

Konstrukcija mutiranog protonskog izmjenjivača NHE3 i njegova funkcija

Brauneger, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:235476>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Brauneger

**Konstrukcija mutiranog protonskog
izmjenjivača NHE3 i njegova funkcija**

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za fiziologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Mirze Žiška i doc dr. sc. Nataše Bauer. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Prvenstveno zahvaljujem svojem mentoru prof. dr. sc. Mirzi Žišku na znanju, utrošenom vremenu, neizmjernoj pomoći i strpljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada. Velika hvala na gostoprimstvu i mogućnosti rada u tako ugodnom okruženju.

Također, posebno zahvaljujem svojoj komentorici doc. dr. sc. Nataši Bauer na korisnim savjetima te velikoj pomoći i podršci.

Posebnu zahvalu zaslužuje moj dragi kolega i prijatelj Adam zbog velike pomoći prilikom rada u labosu. Hvala ti i na odličnom društvu i ramenu za utjehu. Uz tebe je uvijek vrijeme brže prolazilo. Najbolji si!

Hvala svim mojim najdražim prijateljicama i prijateljima na nezaboravnom studiranju, trajnim uspomenama te velikoj podršci i ljubavi.

Sve vas jako volim!

Najveća HVALA mojim roditeljima i najdražem bratu bez čije bezgranične ljubavi, podršci i neograničenom strpljenju ne bi bilo ovog diplomskog, kao ni samog studiranja.

Volim vas najviše!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

KONSTRUKCIJA MUTIRANOG PROTONSKOG IZMJENJIVAČA NHE3 I NJEGOVA FUNKCIJA

Dora Brauneger

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Tema ovog rada bila je stvoriti mutirani transmembranski proteinski izmjenjivač Na^+/H^+ izooblik 3 (NHE3). Postupkom delecije uklonjene su 24 aminokiseline (Leu 586 – Arg609) važne za vezanje pojedinih stimulatora i inhibitora aktivnosti proteina NHE3 koji sudjeluje u održavanju homeostaze pH stanica. Delecija je provedena pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR) metodom preklapanja dvaju fragmenta DNA sekvence gena *NHE3*. Predložak je bio plazmid *pcDNA 3.1(+)* s prethodno ugrađenom cDNA sekvencom gena *HA-NHE3* (*pcDNA/HA-NHE3*). Uspješnost delecija provjerena je usporedbom dobivenog mutiranog fragmenta AD s kontrolnim fragmentom bez delecije. Fragment AD i plazmid *pcDNA/HA-NHE3* tretirani su restriksijskim enzimom *PmaCI* koji sekvencu *NHE3* cijepa na dva mjesta. Pocijepani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* i fragment AD spojeni su *ligazom* i kao rezultat dobiven je plazmid s mutiranom sekvencom gena *NHE3*, *pcDNA/dHA-NHE3*. Produkt ligacije transformirao je bakterijske stanice *Escherichia coli* soja DH5 α . Iz izraslih kolonija izoliran je plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* i pomoću restriksijskih enzima *HindIII* i *KpnI* dokazana je uspješnost ligacije i pravilna orijentacija umetnutog fragmenta AD. Reakcijom PCR dokazana je uspješnost mutacije pomoću negativne početnice koja se veže za deletiran dio unutar gena *NHE3*. Konačna potvrda postojanja delecije je sekvenciranje dobivenog plazmida. Plazmidom *pcDNA/dHA-NHE3* transficirane su stanične linije fibroblasta PS120. Postupkom zakiseljavanja medija dokazana je funkcionalnost proteina NHE3 unatoč mutaciji što bi značilo da unutar sekvence *NHE3* postoji više regulacijskih mjesta aktivnosti proteina NHE3, zasebno ili u interakciji.

(71 stranica, 18 slika, 6 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: NHE3, kloniranje

Voditelj: Dr. sc. Mirza Žižak, izv. prof.

Suvoditelj: Dr. sc. Nataša Bauer, docent

Ocjenitelji: Dr. sc. Nataša Bauer, docent

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. Prof

Dr. sc. Ana Galov, docent

Rad prihvaćen: 18.02.2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

CONSTRUCTION OF THE MUTATED NHE3 PROTON EXCHANGER AND HIS FUNCTION

Dora Brauneger

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb

The subject of this thesis was the construction of a mutated transmembrane isoform 3 Na⁺/H⁺ protein exchanger (NHE3). 24 amino acids deleted (Leu 586 – Arg609) are crucial for NHE3 protein regulation. The role of this exchanger is maintaining the homeostasis of cellular pH, by certain stimulators or inhibitors. The deletion has been accomplished by standard polymerase chain reaction method (PCR) using fragments of *NHE3* sequence with flanking ends. The template for the reaction was *pcDNA 3.1(+)* plasmid with an inserted *HA-NHE3* cDNA sequence (*pcDNA/HA-NHE3*). The efficacy of the deletion was checked by comparing the mutated fragment AD with control, unmutated fragment. After that, both *pcDNA/HA-NHE3* plasmid and fragment AD were treated with *PmaCI* restriction enzyme having two restriction sites within the *NHE3* sequence. Then, using the products of the reaction and treating them with *ligase*, a plasmid with a mutated *NHE3* sequence was constructed, *pcDNA/dHA-NHE3*. *Escherichia coli*, DH5 μ were transformed with ligation product and *pcDNA/dHA-NHE3* plasmid was isolated from transformed colonies. The efficacy of the ligation and the proper orientation of the insert were examined by restriction analysis. The efficacy of the mutation was shown by PCR reaction using an anti-sense primer annealing to the deleted amino acid sequence. The final confirmation of the deletion was the sequencing of the isolated plasmid. A fibroblast PS120 cell line was transformed by *pcDNA/dHA-NHE3* plasmid and the functionality of the NHE3 protein was shown by acid loading. The mutated protein was functional, leading to the conclusion that the protein contains several regulation sequences, separate or together.

(71 pages, 18 figures, 6 tables, 55 references, original in: Croatian)

Key words: NHE3, cloning

Supervisor: Mirza Žižak, PhD, Assoc. Prof

Co-supervisor: Nataša Bauer, PhD, Assistant Prof

Reviewers: Nataša Bauer, PhD, Assistant Prof

Mirta Tkalec, PhD, Assoc. Prof

Ana Galov, PhD, Assistant Prof

Thesis accepted: 18.02.2015.

POPIS KRATICA

CaM KII	kalmodulin kinaza II
CaM	kalmodulin
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
cGKII	ciklički GMP kinaza II
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
CK II	kazein kinaza II
dNTP	deoksiribonukleotid-3-fosfat
DPPIV	protein peptidaza IV
FGF	fibroblastni čimbenik rasta
HA biljeg	peptid deriviran iz glikoproteina humanog virusa influence (<i>eng. Human influenza hemagglutinin</i>) sastavljen od 9 aminokiselina
HA-NHE3	protein NHE3 koji sadrži tri HA epitopa kao biljeg za imunološku detekciju
<i>HA-NHE3</i>	sekvenca gena NHE3 koji sadrži sekvencu koja kodira tri HA epitopa kao biljeg
IFN- γ	interferon γ
IRBIT	receptor vezujući protein inozitol 1,4,5-trifosfat (od <i>eng. inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein</i>)
LB	Luria-Bertani medij
LP	lipofektamin
NHE3	izmjenjivač natrija i vodika izooblik 3 (od <i>eng. sodium proton exchanger type 3</i>)
<i>NHE3</i>	gen za Na ⁺ /H ⁺ proteinski izmjenjivač izooblika 3
NHERF1	regulator Na ⁺ /H ⁺ proteinskog izmjenjivača 1 (od <i>eng. sodium proton exchanger type 3 regulator 1</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (od <i>eng. Polymerase Chain Reaction</i>)

PDZ	strukturna proteinska domena, dobila ime po proteinima gdje je prvi puta otkrivena: protein post-sinaptičke gustoće (od eng. <i>Post synaptic density protein, PSD95</i>) + veliki tumorski supresor Drosophila (od eng. <i>Drosophila disc tumor suppressor, Dlg1</i>) + protein zonula occludens-1 (od eng. <i>Zonula occludens-1 protein, zo-1</i>)
PepT1	di/tripeptidi
PKA	protein kinaza A
PKC	protein kinaza C
PP2A	protein fosfataza 2
SGK1	glukokortikoid inducibilna kinaza 1
SOC	super optimalni medij (SOB, super optimal broth) s glukozom
TAE	pufer: 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 2 mM EDTA
TE	pufer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA
TNF- α	tumorski faktor nekroze α (eng. <i>tumor necrosis factor α</i>)
Umetak	fragment s delecijom nastao djelovanjem enzima <i>PmaCI</i> na mutirani fragment AD

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Protein NHE3 u tkivima	2
1.2. Fiziološka uloga proteina NHE3	3
1.3. Proteini NHE	5
1.4. Funkcionalne domene proteina NHE	6
1.4.1. Transportna domena	6
1.4.2. Regulatorna domena	7
1.4.3. Vezno mjesto amilorida	8
1.5. Mehanizmi regulacije proteina NHE3	8
1.5.1. Kratkoročna regulacija	8
1.5.1.1. Fosforilacija	9
1.5.1.2. Tkivna lokalizacija proteina NHE3	10
1.5.1.3. Protein-protein interakcija	11
1.5.2. Dugoročna regulacija	12
1.5.2.1. Efekti glukokortikoida	13
1.5.2.2. Kronična acidoza i izmjena Na^+/H^+	13
1.6. Važnost regulacijske poddomene smještene između Leu586 – Arg609	13
1.7. Ciljevi istraživanja	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Materijali	16
2.1.1. Kemikalije	16
2.1.1.1. Početnice	16
2.1.1.2. Enzimi	16
2.1.1.3. Pufferi	16
2.1.1.4. Komercijalni kompleti	17
2.1.1.5. Reagensi	17
2.1.1.6. Plazmidni vektor	17
2.1.2. Programi	18
2.1.3. Stanice	18
2.1.4. Hranjive podloge	18
2.1.5. Oprema	19

2.2. Metode	20
2.2.1. Strategija kloniranja plazmida s delecijom cDNA NHE3	20
2.2.2. Reakcije PCR na predlošku plazmidne DNA.....	22
2.2.3. Prespajanje DNA tehnikom preklapanja dvaju fragmenata	22
2.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	26
2.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela	26
2.2.6. Cijepanje plazmidne DNA restrikcijskim enzimima	27
2.2.7. Defosforilacija tupih krajeva plazmida tretiranog restrikcijskom endonukleazom PmaCI .	27
2.2.8. Ugradnja DNA fragmenata u vektorski plazmid postupkom ligacije.....	28
2.2.9. Stvaranje kompetentnih bakterijskih stanica Escherichia coli soja DH5 α kemijskom metodom	29
2.2.10. Transformacija bakterije E. coli soj DH5 α plazmidnom DNA	29
2.2.11. Umnažanje plazmidne DNA i njena izolacija iz kompetentnih bakterijskih stanica pomoću postupka Mini/Midi prep	29
2.2.12. Sekvenciranje mutirane plazmidne DNA.....	30
2.2.13. Kultura stanica.....	30
2.2.14. Transfekcija plazmidne DNA u staničnu kulturu fibroblasta	31
2.2.15. Selekcija stanica postupkom zakiseljavanja	31
3. REZULTATI.....	33
3.1. Dizajniranje početnica za mutiranje gena <i>NHE3</i>	34
3.2. Konstrukcija mutirane sekvence <i>NHE3</i>	35
3.2.1. Stvaranje fragmenata AB i CD	35
3.2.2. Povezivanje komplementarnih krajeva fragmenata AB i CD.....	37
3.2.3. Umnožavanje fragmenta AD	39
3.3. Tretiranje fragmenta AD i plazmida <i>pcDNA/HA-NHE3</i> restrikcijskom endonukleazom <i>PmaCI</i> .	40
3.4. Povezivanje plazmida <i>pcDNA/HA-NHE3</i> i mutiranog fragmenta AD prethodno tretiranih endonukleazom <i>PmaCI</i>	42
3.5. Transformacija mutiranog plazmida <i>pcDNA/dHA-NHE3</i> u kompetentne bakterijske stanice ...	44
3.6. Odabir plazmida <i>pcDNA/dHA-NHE3</i> s pravilno orijentiranim umetkom.....	45
3.6.1. Ispitivanje orijentacije pomoću restrikcijskih enzima	45
3.6.2. Ispitivanje orijentacije umetka pomoću reakcije PCR	47
3.7. Ispitivanje uspješnosti delecije pomoću reakcije PCR.....	48
3.8. Midi-prep izolacija plazmida <i>pcDNA/dHA-NHE3</i>	49
3.9. Sekvenciranje mutiranog plazmida <i>pcDNA/dHA-NHE3</i> klon 1 i 5	50
3.10. Transfekcija mutiranog plazmida <i>pcDNA/dHA-NHE3</i> u stanice PS120	53

4.	RASPRAVA.....	54
4.1	Konstrukcija mutiranog fragmenta AD.....	55
4.2.	Transfekcija stanične linije fibroblasta PS120 i zakiseljavanje stanica.....	57
5.	ZAKLJUČAK.....	60
6.	LITERATURA.....	62
7.	ŽIVOTOPIS.....	70

1.UVOD

Do danas je u stanicama sisavaca otkriveno devet različitih izooblika Na^+/H^+ izmjenjivača (NHE1-9). Na^+/H^+ izmjenjivači (NHEs) integralni su membranski proteini koji posreduju elektroneutralnu izmjenu unutarstaničnog H^+ za izvanstanični Na^+ (Grinstein i sur. 1989; Murer i sur. 1976.), a važni su za brojne fiziološke procese u širokom rasponu od nadzora nad unutarstaničnim pH i staničnim volumenom (Krapf i Alpern 1993.) do nadzora nad sistemskim elektrolitima, acido-baznom i volumnom homeostazom (Donowitz i sur. 1996.)

Za NHE3 posredovanu izmjenu Na^+/H^+ u tankom crijevu je poznato da je uključena u neutralan apsorpcijski proces NaCl . Iz toga se može zaključiti da je NHE3 važan kod bolesti sa simptomima proljeva budući da je neutralna apsorpcija NaCl važan dio apsorpcije Na^+ u probavnom traktu uključena u probavu i u patologiju bolesti s proljevima.

1.1. Protein NHE3 u tkivima

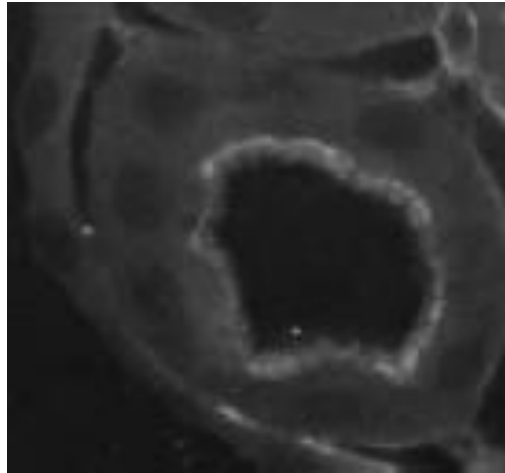
Iako su Na^+/H^+ izmjenjivači slični po strukturi i funkciji, ipak svaki izmjenjivač ima svoje jedinstvene značajke s obzirom na smještaj i regulaciju.

Obitelj od devet Na^+/H^+ proteinskih izmjenjivača dijeli se na dvije podgrupe: one čije se primarne funkcije odvijaju na staničnoj membrani (protein NHE 1, 2, 3, 4 i 5) i druge koje su primarno prisutne na unutarstaničnim organelama (proteini NHE 6, 7 i 9). Unutar prve podgrupe, NHE3 i NHE5 su izooblici koji konstantno recirkuliraju između stanične membrane i unutarstaničnog prostora, dok su NHE1, NHE2 i NHE4 statični na staničnoj membrani. Za razliku od izooblika koje se nalaze na membrani, NHE6, NHE7 i NHE9 su smješteni u membranama unutarstaničnih organela kao što su Golgijev aparat i endosomi (D'Souza i sur. 1998.).

Dokazano je da se protein NHE1 nalazi u gotovo svim stanicama sisavaca, što se ne može reći za izooblike NHE2, NHE3 i NHE4. Ova tri izooblika se uglavnom nalaze u epitelnim stanicama želuca, crijeva i bubrega. Protein NHE2 se nalazi u želucu, maternici, bubrezima, crijevima, nadbubrežnim žlijezdama i u manjim količinama u dušniku i skeletnim mišićima (Tse i sur. 1993; Orłowski i sur. 1992.). Protein NHE4 se pak nalazi u želucu, potom u crijevima, maternici i u jednakim količinama u mozgu, bubrezima i skeletnim mišićima (Orłowski i sur. 1992.).

NHE3 je epitelni izooblik koji je najvećim dijelom smješten na apikalnoj membrani različitih Na^+ apsorpcijskih epitelnih stanica u tankom (ileum i jejunum) i debelom crijevu (Bookstein i sur. 1994; Biemesderfer i sur. 1992.), proksimalnim kanalićima bubrega i debelom uzlaznom kraku Henleove petlje, ali isto tako nalazimo ga u epididimusu, nekim živčanim stanicama produžene moždine i nekim stanicama kanalića žlijezda slinovnica. Na apikalnoj membrani proksimalnog kanalića bubrega NHE3

sudjeluje u procesu apsorpcije iona Na^+ (Yip i sur. 1998.). Zbog smještaja u apikalnoj membrani Na^+ apsorpcijskih epitelnih stanica crijeva pretpostavlja se da je primarna uloga proteina NHE3 apsorpcija iona Na^+ iz lumena crijeva (Bookstein i sur. 1994.). NHE3 se nalazi samo u tkivima u kojima se odvija transportni proces (Syed i sur. 1994.) (Slika 1).

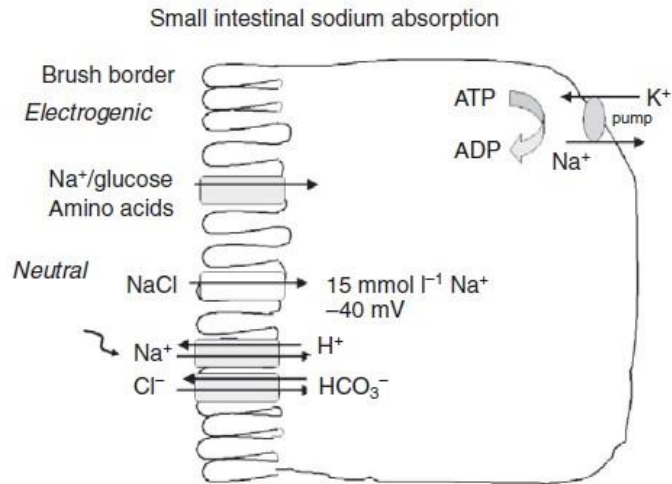


Slika 1. Distribucija proteina NHE3 u stanicama proksimalnih kanalića bubrega. *Na slici je prikazan poprečni presjek proksimalnog kanalića bubrega. Distribucija proteina NHE3 je određena inkubacijom antitijelima i potom vizualizirano. Rezultati su pokazali najveću distribuciju proteina NHE3 na apikalnoj membrani stanica proksimalnih kanalića okrenutih u smjeru lumena (na slici se vidi kao svijetlo-sivo obojenje) (Preuzeto od: Honegger i sur. 2005.)*

1.2. Fiziološka uloga proteina NHE3

Kroz probavni sustav, svaki dan, prođu velike količine vode i iona Na^+ . Većina se izbacuje putem probavnih procesa dok se manji dio apsorbira. Na taj način, probavni sustav održava stabilnu homeostazu vode i iona Na^+ (Zachos i sur. 2005.). Uz probavni sustav, u održavanju homeostaze vode, ulogu ima i bubrežni sustav. Oba sustava posjeduju različite mehanizme regulacije u koje su većim dijelom uključeni različiti transportni proteini. Kao što je već prije spomenuto, jedan od njih je protein NHE3.

NHE3 treba omogućiti apsorpciju velikih količina iona Na^+ putem neutralne NaCl apsorpcije i time održati pravilnu homeostazu unutar organizma (Slika 2).



Slika 2. Prikaz funkcije proteina NHE3 tijekom probavnog procesa unutar crijeva kao i prikaz procesa neutralne apsorpcije. Protein NHE3 je stimuliran na samom početku probave kako bi došlo do povećanja volumena crijeva vodom i time efikasnijeg širenja probavnih enzima (Krishnan i sur., 2003.). Nakon toga dolazi do inhibicije NHE3, da bi se ponovno stimulirao tek u kasnijoj fazi probave radi održavanja volumena. Također, ravnomjernom izmjenom iona Na⁺ i H⁺ protein NHE3 stvara kiselu mikroklimu unutar lumena crijeva i time omogućuje apsorpciju hranjivih tvari preko drugih proteinskih transportera (Donowitz i sur., 1987.). Isto tako, procesom neutralne apsorpcije, koji se odvija u razdobljima između obroka, protein NHE3, u suradnji s Cl⁻/HCO₃⁻ transporterom apsorbira ion Na⁺ u zamjenu za ion Cl⁻ (Knickelbeini sur., 1983.). (Preuzeto od: Donowitz i sur. 2009.)

Proces neutralne apsorpcije se odvija unutar probavnog sustava u razdobljima između obroka pri čemu je, dakle, NHE3 inhibiran tijekom i poslije jela, a podražuje se u kasnijem procesu probave (Zachos i sur. 2005.). Neutralna apsorpcija je isto tako povezana i uz kretanje iona Cl⁻ preko Cl⁻/HCO₃⁻ proteinskog izmjenjivača, iako je pokazano da NHE3 može funkcionirati i odvojeno od njega (Walker i sur. 2008.).

Jedna od važnih značajki NHE3 je njegova djelomična aktivnost pod bazalnim uvjetima. Kao dio normalne fiziologije probave, NHE3 je stimuliran na samom početku probave i to omogućuje povećanje vode u lumenu crijeva što potom služi za širenje probavnih enzima i probavu čini efikasnijom. U kasnijoj fazi probave, NHE3 je aktivan kako bi održavao homeostazu volumena (Bobulescu i Moe 2006.).

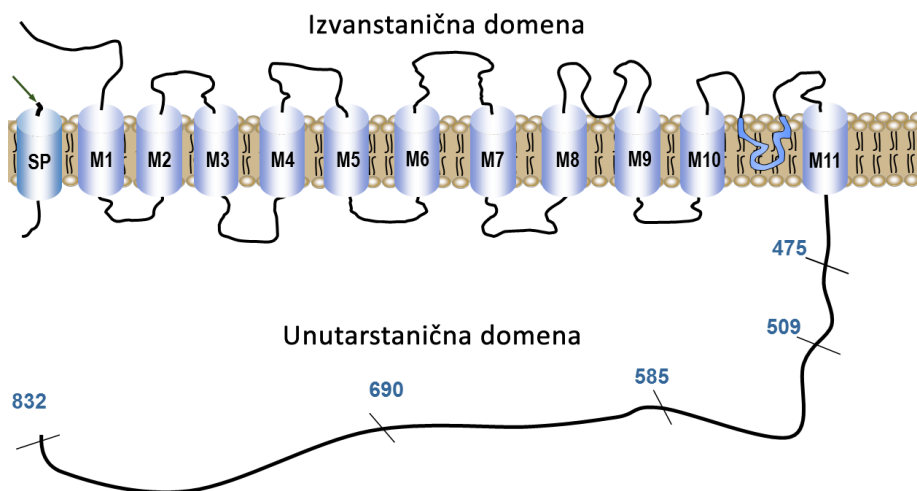
Unutar bubrega, osim sudjelovanja u procesu NaCl apsorpcije, protein NHE3 ima ulogu u apsorpciji iona HCO₃⁻ kao i sekreciji iona NH₄⁺.

NHE3 je važan i u apsorpciji različitih probavnih tvari što se ostvaruje izbacivanjem iona H^+ u lumen crijeva i stvaranjem kisele mikroklime. Zahvaljujući povišenom pH gradijentu, aktiviraju se mnogi transporteri koji potom apsorbiraju hranjive tvari. Najpoznatije hranjive tvari uključuju dipeptide i aminokiseline koje se prenose preko PepT1 (di/tripeptidi) transportera i nekoliko L-aminokiselinskih transportera (Gekle i sur. 1999; Gekle i sur. 2001.).

