

Biokemijska karakterizacija interakcije proteina IqgC i male GTPaze RASG iz amebe Dictyostelium discoideum

Mijanović, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:585696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Mijanović

Biokemijska karakterizacija interakcije proteina IqgC i male
GTPaze RasG iz amebe *Dictyostelium discoideum*

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za biofiziku stanice na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Vedrane Filić Mileta, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvaljujem se..

...mentorici dr. sc. Vedrani Filić Mileta, za ukazano povjerenje, strpljivo poučavanje i svakodnevna savjetovanja

...suvoditeljici dr. sc. Ivani Ivančić Baće, na konstruktivnim kritikama i pomoći pri pisanju ovog rada

...svim prijateljima i Karlu, koji su studentske dane obilježili kao divan period života

...i na kraju, najveće hvala mojoj obitelji, Domagoju, Mladeni, Nini i Roku, za svu pruženu ljubav, podršku i razumijevanje

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA INTERAKCIJE PROTEINA IqgC I MALE GTPaze RasG IZ AMEBE *Dictyostelium discoideum*

Lucija Mijanović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Proteini IQGAP u pravilu ne vežu proteine Ras i ne posjeduju sposobnost poticanja GTPazne aktivnosti malih GTPaza Ras (aktivnost RasGAP). Međutim preliminarni rezultati karakterizacije *Dictyostelium* proteina IqgC, koji je srodan proteinima IQGAP sisavaca, sugerirali su aktivnost RasGAP ovog proteina prema *Dictyostelium* GTPazi RasG. Cilj ovog rada bio je biokemijskim metodama demonstrirati interakciju proteina IqgC i RasG te ispitati posjeduje li IqgC aktivnost GAP prema GTPazi RasG. Interakcija je potvrđena metodama *pull-down*, ko-imunoprecipitacija i bimolekularna komplementacija fluorescencije, nakon čega je napravljen test aktivacije proteina RasG koji je sugerirao aktivnost GAP. Konačna potvrda da IqgC ima aktivnost RasGAP dobivena je testom GAP s pročišćenim proteinima *in vitro*. U testu su korišteni ljudska GTPaza H-Ras i *Dictyostelium* GTPaza RasG te je pokazano da IqgC potiče, inače slabu intrinzičnu, hidrolizu GTP-a obaju GTPaza. Ovi eksperimenti nedvosmisleno pokazuju da je IqgC netipičan srodnik proteina IQGAP, koji za razliku od druga dva predstavnika u organizmu *D. discoideum*, DGAP1 i GAPA, kao i ostalih pripadnika ove obitelji u viših eukariota, jer osim što veže Ras stimulira i njegovu GTPaznu aktivnost time ga deaktivirajući u stanici.

(70 stranica, 23 slike, 5 tablica, 93 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj Biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Dictyostelium*, IqgC, IQGAP, RasGAP, Ras, GTPase

Voditelj: dr. sc. Vedrana Filić Mileta, znanstvena suradnica, IRB Zagreb

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

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof. ; dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof.; dr. sc. Jasna Hrenović, prof.

Rad prihvaćen: 14.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION BETWEEN *Dictyostelium* IQGAP-RELATED PROTEIN IqgC AND SMALL GTPase RasG

Lucija Mijanović

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

IQGAP proteins generally do not interact with small GTPases from the Ras family nor stimulate their GTPase activity as do RasGAPs (*Ras GTPase activating proteins*). However, preliminary characterization of *Dictyostelium* IQGAP-related protein IqgC suggested it could have GAP activity toward the *Dictyostelium* GTPase RasG. The aim of this study was to biochemically validate the interaction between IqgC and RasG and to test whether IqgC exerts GAP activity toward the RasG GTPase. Pull down, co-immunoprecipitation and bimolecular fluorescence complementation were methods used to confirm the interaction, followed by Ras activation assay which indicated that IqgC has GAP activity. Finally, *in vitro* GAP assay, in which purified human GTPase H-Ras and *Dictyostelium* GTPase RasG were tested, showed that IqgC accelerates otherwise weak intrinsic GTP hydrolysis of both H-Ras and RasG. These experiments unequivocally demonstrate that this atypical IQGAP-related protein is a genuine RasGAP. In contrast to the other two *Dictyostelium* IQGAPs, DGAP1 and GAPA, as well as other IQGAPs, IqgC not only binds Ras but also stimulates its GTPase activity thus deactivating Ras in the cell.

(70 pages, 23 figures, 5 tables, 93 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Dictyostelium*, IqgC, IQGAP, RasGAP, Ras, GTPase

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

Cosupervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.; Dr. Damjan Franjević, Assoc. Prof.; Dr. Jasna Hrenović, Prof.

Thesis accepted: 14.02.2018.

Contents

1. UVOD	1
1.1. Superobitelj proteina Ras	1
1.1.1. Struktura proteina Ras	2
1.1.2. Regulacija aktivnosti proteina Ras.....	2
1.1.3. Posttranslacijske modifikacije proteina Ras	4
1.2. Proteini aktivatori GTPaza Ras	5
1.2.1. Hidroliza GTP-a stimulirana proteinima RasGAP.....	6
1.1.4. Prekomjerna aktivacija proteina Ras.....	8
1.3. Proteini IQGAP.....	8
1.4. Modelni organizam <i>Dictyostelium discoideum</i>	12
1.4.1. Taksonomija	12
1.4.2. Genom amebe <i>D. discoideum</i>	13
1.4.3. <i>Dictyostelium</i> kao modelni organizam.....	13
1.4.4. Proteini Ras u amebi <i>D. discoideum</i>	14
1.4.5. Proteini GAP u amebi <i>D. discoideum</i>	15
1.4.6. Proteini srodni proteinima IQGAP u amebi <i>D. discoideum</i>	16
1.5. Cilj istraživanja.....	18
2. MATERIJALI I METODE.....	20
2.1. Materijali	20
2.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica <i>D. discoideum</i>	20
2.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterijskih stanica <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2.1. Korišteni sojevi <i>E. coli</i>	21
2.1.3. Početnice	22
2.1.4. Plazmidi	22
2.1.5. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA.....	26
2.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju.....	27
2.2. Metode	31
2.2.1. Manipulacija staničnom kulturom <i>D. discoideum</i>	31
2.2.2. Manipulacija bakterijskom kulturom <i>E. coli</i>	32
2.2.3. Manipulacija nukleinskim kiselinama.....	33
2.2.4. Metode proteinske biokemije	38
2.2.5. Bimolekularna komplementacija fluorescencije (BiFC).....	46
3. REZULTATI.....	48

3.1. Proteini IqgC i RasG tvore kompleks	48
3.1.1. Rekombinantni protein IqgC veže RasG iz staničog lizata	48
3.1.2. Endogeni protein IqgC veže RasG iz staničnog lizata	50
3.2. Proteini IqgC i RasG izravno interagiraju u živim stanicama	51
3.3. Test aktivacije proteina RasG sugerira povišenu aktivnost RasG u <i>iqgC</i> stanicama	53
3.4. IqgC stimulira GTPaznu aktivnost humanog proteina H-Ras i <i>Dictyostelium</i> proteina RasG	55
4. RASPRAVA.....	58
5. ZAKLJUČAK.....	63
6. LITERATURA.....	64
7. ŽIVOTOPIS.....	71

POPIS KRATICA

BiFC – bimolekularna komplementacija fluorescencije, engl. *bimolecular fluorescence complementation*

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

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

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

GEF – protein koji potiče uklanjanje gvanozin-difosfata s malih GTPaza, engl. *guanine nucleotide exchange factor*

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

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

G12V – supstitucija glicina u valin na poziciji 12 u proteinu Ras

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

motiv CAAX – posljednje četiri aminokiseline C-terminalnog kraja proteina Ras, aminokiselinske sekvence cistein – (alifatska aminokiselina)₂ – bilo koja aminokiselina

motiv FLR – motiv aminokiselina prisutan u proteinima GAP, započinje tripeptidom fenilalanin – leucin – arginin

motiv YYR – motiv aminokiselina prisutan u proteinima IQGAP, počinje tripeptidom (tirozin)₂ – arginin

mRaf1(RBD) – Ras-vezujuća domena mišjeg proteina Raf1

Q61L – supstitucija glutamina u leucin na poziciji 61 u proteinu Ras

RBD – Ras-vezujuća domena, engl. *Ras binding domain*

S17N – supstitucija serina u asparagin na poziciji 17 u proteinu Ras

VC – C-terminalni fragment proteina Venus

VN – N-terminalni fragment proteina Venus

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

1. UVOD

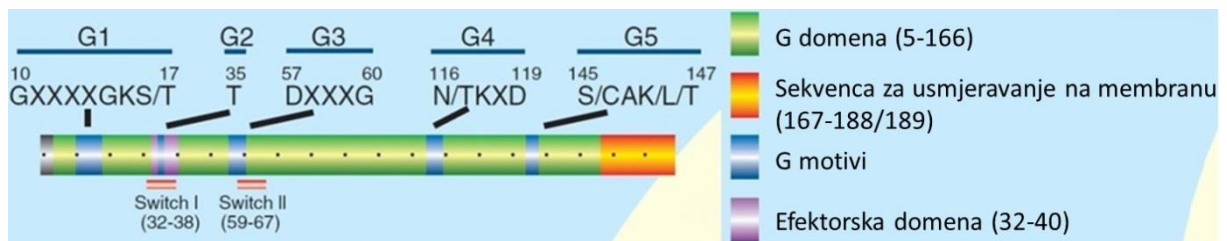
1.1. Superobitelj proteina Ras

Superobitelj proteina Ras malih gvanozin-trifosfataza (GTPaza) se sastoji od preko 150 proteina kod ljudi, s evolucijski očuvanim ortolozima u drugim modelnim organizmima, uključujući *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, te *Arabidopsis thaliana*. Na temelju strukture i funkcije superobitelj proteina Ras je podijeljena u 5 obitelji: Ras, Rho, Rab, Ran i Arf. To su monomerni G proteini kojima varijacije u strukturi, posttranslacijskim modifikacijama te regulatornim i efektornim proteinima omogućavaju raznoliku staničnu lokalizaciju te sudjelovanje u različitim staničnim procesima (Wennerberg i sur., 2005). Proteini obitelji Ras su ključni u regulaciji prijenosa izvanstaničnih signala koji kontroliraju ekspresiju gena, stanični rast, preživljenje i diferencijaciju stanica. Obitelj Rho je također uključena u prijenos signala te ima važne uloge u regulaciji aktinskog citoskeleta, oblika, polarnosti i pokretanja stanice. GTPaze Rab su uključene u promet vezikula, regulaciju endocitoze i sekretorne puteve, kao i proteini Arf, koji uz navedeno reguliraju i dinamiku mikrotubula. GTPaze Ran su uključene u transport molekula između jezgre i citoplazme te organizaciju diobenog vretena (Rojas i sur., 2012).

Tijekom 1960-ih, geni *ras* su identificirani kao geni virusa koji uzrokuju brz nastanak sarkoma u inficiranih životinja te transformiraju stanične kulture. Inicijalno su definirani kao varijante gena *src*, ali su kasnije preimenovani u gene *ras* zbog sposobnosti da uzrokuju sarkome kod štakora (*rat sarcoma*) te prema imenima znanstvenika koji su ih otkrili; H-ras (Harvey) i K-ras (Kirsten) (Harvey, 1964; Kirsten i Mayer, 1967). Tijekom 1970-ih i 1980-ih posvećeno je mnogo pažnje navedenim genima, te je otkriveno da virusni geni *H-ras* i *K-ras* imaju stanično porijeklo. Stanične varijante gena kodiraju proteine veličine 21 kDa koji vežu gvanozin-trifosfat (GTP) i gvanozin-difosfat (GDP), lokaliziraju na stanične membrane te prekomjernom ekspresijom mogu transformirati stanice (Cox i Der, 2010).

1.1.1. Struktura proteina Ras

Proteini Ras sadrže evolucijski očuvane motive G odgovorne za vezanje GDP-a i GTP-a te efektornih molekula. Počevši od N-terminalnog kraja proteina, prisutna je G1 omča aminokiselinske sekvence GXXXGKS/T (G=glicin, K=lizin, S=serin, T=treonin, X=bilo koja aminokiselina); zatim G2, unutar koje je očuvana samo jedna aminokiselina, treonin; omča G3, očuvane sekvence DXXGQ/H/T (D=aspartat, Q=glutamin, H=histidin); potom G4, T/NKXD sekvence (N=asparagin) te na kraju omča G5, čija je aminokiselinska sekvenca C/SAK/L/T (C=cistein, A=alanin, L=leucin). Zajedno, ovi elementi čine domenu G veličine oko 20 kDa očuvane strukture i biokemije (Wennerberg i sur., 2005; Slika 1).

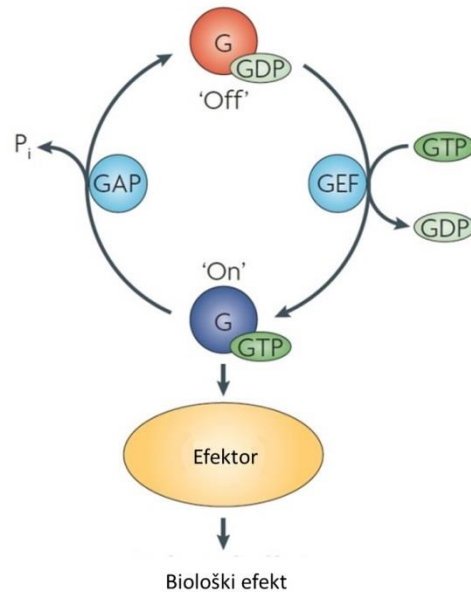


Slika 1. Evolucijski očuvana domena G proteina Ras superobitelji građena od 5 funkcionalnih motiva; G1, G2, G3, G4 i G5. Regija *switch I* omeđuje motiv G2, a *switch II* se djelomično preklapa s G3 (prilagođeno prema Wennerberg i sur., 2010).

Za afinitet prema gvanin-nukleotidima odgovorne su G1 (nazvana i P-omča), G4 i G5 omče, dok hidrolizu GTP-a olakšavaju konformacijske promjene u motivima *switch I* i *switch II*. Također, motivi *switch* pružaju većinu površine potrebne za interakciju proteina Ras s efektorima (Henning i sur., 2015).

1.1.2. Regulacija aktivnosti proteina Ras

Dvije osnovne karakteristike GTPaza Ras su vezanje gvanin-nukleotida visokim afinitetom, te hidroliza vezanoga GTP-a u GDP i anorganski fosfat. Hidroliza GTP-a je reakcija koja kontrolira brojne procese kao što su sinteza proteina, rast i diferencijacija, različiti transportni procesi te reorganizacija citoskeleta (Scheffzek i Ahmadian, 2005). Proteini koji vežu gvanin-nukleotide se ponašaju kao molekularni prekidači (engl. *molecular switch*) koji u aktivnom stanju (vezan GTP) imaju sposobnost vezanja efektornih molekula i prijenosa signala nizvodno, dok ih hidroliza GTP-a deaktivira (vezan GDP) što za posljedicu ima prekid signalnog puta (Scheffzek i Ahmadian, 2005; Slika 2).



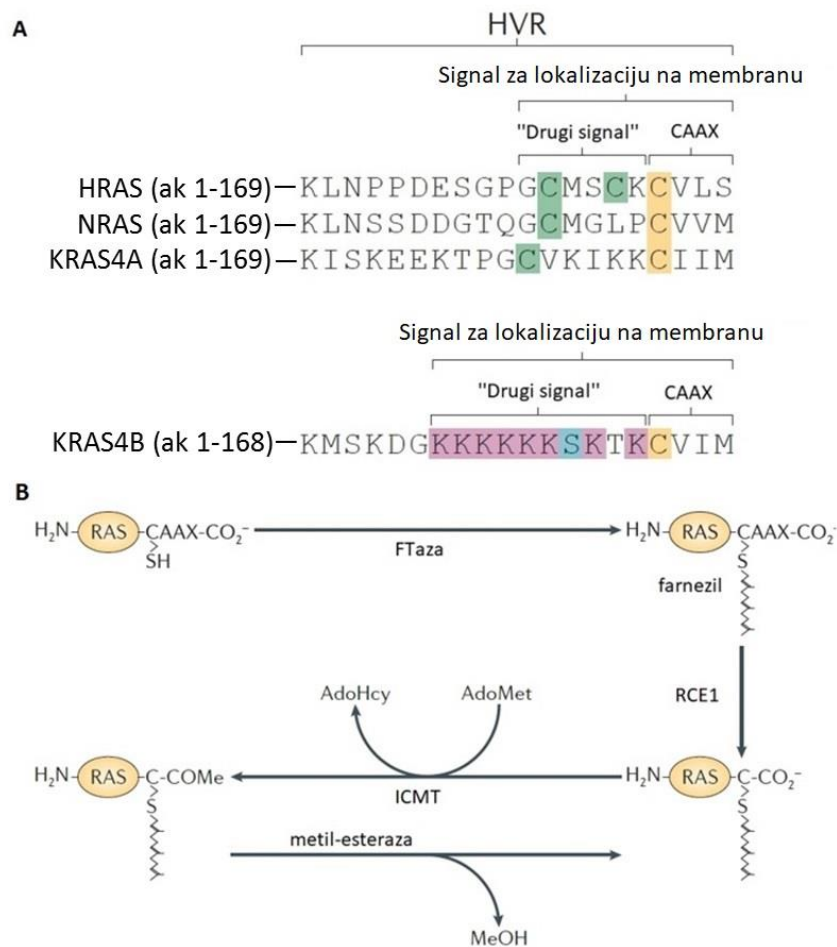
Slika 2. Proteini Ras kao molekularni prekidači. Izvanstanični signal aktivira proteine GEF koji potiču uklanjanje molekule GDP-a vezane na Ras i time omogućuju slobodnom proteinu Ras vezanje GTP-a, čime se on aktivira i prenosi signal nizvodno efektorima. Po prijenosu signala, proteini GAP potiču hidrolizu vezanog GTP-a, te dolazi do deaktivacije proteina Ras i terminacije prijenosa signala (prilagođeno prema Gasper, 2009).

Kruženje proteina Ras između aktivne i neaktivne forme reguliraju dvije klase proteina. Naime, proteini Ras u pravilu imaju vrlo slabu intrinzičnu GTPaznu aktivnost ($k_{cat} \approx 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), te je za njihovu deaktivaciju nužna aktivnost proteina GAP (engl. *GTPase activating proteins*). Proteini GAP su negativni regulatori proteina Ras koji ubrzavaju hidrolizu GTP-a do 10^5 puta i time deaktiviraju protein Ras nakon što je signal prenešen nizvodno (Ahearn i sur., 2011). Za aktivaciju proteina G odgovorni su proteini GEF (engl. *guanine nucleotide exchange factors*), koji potiču disocijaciju GDP-a s proteina Ras (Slika 2). S obzirom na to da je GTP u većini stanica u 10 do 50 puta većoj koncentraciji nego GDP, slobodan Ras veže GTP i time se aktivira (Henning i sur., 2015). Regulatorni proteini GAP i GEF razaznaju GTP- i GDP-vezana stanja malih GTPaza. To razlikovanje je posredovano P-omčom te motivima *switch I* i *switch II* koji omeđuju mjesto vezanja nukleotida. P-omča omogućuje vezanje nukleotida koordiniranjem Mg^{2+} iona dok *switch* regije čine površinu koja mijenja konformaciju ovisno o vezanom nukleotidu (Corbett i Alber, 2001). Pripadnici Rho i Rab obitelji su regulirani i trećom klasom proteina, nazvanom GDI (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) koji vežu GDP-vezanu GTPazu i inhibiraju otpuštanje GDP-a (Boulter i Garcia-Mata, 2010; Muller i Goody, 2017).

1.1.3. Posttranslacijske modifikacije proteina Ras

Kao što je već opisano, domene G proteina Ras su visoko očuvane, dok se izoforme proteina Ras gotovo isključivo razlikuju u varijabilnim C-terminalnim domenama odgovornim za membransku lokalizaciju proteina, vezanje lipida i biološku aktivnost (Cox i Der, 2010). Proteini Ras se sintetiziraju kao hidrofilni citoplazmatski prekursori koji zatim prolaze posttranslacijske modifikacije kako bi protein postao hidrofoban i vezao se na unutarnji dio plazma membrane (Lowy i Willumsen, 1993). Većina proteina iz obitelji Ras i Rho na C-terminalnom kraju sadrži motiv CAAX (C=cistein, A=alifatska aminokiselina, X=bilo koja aminokiselina). Ovaj motiv prepoznaje farnezil-transferaza ili geranilgeranil-transferaza I, koje kataliziraju kovalentno vezanje izoprenoida¹ na cisteinski ostatak unutar motiva CAAX, Cys186 u humanom proteinu H-Ras (Wennerberg i sur., 2005). Na proteine Ras djeluje farnezil-transferaza, potom se tri aminokiseline C-terminalno od Cys186 proteolitički cijepaju, a Cys186 metilira, čime se povećava hidrofobnost proteina (Lowy i Willumsen, 1993; Slika 3). Ova modifikacija je esencijalna za asocijaciju proteina na plazmatsku membranu. Iako za neke članove Ras superobitelji nije dokazano da su modificirani lipidima, a i dalje asociraju s membranom, većina nemodificiranih proteina nije vezana na membranu (Wennerberg i sur., 2005). Međutim, ova modifikacija sama po sebi nije dovoljna za lokalizaciju proteina na plazmatsku membranu. Sljedeći korak je palmitoilacija cisteina uzvodno od Cys186. Za palmitoilaciju je odgovorna hipervarijabilna domena uzvodno od CAAX, koja čini "drugi signal". Zajedno, motiv CAAX i "drugi signal" čine signal dovoljan za pravilno vezanje Ras proteina na plazma membranu. Mutacija Cys186 koja sprječava farnezilaciju ostavlja Ras protein topivim u citosolu, dok protein koji je farneziliran ali ne i aciliran, lokalizira na endomembrane (Choy i sur., 1999).

¹ Izoprenoidi su skupina spojeva čija je osnovna građevna jedinica 2-metilbutan, ili izopren, veličine 5 C atoma. Farnezil sadrži tri takve jedinice i građen je od 15 C atoma, a geranilgeranil od 20 C atoma.



Slika 3. Posttranslacijske modifikacije motiva CAAX humanih proteina Ras. **A)** Hipervarijabilne regije (HVR) izoformi humanih proteina Ras sadrže sekvence nužne za pravilno lokaliziranje proteina. Motiv CAAX se smatra "prvim signalom" dok je "drugi signal" uzvodno te ga čine cisteinski ostaci koji se palmitoiliraju, osim u slučaju K-Ras4B, kod kojeg je ta regija polibazična (lizin) te sadrži serin koji se fosforilira. **B)** Enzimi koji sekvencijalno sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama. Farnezil-transferaza (FTaza) katalizira prvu reakciju vezanja farnezila tioeterskom vezom, Ras-konvertirajući enzim 1 (RCE1) uklanja AAX aminokiseline te farnezil-cistein postaje novi C-terminalni kraj proteina. Izoprenilcisteinkarboksimetil-transferaza (ICMT) metilira karboksilnu skupinu farnezil-cisteina. Krajnji rezultat je hidrofobna C-terminalna domena proteina Ras (prilagođeno prema Ahearn i sur., 2012).

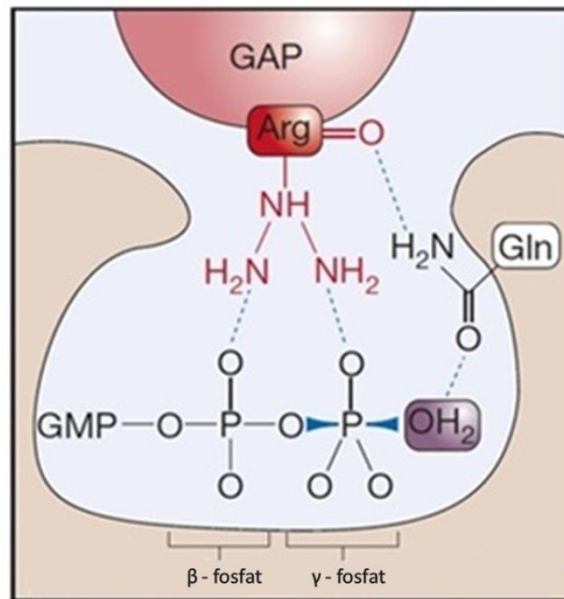
1.2. Proteini aktivatori GTPaza Ras

Proteini aktivatori GTPaza Ras (RasGAP) su veliki proteini koji sadrže nekoliko domena te interakcijom s proteinima G potiču njihovu, inače slabu, intrinzičnu GTPaznu aktivnost, koju ubrzavaju za nekoliko redova veličine. S obzirom na to da postoji veliki broj malih G proteina, proteini GAP su također mnogobrojni i raznoliki (Bos i sur., 2007). Razlikujemo

nekoliko obitelji GAP proteina, koje nisu međusobno strukturno povezane te imaju različite profile specifičnosti za male GTPaze. Proteini RhoGAP, RanGAP i RabGAP djeluju na članove specifičnih obitelji, dok i RasGAP i RapGAP djeluju na obitelj Ras. Funkcionalne domene uglavnom omogućuju interakciju s proteinima ili lipidima i tako služe kao signali za lokalizaciju i kao kosturi za nastanak proteinskih kompleksa. Mehanizam reakcije je dobro istražen te uključuje pravilnu orijentaciju molekule vode u aktivnom mjestu i njenu polarizaciju za izvršavanje nukleofilnog napada na fofoanhidridnu vezu između β - i γ -fosfata, okluziju vode iz aktivnog mjesta i stabilizaciju prijelaznog stanja. Budući da proteini GAP nisu evolucijski očuvani, postoje razlike u samim mehanizmima (Bos i sur., 2007). U istraživanjima mehanizma reakcije hidrolize GTP-a potaknute GAP-om došlo je do prekretnice s početkom upotrebe aluminij-florida (AlF_x). Ta mala anorganska molekula kompleksira s proteinima te se može koristiti za proučavanje mehanističkog aspekta reakcija prijenosa fosforilne skupine jer služi kao dobar analog za γ -fosfat brojnim ATP- i GTP-konvertirajućim enzimima. Za kompleks Ras:RasGAP aktivni oblik molekule je AlF_3 . Protein Ras veže aluminij-florid samo u prisutstvu RasGAP-a, te se aktivno mjesto neophodno za efikasnu hidrolizu GTP-a stvara samo uz dodatak RasGAP-a. Pokazano je da argininski ostatak na poziciji 789 humanog RasGAP-a p120 nužan za katalitičku aktivnost proteina i njegovu sposobnost induciranja konformacije prijelaznog stanja, što je potvrđeno određivanjem strukture kompleksa između RasGAP-a i Ras-GDP u prisutstvu AlF_3 (Wittinghofer, 1997).

