

Ekspresija domene SprT proteina ACRC i analiza vezanja ACRC i DNA in vitro

Valičević, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:485031>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-31**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Josipa Valičević

**EKSPRESIJA DOMENE SprT PROTEINA
ACRC I ANALIZA VEZANJA ACRC I DNA
*IN VITRO***

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Nives Ivić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović.

Diplomski rad izrađen je u okviru Slovensko-Hrvatskog bilateralnog istraživačkog projekta pod nazivom *Strukturna karakterizacija čimbenika uključenih u put popravka unakrsnog vezanja DNK-protein* (IPS-2020-01 (4225), voditeljica projekta: dr. sc. Marta Popović).

Zahvale

Veliko hvala mentorici dr. sc. Nives Ivić na pruženoj prilici za rad na Institutu Ruđer Bošković, na uloženom trudu i znanju koje je sa mnom podijelila, te na poticanju samostalnosti u istraživačkom radu. Hvala, također, na strpljivosti i ugodnoj atmosferi tijekom svakog dana.

Hvala voditeljici projekta dr. sc. Marti Popović na mogućnosti da, barem na kratko, budem dio njene istraživačke grupe i da upoznam članove Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju koji su uvijek bili spremni odgovoriti na moja pitanja i pomoći u eksperimentalnom radu.

Puno hvala prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović na velikom znanju koje sam imala prilike slušati i naučiti tijekom cijelog studija, posebno na diplomskom studiju. Hvala na predavanjima iz Proteinske kristalografije koja su proširila moje horizonte znanja u želji da to područje kemije dodatno istražim i zavolim.

Neizmjereno hvala mojoj obitelji.

Hvala mojim predivnim starijim djevojčicama, Martini i Ivani, za svaku ljubavnu, veselu, radosnu i sretnu – a isto tako brižnu, ozbiljnu, autoritetno, te tonalitetno povišenu – riječ kako bi me učinile osobom kojom sam danas.

Hvala mojim roditeljima na neizmjerenoj ljubavi i vjeri, te velikoj strpljivosti da moje ionako kasnije izgovorene riječi imaju svoje *mjesto*, *značenje* i *težinu*. Hvala na sveopćoj i dječjoj bezbrižnosti koju sam uživala sve ove godine u želji da barem i upola od toga nekad pružim i ja svojim bližnjima.

Hvala mojim biserima, Dori i Davidu, na mnoštvu pusa i zagrljaja.

Hvala mom Tomislavu na ljubavi, razumijevanju, strpljenju i velikoj potpori.

Hvala i svim dragim ljudima, prijateljima, kolegama i poznanicima koji su ispunili i uveselili trenutke mog studentskog života.

Za kraj kako bi Zdenko Runjić *sklada*, a Oliver *otpjeva*:

Još jednom da se rodi, nemirno ovo tilo,

Zvizdu će istu slidit, i bi' će ča je bilo.

Ma je sriću snilo, i nike svitle dane,

Kad skupiš ča je bilo, u jednu pismu stane...

Sadržaj

| | |
|---|------------|
| SAŽETAK..... | X |
| ABSTRACT | XII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED..... | 3 |
| 2.1. Oštećenja DNA | 3 |
| 2.2. Mehanizmi popravka DNA oštećenja..... | 4 |
| 2.3. Unakrsna veza DNA–protein | 6 |
| 2.4. Popravak unakrsne veze DNA-protein | 8 |
| 2.4.1. <i>Metaloproteaze Wss1 i SPRTN</i> | <i>9</i> |
| 2.4.2. <i>ACRC ili GCNA</i> | <i>12</i> |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. Materijali | 15 |
| 3.1.1. <i>Standardne kemikalije.....</i> | <i>15</i> |
| 3.1.2. <i>Boje</i> | <i>15</i> |
| 3.1.3. <i>Proteinski i DNA markeri</i> | <i>15</i> |
| 3.1.4. <i>Nukleinske kiseline i oligonukleotidi.....</i> | <i>16</i> |
| 3.1.5. <i>Enzimi</i> | <i>16</i> |
| 3.1.6. <i>Kromatografska punila, kolone i ostalo.....</i> | <i>16</i> |
| 3.1.7. <i>Kompleti za pročišćavanje.....</i> | <i>16</i> |
| 3.1.8. <i>Instrumenti</i> | <i>16</i> |
| 3.1.9. <i>Plazmidni vektor i sojevi bakterija Escherichia coli.....</i> | <i>17</i> |
| 3.1.10. <i>Puferi korišteni tijekom eksperimenata s nukleinskim kiselinama, probama DNA molekula i proteinima</i> | <i>18</i> |
| 3.2. Metode izrade predikcija trodimenzijskih struktura | 22 |
| 3.2.1. <i>Korišteni programi za predikciju trodimenzijskih struktura.....</i> | <i>22</i> |
| 3.3. Metode kloniranja..... | 22 |
| 3.3.1. <i>Lančana reakcija polimeraze.....</i> | <i>22</i> |
| 3.3.2. <i>Dizajn početnica</i> | <i>23</i> |
| 3.3.3. <i>Inverzna lančana reakcija polimeraze.....</i> | <i>24</i> |
| 3.3.4. <i>Fosforilacija, ligacija i dodatak restriktivnog enzima Dpn I.....</i> | <i>25</i> |
| 3.4. Metode rada s bakterijama | 26 |
| 3.4.1. <i>Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija.....</i> | <i>26</i> |
| 3.4.2. <i>Transformacija bakterija i postav noćnih pretkultura/kultura</i> | <i>26</i> |

| | |
|---|------------|
| 3.4.3. Prekomjerna ekspresija proteina u bakterijama..... | 27 |
| 3.4.4. Liza bakterijskih stanica pomoću homogenizatora..... | 28 |
| 3.5. Metode rada s proteinima | 29 |
| 3.5.1. Pročišćavanje proteina pomoću afinitetne kromatografije na Ni-NTA smoli..... | 29 |
| 3.5.2. Promjena pufera u kojem se nalaze proteini pomoću PD-10 kolone ili dijalize..... | 29 |
| 3.5.3. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat | 30 |
| 3.5.4. Kromatografija ionske izmjene | 31 |
| 3.5.5. Gel-filtracija i ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom..... | 32 |
| 3.5.6. Određivanje koncentracije proteina | 33 |
| 3.5.7. Western-hibridizacija..... | 33 |
| 3.6. Metode vezanja proteina i proba molekula DNA..... | 34 |
| 3.6.1. Priprema i sparivanje proba molekula DNA | 34 |
| 3.6.2. Ispitivanje vezanja DNA i protein i detekcija kompleksa..... | 35 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 37 |
| 4.1. Predikcije trodimenzijskih struktura domene SprT u proteinu ACRC | 37 |
| 4.1.1. Dobivene predikcije konstrukata..... | 37 |
| 4.2. Kloniranje konstrukata domene SprT | 39 |
| 4.2.1. Analiza produkata inverzne lančane reakcije polimeraze | 39 |
| 4.2.2. Pripravljene rekombinantni plazmidi | 40 |
| 4.3. Testne prekomjerne ekspresije proteina..... | 41 |
| 4.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina | 46 |
| 4.4.1. Proteinski konstrukti <i>H. sapiens</i> ACRC | 46 |
| 4.4.2. Protein <i>D. rerio</i> ak 378-484..... | 57 |
| 4.4.3. Proteini <i>H. sapiens</i> ACRC WT i ACRC E593A..... | 59 |
| 4.5. Western-hibridizacija | 64 |
| 4.6. Vezanje proteina ACRC i molekula DNA | 65 |
| 4.6.1. Vezanje proteina <i>H. sapiens</i> ACRC WT..... | 65 |
| 4.6.2. Vezanje proteina <i>H. sapiens</i> ACRC E593A..... | 67 |
| § 5. ZAKLJUČAK | XV |
| § 6. LITERATURNI IZVORI..... | XVI |
| § 7. ŽIVOTOPIS | XIX |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

EKSPRESIJA DOMENE SprT PROTEINA ACRC I ANALIZA VEZANJA ACRC I DNA IN VITRO

Josipa Valičević

Unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC) specifičan je tip oštećenja molekule DNA koji nastaje kao posljedica ireverzibilne kovalentne veze proteina i DNA. S obzirom na važnost genetičke informacije pohranjene u DNA, oštećenja kao što su DPC rezultirala bi gubitkom integriteta molekule DNA. Proučavanjem metaloproteaza, Wss1 i SPRTN, otkriveno je da sadrže domenu SprT koja sudjeluje u popravku DPC-a. Nedavno je otkriveno da protein ACRC (engl. *Acidic containing-repeat protein*, ACRC) također ima očuvanu domenu SprT, što daje zaključiti da je uključen u popravak spomenutog oštećenja. Kako bi se strukturno i biokemijski okarakterizirala domena SprT proteina ACRC dizajnirani su konstrukti domene različitih duljina. Konstrukti su klonirani, testirana je njihova nadekspresija u bakteriji *Escherichia coli* i njihova topljivost. U želji za razumijevanjem uloge ACRC-a u popravku DPC-a pročišćeni su humani proteini ACRC i njegov katalitički mutant E593A, te je ispitano njihovo vezanje na različite molekule DNA (dvolančanu, jednolančanu i u obliku rašlji), a od sva tri tipa najbolje je vezanje na DNA u obliku rašlji.

(73 + 14 stranica, 32 slika, 25 tablica, 41 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: ACRC, izolacija proteina, unakrsna veza DNA-protein, vezanje i popravak DNA

Mentor: dr. sc. Nives Ivić, znanstveni suradnik

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. doc. dr. sc. Đani Škalamera
3. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 29. rujna 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

EXPRESSION OF ACRC SprT DOMAIN AND ACRC:DNA BINDING ANALYSIS *IN VITRO*

Josipa Valičević

DNA-protein crosslink (DPC) is a specific type of DNA damage that occurs as a result of the formation of an irreversible covalent bond between DNA and protein. Given the importance of genetic information stored in DNA, damage such as DPC would result in losing DNA integrity. Previously, metalloproteases Wss1 and SPRTN were found to contain the SprT domain involved in DPC repair. Recently, it has been discovered that ACRC (Acidic containing-repeat protein) protein also has the preserved SprT domain, which suggests its involvement in DPC repair. In order to structurally and biochemically characterize the SprT domain of the ACRC protein, domain constructs of different lengths were designed. The constructs were cloned, their overexpression in *Escherichia coli* and their solubility were tested. In order to understand the role of ACRC in DPC repair, human ACRC protein and its catalytic mutant E593A were purified and their binding to different DNA molecules (double-stranded, forked and single-stranded) were examined. Of all three types, binding to the fork type of DNA molecule was the best.

(73 + 14 pages, 32 figures, 25 tables, 41 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: ACRC, DNA binding and repair, DNA-protein crosslink, protein isolation

Mentor: Dr. Nives Ivić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Professor

Reviewers:

1. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Professor
 2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
 3. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: September 29th, 2021

§ 1. UVOD

Stabilnost molekule DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), a samim time i genetičke informacije koju sadrži, važna je za normalnu funkciju stanica i organizama, njihov rast i razvoj te prijenos informacije na nove generacije. Gubitak integriteta tako važne molekule uzrokovao bi niz defekata i mutacija u staničnoj fiziologiji što vodi ka nastanku oboljenja i tumora, ubrzanog starenja te posljedično i smrti stanice.^{1,2}

Jedan od specifičnog i do sada nedovoljno neistraženog tipa oštećenja molekule DNA je unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC). U prisutnosti endogenog ili egzogenog DPC-inducirajućeg agensa proteini koji se nalaze u neposrednoj blizini molekule DNA se kovalentno vežu na nju. Stvorena kovalentno ireverzibilna veza DNA-protein ometa sve procese u kojima sudjeluje DNA, poput replikacije i transkripcije, što vodi do genomske nestabilnosti koja je toksična za život stanice. Iako se DPC svakodnevno odvija u stanicama, točan mehanizam njegova popravka nije u potpunosti razjašnjen.¹

Nedavno je otkriveno da se popravak DPC-a tijekom replikacije DNA odvija posebnim putem popravka oštećenja molekule DNA pomoću staničnih enzima metaloproteaza Wss1 (engl. *Weak suppressor of SMT3 protein*) u kvascu i SPRTN u višim eukariotima.^{3,4,5,6,7} Oni proteolitičkom razgradnjom cijepaju kovalentno vezane proteine na peptide i na taj način iniciraju popravak oštećenja u replikacijskim rašljama i omogućuju ponovno pokretanje replikacijske mašinerije. Kasnije se zaostala oštećenja popravljaju postupkom izrezivanja.

Međutim, još jedna nedavno otkrivena metaloproteaza, ACRC (engl. *Acidic repeat-containing protein*, ACRC) ili drugim nazivom GCNA (engl. *Germ cell nuclear antigen*, GCNA) mogla bi imati važnu ulogu u rješavanju DPC-a.^{1,8} ACRC sadrži domenu SprT koja je homologna domeni nađenoj u proteazi SPRTN, a značajnu sličnost s ostalim metaloproteazama dijeli i u cjelokupnoj organizaciji domena te sadržaju HEXXH motiva. Spomenute proteaze pripadaju zincin obitelji metalopeptidaza, što daje zaključiti da je sadržaj istog koordinacijskog metalnog iona i organizacije domena preduvjet za sličan katalitički mehanizam proteolize.⁹

U cilju novih saznanja vezanih uz strukturu i funkciju proteina ACRC u ovom diplomskom radu su pripremljeni konstrukti različite duljine humanog proteina ACRC koji sadrže samo spomenutu domenu SprT obilježenu heksahistidinskim privjeskom. Testirana je

prekomjerna ekspresija pripremljenih konstrukata u raznim sojevima bakterija *Escherichia coli*, nakon čega je slijedilo pročišćavanje proteina kromatografskim metodama, od afinitetne kromatografije na Ni-NTA (engl. *nickel-nitrilotriacetic acid*) smoli, gel-filtracije pa sve do kromatografije ionske izmjene, s ciljem kasnije kristalizacije proteina i rješavanja trodimenzijske strukture. Nadalje, spomenutim kromatografskim metodama pročistio se divlji tip humanog proteina ACRC (*Hs* ACRC WT) i njegov mutant kojem je na mjestu 593. aminokiseline katalitički aktivni glutamat zamijenjen s alaninom (E593A).

Osim navedenog, cilj je bio ispitati i vezanje proteina ACRC na molekule DNA. Za taj eksperiment koristili su se dobiveni pročišćeni proteini ACRC WT i E593A, a kao predložci DNA koristile su se molekule s nasumičnim slijedom baza obilježene s fluorescentnom bojom Alexa 488 na 5'-kraju. Analiza vezanja proteina i DNA provodila se metodom zaostajanja u gelu (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA), a pregledom cjelokupnih eksperimenata želja je saznati što više novih informacija o mehanizmu proteolitičkog rješavanja DPC-a.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oštećenja DNA

Sve genetičke informacije i upute za specifičan biološki rast i razvoj staničnih oblika života i većine virusa sadržane su u molekuli DNA, dvostrukoj spiralnoj uzvojnici. Genetička informacija pohranjena je u obliku točno određenog slijeda nukleotida, koji predstavlja osnovnu građevnu jedinicu DNA. Nukleotid se sastoji od molekule šećera deoksiriboze koja je vezana na jednu od četiri moguće dušične baze i jedne fosfatne skupine.¹⁰ Dušične baze se dijele u dvije skupine: purinske (adenin i gvanin) i pirimidinske (citozin i timin).

Oštećenja molekule DNA uzrokovana su endogenim i egzogenim faktorima kao i brojnim procesima koji se svakodnevno odvijaju u vrlo reaktivnom okolišu kojeg čini voda kao idealno otapalo.¹ Njihovim djelovanjem može doći do promjena u načinu povezivanja i komplementarnosti sparivanja baza duž lanaca DNA što posljedično utječe na njenu nativnu strukturu i građu dvostruke uzvojnice te dovodi do nastajanja adukata koji, se kao takvi, ne uklapaju u strukturnu građu DNA.

U endogene faktore ubrajaju se neželjeni međuprodukti metaboličkih procesa čija prisutnost u povećanoj koncentraciji može predstavljati potencijalnu opasnost za stanicu. Jedan od takvih procesa je redukcija molekulskog kisika u vodu. Proces kao takav nije opasan, no tijekom reakcije prijenosa elektrona na molekulski kisik može doći do nastajanja toksičnih nusprodukata, kao što su anioni peroksida i radikali kisika. Takvi nusprodukti se nazivaju *reaktivnim kisikovim vrstama* (engl. *reactive oxygen species*, ROS), a oksidativna oštećenja kojima su uzrok ROS smatraju se odgovornima za starenje i za niz bolesti.¹⁰

Oštećenja DNA mogu uzrokovati i egzogeni faktori, kao što su ultraljubičasto, rendgensko ili ionizirajuće zračenje, kemikalije nastale djelovanjem čovjeka i virusi. Ultraljubičasta komponentna Sunčeve svjetlosti glavni je uzrok nastajanja kovalentno povezanih susjednih pirimidinskih ostataka duž lanaca DNA. Takvi pirimidinski dimeri ne pristaju u dvostruku uzvojnici,¹⁰ te su primarni uzrok melanoma kože kod ljudi.^{11,12}

Osim navedenih oštećenja moguća su i ona koja nastaju uslijed samog procesa replikacije molekule DNA. Takva oštećenja su metabolička jer nastaju u procesu udvostručavanja genetičke informacije tijekom procesa diobe stanice, te mogu biti raznovrsna: od mogućnosti krivo sparenih baza tijekom sinteze novog lanca komplementarnom lancu kalupa zbog niske

vjerosti DNA-polimeraze pa do dvolančanih lomova u strukturi DNA. Svi takvi procesi su kobni za pohranu ispravne genetičke informacije.

Nedavno je otkriven novi tip oštećenja DNA nazvan unakrsna veza DNA-protein (engl. *DNA-protein crosslink*, DPC) kojeg karakterizira kovalentno vezanje proteina na molekulu DNA. Takav tip oštećenja remeti proces replikacije DNA uzrokujući dvolančane lomove DNA što može biti toksično za stanicu (detaljnije u odjeljku 2.3).^{1,13}

Kako ne bi došlo do dugoročnih oštećenja, evolucija je razvila niz procesa kojim se vrši provjera, ispravak ili popravak oštećenja u strukturi DNA kako bi sačuvala genetičku informaciju tako bitnu za opstanak same stanice, prijenos informacije na potomke i varijabilnost svih vrsta kao takvih.

2.2. Mehanizmi popravka DNA oštećenja

Stanice ne mogu vršiti svoju funkciju ako im je dostupnost bitnih informacija u genomu narušena ili u potpunosti uništena. Ovisno o vrsti oštećenja strukture DNA razvijene su brojne strategije popravka kako bi se izgubljene informacije obnovile. Ako je sačuvan jedan od lanaca kalupa DNA ili sestrinska kromatida, tada će ga stanica koristiti kao predložak ili kalup za sintezu novog komplementarnog lanca.¹⁰ Međutim, ako je razina oštećenja toliko velika da navedeni mehanizam ne može izvršiti popravak, tada će stanica kao krajnju mogućnost koristiti mehanizam sklon pogreškama, poznat kako *translezijska sinteza*.¹⁴ Takav popravak vrši se pomoću translezijskih polimeraza (TLS-polimeraza), koje zamjenjuju replikacijsku DNA-polimerazu kada su replikacijske rašlje zaustavljene na mjestu oštećenja. TLS-polimeraze nastavljaju daljnju sintezu lanca preko mjesta oštećenja te samim time uzrokuju veliki broj pogrešaka što je povezano s povećanim rizikom mutageneze i pojavom karcinoma.^{14,15}

Izravnim se popravkom popravljaju oštećenje izravnim obratom kemijske reakcije odgovorne za to oštećenje. Fotokemijsko cijepanje pirimidinskih dimera ili UV-dimera odvija se izravnim popravkom pomoću fotoreaktivacijskog enzima zvanog fotolijaza. Za katalitičku aktivnost fotolijaza se koristi energijom apsorbiranog zračenja i još dva faktora, a takav tip popravka prisutan je u gotovo svim stanicama.¹⁰ Alkilirani gvaninski ostaci također se popravljaju izravnim popravkom pomoću *O*⁶-metilgvanin-DNA-metiltransferaze koja prenosi metilnu skupinu s *O*⁶-metilgvanina na bočni ogranak cisteina u aktivnom mjestu enzima.^{16,17}

Jednolančani lomovi u strukturi dvostruke uzvojnice su oštećenja jednog od lanaca DNA, a za njihov popravak stanica aktivira više tipova popravaka ovisno o vrsti oštećenja u tom lancu.

Popravak izrezivanjem baza (engl. *base excision repair*, BER) vrši se pomoću enzima glikozidaze, koja cijepa glikozidnu vezu i oslobađa oštećenu ili neispravnu bazu iz lanca, čime se stvara AP mjesto (engl. *apurinic/aprimidinic site*, AP). Tako nastalo mjesto prepoznaje AP-endonukleaza koja zarezuje okosnicu blizu mjesta na kojem nedostaje baza. Deoksiriboza-fosfodiesteraza izrezuje preostalu jedinicu deoksiriboza-fosfata, a potom DNA-polimeraza umeće novi nukleotid koji je komplementaran nukleotidu u neoštećenom lancu. Konačno, popravljeni se lanac „lijepi“ pomoću DNA-ligaze.¹⁰

Popravak izrezivanjem nukleotida (engl. *nucleotide excision repair*, NER) je veoma važan tip popravka jer krivo spareni ili oštećeni nukleotidi stvaraju velike distorzije u strukturi DNA koje mogu uzrokovati dvolančane lomove te samim time mogu biti toksični za život stanice.¹⁸ Popravak započinje enzim koji prepoznaje mjesto distorzije, zatim se, kod *E. coli* i ostalih bakterija, specifičnom ekscinukleazom uklanja oligonukleotid od 12 ostataka nastalih izrezivanjem 4 nukleotida od oštećenog mjesta na 3'-strani i 8 nukleotida od oštećenog mjesta na 5'-strani.¹⁰ Kod ljudi i ostalih eukariota se izrezuje 27 do 29 oligonukleotida i to 6 nukleotida sa 3'-strane i 22 nukleotida sa 5'-strane u lancu.¹⁸ DNA-polimeraza potom sintetizira novi fragment pri čemu 3'-kraj zarezanog lanca služi kao početnica, a neoštećeni komplementarni lanac kao kalup. Konačno, DNA-ligaza potom lijepi 3'-kraj novonastalog fragmenta s originalnim dijelom lanca DNA.¹⁰ Takav tip popravka evolucijski je očuvan u gotovo svim prokariotskim i eukariotskim stanicama.¹⁹

Sustav za uklanjanje pogrešno sparenih parova (engl. *mismatch-repair system*) postoji u gotovo svim stanicama i uklanja replikacijom nastale pogreške koje nisu uklonjene provjerom tijekom replikacije. Mehanizam se sastoji od najmanje dva proteina, jednog za detekciju krivih parova baza i drugog koji privlači endonukleazu, potrebnu za cijepanje novonastale DNA i zatvaranje lezije kako bi se olakšao popravak.¹⁰ DNA-ligaza, enzim koji može povezati lomove u jednom lancu DNA, krajnji je enzim svakog spomenutog mehanizma.

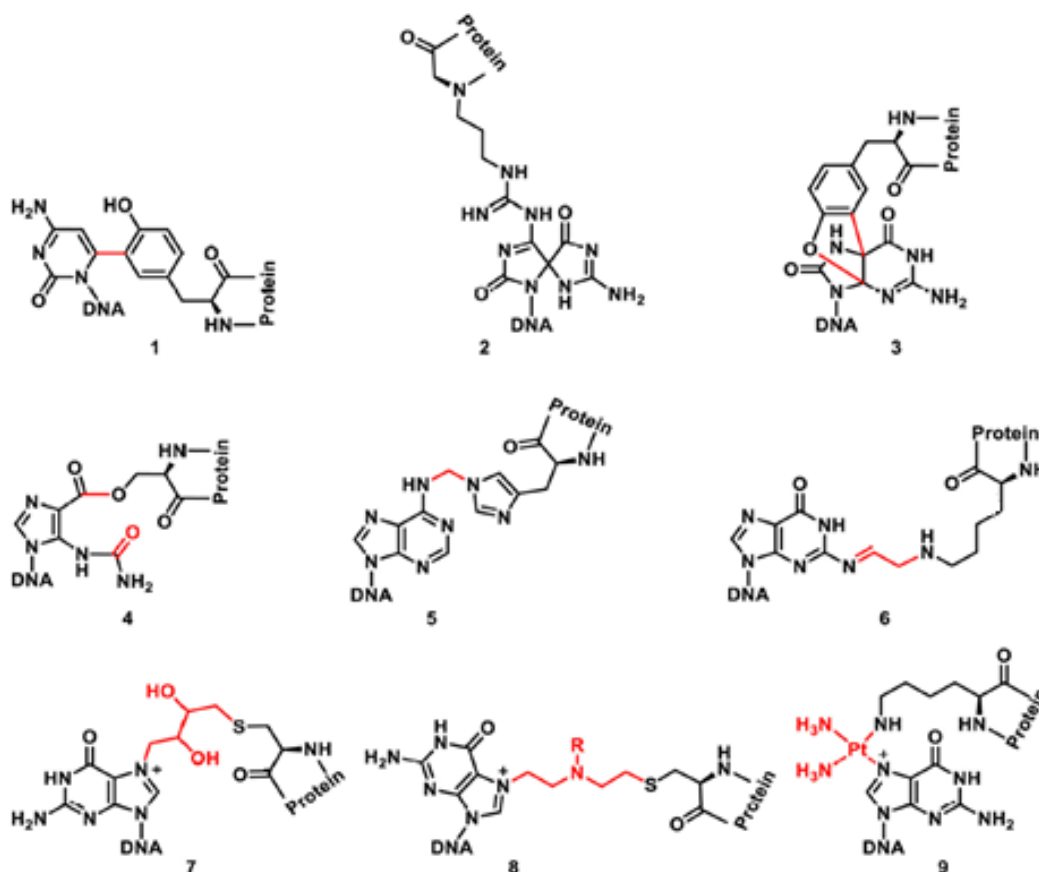
Međutim, za popravak lomova obaju lanaca, iako bili toliko blizu jedan drugome, potreban je drugačiji mehanizam. Specifičan tip popravka dvolančanih lomova aktivan u fazi staničnog ciklusa kada nema procesa replikacije i kada nema prisutnih sestrinskih kromatida, sadržan u svim eukariotima i uočen kod nekih bakterija,¹⁸ nazvan je *povezivanje*

nehomolognih krajeva (engl. *nonhomologous end joining*, NHEJ).¹⁰ Važnost mehanizma je veća što je kompleksnost genetskog materijala veća te je u kvascu, gdje je genom manji, takav mehanizam rijedak.¹⁸ Slobodni se krajevi lanaca, nastali dvolančanim lomom, povezuju pomoću heterodimera dvaju proteina, Ku70 i Ku80. Ti proteini stabiliziraju krajeve i obilježavaju ih za manipulacije koje slijede. Mehanizmom koji još nije u potpunosti razjašnjen, heterodimeri djeluju kao dršci kojima se koriste drugi proteini za privlačenje dvaju dvolančanih krajeva bliže jedan drugom, tako da enzimi mogu „slijepiti“ taj lom.¹⁰

U stanicama u kojima postoje neoštećeni fragmenti DNA s identičnom ili vrlo sličnom sekvencom djeluju drugačiji mehanizmi popravka dvolančanih lomova u DNA.¹⁰ *Homologna rekombinacija* (engl. *homologous recombination*, HR) ili samo *rekombinacija* predstavlja popravak u kojemu takvi neoštećeni fragmenti služe kao kalup za popravak loma. Enzimi koji sudjeluju u mehanizmu popravka vrlo su slični enzimima odgovornima za *rekombinaciju* (engl. *cross-over*), izmjenu genetskog materijala između dviju roditeljskih molekula DNA, koja se događa tijekom mejoze. Takav mehanizam omogućuje popravak oštećenog kromosoma koristeći sestrinsku kromatidu ili homologni kromosom kao kalup.²⁰ Popravak *rekombinacijom*, za razliku od *povezivanja nehomolognih krajeva*, primarni je mehanizam popravka u bakterijama.¹⁸ Svi navedeni mehanizmi pripadaju mreži signalizacijskih puteva za popravak, signalizaciju i aktivaciju popravka te zajedno čine *odgovor na oštećenje DNA* (engl. *DNA damage response*, DDR).¹

2.3. Unakrsna veza DNA–protein

Unakrsna veza DNA–protein karakterizirana je proteinima koji su ireverzibilno kovalentno vezani na molekulu DNA, a složenost vezanja ovisi o veličini i karakteristikama vezanog proteina (naboj, sastav aminokiselina i struktura), vezanju na jedan ili oba lanca DNA, broju kovalentnih veza kao i o fazi staničnog ciklusa u kojemu se DPC pojavljuje. S obzirom da je DPC izrazito složen proces koji ovisi o mnogim čimbenicima, karakteristike nastalih kompleksa (slika 1) su raznolike. S obzirom na način nastajanja DPC-ovi se mogu podijeliti u dva tipa.^{1,2,9}



Slika 1. Kemijske strukture kompleksa unakrsnih veza DNA–protein induciranih reaktivnim kisikovim vrstama (1–3), reaktivnim vrstama dušika (4), formaldehidom (5), akroleinom (6), 1,2,3,4–diepoksubutanom (7), dušikovim derivatima (8) i cisplatinom (9) (preuzeto i prilagođeno prema referenci 21).

