU domain with XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 and proteins labeled with ubiquitin or SUMO-2/3 post-translational modification. Protein interactions were verified by a Western blot method. The MIU domain did not bind any tested protein. The XRCC1 and PMS2 proteins were defined as new C-terminal interactors of SPRTN protein, while CHK1 was found to bind the N-terminal part of SPRTN protein.

Keywords: DPC, aging, protein interaction, pulldown
(65 pages, 20 figures, 5 tables, 76 references, original in: Croatian)
The thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof., PhD Ivana Marinović Terzić
Co-mentor: Assoc. Prof., PhD Nataša Bauer

Reviewers:

Assoc. Prof. Nataša Bauer, PhD
Assoc. Prof. Martina Šeruga Musić, PhD
Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kovalentno vezanje proteina na DNA (engl. DNA-protein crosslink, DPC).....	2
1.2. Vrste DPC-a	4
1.3. Mehanizmi popravka DPC	6
1.3.1. Direktna hidroliza kovalentne veze	6
1.3.2. Ekscizijski popravak nukleazama.....	7
1.3.3. Popravak posredovan proteazama	8
1.4. DNA-ovisna metaloproteaza SPRTN.....	10
1.4.1. Otkriće DPC proteaze SPRTN	10
1.4.2. Organizacija domena proteina SPRTN.....	11
1.4.3. Regulacija metaloproteaze SPRTN	12
1.5. Cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Materijali	15
2.1.1. Kemikalije	15
2.1.2. Pufferi	17
2.1.3. Uređaji i oprema	19
2.1.4. Markeri veličina	19
2.1.5. Mediji za uzgoj bakterija	20
2.1.6. Bakterijski soj.....	20
2.1.7. Plazmidi.....	20
2.1.8. Aminokiselinske sekvence delecijских varijanti proteina SPRTN	22
2.1.9. Stanične linije.....	23
2.2. Metode.....	24
2.2.1 Sterilizacija.....	24
2.2.2. Kultura stanica.....	24
2.2.2.1. Tretman stanica formaldehidom.....	25
2.2.2.2. Tretman stanica UV-zračenjem	25
2.2.3. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica.....	27
2.2.4. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica toplinskim šokom	27
2.2.5. Indukcija ekspresije varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom.....	28
2.2.6. Ekstrakcija proteina iz bakterija	29
2.2.7. Purifikacija GST-fuzijskih proteina afinitetnom kromatografijom	29

2.2.8. Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-PAGE)	30
2.2.9. Hibridizacija po Westernu	31
2.2.9.1. Transfer proteina na membranu	32
2.2.9.2. Blokiranje i inkubacija s protutijelima	32
2.2.9.3. Detekcija ciljanih proteina na nitroceluloznoj membrani	34
2.2.10. <i>Pulldown</i> analiza	35
3. REZULTATI	36
3.1. Prekomjerna ekspresija i purifikacija varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom .	36
3.2 Ispitivanje proteinskih interakcija varijanti proteina SPRTN i proteina stanične linije HeLa	39
3.4. Ispitivanje proteinskih interakcija varijanti proteina SPRTN i proteina stanične linije HepG2.	44
3.5. Ispitivanje interakcija proteina SPRTN s proteinima obilježenim ubikvitinom ili SUMO proteinima	49
4. RASPRAVA	52
4.1. Uspješnost ekspresije i pročišćavanja varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom	52
4.2. MIU domena	54
4.3. Proteini PCNA, VCP, XRCC1 te PMS2 kao C-terminalni interaktori proteina SPRTN	56
4.4. Protein CHK1 kao N-terminalni interaktor proteina SPRTN	57
5. ZAKLJUČAK	59
6. LITERATURA	60

KRATICE

reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS)

reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS)

popravljanje krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR)

nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ)

kovalentno povezivanje proteina na DNA (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC)

topoizomeraza 1 (TOP1)

topoizomeraza 2 (TOP2)

tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (TDP1)

tirozil-DNA fosfodiesteraza 2 (TDP2)

peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP).

MIU (engl. *motif interacting with ubiquitin*)

SprT (engl. *SprT-like domain*)

BR (engl. *basic region*)

SHP (engl. *VCP-interacting motif*)

PIP (engl. *PCNA-interacting motif*)

UBZ (engl. *ubiquitin binding domain*)

optičke gustoća (engl. *optical density*, OD)

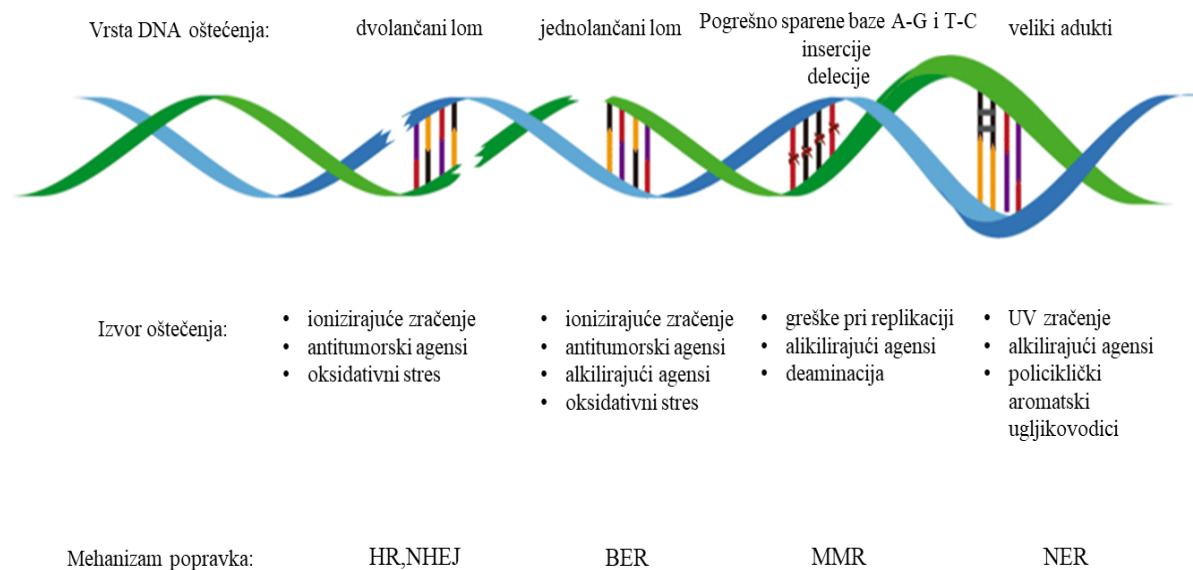
VCP (engl. *Valosin-containing protein*)

PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

XRCC1 (engl. *X-ray cross complementing group 1 protein*)

1.UVOD

DNA predstavlja izvor genetske informacije te je stoga očuvanje njezinog integriteta bitno za održavanje života. Svaka ljudska stanica doživljava više od 10 000 DNA oštećenja dnevno, od kojih je većina obično uzrokovana normalnim staničnim procesima (Jackson i Bartek, 2009). Na primjer, spontane pogreške DNA polimeraze tijekom replikacije DNA mogu rezultirati ugradnjom pogrešnih nukleotida u novosintetiziranu molekulu DNA, uzrokujući pogrešno sparivanje dušičnih baza. Također, reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kao i reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), koje nastaju kao međuprodukti fizioloških procesa, odgovorne su za različite vrsta DNA oštećenja uključujući nastanak apurinskih ili apirimidinskih mjesta te formiranje jednolančanih ili dvolančanih lomova (Hegde i sur., 2012). Stvaranju promjena unutar DNA također doprinosi i izlaganje ionizirajućem ili ultraljubičastom zračenju čime se formiraju pirimidinski dimeri i 6,4 fotoproducti (Carusillo i Mussolino, 2020). Koliko je DNA izložena oštećenju govore podaci iz rada Berstain i sur. (2013) koji su procijenili da jedna humana stanica unutar 24 sata pretrpi otprilike 55 000 jednolančanih lomova, 10 dvolančanih lomova, 200 deaminacija citozina, 9000 depurinacija, 700 depirimidinacija te oko 10 000 oksidativnih oštećenja. Kako bi se osigurao vjeran prijenos genetskih informacija, stanice su za svaki tip oštećenja razvile specifičan mehanizam popravka (Slika 1). Krupna oštećenja uzrokovana UV zračenjem se popravljaju ekscizijom nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER). Manja oštećenja kao što su alkilirane, oksidirane ili deaminirane baze se popravljaju ekscizijom baza (engl. *base excision repair*, BER). Pogrešno ugrađeni nukleotidi u novosintetiziranom lancu se popravljaju popravkom krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR) dok se dvolančani lomovi popravljaju homolognom rekombinacijom (HR) ili nehomolognim spajanjem krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) (Chatterjee i Walker, 2017). Posljednjih desetljeća, zbog svoje važnosti, mehanizmi popravka DNA temeljito su istraženi te kao rezultat identificirani su ključni čimbenici i signalne kaskade karakteristične za pojedini tip lezije (Sancar i sur., 2004). Usprkos tome, postoji specifičan tip oštećenja pod nazivom kovalentno povezivanje proteina na DNA (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC), koje unatoč svojoj velikoj učestalosti i toksičnosti nema u potpunosti razjašnjen mehanizam popravka.

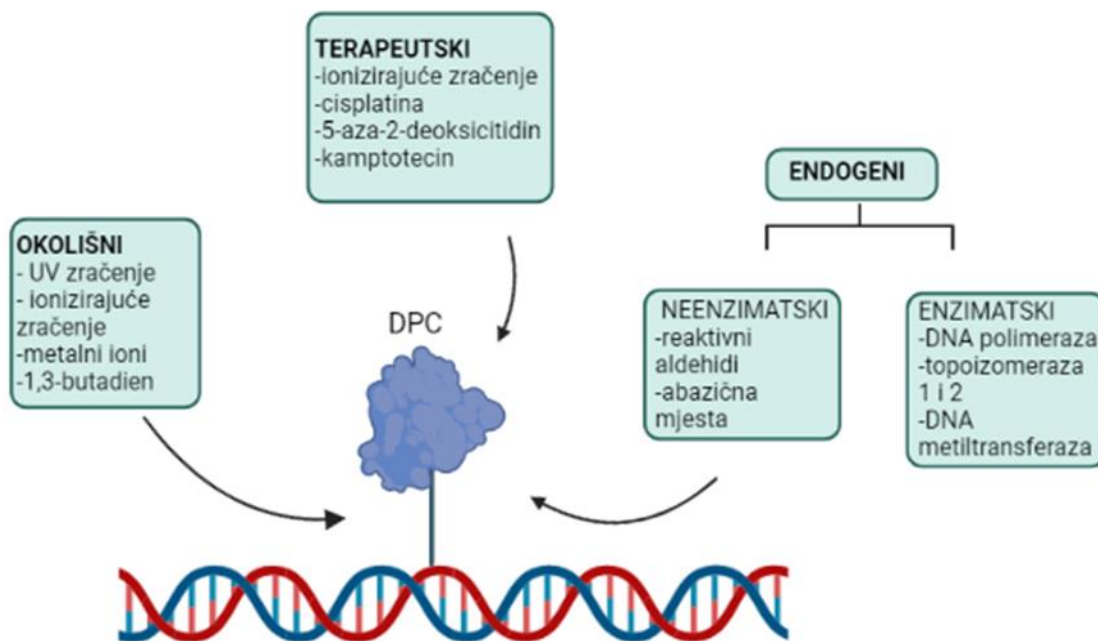


Slika 1. Shematski prikaz različitih vrsta DNA oštećenja te odgovarajućih mehanizama popravka. HR, homologna rekombinacija; NHEJ, nehomologno spajanje krajeva; BER, popravak ekscizijom baza; MMR, popravak krivo sparenih baza; NER, popravak ekscizijom nukleotida (preuzeto i prilagođeno prema Marconi i sur., 2020)

1.1. Kovalentno vezanje proteina na DNA (engl. DNA-protein crosslink, DPC)

Kovalentno vezanje proteina na DNA (engl. DNA-protein crosslink, DPC) specifičan je tip oštećenja molekule DNA pri čemu se stvaraju adukti koji narušavaju vitalnost i homeostazu stanice. Za uspješno odvijanje temeljnih staničnih aktivnosti kao što su replikacija, transkripcija i popravak DNA, brojni proteini trebaju stupiti u interakciju s molekulom DNA. Ove interakcije DNA-protein uglavnom su nekovalentne i precizno regulirane kako bi se spriječilo nepotrebno zadržavanje proteina na molekuli DNA. Međutim, proteini također mogu biti ireverzibilno zarobljeni na DNA kada se nađu izloženi reaktivnim tvarima koji potiču stvaranje kovalentnih veza (Kojima i Machida, 2020). Indukcija kovalentnog vezanja proteina na dušične baze, šećere ili prekinutu fosfodietersku vezu DNA može biti potaknuta djelovanjem okolišnih čimbenika, endogenih čimbenika ili farmaceutika (Slika 2) (Stingele i sur., 2017). Prema mehanizmu nastanka, DPC se dijele na one nastale ionizirajućim zračenjem, kemijskim povezivanjem te neuspješnim reakcijama enzima koji stupaju u kontakt s DNA (Ide i sur., 2018). Formiranje DPC posredovano ionizirajućim zračenjem (gama i X

zrake) odvija se na dva načina: direktnim i indirektnim putem. Direktnim putem baza unutar DNA se ionizira, pri čemu se formira DNA radikal koji je nestabilan i izrazito reaktivan. Zbog reaktivne prirode, radikal stupa u interakciju s proteinom koji je vezan za DNA (npr. histon) ili se nalazi u blizini DNA (npr. aktin) što rezultira nastankom DPC. Indirektnim putem, apsorpcijom energije ionizirajućeg zračenja molekula vode izbacuje elektrone te pritom u stanici uzrokuje nakupljanje hidroksilnog radikala (OH^\cdot). OH^\cdot je kratkoživući, ali zbog svoje velike reaktivnosti može ionizirati brojne biološke makromolekule, uključujući i proteine. Posljedično, ionizirani proteini koji se nađu u blizini DNA reagiraju s njom, formirajući DPC. Nastanak DPC indirektnim djelovanjem ionizirajućeg zračenja puno je češći u odnosu na direktno djelovanje ionizirajućeg zračenja, pogodovano time što je ljudski organizam građen od 80 % vode (Nakano i sur., 2016). Kemijsko povezivanje uzrokovano je brojnim kemijskim spojevima, počevši od štetnih spojeva koji potječu iz okoliša (1,3-butadien), oksidiranim raspadnim produktima metiliranih spojeva (aldehidi), sve do lijekova koji se koriste u liječenju tumora (cisplatina, 5-aza-2-deoksicitidin). Među poznatijim kemijskim spojevima koji se koriste u eksperimentima za poticanje formiranja DPC *in vitro* i *in vivo* je formaldehid. Formaldehid stupa u interakciju s proteinskim bočnim ograncima cisteina, lizina i histidina stvarajući međuprodukt koji sadrži imino skupinu ($\text{C}=\text{N}$). U sljedećem koraku imino grupa intereagira s amino grupom baza DNA, kako bi se formirale različite vrste umreženih veza koje imaju različitu kemijsku stabilnost (Vaz i sur., 2017). Također, uslijed destruktivnog djelovanje ROS, RNS i aldehida, dvolančana uzvojnica DNA može pretrpjeti različite distorzije koje će spriječiti da određeni proteini poput topoizomerase 1 ili topoizomerase 2 izvrše svoju enzimatsku funkciju Tako se enzimatski intermedijeri na DNA stabiliziraju te nastaju DPC (Vaz i sur., 2017).



Slika 2. Različiti faktori koji uzrokuju formiranje DPC. (preuzeto i prilagođeno prema Stinglee i sur., 2017)

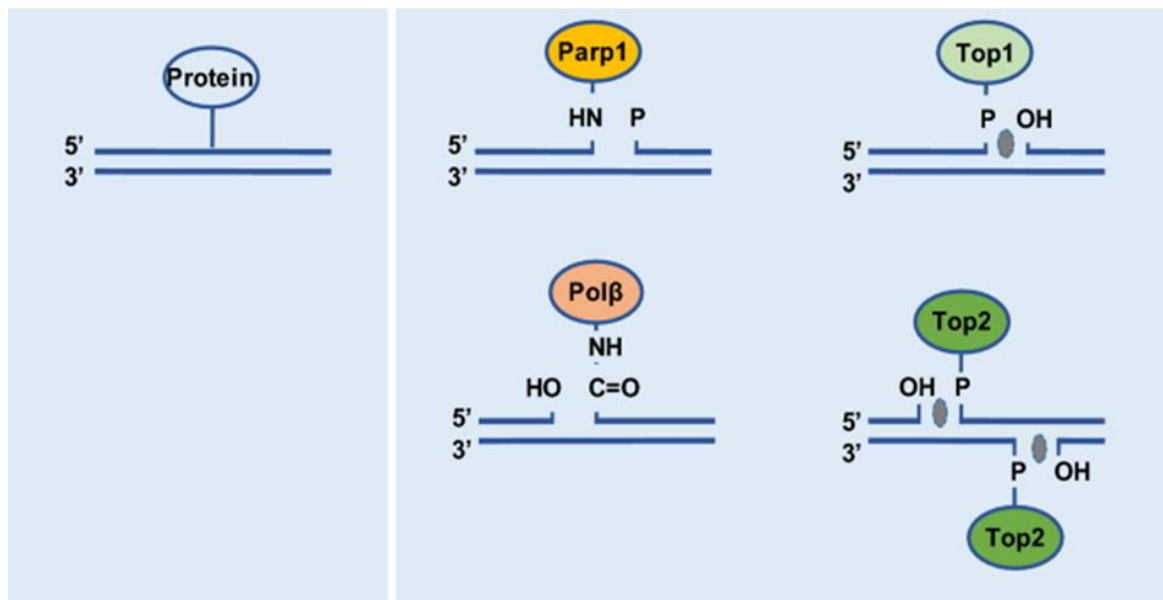
1.2. Vrste DPC-a

Na temelju svojstava kovalentno vezanih proteina, DPC se dijele u dvije osnovne kategorije: neenzimatski i enzimatski (Slika 3). Neenzimatski DPC su uzrokovani nespecifičnim kovalentnim povezivanjem proteina koji se nalaze u neposrednoj blizini DNA u trenutku izlaganja reaktivnim endogenim metabolitima poput aldehida, metalnim ionima ili zračenju (Zhang i sur., 2020). Izvor aldehida u stanici su brojni, pa tako peroksidacijom lipida nastaje malondialdehid, razgradnjom alkohola acetaldehid te u jezgri demetilacijom histona formaldehid. Zajednička karakteristika svim neenzimatskim DPC-ovima je da se vežu na neprekinuti lanac DNA. Enzimatski DPC uključuju samo određene enzime poput DNA topoizomerase, apurinske ili apirimidinske (AP) ligaze, poli (ADP-riboza) polimeraze 1 (PARP1), DNA metiltransferaze i DNA polimeraze (Stinglee i sur., 2015). Navedeni enzimi kako bi izvršili svoju funkciju, kovalentno se povezuju za DNA formirajući reakcijski međuprodukt. U normalnim okolnostima formirana kovalentna veza je prolazna te se enzimi nakon izvršene funkcije otpuštaju s DNA. Međutim, u slučaju nastanka distorzija dvolančane uzvojnice DNA ili pak djelovanjem specifičnih farmaceutika enzimi se ne otpuštaju s DNA,

već postaju zarobljeni formirajući stabilne DPC (Zhang i sur., 2020). Najistaknutiji i dobro proučeni primjer enzimatskog DPC je onaj koji uključuje topoizomeraze. Topoizomeraza 1 (TOP1) ublažava torzijski stres DNA uvođenjem jednolančanog loma. Pritom TOP1 ostaje kovalentno vezana za 3' kraj dok je 5'-OH kraj slobodan te svojom rotacijom oko DNA ublažava torzijski stres. Ponovnu ligaciju loma TOP1 može postići samo ako su dva kraja lanca DNA pravilno poravnata. To znači da će svako izobličenje strukture DNA koje narušava poravnavanje lanaca DNA dovesti do trajnog hvatanja TOP1 i stoga formiranja stabilnog DPC-a na mjestu uvedenog jednolančanog loma. (Stingele i Jentch., 2015) Najčešće se poravnavanje lanca spriječi postojanjem abazičnog mjesta u blizini loma ili upotrebom malih molekula poput kamptotecina. Slično, topoizomeraza 2 (TOP2) koja uvodi dvolančani lom može biti zarobljena na DNA i pridonijeti stvaranju DPC-a. Zajednička karakteristika svim enzimatskim DPC je kovalentno vezanje na mjestu loma DNA. TOP1 se veže preko tirozinil-fosfodieterske veze na 3' kraj jednolančanog loma, TOP2 tirozinil-fosfodieterskom vezom na 5' kraj dvolančanog loma te PARP1 na 3' kraj jednolančanog loma (Wei i sur., 2021).

Neenzimatski DPC

Enzimatski DPC



Slika 3. Prikaz neenzimatskih i enzimatskih DPC. Parp1, poli (ADP-riboza) polimeraza 1; Top1, topoizomeraza 1; Top2, topoizomeraza 2; Pol β, polimeraza β. (preuzeto i prilagođeno prema Zhang i sur., 2020.)

1.3. Mehanizmi popravka DPC

U usporedbi s pirimidinskim dimerima ili aduktima koje tvore policiklički aromatski ugljikovodici, DPC stvaraju mnogo veće lezije. Zbog svoje veličine, DPC predstavljaju steričke smetnje enzimima popravka DNA, DNA polimerazi i helikazi te RNA polimerazi. Posljedično tome, u stanici su zaustavljeni osnovni procesi kao što su popravak, sinteza i odmatanje DNA, transkripcija te u konačnici dioba (Stingele i Jentsch, 2015). Stanice obično otkrivaju DNA oštećenja pomoću visoko specifičnih senzornih molekula, koje otkrivaju različite vrste oštećenja s visokim afinitetom. Raznolikost DPC predstavlja problem za popravak pošto se potencijalno bilo koji nuklearni protein (proteini DNA popravka, histoni, transkripcijski faktori) može vezati na DNA. Međutim, unatoč raznolikosti, ono što je zajedničko svim DPC je da uvijek sadrže 3 različite komponente koje se mogu iskoristiti kao mete za popravak. Svaki DPC sadrži DNA komponentu koja se može cijepati nukleazama, kovalentnu vezu između proteina i DNA koja se može direktno hidrolizirati te proteinsku komponentu koja se može razgraditi djelovanjem proteaza (Slika 4) (Stingele i sur., 2017). Neispravan popravak DPC-a dovodi do pogrešne replikacije DNA i abnormalnosti staničnog ciklusa, što potencijalno otvara put kromosomskoj nestabilnosti te kancerogenezi (Nakamura i Nakamura, 2020).