1.2.1. Hidroliza GTP-a stimulirana proteinima RasGAP

Detaljno objašnjenje mehanizma hidrolize GTP-a potpomognute proteinima RasGAP dobiveno je 1997. istraživanjem kompleksa proteina H-Ras i katalitičke domene proteina GAP p120 (GAP-334). RasGAP argininskim ostatkom na poziciji 789 stabilizira evolucijski očuvani glutamin na poziciji 61 proteina Ras, što omogućuje koordinaciju molekule vode koja vrši nukleofilni napad na γ -fosfat GTP-a. Argininski ostatak, nazvan argininski prst (engl. *arginine finger*), također stabilizira prijelazno stanje pozicioniranjem u vezno mjesto za fosfat te neutralizira negativni naboj γ -fosfata (Scheffzek i sur., 1997; Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz aktivnog mjesta proteina Ras u kompleksu s RasGAP. Prikazani su aminokiselinski ostaci iz proteina Ras (Gln) i RasGAP (Arg) izravno uključeni u hidrolizu GTP-a. Arginin stabilizira glutamin i neutralizira negativni naboj kontaktom s β- i γ-fosfatom. Glutamin pozicionira vodu za nukleofilni napad. Kompleks je prikazan u prijelaznom stanju hidrolize (prilagođeno prema Rehmann i Bos, 2004).

Istraživanja mutiranih formi proteina Ras potvrđuju ovaj model katalize. Aminokiselinski ostaci u proteinu Ras važni za hidrolizu GTP-a potpomognutu proteinima GAP su već spomenuti glutamin na poziciji 61, te glicini 12 i 13 (Scheffzek i sur., 1997). Mutacija glicina 12 u valin (G12V) u G1 omći dovodi do smanjenja afiniteta za vezanje GAP-a u odnosu na divlji tip proteina te GAP ne potiče GTPaznu aktivnost takvog mutanta. Mutacija glutamina 61 u leucin (Q61L) u regiji *switch II* značajno povećava afinitet vezanja proteina Ras i GAP, no kao i kod G12V mutanta, ne dolazi do aktivacije GTPazne aktivnosti (Gideon i sur., 1992). Glutamin na poziciji 61 je neophodan za katalitičku reakciju (Slika 4), dok mutacije glicina 12 i 13 sterički ometaju pravilnu orijentaciju argininskog prsta i glutamina 61. U oba slučaja, Ras postaje neosjetljiv na aktivnost proteina GAP te trajno ostaje u aktivnom, GTP-vezanom stanju kao onkoprotein (Scheffzek i sur., 1997). Osim navedenih aminokiselinskih ostataka, važne su i regije *switch I* i *II* koje prolaze konformacijske promjene ovisno o vezanju i otpuštanju gvanin-nukleotida. Promjena konformacije se opisuje kao mehanizam "napete opruge" (engl. *loaded spring mechanism*), gdje otpuštanje γ-fosfata nakon hidrolize GTP-a omogućuje regijama *switch* povratak u relaksirani oblik, specifičan za GDP-vezanu GTPazu (Vetter i Wittinghofer, 2001).

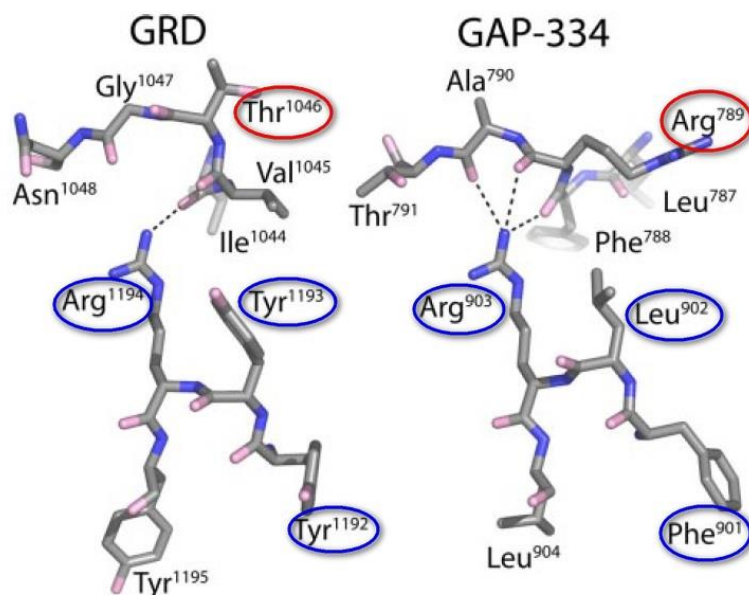
1.1.4. Prekomjerna aktivacija proteina Ras

Proteini obitelji Ras tema su intenzivnog istraživanja posljednjih nekoliko desetljeća. Jedan od glavnih povoda je važna uloga proteina Ras u regulaciji ekspresije gena, stanične proliferacije i diferencijacije, zbog čega su ključni u onkogenezi. Mutirani, konstitutivno aktivni Ras je identificiran u oko 30% svih humanih tumora, a mutacije su najčešće prisutne u izoformi K-Ras (85% slučajeva) (Zhou i sur., 2016). Također, postoje preferencijalne mutacije Ras izoformi u različitim tipovima tumora, kao i preferencijalna mjesta mutacija. U 98% slučajeva riječ je o točkastim mutacijama u kodonima Gly12, Gly13 i Gln61 ("*hot spot*") koje rezultiraju konstitutivno aktivnim signalnim putevima nizvodno od proteina Ras. Osim uloge u onkogenezi, mutacije proteina Ras mogu biti prisutne i u germinativnoj liniji te su odgovorne za nekoliko razvojnih sindroma zajednički nazvanim rasopatije, npr. Costello sindrom, CFC (engl. *cardio-facio-cutaneous*) sindrom te Noonan sindrom (Tidyman i Rauen, 2016). Osim zbog izravnih mutacija, do prekomjerne aktivacije proteina Ras u rasopatijama može doći i zbog prekomjerno aktivnog regulatornog RasGEF faktora Sos1 ili zbog mutacija koje izazivaju gubitak funkcije RasGAP proteina neurofibromina kao što je slučaj u neurofibromastoziji tipa 1 (Fernandez-Medarde i Santos, 2011).

1.3. Proteini IQGAP

Proteini iz obitelji IQGAP su veliki proteini s više domena, evolucijski očuvani kod eukariotskih organizama, od kvasca do čovjeka. Zahvaljujući velikom broju interaktora, sudjeluju u regulaciji brojnih staničnih procesa kao što su stanična adhezija, pokretanje, prijenos signala, egzocitoza i citokineza (Shannon, 2012). Prvi opisani član obitelji, IQGAP1, otkriven je 1994. godine, a ime je akronim sastavljen od naziva domena prisutnih u strukturi proteina; domena IQ koja sadrži motive IQ te regija homologna domeni RasGAP prisutnoj u proteinima RasGAP (Weissbach i sur., 1994). Većina kralježnjaka eksprimira tri izoforme, IQGAP1, IQGAP2 i IQGAP3 (Hedman i sur., 2015). Na N-terminalnom kraju svih istraživanih IQGAP proteina, osim onih u amebi *Dictyostelium*, je domena CH (engl. *calponin homology*) odgovorna za vezanje F-aktina. Kod proteina kralježnjaka, nastavlja se nekoliko ponovljenih sekvenci, nazvanih IR (engl. *internal repeats*), koje omogućuju dimerizaciju proteina, motiv WW (engl. *tryptophan repeat motif*) nepoznate funkcije te već spomenuta domena IQ odgovorna za interakciju s Ca²⁺-vezujućim proteinima. Na C-terminalnom dijelu svih IQGAP

proteina (osim Iqg1p kod *S.cerevisiae*) nalazi se domena srodna katalitičkoj domeni proteina RasGAP (engl. *GAP-related domain*, GRD) koja veže male GTPaze iz Rho obitelji, Cdc42 i Rac1 te RGcT (engl. *Ras-GAP C-terminal*) domena (Mateer i sur., 2003). Poznato je da domena GRD proteina IQGAP1 i IQGAP2 veže isključivo aktivne oblike GTPaza Cdc42 i Rac1, ali ne RhoA i Ras (Kuroda i sur., 1996). Ipak, nedavno je pokazano da proteini IQGAP mogu ostvariti interakcije s GTPazama obitelji Ras. Protein IQGAP1 veže K-Ras preko motiva IQ te interakcija ne ovisi o nukleotidnom statusu proteina K-Ras, to jest IQGAP1 veže i aktivni i neaktivni oblik GTPaze (Matsunaga i sur., 2014). Također, IQGAP3 interagira isključivo s aktivnim oblikom proteina H-Ras, no ne deaktivira ga nego usmjerava njegovu funkciju (Nojima i sur., 2008). Unatoč prisutstvu domene GRD, koja dijeli najmanje 25% sekvence s katalitičkim regijama proteina RasGAP, nije dokazano da proteini IQGAP posjeduju aktivnost GAP, te čak mogu imati inhibitorski efekt na intrinzičnu GTPaznu aktivnost proteina Cdc42 i Rac1 čime ih stabiliziraju u aktivnom stanju (Mateer i sur., 2003). Nedostatak aktivnosti GAP je vjerojatno posljedica nedostatka argininskog prsta esencijalnog za katalitičku aktivnost proteina RasGAP, koji nije očuvan u proteinima IQGAP (Wang i sur., 2007). Naime, rješavanjem kristalne strukture domene GRD IQGAP1 i usporedbom aminokiselinskog slijeda proteina IQGAP s proteinima RasGAP, pokazano je da su aminokiseline ključne za katalitičku aktivnost proteina RasGAP u proteinima IQGAP mutirane (Adachi i sur., 1997; Faix i sur., 1998; Kurella i sur., 2008; Scheffzek i sur., 1996; Weissbach i sur., 1994). Jedno od obilježja proteina RasGAP je motiv FLR, evolucijski očuvana sekvenca FLRXXXPAXXP (F=fenilalanin, R=arginin, P=prolin), čiji tripeptid Phe-Leu-Arg je u domeni GRD proteina IQGAP mutiran u Tyr-Tyr-Arg. Nadalje, argininski prst u domeni GRD na C-terminalnom dijelu α_2a_c heliksa je zamijenjen treoninom (Slika 5). Arginin iz motiva FLR ostvaruje vodikove veze s kisikovim atomima fenilalanina⁷⁸⁸, arginina⁷⁸⁹ i alanina⁷⁹⁰, čime stabilizira omču prsta (engl. *finger loop*), konformaciju arginina⁷⁸⁹ važnu za stabilizaciju prijelaznog stanja, dok treonin¹⁰⁴⁶ domene GRD uspostavlja rigidnu konformaciju. Poravnavanje sekvence IQGAP1 sa sekvencama još 55 homologa proteina IQGAP iz metazoa pokazalo je da svi homolozi sadrže treonin na poziciji argininskog prsta GAP proteina, te da 54 homologa sadrži motiv YYR (Kurella i sur., 2008).



Slika 5. Usporedba interakcija posredovanih argininom iz motiva YZR i FLR prisutnih u domeni GRD proteina IQGAP1 odnosno domeni GAP-334 proteina p120 RasGAP. Arginin iz motiva YZR ostvaruje samo jednu vodikovu vezu za stabilizaciju $\alpha 2a$ heliksa, unutar kojeg je katalitički aktivan arginin zamijenjen treoninom. Nasuprot, arginin iz motiva FLR stabilizira argininski prst s tri vodikove veze. Crvenom bojom je označen katalitički aktivan arginin i ekvivalentni treonin u domeni GRD. Plavo su označene aminokiseline motiva FLR i YZR (prilagođeno prema Kurella i sur., 2008).

Izoforme IQGAP međusobno dijele neke zajedničke karakteristike, kao veliko preklapanje sekvence te određene zajedničke interaktore. Ipak, razlikuju se u funkcijama, tkivnoj distribuciji i unutarstaničnoj lokalizaciji. Dok je IQGAP1 eksprimiran u svim tkivima, IQGAP2 je najprisutniji u jetri, a ekspresija IQGAP3 je detektirana u mozgu, plućima, testisima, tankom i debelom crijevu (White i sur., 2012). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se spoznale jedinstvene funkcije pojedine izoforme.

IQGAP1 je najbolje istražen predstavnik ove obitelji proteina, te je pokazano da ostvaruje interakcije s više od 90 proteina i ima velik broj izravnih interaktora (White i sur., 2012). Uključen je regulaciju aktinskog citoskeleta izravnim vezanjem aktina te faktora uključenih u polimerizaciju aktina, kao što su formin Dia1 i N-WASP, ali i neizravno vezanjem malih GTPaza Rho koje su glavni regulatori rearanžiranja aktinskog citoskeleta (Brandt i sur., 2007; Fukata i sur., 1997; Le Clainche i sur., 2006; Owen i sur., 2007). Također sudjeluje u povezivanju aktinskog citoskeleta s mikrotubulima putem proteina CLIP-170 (Fukata i sur., 2002). IQGAP1 djeluje kao kostur za formiranje multiproteinskih kompleksa (Ho i sur., 1999; Roy i sur., 2005). Primjerice djeluje kao okosnica MAPK (engl. *mitogen activated protein*

kinase) signalnog puta, čija aktivacija rezultira rastom i proliferacijom stanica, vežući izravno Raf, MEK1/2 i ERK1/2 kinaze (Roy i sur., 2005). Pokazane su i interakcije s receptorima za faktore rasta, kao što je VEGFR 2 (engl. *vascular endothelial growth factor receptor type 2*) uključen u angiogenezu (Shannon, 2012). Osim navedenih, IQGAP1 je uključen i u mnoge druge procese, a novi interaktori se kontinuirano otkrivaju. Mnogi interaktori proteina IQGAP1 su uključeni u karcinogenezu, te je pokazano kako promjena ekspresije IQGAP1 utječe na migraciju stanica, invaziju i signalizaciju putem receptora za epidermalni faktor rasta (Briggs i Sacks, 2003). Prekomjerna ekspresija IQGAP1 je povezana s poboljšanom proliferacijom tumora, invazivnošću i angiogenezom (Jadeski i sur., 2007).

IQGAP2 je slabije istražen te je poznato svega nekoliko izravnih interaktora. Pretežito je eksprimiran u jetri, ali je njegova mRNA detektirana i u trombocitima, bubrezima, prostati, štitnoj žlijezdi, želucu, žlijezdama slinovnicama i testisima (Shannon, 2012). Kao i IQGAP1, veže Rac1 i Cdc42 te stabilizira njihova GTP-vezana stanja (Brill i sur., 1996). Interakcijom s β -kateninom modulira Wnt/ β -katenin signalni put (Schmidt i sur., 2008). Uključen je u metabolizam, tako IQGAP2^{-/-} miševi imaju oslabljen unos dugolančanih masnih kiselina i povišenu osjetljivost na inzulin, što sugerira ulogu u transportu masnih kiselina i potencijalno metabolizmu lipida (Chiariello i sur., 2012). Dok IQGAP1 pokazuje onkogeni potencijal, IQGAP2 bi mogao imati suprotan učinak. Istraživanje na IQGAP2^{-/-} miševima pokazalo je njegovu funkciju tumor-supresora s obzirom da je deaktivacija IQGAP2 povezana s razvojem hepatocelularnog karcinoma (Schmidt i sur., 2008). Također, smanjena ekspresija IQGAP2 je primjećena u hepatocelularnom karcinomu i karcinomima prostate i želuca kod ljudi (Smith i sur., 2015).

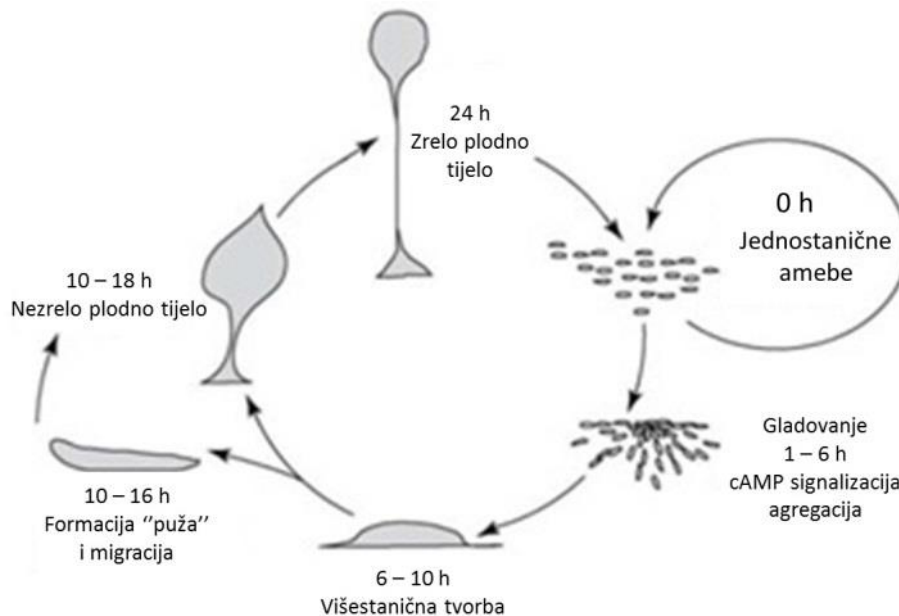
Protein IQGAP3 je najmanje istraživana izoforma. Nojima i suradnici su 2008. godine potvrdili da je u kulturi epitelnih stanica sisavaca IQGAP3 eksprimiran isključivo u proliferirajućim stanicama. Konzistentno s prethodna dva člana IQGAP obitelji proteina, IQGAP3 pokazuje interakciju s Rac1 i Cdc42 ali ne i s GTPazom RhoA (Wang i sur., 2007). Kao i IQGAP1, regulira proliferaciju putem Ras/ERK signalnog puta, no interagira samo s ERK1 (Yang i sur., 2014). Ekspresija IQGAP3 korelira s migracijom, invazijom i proliferacijom stanica tumora pluća pa bi mogao imati sličnu ulogu u tumorigenezi kao IQGAP1.

1.4. Modelni organizam *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum je protist koji spada u razred *Dictyostelia* ili "društvenih" ameba, koje tijekom životnog ciklusa izmjenjuju jednostaničnost i višestaničnost. Prirodno stanište im je tlo u kojem žive kao jednostanične haploidne amebe i fagocitiraju bakterije. U uvjetima gladovanja ispuštaju kemoatraktant, ciklički adenozin-monofosfat (cAMP), na koji susjedne stanice odgovaraju krećući se uz kemijski gradijent te se agregiraju i formiraju višestanično rasplodno tijelo na čijem dršku se nalaze spore (Eichinger i sur., 2005). *Dictyostelia* pripadaju kraljevstvu *Amoebozoa*, koje se uglavnom sastoji od jednostaničnih organizama sličnih amebama s jednostavnim životnim ciklusom. Nekoliko skupina unutar *Amoebozoa* sadrži organizme koji mogu formirati jednostavna rasplodna tijela građena od jedne spore koja se nalazi na dršku porijeklom iz iste stanice, no jedino *Dictyostelia* mogu formirati višestanična rasplodna tijela (Schaap, 2011).

1.4.1. Taksonomija

Poznato je oko 120 vrsta ameba koje pripadaju razredu *Dictyostelia*, tradicionalno klasificiranih prema morfologiji rasplodnog tijela. Na taj način su podijeljene u tri roda: *Dictyostelium*, s nerazgranatim ili lateralno razgranatim rasplodnim tijelima; *Polysphondylium*, čija rasplodna tijela sadrže periodično spiralno razdijeljene bočne grane; te *Acytostelium*, koje formiraju acelularni držak rasplodnog tijela. Novije filogenetske analize na temelju sekvenci ribosomske DNA su dovele do revizije taksonomije *Dictyostelia*, te ih podijelile u 4 velike skupine. Skupine 1 i 2 se sastoje od morfološki raznolikih vrsta *Dictyostelium*. Skupina 3 sadrži reprezentativne vrste iz sve 3 skupine tradicionalne podjele. Skupina 4 je najveća i sastoji se gotovo isključivo od vrsta *Dictyostelium*, ali uključuje i nekoliko vrsta koje tradicionalno pripadaju *Polysphondylium* i *Acytostelium* (Schaap i sur., 2006). Većina vrsta u skupinama 1-3 mogu encistirati kao samostalne stanice u nepovoljnim uvjetima, dok je skupina 4 najkasnije divergirala te je izgubila tu sposobnost. Također, sve istraživane vrste skupine 4 luče cAMP kao kemoatraktant za agregaciju, što je specifičnost ove skupine. Vrste iz skupina 1-3 ne koriste cAMP nego glorin, ornitin, folnu kiselinu, pterin ili neki još neidentificirani kemoatraktant (Schaap, 2011). *Dictyostelium discoideum* pripada skupini 4 te tvori velika nerazgranata rasplodna tijela nastala agregacijom i do 10^5 stanica uz cAMP kao kemoatraktant (Schaap i sur., 2006). Životni ciklus je prikazan na Slici 6.



Slika 6. Životni ciklus amebe *Dictyostelium discoideum*. U povoljnim uvjetima vegetativne stanice se mitotski dijele. Kada nastupi gladovanje, stanice ulaze u razvojni ciklus koji traje 24 sata. Tijekom razvoja, oko 10^5 stanica agregira te diferenciraju kroz različite višestanične razvojne oblike do rasplodnog tijela sa sporama i drškom. Nakon što ponovno nastupe povoljni uvjeti, spore germiniraju i počinje novi vegetativni ciklus u obliku jednostaničnih ameba (prilagođeno prema Williams, 2006).

1.4.2. Genom amebe *D. discoideum*

Genom *D. discoideum*, soja AX4, je potpuno sekvenciran 2005. godine (Eichinger i sur., 2005). Sastoji se od 6 kromosoma te je velik oko 34 Mb koje kodiraju 12 257 gena (Eichinger i sur., 2005; dictybase.org). Genom je neuobičajeno bogat AT nukleotidima (77.57%). Geni za ribosomalne RNA se nalaze na palindromskom ekstrakromosomalnom elementu velikom 88 kb.

1.4.3. *Dictyostelium* kao modelni organizam

D. discoideum je modelni organizam već dugi niz godina, te je vodeći model za istraživanje stanične pokretljivosti i kemotaksije eukariotskih stanica, fagocitoze, makropinocitoze i endolizosomalnog prometa (Bozzaro i sur., 2008; Cai i Devreotes, 2011). Nadalje, dobar je model za citokinezu, staničnu adheziju, autofagiju i neapoptotsku staničnu smrt (Giusti i sur., 2008; Siu i sur., 2011; Surcel i sur., 2010). Jedna od značajki koja čini *D. dictyostelium* primamljivim modelnim organizmom je jednostavnost uzgoja; stanice se mogu

brzo uzgajati na sobnoj temperaturi u kemijski definiranom mediju. Neki laboratorijski sojevi se uzgajaju na bakterijskim livadama na agaru, međutim većinom se koristi njihova sposobnost rasta u odsutnosti bakterija, aksenično u tekućem mediju, od kuda i potječu nazivi laboratorijskih sojeva, AX2, AX3 i AX4 (Schaap, 2011). Životni ciklus je kratak, a vrijeme udvostručenja 4 do 12 sati, ovisno o soju i uvjetima uzgoja (dictybase.org). Također, postupak transfekcije stanica i selekcije mutanata je jednostavan. Dostupan je velik broj molekularno-genetičkih tehnika, a s obzirom na to da je *Dictyostelium* haploidan organizam, promjene u fenotipu je moguće izravno povezati s uvedenim mutacijama. Iako ortolozi animalnih i kvašćevih proteina često imaju višu razinu sličnosti sekvence međusobno nego s proteinima iz *D. discoideum*, *D. discoideum* ima veći broj gena zajedničkih sa životinjama, čime pruža mogućnost istraživanja mnogih proteina nedostupnih u kvascu (Williams, 2010). Osim toga, genom sadrži ortologe najmanje 33 gena uključena u bolesti kod ljudi što *D. discoideum* svrstava i među modele korisne za biomedicinska istraživanja (Eichiner i sur., 2005).