Uloga NHE3 u apsorpciji vode ispitivana je istraživanjima na miševima koji ne eksprimiraju NHE3. Pokazalo se da feces miševa sadrži povećane količine vode te imaju kraći životni vijek, poremećenu pH homeostazu (acidoza), smanjeni krvni tlak i smanjenu količinu masnog tkiva (Schultheis i sur. 1998; Noonan i sur. 2005.).

1.3. Proteini NHE

Primarna i pretpostavljena sekundarna struktura svih izoformi je slična. Protein NHE se sastoji od dvije strukturne domene: transmembranske koja se sastoji od približno 500 aminokiselina i citoplazmatske koja sadrži približno 300 aminokiselina (Donowitz i sur. 1996.) (Slika 3).



Slika 3. Struktura proteina NHE3. NHE3 posjeduje transmembransku domenu i unutarstaničnu domenu. Transmembranska domena je građena od 12 poddomena koji se protežu od jedne na drugu stranu membrane. Unutarstanična domena je podijeljena u dvije poddomene, inhibicijsku i stimulacijsku, i sudjeluje u regulaciji aktivnosti NHE3.

Proteini NHE, kojima je nakon kloniranja i sekvenciranja određen slijed aminokiselina, (NHE1, NHE2 i NHE3) uvelike se razlikuju prema svojim transmembranskim i citoplazmatskim domenama. Citoplazmatska domena ima regulatornu ulogu radi sposobnosti vezanja mnogih agonista i antagonistata koji utječu na aktivnost proteina NHE dok transmembranska domena ima ulogu u prijenosu iona (Tse i sur. 1992.).

Protein NHE1 ima vezna mjesta za enzim *protein kinazu C* kao i za enzim *kalmmodulin kinazu II*, ali ne i za *protein kinazu A*, dok NHE3 sadrži vezna mjesta za sva tri enzima. Zbog takve razlike unutar citoplazmatske domene svaki NHE ima specifična mjesta regulacije (Tse i sur. 1992.).

NHE1 i NHE3 se razlikuju po sekvenci u citoplazmatskoj domeni te prema značajkama unutar transmembranske domene. Na primjer, protein NHE1 sadrži petlju unutar transmembranske domene koja je veća od one koju ima protein NHE3. Slične razlike u strukturi transmembranske domene nisu samo nađene među različitim izooblicima proteina NHE, nego i unutar istog izooblika kod različitih vrsta sisavaca (Tse i sur. 1993.). Iz toga se može pretpostaviti da je struktura sekvence transmembranske domene određena prema specifičnim tkivima u kojima se NHE eksprimira.

1.4. Funkcionalne domene proteina NHE

1.4.1. Transportna domena

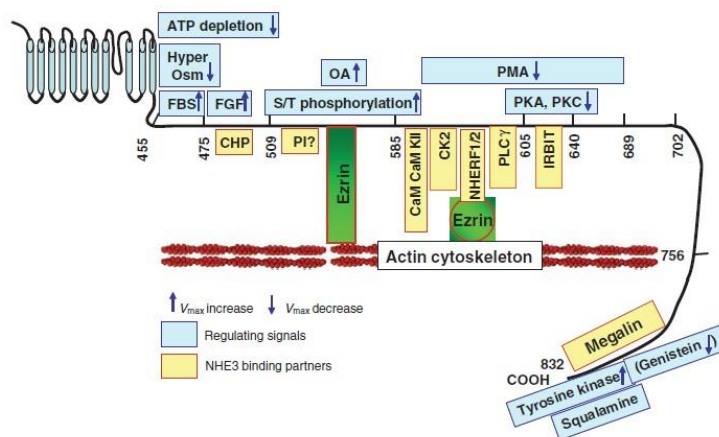
Transportna domena, dužine od približno 500 aminokiselina, većinom je homologna među izooblicima NHE i odgovorna za izmjenu izvanstaničnog iona Na^+ za unutarstanični ion H^+ (Wakabayashi i sur. 2000.). Sastoji se od 12 pretpostavljenih poddomena od kojih 11, funkcionalnih, prolazi kroz membranu stanice dok se jedna poddomena nalazi u izvanstaničnom prostoru i funkcionira kao signalni peptid (Žižak i sur. 2000.). Transmembranske poddomene 4 i 9 sadrže sekvencu odgovornu za osjetljivost na diuretik amilorid, a sukladno tome, istraživanjem je pokazano da se između transmembranskih poddomena 9 i 10 nalazi P-petlja koja sudjeluje u izmjeni iona kao i u određivanju specifičnosti transporta (Žižak i sur. 2000.).

Kompletna struktura transportne domene još nije do kraja otkrivena, međutim na osnovi dosadašnjih studija smatra se da transportnu domenu gradi 12 transmembranskih poddomena od kojih prvu najvjerojatnije čini signalni peptid, te da posjeduje dvije petlje koje uranjaju u membranu stanice (Donowitz i sur. 2009.).

1.4.2. Regulatorna domena

Citoplazmatska, regulatorna domena proteina NHE3 sastoji se od 378 aminokiselina i pretpostavlja se da ima spiralnu strukturu u dijelovima koji su bliži transmembranskoj domeni (Chou i Fasman 1974.)

Sa svojim stimulacijskim i inhibicijskim veznim mjestima, glavna zadaća citoplazmatske domene je regulacija aktivnosti proteina NHE3. Unutar ove regije nalaze se vezna mjesta za različite proteine, enzime ili faktore rasta koji sudjeluju u regulaciji aktivnosti proteina NHE3 (Donowitz i sur. 2001.). Primjer su enzim *kalmomodulin kinaza II* (CaM kinaza II), protein megalin, enzim *protein peptidaza IV* (DPP IV), protein ezrin, receptor vezujući protein inozitol 1,4,5-trifosfat (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, IRBIT) i mnogi drugi (Yun i sur. 1997.) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz citoplazmatske domene proteina NHE3. Shematski prikaz citoplazmatske domene s proteinima koji se vežu za citoplazmatski dio proteina NHE3. Naznačene su aminokiseline na koje se vežu proteini regulatori. Protein NHE3 je direktno i indirektno, preko proteina ezrina, vezan za citoskelet stanice (Preuzeto od: Donowitz i sur. 2009.).

Različitim mutacijama regulatorne domene identificirane su specifične regije potrebne za pravilnu aktivnost i regulaciju proteina NHE3. Nedavna istraživanja pokazuju da pored pojedinih regulatornih proteina, u regulaciji NHE3 sudjeluju i regulatorni proteini organizirani u velike komplekse unutar kojih ti proteini međusobno reagiraju kako bi u konačnici aktivirali ili inhibirali protein NHE3 (Thomson i sur. 2005.). Pokazatelj takvog djelovanja je malo područje unutar regulatorne domene, između aminokiselina Leu586 i Arg605, za koje se vežu proteini koji aktiviraju i/ili inhibiraju protein NHE3. Interakcije ovih proteina je dinamična, često se mijenja promjenom signala što utječe na samu

aktivnost proteina NHE3 (Donowitz i Li 2007.). Stoga se pretpostavlja da je upravo ova domena glavna u regulaciji samoga proteina NHE3.

1.4.3. Vezno mjesto amilorida

Amilorid je diuretik koji je zajedno sa svojim analogima inhibira proteine NHEs. Mehanizam njegova djelovanja je kompetitivno djelovanje u kojem se amilorid natječe s ionom Na^+ za njegovo vezno mjesto smješteno unutar transmembranske domene proteina NHE. Uklanjanjem 300 aminokiselina iz citoplazmatske domene dokazana je gotovo jednaka osjetljivost mutanta na amilorid kao u divljeg tipa izmjenjivača. Različiti klonirani izooblici proteina NHE imaju različit stupanj osjetljivosti na amilorid. NHE1 je osjetljiv na diuretik amilorid i njegove analoge, protein NHE3 je otporan, dok je protein NHE2 osjetljiv na diuretski amilorid, ali otporan na njegov 5'-amino analog (Counillon i sur. 1993; Wakabayashi i sur. 1992.).

Serijom strukturnih mutacija pokazano je da je vezno mjesto diuretskog amilorida, Leu167, unutar četvrte transmembranske domene. Također je otkriveno da su aminokiseline koje okružuju Leu167 visoko konzervirane među proteinskim NHE izooblicima, a daljnjim istraživanjem se pokazalo da je Leu167 vezno mjesto 5'-amino analoga, dok je Tyr165 vezno mjesto diuretskog amilorida (Counillon i sur. 1993; Yun i sur. 1993.).

1.5. Mehanizmi regulacije proteina NHE3

1.5.1. Kratkoročna regulacija

Postoje dvije vrste mehanizama koji reguliraju aktivnost Na^+/H^+ proteinskog izmjenjivača ovisno o vremenskom rasponu u kojem uzrokuju promjene. Neki mehanizmi uzrokuju trenutačne promjene u aktivnosti dok kod drugih, one dolaze tek nakon nekoliko sati (He i Yun 2009.)

Na primjer, enzimi *protein kinaze* i serumi uzrokuju trenutačne promjene u aktivnosti proteina NHE, dok promjene uzrokovane osmolalnošću dolaze do izražaja kasnije. Neki hormoni, uključujući glukokortikoide, također počinju djelovati tek nakon nekoliko sati (Donowitz i sur. 1996.).

Samo istraživanje mnogobrojnih mehanizama koji reguliraju protein NHE daleko je još od završenoga, međutim, sada su znanstvenici u mogućnosti podijeliti te mehanizme u osnovne grupe. Te grupe uključuju kratkoročnu i dugoročnu regulaciju (He i Yun 2009.).

1.5.1.1. Fosforilacija

Citoplazmatska domena proteina NHE3 sadrži mnogobrojna mjesta koja su fosforilirana enzimima *protein kinazama* kao dio signalne transdukcije koja regulira samu aktivnost proteina (Zhao i sur. 1999.). Studije su pokazale kako enzim *protein kinaza A (PKA)* fosforilira i regulira aktivnost proteina NHE3. Mutacijama dviju specifičnih aminokiselina, Ser552 i Ser605, pokazano je da su te aminokiseline fosforilacijsko mjesto za enzim *PKA*. Konačni rezultat je bio prestanak fosforilacije proteina NHE3, pri čemu je transportna aktivnost proteina NHE3 smanjena samo za 50% (Kurashima i sur. 1997.). Otkriveno je da je aminokiselina Ser634 također odgovorna za regulaciju proteina NHE3 enzimom *PKA*. Mutacijom aminokiseline Ser634 regulacija se u potpunosti prekida (Zhao i sur. 1999.). Uz enzim *PKA* je enzim *glukokortikoid inducibilna kinaza 1 (SGK1)* sposobna fosforilirati protein NHE3 na aminokiselini Ser665 čijom mutacijom dolazi do prekida regulacije (Zhao i sur. 1999.).

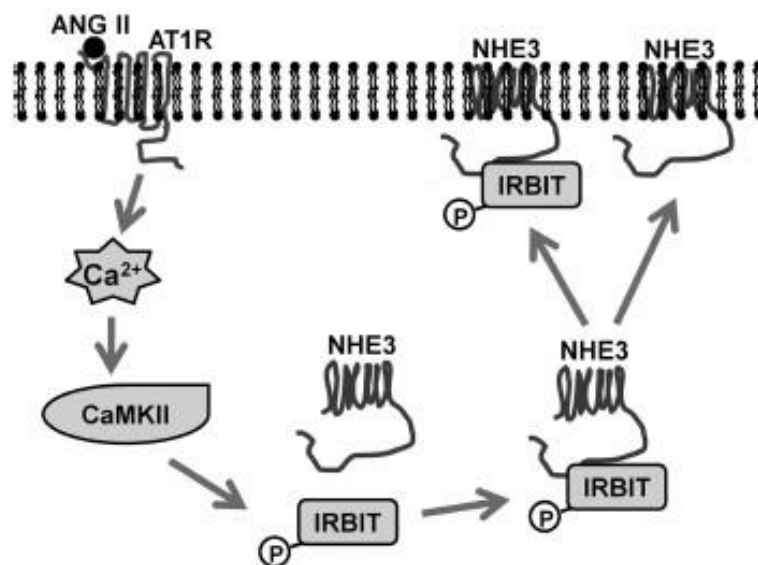
Isto tako, jedan od bolje pojašnjenih mehanizama uključuje enzim *kazein kinazu II (CK II)*. Enzim *CK II* stimulira protein NHE3 pod bazalnim uvjetima tako što se veže na njegovu citoplazmatsku domenu i fosforilira aminokiselinu Ser719. Važno je napomenuti da vezno mjesto enzima *CK II* nije isto onomu koje fosforilira (Sarker i sur. 2008.). Fosforilacijom se povećava ekspresija proteina NHE3 na apikalnoj membrani i potiče sinteza novostvorenih proteina. Isto tako se fosforilacijom stimulira njegova aktivnost. Mutacijom aminokiseline Ser719 pokazala se smanjena ekspresija proteina NHE3 kao i njegova aktivnost iako se količina proteina unutar stanice nije smanjila. Time je pokazano da enzim *CK II* ima važnu ulogu u regulaciji i ekspresiji proteina NHE3 (Sarker i sur. 2008.).

Sam mehanizam kojim fosforilacija mijenja aktivnost proteina NHE3 još nije otkriven. Smatra se da fosforilacija mijenja njegovu aktivnost alosteričkim pomakom koji je uzrokovan velikim, fosfatnim, bočnim lancem (Kocinsky i sur. 2007.). Isto tako se smatra da fosforilacija utječe na unutarstanično kretanje NHE3 kao i na interakciju s drugim regulatornim proteinima.

1.5.1.2. Tkivna lokalizacija proteina NHE3

Protein NHE3 se razlikuje od ostalih izoformi time što se on kreće između stanične membrane i unutarstaničnih odjeljaka procesom recikliranja. Pokazalo se da protein NHE3u stanicama bubrega i crijeva, postoji unutar četiri različita odjeljka: statična subpopulacija koja se stalno nalazi na apikalnoj membrani, pokretna subpopulacija koja se kreće između apikalne membrane i unutarstaničnih odjeljaka i dva unutarstanična odjeljka koja se mogu razlikovati po svojoj brzini izmjene proteina NHE3 koji se nalaze na apikalnoj membrani (Alexander i sur. 2005.).

Postoje mnogobrojni faktori koji utječu na površinsku ekspresiju proteina NHE3. Jedan od njih je protein IRBIT (protein koji se veže za receptor i oslobođen u prisutnosti inozitol 1,4,5-trifosfata, IP3) koji se pod utjecajem proteina angiotenzina II veže za protein NHE3 i zajedno s njim, kao i s enzimom *kalmodulin kinazom II (CaM K II)* utječe na povišenu ekspresiju proteina NHE3. U taj mehanizam još ulazi i neophodna fosforilacija proteina IRBIT kao i prisutnost iona Ca^{2+} (He i sur. 2010.) (Slika 5).



Slika 5. Prikaz regulacije NHE3 preko CaMK II i IRBIT i njegova ekspresija. Aktivacijom receptora za protein angiotensin (angiotensin receptor, AT1R) dolazi do nakupljanja unutarstaničnog iona Ca^{2+} što dovodi do aktivacije enzima CaM kinaze II. Enzim CaM kinaza II potom fosforilira protein IRBIT čime se povećava njegova interakcija s proteinom NHE3 i time dovodi do povećane ekspresije proteina NHE3 na apikalnoj membrani (Preuzeto od: He i sur. 2010.)

Do sada je otkriveno vrlo malo mehanizama koji direktno imaju utjecaj na ekspresiju proteina NHE3, a još manje ih se u potpunosti razumije. Zna se da su svi mehanizmi usko povezani i da im je

konačni cilj pravilno aktivirati protein NHE3 kako bi se on mogao eksprimirati na površini membrane i pravilno obavljati svoju funkciju.

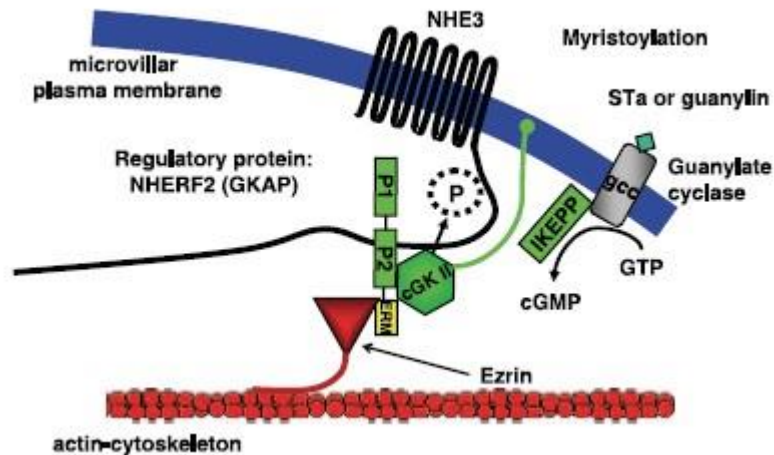
1.5.1.3. Protein-protein interakcija

Pored regulacije u kojoj se pojedini regulatorni protein veže za specifično mjesto unutar citoplazmatske domene preko koje stimulira ili inhibira protein NHE3, važnu ulogu u regulaciji imaju i veliki proteinski kompleksi unutar kojih proteini reagiraju međusobno te se preko PDZ-domena tzv. pomoćničkih proteina vežu na citoplazmatsku domenu proteina NHE3 (Zachos i sur. 2005.).

PDZ-domene su strukturne domene sastavljene od približno 90 aminokiselina, a pronađene su unutar različitih signalnih proteina, bakterija, kvasca, biljaka i virusa. Naziv su dobili prema proteinima u kojima su otkriveni: Protein post-sinaptičke gustoće (eng. *Post synaptic density protein, PSD95*), veliki tumorski supresor u *Drosophila* (eng. *Drosophila disc tumor suppressor, Dlg1*) i protein zonula occludens-1 (eng. *Zonula occludens-1 protein, zo-1*) ili skraćeno PDZ. Proteini koji sadrže PDZ domene potpomažu sastavljanju velikih proteinskih kompleksa unutar staničnih membrana i omogućuju njihovu pravilnu regulaciju. Iz tog razloga se ove domene vežu za krajeve regulatornih domena, u ovom slučaju, za kraj citoplazmatske domene proteina NHE3. Proteini koji sadrže ove domene, a ujedno i reguliraju protein NHE3 su proteini regulatori Na^+/H^+ proteinskog izmjenjivača 1 (NHERF1), 2, 3 i 4 te gen *PDZK1* koji kodira stvaranje regulatornog faktora Na^+/H^+ proteinskog izmjenjivača (NHE-RF3).

Primjer stvaranja proteinskih kompleksa uz pomoć PDZ domene predstavlja i vezanje proteina NHE3 za citoskelet stanice. NHE3 se za citoskelet veže preko dva segmenta smještena unutar citoplazmatske domene. Prvi segment, Phe509-Arg529, se preko proteina ezrina veže za citoskelet, dok se drugi segment, Leu586 do Arg605, veže za protein ezrin i citoskelet preko proteina NHERF.

Drugi poznati mehanizam proteinskih kompleksa je regulacija proteina NHE3 preko cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) zahvaljujući proteinu NHERF2 i njegovoj PDZ domeni (Hwang i sur. 2000.) (Slika 6).



Slika 6. Mehanizam regulacije proteina NHE3 stvaranjem proteinskog kompleksa NHE3-NHERF2-cGKII. *Vežanjem NHERF2 za vezno mjesto unutar citoplazmatske domene proteina NHE3 aktivira se izlučivanje enzima cGKII koji se potom veže na dva vezna mjesta. Prvo se nalazi na apikalnoj membrani i veže se procesom miristolacije, a drugo je za PDZ domenu proteina NHERF2. Vežanjem na ta dva mjesta, enzim cGKII se aktivira i tada stimulira izlučivanje cGMPa i inhibiciju proteina NHE3 (Preuzeto od: Cha i sur. 2005.)*

Danas je poznato da protein NHE3 postoji kao dio velikih, proteinskih kompleksa koji su dinamični i mijenjaju se kao dio njegove regulacije. Proteini koji su dio tih kompleksa uključuju proteine NHERF1, 2, 3 i 4 sa svojim PDZ domenama.

1.5.2. Dugoročna regulacija

Studije su pokazale da se regulacije proteina NHE3 odvijaju tijekom nekoliko minuta (kratkoročna) do nekoliko sati (dugoročna) nakon stanične aktivacije. Akutna ili kratkoročna regulacija je ubrzana i reverzibilna i često uključuje promjene u fosforilaciji, kretanju i dinamičkim interakcijama s regulatornim proteinima (He i Yun 2009.). Suprotno tome, dugoročna regulacija proteina NHE3 uključuje transkripcijske i translacijske modifikacije izmjenjivača. Tvari koji sudjeluju u dugoročnoj regulaciji uključuju regulatorne faktore poput glukokortikoida, aldosterona, metaboličke acidoze, kronične hiperosmolalnosti i proupalnih citokina (IFN- γ i TNF- α) koji smanjuju ekspresiju proteina NHE3 (He i Yun 2009.).

1.5.2.1. Efekti glukokortikoida

Glukokortikoidi stimuliraju apsorpciju crijevne vode i NaCl, efekt koji se događa unutar nekoliko sati. Kod pokusa gdje su zečevi tretirani metilprednizolonom u rasponu od 24 do 72 sata pokazuju povećanje ekspresije gena *NHE3* za 100% dok oni tretirani aminoglutetimidom pokazuju smanjenje ekspresije za 50%. Pokazano je da metilprednizol potiče stvaranje glasničke RNA (mRNA) za *NHE3* 4-6 puta. Ovaj se učinak metilprednizola očituje regulacijom transkripcije i/ili regulacijom promjene stabilnosti mRNA (Freiberg i sur. 1982.).

1.5.2.2. Kronična acidoza i izmjena Na^+/H^+

Kronična acidoza je stanje u kojem se odvija povećana izmjena iona Na^+ za ion H^+ unutar epitela proksimalnih kanalića. Studije su pokazale da metabolička i respiratorna acidoza u stanicama proksimalnih kanalića povećava aktivnost proteina *NHE3* paralelno s povećanjem količine njegove mRNA (Moe i sur. 1991.). Ovakav odgovor na acidozu nije trenutačan i reguliran je na transkripcijskoj i/ili posttranskripcijskoj razini povećanjem koncentracije mRNA transkripcije, njezine stabilnosti ili boljim prevođenjem u protein. Mehanizam koji posreduje povećanju količine mRNA kao odgovor na acidozu uključuje i enzim *protein kinazu C* (Donowitz, M. i sur. 1996.).

1.6. Važnost regulacijske poddomene smještene između Leu586 – Arg609

Već je ustanovljeno kako je citoplazmatska domena mjesto vezanja mnogih stimulatora i inhibitora aktivnosti proteina *NHE3*. Sastavljena je od poddomena koje sudjeluju u regulaciji aktivnosti *NHE3* (Donowitz i sur. 2001.). Serijom točkastih mutacija, otkriveno je da aminokiselinski slijed Leu586-Arg605 ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti *NHE3*. Stimulacijski i inhibicijski učinci različitih čimbenika se dijelom ostvaruju i putem njihova vezanja na poddomenu Leu586-Arg605. Tako se na ovu poddomenu vežu kalmodulin (CaM), enzim *kalmodulin kinaza II* (*CaM K II*), kazein kinaza II (CK II), fosfolipaza C (PLC γ) i proteini NHERF1 i 2 (Donowitz i sur. 1982.).

Protein CaM i enzim *CaM K II* su prisutni u epitelu crijeva i proksimalnih kanalića i sudjeluju u regulaciji neutralne NaCl apsorpcije. Bazična aktivnost proteina *NHE3* je inhibirana ovim regulatorima, a mehanizam regulacije uključuje njihovo vezanje unutar aminokiselinskog slijeda Leu586-Arg605 (Žižak i sur. 2003.). Učinci kalmodulina i *CaM K II* na *NHE3* odvijaju se u prisutnosti iona Ca^{2+} (Cohen i sur. 1990.).