1.3.1. Direktna hidroliza kovalentne veze

Ciljanje kovalentne veze kao mete popravka DPC predstavlja problem pošto joj je fizički teško pristupiti. Nadalje, kovalentna veza kojom se DPC zarobi za DNA se uvelike razlikuje po kemijskoj prirodi, što ovisi o aminokiselinskim ostacima staničnih proteina koji sudjeluju u njenom formiranju. Unatoč tome, određeni enzimatski DPC se javljaju s toliko velikom učestalošću da su se razvili specijalizirani enzimi koji ih uklanjaju upravo ciljanjem kovalentne veze. Tirozil-DNA fosfodiesteraza 1 (TDP1) i tirozil-DNA fosfodiesteraza 2 (TDP2) ciljaju kovalentnu vezu između DNA i tirozinskog aminokiselinskog ostatka smještenog u aktivnom mjestu enzima TOP1 i TOP2. Važnost TDP1 i TDP2 za ljudsko zdravlje očitava se učinkom mutacija zametne linije u genima koji kodiraju TDP1 i TDP2, što rezultira ljudskim sindromima s različitim patološkim stanjima (spinocerebralna ataksija, epilepsija, arefleksija). Također TDP ortolozi su prisutni kod svih eukariota, a njihov gubitak dovodi do preosjetljivosti na topoizomerazne inhibitore poput irinotekana, topotekana, etopozida (You i Gao, 2019). Početni korak u popravku TOP1-DPC obuhvaća djelomičnu

razgradnju enzima TOP1 posredovanu endogenom proteazom ili proteasomom. Taj korak je ključan jer tako TDP1 ima olakšan pristup 3'-fosfotirozilnoj vezi koju hidrolizira te time u potpunosti oslobađa protein s DNA. Kako bi se lezija u potpunosti sanirala potrebno je prisustvo enzima bifunkcionalne polinukleotid-kinaze/fosfataze (engl. *bifunctional polynucleotide kinase/phosphatase*, PNKP) koja će istovremeno ukloniti fosfatnu skupinu s 3' kraja i fosforilirati 5'-OH kraj čineći tako krajeve jednolančanog loma kompatibilnim za enzim DNA ligazu (El-Khamisy, 2011). Popravak TOP2-DPC se odvija na sličan način. Kako bi se dobio pristup DPC, TDP2 zahtjeva proteolitičku obradu TOP2 adukta. Time se olakša hidroliza 5'-fosfotirozilne veze što dovodi do oslobađanja TOP2. Preostali dvolančani lom se popravljaju nehomolognim spajanjem krajeva ili homolognom rekombinacijom (Gómez-Herreros i sur., 2013).

1.3.2. Ekscizijski popravak nukleazama

Enzimatski DPC se stvaraju na mjestu jednolančanog ili dvolančanog loma DNA. U slučajevima kada se DPC formira na krajevima dvolančanog loma (npr. kovalentno vezana TOP2), enzimi koji sudjeluju u popravku dvolančanog loma se mogu prenamijeniti i koristiti za popravak DPC. Takav je slučaj upravo s MRN proteinskim kompleksom, koji kod ljudi ima izvršnu funkciju u dva glavna puta popravka dvolančanog loma: HR i NHEJ. Kompleks se sastoji od proteina MRE11 (engl. *meiotic recombination 11*), RAD50 i NBS1 (engl. *Nijmegen breakage syndrome protein 1*) (Rupnik i sur., 2008). Korištenje ovog kompleksa za uklanjanje DPC je evolucijski visoko očuvana strategija (Lee i Paull, 2005). T4 bakteriofag koristi svoj MR kompleks (gp46/gp47) za popravak zarobljene Top2 (Onda i sur., 2001). *Escherichia coli* koristi kompleks SbcCD, koji je bakterijski ortolog MRN, za uklanjanje proteinskih adukata s krajeva DNA (Connelly i sur., 2003), dok *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* koriste MRX proteinski kompleks za uklanjanje Top1, Top2 i Spo11 adukata (Keeney i sur., 1997). Nedostatak jedne od komponenti kompleksa može dovesti do gubitka integriteta genoma. Gubitak funkcije Mre11 rezultira staničnom osjetljivošću na topoizomernu inhibiciju, a nedostatak NBS1 nakupljanjem TOP2 i SPO11 DPC. Ekscizijski popravak DPC započinje lokalizacijom MRN kompleksa na mjesto dvolančanog loma. Vezanje se ostvaruje preko MRE11 podjedinice kompleksa, pošto ona posjeduje DNA vezujuću domenu. Podjedinica MRE11 također ima endonukleaznu i egzonukleaznu aktivnost (Deshpande i sur., 2016). Prisustvo DPC stimulira endonukleaznu aktivnost MRE11 podjedinice, koja napravi početni urez u lancu koji sadrži DPC ili lancu

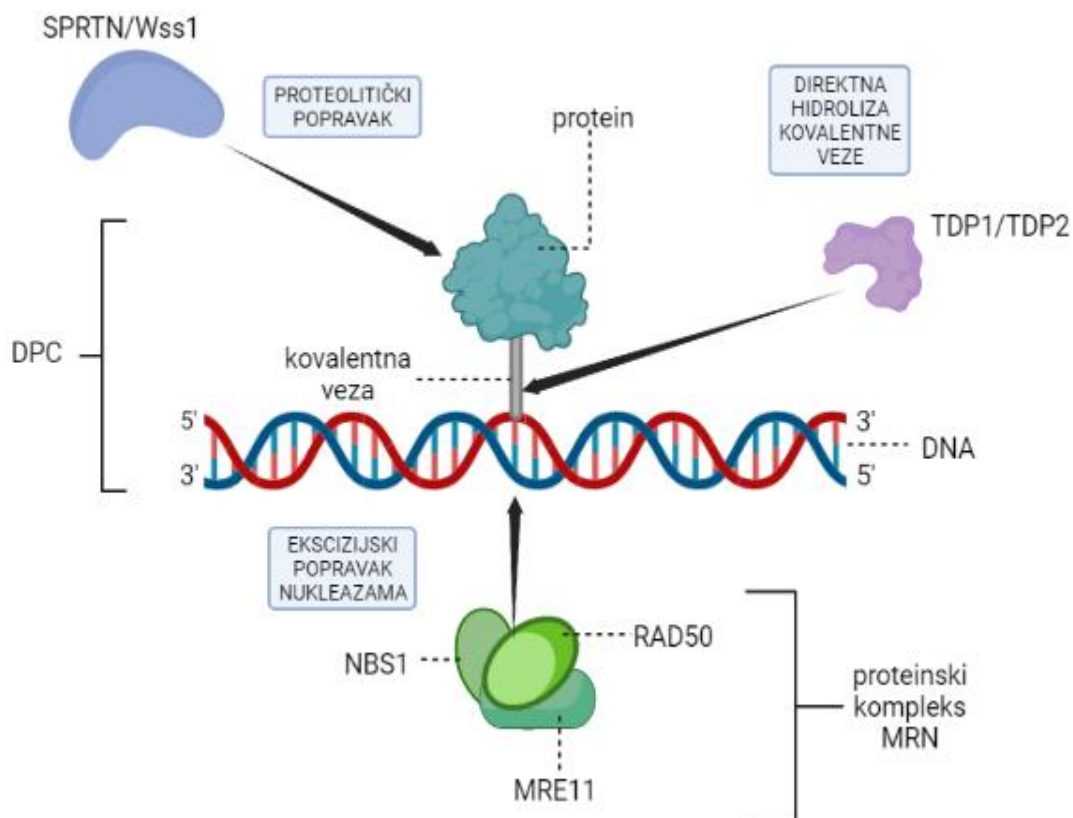
komplementarnom njemu te se nastavi kretati u smjeru 3' prema 5'. Nastajanje drugog ureza na nasuprotnom lancu je snažno stimulirano prvim urezom i događa se na spoju između jednolančane i dvolančane DNA, oslobađajući DPC. Ovako nastali dvolančani lomovi se popravljaju mehanizmom HR ili NHEJ (Hoa i sur., 2016).

1.3.3. Popravak posredovan proteazama

Na temelju genetskih i biokemijskih podataka dobivenih iz bakterija i kvasaca, dugo vremena se smatralo da su za uklanjanje DPC od iznimne važnosti procesi homologna rekombinacija i popravak ekscizijom nukleotida (Fielden i sur., 2018). Međutim, NER može odstraniti samo male DPC (maksimalne veličine od 6-16 kDa), što sugerira da je DPC veće od 16 kDa potrebno prethodno obraditi u manje peptide prije početka njihovog popravka (Debéthune i sur., 2002) Slično, uklanjanje TOP1 i TOP2 pomoću TDP1 i TDP2 zahtijeva prethodnu proteolizu jer TDP1 i TDP2 mogu učinkovito obraditi samo peptide duge približno 150 aminokiselina (Pommier i sur., 2016). Navedeni podaci su sugerirali da stanica mora sadržavati specijaliziran put popravka DPC koji se zasniva na postojanju proteaze koja pocijepa velike DPC do malih peptidnih ostataka koji potom ostaju vezani za DNA. Postojanje takve specifične proteaze koja uklanja DPC je prvi otkrio Jentsch proučavajući kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao modelni organizam (Fielden i sur., 2018) . Riječ je o DNA ovisnoj metaloproteazi Wss1 (engl. *weak suppressor of Smt3*) a do njenog otkrića je došao na temelju probira (engl. *screening*) genoma mutiranih stanica kvasca s ciljem identificiranja gena koji su odgovorni za određeni fenotip. Tim pristupom je ustanovio da one stanice kvasca koje imaju deleciju gena *wss1* rastu sporije dok dvostruki mutanti $\Delta wss1\Delta tdp$ akumuliraju nepopravljene Top1-DPC, zaustavljaju stanični ciklus i aktiviraju kontrolne točke oštećenja DNA (Reinking i sur., 2020). Daljnjim istraživanjima je otkriveno da proteaza Wss1 ne štiti stanice samo od Top1-DPC, već i od neenzimatskih DPC poput histona (H1, H2A, H2B, H3 i H4) te da doprinosi rezistenciji stanica kvasca na formaldehid i kamptotecin (Stingele i sur., 2014). Na N-terminusu, Wss1 sadrži metaloproteaznu domenu WLM (engl. WSS1-like metalloprotease domain) s aminokiselinskim motivom HEXXH u aktivnom mjestu, domenu SHP odgovornu za interakciju s Cdc48, DNA vezujuću domenu te domenu VIM (engl. VCP-interacting motif) preko koje se ostvaruje interakcija s proteinom VCP. Na C-terminusu se nalazi domena SIM (engl. *SUMO-interacting motifs*) preko koje Wss1 prepoznaje proteine sa SUMO posttranslacijskom modifikacijom (Svoboda i sur., 2019). Modifikacija pomoću proteina SUMO (eng. *Small Ubiquitin-like Modifier*) je toliko česta da

se procjenjuje da je broj proteina ciljanih za sumoilaciju u *Saccharomyces cerevisiae* preko 500 (Makhnevych i sur., 2009). Specifičnost djelovanja enzima Wss1 se povećava sumoilacijom ciljnog proteina. U prilog tome ide činjenica da DPC poput Top1 ili Top2 budu obilježeni SUMO postranslacijskom modifikacijom. Za aktivnost Wss1 ujedno je potrebno i prisustvo DNA koja ima funkciju poveznice između proteaze i njenog supstrata (Stingele i sur., 2014).

Otkriće proteaze Wss1 kvasca olakšalo je i ubrzalo otkrivanje ortolognog humanog proteina, koji ima sličnu funkciju uklanjanja DPC oštećenja DNA. Taj novootkriveni protein nazvan je SPRTN.



Slika 4. Shematski prikaz mehanizama popravka DPC: ekscizijski popravak nukleazama, direktna hidroliza kovalentne veze i proteolitički popravak. (preuzeto i prilagođeno prema Stingele i sur., 2017)

1.4. DNA-ovisna metaloproteaza SPRTN

1.4.1. Otkriće DPC proteaze SPRTN

Lessel i sur. su 2014. godine proučavali tri pacijenta iz dvije nepovezane obitelji koji su pokazivali značajke karakteristične za progeroidni sindrom (nizak rasta, sijeda kosa, mišićna atrofija). Segmentni progeroidni sindromi su rijetke monogenske bolesti koje uzrokuju preuranjeno starenje organizma. Stanice oboljelih pojedinaca podliježu genomskoj nestabilnosti i povećanom riziku razvoja tumora (Mohaghegh i Hickson, 2001). Među značajnijim progeroidnim sindromima ističu se: Bloomov sindrom, Werner sindrom, Hutchinson-Gilfordov i Nestor-Guillermo sindrom. Bloomov sindrom je uzrokovan mutacijom u genu za WRN helikazu, Werner sindrom mutacijom u genu za BLM helikazu. Nadalje, Hutchinson-Gilfordov sindrom je povezan s mutacijom u genu *LMN* koji kodira za laminin dok mutacija gena *BANFI* uzrokuje Nestor-Guillermo sindrom (Misteli i Scaffidi, 2005).

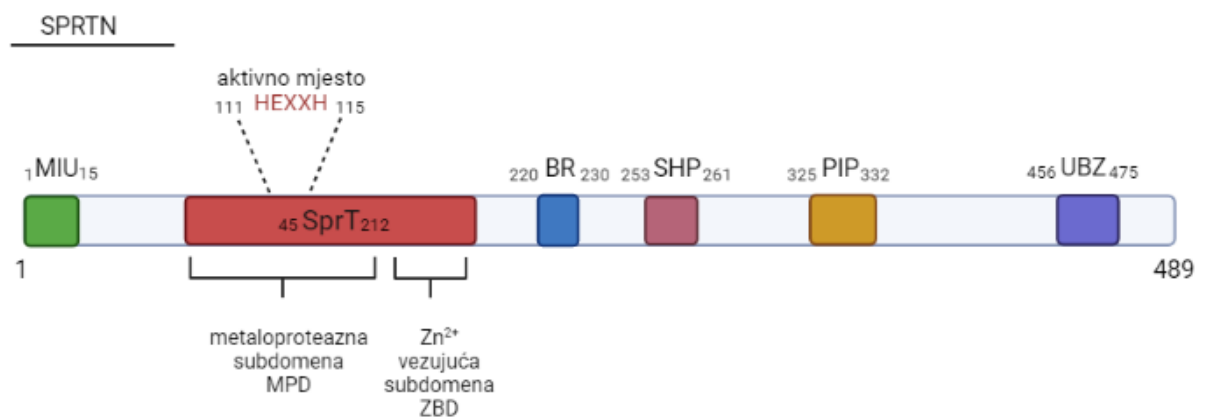
Pacijenti koje su proučavali su već u adolescenciji razvili hepatocelularni karcinom. Analizom njihovog genoma otkriveno je da je uzrok bolesti mutacija u do tada neopisanom genu koji je dobio ime *SPRTN* dok je bolest nazvana Ruijs-Aalfsov sindrom (RJALS). Riječ je o autosomno recesivnoj bolesti koju karakteriziraju kromosomska nestabilnost, preuranjeno starenje i razvoj hepatocelularnog karcinoma u adolescentnoj dobi. Ustanovljeno je da pacijenti nose mutacije na oba alela u genu *SPRTN*. Kod jednog pacijenta je ustanovljena homozigotna, točkasta delecija koja uzrokuje preuranjenu pojavu STOP kodona te posljedično nastanak skraćene verzije proteina *SPRTN* (*SPRTN-ΔC*). Druga dva pacijenta bili su složeni heterozigoti, kod kojih je jedan alel imao točkastu mutaciju koja uzrokuje nastanak proteina sličnog *SPRTN-ΔC*, dok je točkasta mutacija drugog alela rezultirala supstitucijom tirozina cisteinom na poziciji 117 unutar metaloproteazne domene SprT (*SPRTN-Y117C*) (Lessel i sur., 2014). Biopsijom jetre pacijenata s RJALS sindromom ustanovljena je povišena akumulacija proteina vezanih uz popravak DNA dok su fibroblasti pokazali poremećenu proliferaciju, povećan replikacijski stres te povećan broj zaustavljenih replikacijskih rašlji. Analogno tome analizom tkiva jetre *SPRTN* hipomorfni (sa sniženom ekspresijom gena *SPRTN*) miševa starih između 22 i 25 mjeseci ustanovljena je povećana razina aneuploidije, a miševi su imali povećanu učestalost spontanog stvaranja tumora, od kojih su mnogi nastali u

jetri (Maskey i sur., 2014). Navedene činjenice su sugerirale da stanice tih miševa, kao i osoba sa RJALS sindromom, imaju poteškoće s akumulacijom lezija koje blokiraju DNA replikaciju (Hiom, 2014). Daljnjim provođenjem detaljnih bioinformatičkih i filogenetskih analiza ustanovljena je sličnost sekvenci i organizacija domena između proteaze SPRTN kod sisavaca i proteaze Wss1 kod kvasca. Također, ustanovljena je podudarnost sekvenci oko aminokiselinskog motiva HEXXH metaloproteazne domene Wss1 i metaloproteazne domene SprT proteina SPRTN. Time je ustanovljeno da je SPRTN funkcionalni homolog metaloproteaze Wss1 (Stingele i sur., 2015).

1.4.2. Organizacija domena proteina SPRTN

Protein SPRTN kodiran genom na kromosomu 1, molekularne mase 55 kDa, građen je od 489 aminokiselina (Slika 5) (Reinking i sur., 2020). Amino (N) terminalni dio proteina sadržava domenu SprT (engl. *SprT-like domain*), koja se dodatno dijeli na dvije poddomene: metaloproteaznu katalitičku (engl. *metalloprotease sub-domain*, MPD) i cink-vezujuću (engl. *Zn²⁺ binding sub-domain*, ZBD) pri čemu svaka poddomena veže po jedan ion cinka (Li i sur., 2019). MPD obuhvaća konzervirano aktivno mjesto HEXXH koje razgrađuje proteinsku komponentu DPC-a te time održava vijabilnost stanice i integritet genoma. Biofizičke analize i mutageneza sugeriraju da ZBD, osim što pomaže u cijepanju supstrata, pomaže i u vezanju jednolančane DNA (engl. *single-stranded DNA*, ssDNA) zahvaljujući pozitivno nabijenoj površini aromatičnog džepa koji specifično veže nesparene baze DNA. U neposrednoj blizini ZBD se nalazi druga DNA vezujuća domena BR (engl. *basic region*) preko koje se SPRTN nespecifično veže na fosfatnu okosnicu dvolančane DNA (engl. *double-stranded DNA*, dsDNA). Istaknute DNA vezujuće domene su od iznimne važnosti jer je dokazano da je za potpunu aktivaciju proteolitičke funkcije potrebno istovremeno vezanje ssDNA i dsDNA. Prisustvo ssDNA i dsDNA u stanici je najčešće za vrijeme stvaranja replikacijskog mjehurića, stoga se proteolitički popravak DPC vjerojatno odvija paralelno s procesom replikacije (Ruggiano i Ramadan, 2021). Uz navedene, na samom početku N-terminalnog dijela proteina SPRTN nalazi se domena pod nazivom MIU (engl. *motif interacting with ubiquitin*) građena od svega 15 aminokiselina. Karboksi (C) terminalni dio sadržava nekoliko domena važnih za protein-protein interakcije uključujući: SHP (engl. *VCP-interacting motif*), PIP (engl. *PCNA-interacting motif*), i UBZ (engl. *ubiquitin-binding zinc finger*). Preko domene SHP se ostvaruje interakcija s VCP (engl. *Valosin-containing protein*). Pretpostavlja se da vezanje

VCP, poznatog još i kao šaperon p97 pomaže u djelomičnom razmatanju supstrata, što u konačnici olakša njegovo cijepanje. Također se smatra da je interakcija s VCP potencijalno važna jer nakon cijepanja VCP pomaže u odstranjivanju supstrata s kromatina (Li i sur., 2019). PIP domena proteina SPRTN ostvaruje interakciju s proteinom kličuće stezaljke PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) koji je uključen u proces translezijske sinteze DNA, dok domena UBZ (engl. *ubiquitin binding domain*) pomaže u vezanju ubikvitina.



Slika 5. Organizacija domena proteina SPRTN. (preuzeto i prilagođeno prema Perry i Ghosal, 2022)

1.4.3. Regulacija metaloproteaze SPRTN

SPRTN proteazna domena nema jasno strukturiran vezni džep u kojem je smješten katalitički centar HEXXH, stoga SPRTN ima „otvoreno“ aktivno mjesto. Analiza peptida spektrometrom masa nastalih proteolitičkim cijepanjem proteinom SPRTN nije otkrila zajedničku aminokiselinsku sekvencu prema kojoj se prepoznaje mjesto za cijepanje peptidne veze, već je umjesto toga ustanovljeno da se supstrati cijepaju u nestrukturiranim, pozitivno nabijenim regijama koje su bogate ostacima arginina, lizina i serina (Perry i Ghosal, 2022). To omogućava obradu različitih supstrata, što je dobro budući da se svaki nuklearni protein potencijalno može kovalentno vezati na DNA tvoreći DPC. Međutim, takva nespecifična proteazna aktivnost zahtijeva strogu kontrolu kako bi se spriječila nekontrolirana proteoliza u trenucima kada nije potrebna. Biokemijskim istraživanjima identificirano je nekoliko regulatornih mehanizama koji ograničavaju potencijalno toksičnu aktivnost proteina SPRTN.

Prva razina regulacije se zasniva na ubikvitinaciji koja se uglavnom događa na jednom od četiri C-terminalna lizinska ostatka (K341, K376, K414, K435) (Vaz i sur., 2016). Ubikvitinskim prekidačem (engl. *ubiquitin Switch*) se regulira razina proteina SPRTN u stanici. Monoubikvitinacija potiče autokatalitičko cijepanje, dok poliubikvitinacija pokreće razgradnju SPRTN posredovanu proteasomom (Zhao i sur., 2021). S druge strane deubikvitinacija SPRTN koju stimulira prisustvo DPC, povećava afinitet proteolitičke aktivnosti prema DPC, a smanjuje učestalost autoproteolize (Perry i Ghosal, 2022). Masenom spektrometrijom identificirane su 3 deubikvitinaze (VCPIP1, USP7 i USP11) koje deubikvitiniraju SPRTN u stanicama i *in vitro* (Perry i sur., 2021). Osim deubikvitinacije proteina SPRTN, deubikvitinaza VCPIP1 potiče interakciju SPRTN s acetiltransferazom PCAF/GCN5. Hang i sur., su korištenjem protutijela specifičnih za acetilirane ostatke otkrili acetilaciju SPRTN nakon tretmana formaldehidom, a masenom spektrometrijom su identificirali K230 kao mjesto acetilacije (Huang i sur., 2020) Mutacijom mjesta acetilacije (SPRTN K230R) spriječeno je nakupljanje proteina SPRTN na kromatinu nakon tretmana formaldehidom. Sukladno rezultatima, predloženo je da acetilacija služi kao druga razina regulacije koja pomaže u zadržavanju proteaze SPRTN na kromatinu kada su stanice opterećene visokim razinama DPC (Huang i sur., 2020). Treća razina regulacije se zasniva na DNA prekidaču (engl. *DNA Switch*) koji regulira aktivaciju proteazne aktivnosti. Aktivno mjesto SPRTN u odsutnosti DNA je zaštićeno fleksibilnom ZBD domenom. SPRTN se na mjesto oštećenja regrutira protein-protein interakcijama posredovanim C-terminalnim domenama, nakon čega slijedi vezanje DNA pomoću dvije DNA vezujuće domene: ZBD i BR (Larsen i sur., 2019). U tom procesu DNA djeluje kao spona koja dovodi SPRTN i njegov supstrat u međusobnu blizinu, inducirajući tako konformacijsku promjenu proteaze te razotkrivanje aktivnog mjesta u svrhu peptidnog cijepanja (Li i sur., 2019). Za potpunu proteolitičku aktivaciju potrebno je istovremeno vezanje ssDNA i dsDNA, što sugerira da je prisutnost atipične strukture DNA jedan od faktora koji doprinosi specifičnosti proteaze SPRTN (Larsen i sur., 2019). Četvrta razina regulacije se zasniva na temelju staničnog ciklusa. SPRTN se pretežno eksprimira tijekom S i G2 faze, dok se tijekom G1 faze regulirano razgrađuje nakon ubikvitinacije (posredstvom APC/Cdh1 u kvascima). Smatra se da je razgradnja za vrijeme G1 faze potrebna kako bi se smanjila razina proteaze SPRTN kada je manje potrebna te se time sprječava njeno nespecifično, odnosno neželjeno djelovanje (Mosbech i sur., 2012).