1.4.4. Proteini Ras u amebi *D. discoideum*

Genom amebe *D. discoideum* kodira za 14 proteina obitelji Ras, od kojih je 6 djelomično okarakterizirano; RasG, RasD, RasB, RasC, RasS i RapA (Weeks i Spiegelman, 2003). Uključeni su u raznolike procese kao što su pokretanje stanica, polarnost, rast, citokineza, kemotaksija, makropinocitoza i višestanični razvoj. Pokazuju visoku funkcionalnu specifičnost te čak ni RasG i RasD, koji su međusobno najbliži u aminokiselinskoj sekvenci, ne pokazuju visok stupanj funkcionalnog nadomještanja (Bolourani i sur., 2010). RasG i RasD su bliski proteinu H-Ras sisavaca, sa 68% i 65% identičnosti primarne aminokiselinske sekvence, dok su ostali proteini Ras evolucijski prilično odvedeni od ova dva, ali i međusobno (Tuxworth i sur., 1997).

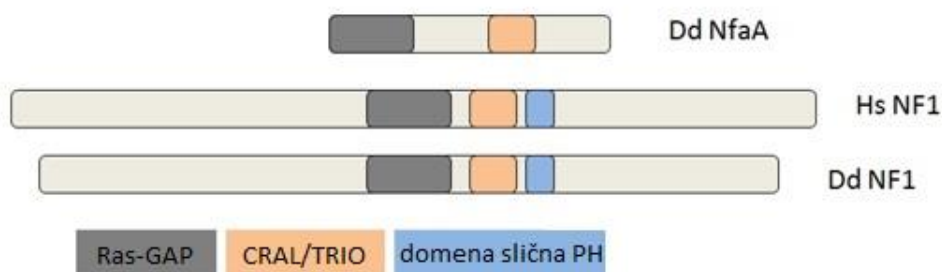
Protein RasG se u *D. discoideum* eksprimira tijekom rasta i ranog višestaničnog razvoja, nakon čega ekspresija naglo pada (Weeks i Spiegelman, 2003). RasG je uključen u regulaciju rasta i citokineze, kemotaksiju prema folnoj kiselini, regulaciju nasumičnog kretanja stanica i makropinocitoze (Hoeller i sur., 2013; Junemann i sur., 2016; Tuxworth i sur., 1997). Neke od ovih funkcija mogu biti djelomično nadomještene ekspresijom proteina RasD i RasC, kao rast i citokineza (RasD) te kemotaksija (RasC) (Bolourani i sur., 2010).

Najizraženiji fenotip stanica genetički deficijentnih za RasG je multinukleiranost zbog defekta tijekom citokineze (Tuxworth i sur., 1997). Također, u stanicama *rasG⁻* dolazi do promjena u aktinskim strukturama, polarnosti, smanjenja mobilnosti stanica i usporavanja rasta. Nizvodni efektori proteina RasG uključuju Rip3 (engl. *Ras interacting protein 3*) i fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3-kinaze) klase I. Rip3 je komponenta TORC2 kompleksa uključenog u kemotaksiju prema cAMP-u, a PI3-kinaza ima regulatorne uloge u kemotaksiji, pokretanju i citokinezi (Bolourani i sur., 2010). RasG, zajedno s RasS, specifično regulira PI3-kinaze 1 i 2, uključene u aktivaciju djelova plazmatske membrane potrebnu za stvaranje makropinocitotske čašice, i PI3-kinaze 4, ključne za sazrijevanje makropinosoma (Hoeller i sur., 2013). Nedavno je također pokazano da RasG izravno veže te aktivira i regrutira formin G u bazu makropinocitotske čašice gdje ovaj protein sudjeluje u elongaciji aktinskih filamenata (Junemann i sur., 2016). Iako tijekom ranog razvoja naglo dolazi do pada ekspresije proteina RasG, pokazano je da je on još uvijek prisutan tijekom agregacije (Weeks i Spiegelman, 2003). Stanice *rasG⁻* ne pokazuju fenotipske promjene u tom stadiju, osim malog zakašnjenja u početku agregacije. Protein RasC je potreban za kemotaksiju prema cAMP-u tijekom agregacije, no RasG može samo djelomično nadomjestiti njegovu funkciju, to jest pokazano je određeno preklapanje funkcija ova dva proteina u kemotaksiji (Bolourani i sur., 2006).

1.4.5. Proteini GAP u amebi *D. discoideum*

Nekolicina proteina GAP je okarakterizirana u *D. discoideum*, kao na primjer DRG, koji djeluje kao GAP na članove Rab i Rho/Rac obitelji i ACAP-A, GAP za protein ArfA (Dias i sur., 2013; Knetsch i sur., 2001). Što se tiče proteina RasGAP, u genomu ih je pronađeno barem 7 potencijalnih na temelju prisutstva domene RasGAP, no, izuzev proteina NfaA, još uvijek nisu okarakterizirani (dictybase.org). Zhang i suradnici su 2008. godine identificirali ortolog NF1 RasGAP proteina sisavaca kao negativni regulator aktivnosti proteina Ras, kodiran genom *nfaA*. Pokazali su da NfaA regulira RasG te u manjoj mjeri i RasB, i na taj način igra ulogu u regulaciji kemotaksije, citokineze i nasumičnog kretanja stanice (Zhang i sur., 2008). Nekoliko godina kasnije, u potrazi za genom odgovornim za pojačanu makropinocitozu u akseničnim *Dictyostelium* sojevima, pronađeno je da gen *axeB* kodira za još jedan homolog humanog NF1 (Bloomfield i sur., 2015). Gubitak ovog proteina je jedan od razloga za uspješan rast

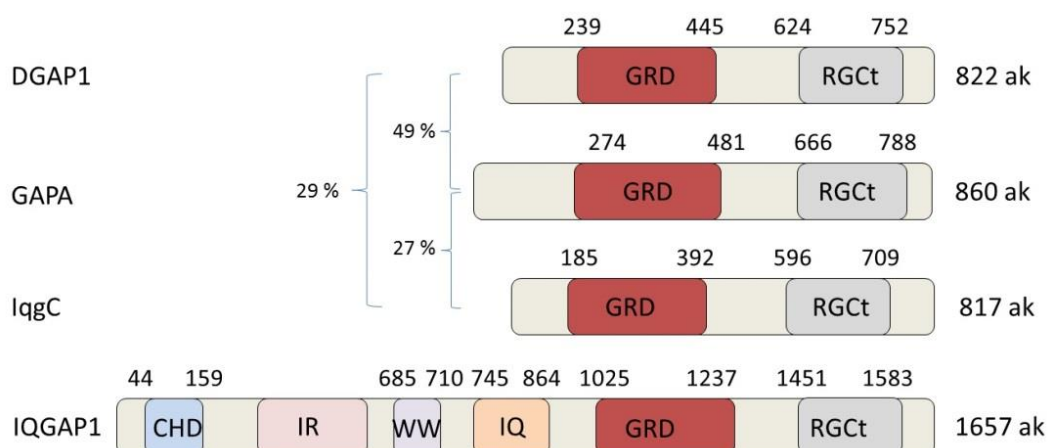
laboratorijskih sojeva u tekućem hranjivom mediju. Autori su tada svrstali prethodno otkriveni NfaA u grupu minijaturnih neurofibromina (engl. *miniature neurofibromin*, MNF), jer mu nedostaju homologije izvan centralne regije s domenom RasGAP (Slika 7). Aktivnost RasGAP produkta gena *axeB* nije dokazana *in vitro* iako protein sadrži dva uzastopna argininska ostatka na poziciji argininskog prsta kritičnog za aktivnost GAP. Štoviše, NF1 s mutiranim katalitičkim argininom nije pokazao negativan utjecaj na makropinocitozu kao divlji tip proteina, što dodatno upućuje na aktivnost GAP. Funkcionalan protein DdNF1 je prisutan samo u divljim izolatima amebe *Dictyostelium* koji se isključivo hrane fagocitozom bakterija, a mutiran je u laboratorijskim sojevima, kao što su AX2 i AX4 (Bloomfield i sur., 2015).



Slika 7. Organizacija domena humanog proteina NF1 te homologa iz amebe *D. discoideum* kodiranih gena *nfaA* i *axeB*. Evolucijski su očuvane domene RasGAP i CRAL/TRIO (odgovorna za vezanje malih lipofilnih molekula), dok domena slična domeni PH (odgovorna za lokalizaciju proteina vezanjem fosfoinozitida na membrani) nije prisutna u NfaA, koji je mnogo kraći od humanog ortologa (prilagođeno prema Bloomfield i sur., 2015).

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

Genom amebe *D. discoideum* kodira za četiri proteina srodna proteinima IQGAP; DGAP1 (DdIQGAP1), GAPA (DdIQGAP2), IqgC (DdIQGAP3) i IqgD (DdIQGAP4). Strukturno su različiti od IQGAP proteina ostalih istraživanih organizama; sadrže samo domene GRD i RGCT dok im domene prisutne u N-terminalnoj polovici humanih proteina nedostaju (Slika 8).



Slika 8. Prikaz tri proteina iz amebe *D. discoideum* i humanog proteina IQGAP1. Od domena prisutnih u humanim proteinima IQGAP, *D. discoideum* srodnici sadrže samo domene GRD i RGcT te su mnogo kraći. DGAP1 i GAPA dijele 49% identičnih aminokiselina, dok je IqgC 27% identičan s GAPA i 29% s DGAP1 (prilagođeno prema Shannon, 2012).

Na N-terminalnom kraju su prisutni slabo očuvani motivi IQ kojima nedostaje konsenzus L/IQxxxRxxxxR sekvenca, te je potrebno utvrditi jesu li to funkcionalne domene (Shannon, 2012). Jedino IqgD ima dvije domene CH, no strukturno su srodne aktin-vezujućoj domeni fimbrina, a ne domeni CH karakterističnoj za proteine IQGAP (Vlahou i Rivero, 2006). Do sada su istraženi samo DGAP1 i GAPA1. DGAP1 je gotovo istovremeno kloniran od strane dviju grupa. Lee i suradnici su ga nazvali DdRasGAP1 i svrstali u srodnike proteina GAP s mogućnošću vezanja RasD i poticanja hidrolize GTP-a (Lee i sur., 1997). Faix i suradnici su protein nazvali DGAP1 i pokazali da ne posjeduje aktivnost RasGAP te da ne veže *D. discoideum* RasG i humani protein H-Ras (Faix i sur., 1998). Naime, DGAP1 i GAPA, kao i njihovi IQGAP srodnici iz viših eukariota, imaju supstituirane aminokiseline u dva motiva unutar domene GRD esencijalna za aktivnost RasGAP (vidi poglavlje 1.3). Nadalje, oba proteina vežu male GTPaze iz *Dictyostelium* obitelji GTPaza Rho, jednako kao i IQGAP proteini sisavaca (Faix i sur., 1998). Pokazano je da vežu GTPaze Rac1 u aktivnom obliku, što potiče stvaranje tetramernog kompleksa s heterodimerom korteksilina (Faix i sur., 2001).

Proteini DGAP1 i GAPA su relativno dobro istraženi te su poznate njihove uloge u citokinezi i drugim procesima ovisnima o aktinu (Adachi i sur., 1997; Faix i Dittrich., 1996; Faix i sur., 1998). Stanice GAPA⁻ uspješno formiraju diobenu brazdu, ali ne mogu završiti posljednju fazu citokineze i razdvajanje dviju stanica kćeri što za posledicu ima nastanak

velikih multinukleiranih stanica (Adachi i sur., 1997). Nasuprot, prekomjerna ekspresija DGAP1 uzrokuje citokinetski defekt i nastanak višejezgrenih stanica (Faix i Dittrich, 1996). Zanimljivo, stanice genetički deficijentne za oba proteina su ekstremno velike s ogromnim brojem jezgara još izraženijeg citokinetskog defekta (Faix i sur., 2001). Genetička eliminacija DGAP1 mijenja arhitekturu aktinskog citoskeleta, stanice imaju povišen sadržaj filamentoznog aktina, pokretljivije su, pojačano fagocitiraju i pokazuju razvojne defekte, u usporedbi sa stanicama divljeg tipa (Faix i Dittrich, 1996; Faix i sur., 1998). DGAP1 i GAPA u interfaznim stanicama lokaliziraju u stanični korteks, dok su tijekom citokineze lokalizirane u diobenu brazdu (Faix i sur., 2001). GAPA je također dio kompleksa koji ima funkciju u odgovoru na mehanički stres. Zajedno s miozinom II, korteksilinom I, kinezinom-6 i unutarnjim centromernim proteinom (INCENP) omogućuje inicijaciju nastanka brazde bez diobenog vretena. DGAP1 inhibira navedeni put, što sugerira da ova dva proteina imaju uloge u odgovoru na različite stimulanse. DGAP1 sudjeluje u odgovoru na biokemijske signale, a GAPA na mehanosenzorne stimulanse (Kee i sur., 2012).

Protein IqgC je do sada istražen samo u kontekstu kemotaksije prema cAMP-u (Lee i sur., 2010). Autori su konstruirali *iqgC* mutant u AX3 soju i pokazali da su kemotaksija uzrokovana gradijentom cAMP-a, polimerizacija aktina i filopodiji slični kao u stanicama divljeg tipa, no da su *iqgC* stanice su malo više polarizirane i brže migriraju od stanica divljeg tipa.

1.5. Cilj istraživanja

Grupa prof. Webera (Laboratorij za biofiziku stanice, IRB) proučava ulogu proteina IqgC u vegetativnoj fazi životnog ciklusa amebe *D. discoideum*. Do sada neistražen protein IqgC je prema svojoj aminokiselinskoj sekvenci svrstan u obitelj proteina IQGAP, međutim preliminarni rezultati sugeriraju da IqgC ima drugačije molekularne i stanične funkcije u usporedbi s proteinima DGAP1 i GAPA. Naime, konfokalnom mikroskopijom fluorescentno obilježenog proteina IqgC otkrivena je lokalizacija isključivo u makropinosome, "prednje" strukture oblika čašice koje se stvaraju prilikom unosa tekuće faze u stanicu. Nadalje, sustav dva hibrida u kvascu je pokazao da IqgC ne reagira s malim GTPazama iz obitelji Rho, koje su etablirani interaktori proteina IQGAP sisavaca te DGAP1 i GAPA iz amebe *D. discoideum*. Preliminarna analiza interaktoma pomoću masene spektroskopije identificirala je nekoliko

GTPaza iz obitelji Ras, a sustav dva hibrida u kvascu je potvrdio izravnu interakciju s aktivnim oblikom GTPaze RasG i to, specifično njenim mutantom koji ima Q61L, a ne G12V aktivirajuću mutaciju. Osim toga, analiza sekvence pokazuje da protein IqgC ima očuvana dva argininska ostatka unutar specifičnih motiva koji su esencijalni za RasGAP katalitičku aktivnost. Iz svega opisanog nametnula se hipoteza da bi protein IqgC, iako srodnik proteina IQGAP, mogao biti istinski RasGAP koji djeluje kao negativni regulator male GTPaze RasG specifično tijekom makropinocitoze.

Cilj ovog diplomskog rada je biokemijski potvrditi interakciju proteina IqgC i GTPaze RasG te definirati molekularnu funkciju ovog proteina. Izravnu interakciju proteina IqgC i aktivnog oblika RasG planiramo potvrditi metodom *pull-down*. Vezanje endogenog proteina IqgC i RasG ćemo ispitati ko-immunoprecipitacijom, nakon čega će se pristupiti analizi molekularne funkcije. U tu svrhu koristit ćemo test aktivacije proteina RasG u stanicama stimuliranim folnom kiselinom kako bi se utvrdilo utječe li protein IqgC na razinu aktivnog proteina RasG u stanici.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Materijali korišteni za uzgoj stanica *D. discoideum*

mediji i podloge:

HL5 hranjivi medij

22 g/l HL5 medija bez glukoze (Formedium)

18 g/l maltoze (Sigma Aldrich)

fosfatni agar – u Sørensen fosfatni pufer dodaje se 12 g/l agara

otopine za transformaciju stanica:

Sørensen fosfatni pufer, pH 6,0

0,897 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

1,99 g/l KH_2PO_4

otopina za oporavak stanica, 50x

0,1 M CaCl_2

0,1 M MgCl_2

pufer za elektroporaciju

10 mM K-fosfatni pufer, pH 6,1

50 mM glukoza (Roth)

antibiotici – ampicilin (Sigma) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; streptomycin (Fluka) 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; geneticin G-418 (Gibco) 10 - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

2.1.2. Materijali korišteni za uzgoj bakterijskih stanica *Escherichia coli*

hranjivi mediji i podloge:

LB (Luria-Bertani) medij

5 g/l ekstrakta kvasca (Biolife)

10 g/l triptona (Biolife)

5 g/l NaCl

za krutu podlogu i 15 g/l agara (Roth)

obogaćeni LB medij

8 g/l ekstrakta kvasca

16 g/l triptona

5 g/l NaCl

5 mM fosfatni pufer, pH 7,3

NZY+ kompletni medij	SOC medij za oporavak stanica
10 g/l NZ amina (Fluka)	0,5% ekstrakta kvasca
5 g/l ekstrakta kvasca	2% triptona
5 g/l NaCl	10 mM NaCl
12,5 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
12,5 mM MgSO ₄	2,5 mM KCl
20 mM glukoza	20 mM MgSO ₄
	20 mM glukoza

antibiotici – ampicilin (Sigma) 100 µg/ml; kloramfenikol (Sigma) 35 µg/ml

2.1.2.1. Korišteni sojevi *E. coli*

DH5α – laboratorijski soj s visokom efikasnošću transformacije. Zahvaljujući mutacijama gena *recA1* i *endA1* nema homologne rekombinacije ni nespecifične nukleazne aktivnosti endonukleaze I, što rezultira poboljšanom stabilnošću plazmida te kvalitete DNA. Kemijski kompetentan soj ranije napravljen u laboratoriju.

XL10-Gold (Agilent Technologies) – ultrakompetentne bakterije koje imaju Hte fenotip, što povećava efikasnost transformacije ligiranih i velikih molekula DNA. Deficijentne su za mnoge restrikcijske enzime te rekombinacijski popravak.

Rosetta 2 (Merck) – soj korišten za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina, derivat soja BL21 prilagođenog povećanoj ekspresiji eukariotskih proteina koji sadrže kodone rijetko korištene u *E. coli*. U bakterijama je prisutan vektor pRARE s kodirajućom sekvencom za otpornost na kloramfenikol te za tRNA za kodone AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC i CGG.

2.1.3. Početnice

početnica za mutagenezu

5' - GTTATTGTTGGTGGTGGTGGTGTTCGGTAAAAGTGC - 3' – RasG_G12V_mut s fosforiliranim 5'-krajem, početnica korištena za mutiranje proteina RasG(wt) u RasG(G12V)

početnice za sekvenciranje – za provjeru konstrukata pripremljenih tehnikama rekombinantne DNA korištene su sljedeće početnice

5' - TTCTTATTTCTTAAAACAAATAAA - 3' – UP1_seq, početnica koja je komplementarna sekvenci zaostajućeg lanca unutar act15 promotora pDM304 plazmida

5' - TATAATCTAATAATGTTGTAAACAA - 3' – DP1_seq, početnica koja je komplementarna sekvenci vodećeg lanca unutar act8 terminator pDM304 plazmida

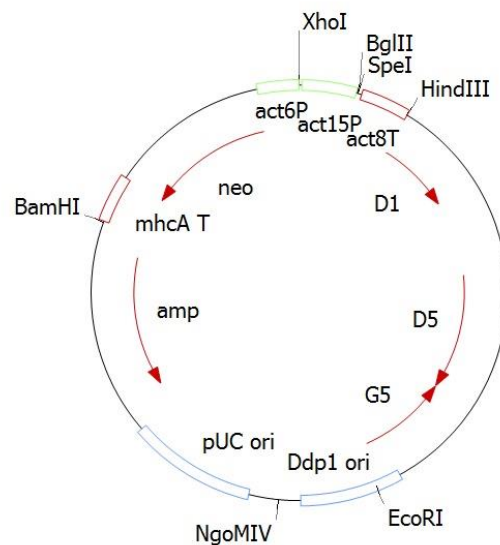
5' - GACAATCATTGGTACTCTATCC - 3' – RasG_rev_seq1, početnica koja je komplementarna sekvenci vodećeg lanca unutar same sekvence RasG proteina

2.1.4. Plazmidi

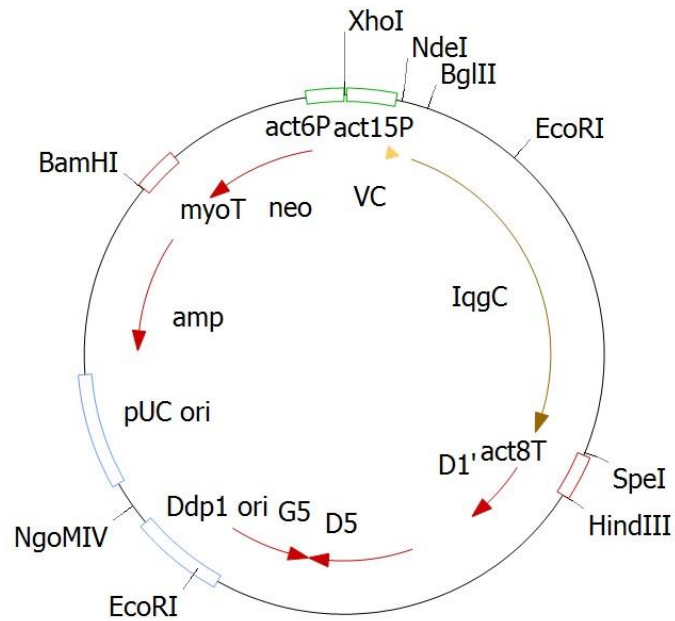
2.1.4.1. Plazmidi korišteni za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *D. discoideum*

Za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *D. discoideum* korištenih u proteinskoj biokemiji i analizi bimolekularne komplementacije fluorescencije (engl. *bimolecular fluorescent complementation*, BiFC) korišteni su derivati vektora pDM304 (Slika 9). pDM304 je ekstrakromosomalni vektor koji nosi gen za otpornost prema genicinu (G418), a omogućava istovremenu ekspresiju dva rekombinantna proteina pod kontrolom identičnih promotora (Veltman i sur., 2009). Vektor sadrži jedinstvena restrikcijska mjesta BglII i SpeI koja su korištena za unošenje željene kodirajuće sekvence gena te je takva cDNA pod kontrolom promotora act15 i terminatora act8. Osim gena za otpornost na genicinu (neo), vektor kodira i za rezistenciju na ampicilin (amp) te ima dva ishodišta replikacije, bakterijsko i za *Dictyostelium* (pUC ori, Ddp1 ori). Za metodu BiFC, korišten je vektor pDM304 u kojem se nakon act15 promotora nalazi kodirajuća sekvenca za C-terminalni fragment proteina Venus (VC), što omogućuje konstruiranje kodirajuće sekvence za fuzijske proteine VC-IqgC i VC-mRaf1(RBD) (Slika 10). pDM344 je pomoćni vektor u koji su

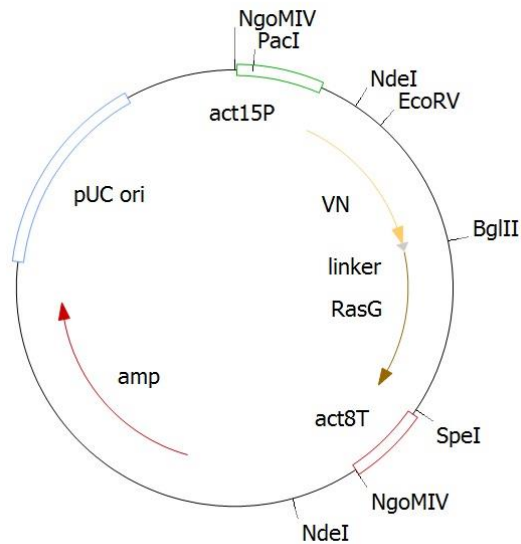
upotrebom BglII i SpeI restrikcijskih mjesta unešene sekvence za varijante proteina RasG u istom okviru čitanja s N-terminalnim fragmentom proteina Venus (VN; Slika 11). Nakon insercije željene cDNA, cijela ekspresijska kazeta zajedno s promotorom act15 i terminatorom act8 je korištenjem restrikcijskog enzima NgoMIV prebačena u ciljni vektor pDM304-VC-IqgC/mRaf1(RBD) (Slika 12). Za biokemijske metode su korišteni derivati pDM304 kod kojih su kodirajuće sekvence RasG varijanti uklonirane u BglII i SpeI restrikcijska mjesta tako da su u istom okviru čitanja s HA biljekom koji je uzvodno od BglII mjesta.



Slika 9. Osnovni plazmid pDM304 korišten za ekspresiju rekombinantnih proteina u stanicama *D. discoideum*.