Regulaciju NHE3 posreduju i veliki proteinski kompleksi koji se preko proteina s PDZ domenama vežu na protein NHE3. Važni proteini s PDZ domenom koji sudjeluju u stvaranju proteinskih kompleksa a istodobno se vežu na NHE3 su NHERF1 i NHERF2. Oni se vežu za NHE3 unutar segmenta Leu586-Arg605 i posreduju u inhibiciji bazične aktivnosti proteina NHE3 tako što aktiviraju specifične regulatorne proteine (Yun i sur. 1995.).

Jedan od mehanizama inhibicije uključuje regulacijske proteine NHERF1 ili NHERF2 koji se s jedne strane vežu na segment Leu586-Arg609, a sa druge na protein ezrin. Protein ezrin potom aktivira cAMP i to za posljedicu ima oslobađanje i aktiviranje enzima *protein kinaze A (PKA)*. Enzim tada fosforilira i inhibira protein NHE3 (Žižak i sur. 1999.). S druge strane, regulacijski proteini NHERF1 ili NHERF2 posreduju u aktivaciji *protein kinaze A (PKA)* koja potom fosforilira i inhibira protein NHE3 (Žižak i sur. 1999.). NHERF1 i NHERF2 se s jedne strane vežu na segment Leu586-Arg605, a sa druge na protein ezrin. Protein ezrin potom aktivira cAMP što za posljedicu ima oslobađanje i aktiviranje enzima PKA.

Nedavne su studije pokazale da cGMP i enzim *cGKII* na sličan način preko proteina NHERF2 sudjeluju u inhibiciji bazične funkcije proteina NHE3 (Slika 6.).

Dosadašnje studije, prema tome, pokazuju da aminokiselinski slijed Leu586-Arg609 posjeduje vezna mjesta koja služe za inhibiciju bazične aktivnosti proteina NHE3 te time sudjeluje u održavanju pravilne homeostaze organizma i sprječavanju prevelikog gubitka vode tijekom procesa probave.

1.7. Ciljevi istraživanja

Aminokiselinski slijed Leu586-Arg609 je segment proteina NHE3 za koji se vežu brojni regulatori, poput kalmodulina, enzima *kalmodulin kinaze II*, *kazein kinaze II* i proteina NHERF1 i 2. Mehanizam djelovanja ovih regulatora na NHE3 još uvijek nije razjašnjen. Između ostalog, nepoznato je djeluju li oni isključivo preko segmenta Leu586-Arg609 i je li vezanje za ovaj segment ključan za njihovo djelovanje. Kako bi dobili odgovore na ova pitanja potrebno je segment Leu586-Arg609 isjeći iz NHE3 i zatim vidjeti hoće li se izgubiti učinak regulatora.

Stoga je cilj ovog rada isjeći segment Leu586-Arg609 iz proteina NHE3 i provjeriti hoće li navedena delecija u NHE3, u stanicama fibroblasta, utjecati na ekspresiju i bazičnu funkcionalnost transfeciranog mutiranog proteina NHE3 .

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Kemikalije

2.1.1.1. Početnice

- A (pozitivna) CTGGTGACGCGCTTCACC
- B (negativna) CTCTGCGTCGTAGGAGACGGAGGCCTC
- C (pozitivna) GAGGCCTCCGTCTCTCTACGACGCAGAGGACGTCATC
- D (negativna) GTCGGAGGTCGTGTCCTT
- T (negativna) GCTGCGCCGCCGCTG

2.1.1.2. Enzimi

- Enzim *T4 ligaza*
- Restriksijska endonukleaza *BbrPI (PmaCI)* (Roche)
- Enzim *fosfataza* (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) (Fermentas)
- Enzim *Taq DNA polimeraza*, (TaKaRa)
- Restriksijska endonukleaza *HindIII* (Promega)
- Restriksijska endonukleaza *KpnI* (Promega)

2.1.1.3. Pufferi

- TE puffer (*pH 8, 10 mM Tris, 1 mM EDTA*)
- 50x TAE puffer (*pH 8.5, 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 1 mM EDTA*)
- Puffer za nanošenje uzoraka na agarozni gel 10x Sample loading dye, (BioRad)
- DNA marker *exACTGene™ DNA Ladders 1 kb* s fragmentima molekularne mase 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pb
- HBSS puffer (**H**ank's **B**alanced **S**alt **S**olution) bez kalcija i magnezija (Gibco – Invitrogen Cat.N#14170-088)
- TMA puffer (TMA-Cl 1.3 M, KCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, MgSO₄ 10 mM, HEPES 200 mM, TMA-OH 80 mM)

Za pojedine enzime i njihove kombinacije koristila sam odgovarajuće pufere prema preporuci proizvođača:

- Puffer za *Taq* polimerazu (Takara)
- Puffer za *T4 DNA ligazu* (Roche)
- NEB puffer 2 je korišten za kombinaciju *HindIII* i *KpnI* restriksijske enzime

2.1.1.4. Komercijalni kompleti

- Za izolaciju DNA fragmenata iz agaroznog gela koristila sam komercijalni komplet QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Za izolaciju plazmidne DNA koristila sam komercijalne komplete QIAprep Spin Mini-prep Kit (Qiagen) i QIAprep Spin Midi-prep Kit (Qiagen)

2.1.1.5. Reagensi

- Deoksinukleotid trifosfat dNTP, (2.5 mM)
- Agaroz UltraPure Agarose (Invitrogen)
- Boja za prikaz nukleinskih kiselina u gelu (GelStar Nucleic Acid Gel Stain 10000X, Lonza)
- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
- Antibiotik ampicilin (*stock* koncentracija 100 mg/ml)
- Antibiotik Geneticin (G418 sulfate) (koncentracija 400 µg/ml) (Gibco-Invitrogen)
- bakto-tripton (Difco)
- Deionizirana voda
- HBSS pufer (8 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.14 g CaCl₂, 0.01 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g MgCl₂·6H₂O, 0.06 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0.06 g KH₂PO₄, 1 g glukoza)
- 1x TMA pufer (1.3 M TMA-Cl, 50 mM KCl, 20 mM CaCl₂, 10 mM MgSO₄, 200 mM HEPES, 80 mM TMA-OH)

2.1.1.6. Plazmidni vektor

Za izradu mutirane molekule NHE3 koristila sam plazmid *pcDNA 3.1(+)* s ranije ukloniranim cDNA za *NHE3* (Gene ID 100009430; *Oryctolagus cuniculus*, L.). Plazmid *pcDNA 3.1(+)* komercijalni je plazmid s višestrukim mjestom za kloniranje unutar kojeg je između restrikcijskih mjesta za enzime *HindIII* i *XbaI* uklonirana sekvenca za *NHE3* (*pcDNA/NHE3*).

NHE3 korišten u ovom radu je unutar svoje sekvence imao ugrađenu sekvencu za biljeg HA koji se koristio za potrebe imunološke detekcije (*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)). U gen *NHE3* su, između nukleotida koji kodiraju aminokiseline Glu37-Ile38, ugrađene sekvence za tri kopije biljega HA. Biljeg HA je peptid deriviran iz glikoproteina *Human influenza hemagglutinin* i sastavljen je od 9 aminokiselina (YPYDVPDYA). Protein NHE3 i sekvence *NHE3* koji su se koristili u ovom radu posjeduju triplet biljega HA zbog čega su označavani kraticom protein HA-NHE3 odnosno sekvenca *HA-NHE3*.

2.1.2. Programi

- NEB Tm Calculator (BioLabs) (<http://tmcalculator.neb.com/#/>)
- NEB Ligation Calculator (<http://nebiocalculator.neb.com/#/ligation>)

2.1.3. Stanice

- Stanice fibroblasta linije PS120 u odgovarajućem mediju (PS120 je stanična linija dobivena iz fibroblasta pluća linije CCL39 kineskog hrčka)
- Bakterije *Escherichia coli* soja One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen)
- Bakterije *Escherichia coli* soja DH5α

2.1.4. Hranjive podloge

Za kulturu stanica koristila sam:

- DMEM medij (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) s dodatkom 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 50 U/ml penicilina, 50 g/ml streptomicina, 400 μg/ml G418 (*Neomycin*) i 10% fetalnog seruma (*Gibco Invitrogen Corporation*)

Za umnažanje transformiranih bakterija (*E. coli*) koristila sam:

- LB hranjivi medij (*Luriya-Bertani*) sastava 10 g/l NaCl, 5 g/l baktokvašćev ekstrakt i 10 g/l baktotripton (*Difco Laboratories*)
- SOC medij sastava 2% tripton, 0.5% baktokvašćev ekstrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza (*Invitrogen*)

Za selekciju transformiranih bakterija koristila sam:

- LB hranjivu krutu podlogu (**Luriya-Bertani** medij) sastava 10 g/l NaCl, 5 g/l baktokvašćev ekstrakt, 10 g/l baktotripton i 15 g/l baktogara s dodatkom ampicilina do koncentracije od 100 μg/ml (*Difco Laboratories*)

Za transfekciju koristila sam:

- Opti-MEM® medij s reduciranim serumom je modificirani *Eagle's Minimum Essential Media*, puferiran sa HEPESom i Na-bikarbonatom s dodatkom hipoksantina, timidina, Napiruvata, L-glutamina, i faktora rasta u tragovima (*Life Technologies*)

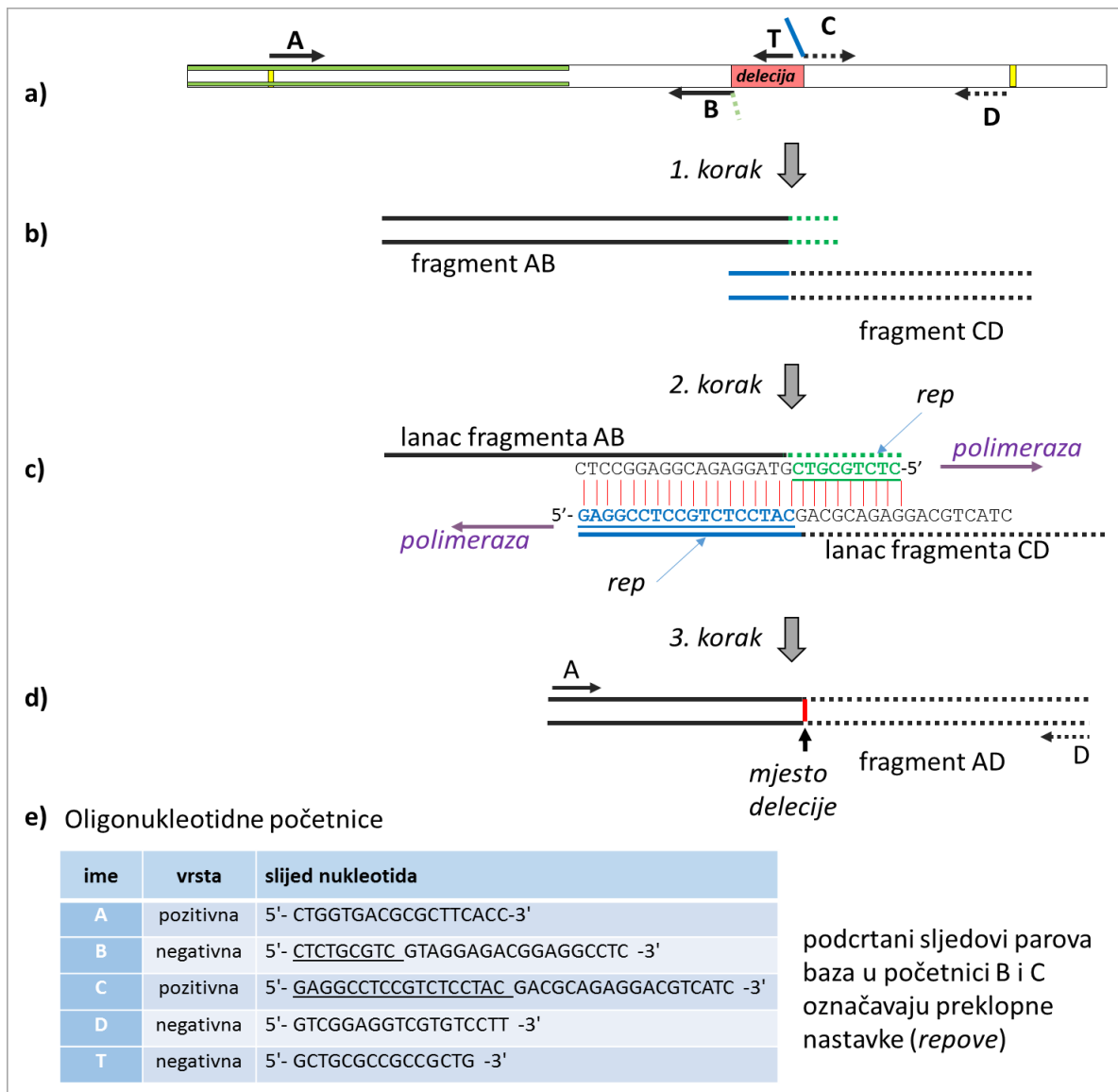
2.1.5. Oprema

- PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems)
- epruvete (Eppendorf 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml i 1 ml)
- epruvete (Falcon, 14, 15 i 50 ml)
- Mješalica (*vorteks*, Fisher Scientific)
- Mini centrifuga (Fisher Scientific)
- Uređaj za elektroforezu s odgovarajućom kadicom, češljicom za izradu jažica i izvorom istosmjerne struje (PowerPac 200, BioRad)
- Blok za zagrijavanje (Digital heatblock, VWR)
- Inkubator (Isotemp Incubator, Fisher Scientific)
- Centrifuga (Centrifuge 5415D, Eppendorf)
- Vodena kupelj (Microprocessor Controlled 280 Series Water Bath, Precision)
- Pipetori različitih volumena (Gilson)
- Nastavci za automatske pipete različitih volumena (Thermo Scientific)
- Vakum sisaljka (Maxima dry, FisherScientific)
- Termostatirana rotacijska tresilica (Max^QMini 4000, Barnstead Lab-Line)
- Magnetna mješalica (Fisher Scientific)
- pH metar (PerpHectT[®] LogR[®] Meter model 320, Thermo Orion)
- Vaga (APX-402, Denver Instrument)
- UV-transiluminator (lampa s ultra-ljubičastim svjetlom) (UV lampa)
- Invertni mikroskop (Axiovert 25, Zeiss)
- Inkubator (Heracell 150, Heraeus)
- Sterilna komora (Heraeus)
- Uređaj za sterilizaciju (Autoklav, Kambič)
- NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)

2.2. Metode

2.2.1. Strategija kloniranja cDNA NHE3 s delecijom

Za stvaranje fragmenata, njihovo međusobno povezivanje te naknadnu provjeru uspješnosti u stvaranju mutiranog plazmida s delecijom dizajnirala sam pet početnica (Slika 7.).



Slika 7. Strategija kloniranja s delecijom. (a) shematski je prikazana sekvenca NHE3 i pozicije dizajniranih početnica A, B, C, D i T. (b) fragmenti AB i CD koji nastaju djelovanjem početnica A i B odnosno C i D. Preklopni nastavci se nalaze na kraju fragmenta AB (zelene isprekidane linije) i na početku fragmenta CD (plave isprekidane linije). (c) povezivanje lanca fragmenta AB s lancem fragmenta CD komplementarnim sparivanjem repa fragmenta AB s početnom sekvencom fragmenta CD te repa fragmenta CD sa završnom sekvencom fragmenta AB. Nakon povezivanja fragmenata preko preklopnih nastavaka veže se DNA polimeraza i sintetizira komplementarne lance čime se stvara fragment AD (d) umnožavanje fragmenta AD (e) sekvence dizajniranih pozitivnih i negativnih oligonukleotidnih početnica

U izradi početnica pazila sam da one budu dovoljno duge kako bi se izbjeglo nespecifično vezanje na drugo, neželjeno, mjesto na DNA sekvenci. Prve dvije početnice, početnica A i B, dizajnirane su za stvaranje fragmenta AB koji se nalazi neposredno ispred sekvence *NHE3* koju sam postupkom delecije željela ukloniti. Sekvenca početnice A (pozitivna ili *sense* početnica) se sa svojih 18 nukleotida komplementarno sparuje sa sekvencom *NHE3* koja počinje s aminokiselinom Leu273. Sekvenca početnice B (negativna ili *antisense* početnica) se komplementarno sparuje sa sekvencom *NHE3* koja prethodi mjestu delecije (Slika 7.a.). Obje početnice su duge 18 parova baza, s tim da sam početnici B dodala još i preklopni nastavak (rep dug 9 nukleotida) čija se sekvenca komplementarno sparuje sa sekvencom *NHE3* neposredno iza mjesta delecije (Asp610-Glu612). Sljedeće dvije početnice, početnica C i D, dizajnirane su za stvaranje fragmenta CD koji se nastavlja neposredno iza delecije. Sekvenca početnice C (pozitivna početnica) komplementarno se sparuje sa sekvencom *NHE3* koja slijedi neposredno nakon delecije. Sekvenca negativne početnice D komplementarno se sparuje sa sekvencom *NHE3* koja započinje sa aminokiselinom Asp750 (Slika 7.a.). Početnice C i D duge su 18 parova baza s tim da sam početnici C dodala preklopni nastavak (rep dug 18 nukleotida) čija se sekvenca komplementarno sparuje sa sekvencom *NHE3* koja neposredno prethodi mjestu delecije. Prema tome, sekvenca preklopnog nastavka negativne početnice B komplementarno se sparivala sa sekvencom koja kodira aminokiseline Asp610-Glu612, dok se sekvenca preklopnog nastavka pozitivne početnice C komplementarno sparivala sa sekvencom koja kodira aminokiseline Glu580-Tyr585. Dizajniranje repova na početku negativne početnice B i pozitivne početnice C bilo je potrebno radi provođenja metode kojom sam iz *NHE3* deletirati sekvencu koja kodira 24 aminokiseline (Leu586-Arg609). Povezivanjem fragmenata AB i CD stvorila sam mutirani fragment (fragment AD) iz kojeg je postupkom delecije uklonjena sekvenca za 24 aminokiseline (Slika 7.d.).

Pri izboru pozicija za početnice A i D pazila sam da se unutar oba fragmenta nalaze restriksijska mjesta koja ću kasnije koristiti kako bih uz pomoć restriksijskih endonukleaza odgovarajući segment u sekvenci *NHE3* zamijenila mutiranim fragmentom.

Pored ove četiri glavne početnice, dizajnirala sam još jednu testnu početnicu, negativnu početnicu T, čija se sekvenca komplementarno sparuje sa sekvencom koja kodira aminokiseline Glu603-Ser607. Početnicu T, koja je pozicionirana unutar segmenta kojeg sam planirala izbaciti iz *NHE3*, koristila sam u svrhu provjere uspješnosti postupka delecije (Slika 7.a.).

Pri konstrukciji početnica, pazila sam da početnice (15-18 pb) i preklopni nastavci (9-18 pb) budu dovoljno dugi kako bi se lakše povezivali. Nastojala sam izraditi početnice čije bi temperature spajanja bile približno jednake te da nemaju međusobno komplementarne dijelove kako ne bi došlo do neželjenog međusobnog spajanja. Za određivanje temperature spajanja koristila sam NEB Tm Calculator (BioLabs).

Dizajnirane početnice sam dala sintetizirati u *Invitrogenu*, UK, preko Biosistema. Po primitku sam liofilizirane početnice otopila prema uputama proizvođača i priredila ih za potrebe rezervne zalihe

(stock) u koncentraciji od 100 μM u sterilnoj vodi odnosno kao radne pripravke za potrebe pokusa u koncentraciji od 10 μM . Tako pripremljene radne zalihe početnica su korištene za PCR reakcije.

2.2.2. Reakcije PCR na predložku plazmidne DNA

Reakcija polimerazom (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) je brza i specifična metoda sinteze *in vitro* nukleinskih kiselina kojom se odabrani odsječci DNA (geni ili dijelovi gena) umnažaju u velikom broju kopija. Kao predložak za umnažanje koristila sam plazmidnu DNA, *pcDNA 3.1(+)* u čije je višestruko mjesto za kloniranje umetnuta cDNA *NHE3*.

Reakcijska smjesa za PCR reakciju, ukupnog volumena od 50 μl , sadržavala je:

- plazmidnu DNA (100 ng)
- par oligonukleotidnih početnica (125 ng)
- smjesu deoksiribonukleotida dNTP (200 μM svaki)
- PCR pufer
- Taq DNA polimerazu (2.5 U)

Za amplifikaciju sam koristila Taq DNA polimerazu. Reakciju umnažanja provodila sam u stroju za lančanu reakciju polimerazom (2720 ThermalCycler, *Applied Biosystems*), a uvjeti pod kojima sam provodila reakcije ovisili su o svojstvima regija koje sam umnažala. Ukratko, nakon denaturacije od 60 sekundi na 95 $^{\circ}\text{C}$, slijedilo je povezivanje početnica (*engl. annealing*) tijekom 1 minute na temperaturi od 55 $^{\circ}\text{C}$ (obično sam koristila raspon temperature između 55-75 $^{\circ}\text{C}$), i potom sinteza nukleinskog lanca na 72 $^{\circ}\text{C}$.

Trajanje sinteze ovisilo je o veličini PCR produkta (1 minuta za svakih 1000 bp). Pri umnažanju plazmidne DNA očekivana je pojava nespecifičnih produkata.

2.2.3. Prespajanje DNA tehnikom preklapanja dvaju fragmenata

Prespajanje sekvence DNA tehnikom povezivanja fragmenata preko preklopnih nastavaka bazira se na konstrukciji mutiranih DNA fragmenata *in vitro* koji na svojim 5'-krajevima posjeduju preklopne nastavke. Preklopni nastavci sadrže željenu mutaciju bilo da se radi o deleciji određenog segmenta sekvence DNA ili ubacivanju segmenta unutar postojeće sekvence. Generirajući dva DNA fragmenta s preklopnim nastavcima, reakcijom PCR ih je moguće spojiti zahvaljujući nastavcima koji su komplementarni sekvenci drugog fragmenta.

Izbacivanje sekvence od 72 nukleotida koji kloniraju 24 aminokiseline započet je konstrukcijom početnica za stvaranje dva fragmenta (AB i CD) koji na svojim 5' krajevima sadrže preklopne nastavke

za međusobno povezivanje. Za stvaranje preklapnih nastavaka bilo je neophodno dizajnirati početnice koje će na svom 5' kraju posjedovati preklapnu sekvencu. Za fragment AB to je bila negativna početnica B, dok je za fragment CD to bila pozitivna početnica D (Slika 7.e.). Početni dio negativne početnice B je bio komplementaran sekvenci koja je neposredno prethodila mjestu delecije, dok je preklapni nastavak koji je ostajao slobodan poput repa posjedovao sekvencu komplementarnu sekvenci koja je slijedila odmah iza mjesta delecije. Za fragment CD pozitivna početnica C je bila odgovorna za deleciju. Završni dio početnice C je bio komplementaran sekvenci koja slijedila neposredno iza delecije dok je preklapni nastavak posjedovao sekvencu koja je bila komplementarna sekvenci koja je prethodila deleciji. Pojednostavljeno, rep početnice B bio je komplementaran početku fragmenta CD, dok je rep početnice C bio komplementaran kraju fragmenta AB (Slika 7.b-c.).

U prvoj se reakciji PCR najprije stvore fragmenti AB i CD sa svojim preklapnim nastavcima (Slike 7.b.). Reakcija PCR je provedena u prisutnosti sve četiri početnice (početnice A, B, C i D), plazmida *pcDNA/HA-NHE3*, *Taq polimeraze*, nukleotida i odgovarajućeg pufera. Sastav prve smjese PCR prikazan je u Tablici 1, dok su postavke reakcije PCR prikazane su u Tablici 2.

