

# Ciljni proteini za ADP-ribozilaciju iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

---

**Kozulić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:053774>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-24**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Petra Kozulić

**CILJNI PROTEINI ZA ADP-RIBOZILACIJU  
IZ BAKTERIJE *STREPTOMYCES  
COELICOLOR***

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Andreje Mikoč, znanstvene suradnice.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Istraživanje uloge proteinske modifikacije ADP-ribozilacije kod bakterija (HrZZ IP-2016-06-4242).

## Zahvale

*Mentorici dr. sc. Andreji Mikoč veliko hvala na pruženoj prilici i povjerenju – znala sam da ovaj Diplomski rad želim izraditi pod Vašim mentorstvom i prije nego ste mi na prvom sastanku do kraja objasnili čime se bavite. Divim se Vašoj predanosti prema svemu što radite, a prenijeli ste to i na mene. Hvala Vam na tome.*

*Hvala svima iz Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković, a posebno Petri i Andrei na svim savjetima, odgovorima na pitanja i ugodnoj atmosferi od prvog dana.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Morani Dulić na susretljivosti, korisnim komentarima i stručnim savjetima.*

*Hvala mojem malom krugu velikih ljudi – Jana, Ema, Martina, Ana, Tihana, Ivana, Copaki, Mirta, Dominik, ekipa ZČ...učinili ste studiranje (i život van studiranja) puno lakšim i ljepšim.*

*Matiji, jer je moj najveći oslonac i izvor motivacije. Hvala ti što si se pojavio baš onda kada je trebalo i što se svaki dan trudiš usrećiti me.*

*Na kraju veliko hvala mojoj obitelji koji su mi omogućili ovaj uspjeh. Roditeljima za svaku žrtvu, braći za svaki smijeh i baki za svaku molitvu. Hvala vam za sve...*

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Rod <i>Streptomyces</i>.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Opća obilježja</i> .....	3
2.1.2. <i>Životni ciklus</i> .....	3
<b>2.2. <i>Streptomyces coelicolor</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. ADP-ribozilacija proteina .....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. ADP-ribozilacija kod streptomiceta .....</b>	<b>7</b>
<b>§ 3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>8</b>
3.1.1. <i>Kemikalije</i> .....	8
3.1.2. <i>Puferi</i> .....	8
3.1.3. <i>Oligonukleotidne početnice</i> .....	9
3.1.4. <i>Plazmidi</i> .....	9
3.1.5. <i>Enzimi</i> .....	10
3.1.6. <i>Hranjive podloge</i> .....	10
3.1.7. <i>Bakterijski sojevi</i> .....	10
3.1.8. <i>Antibiotici</i> .....	11
3.1.9. <i>Boje i markeri</i> .....	11
3.1.10. <i>Ostali materijal</i> .....	11
<b>3.2. Metode.....</b>	<b>11</b>
3.2.1. <i>Izolacija genomske DNA</i> .....	11
3.2.2. <i>Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)</i> .....	12
3.2.3. <i>Elektroforeza u agaroznom gelu</i> .....	13
3.2.4. <i>Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela</i> .....	14
3.2.5. <i>Razgradnja molekula DNA restrikcijskim endonukleazama</i> .....	14
3.2.6. <i>Ligacija fragmenata DNA</i> .....	15
3.2.7. <i>Transformacija bakterijskih stanica</i> .....	15
3.2.8. <i>Izolacija plazmidne DNA</i> .....	16

---

3.2.9. Određivanje primarne strukture DNA Sangerovom dideoksi metodom.....	16
3.2.10. Indukcija prekomjerne ekspresije gena.....	17
3.2.11. Sonikacija.....	17
3.2.12. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom.....	18
3.2.13. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu.....	18
3.2.14. Vizualizacija proteina u gelu.....	20
3.2.15. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	21
3.2.16. ADP-ribozilacija in vitro.....	21
3.2.17. Western analiza.....	22
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Rezultati.....</b>	<b>24</b>
4.1.1. Izolacija genomske DNA iz bakterije <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	24
4.1.2. Odabir ciljnih proteina za ADP-ribozilaciju.....	25
4.1.3. Dizajniranje početnica za umnažanje odabranih gena.....	27
4.1.4. Umnažanje gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).....	28
4.1.5. Razgradnja vektora i PCR produkata.....	29
4.1.6. Ligacija i transformacija.....	30
4.1.7. PCR na kolonijama.....	30
4.1.8. Izolacija rekombinantnih plazmida.....	31
4.1.9. Sekvenciranje.....	32
4.1.10. Ekspresija gena.....	35
4.1.11. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom i određivanje koncentracije.....	37
4.1.12. ADP-ribozilacija in vitro i western analiza.....	40
<b>4.2. Rasprava.....</b>	<b>42</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>45</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>46</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>47</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>LI</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Ciljni proteini za ADP-ribozilaciju iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

Petra Kozulić

ADP-ribozilacija je reverzibilna posttranslacijska modifikacija u kojoj se adenzin-difosfat-riboza (ADP-riboza) iz nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) prenosi na ciljni protein. Enzimi koji prenose ADP-ribozu na ciljne proteine su ADP-ribozil-transferaze, a enzimi koji ovu modifikaciju uklanjaju su ADP-ribozil-hidrolaze. ADP-ribozilacija kontrolira brojne važne stanične procese u eukariota i prokariota. Bakterije iz roda *Streptomyces*, a posebno *S. coelicolor*, dobri su modelni organizmi za proučavanje ADP-ribozilacije kod bakterija, jer posjeduju gene za nekoliko vrsta enzima koji bi mogli biti uključeni u reakcije ADP-ribozilacije i de-ADP-ribozilacije. K tome, ADP-ribozilacija regulira proizvodnju antibiotika, sekundarnih metabolita koje ove bakterije proizvode.

Kod *S. coelicolor* identificirano je nekoliko ciljnih proteina za ADP-ribozilaciju. U sklopu ovoga rada iz genoma bakterije *S. coelicolor* tehnologijom rekombinantne DNA klonirani su geni pet odabranih proteina za koje je pokazano da su mete ADP-ribozilacije. Geni su prekomjerno eksprimirani, a rekombinantni proteini pročišćeni afinitetnom kromatografijom. Provedeno je testiranje pročišćenih ciljnih proteina kao supstrata u reakciji ADP-ribozilacije *in vitro* pomoću enzima ADP-ribozil-transferaze SCO5461, čija je aktivnost od prije poznata, ali nisu poznati njeni proteinski supstrati. Reakcijom ADP-ribozilacije *in vitro* potvrđena je sposobnost enzima SCO5461 da modificira samoga sebe te je pokazano da ADP-ribozilira tri odabrana ciljna proteina.

Ovaj rad doprinosi istraživanju ADP-ribozilacije kod streptomiceta koje će omogućiti bolje razumijevanje i kontrolu metaboličkih puteva ovih važnih proizvođača velikog broja bioaktivnih spojeva.

(50 stranica, 22 slike, 9 tablica, 62 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ADP-ribozilacija, protein, posttranslacijska modifikacija, *Streptomyces coelicolor*

Mentor: dr. sc. Andreja Mikoč, zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zamjena: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Datum diplomskog ispita: 28. listopada 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

ADP-ribosylation target proteins from *Streptomyces coelicolor*

Petra Kozulić

ADP-ribosylation is a reversible post-translational modification in which adenosine-diphosphate-ribose (ADP-ribose) is transferred from nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) to the target protein. The enzymes which transfer ADP-ribose onto target proteins are ADP-ribosyl-transferases, while the enzymes which reverse this modification are ADP-ribosyl hydrolases. ADP-ribosylation controls many important cellular processes in eukaryotes and prokaryotes. Bacteria of the genus *Streptomyces*, in particular *S. coelicolor*, are good model organisms for studying ADP-ribosylation in bacteria because they have genes for several enzyme types that might be included in ADP-ribosylation and de-ADP-ribosylation reactions. In addition, ADP-ribosylation regulates the production of antibiotics which are secondary metabolites produced by these bacteria.

Several target proteins for ADP-ribosylation have been identified in *S. coelicolor*. In this research recombinant DNA technology has been used to clone the genes from five selected proteins from genome of *S. coelicolor* bacterium, which have been proven to be ADP-ribosylated. Genes are overexpressed, while recombinant proteins are purified by affinity chromatography. The testing was carried out on purified target proteins as substrates in reaction of ADP-ribosylation *in vitro* by using the enzyme ADP-ribosyl-transferase SCO5461 of which activity has been previously known, but its protein substrates have been unknown. ADP-ribosylation reaction *in vitro* has confirmed the ability of SCO5461 enzyme to modify itself and also demonstrated its ability to modify three selected target proteins.

This work contributes to the research of ADP-ribosylation in streptomyces, which will provide better understanding and control of metabolic pathways of these important producers of numerous bioactive compounds.

(50 pages, 22 figures, 9 tables, 62 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ADP-ribosylation, protein, post-translational modification, *Streptomyces coelicolor*

Mentor: Dr. Andreja Mikoč, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor
3. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor

Substitute: Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Date of exam: 28 October 2020

## § 1. UVOD

Streptomiceti su bakterije tla koje karakterizira kompleksan životni ciklus, u mnogim aspektima drugačiji nego u ostalih prokariota. Rastu u obliku micelija sastavljenog od razgranatih nitastih struktura tzv. hifa i razmnožavaju se tvoreći zračne hife koje pretvaraju u lance spora. Bakterije roda *Streptomyces* imaju razvijen sekundarni metabolizam kojim proizvode brojne biološki aktivne spojeve. Ovaj rod proizvodi oko 70% dostupnih antibiotika koji se koriste u medicinske svrhe.<sup>1</sup> Upravo zbog svog biotehnološkog potencijala streptomiceti su predmet mnogih istraživanja već dugi niz godina.<sup>2-4</sup>

Modelni organizam roda *Streptomyces*, bakterija *S. coelicolor*, najbolje je istražena vrsta streptomiceta. Njezin genom ima 8,6 Mbp i sastoji se od velikog broja kodirajućih gena zaslužnih za olakšanu prilagodbu ove bakterije različitim životnim uvjetima.<sup>5</sup> Među brojnim regulacijskim mehanizmima koji postoje kod ove bakterije je i posttranslacijska modifikacija, ADP-ribozilacija.<sup>6</sup>

ADP-ribozilacija je reverzibilna posttranslacijska modifikacija u kojoj se adenzin-difosfat-riboza (ADP-riboza) iz nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) prenosi na ciljni protein. Enzimi koji provode ADP-ribozilaciju nazivaju se ADP-ribozil-transferaze, a oni koji uklanjaju modifikaciju su ADP-ribozil-hidrolaze. Razlikujemo mono-ADP-ribozilaciju i poli-ADP-ribozilaciju. Mono-ADP-ribozilacija je vezanje jedne ADP-riboze na ciljni protein, a poli-ADP-ribozilacija vezanje lanaca ADP-riboze koji mogu biti razgranati te sadržavati i do 200 ADP-riboza. ADP-ribozilacijom se u prokariota i eukariota kontroliraju važni stanični procesi. ADP-ribozilacija u eukariota regulira popravak DNA, transkripciju, diobu stanice, razgradnju proteina.<sup>7</sup> Za razliku od eukariota, ADP-ribozilacija kod prokariota je slabo istražena. Poznato je da kod *S. coelicolor* ADP-ribozilacija kontrolira morfološku diferencijaciju i sekundarni metabolizam.<sup>8</sup> Bakterije iz roda *Streptomyces* dobri su modelni organizmi za proučavanje ADP-ribozilacije kod bakterija, jer posjeduju gene za nekoliko vrsta enzima koji bi mogli biti uključeni u reakcije ADP-ribozilacije i de-ADP-ribozilacije.<sup>9</sup> Kod bakterije *S. coelicolor* identificirana je i nekolicina ADP-riboziliranih proteina,<sup>6</sup> ali nije poznato koja ih ADP-ribozil-transferaza modificira.

S ciljem istraživanja ADP-ribozilacije kod streptomiceta koje će omogućiti bolje razumijevanje i kontrolu metaboličkih puteva ovih bakterija, u sklopu ovoga rada odabrani su

geni pet potencijalnih ciljnih proteina za ADP-ribozilaciju (SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629) iz bakterije *S. coelicolor* i provedeno je njihovo testiranje kao supstrata u reakciji ADP-ribozilacije *in vitro* pomoću enzima ADP-ribozil-transferaze SCO5461, čija je aktivnost od prije poznata,<sup>10</sup> ali nisu poznati njeni proteinski supstrati.

Ciljevi istraživanja:

1. Klonirati gene (SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629) koji kodiraju ciljne proteine za ADP-ribozilaciju iz bakterije *S. coelicolor*
2. Pročistiti ciljne proteine za ADP-ribozilaciju
3. Ciljne proteine testirati kao supstrate u reakcijama ADP-ribozilacije i de-ADP-ribozilacije *in vitro* koristeći dostupne ADP-ribozil-transferaze i ADP-ribozil-hidrolaze iz *S. coelicolor*

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Rod *Streptomyces*

#### 2.1.1. Opća obilježja

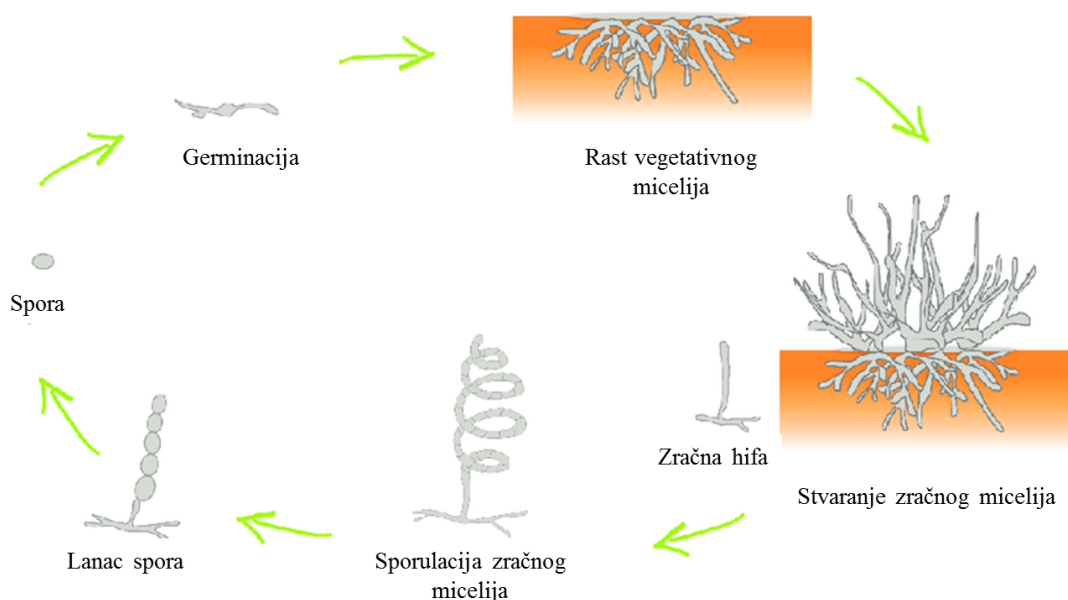
Streptomiceti su Gram-pozitivne aerobne bakterije tla svrstane unutar koljena *Actinobacteria* iz reda *Actinomycetales*.<sup>11</sup> Naziv *Actinomycetales* što u prijevodu znači „zrakaste gljive“, dodijeljen je ovom redu bakterija jer je prvi poznati primjer koji raste u obliku razgranatih mreža, poput hifa kod gljiva. Pretpostavlja se da se rod *Streptomyces* pojavio prije oko 450 milijuna godina potaknut kolonizacijom tla zelenim biljkama. Naime, streptomiceti su zahvaljujući specifičnom načinu rasta spremno odgovorili izazovu poput razgradnje teških biljnih materijala i crpljenja hranjivih tvari. Klasifikacija vrsta unutar roda *Streptomyces* je kompleksna i ovisi o različitim kriterijima poput fizioloških i morfoloških obilježja.<sup>12</sup> Streptomiceti su najviše istraživani rod iz koljena *Actinobacteria* čemu uvelike pridonosi činjenica da stvaraju više od polovice svjetski poznatih antibiotika i smatraju se neprocjenjivima u području medicine, veterine i agronomije.