Općeniti ili neenzimski tip DPC mogu stvoriti bilo koji proteini u blizini molekule DNA, od histona, transkripcijskih faktora, pa do proteina koji popravljaju ili sudjeluju u procesu replikacije,⁵ a njihovo vezanje posljedica je stresa u stanici uzrokovanog endogenim i egzogenim faktorima. Takav tip oštećenja karakterizira vezanje proteina na jedan ili oba lanca koja nisu oštećena. Aldehidi, koji su međuprodukti u metaboličkom procesu demetilacije histona, mogu uzrokovati nastajanje DPC tako da reakcijom s proteinima u blizini DNA induciraju njihovo vezanje na DNA.¹ Aldehidi su kemijske vrste izrazito reaktivne prirode te kada se nađu u blizini proteina vrlo brzo mogu reagirati s bočnim ograncima aminokiseline lizina, cisteina i histidina, tvoreći tako proteinske adukte koji se potom vežu na amino skupinu DNA stvarajući unakrsnu vezu. Ciljna mjesta za nastanak DPC-a u molekuli DNA uključuju N7 u bazi gvanin, metilnu skupinu C5 u timinu te egzocikličke amino skupine gvanina,

citozina i adenina, čime se dodatno proširuje raznolikost i složenost vezanja.²¹ Nadalje, dušik i molekularni kisik kao reaktivne vrste, mogu reagirati s bazama gvanin, citozin i timin i/ili s bočnim ograncima aminokiselina lizin i tirozin, stvarajući reakcijom radikale, koji potom mogu reagirati s drugim proteinima i/ili molekulom DNA koje se nalaze u blizini stvarajući tako ogromne adukte DPC-a koji sadrže više od jedne molekule u kompleksu.²¹

Za vrijeme normalnih uvjeta u stanici mnogi se enzimi, razne vrste topoizomeraza i DNA-polimeraza, reverzibilno vežu za molekulu DNA tijekom svog katalitičkog ciklusa. Topoizomeraze, enzimi koji uklanjaju torzijski stres u strukturi DNA tijekom procesa replikacije i transkripcije, uvođenjem jednonančanih ili dvolančanih lomova. Topoizomeraze za uvođenje ili ukidanje negativnih superuvijanja moraju cijepati jedan ili dva lanaca DNA, provlačiti segment DNA kroz taj lom te zatim krpati nastali lom u strukturi. Kako bi se to izvelo, topoizomeraza sa svojim tirozinskim bočnim ograncima stvara privremenu kovalentnu vezu s pocijepanom polinukleotidom okosnicom,¹⁰ te ako iz nekog razloga disocira prije vremena završetka reakcije s navedenog mjesta, za sobom ostavlja DPC-ove,²² međuprodukte koji su kovalentno vezani na DNA uzrokujući tako nastajanje enzimskog tipa DPC-a.⁵ Također, djelovanjem antitumorskih lijekova, koji sadrže inhibitore topoizomeraza i niz drugih toksičnih spojeva, uzrokuje se promjena reverzibilnosti vezanja proteina u ireverzibilnu kovalentnu vezu.² Isti rezultat topoizomeraza može stvoriti i u normalnim fiziološkim uvjetima ukoliko se nađe u blizini radikala ili adukata koje tvori vezana DNA.¹ S obzirom da su topoizomeraze enzimi potrebni za mnoštvo procesa u stanici, poput procesa replikacije, transkripcije, rekombinacije i kondenzacije kromosoma te da su prisutni u većini faza staničnog ciklusa, oštećenja koja za sobom ostavljaju usred nenormalnih uvjeta izuzetno su toksična i opasna za život stanice i organizama.²²

2.4. Popravak unakrsne veze DNA-protein

Posljedice koje za sobom ostavlja DPC mogu biti toksične i opasne po život stanice. S obzirom da se u stanici svakodnevno odvijaju procesi replikacije, transkripcije i rekombinacije mogućnost za nastajanje takvog tipa oštećenja uvelike raste te je DPC jedan od najčešćih oštećenja molekule DNA.¹ Prvi rezultati studija spominju dva tipa DNA popravka, *homolognu rekombinaciju* i *popravak izrezivanjem nukleotida*.²³ Uloga *homologne rekombinacije* u samom popravku DPC-a još nije detaljno istražena, no vjeruje se da je dio

mehanizma koji uključuje popravak dvolančanih lomova koji nastaju kao posljedica DPC-a. Nadalje, u nekim bakterijama i stanicama sisavaca otkriveno je da *popravak izrezivanjem nukleotida* sudjeluje u popravku manjih DPC-ova veličine od 11-16 kDa.^{1,24}

Zatim se postavilo pitanje sudjeluju li u DPC popravku specifične proteaze koje bi kompleksan DPC umanjile do veličine manjih peptida. Hipotetski model o usklađenoj proteolizi kovalentno vezanih proteina koji uzrokuju DPC tijekom procesa replikacije DNA postavljen je 2006. godine,²⁵ dok su pioniri istraživanja bili Stefan Jentsch i suradnici koji su 2014. godine izloživši kvasac DPC-inducirajućim agensima, identificirali proteazu Wss1 (engl. *Weak suppressor of SMT3 protein*) koja je uspješno popravila nastala oštećenja i pri tome očuvala život jednostaničnog eukariota.³ Tako otkriven jedinstven način popravka bio je ključan u daljnjem istraživanju obitelji proteaza čija je katalitička aktivnost uvjetovana prisustvom molekule DNA.¹

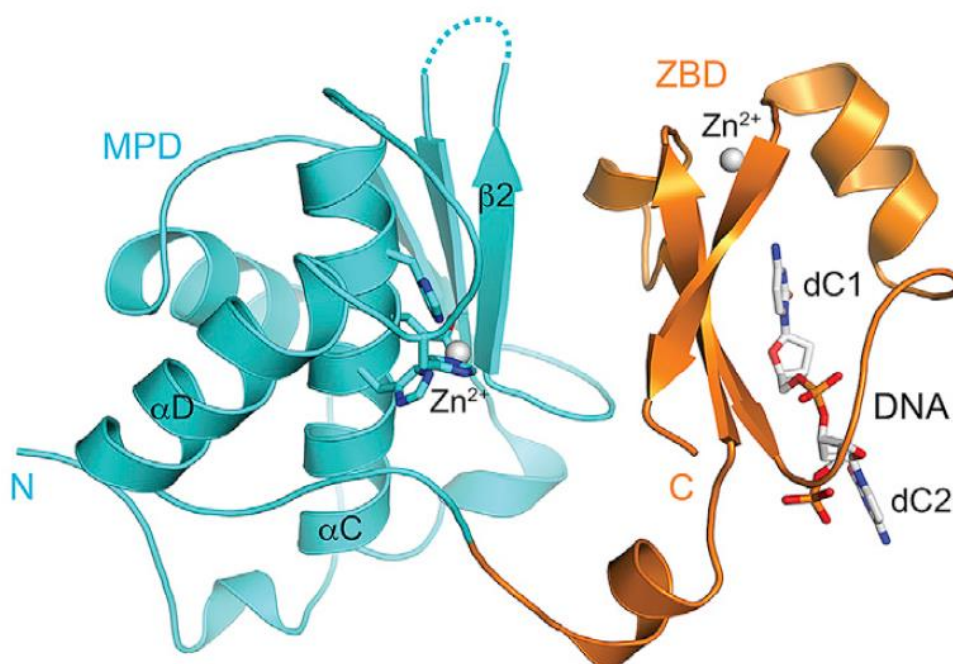
2.4.1. Metaloproteaze Wss1 i SPRTN

Istraživanje uloga proteaza u DPC popravku rezultiralo je otkrićem SPRTN (engl. *SprT-like N-terminal domain*, SPRTN) proteaze ili drugim nazivom Spartan ili DVC-1, koja ima ključnu ulogu u popravku DPC-a kod sisavaca.^{4,5,6,7} Filogenetskim analizama utvrđeno je kako su proteaze Wss1 i SPRTN funkcionalni homolozi¹ sa sličnostima u građi protezanih domena WLM u Wss1 i SprT u SPRTN-u. Homolognost se odnosi na sadržaj očuvanog HEXXH motiva unutar proteaznih domena, gdje im je podudarnost u aminokiselinskom sastavu 24 %.⁵ Postojanje HEXXH motiva čini ih članovima zincin obitelji metalopeptidaza, koje karakterizira sadržaj kationa cinka u aktivnom mjestu.

Članovi superobitelji metalopeptidaza su enzimi koji su uključeni u različite regulatorne procese kao što su razvoj embrija i formiranje kostiju, reprodukcijски razvoj te pojava artritisa i raka.²⁶ Detaljnijim istraživanjem članova superobitelji utvrđeno je kako postoje jedinstveni aminokiselinski sljedovi u pojedinim enzimima, što je rezultiralo njihovom podjelom u nekoliko različitih obitelji na temelju specifičnosti aminokiselinskog slijeda i strukture. Enzimi koji pripadaju zincin obitelji metalopeptidaza jedinstveni su po kratkom aminokiselinskom slijedu, skraćeno HEXXH, koji označava aminokiseline koje koordiniraju kation cinka u aktivnom mjestu. Analizom je potvrđeno kako je kation cinka koordiniran s tri histidina (oznaka H) i glutamatom (oznaka E) koji zajedno sudjeluju u katalizi. Ostale dvije

aminokiseline (oznaka X) u aktivnom mjestu nisu specifične, te mogu predstavljati bilo koju aminokiselinu.

Iako detaljan mehanizam katalize nije u potpunosti razjašnjen, pokazano je *in vitro* eksperimentima kako DNA-ovisne metaloproteaze proteolitički cijepaju proteine kovalentno vezane na DNA.^{2,13,14,17} Nedavno je došlo do novih saznanja na području strukturne analize domene SprT i mogućeg mehanizma proteolize tako što je riješena kristalna struktura domene SprT humane proteaze SPRTN.² Utvrđeno je kako se humana domena SprT sastoji od dvije poddomene (slika 2), metaloproteazne (engl. Metalloprotease sub-domain, MPD) i cink vezujuće poddomene (engl. Zinc-binding sub-domain, ZBD). Na N-terminalnom kraju nalazi se MPB koja sadrži aktivno mjesto s HEXXH motivom i ionom cinka. Ion cinka koordiniran je s bočnim ograncima aminokiselina H111, E112, H115 i H130. Na C-terminalnom kraju domene SprT nalazi se poddomena ZBD koja također sadrži kation cinka koordiniran s C169, C173, H201 i C205. Iako svaka od poddomena čini zasebnu cjelinu, međusobno su povezane izrazito jakim hidrofobnim interakcijama koje su bitne za stabilnost MBD poddomene.²



Slika 2. Prikaz domene SprT humane proteaze SPRTN s označenim poddomenama: MPD (plavo) i ZBD (narančasto) s ionima cinka i vezujućim fragmentom jednolančane molekule DNA (preuzeto i prilagođeno prema referenci 2).

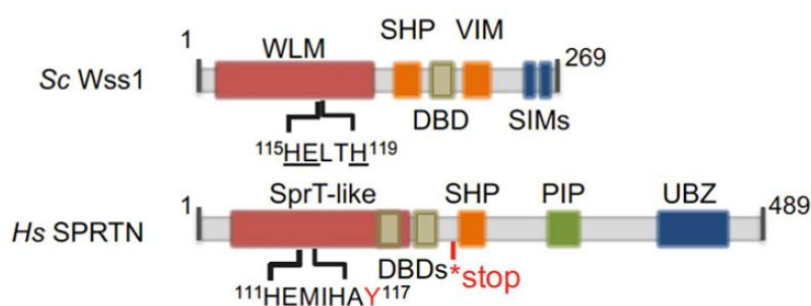
Važnost postojeće poddomene ZBD je u tome što zajedno s poddomenom MBD formira specifično-selektivan ulaz koji je moguć samo za proteinske supstrate s neuređenim regijama. Naime, veličina aktivnog mjesta ne dozvoljava ulaz dijelova proteina koji imaju uređenu sekundarnu strukturu, poput α -zavojnica.² Iako nema specifičnosti u sekvencama koje cijepa, nađeno je kako proteaza SPRTN preferira cijepanje neuređenih regija proteina s bočnim ograncima lizina, arginina i serina.⁵ Nadalje, vezanje DNA odvija se pomoću pozitivno nabijene površine poddomene ZBD i njenog dubokog utora koji sadrži specifične aromatske aminokiseline koje bolje stabiliziraju jednolančane od dvolančanih fragmenata DNA.² Pretpostavlja se da vezanjem DNA dolazi do konformacijske promjene ZBD na način da zatvara aktivno mjesto u MBD i štiti reakciju do njenog završetka.⁶

Iako su domene WLM i SprT funkcionalno homologne, velika različitost u građi odnosi se na izostanak poddomene ZBD na C-terminalnom kraju domene WLM. Rezultat takve građe pretpostavlja kako je aktivno mjesto u proteazi Wss1 izloženo okolini.⁶

Nadalje, metaloproteaze Wss1 i SPRTN dijele određene sličnosti i u organizaciji ostalih domena i motiva u proteinu (slika 3) bitnih za signalizaciju, vezanje DNA i njihovu regulaciju. Obje metaloproteaze sadrže motiv SHP (engl. *suppressor of high copy PPI*) ili drugim imenom VIM (engl. *VCP-interacting motif*) koji omogućuje interakciju s Cdc48 ili p97 u kvascu i AAA+ ATPazom p97 ili VCP (engl. *vasolin-containing protein*) u kralježnjaka.¹ Kod oba enzima mogu se naći motivi DBD (engl. *DNA binding domains*) s visokim udjelom aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ograncima koje omogućuju vezanje DNA. Motiv SIM (engl. *SUMO-interacting motif*) u kvascu i UBZ (engl. *ubiquitin-binding zinc finger*) u SPRTN-u odgovoran je za vezanje SUMO (engl. *small ubiquitin-like modifier*) proteina, odnosno proteina ubikvitina. Motiv PIP (engl. *PCNA-interacting protein*) karakterističan je samo za proteazu SPRTN na koju se vežu PCNA proteini (engl. *proliferating cell nuclear antigen*).⁹ PCNA proteini nalaze se u jezgri stanice i sudjeluju u procesu replikacije i popravka DNA te rekombinaciji kromosoma. Aktivni su tijekom S faze staničnog ciklusa, kao i proteaza SPRTN, te njihovim vezanje za motiv PIP omogućuje se proteazi da putuje usklađeno s replikacijom DNA tijekom koje uklanja moguće kovalentno vezane proteine.⁵ Dio navedenih motiva ima veliku važnost za aktivnost proteaza jer se vezanjem proteina na motive regulira aktivnost proteaza.²⁷

Proteaze Wss1 i SPRTN prisutne su tijekom S i G2 faza staničnog ciklusa nakon čega dolazi do njihove razgradnje tijekom G1 faze.^{5,28} Prisutnost u navedenim fazama staničnog

ciklusa implicira sudjelovanje u procesu udvostručavanja genetskog materijala tako da prate proces replikacije i štite replikacijske rašlje tijekom sinteze novog lanca od zastoja i mogućih kolapsa koji za sobom ostavljaju DPC na mjestu oštećenja. Topoizomeraze koje sudjeluju u procesu replikacije su jedni od uzročnika DPC-a, te predstavljaju DPC supstrate navedenih proteaza.²² S obzirom da su podvrgnute razgradnji tijekom G1 faze, smatralo se da mora postojati barem još jedna proteaza potrebna za popravak DPC-a koja bi bila aktivna u ostalim fazama staničnog ciklusa ili kod stanica koje nisu u fazi diobe.²²



Slika 3. Domene/motivi proteaza *Sc Wss1* i *Hs SPRTN* ključni za interakciju s drugim proteinima označeni različitim bojama: proteazna domena (crveno), domena za vezanje Cdc48/p97 (narančasto), interakcija s PCNA (zeleno), vezanje DNA (oker), vezanje SUMO proteina ili ubikvitina (plavo) (preuzeto i prilagođeno prema referenci 9).

2.4.2. ACRC ili GCNA

Saznanja o obitelji ACRC (engl. *Acidic repeat-containing protein*) proteina temelje se na rezultatima filogenetskih analiza koje starost proteina procjenjuju na oko 600 milijuna godina.⁸ Očuvanje proteina kroz čitavo vrijeme bilo je od velike važnosti radi njegove funkcije u reproduktivnom procesu te se pretpostavlja da su proteini nastali u najranijim eukariotima prilikom čega im je primarna funkcija bila sačuvanje genetičke informacije. Ekspresija proteina ACRC odvija se prije ili tijekom mejoze u jednostaničnim eukariotima, te u matičnim i spolnim stanicama višestaničnih životinja.⁸ Novijim istraživanjima utvrđeno je kako se proteini obitelji ACRC eksprimiraju u jednostaničnim organizmima, biljkama i svim eukariotima, uključujući i sisavce.⁸ Specifičnost u građi proteina ACRC je postojanje unutarnjeg neuređenog slijeda (engl. *intrinsically disordered region, IDR*)^{8,29} koji nema jasno

definiranu trodimenzijsku strukturu, te je iz tog razloga dugi niz godina bio nedovoljno istražen.⁸

Nedavno je istraživanjem unakrsnih veza DNA-protein zapažen ACRC kao jedan od mogućnih proteina s proteolitičkom aktivnosti.²² Imajući na umu evolucijski značaj ACRC-a, filogenetskim je analizama utvrđeno kako protein ACRC sadrži domenu SprT koja je homologna domeni proteaze SPRTN.^{8,13} Detaljnijim istraživanjem utvrđeno je kako se domena SprT nalazi na C-terminalnom kraju proteina, za razliku od proteaze SPRTN kod koje je domena smještena na N-terminalnom kraju (slike 3 i 4). Protein ACRC sadrži aktivno mjesto s očuvanim HEXXH motivom što ga čini članom zincin obitelji metalopeptidaza. S obzirom na očuvanosti motiva, pretpostavlja se da aktivno mjesto proteina ACRC također sadrži kation cinka koji je koordiniran s tri histidina i katalitički aktivnim glutamatom.¹³

Nadalje, potvrđeno je kako protein ACRC sudjeluje u popravku DPC-ova koje uzrokuju topoizomerase odgovorne za kondenzaciju kromosoma i njegovo razdvajanje na dvije sestrinske kromatide tijekom M faze staničnog ciklusa kod kvasca *S. pombe*, embrijskih stanica miša, oblića *C. elegans* i vinske mušice *Drosophila*.^{22,29,30} Proteaznom aktivnosti Wss1 i SPRTN-a tijekom S i G2 faza, i novo otkrivene proteaze tijekom M faze staničnog ciklusa, postiže se očuvanje integriteta molekule DNA i pohranjene genetičke informacije tijekom svih faza staničnog ciklusa.

Prema dostupnim strukturnim predikcijama, ACRC sadrži oko 79 % neuređenog slijeda što uvelike umanjuje mogućnost kristalizacije čitavog proteina u svrhu određivanja njegove trodimenzijske strukture. Dio neuređenog aminokiselinskog slijeda čini motiv SIM (slika 4) koji omogućuje interakciju sa SUMO proteinom, koji ima regulatornu ulogu u stabilnosti molekule DNA i aktivaciji odgovora na njena oštećenja. Vezanjem SUMO proteina na motiv SIM protein ACRC dolazi do mjesta oštećenja i vjerojatno popravljiva nastale DPC-ove.³⁰



Slika 4. Domene/motivi proteaze *Hs* ACRC za interakciju s drugim proteinima označeni različitim bojama: proteazna domena (crveno) i vezanje SUMO proteina (plavo) (preuzeto i prilagođeno prema referenci 9).

S obzirom da je protein ACRC tek nedavno otkriven kao potencijalna proteaza kojom se popravljaju oštećenja DPC-a izvan S faze staničnog ciklusa, malo je toga poznato. Način regulacije proteina, mehanizam njegova djelovanja i način proteolitičkog cijepanja još je uvijek u potpunosti nepoznat.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinil]etansulfonska kiselina (HEPES) (*Carl Roth*), 2-(4-morfolinil)etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris) (*Sigma*), 2-merkaptoetanol (*Sigma*), agar (*Carl Roth*), agarozna (*Carl Roth*), akrilamid/bisakrilamid (*Carl Roth*), ampicilin (*Sigma*), amonijev persulfat (APS) (*Carl Roth*), borna kiselina (*Kemika*), cinkov sulfat (*Sigma*), dinatrijev hidrogenfosfat (*Sigma*), ditiotreitol (DTT) (*Carl Roth*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), etanol (*T.T.T.*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Carl Roth*), glicerol (*Kemika*), glicin (*Sigma*), gvanidinijski hidroklorid (*Carl Roth*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Ambion*), kanamicin (*Sigma*), kloramfenikol (*Carl Roth*), klorovodična kiselina (*Kemika*), L-Arginin (*Sigma*), LB Broth (*Becton, Dickinson and Company*), magnezijev klorid (*Sigma*), metanol (*Kemika*), mlijeko u prahu (*Carl Roth*), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (*Carl Roth*), natrijev dodecil sulfat (SDS) (*Carl Roth*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*Carl Roth*), *N,N,N',N'*-tetrametil-1,2-etandiamin (TEMED) (*Thermo Fisher Scientific*), octena kiselina (*J. T. Baker*), urea (*Sigma*).

3.1.2. Boje

6 \times Gel Loading Dye Purple (*New England Bio Labs*), Bromfenol plavo (*Sigma*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Fluka Analytical*), Sybr Green (*Invitrogen*), Sypro Ruby Protein Gel Stain (*Invitrogen*).

3.1.3. Proteinski i DNA markeri

Gene Ruler 1kb DNA Ladder (*Sigma*), Page Ruler Unstained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*), Precision Plus Protein Dual Color Standards (*Bio-Rad*).

3.1.4. Nukleinske kiseline i oligonukleotidi

Oligonukleotidi korišteni kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze koji su dizajnirani i naručeni od komercijalnog dobavljača (*Macrogen*), razne strukture DNA molekula označene s fluorescentnom bojom Alexa 488 na 5'-kraju korištene kao probe u reakciji vezanja s proteinima (*Integrated DNA Tehnologies*).

3.1.5. Enzimi

Dpn I (*Thermo Fisher Scientific*), Master Mix 2× Phusion Flash (*Thermo Fisher Scientific*), HRV 3C proteaza (*pripravljeno u laboratoriju*), T4 DNA ligaza (*Thermo Fisher Scientific*), T4 polinukleotidna kinaza (PNK) (*Thermo Fisher Scientific*).

3.1.6. Kromatografska punila, kolone i ostalo

Centrikoni *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (*Millipore*), epice *Micro Tube* (*Sarstedt*), kromatografske kolone (*Superdex 200 Increase 10/300 GL*, *HiTrap Q HP 1 mL* i *PD-10* (*Cytiva*), nativni poliakrilamidni gelovi 4 - 15 % *Mini-Protean TGX* (*Bio-Rad*), *Protino Ni-NTA* agarozna (*Macherey-Nagel*), PVDF membrana (*Millipore*).

3.1.7. Kompleti za pročišćavanje

Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (*New England Bio Labs*) za pročišćavanje produkata dobivenih lančanom reakcijom polimeraze, *NucleoSpin Plasmid (NoLid)* (*Macherey-Nagel*) za pročišćavanje plazmidne DNA.

3.1.8. Instrumenti

Analitička vaga *PM400* (*Mettler Toledo*) i jednostavna vaga *EMB* (*Kern*), aparatura za elektroforetsku analizu dobivenih produkata lančane reakcije polimeraze *Horizon 58* (*Biometra*), izvor napajanja *Standard Power Pack P25* (*Biometra*), aparatura za SDS-PAGE *Mini-Protean Tetra Cell* (*Bio-Rad*), izvor napajanja *PowerPac* (*Bio-Rad*), dodatak za izvođenje Western blotting *Mini Trans-Blot* (*Bio-Rad*), centrifuga *Minispin* (*Eppendorf*), centrifuga *Sorvall RC-5B* (*Sorvall*), elektroporacijski susutav *Gene Pulser Xcell* (*Bio-Rad*), fotometar *OD600 DiluPhotometer* (*AlphaMetrix*), homogenizator za razbijanje stanica *Emulsiflex C3* (*Avestin*), magnetska miješalica s pločom za grijanje *MS-H280-Pro* (*Toption*),

mikrovolumni spektrofotometar *BioSpec-nano* (Shimadzu), *Duo* (BioDrop) i *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), pH metar *pH 526 MultiCal* (WTW), razne vrste pipeta *Pipetman* (Gilson), termoblok *T Gradient* (Biometra) za lančanu reakciju polimeraze, tresilica s termoblokom *Thermomixer* (Eppendorf), uređaj za pročišćavanje proteina pomoću kromatografskih metoda *AKTA pure* (Cytiva), uređaj za slikanje i analizu gelova *ChemiDoc XRS+ System* (Bio-Rad).