Tablica 1. Sastav smjese prve reakcije PCR

	fragment AB (μ l)	fragment CD (μ l)
početnica A (10 μ M)	1.5	
početnica B (10 μ M)	1.5	
početnica C (10 μ M)		1.5
početnica D (10 μ M)		1.5
pcDNA/HA-NHE3 (17 ng/ μ l)	3	3
dNTP (2.5 mM)	3	3
Taq pufer 10x	5	5
<i>Taq polimeraza</i> (5 U/ μ l)	1	1
dH ₂ O	35	35
Ukupno	50	50

Tablica 2. Postavke prve reakcije PCR

Korak I	Korak II (30 ciklusa)			Korak III
95 °C	94°C	55°C	72°C	72 °C
1'	1'	1'	2'	7'

Druga reakcija PCR je provedena u prisutnosti fragmenata AB i CD, *Taq polimeraze*, nukleotida i odgovarajućeg pufera, a u odsutnosti početnica. Tijekom ove reakcije PCR lanci DNA molekula se pri visokoj temperaturi (95 °C) razdvoje i zatim se pri sniženoj temperaturi (72 °C) događa povezivanje preklopnih nastavaka lanaca dvaju fragmenata. Tako se preko preklopnih nastavaka lanac fragmenta AB poveže s lancem fragmenta CD (Slika 7.c.). Nakon povezivanja lanaca dvaju fragmenata dolazi do elongacije tako što se DNA polimeraza veže na krajeve povezanih preklopnih lanaca i sintetizira komplementaran lanac na kalupu povezanog lanca (Slika 7.c.). Na taj način od dva fragmenta nastaje novi mutirani fragment AD. S obzirom da sam u reakcijskoj smjesi imala ograničenu količinu raspoloživih fragmenata AB i CD broj ciklusa je smanjen. Sastav druge smjese PCR prikazan je u Tablici 3., dok su postavke reakcije PCR prikazane su u Tablici 4.

Tablica 3. Sastav smjese druge reakcije PCR.

sastav	μl
fragment AB (38 ng/μl)	5,3
fragment CD (34 ng/μl)	1,5
dNTP (2.5 mM)	2,5
10x Taq pufer	5
<i>Taq polimeraza</i> (5 U/μl)	0,2
H ₂ O	35.5
UKUPNO	50

Tablica 4. Postavke reakcije PCR.

Korak I	Korak II (12 ciklusa)		Korak III
95 °C	95 °C	72 °C	72 °C
1'	1'	2'	7'

Malu količinu mutiranog fragmenta AD, dobivenog u drugoj reakciji PCR, bilo je potrebno umnožiti. Nakon izolacije iz gela mutirani fragment AD je korišten kao predložak za umnožavanje u slijedećoj PCR reakciji. U ovoj su reakciji u reakcijsku smjesu pored fragmenta AD kao predložka, *Taq* polimeraze, nukleotida i odgovarajućeg pufera dodane i početnice A i D koje se komplementarno sparuju s krajevima mutiranog fragmenata AD (Slika 7.d.). Sastav treće smjese PCR prikazan je u Tablici 5., dok su postavke reakcije PCR prikazane u Tablici 6.

Tablica 5. Sastav smjese treće reakcije PCR.

sastav	ul
fragment AD (2 ng/μl)	37
početnica A (10 μM)	1,5
početnica D (10 μM)	1.5
dNTP (2.5 mM)	3
10x pufer	5
Taq DNA polimeraza (5 U/μl)	1
H ₂ O	38
UKUPNO	50

Tablica 6. Postavke reakcije PCR.

Korak I	Korak II (30 ciklusa)			Korak III
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C
1'	1'	1'	2'	7'

2.2.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu je standardna metoda kojom je moguće razdvajati molekule DNA pod utjecajem istosmjernog električnog polja. Na učinkovito razdvajanje fragmenata DNA utječu molekularna veličina i konformacija DNA, jakost električnog polja, sastav pufera za elektroforezu te koncentracija agaroze. U ovom sam radu horizontalnu elektroforezu upotrebljavala za:

- a) provjeru rezultata umnažanja lančanom reakcijom polimeraze
- b) provjeru rezultata cijepanja plazmidne DNA restrikcijskim endonukleazama
- c) izolaciju DNA fragmenata

Ukratko, agarozni gel sam izradila tako što sam agarozu pomiješala s 1xTAE puferom (pH 8,5 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 1 mM EDTA) i potom smjesu zagrijavala u mikrovalnoj dok se nije otopila odnosno dok se nije stvorila prozirna i bistra otopina. Količina agaroze koju sam miješala s 1xTAE puferom ovisila je o postotku gela koji sam izrađivala što je ovisilo o veličini fragmenata DNA koje sam htjela razdvojiti radi lakše identifikacije i analize. Otopljenu agarozu rashladenu do temperature pri kojoj sam posudu s agaroznom smjesom mogla primiti u ruku, izlila sam u nosač gela na koji sam prethodno postavila češalj za formiranje jažica. Prije izlijevanja u kalup, u agaroznu smjesu sam dodala boju za gel (*Gel Star Nucleic Acid Gel Stain*) u omjeru 1:10 000. Radi se o interkalirajućem reagensu koji se ugrađuje između lanca DNA i time omogućuje vizualizaciju DNA pod UV svjetlom.

Nakon polimerizacije agaroznog gela, nosač gela sam položila u kadicu za elektroforezu i potom u kadicu ulila 1xTAE pufer tako da sloj pufera iznad gela bude približno 5 mm. Iz gela sam potom izvadila češalj iza kojeg su u gelu ostale formirane jažice. Uzorke sam, prije nanošenja u jažice agaroznog gela, miješala s puferom za nanošenje uzoraka (*loading dye*) u omjeru 10:1. Elektroforezu sam provodila pod stalnim naponom od 100 V, a trajanje je ovisilo o veličinama fragmenata DNA koje je trebalo analizirati i/ili izolirati.

U svrhu određivanja veličina fragmenata DNA, na gel sam nanosila biljeg molekulske mase. fragmenti DNA su nakon završene elektroforeze vizualizirani pomoću UV-transiluminatora i snimljeni kamerom.

2.2.5. Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela

Izolaciju fragmenata DNA, nastalih reakcijom PCR ili djelovanjem restrikcijskih endonukleaza, iz agaroznog gela provodila sam u svrhu njihova pročišćavanja od početnica i ostalih nespecifičnih produkata koji mogu interferirati u postupku kloniranja. U tu svrhu koristila sam komercijalni komplet za izolaciju DNA iz gela (QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)) i DNA fragmente izolirala prema uputama proizvođača.

Ukratko, nakon što sam reakcijom PCR ili djelovanjem endonukleaza dobila željeni fragment DNA, pod UV svjetlom sam iz gela izrezala najmanji mogući komadić gela koji je sadržavao željeni

fragment DNA. Izrezani komadić gela sam izvagala i potom otopila u 3 volumena pufera za otapanje gela. Smjesu sam zatim inkubirala 10 min na 50 °C u svrhu potpunog otapanja agaroznog gela, nakon čega sam u nju dodala 1 volumen izopropanola i sve promiješala. Otopinu sam u sljedećem koraku nanijela na kolonu za izolaciju DNA, koju sam zatim centrifugirala 1 minutu na 12500 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam kolonu isprala s puferom za ispiranje kojim su se s kolone uklonile nečistoće i različite soli. Ispiranje sam provela dodavanjem 750 µl pufera za ispiranje i centrifugiranjem kolone 2x 1 minutu na 12500 okretaja/min. Drugim centrifugiranjem sam se riješila zaostalog etanola u koloni. Skidanje DNA s kolone provela sam dodavanjem 50 µl elucijskog pufera (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) u središnji dio kolone u kojem se nalazi vezana DNA nakon čega sam kolonu centrifugirala ponovno 1 minutu na 12500 okretaja/min. Koncentracija i čistoća otopljene DNA određivala sam mjerenjem apsorbancije na 260 nm i 280 nm pomoću uređaja *NanoDrop*. Nakon određivanja koncentracije DNA uzorak sam pohranila na -20 °C

2.2.6. Cijepanje plazmidne DNA restrikcijskim enzimima

Plazmidnu DNA s genom za nemutirani *NHE3* (*pcDNA/HA-NHE3*) odnosno mutirani *NHE3* (*pcDNA/dHA-NHE3*) tretirala sam restrikcijskim endonukleazama *PmaCI*, *HindIII*, *KpnI* koji prepoznaju i cijepaju nukleotidne sekvence (restrikcijska mjesta):

PmaCI 5'...CAC^GTG...3'
3'...GTC^CAC...5'

HindIII 5'...A^AGCTT...3'
3'...TTCGA^A...5'

KpnI 5'...GGTAC^C...3'
3'...C^CATGG...5'

Djelovanjem enzima *PmaCI* nastaju DNA fragmenti s tupim krajevima, dok djelovanjem enzima *HindIII* i *KpnI* nastaju DNA fragmenti s ljepljivim krajevima. Restrikcijske enzime sam koristila:

- za pripravljanje plazmida *pcDNA/HA-NHE3* u koji će se ugraditi (uklonirati) fragment s mutiranom sekvencom (umetak),
- za ispitivanje uspješnosti ugradnje umetka u plazmidni vektor *pcDNA/HA-NHE3*
- za ispitivanje orijentacije umetka unutar mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3*

2.2.7. Defosforilacija tupih krajeva plazmida tretiranog restrikcijskom endonukleazom *PmaCI*

Kako bih spriječila recirkulaciju plazmida *pcDNA/HA-NHE3*, prethodno tretiranog endonukleazom *PmaCI*, plazmid sam podvrgnula postupku defosforilacije. Naime, *PmaCI* stvara tupe krajeve koji se tijekom ligacije mogu spojiti i time onemogućiti ugradnju umetka. Defosforilaciju sam provela s enzimom *fosfataza* (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) koja s nukleotida na tupim krajevima odcjepljuje fosfatne skupine. Na taj način je spriječeno međusobno povezivanje odrezanih krajeva.

Ukratko: plazmid pocijepan s enzimom *PmaCI* koji sam u epruveti pomiješala zajedno s enzimom *fosfataza* i prikladnim puferom sam inkubirala na 37 °C kroz 20 min. Nakon toga sam *fosfatazu* inaktivirala dodatnim inkubiranjem na 65 °C tijekom 15 min.

2.2.8. Ugradnja DNA fragmenata u vektorski plazmid postupkom ligacije

Ligacija je postupak koji omogućuje ugradnju fragmenta DNA (umetka) u vektor stvaranjem fosfodieterskih veza između vektora i umetka u prisutnosti enzima *T4 DNA-ligaze*. Ligaciju sam koristila za ugradnju fragmenta AD tretiranog s *PmaCI* (umetak) u vektor *pcDNA/HA-NHE3*. Prije provođenja ligacije bilo je neophodno pripremiti umetak i vektor. Njih sam najprije podvrgnula djelovanju restriksijske endonukleaze *PmaCI* koja vektor i umetak cijepa na dva mjesta, između nukleotida C840-G841 i C1914-G1915. Prije ligacije umetak i plazmid sam izolirala i pročistila, a plazmid sam dodatno defosforilirala da bih tijekom ligacije spriječila međusobno povezivanje odrezanih krajeva vektora.

Ligaciju sam provela u epruveti u prisutnosti *PmaCI* tretiranog i defosforiliranog plazmida *pcDNA/HA-NHE3*, fragmenta AD tretiranog s *PmaCI* (umetak), enzima *T4 ligaze* i odgovarajućeg pufera u ukupnom volumenu od 20 µl. Smjesa je sadržavala vektor i umetak u omjeru 1:3. Za izračunavanje potrebne mase i omjera u reakciji koristila sam program NEBioCalculator. Reakcijsku smjesu sam inkubirala na 16 °C u vodenoj kupelji (Termar Cyder (Applied Biosystems) preko noći. Na kraju sam enzim *ligazu* u ligacijskoj smjesi deaktivirala inkubirajući smjesu na 65 °C tijekom 10 min.

2.2.9. Stvaranje kompetentnih bakterijskih stanica *Escherichia coli* soja DH5 α kemijskom metodom

Bakterijske stanice *Escherichia coli* soja DH5 α inokulirala sam u 3 ml tekućeg LB medija (bez antibiotika) i pustila da narastu preko noći na 37 °C uz 225 okretaja/minuti. Sve sam radila u sterilnim uvjetima.

Sljedeći dan sam 2.5 ml tekućeg medija s naraslim stanicama prenijela u tikvicu sa 150 ml tekućeg LB medija bez antibiotika i inkubirala ga 2 sata na 37 °C i 225 okretaja/minuti. Tijekom inkubacije sam pomoću spektrofotometra na 600 nm, provjeravala optičku gustoću (OD 600) koja mi je bila orijentir za duljinu inkubacije. Idealna gustoća stanica je 0.6, s tim da su vrijednosti 0.7 i 0.8 isto tako prihvatljive. Ukoliko je optička gustoća manja od 0.5, ostavila bih stanice za dodatnu inkubaciju.

Po 30 ml inkubacijskog medija sa stanicama sam nakon inkubacije prenijela u Corex tube i centrifugirala ih 5 min na 4 °C i 5000 okretaja/minuti (3000 g). Uklonila sam supernatant, a talog sam resuspendirala u 15 ml (1/2 volumena) hladnog 50 mM CaCl₂ i potom suspenziju inkubirala na ledu 30 min. Nakon inkubacije, tube sam ponovno centrifugirala 5 min na 4 °C i 5000 okretaja/minuti.

Nakon centrifugiranja sam izbacila supernatant, a stanice sam resuspendirala u 1/10 volumena (3 ml) hladnog 50 mM CaCl₂ i resuspendirane stanice sam razdijelila u tubice. U svaku epruvetu sam stavila po 100 μ l resuspendiranih stanica i pohranila ih na -80 °C.

2.2.10. Transformacija bakterije *E. coli* soj DH5 α plazmidnom DNA

Transformaciju bakterijskih stanica provela sam metodom toplinskog šoka. Ukratko, 5-10 μ l ligacijske smjese pomiješala sam s 100 μ l kompetentnih bakterijskih stanica *E. coli* DH5 α . Smjesu sam potom inkubirala na ledu 30 minuta, nakon čega sam stanice izložila toplinskom šoku pri 42 °C kroz 45 sekundi. Nakon 1 minutnog inkubiranja bakterija na ledu, smjesi stanica sam dodala 600 μ l tekućeg SOC medija i potom smjesu inkubirala jedan sat na 37 °C uz miješanje na 225 okretaja/min. Nakon inkubacije, približno 250 μ l smjese transformiranih stanica sam nasadila na kruti selekcijski LB medij (agar) koji sadrži antibiotik ampicilin i ostavila ih preko noći na 37 °C u inkubatoru.

2.2.11. Umnažanje plazmidne DNA i njena izolacija iz kompetentnih bakterijskih stanica pomoću postupka Mini/Midi prep

Plazmidnu DNA izolirala sam iz transformiranih kompetentnih bakterijskih stanica. Za malu količinu plazmidne DNA, bakterije sam inokulirala u 2 ml, dok sam za veću količinu plazmidne DNA, bakterije inokulirala u 50 ml tekućeg LB medija sa selekcijskim antibiotikom ampicilinom i potom ih

ostavljala da rastu preko noći na 37 °C uz 225 okretaja/min. Nakon ~18 satne inkubacije bakterije sam centrifugirala 2 minute na 4500 g. Ostale korake sam provodila prema uputama komercijalno dostupnih kompleta za izolaciju plazmidne DNA (Mini prep ili Midi prep kit, Qiagen).

Ukratko, istaložene bakterije sam resuspendirala u puferu za resuspendiranje nakon čega sam dodala pufer za lizu stanica i izmiješala sadržaj laganim okretanjem ependorvice. Nakon inkubacije od 3 minute dodala sam neutralizacijski pufer i sadržaj odmah izmiješala laganim okretanjem ependorvice. Nakon kratke inkubacije lizirane bakterije sam centrifugirala kroz 10 minuta pri 13000 g u reakciji Mini prep, dok sam u reakciji Midi prep lizirane bakterije protisnula kroz filter. Nakon centrifugiranja supernatant iz ependorvice sam prenijela na 'kolone' koje specifično vežu plazmidnu DNA. Supernatant u kojem se nalazi plazmidna DNA prilikom centrifugiranja prolazi kroz 'kolonu' pri čemu se plazmidna DNA veže za kolonu. Na kraju, kolonu sam isprala dva puta otopinom za ispiranje i potom dodala 50 µl elucijskog pufera (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) kojim sam plazmidnu DNA eluirala s membrane kolone. Kod primjene Midi prep kompleta plazmidnu DNA sam još dodano pročistila precipitacijom izopropanolom i ispiranjem u 70% etanolu. Koncentraciju plazmidne DNA sam određivala uređajem *Nanodrop*. Izoliranu i pročišćenu plazmidnu DNA sam pohranila na -20°C.

2.2.12. Sekvenciranje mutirane plazmidne DNA

Za izradu ovog diplomskog rada sekvencirani su DNA uzorci mutiranih plazmida za koje je restrikcijским enzimima i PCR reakcijama potvrđena delecija i pravilna orijentacija umetka unutar mutiranog plazmida. Za usluge sekvenciranja korišten je MacroGen-ov servis za sekvenciranje (www.macrogen.com) koji se nalazi u Amsterdamu, Nizozemska. Korištena je njihova usluga "*Standard-seq single Regular*", a za početnice prilikom sekvenciranja su korištene pozitivna početnica A i negativna početnica D te novodizajnirana početnica 1358 koju je za potrebe sekvenciranja za nas izradio MacroGen.

Uzorci su sekvencirani iz oba smjera, korištenjem pozitivne (A) i negativne (D) početnice, radi točnog čitanja čitavog slijeda.

2.2.13. Kultura stanica

Stanice PS120 su komercijalne stanice kultivirane iz fibroblasta pluća hrčka. Uzgajaju se u uvjetima *in vitro* u inkubatoru za staničnu kulturu, u atmosferi od 5% CO₂ i pri temperaturi od 37 °C, u hranjivom mediju DMEM nadopunjenom s 10% fetalnim goveđim serumom (FBS, od engl. fetal bovine serum). Sve postupke pri radu sa staničnim kulturama provodila sam sa sterilnim otopinama i u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka.

Stanicama sam mijenjala hranjivi medij svaka 3-4 dana. U hranjivi medij za netretirane stanice PS120 nisam dodavala antibiotik, dok sam u medij za transfecirane stanice dodavala antibiotik G418 u koncentraciji od 400 µg/ml (seleksijski medij). Presađivanje stanica provodila sam približno jednom tjedno odnosno kad god je konfluentnost stanica na podlozi na kojoj rastu bila između 90 - 100%. Presađivanje stanica sam provodila na sljedeći način: najprije sam sterilnom staklenom pipetom sam iz bočice uklonila stari medij, zatim sam dodala 5 ml pufera HBSS kojeg sam uklonila nakon inkubacije od 3-5 min i na kraju stanice inkubirala 1-2 min u 1 ml tripsina (0.05%). Tripsin odvaja stanice od podloge (tripsinizacija stanica). Kada su se stanice odvojile od podloge dodala bih 5 ml hranjivog medija i stanice resuspendirala provlačenjem kroz pipetu. Na kraju bih, ovisno o potrebi, odgovarajući volumen resuspendiranog medija sa stanicama (kap ili veći volumen) prenijela u novu bočicu u koju sam prethodno dodala 5-8 ml hranjivog medija, a preostale stanice bih bacila. Stanice bih ponovno pohranila u inkubator na 37 °C i 5% CO₂.

2.2.14. Transfekcija plazmidne DNA u staničnu kulturu fibroblasta

Transfekcija je postupak unošenja plazmidne DNA u stanice u svrhu izražavanja i/ili ispitivanja specifičnog proteina u stanicama.

Transfekciju sam izvodila na sljedeći način: nasadila sam PS120 stanice 24 sata prije provođenja pokusa u pločicu sa 6 bunarića tako da su na dan pokusa stanice bile 80% konfluentne. Pokus sam započinjala tako da sam za svaki plazmid koji sam planirala transfecirati pripremala dvije otopine u tubicama. U jednoj sam pomiješala ~1 µg odgovarajućeg plazmida s 250 µl medija bez seruma (OptiMEM medij), a u drugoj sam pomiješala 6 ul Lipofektamina 2000 s 250 ul OptiMEM medija. Priređene otopine sam ostavila da se inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi i zatim sam otopine međusobno pomiješala i inkubirala ih narednih 15 minuta. U međuvremenu sam stanice nasadene u pločici s bunarićima isprala dva puta OptiMEM medijem. Stanice sam inkubirala 5 sati s mješavinom Lipofektamina i plazmida na 37 °C uz 5% CO₂. Nakon inkubacije stanicama sam dodala 3 ml medija DMEM bez antibiotika i ostavila preko noći. Iduće sam jutro promijenila medij i stanice ostavila daljnjih 24 sata u DMEM mediju bez antibiotika. Ukoliko je bilo potrebno stanice sam presađila. Nakon 24 sata stanicama sam promijenila medij i inkubirala ih u mediju DMEM sa seleksijskim antibiotikom G418 u koncentraciji od 800 µg/ml što je dvostruko veća koncentracija od koncentracije koja se koristi za normalno održavanje i pasažu stanica PS120. Nakon druge pasaže i konfluentnosti stanica od 60-70% napravila sam prvo zakiseljavanje stanica.

2.2.15. Selekcija stanica postupkom zakiseljavanja

Postupak zakiseljavanja (eng. *acid loading*) koristila sam za odabir transfeciranih stanica PS120 koje imaju dobru ekspresiju mutiranog proteina NHE3 u membrani. Ovim se postupkom PS120 stanice izlažu letalnoj koncentraciji kiseline (40 mM NH_4Cl) koja dovodi do akutnog unutarstaničnog zakiseljavanja. Za oporavak stanica je neophodna prisutnost proteina NHE3 u membrani stanice. Stoga, daljnja inkubacija stanica u otopini koja sadrži Na^+ omogućit će preživljavanje samo onih stanica koje u svojoj membrani posjeduju funkcionalni protein NHE3.

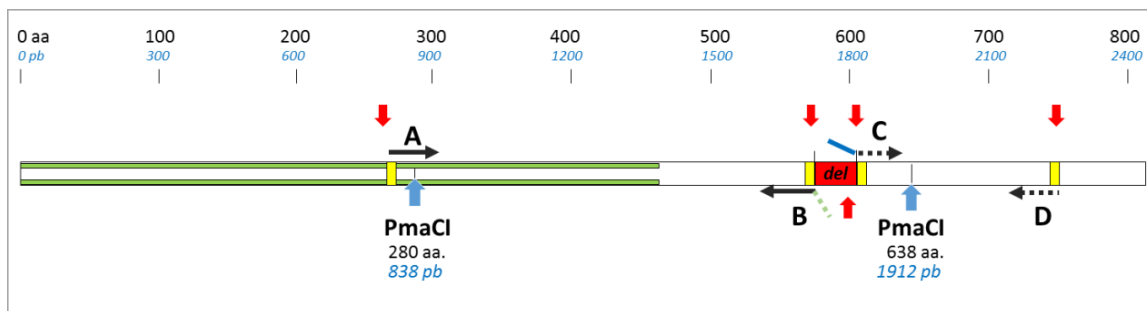
Ukratko: stanice PS120 transfecirane plazmidom nasadene u bočicu i ostavljene rasti do 70-80% konfluentnosti inkubirala sam s 40 mM NH_4Cl kroz 60 minuta. Nakon isteka inkubacije, staklenom pipetom sam iz bočice usisala kiseli inkubacijski medij i stanice dva puta isprala otopinom 1x TMA. Nakon ispiranja, stanice sam 1 sat inkubirala s 2 mM NaCl . Na kraju sam uklonila inkubacijsku otopinu NaCl i u bočicu dodala DMEM selekcijski medij s antibiotikom G418 (400 ug/ml).

3. REZULTATI

3.1. Dizajniranje početnica za mutiranje gena *NHE3*

U dizajniranju početnica za izradu delecije unutar sekvence gena *NHE3* bilo je potrebno najprije odrediti krajnje pozicije za početnice unutar sekvence *NHE3*. U definiranju tih pozicija trebalo je zadovoljiti sljedeće uvjete: (1) da se između krajnjih pozicija početnica nalazi sekvenca koju treba ukloniti, (2) da se između krajnjih pozicija početnica nalaze restriksijska mjesta koja će koristiti za umetanje mutiranog fragmenta u plazmid *pcDNA/NHE3* i (3) da su fragment prije i nakon delecije različite veličine tako da ih se može lakše razlikovati gel elektroforezom.