Streptomiceti imaju velike linearne genome (>8 Mbp) koje karakterizira visoki molarni udio gvanin-citozin (G-C) parova baza (69-78 %).<sup>5</sup> Proizvode brojne primarne i sekundarne metabolite. Primarne metabolite stvaraju tijekom rasta i intenzivno ih koriste za razvoj i preživljavanje. Sekundarne metabolite, neesencijalne produkte metabolizma (alkohole, šećere, aminokiseline, antibiotike, antitumorske lijekove...) proizvode u stacionarnoj fazi rasta.<sup>13</sup>

#### 2.1.2. Životni ciklus

Prirodno okruženje streptomiceta je tlo i odumrla vegetacija zbog čega se njihov rast odvija u uvjetima s ograničenim izvorom hranjivih tvari. U takvim uvjetima slobodne spore germinacijom (klijanjem) proizvode vegetativni micelij. Vegetativni micelij je zapravo mreža strukturnih filamenata koje nazivamo hife. One svojim grananjem mogu doprijeti do raznih dijelova podloge tražeći hranjive tvari. Kada količina hranjivih tvari postane oskudna (ili zbog odgovora na neki drugi signal), određene hife započinju grananje izvan podloge, odnosno u zrak. Na taj način stvara se tzv. zračni micelij za čiji rast su potrebne tvari nastale hidrolizom vegetativnog micelija. Zračni micelij se spaja u spirale na čijim vrhovima se nalaze pregrade

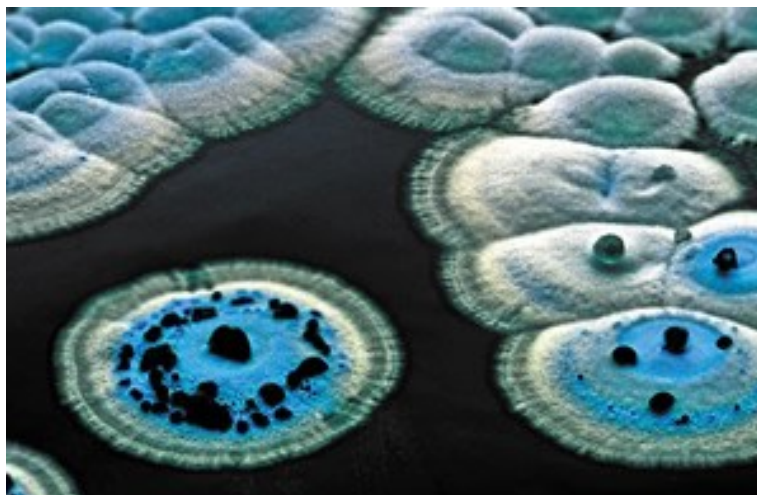
stvarajući tako hidrofobne lance spora s dugim vijekom trajanja i velikom otpornošću na nepovoljne uvjete. Svaka spora u lancu sadrži jednu kopiju genoma bakterije. U trenutku prelaska iz vegetativnog u zračni oblik micelija počinje proizvodnja sekundarnih metabolita u obliku antibiotika koji bivaju otpušteni u tlo.<sup>14,15</sup> Opisani ciklus prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz životnog ciklusa bakterije roda *Streptomyces*.<sup>16</sup>

## 2.2. *Streptomyces coelicolor*

*S. coelicolor* je vrsta koja pripada rodu *Streptomyces* i najčešće se koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima. Njezin genom veličine 8,667,507 bp u cijelosti je sekvenciran, a zbog svoje veličine i mogućnosti da kodira 7 825 različitih proteina predstavlja značajno interesno područje genetičkog inženjerstva.<sup>5</sup> *S. coelicolor* proizvodi nekoliko vrsta antibiotika, među kojima su aktinorodin, plavo pigmentirani antibiotik u lužnatom pH (slika 2), crveni undecilprodigiozin, metilenomicin te perimicin.<sup>17</sup> Sazrijevanje spora popraćeno je pojavom sivog pigmenta na rubovima spora. Do danas je okarakterizirano nekoliko regulatornih gena morfološke diferencijacije i proizvodnje antibiotika. Uz to, pretpostavlja se da okidač mogu biti razni vanjski i unutarnji signali.<sup>7</sup>



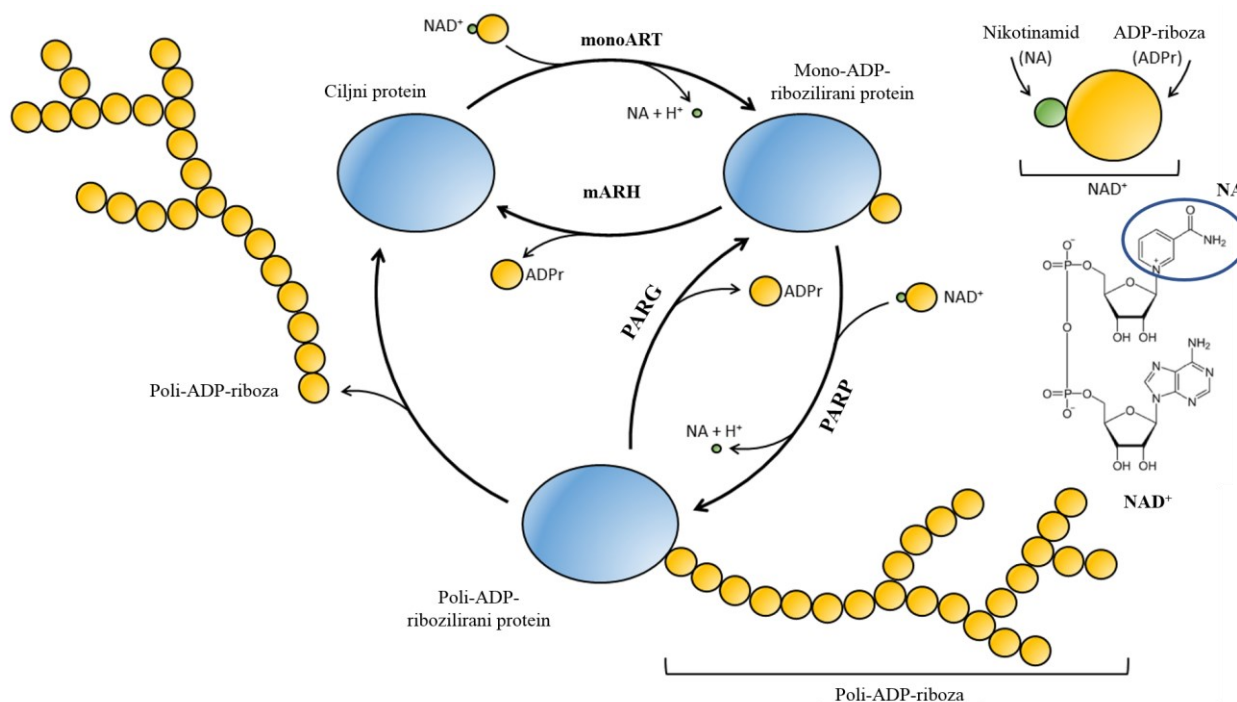
Slika 2. Kolonije bakterije *S. coelicolor*. Ime je dobila zahvaljujući antibiotiku aktinorodinu koji daje plavo obojenje (*coelicolor* znači „nebesko plavo“).<sup>18</sup>

### 2.3. ADP-ribozilacija proteina

Posttranslacijska modifikacija proteina odnosi se na reverzibilne ili ireverzibilne promjene na proteinu nakon translacije. Javlja se kao odgovor na razne signale, poput onih koje stanica prima od receptora s površine stanice ili one nastale prilikom oštećenja DNA. Postupak posttranslacijske modifikacije obuhvaća enzimsko cijepanje peptidnih veza ili kovalentno vezanje kemijskih grupa, lipida, proteina na bočne lance aminokiselina. Posljedično nastaju proteini sa širim rasponom aminokiselinskih struktura i svojstava, te na kraju i preinačenom funkcijom proteina.<sup>7</sup>

Za kompletno razumijevanje regulacije morfološke diferencijacije i proizvodnje antibiotika kod bakterije *S. coelicolor* valja obratiti pozornost i na posttranslacijske regulatorne mehanizme. Jedan od bitnijih je ADP-ribozilacija, posttranslacijska modifikacija kojom se prenosi skupina ADP-riboze sa supstrata nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) na bočne ogranke aminokiselina. Razlikujemo dvije vrste ADP-ribozilacije, mono-ADP-ribozilaciju koju kataliziraju enzimi mono-ADP-ribozil-transferaze (mART) te poli-ADP-ribozilaciju za koju su zaslužni enzimi poli-ADP-ribozil-polimeraze (PARP) (slika 3).<sup>7</sup> Prvo otkriće mono-ADP-ribozil-transferaza povezano je s djelovanjem patogenih bakterija koje uzrokuju koleru i difteriju. One ulaskom u stanice otpuštaju toksine koji ireverzibilno modificiraju proteine domaćina i time postižu prednost nad zaraženim domaćinom.<sup>19,20</sup> Reakcije ADP-ribozilacije događaju se na bočnim ograncima aminokiselina s nukleofilnim donorima poput kisika, dušika

ili sumpora. Nukleofilnim napadom bočnog ogranka aminokiseline na C1 atom NAD-a dolazi do otpuštanja nikotinamida. Za nastanak poli-ADP-riboza lanca hidroksilna skupina s C2 atoma vrši nukleofilni napad na C1 atom sljedeće molekule NAD-a stvarajući O-glikozidne veze. Mehanizam ADP-ribozilacije je reverzibilan, što znači da se ADP-riboza može ukloniti s proteina. S obzirom na različitu vrstu glikozidne veze između bočnih ogranka aminokiselina i ADP-riboze te ADP-riboznih jedinica međusobno postoje dvije vrste enzima za uklanjanje proksimalne ADP-riboze i poli-ADP-riboza lanca. Ti enzimi poznati su kao mono-ADP-riboza protein hidrolaze (mARH) i poli-ADP-riboza glikohidrolaze (PARG). ADP-riboza zbog svojih svojstava i adeninskog prstena može tvoriti vodikove veze i hidrofobne interakcije što otvara razne mogućnosti u pogledu izmjene funkcije samoga supstrata. U slučaju poli-ADP-ribozilacije ta svojstva su još izraženija s obzirom na nastale poli-ADP-riboza lance.<sup>7</sup>



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma ADP-ribozilacije proteina mono- i poli-ADP-ribozil-transferazom. PARP katalizira kovalentno vezanje više skupina ADP-riboza. Također, prikazano je djelovanje enzima mono-ADP-riboza protein hidrolaze (mARH) koji uklanja jednu skupinu ADP-riboze, dok s druge strane poli-ADP-riboza glikohidrolaza (PARG) uklanja poli-ADP-ribozu s ciljanog proteina. Na slici se nalazi i strukturalni prikaz NAD<sup>+</sup> molekule s obilježenim nikotinamidom (NA) čijim otpuštanjem nastaje ADP-riboza.<sup>21</sup>



## 2.4. ADP-ribozilacija kod streptomiceta

ADP-ribozilacija kod streptomiceta zabilježena je prvi put prije tridesetak godina otkrićem ADP-ribozil-transferazne aktivnosti kod bakterije *S. griseus*.<sup>22</sup> Od tada streptomiceti predstavljaju bakterijski modelni organizam za proučavanje ADP-ribozilacije. Identificirane su tri ADP-ribozil-transferaze iz modelnog streptomiceta *S. coelicolor*: SCO2860, SCO3953 i SCO5461.<sup>8,9</sup> SCO2860 je homolog ADP-ribozil-transferaze iz *Mycobacterium smegmatis* koja modificira antibiotik rifampin.<sup>23</sup> SCO3953 je homolog kvašćevog proteina Tpt1, tRNA 2'-fosfotransferaze, esencijalnog enzima koji kod kvasca katalizira finalni korak u tRNA posttranskripcijskoj obradi.<sup>24</sup> SCO5461 je homolog pierisina, enzima iz leptira kupusara, sa ADP-ribozil-transferaznom aktivnošću specifičnom za gvanin i predstavlja primjer ADP-ribozilacije DNA.<sup>10</sup> ADP-ribozil-hidrolaza pronađenih u *S. coelicolor*<sup>25</sup> ima puno više te se one dijele u dvije porodice; makrodomenska porodica<sup>26</sup> i DraG porodica<sup>27</sup> (predstavnik je glikohidrolaza uključena u regulaciju aktivnosti enzima nitrogenaze kod bakterija koje fiksiraju dušik). Poznato je da ADP-ribozilacija proteina može imati pozitivan ili negativan utjecaj na njihovu funkciju unutar organizma. Istraživanja su pokazala da kod streptomiceta ADP-ribozilacija utječe na procese poput sporulacije, morfološke diferencijacije i proizvodnje antibiotika. Primjerice, ADP-ribozilacija regulira rast i diferencijaciju te proizvodnju antibiotika streptomicina kod bakterije *S. griseus*.<sup>28</sup> Nadalje, otkriće nekolicine ADP-riboziliranih proteina iz bakterije *S. coelicolor* povezalo je ADP-ribozilaciju s presudnim metaboličkim putevima te regulacijom morfološke diferencijacije te vrste.<sup>6</sup> Biotehnološki potencijal streptomiceta ističe se kao najbitniji čimbenik koji potiče istraživanja uloge ADP-ribozilacije kod streptomiceta. Bolje razumijevanje uloge ove posttranslacijske modifikacije omogućit će veće iskorištenje i bolju kontrolu proizvodnje antibiotika ovih bakterija.

## § 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- agaroz (Sigma)
- akrilamid/bisakrilamid ( $T = 40\%$ ) (Sigma)
- APS (Serva)
- etanol (Kemika)
- glicerol (Kemika)
- izopropanol (Kemika)
- izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (Thermo Scientific)
- 2-merkptoetanol (BIO RAD)
- natrijev dodecilsulfat (SDS) (Sigma)
- $N,N,N',N'$ -tetraetilendiamin (TEMED) (Sigma)
- natrijev klorid (Kemika)

#### 3.1.2. Pufferi

- puffer za proteine ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 7,5;  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl, 10 %-tni glicerol,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  DTT,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA)
- TAE puffer za agaroznu elektroforezu ( $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-acetat,  $0,001 \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA, pH = 8,3)
- puffer za lizu bakterija ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl, pH = 8,0;  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol, 1 mg/mL lizozim)
- puffer 1 za ispiranje kolone ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 8,0;  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol)
- puffer 2 za ispiranje kolone ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 8,0;  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol)
- puffer 3 za ispiranje kolone ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 8,0;  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol)

- pufer za eluiranje proteina s kolone ( $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 8,0;  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol)
- SDS-PAGE pufer za elektroforezu (10x) (30 g / L Tris, 144 g / L glicin, 10 g / L SDS)
- SDS-PAGE pufer za denaturaciju (4x) ( $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 6,8 4 mL; 0,8 g SDS, 0,616 g DTT, 4 mL glicerol, 0,04 g brom-fenol plavo i dopunjeno do 10 mL deH<sub>2</sub>O)
- pufer za prijenos na membranu (3,03 g Tris, 14,4 g glicin, 200 mL metanol)
- TBS ( $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 7,4)
- TBST ( $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl,  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH = 7,4; 0,1% Tween 20)
- pufer za blokiranje (TBST + 5% nemasno mlijeko u prahu (BIO RAD))

### 3.1.3. Oligonukleotidne početnice

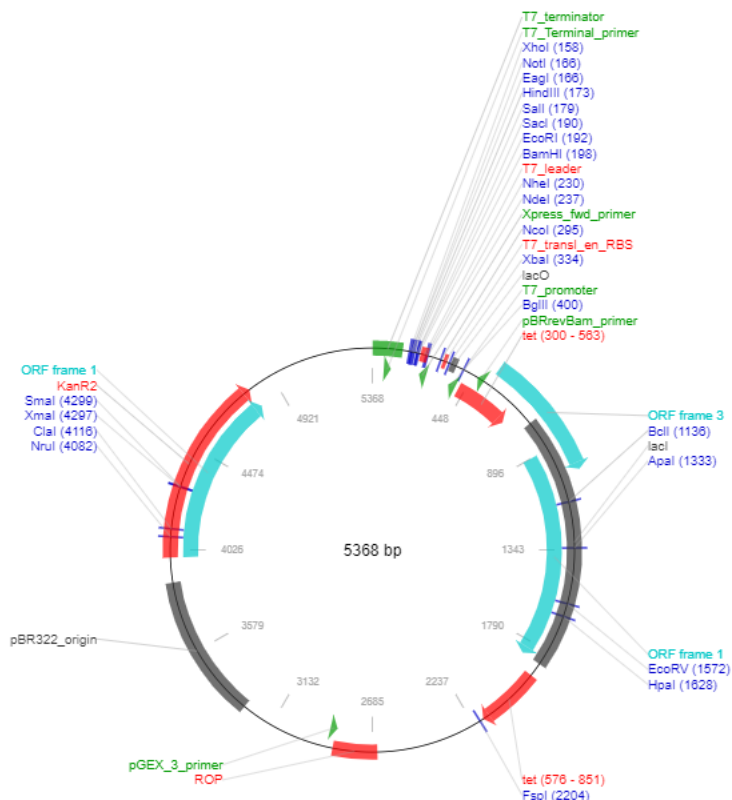
Korištene su oligonukleotidne početnice za umnažanje gena te za sekvenciranje. Naziv, svrha i nukleotidni slijed početnica navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Oligonukleotidne početnice.

Ime početnice	Nukleotidni slijed 5' – 3'	Namjena
SCO 2198-Nde	CACATATGTTCCAGAACGCCGACGACGTCAAG	umnažanje gena PCR-om
SCO 2198-Xho	CACTCGAGTCACACGTCGAAGTACATCTCGAAC	umnažanje gena PCR-om
SCO 4771-Nde	CACATATGACTGAGATCGAGATCGGGCGCGG	umnažanje gena PCR-om
SCO 4771-Xho	CACTCTAGCTACCGCCGGTGCTGCGAGTCCGCG	umnažanje gena PCR-om
SCO 7629-Nde	CACATATGAAGATCACCGCCGCCGACGTCGTC	umnažanje gena PCR-om
SCO 7629-Xho	CACTCGAGTCACCAGTCGTGCACCGTGCCGTCC	umnažanje gena PCR-om
SCO 4662-Nde	CACATATGGCGAAGGCGAAGTTCGAGCGGAC	umnažanje gena PCR-om
SCO 4662-Bam	CAGGATCCTTACTTGTTGATCTTGGTGACCTGG	umnažanje gena PCR-om
SCO 5737-Nde	CACATATGGAGAACGAGACCCACTACGCCG	umnažanje gena PCR-om
SCO 5737-Bam	CAGGATCCTCACTTGTCGGCGTGCCTTCTTG	umnažanje gena PCR-om
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	PCR na kolonijama, sekvenciranje
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	PCR na kolonijama, sekvenciranje
SCO-5737 F	GTCTTCGACATGGTCGTCG	sekvenciranje
SCO-5737 R	GTCACGAACTCCTTGGTGC	sekvenciranje

### 3.1.4. Plazmidi

Kodirajući sljedovi gena od interesa eksprimirani su korištenjem vektora iz pET serije – pET28b. Mapa ekspresijskog vektora pET28b prikazana je na slici 4.

Slika 4. Mapa ekspresijskog vektora pET28b.<sup>29</sup>

### 3.1.5. Enzimi

- Q5 DNA-polimeraza (NEB)
- Elektroligaza (NEB)
- Restriksijske endonukleaze *Bam*HI, *Nde*I i *Xho*I (Thermo Scientific)

### 3.1.6. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je LB tekuća (5 g / L kvašćev ekstrakt, 10 g / L tripton, 5 g / L NaCl, 1 mL MgCl<sub>2</sub>, 10 mL Tris-HCl pH = 7,5) i kruta podloga (uz dodatak 12 g / L agara).

### 3.1.7. Bakterijski sojevi

Za kloniranje su korištene elektrokompetentne stanice *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific), a za ekspresiju kemijski kompetentne stanice *E. coli* BL21(DE3) codon + RIL (omogućavaju translaciju rijetkih kodona za GC bogate genome).