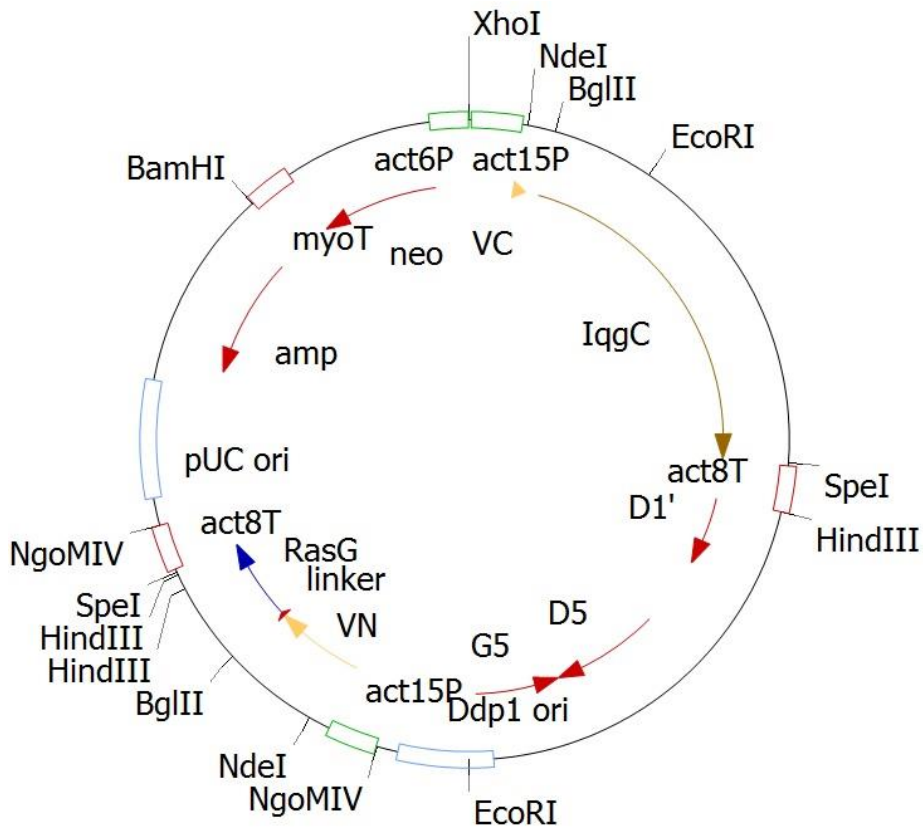


Slika 10. Ciljni vektor pDM304_VC-IqgC sadrži kodirajuću sekvencu za C-terminalni kraj proteina Venus fuzioniran s proteinom IqgC. Kodirajuća sekvencu za protein IqgC je uklonirana pomoću BglIII i SpeI restrikcijskih enzima. Na isti način konstruiran je i pDM304_VC-mRaf1(RBD) vektor.



Slika 11. Pomoćni vektor pDM344_VN-RasG_FL² sadrži kodirajuću sekvencu za N-terminalni kraj proteina Venus fuzioniran s varijantama proteina RasG. Korištenjem restrikcijskog enzima NgoMIV ekspresijska kazeta je prebačena u ciljni vektor.

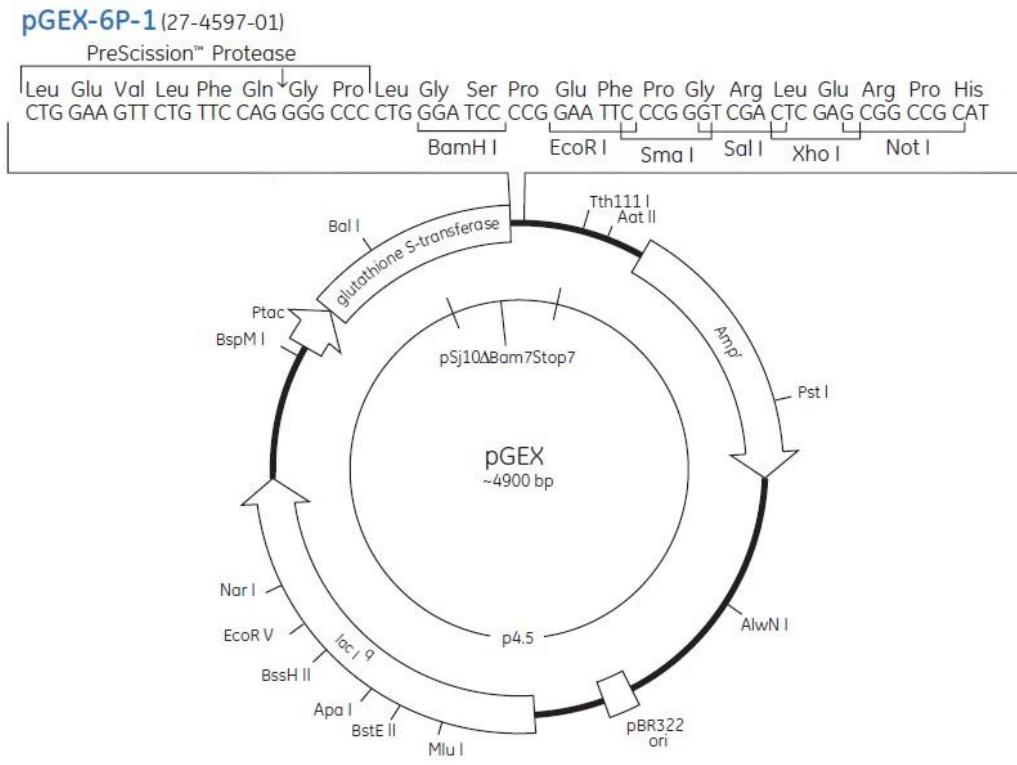
² FL – kodirajuća sekvencu za protein pune duljine (engl. *full length*)



Slika 12. Konačni konstrukt pDM304_VC-IqgC_VN-RasG_FL s kojeg se istovremeno ekspimiraju rekombinantni proteini VC-IqgC te VN-RasG u *D. discoideum*. U pripremljeni ciljni vektor pDM304_VC-IqgC je u jedinstveno mjesto NgoMIV ubačena ekspresijska kazeta sa sekvencom za fuzijski protein VN-RasG.

2.1.4.2. Plazmid korišten za ekspresiju GST- rekombinantnih proteina u bakterijama

Za prekomjernu ekspresiju GST-obilježenih rekombinantnih proteina u bakteriji *E. coli* korišten je pGEX-6P-1 ekspresijski vektor (Slika 13). Sadrži višestruko mjesto za kloniranje unutar *lac* operona te kodirajuću sekvencu za glutation S-transferazu (GST biljeg). Također nosi gen za rezistenciju na ampicilin te ishodište replikacije pBR322.



Slika 13. Ekspresijski vektor pGEX-6P-1 korišten za ekspresiju velikih količina GST-obilježenih rekombinantnih proteina u *E. coli* (preuzeto s gelifesciences.com/pgex).

2.1.5. Materijali korišteni za tehnike rekombinantne DNA

enzimi – BglII, BstUI, NgoMIV, PacI, Spe-HF, XhoI (NEB); EcoRV (Fermentas); alkalna fosfataza (CIAP, Invitrogen); T4 DNA ligaza (Thermo Scientific)

DNA standardi – DNA bakteriofaga λ (Fermentas) porezana s enzimima EcoRI i HindIII, λ DNA porezana s HindIII enzimom,; 1 kb DNA Ladder (NEB); 100 bp Ladder (NEB)

komercijalni kompleti za mutagenezu te za pročišćavanje plazmidne DNA i PCR-produkata: USB Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affymetrix); QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

boja za nanošenje DNA na gel, 10x

- 1,25% (W/V) ksilen-cijanol
- 1,25% (W/V) bromfenol plavo
- 0,625% (V/V) SDS
- 62,5% (V/V) glicerol

TAE puffer pH 8,5, 50x

- 50 mM EDTA
- 242 g/l Tris-baza
- 57,1 ml/l octene kiseline

otopine za izolaciju plazmidne DNA

otopina 1

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNaze A (Qiagen)

otopina 2

200 mM NaOH
1% SDS

otopina 3

3 M kalij acetata pH 5,5
5,75 ml octene kiseline (99,5%)

2.1.6. Materijali korišteni za proteinsku biokemiju

proteinski standardi: PageRulerUnstained Protein Ladder (Fermentas), PageRuler Plus Prestained (Thermo Scientific)

proteini: IqgC (ranije pročišćen u laboratoriju), H-Ras (Calbiochem), mRaf1(RBD) (ovaj rad), RasG(wt), RasG(Q61L) (ovaj rad)

GTPase-Glo Assay komplet (Promega)

glutation-sefaroza 4B (GE Healthcare), protein A-sefaroza CL-4B (GE Healthcare)

supstrat za alkalnu fosfatazu: 5-brom-4-klor-3-indolilfosfat p-toluidin, BCIP (Sigma)

antitijela

primarna antitijela – anti-korteksilin I monoklonalno, anti-GFP monoklonalno (ljubazni poklon prof. Jan Faixa); anti-IqgC poliklonalno (ranije pripravljeno u laboratoriju); anti-HA monoklonalno (Sigma); anti-HA poliklonalno (Sigma)

sekundarna antitijela – na mišja IgG antitijela, proizvedeno u ovci i konjugirano s alkalnom fosfatazom (Sigma); na zečja IgG antitijela proizvedeno u ovci, konjugirano s alkalnom fosfatazom (Sigma)

puferi za purifikaciju GST-rekombinantnih proteina iz bakterija

pufer za kolonu

- 1x PBS
- 1 mM EGTA
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF
- 6,6 mM benzamidina (Roth)

pufer za eluiranje – 30 mM reducirani L-glutation (Sigma) u puferu za kolonu, pH 7,3

pufer za dijalizu

- 50% glicerol (Kemika)
- 1x PBS
- 1 mM MgCl₂

pufer korišten za metode *pull-down* i ko-imunoprecipitacija

pufer za lizu stanica

- 30 mM Tris, pH 7,5
- 1 mM PMSF³ (Sigma)
- 1 mM AEBSF⁴ (Roth)
- 2 mM DTT⁵ (Roth)
- 1 mM EGTA⁶ (Sigma)
- 0,5 % n-oktil-polioksi-etilen (Serva)
- 40 mM NaCl

³ Fenilmetan-sulfonil-florid, nespecifični inhibitor proteaza, u najvećoj mjeri serinskih

⁴ Aminoetil-benzensulfonil-florid-hidroklorid, inhibitor serinskih proteaza

⁵ Ditiotreitol

⁶ Etilen-glikol-tetraoctena kiselina

puferi za test aktivacije proteina Ras

pufer za navezivanje proteina

1x PBS
1 mM EGTA
1 mM DTT
15 µg/ml benzamidina
1 mM PMSF

pufer za ispiranje

10 mM Na-fosfatni puffer, pH 7,2
150 mM NaCl
0,5% NP-40 (Fluka)
10% glicerol
10 mM MgCl₂ x 6H₂O
1 mM EGTA pH 7,2

pufer za lizu stanica

20 mM Na-fosfatni pufer pH 7,2
300 mM NaCl
1% NP-40
20% glicerol
1 mg/ml BSA⁷ (Fluka)
20 mM MgCl₂ x 6H₂O
2 mM EGTA pH 7,2
2 mM Na₃VO₄
10 mM NaF
25 µg/ml AEBSF

⁷ Albumin iz goveđeg seruma

otopine korištene za analizu metodom Western blot

SDS pufer za nanošenje uzoraka, 3x	SDS pufer za elektroforezu pH 8,8, 10x
150 mM Tris/0,4% SDS, pH 6,8	30,25 g/l Tris (Roth)
30 % glicerol	142,5 g/l glicina (Roth)
2,9% SDS (Roth)	1% SDS
3% β-merkaptioetanol (Fluka)	
0,3 % bromfenol plavo	
pufer za mokri prijenos, 10x	NCP pufer, pH 8,0, 10x
2,93 g/l glicina	12,1 g/l Tris/HCl
5,81 g/l Tris	87 g/l NaCl
0,0375% SDS	5 ml/l Tween 20 (Sigma)
20% metanol	

otopina za blokiranje membrane - 4% BSA u 1x NCP puferu

pufer za razvijanje membrane – 0,1 M Na₂CO₃, pH 10,0

12% SDS-poliakridamidni gelovi

gel za razdvajanje	gel za sabijanje
11 ml akrilamid/bisakrilamida	1,125 ml akrilamid/bisakrilamida
30%/0,8% (Roth)	30%/0,8%
6,68 ml 1,5 M Tris/0,8% SDS, pH 8,8	2,5 ml 0,5 M Tris/0,8% SDS, pH 6,8
8,43 ml dH ₂ O	6,3 ml dH ₂ O
135 μl 200 mM EDTA pH 7,2	50 μl 200 mM EDTA pH 7,2
6,68 μl TEMED ⁸ (Fluka)	5 μl TEMED
300 μl 20% APS ⁹ (Roth)	150 μl 20% APS

⁸ N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, katalizator polimerizacije akrilamida i bisakrilamida

⁹ Amonij-persulfat, inicijator polimerizacije akrilamida i bisakrilamida

2.2. Metode

2.2.1. Manipulacija staničnom kulturom *D. discoideum*

D. discoideum stanice su uzgajane pričvršćene za podlogu ili uz trešnju u suspenziji brzinom 150 rpm¹⁰, uz svjetlo te temperaturu od 22°C. Stanice su u petrijevkama uzgajane nakon pokretanja iz spora ili transfekcije, a za potrebe uzgoja većeg broja stanica uzgajane su u suspenziji. U ovom istraživanju korišten je laboratorijski aksenični soj AX2, koji može rasti u tekućem hranjivom mediju HL5. Za test BiFC i test aktivacije proteina Ras je korišten soj genetički deficijentan za *IqgC*, *iqgC*. Stanicama je svakodnevno mijenjan medij te su uzgajane do subkonfluencije, nakon čega su razrjeđivane. Naime, važno je da stanice ne prerastu gustoću od 4×10^6 stanica ml⁻¹ jer približavanjem stacionarnoj fazi stanice ulaze u gladovanje koje uzrokuje promjenu ekspresija gena i fiziologije. Stanice iz ovakvih kultura su korištene za eksperimente tijekom otprilike 3 do 4 tjedna, nakon čega su se pokretale svježije kulture iz prethodno pohranjenih spora, kako bi se izbjegla akumulacija spontanijh mutacija.

D. discoideum se dugoročno čuva u obliku spora u fosfatnom puferu na -80°C. Sporulacija se potiče tako da se subkonfluentne stanice, prikupljene centrifugiranjem 3 minute na 700 g pri +4°C, te isprane s 30 ml hladnog fosfatnog pufera, nakon ponovnog spuštanja resuspendiraju u 1 ml hladnog fosfatnog pufera te nasade na ploče s fosfatnim agarom koje se drže na 22°C. Zbog nedostatka hranjivih tvari u fosfatnom agaru stanice ulaze u razvojni ciklus te tijekom 24 h diferenciraju u višestanična rasplodna tijela s drškom i sporama. Nakon jedan do dva dana, rasplodna tijela se prikupe ispiranjem s nekoliko mililitara fosfatnog pufera, razdijele u kriotubice te naglo zamrznu u tekućem dušiku. Kod pokretanja stanične kulture iz spora, 200 – 500 µl rasplodnih tijela u fosfatnom puferu se doda u petrijevku u 10 ml HL5 medija s odgovarajućim antibioticima.

U HL5 medij se rutinski dodaju ampicilin i streptomycin u koncentracijama 100 i 300 µg/ml za sprječavanje kontaminacije bakterijama. Kao selekcijski antibiotik za transformirane stanice korišten je G418 u koncentracijama 10 i 20 µg/ml.

¹⁰ Broj okretaja u minuti, engl. *revolutions per minute*

2.2.1.1. Transfekcija stanica

Za jednu transfekciju je potrebno 5×10^6 stanica i oko 5 μg plazmidne DNA. Stanice su prikupljene centrifugiranjem 3 min na 700 g pri 4°C . Nakon odlijevanja supernatanta stanice su isprane s 30 ml hladnog fosfatnog pufera te nakon toga s 30 ml hladnog pufera za elektroporaciju. Nakon posljednjeg centrifugiranja stanice su resuspendirane u 700 μl pufera za elektroporaciju i prenešene u kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda 4 mm, zajedno s odgovarajućim volumenom plazmida. Stanice su elektroporirane pomoću elektroporatora *Xcell gene pulser* (Biorad) koristeći unaprijed unešen protokol za *Dictyostelium*. Uvjeti elektroporacije su pravokutni valovi, napon 1000 V, kapacitet 10 μF , dva pulsa u trajanju 1 milisekundu s intervalom od 5 sekundi između. Nakon elektroporacije, sadržaj kivete je prenešen u petrijevku te inkubiran 15 minuta na 22°C na rotacijskoj tresilici uz brzinu trešnje 100 rpm. Nakon toga dodana je otopina za oporavak stanica tako da finalna koncentracija CaCl_2 i MgCl_2 bude 2 mM te su stanice ostavljene tresti u istim uvjetima još 15 minuta. Na kraju je stanicama dodano 10 ml HL5 medija te su inkubirane na 22°C sljedeća 24 sata nakon čega im je dodan antibiotik za selekciju transfektanata.

2.2.2. Manipulacija bakterijskom kulturom *E. coli*

2.2.2.1. Transformacija kemijski kompetentnih stanica

Za potrebe konstruiranja i propagacije vektora korištenih za ekspresiju proteina u stanicama *D. discoideum* korišten je komercijalni soj *E. coli*, ultrakompetentne XL10-Gold stanice koje omogućuju uspješnu transformaciju s velikim plazmidima. Bakterije su transformirane izlaganjem temperaturnom šoku prema uputama proizvođača nakon čega su nasađene na krutu podlogu LB s ampicilinom koncentracije 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ te inkubirane na 37°C preko noći.

2.2.2.2. Transformacija elektroporacijom

Za ekspresiju i pročišćavanje rekombinantnih proteina GST-RasG(wt) i GST-RasG(Q61L) iz bakterija, korišten je soj Rosetta 2. Bakterije su transformirane odgovarajućim derivatom pGEX-6P1 vektora elektroporacijom. Unaprijed pripremljene elektrokompetentne bakterije Rosetta 2 se čuvaju pohranjene na -80°C u jednakim volumenima od po 40 μl .

Bakterije su prvo otopljene na ledu, nakon čega im je dodan 1 μ l plazmida i sve je prenešeno u kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija je napravljena na uređaju *Xcell gene pulser* (Biorad), a korišten je unaprijed pohranjen program za elektroporaciju *E. coli*, koji odgovara upotrebi kiveta s razmakom elektroda 2 mm. Uvjeti elektroporacije su pravokutni valovi, napon 2400 V, kapacitet 25 μ F, jedan puls u trajanju 2,6 milisekunde. Odmah nakon elektroporacije u kivetu je dodan 1 ml SOC medija i sadržaj je nekoliko puta inverzno izmiješan te je prebačen u 1,5 mililitarsku mikrotubicu za centrifugiranje. Bakterije su centrifugirane 3 minute na 12000 g, većina supernatanta je uklonjena i bakterije su u malom volumenu medija nasađene na LB selekcijske ploče koje sadrže ampicilin, 100 μ g/ml i kloramfenikol, 35 μ g/ml. Inkubirane su preko noći na 37°C.

2.2.3. Manipulacija nukleinskim kiselinama

2.2.3.1. Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli*

Plazmidi su bili izolirani na dva načina, ovisno o nizvodnoj aplikaciji. Za potrebe sekvenciranja korišten je komercijalni komplet za pročišćavanje plazmidne DNA iz bakterija, *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Za ostale svrhe korišten je protokol za izolaciju DNA metodom alkalne lize. Izolacija DNA kompletom se temelji na vezanju DNA na silika-membranu u koloni u prisutnosti pufera visoke koncentracije kaotropnih soli, te kasnijoj eluciji u malom volumenu pufera niske koncentracije soli ili vodi. Izolacija je izvođena prema uputama proizvođača. Za izolaciju plazmida alkalnom lizom korišten je sljedeći protokol. 4 mL prekončne bakterijske kulture centrifugirano je u 2 mililitarskim tubicama za centrifugiranje 3 minute na 12000 g. Supernatant je uklonjen, a talog bakterijskih stanica resuspendiran u 200 μ L otopine 1. Nakon potpunog resuspendiranja, dodano je 200 μ L otopine 2 te je suspenzija nekoliko puta inverzno izmiješana. Nakon inkubacije 5 minuta na sobnoj temperaturi tijekom koje otopina 2 lizira bakterijske stanice, denaturira DNA i proteine, u smjesu je dodano 200 μ L otopine 3 te je ponovno nekoliko puta inverzno izmiješana. Neutralizacijom alkalne smjese cirkularna plazmidna DNA renaturira, dok genomski DNA tijekom centrifugiranja 10 minuta na 17900 g taloži zajedno sa staničnim ostacima i proteinima. Supernatant u kojem se nalazi plazmidna DNA je prebačen u čistu tubicu te je plazmidna DNA istaložena dodatkom 400 μ l izopropanola, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 5 minuta na 17900 g. Talog je ispran s 500 μ l 70%-tnog etanola te

ponovo centrifugiran pod istim uvjetima. Nakon centrifugiranja, etanol je potpuno uklonjen pipetom i sušenjem taloga 5 do 10 minuta u uređaju za ugušćivanje uzoraka *Savant SpeedVac* (Thermo Scientific). Talog je resuspendiran u 20 μ L redestilirane vode. Tako izolirana plazmidna DNA pohranjena je na -20°C . Za procjenu kvalitete i kvantifikaciju DNA korištena je agarozna elektroforeza te mjerenje apsorbancije uzoraka pri valnim duljinama 260 i 280 nm na uređaju *Biodrop Duo* (Serva).

2.2.3.2. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Elektroforeza DNA na agaroznom gelu je korištena za provjeru svakog koraka procesa kloniranja. U ovom radu rutinski su korišteni 1% (w/v) agarozni gelovi pripremljeni otapanjem agaroze u 1x TAE puferu u kojeg je prethodno dodano 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ etidij-bromida za vizualizaciju DNA. Uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani s bojom za nanošenje uzoraka. Elektroforeza je izvođena u 1x TAE puferu u kadici za horizontalnu elektroforezu pri naponu od 5V/cm. Nakon elektroforeze DNA u gelu je vizualizirana pod UV svjetlom transiluminatora, a gelovi dokumentirani pomoću kamere povezane s računalom. Veličina i koncentracija fragmenata DNA u gelu procjenjena je usporedbom s DNA standardima.

Za pročišćavanje odsječaka DNA iz agaroznog gela korišteni su isti uvjeti elektroforeze, nakon čega je DNA vizualizirana pod UV svjetlom transiluminatora te su skalpelom izrezani dijelovi gela s fragmentima DNA od interesa i prebačeni u 2 mililitarske tubice za centrifugiranje. DNA je pročišćena korištenjem komercijalnog kompleta za pročišćavanje DNA iz gela, *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), prema uputama proizvođača.

2.2.3.3. Ciljana mutagenaza

Pomoćni vektor pDM344_VN-RasG(wt) je korišten kao kalup u reakciji mutagenaze divljeg tipa proteina RasG. Mutagenaza je napravljena koristeći komercijalni komplet za ciljanu mutagenazu, *USB[®] Change-IT[™] Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit* (Affymetrix). Korištena je početnica RasG_G12V_mut fosforilirana na 5'-kraju, kojom se unosi točkasta mutacija u kodon 12 kodirajuće sekvence za RasG, čime je u proteinu na poziciji 12 glicin zamijenjen valinom (G12V). Plazmid je razrijeđen prema uputama proizvođača na 8

ng/μl te je napravljena 20 μl reakcijska smjesa koja uključuje 1x Change-IT pufer, 0,25 μM fosforiliranu mutagenu početnicu, 0,25μM fosforiliranu univerzalnu početnicu Amp REV , 8 ng plazmida te 0,8 μl Change-IT enzima. PCR¹¹ program je prikazan u Tablici 1.

Tablica 1. PCR program korišten za ciljanu mutagenezu sekvence gena za divlji tip proteina RasG u RasG s točkastom mutacijom u kodonu 12.

korak PCR programa	temperatura	vrijeme	
početna denaturacija	95°C	2 min	
denaturacija	95°C	30 sec	35 x
sljepljivanje početnice	57°C	30 sec	
elongacija	68°C	20 min	
završna elongacija i ligacija	68°C	15 min	
pauza	16°C		

Po završetku reakcije uzet je volumen od 10 μl u koji je dodano 1 μl enzima DpnI, restrikcijske endonukleaze koja prepoznaje metiliranu sekvencu 5' – GAm6TC – 3'. S obzirom da su nosintetizirane DNA u PCR-smjesi nemetilirane, DpnI digestira samo metilirane roditeljske lance kalupe i na taj način se iz smjese uklanjaju nemutirani roditeljski plazmidi. Digestija je inkubirana 2 sata na 37°C te je po završetku reakcije 2 μl DNA transformirano u *E. coli* XL10-Gold. Iz nekoliko klonova od transformacije je izolirana plazmidna DNA i poslana na sekvenciranje kako bi se potvrdilo uspješno unošenje željene mutacije.