Dizajnirala sam pet početnica. Dvije su početnice postavljene tako da „graniče“ s mjestom delecije. Početnicu koju sam pozicionirala neposredno prije same delecije nazvala sam početnica B, dok sam početnicu koja je pozicionirana neposredno iza delecije nazvala početnica C. Kako sam za izradu delecije odabrala metodu preklapanja krajeva dvaju fragmenata tako sam početnicama B i C pri dizajniranju dodala tzv. preklopne sekvence. U početnici B je preklopna sekvenca sadržavala slijed baza (9 parova baza) koji je bio komplementaran slijedu baza koje se nalaze neposredno iza mjesta delecije. U početnici C je preklopna sekvenca sadržavala slijed baza (18 parova baza) koji je bio komplementaran slijedu baza koje su prethodile mjestu delecije (Slika 8.).



Slika 8: Dizajniranje početnica za deleciju gena *NHE3*. Početnice A (pozitivna) i D (negativna) nalaze se na dva suprotna kraja od mjesta delecije, dok su početnice B (negativna) i C (pozitivna) pozicionirane neposredno prije i poslije delecije. Početnice B i C posjeduju na svom 5'-kraju preklopne nastavke. Između početnica A i B nalazi se jedno restriksijsko mjesto za restriksijsku endonukleazu PmaCI, dok se između početnica C i D nalazi drugo restriksijsko mjesto za PmaCI.

Pozicije za sljedeće dvije početnice, početnicu A i početnicu D, odredila sam nakon analize sekvence gena *NHE3* u kojoj sam tražila potencijalna restrikcijska mjesta za restrikcijske endonukleaze koje bih iskoristila u završnoj fazi stvaranja delecije unutar sekvence gena *NHE3*. Budući da se nije mogla pronaći kombinacija dviju restrikcijskih endonukleaza koje plazmid *pcDNA/HA-NHE3* cijepaju samo na jednom mjestu, odabir se u konačnici sveo na endonukleazu *PmaCI* koja sekvencu gena *NHE3* cijepa na dva mjesta i pritom ne djeluje na vektor *pcDNA 3.1(+)*. Enzim *PmaCI* cijepa sekvencu gena *NHE3* na dva mjesta, između nukleotida C840-G841 i C1914-G1915.

Pozicije restrikcijskih mjesta za enzim *PmaCI* utjecale su na izradu početnica A i D. Početnica A je postavljena neposredno ispred 280., dok sam početnicu D postavila stotinjak nukleotida dalje iza 638. kako bi mi u sljedećim koracima bilo lakše raspoznavati PCR produkte stvorene djelovanjem početnice D.

Pozitivna (*sense*) početnica A i negativna (*antisense*) početnica B korištene su za stvaranje fragmenta AB koji na svom kraju sadrži preklopnu sekvencu koja potječe od početnice B. Pozitivna početnica C i negativna početnica D stvaraju fragment CD na čijem se početku nalazi preklopna sekvencu koja potječe od početnice C. Povezivanjem fragmenata AB i CD nastaje fragment AD iz kojeg je uklonjena željena sekvencu.

Pri konstrukciji početnica pazila sam da početnice budu najmanje 18 pb i da preklopni nastavci početnica B i C budu dovoljno dugi za lakše povezivanje. Nastojala sam izraditi početnice čije bi temperature spajanja bile približno jednake te da nemaju međusobno komplementarne dijelove kako ne bi došlo do neželjenog međusobnog spajanja.

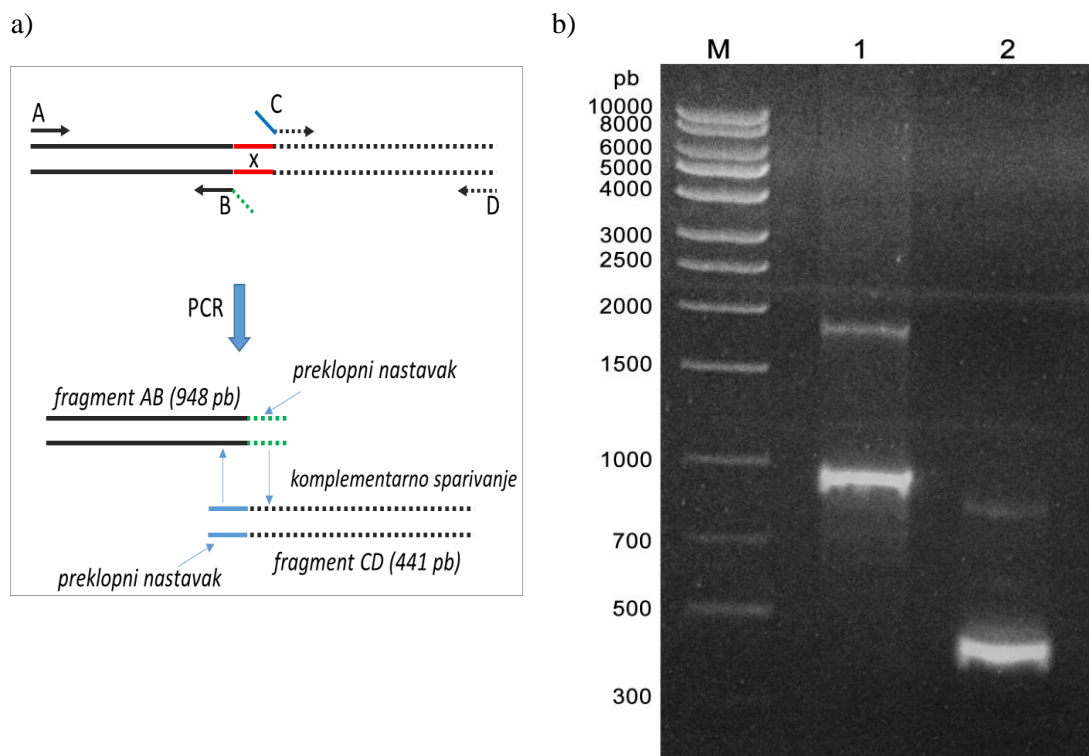
Peta početnica je imala testnu ulogu i njome sam planirala testirati uspješnost delecije u fragmentu AD. Stoga je testna početnica (početnica T) bila komplementarna sekvenci koja se nalazila unutar područja delecije.

3.2. Konstrukcija mutirane sekvence *NHE3*

Stvaranje fragmenta AD iz kojeg je izbačena sekvencu koja kodira 24 aminokiseline (Leu586 – Arg609) provedeno je kroz nekoliko koraka. U prvom sam koraku uz pomoć početnica generirala dva fragmenta DNA; fragmente AB i CD. Budući da je negativnoj početnici B i pozitivnoj početnici C na 5'-krajevima dodana preklopna sekvencu to će fragmenti AB i CD biti uvećani za dužinu preklopnih sekvenci (Slika 9.a.). U drugom koraku dolazi do povezivanja dvaju fragmenata i sinteze komplementarnih lanaca nakon čega nastaje mutirani fragment AD. U trećem koraku se mutirani fragment AD izolira i koristi kao predložak za umnožavanje uz pomoć početnica A i D.

3.2.1. Stvaranje fragmenata AB i CD

Fragment AB završava neposredno prije, dok fragment CD započinje neposredno nakon sekvence koju sam planirala izbaciti iz sekvence gena *NHE3*. Fragment AB, pored sekvence koja odgovara slijedu aminokiselina Leu273-Tyr585, na svom kraju sadrži tzv. preklopnu sekvencu koja se komplementarno sparuje sa sekvencom za aminokiseline Asp610-Glu612. Fragment CD, pored sekvence koja odgovara slijedu aminokiselina Asp610-Asp750, na svom početku sadrži preklopnu sekvencu koja se komplementarno sparuje sa sekvencom za aminokiseline Glu580-Tyr585. Prema tome, fragment AB je zajedno sa preklopnim nastavkom dug 948 pb, dok je fragment CD zajedno sa svojom preklopnim nastavkom dug 441 pb. Fragmente AB i CD sam nakon provedene PCR reakcije vizualizirala pomoću gel elektroforeze. Veličine dobivenih fragmenata sam određivala usporedbom sa pozicijama biljega standardnog DNA markera od 1 kb. Iz Slike 9.b. vidljivo je da veličine fragmenata AB i CD odgovaraju očekivanim vrijednostima.

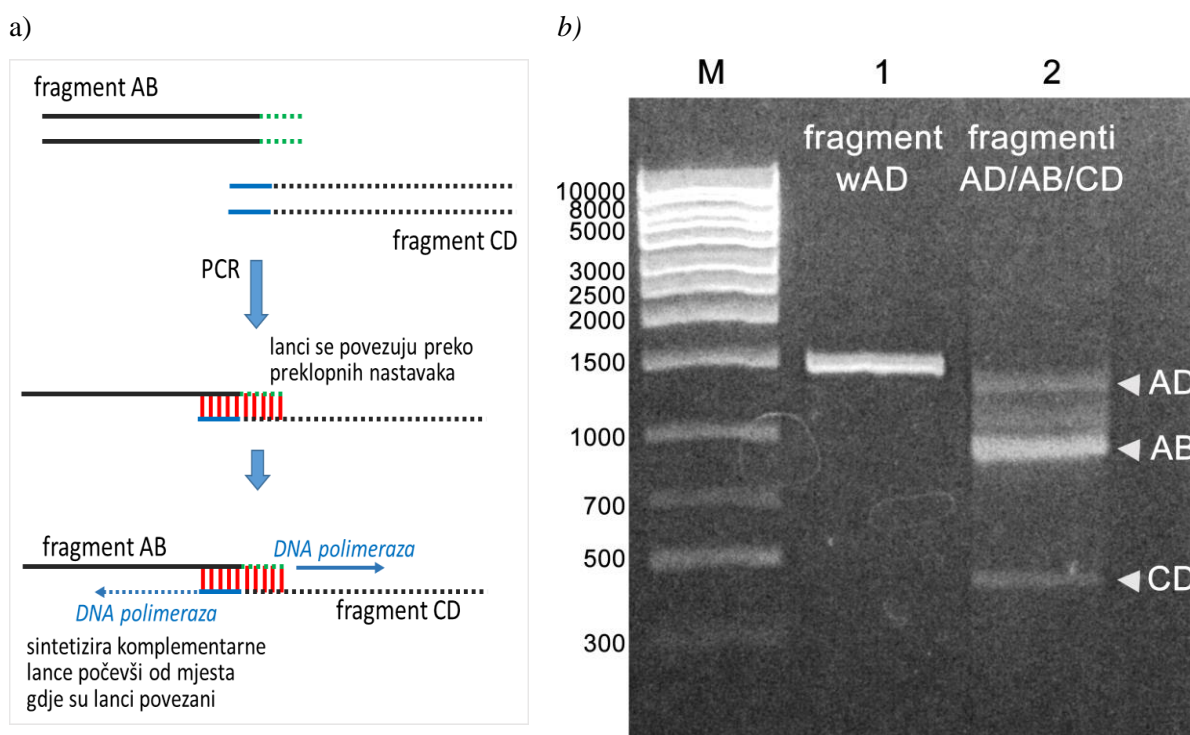


Slika 9. Stvaranje fragmenata AB i CD pomoću reakcije PCR. (a) PCR reakcijama u kojima je plazmid *pcDNA/HA-NHE3* pomiješan s početnicama A i B odnosno početnicama C i D nastaju dva PCR produkta, fragment AB koji je s preklopnim nastavkom dug 948 pb odnosno fragment CD koji je s preklopnim nastavkom dug 441 pb. (b) Vizualizacija PCR produkata na gel elektroforezi pokazuje da se fragment AB (linija 1) nalazi na očekivanoj visini od ~950 pb, dok se fragment CD (linija 2) nalazi na očekivanoj visini od ~440 pb. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

3.2.2. Povezivanje komplementarnih krajeva fragmenata AB i CD

Nakon izolacije, dobivene fragmente AB i CD sam povezala i umnožila. Tijekom reakcije PCR lanci svakog fragmenta su se prvo razdvojili (95 °C), zatim su se razdvojeni lanci na nižoj temperaturi (72 °C) povezali preko preklopnih nastavaka da bi se na kraju *Taq polimeraza* vezala na krajeve povezanih dijelova lanaca i sintetizira komplementarne lance koristeći slobodne dijelove povezanih lanaca za predložak (Slika 10.a.).

Ova je reakcija PCR provedena u prisutnosti fragmenata AB i CD, *Taq polimeraze*, nukleotida i odgovarajućeg pufera, a u odsutnosti početnica. Budući da nema početnica tijekom ove reakcije ne dolazi do umnožavanja fragmenta AD. Stvaraju se male količine fragmenta AD budući da *Taq polimeraza* može sintetizirati komplementarne lance samo na kalupima lanaca fragmenata AB i CD koji su se međusobno povezali preko preklopnih nastavaka (Slika 10.a. shematski prikaz djelovanja *Taq polimeraze* na dnu slike).



Slika 10. Povezivanje fragmenata AB i CD i stvaranje fragmenta AD pomoću reakcije PCR. (a) PCR reakcijom je omogućeno povezivanje fragmenata AB i CD preko njihovih komplementarnih sekvenci. Na povezane fragmente se veže DNA polimeraza koja sintetizira odgovarajuće komplementarne lance. Nastaje fragment AD. (b) Uzorak PCR reakcije na gel elektroforezi (linija 2) pokazuje prisutnost triju fragmenata: AB (948 pb), CD (441 pb) i fragmenta AD (1362 pb). Fragment AD je očekivane veličine. Kao kontrola korišten je fragment wAD (linija 1) nastao PCR reakcijom u kojoj su početnice A i D pomiješane s nemutiranim plazmidom pcDNA/HA-NHE3. Fragment wAD, dug 1434 pb, se nalazi neznatno ispod biljega za 1500 pb i očekivano je veći od mutiranog fragmenta AD. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

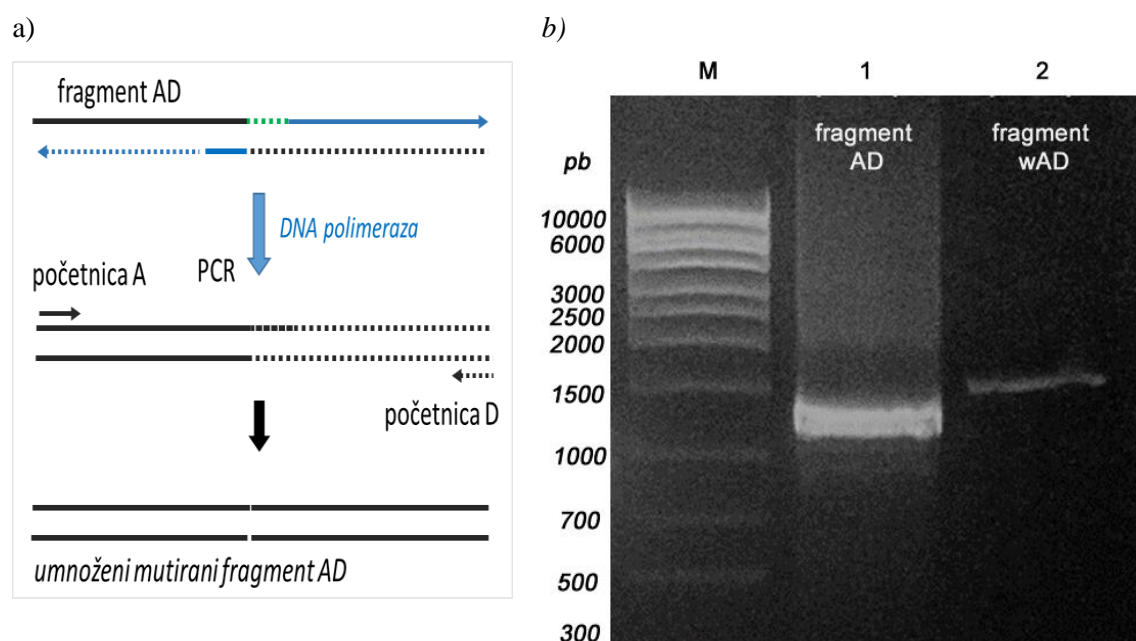
Fragment AD je mutirani fragment nastao postupkom povezivanja fragmenata AB i CD preko preklopnih nastavaka pomoću kojih je iz sekvence gena *NHE3* izbačena sekvenca koja kodira 24 aminokiseline (Leu586 – Arg609). Mutirani fragment AD je stoga za 72 nukleotida kraći od fragmenta koji nastaje kad se početnice A i D pomiješaju s nemutiranim plazmidom *pcDNA/HA-NHE3* (fragment wAD). Mutirani fragment AD je dug 1362 parova baza, dok je fragment wAD dug 1434 parova baza. Fragment wAD sam koristila kao kontrolu u određivanju veličine mutiranog fragmenta AD. Kao što se može vidjeti na slici 10.b. fragment AD (linija 2) je nešto niže pozicioniran od fragmenta wAD čija je veličina neznatno ispod biljega za 1500 parova baza (Slika 10.b. linija 1).

U ovom koraku stvorila sam mutirani fragment AD kojeg sam izolirala iz gela za potrebe sljedeće PCR reakcije.

3.2.3. Umnožavanje fragmenta AD

Mutirani fragment AD, stvoren u prethodnoj PCR reakciji, sam izolirala iz gela i koristila ga kao predložak za umnožavanje u sljedećoj PCR reakciji (Slika 11.a.). Ovoj su PCR reakciji pored fragmenta AD, *Taq polimeraza*, nukleotida i odgovarajućeg pufera dodane i početnice A i D.

Na slici 11.b. prikazani su rezultati umnožavanja mutiranog fragmenta AD (linija 1). Kao kontrolu koristila sam fragment wAD, prikazan u liniji 2, koji je dobiven PCR reakcijom u kojoj su početnice A i D pomiješane s nemutiranim plazmidom *pcDNA/HA-NHE3*. Kako je fragment wAD za 72 nukleotida veći od mutiranog fragmenta AD to bi se na elektroforezi morao naći iznad mutiranog fragmenta AD. Na slici 11.b. može se jasno vidjeti da je fragment AD manji od fragmenta wAD koji se nalazi neznatno ispod razine DNA biljega koji označava 1500 parova baza što odgovara očekivanoj veličini fragmenta wAD od 1434 parova baza.



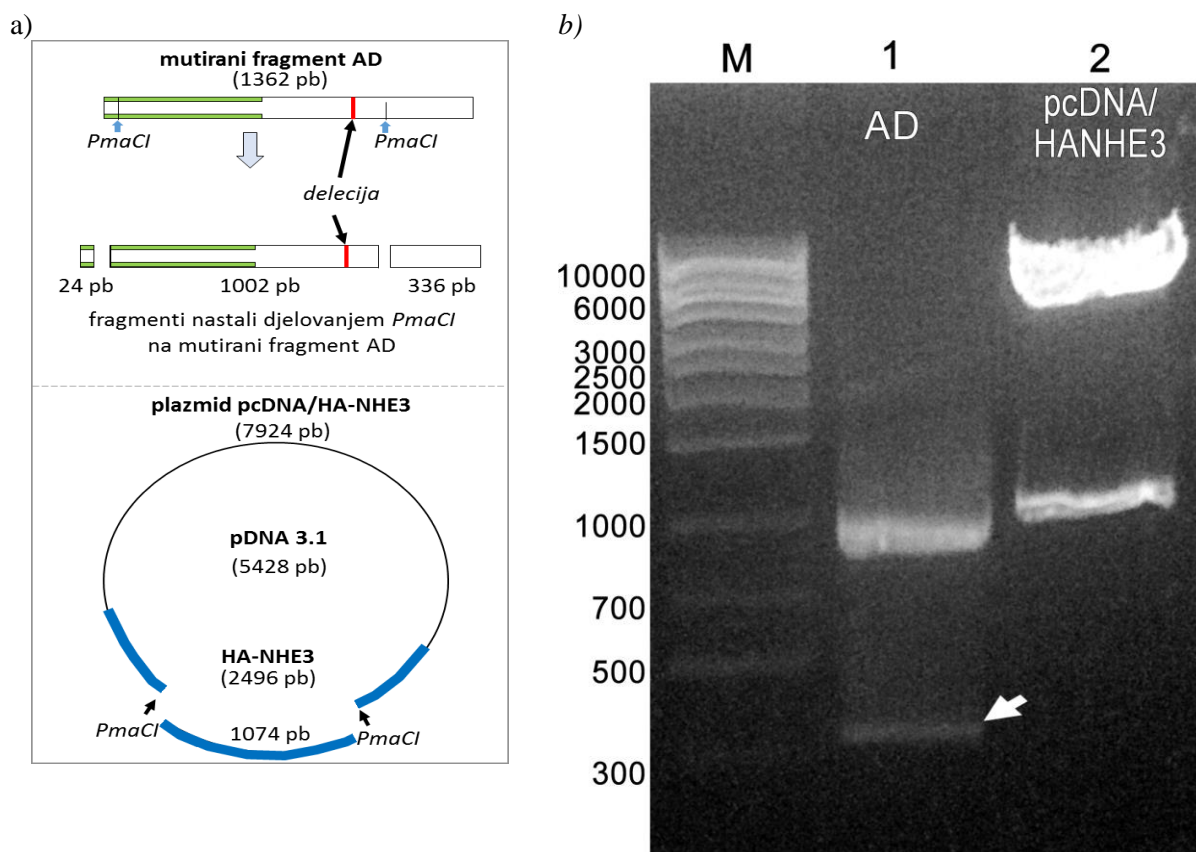
Slika 11. Umnožavanja fragmenta AD pomoću reakcije PCR. (a) Shematski prikaz PCR reakcije kojom se u prisutnosti početnica A i D umnožava fragment AD. (b) U liniji 1 je prikazan umnoženi mutirani fragment AD očekivane veličine od 1362 pb. Kao kontrola korišten je fragment wAD koji je za 72 nukleotida veći od mutiranog fragmenta AD. U liniji 2 vidljiv je fragment wAD koji se očekivano nalazi iznad mutiranog fragmenta AD. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

3.3. Tretiranje fragmenta AD i plazmida *pcDNA/HA-NHE3* restriksijskom endonukleazom *PmaCI*

Za umetanje fragmenta s delecijom u plazmid *pcDNA/HA-NHE3* bilo je potrebno oboje, mutirani fragment AD i plazmid *pcDNA/HA-NHE3* tretirati restriksijskom endonukleazom *PmaCI* koja sekvencu gena *NHE3* reže na dva mjesta, između nukleotida C840-G841 i C1914-G1915.

Djelovanjem enzima *PmaCI* na plazmid *pcDNA/HA-NHE3* nastaju dva fragmenta od kojih veći fragment predstavlja linearizirani plazmid s dijelom sekvence *HA-NHE3*, dok manji fragment predstavlja dio gena *HA-NHE3* između dva *PmaCI* restriksijska mjesta (Slika 12.a). Veći fragment je dug 6931 parova baza, dok je manji dug 1074 parova baza. S druge strane, djelovanjem enzima *PmaCI* na mutirani fragment AD nastaju tri fragmenta. Najveći fragment (1002 para baze) čini segment između *PmaCI* restriksijskih mjesta i u njemu se nalazi područje delecije. Preostala dva fragmenta čine segmenti od *PmaCI* restriksijskih mjesta do jednog (24 para baze) i drugog (336 para baze) kraja mutiranog fragmenta AD (Slika 12.a.).

Na slici 12.b. pokazani su produkti DNA nastali djelovanjem endonukleaze *PmaCI* na mutirani fragment AD (linija 1) i na plazmid *pcDNA/HA-NHE3* (linija 2). Inkubacija endonukleaze s plazmidom dovela je do nastanka dva fragmenta. Manji fragment je pozicioniran neznatno iznad biljega za 1000 parova baza, dok je veći fragment razvučen na elektroforezi pa se sa sigurnošću može samo reći da je njegova veličina iznad 6000 parova baza što bi osnovi odgovaralo očekivanoj veličini fragmenta. Naime, kako je pokazano na slici 12.a. veći fragment obuhvaća plazmidnu DNA plus segmente od *PmaCI* restriksijskih mjesta do jednog i drugog kraja *HA-NHE3* sekvence. Inkubacijom *PmaCI* sa mutiranim fragmentom AD nastala su dva fragmenta (linija 1). Veći fragment je na visini nešto nižoj od 1000 parova baza, dok je pozicija manjeg fragmenta na visini malo iznad biljega za 300 parova baza (prikazan strelicom na slici 12.b.). Prema slici 12.a. djelovanjem *PmaCI* nastaje i treći fragment no zbog male veličine (24 pb) ne može ga se vidjeti na gelu.