3.1.9. Plazmidni vektor i sojevi bakterija *Escherichia coli*

Plazmid pETDuet-1 (Novagen) pripada obitelji pET vektora i sadržava gen za ampicilinsku rezistenciju *Amp^R* te je pod kontrolom T7 promotora.³¹ U ovom je radu korišten vektor koji je prethodno rekombiniran tako da na N'-kraju sadrži heksahistidinski privjesak ((His)₆) i nukleotidnu sekvencu za SUMO protein koji potiče bolje smatanje proteina, pročišćavanje i povećava topljivost proteina. Nadalje, iza heksahistidinskog privjeska i slijeda za SUMO protein nalazi se nukleotidna sekvenca koja odgovara aminokiselinskom slijedu kojeg prepoznaje HRV 3C proteaza (Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, cijepa iza Gln).

BL21 CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent Technologies) je soj bakterije *E. coli*. Stanice su dizajnirane kako bi pojačale ekspresiju proteina s rijetkim kodonima.³² *RIL* stanice sadrže gen za rezistenciju na kloramfenikol *Cam^R* i gen za T7-RNA-polimerazu koji je pod kontrolom *lacUV5* promotora što olakšava ekspresiju proteina induciranu IPTG-om.

Rosetta (DE3) (Novagen) je derivat soja *BL21 (DE3)* bakterije *E. coli* koje se koriste za pojačanu ekspresiju eukariotskih proteina s kodonima koji se rijetko koriste u *E. coli*. Takav soj kodira molekule tRNA s rijetkim kodonima kao što su: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC i GGA te na taj način omogućuje univerzalni prijevod koji je inače ograničen sadržajem kodona *E. coli*. *Rosetta* stanice sadrže gen za rezistenciju na kloramfenikol *Cam^R* i gen za T7-RNA-polimerazu koji je pod kontrolom *lacUV5* promotora što olakšava ekspresiju proteina induciranu IPTG-om.³³

Rosetta 2 (DE3) (Novagen) je derivat soja *BL21 (DE3)* bakterije *E. coli* i sadrži gen za T7-RNA-polimerazu koji je pod kontrolom promotora *lacUV5*. *Rosetta 2* stanice namijenjene su za pojačanu ekspresiju eukariotskih proteina s kodonima koji se rijetko koriste u *E. coli* kodirajući molekule tRNA s rijetkim kodonima kao što su: AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC i CGG. Uz navedeno, sadrže gen za rezistenciju na kloramfenikol *Cam^R*.³⁴

XL10-Gold (Agilent Technologies) su soj *E. coli* stanica dizajniran za umnažanje plazmida velikih veličina, uključujući ekspresiju vektora i genomske DNA. Posebnost im je velika učinkovitost procesa transformacije karakterizirana bržim rastom i povećanim volumenom kolonija.³⁵

3.1.10. Puferi korišteni tijekom eksperimenata s nukleinskim kiselinama, probama DNA molekula i proteinima

Tablica 1. Sastav TAE pufera (50×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| Tris (pH = 8,5) | 242 g/L |
| Octena kiselina | 57,1 mL/L |
| EDTA | 37,2 g/L |

Tablica 2. Sastav pufera za SDS-PAGE (10×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| Tris (pH = 8,3) | 30 g/L |
| Glicin | 144 g/L |
| SDS | 10 g/L |

Tablica 3. Sastav TBE pufera (10×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| Tris | 107,8 g/L |
| Borna kiselina | 55 g/L |
| EDTA (pH = 8,0) | 5,8 g/L |

Tablica 4. Sastav uobičajenih pufera A, B i C korištenih za pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA smoli.

| Supstance/Koncentracija | Pufer A | Pufer B | Pufer C |
|--|------------|------------|------------|
| NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ (pH = 8,0) | 50 mmol/L | 50 mmol/L | 50 mmol/L |
| NaCl | 500 mmol/L | 500 mmol/L | 500 mmol/L |
| Imidazol (pH = 8,0) | 20 mmol/L | 40 mmol/L | 350 mmol/L |
| MgCl ₂ | 1 mmol/L | 1 mmol/L | / |
| Glicerol | 10 % (v/v) | 10 % (v/v) | 10 % (v/v) |
| 2-merkptoetanol | 200 µL/L | 200 µL/L | 200 µL/L |

Tablica 5. Sastav pufera A, B i C s HEPES-om.

| Supstance/Koncentracija | | Pufer A | | Pufer B | | Pufer C | |
|-------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| HEPES (pH = 7,5) | HEPES (pH = 7,0) | 50 mmol/L | 25 mmol/L | 50 mmol/L | 25 mmol/L | 50 mmol/L | 25 mmol/L |
| NaCl | | 500 mmol/L | | 500 mmol/L | | 500 mmol/L | |
| Imidazol (pH = 8,0) | | 20 mmol/L | | 40 mmol/L | | 400 mmol/L | |
| MgCl ₂ | | 1 mmol/L | / | 1 mmol/L | / | / | |
| Glicerol | | 10 % (v/v) | | 10 % (v/v) | | 10 % (v/v) | |
| 2-merkptoetanol | | 200 µL/L | | 200 µL/L | | 200 µL/L | |

Tablica 6. Sastav pufera za dijalizu.

| Supstance/Koncentracija | | Pufer za dijalizu 1 | | Pufer za dijalizu 2 | |
|-------------------------|-----|---------------------|---|---------------------|----------|
| HEPES (pH = 7,5) | | 15 mmol/L | | 15 mmol/L | |
| NaCl | | 200 mmol/L | | 250 mmol/L | |
| Glicerol | | / | | 10 % (v/v) | |
| 2-merkptoetanol | DTT | 200 µL/L | / | / | 1 mmol/L |

Tablica 7. Sastav pufera za kromatografiju ionske izmjene.

| Supstance/Koncentracija | Pufer za resuspenziju uzorka | Pufer A | Pufer B |
|-------------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| MES (pH = 6,5) | 50 mmol/L | 20 mmol/L | 20 mmol/L |
| NaCl | 20 mmol/L | / | 1 mol/L |
| DTT | 1 mmol/L | 1 mmol/L | 1 mmol/L |
| Glicerol | 10 % (v/v) | / | / |

Tablica 8. Sastav pufera za gel-filtraciju.

| Supstance | Koncentracija |
|------------------|---------------|
| HEPES (pH = 7,5) | 15 mmol/L |
| NaCl | 250 mmol/L |
| DTT | 1 mmol/L |
| Glicerol | 5 % (v/v) |

Tablica 9. Sastav pufera za izolaciju proteina u denaturirajućim uvjetima.

| Supstance/Koncentracija | Pufer D-a1 | Pufer D-a2 | Pufer D-b | Pufer D-c |
|--|------------|------------|------------|------------|
| NaH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄ (pH = 8,0) | 50 mmol/L | 50 mmol/L | 50 mmol/L | 50 mmol/L |
| NaCl | 150 mmol/L | 150 mmol/L | 150 mmol/L | 150 mmol/L |
| Imidazol (pH = 8,0) | 20 mmol/L | 20 mmol/L | 40 mmol/L | 350 mmol/L |
| Gvanidinij hidroklorid | 6 mol/L | 3 mol/L | 3 mol/L | 3 mol/L |
| PMSF | 0,1 mmol/L | 0,1 mmol/L | / | / |
| 2-merkaptetanol | 200 µL/L | 200 µL/L | 200 µL/L | 200 µL/L |

Tablica 10. Sastav pufera za renaturaciju proteina.

| Supstance/Koncentracija | Pufer R-1 | Pufer R-2 |
|-------------------------|------------|------------|
| Tris HCl (pH = 8,5) | 20 mmol/L | 20 mmol/L |
| NaCl | 150 mmol/L | 150 mmol/L |
| Arginin | 0,5 mol/L | / |
| ZnSO ₄ | 0,1 µmol/L | 0,1 µmol/L |
| 2-merkaptetanol | 200 µL/L | 200 µL/L |

Tablica 11. Sastav Klenow-ovog pufera (10×).

| Supstance | Koncentracija |
|---------------------|---------------|
| Tris HCl (pH = 7,5) | 60,6 g/L |
| MgCl ₂ | 4,8 g/L |

Tablica 12. Sastav pufera Tris/Glicin (10×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| Tris (pH = 8,3) | 30 g/L |
| Glicin | 144 g/L |

Tablica 13. Sastav pufera za prijenos korištenog u metodi Western blotting (1×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| 10× Tris/Glicin | 100 mL/L |
| Metanol | 200 mL/L |
| 20 % SDS | 5 mL/L |

Tablica 14. Sastav pufera TBS (10×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------------|---------------|
| Tris (pH = 7,6) | 24 g/L |
| NaCl | 88 g/L |

Tablica 15. Sastav pufera TBST (1×).

| Supstance | Koncentracija |
|-----------|---------------|
| 10× TBS | 100 mL/L |
| Tween 20 | 1 mL/L |

3.2. Metode izrade predikcija trodimenzijskih struktura

3.2.1. Korišteni programi za predikciju trodimenzijskih struktura

Za predikciju trodimenzijske strukture proteina ACRC korišteni su programi *Modeller*³⁶ i *Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine)*³⁷. Oba programa temelje svoje izračune na sličnom principu koji kreće unosom aminokiselinske sekvence proteina u program koji potom uspoređuje zadanu sekvencu s 10 milijuna identificiranih i pohranjenih sekvenci u bazi. Sličnosti između sekvenci uvjetuju određeni strukturni motiv ili struktura koja se analizira programom *PSI-Blast*. Program uspoređuje sljedove s istim ili sličnim aminokiselinama, pri čemu su moguće evolucijske mutacije u tipu aminokiselina što usporedbom daje Hidden-Markov model, koji na temelju mutacija pojedinih aminokiselina stvara evolucijski otisak prsta (engl. *evolutionary fingerprint*) pri čemu se može dobiti informacija o evolucijskoj prošlosti proteina ili dijela sekvence u proteinu. Takva vrsta metoda za predikciju izrazito je moćna te je moguće odrediti strukturu aminokiselinskih sekvenci pri postotku sličnosti sa podacima iz baze manjoj od 15 %.³⁷

3.3. Metode kloniranja

3.3.1. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda za umnažanje specifičnih sekvenca DNA *in vitro*. Kada je željena sekvenca okružena poznatim regijama moguće je reakcijom PCR-a u tri koraka uzastopnim ponavljanjem u 30-35 ciklusa dobiti do milijardu kopija takvih sekvenci.

Jedan ciklus sastoji se od tri koraka, a to su: razdvajanje lanaca, hibridizacija ili sljepljivanje početnica i korak sinteze DNA ili elongacije. Tri koraka se mogu ponavljati promjenom temperature reakcijske smjese, koja se sastoji od: kalupa ili ciljane sekvence DNA, plazmida, para početnica koje hibridiziraju s okružujućim sljedovima ciljane sekvence, smjese nasumičnih nukleotida (sva četiri deoksinukleozid-trifosfata), pufera koji sadrži katione magnezija¹⁰ i Phusion DNA-polimeraze.

3.3.2. Dizajn početnica

Lančana reakcija polimeraze izrazito je specifična reakcija čiji parametri uvelike ovise o tipu PCR reakcije koja se provodi, specifičnosti kalupa ili ciljane sekvence koja se amplificira, početnicama koje se koriste i konačnim produktima ili informacijama koje PCR reakcijom želimo dobiti. Prilikom dizajna početnica bitno je obratiti pozornost da: duljina početnice bude između 18 do 30 nukleotida, temperatura mekšanja (engl. *primer melting temperature*, T_m) bude između 55 i 72 °C, razlika u temperaturi mekšanja između nizvodne i uzvodne početnice bude manja od ili jednaka 5 °C, postotak GC sadržaja bude oko 40-60 %, stabilnost na 3'-kraju bude osigurana sa sadržajem gvanina ili citozina, te da nema autokomplementarnosti i komplementarnosti s drugom početnicom (manje od 4 baze u slijedu), bez sekundarnih struktura i da udaljenost između dviju početnica u ciljnom slijedu bude manja od 2000 nukleotida. Također, bitno je da temperatura sljepljivanja početnica bude 5 °C manja od temperature mekšanja one početnice u paru koja ima manju temperaturu mekšanja. Međutim, bolje je da temperatura sljepljivanja početnica bude više vrijednosti nego niže, iz razloga što se komplementarnost baza postiže višim vrijednostima temperature sljepljivanja.

Tablica 16. Prikaz nukleotidnih sljedova uzvodnih (engl. *forward*, *F*) i nizvodnih (engl. *reverse*, *R*) početnica korištenih u inverznoj lančanoj reakciji polimeraze.

| Duljina konstrukata (u broju aminokiselina) | Nukleotidni slijed početnica | Temperatura mekšanja ³⁸ |
|--|--|------------------------------------|
| od 519 do 691 | <i>F</i> 5'-GATGAATTGGTTCAGAGAATCTAC-3' <i>R</i> 5'-CATGGATCCGGGCCCC-3' | 61 °C |
| od 497 do 691 | <i>F</i> 5'-GGATGTTTCTTGCAAGACC-3' <i>R</i> 5'-CATGGATCCGGGCCCC-3' | 62 °C |
| od 519 do 683 | <i>F</i> 5'-TGACTCGAGTCTGGTAAAG-3' <i>R</i> 5'-ATCTTTCTGAGTTAATGGCAC-3' | 61 °C |
| od 519 do 624 | <i>F</i> 5'-TGACTCGAGTCTGGTAAAG-3' <i>R</i> 5'-GTGTATCCTGTTGGATTCC-3' | 61 °C |
| od 497 do 681 | <i>F</i> 5'-TGACTCGAGTCTGGTAAAG-3' <i>R</i> 5'-CTGAGTTAATGGCACCATG-3' | 61 °C |
| od 497 do 624 | <i>F</i> 5'-TGACTCGAGTCTGGTAAAG-3' <i>R</i> 5'-GTGTATCCTGTTGGATTCC-3' | 61 °C |

| Duljina konstrukata (u broju aminokiselina) | Nukleotidni slijed početnica | Temperatura mekšanja ³⁸ |
|--|---|---------------------------------------|
| od 522 do 691 | F 5'- GTTCAGAGAATCTACGACCTG -3' R 5'-CATGGATCCGGGCCCC-3' | 60 °C |
| od 522 do 677 | F 5'-TGACTCGAGTCTGGTAAAG-3' R 5'- CACCATGACCAGAGACC -3' | 58 °C |

3.3.3. Inverzna lančana reakcija polimeraze

Za kloniranje željenih konstrukata *Hs ACRC* u ovom diplomskom radu korištena je metoda inverznog PCR-a (engl. *inverse PCR*, iPCR).³⁹

Reakcijska smjesa za iPCR:

- 5 µL 2× Phusion Flash Master Mix
- 3,8 µL sterilne vode
- 0,5 µL uzvodne početnice (10 µmol/L)
- 0,5 µL nizvodne početnice (10 µmol/L)
- 0,2 µL plazmida (50 ng/µL)

Plazmid koji je korišten kao kalup u reakciji iPCR-a je bio pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC*. PCR reakcija se provodi u termobloku *T Gradient (Biometra)* u trajanju od 30 ciklusa. Korak sljepljivanja početnica odvijao se na temperaturi od 58 do 62 °C ovisno o temperaturi mekšanja para početnica koje su korištene tijekom amplifikacije određenog konstrukta.

Tablica 17. Prikaz programa za postavu inverzne lančane reakcije polimeraze.

| Korak | <i>T</i> / °C | Trajanje / sekunde |
|-------------------------|---------------|--------------------|
| Početna denaturacija | 95 | 30 |
| Denaturacija | 95 | 15 |
| Sljepljivanje početnica | 58-62 | 15 |
| Elongacija | 72 | 240 (15-30 s/kb) |
| Završna elongacija | 75 | 300 |
| Hlađenje | 12 | ∞ |

Nakon završene reakcije rezultat se provjerava agaroznom gel-elektroforezom na 0,8 % agaroznom gelu (0,4 g agaroze u 50 mL 1×TAE puferu (tablica 1)) pri čemu se na gel nanosi i marker kao referentan signal za mogućnost određivanja veličine umnoženih fragmenata. Vizualizacija produkata na agaroznom gelu odvijala se pomoću *ChemiDoc XRS+ System* (Bio-Rad). Dobiveni PCR produkti su zatim pročišćeni pomoću kompleta *Monarch PCR & DNA Cleanup Kit* (New England Bio Labs).

3.3.4. Fosforilacija, ligacija i dodatak restrikcijskog enzima *Dpn I*

Pročišćeni PCR produkti su zatim fosforilirani na 5'-kraju pomoću PNK. PNK ili T4 polinukleotidna kinaza katalizira prijenos i izmjenu γ -fosfatnih skupina s ATP na 5'-hidroksilni kraj polinukleotida (jednolančane ili dvolančane molekule DNA ili RNA) i nukleozidnih 3'-monofosfata.

Reakcijska smjesa sadrži:

- 10 μ L pročišćenog produkta iPCR
- 6,5 μ L sterilne vode
- 2 μ L 10× pufera za T4 DNA ligazu
- 0,5 μ L enzima PNK

Smjesa je zatim inkubirana 30 minuta na 37 °C.

Nakon inkubacije, slijedi ligacija pomoću T4 DNA ligaze koja se u volumenu od 0,5 μ L dodaje u reakcijsku smjesu (1 sat na sobnoj temperaturi). T4 DNA ligaza je enzim koji katalizira stvaranje fosfodieterske okosnice između 5'-fosfatnog i 3'-hidroksilnog kraja u dvolančanoj molekuli DNA ili RNA te može spojiti i tupe krajeve i popraviti jednolančane lomove u strukturi dvolančane DNA. Potom se dodaje 0,5 μ L restrikcijskog enzima *Dpn I* (preko noći na 37 °C). *Dpn I* je restrikcijski enzim koji prepoznaje mjesto cijepanja u metiliranoj DNA, koji je u ovoj reakciji bio početni roditeljski plazmid, dok novo sintetizirani produkti PCR nisu metilirani. Kao negativna kontrola pripremljena je ista reakcijska smjesa, ali bez dodatka PNK i T4 DNA ligaze.

3.4. Metode rada s bakterijama

3.4.1. Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterija

Za rast i uzgoj bakterija potrebne su tekuće i krute hranjive podloge. Za pripremu tekućih hranjivih podloga potrebno je otopiti 25 g/L LB (Luria-Bertani) medija, odnosno LB Broth supstance u destiliranoj vodi. Tako pripremljeni LB medij potrebno je sterilizirati u autoklavu pri 120 °C u trajanju od 20 minuta nakon čega se može skladištiti u zatvorim bocama ili tikvama na sobnoj temperaturi.

Prilikom pripreme krute hranjive podloge potrebno je koristiti LB medij, agar te kasnije i razne antibiotike ovisno o bakterijama koje koristimo i sadržajnim genima za rezistenciju. Najprije se izvaže 15 g/L agara i 25 g/L LB Broth supstance u destiliranoj vodi i otopi. Potom se otopina sterilizira u autoklavu pri 120 °C u trajanju od 20 minuta i ostavi da se malo ohladi na sobnoj temperaturi uz postepeno miješanje kako ne bi došlo do mjestimičnog zgrudnjavanja otopine. Kad se otopina ohladi do temperature da se može držati u rukama (temperatura niža od 40 °C) dodaje se željeni antibiotik u omjeru 1:1000 u odnosu na hranjivi medij. Nakon toga otopina se još jednom dobro promiješa i potom u brzim koracima počinje izlivanje krutih hranjivih podloga tako da se sa sadržajem dobro prekrije dno posudice, poklopi i suši. Tako pripremljene krute hranjive podloge čuvaju se u plastičnoj vrećici u hladnjaku na 4 °C.

3.4.2. Transformacija bakterija i postavljanje noćnih prekultura/kultura

Kompetentne stanice pohranjene su u malim volumenima u hladnjaku na -80 °C, a prije transformacije se moraju u potpunosti otopiti i čuvati u ledu. Alikvotu od 25 µL otopljenih stanica dodaje se 0,5 µL rekombinantnog plazmida, ili u slučaju transformacije iPCR-a 5 µL smjese u 50 µL stanica. Postupak metode transformacije se sastoji od tri koraka: alikvot stanica i plazmida drži se 15 minuta u ledu, zatim stavlja 45 sekundi na 42 °C te ponovno 2 minute u ledu. Za transformaciju stanica metodom elektroporacije potreban je elektroporator koji kratkim električnim pulsevima visokog napona stvara pore na membrani kroz koje može proći rekombinantni plazmid. Metodom elektroporacije transformirane su *E. coli RIL (DE3)* stanice.

Kako bi se bakterijske stanice oporavile od temperaturnog šoka ili električnih pulseva tijekom transformacije, dodaje im se 500 µL LB medija bez antibiotika i inkubira sat vremena

pri 37 °C na 600 rpm (engl. *revolutions per minute*, RPM). Nakon inkubacije alikvot od 250 µL transformiranih stanica se razmaže po LB ploči s odgovarajućim antibiotikom.

3.4.3. Prekomjerna ekspresija proteina u bakterijama

U 500 mL LB medija u tikvi volumena 2 L dodaju se antibiotici ampicilin (konačne koncentracije 100 µg/mL) i kloramfenikol (konačne koncentracije 34 µg/mL) i 5 mL prethodno pripremljene prekonocne pretkulture. Bakterije su uzgajane oko 2 sata na 37 °C i 180 rpm do vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm između 0,4-0,6 mjerene na fotometru *OD600 DiluPhotometer (AlphaMetrix)* i spektrofotometru *Duo (BioDrop)*. Optička gustoća stanica (engl. *optical density*) ili OD₆₀₀ je vrijednost proporcionalna broju bakterijskih stanica pri valnoj duljini od 600 nm. Nakon što je vrijednost OD₆₀₀ zadovoljena, temperatura se spušta na 18 °C te se nakon 20 minuta dodaje IPTG, induktor prekomjerne ekspresije (konačne koncentracije 0,5 mmol/L). Tako inducirane stanice ostavljaju se prekonocno na 18 °C kako bi prekomjerno eksprimirale željene proteine.

Krivulja rasta bakterija sastoji se od četiri faze, a to su *lag* faza, *log* faza, *stacionarna* faza i faza *smrti*. Početna je *lag* faza u kojoj se stanice još nisu počele intenzivno dijeliti iz razloga što se adaptiraju na medij i uvjete inkubacije. Potom slijedi *log* faza u kojoj se bilježi eksponencijalno povećavanje broja stanica pri konstantnoj brzini diobe stanica. U toj fazi rasta je najveća učinkovitost indukcije IPTG-om, jer su tada uvjeti rasta najoptimalniji uz mnoštvo hranjivog medija i stanice su najzadovoljnije. *Stacionarna* faza slijedi nakon *log* faze, u kojoj iz razloga pomanjkanja nutrijenata i ostalih preduvjeta za diobom stanice prestaje razdoblje intenzivnog dijeljenja pri čemu dolazi do akumulacije toksičnih produkata te je brzina rasta jednaka brzini odumiranja. Konačna faza je faza *smrti* gdje stanice odumiru zbog istrošenosti svih nutrijenata i velike količine toksičnih metaboličkih nusprodukata.

Važnost indukcije s IPTG-om sadržana je u sustavu pET vektora i soju (*DE3*) bakterija *E. coli*. U bakterijskoj stanici postoji uobičajena bakterijska RNA-polimeraza koja prepoznaje sve promotore u stanici te čijim vezanjem na mjesto promotora pokreće translaciju svih potrebnih bakterijskih gena. Bakterijska RNA-polimeraza samim time nije specifična i ne može specifično vršiti translaciju samo željenog gena. Kako bi došlo do prekomjerne ekspresije željenog proteina, postoji sustav regulacije za koji je potrebna izrazito specifična i procesivna T7-RNA-polimeraza čiji se gen nalazi u soju (*DL3*) bakterija *E. coli*, a njeno mjesto vezanja, T7-promotor, dio je pET vektora. Gen za T7-RNA-polimerazu pod kontrolom

je *lac* promotora i *lac* operatora kojeg kontrolira bakterija pa samim time može biti induciran ili reprimiran ovisno o potrebi bakterije. U uvjetima kada nema IPTG-a sintetizira se Lac represor koji vezanjem na *lac* operator osigurava nisku razinu ekspresije proteina jer utišava ekspresiju gena T7-RNA-polimeraze na genomu i gena ugrađenog u pET vektor.

U prisustvu IPTG-a dolazi do disocijacije Lac represora s *lac* operatora s genoma i s gena ugrađenog u pET vektor pri čemu bakterijska RNA-polimeraza započinje transkripciju gena za T7-RNA-polimerazu. Tako eksprimirana T7-RNA-polimeraza specifično prepoznaje T7-promotor u pET vektoru, te započinje transkripciju željenog gena koji se potom translatira u protein.

3.4.4. *Liza bakterijskih stanica pomoću homogenizatora*

Idućeg dana, provodi se centrifugiranje i razbijanje stanica. Bitno je naglasiti kako je u svakom koraku potrebno uzeti uzorak potreban za analizu SDS-PAGE. Stanice se odvajaju od LB medija u kojem su raste centrifugiranjem u centrifugi *Sorvall RC-5B* (10 minuta na 4000 rpm pri 4 °C). Nastali talog stanica se resuspendira u puferu A (tablica 4 i 5), prvotno u manjim volumenima kako bi resuspenzija stanica bila što uspješnija te konačno, volumen resuspendiranih stanica iznosi između 40-150 mL (ovisno o količini uzgojenih bakterijskih stanica). Isti postupak resuspenzije stanica provodi se i u denaturirajućim uvjetima koristeći samo drugi pufer D-a1 (tablica 9). Potom se sadržaj resuspendiranih stanica provlači kroz špricu kako ne bi bilo zaostalih grudica koje bi kasnije smetale prilikom homogeniziranja. Neposredno prije homogenizacije, resuspendiranim stanicama dodaje se inhibitor proteaza, PMSF (koncentracije 0,1 mol/L), u omjeru 1:1000 u odnosu na volumen stanica. Homogenizator je uređaj za razbijanje stanica koji pod visokim tlakom uzrokuje pucanje stanične membrane, a uzorak stanica provlači se dva puta kako bi bili sigurni da su sve stanice razbijene. Prilikom prikupljanja razbijenih stanica bitno je držati sadržaj u ledu. Zatim se sadržaj razbijenih stanica ponovno centrifugira (20 minuta na 11000 rpm pri 4 °C) kako bi se membrane, netopljivi i agregirani proteini koji talože odvojili od sadržaja preostalih topljivih proteina zajedno s proteinima od interesa koji se nalaze u supernatantu.