1.5. Cilj istraživanja

Protein SPRTN je aktualna tema u znanstvenim krugovima i mnoga istraživanja se provode s ciljem razumijevanja molekularnih mehanizama popravljavanja DPC oštećenja. Kako bi to bilo moguće potrebne su detaljne spoznaje o ulogama domena koje sačinjavaju protein. Na temelju dosadašnjih istraživanja domenama SprT, SHP, PIP i UBZ razjašnjene su uloge dok s druge strane domena MIU nema ustanovljene interakcijske partnere niti opisanu funkciju.

Stoga je cilj ovog rada ustanoviti interakcijske partnere proteina SPRTN, poglavito one koji se vežu na domenu MIU u uvjetima oštećenja DNA i stvaranja DPC te na taj način pokušati razjasniti ulogu koju domena MIU ima u popravku DPC. U tu svrhu bilo je potrebno proizvesti i pročistiti protein SPRTN i njegove delecijske varijante GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus, GST-C-terminus, GST- Δ MIU i GST-MIU obilježene GST privjeskom za provođenje *pulldown* analize te upotrebom specifičnih protutijela metodom *Western blot* istražiti postoji li interakcija domene MIU s proteinima XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 povezanih s popravkom DNA i DPC oštećenja kao i proteinima koji su obilježeni s ubikvitinom ili SUMO-2/3 posttranslacijskom modifikacijom proteina.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

U tablici 1 prikazane su sve kemikalije korištene u ovom radu.

Tablica 1. Kemikalije, njihovi proizvođači i kataloški brojevi

Naziv kemikalije	Proizvođač, kataloški broj
Agar	Carl Roth, 5210.3
40% akrilamid/0.8% bisakrilamid	Applichem, A4989
Albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. <i>bovine serum albumin</i>)	Carl Roth, 8076.1
Amonijev persulfat (APS)	Sigma Aldrich, A9164
Ampicilin	Carl Roth, K029.2
Bromfenol plavo	Sigma Aldrich, B5525-5G
Cinkov klorid ($ZnCl_2$)	Sigma Aldrich, Z0152
Coomasie Brilliant Blue R250	Carl Roth, 3862.2
DNAza	Sigma Aldrich, T4330
Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija (DMEM)	Sigma Aldrich, D6429
Tripton ekstrakt kvasca	Fluka, 95039
Etanol (C_2H_5OH)	Kemika, 0528155
Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	Carl Roth, 8040.3
Fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF)	Roche, 329986

Fenol crveno	Sigma Aldrich, P5530
Fetalni goveđi serum (FBS)	Sigma Aldrich, F7524
Fosfatazni inhibitori (engl. <i>PhosSTOP</i>)	Roche, 04906837001
Glicerol	Kemika, 56815
Glicin	Sigma Aldrich, G7126
Glutation sefarozne kuglice	GE Healthcare, 17075601
HBSS (engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)	Gibco, 14170112
Izopropanol	Kemika, 1622601
Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Carl Roth, 2316,5
Kalcijev klorid (CaCl_2)	Carl Roth, CN93.2
Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	Kemika, 1112408
Kalijev klorid (KCl)	Kemika, 1120907
Klorovodična kiselina (HCl)	Fluka, 7647-01-0
Luminol reagens otopina A	Santa Cruz Biotechnology, SC2048
Luminol reagens otopina B	Santa Cruz Biotechnology, SC2048
Magnezijev klorid (MgCl_2)	Carl Roth, KK36.1
β - merkaptoetanol	Sigma Aldrich, M3148
Metanol	Honeywell
Natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4)	Sigma Aldrich, 7558-80-7
Mlijeko u prahu	Carl Roth, T145.2
Natrijev azid (NaN_3)	Sigma Aldrich, S2002

Natrijev deoksikolat (DOC)	Sigma Aldrich, D6750
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	Carl Roth, 2326.2
Natrijev fluorid (NaF)	Kemika, 1407908
Natrijev klorid (NaCl)	Kemika, 1417506
Natrijev ortovanadat (Na_3VO_4)	Sigma Aldrich, S6508
N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, T7024
NP-40	Sigma Aldrich, 492018
Octena kiselina (CH_3COOH)	Kemika, P150501
Penicilin-streptomycin	Sigma Aldrich, P0781
PIPES	Carl Roth, 9156.2
Ponceau S	Sigma Aldrich, 81460
Proteazni inhibitori (engl. <i>CompleteSTOP</i>)	Roche, 04693116001
Tripsin	Capricorn, TRY1B
Tris baza	Sigma Aldrich, T1503
Triton X-100	Sigma Aldrich, 11332481001
Tween-20	Sigma Aldrich, P9146

2.1.2. Pufferi

Za ispiranje nitroceluloznih membrana korišten je puffer $1 \times$ TBS puffer (engl. *Tris-Buffered Saline*) sastava: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl.

Za ispiranje nitroceluloznih membrana korišten je puffer TBS-Tween sastava: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween.

Za blokiranje nitroceluloznih membrana korišten je puffer $1 \times$ TBS-BSA sastava: sterilni $1 \times$ TBS, 5% BSA, 0.1% natrijev azid, fenol crveno, pH 7.4.

Za SDS-PAGE elektroforezu korišten je 1 x pufer za elektroforezu (engl. *Running buffer*) pripremljen iz matične otopine 10 x sastava: 250 mM Tris, 2 M glicin, 1% SDS.

Za transfer proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu korišten je 1 x pufer za transfer (engl. *Transfer buffer*) pripremljen iz matične otopine 10 x sastava: 250 mM Tris, 2 M glicin, 20% metanol.

Za izradu poliakrilamidnog gela korišten je 4 x pufer za razdvajanje (engl. *Lower/Seperating buffer*) sastava: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4 % SDS.

Za izradu poliakrilamidnog gela korišten je 4 x pufer za sabijanje (engl. *Upper/Stacking buffer*) sastava: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS.

Za rad u staničnoj kulturi korišten je 1 x PBS pufer (engl. *Phosphate-buffered saline*) pripremljen iz matične otopine 10 x sastava: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ × 7H₂O, 2.0 mM KH₂PO₄.

Za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel korišten je 2 x Laemmli pufer sastava: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 4% SDS, 0.01% bromfenol plavo, 2% β-merkaptioetanol.

Za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel korišten je 6 x Laemmli pufer sastava: 250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 0.02% bromfenol plavo, 6% β-merkaptioetanol.

Za lizu bakterijskih stanica prilikom purifikacije proteina korišten je GST pufer 1 sastava: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% triton X-100.

Za ispiranje glutation sefaroznih kuglica korišten je GST pufer 2 sastava: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% triton X-100.

Za čuvanje purificiranih proteina korišten je GST pufer 3 sastava: 20 mM Tris/HCl, pH 7.5

Za lizu bakterijskih stanica korišten je RIPA pufer sastava: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%, 0.5 % DOC, 0.1 % SDS, 1% triton X-100.

Za lizu stanica korišten je RIPA modificirani pufer sastava: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% DOC.

Za bojanje gelova nakon SDS-PAGE elektroforeze korištena je otopina za bojanje gelova Coomassie Brilliant Blue sastava: 100 mL metanola, 20 mL octena kiselina, 80 mL H₂O, 0.4 g Coomassie Brilliant Blue R250.

Za bojanje gelova nakon SDS-PAGE elektroforeze korištena je otopina za odbojavanje Coomassie Brilliant Blue sastava: 200 mL metanol, 100 mL octena kiselina, 700 ml H₂O.

Za bojanje nitrocelulozne membrane nakon transfera korištena je otopina Ponceau S sastava: 50 mL octena kiselina, 450 mL H₂O, 2.5 g Ponceau S.

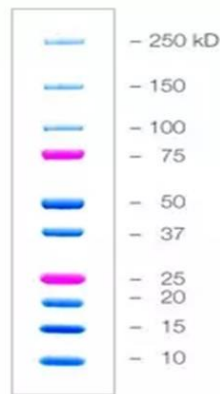
Za pripremu kompetentnih bakterijskih stanica korištena je otopina CaCl₂ sastava: 60 mM CaCl₂, 15% glicerol, 10 mM PIPES, pH 7.0.

2.1.3. Uređaji i oprema

- Centrifuga (5415D-Eppendorf, 5810R-Eppendorf, Fresco17-Thermo scientific)
- Termoblok (TDB120-Biosan)
- Tresilica (See-saw rocker SSL4- Stuart)
- Uređaj za napajanje za SDS-PAGE elektroforezu (Power pac 300-BioRad)
- Mini protean Tetra - aparatura za vertikalnu elektroforezu (BioRad)
- Uređaj za rotaciju uzoraka (Rotator drive STR4-Stuart)
- Inkubator za uzgoj bakterijskih stanica (Incubator shaker Innova 42-Eppendorf)
- Inkubator za uzgoj animalnih stanica (Heracell 150i-Thermo scientific)
- Digestor s laminarnim protokom i filtracijom zraka (Micro PTE LTD-ESCO)
- pH metar (Seven compact-Mettler toledo)
- laboratorijska tehnička vaga (Mettler toledo)
- Svjetlosni invertni mikroskop (Olimpus CKX41)
- Uređaj za vizualizaciju (molecular imager ChemiDoc XRS-BioRad)
- UV/VIS spektrofotometar (DU530 Life Science UV/VIS Spectrophotometer-Beckman Coulter)
- UV-A/UV-C Crosslinker (Uvitec CL-508)

2.1.4. Markeri veličina

U svrhu analize proteina nakon SDS-PAGE (engl. SDS Polyacrilamide Gel) elektroforeze korišten je proteinski molekularni standard Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard (Slika 6).



Slika 6. Molekularni standard za provjeru veličine proteina Precision Plus Protein™ Dual Color Standard

2.1.5. Mediji za uzgoj bakterija

Tekući LB (Luria Bertani) medij sadrži 10 g/L tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 5 g/L NaCl. Za pripremu krutog medija LB dodaje se 15 g/L agra. Mediji su autoklavirani 20 min na temperaturi od 121 °C i pri tlaku od 1.5 bara. Za bakterijsku selekciju korišten je antibiotik ampicilin (100µg/mL). SOC (*engl. Super optimal broth with catabolite repression*) medij sadrži 20 g/L tripton, 5 g/L grama ekstrakt kvasca, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukozu. Medij se prije upotrebe autoklavira.

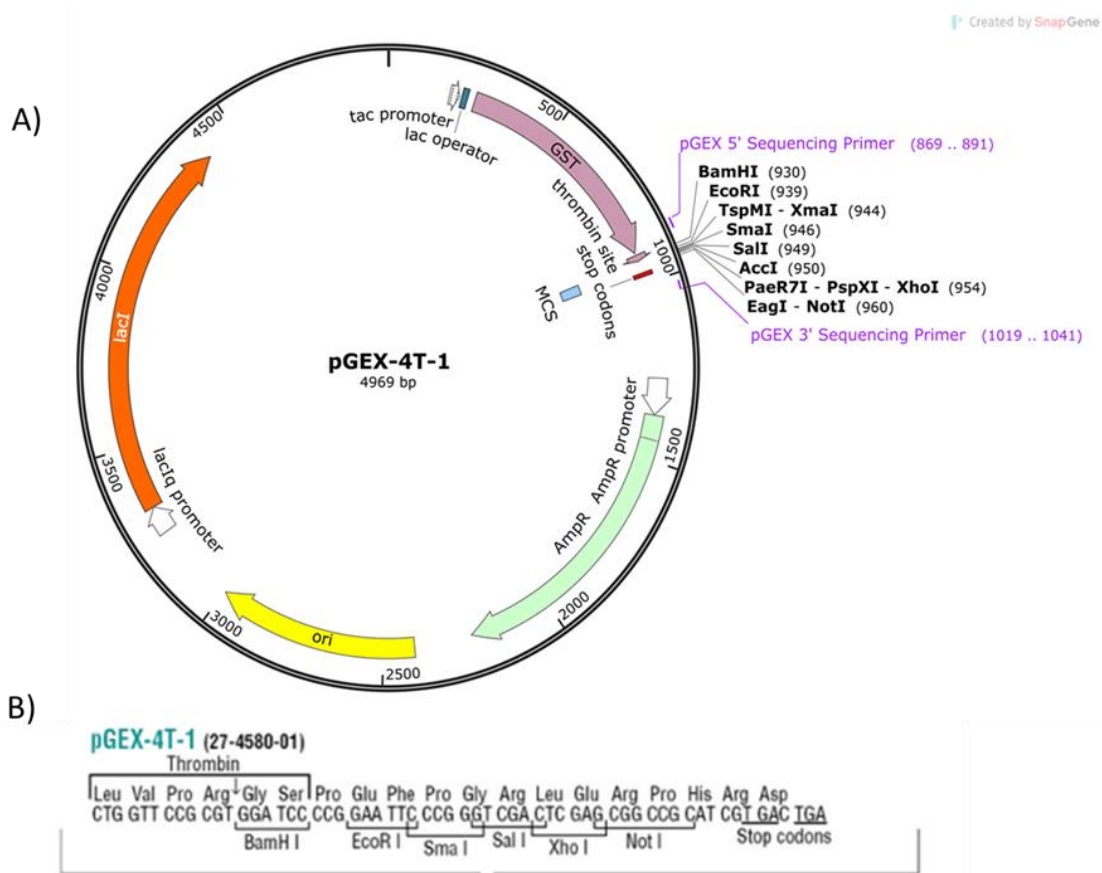
2.1.6. Bakterijski soj

U svrhu transformacije ekspresijskim plazmidom korišten je kompetentni soj bakterije *Escherichia coli* BL21. Navedeni soj se koristi za prekomjernu ekspresiju gena koji su uklonirani u pGEX seriju ekspresijskih vektora. Soj ima visoku učinkovitost transformacije te zbog deficijencije OmpT i Lon proteaza. Niska stopa proteazne aktivnosti omogućava efikasnu proizvodnju rekombinantnog proteina od interesa. Bakterijski soj je uzgajan u krutom ili tekućem LB mediju, u inkubatoru za uzgoj bakterijskih kultura na 37 °C.

2.1.7. Plazmidi

Plazmid pGEX-4T-1 (Slika 7A) je ekspresijski vektor koji se učestalo koristi za prekomjernu ekspresiju rekombinantnog proteina od interesa fuzioniranog s GST (glutation-s-transferaza) tagom ili privjeskom na N-terminalnom kraju. Ekspresijska kazeta je pod kontrolom *tac* promotora koji se inducira analogom laktoze, izopropil β-D-tiogalaktozidom (IPTG). Kako bi

se regulirala razina ekspresije rekombinantnog gena, navedeni plazmid sadržava *lacIq* gen koji kodira za represorski protein. Represorski protein vezanjem za operatorsku regiju tac promotora sprječava ekspresiju sve do indukcije IPTG-om. Vektor također sadrži ishodište replikacije (engl. *origin of replication*, ORI) koje će omogućiti njegovu replikaciju u bakterijama, ampicilinski selekcijski marker te višestruko mjesto za kloniranje (engl. *multiple cloning site*, MCS) (Slika 7B). Unutar MCS je uklonirana komplementarna DNA sekvenca (cDNA) gena *SPRTN*, koja kodira za divlji tip (engl. *wild-type*, wt) proteina SPRTN, ili neku od domena ili dijelova proteina SPRTN. Upotrebom posebno dizajniranih početnica za ciljanu mutagenezu klonirane su različite delecijejske varijante rekombinantnog gena GST-SPRTN. U laboratoriju su bili dostupni navedeni plazmidi (Slika 8): pGEX-4T-1-SPRTN-wt, u koji je ugrađen cjeloviti gen *SPRTN*; pGEX-4T-1-N-terminus, u koji je ugrađen gen za N-terminalni dio proteina SPRTN; pGEX-4T-1-C-terminus, u koji je ugrađen gen za C-terminalni dio proteina SPRTN; pGEX-4T-1- Δ MIU, koji ima deleciju dijela gena koji kodira za domenu MIU protein SPRTN te pGEX-4T-1-MIU, u koji je ugrađen gen koji kodira za domenu MIU proteina SPRTN.



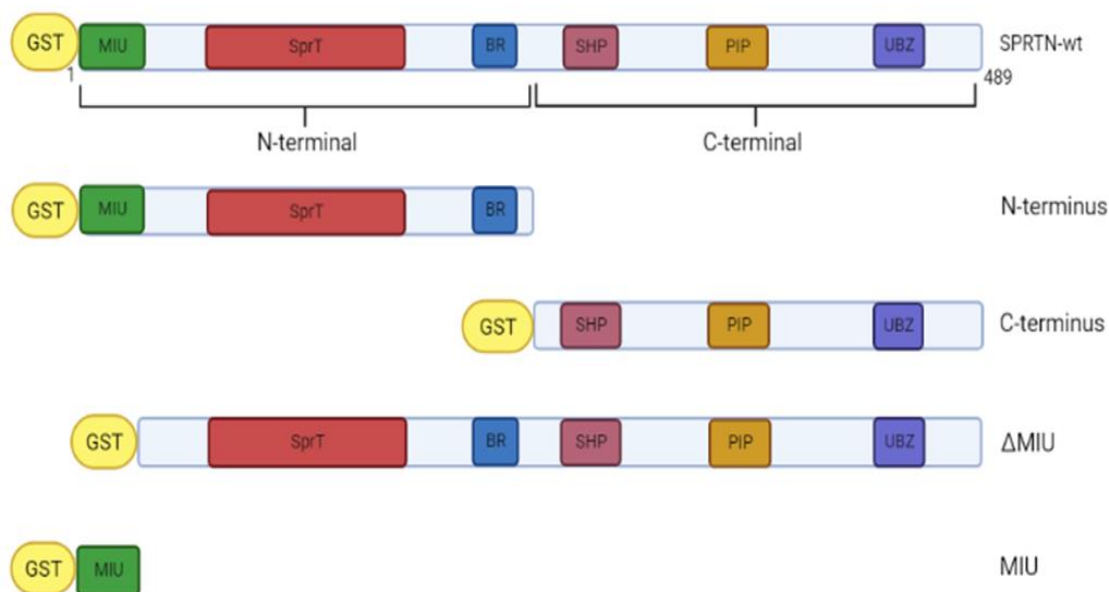
Slika 7. Mapa plazmida pGEX-4T-1 (A) s uvećanim prikazom višestrukog mjesta za kloniranje (B). Ori-izvorište replikacije plazmida pGEX-4-T-1, lacI-kodirajući slijed za lac represor, GST-kodirajući slijed za GST privjesak, MCS-višestruko mjesto za kloniranje, AmpR-kodirajući slijed za β -laktamazu. Slika 7B preuzeta je <https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pgex4t1-p-63179.html>

2.1.8. Aminokiselinske sekvence delecijских varijanti proteina SPRTN

Bazu podataka NCBI-Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/proteins/>) sam koristio za preuzimanje aminokiselinskih sekvenci proteina SPRTN-wt (pristupni broj NP_114407.3). Upotrebom programa ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) analizirao sam aminokiselinske sekvence delecijских varijanti proteina SPRTN te su dobio informacije o: broju aminokiselina (N), molekularnoj masi (Mr), izoelektričnoj točki (pI), faktoru nestabilnosti (II) te faktoru topivosti u vodi (AI). Vrijednosti navedenih karakteristike delecijских varijanti proteina SPRTN te samog GST privjeska nalaze se u Tablici 2. U programu BioRender (<https://biorender.com/>) izradio sam shematski prikaz konstrukta SPRTN-wt (1-489aa) i njegovih delecijских varijanti N-terminus (1-248aa), C-terminus (247-489aa), Δ MIU (22-489aa), i MIU (1-25aa) (Slika 8).

Tablica 2. Teoretske vrijednosti aminokiselinskog broja (N), molekulske mase (Mr), izoelektrične točke (pI), faktora nestabilnosti (II) i faktora topivosti u vodi (AI) za proteine korištene u ovom istraživanju. Vrijednosti dobivene upotrebom programa ProtPram.

GST-fuzijski protein	N	Mr/kDa	pI	II	AI
GST-SPRTN-wt	709	80.81	7.31	36.90	74.23
GST-N-terminus	468	54.57	6.08	29.16	76.90
GST-C-terminus	463	52.14	8.59	44.45	77.65
GST- Δ MIU	688	78.21	8.43	35.50	73.37
GST-MIU	245	28.72	5.24	40.10	87.59
GST	220	26	5.9	36.57	87.32



Slika 8. Shematski prikaz konstrukta GST-SPRTN-wt i njegovih delecijskih varijanti N-terminus, C-terminus, Δ MIU i MIU. MIU (engl. *motif interacting with ubiquitin*), SprT (engl. *SprT-like domain*), BR (engl. *basic region*), SHP (engl. *VCP-interacting motif*), PIP (engl. *PCNA-interacting motif*), UBZ (engl. *ubiquitin binding domain*). Slika izrađena u programu Biorender.

2.1.9. Stanične linije

U istraživanju sam koristio dvije humane tumorske stanične linije: HeLa (epitelne stanice karcinoma vrata maternice) i HepG2 (epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma)

2.2. Metode

2.2.1 Sterilizacija

Otopine i puferi koji su prije upotrebe trebali biti sterilizirani, sterilizirani su procesom autoklaviranja. Autoklaviranje se provodilo 20 min na temperaturi od 121 °C i pri tlaku od 1,5 bara.