2.2.3.4. Konstruiranje vektora za bimolekularnu komplementaciju fluorescencije (BiFC)

Bimolekularnom komplementacijom fluorescencije su testirani proteini interaktori eksprimirani s istog vektora pod kontrolom identičnih promotora. mRaf1(RBD) i IqgC su fuzionirani s C-terminalnim dijelom fluorescentnog proteina Venus, a četiri varijante RasG s njegovim N-terminalnim dijelom. Plazmidi pDM304_VC-IqgC i pDM304_VC-mRaf1(RBD) su već bili pripremljeni na način da su kodirajuće sekvence za IqgC i mRaf1(RBD) proteine uklonirane u BglII i SpeI mjesta pDM304_VC vektora, te ih je samo trebalo pripremiti za unos druge ekspresijske kazete, VN-RasG inserta. Kodirajuće sekvence za četiri varijante proteina

¹¹ Lančana reakcija polimerazom, engl. *polymerase chain reaction*

RasG (wt, G12V, S17N i Q61L) je bilo potrebno uklonirati u okviru čitanja s N-terminalnim dijelom proteina Venus za što je korišten pomoćni vektor pDM344_VN-RasG(wt) koji smo već imali.

U tu svrhu korišteni su već ranije konstruirani i sekvencirani plazmidi pDM304_HA-RasG(Q61L)_FL i pDM304_HA-RasG(S17N)_FL, dizajnirani tako da sadrže jedinstvena mjesta za prepoznavanje restrikcijskih enzima BglII i SpeI nakon sekvence biljega HA, koja omeđuju kodirajuću sekvencu proteina RasG. Time je omogućeno jednostavno prekloniranje RasG sekvence u vektor pDM344_VN koji ima ista jedinstvena restrikcijska mjesta nakon VN sekvence. RasG(G12V) je pripremljen mutagenezom pDM344_VN-RasG(wt) vektora (vidi 2.2.3.3.) S obzirom da restrikcijski enzimi BglII i SpeI imaju optimalne aktivnosti u različitim puferima, BglII u puferu 3.1, a SpeI-HF u puferu CutSmart, rađena je uzastopna digestija. Jedinica enzimske aktivnosti (engl. *unit*, U) je definirana kao količina enzima potrebna za digestiju 1 µg DNA bakteriofaga lambda tijekom 1 sata na 37°C u ukupnom volumenu reakcije 50 µl. Prema koncentraciji restrikcijskog enzima (BglII 10000 U/ml i SpeI-HF 20000 U/ml) i koncentraciji korištene DNA određen je potreban volumen enzima. Reakcije su inkubirane na 37°C oko 3 sata ili preko noći prilikom korištenja HF (engl. *high fidelity*) enzima koji ne pokazuju "*star*" aktivnost te se digestije mogu odvijati dulje vrijeme bez nespecifične degradacije DNA.

Kako bi pripremili konstrukte VN-RasG, plazmidi pDM304 i plazmid pDM344_VN-RasG(wt) su porezani sa enzimima SpeI i BglII. Između dvije digestije uzorci su pročišćeni kompletom za pročišćavanje DNA iz enzimatskih reakcija (*QIAquick PCR Purification Kit*) kako bi se uklonili enzim i pufer. Nakon druge digestije vektor pDM344 je defosforiliran s 1 µl CIAP-a uz dodatak 1x defosforilacijskog pufera tijekom 1 sata na 37°C. Fragmenti su razdvojeni agaroznom gel elektroforezom, potrebni fragmenti su izrezani iz gela te pročišćeni korištenjem kompleta za purifikaciju DNA iz agaroznih gelova (*QIAquick Gel Extraction Kit*). U PCR-tubicama su pripremljene ligacijske smjese koje su sadržavale oko 100 ng pripremljenog vektora pDM344, 12 µl inserata RasG(Q61L/S17N/G12V), 1 µl T4 DNA ligaze, 1x pufer za ligaciju i 2 µl 50% PEG 4000, u ukupnom volumenu 20 µl. Reakcije su se odvijale tijekom nekoliko sati u PCR bloku na 16°C. Po 2 µl ligacijskih smjesa je korišteno za transformaciju *E. coli* XL10-Gold, a ostatak je spremljen na -20°C. Klonovi su nasađeni u tekući LB medij i

izolirana je plazmidna DNA. Napravljene su testne digestije korištenjem restrikcijskog enzima SpeI-HF kojim su plazmidi linearizirani i odabrani klonovi su poslani na sekvenciranje.

Potrebne količine inserta za ligaciju izračunate su prema sljedećoj formuli:

$$\frac{\text{masa vektora (ng)} \times \text{veličina inserta (kb)}}{\text{veličina vektora (kb)}} \times \text{molarni omjer inserta i vektora} = \text{masa inserta (ng)}$$

Nakon što su sve četiri varijante RasG uspješno fuzionirane sa sekvencom VN, bilo je potrebno kompletne ekspresijske kazete iz pomoćnog vektora pDM344 prebaciti u restrikcijska mjesta NgoMIV vektora pDM304_VC-IqgC i pDM304_VC-mRaf1(RBD). Ova dva ciljana vektora su linearizirana digestijom s restrikcijskim enzimom NgoMIV u puferu *Cut Smart* na 37°C, nakon čega su defosforilirani s enzimom CIAP i pročišćeni. Inserti VN-RasG su izrezani iz odgovarajućih vektora korištenjem istog enzima NgoMIV, koji ima dva mjesta prepoznavanja na plazmidima pDM344_VN koja omeđuju ekspresijsku kasetu VN-RasG. Kako bi se okosnica vektora potpuno uklonila, digestirani su s enzimom BstUI u puferu *Cut Smart* na 60°C u termobloku, nakon čega je napravljena agarozna gel elektroforeza i fragmenti DNA su pročišćeni iz gela. Složene su ligacijske smjese u 20 µl koje su sadržavale 1 µl T4 DNA ligaze, 1x pufer za ligaciju, 2 µl 50% PEG 4000, 8 µl inserata i 1 µl odnosno 1,5 µl vektora pDM304_VC-IqgC odnosno pDM304_VN-mRaf1(RBD). Nakon transformacije bakterija i izolacije plazmida iz nekoliko klonova, uspješnost kloniranja je provjerena cijepanjem s enzimima SpeI, PaeI, EcoRV i BglII. Iz odabranih klonova je komercijalnim kompletom izolirana plazmidna DNA i uzorci su poslani na provjeru sekvenciranjem. Kombinacije i nazivi konačnih plazmidnih konstrukata za dvostruku ekspresiju u stanicama *D. discoideum* prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Konstrukti u plazmidu pDM304 s IqgC i mRaf1(RBD) fuzioniranim na VC i varijantama proteina RasG fuzioniranim na VN.

konačni plazmidni konstrukti za bimolekularnu fluorescentnu komplementaciju	
pDM304_VC-IqgC_VN-RasG(wt)_FL	pDM304_VC-mRaf1(RBD)_VN-RasG(wt)_FL
pDM304_VC-IqgC_VN-RasG(Q61L)_FL	pDM304_VC-mRaf1(RBD)_VN-RasG(Q61L)_FL
pDM304_VC-IqgC_VN-RasG(S17N)_FL	pDM304_VC-mRaf1(RBD)_VN-RasG(S17N)_FL
pDM304_VC-IqgC_VN-RasG(G12V)_FL	pDM304_VC-mRaf1(RBD)_VN-RasG(G12V)_FL

2.2.4. Metode proteinske biokemije

2.2.4.1. Ekspresija i pročišćavanje GST-rekombinantnih proteina afinitetnom kromatografijom

U ovom radu su pročišćavani sljedeći proteini: GST-IqgC, GST-mRaf1(RBD), GST-RasG(wt) i GST-RasG(Q61L). Uvjeti za ekspresiju prva dva proteina su već bili poznati dok je optimalne uvjete za ekspresiju dviju varijanti proteina GST-RasG trebalo utvrditi. Nakon transformacije plazmida pGEX-6P1_RasG(wt)_ Δ CAAX¹² i pGEX-6P1_RasG(Q61L)_ Δ CAAX u soj Rosetta 2, po 2 klona od svake transformacije su nasađena u tekući LB medij s odgovarajućim antibioticima. Takva prekonoćna kultura je sljedeći dan presađena u 20 ml obogaćenog LB medija u omjeru 1:100. Bakterije su rasle na 37°C pri 250 rpm do optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}) od 0,5 do 0,7. Tada je temperatura spuštana na 21°C te je dodatkom 0,75 mM IPTG-a inducirana ekspresija proteina GST-RasG. Kako bi se pronašli optimalni uvjeti, testirana su različita vremena indukcije (3 sata i preko noći) i različite brzine trešnje (250 i 150 rpm). Uzorci neinduciranih i induciranih stanica su lizirani kuhanjem 5 minuta u 1x SDS boji za uzorke te nanešeni na poliakrilamidni gel. Nakon elektroforeze i bojanja gela Coomassie bojom, utvrđeno je da je ekspresija najbolja kod prekonoćne indukcije i trešnje brzinom 150 rpm. Za purifikaciju proteina GST-IqgC i GST-mRaf1(RBD) stanice su rasle pri brzini 250 rpm, pri čemu je temperatura indukcije za GST-IqgC bila također 21°C, dok je temperatura indukcije za GST-fuziju s mRaf1(RBD) proteinom sisavaca, bila 28°C.

Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta ekspresije proteina, pristupljeno je pročišćavanju proteina iz 1 litre bakterijske kulture, pri čemu je vođeno računa da volumen stanične kulture ne prelazi 20% volumena tikve. Također, u obogaćeni LB medij je dodan 0,06% (V/V) Extran AP 33 kako bi se spriječila mehanička degradacija proteina uzrokovana pjenjenjem. Nakon prekonoćne indukcije, bakterijske stanice su prikupljene centrifugiranjem 20 minuta na 4500 g pri 4°C. Bakterijski talog je resuspendiran u puferu za kolonu, dodano mu je 0,2 mg/ml lizozima i 25 μ g/ml AEBSF-a te je miješan na magnetnoj miješalici 10 minuta u hladnoj sobi na 8°C. Uzorak je potom soniciran dva puta po 3 minute ultrazvukom frekvencije 20 kHz, amplitude 60, na uređaju za sonikaciju *Ultrasonic Processor* (Cole Parmer) s pauzom od 5 minuta između. Nakon toga je lizat centrifugiran 1 sat na 16000 g pri

¹² Δ CAAX označava kodirajuću sekvecu za protein RasG koji ne sadrži motiv CAAX (vidi poglavlje 1.1.3.)

4°C. Za to vrijeme u hladnoj sobi je pripremljena kolona glutation-sefaroze za afinitetno pročišćavanje. U plastičnu kolonu je stavljeno nekoliko mililitara glutation-sefaroze koja je najprije isprana s oko 150 ml hladne redestilirane vode, a potom ekvilibrirana s oko 250 ml hladnog pufera za kolonu. Supernatant od centrifugiranja je profiltriran kroz filter s porama veličine 0,45 µm i potom nanešen na pripremljenu kolonu spojenu na zatvoren sustav cijevi kroz koji je protok osiguran peristaltičkom pumpom. Protein je vezivan preko noći s malim protokom supernatanta (oko 3 ml/min). Sljedeći dan je supernatant uklonjen s kolone te je kolona isprana s oko 200 ml svježe pripremljenog hladnog pufera za kolonu. GST-rekombinantni protein je eluiran s glutation-sefaroznih kuglica dodatkom 30 mM reduciranog L-glutaciona, pH 7,3. Eluat je prikupljen u frakcijama od po 3 ml te je prisutnost proteina u pojedinoj frakciji provjerena Bradford testom. 780 µl vode je pomiješano s 200 µl Bradford otopine te je dodano 20 µl eluata. Frakcije koje sadrže proteine su spojene i prenesene u crijevo za dijalizu *Membra-Cel* (Roth), koje ne propušta proteine veličine iznad 14 kDa, te je protein dijaliziran preko noći u puferu za dijalizu. Tako pripremljen protein u glicerolu se pohranjuje na -20°C.

2.2.4.2. Testiranje protein-protein interakcije metodom *GST-pull-down*

GST-pull-down je metoda za povlačenje proteina interaktora GST-rekombinantnog proteina vezanog na kolonu glutation-sefaroze. Može se koristiti za testiranje interakcije s određenim proteinom, na primjer iz staničnog lizata, ako za taj protein postoji specifično protutijelo. cDNA za IqgC je fuzionirana u istom okviru čitanja s cDNA za glutation-S-transferazu u ekspresijskom vektoru pGEX-6P-1 te je rekombinantni protein GST-IqgC eksprimiran u bakterijama i afinitetno pročišćen preko kolone glutation-sefaroze. Takva kolona s vezanim GST-IqgC služi kao "mamac" na koji se vežu proteini interaktori iz staničnog lizata. S obzirom da je nas zanimala interakcija s RasG, RasG je fuzioniran s HA biljegom što omogućuje kasniju analizu metodom Western blot s anti-HA antitijelom za potvrdu interakcije ova dva proteina. U slučaju kada test *pull-down* nije izvođen odmah nego nakon određenog vremena, tada se protein eluiran s kolone i dijaliziran prema 50%-tnom glicerolu prvo trebao navezati na zrnca glutation-sefaroze.

500 µl glutation-sefaroze je stavljeno u 2 mililitarsku tubicu za centrifugiranje te je isprana 5 puta s po 1 ml svježe pripremljenog pufera za kolonu kako bi se uklonio etanol u

kojem se sefaroza čuva. Kuglice su potom pomiješane s 1 ml pufera za kolonu te 350 µl proteina GST-IqgC odnosno GST, koji je korišten za negativnu kontrolu, te je vezivanje GST-proteina provedeno na rotatoru u hladnoj sobi na +8°C u trajanju od oko 2 sata. Nakon toga je sefaroza s vezanim proteinom isprana 5 puta s po 1 ml pufera za kolonu te potom 5 puta s 1 ml pufera za lizu stanica *D. discoideum*. Tako isprana i ekvilibrirana sefaroza je inkubirana sa staničnim lizatima prema tablici 3. Uzorci su miješani u hladnoj sobi na rotacijskoj mješalici 1,5 sat, nakon čega su 5 puta isprani puferom za lizu. Proteini vezani na glutation-sefazoru su denaturirani kuhanjem u 1x SDS puferu za uzorke nakon čega je napravljen Western blot s anti-HA antitijelom.

Tablica 3. Kombinacije staničnih lizata *D. discoideum*, koje eksprimiraju konstitutivno aktivan ili neaktivan oblik proteina RasG, i sefaroznih kuglica s vezanim GST-IqgC ili samo GST proteinom, korištene za test *pull-down*

	GST-IqgC <i>pull-down</i>	GST <i>pull-down</i>
konstitutivno aktivna forma RasG	100 µl GST-IqgC sefaroze + 700 µl lizata AX2 stanica koje eksprimiraju HA-RasG(Q61L)_ΔCAAX	100 µl GST sefaroze + 700 µl lizata AX2 stanica koje eksprimiraju HA-RasG(Q61L)_ΔCAAX
konstitutivno neaktivna forma RasG	100 µl GST-IqgC sefaroze + 700 µl lizata AX2 stanica koje eksprimiraju HA-RasG(S17N)_ΔCAAX	100 µl GST sefaroze + 700 µl lizata AX2 stanica koje eksprimiraju HA-RasG(S17N)_ΔCAAX
prazna proba	100 µl GST-IqgC sefaroze	100 µl GST sefaroze

2.2.4.3. Testiranje protein-protein interakcije metodom ko-imunoprecipitacije

Imunoprecipitacija je metoda u kojoj se određeni antigen precipitira iz smjese proteina pomoću specifičnog antitijela. Antitijelo se imobilizira na zrnca sefaroze s proteinom A (GE Healthcare) koja se koriste za imunološko izdvajanje specifičnog proteina iz staničnog lizata. Ko-imunoprecipitacija je metoda u kojoj se protutijelom specifičnim za protein od interesa proba da li je ko-precipitiran iz smjese proteina zbog toga što tvori kompleks s primarno imunoprecipitiranim proteinom. Dakle, fokus nije na samom antigenu nego na proteinu koji tvori kompleks s tim antigenom, koji sada služi kao "mamac".

U dvije tubice za centrifugiranje otpipetirano je po 300 μ l sefaroze s proteinom A. Zrnca su isprana 3 puta s po 1 ml pufera za lizu stanica i uzeto je po 90 μ l u zasebne tubice, nakon čega su pomiješani sa staničnim lizatima i anti-IqgC anti-serumom, prema tablici 4.

Tablica 4. Kombinacije lizata stanica *D. discoideum*, koje ekspimiraju različite varijante proteina RasG, sefaroze s proteinom A i anti-IqgC anti-seruma, korištene za ko-immunoprecipitaciju.

	Co-IP	Co-IP bez antitijela
konstitutivno aktivna forma RasG	90 μ l protein A-sefaroze + 120 μ l anti-IqgC anti-seruma + 1350 μ l lizata AX2 stanica koje ekspimiraju HA-RasG(Q61L) Δ CAAX	90 μ l protein A-sefaroze + 1350 μ l lizata stanica koje ekspimiraju HA-RasG(Q61L) Δ CAAX
konstitutivno neaktivna forma RasG	90 μ l protein A-sefaroze + 120 μ l anti-IqgC anti-seruma + 1350 μ l lizata AX2 stanica koje ekspimiraju HA-RasG(S17N) Δ CAAX	90 μ l protein A-sefaroze + 1350 μ l lizata AX2 stanica koje ekspimiraju HA-RasG(S17N) Δ CAAX
divlji tip proteina RasG	90 μ l protein A-sefaroze + 120 μ l anti-IqgC anti-serum + 1350 μ l lizata AX2 stanica koje ekspimiraju YFP-RasG(wt) Δ CAAX	90 μ l protein A-sefaroze + 1350 μ l lizata AX2 stanica koje ekspimiraju YFP-RasG(wt) Δ CAAX

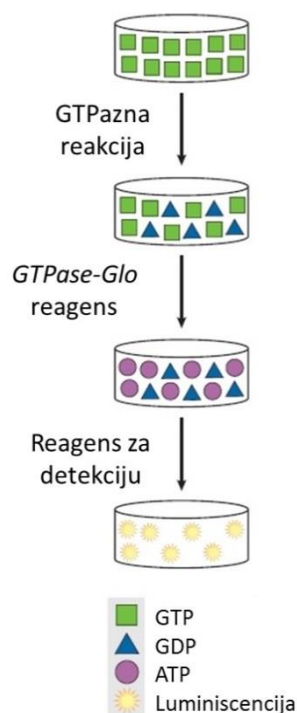
Uzorci su miješani 3 sata na rotacijskoj mješalici u hladnoj sobi na +8⁰C. Kratko su centrifugirani i isprani 5 puta s po 1 ml pufera za lizu stanica. Nakon ispiranja, na zrnca je dodan 1x SDS pufer za uzorke te su skušana 5 minuta kako bi se denaturirali proteini vezani na sefarozu preko proteina A. Kratkim centrifugiranjem zrnca su spuštena, a supernatant s denaturiranim proteinima je prenešen u čistu tubicu za centrifugiranje i kasnije analiziran metodom Western blot s anti-HA antitijelom.

2.2.4.5. Test aktivacije proteina Ras

Za određivanje razine aktivnog proteina RasG u stanicama korišten je test *pull-down* HA-obilježenog proteina RasG iz ukupnog staničnog lizata AX2 i *lqqC* stanica preko GST-mRaf1(RBD) kolone. RBD je domena iz mišje kinaze Raf1 koja, kao i svi efektori GTPaza Ras, veže isključivo aktivni, GTP-vezani oblik proteina Ras. Protokol je prilagođen prema protokolu Cai i suradnika (2012) s time da je u ovom istraživanju aktivacija Ras signalnog puta analizirana u vegetativnim stanicama stimuliranim folnom kiselinom. Vezanje proteina na glutation-sefarozu, ispiranje i ekvilibriranje kolone s vezanim proteinom je napravljeno kako je opisano ranije (vidi 2.2.4.2.). Po 30 μ l sefaroze je otpipetirano u tubice za *pull-down*. AX2 stanice koncentracije 4×10^7 st/ml u ukupno 5 ml su neposredno prije stimulacije folnom kiselinom stavljene 10 minuta na led, a zatim još tresti 2 minute brzinom 150 rpm. Potom je uzeto po 400 μ l za određivanje bazalne razine aktivnog RasG. Odmah nakon toga, stanice su stimulirane dodatkom folne kiseline u konačnoj koncentraciji 50 μ M te je po 400 μ l uzimano u određenim vremenskim točkama; 5, 10, 20, 40 i 60 sekundi od dodatka folne kiseline. Uzorci su pomiješani s 2x puferom za lizu stanica u omjeru 1:1, kratko inverzno promješani i stavljeni na led. Stanični lizati su centrifugirani 10 minuta na 15000 g pri +4°C. Po 600 μ l supernatanta je prebačeno u tubice s glutation-sefarozom na koju je vezan GST-mRaf1(RBD) te je *pull-down* izveden kako je opisano ranije (vidi 2.2.4.2.). Uzorci su analizirani metodom Western blot s anti-HA antitijelom.

2.2.4.4. Analiza aktivnosti GAP

Za testiranje aktivnosti RasGAP proteina *lqqC* korišten je komercijalni komplet za analiziranje aktivnosti GAP ispitivanog proteina *in vitro* baziran na luminiscenciji (*GTPase-GloAssay*, Promega) (Mondal i sur., 2015). Protein za kojeg se pretpostavlja da ima aktivnost GAP se inkubira s odgovarajućom GTPazom te se, po završetku GTPazne reakcije, određuje količina preostalog GTP-a u puferu tako da se GTP konvertira u ATP pomoću enzima nukleozid-difosfat kinaze uz dodatak ADP-a. Smjesi se potom dodaje reagens za detekciju u kojem se nalaze luciferin i enzim luciferaza, kojoj je za aktivnost potreban nastali ATP. Luciferaza oksidira luciferin uz emisiju svjetlosti, koja se detektira luminometrom što omogućuje kvantifikaciju rezultata (Slika 14).



Slika 14. Princip na kojem se zasniva test GTPazne aktivnosti. Bez obzira mjeri li se intrinzična GTPazna aktivnost ili aktivnost GAP, nehidrolizirani GTP preostao po završetku inkubacije se uz *GTPase-Glo* reagens prevodi u ATP. Nastali ATP je potreban enzimu luciferazi za reakciju oksidacije luciferina prilikom koje se oslobađa svjetlo. Količina detektiranog svjetla je obrnuto proporcionalna količini hidroliziranog GTP-a u GTPaznoj reakciji (prilagođeno prema TM452, Promega).

Aktivnost RasGAP je ispitana s ljudskim proteinom H-Ras (Calbiochem) i s *Dictyostelium* proteinom RasG. U GTPaznoj reakciji kataliziranoj ljudskom GTPazom, H-Ras je korišten u 1 μM finalnoj koncentraciji, a reakcija je složena prema uputama proizvođača (TM452, Promega). Pripremljena je 2x otopina GTPaze koja sadrži 2 μM H-Ras i 1 mM DTT u puferu GAP. Pročišćeni protein IqgC je serijski razrijeđen, u rasponu od 2 μg do 1 ng s faktorom razrjeđenja 2 (2000 ng, 1000 ng, 500 ng, ...), u puferu GAP koji sadrži 10 μM GTP. Po 5 μl serijskih razrjeđenja je u triplikatima raspipetirano u jažice bijele polistirenske mikrotitarske pločice s 384 jažice. GTPazna reakcija je inicirana dodatkom 5 μl 2x otopine GTPaze i inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi (23°C). U međuvremenu je 500x *GTPase-Glo* reagens razrijeđen s *GTPase-Glo* puferom uz dodatak 10 mM ADP-a te je po završetku GTPazne reakcije, po 10 μl tako pripremljenog reagensa dodano u reakciju. Reakcija je dalje inkubirana uz trešnju na sobnoj temperaturi 30 minuta. Na kraju je u nju dodano po 20 μl reagensa za detekciju te je nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerena luminiscencija na uređaju *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Scientific).

Za ispitivanje aktivnosti RasGAP proteina IqgC prema *Dictyostelium* GTPazi RasG, rekombinantni proteini GST-RasG (wt i Q61L varijanta) su afinitetno pročišćeni preko kolone glutation-sefaroze i takav protein imobiliziran na zrnca sefaroze je odmah korišten u testu GAP. Pripremljena su serijska razrjeđenja proteina IqgC, kako je već opisano, u rasponu od 2 µg do 1 ng u puferu GAP s 10 µM GTP-om. U 0,5 mililitarske tubice je otpipetirano po 30 µl sefaroze s vezanim proteinom GST-RasG te je GTPazna reakcija inicirana dodatkom proteina IqgC u puferu GAP. Reakcija je inkubirana 2 sata na sobnoj temperaturi uz rotacijsko miješanje. U međuvremenu je pripremljen *GTPase-Glo* reagens kako je opisano. Po završetku GTPazne reakcije uzorci su kratko centrifugirani da se sefarozne kuglice spuste na dno tubica te su supernatanti prenijeti u jažice mikrotitarske ploče u triplikatima. U uzorke je dodan GTPazni reagens u omjeru 1:1 te su inkubirani 30 minuta uz trešnju na sobnoj temperaturi. Potom su u reakcije dodana 2 volumena detekcijskog reagensa i nakon 10 minuta inkubacije je izmjerena luminiscencija.