3.5. Metode rada s proteinima

3.5.1. Pročišćavanje proteina pomoću afinitetne kromatografije na Ni-NTA smoli

Nakon centrifugiranja, supernatant s topljivim proteinima se pomiješa s Ni-NTA smolom koja je prethodno ekvilibrirana u puferu A (ili u puferu D-a1 ako se izolacija proteina provodi u denaturirajućim uvjetima), te ostavlja inkubirati 20 minuta u ledenici uz miješanje.

U Ni-NTA smoli kationi nikla su koordinirani s nitrilotriocetnom kiselinom koja koordinira četiri od šest koordinacijskih veznih mjesta na kationu nikla. Preostala koordinacijska mjesta nikla mogu koordinirati histidinski ostatci što je temelj afinitetne kromatografije jer samo oni proteini sa sadržajem heksahistidinskog privjeska se vežu za smolu te kasnije budu i selektivno pročišćeni nakon eluiranja smole s imidazolom.

Nakon inkubacije slijedi ispiranje Ni-NTA smole s velikom količinom pufera A ili D-a2 (tablica 9) u denaturirajućim uvjetima. Ni-NTA smola se prebacuje u kolonu za kromatografiju, te se ispiru s četiri volumena smole pufera B (tablica 4 i 5) ili pufera D-b (tablica 9) pri denaturirajućim uvjetima. Potom slijedi elucija s pet volumena smole pufera C (tablica 4 i 5) ili pufera D-c (tablica 9) kod denaturirajućih uvjeta.

Nadalje, pročišćavanje na Ni-NTA smoli radilo se i nakon prekonoćne dijalize s HRV 3C proteazom kako bi se pročistio željeni protein od zaostalog fuzijskog proteina kojem nije pocijepan heksahistidinski privjesak. Postupak započinje prebacivanjem sadržaja dijalize iz vrećice u čistu posudicu i dodavanjem određenog volumena 1 mol/L imidazola pH 8,0 do konačne koncentracije otopine od 20 mmol/L. Dodaje se Ni-NTA smola koja je prethodno ekvilibrirana u puferu A te se protein i smola inkubiraju 20 minuta u ledu uz povremeno miješanje. Potom se otopina prebacuje u kolonu za kromatografiju i porezani protein se skuplja kao nevezana frakcija.

Nakon završene afinitetne kromatografije, Ni-NTA smola se ispiru s 2 mL 1 mol/L imidazola pH 8,0, potom tri puta destiliranom vodom i volumenom kolone 20 % etanola u kojem se smola i čuva.

3.5.2. Promjena pufera u kojem se nalaze proteini pomoću PD-10 kolone ili dijalize

Pomoću kolone PD-10 koja djeluje na principu gel-filtracije se može izmijeniti pufer u kojem se protein nalazi. U našem slučaju, potrebno je promijeniti denaturirajući pufer proteina sa puferom koji sadrži arginin kako bi se proteinu vratila nativna struktura. Postupak filtracije

kolonom PD-10 vrlo je jednostavan, a provodi se nanošenjem pufera R-1 (tablica 10) na kolonu te nakon što je pufer u potpunosti izašao iz kolone (ekvilibracija), nanosi se otopina proteina u volumenu od 2,5 mL. Nakon što je otopina prošla kolonom nanosi se 3,5 mL pufera R-1 te se ta frakcija skuplja.

Dijaliza je metoda kojom dolazi do razdvajanja molekula na temelju gradijenta koncentracije i veličine molekula preko polupropusne membrane. Polupropusna membrana je zapravo vrećica s porama određenih veličina koja se stavlja u otopinu te na temelju razlike u koncentraciji unutar vrećice i u otopini, dolazi do kretanja molekula iz područja veće koncentracije u područje niže koncentracije dok se ne postigne ravnoteža. Takvo kretanje moguće je samo za molekule čije su dimenzije manje od veličine pora polupropusne membrane, dok molekule većih dimenzija od pora ostaju unutar membrane. Na taj način mogu se pročistiti molekule od soli i reagensa ili mijenjati pufer u kojem se nalaze molekule unutar vrećice.

U našem slučaju postavlja se dijaliza tako da se koristi vrećica određenih veličina pora u koju se stavlja frakcija sa sadržajem željenog proteina i dodaje se 100 μ L HRV 3C proteaze koja prepoznaje mjesto cijepanja u fuzijskom proteinu i odvaja (His)₆-SUMO privjesak. Tako pripremljena vrećica za dijalizu se uranja u pufer za dijalizu (tablica 6) zajedno s magnetom i stavlja na prekonoćnu dijalizu na magnetskoj miješalici u ledenici na 4 °C.

3.5.3. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat

Metoda elektroforeze na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je najšire korištena elektroforetska tehnika za analizu proteina koja se provodi u denaturirajućim uvjetima. U prisustvu anionskog detergenta dolazi do pucanja gotovo svih nekovalentnih interakcija u nativnom proteinu, te se tako denaturirani proteini gibaju u električnom polju na temelju omjera mase i naboja. Brzina gibanja proteina u električnom polju ovisi i o jakosti električnog polja, naboju i masi, obliku molekule i viskoznosti medija. Razdvajanje elektroforezom provodi se u gelu koji služi kao molekulsko sito i poboljšava razdvajanje. Manje molekule se kroz gel gibaju brže dok molekule većih dimenzija se gibaju sporije. Ovisno o veličini proteina koji se analiziraju ovom tehnikom potrebno je prilagoditi veličinu pora molekulskog sita, tj. gela, kako bi razdvajanje bilo moguće i vidljivo.

U našem slučaju korišteni gelovi sastoje se od dvije vrste gela, gela za sabijanje i gela za razdvajanje, a veličina pora prilagođena je veličini analiziranih proteina pomoću omjera dodanih reagensa akrilamida i metilenbisakrilamida prilikom čije polimerizacije nastaje poliakrilamid. Tako pripremljeni gelovi stavljaju se u zato predviđeni utor aparature za SDS-PAGE *Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)* koja je priključena na izvor napajanja *PowerPac (Bio-Rad)*.

Obično se 10 μL proteinskog uzorka pomiješa s 5 μL pufera za SDS-PAGE uzorke te denaturira grijanjem 5 minuta na 95 °C. Potom se tako obrađeni uzorci i marker za proteine (2 μL) nanose na gel. Elektroforeza se provodi u puferu za SDS-PAGE (tablica 2) pri sobnoj temperaturi, prvotno na 120 V kako bi uzorci ušli u gel, a potom se povisuje na 180 V. Produkti na gelu vizualiziraju se Coomassie bojom, nakon čega se kuhanjem zaostala boja ispire i gelovi se čuvaju u zatvorenoj posudici s destiliranom vodom.

Opisani postupak elektroforeze na poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat ili SDS-PAGE provodio se nakon svakog koraka pročišćavanja proteina.

Tablica 18. Sastav gela za sabijanje i razdvajanje korištenih u analizi SDS-PAGE.

| Supstance | Gel za sabijanje | | Gel za razdvajanje | |
|------------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Postotak gela | 12 % | 17 % | 12 % | 17 % |
| 4× pufera za sabijanje | 2,5 mL | 2,5 mL | / | / |
| 4× pufera za razdvajanje | / | / | 5 mL | 5 mL |
| 50 % glicerol | / | / | 2 mL | 2 mL |
| Sterilna voda | 6,2 mL | 6,2 mL | 5 mL | 1,67 mL |
| 30 % akrilamid/bis-akrilamid | 1,3 mL | 1,3 mL | 8 mL | 11,33 mL |
| APS | 80 μL | 80 μL | 70 μL | 70 μL |
| TEMED | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL |
| Σ | 10 mL | 10 mL | 20 mL | 20 mL |

3.5.4. Kromatografija ionske izmjene

Kromatografija ionske izmjene je metoda kojom se razdvajaju molekule na temelju njihovog neto naboja. Ako u smjesi postoji željena molekula koja sadrži pozitivan ili negativan naboj moguće ju je pročistiti na koloni suprotnog naboja. Punila kolone mogu biti kationska i

anionska, a dobivena su vezanjem određenih funkcionalnih skupina na punilo kolone, pa tako postoji dietilaminoetil-celuloza koja nosi pozitivan naboj i karboksimetil-celuloza koja je negativnog naboja čime se daje zaključiti da postoje dvije vrste izmjena. Ako je molekula koju želimo pročistiti pozitivnog naboja tada se koristi punilo kolone s negativnim nabojem (kationska izmjena), a kada se želi izdvojiti molekula s anionskim nabojem tada se koristi punilo s skupinama pozitivnog naboja (anionska izmjena). Nakon što su ioni vezani na stupac ili punilo kolone, ispiranje se provodi u gradijentu soli, počevši od najmanjeg pa prema većem gradijentu soli.

Takvim tipom kromatografije želio se pročistiti humani protein ACRC sa slijedom ak 497-691 koji je pozitivnog naboja zbog velikog sadržaja aminokiseline lizina u svom slijedu. Kako bi se protein pročistio od ostatka molekula u supernatantu koristila se kolona s negativnim punilom *HiTrap Q HP 1 mL (Cytiva)*. Uzorak proteina eluiran je u gradijentu soli s početnih 5 % soli u puferima A i B (tablica 7).

3.5.5. Gel-filtracija i ukoncentriravanje proteina ultrafiltracijom

Metoda molekuskog isključivanja ili gel-filtracija je metoda kromatografije kojom se razdvajaju molekule na temelju veličine i oblika. Gel-filtracija se provodi kroz kolonu u kojoj se nalazi hidrofilna stacionarna faza, odnosno punilo koje sadrži pore različitih dimenzija. Tijekom prolaska mobilne faze kroz kolonu, molekule čija je veličina veća od veličine pora punila gibaju se brže kroz prostor između čestica, dok manje molekule, koje mogu ući u pore, ulaze u pore i time se gibaju sporije. Što su molekule manje veličine to će se one sporije kretati iz razloga što duže ostaju unutar pora punila. Rezultat takvog tipa razdvajanja je niz frakcija u kojima su sadržane molekule s istim veličinama.

U ovom diplomskom radu metodom gel-filtracije se željelo dodatno pročistiti proteine od mogućih nečistoća i od zaostalih fuzijskih proteina kojima nije pocijepan privjesak. Proteini ACRC WT i ACRC E593A pročišćeni su preko kolone *Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva)* spojene na uređaj *ÄKTA pure (Cytiva)* pomoću pufera za gel-filtraciju (tablica 8). Pročišćavanje se pratilo u programu Unicorn mjerenjem UV zračenja pri valnoj duljini od 280 nm.

Ukoncentriravanje proteina provodilo se kako bi se povećala koncentracija proteina pomoću centrikona *Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore)* veličine pora 50 kDa, a ovisno o količini otopine proteina korišteni su centrikoni manjeg ili većeg volumena.

Ultrafiltracija se odvijala centrifugiranjem u ciklusima od 3 do 5 minuta na 4000 rpm pri 4 °C.

3.5.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina mjerena je pomoću spektrofotometra *Duo (BioDrop)* i *NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)* pri valnoj duljini od 280 nm. Mogućnost mjerenja apsorbancije pri toj valnoj duljini može se zahvaliti bočnim ograncima aromatskih aminokiselina koje pri 280 nm maksimalno apsorbiraju UV zračenje i time omogućuju mjerenje koncentracije proteina. Prije mjerenja apsorbancije potrebno je nulirati spektrofotometar s puferom u kojem se protein nalazi te se potom nanosi 2 µL otopine proteina i mjeri koncentracija. Za potvrdu ispravne vrijednosti mjerenje se može provesti dva puta. Izmjerena vrijednost je apsorbancija, kojom se preko formule

$$A_{280} = c \times b \times \varepsilon,$$

može izračunati koncentracija proteina. Oznaka ε označava molarni ekstincijski koeficijent, čija je vrijednost individualna za svaki protein, dok oznaka b označava duljinu optičkog puta, koja iznosi 1 cm.

3.5.7. Western-hibridizacija

Western-hibridizacija kao metoda analize koristi se za detekciju specifičnih interakcija proteina sa antitijelima, čime se među svim interakcijama specifično detektiraju samo one čija su antitijela specifična za određeni protein. Temelj metode su komplementarnost i hibridizacija, a postupak provođenja metode ukratko se sastoji od: elektroforeze na gelu, prijenosa na čvrstu podlogu, blokiranja nespecifičnih interakcija, pripreme antitijela, hibridizacije, ispiranja i detekcije ciljanog kompleksa proteina i antitijela. U ovom diplomskom radu western-hibridizacijom se željelo ispitati da li su izolacijom proteina zaista dobiveni proteini *Hs ACRC WT* i *D. rerio ACRC ak 378-484*.

Pripremljeni su uzorci proteina *H. sapiens ACRC WT* ($\gamma = 0,9$ mg/mL) u volumenu od 1 µL, 2 µL i 4 µL, *D. rerio ACRC ak 378-484* ($\gamma = 1,84$ mg/mL) u volumenu od 0,5 µL, 1 µL i 2 µL i proteina *Hs ACRC WT* (nepoznate koncentracije) u volumenu od 0,5 µL, 1 µL i 3 µL. Ukupni volumen nanijetih proteina na 12 % SDS-gel iznosio je 8 µL, pri čemu se otopina sastojala od proteina, 4 µL boje za uzorke i preostalog volumena sterilne vode. Uzorci su denaturirani prije nanošenja na gel. Kao pozitivna kontrola za kasniju detekciju nanijete su i

HEK (engl. *human embryonic kidney cells*) stanice, koje nativno ekspimiraju proteine ACRC, u količini od 4 μ L i 4 μ L boje za uzorke, denaturirane 30 minuta na 95 °C. Volumen markera za proteine iznosio je 3 μ L. Elektroforeza se provodila na 180 V u trajanju od jednog sata. Kao membrana korištena je PVDF membrana (*Millipore*), a kao primarna antitijela korištena su antitijela humanog proteina ACRC (*Hs ACRC*). Za blokiranje nespecifičnih interakcija korišteno je mlijeko u prahu koje sadrži proteine kazein čija je uloga zasićenje viška mjesta za vezanje proteina na membrani (5 %-tna otopina u TBST puferu). Za sekundarna antitijela korištena su antitijela miša (engl. *anti-mouse antibody*). Prije detekcije, membrana je isprana s puferima TBST (tablica 15) i TBS (tablica 14) te vodom. Potom se membrana priprema za detekciju tako da se neposredno prije pomiješaju dvije otopine iz seta *Clarity and Clarity Max ECL Western blotting substrates (Bio-Rad)* u omjeru 1:1 i inkubiraju s membranom do 5 minuta. Membrana je spremna za vizualizaciju uređajem *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)*.

3.6. Metode vezanja proteina i proba molekula DNA

3.6.1. Priprema i sparivanje proba molekula DNA

Naručene probe molekula DNA (tablica 19) su otopljene u sterilnoj vodi do koncentracije 100 μ mol/L. Nakon otapanja, slijedi protokol (tablica 20) kojim se odgovarajuće probe molekula DNA međusobno sparuju (engl. *annealing*) kako bi se dobile razne strukture molekula DNA.

Tablica 19. Sekvence DNA koje su korištene za testiranje vezanja proteina ACRC i DNA.

| Oznaka probe | Slijed baza |
|-----------------------------------|---|
| OD1 | ATCGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGC |
| OD2 | GCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTACATGGAGCTGTCTAGAGGATCCGACTATCGAT |
| OD3 | GCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCTTTGCCACCTGCAGGTTACCC |
| OD1 s Alexa Fluor 488 na 5'-kraju | 5'-ATCGATAGTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGTAGCAAGGCACTGGTAGAATTCGGCAGC |

Tablica 20. Prikaz protokola/reakcija za sparivanje proba molekula DNA.

| Naziv probe | Protokol/reakcije sparivanja proba | Ukupni volumen |
|--------------------|--|----------------|
| OD1 + OD2 | 24 μ L OD1 (100 μ mol/L) + 24 μ L OD2 (100 μ mol/L) + 6 μ L 10 \times Klenow pufer + 6 μ L sterilne vode | 60 μ L |
| OD1 + OD3 | 24 μ L OD1 (100 μ mol/L) + 24 μ L OD3 (100 μ mol/L) + 6 μ L 10 \times Klenow pufer + 6 μ L sterilne vode | 60 μ L |
| 5'-Alexa OD1 + OD2 | 12 μ L OD1 (100 μ mol/L) + 12 μ L OD2 (100 μ mol/L) + 3 μ L 10 \times Klenow pufer + 3 μ L sterilne vode | 30 μ L |
| 5'-Alexa OD1 + OD3 | 12 μ L OD1 (100 μ mol/L) + 12 μ L OD3 (100 μ mol/L) + 3 μ L 10 \times Klenow pufer + 3 μ L sterilne vode | 30 μ L |

Prvotno se reakcije inkubiraju 5 minuta na 95 °C te ostavljaju da se postepeno hlade na sobnoj temperaturi tri sata nakon čega se stavljaju u hladnjak na 4 °C. Ohlađene probe se alikvotiraju u manje volumene kako bi se izbjeglo nepotrebno otapanje tijekom svakog sljedećeg eksperimenta i konačno spremaju u hladnjak na -20 °C.

Sparivanjem proba DNA dobile su se razne strukture DNA, pa je tako sparivanjem OD1 i OD2 dobivena dvolančana molekula DNA, OD1 i OD3 čine strukturu DNA molekule koja podsjeća na rašlje (engl. *splayed, fork*), dok je OD1 jednolančana molekula DNA.

3.6.2. Ispitivanje vezanja DNA i protein i detekcija kompleksa

Za pripremu reakcija potrebne su fluorescentno obilježene molekule DNA na 5'-kraju s Alexa Fluor 488, proteini kojima se ispituje vezanje i 10 \times Klenow pufer (tablica 11). Potrebno je držati sve supstance u ledu. Neposredno prije postavljanja reakcija potrebno je isprati 4 – 15 % nativni poliakrilamidni gel *Mini-Protean TGX (Bio-Rad)* od mogućih nečistoća amonijevog persulfata vožnjom gela u TBE puferu (tablica 3) na 80 V oko 15-30 minuta (engl. *pre-run*).

Reakcijska smjesa se sastoji od:

- 2,6 μ L probe molekule DNA (konačne koncentracije 0,4 μ mol/L, masa 20 ng)
- 20 ng do 3 μ g pročišćenog proteina (količina proteina prema dogovorenim omjerima)
- 1,5 μ L 10 \times Klenow-ovog pufera
- sterilne vode

Reakcije se ostavljaju inkubirati pokrivene na sobnoj temperaturi 25 minuta. Nakon inkubacije, reakcijske smjese se nanose na 4 - 15 % nativni poliakrilamidni gel, kojem su prethodno isprane jažice, te se analiza provodi na 120 V kroz sat vremena u tami. Prije vizualizacije se gel ispere s malom količinom destilirane vode i vizualizira na *ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad)* pri čemu je potrebno odabrati filter kojim se detektira Alexa Fluor 488. Detektirani kompleksi DNA-protein se potom analiziraju.

Metoda zaostajanja u gelu (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) uobičajena je metoda kojom se analiziraju interakcije između DNA i proteina. Analizom na gelu bilježi se nastajanje kompleksa DNA-protein koji se u gelu giba sporije od same molekule DNA. Zaostajanjem u gelu koje je u drugačijem položaju od molekule DNA potvrđuje se nastajanje kompleksa, odnosno kompleks je potvrda da se protein veže za DNA.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Predikcije trodimenzijskih struktura domene SprT u proteinu ACRC




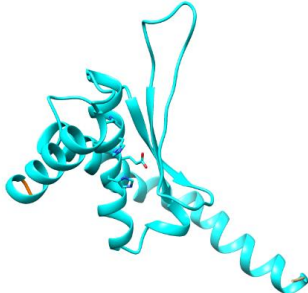
4.1.1. Dobivene predikcije konstrukata

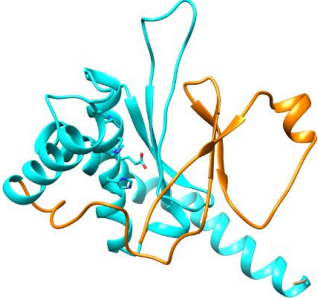
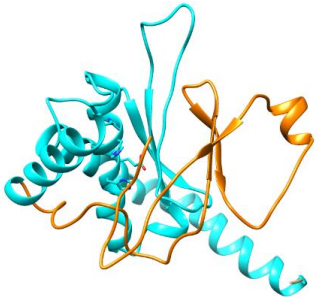
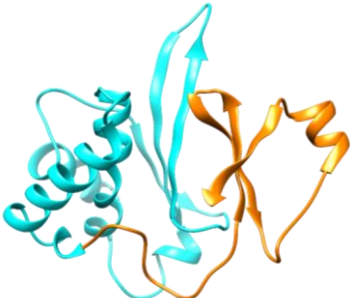
U želji za detaljnijim saznanjima o strukturi i funkciji proteina ACRC u mehanizmu popravka DPC-a, došlo je do ideje o pripravi konstrukata različitih duljina aminokiselinskih sljedova koji sadrže samo domenu SprT u svrhu njene kristalizacije i određivanja trodimenzijske strukture. S obzirom da je domena SprT u proteinu ACRC homologna domeni proteaze SPRTN postoje modeli predikcije njene strukture.⁸ Međutim, pretpostavljeni modeli ne prikazuju detaljno pojedine dijelove domene SprT čime su detalji proteolitičke katalize još uvijek nedovoljno neistraženi. Pomoću programa *Modeller*³⁶ i *Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine)*³⁷ napravljene su predikcije trodimenzijske strukture humanog proteina ACRC. Na temelju tih predikcija su dizajnirani konstrukti domene SprT u svrhu njene kasnije kristalizacije. Dizajnirane su dvije osnovne grupe konstrukata, jedna s čitavom domenom SprT koja prema predikcijama uključuje obje poddomene i druga koja sadrži samo MBD poddomenu. Unutar svake grupe konstrukata postoji više njih koji se međusobno razlikuju duljinom aminokiselinskih sekvenci u cilju smanjenja udijela okolnih neuređenih dijelova radi lakših kristalizacija. U tablici 21 prikazane su predikcije trodimenzijskih struktura dizajniranih konstrukata koji su korišteni u ovom radu.

Važnost poznavanja trodimenzijske strukture nekog proteina ili dijela njegove sekvence je mogućnost uvida u raspored bočnih ogranaka aminokiselina u prostoru. Rasporedom bočnih ogranaka aminokiselina u prostoru jasno se mogu pretpostaviti bitna mjesta u proteinu, od aktivnog mjesta pa do veznih mjesta za interakciju s drugim proteinima bitnih za aktivnost proteina i slično. Nadalje, ako o proteinu postoje već neka saznanja, rješavanjem trodimenzijske strukture informacije o aktivnosti ili interakcijama s drugim proteinima se mogu obogatiti, te potvrditi ili negirati. Također, ako je aktivno mjesto jasno strukturirano moguće je odrediti katalitički aktivne aminokiseline kojima se kasnijom mutacijom može potvrditi aktivnost. S obzirom da je kristalizacija proteina zahtjevna i teška, ponekad i nemoguća zbog neuređenosti proteina, predikcija trodimenzijske strukture proteina postaje

izrazito poželjna i korisna. Zahvaljujući sve brojnijom bazom riješenih trodimenzijskih struktura makromolekula i brzom razvitku usklađenih tehnika modeliranja i umjetne inteligencije, moguće je na temelju tek poznate primarne strukture proteina pretpostaviti trodimenzijsku strukturu s velikom vjerojatnošću.³⁷

Tablica 21. Prikaz dizajniranih konstrukata i njihove predikcije trodimenzijske strukture domene SprT pri čemu su prikazane poddomene MPD (plavo) i ZBD (narančasto) s označenim aminokiselinama aktivnog mjesta u HEXXH motivu oblikom štapića.

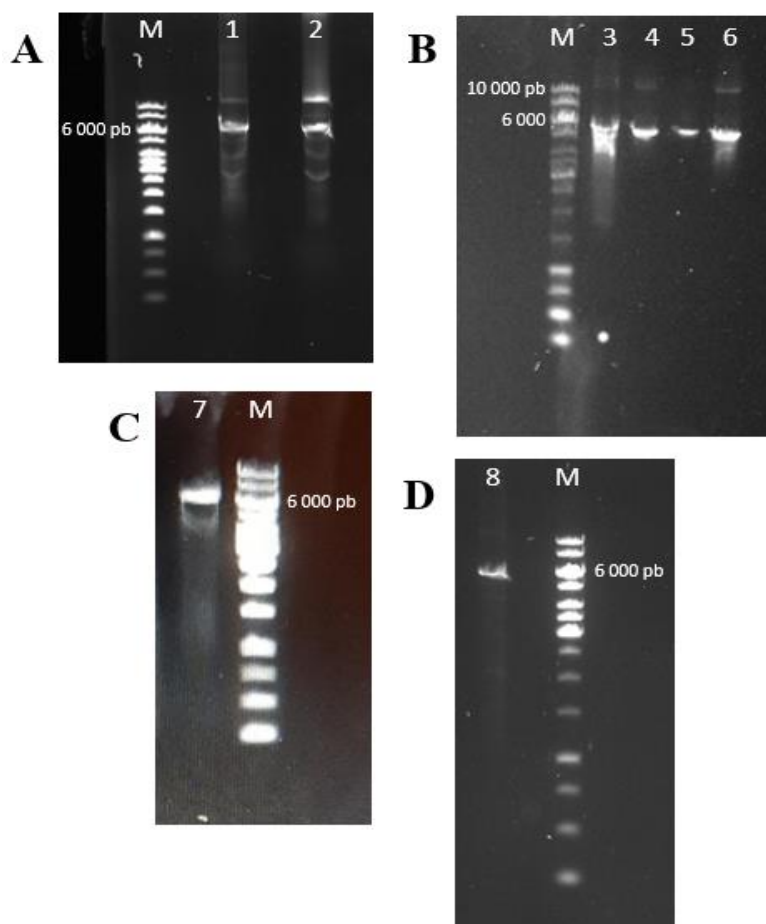
| Dizajnirani konstrukti ACRC-a | Predikcije trodimenzijskih struktura |
|--|--|
| <i>Hs ACRC ak 519–624</i> Program <i>Modeller</i> ³⁶ |  |
| <i>Hs ACRC ak 519–683</i> Program <i>Modeller</i> ³⁶ |  |
| <i>Hs ACRC ak 519–691</i> Program <i>Modeller</i> ³⁶ |  |
| <i>Hs ACRC ak 497–624</i> Program <i>Phyre2</i> ³⁷ |  |

| Dizajnirani konstrukti ACRC-a | Predikcije trodimenzijskih struktura |
|--|---|
| <p><i>Hs</i> ACRC ak 497–681 Program <i>Phyre2</i>³⁷</p> |  |
| <p><i>Hs</i> ACRC ak 497–691 Program <i>Phyre2</i>³⁷</p> |  |
| <p><i>D. rerio</i> ACRC ak 378–537 (plavo i narančasto) <i>D. rerio</i> ACRC ak 378-484 (plavo) Program <i>Phyre2</i>³⁷</p> |  |

4.2. Kloniranje konstrukata domene SprT

4.2.1. Analiza produkata inverzne lančane reakcije polimeraze

Svi konstrukti domene SprT dobiveni su metodom inverznog PCR-a pri čemu je kao kalup korišten plazmid pET Duet-1 s već ukloniranim genom za *Hs*ACRC. Popis početnica korištenih u ovim reakcijama može se naći u tablici 16. Produkti inverzne lančane reakcije polimeraze su čitavi plazmidi te željeni skraćeni konstrukti *Hs*ACRC. Produkti reakcije umnažanja analizirani su agaroznom gel-elektroforezom na 0,8 % agaroznom gelu. Na slici 5 se može vidjeti da veličina dobivenih PCR produkata odgovara očekivanoj veličini, tj. kalupu plazmida (veličina plazmida 5420 pb + veličina *Hs*ACRC ~ 6 kb).