2.2.2. Kultura stanica

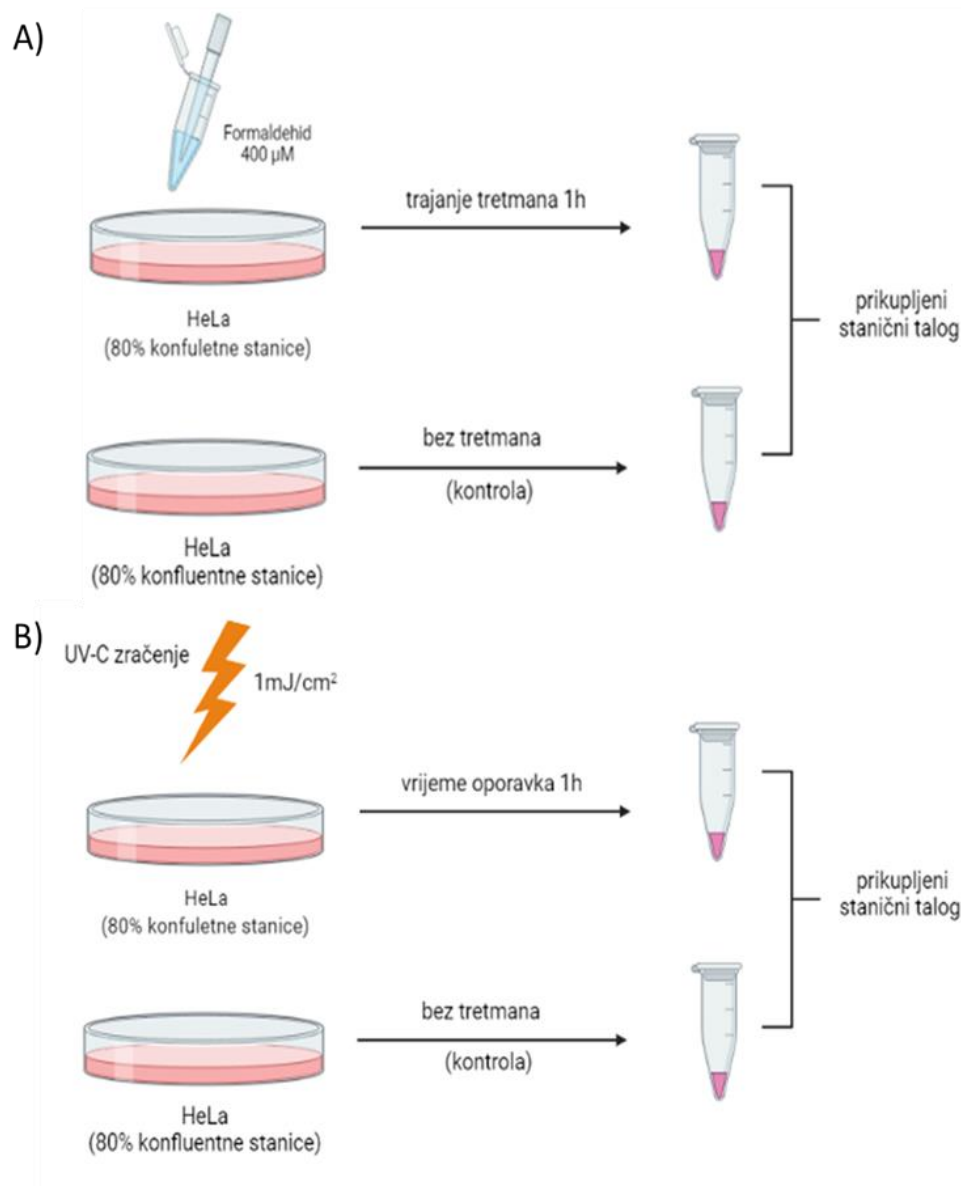
Za rast kultura stanica sisavaca *in vitro* važno je osigurati sterilnost kao i specifične uvijete uzgoja, što podrazumijeva hranjivi medij, podlogu, temperaturu te atmosferu. Humane tumorske stanične linije HeLa (epitelne stanice karcinoma vrata maternice) i HepG2 (epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma) sam uzgajao u inkubatoru pri 37 °C i vlažnoj atmosferi uz 5% CO₂. Za njihov uzgoj koristio sam Dulbeccovu modifikaciju Egelovog medija (DMEM) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS) i otopine antibiotika penicilin/streptomycin (1%). Stanice sam održavao periodičnim pasažiranjem. Stanicama se pri tome odsiše medij te se isperu puferom 1 × PBS. Potom se na stanice doda tripsin (0.25%) otopljen u HBSS te se stanice vrata u inkubator 5 min na 37 °C. Kada se stanice odlijepe od podloge, u petrijevu zdjelicu se doda 1 mL medija DMEM s 10% FBS. Stanice se suspendiraju pipetiranjem te se dio prebaci u novu petrijevu posudu sa svježim hranjivim medijem. Stanice koje će se koristiti za pripremu staničnog lizata (bez tretmana ili nakon nekog tretmana) se nakon tripsinizacije prebace u Eppendorf tubicu od 2 mL. Stanice se potom dva puta centrifugiraju na 400 g uz uklanjanje supernatanta i ispiranjem s 1 × PBS. Po završetku zadnjeg centrifugiranja, 1 × PBS se odsiše, a Eppendorf tubice sa staničnim talozima se pospreme u zamrzivač na -20 °C do trenutka korištenja.

2.2.2.1. Tretman stanica formaldehidom

Stanice HeLa i HepG2 sam nasijao u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm tako da im konfluentnost idućeg dana bude 80%. Dan nakon nasađivanja, stanicama sam uklonio stari medij te ih isprao puferom $1 \times$ PBS. Stanice sam tretirao s 10 mL svježeg medija DMEM (kontrola) ili s 10 mL medija DMEM s dodatkom formaldehida do konačne koncentracije od $400 \mu\text{M}$ (Slika 9A). Tretman je trajao 1 h. Po završetku, kontrolne i tretirane stanice sam izvadio iz inkubatora te prikupio po protokolu opisanom u poglavlju 3.1.10.

2.2.2.2. Tretman stanica UV-zračenjem

Stanice HeLa i HepG2 sam nasadio u Petrijeve zdjelice promjera 10 cm tako da im konfluentnost idućeg dana bude 80%. Dan nakon nasađivanja, stanicama sam uklonio stari medij te ih isprao $1 \times$ PBS. Kontrolnim stanicama sam promijenio medij za 10 mL svježeg medija DMEM (kontrola) dok su tretirane stanice prethodno ozračene dozom UV zračenja od 1 mJ/cm^2 nakon čega sam im zamijenio 10 mL svježeg medija DMEM (Slika 9B). Po završetku tretmana, kontrolne i tretirane stanice sam dodatno uzgajao 1 h u inkubatoru u svrhu oporavka. Istekom vremena oporavka, prikupio sam stanični talog po protokolu opisanom u poglavlju 3.1.10.



Slika 9. Shematski prikaz tretmana formaldehidom (A) te UV zračenjem (B) u svrhu indukcije stvaranja DPC unutar HeLa i HepG2 stanične linije. (A) Stanice su tretirane s 10 mL svježeg medija DMEM (kontrola) ili s 10 mL medija DMEM s dodatkom formaldehida do konačne koncentracije od 400 μM . (B) Stanice su tretirane s 10 mL svježeg medija DMEM (kontrola) dok su tretirane stanice ozračene dozom UV zračenja od 1 mJ/cm^2 nakon čega su tretirane s 10 mL svježeg medija DMEM. Prije UV tretmana, stanicama je uklonjen medij.

2.2.3. Priprema kemijski kompetentnih bakterijskih stanica

Za pripremu kompetentnih stanica *E. coli* BL21, slijedio sam protokol za uzgoj koji koristi otopina CaCl_2 . Prvi dan se odgovarajući soj *E. coli* (BL21 ili neki drugi) nasadi na krutu hranjivu podlogu LB bez selekcijskog antibiotika te se inkubira na $37\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 16 - 24 h. Drugi dan se s krute hranjive podloge izabere jedna kolonija koja se inokulirana u 5 mL tekućeg LB medija bez dodatka antibiotika. Bakterije se ostave rasti preko noći (tijekom 16 h) u inkubatoru na $37\text{ }^\circ\text{C}$, uz rotaciju od 220 rpm. Treći dan se 5 mL prekonoćne bakterijske kulture inokulira u 400 mL svježeg LB medija. Bakterije nastavljaju rasti uz rotaciju na $37\text{ }^\circ\text{C}$, sve dok vrijednost optičke gustoće (engl. *optical density*, OD) koja se periodično mjeri pri 600 nm ne naraste na 0.375. Važno je da vrijednost OD ne prijeđe 0.4 zato jer bakterije treba zadržati u eksponencijalnoj fazi rasta. Bakterijska suspenzija se centrifugira 7 min na 4000 g pri $4\text{ }^\circ\text{C}$. Dobiveni bakterijski talog se resuspendira u 10 ml sterilne, ledeno hladne otopine CaCl_2 . Bakterije se potom ponovno centrifugiraju kao u prethodnom koraku. Resuspendiranje bakterijskog taloga u 10 ml sterilne ledeno hladne otopine CaCl_2 se ponovi još jednom, ali sada bakterije treba inkubirati na ledu 1 h. Po završetku inkubacije, bakterije se centrifugiraju, a bakterijski talog resuspendira u 2 mL sterilne ledeno hladne otopine CaCl_2 . Resuspendirane bakterije se alikvotiraju po 200 μL u sterilne, ohlađene Eppendorf tubice, naglo zamrzavaju uranjanjem u tekući dušik te pohranjuju na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.4. Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica toplinskim šokom

Toplinski šok (engl. *heat-shock*) je metoda transformacije koju sam koristio, u svrhu unosa plazmidne DNA u bakteriju *E. coli*. Kako bi efikasnost transformacije ovom metodom bila što veća, ključno je da se bakterijske stanice prethodno inkubiraju u otopini koja sadrži divalentne katione (najčešće CaCl_2). Prisustvo Ca^{2+} kationa potiče umetanje transportnih proteina u bakterijsku membranu, koji se pod utjecajem toplinskog šoka otvaraju. Kroz otvorene transportne proteine omogućen je prolaz iona kao i plazmidne DNA. Za izvođenje toplinskog šoka, kompetentne stanice *E. coli* BL21 suspendirane u 100 μl otopine CaCl_2 se zajedno s 100 ng plazmida inkubiraju 5 min na ledu. Potom se transformacijska smjesa izloži toplinskom šoku na $42\text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 2 minute. Nakon toga slijedi oporavak bakterija dodatkom 700 μL SOC regeneracijskog medija te inkubacijom 40 minuta na $37\text{ }^\circ\text{C}$ uz rotaciju na 800 rpm. Za to vrijeme bakterijske stanice se oporavljaju i repliciraju plazmidnu DNA koju

su primile, što je preduvjet za njihovo preživljavanje na selekcijskoj, hranjivoj podlozi na koju će biti nasijane. U zadnjem koraku bakterijske stanice se centrifugiraju 2 min pri 800 g, supernatant se odbaci, a zaostali bakterijski talog resuspendira u 15 μ L SOC medija i nanese na krutu LB hranjivu podlogu koja sadrži antibiotik ampicilin (100 μ g/mL). Bakterije na podlogama se uzgajaju preko noći u inkubatoru na 37°. Pošto plazmidi sadrže gen za rezistenciju na ampicilin, na hranjivoj podlozi će narasti samo transformirane bakterije.

2.2.5. Indukcija ekspresije varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom

Za uspostavu prekonoćne bakterijske kulture propagirao sam pojedinačne kolonije s krute LB hranjive podloge. Pojedinačna kolonija se sterilnim nastavkom za pipetu inokulira u 10 do 60 mL (ovisno o varijanti proteina koji će se proizvodi) medija LB s dodatkom 100 μ g/mL ampicilina. Bakterije se uzgajaju preko noći na 37 °C uz rotaciju od 250 rpm, te potom koriste u postupku ekspresije proteina. Prekonoćna bakterijska kultura koristi se za pripremu proizvodne bakterijske kulture. U svježi medij LB s dodatkom 100 μ g/mL ampicilina dodaje se 1/20 volumena prekonoćne kulture. Proizvodne kulture bile su volumena od 200 mL do 1.2 L. Za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU za koje se očekuje produkcija u manjoj količini (zbog toksičnosti za bakterijske stanice ili autokatalize) u medij za uzgoj može se dodati do 2.5% etanola (Chhetri i sur., 2015). Za uzgoj konstrukata koji sadržavaju SprT domenu, kao što su GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU, dodavao sam ZnCl₂ u koncentraciji od 5 μ M. 2.5% etanol i 5 μ M ZnCl₂ dodao sam paralelno uz dodatak 1mM IPTG. Bakterije se potom uzgajaju na 37 °C uz rotaciju od 200 - 250 rpm. Rotacija osigurava bolju prozračenost (aerizaciju) bakterija, što poboljšava njihov rast. Tijekom uzgoja je potrebno periodično spektrofotometrijski mjeriti optičku gustoću medija pri 600 nm te kada vrijednost OD₆₀₀ bude između 0.5-0.9 (bakterije se tada nalaze u logaritamskoj fazi rasta), inducirati ekspresiju proteina dodatkom 1 mM IPTG. Za provjeru uspješnosti indukcije konstrukata, prije (-) i poslije (+) dodatka IPTG odvoji se po 10 mL bakterijske suspenzije, centrifugira, te se bakterijski talog zamrzne za kasniju analizu. Indukcija se odvija 4 h na 37 °C uz rotaciju od 200 – 250 rpm. Po završetku inkubacije od 4 h, bakterijske suspenzije je potrebno prelići u tube za centrifugiranje volumena 50 mL i centrifugirati 20 minuta na 3000 g pri 4 °C. Nakon centrifugiranja tekući medij se odlije, a zaostali bakterijski talozi se koriste za pročišćavanje proteina ili se mogu pospremiti u zamrzivač na -20 °C.

2.2.6. Ekstrakcija proteina iz bakterija

Kako bi se izolirali proteini, bakterijski talog sam lizirao u puferu RIPA, kojem je dodana otopina mješavine proteaznih inhibitora (100×, razrijeđeno po uputama proizvođača), DNaza (100 U/mL), natrij ortovanadat (1 mM), lizozim (1 mg/mL) i MgCl₂ (10 mM). Nakon lize bakterijskih stanica u trajanju od 15 min na 37 °C, bakterijski lizat se centrifugira 15 min na 12 000 g pri 4 °C. Dobiveni proteinski ekstrakt je korišten za provjeru uspješnosti indukcije konstrukata, prije (-) i poslije (+) dodatka IPTG. U svrhu purifikacije GST-fuzijskih proteina, u prvom koraku bakterijski talog se resuspendira u 20 mL GST pufera 1 s dodatkom PMSF (0.7 mM), lizozim (1 mg/mL), DNaza (100 U/mL), triton X-100 (1%), 5 mM MgCl₂ i 2 mM CaCl₂. Kako bi se postigla učinkovitost lizozima, liza bakterijskih stanica u trajanju od 20 min se odvija pri 37 °C. Po završetku inkubacije, bakterijski lizat se centrifugira 20 min na 12 000 g pri 4 °C

2.2.7. Purifikacija GST-fuzijskih proteina afinitetnom kromatografijom

U svrhu purifikacije GST-fuzijskih proteina, slijedio sam protokol koji se sastoji od nekoliko koraka. U prvom koraku, proteinski ekstrakt dobiven centrifugiranjem se prebacuje u nove Falcon tubice od 50 mL te inkubira s 200 µL glutation sefarnih kuglica 2 h uz rotaciju na uređaju Rotator drive STR4 pri 4 °C. Prije dodavanja na proteinski ekstrakt, glutation sefarnih kuglica se ispiru 3 puta s 750 µL GST pufera 2 u svrhu uklanjanja zaostalog etanol koji bi mogao spriječiti interakciju između GST privjeska i tripeptidnog liganda glutationa. Nakon inkubacije od 2 h, uzorci se centrifugiraju 4 min na 800 g pri 4°C. Nevezana frakcija se odstrani, a talog glutation sefarnih kuglica s vezanim GST fuzijskim proteinima se ispere s 5 mL GST pufera 2. Proces ispiranja se ponavlja 3 puta uz centrifugiranje 4 min na 800 g. Višestrukim ispiranjem se odstranjuju nečistoće i zaostali nevezani stanični proteini. Nakon posljednjeg ispiranja i centrifugiranja zaostatci pufera se uklone inzulinskom špicom, a glutation sefarnih kuglica s vezanim proteinima se resuspendiraju u 500 µL GST pufera 3 koji je dodatno suplementiran s 0.1% NaN₃. Kako bi se ustanovila kvaliteta produkcije te čistoća GST fuzijskih proteina kao i količina GST fuzijskih proteina potrebnih za provođenje *pull-down* metode, uzorci se provjere SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu koji se po završetku oboja otopinom za bojanje gelova Coomassie Brilliant Blue.

2.2.8. Natrij dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *Sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)

SDS-PAGE je elektroforetska tehnika koja je u ovom radu korištena za analizu proteinske ekspresije kao i uzoraka nakon *pull-down* testa. Pokretljivost proteina u električnom polju ovisi o veličini, obliku i neto naboju. Anionski deterdžent SDS u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza (β -merkaptoetanol), denaturira proteine te svojim vezanjem maskira naboj polipeptidnih lanaca. Stoga se metodom SDS-PAGE proteini isključivo razdvajaju na temelju njihove molekulske mase. Prije elektroforeze potrebno je napraviti poliakrilamidne gelove koji nastaju polimerizacijom monomera akrilamida u duge lance poliakrilamida, te njihovim križnim povezivanjem ugradnjom odgovarajućeg ko-monomera N, N'-metilenbis-akrilamida. Za pripremu gelova slijedio sam protokol koji se standardno koristi u Laboratoriju za istraživanje raka. Prvo se priprema gel za razdvajanje (engl. separating gel) željene gustoće i veličine pora, što ovisi o postotku akrilamida u mješavini. Gel za razdvajanje sačinjava donji, veći dio poliakrilamidnog gela. Sastojci se miješaju redoslijedom kako je navedeno u Tablici 3. Nakon dodavanja temeda i APS-a, suspenzija se lagano promiješa i nanese u kazetu za polimeriziranje gela. Nakon izlivanja, gel za razdvajanje se nadsloji izopropanolom kako bi se uklonili zaostali mjehurići te kako bi se spriječila interferencija kisika pri polimerizaciji akrilamida. Nakon 15 min, gel je polimeriziran te se pomoću filter papira odstrani izopropanol, a u kazetu se potom nanese prethodno pripremljena smjesa gela za sabijanje (engl. stacking gel). Na vrh gela za sabijanje se doda češalj za izradu jažica. Nakon polimerizacije gela za sabijanje, češalj se pažljivo ukloni te se kazeta premjesti u kadnicu za vertikalnu elektroforezu, koja se napuni $1 \times$ puferom za elektroforezu. Za potrebe istraživanja, u ovom radu su korišteni gradijenti gelovi (8-15%). Na svaki gel u prvu jažicu se nanosi proteinski molekularni standard (Slika 6) dok se u preostale jažice nanose proteinski uzorci. Prije nanošenja uzoraka na gel, uzorke je potrebno pomiješati s $2 \times$ ili $6 \times$ Laemmli puferom te denaturirati inkubacijom 5 min na 95°C . Vrijeme trajanja elektroforeze je oko 70 min pri konstantnoj jakosti struje od 25 mA po gelu. Početni napon uz ovako postavljene uvijete je 90 V. Napredovanje elektroforetske fronte potrebno je vizualno kontrolirati, što nam omogućava brom fenol plava boja iz Laemmli pufera.

Tablica 3. Sastav poliakrilamidnih gelova za sabijanje i razdvajanje proteina.

Sastav	Gel za razdvajanje	Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje
	8 %	15 %	5 %
40 % Akrilamid/bisakrilamid	2 mL	3.75 mL	0.25 mL
Pufer za razdvajanje 4×, pH 6.8	2.5 mL	2.5 mL	-
Pufer za sabijanje 4×, pH 8.8	-	-	0.47 mL
10 % APS	50 µL	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	10 µL	5 µL
Autoklavirana H ₂ O	5.5 mL	3.75 mL	1.25 mL
Ukupni volumen, dostatan za dva gela	10 mL	10 mL	2 mL

2.2.9. Hibridizacija po Westernu

Hibridizacije po Westernu je metoda koju sam koristio za imunodetekciju proteina od interesa. Metoda se sastoji od nekoliko koraka. U prvome koraku proteine koji su razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom je potrebno prenijeti na membranu. Membrane su građene od različitih materijala poput nitroceluloze, poliviniliden difluorida, aktiviranog papira ili aktiviranog najlona a zajedničko svojstvo im je veliki kapacitet vezanja (lijepljenja) proteina. U drugom koraku nakon izvršenog prijenosa, membranu je potrebno inkubirati u puferu za blokiranje. Pufer za blokiranje sadržava otopinu inertnog proteina, poput govedeg serumskog albumina ili bezmasnih proteina mlijeka, koji se vežu (lijepe) na slobodne i aktivne dijelove membrane. Ovim postupkom se onemogućava nespecifično lijepljenje protutijela (korištenih

u daljnjim koracima u postupku) za membranu, eliminirajući tako lažno pozitivne rezultate i pozadinske smetnje. Potom se membrana inkubira u odgovarajućem primarnom, a potom i sekundarnom protutijelu. Završni korak obuhvaća detekciju signala kolorimetrijskim, fluorescentnim ili radioaktivnim metodama. Kemiluminiscencija je među najčešće korištenim metodama detekcije. Zasniva se na principu vezanja primarnog protutijela za ciljni protein, a sekundarno protutijelo, koje specifično prepoznaje primarno protutijelo i obično je kovalentno povezano s peroksidazom hrena, cijepa kemiluminiscentno sredstvo dajući luminiscentni produkt. Intenzitet razvijenog svijetla je u korelaciji s količinom proteina detektiranog protutijelima.

2.2.9.1. Transfer proteina na membranu

Po završetku SDS-PAGE elektroforeze, slijedio sam postupak prebacivanja proteina iz gela na nitroceluloznu membranu. Proteini se prenose na membranu djelovanjem električnog polja okomito na ravninu gela. U postupku takozvanog „mokrog“ transfera, prije slaganja u „sendvič“ se sve komponente natope u $1 \times$ puferu za transfer. Na plastični okvir kazete, redom se postave: spužvica, filter papir, poliakrilamidni gel, nitrocelulozna membrana, filter papir te spužvica. Zaostali mjehurići zraka između membrane i gela se uklone jer njihovo prisustvo ometa transfer proteina. Kazeta se preklopi i postavi u kadicu tako da membrana bude okrenuta prema anodi. U kadicu se doda ledeni blok kako bi se spriječilo pregrijavanje te se kadica do oznake ispuni $1 \times$ puferom za transfer. Prilikom transfera koristi se uređaj za napajanje. Vrijeme trajanja transfera se namjesti na 90 min pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA. Nakon što je izvršen transfer, membrana se oboja s Ponceau S otopinom za bojanje. To je crvena boja koja se reverzibilno veže za proteine na membrani i time ih vizualizira, a bojanje se radi u svrhu provjere učinkovitosti prijenosa proteina s gela na membranu. Boja se s membrane postepeno ispiri destiliranom vodom te u potpunosti ukloni ispiranjem u TBS-Tween puferu.

2.2.9.2. Blokiranje i inkubacija s protutijelima

Nakon uspješno provedenog transfera, membrane sam inkubirao 1 h u 10 mL $1 \times$ TBS-BSA puferu za blokiranje. Nakon blokiranja, membrane se inkubiraju na tresilici, u otopini nemasnog mlijeka u prahu (5%) u $1 \times$ TBS-Tween, u koje se doda primarno protutijelo u određenom razrjeđenju. Inkubacija primarnim protutijelom traje 1 h pri sobnoj temperaturi ili preko noći u hladnoj komori na 4 °C. Korištena primarna protutijela te njihova razrjeđenja

navedena su u Tablici 4. Zaostalo, nevezano protutijelo nakon inkubacije se ukloni serijom od 3 ispiranja po 15 min u $1 \times$ TBS-Tween. Potom se membrane inkubiraju na tresilici u 5% otopini nemasnog mlijeka u prahu u $1 \times$ TBS-Tween u koje se doda sekundarno protutijelo, razrijeđeno u omjeru 1:5000. Inkubacija sekundarnim protutijelom traje 1 h na sobnoj temperaturi. Korištena sekundarna protutijela navedena su u Tablici 5. Po završetku inkubacije membrane se ponovno ispiru 3 puta po 15 min s $1 \times$ TBS-Tween. Nakon trećeg ispiranja membrana se prebaci u otopinu $1 \times$ TBS te je spremna za vizualizaciju.

Tablica 4. Korištena primarna protutijela s navedenim pripadajućim porijeklom, razrjeđenjem, proizvođačem te kataloškim brojem

Naziv protutijela	Porijeklo	Razrjeđenje	Proizvođač, kataloški broj
anti-GST	Miš	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, SC138
anti-VCP	Zec	1:1000	Novus Biologicals, NB100-1557
anti-PCNA	Miš	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SC56
anti-GAPDH	Zec	1:2000	Proteintech, 10494-1-AP
anti-CHK1	Miš	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, SC8408
anti-XRCC1	Miš	1:500	Santa Cruz Biotechnology, SC56254
anti-PMS2	Miš	1:1000	BD Pharmingen, 556415
anti- β aktin	Miš	1:1000	Sigma Aldrich, A5316-2ML
anti-MLH1	Miš	1:1000	BD Pharmingen, SC271978
anti-Ub	Miš	1:1000	Santa Cruz, SC8017
anti-SUMO-2/3	Miš	1:200	DSHB, 8A2-C

Tablica 5. Korištena sekundarna protutijela s navedenim pripadajućim konjugatom, porijeklom, proizvođačem te kataloškim brojem. HRP: peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase*).