2.2.4.6. Natrij-dodecil-sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima upotrebljavana je za provjeru indukcije ekspresije, tijekom pročišćavanja proteina te za analize metodom Western blot. Korištena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u vertikalnom sustavu za elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra System* (BioRad) u prisutnosti SDS-a. Pripremljeni su 12% gelovi s 4% gelom za sabijanje debljina 1 i 1,5 mm. U tikvice na ledu dodane su sve komponente, a kao posljednje su dodani APS koji inicira polimerizaciju akrilamida i bisakrilamida, te TEMED koji služi kao katalizator reakcije. Gel za razdvajanje je izliven u prethodno pripremljena stakla u stalku za izlivanje gelova (Biorad). Za vrijeme polimerizacije na gelove je nanešen izopropanol koji sprječava oksidaciju. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje pripremljen je gel za sabijanje, te je izliven na polimerizirani gel za razdvajanje s kojeg je uklonjen izopropanol. Stavljene su češljevi te su gelovi ostavljeni još 2 sata da polimerizira gel za sabijanje.

Gelovi su postavljeni u kadicu za elektroforezu te je u jažice nanešeno po 16 µl uzoraka i 10 µl neobojanog proteinskog standarda, *PageRuler Unstained Protein Ladder*. Ukoliko je rađena analiza Western blot korišteno je 10 µl obojanog proteinskog standarda, *PageRuler Plus Prestained*. Denaturirajuća gel elektroforeza je provedena u 1x SDS puferu za

elektroforezu pri naponu od 120 V do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje, a nakon toga 150 V.

2.2.4.7. Bojanje gela

Po završetku elektroforeze proteini su vizualizirani bojanjem gela u boji Coomassie zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja, nakon čega su hlađeni 5 minuta uz laganu trešnju. Odbojavanje gela je izvršeno dodatkom otopine za odbojavanje, u kojoj su gelovi zagrijavani do vrenja i potom trešeni 5 minuta, što je ponovljeno dva puta. Nakon toga gelovi su isprani destiliranom vodom.

2.2.4.8. Prijenos proteina na membranu (metoda Western blot)

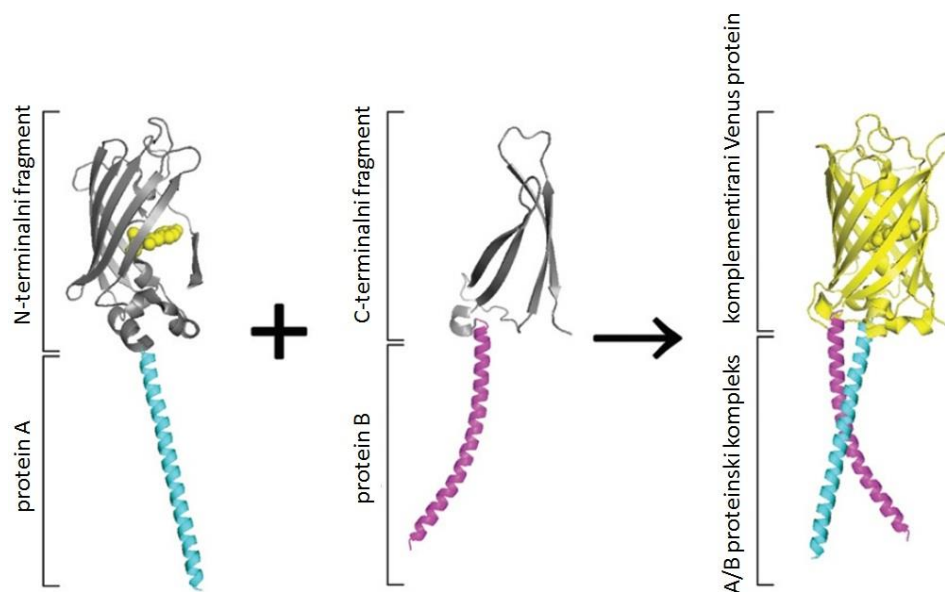
Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su iz gela prenešeni na nitroceluloznu membranu mokrim elektro-prijenosom. U puferu za prijenos je pripremljen "sendvič" koji se sastoji od plastičnog okvira, spužvi, filter papira, gela i nitrocelulozne membrane. Prijenos je omogućen električnim poljem napona 100 V u trajanju sat vremena. Po završetku membrana s prenešenim proteinima je blokirana 2 sata u 4% BSA pripremljenoj u 1x NCP puferu kako bi se spriječio nespecifično vezanje antitijela. Potom je membrana isprana 3 puta po 5 minuta u 1x NCP puferu te inkubirana preko noći na sobnoj temperaturi uz polaganu trešnju s primarnim antitijelom pripremljenim u 1x NCP puferu (vidi Tablicu 5). Sljedeći dan uklonjeno je primarno antitijelo, membrana je isprana 5 puta po 5 minuta u 1x NCP puferu, a potom inkubirana s odgovarajućim sekundarnim antitijelom 2 sata na sobnoj temperaturi. Upotrebljavana sekundarna antitijela su konjugirana s alkalnom fosfatazom (AP), što omogućuje kasniju vizualizaciju dodatkom supstrata za AP. Nakon inkubacije, membrane su isprane 5 puta po 5 minuta u 1x NCP puferu te potom kratko ekvilibrirane u puferu za razvijanje. Supstrat za alkalnu fosfatazu, BCIP, je korišten kao 0,02% (w/v) u puferu za razvijanje. Dodatkom supstrata membrane se inkubiraju uz trešnju do pojave proteinskih vrpca.

Tablica 5. Optimalna razrjeđenja korištenih primarnih i sekundarnih antitijela u 1x NCP puferu.

antitijelo	omjer
anti – korteksilin I, monoklonsko	1 : 1000
anti – HA, monoklonsko	1 : 1500
Anti – HA, poliklonsko	1 : 800
anti – GFP, monoklonsko	1 : 1000
antitijelo na zečja IgG antitijela proizvedeno u ovci, konjugirano s alkalnom fosfatazom	1 : 1000
antitijelo na mišja IgG antitijela proizvedeno u ovci, konjugirano s alkalnom fosfatazom	1 : 20000

2.2.5. Bimolekularna komplementacija fluorescencije (BiFC)

Bimolekularna komplementacija fluorescencije (engl. *bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) je metoda koja omogućuje detekciju proteinskih interakcija *in vivo*. Spada u testove komplementacije proteinskih fragmenata, koji se zasnivaju na razdvajanju proteina biljega (reporter; fluorescentni protein ili enzim) i fuzioniranju tih dijelova s dva proteina od interesa. U slučaju interakcije proteina od interesa, dijelovi proteina biljega se mogu pravilno sastaviti i rekonstituirati aktivni cijeli protein. BiFC je metoda u kojoj se kao biljeg koristi fluorescentni protein, u našem slučaju korišten je protein Venus (Slika 15). To je verzija žutog fluorescentnog proteina, s uvedenih nekoliko točkastih mutacija koje su omogućile brže sazrijevanje proteina i jači signal. Vektori za bimolekularnu komplementaciju fluorescencije konstruirani su ciljanom mutagenезom (vidi poglavlje 2.2.3.3.) i tehnikama rekombinantne DNA (vidi poglavlje 2.2.3.4.) korištenjem osnovnog vektora pDM304-VC i pomoćnog vektora pDM344-VN. Četiri varijante proteina RasG (wt, S17N, Q61L i G12V) fuzionirane su s N-terminalnim dijelom proteina Venus, koji sadrži prvih 210 aminokiselina tog proteina, a IqgC i mRaf1(RBD) su fuzionirani s dijelom od 28 aminokiselina C-terminalnog kraja proteina. Popis konačnih konstrukata je u Tablici 2, poglavlje 2.2.3.4. Konstrukti koji sadrže VC-mRaf1(RBD) kodirajuću sekvencu su transfecirani u *D. discoideum* soj AX2, a vektori s VC-IqgC sekvencama su transfecirani u soj genetički deficijentan za protein IqgC. Stanice su uzgajane u HL5 mediju s G418 u konačnim koncentracijama 10 µg/ml i 20 µg/ml.



Slika 15. Princip metode BiFC. Na dva proteina od interesa fuzionirani su N-terminalni i C-terminalni dio proteina Venus koji zasebno ne fluoresciraju. Ukoliko su fuzionirani proteini u interakciji, Venus dijelovi su u neposrednoj blizini što omogućuje ostvarivanje interakcija, pravilno smatanje proteina te fluorescenciju rekonstituiranog proteina Venus. Ilustracija ne odražava u ovom istraživanju korištene VN210 i VC210, nego VN155 i VC155 fuzijske konstrukte (prilagođeno prema Kodama i Hu, 2012).

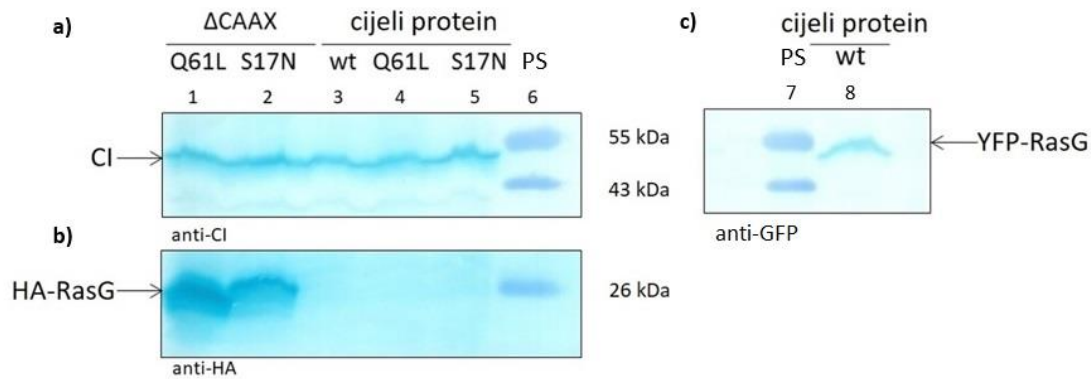
Mikroskopska analiza živih stanica napravljena je na fluorescencijskom konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems). Za mikroskopiranje je uzeto po 1 ml stanične kulture prenešene u plastični kvadratni okvir veličine 12 x 12 milimetara, pričvršćen na pravokutno predmetno stakalce dimenzija 24 x 50 milimetara. Stakalca su pokrivena prozirnim poklopcem te je ispod njih stavljen papir natopljen vodom kako bi stanice bile u vlažnoj atmosferi dok ne adheriraju za podlogu. Tako su ostavljene pola sata na 22°C nakon čega je HL5 medij zamijenjen komercijalnim medijem LoFlo. Medij LoFlo se koristi za fluorescencijsku mikroskopiju kako bi se smanjila autofluorescencija stanica. Time je omogućena mikroskopija stanica u hranjivom mediju te se izbjegava upotreba fosfatnog pufera koji pomaže smanjenju autofluorescencije, ali istovremeno se stanice izgladnjuju. Valna duljina korištena za pobudu Venus fluorofora je 515 nm, a emisija fluorescencije je detektirana u rasponu 525-600 nm uz pomoć hibridnih detektora, koji značajno povećavaju osjetljivost detekcije signala.

3. REZULTATI

3.1. Proteini IqgC i RasG tvore kompleks

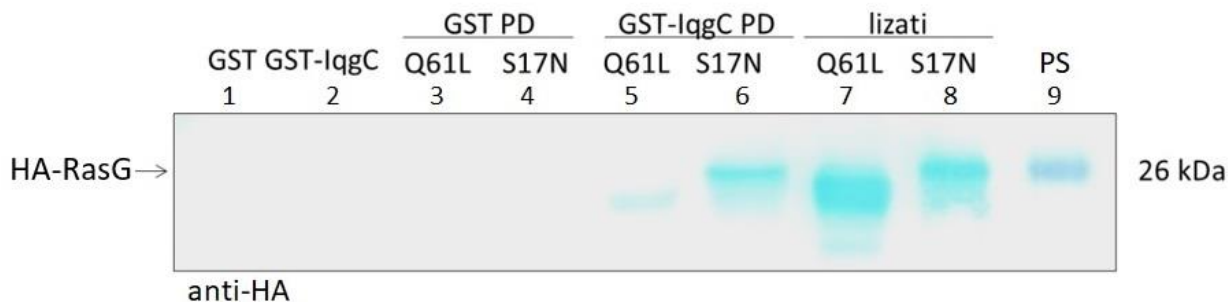
3.1.1. Rekombinantni protein IqgC veže RasG iz staničog lizata

GTPaza RasG je identificirana masenom spektroskopijom u interaktomu proteina IqgC, a kasnije je izravna interakcija s IqgC potvrđena sustavom dva hibrida u kvascu. Stoga smo ovu interakciju odlučili demonstrirati i biokemijskim metodama. Prvo smo napravili *pull-down* proteina RasG iz staničnog lizata preko kolone s rekombinantnim GST-IqgC pročišćenim iz bakterija. S obzirom da je sustavom dva hibrida u kvascu pokazano vezanje proteina IqgC samo na aktivni oblik GTPaze i to, specifično na formu s Q61L, a ne G12V aktivirajućom mutacijom, za test *pull-down* smo koristili AX2 stanice transfecirane vektorima za ekspresiju HA-obilježenog konstitutivno aktivnog (Q61L) i konstitutivno neaktivnog (S17N) RasG. Prije izvođenja samih eksperimenata, testirane su ekspresije varijanti RasG u AX2 stanicama transfeciranim s plazmidima pDM304 koji kodiraju za divlji tip proteina RasG te Q61L i S17N mutante u punoj duljini i bez motiva CAAX, fuzionirani s biljekom HA ili s YFP. $2,5 \times 10^7$ stanica po soju je prikupljeno u eksponencijalnoj fazi rasta i napravljena je analiza metodom Western blot koristeći anti-CI monoklono antitijelo za kontrolu nanošenja uzoraka, poliklono anti-HA antitijelo za detekciju ekspresije RasG varijanti obilježenih HA biljekom i anti-GFP monoklono antitijelo za detekciju proteina obilježenog s YFP. Na Slici 16 je vidljivo da je ekspresija rekombinantnih proteina detektirana samo u stanicama transfeciranim s Δ CAAX varijantama Q61L i S17N mutantnih proteina i divljim tipom RasG obilježenim s YFP. Iz tog razloga odlučeno je da se za *pull-down* eksperimente koriste Δ CAAX varijante RasG u dvije mutirane forme. RasG mutant S17N, koji umjesto serina na poziciji 17 sadrži asparagin, je konstitutivno neaktivna varijanta GTPaze. Naime, S17N mutacija smanjuje afinitet proteina za gvanin-nukleotide, i to prvenstveno za GTP, zbog čega je mutantni protein dominantno u neaktivnom, GDP-vezanom obliku (Feig i Cooper, 1988).



Slika 16. Ekspresija različitih varijanti proteina RasG u *D. discoideum* AX2 stanicama transfeciranim s vektorima za ekspresiju HA-RasG i YFP-RasG analizirana metodom Western blot. **a)** Membrana inkubirana s anti-Cl antitijelom pokazuje ujednačene količine svih uzoraka korištenih u testu (uzorci u jažicama 1 do 5); **b)** Membrana inkubirana s anti-HA antitijelom pokazuje ekspresiju rekombinantnih proteina samo u stanicama transfeciranim s Δ CAAX varijantama mutiranih proteina RasG (jažice 1 i 2); **c)** Membrana inkubirana s anti-GFP antitijelom pokazuje ekspresiju protein RasG divljeg tipa pune duljine fuzioniranim s YFP (uzorak u jažici 8). Molekularne mase se odnose na vrpce proteinskog standarda (PS, jažice 6 i 7).

AX2 stanice transfecirane s pDM304_HA-RasG(Q61L) Δ CAAX i pDM304_HA-RasG(S17N) Δ CAAX konstruktima su uzgojene do srednje ekspanzionalne faze rasta te je prikupljeno 6×10^7 stanica po soju koje su lizirane u puferu za lizu stanica. Stanični lizati su inkubirani sa sefarnim kuglicama s vezanim proteinima GST-IqgC i GST. Potonja je korištena kao kontrola nespecifičnog vezanja proteina na sam GST. Količina rekombinantnih proteina HA-RasG u uzorcima nakon pokusa *pull-down* određena je metodom Western blot s anti-HA monoklonskim antitijelom. Rezultat je prikazan na Slici 17. Ekspresija rekombinantnih proteina je bila zadovoljavajuća, što je vidljivo iz staničnih lizata. Iznenadujuće, testom *pull-down* pokazana je snažna interakcija konstitutivno neaktivnog mutanta RasG s proteinom IqgC, mnogo jača nego s konstitutivno aktivnom varijantom Q61L.



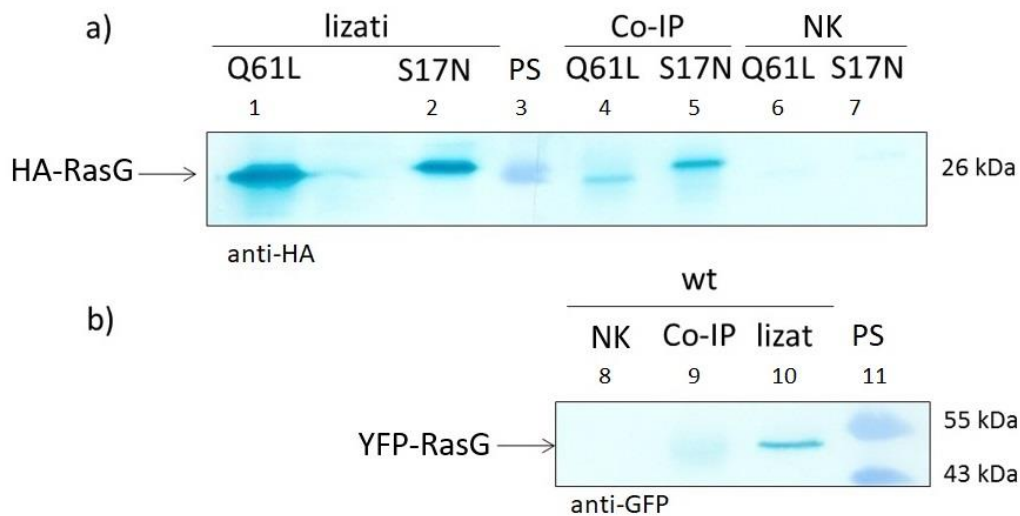
Slika 17. Analiza interakcije proteina lqgC i varijanti RasG metodom *pull-down* i zatim metodom Western blot s monoklonskim anti-HA antitijelom. Lizati stanica *D. discoideum* AX2 transformiranih s vektorima s kojih se eksprimiraju Q61L i S17N varijante proteina RasG inkubirani su s pročišćenim proteinom GST-lqgC. U jažicama 1 i 2 prikazan je rezultat testa *pull-down* s obje sefaroze (s vezanim proteinima GST i GST-lqgC) inkubirane s čistim puferom za lizu stanica kako bi se pokazalo da se antitijelo ne veže nespecifično za neku od komponenata kolona; jažice 3 i 4 prikazuju kontrolni test *pull-down* u kojem su lizati stanica inkubirani s glutation-sefarozom na koju je vezan GST kako bi se pokazalo da se protein Ras ne veže na GST ili sefarozu; jažice 5 i 6 prikazuju *pull-down* u kojem su lizati stanica inkubirani s glutation-sefarozom na koju je vezan GST-lqgC; u jažicama 7 i 8 je detektirana ekspresija RasG Q61L i S17N u staničnim lizatima. Molekularna masa se odnosi na vrpce proteinskog standarda (PS, jažica 9). Prikazana je reprezentativna slika četiri neovisna eksperimenta.

3.1.2. Endogeni protein lqgC veže RasG iz staničnog lizata

Nakon što smo pokazali da rekombinantni lqgC uspješno povlači RasG iz staničnog lizata, zanimalo nas je da li i endogeni lqgC stvara kompleks s RasG. U tu svrhu smo koristili metodu ko-imunoprecipitacije. Zrnca s proteinom A su inkubirana s anti-lqgC anti-serumom i s lizatima stanica koje eksprimiraju Δ CAAX varijante Q61L i S17N mutantnog proteina RasG obilježenog s HA biljgom, isto kao i u testu *pull-down*. S obzirom da se YFP-RasG(wt) uspješno eksprimirao u stanicama (Slika 16), ovdje smo odlučili testirati i divlji tip proteina.

Prikupljeno je 6×10^7 stanica po soju čiji su lizati inkubirani sa zncima proteina A i anti-lqgC anti-serumom. Kao negativna kontrola su korišteni stanični lizati inkubirani s proteinom A bez anti-seruma. Za analize metodom Western blot su korištena anti-HA i anti-GFP monoklonska antitijela. Ko-imunoprecipitacija je dala isti rezultat kao i test *pull-down* (Slika 18). Konstitutivno neaktivna varijanta RasG je ponovno pokazala snažnu interakciju s proteinom lqgC, dok Q61L interagira nešto slabije. Primjećena je i vrlo slaba vrpca kod uzorka ko-imunoprecipitacije iz lizata stanica koje eksprimiraju divlji tip RasG, no i ekspresija samog proteina u stanicama je bila niža nego ekspresija Q61L i S17N varijanti RasG.

Negativne kontrole pokazuju da se anti-HA i anti-YFP antitijela ne vezuju nespecifično na zrnca s proteinom A (NK).

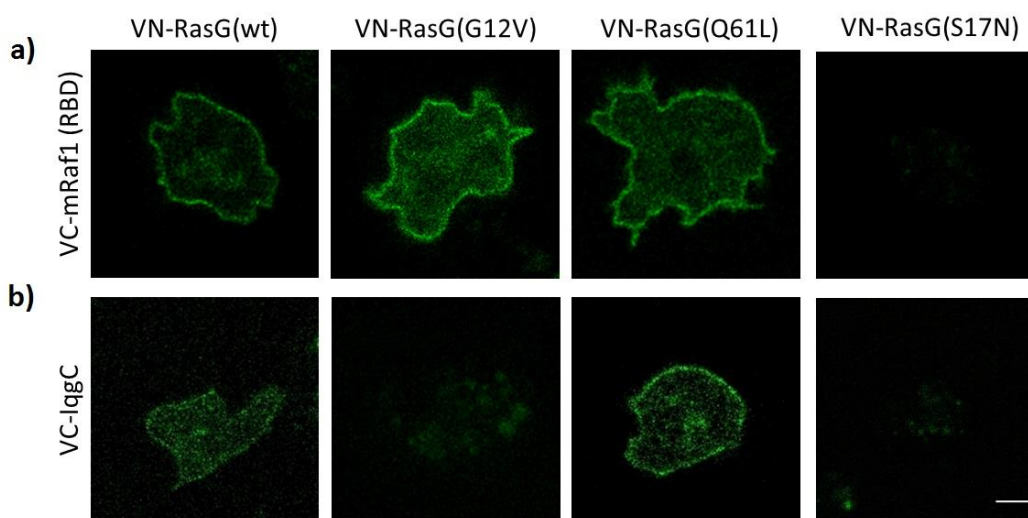


Slika 18. Analiza interakcije proteina IqgC i varijanti proteina RasG metodom ko-immunoprecipitacija i zatim Western blot. **a)** Membrana inkubirana s anti-HA antitijelom prikazuje ekspresiju Q61L i S17N varijanti RasG u jažicama 1 i 2; u jažicama 4 i 5 su detektirani Q61L i S17N proteini RasG iz uzorka lizata stanica inkubiranih s proteinom A i anti-IqgC anti-serumom (Co-IP); u jažicama 6 i 7 su negativne kontrole u kojima su lizati stanica bili inkubirani samo s proteinom A; **b)** Membrana inkubirana s anti-GFP antitijelom za detekciju RasG(wt) obilježenog s biljegom YFP. U jažici 8 je negativna kontrola; u jažici 9 uzorak ko-immunoprecipitacije; u jažici 10 protein RasG(wt) detektiran u lizatu stanica. Molekularne mase se odnose na vrpce proteinskog standarda (PS, jažice 3 i 11).