Slika 5. Prikaz agaroznih gelova (0,8 %) nakon provedene elektroforeze s produktima inverznog PCR-a za konstrukte *HsACRC* različitih duljina domene SprT: slika **A** ak 519–691 (1), ak 497–691 (2), slika **B** ak 519–683 (3), ak 519–624 (4), ak 497–681 (5), ak 497–624 (6), slika **C** ak 522–691 (7) i slika **D** ak 522–677 (8).

4.2.2. Pripravljene rekombinantni plazmidi

Produkti inverznog PCR-a su zatim pročišćeni, te fosforilirani, ligirani uz dodatak restrikcijskog enzima Dpn I kojim je pocijepan početni roditeljski plazmid (detaljnije u odjeljku 3.3.4). U konačnici, pripremljeni su rekombinantni plazmidi:

pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 519-691, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 497-691, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 519-683, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 519-624, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 497-681, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 497-624, pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 522-691 i pET Duet1-(His)₆-SUMO-HRV3C-*HsACRC* ak 522-

677. Izmjerene koncentracije plazmida prikazane su u tablici 22, a uspješnost kloniranja potvrđena je sekvenciranjem koristeći početnice T7 promotor i T7 terminator (*Macrogen*).

Tablica 22. Prikaz koncentracija pripremljenih rekombinantnih plazmida.

| Rekombinantni plazmid | $\gamma / \text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ |
|---|--|
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 519-691 | 217,09 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 497-691 | 140,25 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 519-683 | 148,50 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 519-624 | 90,48 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 497-681 | 373,08 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 497-624 | 119,13 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 522-691 | 109,56 |
| pET Duet1-(His) ₆ -SUMO-HRV3C- <i>Hs</i> ACRC ak 522-677 | 71,78 |

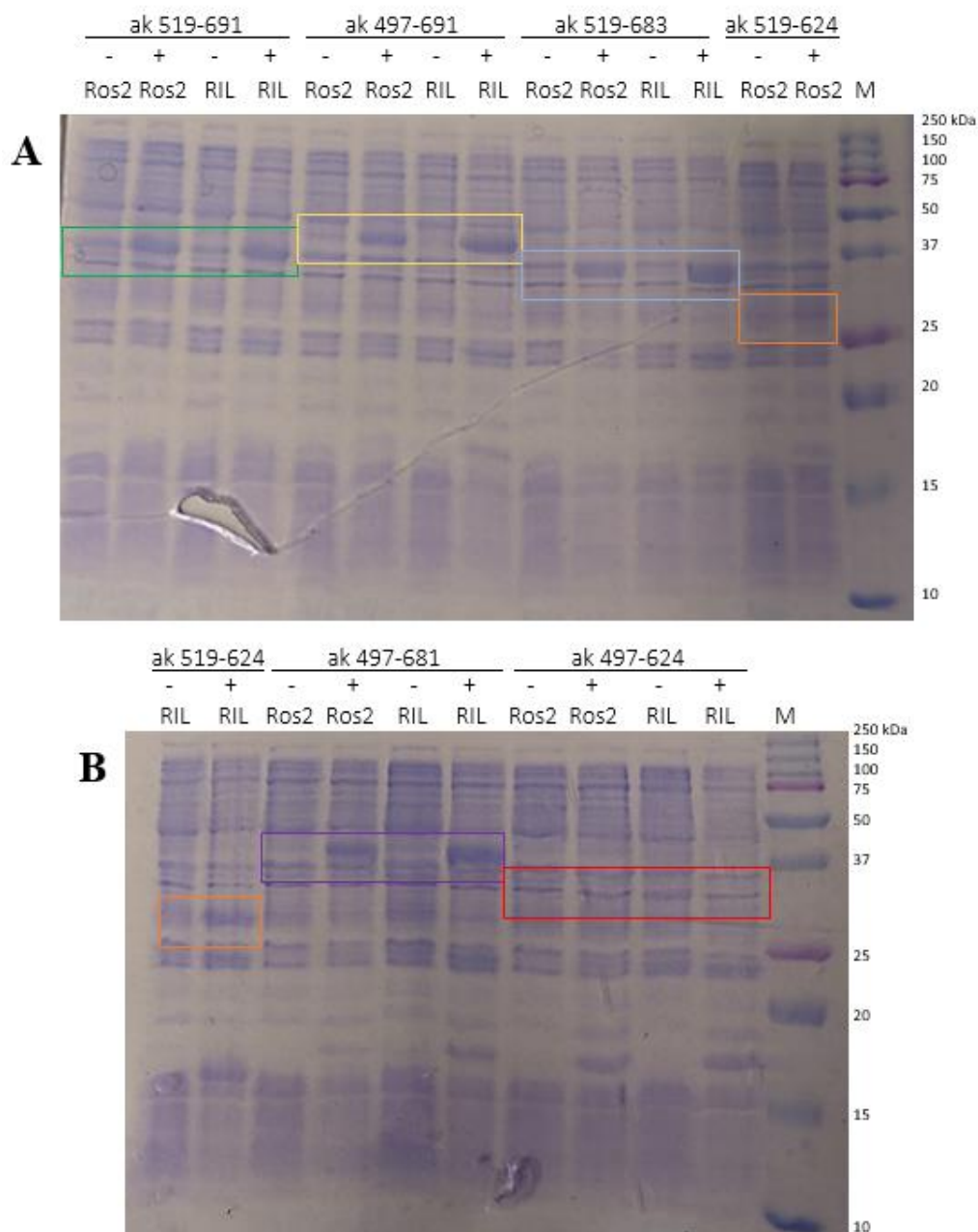
4.3. Testne prekomjerne ekspresije proteina

U cilju testiranja prekomjernih ekspresija proteina sa željenim aminokiselinskim sekvencama, pripremljeni plazmidi su transformirani u razne sojeve bakterija *E. coli*, soj *Rosetta (DE3)* i *Rosetta 2 (DE3)* i soj *RIL(DE3)*. Plazmidi pET Duet1-(His)₆-*Dr*ACRC ak 378-537 i pET Duet1-(His)₆-*Dr*ACRC ak 378-484 su transformirani u soj *RIL(DE3)*. Kako bi se ispitalo ima li prekomjerne ekspresije proteina u sojevima bakterije *E. coli* prvo su napravljene testne ekspresije u manjim volumenima LB medija (6 mL). Za analizu prekomjerne ekspresije uzet je 1 mL stanica prije indukcije IPTG-om i odgovarajuća količina stanica nakon prekonocnog uzgoja induciranog IPTG-om. Stanice su zatim odvojene od medija centrifugiranjem, te lizirane u SDS-PAGE puferu na 94 °C. Tako dobiveni stanični lizati su zatim analizirani pomoću SDS-PAGE. U tablici 23 su navedene bitne informacije o proteinima koji su prekomjerno eksprimirani.

Tablica 23. Važnije informacije o proteinima: molarna masa (M), izoelektrična točka (pI) i ekstincijski koeficijent (ϵ).

| Protein | $M / \text{g mol}^{-1}$ | pI | $\epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
|---|-------------------------|------|---|
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 519-691 | 34 286,40 | 8,99 | 41 535 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 497-691 | 36 853,40 | 9,23 | 43 025 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 519-683 | 33 426,37 | 8,90 | 41 535 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 519-624 | 26 645,37 | 7,77 | 35 200 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 497-681 | 35 618,92 | 9,18 | 43 025 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 497-624 | 29 081,19 | 8,96 | 36 690 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 522-691 | 33 929,04 | 9,14 | 41 535 |
| (His) ₆ -SUMO- <i>Hs</i> ACRC ak 522-677 | 32 386,24 | 9,07 | 41 535 |
| (His) ₆ - <i>Dr</i> ACRC ak 378-537 | 20 040,86 | 9,05 | 28 920 |
| (His) ₆ - <i>Dr</i> ACRC ak 378-484 | 13 961,74 | 8,50 | 24 075 |

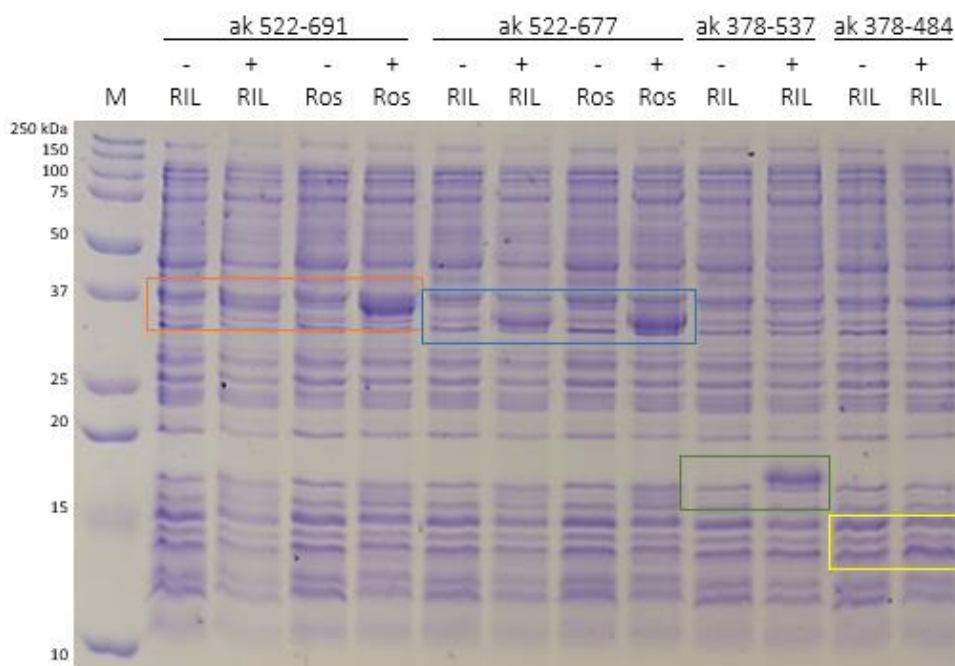
Na slici 6 prikazani su 17 % poliakrilamidni gelovi nakon provedene metode SDS-PAGE s uzorcima neinduciranih i induciranih stanica. Mase eksprimiranih proteina navedene su u tablici 23, a njihov položaj u gelu dodatno je označen. Moguće je vidjeti da kod proteina (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-691, (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 497-691, (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-683 i (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 497-681 prekomjerne ekspresije ima i dobro je vidljiva na gelu, što znači da se u korištenim stanicama proteini dobro eksprimiraju te da se uzgoj može provesti i u većim količinama u sojevima *Rosetta 2 (DE3)* i *RIL(DE3)*. U slučaju proteina (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-624 i (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 497-624 nema značajne promjene u ekspresiji između neinduciranih i induciranih stanica u sojevima *Rosetta 2 (DE3)* i *RIL(DE3)*, za što su moguća dva razloga. Jedan od razloga je mogućnost da korišteni sojevi bakterije *E. coli* nisu pogodni za prekomjernu ekspresiju tih proteina što je moguće provjeriti odabirom drugih sojeva za uzgoj. Drugi mogući razlog slaboj nadekspresiji jest da u stanici domaćina prokariota, bakterije *E. coli*, eukariotski protein nije eksprimiran zbog sadržaja rijetkih kodona koji nisu prisutni u stanici bakterije. Kako bi se utvrdio razlog neuspjele ekspresije proteina, u idućim se eksperimentima provodila ekspresija odabirom drugog soja bakterije *E. coli*.



Slika 6. Prikaz testnih ekspresija analiziranih metodom SDS-PAGE s uzorcima neinduciranih (-) i induciranih (+) stanica *Rosetta 2 (DE3)* i *RIL (DE3)* proteina $(\text{His})_6$ -SUMO-*HsACRC* sa sadržajem aminokiselinskih sekvenci navedenih iznad slike i marker za proteine (M).

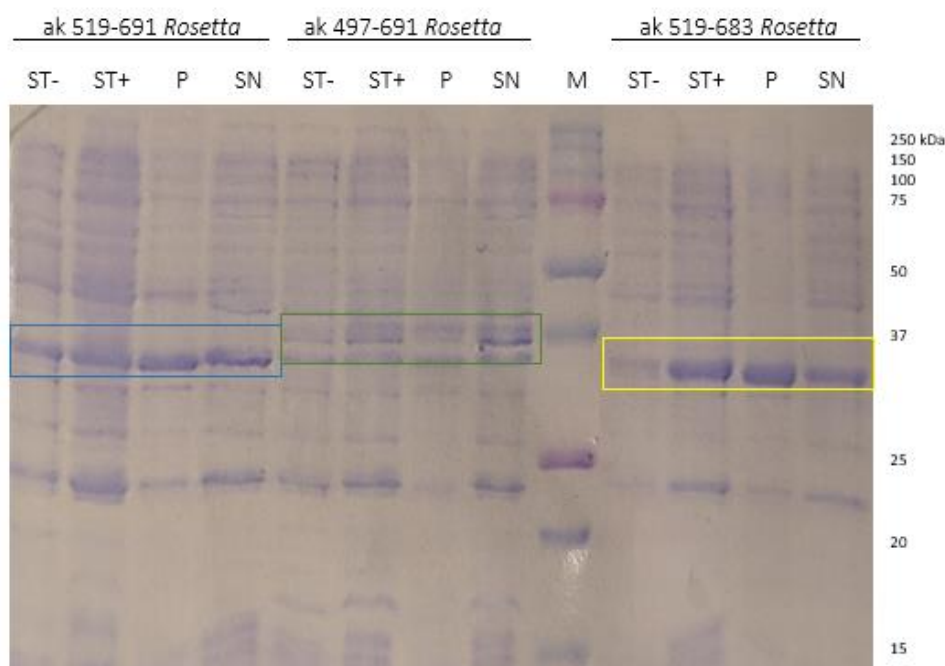
Za proteinske konstrukte $(\text{His})_6$ -SUMO-*HsACRC* ak 522-691 i ak 522-677 značajna nadekspresija u induciranim stanicama *RIL (DE3)* nije primijećena (slika 7), dok je u stanicama *Rosetta (DE3)* prekomjerna ekspresija prisutna i vidljiva kao snažna vrpca na položaju u gelu koji odgovara očekivanoj molarnoj masi proteina (tablica 23). Prekomjerna ekspresija u soju *RIL (DE3)* vidljiva je kod proteina $(\text{His})_6$ -*DrACRC* ak 378-537 i $(\text{His})_6$ -

DrACRC ak 378-484 (slika 7). Provedbom testnih ekspresija u raznim sojevima bakterija *E. coli* može se vrlo jednostavno zaključiti koji je odabir stanica za uzgoj najoptimalniji i koji nije, u svrhu uštede na vremenu potrebnom za provedbu svih koraka izolacije proteina. S obzirom na rezultate testnih ekspresija, dalje se nastavlja s uzgojem proteinskih konstrukata (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 519-691, ak 497-691, ak 519-683, ak 497-681, ak 522-691 i ak 522-677 u soju *Rosetta (DE3)* i *Rosetta 2 (DE3)*, te s (His)₆-*DrACRC* ak 378-537 i (His)₆-*DrACRC* ak 378-484 u soju *RIL (DE3)*.

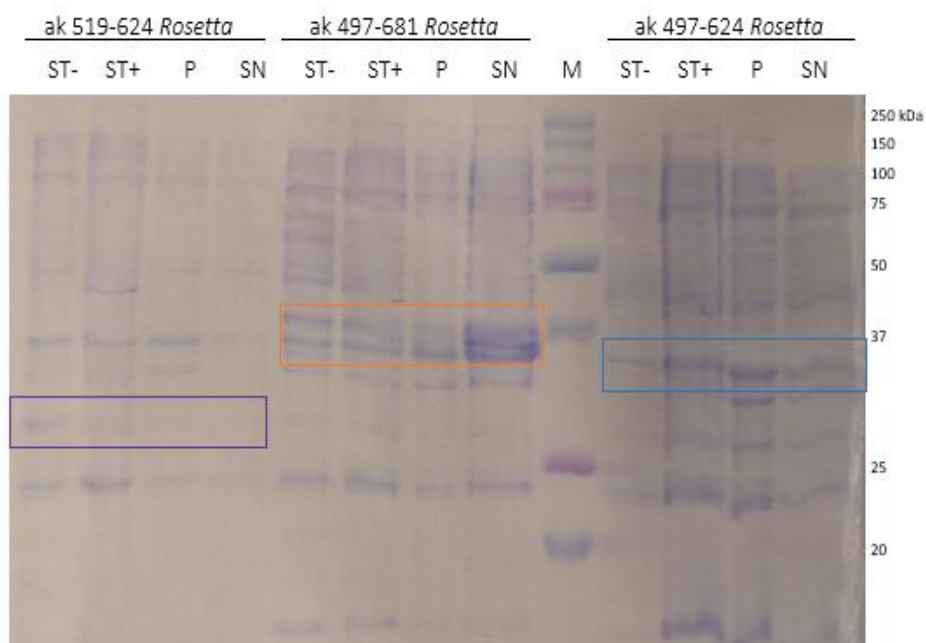


Slika 7. Prikaz testnih ekspresija analiziranih metodom SDS-PAGE s uzorcima neinduciranih (-) i induciranih (+) stanica *RIL (DE3)* i *Rosetta (DE3)* proteinskih konstrukata (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 522-691 i ak 522-677, te (His)₆-*DrACRC* ak 378-537 i ak 378-484 i marker za proteine (M).

Nadalje, na slici 8 i 9 prikazani su 17 % poliakrilamidni gelovi nakon provedene metode SDS-PAGE s uzorcima neinduciranih i induciranih stanica, taloga stanica nakon centrifugiranja i supernatanta. Proteinski konstrukti (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 519-691, ak 497-691, ak 519-683 i ak 497-681 su uspješno nadeksprimirani u soju *Rosetta (DE3)* bakterije *E. coli*. Kod proteina (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 519-624 i ak 497-624 ne dolazi do nadekspresije niti u jednom od tri do sada ispitana soja bakterije *E. coli*.



Slika 8. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog metodom SDS-PAGE proteina (His)₆-SUMO-HsACRC sa sadržajem aminokiselinskih sekvenci navedenih iznad slike s uzorcima: neinduciranih stanica (ST-), induciranih stanica (ST+), taloga stanica (P) i supernatanta (SN).



Slika 9. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog metodom SDS-PAGE proteina (His)₆-SUMO-HsACRC sa sadržajem aminokiselinskih sekvenci navedenih iznad slike s uzorcima: neinduciranih stanica (ST-), induciranih stanica (ST+), taloga stanica (P) i supernatanta (SN).

Loša ekspresija proteina je posljedica nestabilne ekspresije eukariotskih proteina u prokariotskom domaćinu bakteriji *E. coli*. Samo neki od faktora koji mogu utjecati na nadekspresiju proteina su: nedovoljne količine šaperona koji pomažu pri pravilnom smatanju proteina, nespecifična razgradnja željenog proteina u stanici zbog neispravnog smatanja ili nastanka oštećenog proteina, nemogućnost posttranslacijskih modifikacija bitnih za pravilno smatanje proteina i slično.

4.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina

Proteinski konstrukti *H. sapiens* ACRC i *D. rerio* ACRC različitih duljina koji uključuju domenu SprT, kao i čitavi proteini *H. sapiens* ACRC WT i *H. sapiens* ACRC E593A eksprimirani su i pročišćeni u svrhu kristalizacije i analize vezanja DNA-protein. Riješenom strukturom postoji mogućnost za odgonetanjem načina katalize popravka, a analizom vezanja proteina i DNA željelo se ispitati veže li ACRC molekulu DNA i u kolikom omjeru. S obzirom da je tek nedavno otkriveno kako protein ACRC sadrži homolognu domenu SprT, kao i ostale proteaze uključene u popravak DPC-a, detaljnije informacije o ulozi ACRC nisu poznate.

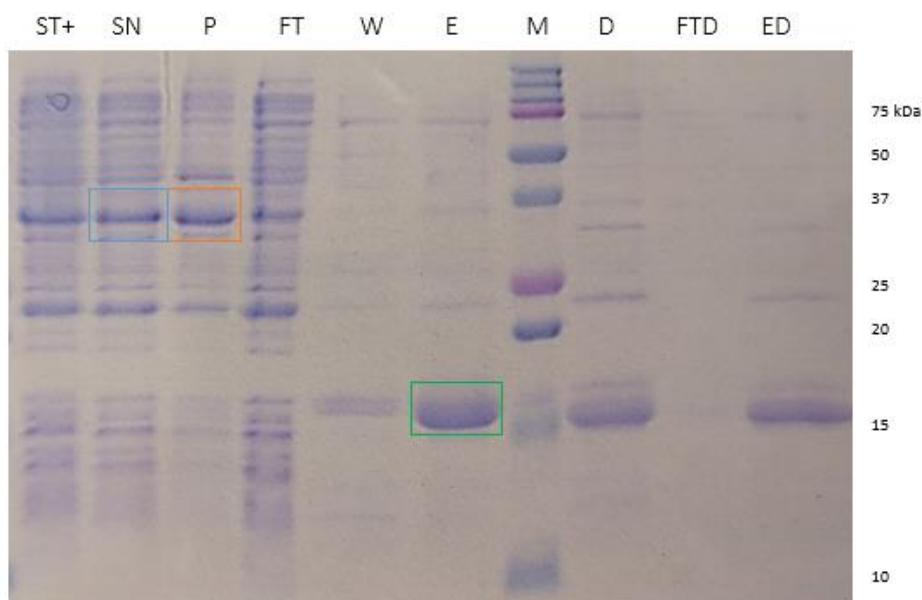
Prekomjerna ekspresija proteina provodila se prema opisanim koracima u odjeljku 3.4, a pročišćavanje prema opisanim koracima u odjeljku 3.5 pri čemu su korišteni puferi navedeni u tablici 4, ako drugačije nije naznačeno u opisu rezultata.

4.4.1. Proteinski konstrukti *H. sapiens* ACRC

Proteinski konstrukti (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-691, ak 497-691, ak 519-683, ak 497-681, ak 522-691 i ak 522-677 uzgajani su u većim volumenima LB medija (500 mL) te im je inducirana nadekspresija proteina IPTG-om. Inducirane stanice su zatim oborene, lizirane te su željeni proteini pokušani pročititi afinitetnom kromatografijom koristeći Ni-NTA smolu (detaljnije u odjeljku 3.5.1). Tijekom svih koraka pročišćavanja uzimani su mali alikvoti uzoraka proteina (10 µL) i analizirani su pomoću metode SDS-PAGE.

Stanice *Rosetta* (*DE3*) koje sadrže plazmidni vektor s genskom sekvencom za proteinski konstrukt (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-691 su uzgajane u većem volumenu LB medija. Na slici 10 se može vidjeti snažna vrpca (označeno narančasto na slici) čija veličina odgovara očekivanoj masi željenog proteinskog konstrukta u uzorku taloga stanica što ukazuje na

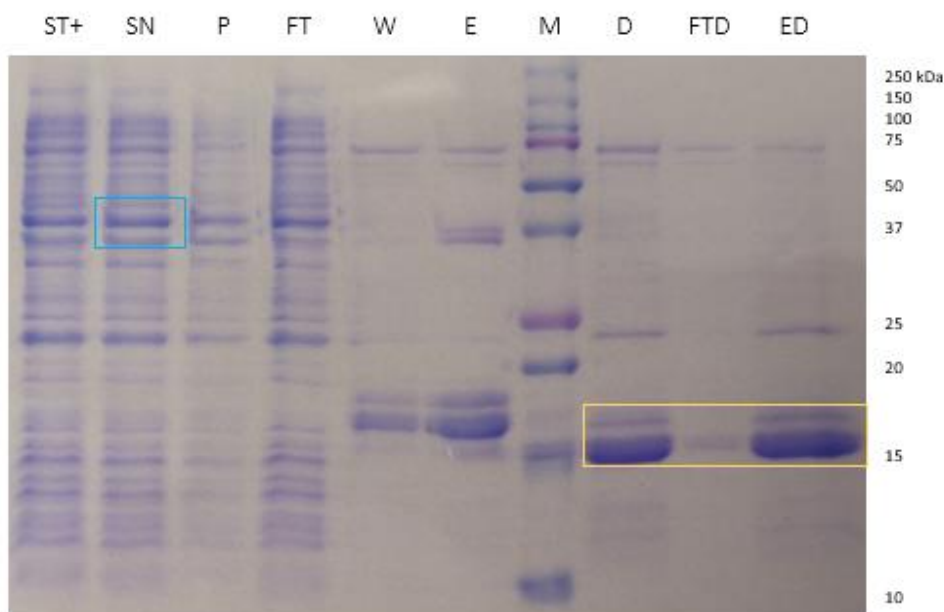
netopljivost nadeksprimiranog proteina. To je najvjerojatnije posljedica nepravilnog smatanja proteina ili prekomjerne izloženosti hidrofobnih regija proteina otapalu što dovodi do nastanka inkluzijskih tijela koja završavaju u talogu stanica kao agregati. U uzorku supernatanta je vidljiva manja količina proteina (označeno plavo na slici), a vrpca nestaje u daljnjim frakcijama što ukazuje da najvjerojatnije dolazi do razgradnje proteina s obzirom da postoje vrpce (označeno zeleno na slici) koje se nalaze na mjestima u gelu koja su puno manjih masa od mase proteina. Nadalje, na gelu se nalaze i frakcije nakon prekonoćne dijalize s HRV 3C proteazom (detaljnije u odjeljku 3.5.2) u puferu navedenim u tablici 6 (pufer za dijalizu 1) tijekom kojeg dolazi do cijepanja heksahistidinskog privjeska s proteina. U ovom slučaju cijepanje nije primijećeno, što ukazuje da proteini koji se nalaze u frakciji elucije nisu željeni proteini.



Slika 10. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 519-691 ($M = 34\,286,40 \text{ g mol}^{-1}$) s uzorcima: induciranih stanica (ST+), supernatanta (SN), taloga stanica (P), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E), markera za proteine (M), prekonoćne dijalize s HRV 3C proteazom (D), nevezane frakcije nakon dijalize (FTD), elucije nakon dijalize (ED).