### 3.1.8. Antibiotici

- Kanamicin (Sigma)
- Kloramfenikol (Sigma)

### 3.1.9. Boje i markeri

- *Comassie Brilliant Blue R-250* (Sigma)
- etidijev bromid (Sigma)
- *DNA Gel Loading Dye (6x)* (Thermo Scientific)
- *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BIO RAD)
- *MassRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fisher)

### 3.1.10. Ostali materijal

Korišteni komercijalno dostupni paketi:

- *DNeasy Blood & Tissue Kit (250)* (QIAGEN)
- *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN)
- *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN)
- *Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices* (Milipore)
- *Quick Start Bradford Protein Assay* (BIO RAD)

Za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom korištena je Talon Metal Affinity Resin (Takara Bio) matrica.

Za western analizu korišteni su PVDF membrana (Amersham Biosciences), biotinom obilježen NAD (Trevigen), kompleks streptavidina i peroksidaze iz hrena (Trevigen) te luminol (Amersham) i pojačivač (Amersham) za vizualizaciju.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA

Ukupna genomska DNA izolirana je iz bakterije *S. coelicolor* pomoću komercijalno dostupnog paketa *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN) prema standardnom protokolu uz predtretman za Gram-pozitivne bakterije. Stanice su resuspendirane u enzimskom puferu za lizu (0,02 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH=8, 0,002 mol dm<sup>-3</sup> EDTA, 1.2 % Triton X-100, 20 mg / mL lizozim). Postupak uključuje dodatak proteinaze K, enzima koji efikasno pospješuje lizu stanice i

razgradnju proteina, te RNaze A, enzima koji razgrađuje lance RNA. Metoda se temelji na zadržavanju genomske DNA na koloni uz korištenje pufera osmišljenih tako da omogućuje vezanje DNA na membranu pri čemu otklanjaju nečistoće i zaostale proteine.<sup>30</sup>

### 3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR je metoda umnažanja DNA *in vitro* uz korištenje para odgovarajućih početnica i DNA-polimeraze. Par početnica koji se koristi mora biti komplementaran krajevima gena koji se umnaža. Sintezu identičnih klonova obavlja DNA-polimeraza koja započinje dodavanje dNTP-ova upravo na sljedovima početnica. PCR reakcija sastoji se od ukupno tri koraka koji se ponavljaju u više ciklusa, a to su toplinska denaturacija dvolančane DNA, sljepljivanje početnica na kalup jednolančane DNA te sinteza komplementarnog lanca DNA-polimerazom.<sup>31</sup> Ovisno o vrsti početnica, DNA-polimerazi te veličini gena od interesa određuju se uvjeti za svaki pojedini korak.

U radu je za PCR gena od interesa korištena Q5 polimeraza te specifično dizajnirane početnice čije sekvence su navedene u poglavlju *Materijali* (3.1.3.). U tablici 2 navedene su postavke PCR instrumenta za Q5 DNA-polimerazu, a u tablici 3 nalaze se koncentracije i volumeni svih korištenih reagensa.

Tablica 2. Postavke PCR instrumenta za umnažanje gena iz bakterije *S. coelicolor*.

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	10	30
Sparivanje početnica	60	20	30
Produljenje	72	20-30 s/kb	30
Završno produljenje	72	120	1

U svim provedenim PCR reakcijama temperatura sparivanja početnica korigirana je ovisno o vrsti početnica u skladu s time da je optimalna temperatura sparivanja 5°C niža od temperature mekšanja pojedinog oligonukleotida. Vrijeme denaturacije prilagođeno je duljini kalupa i GC sastavu, a vrijeme potrebno za sintezu DNA lanca očekivanoj duljini ciljnog gena. Ukoliko lanci sadrže veći broj parova baza potrebno je i više vremena za uspješnu denaturaciju i sintezu.

Tablica 3. Volumeni i koncentracije korištenih reagensa prilikom umnažanja gena iz bakterije *S. coelicolor* za 50  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese.

Reagens	Koncentracija	Volumen / $\mu\text{L}$
5X Q5 reakcijski pufer	1X	10
0,01 mol $\text{dm}^{-3}$ dNTP	$2 \times 10^{-4}$ mol $\text{dm}^{-3}$	1
$1 \times 10^{-5}$ mol $\text{dm}^{-3}$ nizvodna početnica	$5 \times 10^{-7}$ mol $\text{dm}^{-3}$	2,5
$1 \times 10^{-5}$ mol $\text{dm}^{-3}$ uzvodna početnica	$5 \times 10^{-7}$ mol $\text{dm}^{-3}$	2,5
kalup DNA	1 ng – 1 $\mu\text{g}$ genomske DNA 1 pg – 1 ng plazmidne DNA	0,5-5
Q5-DNA polimeraza	0,02 U/ $\mu\text{L}$	0,5
5X Q5 GC pufer	1X	10
NFW (eng. <i>nuclease-free water</i> )	-	do 50 $\mu\text{L}$

Ovisno o tome koliko se PCR reakcija provodi moguće je pripremiti reakcijsku smjesu većeg volumena na način da se korigiraju volumeni pojedinih reagensa u skladu s konačnim koncentracijama navedenima u tablici 3 i željenim ukupnim volumenom.

Metoda PCR-a na kolonijama omogućava provjeru uspješnosti kloniranja direktno iz transformiranih stanica bez prethodne izolacije rekombinantnih plazmida. Reakcijska smjesa pripremljena je u skladu s brojem kolonija koje se provjeravaju. Mali dio bakterijske kolonije zahvati se pomoću sterilnog nastavka za pipetu i resuspendira u reakcijskoj smjesi za PCR. U slučaju PCR-a na kolonijama trajanje početne denaturacije produljeno je na 2 minute.

Gradijentni PCR je tehnika koja omogućava pronalaženje optimalne temperature sljepljivanja početnica na način da se tijekom jedne PCR reakcije provede sljepljivanje pri više različitih temperatura. Ova vrsta PCR tehnike korištena je kod umnažanja gena koji nisu uspješno umnoženi korištenjem standardne metode. Praćen je protokol za Q5 DNA-polimerazu uz promjenu u temperaturi sljepljivanja čiji raspon je bio od  $57^{\circ}\text{C}$  do  $67^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza se zasniva na procesu gibanja čestica u električnom polju ovisno o jačini električnog polja, svojstvima čestice te sredini u kojoj se čestica nalazi. Čestica putuje prema nekoj od elektroda ovisno o njezinom naboju. Pozitivno nabijena čestica putuje prema negativnoj elektrodi, anodi, dok negativno nabijena čestica putuje prema pozitivnoj elektrodi, odnosno katodi. S obzirom na to da je naboj molekula DNA uvijek jednak (negativan zbog

fosfatne skupine koja tvori fosfodietersku vezu pri čemu joj preostaje jedan od ukupno dva negativna naboja) elektroforeza omogućuje razdvajanje DNA na osnovi razlike u masi. Na kretanje DNA osim veličine utječu još i koncentracija agaroze u gelu, sastav pufera za elektroforezu, konformacija molekule te jačina napona. Za elektroforezu nukleinskih kiselina najčešće se koristi poliakrilamidni ili agarozni gel. Odabir ovisi o vrsti tehnike i samom uzorku, pa se tako za DNA od 100 do 50 000 bp koristi agarozni gel.<sup>32</sup>

U ovom radu korišten je 1%-tni agarozni gel pripremljen otapanjem agaroze u puferu TAE (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.) kojemu je dodan etidijev bromid (0,5 µg / mL). Uzorci DNA su prije nanošenja na gel pomiješani s odgovarajućom bojom kako bi se omogućilo nanošenje u jažice i praćenje tijekom elektroforeze. Osim uzoraka na gel se nanosi i marker (*MassRuler DNA Ladder Mix*) za pomoć pri određivanju veličina fragmenata DNA. Elektroforeza je provedena pri naponu od 60 V u trajanju 60 min ili do dolaska boje do samog ruba gela. Snimanje gela pod UV-svjetlom napravljeno je pomoću uređaja G:Box (Syngene). Elektroforeza molekula DNA na gelu korištena je za provjeru veličine izolirane genomske DNA i plazmida, provjeru veličine DNA nakon restrikcije i ligacije te provjeru uspješnosti PCR reakcija.

#### 3.2.4. Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela

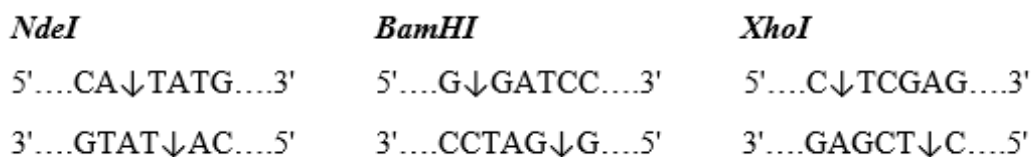
Za pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela korišten je komercijalno dostupan komplet *QIAQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Molekule DNA izrezane su iz gela skalpelom i nakon toga pročišćene na maloj koloni pomoću pufera s različitim udjelima soli koji omogućuju vezanje i ispiranje DNA s kolone. Metoda je korištena za pročišćavanje PCR produkata i vektora nakon razgradnje restrikcijskim enzimima.

#### 3.2.5. Razgradnja molekula DNA restrikcijskim endonukleazama

Fragmenti DNA potrebni za ugradnju u vektor dobivaju se cijepanjem dvolančane DNA na mjestima koja se nazivaju restrikcijska mjesta, a enzimi koji provode taj postupak nazivaju se restrikcijske endonukleaze.

U ovom radu korištene su restrikcijske endonukleaze tipa II koje prepoznaju restrikcijska mjesta *NdeI*, *BamHI* i *XhoI* prikazana na slici 5.





Slika 5. Prikaz mjesta prepoznavanja i načina cijepanja restriksijskih endonukleaza.

Razgradnja vektora pET28b i PCR produkata provedena je u puferu za razgradnju (FastDigest pufer (10x)) uz dodatak odgovarajućih restriksijskih enzima. Smjesa za razgradnju inkubirana je 30 minuta na 37°C nakon čega su uzorci nanoseni na agarozni gel.

### 3.2.6. Ligacija fragmenata DNA

Ligacija je postupak kojim se uz pomoć enzima DNA-ligaze povezuju komplementarni krajevi DNA prethodno razgrađeni restriksijskim endonukleazama. Povezuju se nastajanjem fosfodieterskih veza između 3' hidroksilne skupine jednog fragmenta i 5' fosfatne skupine drugog fragmenta.<sup>31</sup>

Za ligaciju je korištena elektroligaza (NEB) uz odgovarajući pufer prema uputama proizvođača. Sastav ligacijske smjese naveden je u tablici 4. Molarni omjer DNA fragmenta i vektora bio je približno 3:1. Ligacija je provedena 30 minuta na 25°C, nakon čega je uslijedila inaktivacija ligaze 15 minuta na 65°C.

Tablica 4. Sastav ligacijske smjese (SCO7629).

Otopina	Volumen/ $\mu$ L
<b>pET28b</b>	1
<b>DNA fragment</b>	3
<b>T4 DNA-ligaza</b>	1
<b>Pufer za ligazu (2x)</b>	5
<b>NFW (eng. <i>nuclease-free water</i>)</b>	do 10 $\mu$ L

### 3.2.7. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija bakterija je proces kod kojeg bakterija uzima strani genetički materijal odnosno golu DNA iz svoje okoline. Jedna od uloga transformacije je uvođenje rekombinantnog plazmida u bakterijsku stanicu kako bi uzgojem tih stanica u hranjivom mediju nastalo više istovrsnih kopija rekombinantnog plazmida. Transformacija se može provesti kemijskim ili

fizikalnim metodama. Elektroporacija je jedna od fizikalnih metoda kod koje se bakterije podvrgnu visokom naponu pri čemu nastaju pore na bakterijskim staničnim stijenkama koje omogućuju ulazak strane DNA. Metoda kemijske transformacije je zapravo kombinacija kemijskih tvari i fizičkog procesa. Temelji se na toplinskom šoku bakterijskih stanica koji služi za oporavak stanične membrane nakon prethodne inkubacije u otopini  $\text{CaCl}_2$  i stvaranja pora za prolazak DNA.<sup>31</sup>

Transformacija elektroporacijom izvršena je dodatkom 1,5  $\mu\text{L}$  ligacijske smjese u 25  $\mu\text{L}$  elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli* uz korištenje elektroporatora (5000 V/cm u trajanju 4-5 ms). Nakon transformacije bakterijske stanice su resuspendirane u 1 mL SOC medija i inkubirane sat vremena na 37°C kako bi se regenerirale. Za kemijsku transformaciju korištene su kemijski kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja BL21(DE3) codon + RIL. U 50  $\mu\text{L}$  bakterijskih stanica dodano je 25  $\mu\text{L}$  pufera za transformaciju (0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pH 7,5; 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ ) i 1  $\mu\text{L}$  pročišćenog rekombinantnog plazmida. Transformacijska smjesa zatim je inkubirana 30 minuta na ledu i nakon toga podvrgnuta toplinskom šoku od 2 minute na 37°C. Potom su bakterijske stanice resuspendirane su u 1 mL SOC medija te inkubirane sat vremena na 37°C. Nakon inkubacije stanice su nacijepnjene na krute LB hranjive podloge s odgovarajućim antibiotikom (kanamicin za elektroporirane stanice, kanamicin i kloramfenikol za BL21 stanice) te inkubirane preko noći na 37°C.

### 3.2.8. Izolacija plazmidne DNA

Pročišćavanje rekombinantnih plazmida provedeno je pomoću kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) prema protokolu zadanom od strane proizvođača. Metoda se temelji na liziranju bakterijskih stanica te pročišćavanju lizata centrifugiranjem. Čisti lizat zatim se propušta kroz kolonicu s membranom na koju se veže DNA. Nečistoće se ispiru, a čista DNA eluira se u malom volumenu pufera za eluiranje ili vodi.

### 3.2.9. Određivanje primarne strukture DNA Sangerovom dideoksi metodom

Sangerova dideoksi metoda temelji se na principu DNA replikacije uz dodavanje fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida (ddNTP) čime se postiže terminacija elongacije lanca DNA.<sup>31</sup> ddNTP-ovi su analozi dNTP-ova koji nemaju 3'-OH skupinu potrebnu za stvaranje fosfodiesterske veze. Na taj način dobivaju se manji fragmenti DNA čiji krajevi su baze označene fluorescentnim

oznakama. Produkti sekvenciranja su različitih duljina i kao takvi se razdvajaju kapilarnom elektroforezom. Tijekom elektroforeze primjenjuje se električno polje zbog čega se negativno nabijeni DNA fragmenti kreću dugačkom kapilarnom prema pozitivnoj elektrodi. Brzina kojom se kreće DNA fragment obrnuto je proporcionalna molekularnoj masi. Na kraju kapilare nalazi se maleni prozor kroz koji laserska zraka dopire do obilježenih DNA fragmenata. Laser pobuđuje fluorescirajuće molekule i uzrokuje emisiju zračenja određenih valnih duljina koje se očitavaju pomoću detektora.<sup>33</sup> Ovom metodom provjereni su sljedovi gena ugrađeni u ekspresijski vektor.

### 3.2.10. Indukcija prekomjerne ekspresije gena

Gen od interesa u pET28b vektoru nalazi se pod kontrolom *lac*-operatora i jakog T7-promotora koji djeluje samo prilikom specifičnog vezanja T7-RNA-polimeraze. Također, RNA-polimeraze stanice domaćina ne prepoznaju T7-promotor što ima za posljedicu neinducirano stanje gena od interesa sve do trenutka kada se u sustav doda IPTG odnosno izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid koji najprije pokreće transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu, a nakon toga i za protein od interesa.<sup>31</sup>

Prije indukcije transformanti s hranjivih krutih podloga su uzgojeni preko noći na 37°C u malom volumenu tekućeg LB/TB medija uz dodatak kanamicina i kloramfenikola. Prekonoćna kultura razrijeđena je u većem volumenu (500 mL) istog medija s antibioticima. Stanice se induciraju u logaritamskoj fazi rasta kada postoji najveći broj stanica pogodnih za indukciju. Mjeri se optička gustoća (OD) stanica pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini 600 nm i kada ona dosegne vrijednost između 0,6 i 0,8 provodi se indukcija dodatkom IPTG-a. Indukcija se može provesti na više načina. Za indukciju pri temperaturi od 37°C u trajanju 2-3 sata dodano je  $8 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> IPTG-a, dok je indukcija pri temperaturi od 16°C provedena preko noći dodatkom  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> IPTG-a. Nakon određenog vremena indukcije, bakterijske stanice oborene su centrifugiranjem 30 minuta pri 4°C na 4500 rpm.

### 3.2.11. Sonikacija

U slučaju stanične lize korištena je sonikacija kao metoda kojom se primjenjuju ultrazvučni (visokofrekventni) valovi na taloge stanica što uzrokuje razaranje staničnih membrana. Talozi induciranih stanica resuspendirani su u puferu za lizu (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.) te inkubirani 15 minuta na ledu. Lizat stanica zatim je soniciran u 4 ponavljajuća ciklusa pri čemu se lizat cijelo vrijeme nalazio na ledu kako bi se spriječilo zagrijavanje i denaturiranje proteina.

Nakon toga, dobivena suspenzija centrifugirana je 30 minuta na 4°C pri 12500 rpm kako bi se odvojili netopljivi dijelovi stanice i topljivi stanični proteini koji ostaju u supernatantu.

### 3.2.12. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom

Pročišćavanje proteina od interesa je olakšano ukoliko je on eksprimiran kao fuzijski protein, odnosno, kao protein s afinitetnim privjeskom. Topljivi fuzijski proteini obilježeni afinitetnim privjeskom se uobičajeno pročišćavaju metodom afinitetne kromatografije. Afinitetna kromatografija je metoda pročišćavanja u kojoj se proteini s afinitetnim privjeskom specifično vežu na ligand imobiliziran na čvrstu podlogu kolone. Metoda kojom se His-privjesak specifično veže na ligand poznata je kao afinitetna kromatografija na imobiliziranim ionima metala (eng. *immobilized metal affinity chromatography*; IMAC). IMAC je selektivna metoda koja se bazira na interakciji određenog aminokiselinskog ostatka na površini peptida i nekog metalnog iona ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , ili  $\text{Ni}^{2+}$ ) imobiliziranog na matrici pomoću polidentatne kelirajuće skupine poput nitrilotrioctene kiseline (eng. *nitrilotriacetic acid*; NTA). Proteini vezani na kolonu eluiraju se dodavanjem imidazola. Imidazol je ujedno funkcijska skupina histidina te posjeduje specifičan vezujući afinitet za metalne ione (poput  $\text{Co}^{2+}$ ). Imidazol se stoga koristi kao kompetitivni reagens za odvajanje proteina s His-privjeskom s kolone.<sup>34</sup>

Za afinitetnu kromatografiju pripremljena je odgovarajuća kolona koja sadrži  $\text{Co}^{2+}$ -NTA (TALON) matricu. Nakon dodatka suspenzije  $\text{Co}^{2+}$ -NTA kolona je ekvilibrirana puferom za lizu stanica. Na kolonu je nanesen proteinski ekstrakt dobiven centrifugiranjem nakon lize stanica. Nakon toga kolona je isprana puferima (sastavi navedeni u poglavlju 3.1.2.) koji sadrže imidazol u rastućoj koncentraciji. Tako je prvo ispiranje izvršeno puferom koji sadrži  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol, drugo ispiranje puferom s  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazolom i treće ispiranje puferom s  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazolom. Vezani protein eluiran je s kolone pomoću 5 mL pufera koji sadrži  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  imidazol.