Naziv protutijela	Konjugat	Porijeklo	Proizvođač, kataloški broj
anti-mišje IgG	HRP	koza	Dako, p0447
anti-zečje IgG	HRP	koza	BioRad, 31461

2.2.9.3. Detekcija ciljanih proteina na nitroceluloznoj membrani

Proteine od interesa na nitroceluloznoj membrani sam detektirao pomoću komercijalnog kompleta za kemiluminiscenciju *Western blott luminol* (Santa Cruz Biotechnology) . Komplet sadržava dvije otopine: luminol reagens otopinu A i otopinu B, koje se pomiješaju u omjeru 1:1, kako bi se dobila aktivna mješavina. Kada se membrana uroni u aktivnu mješavinu, peroksidaza hrena posreduje u oksidaciji luminol reagensu u prisutnosti vodikovog peroksida, što rezultira proizvodnjom svjetlosnog signala. Svjetlosni signal se detektira korištenjem uređaja *ChemiDoc*. U slučaju kada se na istoj membrani želi detektirati više različitih proteina, s membrane je potrebno uništiti aktivnu peroksidazu sa sekundarnih protutijela iz prethodne reakcije (engl. *membrane stripping*). Membrana se prvo ispiru 10 min u destiliranoj vodi nakon čega slijedi inkubacija u 200 mM NaOH 8 min. Inkubacijom u NaOH se postiže uništavanje peroksidazne aktivnosti sekundarnog protutijela. Potom se membrana ispiru tri puta po 10 min, redom, u 1 × TBS, 1 × TBS-Tween, 1 × TBS. Nakon ispiranja, membrana se ponovo blokira (minimalno 20 min u 1 × TBS-BSA), nakon čega je moguća inkubacija u otopini narednog primarnog protutijela.

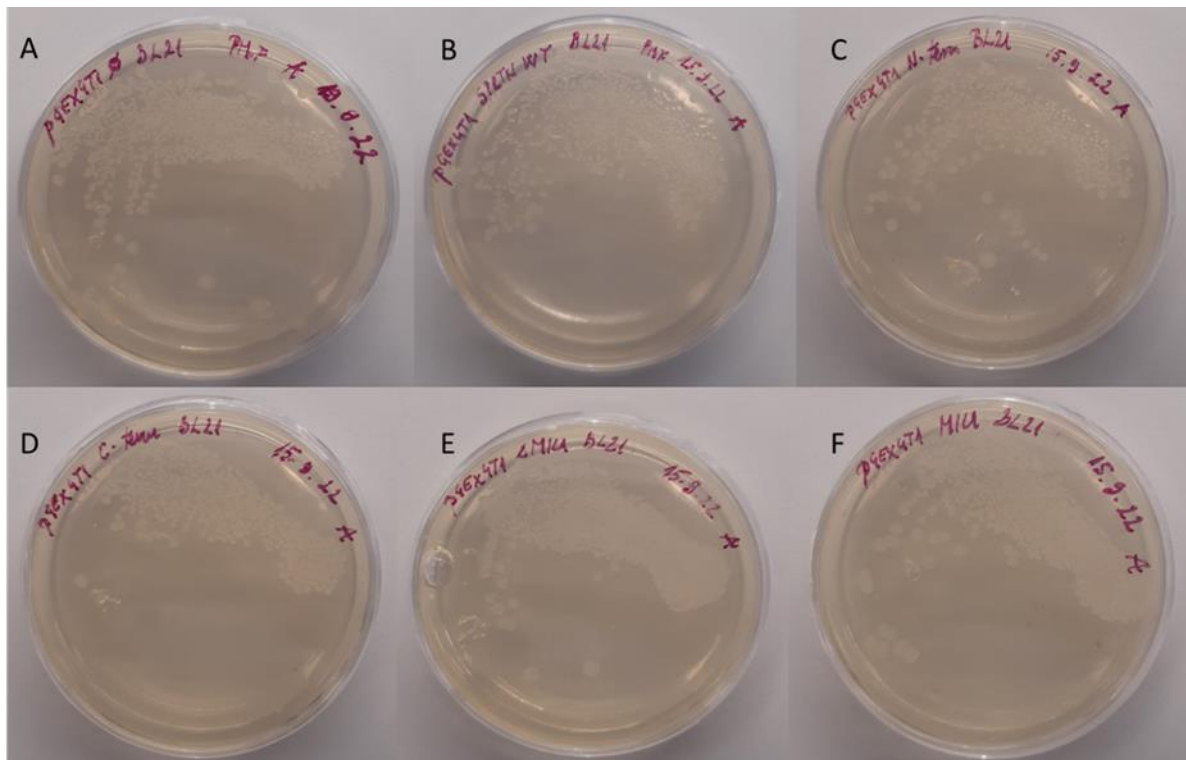
2.2.10. *Pulldown* analiza

Pulldown analiza je *in vitro* metoda za potvrđivanje ili identificiranje novih proteinskih interakcija. Metoda uključuje protein od interesa (mamca, engl. *bait*) te potencijalne interakcijske partnere (plijen, engl. *prey*). Dok su proteini mamca imobilizirani na sefarnim kuglicama, proteini plijena prisutni su u otopini staničnog lizata. Ukoliko tijekom inkubacije protein plijen interagira s proteinom mamcem, tijekom ispiranja interakcija se neće narušiti te će se naposljetku izvučeni protein moći vizualizirati imunodetekcijom. U ovome radu, protein SPRTN te njegove delecije s GST privjeskom, imobilizirani na glutation sefarnim kuglicama, predstavljaju mamca. Novi interakcijski partneri testirani su korištenjem staničnog lizata linija HeLa i HepG2. Stanice sam lizirao u modificiranom puferu RIPA kojem sam dodao $MgCl_2$ (10 mM), $ZnCl_2$ (12.5 μ M), otopinu mješavine proteaznih inhibitora (100 \times , razrijeđeno po uputama proizvođača), natrij ortovanadat (1 mM) te benzonazu (250 U/ μ L). Kako bi se pospješila efikasnost djelovanja benzonaze, uzorci su inkubirani 15 min na 37 °C, a potom dodatnih 15 minuta na ledu. Po isteku inkubacije uzorci su centrifugirani 15 minuta na 16000 g pri 4°C. Manji dio dobivenog proteinskog ekstrakta (10% volumena korištenog za pojedini *pulldown*) zakuha se u 6 \times Laemmli puferu, dok se ostatak pomiješa s 2000 μ L modificiranog pufera RIPA s dodatkom mješavine proteaznih inhibitora (100 \times , razrijeđeno po uputama proizvođača), natrij ortovanadata (1 mM), PMSF (0.7 mM) i NaF (25 mM). U idućem koraku, u nove tubice od 1.5 mL raspodjeli se po 500 μ L razrijeđenog proteinskog ekstrakta koji se pomiješa s eksperimentalno određenom količinom glutation sefarnih kuglica na koje je imobiliziran odgovarajući protein mamca (GST-Ø, GST-SPRTN-wt, GST-N terminus, GST-C terminus, GST-ΔMIU, GST-MIU). Reakcija vezanja je trajala 2 h na 4 °C uz konstantnu rotaciju 20 o/min. Nakon inkubacije tubice se centrifugiraju 4 min na 800 g pri 4 °C. Supernatant se ukloni, a talog glutation sefarnih kuglica se ispiru hladnim 1 \times PBSom, nakon čega se ponovi centrifugiranje i uklanjanje supernatanta. Ispiranje se ponovi 3 puta uz centrifugiranje pri istim uvjetima. Višestrukim ispiranjem se odstranjuju nečistoće i zaostali nevezani stanični proteini. Nakon posljednjeg ispiranja i centrifugiranja zaostatci pufera su uklonjeni inzulinskom špricom, a preostale kuglice se pomiješaju s 20 μ L 2 \times Laemmli pufera te denaturiraju 5 min na 95 °C. Uzorci se analiziraju elektroforezom SDS-PAGE i hibridizacijom po Westernu.

3. REZULTATI

3.1. Prekomjerna ekspresija i purifikacija varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom

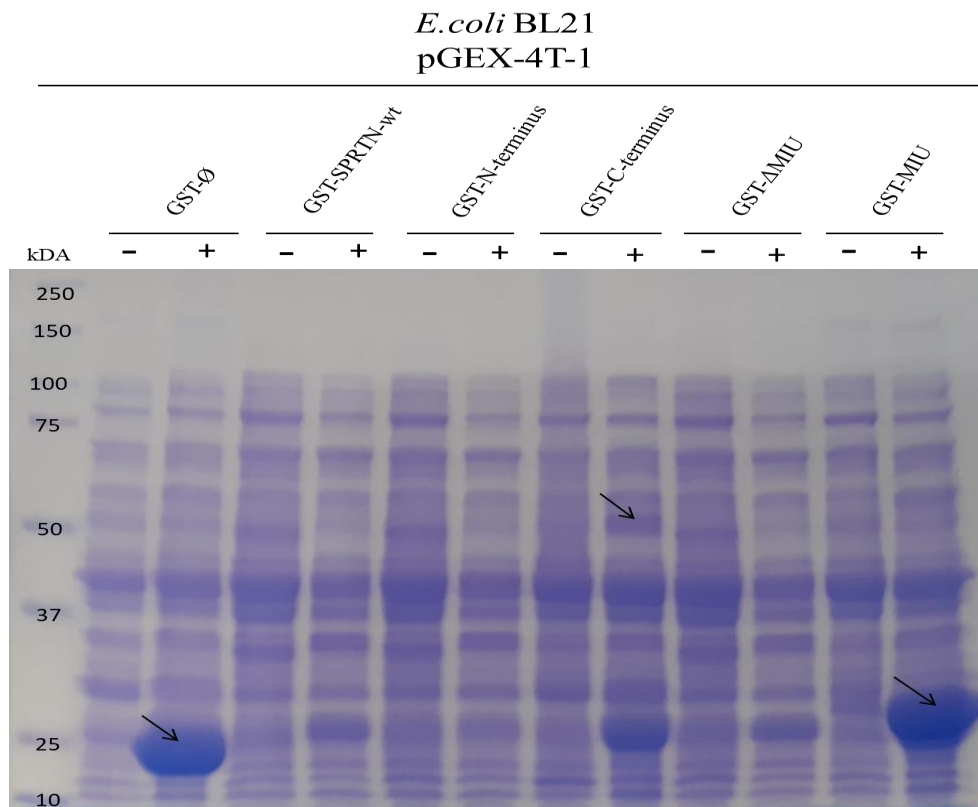
Nakon efikasne transformacije bakterija *E. Coli* BL21 (Slika 10) uspostavio sam prekonnočne bakterijske kulture koja su propagirane u tekućm mediju LB.



Slika 10. Krute LB-ampicilin hranjive podloge s nasadenim transformiranim bakterijama *E. coli* BL21 nakon prekonnočne inkubacije. Konstrukti korišteni za transformaciju su A) pGEX4T1-empty, B) pGEX4T1-SPRTN-wt, C) pGEX4T1-N-terminus, D) pGEX4T1-C-terminus, E) pGEX4T1- Δ MIU te F) pGEX4T1-MIU

Za ekspresija proteina GST- \emptyset , GST-C-terminus, GST-MIU koristio sam 200 mL proizvodne kulture, za GST-N-terminus i GST- Δ MIU 800 mL dok sam za GST-SPRTN-wt koristio 1.2 L proizvodne kulture. Indukciju ekspresije delecijjskih varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom sam aktivirao dodatkom 1 mM IPTG, u trajanju od 4 h pri 37 °C. Slika 11. prikazuje proteinske ekstrakte prije i poslije indukcije sinteze rekombinantnih proteina IPTGom. Očekivane molekulske mase proteina GST- \emptyset , GST-C-terminus i GST-MIU su 26.00, 52.14 odnosno 28.72 kDa (Tablica 2), što sugerira da je došlo do uspješne prekomjerne

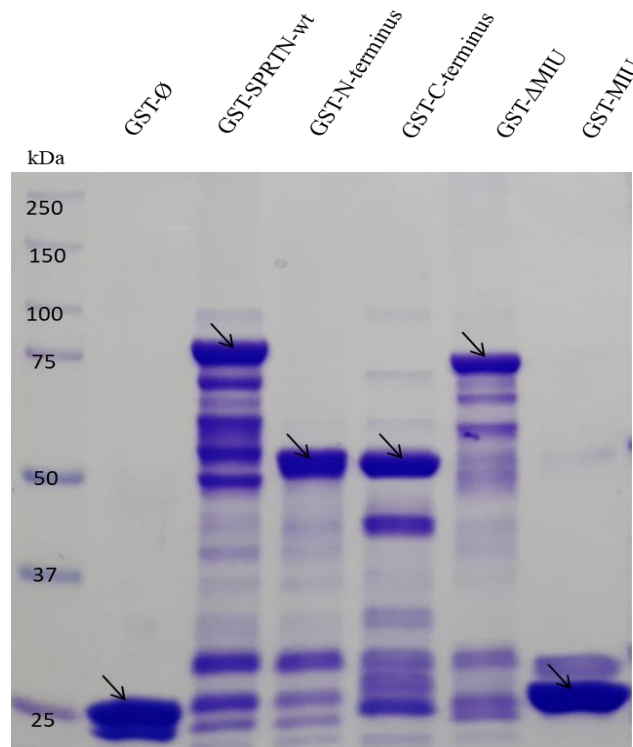
ekspresije proteina GST-Ø, GST-C-terminus i GST-MIU. Za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST-ΔMIU molekulske mase iznose 80.81, 54.57 odnosno 78.21 kDa (Tablica 2). Unatoč produkciji u puno većem volumenu LB medija, vrpce na navedenim veličinama u uzorcima nakon indukcije ekspresije nisu vidljive što sugerira da se navedeni konstrukti ili nisu producirali ili su se producirali u maloj količini.



Slika 11. Proteinski ekstrakti prije (-) i poslije (+) dodatka 1 mM IPTG-a razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE i obojani s Coomassie Brilliant R-250. Strelicom su označeni uspješno inducirani konstrukti GST-Ø (26.00 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa) i GST-MIU (28.72 kDa). Indukcija konstrukata GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa) i GST-ΔMIU (78.21 kDa) nije vidljiva. Oznaka kDa na gelu predstavlja proteinski molekularni standard.

Stoga je idući korak bio provjeriti da li se navedeni rekombinantni proteini nalaze zarobljeni u talogu zbog potencijalnog stvaranja inkluzijskih tijela. Uzorke taloga prije i poslije dodatka induktora IPTG sam analizirao elektroforezom SDS-PAGE te transferirao na nitroceluloznu membranu u svrhu detekcije konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST-ΔMIU upotrebom primarnog anti-GST protutijela. Nakon imunodetekcije s protutijelom anti-GST

nisam potvrdio prisustvo proteina GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU u talogu. Unatoč tome što za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU indukcija ekspresije u uzorcima supernatanta nije bila uočljiva napravio sam pročišćavanje svih produciranih, rekombinantnih proteina. Po 200 μ L glutation sefarnih kuglica sam pomiješao s 10 mL bakterijskog proteinskog ekstrakta. Na slici 12. prikazani su pročišćeni proteini razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE i obojani s Coomassie Brilliant R-250. Na temelju dominantnih vrpca vidljivo je da su svi rekombinantni proteini uspješno purificirani. Uz dominantne vrpce na gelu su prisutne i druge proteinske vrpce koje su najvjerojatnije nastale zbog autoproteolitičkog cijepanja proteina SPRTN.

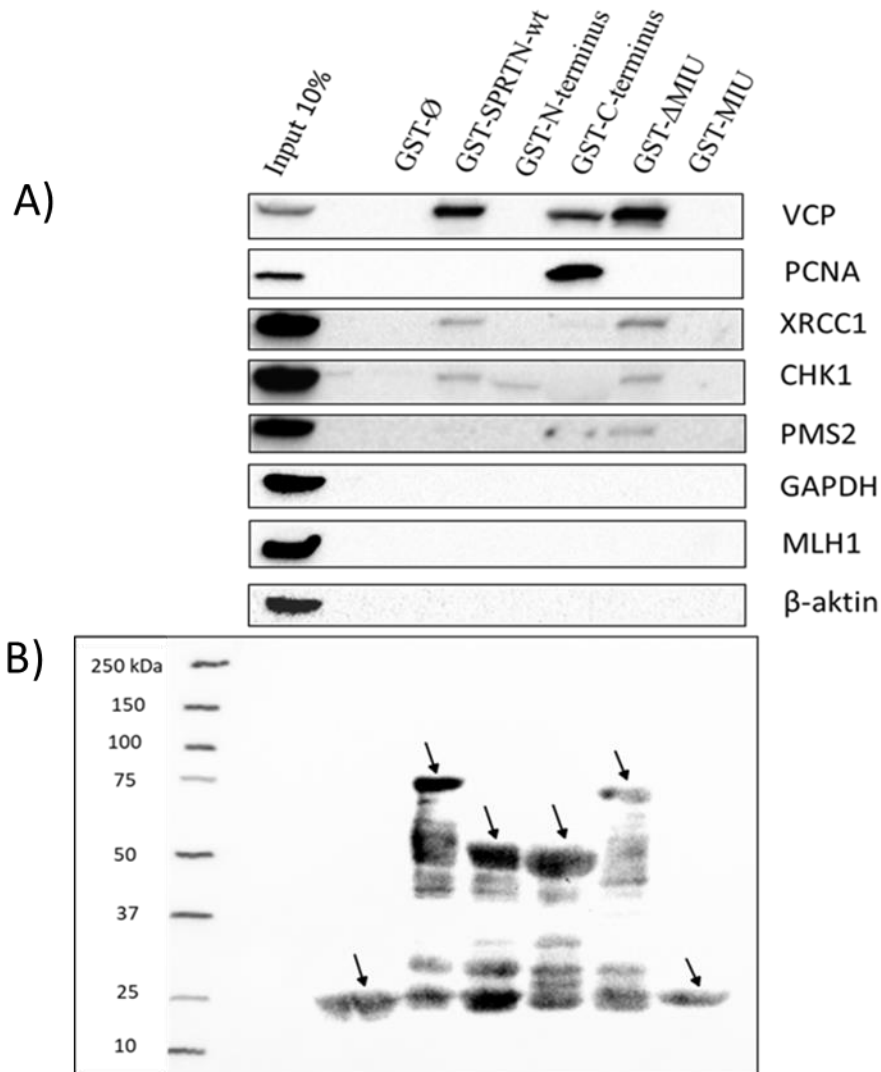


Slika 12. Purificirani konstrukti vezani za glutation sefarnih kuglica razdvojeni elektroforezom SDS-PAGE i obojani s Coomassie Brilliant R-250. Crnim strelicama su označeni konstrukti GST- \emptyset , GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus, GST-C-terminus, GST- Δ MIU i GST-MIU. Volumeni purificiranih proteina na sefarnim kuglicama od, redom, 3 μ L GST- \emptyset , 140 μ L GST-SPRTN-wt, 80 μ L GST-N-terminus, 10 μ L GST-C-terminus, 140 μ L GST- Δ MIU i 4 μ L GST-MIU su osušeni pomoću šprice, zakuhani u 20 μ l Laemmly pufera i naneseni na gel. Oznaka kDa na gelu predstavlja proteinski molekularni standard.

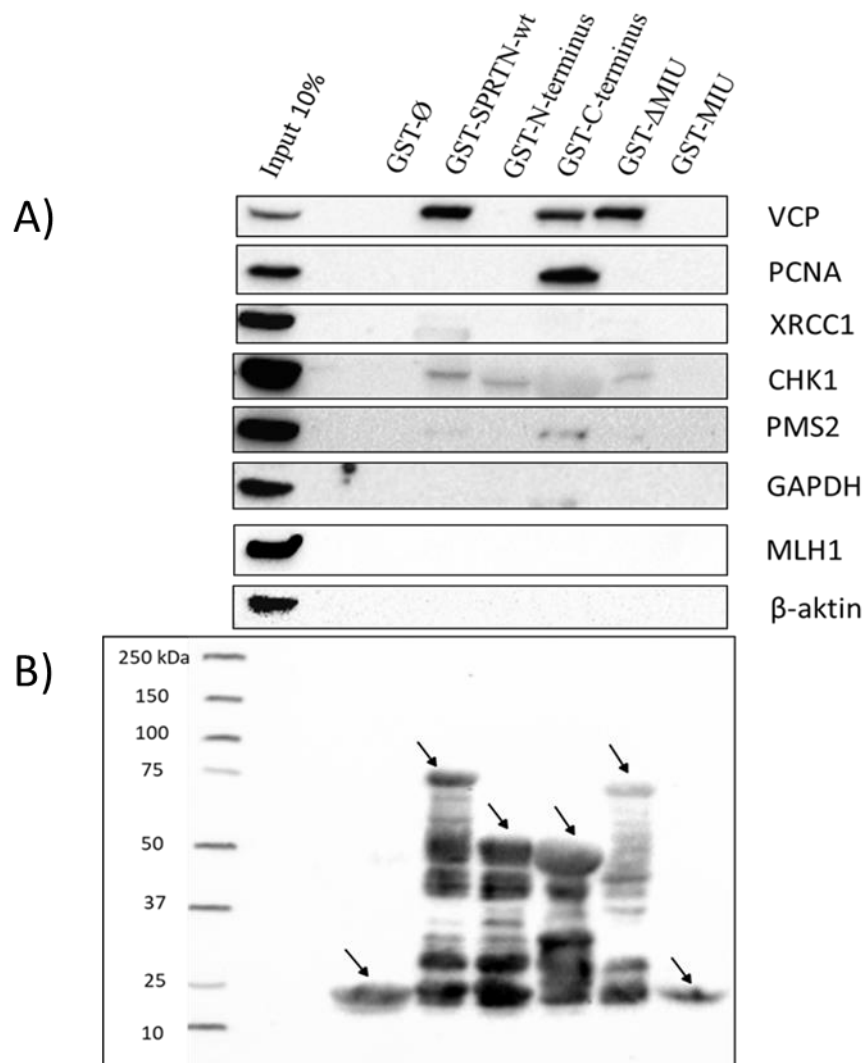
3.2 Ispitivanje proteinskih interakcija varijanti proteina SPRTN i proteina stanične linije HeLa