Vrlo sličan slučaj je i s proteinom $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-691 u soju *Rosetta (DE3)* prikazanom na slici 11, no u ovom slučaju količina proteina u supernatantu (označeno plavo na slici) je mnogo veća od količine u talogu stanica, što daje zaključak da je protein

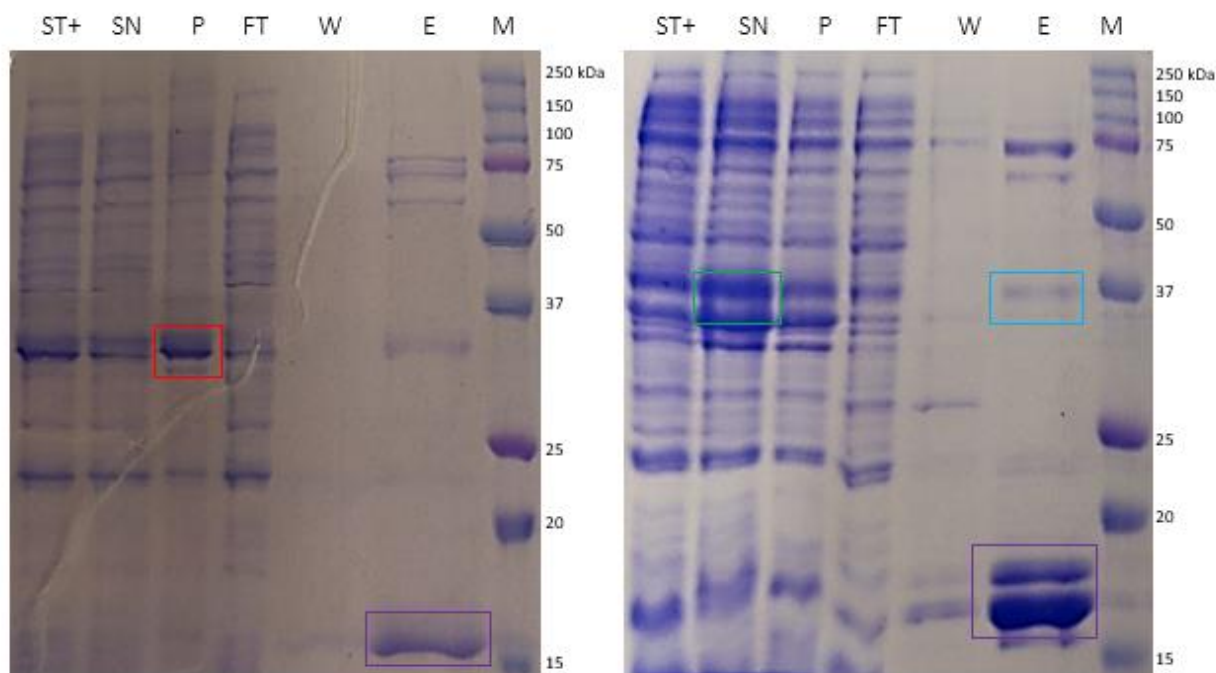
pravilno smotan te se nalazi u supernatantu. Nakon prekončne dijalize rezultati su isti (označeno žuto na slici), razgradnja proteina je u najvećem postotku što nije željeni cilj. S obzirom da u supernatantu postoji protein i vrpca je podebljana, postavlja se pitanje gdje protein kasnije nestaje, zašto se ne nalazi u kasnijim frakcijama te da li se sav protein razgradio.



Slika 11. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-691 ($M = 36\,853,40\text{ g mol}^{-1}$) s uzorcima: induciranih stanica (ST+), supernatanta (SN), taloga stanica (P), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E), markera za proteine (M), prekončne dijalize s HRV 3C proteazom (D), nevezane frakcije nakon dijalize (FTD), elucije nakon dijalize (ED).

Kako bi se ispitalo da li i u ostalim proteinima *HsACRC* dolazi do istih rezultata tijekom izolacije proteina, također je pokušano pročišćavanje prekomjerno eksprimiranih proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 519-683 i $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-681 u soju *Rosetta (DE3)*. Na slici 12 i 13 prikazani su 17 % poliakrilamidni gelovi nakon provedene metode SDS-PAGE s uzorcima koraka izolacije proteina. Na slici 12 se može vidjeti kako, i u ovom slučaju, najveći dio proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 519-683 nalazi se u talogu stanica (označeno crveno na slici). Proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-681 (slika 13) najviše ima u supernatantu (označeno zeleno na slici), iako ga ima i u talogu stanica, no u frakciji

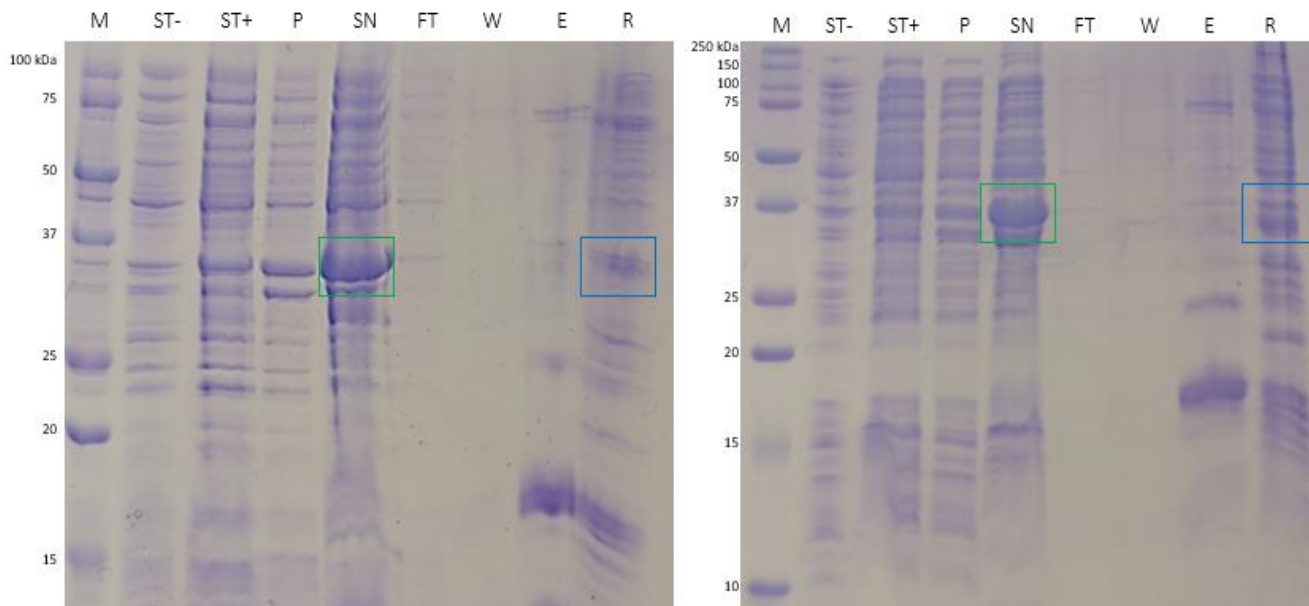
elucije s puferom C ga ima u vrlo niskim količinama (označeno plavo na slici). Vidljiva količina proteina u frakciji ispiranja puferom C nije dovoljna za daljnje pročišćavanje, iz razloga što ekspresija nije u potpunosti optimizirana te postoji mnoštvo nečistoća, a postoji i jaka vrpca na mjestu u gelu puno manje mase od mase proteina, što je slučaj i kod prethodno pročišćenih proteina (označeno ljubičasto na slici 12 i 13).



Slika 12 i 13. Prikaz poliakrilamidnih gelova analiziranih SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 519-683 (lijevo) i $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-681 (desno) s uzorcima: induciranih stanica (ST+), supernatanta (SN), taloga stanica (P), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E) i markera za proteine (M).

Ekspresija proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 522-691 i $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 522-677 provodila se prema potvrdnim rezultatima testnih ekspresija u soju *Rosetta (DE3)* te za dodatna ispitivanja ekspresije i u soju *Rosetta 2 (DE3)*. Na slici 14 i 15 prikazani su 17 % poliakrilamidni gelovi s uzorcima izolacije dvaju proteina iz stanica *Rosetta (DE3)* na kojima se može vidjeti kako se proteini nalaze u supernatantu (označeno zeleno na slici). S obzirom da su dosadašnji eksperimenti izolacije proteina *HsACRC* upućivali kako u frakcijama nakon supernatanta protein nestaje na gel je nanijeta i frakcija Ni-NTA smole. Kao što je vidljivo Ni-NTA smola sadrži mnogo nečistoća, međutim moguće je zamijetiti jaču vrpca (označeno

plavo na slici) u frakciji smole na mjestu koje odgovara masi proteina. S obzirom da je to novo saznanje, u sljedećim eksperimentima izolacije proteina uzimala se i frakcija smole, jer zbog nestajanja proteina u frakcijama nakon supernatanta, zadržavanje proteina na smoli mogao bi biti mogući razlog.



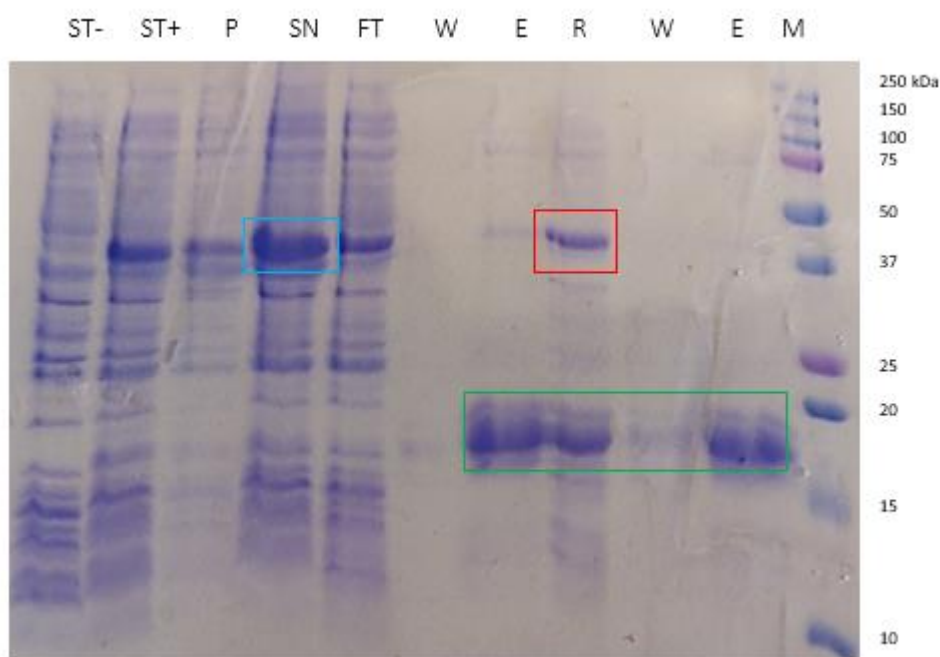
Slika 14 i 15. Prikaz poliakrilamidnih gelova analiziranih metodom SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 522-691 (lijevo) i $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 522-677 (desno) s uzorcima: neinduciranih stanica (ST-), induciranih stanica (ST+), taloga stanica (P), supernatanta (SN), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E), resina (R) i markera za proteine (M).

Nadalje, izolacija dvaju proteina iz soja *Rosetta 2 (DE3)* bakterije *E. coli* provodila se pomoću pufera koji sadrže HEPES pH 7,0 navedenih u tablici 5 kako bi se ispitalo da li je razlog neuspješnih rezultata možda odabir nedovoljno dobrih pufera za izolaciju proteina. Međutim, nakon analize uzoraka izolacije proteina metodom SDS-PAGE rezultati su bili jednaki prethodnim pokušajima, koji su rezultirali velikim dijelom proteina u talogu stanica te zadržavanjem proteina na Ni-NTA smoli.

Zadržavanje proteina na Ni-NTA smoli bilo je neočekivan rezultat svih provedenih izolacija te kako bi se rezultati mogli u potpunosti zaključiti, dodatno su provedeni koraci pročišćavanja na Ni-NTA smoli koristeći se puferima s HEPES-om pH 7,5 (tablica 5) i

metodom ionske izmjene, a pionir eksperimenata pročišćavanja bio je protein (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 497-691 u soju *Rosetta 2 (DE3)*.

Na slici 16 prikazan je 17 % poliakrilamidni gel nakon provedene metode SDS-PAGE s uzorcima uzetih tijekom izolacije proteina (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 497-691. Izolacija proteina provedena je puferima koji sadrže HEPES pH 7,5, navedenih u tablici 5, kako bi se dodatno ispitaio utjecaj pufera na izolaciju. S obzirom da su rezultati jednaki prethodnima, zaključak je da promjena pufera ne utječe na uspješnost izolacije. U supernatantu je sadržan protein (označeno plavo na slici), no u frakcijama ispiranja s puferom B i C protein nestaje, a ovdje je vidljivo da je razlog takvom rezultatu zadržavanje velike količine proteina na Ni-NTA smoli (označeno crveno na slici). Također, vidljive su degradacije, tj. razgradnja proteina (označeno zeleno na slici).



Slika 16. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina (His)₆-SUMO-*HsACRC* ak 497-691 ($M = 36\ 853,40\ \text{g mol}^{-1}$) u soju *Rosetta 2 (DE3)* s uzorcima: neinduciranih stanica (ST-), induciranih stanica (ST+), taloga stanica (P), supernatanta (SN), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E), resina (R) i markera za proteine (M).

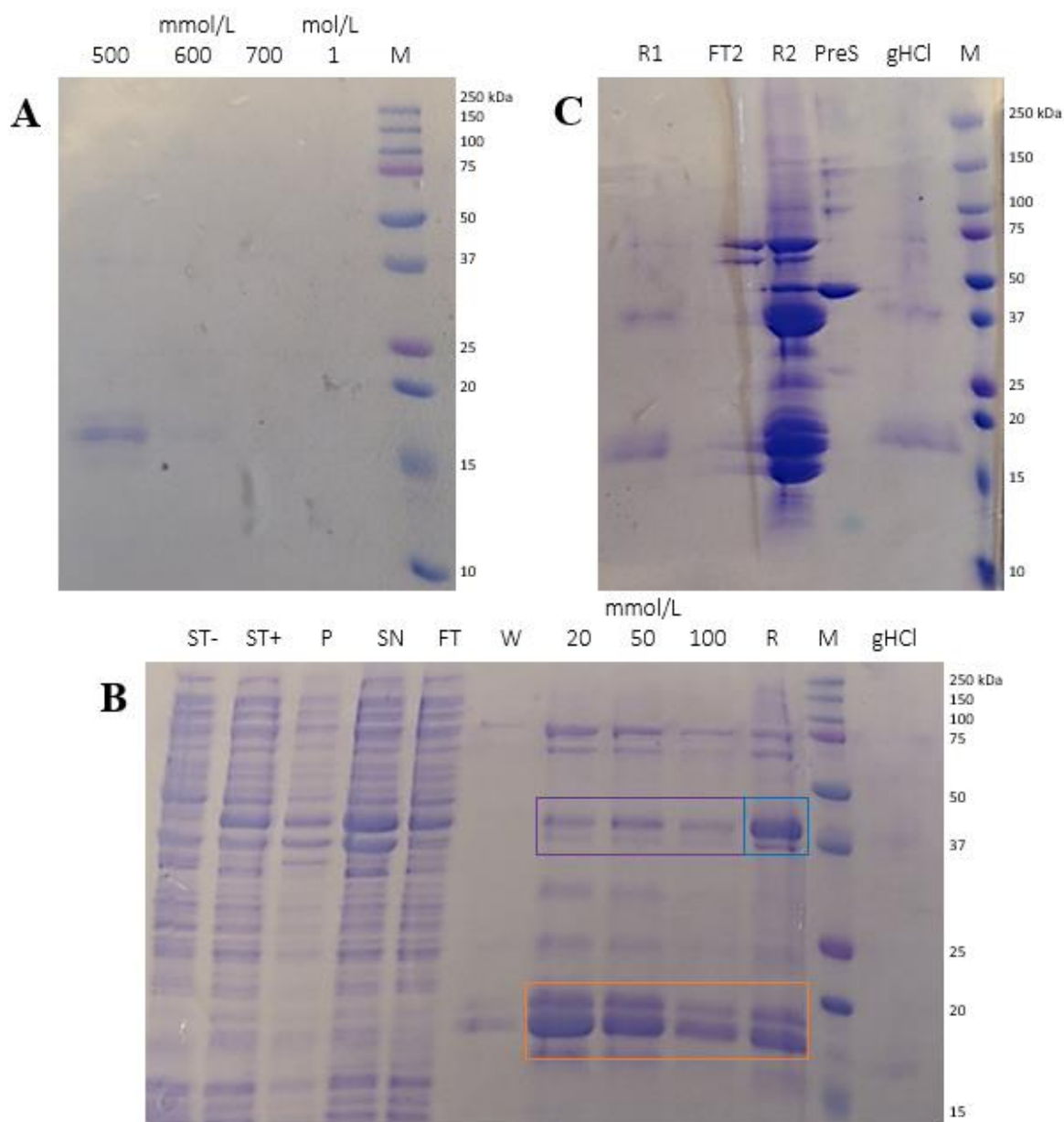
Sljedeći koraci bile su elucije Ni-NTA smole s vezanim proteinom raznim koncentracijama imidazola pH 8,0 kako bi se vezani protein eluirao s smole. Pokušaj provedbe eluiranja prikazan je na slici 17A gdje se može vidjeti da ni usprkos eluiranju s 1

mol/L imidazolom pH 8,0 protein nije eluiran s Ni-NTA smole. S obzirom na takav rezultat, pretpostavlja se kako pročišćeni proteini iz nepoznatog razloga precipitiraju na Ni-NTA smoli ili nose veliki naboj kojim se tako jako vežu na smolu iz koje ih je nemoguće eluirati.

Protein se zatim pokušao eluirati puferima s raznim koncentracijama EDTA kako bi se s Ni-NTA smole pokušali maknuti ioni nikla pa samim time i protein vezan za ione. Rezultati tog eksperimenta prikazani su na slici 17B, gdje se vidi da je dio proteina eluiran sa Ni-NTA smole no u nedovoljnoj količini (označeno ljubičasto na slici) jer je veći dio proteina i dalje ostao vezan na smolu (označeno plavo na slici). Usprkos boljim rezultatima, i dalje postoji degradacija proteina (označeno narančasto na slici), koja je također zajedno s proteinom vezanim na smolu u većoj količini nego količina proteina u eluatu. Na slici 17B se nalazi i frakcija ispiranja smole s gvanidinijevim hidrokloridom (koncentracija 3 mol/L), no niti u tom slučaju protein nije eluiran.

Pročišćavanjem proteina kromatografijom ionske izmjene preko kolone *HiTrap Q HP* 1 mL na koju je nanijet uzorak supernatanta, resuspendiran i pročišćen puferima navedenima u tablici 7 (detaljnije u odjeljku 3.5.4) nije došlo do novih saznanja o mogućnosti dobivanja pročišćenog proteina, te iz tog razloga rezultati neće biti detaljnije prikazani.

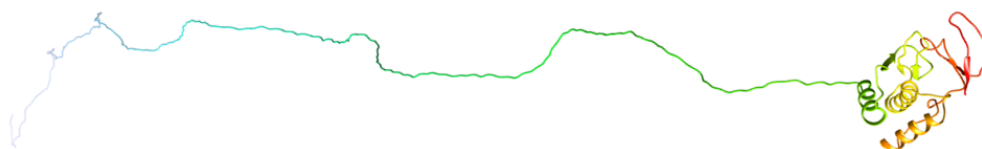
Nakon svih provedenih metoda pročišćavanja, ispitana je i mogućnost cijepanja proteina od heksahistidinskog privjeska direktno dodavanjem HRV 3C proteaze na Ni-NTA smolu, prikazanog na slici 17C, pri čemu dobiveni rezultati nisu bili uspješni. Elucija smole inkubirane prekonoćno s HRV 3C proteazom provodila se s puferom C koji sadrži 400 mmol/L imidazol pH 8,0 (tablica 5) i s gvanidinijevim hidrokloridom, međutim protein i dalje nije bilo moguće odvojiti od Ni-NTA smole.



Slika 17. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-SUMO-HsACRC}$ ak 497-691 ($M = 36\,853,40\text{ g mol}^{-1}$) u soju *Rosetta 2 (DE3)* s uzorcima: slika **A** ispiranja Ni-NTA smole s raznim koncentracijama imidazola pH 8,0, slika **B** koraka izolacije proteina i pročišćavanja Ni-NTA smole s raznim koncentracijama EDTA i s gvanidinijevim hidrokloridom (gHCl), slika **C** ispiranja Ni-NTA smole s dodatkom HRV 3C proteaze: resin prije dodatka HRV 3C proteaze (R1), ispiranje smole s puferom C nakon prekončne dijalize s proteazom (FT2), resin s HRV 3C proteazom (R2), HRV 3C proteaza (PreS), ispiranje smole s gvanidinijevim hidrokloridom nakon prekončne dijalize s proteazom (gHCl) i markera za proteine (M).

Uzevši sve provedene eksperimente i metode u obzir, korištenjem širokog spektra pufera za izolaciju proteina cilj je bila optimizacija postupka izolacije kako bi se dobio topljivi protein u eluatu. Međutim, problem vezanja proteina na Ni-NTA smolu nije bio očekivan. Problem zadržavanja proteina na smoli ispitan je kromatografijom ionske izmjene pri čemu nisu dobivene nove spoznaje o proteinu. Korištenjem otopina raznih koncentracija imidazola, EDTA i gvanidinijevog hidroklorida željela se ispitati elucija proteina sa Ni-NTA smole u želji dobivanja proteina za kristalizaciju. S obzirom da se niti u jednom pokušaju protein nije mogao dobiti u dovoljnoj količini u eluatu, daljnja mogućnost za kristalizaciju proteina nije bila moguća. Nadalje, problem degradacije proteina bio je značajan kod svih pročišćenih proteina. Bitno je reći kako degradacija proteina je zapravo u većini slučajeva pojava snažne vrpce na mjestu u gelu koje odgovara veličini manjoj od 20 kDa, što se pretpostavlja da je SUMO protein, čija je masa oko 12 kDa, a s obzirom na njegov sadržaj u proteinu, velika je vjerojatnost njegove pojave. Sagledavši sve nabrojeno, od nestabilnih ekspresija proteina u sojevima bakterija *E. coli*, do zadržavanja proteina na Ni-NTA smoli i njegove degradacije u frakcijama ispiranja sa smole može se zaključiti da su pripremljeni proteinski konstrukti nestabilni te najvjerojatnije nepravilno svijeni. Problem lošeg smatanja je razlog precipitiranja i taloženja proteina na Ni-NTA smoli stvarajući tako nabijene agregate, koji kao takvi, nisu mogli biti eluirani.

S obzirom da su pretpostavljene strukture proteinskih konstrukata temeljene na predikciji humanog proteina ACRC dobivenog programima *Modeller* i *Phyre2* moguće da one nisu bile upotpunosti točne. Na slici 18 prikazana je predikcija trodimenzijske strukture humanog proteina ACRC izračunata programom *Modeller*, gdje se može vidjeti kako je veći dio proteina, kojem pripada i IDR regija, neuređen i izložen utjecaju otapala. Detaljnije prikazana domena SprT je na slici 19, a sastoji se od triju α -zavojnica i antiparalelne β -nabrane ploče koju čini tri β -lanca koji formiraju domenu.



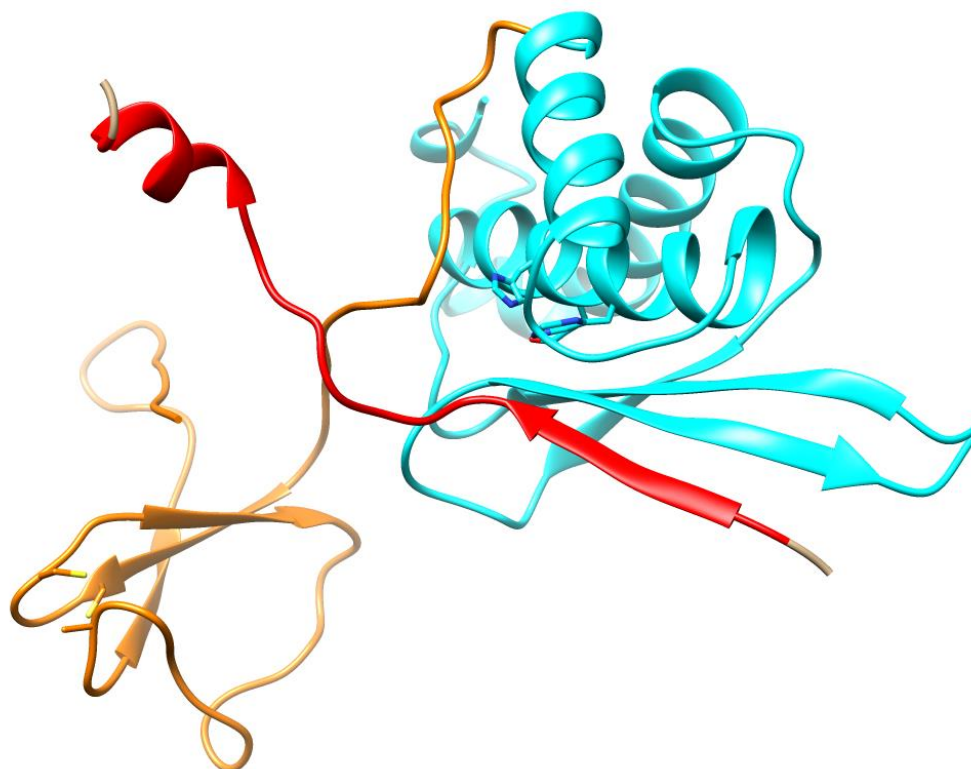
Slika 18. Prikaz predikcije trodimenzijske strukture humanog proteina ACRC dobivenog programom *Modeller*.³⁶



Slika 19. Prikaz predikcije trodimenzijske strukture domene SprT humanog proteina ACRC dobivenog programom *Modeller*.³⁶

Zahvaljujući tek odnedavno javno dostupnoj bazi koja je otvorena tijekom pisanja ovog diplomskog rada, *AlphaFold Protein Structure Database*,⁴⁰ umjetnoj inteligenciji koja daje izuzetno točne trodimenzijske predikcije, moguće je pretpostaviti strukture proteina s točnosti najvećom do sada.⁴¹ Kako bi se ispitala točnost naših predikcija usporedile su se sa predikcijom iz *AlphaFold*. Na slici 20 detaljnije je prikazan raspored sekundarnih struktura domene SprT dobivene predikcijom programa *AlphaFold*. Na slici se može vidjeti kako domenu SprT čini tri α -zavojnice i četiri β -lanca koji formiraju antiparalelnu β -nabranu ploču. S obzirom da su naše predikcije pretpostavljale kako se domena SprT sastoji od tri β -lanaca, a ovim je pokazano da je čini njih četiri, vrlo je vjerojatno riječ o nepravilnom smatanju konstrukata koje je posljedica nedostatka upravo tog β -lanca. Detaljnijim istraživanjem nađeno je kako na N-terminalnom kraju, koji je većinom neuređen, dio aminokiselinskog slijeda ak 75-95 formira uređene sekundarne strukture, jedan β -lanac (označeno crveno na slici 20) i manju α -zavojnicu. Upravo taj β -lanac četvrti je lanac, koji zajedno s preostala tri, čini antiparalelnu β -nabranu ploču u domeni SprT, te njegovim nedostatkom dolazi do

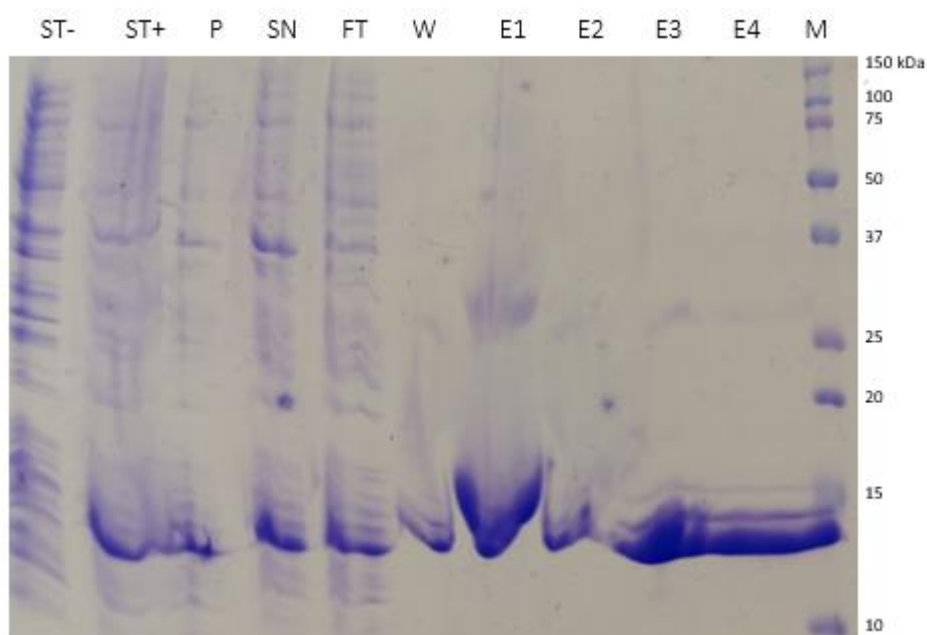
narušavanja cijele strukture domene i posljedica je nestabilnosti proteinskih konstrukata. Time se može zaključiti kako je ispravna predikcija trodimenzijske strukture izrazito važna jer bez obzira što su stotinama aminokiselina udaljeni, uređeni dijelovi proteina mogu u prostoru biti vrlo blizu formirajući tako važna mjesta u proteinu.