### 3.2.13. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu

Natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) najviše je korištena metoda za analizu proteina. Glavna karakteristika ove metode je upotreba SDS-a koji uz pomoć reagensa za razaranje disulfidnih veza može denaturirati proteine u pojedinačne polipeptidne lance. Vezanjem SDS-a na polipeptidne lance maskira se njihov naboj (naboj bočnih ogranaka) te je tako neto naboj po jedinici mase približno konstantan kod svih. Elektroforetsko kretanje zbog toga ne ovisi o naboju već samo o relativnoj molekulskoj masi proteina.<sup>32</sup> U SDS-PAGE

koristi se poliakrilamidni gel koji se sastoji od dva dijela: gela za sabijanje (sastav naveden u tablici 5) i gela za razdvajanje (sastav naveden u tablici 6).

U ovom radu SDS-PAGE korištena je za analizu proteina nakon indukcije, nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom te za western analizu. Uzorci su nakon centrifugiranja pripremljeni za nanošenje na gel korištenjem pufera za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel i pufera za proteine (sastavi navedeni u poglavlju 3.1.2.) u slučaju taloga. Pufer za nanošenje uzoraka na poliakrilamidni gel sadrži glicerol u svrhu povećanja gustoće uzoraka i lakšeg sabijanja istih na dno jažica. Za postizanje potpune denaturacije proteina pomoću SDS-a uzorci su zagrijavani u odgovarajućem puferu (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.) 10 min na 95°C. Ovaj pufer sadrži između ostalog i DTT, reducirajući agens koji ireverzibilno reducira disulfidne mostove i pospješuje denaturaciju proteina. Proteini koji ostaju povezani disulfidnim mostovima daju nejasne vrpce na gelu. Osim uzoraka na gel se nanosi i biljeg molekulskih masa (smjesa pročišćenih proteina poznate molekulske mase). Korišten je biljeg molekulskih masa *Precision Plus Protein Dual Color Standards*. Gel s uzorcima stavljen je u kadicu za elektroforezu i uronjen u pufer za elektroforezu na SDS – poliakrilamidnom gelu (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.). Pufer za elektroforezu u svom sastavu sadrži glicin. Glicin je aminokiselina koja može postojati u ionskom, negativno nabijenom obliku kada se nalazi u otopini određene pH vrijednosti. Pri nižim vrijednostima pH veći udio glicina bit će pozitivno nabijen, dok će pri višim vrijednostima pH glicin postati negativno nabijen. Pufer ima takvu pH vrijednost (u ovom slučaju pH = 8,4) koja uvjetuje nastajanje glicinatnog aniona. Ulaskom u gel za sabijanje (pH = 6,8) glicinatni anioni postaju neutralno nabijeni zwitterioni zbog čega se kreću sporije prema anodi. Zajedno s kloridnim anionima čija pokretljivost je puno brža stvaraju dvosloj između kojeg se nalaze proteini. Dolaskom u gel za razdvajanje (pH = 8,8) glicin kreće prema anodi u obliku glicinatnih aniona „gurajući“ proteine ispred sebe u uskoj ravnoj liniji.<sup>35</sup> Na gel je primijenjen napon od 120 V, a nakon sabijanja uzoraka povećan je na 150 V.

Tablica 5. Sastav gela za sabijanje (5%-tni).

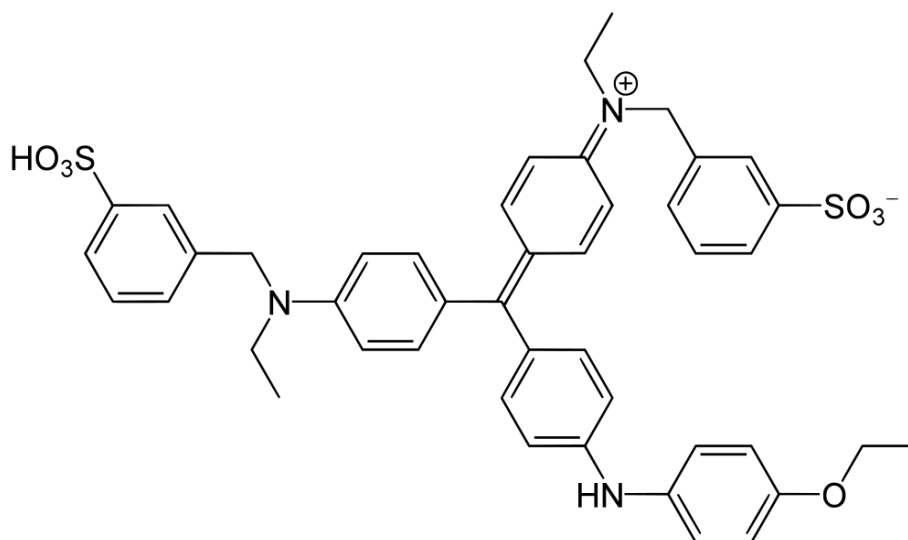
	za 3 gela
<b>mQ H<sub>2</sub>O</b>	3,0775 mL
<b>0,5 M Tris pH = 6,8</b>	1,25 mL
<b>10% SDS</b>	50 µL
<b>40% AA:BAA</b>	0,6225 mL
<b>10% APS</b>	25 µL
<b>TEMED</b>	5 µL

Tablica 6. Sastav gela za razdvajanje (12%-tni).

	za 3 gela
<b>mQ H<sub>2</sub>O</b>	4,35 mL
<b>1,5 M Tris pH = 8,8</b>	2,5 mL
<b>10% SDS</b>	100 µL
<b>40% AA:BAA</b>	3,0 mL
<b>10% ABS</b>	50 µL
<b>TEMED</b>	10 µL

### 3.2.14. Vizualicija proteina u gelu

Nakon razdvajanja proteina na gelu potrebno ih je vizualizirati nekom od metoda bojanja. Korištena je *Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250*, čije vezanje se temelji na elektrostatskom privlačenju sulfonskih skupina prikazanih na slici 6 i bočnih ogranaka aminokiselina. Najčešća mjesta vezanja su arginin, lizin i histidin te u manjoj mjeri tirozin i triptofan.<sup>32</sup>

Slika 6. Molekulska struktura *Coomassie Brilliant Blue R-250*.<sup>36</sup>

Otopina za bojanje osim 0,1% CBB sadrži još i metanol, destiliranu vodu i octenu kiselinu. Vrijeme bojanja ovisi o debljini gela, a nakon završetka bojanja proteini i gel poprime plavu boju. Odbojavanje gela izvršeno je u puferu koji je istog sastava kao otopina za bojanje, ali bez CBB. Postupak odbojavanja završen je dobivanjem plavih pruga na bezbojnoj pozadini.

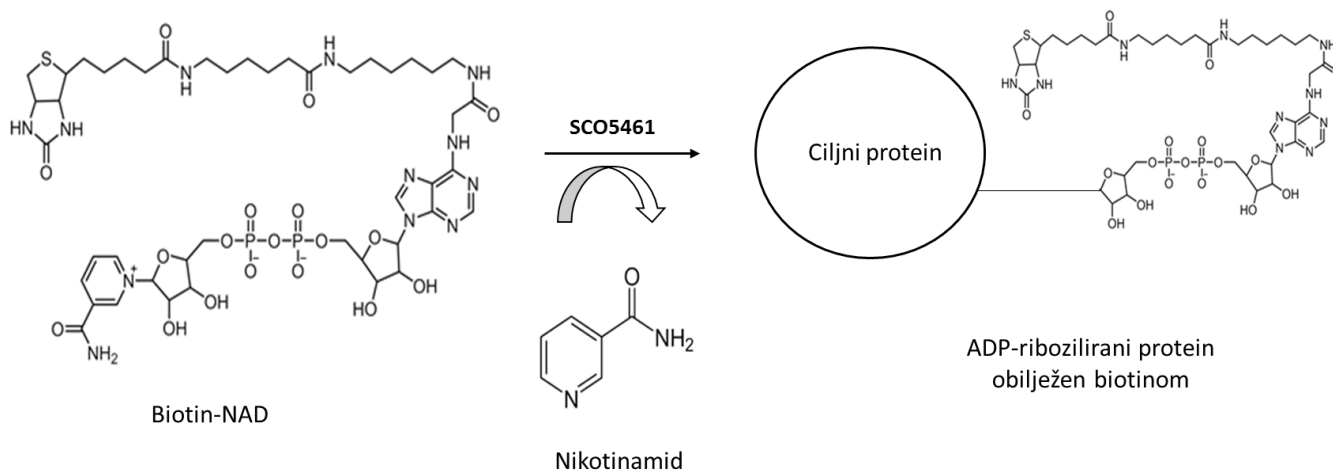
#### 3.2.15. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina određena je korištenjem *Quick Start Bradford Protein Assay* (BIO RAD) kompleta koji sadrži otopine BSA (eng. *bovine serum albumine*) poznatih koncentracija. Pomiješano je 20  $\mu\text{L}$  otopina standarda s 1 mL Bradfordovog reagensa (2,375 % (V/V) etanol, 4,4 % (w/V)  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,07 % (w/V) *Coomassie Brilliant Blue*) i izmjerena je apsorbancija pri 595 nm. Vežanje *Coomassie Brilliant Blue* boje i proteina (poglavlje 3.2.14.) u ovom slučaju dovodi do promjene maksimalne apsorbancije s 465 nm na 595 nm što omogućava određivanje koncentracije proteina pri 595 nm. Za određivanje koncentracije proteina pripremljene su smjese uzoraka proteina različitih volumena i 1 mL Bradfordovog reagensa te je izmjerena apsorbancija. Pomoću podataka dobivenih baždarnim pravcem izračunata je masena koncentracija proteina.

#### 3.2.16. ADP-ribozilacija *in vitro*

U reakcijama ADP-ribozilacije *in vitro* je kao donor ADP-riboze korišten biotinom obilježeni NAD (bio-NAD) (slika 7). Reakcijska smjesa osim donora ADP-riboze mora sadržavati i enzim koji katalizira navedenu reakciju te protein supstrat.

U ovom radu korištena je ADP-ribozil-transferaza SCO5461 iz bakterije *S. coelicolor*. Reakcija se odvijala u puferu sastava 0,2 mol  $\text{dm}^{-3}$  Tris, 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  EDTA, 0,01 mol  $\text{dm}^{-3}$  DTT, 30 minuta na 30°C. Za detekciju biotinom obilježenih produkata reakcije korišten je streptavidin u kompleksu s peroksidazom iz hrena. Streptavidin pokazuje veliki afinitet prema biotinu, dok peroksidaza iz hrena prilikom inkubacije s odgovarajućim supstratom stvara luminiscentne derivate obilježene molekule i na taj način omogućuje njezinu detekciju kemiluminiscencijom.



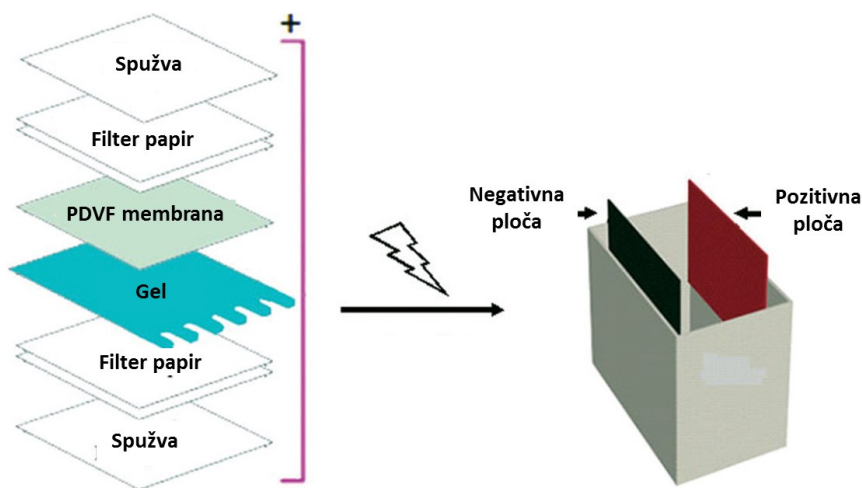
Slika 7. Shematski prikaz ADP-ribozilacije ciljnog proteina ADP-ribozil-transferazom SCO5461 uz bio-NAD kao donor ADP-riboze.

### 3.2.17. Western analiza

Western analiza je jedna od važnijih metoda upotrebljivanih u molekularnoj biologiji. Korištenje ove metode omogućava izdvajanje proteina od interesa iz smjese različitih proteina. Tri su glavna koraka u ovoj metodi: (1) razdvajanje proteina na temelju molekulske mase pomoću gel-elektroforeze, (2) prijenos na membranu, i (3) obilježavanje proteina od interesa pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitijela. Nevezana antitijela odvajaju se ispiranjem, a vezana antitijela detektiraju se razvijanjem filma. Sekundarna antitijela nalaze se u kompleksu s peroksidazom iz hrena što omogućuje detekciju kemiluminiscencijom.<sup>31</sup>

U ovom radu western analiza korištena je za provjeru funkcije enzima SCO5461 koji je mono-ADP-ribozil-transferaza sa sposobnošću auto modifikiranja. Produkti reakcije ADP-ribozilacije razdvojeni su pomoću SDS-PAGE. Prijenos s gela na membranu proveden je na uređaju *Mini Trans-Blot* (BIO RAD), pri čemu je korištena PVDF (polivinildifluoridna) membrana te pufer za prijenos (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.). U puferu za prijenos najčešće se nalazi metanol čija je uloga uklanjanje SDS s proteina čime se povećava afinitet vezanja proteina na membranu. Postupak je proveden pri naponu od 100 V tijekom sat vremena uz hlađenje. Način slaganja tzv. „sendviča“ za prijenos proteina prikazan je na slici 8.





Slika 8. Prikaz slaganja slojeva za prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na PVDF membranu i položaj elektroda u uređaju.<sup>37</sup>

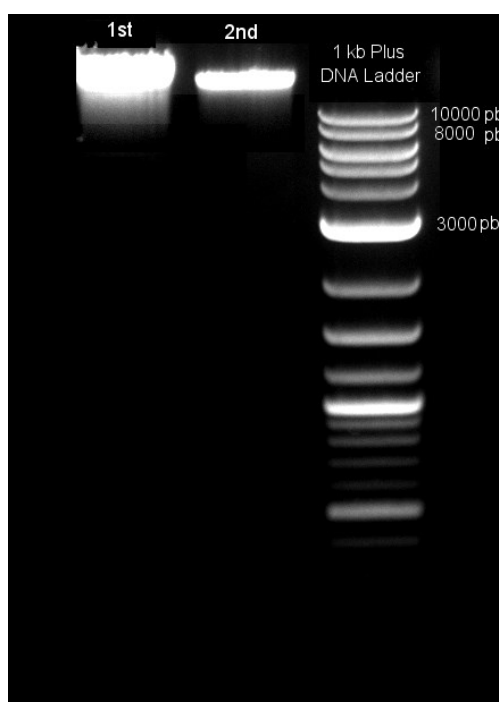
U sljedećem koraku membrana je blokirana otopinom nemasnog mlijeka *Blotting Grade Blocker* (BIO RAD) kako bi se onemogućilo nespecifično vezanje antitijela. Blokiranje je izvršeno inkubacijom membrane 60 minuta u puferu za blokiranje (sastav naveden u poglavlju 3.1.2.). Zatim je membrana inkubirana s kompleksom streptavidina i peroksidaze iz hrena 60 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga isprana puferom za ispiranje (TBST) koji minimizira pozadinsku detekciju i ispire nevezani kompleks. Na kraju se dodaju supstrati za kemiluminiscenciju, a signal se detektira na rendgenskom filmu.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Izolacija genomske DNA iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

Genomska DNA izolirana je iz stanica divljeg tipa bakterije *S. coelicolor* pomoću paketa *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN). Postupak izolacije proveden je prema protokolu za izolaciju iz Gram pozitivnih bakterija kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Posljednji korak, odnosno elucija genomske DNA, izvršena je dva puta u svrhu dobivanja maksimalnog prinosa DNA. Izolirana genomska DNA provjerena je elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu (slika 9).



Slika 9. Gel-elektroforeza genomske DNA nakon izolacije iz *S. coelicolor*. Oznake 1st i 2nd predstavljaju redom prvi i drugi eluat. U gelu je razdvojen i DNA biljeg (*1 kb Plus DNA Ladder*).

Na slici 9 vidi se da uzorci obje elucije sadrže genomsku DNA, ali deblja vrpca prvog eluata govori nam da se genomska DNA najbolje eluira u prvom koraku dok se u svakom sljedećem

smanjuje njezina koncentracija. Također vidimo da je genomski DNA visokomolekularna (veća od 10 000 bp).

#### 4.1.2. Odabir ciljnih proteina za ADP-ribozilaciju

Odabrali smo pet gena iz genoma bakterije *S. coelicolor* koji kodiraju ciljne proteine za ADP-ribozilaciju: SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629.