Proteinske interakcije varijanti proteina SPRTN sam ispitao *pulldown* analizom. Za potrebe eksperimenta, kao mamce sam koristio proteine vezane na glutation sefarozne kuglice, u volumenima 3 μL GST- \emptyset , 140 μL GST-SPRTN-wt, 80 μL GST-N-terminus, 10 μL GST-C-terminus, 140 μL GST- ΔMIU , ili 4 μL GST-MIU. Različiti volumeni mamaca vezanih za glutation sefarozne kuglice služili su kako bi se ujednačila količina purificiranih proteina korištenih u *pulldown* reakcijama. Mamce sam vizualizirao na nitroceluloznoj membrani upotrebom anti-GST protutijela (Slike 13B, 14B i 15B). Detektirao sam dominantne vrpce koje odgovaraju pojedinom mamcu dok preostale vrpce vjerojatno odgovaraju degradacijskim produktima koji nastaju uslijed autoproteolitičkog cijepanja proteina SPRTN (Slika 13B., 14B. i 15B.). Kako bih eliminirao lažno pozitivne rezultate, GST- \emptyset je korišten kao negativna kontrola vezanja proteina na protein GST i glutation sefarozu, a detekcija β -aktina u inputu kao kontrola ispravnosti proteinskog ekstrakta HeLa stanica. Na slici 13A., 14A. i 15A. vidljivo je da nema nespecifičnog vezanja proteina iz HeLa stanica na GST- \emptyset i glutation kolonu. Također, signal na visini od 42 kDa koji odgovara molekularnoj masi β -aktina je prisutan samo u inputu, što potvrđuje da β -aktin ne stupa u interakciju s pročišćenim proteinima vezanim na glutation kolonu (Slika 13A., 14A. i 15A.). Kontrolne (Slika 13A) i stanice tretirane s 400 μM formaldehida (Slika 14A) ili s UV zračenjem (Slika 15A) pokazuju da se proteini VCP i PCNA koji su poznati interaktori proteina SPRTN vežu na protein SPRTN. Poznato je da se interakcija proteina VPC i SPRTN ostvaruje preko domene SHP dok se interakcija s PCNA odvija preko domene PIP (Perry i Ghosal, 2022). Protein VCP na nitroceluloznoj membrani sam detektirao protutijelom anti-VCP na poziciji koja odgovara molekulskoj masi od 89 kDa. VCP se veže na GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- ΔMIU što potvrđuje vezanje VCP za C terminalni dio proteina SPRTN. Razlika jačine VCP signala između kontrolnih stanica, stanica tretiranih s 400 μM formaldehida i stanica ozračenih dozom zračenja od 1 mJ/cm^2 nije vidljiva (Slika 13A., 14A. i 15A.) što znači da tretman nije imao utjecaj na vezanje VCP. Protein PCNA sam imunodetektirao protutijelom anti-PCNA na poziciji koja odgovara molekulskoj masi od 29 kDa. Očekivani rezultat je bio da će se signal pojaviti u jažicama s konstruktima GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- ΔMIU , no signal od 29 kDa je prisutan samo u jažici s GST-C-terminus konstruktom što i dalje potvrđuje da u stanicama PCNA stupa u interakciju s proteinom SPRTN preko C-terminalnog dijela. Kao i kod VCP signala, promjena u jačini PCNA signala između

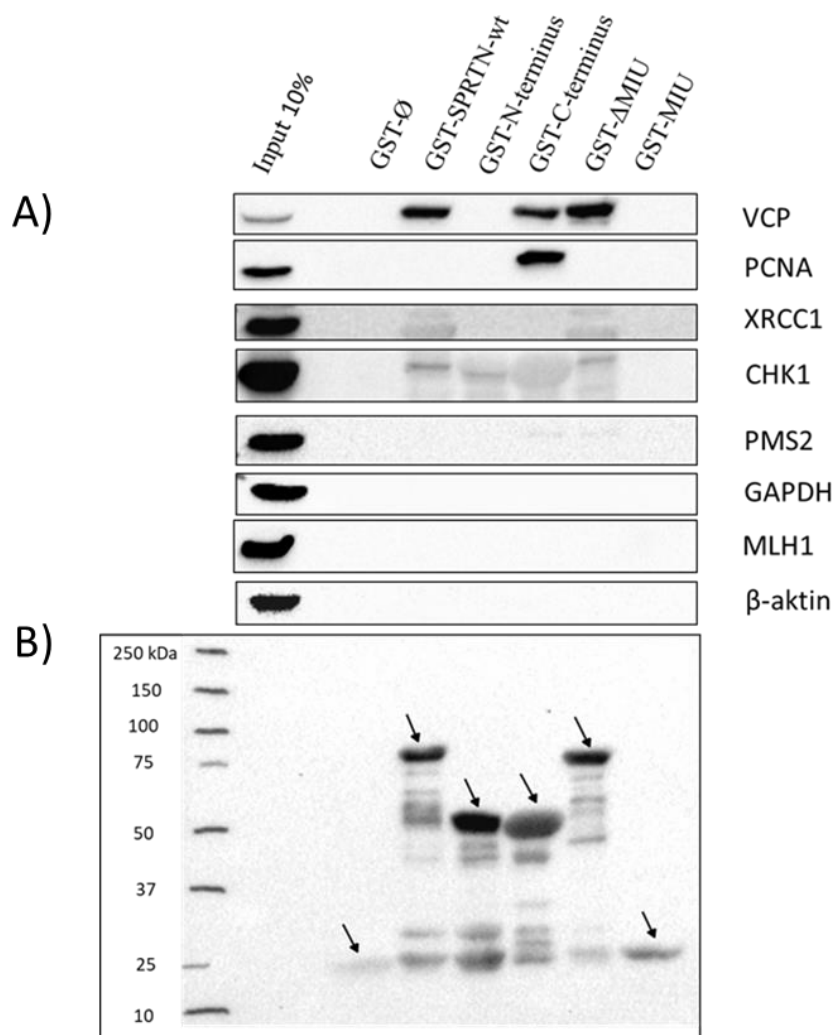
kontrolnih stanica, stanica tretiranih formaldehidom te zračenjem nije vidljiva (Slika 13A., 14A. i 15A.). Iz toga je zaključeno da tretman nije utjecao na vezanje PCNA za protein SPRTN. Korištenjem protutijela anti-XRCC1 dobio sam pozitivan signal na poziciji koja odgovara molekularnoj masi od 85 kDa. Signal koji odgovara molekularnoj masi proteina XRCC1 je vidljiv u jažicama s konstruktima GST-SPRTN-wt, GST- Δ MIU te jako slab pozitivan signal je vidljiv u jažici s GST-C-terminusom (Slika 13A) Iz navedenog je zaključeno da u stanicama protein XRCC1 stupa u interakciju s proteinom SPRTN preko C-terminalnog dijela. Kod stanica koje su tretirane dozom UV zračenjem od 1 mJ/cm^2 pozitivan signal vezanja XRCC1 za konstrukte GST-SPRTN-wt i GST- Δ MIU je izrazito slab dok interakcije s GST-C terminusom uopće nema što znači da je UV tretman smanjio interakciju proteina XRCC1 s proteinom SPRTN (Slika 15A). Kod stanica koje su tretirane s $400 \mu\text{M}$ formaldehida, interakcija između XRCC1 i delecijских varijanti proteina SPRTN nije dokazana što znači da je tretman formaldehidom spriječio interakciju XRCC1 s proteinom SPRTN (Slika 14A). Imunodetekcija protutijelom anti-CHK1 je pokazala pozitivan signal na od 55 kDa. Signal koji odgovara molekularnoj masi CHK1 je prisutan u jažicama s konstruktima GST-WT, GST-N-terminus i GST- Δ MIU (Slika 13A., 14A. i 15A.) Iz rezultata je ustanovljeno da se interakcija između proteina CHK1 i SPRTN odvija preko N-terminalnog dijela te da je interakcija prisutna u kontrolnim stanicama kao i u stanicama koje su bile izložene formaldehidu i zračenju. Upotrebom protutijela anti-PMS2 detektirao sam signal na poziciji koja odgovara molekularnoj masi od 110 kDa u jažicama sa konstruktom GST-C-terminus i GST- Δ MIU što ukazuje na interakciju proteina PMS2 s C-terminalnim dijelom proteina SPRTN (Slika 13A., 14A.). Postojanje pozitivnog signala vezanja PMS2 je prisutno i kod stanica koje su bile izložene zračenju no signal je izrazito slab što znači da je UV tretman smanjio interakciju proteina PMS2 s proteinom SPRTN (Slika 15A). Signal na visini od 36 kDa koji odgovara molekularnoj masi GAPDH detektirao sam anti-GAPDH protutijelom. Signal je prisutan samo u inputu što potvrđuje da GAPDH ne stupa u interakciju s proteinom SPRTN (Slika 13A., 14A. i 15A.). Upotrebom protutijela anti-MLH1 detektiran je signal na poziciji koja odgovara molekularnoj masi 86 kDa. Signal je prisutan samo u inputu što potvrđuje da MLH1 ne stupa u interakciju s proteinom SPRTN niti s delecijским varijantama proteina SPRTN (Slika 13A., 14A. i 15A.). Od analiziranih proteina vidljivo je da ni jedan od testiranih proteina nije u uvjetima istraženim u ovom radu purificiran s domenom MIU.



Slika 13. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijских varijanti u kontrolnim uvjetima uzgoja HeLa stanica. (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa), β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. PCNA se vezao za konstrukt GST-C-terminus. XRCC1 se vezao za GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. CHK1 se vezao za GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU. PMS2 se vezao za GST-C-terminus i GST- Δ MIU. Proteini GAPDH, MLH1 i β -aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST- \emptyset (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST- Δ MIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard.



Slika 14. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijских varijanti u stanicama HeLa tretiranim s 400 μ M formaldehida u trajanju od 1 h. (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa), β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. PCNA se vezao za GST-C-terminus. XRCC1 se nije vezano na ni jedan konstrukt. CHK1 se vezao za GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU. PMS2 se vezao za GST-C-terminus i GST- Δ MIU. Proteini GAPDH, MLH1 i β -aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST- \emptyset (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST- Δ MIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard.

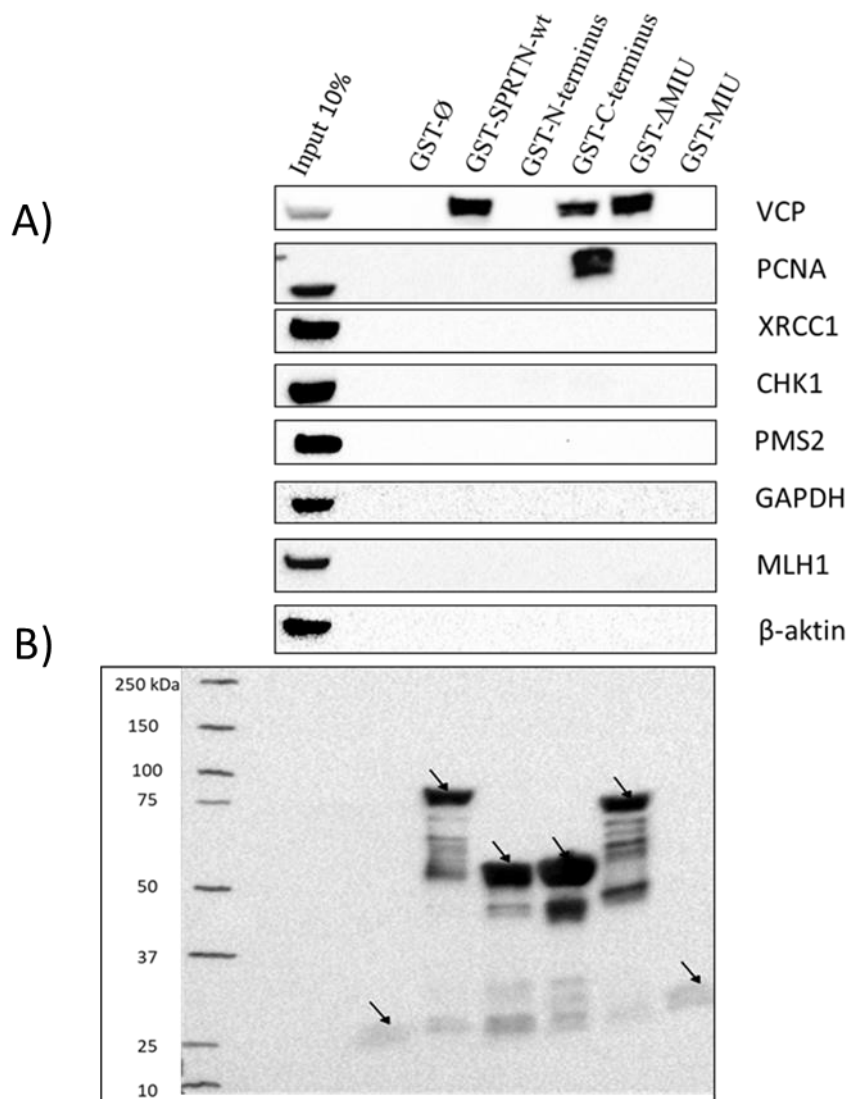


Slika 15. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijskih varijanti u stanicama HeLa izloženih dozi zračenja od 1 mJ/cm^2 . (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa) β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. PCNA se vezao za GST-C-terminus. XRCC1 se vezao za GST-SPRTN-wt i GST- Δ MIU. CHK1 se vezao za GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU. PMS2 se vezao za GST-C-terminus i GST- Δ MIU. Proteini GAPDH, MLH1 i β -aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST- \emptyset (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST- Δ MIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard.

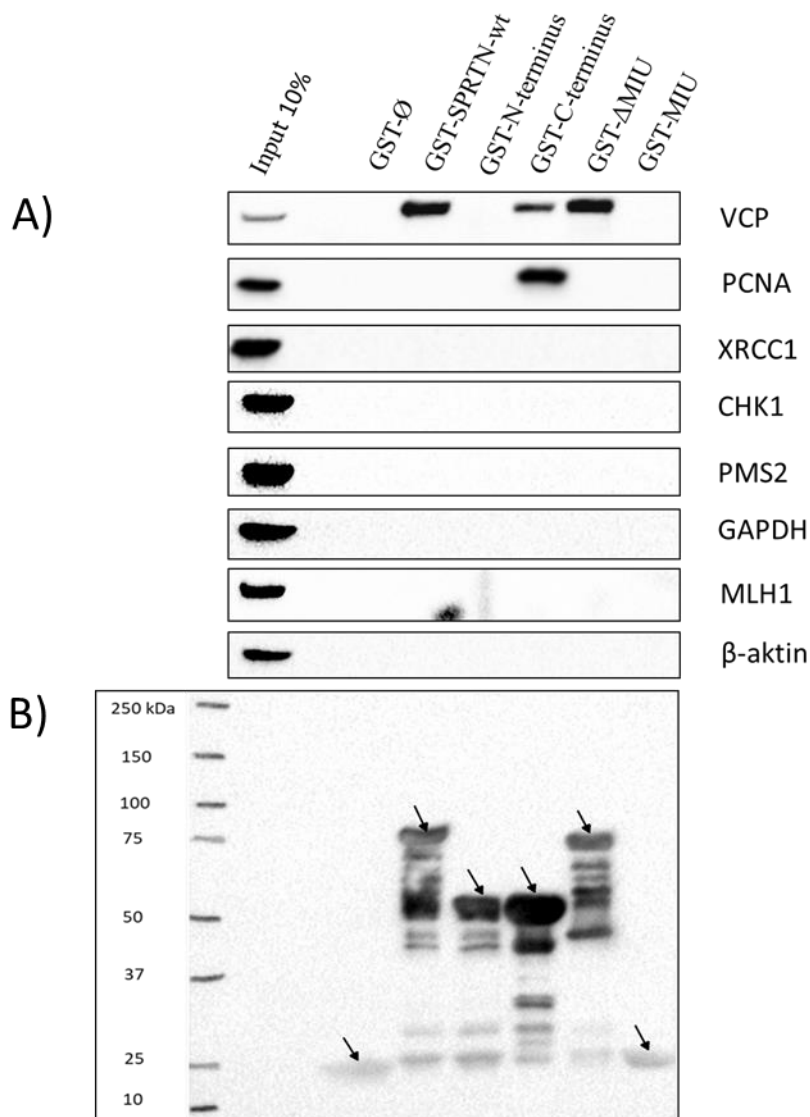
3.4. Ispitivanje proteinskih interakcija varijanti proteina SPRTN i proteina stanične linije HepG2

Proteinske interakcije varijanti proteina SPRTN sam ispitao *pull-down* analizom. Za potrebe eksperimenta, kao mamce sam koristio proteine vezane na glutation sefarozne kuglice, u volumenima 3 μL GST- \emptyset , 140 μL GST-SPRTN-wt, 80 μL GST-N-terminus, 10 μL GST-N-terminus, 140 μL GST- ΔMIU , ili 4 μL GST-MIU. Različiti volumeni mamaca vezanih za glutation sefarozne kuglice služili su kako bi se ujednačila količina purificiranih proteina korištenih u *pull-down* reakcijama. Mamce sam vizualizirao na nitroceluloznoj membrani upotrebom anti-GST protutijela (Slika 16B., 17B. i 18B.). Detektirano sam dominantne vrpce koje odgovaraju pojedinom mamcu (Slika 16B., 17B. i 18B.). Kao bih eliminirao lažno pozitivne rezultate, GST- \emptyset je korišten kao negativna kontrola vezanja proteina na protein GST i glutation sefarozu, a detekcija β -aktina u inputu kao kontrola ispravnosti proteinskog ekstrakta HepG2 stanica. Na slici 16A., 17A. I 18A. Vidljivo je da nema nespecifičnog vezanja proteina iz HeLa stanica na GST- \emptyset i glutation kolonu. Također signal na visini od 42 kDa koji odgovara molekularnoj masi β -aktina je prisutan samo u inputu, što potvrđuje da β -aktin ne stupa u interakciju s pročišćenim proteinima vezanim na glutation kolonu (Slika 16A., 17A. i 18A.). Kontrolne (Slika 16A) i stanice tretirane s 400 μM formaldehida (Slika 17A) ili UV zračenjem (Slika 18A) pokazuju da su proteini VCP i PCNA koji su poznati interaktori proteina SPRTN vežu na protein SPRTN. Poznato je da se interakcija proteina VCP i SPRTN ostvaruje preko domene SHP dok se interakcija s PCNA odvija preko domene PIP (Perry i Ghosal, 2022). Protein VCP na nitroceluloznoj membrani je detektiran protutijelom anti-VCP na poziciji koja odgovara molekularnoj masi od 89 kDa. VCP se veže na GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- ΔMIU što potvrđuje interakciju VCP s C terminalni dijelom proteina SPRTN. Jačina signala vezanja VCP je puno veća kod kontrolnih stanica (Slika 16A) i stanica ozračenih dozom zračenja od 1 mJ/cm^2 (Slika 17A) nego kod stanica tretiranih s 400 μM formaldehida (Slika 18A) što znači da je tretman formaldehidom smanjio interakciju između proteina VCP i proteina SPRTN. PCNA sam imunodetektirao protutijelom anti-PCNA na poziciji koja odgovara molekularnoj masi od 29 kDa te je signal kao i kod HeLa stanične linije prisutan samo u jažici s konstruktom GST-C terminus. Takav rezultat je još jednom potvrdio poznatu informaciju da je PCNA interaktor proteina SPRTN te da se interakcija u stanicama odvija preko C terminalnog dijela. Razlika u jačini signala vezanja VCP između kontrolnih stanica (Slika 16A), stanica tretiranih s 400 μM formaldehida (Slika 17A) i stanica ozračenih dozom zračenja od 1 mJ/cm^2 (Slika 18A) nije vidljiva. Iz toga

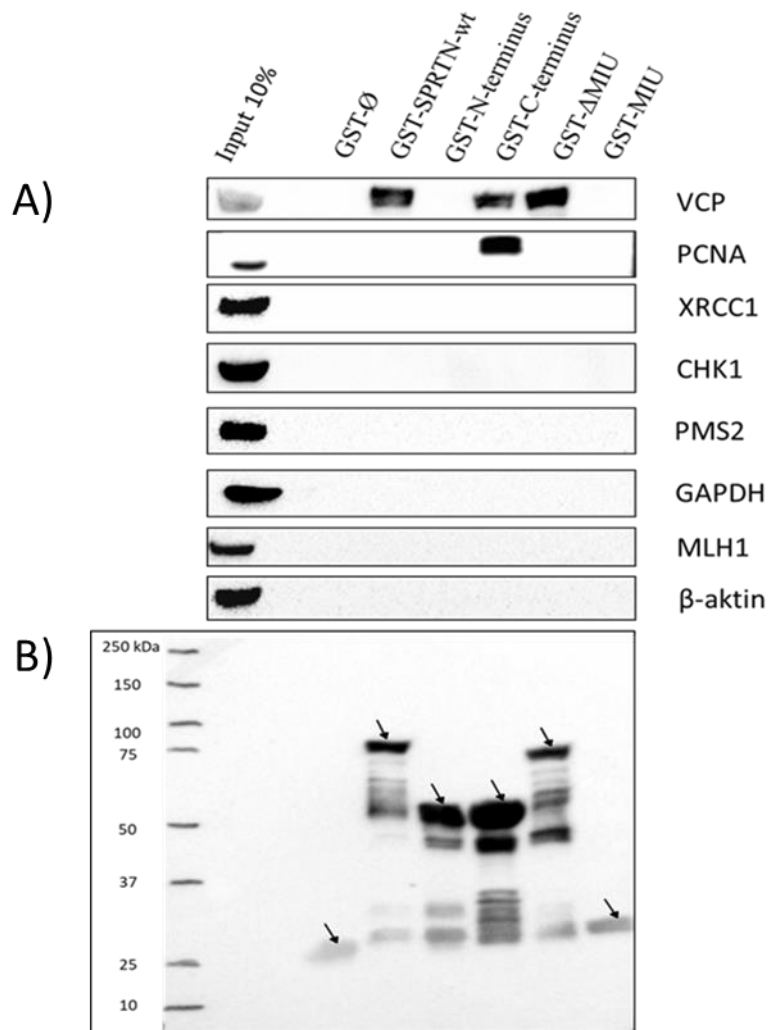
je zaključeno da tretman nije utjecao na vezanje PCNA za protein SPRTN. Što se tiče proteina XRCC1, CHK1, PMS2, za razliku od HeLa stanica gdje su dobiveni pozitivni signali vezanja, kod HepG2 stanične linije (Slika 16A., 17A. i 18A.) navedeni proteini nisu stupili u interakciju ni sa jednom delecijском varijantom proteina SPRTN. Također proteine GAPDH i MLH1 (16A., 17A. i 18A.) sam detektirao na pozicijama koje odgovaraju molekulskim masama 32 kDa i 86 kDa. Signali su prisutni samo u inputu što govori da GAPDH i MLH1 u testiranim uvjetima ne stupaju u interakciju s proteinom SPRTN. Od analiziranih proteina vidljivo je da ni jedan od testiranih proteina nije u uvjetima istraženim u ovom radu purificiran s domenom MIU.



Slika 16. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijских varijanti u kontrolnim uvjetima uzgoja HepG2 stanica. (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa) β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST-ΔMIU. VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST-ΔMIU. PCNA se vezao za GST-C-terminus. Proteini XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 i β-aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST-Ø (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST-ΔMIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard. .



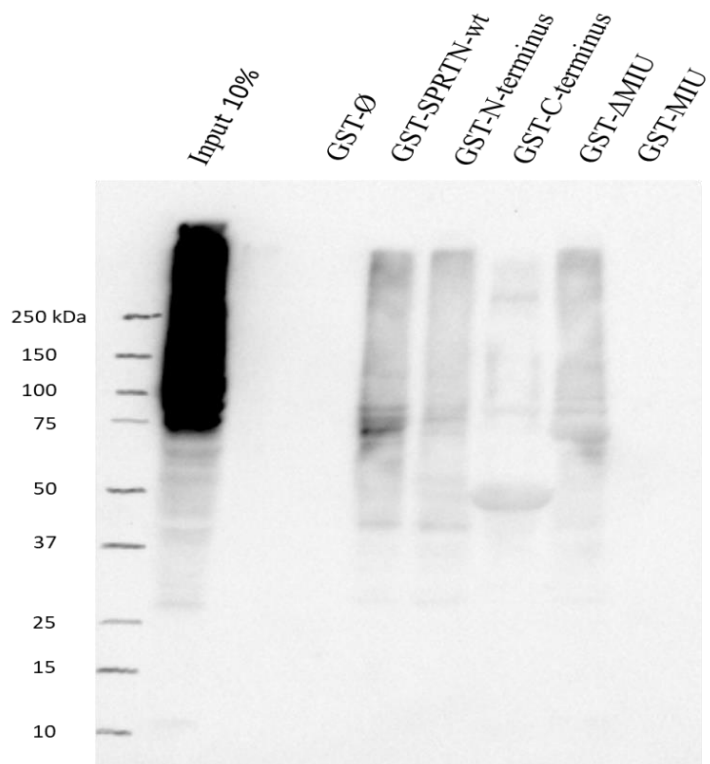
Slika 17. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijских varijanti u stanicama HepG2 tretiranim s 400 μ M formaldehida u trajanju od 1 h. (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa), β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. PCNA se vezao za GST-C-terminus. Proteini XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 i β -aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST-Ø (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST- Δ MIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard. .