3.2. Proteini IqgC i RasG izravno interagiraju u živim stanicama

Iako su biokemijske metode *in vitro* potvrdile interakciju proteina IqgC i RasG, rezultati su nekonzistentni s rezultatima sustava dva hibrida u kvascu. Naime, sustav dva hibrida u kvascu je pokazao da IqgC reagira isključivo s konstitutivno aktivnom varijantom RasG(Q61L), dok su test *pull-down* i ko-immunoprecipitacija ne samo pokazali interakciju s oba oblika GTPaze, već potpuno neočekivano, dali snažniju interakciju s konstitutivno neaktivnom varijantom RasG. Zbog toga smo se odlučili na dodatnu metodu provjere proteinske interakcije, bimolekularnu komplementaciju fluorescencije kojom se testiraju izravne interakcije u živim stanicama. Koristili smo N-terminalni dio fluorescentnog proteina Venus (VN) fuzioniran s proteinom IqgC i C-terminalni dio (VC) fuzioniran s četiri varijante RasG (wt, G12V, S17N, Q61L). U ovom testu smo koristili i mutant G12V koji u sustavu dva

hibrida u kvascu nije reagirao s IqgC. Kao pozitivnu kontrolu za test BiFC koristili smo Ras-vezujuću domenu iz mišjeg proteina Raf1, mRaf1(RBD) za koju se zna da veže isključivo aktivne, GTP-vezane oblike GTPaza Ras (de Rooji i Bos, 1997) te je u *Dictyostelium* stanicama već korištena kao proba za detekciju aktivnih oblika proteina RasG i RasB (Kae i sur., 2004). Vektori za koekspresiju obje fuzije s fragmentima proteina Venus transfecirani su u AX2 stanice, u slučaju mRaf1(RBD), i *iqgC* stanice, u slučaju IqgC kako bi se izbjegle interakcije s endogenim proteinom. Transformanti su selektirani u HL5 mediju s 10 i 20 µg/ml G418 te su mikroskopirani tijekom tjedan dana dok je ekspresija rekombinantnih proteina bila zadovoljavajuća. Na Slici 19 vidljiva je fluorescencija u korteksu nastala rekonstituiranjem dijelova proteina Venus u funkcionalan fluorescentni protein, do koje dolazi zbog interakcije svih aktivnih varijanti proteina RasG; divlji tip, Q61L i G12V, s mRaf1_RBD. Fluorescencija nije opažena u stanicama koje koeksprimiraju RBD i neaktivnu varijantu proteina RasG, S17N, što znači da ne dolazi do spontanog spajanja Venus dijelova. U stanicama koje koeksprimiraju VC-IqgC i VN-RasG konstrukte do komplementacije fluorescencije u korteksu dolazi samo s divljim tipom proteina RasG i konstitutivno aktivnim RasG(Q61L). Fluorescentni signal u korteksu nikad nije primjećen u slučaju G12V i S17N mutanata. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima sustava dva hibrida u kvascu te potvrđuju izravnu interakciju proteina IqgC i RasG u živim stanicama, ali i preferencijalni afinitet proteina IqgC prema aktivnoj formi RasG(Q61L).



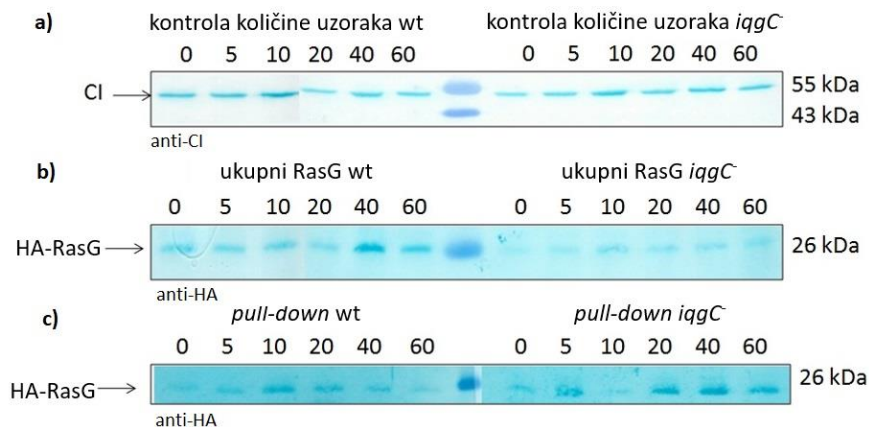
Slika 19. Interakcije proteina IqgC i varijanti proteina Ras testirane metodom bimolekularne komplementacije fluorescencije i analizirane konfokalnom mikroskopijom. **a)** Komplementacija fluorescencije u stanicama soja AX2 koje koeksprimiraju VC-mRaf1(RBD) i varijante proteina RasG obilježene N-terminalnim dijelom proteina Venus (divlji tip proteina, konstitutivno aktivni mutanti G12V i Q61L te neaktivni mutant S17N); **b)** Komplementacija fluorescencije u stanicama *iqgC*-transfeciranim s VC-IqgC i istim varijantama proteina RasG obilježenim N-terminalnim dijelom proteina Venus. Oznaka veličine prikazuje 5 μ m.

3.3. Test aktivacije proteina RasG sugerira povišenu aktivnost RasG u *iqgC* stanicama

Kako smo pokazali da IqgC izravno reagira s aktivnim oblikom RasG, i to preferencijalno s mutantom koji ima Q61L aktivirajuću mutaciju, a ne G12V, te da ima očuvane argininske ostatke unutar motiva FLR i argininskog prsta, pretpostavili smo da bi ovaj protein srodan proteinima IQGAP mogao biti istinski RasGAP.

Kako bismo istražili djeluje li IqgC kao RasGAP prema proteinu RasG, isprva smo se odlučili za test aktivacije proteina RasG. Naime, ako je IqgC negativni regulator RasG u stanici, u stanicama deficitarnim za IqgC razina aktivnog oblika RasG bi mogla biti povišena. Jednako tako je moguće da bi aktivacija RasG u odgovoru na stimulaciju folnom kiselinom mogla biti snažnija i produljena. Proteini Ras imaju važnu ulogu u kemotaksiji, te je pokazano kako RasG sudjeluje u staničnom odgovoru na folnu kiselinu tijekom vegetativne faze rasta i tijekom kemotaksije prema cAMP-u (Bolourani i sur., 2010). S lizatima vegetativnih AX2 i *iqgC* stanica koje eksprimiraju HA-RasG(wt) je napravljen test *pull-down* preko domene mRaf1(RBD) te su metodom Western blot s anti-HA antitijelom uspoređene bazalne razine

aktivnog proteina RasG i trajanje aktivacije RasG nakon stimulacije stanica folnom kiselinom u navedena dva soja. Na žalost, nismo uspjeli postići zadovoljavajuće razine ekspresije proteina RasG(wt) u stanicama da bismo eksperiment mogli reproducibilno ponoviti. Ipak, rezultati jednog od pokušaja sugeriraju da odsutnost proteina IqgC povećava razinu aktivnog RasG u stanicama u mirovanju i nakon stimulacije folnom kiselinom (Slika 20).

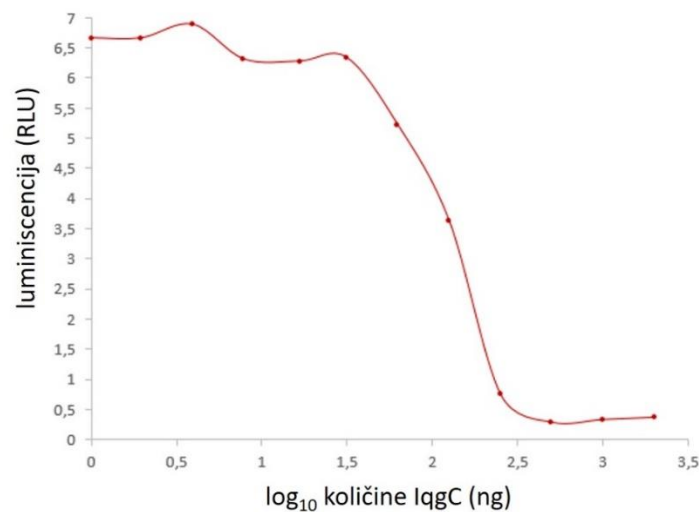


Slika 20. Test aktivacije proteina RasG u stanicama AX2 (wt) i *iqqC* stimuliranim s 50 μ M folne kiseline nakon čega je napravljen test *pull-down* i zatim metoda Western blot. Uzorak stanica 0 je prikupljen prije stimulacije, za određivanje bazalne razine aktivnog RasG, nakon čega je stanicama dodana folna kiselina i uzorci su prikupljeni u vremenskim točkama 5 do 60 sekundi. **a)** Membrana inkubirana s anti-Cl antitijelom pokazuje ekspresiju proteina korteksilina u svim uzorcima i korištena je kao kontrola količine uzoraka; **b)** Membrana inkubirana s anti-HA antitijelom pokazuje ekspresiju ukupnog proteina RasG u uzorcima, aktivnog i neaktivnog oblika; **c)** Membrana inkubirana s anti-HA antitijelom pokazuje razinu aktivnog proteina RasG vezanog na mRaf1(RBD) u testu *pull-down*.

Ekspresija rekombinantnog proteina HA-RasG je bila dosta niska u korištenim stanicama, osobito u soju *iqqC*, i nije bila posve ujednačena (Slika 20b) iako anti-Cl blot pokazuje da su u vremenskim točkama prikupljane jednake količine stanica (Slika 20a). Shodno tome signali u testu *pull-down* su slabi (Slika 20c). Ipak, iako je ukupni HA-RasG slabije eksprimiran u *iqqC* stanicama, razine aktivnog RasG su više u *iqqC* mutantu, kako u nestimuliranim stanicama, što ukazuje na povišenu bazalnu razinu u odsutnosti proteina IqgC, tako i nakon aktivacije folnom kiselinom. U stanicama soja AX2 (divlji tip) se vidi maksimum aktivacije RasG u prvih 10 sekundi od dodatka folne kiseline nakon čega aktivacija opada. Nasuprot tome, soj deficijentan za IqgC pokazuje vrhunac aktivacije u 5 sekundi, nakon čega slijedi pad i ponovni rast razine aktivnog RasG u 20 sekundi te se visoka razina zadržava sve do posljednje vremenske točke od 60 sekundi.

3.4. IqgC stimulira GTPaznu aktivnost humanog proteina H-Ras i *Dictyostelium* proteina RasG

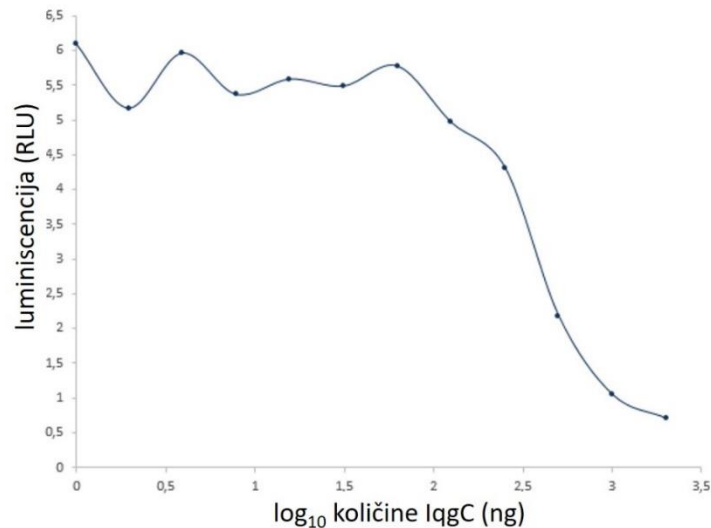
S obzirom da smo s testom aktivacije proteina Ras imali tehničkih problema, odlučili smo aktivnost GAP proteina IqgC testirati izravno biokemijski. U tu svrhu smo koristili komercijalni komplet prema uputama proizvođača. Sposobnost proteina IqgC da potiče hidrolizu GTP-a kataliziranu GTPazom je testirana s humanom GTPazom H-Ras i *Dictyostelium* GTPazom RasG, koje su međusobno 68% identične u aminokiselinskoj sekvenci. IqgC je titriran uz konstantnu koncentraciju GTPaze H-Ras tako da je GTPazna reakcija sadržavala 1 μ M H-Ras, 0,5 mM DTT te IqgC u serijskim razrjeđenjima u rasponu od 2000 ng do 1 ng (vidi 2.2.4.4.). Rezultati su pokazali pad luminiscencije s porastom količine proteina IqgC u reakciji (Slika 21). Prvih nekoliko najnižih koncentracija IqgC ne pokazuje značajnu promjenu luminiscencije, no prelaskom količine od oko 60 ng proteina IqgC u reakciji, pad luminiscencije je drastičan. U posljednjim točkama (500 – 2000 ng) je već došlo do zasićenja te daljnje povećanje količine proteina IqgC ne dovodi do značajnih promjena u luminiscenciji.



Slika 21. Određivanje aktivnosti GAP proteina IqgC prema ljudskom H-Ras mjerenjem luminiscencije. Ispitivani protein IqgC je titriran u prisutnosti 1 μ M H-Ras i po završetku GTPazne reakcije, prevođenja nehidroliziranog GTP-a u ATP i dodatka reagensa za detekciju izmjerena je luminiscencija uzoraka. Luminiscencija je izražena u relativnim jedinicama (engl. *relative luminescence unit*, RLU). Prikazan je pad luminiscencije u uzorcima ovisan o količini proteina IqgC u GTPaznoj reakciji.

Nakon što smo uspješno demonstrirali aktivnost RasGAP proteina IqgC prema humanoj GTPazi H-Ras, odlučili smo ispitati molekularnu funkciju IqgC i prema svojem

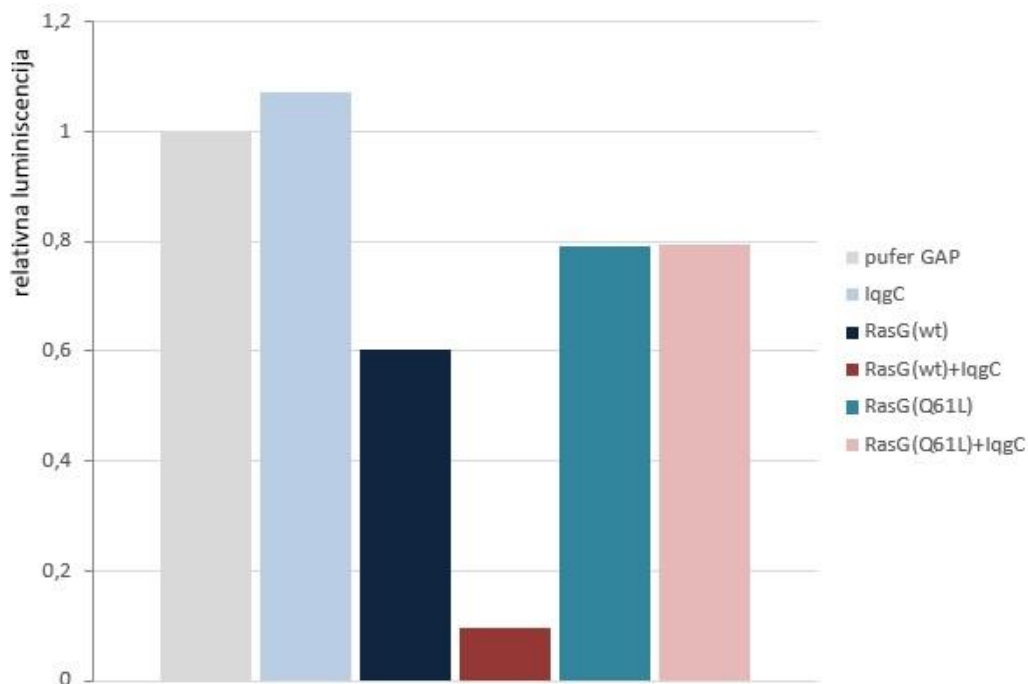
endogenom partneru, *Dictyostelium* GTPazi RasG. U ovom slučaju smo, umjesto pročišćenog proteina, koristili glutation-sefarozu sa svježe vezanim rekombinantnim proteinom GST-RasG(wt) pri čemu je IqgC ponovo titriran, u rasponu od 2 µg do 1 ng, uz konstantnu količinu zrnaca s vezanom GTPazom. Nakon mjerenja luminiscencije dobivena je krivulja vrlo slična onoj s humanom GTPazom što pokazuje da je IqgC RasGAP za *Dictyostelium* GTPazu RasG (Slika 22).



Slika 22. Određivanje aktivnosti GAP proteina IqgC prema *Dictyostelium* proteinu RasG mjerenjem luminiscencije. Ispitivani protein IqgC je titriran u prisutnosti 30 µl glutation-sefaroze s vezanim proteinom RasG(wt). Po završetku GTPazne reakcije nehidrolizirani GTP je preveden u ATP, dodan je reagens za detekciju i izmjerena je luminiscencija. Luminiscencija je izražena u relativnim jedinicama. Prikazan je pad luminiscencije ovisan o količini proteina IqgC prisutnog u GTPaznoj reakciji.

Nakon što smo iz titracijskih krivulja pokazali da količina od 1000 ng proteina IqgC u GTPaznoj reakciji uzrokuje gotovo maksimalno smanjenje luminiscencije, odlučili smo provjeriti da li IqgC u toj koncentraciji ima utjecaja na GTPaznu aktivnost konstitutivno aktivne forme RasG(Q61L), koja bi trebala biti neosjetljiva na aktivnost proteina RasGAP (Gideon i sur., 1992). I zaista, kada smo 1000 ng IqgC pomiješali s glutation-sefarozom na kojoj je bio svježe purificiran GST-RasG(Q61L), pod jednakim uvjetima kao i s GST-RasG(wt), nije bilo smanjenja luminiscencije (Slika 23). Također smo izmjerili GTPaznu aktivnost same GTPaze RasG, ali i luminiscenciju samog pufera GAP te pufera GAP u kojem je prisutan sam IqgC. Sama GTPaza divljeg tipa RasG pokazuje smanjenje luminiscencije od preko 40% u odnosu na pufer, što je posljedica njezine intrinzične GTPazne aktivnosti. U prisutnosti proteina IqgC vidljiv je daljnji pad luminiscencije, što je dokaz aktivnosti RasGAP proteina

IqgC. U GTPaznoj reakciji s konstitutivno aktivnom GTPazom RasG(Q61L) također je izmjeren pad luminiscencije, za oko 20%, koji se nije dalje mijenjao dodatkom proteina IqgC. Kontrola bez GTPaze (IqgC) ne pokazuje pad luminiscencije u odnosu na pufer, što znači da IqgC ne posjeduje GTPaznu aktivnost. Na Slici 23 je prikazan reprezentativan pokus. Za uzorke pufera GAP, samog proteina IqgC u puferu GAP, samog proteina RasG(Q61L) u puferu GAP i RasG(Q61L) s 1000 ng IqgC su izračunate standardne devijacije, koje za prva dva uzorka iznose 10%, za sam protein RasG(Q61L) 0,5% i protein RasG(Q61L) s IqgC 5,2%. Na žalost za uzorke RasG(wt) u puferu GAP i RasG(wt) s 1000 ng IqgC do ovog trenutka nismo prikupili dovoljno podataka za izračun standardne devijacije stoga test planiramo još jednom ponoviti za potpunu statističku obradu rezultata.



Slika 23. Određivanje aktivnosti GAP proteina IqgC prema *Dictyostelium* proteinima RasG divljeg tipa i mutanta Q61L korištenjem testa aktivnosti GAP. Prikazana je relativna luminiscencija uzoraka RasG(wt) i RasG(Q61L) nakon odvijanja GTPazne reakcije u prisutnosti 1000 ng IqgC te luminiscencija kontrolnih uzoraka; pufer GAP, protein IqgC u puferu GAP, same GTPaze RasG(wt) i RasG(Q61L) u puferu GAP. Luminiscencija čistog pufera GAP je namještena na 1 i prema njoj su izražene ostale vrijednosti.

4. RASPRAVA

U ovom istraživanju smo htjeli potvrditi i dodatno okarakterizirati interakciju proteina IqgC i RasG iz amebe *D. discoideum*. Protein IqgC je prema aminokiselinskoj sekvenci svrstan u proteine srodne proteinima IQGAP, međutim preliminarni rezultati dobiveni u grupi prof. Webera su upućivali na to da bi protein IqgC mogao biti RasGAP, odnosno da može poticati GTPaznu aktivnost malih GTPaza Ras. Naime, iako proteini IQGAP posjeduju domenu GRD srodnu katalitičkoj domeni proteina RasGAP, ne posjeduju aktivnost RasGAP (Mateer i sur., 2003). Domene GRD proteina IQGAP1 i IQGAP2 vežu aktivne oblike GTPaza Cdc42 i Rac1, ali ne vežu RhoA te u pravilu ni Ras (Kuroda i sur., 1996). Do sada istraženi *D. discoideum* proteini srodni proteinima IQGAP, DGAP1 i GAPA, također ne ostvaruju interakciju s proteinima Ras niti pokazuju aktivnost RasGAP, što je posljedica supstitucije ključnih aminokiselina u motivu FLR i argininskom prstu (Faix i sur., 1998). Kao i proteini IQGAP sisavaca, DGAP1 i GAPA vežu male GTPaze obitelji Rho (Faix i sur., 1998; Faix i sur., 2001).

Analiza aminokiselinske sekvence proteina IqgC je pokazala da, za razliku od DGAP1 i GAPA, IqgC posjeduje očuvane arginine u motivu FLR i u argininskom prstu, što upućuje na moguću očuvanu aktivnost GAP. Osim toga, sustavom dva hibrida u kvascu je pokazana direktna interakcija proteina IqgC s malom GTPazom RasG u Q61L formi što dodatno osnažuje ovu hipotezu. Prilikom testiranja interakcija malih GTPaza s potencijalnim partnerima najčešće se koriste mutirani oblici GTPaza G12V, Q61L i S17N (Filić i sur., 2012; Junemann i sur., 2016). S obzirom da upotreba divljeg tipa GTPaze ne može razlikovati veže li testirani interaktor samo aktivni (GTP-vezani), samo neaktivni (GDP-vezani) ili oba oblika GTPaze u stanici, koriste se GTPaze s promijenjenom aminokiselinom kod kojih u aktivnom mjestu GTPaze ostaje zarobljen GTP (G12V, Q61L) ili GDP (S17N). Ispitivanje interakcije potencijalnog proteina interaktora i mutiranih oblika GTPaze može dati uvid u funkciju tog proteina. Naime, efektori malih GTPaza u stanici ostvaruju interakciju samo s aktivnim oblikom GTPaze, što znači da u biokemijskim testovima vežu aktivne mutante (Q61L i G12V). Proteini regulatori GTPaza također vežu samo jednu formu GTPaze u stanici; proteini GEF vežu samo neaktivni oblik (S17N), dok proteini GAP vežu aktivni oblik (samo Q61L). Zanimljivo, upravo je za proteine IQGAP pokazano da mogu vezati i više od jednog oblika

GTPaze te vjerojatno djelovati kao njihovi sekvestratori s stanicama (Grohmanova i sur., 2004; Filić i sur., 2014).

U prvom dijelu istraživanja cilj je bio biokemijskim metodama potvrditi interakciju proteina RasG i IqgC. Rezultati testa *pull-down* su pokazali da rekombinantni protein GST-IqgC, pročišćen iz bakterije *E. coli*, stvara kompleks s proteinom RasG, ekstrakromosomalno eksprimiranim u stanicama *D. discoideum*. Ko-imunoprecipitacijom je pokazano da i endogeni protein IqgC stvara kompleks s RasG iz staničnog lizata. Obje metode potvrdile su interakciju s RasG(Q61L), dok je ko-imunoprecipitacijom pokazana i interakcija s divljim tipom proteina, RasG(wt), iako značajno slabija nego s Q61L mutantom (Slika 18). To se može objasniti s nekoliko činjenica. Naime, divlji tip GTPaze u stanicama je smjesa aktivnog i neaktivnog oblika, s tim da je poznato da razina aktivnog, GTP-vezanog proteina Ras u stanicama u mirovanju rijetko prelazi 10% ukupne količine (Gibbs i sur., 1990; Hennig i sur., 2015). Na dalje, pokazano je da RasGAP s većim afinitetom veže Q61L mutant nego divlji tip proteina (Gideon i sur., 1992). Konačno, razina ekspresije divljeg tipa RasG u našim eksperimentima je bila značajno niža od ekspresije mutiranih varijanti proteina, usprkos istim uvjetima uzgoja i selekcijskom pritisku, što rezultira dodatno sniženom, ionako niskom razinom GTP-vezanog proteina Ras u stanicama. Ono što je u našim rezultatima iznenađujuće je snažna interakcija proteina IqgC s mutantom S17N, što nije u skladu s rezultatima sustava dva hibrida u kvascu, koji nije pokazao interakciju s konstitutivno neaktivnom varijantom RasG. S obzirom na oprečne rezultate ovih metoda, interakciju proteina IqgC s RasG odlučili smo ispitati u živim stanicama korištenjem bimolekularne komplementacije fluorescencije. Osim već korištenih varijanti RasG, u ovaj test je dodan i mutant G12V. Kao pozitivna kontrola upotrijebljena je Ras-vezujuća domena iz mišje kinaze Raf1, efektorne molekule aktivnog proteina Ras, za koju je pokazano da je dobra proba i za aktivni *Dictyostelium* RasG (Vojtek i sur., 1993; Kae i sur., 2004).