Slika 20. Prikaz predikcije trodimenzijske strukture domene SprT humanog proteina ACRC dobivenog programom *AlphaFold*.⁴⁰

4.4.2. Protein *D. rerio* ak 378-484

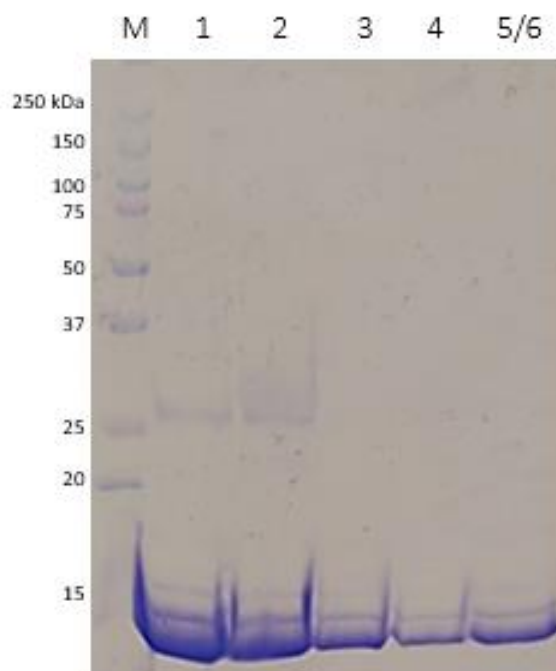
Proteinski konstrukt *D. rerio* ACRC ak 378-484 u soju *RIL (DE3)* pročišćen je afinitetnom kromatografijom pri denaturirajućim uvjetima nakon čega je uslijedila filtracija preko kolone PD-10 puferom R-1 (tablica 10). Izolacija u denaturirajućim uvjetima provodi se istim postupcima kao i uobičajena izolacija samo koristeći pufere navedene u tablici 9. Sakupljeni uzorci tijekom izolacije proteina nanijeti su na 17 % poliakrilamidni gel prikazan na slici 21, gdje su prikazane i frakcije nakon gel-filtracije preko kolone PD-10 puferom R-1 iz tablice 10.



Slika 21. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6\text{-DrACRC}$ ak 378-484 ($M = 13\,961,74\text{ g mol}^{-1}$) s uzorcima: neinducirane stanice (ST-), inducirane stanice (ST+), talog stanica (P), supernatant (SN), nevezana frakcija (FT), frakcija nakon ispiranja s puferom D-b (W), frakcije nakon ispiranja s puferom D-c (E1 i E2), frakcije nakon gel-filtracije s puferom R-1 (E3 i E4) i marker za proteine (M).

Pročišćavanje proteina bilo je uspješno, a s obzirom da je izolacija provedena u denaturirajućim uvjetima frakcije nisu dobro vidljive kao u prijašnjim primjerima. Nakon što je protein izoliran bilo je potrebno gel-filtracijom preko PD-10 kolone promijeniti denaturirajući pufer s puferom R-1 (sadrži arginin koncentracije 0,5 mol/L, tablica 10) kako bi se proteinu vratila nativna struktura potrebna za kristalizaciju proteina. Potom je volumen

proteina podijeljen u više manjih volumena te je jedan volumen proteina postavljen na prekonocnu dijalizu u puferu koji sadrži manju koncentraciju arginina (koncentracija 50 mmol/L). Dio uzorka proteina koji se nalazio u puferu s koncentracijom arginina 0,5 mol/L je ukoncentriran do određenog volumena i spremljen na -80 °C. Tijekom ukoncentriravanja uzorka nakon dijalize došlo je do značajne precipitacije proteina. Kako bi se navedeno izbjeglo dodani su aditivi kao što su glicerol i otopine raznih koncentracija natrijevog klorida. Uzorak proteina s glicerolom izrazito je teško ukoncentriran, dok su uzorci u koje je dodana otopina s 300 mmol/L i 400 mmol/L natrijevim kloridom ukoncentrirani lakše, ali uz pojavu precipitacije.



Slika 22. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina (His)₆-DrACRC ak 378-484 ($M = 13\,961,74\text{ g mol}^{-1}$) s uzorcima ukoncentriranih proteina: protein s puferom koji sadrži 0,5 mol/L arginin (1 i 2), protein s 300 mmol/L natrijeva klorida (3) i 400 mmol/L natrijeva klorida (4), protein s glicerolom (5/6) i marker za proteine (M).

Uzevši sve provedeno u obzir, otopina proteina u puferu s 0,5 mol/L argininom ukoncentrirana je vrlo brzo i uspješno bez pojave precipitacije, dok su otopine proteina nakon dijalize s puferom koji sadrži 50 mmol/L arginina većinski precipitirale i rezultirale manjim ukupnim prinosom proteina. Time se može zaključiti da je koncentracija arginina vrlo važna za stabilnost proteina u otopini te da se njegovim ukoncentriravanjem dobiva veća količina

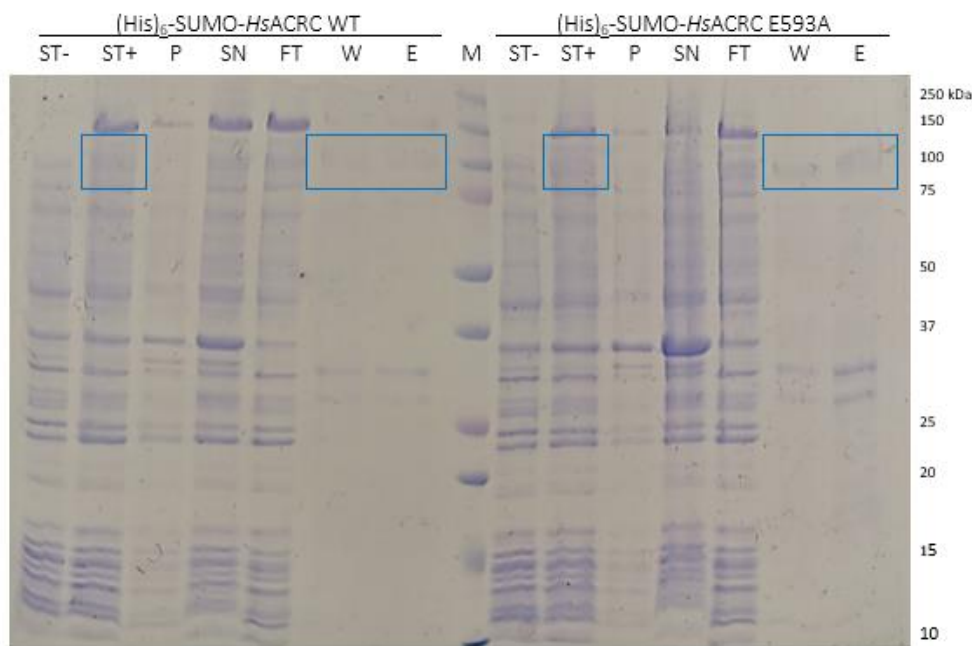
proteina nego u slučaju uzoraka s dijalize (slika 22), čije su konačne koncentracije otopina proteina navedene u tablici 24.

Tablica 24. Izmjerene masene koncentracije proteina (His)₆-DrACRC ak 378-484 ($M = 13\,691,74 \text{ g mol}^{-1}$, $\varepsilon = 24\,075 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

| Naziv uzorka proteina | $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | $V / \mu\text{L}$ |
|-----------------------|------------------------------|-------------------|
| 1 | 1,10 | 500 |
| 2 | 1,84 | 500 |
| 3 | 1,25 | 500 |
| 4 | 0,81 | 500 |
| 5/6 | 1,5 | 600 |

4.4.3. Proteini *H. sapiens* ACRC WT i ACRC E593A

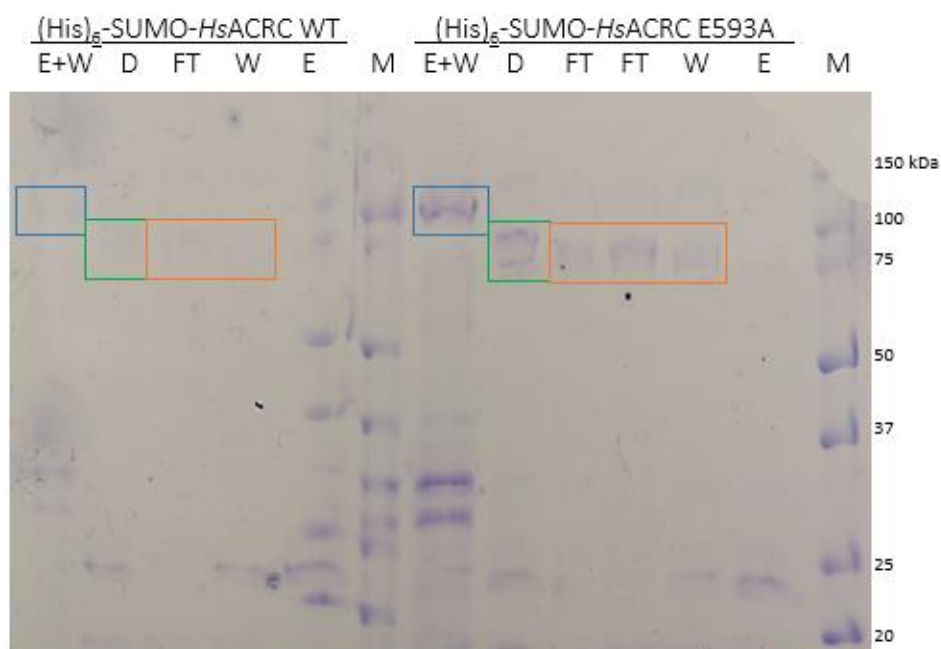
Pročišćavanje proteina *H. sapiens* ACRC WT i ACRC E593A u soju *Rosetta 2 (DE3)* provodilo se koristeći postupke izolacije proteina opisane u odjeljku 3.5. S obzirom na niske vrijednosti izoelektričnih točaka ($pI = 4,37$) obaju proteina, bojanje gelova nakon provedene metode SDS-PAGE moralo se provoditi u dužem vremenskom periodu iz razloga što se Coomassie bojom slabo oboje kiseli proteini. Pročišćavanje proteina (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC WT i proteina (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC E593A prikazano je na slici 23. Iako je na prikazanoj slici 12 % poliakrilamidnog gela teško vidjeti da se u sakupljenim uzorcima izolacije nalaze željeni proteini, neposredno nakon bojanja to je bilo vidljivo (označeno plavo na slici). Frakcije elucije su postavljene na prekonoćnu dijalizu s puferom navedenim u tablici 6 (pufer za dijalizu 2) te im je dodana HRV 3C proteaza kako bi pocijepala (His)₆-SUMO privjesak.



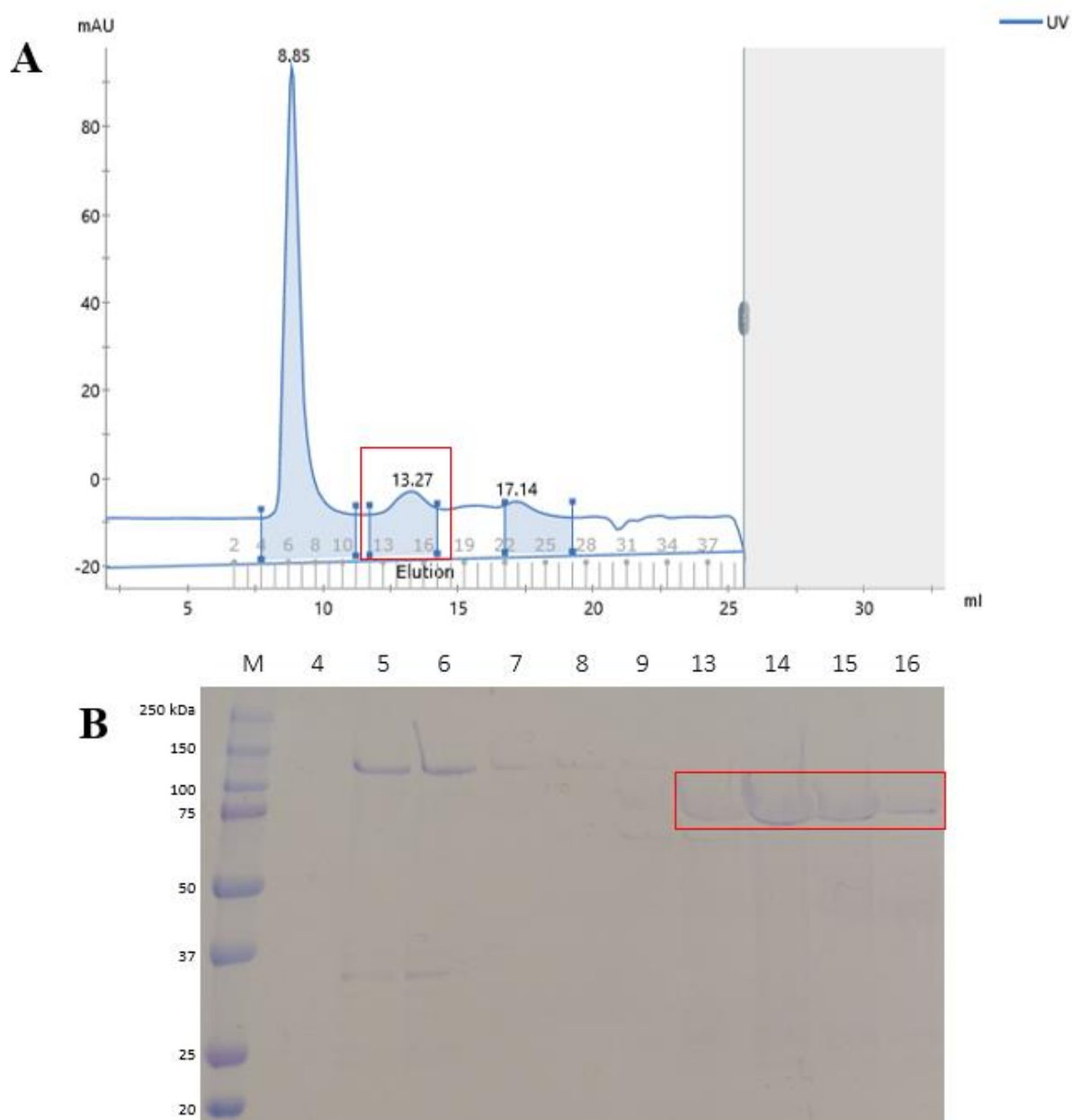
Slika 23. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog metodom SDS-PAGE proteina $(\text{His})_6$ -SUMO-*HsACRC* WT (lijevo) i $(\text{His})_6$ -SUMO-*HsACRC* E593A (desno od markera) s uzorcima: neinduciranih stanica (ST-), induciranih stanica (ST+), taloga stanica (P), supernatanta (SN), nevezane frakcije (FT), frakcije nakon ispiranja s puferom B (W), frakcije nakon ispiranja s puferom C (E) i markera za proteine (M).

Nakon prekonoćne dijalize i rezanja privjeska pomoću proteaze HRV 3C, proveden je još jedan korak pročišćavanja proteina preko Ni-NTA smole (detaljnije u odjeljku 3.5.1) kako bi se odvojili proteini kojima je pocijepan heksahistidinski privjesak. $(\text{His})_6$ -SUMO privjesak i nepocijepani proteini ostali su vezani na smolu, dok je skupljena nevezana frakcija (označeno narančasto na slici) sadržavala protein ACRC. Frakcije opisanog pročišćavanja analizirane SDS-PAGE prikazane su na slici 24, te su također teško vidljive iz razloga što se pročišćeni kiseli proteini slabo boje Coomassie bojom. Potom je protein ukoncentriran do volumena od 500 μL , te je uslijedilo pročišćavanje gel-filtracijom preko kolone *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (Cytiva) spojene na uređaj *ÄKTA pure* (Cytiva) koja je prethodno ekvilibrirana u puferu za gel-filtraciju navedenom u tablici 8. Pročišćavanje se pratilo u programu Unicorn mjerenjem UV zračenja pri valnoj duljini od 280 nm, a rezultati su prikazani na slikama 25 i 26. Na kromatogramima se mogu vidjeti jasno odvojene frakcije (označeno crveno na slici), koje su zatim analizirane pomoću SDS-PAGE. Frakcije koje su sadržavale čiste proteine ACRC su skupljene i ukoncentrirane do željenog volumena. Postupak ukoncentriravanja

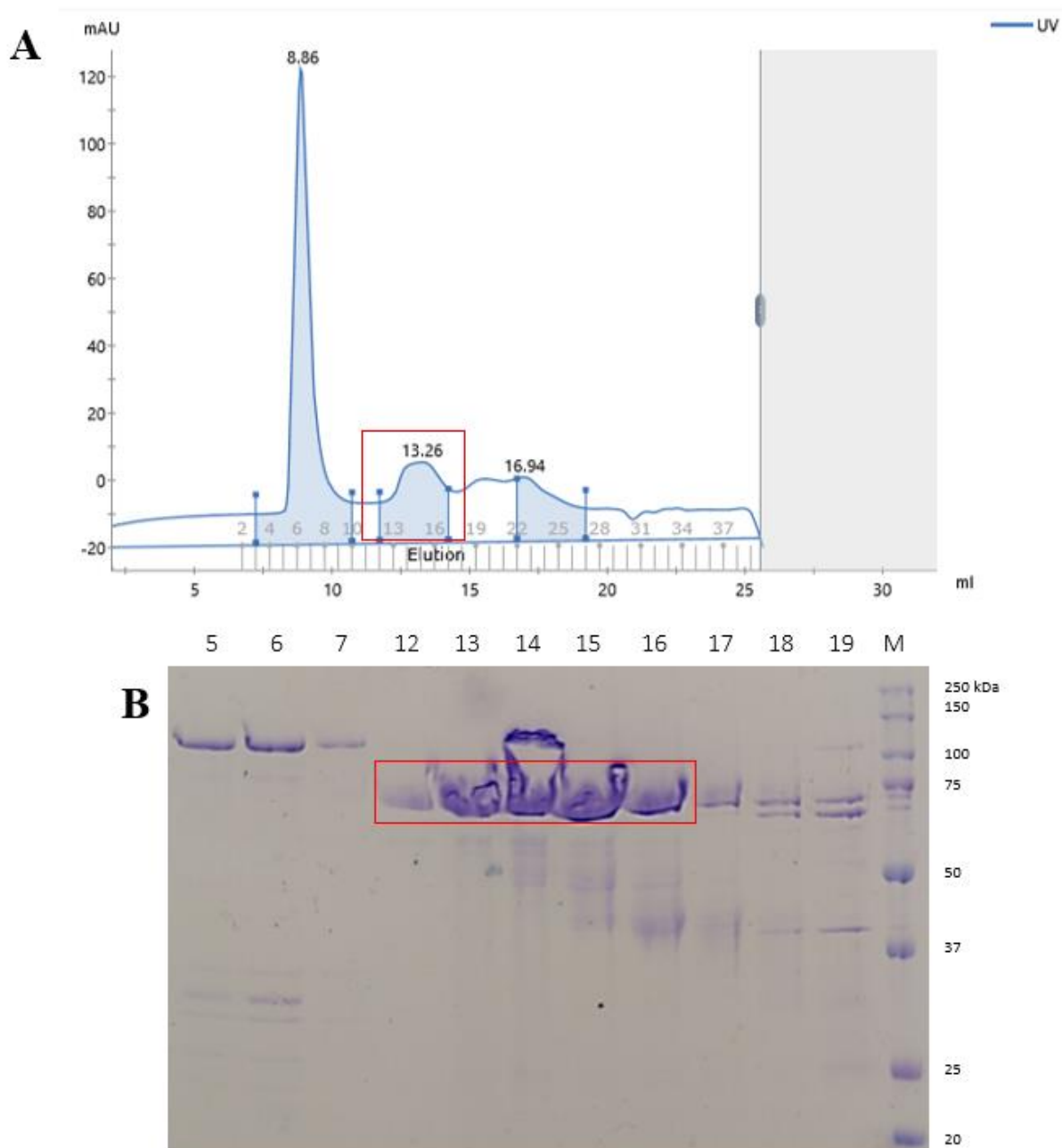
obaju proteina provodio se bez većih problema s precipitacijom, te iako su pročišćavanjem dobiveni željeni proteini, konačna koncentracija proteina bila je niža od očekivane, no ipak dovoljna za daljnje biokemijske pokuse.



Slika 24. Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE proteina *Hs ACRC* WT (lijevo) i *Hs ACRC* E593A (desno od markera) s uzorcima prije i poslije prekončne dijalize s HRV 3C proteazom: protein prije dijalize (E+W), dijaliza (D), nevezana frakcija nakon dijalize (FT), frakcija ispiranja s puferom B (W), frakcija ispiranja s puferom C (E) i marker za proteine (M).



Slika 25. **A** Prikaz kromatograma gel-filtracije preko kolone *Superdex 200 Increase 10/300 GL* na *ÄKTA pure* s označenih dijelom krivulje koja predstavlja protein *Hs ACRC WT*, **B** Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE s uzorcima frakcija nakon gel-filtracije pri čemu su označene frakcije u kojima se nalazi protein *Hs ACRC WT* ($M = 76\,112,34 \text{ g mol}^{-1}$).



Slika 26. **A** Prikaz kromatograma gel-filtracije preko kolone *Superdex 200 Increase 10/300 GL* na *ÄKTA pure* s označenih dijelom krivulje koja predstavlja protein *Hs ACRC E593A*, **B** Prikaz poliakrilamidnog gela analiziranog SDS-PAGE s uzorcima frakcija nakon gel-filtracije pri čemu su označene frakcije u kojima se nalazi protein *Hs ACRC E593A* ($M = 76\,054,30\text{ g mol}^{-1}$).

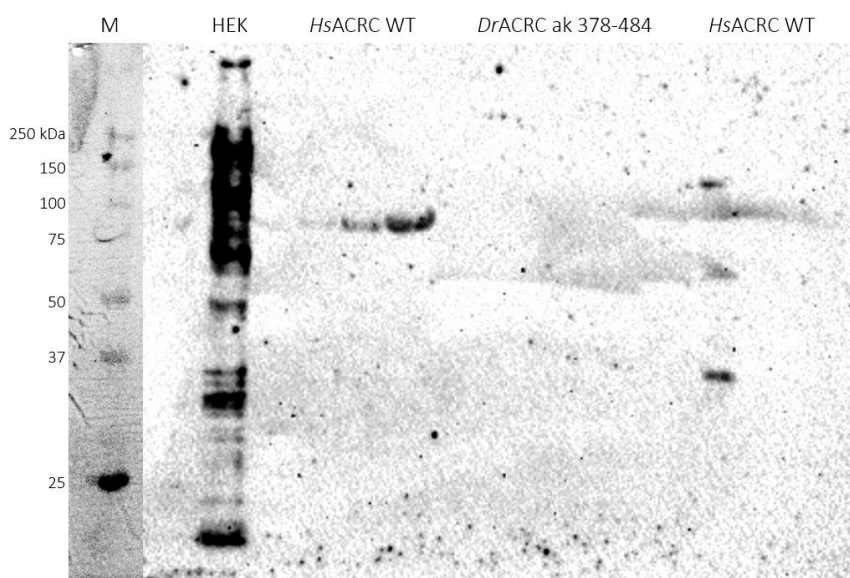
Tablica 25. Prikaz informacija o proteinima i izmjerenim masenim koncentracijama.

| Protein | $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | $M / \text{g mol}^{-1}$ | pI | $\varepsilon / \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
|----------------------|------------------------------|-------------------------|------|--|
| <i>Hs</i> ACRC WT | 0,90 i 0,31 | 76 112,34 | 4,37 | 43 525 |
| <i>Hs</i> ACRC E593A | 0,98 | 76 054,30 | 4,38 | 43 525 |

Uzevši u obzir da su nizom koraka pročišćavanja dobiveni proteini *Hs* ACRC WT i *Hs* ACRC E593A može se zaključiti da je postupak provedbe dobro optimiziran te da su koncentracije proteina dovoljne za sljedeće reakcije vezanja s DNA.