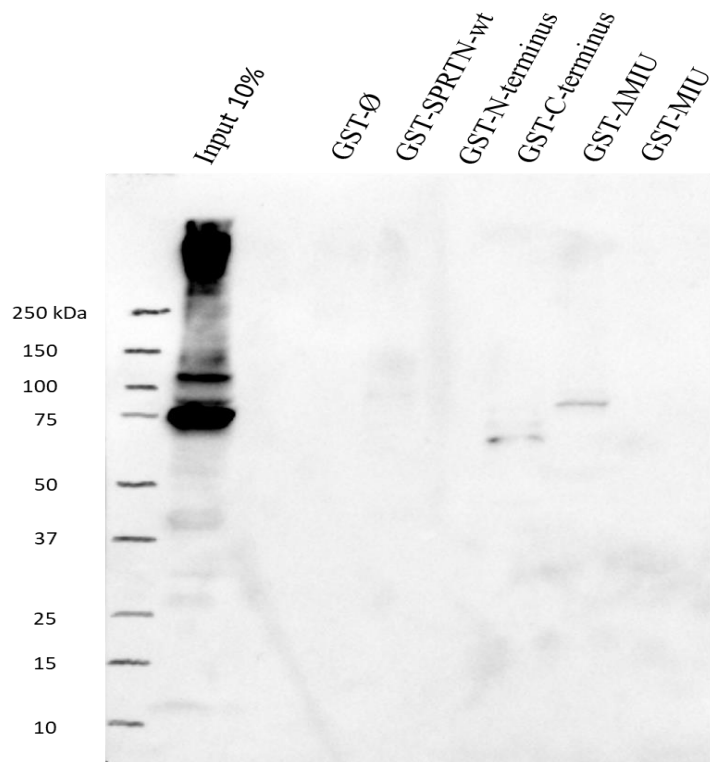
Slika 18. *Pulldown* analiza proteinskih partnera proteina SPRTN i njegovih delecijskih varijanti u stanicama HepG2 izloženih dozi zračenja od 1 mJ/cm^2 60 sec. (A) Proteini plijena detektirani su na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi VCP(89 kDa), PCNA (29 kDa), XRCC1(85 kDa), CHK1(55 kDa), PMS2 (110 kDa), GAPDH (32 kDa), MLH1 (86 kDa), β aktin (42 kDa). VCP se vezao za konstrukte GST-SPRTN-wt, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. PCNA se vezao za GST-C-terminus. Proteini XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH, MLH1 i β -aktin se nisu vezali ni za jedan konstrukt. (B) Na nitroceluloznoj membrani proteini mamci su detektirani anti-GST protutijelom i označeni crnim strelicama na pozicijama koje odgovaraju molekularnoj masi GST-Ø (26.00 kDa), GST-SPRTN-wt (80.81 kDa), GST-N-terminus (54.57 kDa), GST-C-terminus (52.14 kDa), GST- Δ MIU (78.21 kDa), GST-MIU (28.72 kDa). Oznaka kDa na membrani predstavlja proteinski molekularni standard. .

3.5. Ispitivanje interakcija proteina SPRTN s proteinima obilježenim ubikvitinom ili SUMO proteinima

Proteinske interakcije varijanti proteina SPRTN s ubikvitiniranim i sumoiliranim proteinima sam ispitao *pulldown* analizom u HeLa stanicama. Za potrebe eksperimenta, kao mamce sam koristio proteine vezane na glutation sefaroze kuglice, u volumenima 3 μ L GST- \emptyset , 140 μ L GST-SPRTN-wt, 80 μ L GST-N-terminus, 10 μ L GST-C-terminus, 140 μ L GST- Δ MIU, i 4 μ L GST-MIU. Mamce sam vizualizirao na nitroceluloznoj membrani upotrebom anti-GST protutijela (rezultat nije prikazan). U svrhu eliminacije lažno pozitivnih rezultata, GST- \emptyset je korišten kao negativna kontrola. Na slikama 19. i 20. vidljivo je da nije došlo do nespecifičnog vezanja proteina na konstrukt GST- \emptyset . Slika 19. prikazuje nitroceluloznu membranu na kojoj sam upotrebom anti-Ub protutijela imunodetektirao ukupne ubikvitinirane proteine (input). Ubikvitinirani proteini su pročišćeni s proteinima GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus, GST-C-terminus i GST- Δ MIU. Navedeni rezultat potvrđuje sposobnost proteina SPRTN i njegovih delecijских mutanti da veže pojedine proteine iz staničnog lizata koji su ubikvitinirani. Međutim, ubikvitinirani proteini nisu pročišćeni s proteinom GST-MIU što znači da domena MIU u testiranim eksperimentalnim uvjetima ne stupa u interakciju s ubikvitiniranim proteinima. Slika 20. prikazuje nitroceluloznu membranu na kojoj sam upotrebom anti-SUMO-2/3 protutijela imunodetektirao ukupne sumoilirane proteine označene posttranslacijskom modifikacijom SUMO2 ili SUMO3. Signal sumoiliranih proteina prisutan je u inputu što ukazuje da ni jedan konstrukt ne stupa u interakciju s proteinima označenim SUMO2/3 posttranslacijskom modifikacijom u testiranim eksperimentalnim uvjetima. Pozitivnog signal u jažicama s GST-C-terminusom na poziciji koja odgovara molekularnoj masi 52.14 kDa i GST- Δ MIU na poziciji koja odgovara molekularnoj masi 78.21 kDa rezultat je nedovoljno temeljitog uklanjanja peroksidazne aktivnosti nakon prethodne imunodeteckije proteina mamaca anti-GST protutijelom.



Slika 19. *Pulldown* analiza provedena na varijantama proteina SPRTN u kontrolnim uvjetima uzgoja HeLa stanica. Na nitroceluloznoj membrani ukupni ubikvitinirani proteini su detektirani anti-Ub protutijelom. Konstrukti GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus, GST-C-terminus i GST-ΔMIU vežu pojedine ubikvitinirane proteine iz staničnog lizata. GST-MIU ne veže ubikvitinirane proteine.



Slika 20. *Pulldown* analiza provedena na varijantama proteina SPRTN u kontrolnim uvjetima uzgoja HeLa stanica. Na nitroceluloznoj membrani ukupni sumoilirani proteini su detektirani anti-SUMO-2/3 protutijelom. Konstrukti GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus, GST-C-terminus, GST- Δ MIU te GST-MIU ne vežu sumoilirane proteine. Lažni pozitivni signal u jažicama s GST-C-terminusom na poziciji koja odgovara molekularnoj masi 52.14 kDa i GST- Δ MIU na poziciji koja odgovara molekularnoj masi 78.21 kDa rezultat je nedovoljno temeljitog uklanjanja peroksidazne aktivnosti nakon prethodne imunodetekcije proteina mamaca anti-GST protutijelom.

4. RASPRAVA

4.1. Uspješnost ekspresije i pročišćavanja varijanti proteina SPRTN obilježenih GST-privjeskom

Za provođenje ekspresije proteina u *E. coli* postoji univerzalni protokol koji se pokazao uspješnim za veliki raspon proteina. Unatoč tome, svaki protein ima svoje specifične biokemijske karakteristike koje često zahtijevaju uvođenje modifikacija u protokol u svrhu optimizacije ekspresije ciljanog proteina (Francis i Page, 2010). Sukladno tome, ekspresije proteina SPRTN i njegovih varijanti obilježenih GST privjeskom zahtijevala je također uvođenje određenih preinaka. Prilikom proizvodnje varijanti proteina SPRTN uočeno je da se konstrukti GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU produciraju u značajno manjoj količini u odnosu na konstrukte GST-C-terminus te GST-MIU. Jedan od najčešćih razloga koji smanjuje količinu produciranog proteina je stvaranje netopivih inkluzijskih tijela koji zaostaju u peletu i kao takvi se ne mogu uspješno pročistiti (Carrio i Villaverde, 2002). Stvaranju inkluzijskih tijela pridonosi ekspresija pod jakim sustavom promotora kao i upotreba visoke temperature tijekom ekspresije proteina (Singh i sur., 2015). U provedenom istraživanju, uzorci taloga prije i poslije dodatka induktora IPTG analizirani su SDS-PAGE elektroforezom, transferirani na nitroceluloznu membranu te analizirani upotrebom primarnog anti-GST protutijela, u svrhu detekcije konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU. Prisustvo konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU u talogu nije potvrđeno imunodetekcijom. Drugi potencijalni razlog produkcije konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU u značajno manjoj količini je mogućnost da je protein SPRTN eksprimiran u *E. coli* toksičan za bakteriju. Saida i sur. (2006) navode kako problem toksičnosti proteina nastaje kada rekombinantni protein obavlja nepotrebnu i štetnu funkciju u stanici domaćina, uzrokujući bakterijsku staničnu smrt, sporiji rast te nisku konačnu gustoću stanica. Pošto stopa rasta soja *E. coli* transformiranog s pGEX-4T-1-SPRTN-wt nije bila sporija u odnosu na soj koji je nosio prazan vektor pGEX-4T-1-empty, zaključili smo da protein SPRTN nije toksičan za *E. coli*, i samim time da toksičnost ne može biti razlog smanjene produkcije konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU. Treći potencijalni razlog smanjene produkcije konstrukata eksprimiranih u bakterijama je njihova veličina i složenost. Radovi poput Goh i sur. (2004) objašnjavaju kako se manji proteini (prosječne molekularne težine od 22.8 kD) efikasnije sintetiziraju u odnosu na veće proteine (prosječne molekularne težine od 40.4 kD). Sukladno tome konstrukt GST-C-terminus (54

kDa) bi se trebao pročistiti u puno manjoj količini kao što je to slučaj kod konstrukta GST-N-terminus (52 kDa). U provedenom istraživanju, efikasnost pročišćavanja nije bila smanjena kao posljedica veličine konstrukta. Karakteristika konstrukata GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU, koji se slabije eksprimiraju, jest da, za razliku od konstrukata GST-C-terminus i GST-MIU, posjeduju aktivnu metaloproteaznu domenu SprT. Moguće je da metaloproteazna domena konstrukta izražava autokatalitičku aktivnost prema nosintetiziranim proteinima u bakterijama, te da je uzrok smanjene produkcije i purifikacije proteina, zapravo, aktivna proteoliza. Protein SPRTN se proteolitički cijepa s C-terminalnog dijela prema N-terminalnom te su degradacijski produkti vidljivi *Western blot* analizom upotrebom primarnog anti-GST protutijela (Vaz i sur., 2016). Kako bi kompenzirali efekt slabije purifikacije proteina, prekonoćne bakterijske kulture su propagirane u puno većem volumenu mediju LB. Za konstrukte GST-N terminus i GST- Δ MIU, 40 mL prekonoćne kulture je propagirano u 800 mL dok je za GST-SPRTN-wt 60 ml prekonoćne kulture propagirano u 1.2 L medija LB što je nekoliko puta više u odnosu na 200 mL medija u kojem su propagirani konstrukti bez SprT domene. Također za konstrukte koji sadržavaju metaloproteaznu SprT domenu u medij za uzgoj dodano je 2.5 % etanola te $ZnCl_2$ u koncentraciji od 5 μ M. Autoproteolitička enzimatska aktivnost proteina SPRTN otežava i čuvanje pripremljenih, purificiranih konstrukata, kao i korištenje istih u pulldown eksperimentima. Naime, konstrukti GST-SPRTN-wt, GST-N-terminus i GST- Δ MIU, koji sadržavaju SprT domenu, imaju tendenciju brzog propadanja, odnosno degradacije. Autokatalitička aktivnost SPRTN se može inhibirati upotrebom 1,10-fenantrolina, koji djeluje kao kelator cinka (Vaz i sur., 2016). U istraživanju navedeni spoj nije korišten jer nije poznato hoće li uklanjanje cinka iz domene SprT rezultirati promjenom konformacije proteina, a time u konačnici utjecati na sposobnost interakcije s drugim proteinima.

4.2. MIU domena

Ubikvitin je važna signalna molekula građena od 76 aminokiselinskih ostataka koji su visoko očuvani počevši, od kvasaca pa sve do čovjeka. Kovalentna modifikacija proteina ubikvitinom djeluje kao regulatorni mehanizam u brojnim staničnim procesima, poput razgradnje proteina, kontrole kvalitete endocitoze, vezikularnom prometu kao i popravku DNA (Pickart i Eddins, 2004). Kako bi se ubikvitin vezao za proteine potrebno je međudjelovanje po jednog enzima iz svake od triju porodica: ubikvitin-aktivirajućih, ubikvitin-konjugirajućih i ubikvitin-ligirajućih enzima, koji se skraćeno nazivaju E1, E2 i E3 ligaze. Ubikvitinski signal je vrlo složen budući se ubikvitin može vezati na ciljni protein na različite načine: kao mono, di-, tri- ili poliubikvitin, a daljnja kompleksnost postiže se polimerizacijom ubikvitinskih lanaca preko različitih aminokiselina lizina u strukturi ubikvitina, te pozicioniranjem ubikvitina i ubikvitinskih lanaca na različita mjesta na ciljnom proteinu (Sadowski i Sarcevic, 2019). Proteini koji prepoznaju takve ubikvitinske signale na ciljnim proteinima posjeduju jednu od domena specijaliziranih za vezanje ubikvitina (engl. *ubiquitin binding domains*, UBD). Do sada UBD klasa broji najmanje šesnaest različitih domena uključujući i domenu MIU (engl. *motif interacting with ubiquitin*) (Hurley i sur., 2006). Osim proteina SPRTN, poznata su još tri proteina koja sadrže istoimenu domenu. Riječ je o proteinima RABEX-5 (engl. *Rab5 guanine nucleotide exchange factor*) i MIOZIN-VI koji sadrže po jednu domenu MIU te proteinu RNF-168 koji sadrži dvije (Dikić i sur., 2009). Kod proteina RABEX-5, domena MIU je građena od 26 aminokiselina koje smatanjem tvore strukturu jedne α -uzvojnice koja sadrži funkcionalni alanin (Ala58) ključan za interakciju s ubikvitinom preko njegovog aminokiselinskog ostataka izoleucin 44 (Ile44) i hidrofobne površine koja okružuje navedenu aminokiselinu (Zhang i sur., 2014). Lauer i sur., (2019) su ustanovili da vezanje ubikvitina preko domene MIU pomaže u lokalizaciji proteina RABEX-5 na endosomalnoj membrani. Domena MIU proteina MIOZIN-VI je građena od 27 aminokiselina koje smatanjem također stvaraju strukturu jedne α -uzvojnice. Zbog postojanja još jedne dodatne UBD domene, Magistrati i sur. (2021) su utvrdili da je funkcija domene MIU kod proteina MIOZIN-VI prepoznavanje i prilagodba diubikvitinskih signala. Kod proteina RNF-168, domena MIU1 građena od 17 aminokiselina te MIU2 od 16 aminokiselina, smatanjem tvore strukturu dviju α -uzvojnica. Kelliher i sur., (2021) su ustanovili da je domena MIU1 odgovorna za lokalizaciju RNF-168 u PML tjelešca, što potom potiče njihovu

ubikvitinaciju i sumoilaciju, dok domena MIU2 ima izrazito velik afinitet prema ubikvitinu vezanom na aminokiselinskom ostatku K15 histona H2A. Za razliku od navedenih proteina, domena MIU proteina SPRTN građena je od 15 aminokiselina i također formira strukturu jedne α -uzvojnice, ali nema ustanovljenu funkciju. U ovome istraživanju XRCC1, CHK1, PMS2, GAPDH i MLH1 su ispitani kao potencijalni interaktori spomenute domene. Niti jedan od testiranih proteina u ispitanim eksperimentalnim uvjetima nije stupio u interakciju s konstruktom GST-MIU. Nadalje, testirana je domena MIU na sposobnost vezanja ubikvitiniranih proteina. U rezultatima nije dokazana sposobnost vezanja ubikvitiniranih proteina za MIU domenu proteina SPRTN. Takav rezultat nije bio u skladu s očekivanjima. Iako protein SPRTN veže ubikvitinirane proteine, većina vezanja koncentrirana je na c-terminalnom dijelu proteina, gdje je smještena UBZ domena. Razlog zašto MIU domena nije pokazala specifičnost vezanja ubikvitina vjerojatno leži u kombinaciji tri razloga. Prvi razlog je mogući utjecaj velikog privjeska GST na N-terminalnom dijelu proteina, odmah uz MIU domenu. Svojom veličinom od 25 kDa GST višestruko nadmašuje 15 aminokiselina dugačku MIU domenu, koja je bliskim pozicioniranjem uz GST zaklonjena i time, vrlo izgledno, fizički onemogućena u vezanju za interakcijske partnere. Drugi mogući razlog našeg negativnog rezultata je specifičnost vezanja samo određenih vrsta ubikvitinskih lanaca, koji možda nisu bili povećano zastupljeni u testiranim uvjetima. Treći razlog je nekorištenje inhibitora deubikvitinirajućih enzima tijekom pulldown reakcije, što je potencijalno moglo dovesti do skidanja određenih vrsta ubikvitinskih lanaca potrebnih za uspostavu interakcije s MIU domenom. Također, testirali smo domenu MIU na sposobnost vezanja sumoiliranih proteina. SUMO protein je prvi put otkriven 1996. godine i trenutno su kod sisavaca opisane njegove tri izoforme: SUMO-1, SUMO-2 i SUMO-3. SUMO-2 i SUMO-3 su vrlo slični što se tiče njihove aminokiselinske sekvence i često protutijela ne mogu razlikovati o kojem se obliku proteina radi, te se stoga označavaju kao SUMO-2/3 specifična protutijela. Poznato je da SUMO-1 uglavnom modificira proteine vezane uz promjene fiziološkog stanja, dok SUMO-2 i SUMO-3 uglavnom modificiraju proteine stresa. Isto tako, poput ubikvitina, SUMO proteini se vežu na ciljne proteine kao pojedinačne molekule ili u lancima različitih kombinacija (Yang i sur., 2017). Naši rezultati vezanja su pokazali da domena MIU, kao ni protein SPRTN, ne vežu proteine modificirane sa SUMO-2 i 3 proteinima. Moguće je da je taj rezultat točan, no da bismo bili u potpunosti sigurni, potrebno je ukloniti postojanje nekoliko mogućih razloga za izostanak testirane interakcije. Prvi razlog koji može utjecati na rezultat je, slično kao i za ubikvitin, utjecaj veličine privjeska GST, dok drugi razlog može biti izostanak tretmana koji bi potaknuo specifičnu sumoilaciju proteina koja, u normalnim

uvjetima u stanici, nije prisutna. Stoga je naš plan za buduće istraživanje, GST privjesak staviti na C-terminalni dio proteina, gdje ne bi imao dominantan utjecaj na MIU domenu, odnosno, gen za SPRTN i njegove delecijske varijante preklonirati u pET seriju ekspresijskih vektora. Postupkom prekloniranja bi SPRTN varijante obilježili znatno manjim, HIS privjeskom te tako zaobišli utjecaj privjeska na interakciju s ispitivanim proteinima. Također, prilikom ponavljanja testiranja sposobnosti vezanja ubikvitiniranih i sumoiliranih proteina, koristili bi inhibitore deubikvitinirajućih i desumoilirajućih enzima, poput N-etilmaleimida (NEM). Uz to, planiramo producirati i pročistiti monoubikvitin, 4×linearni ubikvitin i SUMO1, koristiti različite komercijalno dostupne SUMO i ubikvitin lance, te ko-purifikacijom „jedan na jedan“ ustanoviti postoji li interakciju između navedenih konstrukata i domene MIU proteina SPRTN. Zbog nedostatka primarnih protutijela anti-ERCC6, anti-p21, anti-p53 te neispravnog protutijela anti-SUMO1 interakcije sa navedenim proteinima u ovom radu nisu ispitane. Navedeni proteini se također planiraju ispitati kao potencijalni interaktori u budućem istraživanju.

4.3. Proteini PCNA, VCP, XRCC1 te PMS2 kao C-terminalni interaktori proteina SPRTN

U ovom radu, *pulldown* analizom na C-terminalnom dijelu proteina SPRTN pronađena su dva već poznata interaktora, proteini PCNA i VCP. PCNA je homotrimerni proteinski kompleks koji funkcionira kao klizna stezaljka tijekom replikacije ili popravka DNA (Moldovan i sur., 2007). VCP je homo heksamerna ubikvitin selektivna AAA-ATPaza (Stolz i sur., 2011), koja sudjeluje u TLS-u, homolognoj i nehomolognoj rekombinaciji (Meerang i sur., 2011.) te NER-u (Zhu i Wani, 2016). Pošto su PCNA i VCP među prvim ustanovljenim interaktorima proteina SPRTN, važnost njihove interakcije je najbolje razjašnjena. U istraživanju Juhazs i sur (2012) na Hek293T stanicama tretiranim UV-zračenjem, razjašnjeno je kako je interakcija s PCNA nužna za lokalizaciju SPRTN na mjesta UV oštećenja dok je u radu Perry i Ghosal (2022) navedeno kako je interakcija proteina SPRTN s PCNA također od ključne važnosti za odvijanje efikasne translezijske sinteze, pošto vezanje proteina SPRTN za PCNA potiče izmjenu polimeraza replikacijskog tipa (POL δ i POL ϵ) za polimeraze translezijskog tipa (POL ζ , POL η , POL ι , POL κ). S druge strane, u radu Kroning i sur. (2022) razjašnjena je funkcionalna važnost interakcije s proteinom VCP. U njihovom radu otkriven je mehanizam VCP potpomognute proteolize DPC u kojem protein VCP uz pomoć

adapterskog kompleksa Ufd1-Npl4 pomaže u razmatanju kompaktne strukture DPC-a, što je čini prikladnijom za proteolitičko cijepanje proteinom SPRTN. Osim dva poznata interaktor, *pulldown* analizom identificirali smo dva do sada nepoznata C-terminalna interaktora. Riječ je o proteinima XRCC1 (engl. *X-ray cross complementing group 1 protein*) te PMS2. Za spomenuti XRCC1 je poznato da u stanicama sisavaca djeluje kao protein skela koji regrutira i stabilizira različite proteine popravka, uključujući PARP1 (engl. *Poly(ADP-ribose) polymerase-1*), PNKP, POL β (engl. *DNA polymerase β*) te LIG3 α (engl. *DNA ligase III α*) (Caldecott, 2003). Navedeni proteini su usko vezani uz popravak jednolančanih lomova, koji se odvija u 4 faze. U Prvoj fazi se prepoznaje oštećenje preko proteina PARP. U drugoj fazi se procesiraju krajevi DNA lanca pomoću PNKP. U trećoj fazi POL β ispunjava prazninu nukleotidom, nakon čega u četvrtom koraku LIG3 α spaja krajeve jednolančanog loma (Caldecott, 2019.) Novootkrivena interakcija proteina SPRTN s XRCC1 sugerira potencijalno novu ulogu proteina SPRTN u popravku lomova u šećerno-fosfatnoj okosnici DNA lanca. Kako sam protein XRCC1 nema enzimatsku funkciju, mogla bi se ispitati sposobnost vezanja gore navedenih proteina, pa ovisno o rezultatima provjeriti u kojoj točno fazi protein SPRTN pomaže spomenuti popravak DNA. S druge strane, protein PMS2 je endonukleaza koja zajedno s MLH1 stvara heterodimer hMutL α , ključan za uvođenje prvog jednolančanog loma u blizini krivo sparene baze (Li, 2008). U našoj studiji smo *pull-down* analizom ustanovili da MLH1 ne interagira s proteinom SPRTN. Navedeni rezultati sugeriraju da u slučaju sudjelovanja u popravku krivo sparenih baza, protein SPRTN u interakciju s hMutL α stupa preko proteina PMS2.