Gen SCO2198 kodira za protein glutaminsku-sintetazu I (GlnA), enzim koji predstavlja jedan od ključnih faktora za metabolizam dušika kod bakterija. Konkretnije, u slučaju kada asimilacija amonijaka pomoću enzima glutamat-dehidrogenaze nije izvediva (stanje u kojem manjka dušika), glutamin-sintetaza katalizira tu reakciju.<sup>38</sup> Aktivnost GlnA je regulirana posttranslacijskom adenilacijom adenilil-transferazom GlnE.<sup>39</sup> Međutim, poznato je da je GlnA modificiran posttranslacijski i ADP-ribozilacijom kod bakterija *S. griseus*<sup>22</sup> i *S. coelicolor*.<sup>6</sup>

Elongacijski faktor Tu (SCO4662), član je superfamilije proteina koji sudjeluju u regulaciji nebrojeno mnogo staničnih procesa kod eukariota i prokariota. Poznato je da elongacijski faktor Tu (Ef-Tu) sudjeluje u translaciji mRNA u aminokiselinski slijed koja se odvija na ribosomu. Stvaranjem kompleksa između aminoacil-tRNA (aa-tRNA), Ef-Tu i GTP-a omogućuje se njegov prijenos na A-mjesto ribosoma gdje hidroliza GTP-a u GDP potiče otpuštanje odgovarajuće aa-tRNA.<sup>40</sup> Za uspješnu translaciju potrebna je dobra kontrola svih procesa koji se odvijaju u tom trenutku, a dio kontrole preuzimaju Ef-Tu odgovarajući na konformacijske promjene ribosoma i tRNA prilikom pravilnog sparivanja kodona i antikodona.<sup>41</sup> Dokazana je ADP-ribozilacija Ef-Tu kod eukariota katalizirana difterijskim toksinom što uzrokuje inhibiciju sinteze proteina te smrt stanice. Posttranslacijska modifikacija ADP-ribozilacija vrši se na histidinskom derivatu poznatom kao diftamid 2-(karboksiamido-trimetilamonio-propil)-histidin.<sup>42</sup>

Gen SCO4771 producira protein inozin 5'-monofosfat dehidrogenazu (eng. *inosine 5'-monophosphate dehydrogenase* (IMPDH)). IMPDH je enzim sa značajnom ulogom u procesu proliferacije stanice, odnosno bitan je za sintezu DNA i RNA. Sudjeluje u *de novo* procesu biosinteze nukleotida gvanina katalizacijom reakcije oksidacije inozin monofosfata (IMP) u ksantozin monofosfat (eng. *xanthosine monophosphate* (XMP)) uz popratnu reakciju redukcije NAD<sup>+</sup>.<sup>43,44</sup> Bitno je napomenuti da ADP-ribozilacija, kao posttranslacijska modifikacija kojom se najčešće inhibira funkcija ciljanih proteina, preko IMPDH predstavlja potencijalno sredstvo

antiproliferacije stanice. Do sada je razvijeno nekoliko vrsta IMPDH inhibitora te im je odobrena primjena u medicini za liječenje raznih bolesti.<sup>45,46</sup>

Protein poliribonukleotid-nukleotidiltransferaza (PNP) kodiran od SCO5737, sadrži fosforolitičku domenu odgovornu za 3'-5' egzoribonukleaznu aktivnost. PNP katalizira reakciju dodavanja fosfatnih grupa iz anorganskih fosfata na supstrat, odnosno RNA, što uzrokuje kidanje fosfodieterske veza i otpuštanje ribonukleozid 5'-difosfata (rNDP) s 3' kraja RNA.<sup>47</sup> Osim toga potvrđeno je da PNP iz *E. coli* katalizira stvaranje heteropolimernog repa na 3' kraju RNA uslijed mutacije gena koji kodira za poli (A) polimerazu I.<sup>48</sup> Poliadenilacija 3' kraja RNA povezuje se s razgradnjom RNA koja je važna za regulaciju ekspresije gena kod bakterija.<sup>49</sup> Najviše istraživana PNP je ona iz bakterije *E. coli*, međutim poznato je da se ovaj enzim nalazi u gotovo svim rodovima bakterija. Novija istraživanja pokazala su da je PNP esencijalan protein kod *S. coelicolor* te da sudjeluje u poliadenilaciji 3' kraja RNA, baš kao i kod *E. coli*.<sup>50</sup>

Gen SCO7629, kodira protein gladovanja (*starvation sensing*), SpaA, homologan regulatornom proteinu stacionarne faze, RspA iz *E. coli*.<sup>51</sup> Oba pokazuju povezanost s mandelat racemaznom i mukonat laktonizirajućom skupinom enzima te je moguće da su uključeni u katabolizam laktone. N-acil homoserin laktone povezani su s regulacijom kod nekoliko vrsta bakterija kao oblik izvanstaničnog signala. Kod *E. coli* sudjeluju u signalnom putu potaknutom nastupanjem gladi prilikom kojeg dolazi do indukcije određenih gena. Daljnjim istraživanjem otkriveno je da RspA protein iz *E. coli* sudjeluje u razgradnji N-acil homoserin laktone. Mutacijom gena koji kodira protein SpaA iz *S. coelicolor*, homolog RspA proteina, pokazano je da dolazi do smanjenog i odgođenog stvaranja antibiotika, što bi se moglo objasniti nemogućnošću proteina SpaA da inaktivira laktone koji suzbijaju sekundarni metabolizam.<sup>52</sup>

Nukleotidni sljedovi ciljnih gena preuzeti su iz baze podataka NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) (tablica 7) te su svi prevedeni u aminokiselinske sljedove programom ExpASy dok su molekulske mase dobivene ExpASy ProtParam Tool programom.

Tablica 7. Osnovni podaci odabranih proteina.

Protein – kod/šifra	Protein – funkcija	NCBI pristupni kod	Gen (pb)	Protein (kDa)
SCO2198	Glutaminska-sintetaza	P15106.1	1410	54,7
SCO4662	Elongacijski faktor Tu	P40174.1	1194	45,9
SCO4771	Inozin-5'-monofosfat dehidrogenaza	CAB82010.1	1125	42,2
SCO5737	Poliribonukleotid-nukleotidiltransferaza	Q8CJQ6.1	2220	81,5
SCO7629	Protein gladovanja ( <i>starvation-sensing</i> )	CAC16962.1	1242	47,4

#### 4.1.3. Dizajniranje početnica za umnažanje odabranih gena

Za uspješno umnažanje gena PCR metodom dizajnirane su specifične početnice na temelju kodirajućih sljedova ciljnih gena preuzetih iz baze podataka NCBI. Svako početnici je unutar nukleotidnog slijeda dodan slijed za mjesto prepoznavanja restrikcijskih endonukleaza kako bi se geni mogli uspješno ugraditi u vektor pET28b. Odabrana su restrikcijska mjesta koja se ne nalaze u kodirajućem slijedu gena. Svaka početnica počinje i završava G ili C nukleotidom kako bi se omogućilo bolje vezanje na DNA kalup. Način dizajniranja početnica prikazan je na primjeru gena SCO2198 na slici 10.

```

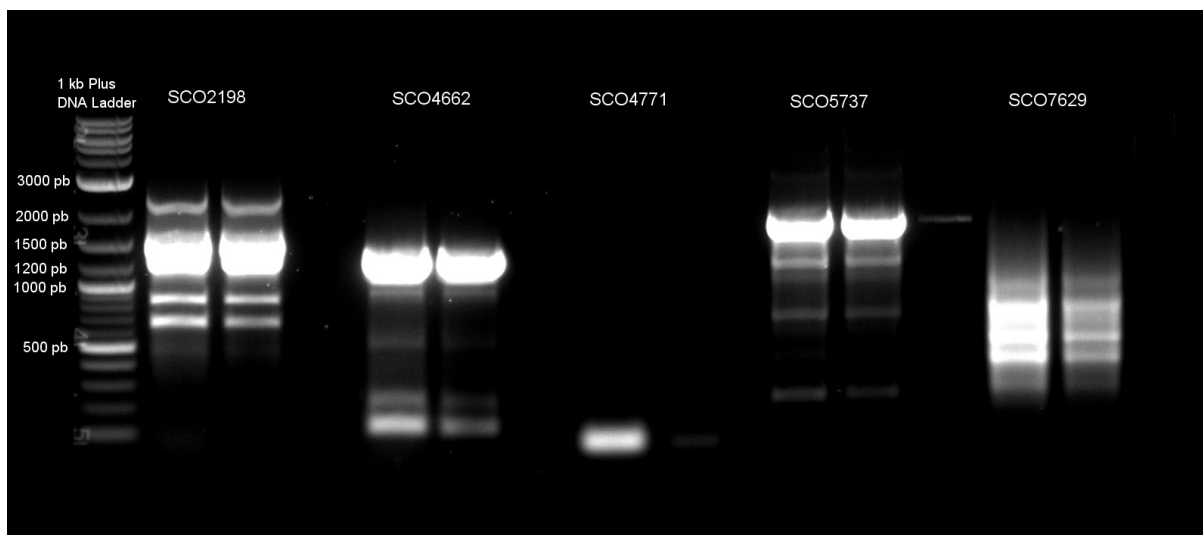
>SCO2198
      NdeI
5' - CACATATGTTCCAGAACGCCGACGACGTC AAG - 3'
      ATGTTCCAGAACGCCGACGACGTC AAGAAGTTCATCGCGGACGAGGACGTC AAGTTCGTCGATGTCCGGT
TCTGCGACCTGCCGGGCGTCATGCAGCACTTCACGCTGCCCGCCACGGCGTTCGACCCCGACGCCGAGCA
GGCCTTCGACGGGTCTCGATCCGCGGCTTCCAGGCCATCCACGAGTCGGACATGTCCCTGCGCCCGAC
CTGTCCACCCGCGCGCTCGACCCGTTCCGCCGGGACAAGACCCTCAACATCAACTTCTTCATCCACGACC
CGATCACGGGCGAGCAGTACTCCCGCACCAGCCGGAACGTTGGCGAAGAAGGCCGAGGCGTACCTGGCCTC
CACGGGCATCGCCGACACGGCGTTCCTCGGTCCCGAGGCCGAGTTCACGTTCTCGACTCCGTCCGCTTC
GCCACCCGCGAGAACGAGTCTTCTACCACATCGACTCCGAGGCCGCGCCTGGAAACACCGGTGCGCTGG
AGGACAACCCGGTTACAAGGTCGCTACAAGGGCGGCTACTTCCCGGTCCCGCCGGTTCGACCACTTCGC
CGACCTGCGCGCCGAGATCTCCCTGGAGCTGGAGCGGTCCGGCCTCCAGGTCGAGCGCCAGCACCACGAG
GTGGGCACCCGGGCCAGGCCGAGATCAACTACAAGTTC AACACTCTGCTCGCGCCCGCGGACGACCTCC
AGCTCTCAAGTACATCGTGAAGAACGTGGCCTGGAAGAACGGCAAGACGGCGACCTTCATGCCGAAGCC
GATCTTCGGTGACAACGGCTCGGGCATGCACGTCCACCAGTCGCTGTGGTTCGGGCGGCGAGCCGCTCTTC
TACGACGAGCAGGGCTACGCCGGCCTGTCCGACACCCCGGCTACTACATCGCGGCATCCTCAAGCAGC
CCCCGTGCTGCTGGCCTTCACCAACCCGACGGTGAAGTTCGTACCACCGCCTGGTCCCGGGCTTCGAGGC
GCCGGTGAACCTGGTGTACTCGCAGCGCAACCGCTCGGCCGCGATGCGGATCCCGATCACGGGCTCGAAC
CCGAAGGCCAAGCGCTCGAGTTCGCGCCCCGGACGCCTCCGGCAACCCGTACTTGGCGTTCGCGCGC
TGCTGCTGGCGGGCCTGGACGGCATCAAGAACAAGATCGAGCCGGCCGAGCCGATCGACAAGGACCTCTA
CGAGCTGGCTCCCGAGGAGCACGCGAACGTGGCGCAGGTCCCGACCTCGCTGGGCGCGGTCTCGACCGC
CTGGAGGCCGACACGAGTTCCTGCTCCAGGGCGACGTGTTACGCGCGACCTGATCGAGACGTGGATCG
ACTTCAAGCGGCCAACGAGATCGCGCCGCTGCAGCTGCGTCCGCACCCGCACGAGTTCGAGATGTACTT
      3' - CAAGCTCTACATGAA
CGACGTG TGA XhoI
GCTGCACACTGAGCTCAC - 5'

```

Slika 10. Početnice (označene plavo) dizajnirane s restrikcijskim mjestima *NdeI* i *XhoI* za umnažanje gena SCO2198. Startni kodon označen je zeleno, a stop kodon crveno.

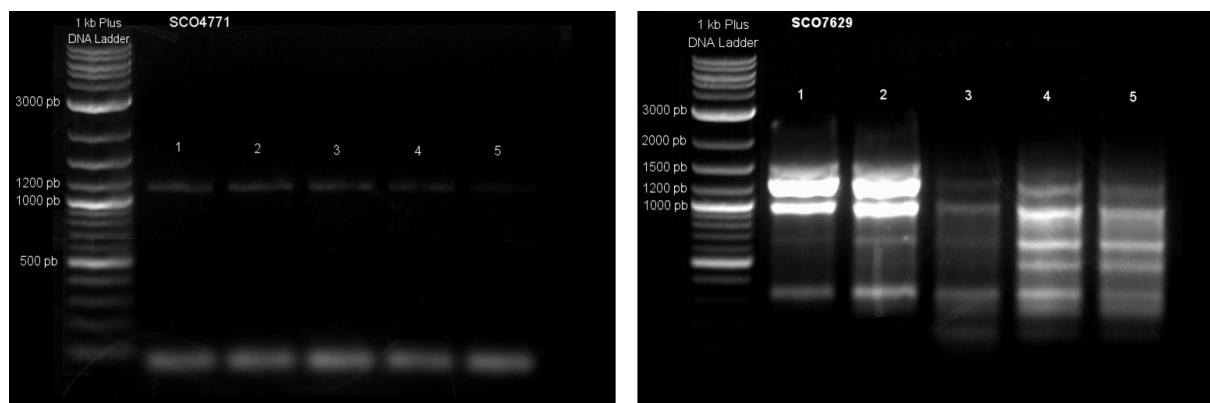
#### 4.1.4. Umnažanje gena od interesa metodom lančane reakcije polimerazom (PCR)

Kodirajući sljedovi nukleotida za proteine SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629 umnoženi su metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) koristeći genomsku DNA iz *S. coelicolor* kao kalup, a prema protokolu za Q5 DNA-polimerazu (poglavlje 3.2.2.) s prethodno osmišljenim početnicama. Rezultati PCR reakcija analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu (1%) i prikazani na slici 11.



Slika 11. Gel elektroforeza PCR produkata kodirajućih sljedova za proteine SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629.

Na slici 11 vidljivo je da PCR produkti kodirajućih sljedova za proteine SCO2198, SCO4662 i SCO5737 veličinom odgovaraju veličini gena. PCR kodirajućeg slijeda za protein SCO7629 je nespecifičan zbog čega je nastalo više PCR produkata, a kodirajući slijed za protein SCO4771 nije uspješno umnožen; vidljiva je samo vrpca koja veličinom odgovara nastanku dimera početnica. Ovom vrstom PCR-a uspješno su umnožena tri kodirajuća slijeda nukleotida, dok je za preostala dva u drugom pokušaju korištena tehnika PCR s gradijentom temperature. Tom tehnikom uspješno su dobiveni PCR produkti prikazani na slici 12.



Slika 12. Gel elektroforeza PCR produkata kodirajućih sljedova za proteine SCO4771 (lijevo) i SCO7629 (desno). Korišten je gradijent temperature sljepljivanja početnica pa su tako redom od 1 do 5 na obje slike prikazani rezultati PCR-a pri temperaturama 57,7°C 60,8°C 63,1°C 65°C i 66,3°C.

Rezultati PCR-a s temperaturnim gradijentom pokazuju da su za umnožavanje kodirajućeg slijeda SCO7629 optimalne temperature sljepljivanja početnica između 57°C i 61°C. U slučaju SCO4771 potvrđeno je da su problem u reakciji dimeri početnica jer su na svim temperaturama dobiveni vrlo slabo vidljivi produkti odgovarajuće veličine.

#### 4.1.5. Razgradnja vektora i PCR produkata

PCR fragmenti izrezani su iz gela i pročišćeni kitom *QIAQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) na način opisan u poglavlju 3.2.4. Nakon toga PCR produkti i vektor pET28b razgrađeni su restrikcijским endonukleazama *NdeI/BamHI* i *NdeI/XhoI* (opisano u poglavlju 3.2.5.). Po dva mjesta prepoznavanja restrikcijских endonukleaza nalaze se u svakom kodirajućem slijedu nakon PCR-a zahvaljujući početnicama koje su osmišljene tako da unutar slijeda nukleotida sadrže restrikcijška mjesta koja će omogućiti ugradnju u ekspresijski vektor. PCR produkti kodirajućih sljedova za proteine SCO2198, SCO4771 i SCO7629 sadrže restrikcijška mjesta *NdeI/XhoI*, a za proteine SCO4662 i SCO5737 *NdeI/BamHI*. Istim kombinacijama restrikcijских endonukleaza razgrađen je i vektor pET28b. Na slici 13 prikazan je primjer rezultata dobivenih nakon razgradnje PCR produkata i vektora.



Slika 13. Gel elektroforeza razgrađenog vektora pET28b te razgrađenih PCR produkata. U prvoj i drugoj jažici nalaze se uzorci vektora pET28b razgrađeni restriktivnim enzimima *NdeI/BamHI* i *NdeI/XhoI*. U preostale tri jažice nalaze se razgrađeni PCR produkti kodirajućih sljedova za proteine SCO2198, SCO4662 i SCO5737.

Na slici 13 u prve dvije jažice vidljive su vrpce veličine 5,3 kbp koje odgovaraju lineariziranom vektoru pET28b. U preostale tri jažice vidljive su vrpce razgrađenih PCR produkata.