Slika 12. Tretiranje fragmenta AD i plazmida *pcDNA/HA-NHE3* endonukleazom *PmaCI*. (a) Shematski su prikazana restrikcijska mjesta *PmaCI* unutar *NHE3* molekule. U gornjem dijelu slike prikazani su fragmenti nastali djelovanjem enzima *PmaCI* na mutirani fragment AD, dok su u donjem dijelu prikazani fragmenti koji nastaju djelovanjem *PmaCI* na plazmid *pcDNA/dHA-NHE3*. (b) U liniji 1 pokazano je da djelovanjem *PmaCI* na mutirani fragment AD nastaju dva fragmenta. Veći fragment, čija je očekivana duljina 1002 pb, se nalazi neznatno niže od razine biljega za 1000 pb. Manji fragment, s očekivanom veličinom od 336 pb, se nalazi na razini malo iznad razine biljega za 300 pb. Djelovanje *PmaCI* na plazmid prikazani su u liniji 2 u kojoj se vidi da su nastala dva fragmenta. Veći razvučeni fragment se nalazi na razini iznad 6000 pb, dok se manji nalazi na visini od ~1000 pb. Razlika u veličini većeg fragmenta u liniji 1 i manjeg u liniji 2 odgovara sekvenci za 24 aminokiseline. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

Nakon što je testiranje pokazalo da sam dobila željene fragmente kompletan preostali sadržaj PCR reakcija sam elektroforezom razvukla na gelu i iz gela izolirala željene DNA fragmente koji su mi dalje potrebni za postupak ligacije, plazmidni vektor i mutirani dio sekvence *NHE3*.

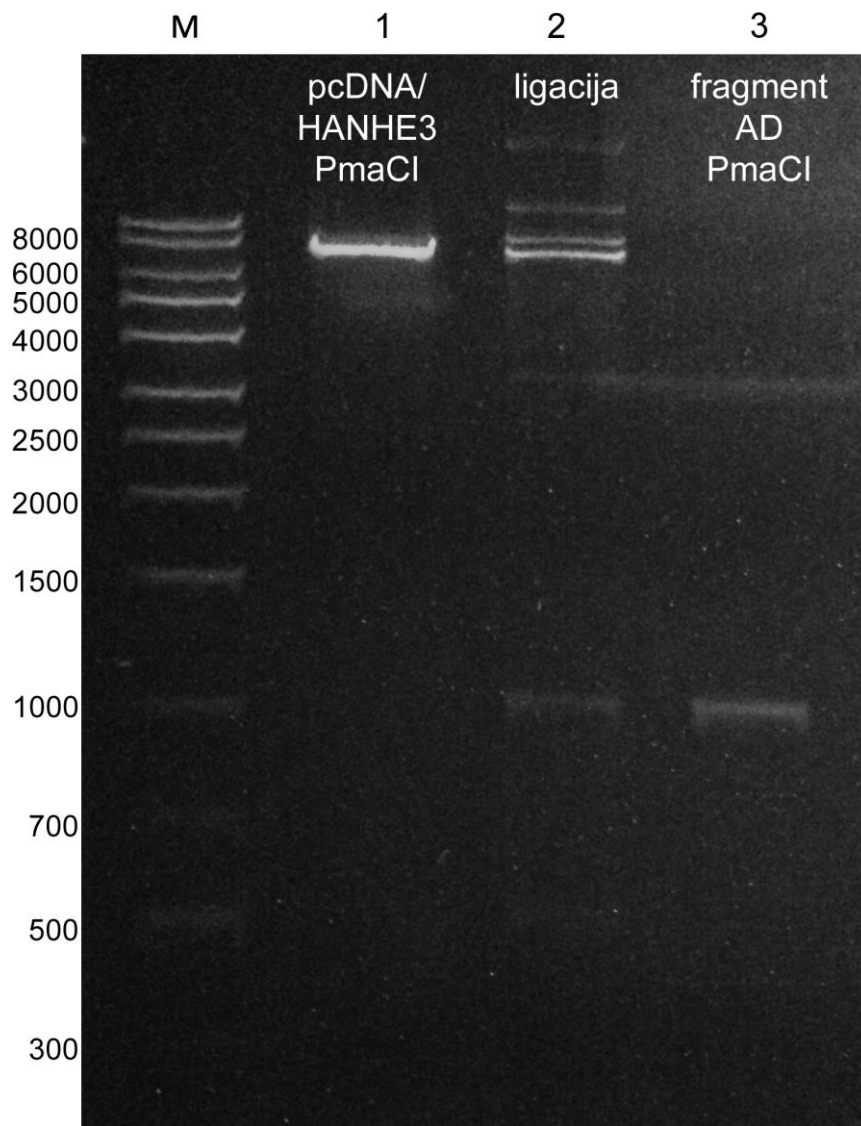
3.4. Povezivanje plazmida *pcDNA/HA-NHE3* i mutiranog fragmenta AD prethodno tretiranih endonukleazom *PmaCI*

Povezivanje umetka, fragment s delecijom nastao djelovanjem *PmaCI* na mutirani fragment AD, i plazmida *pcDNA/HA-NHE3*, koji je prethodno tretiran *PmaCI*, provela sam postupkom ligacije. Kako restriksijska endonukleaza *PmaCI* cijepanjem DNA stvara tupe krajeve moguće su greške u postupku ligacije. S jedne strane, može doći do spontane recirkularizacije lineariziranog plazmida *pcDNA/HA-NHE3* međusobnim povezivanjem odrezanih tupih krajeva, a s druge do pogrešne orijentacije umetka.

Kako bih spriječila recirkularizaciju plazmida, endonukleazom *PmaCI* tretirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* sam tretirala enzimom *fosfataza* koja s nukleotida na oba tupa kraja lineariziranog plazmida uklanja fosfatne skupine. Ovaj se postupak naziva defosforilacija i njime sam nastojala spriječiti mogućnost da se u prisutnosti enzima *ligaze* krajevi lineariziranog plazmida međusobno povežu čime bi se spriječilo umetanje umetka.

Defosforilirani linearizirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* sam povezala s umetkom u reakciji u kojoj su najbolji rezultati postignuti kad je njihov međusobni volumni omjer bio 3:1 (plazmid:umetak). Na slici 13 prikazan je rezultat ligacije defosforiliranog lineariziranog plazmida *pcDNA/HA-NHE3* i umetka. Kako se može vidjeti u liniji 2 ligacijom umetka i lineariziranog plazmida nastaje nekoliko plazmidnih DNA koje mogu biti posljedica različite strukture DNA. Prisutnost DNA fragmenta na udaljenosti od približno 1000 pb iznad fragmenta koji je gotovo paralelan s DNA fragmentom u liniji 1, koji je nastao djelovanjem *PmaCI* na plazmid, snažno sugerira da bi se moglo raditi o plazmidu u koji se ugradio umetak.

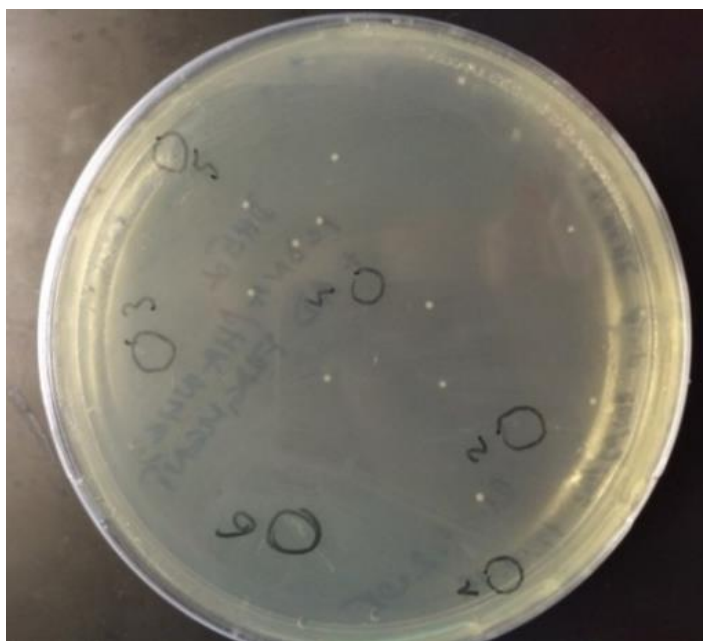
U ovom sam koraku postupkom ligacije stvorila plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* s mutiranim genom *HA-NHE3* iz kojeg je postupkom delecije iz citoplazmatskog dijela sekvence gena *NHE3* izbačena sekvenca koja kodira 24 aminokiseline.



Slika 13. Ligacija defosforiliranog lineariziranog plazmida *pcDNA/HA-NHE3* i umetka. U liniji 1 prikazan je linearizirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* tretiran fosfatazom s ciljem uklanjanja fosfatnih skupina s tupih krajeva, dok je u liniji 3 prikazan umetak, fragment s delecijom, dug ~1000 pb. Oba uzorka su korištena kao orijentir za rezultate ligacije plazmida i umetka prikazane u liniji 2. u kojoj se može vidjeti nekoliko DNA fragmenata. Fragment veličine ~1000 pb odgovara veličini umetka, dok DNA fragment veličine ~7000 pb odgovara veličini plazmida *pcDNA/HA-NHE3* tretiranog PmaCI. Iznad ovog fragmenta nalazi se na udaljenosti od ~1000 pb još jedan fragment koji sugerira da se radi o željenom produktu ligacije umetka i plazmida. M - označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

3.5. Transformacija mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* u kompetentne bakterijske stanice

Nakon ligacije, novostvoreni mutirani plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* sam postupkom transformacije unijela u kompetentne bakterijske stanice *Escherichia coli* soja DH5 α metodom toplinskog šoka. Uspješna transformacija kompetentnih stanica očitovala se naraslim bakterijskim kolonijama (Slika 14.).



Slika 14: . Transformacija plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* u kompetentne bakterijske stanice. Prikazan je kruti selekcijski LB medij s naraslim bakterijskim kolonijama kompetentnih DH5 α stanica. Narasle su samo one kolonije stanica koje su uspješno transformirane mutiranim plazmidom *pcDNA/dHA-NHE3* budući da plazmid sadrži gen za otpornost na antibiotik ampicilin. Flomasterom zaokružene kolonije odabrala sam za postupak izolacije plazmida iz bakterija.

Za izolaciju plazmidne DNA odabrala sam pet kolonija koje sam nasadila na kruti selekcijski LB medij (za kasnije potrebe) i u tekući LB medij sa selekcijskim antibiotikom ampicilinom. Nakon inkubacije izolirala sam mutirani plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* iz umnoženih bakterija uz pomoć Mini prep kompleta, a koncentracije izolirane plazmidne DNA sam određivala uz pomoć uređaja *Nanodrop*.

3.6. Odabir plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* s pravilno orijentiranim umetkom

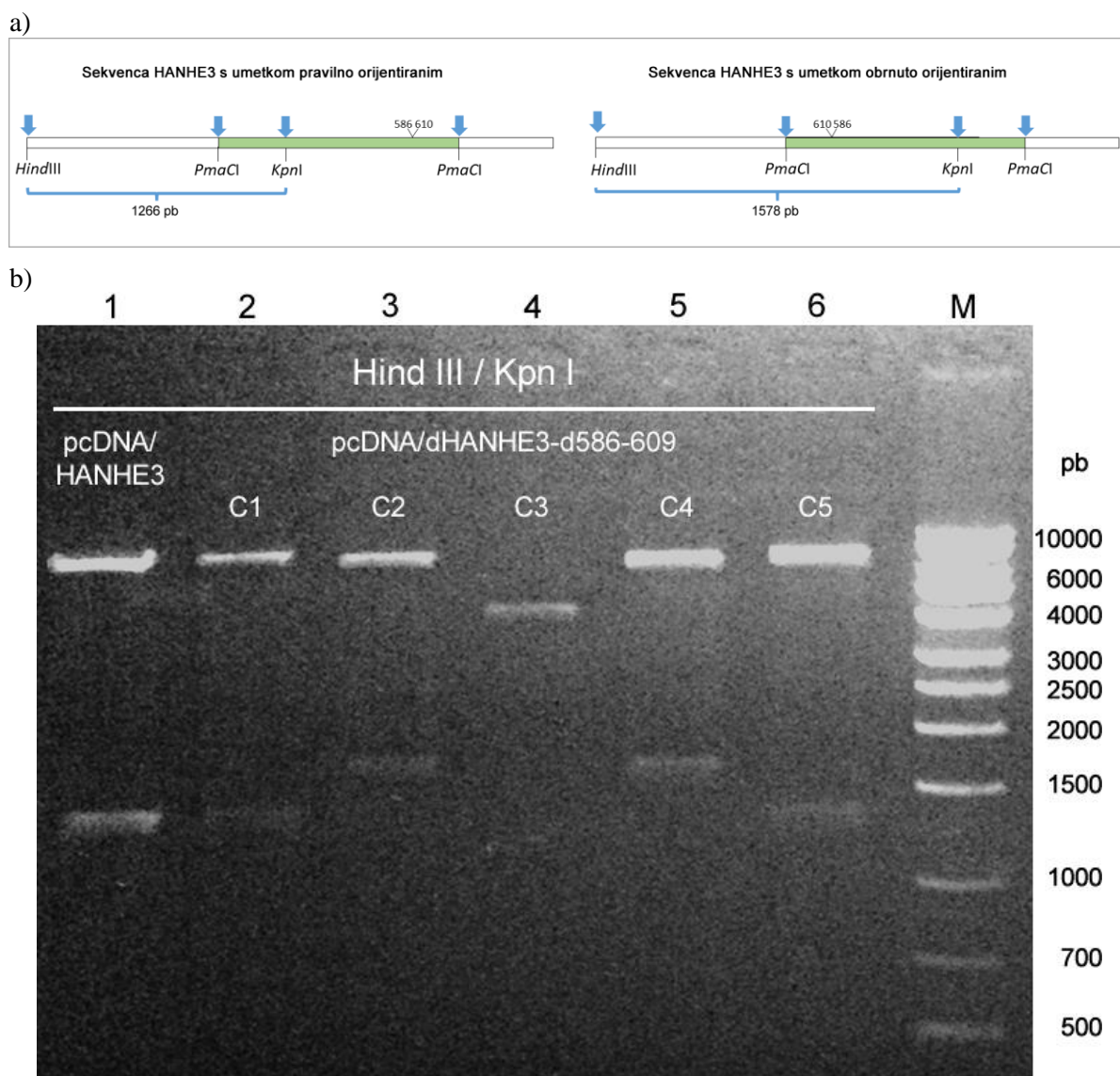
S obzirom da endonukleaza *PmaCI* pri rezanju tupe krajeve, podjednaka je vjerojatnost da se fragment s delecijom (umetak) prilikom umetanja u endonukleazom tretiran i defosforiliran *pcDNA/HA-NHE3* poveže u ispravnom ili obrnutom smjeru. Stoga sam se za pronalaženje mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* s ispravno orijentiranim umetkom koristila dvama testovima. Jedan se bazirao na primjeni restrikcijskih enzima, a drugi na primjeni reakcije PCR.

3.6.1. Ispitivanje orijentacije pomoću restrikcijskih enzima

Od restrikcijskih enzima koristila sam *HindIII* čije se restrikcijsko mjesto nalazi na samom početku gena *NHE3* i koji je zajedno s *XbaI* korišten za umetanje sekvence *NHE3* u višestruko mjesto za kloniranje unutar plazmida *pcDNA 3.1(+)* i stvaranje plazmida *pcDNA/HA-NHE3*. Drugi enzim je *KpnI*, čije je jedinstveno restrikcijsko mjesto, smješteno između nukleotida C1185-C1186, unutar umetka (fragmenta s delecijom) koji je postupkom ligacije umetnut u *pcDNA/HA-NHE3*. Endonukleaza *KpnI* se nametnula kao najbolji izbor za ispitivanje orijentacije umetka iz dva razloga: ne djeluje na plazmid *pcDNA 3.1(+)* i njeno se restrikcijsko mjesto nalazi u prvoj trećini umetka. Primjenom endonukleaza *HindIII* i *KpnI* mogla sam ustanoviti je li umetak orijentiran u pravom ili obrnutom smjeru.

Iz shematskog prikaza sekvence *HA-NHE3* i restrikcijskih mjesta za *HindIII* i *KpnI* (Slika 15.a.) vidljivo je da će pri pravilnoj orijentaciji umetka unutar mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* inkubacija s endonukleazama *HindIII/KpnI* dovesti do stvaranja fragmenta dugog 1266 pb. U slučaju da je prilikom ligacije došlo do pogrešne, obrnute, orijentacije umetka unutar mutiranog plazmida tada će primjena endonukleaza *HindIII/KpnI* dovesti do stvaranja fragmenta dugog 1578 pb. Ispitala sam orijentaciju u mutiranim plazmidima *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranim iz pet različitih kolonija inkubacijom mutiranih plazmida s kombinacijom endonukleaza *HindIII/KpnI* na 37 °C kroz sat vremena. Rezultate djelovanja endonukleaza sam provjerila elektroforezom koja je pokazala da je umetak pravilno orijentiran u mutiranim plazmidima izoliranim iz dvije kolonije, C1 (linija 2) i C5 (linija 6). Iz mutiranih plazmida izoliranih iz ovih kolonija endonukleaza su stvorile dva fragmenta, jedan koji obuhvaća vektorsku DNA plus završni dio sekvence *HA-NHE3*, i drugi, koji obuhvaća segment sekvence *HA-NHE3* između *HindIII* i *KpnI* restrikcijskog mjesta, dug 1266 pb. U mutiranim plazmidima izoliranim iz C2 i C4 kolonije (linija 3 i 5) djelovanje endonukleaza stvorilo je segment veličine iznad 1500 parova baza što odgovara obrnutoj orijentaciji umetka unutar mutiranog plazmida. Djelovanje endonukleaza na mutirani plazmid izoliran iz C3 kolonije stvorilo je fragment koji ne odgovara niti jednoj od dvije ispitivane orijentacije umetka. Kao kontrolu koristila sam nemutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* kojeg sam inkubirala s endonukleazama *HindIII/KpnI*. Djelovanjem

endonukleaza nastaje fragment dug 1266 pb potvrđujući tako rezultate pokazane u liniji 2 i 6 u kojima je umetak pravilno orijentiran unutar mutiranog plazmida.

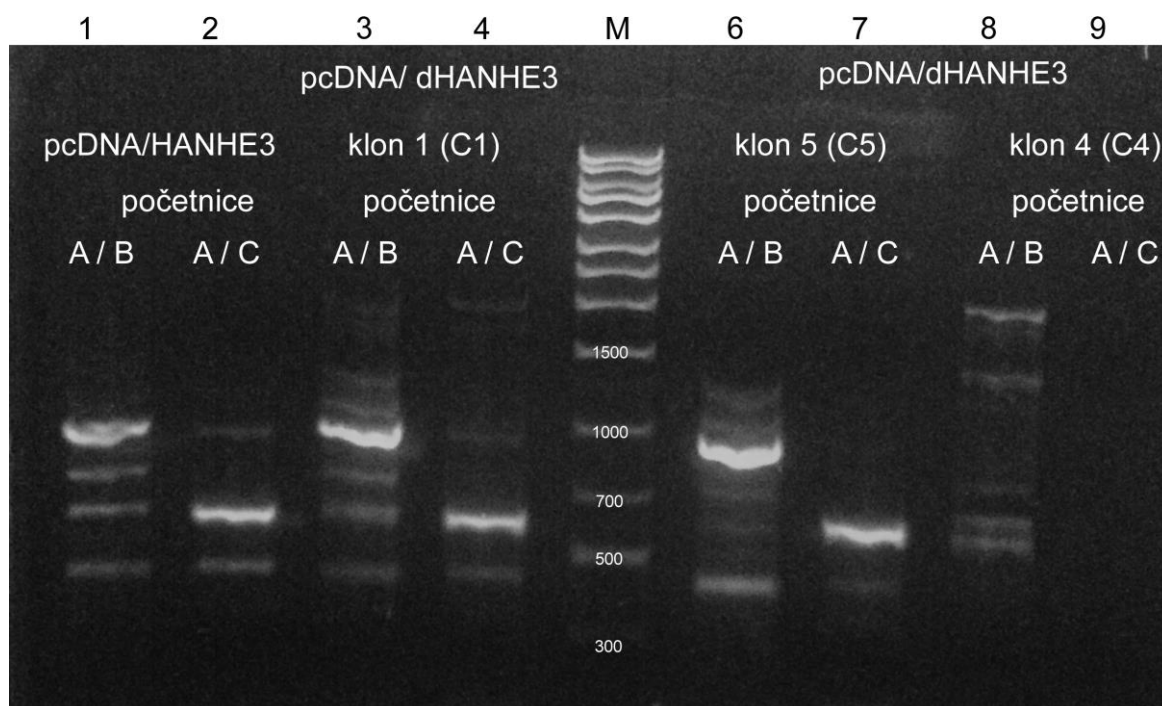


Slika 15. Ispitivanje orijentacije umetka unutar mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* restrikcijским endonukleazama. a) Shematski su prikazane sekvence HA-NHE3 s umetkom (označen zeleno). Na lijevoj strani sheme je sekvenca HA-NHE3 s pravilno orijentiranim umetkom, dok se na desnoj strani nalazi sekvenca HA-NHE3 s obrnuto orijentiranim umetkom. Kod pravilno orijentiranog umetka nakon inkubacije HA-NHE3 s endonukleazama HindIII i KpnI nastaje fragment dug 1266 pb, dok kod obrnuto orijentiranog umetka nastaje fragment dug 1578 pb. b) Prikazana je elektroforeza mutiranih plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranih iz pet različitih kolonija (linije 2-6) i inkubiranih s endonukleazama HindIII/KpnI. U plazmidima izoliranim iz C1 (linija 2) i C5 (linija 6) kolonija nastaje DNA fragment dug ~1300 pb što sugerira da je umetak pravilno orijentiran. U ostalim kolonijama nalazi ukazuju da je umetak obrnuto orijentiran unutar mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3*. U liniji 1 je nemutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* inkubiran s HindIII/KpnI koji služi kao kontrola. M - označava 1 kb marker DNA.

3.6.2. Ispitivanje orijentacije umetka pomoću reakcije PCR

Plazmide *pcDNA/dHA-NHE3* s pravilno orijentiranim umetkom provjerila sam reakcijom PCR kako bih dodatno potvrdila pravilnu orijentaciju. Reakciju sam provodila pomoću enzima *Taq polimeraza* i početnica A, B i C. Za predloške sam koristila kontrolni plazmid *pcDNA/HA-NHE3*, mutirane plazmide *pcDNA/dHA-NHE3* izolirane iz kolonija C1 i C5, te jedan mutirani plazmid koji je prethodnom provjerom pokazao neispravnu orijentaciju.

Svaki plazmid sam inkubirala u dvije zasebne reakcijske smjese. U jednoj je plazmid inkubiran s početnicama A i B, a u drugoj s početnicama A i C. U slučaju pravilne orijentacije, *Taq polimeraza* bi u smjesi plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* i početnica A i B, trebala stvoriti fragment duljine 939 pb. U slučaju obrnute orijentacije, negativna početnica B komplementarna sa sekvencom unutar umetka, će se početi ponašati kao pozitivna početnica i djelovati će u istom smjeru kao početnica A. U skladu s takvim ponašanjem početnice B, u reakcijskim smjesama se neće stvoriti očekivani fragmenti. Kod inkubacije mutiranih plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* s početnicama A i C situacija bi bila obrnuta. *Taq polimeraza* bi u slučaju obrnute orijentacije umetka, u prisutnosti pozitivnih početnica A i C stvorila fragment dug ~100 pb jer bi se sada početnica C ponašala kao negativna početnica. Na slici 16 je prikazan rezultat reakcije PCR. Nemutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* koristila sam kao kontrolu i rezultati su prikazani u liniji 1 i 2. U prvoj liniji koja je rezultat inkubacije plazmida i početnica A i B jasno se vidi fragment od ~939 pb koji nastaje kod pravilne sekvence. Nema fragmenta ukoliko je plazmid inkubiran sa pozitivnim početnicama A i C budući da se u normalnoj sekvenci obje početnice ponašaju kao pozitivne početnice. Identičan rezultat se može vidjeti u linijama tri, četiri, šest i sedam gdje su kao predlošci korišteni mutirani plazmidi *pcDNA/dHA-NHE3* koji su u prethodnoj provjeri s restriksijskim endonukleazama pokazali pravilnu orijentaciju. Zadnje dvije linije prikazuju rezultate inkubacije mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* s neispravnom orijentacijom umetka. U liniji 8 se jasno vidi da nema stvaranja fragmenta od 939 pb budući da se kod obrnute orijentacije negativna početnica B počinje ponašati kao pozitivna početnica.