4.4. Protein CHK1 kao N-terminalni interaktor proteina SPRTN

Protein CHK1 je nedavno otkriven interaktor proteina SPRTN, ali bez ustanovljenog mjesta interakcije. U ovome radu *pulldown* analizom ustanovljeno je da se interakcija s proteinom CHK1 odvija preko N-terminalnog dijela proteina SPRTN. Protein CHK1 je nuklearna serin/treonin protein kinaza s visoko evolucijski konzerviranom N-terminalnom domenom te manje konzerviranom C-terminalnom domenom, koje međusobno povezuje fleksibilna vezna regija (Chen i sur., 2000). U odsutnosti oštećenja DNA, fleksibilna vezna regija savija C-terminalnu regiju te tako inhibira N-terminalnu kinaznu domenu, držeći CHK1 u neaktivnom stanju. Zabilježeno je da brojni proteini stupaju u interakciju s CHK1. Među prvim otkrivenim interaktorima CHK1 je kinaza ATR koja fosforilacijom S317 i S345 aktivira kinaznu

aktivnost CHK1 (Guo i sur., 2000). Halder is sur., (2019) su otkrićem SPRTN kao novog interaktora CHK1 ustanovili da se osim fosforilacijom, CHK1 može aktivirati i proteolitički. SprT metaloproteazna domena cijepa inhibicijsku C-terminalnu domenu, čime omogućava kinaznu aktivnost N-terminalne domene, koja fosforilacijom različitih substrata regulira različite procese, počevši od replikacije i popravka DNA, pa sve do kontrole staničnog ciklusa. Jedan od substrata za fosforilaciju je i sam protein SPRTN. CHK1 fosforilacijom S373, S374 i S383, uzrokuje efikasnije vezanje SPRTN za DNA prilikom popravka DPC (Halder is sur.,2019). Preostale funkcije kinaze CHK1 vezane uz SPRTN su nepoznate.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu uspješno su producirani i pročišćeni protein SPRTN obilježen GST privjeskom kao i njegove delecijske varijante. Kombinacijom metoda *pulldown* i *Western blot* nije pronađen niti jedan interaktor domene MIU proteina SPRTN. Unatoč tome, potvrđeni su proteini PCNA i VCP kao C-terminalni interaktori proteina SPRTN. Također otkrivena su dva do sada nepoznata C-terminalna interaktora, a riječ je o proteinima XRCC1 i PMS2. Nadalje, protein CHK1 je već od prije poznat interaktor proteina SPRTN no do sada nije bilo poznato mjesto interakcije. U ovom radu, ustanovljeno je da se protein CHK1 veže na N-terminusu proteina SPRTN. U narednim istraživanjima vezanim uz otkrivanje funkcije domene MIU trebalo bi genu *SPRTN* i delecijskim varijantama umjesto velikog GST privjeska nadodati manji His₆ privjesak te ponoviti *pulldown* analize koristeći stanične lizate. U planu za buduća istraživanja je producirati i pročistiti stanične proteine modificirane monoubikvitinacijom, 4×linearni ubikvitin i SUMO1, i istražiti postoji li interakciju između tako modificiranih staničnih proteina i domene MIU proteina SPRTN.

6. LITERATURA

- Bernstein, C., Prasad, A. R., Nfonsam, V., Harris Bernstein, H. (2013) 'DNA Damage, DNA Repair and Cancer', in *New Research Directions in DNA Repair*
- Caldecott, K. W. (2003) 'XRCC1 and DNA strand break repair', *DNA Repair*. Elsevier, pp. 955–969. doi: 10.1016/S1568-7864(03)00118-6.
- Caldecott, K. W. (2019) 'XRCC1 protein; Form and function', *DNA Repair*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.102664.
- Carrió, M. M. and Villaverde, A. (2002) 'Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies', *Journal of Biotechnology*, 96(1), pp. 3–12. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00032-9.
- Carusillo, A. and Mussolino, C. (2020) 'DNA Damage: From Threat to Treatment', *Cells*, 9(7), p. 1665. doi: 10.3390/cells9071665.
- Chatterjee, N. and Walker, G. C. (2017) 'Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, pp. 235–263. doi: 10.1002/em.22087.
- Chen, P., Luo, C., Deng, Y., Ryan, K., Register, J., Margosiak, S., Tempczyk-Russell, A., Nguyen, B., Myers, P., Lundgren, K., Kan, C. C., O'Connor, P. M. (2000) 'The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: Implications for Chk1 regulation', *Cell*, 100(6), pp. 681–692. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80704-7.
- Chhetri, G., Kalita, P. and Tripathi, T. (2015) 'An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*', *MethodsX*, 2, pp. 385–391. doi: 10.1016/j.mex.2015.09.005.
- Connelly, J. C., De Leau, E. S. and Leach, D. R. F. (2003) 'Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the *E. coli* SbcCD (MR) complex', *DNA Repair*, 2(7), pp. 795–807. doi: 10.1016/S1568-7864(03)00063-6.
- Debéthune, L., Kohlhagen, G., Grandas, A., Pommier, Y. (2002) 'Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase', *Nucleic Acids Research*, pp. 1198–1204. doi: 10.1093/nar/30.5.1198.
- Deshpande, R. A., Lee, J. H., Arora, S., Paull, T. T. (2016) 'Nbs1 Converts the Human Mre11/Rad50 Nuclease Complex into an Endo/Exonuclease Machine Specific for Protein-DNA Adducts', *Molecular Cell*, 64(3), pp. 593–606. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.010.
- Dikic, I., Wakatsuki, S. and Walters, K. J. (2009) 'Ubiquitin-binding domains from structures to functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), pp. 659–671. doi: 10.1038/NRM2767.

- El-Khamisy, S. F. (2011) 'To live or to die: A matter of processing damaged DNA termini in neurons', *EMBO Molecular Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 78–88. doi: 10.1002/emmm.201000114.
- Fielden, J., Ruggiano, A., Popović, M., Ramadan, K. (2018) 'DNA protein crosslink proteolysis repair: From yeast to premature ageing and cancer in humans', *DNA Repair*. Elsevier, pp. 198–204. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.025.
- Francis, D. M. and Page, R. (2010) 'Strategies to optimize protein expression in E. coli', *Current Protocols in Protein Science*. Curr Protoc Protein Sci. doi: 10.1002/0471140864.ps0524s61.
- Goh, C. S., Lan, N., Douglas, S. M., Wu, B., Echols, N., Smith, A., Milburn, D., Montelione, G. T., Gerstein, M. (2004) 'Mining the Structural Genomics Pipeline: Identification of Protein Properties that Affect High-throughput Experimental Analysis', *Journal of Molecular Biology*, 336(1), pp. 115–130. doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.053.
- Gómez-Herreros, F., Romero-Granados, R., Zeng, Z., Álvarez-Quilón, A., Quintero, C., Ju, L., Umans, L., Vermeire, L., Huylebroeck, D., Caldecott, K. W., Cortés-Ledesma, F. (2013) 'TDP2-Dependent Non-Homologous End-Joining Protects against Topoisomerase II-Induced DNA Breaks and Genome Instability in Cells and In Vivo', *PLoS Genetics*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1003226.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X., Dunphy, W. G. (2000) 'Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts', *Genes and Development*, 14(21), pp. 2745–2756. doi: 10.1101/gad.842500.
- Halder, S., Torrecilla, I., Burkhalter, M. D., Popović, M., Fielden, J., Vaz, B., Oehler, J., Pilger, D., Lessel, D., Wiseman, K., Singh, A. N., Vendrell, I., Fischer, R., Philipp, M., Ramadan, K. (2019) 'SPRTN protease and checkpoint kinase 1 cross-activation loop safeguards DNA replication', *Nature Communications*, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-11095-y.
- Hegde, M. L., Izumi, T. and Mitra, S. (2012) 'Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: Role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes', in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. NIH Public Access, pp. 123–153. doi: 10.1016/B978-0-12-387665-2.00006-7.
- Hiom, K. (2014) 'SPRTN is a new player in an old story', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 1155–1157. doi: 10.1038/ng.3125.
- Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., Ohmori, H., Sato, M. (2009) 'Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen', *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10552–10560. doi: 10.1074/jbc.M809745200.
- Hoa, N. N., Shimizu, T., Zhou, Z. W., Wang, Z. Q., Deshpande, R. A., Paull, T. T., Akter, S., Tsuda, M., Furuta, R., Tsutsui, K., Takeda, S., Sasanuma, H. (2016) 'Mre11 Is Essential for

the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes', *Molecular Cell*, 64(3), pp. 580–592. doi: 10.1016/j.molcel.2016.10.011.

Huang, J., Zhou, Q., Gao, M., Nowsheen, S., Zhao, F., Kim, W., Zhu, Q., Kojima, Y., Yin, P., Zhang, Y., Guo, G., Tu, X., Deng, M., Luo, K., Qin, B., Machida, Y., Lou, Z. (2020) 'Tandem Deubiquitination and Acetylation of SPRTN Promotes DNA-Protein Crosslink Repair and Protects against Aging', *Molecular Cell*, 79(5), pp. 824-835.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.027.

Hurley, J. H., Lee, S. and Prag, G. (2006) 'Ubiquitin-binding domains', *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, pp. 361–372. doi: 10.1042/BJ20061138.

Ide, H., Nakano, T., Salem, A. M. H. Shoulkamy, M. I. (2018) 'DNA–protein cross-links: Formidable challenges to maintaining genome integrity', *DNA Repair*. Elsevier, pp. 190–197. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.024.

Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, pp. 1071–1078. doi: 10.1038/nature08467.

Juhász, S. Balogh, D., Hajdu, I., Burkovics, P., Villamil, M. A., Zhuang, Z., Haracska, L. (2012) 'Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance', *Nucleic Acids Research*, 40(21), pp. 10795–10808. doi: 10.1093/nar/gks850.

Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N. (1997) 'Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family', *Cell*, 88(3), pp. 375–384. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81876-0.

Kelliher, J., Ghosal, G. and Leung, J. W. C. (2022) 'New answers to the old RIDDLE: RNF168 and the DNA damage response pathway', *FEBS Journal*. John Wiley and Sons Inc, pp. 2467–2480. doi: 10.1111/febs.15857.

Kojima, Y. and Machida, Y. J. (2020) 'DNA–protein crosslinks from environmental exposure: Mechanisms of formation and repair', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(7), pp. 716–729. doi: 10.1002/em.22381.

Kröning, A., van den Boom, J., Kracht, M., Kueck, A. F., Meyer, H. (2022) 'Ubiquitin-directed AAA+ ATPase p97/VCP unfolds stable proteins crosslinked to DNA for proteolysis by SPRTN', *Journal of Biological Chemistry*, 298(6). doi: 10.1016/j.jbc.2022.101976.

Larsen, N. B., Gao, A. O., Sparks, J. L., Gallina, I., Wu, R. A., Mann, M., Räschle, M., Walter, J. C., Duxin, J. P. (2019) 'Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair by SPRTN and the Proteasome in *Xenopus* Egg Extracts', *Molecular Cell*, 73(3), pp. 574-588.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.024.

Lee, J. H. and Paull, T. T. (2005) 'ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex', *Science*, 308(5721), pp. 551–554.

- Lessel, D., Vaz, B., Halder, S., Lockhart, P. J., Marinovic-Terzic, I., Lopez-Mosqueda, J., Philipp, M., Sim, J. C. H., Smith, K. R., Oehler, J., Cabrera, E., Freire, R., Pope, K., Nahid, A., Norris, F., Leventer, R. J., Delatycki, M. B., Barbi, G., Von Ameln, S., Högel, J., Degoricija, M., Fertig, R., Burkhalter, M. D., Hofmann, K., Thiele, H., Altmüller, J., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Bahlo, M., Martin, G. M., Aalfs, C. M., Oshima, J., Terzic, J., Amor, D. J., Dikic, I. (2014) ‘Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features’, *Nature Genetics*, 46(11), pp. 1239–1244. doi: 10.1038/ng.3103.
- Li, F., Raczynska, J. E., Chen, Z., Yu, H. (2019) ‘Structural Insight into DNA-Dependent Activation of Human Metalloprotease Spartan’, *Cell Reports*, 26(12), pp. 3336–3346.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.082.
- Li, G. M. (2008) ‘Mechanisms and functions of DNA mismatch repair’, *Cell Research*. Cell Res, pp. 85–98. doi: 10.1038/cr.2007.115.
- Magistrati, E. and Polo, S. (2021) ‘Myomies: myosin VI structural and functional plasticity’, *Current opinion in structural biology*, 67, pp. 33–40. doi: 10.1016/J.SBI.2020.09.005.
- Makhnevych, T., Sydorskyy, Y., Xin, X., Srikumar, T., Vizeacoumar, F. J., Jeram, S. M., Li, Z., Bahr, S., Andrews, B. J., Boone, C., Raught, B. (2009) ‘Global Map of SUMO Function Revealed by Protein-Protein Interaction and Genetic Networks’, *Molecular Cell*, 33(1), pp. 124–135. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.025.
- Marconi, D., Ranfley, H., Menck, C. F. M., Ferreira, C. P., Câmara, N. O. S. (2020) ‘Interface of DNA Repair and Metabolism’, *Current Tissue Microenvironment Reports*, 1(4), pp. 209–220. doi: 10.1007/s43152-020-00018-5.
- Maskey, R. S., Kim, M. S., Baker, D. J., Childs, B., Malureanu, L. A., Jeganathan, K. B., Machida, J., van Deursen, J. M., Machida, Y. J. (2014) ‘Spartan deficiency causes genomic instability and progeroid phenotypes’, *Nature Communications*, 5(1), p. 5744. doi: 10.1038/ncomms6744.
- Meerang, M., Paliwal, S., Garajova, Z., Bosshard, M., Mailand, N., Janscak, P., Hübscher, U., Meyer, H., Ramadan, K. (2011) ‘The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks’, *Nature Cell Biology*, 13(11), pp. 1376–1382. doi: 10.1038/ncb2367.
- Misteli, T. and Scaffidi, P. (2005) ‘Genome instability in progeria: When repair gets old’, *Nature Medicine*, pp. 718–719. doi: 10.1038/nm0705-718.
- Mohaghegh, P. and Hickson, I. D. (2001) ‘DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders’, *Human Molecular Genetics*. Oxford Academic, pp. 741–746. doi: 10.1093/hmg/10.7.741.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) ‘PCNA, the Maestro of the Replication Fork’, *Cell*. Cell, pp. 665–679. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.003.

- Mosbech, A., Gibbs-Seymour, I., Kagias, K., Thorslund, T., Beli, P., Povlsen, L., Nielsen, S. V., Smedegaard, S., Sedgwick, G., Lukas, C., Hartmann-Petersen, R., Lukas, J., Choudhary, C., Pocock, R., Bekker-Jensen, S., Mailand, N. (2012) 'DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(11), pp. 1084–1092. doi: 10.1038/nsmb.2395.
- Nakamura, J. and Nakamura, M. (2020) 'DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites.', *DNA repair*, 88, p. 102806.
- Nakano, T., Xu, X., Salem, A. M. H., Shoukamy, M. I., Ide, H. (2017) 'Radiation-induced DNA–protein cross-links: Mechanisms and biological significance', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, pp. 136–145. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.041.
- Onda, M., Yamaguchi, J., Hanada, K., Asami, Y., Ikeda, H. (2001) 'Repair of topoisomerase-mediated DNA damage in bacteriophage T4', *Genetics*, 158(1), pp. 19–28. doi: 10.1093/genetics/158.1.19.
- Perry, M., Biegert, M., Kollala, S. S., Mallard, H., Su, G., Kodavati, M., Kreiling, N., Holbrook, N., Ghosal, G. (2021) 'USP11 mediates repair of DNA–protein cross-links by deubiquitinating SPRTN metalloprotease', *Journal of Biological Chemistry*, 296, p. 100396. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100396.
- Perry, M. and Ghosal, G. (2022) 'Mechanisms and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair During DNA Replication by SPRTN Protease', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. doi: 10.3389/fmolb.2022.916697.
- Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004) 'Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Biochim Biophys Acta, pp. 55–72. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S. Y. N., Nitiss, J. L. (2016) 'Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 703–721. doi: 10.1038/nrm.2016.111.
- Reinking, H. K., Hofmann, K. and Stingele, J. (2020) 'Function and evolution of the DNA-protein crosslink proteases Wss1 and SPRTN', *DNA Repair*. Elsevier, p. 102822. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102822.
- Ruggiano, A. and Ramadan, K. (2021) 'The Trinity of SPRTN Protease Regulation', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 2–4.
- Rupnik, A., Grenon, M. and Lowndes, N. (2008) 'The MRN complex', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2008.03.040.
- Sadowski, M. and Sarcevic, B. (2010) 'Mechanisms of mono- and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine', *Cell Division*, 5. doi: 10.1186/1747-1028-5-19.

- Saida, F., Uzan, M., Odaert, B., Bontems, F. (2006) 'Expression of Highly Toxic Genes in E. coli: Special Strategies and Genetic Tools', *Current Protein and Peptide Science*, 7(1), pp. 47–56. doi: 10.2174/138920306775474095.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004) 'Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints'. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), p. 39–85.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., Panda, A. K. (2015) 'Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central Ltd., pp. 1–10.
- Stinglee, J., Schwarz, M. S., Bloemeke, N., Wolf, P. G., Jentsch, S. (2014) 'A DNA-dependent protease involved in DNA-protein crosslink repair', *Cell*, 158(2), pp. 327–338. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.053.
- Stinglee, J., Bellelli, R. and Boulton, S. J. (2017) 'Mechanisms of DNA-protein crosslink repair', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 563–573. doi: 10.1038/nrm.2017.56.
- Stinglee, J., Habermann, B. and Jentsch, S. (2015) 'DNA-protein crosslink repair: Proteases as DNA repair enzymes', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 67–71. doi: 10.1016/j.tibs.2014.10.012.
- Stinglee, J. and Jentsch, S. (2015) 'DNA–protein crosslink repair', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2015 16:8, 16(8), pp. 455–460. doi: 10.1038/nrm4015.
- Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., Wolf, D. H. (2011) 'Cdc48: a power machine in protein degradation', *Trends in biochemical sciences*, 36(10), pp. 515–523. doi: 10.1016/J.TIBS.2011.06.001.
- Svoboda, M., Konvalinka, J., Trempe, J. F., Grantz Saskova K. (2019) 'The yeast proteases Ddi1 and Wss1 are both involved in the DNA replication stress response', *DNA Repair*, 80, pp. 45–51. doi: 10.1016/j.dnarep.2019.06.008.
- Vaz, B., Popovic, M., Newman, J. A., Fielden, J., Aitkenhead, H., Halder, S., Singh, A. N., Vendrell, I., Fischer, R., Torrecilla, I., Drobnitzky, N., Freire, R., Amor, D. J., Lockhart, P. J., Kessler, B. M., McKenna, G. W., Gileadi, O., Ramadan, K. (2016) 'Metalloprotease SPRTN/DVC1 Orchestrates Replication-Coupled DNA-Protein Crosslink Repair', *Molecular Cell*, 64(4), pp. 704–719. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.032.
- Vaz, B., Popovic, M. and Ramadan, K. (2017) 'DNA–Protein Crosslink Proteolysis Repair', *Trends in Biochemical Sciences*, 42(6), pp. 483–495. doi: 10.1016/j.tibs.2017.03.005.
- Wei, X., Peng, Y., Bryan, C., Yang, K. (2021) 'Mechanisms of DNA–protein cross-link formation and repair', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, p. 140669. doi: 10.1016/j.bbapap.2021.140669.

Yang, Y. He, Y., Wang, X., Liang, Z., He, G., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., Liang, S. (2017) 'Protein SUMOylation modification and its associations with disease', *Open Biology*. The Royal Society, p. 170167. doi: 10.1098/rsob.170167.

You, F. and Gao, C. (2019) 'Topoisomerase Inhibitors and Targeted Delivery in Cancer Therapy', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(9), pp. 713–729. doi: 10.2174/1568026619666190401112948.

Zhang, H., Xiong, Y. and Chen, J. (2020) 'DNA-protein cross-link repair: What do we know now?', *Cell and Bioscience*. BioMed Central, pp. 1–10. doi: 10.1186/s13578-019-0366-z.

Zhang, Z., Zhang, T., Wang, S., Gong, Z., Tang, C., Chen, J., Ding, J. (2014) 'Molecular mechanism for Rabex-5 GEF activation by Rabaptin-5', *eLife*, 3(3). doi: 10.7554/elife.02687.

Zhao, S., Kieser, A., Li, H. Y., Reinking, H. K., Weickert, P., Euteneuer, S., Yaneva, D., Acampora, A. C., Götz, M. J., Feederle, R., Stingele, J. (2021) 'A ubiquitin switch controls autocatalytic inactivation of the DNA-protein crosslink repair protease SPRTN', *Nucleic Acids Research*, 49(2), pp. 902–915. doi: 10.1093/nar/gkaa1224.

Zhu, Q. and Wani, A. A. (2017) 'Nucleotide Excision Repair: Finely Tuned Molecular Orchestra of Early Pre-incision Events', *Photochemistry and Photobiology*. Photochem Photobiol, pp. 166–177. doi: 10.1111/php.12647.

<https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pgex4t1-p-63179.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/proteins/>

<https://web.expasy.org/protparam/>

<https://biorender.com/>

ŽIVOTOPIS

Osnovne informacije:

Ime: Ivan

Prezime: Blažević

Mjesto i datum rođenja: 21.08.1998. Split, Hrvatska

Email: ivanblazevic98@gmail.com

Obrazovanje:

2006.-2013. Osnovna škola Plokite, Split

2013.-2017. II. Gimnazija, Split

2017.-2020. Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno matematički fakultet, preddiplomski studij, smjer Biologija i kemija

2020.-2023. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet, diplomski studij, smjer Molekularna biologija

Popularizacija znanosti:

2018. Festival znanosti- pod mentorstvom izvanrdne profesorice Sanje Puljas

2019. Festival znanosti- radionica „ČAROBAN SVIJET BILJNIH BOJA“ pod mentorstvom izvanredne profesorice Elme Vuko

2018. 8. Tjedan botaničkih vrtova

2019. 9. Tjedan botaničkih vrtova

Iskustvo i praksa:

2020. demonstrator iz kolegija Biologija stanice

2020. demonstrator iz kolegija Opća botanika

02.08.2021.- 31.08.2021. Laboratorijska stručna praksa u laboratoriju za biologiju robusnosti Mediteranskog instituta za istraživanje života (pod mentorstvom znanstvenog suradnika Katarine Trajković)

12.10.2021.- 09.02.2022. Laboratorijska stručna praksa na Zavodu za molekularnu biologiju (pod mentorstvom izvanredne profesorice Nataše Bauer)

Priznanja:

2021. Dekanova nagrada za uspjeh postignut na preddiplomskom sveučilišnom studiju Biologija i kemija