#### 4.1.6. Ligacija i transformacija

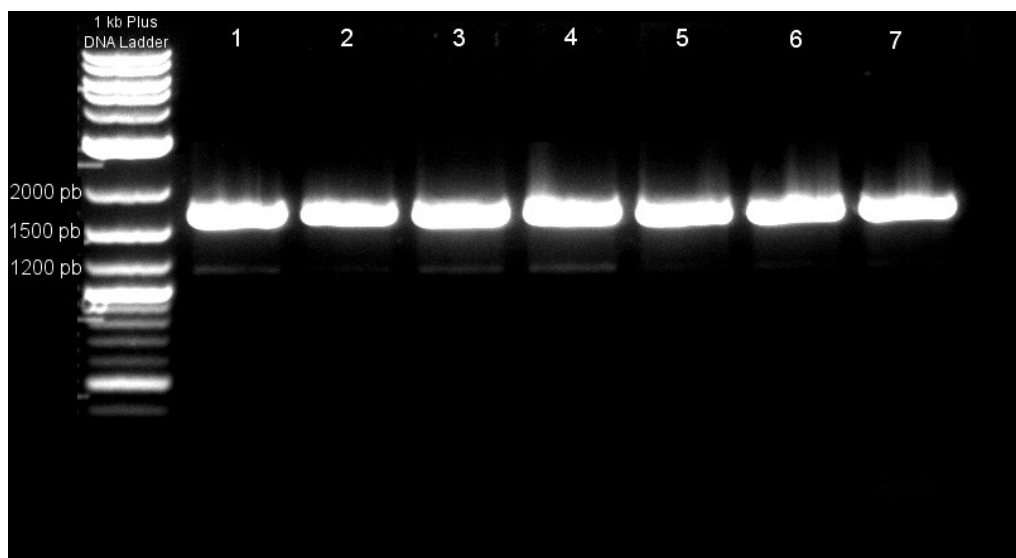
Nakon razgradnje restriktivnim endonukleazama uslijedila je ligacija izoliranih razgrađenih PCR produkata i vektora pET28b (opisana u poglavlju 3.2.6.). Jednim mikrolitrom ligacijske reakcije transformirane su elektroporacijom bakterijske stanice *E. coli* TOP10. Nakon transformacije stanice su se oporavljale sat vremena u 1 mL SOC-a na 37°C, a potom su nasađene na krutu LB podlogu kojoj je dodan kanamicin (35 µg/ml). Nakon inkubacije preko noći na 37°C na podlozi su narasle transformirane bakterije koje su otporne na kanamicin.

#### 4.1.7. PCR na kolonijama

Prisutnost rekombinantnog plazmida u bakterijama provjerena je metodom PCR-a na kolonijama (poglavlje 3.2.2). Primjer rezultata gel elektroforeze nakon metode PCR-a na kolonijama u slučaju transformacije rekombinantnim plazmidom pET28b+SCO2198 prikazan



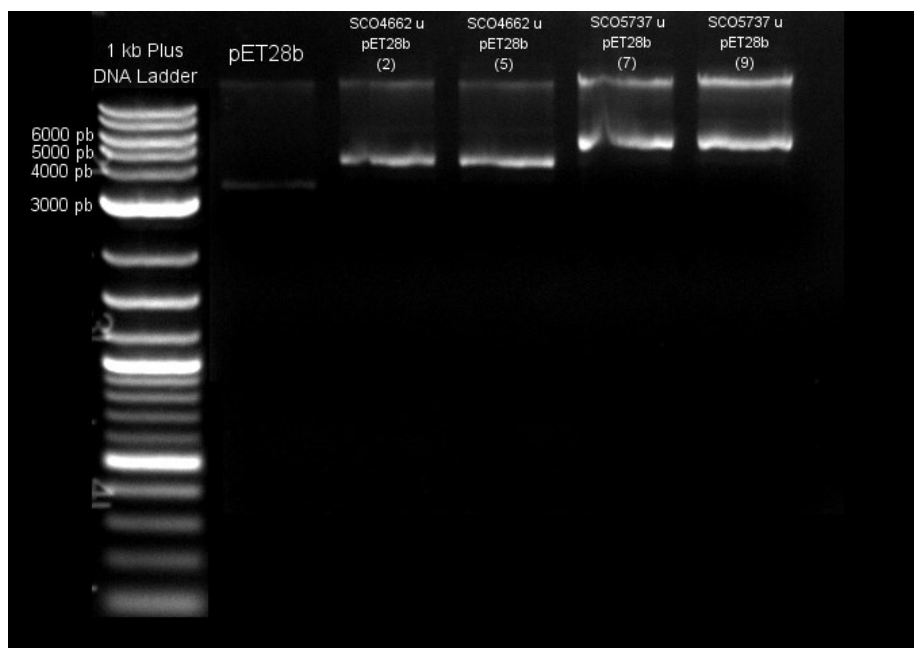
je na slici 14. Iz svih odabranih kolonija umnožili su se produkti očekivane veličine. Dvije su kolonije odabrane za postavu prekonoćne kulture iz koje je izoliran rekombinantni plazmid.



Slika 14. Gel elektroforeza PCR produkata sedam nasumično odabranih bakterijskih kolonija (1-7) transformiranih rekombinantnim plazmidom pET28b+SCO2198.

#### 4.1.8. Izolacija rekombinantnih plazmida

Rekombinantni plazmidi izolirani su iz prekonoćnih kultura pomoću kompleta *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) na način opisan u poglavlju 3.2.8. Rezultati izolacije analizirani su gel elektroforezom i prikazani na slici 15 za rekombinantne plazmide iz dviju pozitivnih kolonija za pET28b+SCO4662 i pET28b+SCO5737. Na gel je nanesen i kontrolni uzorak koji sadrži plazmid pET28b bez ugrađenog inserta.

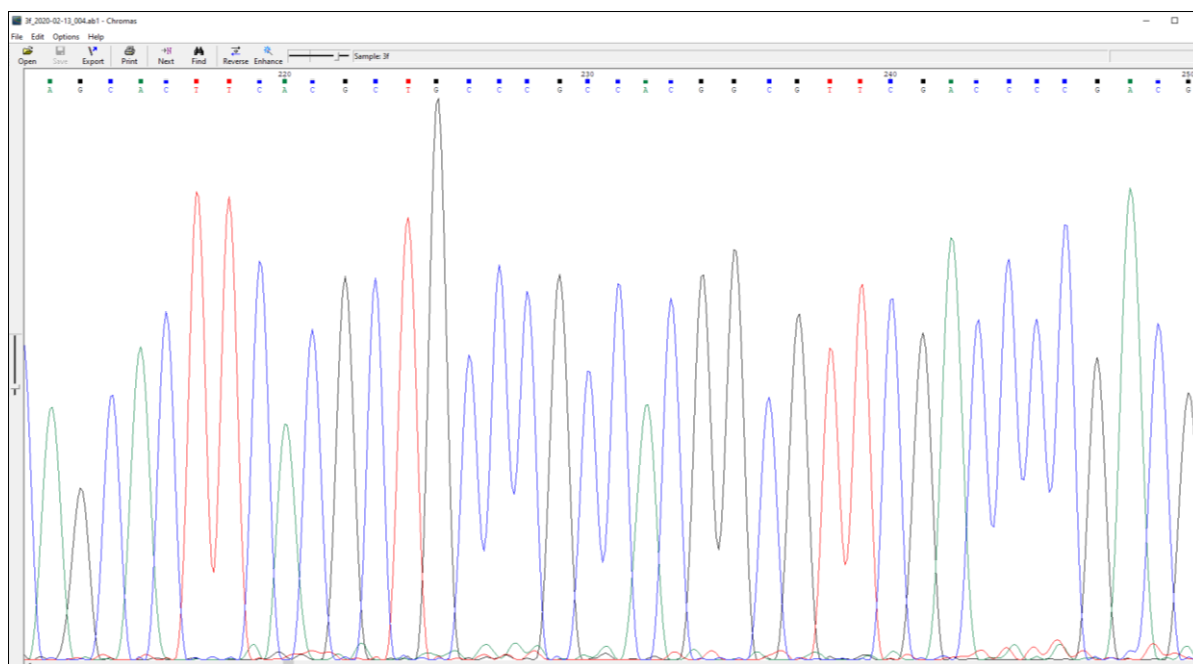


Slika 15. Gel elektroforeza izoliranih rekombinantnih plazmida pET28b+SCO4662 (kolonije 2 i 5) i pET28b+SCO5737 (kolonije 7 i 9).

Vrpce plazmida ne kreću se kroz gel prema svojoj veličini zbog superzavijenosti plazmida, ali se unatoč tome mogu međusobno usporediti. Uspoređujući vrpce plazmida pET28b bez ugrađenog inserta s vrpcama rekombinantnih plazmida koje su tijekom elektroforeze putovale kroz gel sporije, zaključeno je da rekombinantni plazmidi imaju ugrađene inserte. Rekombinantni plazmidi se međusobno također razlikuju u veličini jer nose različito velike inserte. Uspješno su konstruirani i izolirani rekombinantni plazmidi s genima za svih pet ciljnih proteina.

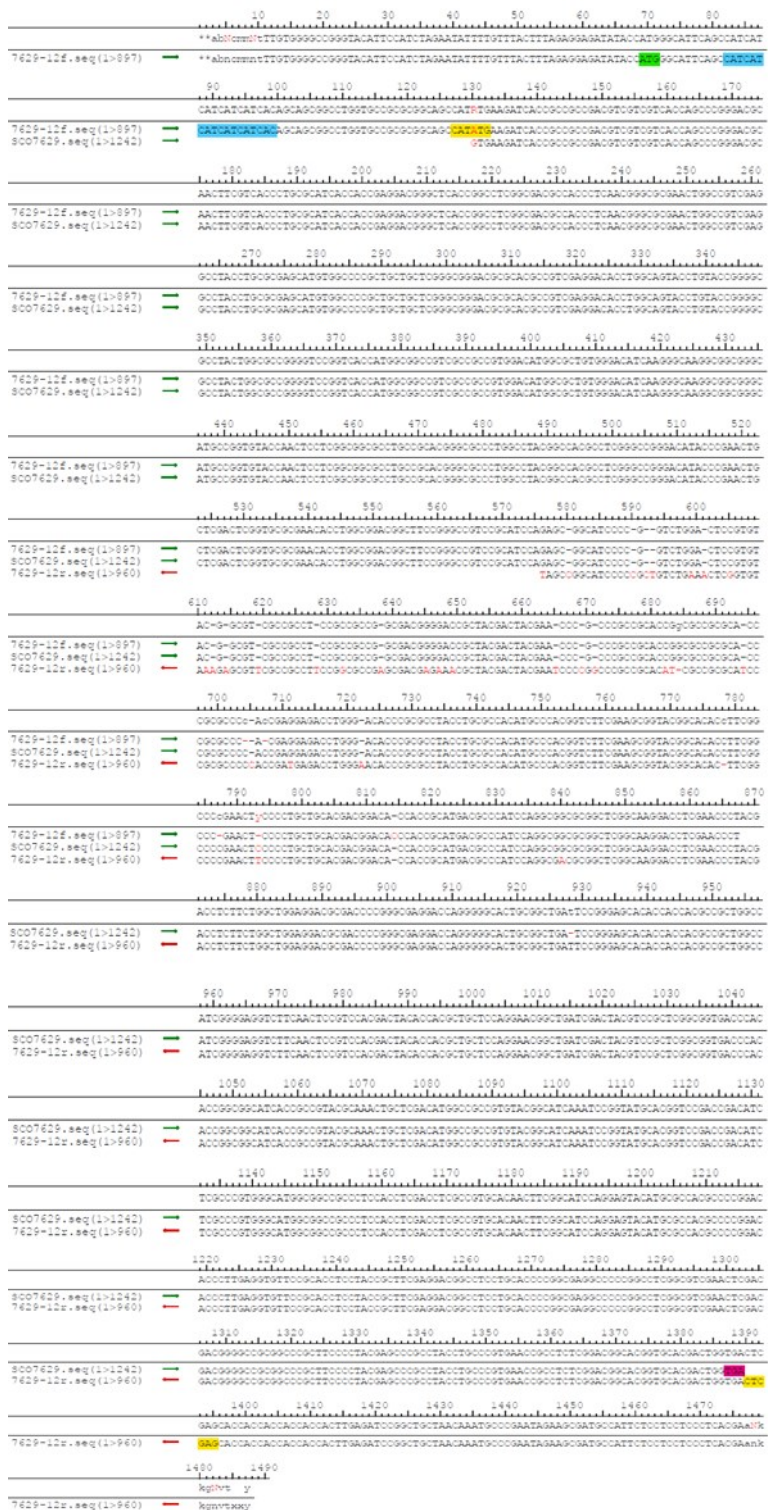
#### 4.1.9. Sekvenciranje

Sangerovom dideoksi metodom sekvenciranja opisanom u poglavlju 3.2.9. određeni su nukleotidni sljedovi inserata ugrađenih u rekombinantne plazmide. Kao početnice za sekvenciranje korišteni su sljedovi T7 i T7 terminator koji omogućuju sekvenciranje inserta u oba smjera. Rezultati sekvenciranja prikazuju se u obliku kromatograma gdje različito obojeni pikovi predstavljaju različite nukleotidne baze (slika 16).



Slika 16. Dio kromatograma dobiven kao rezultat sekvenciranja konstrukta pET28b+SCO2198.

Pomoću programa DNASTAR Lasergene poravnate su sekvence dobivene Sangerovom dideoksi metodom i sekvence preuzete s NCBI-a. Slika 17 prikazuje primjer rezultata sekvenciranja plazmida pET28b+SCO7629. Na temelju podudarnosti poravnatih sljedova određena je točnost sekvenci.

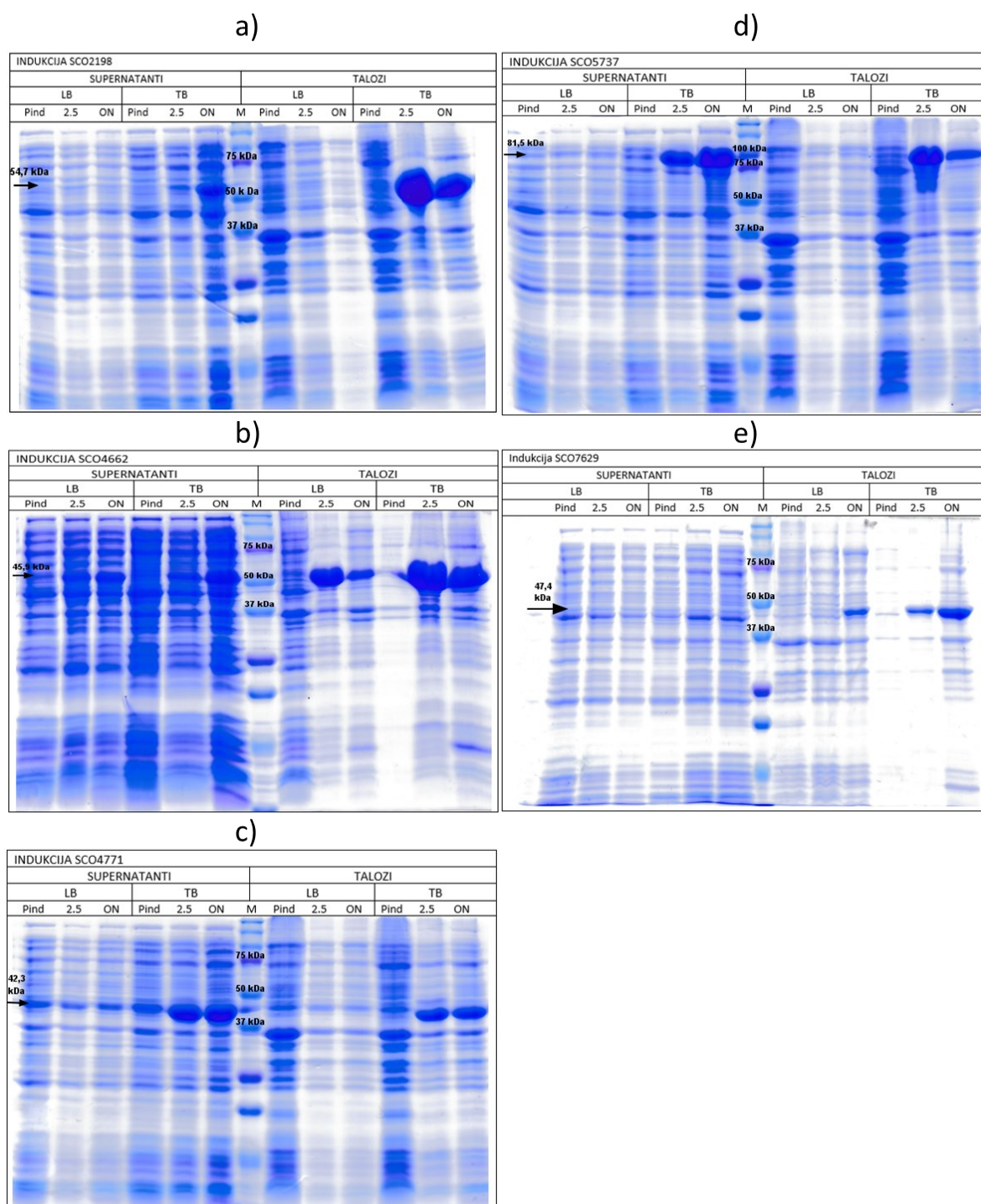


Slika 17. Rezultati dobiveni sekvenciranjem plazmida pET28b+SCO7629. Na slici je vidljivo poravnanje sekvence dobivene korištenjem nizvodne početnice T7 (7629-12f.seq), sekvence preuzete s NCBI (SCO7629.seq) te sekvence dobivene korištenjem uzvodne početnice T7 terminator (7629-12r.seq). Crvena slova označavaju nepodudarnost nukleotidnih baza. Zeleno

je označen startni kodon, a crveno stop kodon. Plavo je označen slijed koji kodira histidinski privjesak, a žuto restrikcijska mjesta korištena prilikom kloniranja.