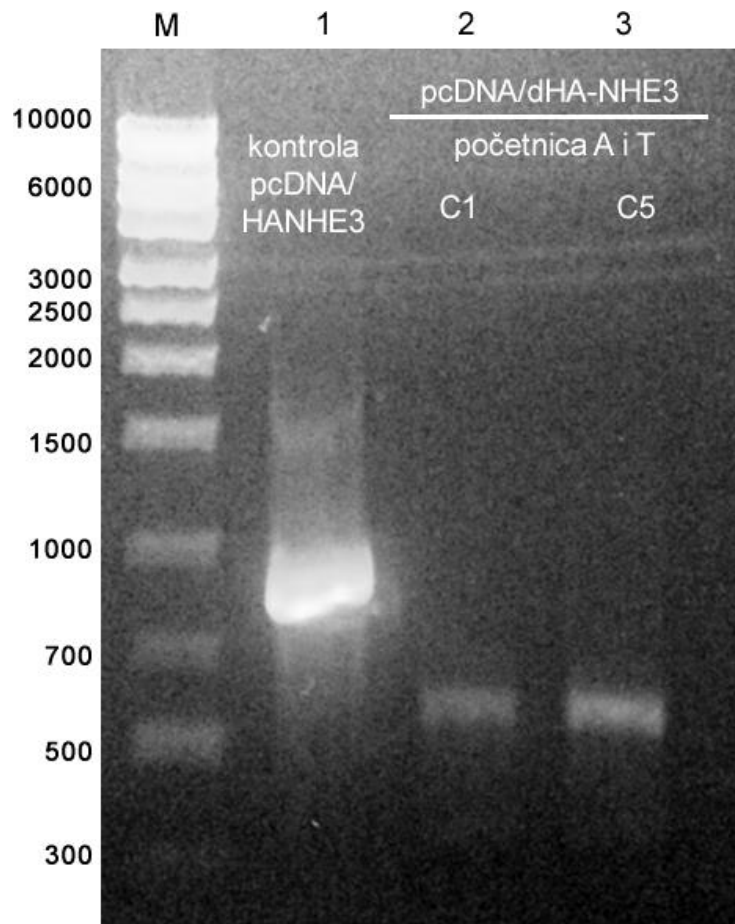


Slika 16. Ispitivanje orijentacije umetka unutar mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* pomoću reakcije PCR. U prve dvije linije, kao predložak, sam koristila kontrolni plazmid *pcDNA/HA-NHE3* gdje se u prvoj liniji jasno vidi rezultat pravilne orijentacije prisutnošću fragmenta od 939 pb dok u drugoj nema fragmenta koji bi nastao u slučaju neispravne orijentacije. Identičan rezultat se može vidjeti u linijama tri, četiri, šest i sedam gdje su kao predlošci korišteni mutirani plazmidi *pcDNA/dHA-NHE3* koji su u prethodnoj provjeri s restriksijskim endonukleazama pokazali pravilnu orijentaciju. Zadnje dvije linije prikazuju plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* s neispravnom orijentacijom i jasno se vidi u liniji osam nedostatak željenog fragmenta od 939 pb. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

3.7. Ispitivanje uspješnosti delecije pomoću reakcije PCR

Mutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3* stvoren je metodom povezivanja dvaju fragmenata, fragmenta AB i CD, preko preklopnih nastavaka koji su komplementarni sa završnom sekvencom prvog (fragment AB) i početnom sekvencom drugog (fragment CD) fragmenta. Ovakvim pristupom sam iz sekvence *HA-NHE3* izbacila sekvencu koja kodira aminokiseline između Leu586 i Arg609 pozicije. Uspješnost postupka sam u mutiranom plazmidu *pcDNA/dHA-NHE3* dodatno ispitala pomoću reakcije PCR. Za početnice u reakciji PCR koristila sam početnicu A i tzv. testnu početnicu T. Početnica T je dizajnirana kao negativna početnica čija sekvenca je komplementarna sa sekvencom koja kodira aminokiseline od Glu602 do Ser607 pozicije, dakle unutar delecijanskog područja. Uspješnost delecije

sam ispitivala na mutiranim plazmidima u kojima sam dokazala ispravnu orijentaciju umetka (kolonije C1 i C5). Kao kontrolu koristila sam nemutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3*. Iz slike 17 je jasno vidljivo da PCR reakcija s početnicama A i T u prisutnosti kontrolnog plazmida stvara fragment DNA veličine malo ispod 1000 pb (očekivana veličina je 1002 pb), dok u prisutnosti mutiranih plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* (klonovi C1 i C5) reakcijom PCR izostaje navedeni fragment.



Slika 17. Ispitivanje uspješnosti delecije sekvence koja kodira aminokiseline Leu586-Arg609 u mutiranim plazmidima *pcDNA/dHA-NHE3* pomoću reakcije PCR. Prikazani su produkti PCR reakcija provedenih u prisutnosti pozitivne početnice A i testne negativne početnice T koja je komplementarna sekvenci unutar delecije. U prisutnosti plazmida *pcDNA/HA-NHE3*, nastaje fragment dug ~1000 pb (fragment je proširen u rasponu od 1000-750 pb). U prisutnosti mutiranih plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* izostaje fragment u razini od 1000 pb. Na ovoj elektroforezi kao i u brojnim drugim ispitivanjima, u prisutnosti početnice A i T nastaje produkt na visini od približno 600 pb koji vjerojatno predstavlja neku nespecifičnu reakciju. M označava 1 kb marker DNA za procjenu veličine fragmenata DNA.

3.8. Midi-prep izolacija plazmida *pcDNA/dHA-NHE3*

Za potrebe pribavljanja konačnog dokaza uspješnosti delecije u mutiranom plazmidu *pcDNA/dHA-NHE3* bilo je potrebno provesti sekvenciranje mutiranog plazmida. Stoga sam u cilju pribavljanja dovoljne koncentracije mutiranog plazmida i veće čistoće plazmidne DNA provela Midipreps pozitivno potvrđenih mutacija plazmida *pcDNA/dHA-NHE3*. Nakon izolacije odredila sam koncentracije mutiranih plazmida i poslala ih na sekvenciranje.

3.9. Sekvenciranje mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* klon 1 i 5

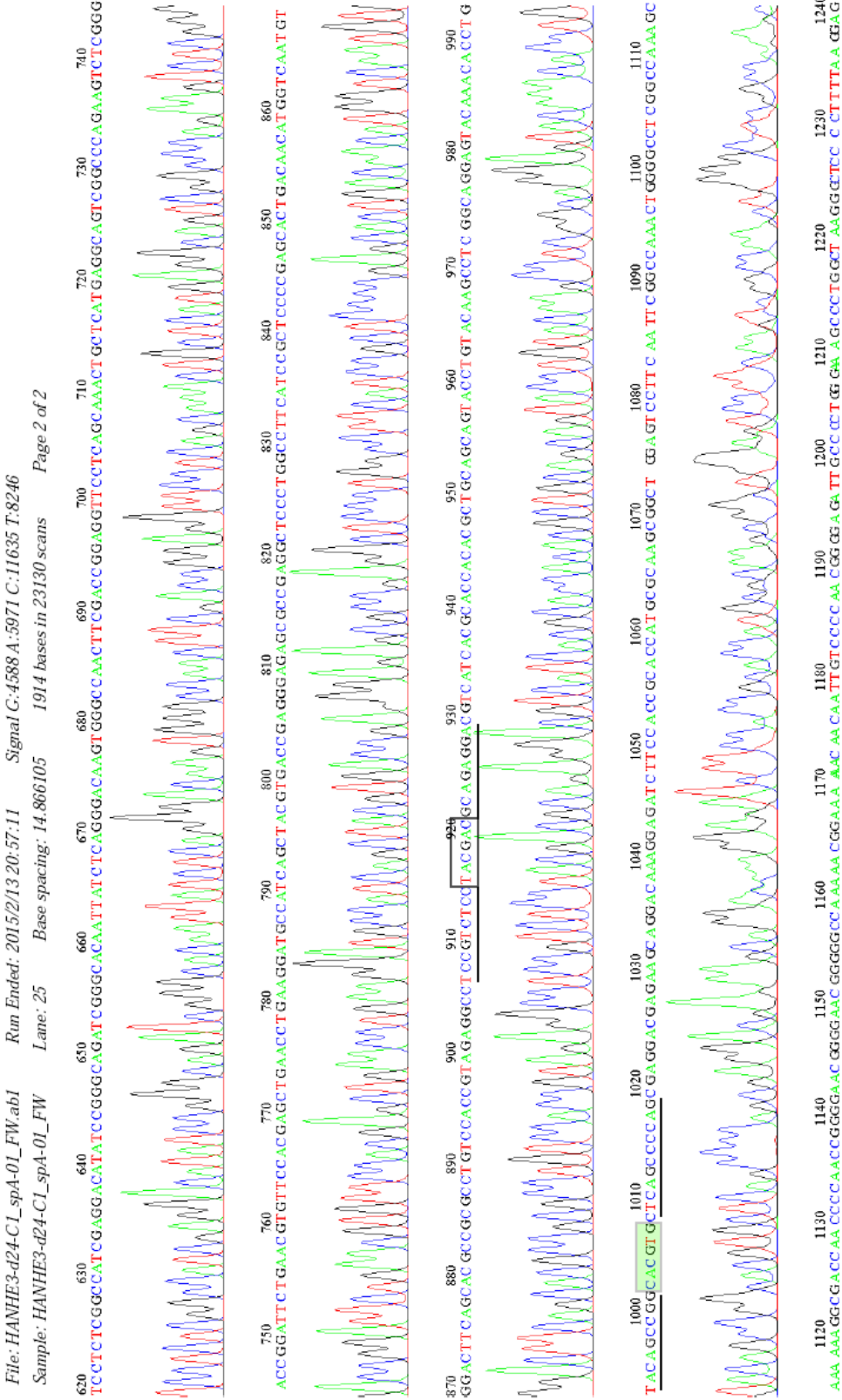
Sekvenciranjem DNA određuje se njen nukleotidni slijed. Na ovaj način možemo odrediti slijed aminokiselina određenog genskog produkta te utvrditi je li tijekom molekularnog kloniranja došlo do mutacije u molekuli DNA. Sekvenciranje DNA za nas je obavila kompanija Makrogen.

Analiza dobivenih sekvenci provedenih s tri početnice, početnica A i D te početnica 1358 koju je za potrebe sekvenciranja izradila kompanija Macrogen. Za sekvenciranje sam odabrala tri početnice kako bih pokrila kompletnu sekvencu umetka i sekvence neposredno prije ili poslije mjesta umetanja.

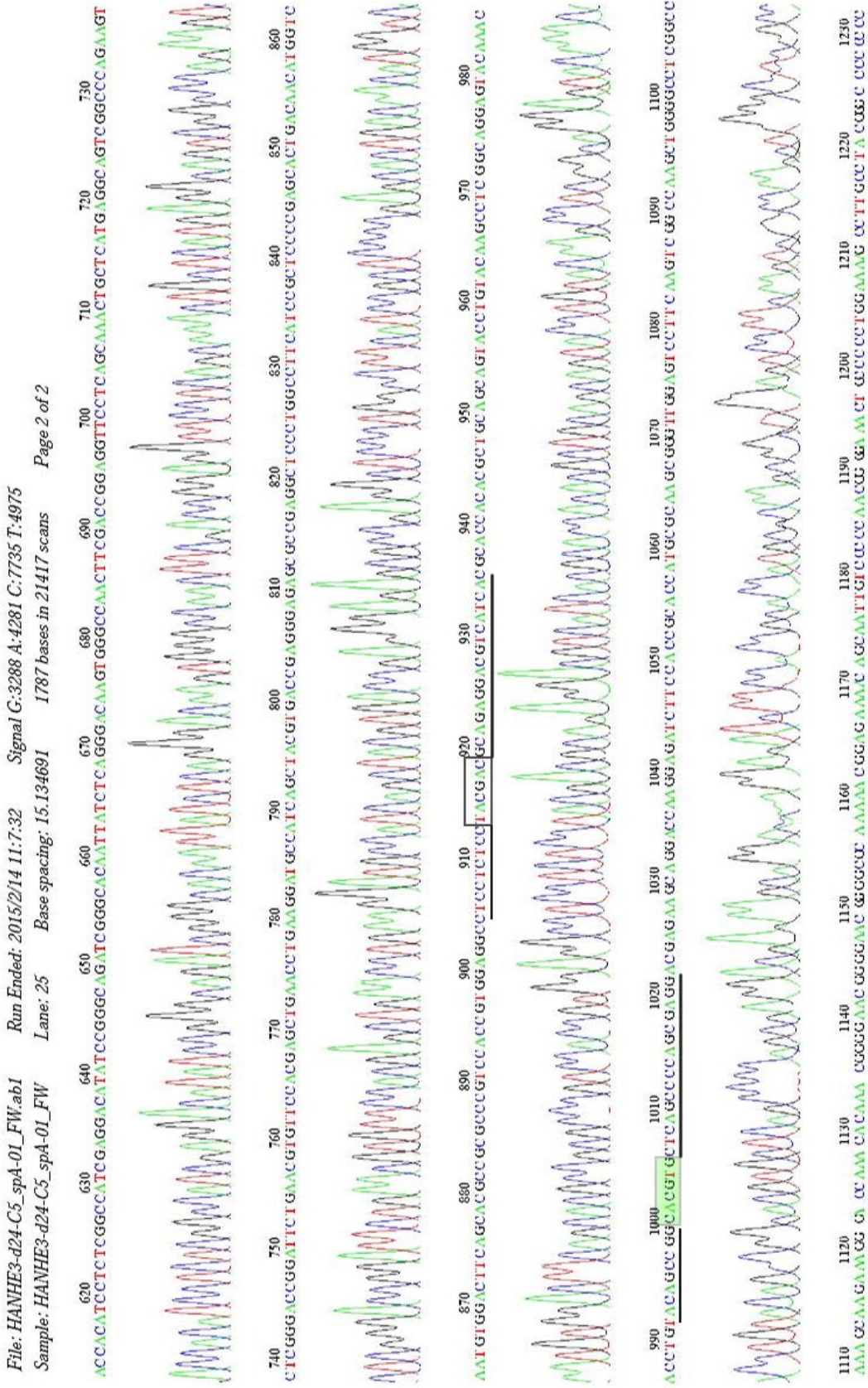
Analize sa sve tri početnice su pokazale da su delecija željene sekvence te postupak umetanja umetka u plazmid *pcDNA/HA-NHE3* uspješno provedeni. Na slici 18.a. i 18.b. su prikazani rezultati sekvenciranja mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranog iz C1 (Slika 18.a.) odnosno iz C5 (Slika 18.b.) uz pomoć početnice A.

Na sekvenci na slikama 18.a. i b. označeno je mjesto delecije kvadratom koji obuhvaća dvije aminokiseline, kodirane nukleotidima TAC i GAC. Radi se o aminokiselinama koje prethode ili slijede mjesto delecije. Analiza sekvence ispred i iza mjesta delecije kao i analiza cijelog umetka potvrdila je da nema greške u sintezi te da se radi o uspješno provedenoj deleciji i ligaciji mutiranog fragmenta. Sekvenca prekrivena prozirnim zelenim kvadratom označava sekvencu restrikcijskog mjesta za *PmaCI* koji je poslužio za umetanje umetaka u *pcDNA/HA-NHE3*. Analizom ove sekvence potvrdila sam da se umetak pravilno orijentirao.

a)



b)



Slika 18. Potvrda prisutnosti delecije sekvenciranjem unutar plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranih iz C1 i C5. a) *Shematski prikaz analize sekvenciranja plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranog iz C1 pomoću početnica A. Dvije aminokiseline, kodirane nukleotidima TAC i GAC (označene kvadratom na slici) su aminokiseline između kojih se nalazio izbačeni slijed od 24 aminokiselina. Analiza sekvence ispred i iza mjesta delecije potvrdila je da nema greške u sintezi te da se radi o uspješno provedenoj deleciji. Drugi, označeni slijed nukleotida prikazuje PmaCI restrikcijsko mjesto čija je analiza sekvence potvrdila da se umetak pravilno orijentirao.* b) *Shematski prikaz analize sekvence *pcDNA/dHA-NHE3* izoliranog iz C5 pomoću početnice A pokazuje identične rezultate.*

3.10. Transfekcija mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* u stanice PS120

Mutirane plazmide *pcDNA/dHA-NHE3* čije su delecije potvrđene sekvenciranjem koristila sam za transfekciju u staničnu liniju fibroblasta PS120. Kao kontrolu koristila sam nemutirani plazmid *pcDNA/HA-NHE3*. Uzgojem stanica u selektivnom mediju s antibiotikom bilo je moguće vidjeti da li je transfekcija uspjela, tj. koje su stanice primile mutirani odnosno nemutirani plazmid.

Kako plazmid *pcDNA 3.1(+)* sadrži gen za otpornost na antibiotik tako on omogućuje stanicama preživljavanje u selektivnom mediju. Stanice transfecirane mutiranim i nemutiranim plazmidom sam održavala u selektivnom mediju s antibiotikom G418 i kroz period od dva tjedna dva puta presađivala. Tijekom održavanja, većina stanica s mutiranim, odnosno nemutiranim plazmidom je preživjela što znači da je transfekcija uspjela. Nakon drugog presađivanja, kada su stanice postigle 60-70% konfluentnosti, nastavila sam s zakiseljavanjem.

Nakon potvrde transfekcije, provela sam zakiseljavanje koje mi je trebalo pokazati očuvanost bazalne funkcije membranskog NHE3. Zakiseljavanjem stanica tek manji dio stanica je uginuo što pokazuje da je najvjerojatnije došlo ili do bolje ekspresije NHE3 ili je izbacivanje regulacijske domene Leu586-Arg609 koja uglavnom djeluje inhibirajuće pospješilo bazalnu aktivnost NHE3 što je rezultiralo boljim preživljavanjem transfeciranih stanica. I nakon zakiseljavanja opaženo je da propada neznatno više stanica transfeciranih nemutiranim plazmidom u usporedbi sa propadanjem stanica transfeciranih mutiranim plazmidom.

4. RASPRAVA

Na^+/H^+ izmjenjivači (NHEs) su membranski proteini važni za brojne fiziološke procese. Odgovorni su za održavanje homeostaze unutarstaničnog pH i staničnog volumena, nadzora nad sistemskim elektrolitima kao i za nadzor nad acidobaznom homeostazom (Krapf i Alpern 1993.). Izooblici se strukturno sastoje od transmembranske i citoplazmatske domene od kojih transmembranska ima ulogu u izmjeni unutarstaničnog H^+ za izvanstanični Na^+ dok je citoplazmatska domena odgovorna za regulaciju aktivnosti NHEs tako što posreduje u djelovanju brojnih inhibitora i stimulatora.

Do sada je otkriveno devet izooblika, od kojih su najviše istraživani izooblici NHE1, NHE2 i NHE3. Serijom točkastih mutacija i delecijama završnih dijelova otkrivena su mnogobrojna regulacijska mjesta unutar citoplazmatskih domena pojedinih izooblika NHE kao i važnost koju pojedina regulacijska mjesta imaju na aktivnost proteina NHE (Tse i sur. 1993.).

Tako su istraživanja kod proteina NHE1 pokazala da se unutar slijeda aminokiselina 636-816 nalaze mnoga fosforilacijska mjesta i da se njegovim odsijecanjem regulacija pomoću kinaza smanjila za 50%, sugerirajući da fosforilacija nekog određenog mjesta unutar sekvence NHEs nije jedini mehanizam regulacije tog proteina (Donowitz i sur. 1996.).

Studije koje su na proteinu NHE3 nastojale odrediti regulacijske regije unutar citoplazmatske domene uključivale su stvaranje točkastih mutacija, delecije završnih dijelova citoplazmatske domene ili stvaranje peptida sastavljenih od sljedova aminokiselina pojedinih segmenata citoplazmatske domene. Ove su studije pokazale da se citoplazmatska domena može grubo podijeliti u dvije regulatorne domene; jedne stimulacijske (Asn475 do Tyr585) i druge inhibicijske (Tyr585 do Met832) domene. Preko stimulacijske domene djeluju faktori rasta (poput fibroblastnog faktora rasta, FGF), okadaična kiselina, fetalni goveđi serum), dok preko inhibicijske domene djeluju različite protein kinaze, protein kalmodulin (CaM), fosfolipaze (Donowitz i sur., 1996.). Danas se zna da je protein NHE3 istodobno reguliran preko više regulacijskih mjesta (Kurashima i sur. 1997.).

Studije koje su provedene u ovom radu koncentrirale su se na inhibicijski dio citoplazmatske domene, konkretno na segment aminokiselina Leu586-Arg609 za koje je dokazano da je vezno mjesto za regulatore poput kalmodulina, enzima *kalmodulin kinaze II*, pomoćničkih proteina NHERF 1 i 2, *kazein kinaza 2* (CK2) i PLC γ kao i za ezrin koji se na ovaj segment veže direktno ili indirektno preko proteina NHERF. (Ikeda i sur. 1997.)

Da li je i koliko vezanje regulatora za ovaj segment iz inhibitornog dijela citoplazmatske domene ključan za njihovu regulaciju moguće je ispitati uklanjanjem navedenog segmenta. Time bi se otvorila mogućnost daljnjih ispitivanja utjecaja spomenutih regulatora na protein NHE3.

4.1 Konstrukcija mutiranog fragmenta AD

U dizajniranju postupka kojim bih iz *NHE3* uklonila sekvencu od interesa prvo sam pokušala s metodom koja je uključivala primjenu restrikcijskih endonukleaza s kojima bi se iz *NHE3* izrezala sekvenca koja kodira segment Leu586-Arg609. Međutim, analizom restrikcijskih mjesta unutar plazmida *pcDNA/HA-NHE3* nisam uspjela pronaći odgovarajuće enzime. Svaki potencijalni enzim koji se mogao koristiti u svrhu isijecanja željene sekvence imao je ili restrikcijsko mjesto unutar plazmida *pcDNA 3.1 (+)* ili je njegovo restrikcijsko mjesto bilo predaleko od mjesta delecije.

Pokušaji isijecanja pojedinih segmenata iz citoplazmatskog dijela *NHE3* nisu se isto tako u suradničkom laboratoriju (osobni kontakti s prof. Donowitzom) pokazali uspješnim. Alternativni pristup koji su koristili bazirao se na izradi početnica koje su sjedale neposredno prije (negativna početnica) i neposredno poslije (pozitivna početnica) mjesta delecije. Tijekom reakcije PCR početnice bi napravile cijeli krug oko plazmida, a plazmid bi se potom recirkulirao pomoću enzima *ligaze*. Prednost ove metode je relativna jednostavnost i mali broj postupaka, međutim negativna strana ovakvog pristupa vezana je uz povećanu vjerojatnost stvaranja grešaka (mutacija) tijekom umnožavanja. U njihovim rukama greške su se javljale učestalo što je bio razlog za njihovo odustajanje od ove metode. Za svaki slučaj pokušala sam napraviti deleciju koristeći istu metodu, međutim nisam uspjela dobiti željeni rezultat.

Stoga sam nastojala pronaći alternativnu metodu koja bi uključivala PCR budući da sam s PCRom mogla precizno odrediti koji će segment izrezati iz sekvence *NHE3*. Pretraživanjem se kao najprihvatljivija pokazala PCR metoda preklopnih nastavaka. Radi se o relativno novoj metodi čije su velike prednosti jednostavnost izvedbe, kratkoća vremena potrebnog za provedbu postupka i jednostavna konstrukcija fragmenata DNA koje u svojim preklopnim nastavcima sadrže željenu mutaciju (Heckman i Pease 2007.). Duljina fragmenata ovisi o restrikcijskim mjestima koja će se u kasnijim koracima postupka iskoristiti za umetanje novostvorenog fragmenta s delecijom u plazmid. Kako se obično radi o relativno kratkim fragmentima tako je i mogućnost nastanka grešaka prilikom reakcija PCR kojima se fragmenti umnožavaju svedena na minimum (Horton i sur. 2013.).