Ohashi i suradnici su testirali velik broj kombinacija N-terminalnih i C-terminalnih dijelova proteina Venus te su pokazali da su optimalni dijelovi proteina Venus za potrebe bimolekularne komplementacije fluorescencije nastali razdvajanjem nakon 210. aminokiseline (Ohashi i sur., 2012). Dobiveni N-terminalni (aminokiseline 1 – 210) i C-terminalni (aminokiseline 211 – 238) dijelovi pokazali su visoku specifičnost pri detekciji različitih proteinskih interakcija, uključujući i onu između H-Ras i Raf1(RBD), bez spontanog

spajanja proteina Venus, to jest lažno pozitivnih rezultata. Iz tih razloga, odlučili smo u ovom radu koristiti upravo te VN i VC dijelove proteina Venus fuzionirane na N-terminalne krajeve proteina od interesa. Kodirajuće sekvence VN i VC su proizvedene sintetski s kodonima prilagođenim upotrebi kodona u organizmu *D. discoideum* kako bi se postigla optimalna ekspresija u stanicama (Junemann i sur., 2016). U *D. discoideum* stanicama divljeg tipa transfeciranim s vektorima s kojih se koeksprimiraju oba rekombinantna proteina; VC fuzioniran s mRaf1(RBD) i VN fuzioniran na jednu od četiri varijante RasG (wt, G12V, S17N, Q61L), do komplementacije fluorescencije dolazi s GTPazom divljeg tipa i obje konstitutivno aktivne varijante (Slika 19). U stanicama koje uz VC-mRaf1(RBD) koeksprimiraju neaktivnu varijantu GTPaze, fluorescentni signal nikad nije primjećen. Ovi rezultati su u skladu s literaturom čime smo potvrdili da se metoda BiFC može koristiti za detekciju direktnih proteinskih interakcija u stanicama amebe *Dictyostelium* i da upotrijebljeni dijelovi proteina Venus ne daju lažno pozitivne rezultate (Junemann i sur., 2016; Ohashi i sur., 2012). Za testiranje interakcije RasG i IqgC, korištene su *iqgC* stanice kako bi se izbjegle nepoželjne interakcije endogenog proteina IqgC s VN-RasG. Stanice u kojima je VC-IqgC koeksprimiran s proteinima RasG(Q61L) i RasG(wt) fuzioniranim na VN pokazale su komplementaciju fluorescencije. Fluorescencija nastala rekonstituiranjem proteina Venus bila je u svim slučajevima prisutna na staničnom korteksu što je očekivano s obzirom da su u testu BiFC korištene varijante RasG pune dužine što omogućuje umetanje GTPaze i cijelog kompleksa u staničnu membranu. U stanicama koje koeksprimiraju VC-IqgC s VN-RasG(G12V) ili VN-RasG(S17N) nikad nije primjećen fluorescentni signal. Ovi rezultati potvrđuju afinitet proteina IqgC prema aktivnom obliku GTPaze RasG u živim stanicama i u potpunosti su u skladu s rezultatima sustava dva hibrida u kvascu.

Međutim, ostaje vrlo zbunjujuć rezultat *in vitro* testova sa staničnim lizatima koji pokazuju veći afinitet proteina IqgC prema konstitutivno neaktivnom mutantu RasG. U pokušaju da razjasnimo ovu kontradikciju, važno je naglasiti da mutant S17N nije u GDP obliku u svim uvjetima. Dok divlji tip proteina Ras s gotovo jednakim afinitetom veže nukleotide GTP i GDP, mutacija S17N uzrokuje pad afiniteta prema oba nukleotida, ali puno drastičniji prema GTP-u (Grand i Owen, 1991; Nassar i sur., 2010). Zbog toga je ovaj mutant dominantno u GDP obliku, ali može vezati i GTP (Farnsworth i Feigh, 1991; Feigh i Cooper, 1988). Moguće je da RasG(S17N) prisutan u suvišku, zbog prekomjerne ekspresije u stanici,

veže sav dostupan GDP, čija je koncentracija ionako barem desetak puta manja od koncentracije GTP-a. Ovo otvara mogućnost da je u metodama *pull-down* i koimunoprecipitacija u kojima smo detektirali jaku ekspresiju mutanta S17N ovaj protein bio prisutan i u GTP obliku te ga je stoga IqgC prepoznao i vezao. S druge strane, razine ekspresije rekombinantnih proteina u testu BiFC općenito su bile razmjerno niske zbog čega pretpostavljamo da je mutant S17N bio prisutan samo u GDP formi i zbog toga nije vezao IqgC. U literaturi nismo pronašli podatke o interakciji mutanta S17N i proteina GAP, no za sličan mutant ljudskog proteina H-Ras, S17A je pokazano da veže protein GAP, s otprilike 12 puta manjim afinitetom od divljeg tipa proteina (John i sur., 1993).

Nakon potvrde da protein IqgC ostvaruje direktnu interakciju s GTPazom RasG, i to preferencijalno s divljim tipom i mutantom Q61L u živim stanicama, ostalo je ispitati pokazuje li ovaj srodnik proteina IQGAP aktivnost GAP prema GTPazi RasG. U tu svrhu smo se najprije odlučili za neizravan način demonstracije aktivnosti RasGAP, test aktivacije proteina RasG, kojim smo htjeli odrediti razinu aktivnog RasG u stanicama u mirovanju te nakon stimulacije folnom kiselinom. RasG ima važnu ulogu u kemotaksiji te do njegove aktivacije dolazi kod stimulacije vegetativnih stanica folnom kiselinom, ali i agregacijski kompetentnih stanica stimuliranih cAMP-om (Bolourani i sur., 2006; Bolourani i sur., 2010). To nam je omogućilo da koristimo protokol za analizu aktivacije proteina Ras u odgovoru na cAMP koji smo prilagodili za stimulaciju vegetativnih stanica folnom kiselinom (Cai i sur., 2012; ovaj rad). S obzirom na našu hipotezu da je IqgC GAP za RasG, pretpostavili smo da bi bazalna razina aktivnog RasG mogla biti povišena u stanicama deficitarnim za IqgC. Jednako tako, pretpostavljamo i da bi aktivacija RasG potaknuta stimulacijom stanica folnom kiselinom mogla biti pojačana u odsutnosti proteina IqgC ako je on negativni regulator RasG. Zhang i suradnici su na ovaj način pokazali da protein NfaA djeluje kao negativni regulator proteina RasG i RasB tijekom kemotaksije i citokineze (Zhang i sur., 2008). U stanicama deficitarnim za ovaj RasGAP, bazalne razine aktivnog RasG i RasB su bile povišene u odnosu na stanice divljeg tipa, te je nakon stimulacije cAMP-om aktivnost ovih proteina Ras bila produljena u odnosu na stanice koje eksprimiraju protein NfaA. Izvedba testa aktivacije proteina Ras u našem radu nije bila zadovoljavajuća na tehničkoj razini zbog čega nismo bili u mogućnosti reproducibilno ponoviti test što bi omogućilo izvođenje konačnih zaključaka. Glavni problem u ovim eksperimentima je bila vrlo niska i nekonzistentna razina ekspresije

proteina HA-RasG(wt) u stanicama oba soja, dok je u nekoliko navrata uopće nismo uspjeli detektirati. Test u budućnosti planiramo ponoviti s pojačanim selekcijskim pritiskom na transfektante za koji se nadamo da bi mogao pridonijeti boljoj ekspresiji rekombinantnih proteina s vektora. Do sada smo već koristili dvostruko veću koncentraciju G418 od one korištene u metodama *pull-down* i ko-immunoprecipitacija (20 µg/ml vs 10 µg/ml), međutim pokušat ćemo koristiti i višu koncentraciju G418 s obzirom da je pokazano da stanice *D. discoideum* mogu rasti i u mnogo višim koncentracijama antibiotika, čak do 100 µg/ml (Swier i sur., 2014).

Iako test aktivacije proteina Ras ukazuje na povišenu razinu aktivnog oblika RasG u stanicama u mirovanju, kao i na produljenu aktivaciju RasG nakon stimulacije folnom kiselinom u odsutnosti proteina IqgC, potencijalnu aktivnost GAP proteina IqgC odlučili smo ispitati na izravan način pomoću pročišćenih proteina *in vitro*. Testirali smo aktivnost GAP proteina IqgC prema ljudskom proteinu H-Ras, koji je 68% identičan *D. discoideum* proteinu RasG. Zbog srodnosti ovih dvaju proteina bilo je za očekivati da, ako je protein IqgC GAP za RasG, može imati aktivnost GAP i prema ljudskoj GTPazi H-Ras. Titracijska krivulja sa serijskim razrjeđenjima proteina IqgC uz konstantnu koncentraciju proteina H-Ras u GTP-aznoj reakciji pokazala je da porast koncentracije IqgC obrnuto korelira s luminiscencijom što nedvojbeno demonstrira aktivnost RasGAP. Potom je isto pokazano i za *D. discoideum* protein RasG divljeg tipa. Osim toga, zanimalo nas je ima li protein IqgC utjecaja na hidrolizu GTP-a u aktivnom mjestu konstitutivno aktivnog mutanta RasG(Q61L). Iz titracijskih krivulja GTPaza H-Ras i RasG s IqgC odabrana je količina od 1000 ng proteina IqgC u GTPaznoj reakciji, pri kojoj je smanjenje luminiscencije bilo gotovo potpuno. Pri toj količini IqgC GTPazna aktivnost RasG(Q61L) je ostala nepromijenjena što je konzistentno s literaturnim podacima da je tako mutirani Ras neosjetljiv na djelovanje proteina RasGAP. Osim toga, primjećena je niska razina hidrolize GTP-a od strane same GTPaze RasG(Q61L), što je također u skladu s prethodnim istraživanjima. Naime, mutant Q61L je konstitutivno aktivan i ne hidrolizira GTP *in vivo*, dok *in vitro* i dalje zadržava sposobnost zauzimanja konformacije povoljne za hidrolizu GTP-a, no značajno manje od divljeg tipa proteina (Buhrman i sur., 2007).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih eksperimenata *in vitro* (*pull-down*, ko-imunoprecipitacija, test aktivnosti GAP) i *in vivo* (test BiFC, test aktivacije proteina Ras) možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. Protein IqgC izravno reagira s malom GTPazom RasG u živim stanicama *D. discoideum*.
2. *Dictyostelium* protein IqgC je netipičan predstavnik proteina srodnih proteinima IQGAP sisavaca jer stimulira GTPaznu aktivnost ljudske GTPaze H-Ras i *Dictyostelium* GTPaze RasG, odnosno ima aktivnost RasGAP.
3. Sve korištene metode za dokazivanje interakcije (*pull-down*, ko-imunoprecipitacija i BiFC) su pokazale interakciju proteina IqgC s divljim tipom GTPaze RasG i s konstitutivno aktivnim mutantom (Q61L). Dodatni dokaz interakcije s divljim tipom RasG je dobiven i testom aktivnosti GAP s obzirom da je preduvjet za aktivnost GAP vezanje odgovarajuće GTPaze. Interakciju s konstitutivno neaktivnim mutantom (S17N) detektirali smo samo *in vitro* testovima *pull-down* i ko-imunoprecipitacija.
4. Različite metode za testiranje proteinskih interakcija ne moraju nužno dati identične rezultate zbog čega nije dovoljno osloniti se na jednu metodu. Prednost u zaključivanju treba dati tehnikama za dokazivanje izravnih interakcija proteina u živim stanicama.

6. LITERATURA

- Adachi, H., Takahashi, Y., Hasebe, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Sutoh, K. (1997): *Dictyostelium* IQGAP-related protein specifically involved in the completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **137**: 891–898.
- Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., Philips, M.R. (2011): Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**: 39–51.
- Bloomfield, G., Traynor, D., Sander, S.P., Veltman, D.M., Pachebat, J.A., Kay, R.R. (2015): Neurofibromin controls macropinocytosis and phagocytosis in *Dictyostelium*. *Elife* **4**: e04940.
- Bolourani, P., Spiegelman, G., Weeks, G. (2010): Ras proteins have multiple functions in vegetative cells of *Dictyostelium*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1728–1733.
- Bolourani, P., Spiegelman, G.B., Weeks, G. (2006): Delineation of the roles played by RasG and RasC in cAMP-dependent signal transduction during the early development of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **17**: 4543–4550.
- Bos, J.L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. (2007): GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* **129**: 865–877.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R. (2010): RhoGDI: A rheostat for the Rho switch. *Small GTPases* **1**: 65–68.
- Bozzaro, S., Bucci, C., Steinert, M. (2008): Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **271**: 253–300.
- Brandt, D.T., Marion, S., Griffiths, G., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Grosse, R. (2007): Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J. Cell Biol.* **178**: 193–200.
- Briggs, M.W., Sacks, D.B. (2003): IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* **4**: 571–574.
- Brill, S., Li, S., Lyman, C.W., Church, D.M., Wasmuth, J.J., Weissbach, L., Bernards, A., Snijders, A.J. (1996): The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4869–4878.
- Buhrman, G., Wink, G., Mattos, C. (2007): Transformation efficiency of RasQ61 mutants linked to structural features of the switch regions in the presence of Raf. *Structure* **15**: 1618–1629.

- Cai, H., Huang, C.-H., Devreotes, P.N., Iijima, M. (2011): Analysis of Chemotaxis in *Dictyostelium*. U: Shimaoka, M. (Ed.) Integrin and Cell Adhesion Molecules. Humana Press, Totowa, NJ, str. 451–468.
- Chiariello, C.S., LaComb, J.F., Bahou, W.F., Schmidt, V.A. (2012): Ablation of *Iqgap2* protects from diet-induced hepatic steatosis due to impaired fatty acid uptake. *Regul. Pept.* **173**: 36–46.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., Philips, M.R. (1999): Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**: 69–80.
- Corbett, K.D., Alber, T. (2001): The many faces of Ras: recognition of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 710–716.
- Cox, A.D., Der, C.J. (2010): Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**: 2–27.
- de Rooij, J., Bos, J.L. (1997): Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* **14**: 623–625.
- Dias, M., Blanc, C., Thazar-Poulot, N., Ben Larbi, S., Cosson, P., Letourneur, F. (2013): *Dictyostelium* ACAP-A is an ArfGAP involved in cytokinesis, cell migration and actin cytoskeleton dynamics. *J. Cell Sci.* **126**: 756–766.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sugang, R., Berriman, ... Kuspa, A. (2005): The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43–57.
- Faix, J., Dittrich, W. (1996): DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* **394**: 251–257.
- Faix, J., Clougherty, C., Konzok, A., Mintert, U., Murphy, J., Albrecht, R., Mühlbauer, B., Kuhlmann, J. (1998): The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility. *J. Cell Sci.* **111**: 3059–3071.
- Faix, J., Weber, I., Mintert, U., Köhler, J., Lottspeich, F., Marriott, G. (2001): Recruitment of cortexillin into the cleavage furrow is controlled by Rac1 and IQGAP-related proteins. *EMBO J.* **20**: 3705–3715.
- Farnsworth, C.L., Feig, L.A. (1991): Dominant inhibitory mutations in the Mg (2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4822–4829.
- Feig, L.A., Cooper, G.M. (1988): Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3235–3243.

- Fernández-Medarde, A., Santos, E. (2011): Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer* **2**: 344–358.
- Filić, V., Marinović, M., Faix, J., Weber, I. (2012): A dual role for Rac1 GTPases in the regulation of cell motility. *J Cell Sci.* **125**: 387–398.
- Filić, V., Marinović, M., Faix, J., Weber, I. (2014): The IQGAP-related protein DGAP1 mediates signaling to the actin cytoskeleton as an effector and a sequestrator of Rac1 GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 2775–2785.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., Kaibuchi, K. (2002): Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**: 873–885.
- Gasper, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M., Wittinghofer, A. (2009): It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 423–429.
- Gibbs, J.B., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Dixon, R.A., Vogel, U.S. (1990): Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein (GAP). *J. Biol. Chem.* **265**: 20437–20442.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J.E., Wittinghofer, A. (1992): Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2050–2056.
- Giusti, C., Kosta, A., Lam, D., Tresse, E., Luciani, M.-F., Golstein, P. (2008): Analysis of autophagic and necrotic cell death in *Dictyostelium*. *Methods Enzymol.* **446**: 1–15.
- Grand, R.J., Owen, D. (1991): The biochemistry of ras p21. *Biochem. J.* **279**: 609–631.
- Grohmanova, K., Schlaepfer, D., Hess, D., Gutierrez, P., Beck, M., Kroschewski, R. (2004): Phosphorylation of IQGAP1 Modulates Its Binding to Cdc42, Revealing a New Type of Rho-GTPase Regulator. *J. Biol. Chem.* **279**: 48495–48504.
- Harvey, J.J. (1964): An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumors in Mice. *Nature* **204**: 1104–1105.
- Hedman, A.C., Smith, J.M., Sacks, D.B. (2015): The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Rep.* **16**: 427–446.
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., Rubio, I. (2015): Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol. Chem.* **396**: 831–848.
- Ho, Y.-D., Joyal, J.L., Li, Z., Sacks, D.B. (1999): IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling. *J. Biol. Chem.* **274**: 464–470.

Hoeller, O., Bolourani, P., Clark, J., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., Weiner, O.D., Weeks, G., Kay, R.R. (2013): Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **126**: 4296–4307.

Jadeski, L., Mataraza, J.M., Jeong, H.-W., Li, Z., Sacks, D.B. (2008): IQGAP1 Stimulates Proliferation and Enhances Tumorigenesis of Human Breast Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **283**: 1008–1017.

John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S., Wittinghofer, A. (1993): Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J. Biol. Chem.* **268**: 923–929.

Junemann, A., Filić, V., Winterhoff, M., Nordholz, B., Litschko, C., Schwellenbach, H., Stephan, T., Weber, I., Faix, J. (2016): A *Diaphanous* -related formin links Ras signaling directly to actin assembly in macropinocytosis and phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**: 7464–7473.

Kae, H., Lim, C.J., Spiegelman, G.B., Weeks, G. (2004): Chemoattractant-induced Ras activation during *Dictyostelium aggregation*. *EMBO Rep.* **5**: 602–606.

Kee, Y.-S., Ren, Y., Dorfman, D., Iijima, M., Firtel, R., Iglesias, P.A., Robinson, D.N. (2012): A mechanosensory system governs myosin II accumulation in dividing cells. *Mol. Biol. Cell.* **23**: 1510–1523.

Kirsten, W.H., Mayer, L.A. (1967): Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**: 311–335.

Knetsch, M.L., Schäfers, N., Horstmann, H., Manstein, D.J. (2001): The *Dictyostelium* Bcr/Abr-related protein DRG regulates both Rac- and Rab-dependent pathways. *EMBO J.* **20**: 1620–1629.

Kodama, Y., Hu, C.-D. (2012): Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *BioTechniques* **53**: 285–298.

Kurella, V.B., Richard, J.M., Parke, C.L., LeCour, L.F., Bellamy, H.D., Worthylake, D.K. (2009): Crystal Structure of the GTPase-activating Protein-related Domain from IQGAP1. *J. Biol. Chem.* **284**: 14857–14865.

Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996): Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* **271**: 23363–23367.

Le Clainche, C., Schlaepfer, D., Ferrari, A., Klingauf, M., Grohmanova, K., Veligodskiy, A., Didry, D., Le, D., Egile, C., Carlier, M.-F., Kroschewski, R. (2007): IQGAP1 Stimulates Actin Assembly through the N-Wasp-Arp2/3 Pathway. *J. Biol. Chem.* **282**: 426–435.

- Lee, S., Escalante, R., Firtel, R.A. (1997): A Ras GAP is essential for cytokinesis and spatial patterning in *Dictyostelium*. *Development* **124**: 983–996.
- Lee, S., Shen, Z., Robinson, D.N., Briggs, S., Firtel, R.A. (2010): Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis. *Mol. Biol. Cell.* **21**: 1810–1824.
- Lowy, D.R., Willumsen, B.M. (1993): Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 851–891.
- Mateer, S.C., Wang, N., Bloom, G.S. (2003): IQGAPs: integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery, and signaling networks. *Cytoskeleton* **55**: 147–155.
- Matsunaga, H., Kubota, K., Inoue, T., Isono, F., Ando, O. (2014): IQGAP1 selectively interacts with K-Ras but not with H-Ras and modulates K-Ras function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**: 360–364.
- Mondal, S., Hsiao, K., Goueli, S.A. (2015): A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev. Technol.* **13**: 444–455.
- Müller, M.P., Goody, R.S. (2017): Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases* **0**: 1–17.
- Nassar, N., Singh, K., Garcia-Diaz, M. (2010): Structure of the Dominant Negative S17N Mutant of Ras. *Biochemistry* **49**: 1970–1974.
- Nojima, H., Adachi, M., Matsui, T., Okawa, K., Tsukita, S., Tsukita, S. (2008): IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat. Cell Biol.* **10**: 971–978.
- Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., Mizuno, K. (2012): Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *BioTechniques* **52**: 45-50.
- Owen, D., Campbell, L.J., Littlefield, K., Evetts, K.A., Li, Z., Sacks, D.B., Lowe, P.N., Mott, H.R. (2008): The IQGAP1-Rac1 and IQGAP1-Cdc42 Interactions: INTERFACES DIFFER BETWEEN THE COMPLEXES. *J. Biol. Chem.* **283**: 1692–1704.
- Rehmann, H., Bos, J.L. (2004): Signal transduction: thumbs up for inactivation. *Nature* **429**: 138–139.
- Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A., Valencia, A. (2012): The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* **196**: 189–201.
- Roy, M., Li, Z., Sacks, D.B. (2005): IQGAP1 Is a Scaffold for Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 7940–7952.

- Schaap, P. (2011): Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Camb. Engl.* **138**: 387–396.
- Schaap, P., Winckler, T., Nelson, M., Alvarez-Curto, E., Elgie, B., Hagiwara, H., Cavender, J., Milano-Curto, A., Rozen, D.E., Dingermann, T., Mutzel, R., Baldauf, S.L. (2006): Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* **314**: 661–663.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. (2005): GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 3014–3038.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., Wittinghofer, A. (1997): The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* **277**: 333–339.
- Schmidt, V.A., Chiariello, C.S., Capilla, E., Miller, F., Bahou, W.F. (2008): Development of Hepatocellular Carcinoma in Iqgap2-Deficient Mice Is IQGAP1 Dependent. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 1489–1502.
- Shannon, K.B. (2012): IQGAP Family Members in Yeast, *Dictyostelium*, and Mammalian Cells. *Int. J. Cell Biol.* **2012**: 1–14.
- Siu, C.-H., Sriskanthadevan, S., Wang, J., Hou, L., Chen, G., Xu, X., Thomson, A., Yang, C. (2011): Regulation of spatiotemporal expression of cell-cell adhesion molecules during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Growth Differ.* **53**: 518–527.
- Smith, J.M., Hedman, A.C., Sacks, D.B. (2015): IQGAPs choreograph cellular signaling from the membrane to the nucleus. *Trends Cell Biol.* **25**: 171–184.
- Surcel, A., Kee, Y.-S., Luo, T., Robinson, D.N. (2010): Cytokinesis through biochemical-mechanical feedback loops. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**: 866–873.
- Swier, P.B., Bhadoriya, P., Saran, S. (2014): Analysis of Rheb in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*: Cellular localization, spatial expression and overexpression. *J. Biosci.* **39**: 75–84.
- Tidyman, W.E., Rauen, K.A. (2016): Pathogenetics of the RASopathies. *Hum. Mol. Genet.* **25**: 123–132.
- Tuxworth, R.I., Cheetham, J.L., Machesky, L.M., Spiegelmann, G.B., Weeks, G., Insall, R.H. (1997): *Dictyostelium* RasG Is Required for Normal Motility and Cytokinesis, But Not Growth. *J. Cell Biol.* **138**: 605–614.
- Veltman, D.M., Akar, G., Bosgraaf, L., Van Haastert, P.J.M. (2009): A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**: 110–118.

- Vetter, I.R. (2001): The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science* **294**: 1299–1304.
- Vlahou, G., Rivero, F. (2006): Rho GTPase signaling in *Dictyostelium discoideum*: Insights from the genome. *Eur. J. Cell Biol.* **85**: 947–959.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., Cooper, J.A. (1993): Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205–214.
- Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itoh, N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N., Kaibuchi, K. (2007): IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* **120**: 567–577.
- Weeks, G., Spiegelman, G.B. (2003): Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cell. Signal.* **15**: 901–909.
- Weissbach, L., Settleman, J., Kalady, M.F., Snijders, A.J., Murthy, A.E., Yan, Y.X., Bernardis, A. (1994): Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J. Biol. Chem.* **269**: 20517–20521.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., Der, C.J. (2005): The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**: 843–846.
- White, C.D., Erdemir, H.H., Sacks, D.B. (2012): IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cell. Signal.* **24**: 826–834.
- Williams, J.G. (2010): *Dictyostelium* finds new roles to model. *Genetics* **185**: 717–726.
- Williams, R.S.B., Boeckeler, K., Gräf, R., Müller-Taubenberger, A., Li, Z., Isberg, R.R., Wessels, D., Soll, D.R., Alexander, H., Alexander, S. (2006): Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol. Med.* **12**: 415–424.
- Wittinghofer, A. (1997): Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr. Biol.* **7**: 682–685.
- Yang, Y., Zhao, W., Xu, Q.-W., Wang, X.-S., Zhang, Y., Zhang, J. (2014): IQGAP3 Promotes EGFR-ERK Signaling and the Growth and Metastasis of Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **9**: e97578.
- Zhang, S., Charest, P.G., Firtel, R.A. (2008): Spatiotemporal Regulation of Ras Activity Provides Directional Sensing. *Curr. Biol.* **18**: 1587–1593.
- Zhou, B., Der, C.J., Cox, A.D. (2016): The role of wild type RAS isoforms in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **58**: 60–69.
- Dictybase, URL <<http://dictybase.org/>> . Pristupljeno 22. prosinca 2017.

7. ŽIVOTOPIS

Ime Lucija Mijanović

Datum rođenja 12.06.1992.

Obrazovanje

2015. – trenutno Diplomski sveučilišni studij molekularne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2011. – 2015. Preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Iskustvo

ožujak 2017. – veljača 2018. Izrada diplomskog rada
Laboratorij za biofiziku stanice, Institut Ruđer Bošković

rujan 2016. – studeni 2016. Laboratorijska praksa
Laboratorij za nasljedni rak, Institut Ruđer Bošković

Ostale aktivnosti

2015. – 2016. Član BIUS-a, Udruge studenata biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

2012. – 2014. Sudjelovanje u manifestaciji "Noć biologije", što je 2012. godine nagrađeno Posebnom rektorovom nagradom