#### *4.1.10. Ekspresija gena*

Kemijski kompetentne stanice *E. coli* soja BL21(DE3) codon + RIL transformirane su rekombinantnim plazmidima za koje je točnost ugrađenih inserta potvrđena sekvenciranjem. Transformanti su uzgojeni na krutoj hranjivoj podlozi uz dodatak antibiotika kanamicina i kloramfenikola. Kolonije su potom prebačene u tekući medij (LB i TB) s istim antibioticima i uzgajane preko noći na 37°C. Prekonoćna kultura razrijeđena je u LB i TB hranjivom mediju i uzgajana na 37°C uz povremeno mjerenje optičke gustoće (OD). Nakon što su kulture dostigle željenu logaritamsku fazu rasta (OD 0,6-0,8) napravljena je indukcija ekspresije IPTG-om (poglavlje 3.2.10.) pri različitim uvjetima temperature, vremena indukcije i koncentracije IPTG-a. Nakon indukcije kulture su centrifugirane, a dobiveni talozi resuspendirani u puferu za lizu i sonicirani (poglavlje 3.2.). Supernatant s topljivim proteinima odvojen je centrifugiranjem. Supernatanti i talozi analizirani su SDS-poliakrilamid gel elektroforezom u svrhu provjere uspješnosti ekspresije u korištenim uvjetima (slika 18). Cjelokupan proces indukcije napravljen je najprije u malom volumenu (20 mL medija), a nakon provjere na gelu i odabira optimalnih uvjeta indukcije, ponovljen je u većem volumenu (500 mL medija). Teorijske vrijednosti molekulskih masa proteina izračunate su pomoću *ExpasyProtParamToola* na temelju njihovih aminokiselinskih sljedova.



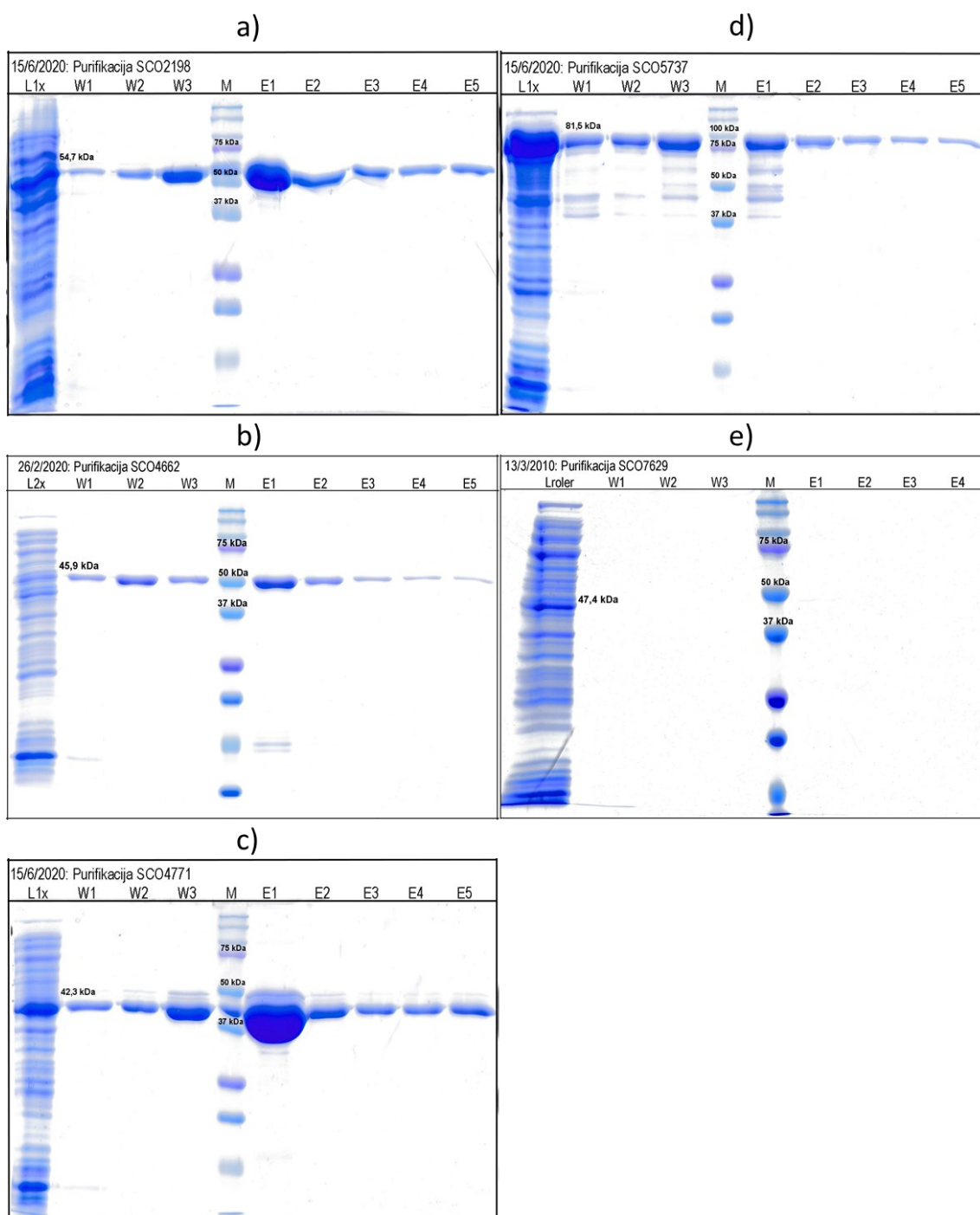
Slika 18. Indukcije proteina a) SCO2198, b) SCO4662, c) SCO4771, d) SCO5737 i e) SCO7629 dodatkom IPTG-a u dva različita hranjiva medija LB i TB te pri dva različita uvjeta: 2 sata i 30 minuta uz  $8 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  IPTG na  $37^\circ\text{C}$  (označeno kao 2.5) te preko noći uz  $1 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  IPTG na  $16^\circ\text{C}$  (označeno kao ON). Pind označava uzorak prije indukcije. Korišten je proteinski biljeg (M) naveden u poglavlju 3.1.9.

Na osnovu dobivenih rezultata odabrani su optimalni uvjeti za svaki pojedini protein pri kojima je izvršena indukcija u većem volumenu (500 mL) odgovarajućeg medija. Za većinu proteina optimalni uvjeti indukcije su bili  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> IPTG, preko noći (22 h) na 16°C u TB mediju (osim SCO4662 u LB mediju). Jedino je SCO4771 induciran u uvjetima  $8 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> IPTG, 2,5 h na 37°C u TB mediju. U navedenim su uvjetima pojedini proteini bili najviše zastupljeni u topljivoj fazi (supernatantu).

#### *4.1.11. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom i određivanje koncentracije*

Proteini su pročišćeni iz staničnih lizata afinitetnom kromatografijom na Co-NTA koloni specifičnim vezanjem proteina na kolonu His-privjescima. Tijekom pročišćavanja sakupljena su po tri ispiranja, svako izvršeno puferom s različitom koncentracijom imidazola (0,01 mol dm<sup>-3</sup>, 0,02 mol dm<sup>-3</sup> i 0,04 mol dm<sup>-3</sup>), i po pet eluata nakon dodatka pufera s najvećom koncentracijom imidazola (0,2 mol dm<sup>-3</sup>). Svi uzorci analizirani su SDS-poliakrilamid gel elektroforezom. Rezultati su prikazani na slici 19. U većini slučajeva u trećem ispiranju i prvom eluatu se nalazilo najviše proteina. Te su frakcije odabrane i ukoncentrirane na Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (BIO RAD), a pomoću njih izvršena je i izmjena pufera.

Masena koncentracija ukoncentriranih proteina određena je metodom po Bradfordu (poglavlje 3.2.15.). Dobiven je baždarni pravac prikazan na slici 20 iz kojeg je izračunana masena koncentracija svih proteina (tablica 8).

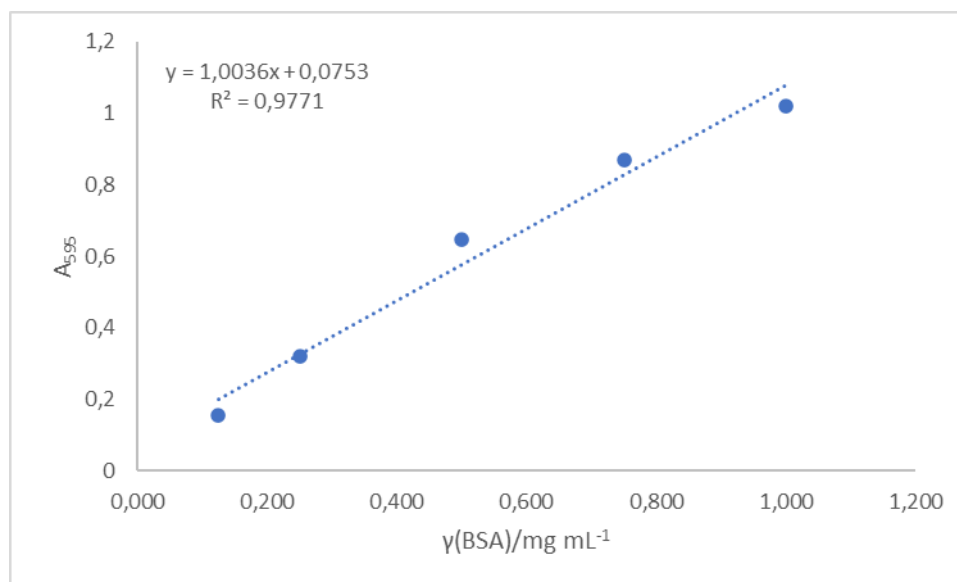


Slika 19. Rezultati gel elektroforeze na poliakrilamidnom gelu nakon pročišćavanja proteina a) SCO2198, b) SCO4662, c) SCO4771, d) SCO5737 i e) SCO7629. Na gel su nanoseni uzorci triju ispiranja – W1, W2 i W3, te pet eluata – E1, E2, E3, E4 i E5. Na četiri gela u prvoj jažici nalazi se uzorak lizata koji je jednom ili dva puta propušten kroz kolonu (L1x ili L2x), a na gelu e) u prvoj jažici nalazi se uzorak lizata inkubiran s TALON Co<sup>2+</sup> matricom.

Korišten je proteinski biljeg naveden u poglavlju 3.1.9.



Na slici 19 vidljivo je da se na svim gelovima nalaze vrpce koje veličinom odgovaraju pročišćenim proteinima. Većina proteina pokazuje zadovoljavajuću količinu i čistoću, što se vidi po tome jer ne postoje vrpce drugih proteina. Jedino je proteina SCO7629 dobiveno vrlo malo.



Slika 20. Spektrofotometrijsko praćenje apsorbancije otopine BSA pri različitim koncentracijama.

Tablica 8. Spektrofotometrijsko određivanje masene koncentracije dobivenih proteina metodom po Bradfordu.

Protein	$V / \mu\text{L}$	$A_{595}$	$\gamma(\text{protein}) / \text{mg mL}^{-1}$
<b>SCO2198</b>	2	1,002	9,234
<b>SCO4662</b>	2	0,253	1,771
<b>SCO4771</b>	1	1,046	19,344
<b>SCO5737</b>	2	1,075	9,961
<b>SCO7629</b>	20	0,146	0,070

Uz određivanje masene koncentracije proteina metodom po Bradfordu proteinima je određena koncentracija i na uređaju Nanophotometer N60 (Implen). Izmjerene koncentracije proteina nalaze se u tablici 9. Podaci o molekulskim masama i ekstincijskim koeficijentima dobiveni su pomoću *ExpasyProtParamToola*. Usporedbom s rezultatima dobivenima metodom po Bradfordu vidljiv je znatniji nesrazmjer koncentracija za protein SCO5737. Omjer  $A_{260} / A_{280}$

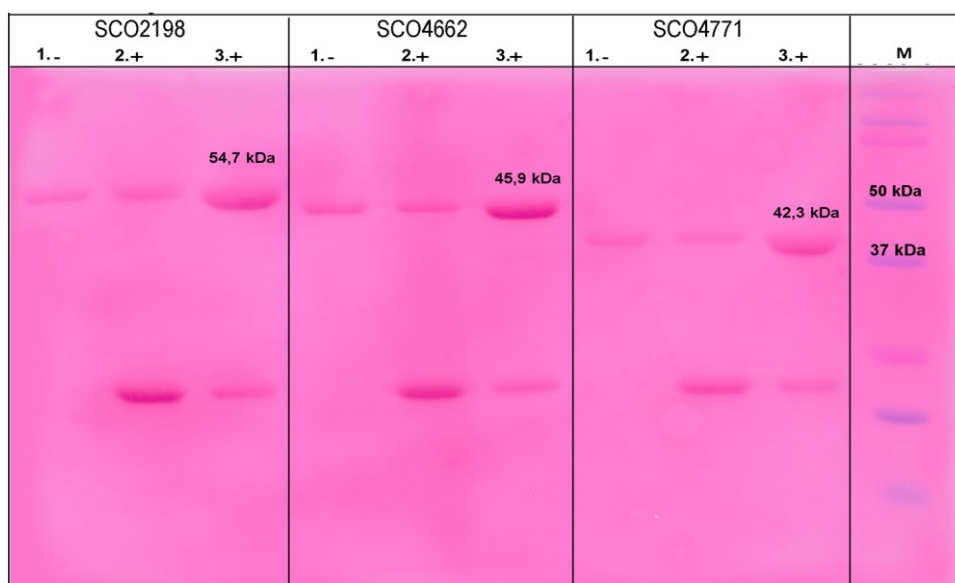
koristi se kao pokazatelj čistoće proteina pri čemu idealna vrijednost iznosi 0,6. Kada je ta vrijednost veća vjerojatno se radi o kontaminaciji zaostalim nukleinskim kiselinama.

Tablica 9. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina pomoću uređaja Nanophotometer N60 (Implen).

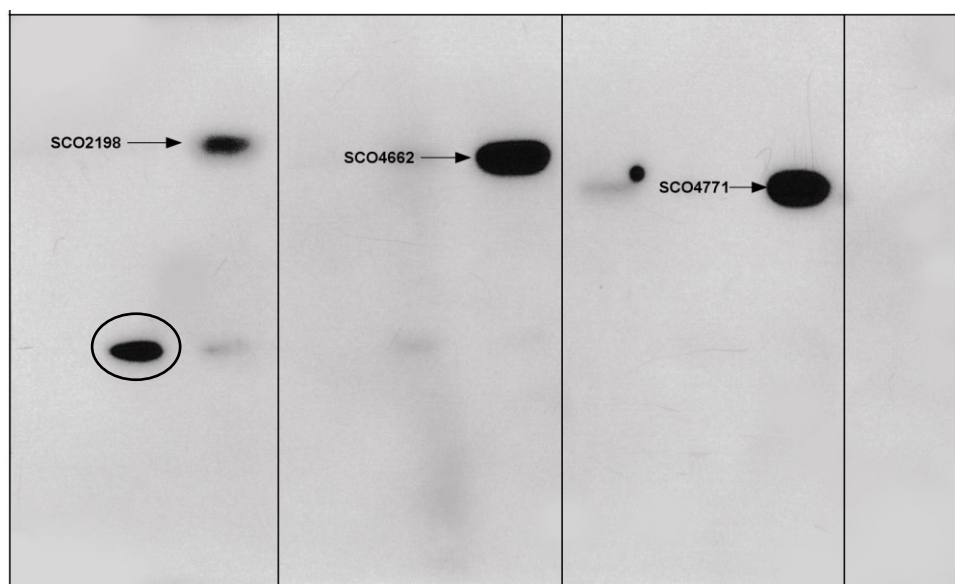
Protein	Molekulska masa (Da)	Ekstincijski koeficijent	$\gamma$ (protein)/ mg mL <sup>-1</sup>	c (protein)/ pmol $\mu$ L <sup>-1</sup>	$A_{260} / A_{280}$	$A_{260} / A_{230}$
SCO2198	54731,25	48820	8,1592	149,08	0,864	0,158
SCO4662	45944,27	18910	1,8881	41,095	1,380	0,170
SCO4771	42278,83	34045	15,696	371,25	0,590	0,188
SCO5737	81523,01	23505	34,318	420,96	1,757	0,436
SCO7629	47369,35	59820	0,0995	2,1005	2,230	0,214

#### 4.1.12. ADP-ribozilacija in vitro i western analiza

Western analiza omogućila je provjeru aktivnosti enzima mono-ADP-ribozil-transferaze SCO5461 na supstratima SCO2198, SCO4662 i SCO4771 u reakciji u kojoj je kao donor ADP-riboze korišten bio-NAD. Proteini su razrijeđeni na koncentraciju 1  $\mu$ g /  $\mu$ L, a početna koncentracija od 6  $\mu$ g /  $\mu$ L SCO5461 razrijeđena je na 3  $\mu$ g /  $\mu$ L. Omjer SCO5461 i proteina meta u jednom uzorku bio je 3:1, a u drugom 1:3. Po završetku reakcije uzorci su razdvojeni SDS poliakrilamid gel elektroforezom. Zatim je izvršen prijenos s gela na membranu kako bi se detektirali potencijalno modificirani proteini pomoću kompleksa streptavidina i peroksidaze iz hrena. Upravo zbog signala kojeg stvara ovaj enzim western analiza omogućila je detekciju na filmu proteina SCO2198, SCO4662 i SCO4771 koji su se tijekom reakcije modificirali. Na slici 21 prikazani su rezultati dobiveni bojanjem membrane nakon prijenosa proteina u otopini Ponceau S, a na slici 22 razvijanjem filma u mraku nakon provedene detekcije kemiluminiscencijom.



Slika 21. Membrana nakon transfera obojana otopinom Ponceau S (natrijeva sol diazo bojila svijetlo crvene boje). **1** – protein od interesa bez enzima SCO5461, **2** – protein od interesa i enzim SCO5461 u omjeru 1:3, **3** – protein od interesa i enzim SCO5461 u omjeru 3:1, **M** – *Precision Plus Dual Color Standards* (BIO-RAD) proteinski biljeg.



Slika 22. Rezultati western analize. Strelicama su označene vrpce proteina detektirane kemiluminiscencijom. Zaokružen je signal proteina SCO5461.

Rezultati na membrani pokazuju da se u slučaju sva tri proteina pojavljuju vrpce odgovarajućih veličina i očekivanih razlika u količini. Nakon izlaganja membrane rendgenskom filmu, crne

vrpce koje veličinom odgovaraju željenim proteinima vidljive su u slučaju kada je omjer proteina i enzima SCO5461 u reakciji bio 3:1. Možemo zaključiti da enzim SCO5461 uspješno modificira proteine SCO2198, SCO4662 i SCO4771. Nadalje, zaokruženi signal koji se također pojavljuje na filmu u slučaju kada enzima SCO5461 ima tri puta više u odnosu na protein odgovara veličinom samom enzimu i potvrđuje njegovu sposobnost da modificira samoga sebe.