4.5. Western-hibridizacija

Metoda *western*-hibridizacije provodila se u cilju ispitivanja da li su pročišćeni proteini *H. sapiens* ACRC WT i *D. rerio* ACRC ak 378-484 zaista ti proteini. Metoda se provodila prema koracima opisanima u odjeljku 3.5.7. Rezultat provedene metode prikazan je na slici 27 gdje se nalazi i marker za određivanje veličine dobivenog kompleksa protein-antitijelo na mjestu u gelu koji odgovara očekivanoj masi proteina.



Slika 27. Prikaz PVDF membrane snimljene s visoko senzitivnim načinom kemiluminiscencije nakon 1200 sekundi s markerom za mogućnost određivanja veličine kompleksa protein-antitijelo.

Dobivene slike PVDF membrane snimljene su visoko senzitivnim načinom kemiluminiscencije u različitim vremenskim periodima. Na slici 27 može se vidjeti da su redom nanijeti uzorci proteina *H. sapiens* ACRC WT, *D. rerio* ACRC ak 378-484 kao i proteina za koji se pretpostavljalo da je *H. sapiens* ACRC WT. Međutim, ovom metodom se utvrdilo kako zadnji uzorak nije očekivani protein jer nije došlo do specifičnog vezanja antitijela na protein. S obzirom da je detektiran jedan kompleks protein-antitijelo u položaju PVDF membrane gdje se naneo prvi uzorak proteina *H. sapiens* ACRC WT može se zaključiti kako je izolacijom proteina zaista izoliran protein *H. sapiens* ACRC WT.

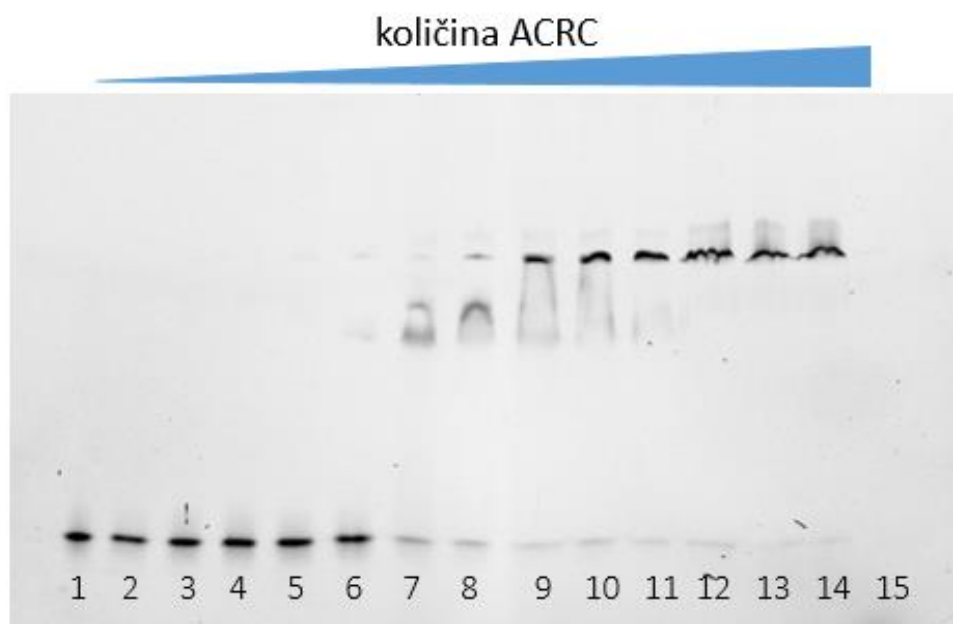
4.6. Vezanje proteina ACRC i molekula DNA

Poznato je da protein ACRC sudjeluje u popravku DPC-a, no detaljni mehanizam i uloga proteina u popravku nije u potpunosti otkrivena. U želji za razjašnjenjem uloge proteina ACRC provelo se testno vezanje proteina divljeg tipa *Hs* ACRC WT i njegovog katalitičkog mutanta proteina *Hs* ACRC E593A na prethodno pripremljene probe molekula DNA koje su različitih struktura i nasumičnih slijedova baza. Analiza nastajanja kompleksa provodila se metodom zaostajanja u gelu (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA), a detektirani kompleksi DNA-protein su potom analizirani.

4.6.1. Vezanje proteina *H. sapiens* ACRC WT

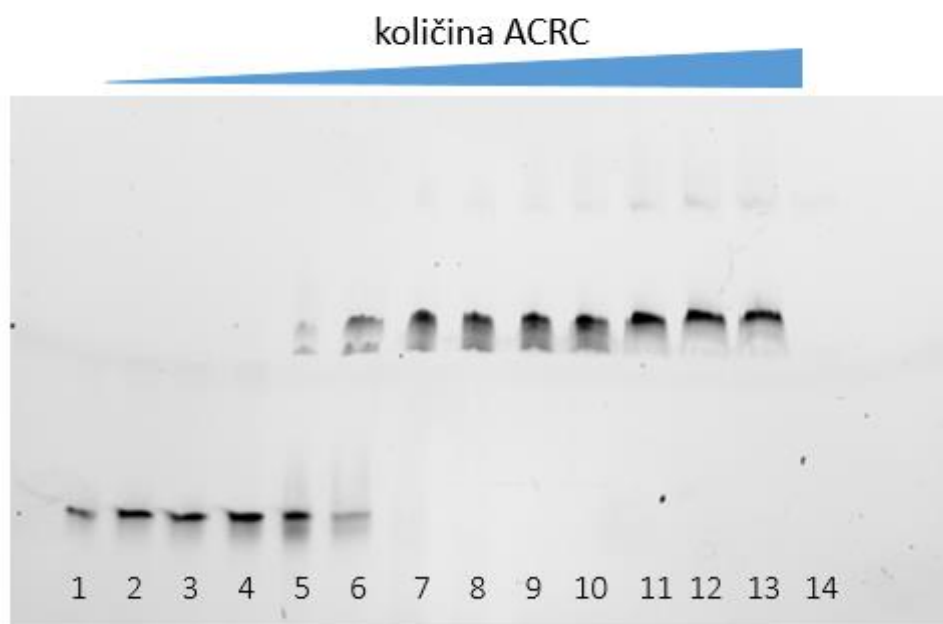
Eksperimenti vezanja provodili su se u raznim omjerima DNA i ACRC pri čemu je količina DNA bila konstantna (20 ng), a korištene molekule DNA bile su fluorescentno obilježene s bojom Alexa 488 na 5'-kraju. Sadržaj fluorescentne boje važan je iz razloga jednostavnije vizualizacije rezultata nastalih kompleksa. Eksperiment se provodio na način da su molekule DNA titrirane s proteinom ACRC čija se količina kroz reakcije povećavala proporcionalno povećanju omjera DNA:ACRC pri konstantnoj količini DNA (detaljnije u odjeljku 3.6.2).

Analiza vezanja proteina *H. sapiens* ACRC WT provodila se vezanjem s dvolančanom strukturom (5'-Alexa OD1 + OD2) i rašljastom strukturom molekule DNA (5'-Alexa OD1 + OD3). Nativni poliakrilamidni gel analiziran metodom EMSA prilikom vezanja proteina na dvolančanu strukturu DNA prikazan je na slici 28 pri čemu je eksperiment ponovljen tri puta. Analizom dobivenih EMSA gelova utvrđeno je da do potpunog vezanja proteina divljeg tipa na dvolančanu molekulu DNA dolazi pri omjeru DNA:ACRC 1:4–1:6.



Slika 28. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela analiziranog metodom EMSA s uzorcima vezanja proteina *Hs* ACRC WT i dvolančane molekule DNA u omjerima: 1:0 (1), 1:0.25 (2), 1:0.5 (3), 1:1 (4), 1:2 (5), 1:3 (6), 1:4 (7), 1:6 (8), 1:8 (9), 1:10 (10), 1:15 (11), 1:25 (12), 1:32 (13), 1:40 (14) i sam protein (15).

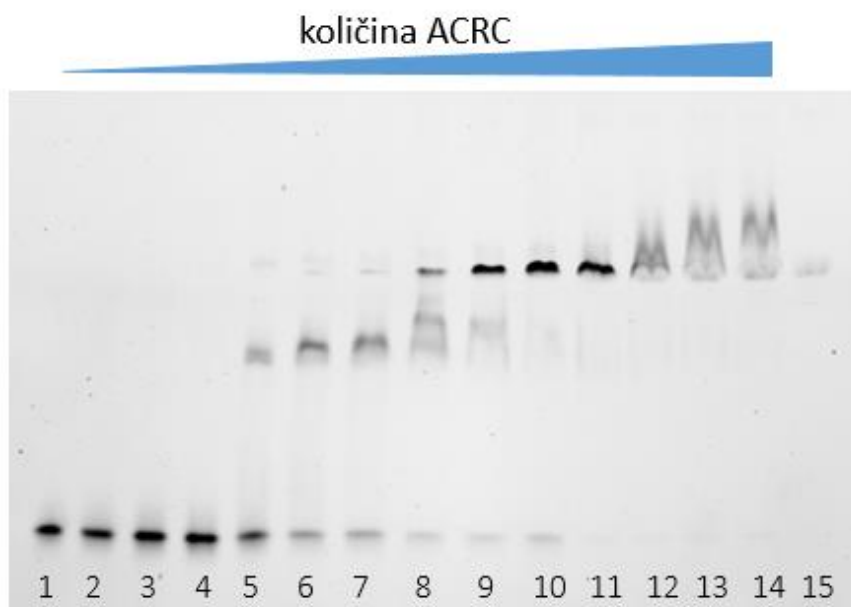
Vežanje proteina na strukturu DNA u obliku rašlji provedeno je samo u jednom eksperimentu prikazanom na slici 29. Zabilježeni omjer vezanja DNA:ACRC je 1:3, čime se zaključuje da *Hs* ACRC WT jače veže strukturu rašljaste DNA nego klasičnu dvolančanu strukturu DNA.



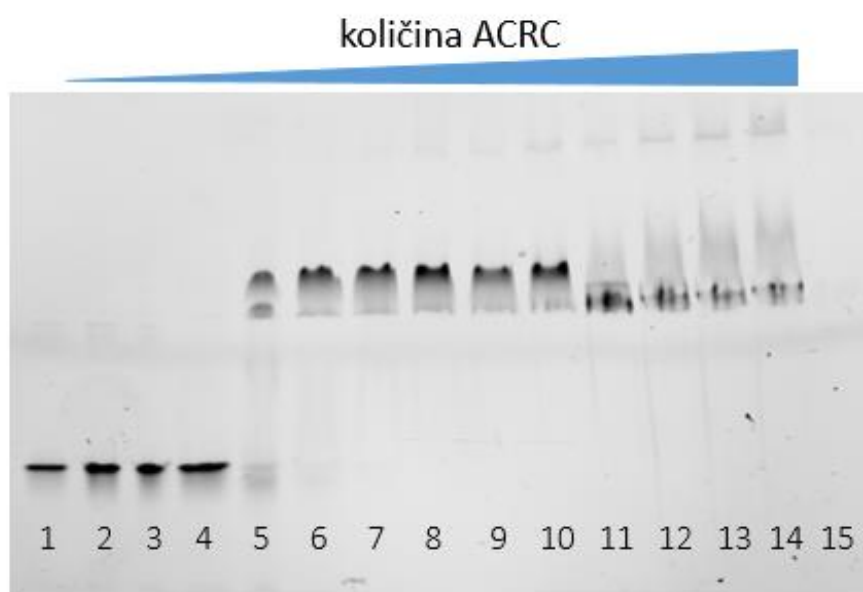
Slika 29. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela analiziranog metodom EMSA s uzorcima vezanja proteina *Hs* ACRC WT i rašljaste DNA u omjerima: 1:0 (1), 1:0.25 (2), 1:0.5 (3), 1:1 (4), 1:2 (5), 1:3 (6), 1:4 (7), 1:6 (8), 1:8 (9), 1:10 (10), 1:15 (11), 1:25 (12), 1:40 (13) i sam protein (14).

4.6.2. Vezanje proteina *H. sapiens* ACRC E593A

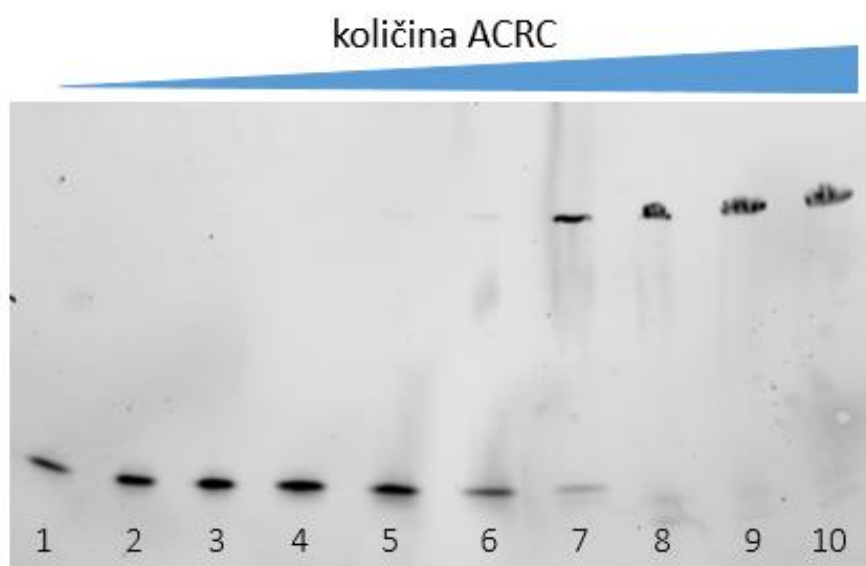
Analiza vezanja proteina mutanta divljeg tipa, *H. sapiens* ACRC E593A, provelo se postupkom opisanom u odjeljku 3.6.2 vezanjem na dvolančanu (5'-Alexa OD1 + OD2), jednolančanu (5'-Alexa OD1) i strukturu rašljaste DNA (5'-Alexa OD1 + OD3). Vezanje na dvolančanu strukturu molekule DNA provelo se u tri eksperimenta pri čemu je na slici 30 prikazan nativni poliakrilamidni gel nakon provedene metode EMSA jednog od eksperimenta. Analizom vezanja utvrđeno je kako protein veže dvolančanu molekulu DNA u omjeru DNA:ACRC 1:2. Iduća analiza bilo je vezanje katalitičkog mutanta na rašljastu DNA pri čemu su provedena dva eksperimenta, jedan od eksperimenta prikazan na slici 31. Do potpunog vezanja na strukturu rašljaste DNA dolazi u omjeru DNA:ACRC 1:1–1:2 što je najjače vezanje od svih dosadašnjih eksperimenata. Nadalje, vezanje proteina ispitano je i s jednolančanom molekulom DNA u jednom eksperimentu prikazanom na slici 32 pri čemu je omjer vezanja DNA:ACRC 1:8.



Slika 30. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela analiziranog metodom EMSA s uzorcima vezanja proteina *Hs* ACRC E593A i dvolančane molekule DNA u omjerima: 1:0 (1), 1:0.25 (2), 1:0.5 (3), 1:1 (4), 1:2 (5), 1:3 (6), 1:4 (7), 1:6 (8), 1:8 (9), 1:10 (10), 1:15 (11), 1:25 (12), 1:32 (13), 1:40 (14) i sam protein (15).



Slika 31. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela analiziranog metodom EMSA s uzorcima vezanja proteina *Hs* ACRC E593A i molekule rašljaste DNA u omjerima: 1:0 (1), 1:0.25 (2), 1:0.5 (3), 1:1 (4), 1:2 (5), 1:3 (6), 1:4 (7), 1:6 (8), 1:8 (9), 1:10 (10), 1:15 (11), 1:25 (12), 1:32 (13), 1:40 (14) i sam protein (15).



Slika 32. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela analiziranog metodom EMSA s uzorcima vezanja proteina *Hs* ACRC E593A i jednolančane molekule DNA u omjerima: 1:0 (1), 1:0.25 (2), 1:0.5 (3), 1:1 (4), 1:2 (5), 1:4 (6), 1:8 (7), 1:15 (8), 1:32 (9), 1:40 (10).

S obzirom da je vezanje proteina *Hs* ACRC WT i *Hs* ACRC E593A provedeno tek testnim analizama, u eksperimentu postoji mnogo mogućnosti za optimizaciju kao što su: omjeri proteina i DNA, detaljnija analiza i mogućnost kvantifikacije zabilježenih vezanja. Detektirani kompleksi vezanja proteina ACRC i DNA biti će detaljnije analizirani i kvantificirani u idućim radovima. Međutim, proučavajući EMSA gelove bilo je moguće zaključiti u kojim omjerima počinje vezanje ACRC na pojedine strukture DNA. Tako je zabilježeno kako je od svih vezanja najbolje vezanje katalitičkog mutanta, *Hs* ACRC E593A, na rašljastu strukturu DNA, a vezanje na jednolančanu molekulu DNA je najslabije. Razlog najjačeg vezanja na rašljastu strukturu DNA, kao što i sam naziv govori, može biti sama struktura molekule koja nalikuje na strukturu koja se stvara tijekom replikacije DNA, replikacijske rašlje, koje su pod kontrolom proteaza bitnih za očuvanje normalnih uvijeta tijekom replikacije i sprečavanje nastajanja DPC-ova. Važnost ovih eksperimenata je u tome što time utvrdilo kako divlji tip i mutant ACRC vežu molekulu DNA, u našem slučaju su to molekule DNA s nasumičnim slijedovima baza i raznih struktura.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno su klonirani konstrukti proteina *H. sapiens* ACRC s različitim duljinama domene SprT: ak 519-691, ak 497-691, ak 519-683, ak 519-624, ak 497-681, ak 497-624, ak 522-691 i ak 522-677.
- Kod proteinskih konstrukata (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-624 i ak 497-624 prekomjerna ekspresija nije zabilježena niti u jednom soju bakterije *E. coli* što je posljedica nestabilnih ekspresija, dok je kod (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-691, ak 497-691, ak 519-683, ak 497-681, ak 522-691 i ak 522-677 prekomjerna ekspresija proteina prisutna.
- Testirana je topljivost nadeksprimiranih proteina prilikom pročišćavanja, pri čemu su proteinski konstrukti (His)₆-SUMO-*Hs*ACRC ak 519-691 i ak 519-683 netopljivi, dok su ak 497-691, ak 497-681, ak 522-691 i ak 522-677 topljivi.
- Kod topljivih konstrukata potvrđeno je zadržavanje na Ni-NTA smoli što ukazuje na njihovo nepravilno smatanje unatoč topljivosti, te je također primijećena i degradacija, tj. razgradnja proteina tijekom pročišćavanja.
- Provedeni su razni postupci kojima se željelo eluirati proteine sa Ni-NTA smole (razne koncentracije imidazola pH 8,0, otopine EDTA i gvanidinijevog hidroklorida, kromatografija ionske izmjene, dodatak HRV 3C proteaze na smolu) međutim, svim postupcima nije se dobio protein u eluatu.
- Prekomjerna ekspresija proteinskih konstrukata (His)₆-*Dr*ACRC ak 378-537 i ak 378-484 potvrđena je u soju *RIL (DE3)* bakterije *E. coli*, te je protein (His)₆-*Dr*ACRC ak 378-484 uspješno pročišćen u denaturirajućim uvjetima, pri čemu su najoptimalniji uvjeti ukoncentriravanja proteina u puferu s 0,5 mol/L argininom.
- Pročišćeni su proteini *H. sapiens* ACRC WT i ACRC E593A.
- Metodom *western*-hibridizacije korištenjem primarnih antitijela na protein *Hs* ACRC potvrđeno je da je pročišćen protein *Hs* ACRC WT.
- Testnim vezanjima proteina ACRC potvrđeno je da proteini vežu sve ispitane molekule DNA, pri čemu *Hs* ACRC WT najbolje veže DNA u obliku rašlji u omjeru DNA:ACRC 1:3, a isti slučaj je i kod *Hs* ACRC E593A koji je veže u omjeru DNA:ACRC 1:1–1:2.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. B. Vaz, M. Popović, K. Ramadan, *Trends Biochem. Sci.* **42** (2017) 483–495.
2. F. Li, J. E. Raczynska, Z. Chen, H. Yu, *Cell Report* **26** (2019) 3336–3346.
3. J. Stingele, M. S. Schwarz, N. Bloemeke, P. G. Wolf, S. Jentsch, *Cell* **158** (2014) 327–338.
4. J. Lopez-Mosqueda, K. Maddi, S. Prgomet, S. Kalayil, I. Marinovic-Terzic, J. Terzic, I. Dikic, *Elife* **5** (2016) e21491.
5. B. Vaz, M. Popović, J. A. Newman, J. Fielden, H. Aitkenhead, S. Halder, A. N. Singh, I. Vendrell, R. Fischer, I. Torrecilla, N. Drobnitzky, R. Freire, D. J. Amor, P. J. Lockhart, B. M. Kessler, G. W. McKenna, O. Gileadi, K. Ramadan, *Molecular Cell* **64** (2016) 704–719.
6. J. Stingele, R. Bellelli, F. Alte, G. Hewitt, G. Sarek, S. L. Maslen, S. E. Tsutakawa, A. Borg, S. Kjaer, J. A. Tainer, J. M. Skehel, M. Groll, S. J. Boulton, *Molecular Cell* **64** (2016) 688–703.
7. M. Mórocz, E. Zsigmond, R. Tóth, M. Zs Enyedi, L. Pintér, L. Haracska, *Nucleic Acids Research* **45** (2017) 3172–3188.
8. M. A. Carmell, G. A. Dokshin, H. Skaletsky, Y. C. Hu, J. C van Wolfswinkel, K. J. Igarashi, D. W. Bellott, M. Nefedov, P. W. Reddien, G. C. Enders, V. N. Uversky, C. C. Mello, D. C. Page, *eLife* **5** (2016) e19993.
9. A. Ruggiano, K. Ramadan, *Commun. Biol.* **11** (2021).
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 140–142, 518, 790–791, 804–816.
11. S. E. Freeman, H. Hacham, R. W. Gange, D. J. Maytum, J. C. Sutherland, B. M. Sutheland, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** (1989) 5605–5609.
12. S. E. Whitmore, C. S. Pottern, C. A. Chadwick, P. T. Strickland, W. L. Morison, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **17** (2001) 213–217.
13. J. Fielden, A. Ruggiano, M. Popović, K. Ramadan, *DNA Repair (Amst)* **71** (2018) 198–204.
14. L. S. Walters, B. K. Minesinger, M. E. Wiltrout, S. D'Souza, R. V. Woodruff, G. C. Walker, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73** (2009) 134–135.

15. D. Grbavac, *Translezijska sinteza DNA polimerazom IV i uloga u replikaciji bakterije Escherichia Coli*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 1, 4.
16. K. Tano, S. Shiota, J. Collier, R. S. Foote, S. Mitra, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** (1990) 686–690.
17. A. Shiraishi, K. Sakumi, M. Sekiguchi, *Carcinogenesis* **21** (2000) 1879–1883.
18. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Vol. 7, Macmillan Higher Education, England, 2017, str. 1006–1030.
19. J. T. Reardon, A. Sancar, *Methods in Enzymology* **408** (2006) 189–213.
20. L. Liang, L. Deng, Y. Chen, G. C. Li, C. Shao, J. A. Tischfield, *The Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 31442–31449.
21. N. Y. Tretyakova, A. Groehler, S. Ji, *Acc. Chem. Res.* **48** (2016) 1631–1644.
22. G. A. Dokshin, G. M. Davis, A. D. Sawle, M. D. Eldridge, P. K. Nicholls, T. E. Gourley, K. A. Romer, L. W. Molesworth, H. R. Tatnell, A. R. Ozturk, D. G. de Rooij, G. J. Hannon, D. C. Page, C. C. Mello, M. A. Carmell, *Dev. Cell* **52** (2020) 53–68.
23. H. Ide, M. I. Shoulkamy, T. Nakano, M. Miyamoto-Matsubara, A. M. H. Salem, *Mutat. Res.* **711** (2011) 113–122.
24. H. Zhang, Y. Xiong, J. Chen, *Cell Biosci* **3** (2020) 1–10.
25. J. T. Reardon, Y. Cheng, A. Sancar, *Cell Cycle* **5** (2006) 1366–1370.
26. N. M. Hooper, *FEBS Lett.* **354** (1994) 1–6.
27. S. Zhao, A. Kieser, H. Li, H. K. Reinking, P. Weickert, S. Euteneuer, D. Yaneva, A. C. Acampora, M. J. Götz, R. Feederle, J. Stingele, *Nucleic Acids Research* **49** (2021) 902–915.
28. A. Mosbech, I. Gibbs-Seymour, K. Kagias, T. Thorslund, P. Beli, L. Povlsen, S. V. Nielsen, S. Smedegaard, G. Sedgwick, C. Lukas, R. Hartmann-Petersen, J. Lukas, C. Choudhary, R. Pocock, S. Bekker-Jensen, N. Mailand, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19** (2012) 1084–1092.
29. V. Bhargava, C. D. Goldstein, L. Russell, L. Xu, M. Ahmed, W. Li, A. Casey, K. Servage, R. Kollipara, Z. Picciarelli, R. Kittler, A. Yatsenko, M. Carmell, K. Orth, J. F. Amatruda, J. L. Yanowitz, M. Buszczak, *Dev. Cell.* **52** (2020) 38–52.
30. N. Borgermann, L. Ackermann, P. Schwertman, I. A. Hendriks, K. Thijssen, J. CY Liu, H. Lans, M. L. Nielsen, N. Mailand, *The EMBO Journal* **38** (2019) 1–17.

31. pETDuet-1, Addgene,
<https://www.addgene.org/vector-database/2659/> (datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
32. T. Kleber-Janke, W. M. Becker, *Protein Expr. Purif.* **19** (2000) 419–424.
33. Rosetta (DE3), Novagen,
https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/RosettaDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70954?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1
(datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
34. Rosetta 2 (DE3), Novagen,
https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Rosetta-2DE3-Singles-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-71400?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
(datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
35. XL10-Gold, Agilent Technologies,
<https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5989-8281ENUS.pdf>
(datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
36. Modeller, <https://salilab.org/modeller/> (datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
37. Phyre2, Protein homology/analogy recognition engine,
<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
(datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
38. NEB Tm calculator,
<https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (datum pristupa 30. listopada 2020.)
39. A. Ulrich, K. R. Andersen, T. U. Schwartz, *Journal Pone* **7** (2012) 1–9.
40. AlphaFold,
<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q96QF7> (datum pristupa 18. kolovoza 2021.)
41. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstern, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohl, D. Hassabis, *Nature* **596** (2021) 583–589.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Josipa Valičević

Datum rođenja: 11. ožuljka 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2000.–2008. Osnovna škola Mihaela Šiloboda, Sveti Martin pod Okićem

2008.–2012. Srednja škola Zdravstveno učilište, Zagreb

2013.–2018. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2018.–2021. Diplomski sveučilišni studij kemije, istraživački smjer, grane: anorganska i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014.–2019. *Otvoreni dani kemije*, Prirodoslovno-matematički fakultet

2014. *Primatijada*, u sklopu znanstvenih radionica

Ostalo

2018. *STEM games*, natjecanje u znanstvenim disciplinama