Pri određivanju endonukleaza koje bi se koristile u svrhu umetanja fragmenta u plazmid ključno je paziti na slijedeće: 1) da endonukleaze režu plazmid i umetak prije i poslije područja delecije, 2) da se restrikcijska mjesta nalaze u području sekvence između krajnjih početnica (u našoj su studiji to početnice A i D), i 3) da potencijalne restrikcijske endonukleaze ne djeluju i unutar plazmida *pcDNA 3.1(+)*. Za potrebe ove studije našla sam da unutar *NHE3* jedino enzim *PmaCI* zadovoljava tražene uvjete. Endonukleaza *PmaCI* nije djelovala na plazmid, a sekvencu *NHE3* je cijepala na dva mjesta, prije (između C840-G841) i poslije (C1914-G1915) mjesta delecije. Međutim otežavajuća je okolnost da *PmaCI* pri rezanju stvara tupe krajeve zbog čega je postojala velika vjerojatnost da se krajevi tretiranog plazmida prilikom postupka ligacije međusobno povežu odnosno da se umetak ugradi s obrnutom orijentacijom.

Postupak izrade mutacije pomoću izrade fragmenata s preklopnim nastavcima pokazala se u našim rukama pouzdanom i u konačnici relativno jednostavnom metodom u kojoj je najzahtjevniji dio bio odrediti najpovoljnije temperature spajanja i omjere koncentracija fragmenata. U našem pristupu najbolji je rezultat postignut pri omjeru koncentracija fragmenata 4:1 (AB:CD) i pri temperaturi od 55 °C.

U originalnu metodu povezivanja fragmenata s preklopnim nastavcima unijela sam modifikaciju koja nam je znatno olakšala umnažanje željenog fragmenta AD. Prije konačne reakcije umnažanja AD fragmenta, koji sam provela u prisutnosti početnica A i D, uvela sam međukorak u kojem sam izolirane fragmente s preklopnim nastavkom (AB i CD) pomiješala najprije s polimerazom i bez uvođenja početnica. Ovim sam međukorakom omogućila stvaranje male količine fragmenta s delecijom (fragment AD) koja je posljednjem koraku poslužila kao predložak za njegovo uspješno umnožavanje u prisutnosti polimeraza i početnica A i D.

Slijedeći koraci u stvaranju mutiranog plazmida *pcDNA/dHA-NHE3* provedeni su manje više rutinski, uz izuzetak vezan za odabir kolonija koje sadrže plazmide s pravilno orijentiranim umetkom. U tu svrhu odabrala sam slučajnim izborom više kolonija iz kojih su izolirani plazmidi *pcDNA/dHA-NHE3*, u koje sam prethodno postupkom ligacije ugradila umetak, fragment s delecijom tretiran endonukleazom *PmaCI*. Zbog tupih krajeva nastalih djelovanjem *PmaCI* umetak se u plazmid mogao ugraditi u bilo kojoj orijentaciji, pravilnoj ili obrnutoj. Odabir kolonije s plazmidom u kojem je umetak orijentiran pravilno bila je rezultat čiste slučajnosti. S druge strane, defosforilacijom tupih krajeva plazmida *pcDNA/HA-NHE3* uspješno sam spriječila njegovu recikulaciju bez umetka.

Za provjeru pravilne orijentacije umetka unutar vektora odlučila sam se za metodu s restriksijskim endonukleazama. Jednostavna i brza metoda koja daje jasne rezultate. Jedini joj je nedostatak što je često teško pronaći odgovarajuće enzime kojim bi se moglo lako testirati uspješnost ugradnje umetka s pravilnom orijentacijom u plazmid. Sretna okolnost je bila da sam uspjela pronaći dvije endonukleaze koje su se pokazale izvrsnim oruđem za provjeru orijentacije umetka u mutiranom plazmidu *pcDNA/dHA-NHE3* što je najbolje pokazano na slici 15. Iz elektroforeze je vrlo jasno vidljivo koje su kolonije posjedovale plazmide s pravilno orijentiranim umetkom, u odnosu na kolonije koje to nisu imale. Dodatno sam pravilnu orijentaciju umetka potvrdila PCR reakcijom.

Također sam željela dokazati uspješnost delecije pomoću restriksijskih endonukleaza, međutim, pošto nisam uspjela naći endonukleazu koja ima restriksijsko mjesto unutar područja delecije, oslonila sam se na reakciju PCR i na početnicu (T) koja sjeda unutar područja delecije. Iako tijekom reakcije PCR uvijek postoji mogućnost nespecifičnog vezanja početnica kao i neželjenih mutacija dobila sam jasan dokaz uspješne mutacije koju sam dodatno potvrdila sekvenciranjem.

4.2. Transfekcija stanične linije fibroblasta PS120 i zakiseljavanje stanica

Pored stvaranja plazmida s mutiranim genom za *HA-NHE3* iz kojeg je izbačeno regulacijsko područje između 586.-609. aminokiseline, cilj mi je bio pokazati i hoće li delecija tog regulacijskog područja utjecati na funkcionalnost mutiranog NHE3 eksprimiranog u membrani stanica. Kako bih ispitala bazičnu funkciju mutiranog NHE3, plazmid *pcDNA/dHA-NHE3* sam transfecirala u staničnu liniju fibroblasta PS120. Kao kontrolnu skupinu koristila sam PS120 stanice koje sam transfecirala s nemutiranim plazmidom *pcDNA/HA-NHE3*.

Rutinski sam stanice transfecirane mutiranim i nemutiranim plazmidom nakon transfekcije izložila mediju sa selektivnim antibiotikom G418 testirajući na taj način prisutnost plazmida u stanicama budući da su izloženost selektivnom antibiotiku mogle preživjeti samo stanice s plazmidom koji posjeduje gen za otpornost na selektivni antibiotik. Preživljenje stanica je bilo približno podjednako, međutim, prilikom postupka zakiseljavanja kojima sam željela testirati ekspresiju mutiranog i nemutiranog proteina NHE3 u staničnoj membrani pokazala je razlike između testiranih stanica. Kod kontrolnih stanica transfeciranih nemutiranim plazmidom *pcDNA/HA-NHE3* bilo je više mrtvih stanica u odnosu na stanice koje su transfecirane mutiranim plazmidom *pcDNA/dHA-NHE3*. Ovakav nalaz sugerirao je da izbacivanje slijeda aminokiselina Leu586-Arg609 iz NHE3 nije utjecalo na njegovu ekspresiju u staničnoj membrani. Upravo suprotno, s obzirom da sam deletirala segment unutar proteina NHE3 za koji je pokazano da uglavnom djeluje inhibirajuće (Žižak i sur. 2012; Sarker i sur. 2008.; Zhao i sur. 1999.) moguće je da je došlo do bolje ekspresije proteina NHE3 ili do bolje bazalne aktivnosti. Radi li se ovdje o prvom ili drugom razlogu ili možda njihovoj kombinaciji ostaje da se analizira u nastavku studije.

Naime, pokazano je da stvari koje preko našeg deletiranog segmenta reguliraju protein NHE3, poput *CaMKII*, *CK2*, *PLC γ* i regulacijski proteini NHERF1 i NHERF2, djeluju tako da povećavaju njegovu ekspresiju na membrani i/ili aktivnost NHE3 povećavaju fosforilacijom fosfatnih mjesta unutar citoplazmatskog dijela proteina NHE3.

S obzirom da su se na sekvenci *NHE3* većinom provodile točkaste mutacije ili delecije cijelih završnih dijelova proteina, važno je analizirati kakav bi učinak na aktivnost NHE3 imalo isijecanje manjih segmenata iz citoplazmatskog dijela NHE3. Na taj način može se testirati djeluju li regulatori NHE3, samo preko isječenog segmenta ili su u njihovu regulaciju proteina NHE3 uključeni dijelovi sekvence koje se nalaze prije ili poslije mjesta delecije.

Stvaranje mutirane molekule NHE3 iz koje sam izbacila regulacijsku domenu predstavlja stoga dobru osnovu za daljnja istraživanja regulacijskih učinaka regulatora koji djeluju preko našeg segmenta na aktivnost NHE3 molekule. Među prvim stvarima biti će važno odrediti gubi li se regulacija NHE3 preko regulacijskog proteina NHERF2 za kojeg je pokazano da je važan u normalnoj funkciji NHE3 te da svoj učinak iskazuje vezanjem za našu deletiranu regulacijsku domenu.

5. ZAKLJUČAK

- Konstruiran je mutirani vektor pcDNA/dHA-NHE3 u kojem je PCR metodom iz gena NHE3 izbačena sekvenca za 24 aminokiseline Leu586-Arg609 koje čine regulacijsku domenu unutar NHE3.
- Mutacija provedena PCR metodom povezivanja fragmenata preko preklopnih nastavaka pokazala se relativno jednostavnom, brzom i uspješnom metodom kojom je moguće ostvariti preciznu kontrolu nad genskim inženjeringom.
- Delecija važne regulacijske domene Leu586-Arg609 iz NHE3 proteina preko koje neposredno ili posredno na aktivnost NHE3 djeluju brojni čimbenici nije se pokazalo ključnim za održavanje bazalne funkcije NHE3 proteina u membrani stanica PS120 fibroblasta.
- Delecija regulacijske domene nije utjecala na sintezu i ekspresiju NHE3 na membrani stanica budući da izbacivanje domene nije smanjilo preživljenje transfeciranih stanica nakon tretmana selektivnim antibiotikom i zakiseljavanjem.
- Budući da se preko regulacijske domene Leu586-Arg609 najvećim dijelom ostvaruje inhibicijsko djelovanje različitih čimbenika izbacivanje ove domene i veće preživljavanje stanica izloženih selekcijskom antibiotiku i zakiseljavanju sugerira da bi za ovakvo ponašanje stanica moglo biti odgovorno uklanjanje inhibicijskog djelovanja izbačene regulacijske domene.

6. LITERATURA

1. Alexander, R. T., Furuya, W., Sz'aszi, K., Orlowski, J., i Grinstein, S. (2005.). "Rho GTPases dictate the mobility of the Na/H exchanger NHE3 in epithelia: role in apical retention and targeting". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12253–12258
2. Biemesderfer, D., Reilly, R., Exner, M. i Igarasgu, P. (1992.). "Imunocytochemical characterization of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE1 in rabbit kidney". *American Journal of Physiology* **263**, F833-F840
3. Bobulescu, I. A. i Moe, O. W. (2006.). "Na⁺/H⁺ exchangers in renal regulation of acid-base balance". *Nephrology* **26**, 334-344
4. Bookstein, C., DePaoli, A. M., Xie, Y., Niu, P., Musch, M. W., Rao, M. C. i Chang, E. B. (1994.). "Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine". *The American Society of Clinical Investigation* **93**, 106-113
5. Cha B., Kim, J. H., Hut, H., Hogema, B. M., Nadarja, J., Žižak, M., Cavet, M., Lee-Kwon, W., Lohmann, S. M., Smolenski, A., Tse, C. M., Yun, C., deJonge, H. R. i Donowitz, M. (2005.). "cGMP inhibition of Na⁺/H⁺ antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity proteine kinase G-anchoring protein". *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 16642-16650
6. Chou, P. Y. i Fasman, G. D. (1974.). "Prediction of protein conformation". *Biochemistry* **13**, 222-245
7. Cohen, M. E., Reinlib, L., Watson, A. J., Gorelick, F., Rys-Sikora, K., Tse, M., Rood, R. P., Czernik, A. J., Sharp, G. W. i Donowitz, M. (1990.). "Rabbit ileal villus cell brush border Na⁺/H⁺ exchange is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, a brush border membrane protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 8990–8994
8. Counillon, L., Franchi, A. i Pouyssegur, J. (1993.). "A point mutation of the Na⁺/H⁺ exchanger gene (NHE-1) and amplification of the mutated allele confer amiloride-resistance upon chronic acidosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **251**, 509-517

9. D'Souza, S., Garcia-Cabado, A., Yu, F., Teter, K., Lukacs, G., Skorecki, K., Moore, H. P., Orłowski, J. i Grinstein, S. (1998). "The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na^+/H^+ exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes". *Journal of Biological Chemistry* **273**, 2035-2043
10. Donowitz, M. i Li, X. (2007.). "Regulatory binding partners and complexes of NHE3". *Physiological Review* **87**, 825-887
11. Donowitz, M. i Tse, C. M. (2001.). "Molecular physiology of mammalian epithelial Na^+/H^+ exchangers NHE2 and NHE3. " *Current Topics in Membranes* **50**, 437-498
12. Donowitz, M. i Welsh, M. J. (1987.). "Regulation of mammalian small intestine electrolyte secretion.". *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 1351-1388
13. Donowitz, M., Fogel, R., Battisti, L. i Asarkof, N. (1982.). "The neurohumoral secretagogues carbachol, substance P and neurotensin increase Ca^{++} influx and calcium content in rabbit ileum". *Life Sciences* **31**, 1929-1937
14. Donowitz, M., Levine, S. A., Yun, C. H. C., Brant, S. R., Nath, S., Yip, J., Hoogerwerf, S., Pouyssegur, J. i Tse, C. (1996.). "Molecular studies of members of the mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family". *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders* 259-275
15. Donowitz, M., Mohan, S., Xinjun Zhu, C., Chen, T., Lin, R., Cha, B., Zachos, N. C., Murtazina, R., Sarker, R. i Li, X. (2009.). *Review article.* "NHE3 regulatory complexes". *The Journal of Experimental Biology* **212**, 1638-1646
16. Freiberg, J. M., Kinsella, J. i Sacktor, B. (1982.). "Glucocorticoids increase the Na^+/H^+ exchange and decrease the Na^+ gradient-dependent phosphate-uptake systems in renal brush border membrane vesicles". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **9**, 4932-4936
17. Gekle M., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., Gaßner, B. i Silbernagl, S. (1999.). "Inhibition of Na^+/H^+ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum". *The Journal of Physiology* **520**, 709-721

18. Gekle, M., Freudinger, R. i Mildenerger, S. (2001.). "Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 3 interferes with apical receptor-mediated endocytosis via vesicle fusion". *Journal of Physiology* **531**, 619-629
19. Grinstein, S., Rotin, D., Marson i M. J. (1989.). "Na⁺/H⁺ exchanger and growth factor-induced cytosolic pH change. Role in cellular proliferaton". *Biochim Biophysica Acta* **988**, 73-91
20. He, P. i Yun, C. (2009). *Review article*, "Mechanisms of the regulation of the intestinal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 1-10
21. He. P., Klein. J. i Yun. C. C. (2010.). "Activation of Na⁺/H⁺ Exchanger NHE3 by Angiotensin II Is Mediated by Inositol 1,4,5-Triphosphate (IP₃) Receptor-binding Protein Released with IP₃ (IRBIT) and Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II". *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 27869-27878
22. Heckman, K. L. i Pease, L. R. (2007.). "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension". *Nature Protocols* **2**, 924-932
23. Honegger, K. J., Capuano, P., Winter, C., Bacic, D., Stange, G., Wagner, C. A., Biber, J., Murer, H. i Hernando, N. (2005.). "Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC)". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 803-808
24. Horton, R. M., Cai, Z., Ho, S. N. i Pease, L. (2013.). "Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction". *BioTechniques* **54**, 528-535
25. Hwang, J. I., Heo, K., Shin, K. J., Kim, E., Yun, C. H. C., Ryu, S. H., Shin, H. S. i Suh, P. G. (2000.). "Regulation of Phospholipase C-b3 Activity by Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2". *The journal of biological chemistry* **275**, 16632-16637
26. Ikeda, T., Schmitt, B., Pouyssegur, J., Wakabayashi, S. i Shigekawa, M. (1997.). "Identification of Cytoplasmic Subdomains That Control pH-Sensing of the Na⁺/H⁺Exchanger (NHE1): pH-Maintenance, ATP-Sensitive, and Flexible Loop Domains". *The Journal of Biochemistry* **121**, 295-303

27. Knickelbein, R., Aronson, P. S., Atherton, W., i Dobbins, J. W. (1983.). “Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange“. *American Journal of Physiological Gastrointestinal Liver Physiology* **245**, G504-G510
28. Kocinsky, H. S., Dynia, D. W., Wang, T., i Aronson, P. S. (2007.). “NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity“. *American Journal of Physiology* **293**, F212–F218
29. Krapf, R. i Alpern, R. J. (1993.). “Cell pH and transepithelial H/HCO₃ transport in renal proximal tubule“. *Journal of Membrane Biology* **131**, 1-10
30. Krishnan, S., Rajendran, V. M. i Binder, J. J. (2003.). “Apical NHE isoforms differentially regulate butyrate-stimulated Na absorption in rat distal colon“. *American Journal of Physiology Cell* **285**, C1246-C1254
31. Kurashima, K., Yu, F. H., Cabado, A. G., Szabo, E. Z., Grinstein, S. i Orlowski, J. (1997.). “Identification of sites required for downregulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase. Phosphorylation-dependent and - independent mechanisms“. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28672–28679
32. Moe, O. W., Miller, R. T., Horie, S., Cano, A., Preisig, P. A i Alpern, R. J. (1991.). “Differential regulation of Na⁺/H⁺ antiporter by acid in renal epithelial cells and fibroblasts“. *Journal of Clinical Investigation* **88**, 1703-1708
33. Murer, H., Hopfer, U. i Kinne, R. (1976.). “Sodium, proton antiport in brush border membranes isolated from rat small intestine and kidney“. *Biochemistry Journal* **154**, 597-602
34. Noonan, W. T., Woo, A. L., Nieman, M. L., Prasad, V., Schultheis, P. J., Shull, G. E. i Lorenz, J. N. (2005.). “Blood pressure maintenance in NHE3-deficient mice with transgenic expression of NHE3 in small intestine“. *American Journal of Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **288**, R685-R689
35. Orlowski, J., Kandasamy, R.A. i Shull, G. E. (1992.). “Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family“. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 9332-9339

36. Sarker, R., Grønberg, M., Cha, B., Mohan, S., Chen, Y., Pandey, A., Litchfield, D., Donowitz, M. i Li, X. (2008.). “Casein Kinase 2 Binds to the C Terminus of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) and Stimulates NHE3 Basal Activity by Phosphorylating a Separate Site in NHE3“. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 3859–3870
37. Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J. i Doetschman, T. (1998.). “Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger“. *Nature Genetics* **19**, 282-285
38. Syed, I., Rao, D. D., Bavishi, D., Dahdal, R. Y., Harig, J. M., Ramaswamy, K. i Dudeja, P. K. (1994.). “Regional distribution of Na/H exchanger isoforms, NHE1 and NHE3“. *Gastroenterology* **93**, 106–113
39. Thomson, R. B., Wang, T., Thomson, B. R., Tarrats, L., Girardi, A., Mentone, S., Soleimani, M., Kocher, O. i Aronson, P. S. (2005). “Role of PDZK1 inmembrane expression of renal brush border ion exchangers“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 13331-13336
40. Tse, CM., Brant, S. R., Walker, M. S., Pouyssegur, J. i Donowitz, M. (1992.). “Cloning and Sequencing of a Rabbit cDNA Encoding an Intestinal and Kidney-specific Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform (NHE-3)“. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 9340-9346
41. Tse, M., Levine, S., Yun, C., Brant, S., Counillon, L. T., Pouyssegur, J. i Donowitz, M. (1993.). *Topical Review* „Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger gene family“. *The Journal of Membrane Biology* **135**, 93-108
42. Wakabayashi, S., Fafournoux, P., Sardet i C., Pouyssegur, J. (1992.). “The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signal and controls H⁺ sensing“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 2424-2428
43. Wakabayashi, S., Pang, T., Su, X. i Shigekawa, M. (2000.). “A novel topology model of the human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1“. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7942-7949
44. Walker, N. M., Simpson, J. E., Yen, P. F., Gill, R. K., Rigsby, E. V., Brazill, J. M., Dudeja, P. K., Schweinfest, C. W. i Clarke, L. L. (2008.). “Down-regulated in adenoma Cl/HCO₃ exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine“. *Gastroenterology* **135**, 1645-1653

45. Yip, K. P., Tse, C. M., McDonough, A. A., i Donald J. Marsh, D. J. (1998.). "Redistribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubules induced by acute and chronic hypertension". *American Journal of Physiology* **98**, F565-F575
46. Yun, C. H., Oh, S., Žižak, M., Steplock, D., Tsao, S., Tse, C. M., Weinman, E. J. i Donowitz, M. (1997.). "cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 3010–3015
47. Yun, C. H., Tse, C. M., Nath, S., Levine, S. L. i Donowitz, M. (1993.). "Structure/function studies of mammalian Na⁺/H⁺ exchangers". *American Journal of Physiology* **482**, 1S–6S
48. Yun, C.H. C., Tse, C. M. i Donowitz, M. (1995.). "Chimeric Na⁺/H⁺ exchangers: an epithelial membrane-bound N-terminal domain requires an epithelial cytoplasmic C-terminal domain for regulation by protein kinases". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 10723-10727
49. Zachos, N. C., Tse, M., i Donowitz, M. (2005.). "Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange". *Annual Review of Psychology* **67**, 411–43
50. Zhao, H., Wiederkehr, M. R., Fan, L., Collazo, R. L., Crowder, L. A, i Moe, O. W. (1999.). "Acute inhibition of Na/H exchanger NHE-3 by cAMP: role of protein kinase a and NHE-3 phosphoserines 552 and 605". *Journal of Biological Chemistry* **274**, 3978–3987
51. Zhao, H., Wiederkehr, M. R., Fan, L., Collazo, R. L., Crowder, L. A. i Moe, O. W. (1999.). "Acute inhibition of Na/H exchanger NHE3 by cAMP". *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 3978-3987
52. Žižak, M., Bartoniček, D., Cha, B., Murtazina, R., Kim, J. H., Lee-Kwon, W., Gorelick, F., Tse, M. i Donowitz, M. (2003.). "Calcium/calmodulin dependent protein kinase II constitutively binds and regulates the ileal BB Na/H exchanger NHE3". *Gastroenterology* **124**, T1034
53. Žižak, M., Cavet, M. E., Bayle, D., Tse, C. M.,Hallen, S., i sur. (2000.). "Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 has 11 membrane spanning domainsand a cleaved signal peptide: topology analysis using in vitro transcription/translation". *Biochemistry* **39**, 8102–8112

54. Žižak, M., Chen, T., Bartoniček, D., Sarker, R., Zachos, C., Cha, B., Kovbasnjuk, O., Korac, J., Mohan, S., Cole, R., Chen, Y., Tse, C. M. i Donowitz, M. (2012.). "Calmodulin kinase II constitutively binds, phosphorylates, and inhibits brush border Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) by a NHERF2 protein-dependent process". *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 13442-13456
55. Žižak, M., Lamprecht, G., Steplock, D., Tariq, N., Shenolikar, S., Donowitz, M., Yun, C. H. C. i Weinman, E. J. (1999.). "cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor". *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 24753-24758

7. ŽIVOTOPIS

Ime mi je Dora Brauneger. Rođena sam 7. 11. 1990. godine u Brežicama u Sloveniji, ali cijeli život živim u Samoboru. Pohađala sam Osnovnu školu Bogumila Tonija, a 2005. godine upisala sam Gimnaziju Antuna Gustava Matoša u Samoboru.

Godine 2009. upisala sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu te sam 2012. godine stekla zvanje sveučilišne prvostupnice biologije. Iste godine upisala sam diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija.

Tijekom studiranja, osim redovnih praktikuma, odradila sam laboratorijsku stručnu praksu iz područja animalne fiziologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Također sam tijekom ljetnog semestra 2013. godine volontirala na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu gdje sam imala priliku proširiti svoje znanje u laboratorijskim tehnikama. Iste godine prešla sam na Medicinski fakultet u Zagrebu, gdje sam u Zavodu za fiziologiju imala priliku usvojiti tehnike molekularne biologije. Zbog velikog zanimanja za područje istraživanja koje sam tamo provodila, odlučila sam se za izradu ovog diplomskog rada.