## 4.2. Rasprava

Unatoč sve većem interesu znanstvenika za ADP-ribozilaciju i njezinu ulogu kod bakterija i dalje se malo toga zna o procesima ADP-ribozilacije i de-ADP-ribozilacije, o njihovim ciljnim proteinima te o enzimima koji te reakcije kataliziraju. U sklopu ovog rada istraživani su ciljni proteini za ADP-ribozilaciju iz bakterije *Streptomyces coelicolor*, modelne bakterije iz roda *Streptomyces*. U slučaju ove bakte

+rije, prema trenutno dostupnim podacima, ADP-ribozilacija kontrolira važne stanične procese kao što su morfološka diferencijacija i sporulacija te proizvodnja i izlučivanje antibiotika.<sup>6,8</sup> Odabrano je pet gena iz *S. coelicolor* koji kodiraju ciljne proteine za ADP-ribozilaciju; SCO2198, SCO4662, SCO4771, SCO5737 i SCO7629. Za kloniranje odabranih gena izolirana je genomska DNA iz *S. coelicolor* koja je poslužila kao kalup za umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze pomoću osmišljenih specifičnih početnica. Početnice moraju biti specifične za sljedove na samom početku i samom kraju gena tako da se na njihov sastav ne može puno utjecati. K tome, radi se o bakteriji karakterističnoj po izrazito visokom udjelu G-C parova baza u genomu. Rezultati PCR-a pokazali su da nije moguće optimizirati uvjete reakcije tako da oni odgovaraju svim genima (npr. temperatura sljepljivanja početnica). Gen za SCO7629 je uspješno umnožen tek nakon testiranja optimalne temperature sljepljivanja početnica. Gen za SCO4771 je uspješno umnožen iako je pojava dimera početnica uzrokovala značajno smanjenje količine umnoženog produkta. Umnoženi geni zatim su klonirani u ekspresijski vektor pET28b sa ciljem produkcije željenih proteina. Indukcija je provedena dodatkom IPTG-a, za svaki protein u najoptimalnijim uvjetima. Analizom na poliakrilamidnom gelu nakon pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom vidljivo je da su neki proteini eksprimirani uspješnije od drugih (slika 19). Geni SCO2198, SCO4662 i SCO4771 ekspresijom pri zadanim uvjetima produciraju veće količine proteina koji nakon pročišćavanja i ukoncentriravanja pokazuju zadovoljavajući stupanj čistoće. Ekspresija proteina kodiranih genima SCO5737 i SCO7629 bila je manje uspješna. Protein dobiven ekspresijom gena

SCO5737 nije efikasno pročišćen afinitetnom kromatografijom i dobivene su previsoke vrijednosti koncentracije (tablica 9) mjerenjem na spektrofotometru. Protein SCO7629 dobiven je u izrazito malim količinama, nedovoljnima za daljnju analizu i testiranja.

Iako su identificirani ADP-ribozilirani proteini u bakteriji *S. coelicolor*, nije razjašnjeno koji enzimi sudjeluju u njihovoj modifikaciji, odnosno uklanjanju modifikacije. Ciljni proteini koji su istraživani u ovom radu su: glutaminska-sintetaza I (SCO2198), elongacijski faktor Tu (SCO4662), inozin-5'-monofosfat-dehidrogenaza (SCO4771), poliribonukleotid-nukleotidiltransferaza (SCO5737) i protein gladovanja (*starvation sensing*) (SCO7629). Ono što je svim ovim proteinima zajedničko je da svi oni na različite načine ostvaruju svoju ulogu kroz procese važne za život stanice.

Glutaminska-sintetaza je enzim koji igra važnu ulogu u metabolizmu dušika. Katalizira reakciju kondenzacije glutamata i amonijaka pri čemu nastaje glutamin.<sup>53</sup> ADP-ribozilacija glutaminske sintetaze primijećena je kod nekoliko bakterijskih vrsta (*Synechocystis sp.*,<sup>54</sup> *Rhizobium meliloti*,<sup>55</sup> *Escherichia coli*,<sup>56</sup> *Streptomyces griseus*<sup>22</sup>), pa je moguće da se radi o univerzalnom mehanizmu kojim se kontrolira aktivnost ovog enzima kod bakterija.

Elongacijski faktor Tu je prokariotski faktor odgovoran za vezanje aminoacil-tRNA na ribosom. Obzirom na njegovu ključnu ulogu u procesu translacije, elongacijski faktor Tu je jedan od najzastupljenijih i najočuvanijih proteina kod prokariota.<sup>57</sup>

Enzim inozin-monofosfat-dehidrogenaza (IMPDH) katalizira ključan korak u *de novo* biosintezi gvaninskih nukleotida. Inhibicija IMPDH ima višestruke posljedice među kojima su smanjenje količine gvaninskih nukleotida u stanici što rezultira prekidom sinteze DNA i RNA, smanjenjem ekspresije c-myc<sup>58</sup> i K-ras onkogena,<sup>59</sup> povećanjem ekspresije p53 (uobičajeno mutirani protein u ljudskim karcinomima).<sup>60</sup> Inhibitori IMPDH se trenutno intenzivno istražuju kao potencijalni antitumorski lijekovi.<sup>61</sup>

Poliribonukleotid-nukleotidil-transferaze, odnosno poliribonukleotid-fosforilaze su bifunkcionalni enzimi važni u metabolizmu RNA. Mogu imati egzonukleaznu (fosforolitičku 3'-5' egzoribonukleaznu) i polimeraznu aktivnost (3'-terminalnu oligonukleotid-polimeraznu aktivnost).

Proteini gladovanja (*starvation-sensing*) kontroliraju fiziološke procese u stacionarnoj fazi rasta. Homologni protein kod *S. coelicolor* regulira proizvodnju antibiotika – delecijski mutant pokazuje odgođenu i smanjenu proizvodnju antibiotika aktinorodina i undecilprodigiozina.<sup>51</sup>

Međutim, za potpunu karakterizaciju proteina i metaboličkih puteva u koje su uključeni uvelike bi doprinijelo poznavanje mehanizma ADP-ribozilacije u tom organizmu.

U ovom radu provedeno je testiranje ADP-ribozil-transferaze SCO5461 nad ciljnim proteinima za ADP-ribozilaciju. Otprije je poznato da u *in vitro* uvjetima ovaj enzim posjeduje auto mono-ADP-ribozilirajuću aktivnost što su dokazali i dobiveni rezultati. Ono što je još poznato o enzimu SCO5461 je da ADP-ribozilira N2 amino skupine gvanozina, odnosno da je to ADP-ribozil-transferaza koja može modificirati DNA.<sup>62</sup> Do sada nisu bili poznati proteinski supstrati enzima SCO5461. Rezultati ovog rada pokazali su da SCO5461 u *in vitro* uvjetima ADP-ribozilira proteine SCO2198, SCO4662 te SCO4771. U sklopu ovog rada bilo je planirano provesti testiranje ciljnih proteina i s drugim dostupnim ADP-ribozil-transferazama iz *S. coelicolor*. Isto tako je u planu bilo dobivene ADP-ribozilirane proteine testirati kao supstrate u reakcijama s različitim ADP-ribozil-hidrolazama da bi se ustanovilo koja/koje od njih mogu skinuti modifikaciju. Rezultati tih testiranja će omogućiti usporedbu aktivnosti različitih ADP-ribozil-transferaza i hidrolaza nad istim supstratima, a iz njih ćemo moći zaključiti o specifičnosti pojedinih enzima.

Ovi rezultati i podaci sakupljeni na temelju drugih istraživanja upućuju na važnost ADP-ribozilacije kod bakterije *S. coelicolor* i streptomiceta općenito. Poznato je da su streptomiceti važni proizvođači brojnih bioaktivnih spojeva, posebno antibiotika, i da ADP-ribozilacija ima važnu ulogu u mehanizma njihove regulacije. Stoga će bolje poznavanje procesa ADP-ribozilacije kod streptomiceta omogućiti bolju kontrolu proizvodnje antibiotika i bolje iskorištenje ovih bakterija kao njihovih proizvođača.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu klonirano je pet gena koji kodiraju ciljne proteine za ADP-ribozilaciju iz bakterije *Streptomyces coelicolor* tehnikom rekombinantne DNA. Visokomolekularna genomska DNA dobivena je izolacijom iz *S. coelicolor* te je poslužila kao kalup za umnažanje gena PCR metodom pomoću specifično dizajniranih početnica. Geni su uspješno ugrađeni u ekspresijski vektor pET28b. Izvršena je prekomjerna ekspresija gena inducirana IPTG-om, a dobiveni proteini pročišćeni su afinitetnom kromatografijom pomoću His-privjeska. Dobivene su zadovoljavajuće količine čistih proteina SCO2198, SCO4662 i SCO4771. Proteini SCO7629 i SCO5737 se nisu dobro eksprimirali/pročišćavali u korištenim uvjetima. Provedeno je testiranje proteina SCO2198, SCO4662 i SCO4771 kao supstrata u reakciji ADP-ribozilacije *in vitro* koju je katalizirala ADP-ribozil-transferaza SCO5461. Potvrđena je sposobnost enzima SCO5461 da modificira samoga sebe, a osim toga enzim SCO5461 uspješno je modificirao i sva tri testirana ciljna proteina.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADP = adenzin-difosfat

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

DTT = ditionitrotol

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

GDP = gvanozin-difosfat

GTP = gvanozin-trifosfat

mRNA = glasnička ribonukleinska kiselina

RNA = ribonukleinska kiselina

tRNA = transportna ribonukleinska kiselina



## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. E. de Lima Procópioa, I. Rejsda, S. Mayra, K. Martinsa, J. Lúciode, A. Janete, M. Araújo, *Braz. J. Infect. Dis.* **16** (2002) 466–471.
2. A. Gerry, A. M. Banat, A. M. Abdelhameed, I. M. Banat, *J. Med. Microbiol.* **69** (2020) 1040–1048.
3. K. F. Chater, *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361** (2006) 761–768.
4. C. R. D. Pamboukian, M. C. R. Facciotti, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **112** (2004) 111–122.
5. S. Bentley, K. Chater, A. Cerdeño-Tárraga, et al., *Nature* **417** (2002) 141–147.
6. A. Penyige, J. Keserű, F. Fazakas, I. Schmelczer, K. Szirák, G. Barabás, S. Biró, *J. Microbiol.* **47** (2009) 549–556.
7. B. Lüscher, M. Bütepage, L. Ecke, S. Krieg, P. Verheugd, B. H. Shilton, *Chem. Rev.* **118** (2018) 1092–1136.
8. K. Szirák, J. Keserű, S. Biró, I. Schmelczer, G. Barabás, A. Penyige, *J. Microbiol.* **50** (2012) 409–418.
9. L. Palazzo, A. Mikoč, I. Ahel, *FEBS J.* **284** (2017) 2932–2946.
10. T. Nakano, Y. Matsushima-Hibiya, M. Yamamoto, A. Takahashi-Nakaguchi, H. Fukuda, M. Ono, T. Takamura-Enya, H. Kinashi, Y. Totsuka, *Toxicon* **63** (2013) 53–63.
11. E. Stackebrandt, F. A. Rainey, N. I. Ward-Rainey, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** (1997) 479–491.
12. A. S. Anderson, E. M. H. Wellington, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51** (2001) 797–814.
13. A. R. Hesketh, G. Chandra, A. D. Shaw, J. J. Rowland, D. B. Kell, M. J. Bibb, K. F. Chater, *Mol. Microbiol.* **46** (2002) 917–932.
14. H. Wildermuth, *J. Gen. Microbiol.* **60** (1970) 43–50.
15. K. F. Chater, R. Losick u J. A. Shapiro, M. Dworkin (ur.), *Bacteria as multicellular organisms*, Oxford University Press, London, 1997. str. 149–182.
16. E. A. Barka, P. Vatsa, L. Sanchez, et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80** (2016) 1–43.
17. B. Price, T. Adamidis, R. Kong, W. Champness, *J. Bacteriol.* **181** (1999) 6142–6151.
18. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptomyces#Life\\_Cycle](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptomyces#Life_Cycle) (datum pristupanja 19. kolovoza 2020.).
19. R. J. Collier, *Toxicon* **39** (2001) 1793–1803.

20. M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, F. Koch-Nolte, *Trends Biochem. Sci.* **35** (2010) 208–219.
21. <https://ivanahellab.wixsite.com/ivan-ahel-lab/research> (datum pristupanja 21. kolovoza 2020.).
22. A. Penyige, G. Barabás, I. Szabó, J. C. Ensign, *FEMS Microbiol. Lett.* **69** (1990) 293–297.
23. J. Baysarowich, K. Koteva, D. W. Hughes, L. Ejim, E. Griffiths, K. Zhang, M. Junop, G. D. Wright, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** (2008) 4886–4891.
24. R. Sawaya, B. Schwer, S. Shuman, *RNA* **11** (2005) 107–113.
25. J. Lalić, M. Posavec Marjanović, L. Palazzo, D. Perina, I. Sabljčić, R. Žaja, T. Colby, B. Pleše, M. Halasz, G. Jankevicius, G. Bucca, M. Ahel, I. Matić, H. Četković, M. Luić, A. Mikoč, I. Ahel, *J. Biol. Chem.* **291** (2016) 23175–23187.
26. J. G. Rack, D. Perina, I. Ahel, *Annu. Rev. Biochem.* **85** (2016) 431–454.
27. V. R. Moure, F. F. Costa, L. M. Cruz, F. O. Pedrosa, E. M. Souza, X. D. Li, F. Winkler, L. F. Huergo, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **384** (2015) 89–106.
28. K. Ochi, A. Penyige, G. Barabas, *J. Gen. Microbiol.* **138** (1992) 1745–1750.
29. <https://www.addgene.org/vector-database/2566/> (datum pristupanja 7. listopada 2020.).
30. <https://www.qiagen.com/br/products/top-sellers/dneasy-blood-and-tissue-kit/#productdetails> (datum pristupanja 20. ožujka 2020.).
31. S. B. Primrose, R. M. Twyman, *Principles of Gene Manipulation and Genomics*, Blackwell Publishing, Oxford, 2006.
32. B. Balen, D. Pavoković, P. Peharec Štefanić, M. Krsnik-Rasol, *Elektroforetske tehnike istraživanja proteina*, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 2011.
33. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/> (datum pristupanja 25. ožujka 2020.).
34. A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, B. Maertens u J. N. Abelson, M. I. Simon, A. M. Pyle (ur.) *Methods in Enzymology*, Elsevier, London, 2015. str. 2–15.
35. <https://www.phosphosolutions.com/sds-page-demystified/> (datum pristupanja 28. ožujka 2020.).
36. [https://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie\\_Brilliant\\_Blue](https://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie_Brilliant_Blue) (datum pristupanja 27. rujna 2020.).
37. T. Mahmood, P. C. Yang, *North Am. J. Med. Sci.* **4** (2012) 429–434.

38. L. V. Wray Jr., S. H. Fisher, *Gene* **71** (1988) 247–256.
39. A. Penyige, A. Kalmanczhelyi, A. Sipos, J. C. Ensign, G. Barabas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204** (1994) 598–605.
40. J. Nilsson, P. Nissen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (2005) 349–354.
41. E. A. Robinson, O. Henriksen, E. S. Maxwell, *J. Biol. Chem.* **249** (1974) 5088–5093.
42. N. J. Oppenheimer, J. W. Bodley, *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 8579–8581.
43. M. D. Sintchak, E. Nimmesgern, *Immunopharmacology*, **47** (2000) 163–184.
44. R. Zhang, G. Evans, F. J. Rotella, E. M. Westbrook, D. Beno, E. Huberman, A. Joachimiak, F. R. Collart, *Biochemistry* **38** (1999) 4691–4700.
45. G. Weber, *Cancer Res.* **43** (1983) 3466–3492.
46. D. W. Smith, L. R. Frankel, L. H. Mathers, A. T. Tang, R. L. Atiagno, C. G. Prober, *N. Engl. J. Med.* **325** (1991) 24–29.
47. T. Godefroy-Colburn, M. Grunberg-Manago, *The Enzymes* **7** (1972) 533–574.
48. B. Sarkar, G. J. Cao, N. Sarkar, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41** (1997) 1045–1050.
49. A. J. Carpousis, N. F. Vanzo, L. C. Raynal, *Trends. Genet.* **15** (1999) 24–28.
50. P. Bralley, B. Gust, S. Chang, K. F. Chater, G. H. Jones, *Microbiology* **152** (2006) 627–636.
51. D. Schneider, C. J. Bruton, K. F. Chater, *Gene* **177** (1996) 243–251.
52. G. W. Huisman, R. Kolter, *Science* **265** (1994) 537–539.
53. R. J. Almassy, C. A. Janson, R. Hamlin, N. H. Xuong, D. Eisenberg, *Nature* **323** (1986) 304–309.
54. N. J. Silman, N. G. Carr, N. H. Mann, *J. Bacteriol.* **177** (1995) 3527–3533.
55. D. L. Woehle, B. A. Lueddecke, P. W. Ludden, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 13741–13749.
56. J. Moss, S. J. Stanley, R. L. Levine, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 21056–21060.
57. H. R. Bourne, D. A. Sanders, F. McCormick, *Nature* **349** (1991) 117–127.
58. S. Mannava, V. Grachtchouk, L. J. Wheeler, M. Im, D. Zhuang, E. G. Slavina, C. K. Mathews, D. S. Shewach, M. A. Nikiforov, *Cell Cycle* **7** (2008) 2392–2400.
59. E. Olah, B. Csokay, N. Prajda, Z. Kote-Jarai, Y. A. Yeh, G. Weber, *Anticancer Res.* **16** (1996) 2469–2477.
60. L. Yuan, S. A. Bohn, J. L. Sherley, *Mol. Biol. Cell* **9** (1997) 15–28.
61. C. P. Shah, P. S. Kharkar, *Eur. J. Med. Chem.* **158** (2018) 286–301.

62. T. Nakano, A. Takahashi-Nakaguchi, M. Yamamoto, M. Watanabe, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **384** (2015) 127–149.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Kozulić

Datum rođenja: 27. listopad 1995.

Mjesto rođenja: Varaždin

### Obrazovanje

2002–2010	Osnovna škola Metel Ožegović Radovan, Radovan
2010–2014	Druga Gimnazija Varaždin, Varaždin
2014–2018	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2018-	Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016-2020	Volonterska udruga Znanstvene čarolije
2015-2019	Otvoreni dan kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)
2018-2019	Smotra Sveučilišta u Zagrebu